

**Anwendung von *Staphylococcus aureus*  
Protein A in Kombination mit rekombinanten  
Antikörperfragmenten zur zielgerichteten *Listeria  
monocytogenes* Infektion in malignen Zellen und  
deren spezifische Schädigung durch  
*Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Macke, Hendrik Lorenz  
aus Braunschweig

Gießen (2022)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Medizinische Mikrobiologie

Gutachter:

Prof. Dr. Trinad Chakraborty

Gutachter:

Prof. Dr. Ulrich Sachs

Tag der Disputation:

10.11.2022

*Für meine Eltern*

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Bakterien in der Therapie maligner Erkrankungen.....	1
1.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	1
1.3 Immunantwort gegen <i>L. monocytogenes</i> .....	5
1.4 <i>L. monocytogenes</i> in der Therapie maligner Erkrankungen.....	7
1.4.1 Immunotherapie maligner Erkrankungen mit <i>L. monocytogenes</i> .....	7
1.4.2 Therapie maligner Erkrankungen mit durch <i>L. monocytogenes</i> vermittelter Bactofektion .....	8
1.4.3 Direkte Infektion von malignen Zellen mit <i>L. monocytogenes</i> .....	8
1.5 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	10
1.5.1 <i>S. aureus</i> Protein A (SPA).....	10
1.6 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
1.6.1 <i>P. aeruginosa</i> Exotoxin A .....	16
1.7 Monoklonale Antikörper und Antikörperfragmente.....	20
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit.....	22
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1 Material .....	24
2.1.1 Verwendete Bakterienstämme.....	24
2.1.2 Verwende Zelllinien .....	24
2.1.3 Verwendete Plasmide .....	24
2.1.4 Oligonukleotide (Primer).....	26
2.1.5 Verwendete Antikörper .....	27
2.1.6 DNA- und Proteingrößenstandards .....	27
2.1.7 Verwendete Chemikalien.....	28
2.1.8 Verwendete gebrauchsfertige Chemikalien .....	29
2.1.9 Verwendete Kits .....	29

## Inhaltsverzeichnis

2.1.10 Chemikalien zur Herstellung von Medien zur Bakterienkultivierung.....	30
2.1.11 Medien und Puffer zur Kultivierung eukaryontischer Zellen .....	30
2.1.12 Herstellung von Medien und Puffern zur Kultivierung von Bakterien.....	30
2.1.13 Antibiotikastammlösungen.....	32
2.1.14 Herstellung von Puffern und Lösungen.....	32
2.1.15 Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	37
2.1.16 Verwendete Geräte .....	38
2.1.17 Verwendete Software .....	40
2.2 Methoden.....	41
2.2.1 Arbeiten mit DNA.....	41
2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	41
2.2.1.2 Klonierung mittels PCR.....	42
2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese.....	43
2.2.1.4 Aufreinigung von DNA .....	43
2.2.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegel .....	44
2.2.1.6 Verdau mit Restriktionsenzymen .....	44
2.2.1.7 Ligation.....	45
2.2.1.8 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> DH10 $\beta$ .....	46
2.2.1.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	47
2.2.1.10 Sequenzierung .....	47
2.2.2 Arbeiten mit Bakterien .....	47
2.2.2.1 <i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e (1/2a).....	47
2.2.2.2 <i>Escherichia coli</i> DH10 $\beta$ .....	48
2.2.2.3 Messungen der optischen Dichte von Bakterienkulturen.....	48
2.2.2.4 Selektive Nährmedien.....	48
2.2.2.5 Herstellung kompetenter Bakterien.....	48
2.2.2.6 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	48

## Inhaltsverzeichnis

2.2.2.7 Herstellung elektrokompetenter <i>L. monocytogenes</i> .....	49
2.2.2.8 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente <i>E. coli</i> .....	49
2.2.2.9 Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente <i>L. monocytogenes</i> .....	50
2.2.2.10 Erstellen von Wachstumskurven .....	50
2.2.2.11 Herstellung von Glycerinkulturen .....	50
2.2.2.12 Auftauen von Glycerinkulturen .....	51
2.2.3 Arbeiten mit Proteinen .....	51
2.2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Bradfordmethode .....	51
2.2.3.2 Isolierung von Proteinen aus der Zellwand von <i>L. monocytogenes</i> .....	52
2.2.3.3 Isolierung von Proteinen aus dem Überstand von <i>L. monocytogenes</i> .....	52
2.2.3.4 Proteinisolierung aus dem Zytosol von <i>L. monocytogenes</i> .....	52
2.2.3.5 Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	53
2.2.3.6 Coomassie Brilliant Blue Färbung .....	54
2.2.3.7 Western Blot .....	54
2.2.3.8 Chemilumineszenz mit proteinspezifischen Antikörpern .....	54
2.2.4 Kultivierung von eukaryotischen Zellen .....	55
2.2.4.1 Kultivierung von KM-H2 Zellen .....	55
2.2.4.2 Kultivierung von DMS-273 Zellen .....	56
2.2.4.3 Kultivierung von P388D1 Zellen .....	56
2.2.4.4 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen .....	57
2.2.5 Durchführung von Infektionsversuchen .....	58
2.2.5.1 Infektionsassay der Zelllinie KM-H2 mit <i>L. monocytogenes</i> .....	58
2.2.5.2 Infektionsassay der Zelllinie KM-H2 mit <i>L. monocytogenes</i> mit verschiedenen FKS-Konzentrationen .....	59
2.2.5.3 Infektionsassay der Zelllinie DMS-273 mit <i>L. monocytogenes</i> .....	59
2.2.5.4 Infektionsassay der Zelllinie P388D1 mit <i>L. monocytogenes</i> .....	60

## Inhaltsverzeichnis

2.2.5.5 Auswertung des Infektionsversuches in P388D1 Zellen mit Lichtmikroskopie.....	60
2.2.5.6 Infektionsversuch in P388D1 Zellen mit MTT Test.....	60
2.2.6 Durchflusszytometrie.....	61
2.2.6.1 Durchflusszytometrie von KM-H2 Zellen mit Ki-4-scFv-Fc-Fusionsproteinen.....	62
2.2.6.2 Durchflusszytometrie von <i>L. monocytogenes</i> zum Nachweis von <i>S. aureus</i> Protein A (SPA).....	62
2.2.6.3 Durchflusszytometrie von P388D1 Zellen nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> .....	63
2.2.6.4 Durchflusszytometrie von KM-H2 Zellen nach Infektion mit SPA- und ETA- produzierenden <i>L. monocytogenes</i> in Kombination mit Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein.....	63
2.2.7 Statistische Auswertung.....	64
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>65</b>
3.1 Strategie der gezielten Infektion von Krebszellen mit <i>L. monocytogenes</i> .....	65
3.2 Klonierung von <i>Staphylococcus aureus</i> Protein A (SPA) in <i>Listeria monocytogenes</i> .....	67
3.3 Nachweis der erfolgreichen Expression von SPA in <i>L. monocytogenes</i> + <i>spa</i> und <i>L. monocytogenes</i> $\Delta$ <i>inlAB</i> + <i>spa</i> .....	70
3.3.1 Nachweis von SPA in <i>L. monocytogenes</i> + <i>spa</i> und <i>L. monocytogenes</i> $\Delta$ <i>inlAB</i> + <i>spa</i> mittels Western Blot.....	70
3.3.2 Nachweis von SPA auf der Oberfläche von <i>L. monocytogenes</i> + <i>spa</i> und <i>L. monocytogenes</i> $\Delta$ <i>inlAB</i> + <i>spa</i> mittels Durchflusszytometrie.....	71
3.3.3 SPA exprimierende <i>L. monocytogenes</i> wachsen extrazellulär ähnlich wie Wildtyp <i>L. monocytogenes</i> .....	72
3.4 Infektionsversuche mit <i>L. monocytogenes</i> in Krebszelllinien.....	73
3.4.1 Nachweis der Bindung von Ki-4-scFv-Fc an der Zelllinie KM-H2.....	73
3.4.2 Die Internalisierung von <i>L. monocytogenes</i> in KM-H2 und DMS-273 Zellen ist Internalin AB abhängig.....	74

## Inhaltsverzeichnis

3.4.3 Infektionsversuche in KM-H2 Zellen mit <i>L. monocytogenes</i> + <i>spa</i> und <i>L. monocytogenes</i> $\Delta$ <i>inlAB</i> + <i>spa</i> .....	75
3.4.3.1 Nachweis der vermehrten Infektion von <i>L. monocytogenes</i> + <i>spa</i> und <i>L. monocytogenes</i> $\Delta$ <i>inlAB</i> + <i>spa</i> in Kombination mit Ki-4-scFv-Fc in Zellen der Linie KM-H2.....	76
3.4.3.2 Unterschiedlich hohe FKS Konzentrationen im Infektionsversuch zeigen keinen Einfluss auf die Anzahl der intrazellulären <i>L. monocytogenes</i> .....	78
3.4.4 Infektionsversuche mit <i>L. monocytogenes</i> in der Zelllinie DMS-273 .....	79
3.4.4.1 Nachweis der vermehrten Infektion von <i>L. monocytogenes</i> $\Delta$ <i>inlAB</i> + <i>spa</i> mit SCBC-scFv-Fc in Zellen der Linie DMS-273 .....	79
3.4.5 Nachweis der Spezifität und der gezielten Infektion von Krebszellen mit dem jeweils gegen sie gerichteten scFv und SPA auf der Oberfläche von <i>L. monocytogenes</i> .....	81
3.5 Klonierung von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Exotoxin A in <i>L. monocytogenes</i> .....	82
3.6 Nachweis der erfolgreichen Expression von ETA in <i>L. monocytogenes</i> .....	87
3.6.1 Nachweis von ETA mittels Western Blot.....	87
3.6.2 Extrazelluläres Wachstumsverhalten von ETA produzierenden <i>L. monocytogenes</i> .....	88
3.6.3 Wirkung der ETA Produktion von <i>L. monocytogenes</i> in eukaryotischen Zellen .....	89
3.6.3.1 Nachweis der erhöhten Toxizität von ETA produzierenden <i>L. monocytogenes</i> mittels Lichtmikroskopie.....	89
3.6.3.2 Nachweis der verminderten Viabilität von Makrophagen der Zelllinie P388D1 nach Infektion mit ETA produzierenden <i>L. monocytogenes</i> mittels MTT- Test.....	91
3.7.1 Nachweis der vermehrten Apoptose von Makrophagen der Zelllinie P388D1 nach Infektion mit ETA produzierenden <i>L. monocytogenes</i> mittels Durchflusszytometrie.....	92
3.7.2 Nachweis der vermehrten Apoptose von Zellen der Linie KM-H2 nach Infektion mit der Kombination aus SPA- und ETA- produzierenden <i>L. monocytogenes</i> und Ki-4 scFv-Fc-Fusionsproteinen.....	93

## Inhaltsverzeichnis

<b>4 Diskussion .....</b>	<b>96</b>
4.1 Expression von <i>Staphylococcus aureus</i> Protein A in <i>Listeria monocytogenes</i> .....	96
4.2 Die Produktion von SPA auf der Zellwandoberfläche von <i>L. monocytogenes</i> ermöglicht eine gezielte, Internalin-unabhängige Infektion in KM-H2 und DMS-273 Zellen.....	97
4.3 Produktion von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Exotoxin A in <i>L. monocytogenes</i> .....	104
4.4 <i>L. monocytogenes</i> in der Therapie maligner Erkrankungen.....	108
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>112</b>
<b>6 Summary .....</b>	<b>113</b>
<b>7 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>114</b>
<b>8 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>116</b>
<b>9 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>117</b>
<b>10 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>121</b>
<b>11 Anhang .....</b>	<b>137</b>
<b>12 Danksagung .....</b>	<b>138</b>
<b>13 Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>139</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Bakterien in der Therapie maligner Erkrankungen

Die Therapie maligner Erkrankungen ist Gegenstand verschiedenster Forschungsarbeiten mit diversen Therapieansätzen. Ein Forschungsfeld ist die Verwendung von Bakterien zur Therapie maligner Erkrankungen. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde von W. Coley eine erfolgreiche Therapie von Knochen- und Weichteilsarkomen mithilfe von abgetöteten *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* beschrieben (Coley 1893). Im Laufe des letzten Jahrhunderts wurden auch andere Bakteriengattungen hinsichtlich therapeutischer Effekte bei malignen Erkrankungen untersucht. Beispiele hierfür sind *Salmonella*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Caulobacter*, *Proteus*, *Streptococcus* und *Listeria* (Sarrotra und Medhi 2016). *Listeria monocytogenes* besitzt verschiedene Eigenschaften, die für die Verwendung in der Therapie maligner Erkrankungen von Vorteil sind. So sind sie fakultativ anaerob und reichern sich im Tumormilieu an (Kim et al. 2009). Weiterhin sind sie durch ihre Eigenschaft, das Zytosol von epithelialen und nicht epithelialen Zellen zu infizieren in der Lage, in das Zytosol von Tumorzellen einzudringen (Yu et al. 2004). Die Eigenschaft, eine starke Immunantwort auszulösen, ist von Vorteil in der Verwendung von *L. monocytogenes* in der bakterienbasierten Immunotherapie maligner Erkrankungen (Pan et al. 1995a).

### 1.2 *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* sind grampositive, stäbchenförmige Bakterien aus der Familie der *Listeriaceae*. *L. monocytogenes* ist fakultativ anaerob und bildet keine Sporen aus. Die Erstbeschreibung erfolgte 1926 durch Murray et al., die eine Infektion von Hasen mit einem bis dahin unbekanntem, grampositiven Bakterium nachwies, das in den infizierten Hasen eine ausgeprägte Monocytose auslöste. Die neu entdeckte Spezies wurde zunächst als *Bacterium monocytogenes* bezeichnet (Murray et al. 1926). Später wurden Listerien nach dem britischen Chirurgen Joseph Lister (1827-1912) zu dessen Ehren benannt. Somit ergab sich die Speziesbezeichnung *Listeria monocytogenes*.

*L. monocytogenes* ist ein ubiquitär vorkommender Keim und konnte in einer Vielzahl von Boden- und Pflanzenproben sowie in Tierausscheidungen nachgewiesen werden (Weis und Seeliger 1975). Die Bakterien sind in der Lage, auch bei niedrigen Temperaturen bis  $-0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zu wachsen (Walker et al. 1990). Zudem vermehren sie sich auch bei hohen Salzkonzentrationen von bis zu 12 % (Cole et al. 1990). Diese Eigenschaften machen *L. monocytogenes* zu einem in der Lebensmittelindustrie schwierig zu eliminierenden Keim. Es konnte nachgewiesen werden, dass Infektionsgeschehen mit *L. monocytogenes* mit kontaminierten Nahrungsmitteln assoziiert sind (Schlech et al. 1983). Ein Beispiel für die Verbreitung von *L. monocytogenes* über kontaminierte Lebensmittel

ist ein Ausbruch in Deutschland in den Jahren 2018 und 2019, bei dem 112 Fälle von Listeriose auf mit *L. monocytogenes* kontaminierte Lebensmittel aus einer Wurstfabrik zurückgeführt werden konnten (Halbedel et al. 2020).

Die invasive Listeriose ist ein Krankheitsbild, das vor allem immunkompromittierte Personengruppen wie geriatrische Patienten, Patienten mit malignen Grunderkrankungen, Patienten mit immunsupprimierender Medikation und AIDS-Patienten betrifft. Zudem konnten vermehrt Infektionen bei Schwangeren und Neugeborenen nachgewiesen werden (Nieman und Lorber 1980; Gellin et al. 1991). Nach der Aufnahme kontaminierter Nahrung kommt es zu einer intestinalen Infektion. *L. monocytogenes* ist in der Lage, die epitheliale Barriere des Darmes zu durchbrechen und anschließend Leber und Milz zu infizieren (Mackaness 1962). Im weiteren Infektionsverlauf können die Bakterien die Blut-Hirn-Schranke überwinden und Infektionen des zentralen Nervensystems wie Meningitiden und Enzephalitiden verursachen (Biester und Schwarte 1939; Cordy und Osebold 1959). Bei infizierten Schwangeren kann *L. monocytogenes* die Blut-Plazenta-Barriere überwinden und den Fötus infizieren.

Die Mechanismen der Pathogenität von *L. monocytogenes* wurden identifiziert und charakterisiert. Die Bakterien sind in der Lage, phagozytierende und nicht phagozytierende Zellen zu infizieren. Einige Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* sind in vier Pathogenitätsinseln (*Listeria pathogenicity island*, LIPI-1-LIPI-4) organisiert. LIPI-1 beinhaltet die Gene einiger Virulenzfaktoren, die für den Infektionszyklus im infizierten Wirt verantwortlich sind: Den positiven Regulationsfaktor A (PrfA), den Aktinakkumulierenden Faktor A (ActA), das Listeriolysin O (LLO), die Metalloprotease (MPL), die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) und die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC) (Vázquez-Boland et al. 2001). LIPI-2 umfasst die Gene der Sphingomyelinase und einiger Internaline (Domínguez-Bernal et al. 2006). LIPI-3 besteht aus dem Gen des Virulenzfaktors Listeriolysin S (Cotter et al. 2008). LIPI-4 beinhaltet Gene des *cellobiose-family phosphotransferase system* und ist mit hypervirulenten Serotypen assoziiert (Maury et al. 2016). Nicht alle Serotypen von *L. monocytogenes* beinhalten alle LIPI.

*L. monocytogenes* ist in der Lage, nicht phagozytierende Zellen zu infizieren. Es produziert als Oberflächenprotein unter anderem Internalin A, ein 88 kDa großes Protein mit dem es epitheliale Zellen infizieren kann (Gaillard et al. 1991). Das Protein wird mittels eines C-terminalen LPTTG-Signalmotivs (Aminosäuremotiv aus Leucin-Prolin-Threonin-Threonin-Glycin) über das Protein Sortase A kovalent an die Peptidoglykanschicht der Zellwandoberfläche gebunden (Lebrun et al. 1996). Die Carboxylgruppe des Threonins im LPTTG-Motiv wird von Sortase A an die Aminogruppe von

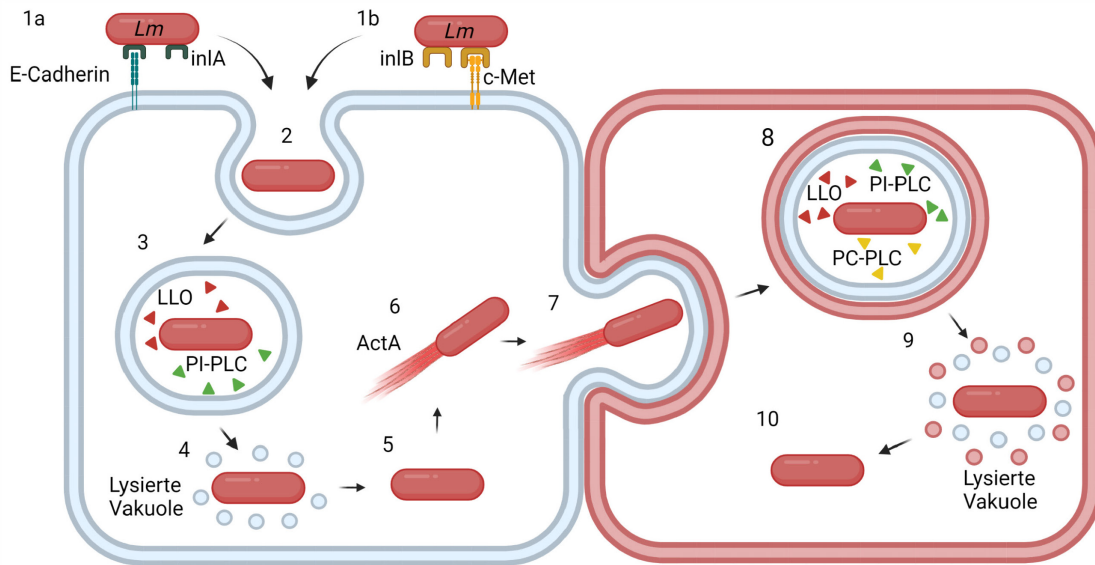
Diaminopimelinsäure in der Zellwand von *L. monocytogenes* gebunden (Dhar et al. 2000). Internalin A bindet an E-Cadherin auf epithelialen Zellen, das für die Verbindung zwischen den Epithelzellen des Dünndarms essenziell ist (Mengaud et al. 1996).

Ein weiteres Oberflächenprotein von *L. monocytogenes* zur Infektion nicht phagozytischer Zellen ist Internalin B. Es ist ein 65 kDa großes Protein, das unabhängig von Internalin A für die Infektion von *L. monocytogenes* in Hepatozyten und einigen epitheloiden Zellen verantwortlich ist (Dramsi et al. 1995; Lingnau et al. 1995; Gaillard et al. 1996). Zudem ist Internalin B entscheidend für die Infektion von Endothelzellen der Nabelschnurvene (Parida et al. 1998). Anders als Internalin A ist es nicht kovalent an die Peptidoglykanschicht der Zellwand gebunden, sondern an Lipoteichonsäure (Jonquières et al. 1999). Internalin B bindet an den *hepatocyte growth factor receptor* (c-Met) (Shen et al. 2000), einer Rezeptortyrosinkinase, die auf der Oberfläche verschiedener Zellen exprimiert wird und normalerweise Ziel des *hepatocyte growth factors* ist. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Internalin A als auch Internalin B ausreichend ist, um eine Internalisierung in entsprechende nicht phagozytierende Zellen zu erzeugen. Dies galt sogar, wenn die Proteine isoliert an Latexkugeln gebunden waren (Lecuit et al. 1997; Braun et al. 1998). Nach der Bindung an den jeweiligen Rezeptor werden die Listerien durch Umstrukturierung des Zytoskeletts der zu infizierenden Zelle über so genannte *zipper* Mechanismen internalisiert (Lecuit et al. 1997). Um eine Internalin A und Internalin B unabhängige Infektion der in dieser Arbeit untersuchten Zellen zu gewährleisten, wurde unter anderem mit der *L. monocytogenes*  $\Delta$ InIAB Deletionsmutante gearbeitet. Bei dieser Mutante wird weder Internalin A noch Internalin B exprimiert.

Da *L. monocytogenes* gemeinsam mit der Zellmembran der nicht phagozytierenden Zellen internalisiert wird, liegt es nach der Internalisierung in einer Vakuole vor. Um die Vakuole zu verlassen und intrazellulär zu überleben ist das von *L. monocytogenes* sezernierte 60 kDa große Haemolysin Listeriolysin O (LLO) essenziell (Gaillard et al. 1987; Kuhn et al. 1988; Portnoy et al. 1988). Das Wirkoptimum von LLO liegt im sauren Milieu bei einem pH-Wert von 5,5, das auch in der Vakuole vorherrscht (Geoffroy et al. 1987). Zusätzlich zu LLO wird ein weiteres Protein, die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) (Leimeister-Wächter et al. 1991) benötigt, damit *L. monocytogenes* die intrazelluläre Vakuole verlassen kann (Camilli et al. 1993; Sun et al. 1990; Camilli et al. 1991). Für die intrazelluläre Motilität im Zytosol ist *L. monocytogenes* in der Lage, Aktinfilamente aus der infizierten Zelle zu rekrutieren. Die Aktinfilamente werden an einem Pol des Bakteriums gebunden und bilden einen Schweif („*comet's tail*“) (Tilney und Portnoy 1989; Tilney et al. 1992a; Tilney et al. 1992b). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktinpolymere an einem 90 kDa großen Protein

binden, dem Aktin-akkumulierenden Faktor A (ActA). Ohne ActA ist *L. monocytogenes* nicht in der Lage, den Aktinschweif auszubilden. Zudem sind *L. monocytogenes*, die kein ActA produzieren weniger virulent (Domann et al. 1992; Kocks et al. 1992). ActA bindet an den *actin related protein 2/3* Komplex (ARP2/3). Durch die wiederholte Rekrutierung von F-Aktin und die kontinuierliche Polymerisierung des Aktins durch ARP2/3 wird eine Vorwärtsbewegung des Bakteriums erzeugt (Welch et al. 1997). Durch diese Vorwärtsbewegung kann *L. monocytogenes* benachbarte Zellen infizieren. Die Plasmamembran der infizierten Zelle wird nach außen gestülpt, während die Membran der Nachbarzelle nach innen gestülpt wird. Der Mechanismus der Ausstülpung wird Protrusion genannt (Tilney und Portnoy 1989; Mounier et al. 1990). Die durch die Protrusion ausgestülpten Membranen werden durch die Aktivierung von Caveolin-assoziierten Mechanismen von der Zellmembran getrennt und das Bakterium liegt in der infizierten Nachbarzelle in einer von einer Doppelmembran umgebenen Vakuole vor (Dhanda et al. 2020). Durch die Sezernierung von LLO, PI-PLC sowie der PC-PLC ist *L. monocytogenes* in der Lage, die sekundäre Vakuole zu verlassen (Vazquez-Boland et al. 1992; Smith et al. 1995). PC-PLC wird nach der Sezernierung von der MPL aktiviert (Poyart et al. 1993). Einige Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* werden vom positiven Regulationsfaktor A (PrfA) reguliert. So erfolgt nach einer Infektion die verstärkte Expression der Gene für die Kodierung von LLO, PI-PLC, PC-PLC, MPL und ActA (Leimeister-Wächter et al. 1990; Leimeister-Wächter et al. 1991; Chakraborty et al. 1992; Domann et al. 1992). *L. monocytogenes* ist an das intrazelluläre Überleben angepasst. So werden 17% des Genoms nach der Infektion von eukaryotischen Zellen herauf- oder herunterreguliert. Ein nach der Infektion stark hochreguliertes Gen ist *actA*. Es konnte 8 h nach Infektion eine fast 14-fach vermehrte Expression des Gens nachgewiesen werden (Chatterjee et al. 2006). *L. monocytogenes* sezerniert außerdem kleine, nicht kodierende RNAs (sRNAs). Es konnten ca. 100 verschiedene sRNAs charakterisiert werden, von denen einige exklusiv intrazellulär exprimiert werden (Toledo-Arana et al. 2009; Mraheil et al. 2011). Es konnte gezeigt werden, dass bei Deletion einiger dieser sRNAs ( $\Delta rli31$ ,  $\Delta rli33-1$  und  $\Delta rli50^*$ ) eine geringere intrazelluläre Proliferation und somit eine geringere Virulenz von *L. monocytogenes* ausgeht (Mraheil et al. 2011).

## Einleitung



**Abbildung 1: Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes* (Lm).** 1a: Lm bindet über Internalin A an E-Cadherin auf epithelialen Zellen. 1b: Lm bindet über Internalin B an c-Met (*hepatocyte growth factor receptor*) 2: Über den zipper Mechanismus wird Lm über eine Umstrukturierung des Zytoskeletts in die eukaryotische Zelle internalisiert. 3: Lm befindet sich innerhalb der Zelle in einer Vakuole. Über die Produktion und Sekretion von Listeriolysin O (LLO) und der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) wird die Vakuole lysiert. 4: Lm verlässt die Vakuole und ist anschließend frei im Zytosol der infizierten Zelle (5). 6: Über die Expression von ActA wird eine Polymerisierung von F-Aktin induziert. Lm bewegt sich über diesen Mechanismus im Zytosol der Zelle fort. 7: Durch die Aktinpolymerisierung bewegt sich Lm an den Rand der infizierten Zelle. Über die aktive Bewegung findet eine Ausstülpung der Zellmembran in Richtung Nachbarzelle statt (Protrusion). 8: Lm liegt nach der Protrusion in einer Vakuole der Nachbarzelle vor, die von einer Doppelmembran umgeben ist. Über die Produktion von LLO, PI-PLC und der Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC) kann Lm die Vakuole lysieren und verlassen (9). 10: Lm liegt frei im Zytosol der Nachbarzelle vor. Abbildung erstellt mit *BioRender.com*.

### 1.3 Immunantwort gegen *L. monocytogenes*

Die Infektion mit *L. monocytogenes* führt zu einer Immunreaktion des infizierten Organismus. Direkt nach der Infektion kommt es zunächst zu einer unspezifischen Immunreaktion. Die erste Phase ist durch Makrophagen vor allem in der Leber und in der Milz bestimmt. (Mackaness 1962; Conlan 1996) In der Leber kommt es zudem zu einem Einstrom von neutrophilen Granulozyten, die infizierte Hepatozyten phagozytieren und so eine fortschreitende Infektion verhindern (Conlan und North 1994; Rogers und Unanue 1993). Makrophagen sezernieren unter anderem die Zytokine Interleukin-12 und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Durch sie werden natürliche Killerzellen (NK-Zellen) dazu stimuliert, Typ II Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) zu produzieren (Tripp et al. 1993). IFN- $\gamma$  führt zu einer positiven Rückkopplung auf Makrophagen und stimuliert zudem T-Zellen zur Produktion von IFN- $\gamma$ . Mäuse, die nicht in der Lage sind, IFN- $\gamma$  zu produzieren, zeigten eine verminderte primäre Immunantwort gegen *L. monocytogenes*, jedoch eine reguläre T-Zell vermittelte Immunantwort (Huang et al. 1993).

Neben der Aktivierung von IFN- $\gamma$  kommt es nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* zu einer Typ I Interferonreaktion mit Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) (Havell 1986). Es konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung von IFN- $\beta$  bei der Infektion für *L. monocytogenes*

von Vorteil ist und zu einer verminderten Resistenz des Wirtes gegen *L. monocytogenes* führt (O'Connell et al. 2004; Auerbuch et al. 2004). Die Aktivierung von IFN- $\beta$  bewirkt eine Abschwächung der Typ II Interferon Reaktion durch die Herunterregulierung des INF- $\gamma$  Rezeptors (Rayamajhi et al. 2010). Weiterhin fördert Typ I Interferon die Produktion von ActA und damit die Fähigkeit von *L. monocytogenes* benachbarte Zellen zu infizieren (Osborne et al. 2017). Zudem führt Typ I Interferon zu einer vermehrten Vulnerabilität von Lymphozyten gegenüber LLO (Carrero et al. 2004). Zyklisches Di-Adenosinmonophosphat (c-di-AMP), das intrazellulär von *L. monocytogenes* sezerniert wird, sorgt für eine Induktion von INF- $\beta$  (Woodward et al. 2010). Weiterhin führen von *L. monocytogenes* intrazellulär sezernierte RNA zu einer Induktion von INF- $\beta$  (Abdullah et al. 2012). Die sRNA rli32, die intrazellulär produziert wird (Mraheil et al. 2011), konnte als starker Induktor von INF- $\beta$  identifiziert werden (Frantz et al. 2019).

In der zellvermittelten Immunantwort spielen CD8 positive (CD8<sup>+</sup>) T-Zellen eine wichtige Rolle bei Infektionen mit *L. monocytogenes* (Kaufmann et al. 1986). Für die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind dendritische Zellen essenziell. Sie sind in der Lage, Antigene von *L. monocytogenes* auf ihrer Oberfläche zu präsentieren und so CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen zu aktivieren (Jung et al. 2002). Dendritische Zellen müssen nicht direkt von *L. monocytogenes* infiziert werden, sondern können Antigene von apoptotischen Zellen aufnehmen, und diese präsentieren (Albert et al. 1998). Die Antigene werden von dendritischen Zellen über den *major histocompatibility complex I* (MHC I) präsentiert und die zytotoxischen T-Zellen werden aktiviert. MHC I kommt auf nahezu allen Zellen des Körpers vor. Auch auf mit *L. monocytogenes* infizierten Zellen findet eine Antigenpräsentation über MHC I statt (Finelli et al. 1999). Ein wichtiges Antigen scheint hier LLO zu sein. Bei einer Infektion mit einer LLO-Deletionsmutante konnte keine Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden (Brunt et al. 1990). Erkennt eine aktivierte zytotoxische T-Zelle das präsentierte Antigen auf einer mit *L. monocytogenes* infizierten Zelle, wird diese durch die zytotoxische T-Zelle eliminiert (Kaufmann et al. 1986). Durch die Aktivierung von CD4 positiven (CD4<sup>+</sup>) T-Zellen durch *L. monocytogenes*, dessen Antigene von dendritischen Zellen und Makrophagen über den *major histocompatibility complex II* (MHC II) präsentiert werden, wird diese Wirkung noch verstärkt. Es konnte gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* bei direkter Infektion von dendritischen Zellen und Makrophagen nur zu einer geringen Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt. Bei einer Präsentation von phagozytierten *L. monocytogenes* Antigenen durch Makrophagen und dendritische Zellen, die nicht direkt infiziert waren, kommt es jedoch zu einer starken Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Skoberne et al. 2002).

#### **1.4 *L. monocytogenes* in der Therapie maligner Erkrankungen**

*L. monocytogenes* ist aufgrund der Eigenschaft als intrazellulärer Keim und der durch eine Infektion ausgelösten Immunantwort seit Jahrzehnten Gegenstand der Forschung in der Therapie maligner Erkrankungen. Dabei werden grundsätzlich drei verschiedene Ansätze verfolgt: Eine von *L. monocytogenes* vermittelte Immunantwort gegen maligne Zellen ohne direkte Infektion, *L. monocytogenes* als Vehikel um Plasmid-DNA in maligne Zellen zu übertragen und die direkte Infektion von malignen Zellen mit *L. monocytogenes*.

##### **1.4.1 Immunotherapie maligner Erkrankungen mit *L. monocytogenes***

Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, induziert *L. monocytogenes* die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen. Diese Immunreaktion wird sich folgendermaßen zu Nutze gemacht: Antigene, die auf Krebszellen vorkommen, werden rekombinant in *L. monocytogenes* exprimiert. Nach der Infektion wird das Immunsystem aktiviert, und gemeinsam mit anderen Proteinen von *L. monocytogenes* werden die Tumorzellantigene von dendritischen Zellen präsentiert. So kommt es zur Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen. Anschließend sollen die Antigene auf Tumorzellen von den zytotoxischen T-Zellen erkannt und die Tumorzellen zerstört werden. Durch die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch *L. monocytogenes*, dessen Antigene von dendritischen Zellen und Makrophagen über MHC II präsentiert werden, wird diese Wirkung noch verstärkt. Dieses Verfahren wird als Immunotherapie bezeichnet. Der erste Nachweis einer Immunantwort gegen ein in *L. monocytogenes* rekombinant exprimiertes Antigen erfolgte gegen  $\beta$ -Galactosidase aus *E. coli* (Schafer et al. 1992). In der Weiterentwicklung wurde ein Fusionsprotein aus Influenza-Nukleoprotein (NP) und LLO in *L. monocytogenes* kloniert. Es konnte gezeigt werden, dass eine Immunantwort zytotoxischer T-Zellen gegen NP *in vitro* und *in vivo* ausgelöst wurde (Ikonomidis et al. 1994). NP wurde zusätzlich in Krebszellen einer Nierenzellkarzinom- und einer Kolorektalkarzinomzelllinie transfiziert. Nach Immunisierung von Mäusen mit NP produzierenden *L. monocytogenes* wurde ein reduziertes Tumorwachstum der NP produzierenden Tumorzelllinien nachgewiesen. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass bereits bestehende Tumoren nach Infektion mit NP produzierenden *L. monocytogenes* wachstumsregredient waren (Pan et al. 1995a). Dies galt sowohl für parenteral applizierte als auch für enteral applizierte *L. monocytogenes* (Pan et al. 1995b). Seitdem wurden verschiedenste Tumorantigene für die Immunotherapie in *L. monocytogenes* exprimiert. Beispiele hierfür sind der *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2), das auf manchen Mammakarzinomen und anderen Tumoren vorkommt (Seavey et al. 2009), das Melanom assoziierte Antigen (Mage) (Kim et al. 2009), Mesothelin, das auf

Pleuramesotheliomen, Pankreaskarzinomen und verschiedenen gastrointestinalen Tumoren vorkommt (Le et al. 2012), das prostataspezifische Antigen (PSA) (Shahabi et al. 2008) und das humane Papilloma Virus 16 Antigen E7 (HPV-16 E7) (Gunn et al. 2001). Diese verschiedenen über *L. monocytogenes* vermittelten Immunotherapien befinden sich derzeit in verschiedenen Phasen der klinischen Erprobung. Aktuell gibt es neun klinische Studien, davon eine Studie in Phase III (Oladejo et al. 2021).

#### **1.4.2 Therapie maligner Erkrankungen mit durch *L. monocytogenes* vermittelter Bactofektion**

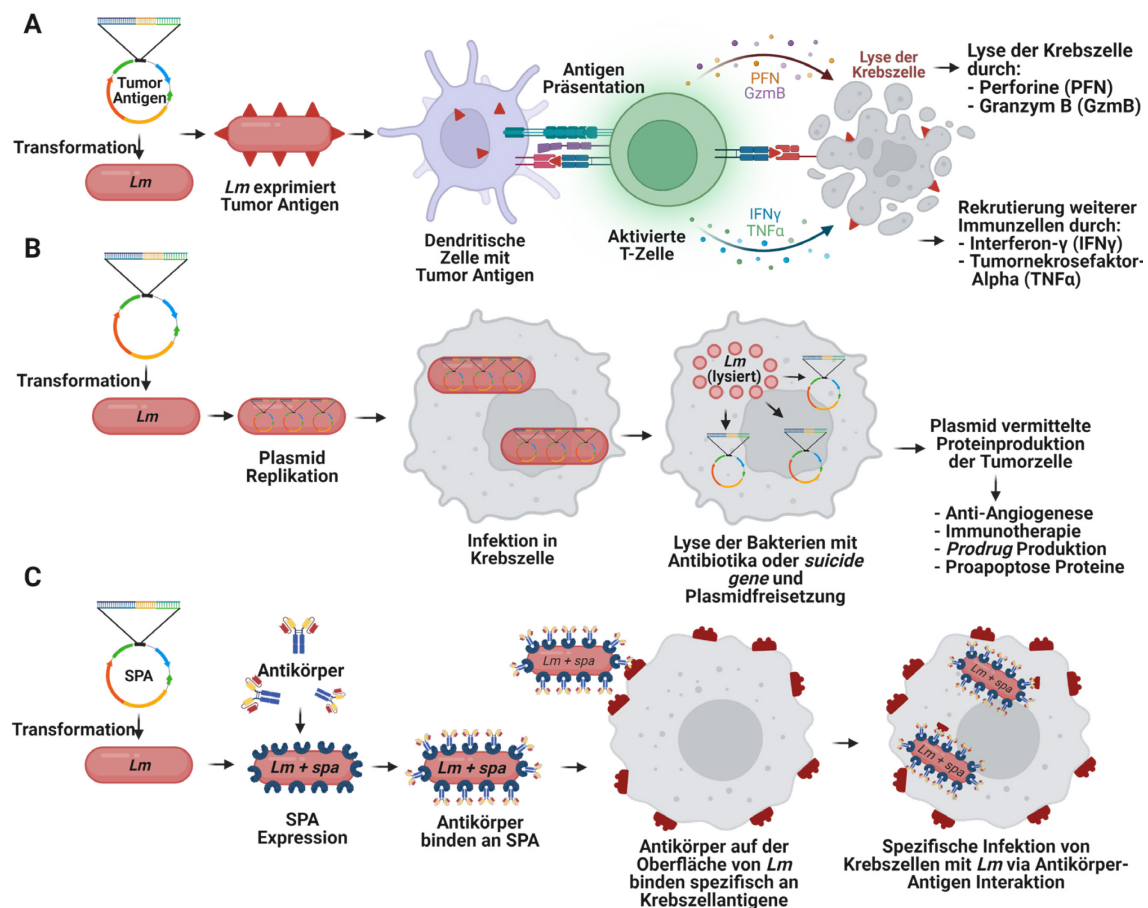
Der zweite Ansatz in der Tumorthherapie mit *L. monocytogenes* ist die so genannte Bactofektion. Hierbei wird *L. monocytogenes* als Vektor genutzt, um Plasmid-DNA in Tumorzellen zu übertragen. Plasmid-DNA konnte *in vitro* erfolgreich in die eukaryotischen Krebszelllinien A549 (Adenokarzinom der Lunge) und HEP-2 (Larynxkarzinom) übertragen werden. Die Zellen wurden nach der Infektion mit *L. monocytogenes* mit dem Antibiotikum Tetrazyklin behandelt um die Bakterien zu lysieren, damit das Plasmid in das Zytosol der infizierten Zelle gelangt (Hense et al. 2001).

Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von *L. monocytogenes*, die durch intrazelluläre Expression eines *Listeria*-spezifischen Phagen-Lysins selbst ihre Lyse einleiten, nachdem sie in den Intrazellularraum erreicht hatten. So konnten Plasmide erfolgreich übertragen werden. Das von den Bakterien selbst produzierte Lysin wurden unter die Kontrolle des *actA*-Promotors gestellt, der vorwiegend intrazellulär aktiviert wird (Dietrich et al. 1998). Auch *in vivo* konnte eine erfolgreiche Transfektion von Plasmid-DNA in Tumorzellen mit *L. monocytogenes* als Vektor gezeigt werden. Das Reporterogen Luciferase wurde unter die Kontrolle des Cytomegalievirus (*cmv*-) Promotors gestellt. Im Anschluss an die Infektion konnte im Mausmodell die Expression von Luciferase in den Krebszellen MCF-7 (Mammakarzinom) und CACO-2 (Kolonkarzinom) nachgewiesen werden (van Pijkeren et al. 2010).

#### **1.4.3 Direkte Infektion von malignen Zellen mit *L. monocytogenes***

Der dritte Ansatz der Krebstherapie mit *L. monocytogenes* ist die direkte Infektion von malignen Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass sich *L. monocytogenes* nach einer parenteralen Applikation bei Mäusen in Tumoren und deren umliegenden Gewebe aufhält und Tumorzellen infiziert. Dabei kam es nicht zu einer systemischen Infektion (Yu et al. 2004). Auch bei den eigentlich als Immunotherapie verwendeten *L. monocytogenes* konnte eine vermehrte Infektion von Tumorzellen als in anderen Geweben der infizierten Maus nachgewiesen werden (Kim et al. 2009). Weiterhin sorgte eine Infektion mit *L. monocytogenes* bei Mäusen mit Ovarialkarzinom für eine Rekrutierung Tumor-assoziiertes Makrophagen im Umfeld des Tumors. Es konnte eine Schädigung der

Tumorzellen durch Stickstoffmonoxid (NO) nachgewiesen werden (Lizotte et al. 2014). Neben dieser ungezielten Infektion von Tumorgeweben gibt es den Ansatz der gezielten Infektion von Tumorzellen mit *L. monocytogenes*. Hierzu wurde das antikörperbindende *Staphylococcus aureus* Protein A (SPA) (1.5.1) in *L. monocytogenes* kloniert. Anschließend wurde der monoklonale Antikörper Trastuzumab (gegen HER2 gerichtet) via Protein A auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* gebunden. Es konnte eine vermehrte Infektion von Tumorzellen mit dem entsprechenden Oberflächenantigen auf der Oberfläche, gegen das Trastuzumab gerichtet war (4T1-HER2 Zellen), *in vitro* nachgewiesen werden (Heisig et al. 2011). Im Mausmodell konnte ebenfalls ein vermehrtes Vorkommen von *L. monocytogenes* im Tumorumfeld und in Tumorzellen nachgewiesen werden, jedoch nur bei der Kombination aus Protein A auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* und gegen die Tumorzellen gerichtetes Trastuzumab (Heisig et al. 2011).



**Abbildung 2: Strategien von *L. monocytogenes* (*Lm*) in der Therapie maligner Erkrankungen. A: Immunotherapie:** Die genetische Information für tumorspezifische Antigene wird in *Lm* transformiert. Die tumorspezifischen Antigene werden von *Lm* exprimiert. Anschließend werden die tumorspezifischen Antigene im Rahmen einer Immunantwort von dendritischen Zellen an T-Zellen präsentiert und so eine Immunantwort ausgelöst. Die aktivierten T-Zellen schädigen die Krebszellen, die die tumorspezifischen Antigene exprimieren. **B: Bactofektion:** Das Plasmid, das in die Tumorzellen gebracht werden soll, wird in *Lm* transformiert. Das Plasmid wird von *Lm* repliziert. Nach der Infektion der Krebszelle wird *Lm* durch Applikation eines Antibiotikums oder durch *suicide gene*-vermittelte Autolyse lysiert. Die Plasmide gelangen so in das Zytosol der Krebszelle. Die durch das Plasmid kodierten Proteine werden von der Krebszelle

exprimiert. Die Krebszellen werden dann, je nach Plasmid, durch Anti-Angiogenese, Immunotherapie, die Produktion von proapoptischen Proteinen oder durch Prodrug Produktion geschädigt. **C: Spezifische Infektion von Krebszellen:** Das antikörperbindende *Staphylococcus aureus* Protein A (SPA) wird in *Lm* kloniert. *Lm* wird mit gegen tumorspezifische Antigene gerichtete Antikörper inkubiert, die Antikörper werden über SPA auf der Oberfläche von *Lm* gebunden. Über die auf der Oberfläche befindlichen Antikörper bindet *Lm* spezifisch an tumorspezifische Antigene. *Lm* wird gemeinsam mit dem Antigen internalisiert. Es findet so eine spezifische Infektion der Krebszelle statt. Abbildung erstellt mit *BioRender.com*.

### 1.5 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus* ist ein grampositives Bakterium aus der Familie der *Staphylococcaceae*. Die erste Beschreibung erfolgte 1880 von Alexander Ogston, der sie in seiner Rede auf dem 9. Chirurgischen Kongress in Berlin als „Weintraubenartig“ beschrieb (Ogston 1880). Die Bezeichnung *Staphylococcus pyogenes aureus* wurde erstmals von F.J. Rosenbach 1884 verwendet (Rosenbach 1884). *S. aureus* ist für eine Reihe von Infektionskrankheiten im Menschen verantwortlich. Einige Beispiele hierfür sind Haut- und Weichteilinfektionen, Infektionen der unteren Atemwege, Infektionen der Herzinnenhaut sowie die *S. aureus*-Bakteriämie.

*S. aureus* produziert eine Reihe von Virulenzfaktoren. Einige Beispiele für sezernierte Virulenzfaktoren sind  $\alpha$ -Hämolyisin, Enterotoxin B und Toxic-shock-syndrome-Toxin 1. Beispiele für zellwandassoziierte Virulenzfaktoren sind Koagulase und *S. aureus* Protein A (SPA), das in dieser Arbeit verwendet wurde.

#### 1.5.1 *S. aureus* Protein A (SPA)

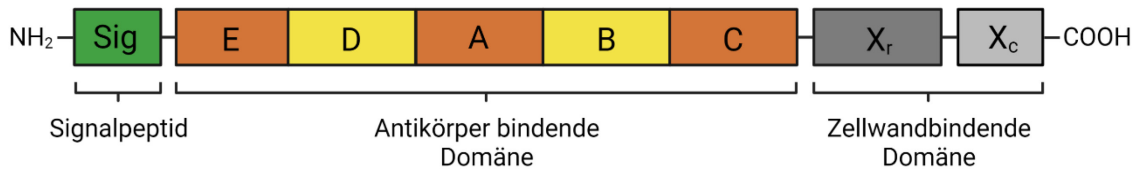
SPA ist ein von *S. aureus* produziertes, oberflächengebundenes Protein. Es wirkt als Virulenzfaktor, indem es Antikörper an deren konstantes *fragment crystallizable* (Fc-Fragment) bindet. Die Beschreibung eines Proteins, das von *S. aureus* produziert wird und mit Antikörperlösungen (Immunsera) reagiert, erfolgte erstmalig von W .F. Verwey in 1940 (Verwey 1940). Es wurde von Jensen 1958 Antigen A genannt. Jensen fand heraus, dass 100 % der über 500 von ihm untersuchten humanen Sera mit Antigen A reagierten. Diese Reaktionen wurden allerdings als spezifische Antikörper-Antigen Reaktionen gedeutet. Man nahm an, dass aufgrund des ubiquitären Vorkommens von *S. aureus* von allen untersuchten Individuen spezifische Antikörper gegen Antigen A gebildet wurden (Jensen 1958). Diese Missdeutung wurde 1966 von Forsgren und Sjöquist berichtigt. Sie fanden heraus, dass SPA an dem konstanten Fc-Fragment von Immunglobulin G (IgG-) Antikörpern bindet, und dass am variablen *antigene-binding fragment* (Fab-Fragment) von Antikörpern keine Bindung an SPA stattfindet. Es handelt sich bei der Bindung von Antikörpern an SPA also um keine spezifische Antikörper-Antigenreaktion sondern um eine unspezifische Bindung des konstanten Fc-Fragments der Antikörper an SPA (Forsgren und Sjöquist 1966).

SPA ist kovalent an die Peptidoglykanschicht der Zellwand von *S. aureus* gebunden (Sjöquist et al. 1972). Es besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen Domänen (Abb. 3). Eine Domäne ist für die Antikörperbindung, die andere Domäne für die Verankerung des Proteins in der Zellwand verantwortlich (Lindmark et al. 1977; Sjödahl 1977). Beide Domänen weisen eine repetitive Struktur auf (Sjödahl 1976; Guss et al. 1984). Die Antikörper bindende Domäne am N-Terminus des Proteins besteht aus repetitiven homologen Regionen, die für die Bindung der Antikörper an deren Fc-Fragment verantwortlich sind. Diese Regionen werden als Region E, D, A, B, und C bezeichnet und haben jeweils eine molekulare Masse von ca. 7 kDa (Sjödahl 1976; Sjödahl 1977; Lofdahl et al. 1983). Unterschiedliche Stämme von *S. aureus* weisen eine unterschiedliche Anzahl an antikörperbindenden Regionen auf. Während der Stamm „Cowan 1“ vier antikörperbindende Domänen hat, gibt es beim Stamm „NCTC 8325“ fünf antikörperbindende Domänen (Lofdahl et al. 1983). Die Regionen A, B und C bestehen jeweils aus 58 Aminosäuren und unterscheiden sich untereinander in weniger als 10 Aminosäuren. Die Unterschiede sind am ehesten auf Punktmutationen zurückzuführen. Region D besteht aus 61 Aminosäuren. Im Vergleich zu den Regionen A, B und C sind am N-terminalen Ende drei zusätzliche Aminosäuren eingefügt. Die restliche Sequenz ähnelt den Regionen A, B und C (Sjödahl 1977). Region E ist mit einer Länge von 50 Aminosäuren kürzer als die anderen Regionen. Die Basenabfolge unterscheidet sich zu Region D in lediglich 8 Aminosäuren (Lofdahl et al. 1983). Die Unterschiede in der Anzahl der antikörperbindenden Regionen sorgen dafür, dass SPA aus verschiedenen Stämmen eine Heterogenität hinsichtlich seiner molekularen Masse aufweist (Cheung et al. 1987).

Für die Bindungen an den Antikörper bindenden Domänen sind zwei antiparallele Alpha-Helices an den antikörperbindenden Domänen E, D, A, B und C von SPA verantwortlich. Unter physiologischen Bedingungen findet die Bindung zwischen den Alpha-Helices der Antikörper bindenden Domänen und den konstanten Regionen der schweren Kette (CH) CH<sub>2</sub> und CH<sub>3</sub> von IgG-Antikörpern statt. Es handelt sich bei der Verbindung um hydrophobe Wechselwirkungen sowie um vier Wasserstoffbrückenbindungen (Deisenhofer 1981). Mols et al. wiesen nach, dass alle fünf Domänen die Fähigkeit besitzen Antikörper zu binden. Hierbei weisen die Regionen D, A, B und C eine ähnlich starke Affinität zu Antikörpern auf, während Binfähigkeit von Region E schwächer ist. SPA kann also sowohl strukturell als auch funktionell als Pentamer bezeichnet werden. (Moks et al. 1986)

SPA wird über einen Zellwandanker an die Zellwand von *S. aureus* gebunden. Diese zellwandbindende Domäne wird Region X genannt und ist am C-Terminus des Proteins lokalisiert. Region X hat eine molekulare Masse von ca. 20 kDa und ist nicht an

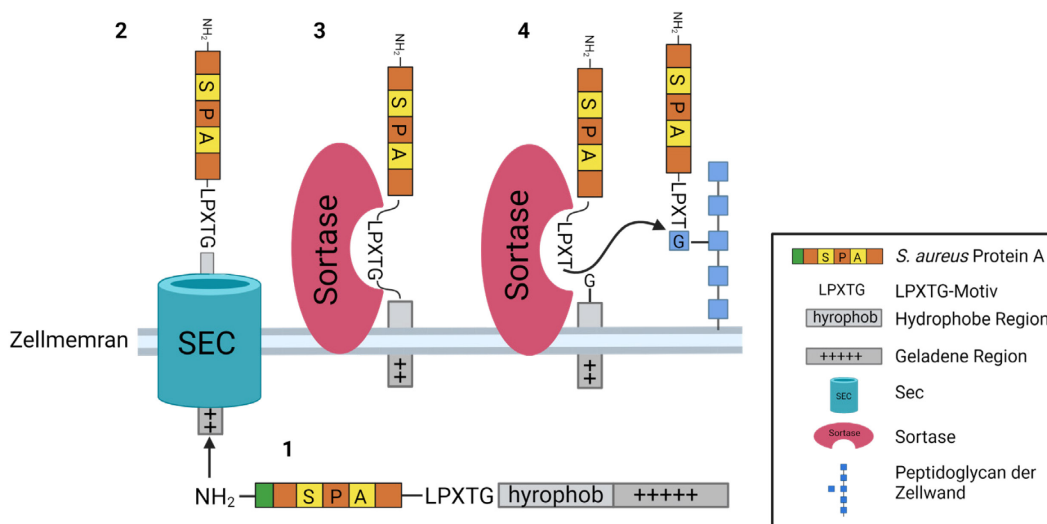
der Antikörperbindung beteiligt (Sjödahl 1977). Sie besteht aus einem N-terminalen repetitiven Part  $X_r$  und dem C-terminalen Part  $X_c$ . Die repetitive Region  $X_r$  besteht aus einem Octapeptid Lysin-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Asparagin-Asparagin-Lysin-Prolin-Glycin, das zwölf Mal wiederholt wird und bis auf einige Ausnahmen homolog ist. Part  $X_c$  weist keine repetitiven Strukturen auf (Guss et al. 1984).



**Abbildung 3: Primärstruktur von *S. aureus* Protein A (SPA).** SPA hat eine molekulare Masse von 54 kDa. Am N-Terminus ist das Signalpeptid (Sig) lokalisiert, das für eine Sekretion des Proteins sorgt. Die Signalsequenz wird über die Signalpeptidase abgespaltet. In Richtung C-Terminus von der Signalsequenz folgen die antikörperbindenden Domänen E, D, A, B und C. Jede der 5 Bindungsstellen ist funktionell in der Lage, Antikörper zu binden. Die antikörperbindende Domäne ist strukturell und funktionell ein Pentamer. Am C-Terminus des Proteins befindet sich die zellwandbindende Domäne X, bestehend aus der repetitiven Region  $X_r$  und dem C-terminalen Part  $X_c$ . Über die Zellwand bindende Domäne wird SPA kovalent an die Peptidoglykanschicht der Zellwand gebunden. Abbildung erstellt mit *BioRender.com*.

SPA wird über die Region X kovalent an die Zellwand von *S. aureus* gebunden (Sjöquist et al. 1972; Schneewind et al. 1993). Bei der Behandlung mit Lysostaphin (Schindler und Schuhardt 1964), einer Endopeptidase, die Pentaglycin-Brücken der Zellwand von *S. aureus* spaltet, kann SPA aus der Zellwand von *S. aureus* gelöst werden (Sjöquist et al. 1972). Um in der Zellwand verankert zu werden, besitzt SPA ein Signalpeptid am N-Terminus (Lofdahl et al. 1983). Dieses Signalpeptid ist, wie für einige Signalpeptide aus grampositiven Prokaryonten üblich, mit einer Länge von 36 Aminosäuren im Vergleich zu eukaryotischen Signalsequenzen relativ lang und weist eine positive Ladung auf (Heijne 1985; Abrahmsén et al. 1985). Am C-terminalen Ende der Signalsequenz folgt beim Stamm „NCTC 8325“ die antikörperbindende Domäne E. Die Kombination aus Signalpeptid und Region E scheint einen positiven Effekt auf die Sekretion von SPA zu haben. Fehlt Region X zur Verankerung in der Zellwand, so wird das Protein mit dem Signalpeptid nach extrazellulär sezerniert. Das Signalpeptid wird mit dem Enzym Signalpeptidase I abgespaltet (Abrahmsén et al. 1985). SPA scheint über den sekretorischen (Sec-) Transportweg über die Zellwand transportiert zu werden. So wurde in einer *S. aureus*  $\Delta$ SecA Deletionsmutante keine Verankerung von SPA auf der Zellwandoberfläche beobachtet, es wurden ausschließlich intrazelluläre Vorläuferproteine nachgewiesen. SecDF sorgt für eine verbesserte Translokation über die Zellwand, ist jedoch nicht essenziell für die Sekretion oder Verankerung (Yu et al. 2018). Zusätzlich zum N-terminalen Signalpeptid sind weitere strukturelle Eigenschaften des Proteins nötig, um auf der Zellwandoberfläche von *S. aureus* verankert zu werden. Es

werden ein C-terminales Signalpeptid in Form eines LPXTG-Motivs (Aminosäuremotiv aus Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin) folgend von einer hydrophoben Region sowie einer geladenen Region benötigt. Im Fall von SPA besteht die variable Aminosäure des LPXTG-Motivs aus Glutaminsäure, es ergibt sich: Leucin-Prolin-Glutaminsäure-Threonin-Glycin. Die Länge der hydrophoben Region beträgt 25 Aminosäuren. Die geladene Region besteht aus 5 Aminosäuren: Arginin-Arginin-Arginin-Glutaminsäure-Leucin (vgl. Anhang Abb. 1) (Schneewind et al. 1992; Schneewind et al. 1993). Während der Sezernierung des Vorläuferproteins über die Zellwand wird das Protein durch die hydrophobe Region und die geladene Region, die als Stop-Signal fungieren, von einer vollständigen Sezernierung abgehalten. Zwischen Threonin und Glycin des LPXTG-Motivs wird das Protein enzymatisch durch die Transpeptidase Sortase A geschnitten (Abb. 4). Über den C-terminalen Teil des Threonins wird der N-terminale Teil des Proteins an eine freie Aminogruppe von Glycin in der Pentaglycin Struktur der Zellwand gebunden (Navarre und Schneewind 1994; Schneewind et al. 1995; Mazmanian et al. 1999).



**Abbildung 4: Bindung von S. aureus Protein A an die Peptidoglykanschicht der Zellwand.** 1: Protein A wird mittels Signalpeptid via des Sec-Transportwegs über die Zellmembran transportiert. 2: Das Signalpeptid wird mittels Signalpeptidase abgespalten. Über eine hydrophobe Region und eine geladene Region am C-terminalen Ende des Proteins, die als Stop-Signal fungieren, wird SPA von einer kompletten Sekretion abgehalten. 3: Das C-terminale Signalmotiv LPXTG wird von dem auf der Zellwand gebundenen Protein Sortase A erkannt und gebunden. 4: Über die Sortase A wird das Protein innerhalb des LPXTG-Motivs zwischen Threonin (T) und Glycin (G) gespalten. Sortase A bindet den C-Terminus des Threonins kovalent an die Pentaglycinstruktur der Zellwand. Abbildung in Anlehnung an (Mazmanian et al. 2001), erstellt mit *BioRender.com*.

LPXTG-Motive sind an der Zellwandbindung vieler Proteine in grampositiven Bakterien beteiligt (Schneewind et al. 1992). Sortase A-Homologe wurden als notwendige Transpeptidasen in diversen grampositiven Bakterien nachgewiesen. Beispiele hierfür sind *Actinomyces naeslundii*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, und *Streptococcus*

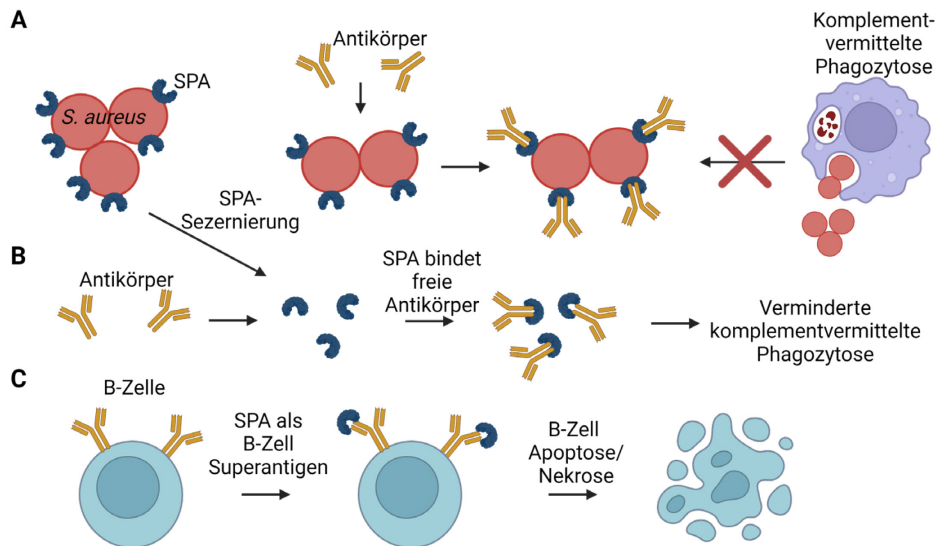
*pyogenes* (Mazmanian et al. 1999). Auch in *L. monocytogenes* konnte ein Sortase A-Homolog nachgewiesen werden (Garandeau et al. 2002).

SPA wird von *S. aureus* nicht nur auf der Zellwandoberfläche gebunden, es wird zusätzlich in das umgebende Medium sezerniert. SPA wird zunächst an der Zellwandoberfläche gebunden und anschließend mittels Mureinhydrolasen aus der Zellwand abgespaltet. Im Stamm „Newman“ konnte ein Anteil von 15% für sezerniertes SPA ermittelt werden (Becker et al. 2014).

SPA wirkt als Virulenzfaktor von *S. aureus*. Indem es Antikörper an deren Fc-Fragment bindet, hat es einen negativen Effekt auf die Opsonierung und wirkt somit anti-phagozytotisch (Abb. 5A) (Forsgren und Quie 1974). Das Vorkommen von SPA auf der Oberfläche inhibiert die Fähigkeit von Leukozyten, *S. aureus* zu phagozytieren. Dies gilt jedoch nur bei der Anwesenheit von IgG-Antikörpern. Wenn im untersuchten Medium keine IgG-Antikörper vorhanden waren, konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte SPA-Konzentration auf der Oberfläche von *S. aureus* dafür sorgt, dass die Bakterien vermehrt phagozytiert wurden (Peterson et al. 1977). Verschiedene IgG-Antikörper binden mit unterschiedlicher Affinität an SPA. Während humane IgG1, IgG2, und IgG4 mit hoher Affinität binden, konnte bei IgG3-Antikörpern keine Bindung nachgewiesen werden (Kronvall und Williams 1969). Weiterhin wurde gezeigt, dass SPA nicht nur IgG-Antikörper, sondern auch Antikörper anderer Klassen binden kann. Während bei IgG-Antikörpern die „klassische“ Bindung von SPA an das konstante Fc-Fragment der Antikörper stattfindet, erfolgt die Bindung bei IgM-, IgA- und IgE- Antikörpern am variablen Fab-Fragment (Inganäs 1981). Bei IgM-Antikörpern konnte eine vermehrte Bindung an die schwere Kette des variablen Teils ( $V_H3$ ) außerhalb der eigentlichen Antigenbindungsstelle der Antikörper festgestellt werden (Hillson et al. 1993).

Die Fähigkeit der Bindung verschiedener Antikörper macht SPA zu einem B-Zell-Superantigen. Lösliches SPA sorgt in vivo für eine Herunterregulation von B-Zellrezeptoren und für den Untergang der B-Zellen (Goodyear und Silverman 2003). Es kommt nach Infektion mit SPA-produzierenden *S. aureus* Bakterien zu einer verminderten komplementvermittelten Phagozytose neutrophiler Granulozyten (Abb. 5A und 5B) (Peterson et al. 1977). Außerdem verhindert SPA über die verminderte Bindung von B-Zellen an *S. aureus* die Bildung von spezifischen Antikörpern und somit die adaptierte Immunantwort. Bei der SPA-Deletionsmutante  $\Delta spa$  konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Hier waren B-Zellen in der Lage, spezifische Antikörper gegen *S. aureus* zu bilden und somit eine gewisse Immunität für folgende Infektionen zu erzeugen (Falugi et al. 2013).

## Einleitung



**Abbildung 5: Virulenz von *S. aureus* Protein A (SPA).** **A:** SPA ist auf der Oberfläche von *S. aureus* gebunden. Über die Bindung von Antikörpern am Fc-Fragment werden freie Antikörper gebunden. Da das Fc-Fragment der Antikörper besetzt ist, kann keine Opsonierung stattfinden. Es findet eine verminderte komplementvermittelte Phagozytose statt. **B:** Antikörper werden an sezerniertes SPA gebunden. Durch die geringere Antikörperkonzentration findet eine verminderte komplementvermittelte Phagozytose statt. **C:** Antikörper, die auf B-Zellen vorliegen, werden von sezerniertem SPA gebunden. SPA wirkt als ein B-Zell Superantigen. Hierdurch werden eine Apoptose und Nekrose der B-Zellen ausgelöst. Es findet eine verminderte adaptive Immunantwort statt. Abbildung in Anlehnung an (Kobayashi und DeLeo 2013), erstellt mit BioRender.com.

Durch die Bindung von SPA sowohl an das Fc-Fragment als auch an das Fab-Fragment von Antikörpern kommt es *in vivo* zu einer Bildung von großen Immunkomplexen, die eine starke proinflammatorische Wirkung auf das umliegende Gewebe haben (Anderson et al. 2006). SPA bindet außerdem an den Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) und sorgt über dessen Aktivierung für weitere proinflammatorische Aktivität (Gómez et al. 2004). Neueste Erkenntnisse zeigen, dass SPA mit der Wirkung als B-Zell Superantigen zu einer Apoptose und zur Nekrose der B-Zellen führt (Abb. 5C). Zusätzlich wurde ein toxischer Effekt von SPA-IgG Komplexen auf Monozyten beobachtet (Fox et al. 2021).

Die Fähigkeit von SPA, Antikörper unspezifisch zu binden, wird seit Jahrzehnten in verschiedenen Anwendungen genutzt. So werden SPA-beschichtete Säulen oder Kugeln zur Aufreinigung von Antikörpern verwendet. Weiterhin können mit SPA beschichtete Platten oder Membranen Antikörper immobilisieren und für ELISA Tests benutzt werden. Industriell hergestelltes SPA wird aufgrund der Virulenz von *S. aureus* meist aus *E. coli* gewonnen.

### 1.6 *Pseudomonas aeruginosa*

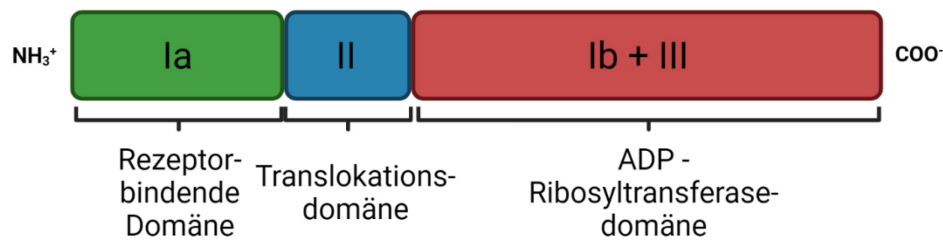
*P. aeruginosa* ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium. Die Erstbeschreibung des Bakteriums erfolgte von W. Migula im Jahr 1894 (Migula 1894). *P. aeruginosa* ist obligat aerob, jedoch ist es in der Lage, Nitrat als einen alternativen

Elektronenakzeptor zu verwenden. Es ist ubiquitär vorkommend und hat die Eigenschaft Biofilme zu bilden. Diese Eigenschaft macht es für viele opportunistische nosokomiale Infektionen im Menschen verantwortlich. So verursacht es Katheter-assoziierte Infektionen des Urogenitaltraktes und Respirator-assoziierte Pneumonien. *P. aeruginosa* exprimiert verschiedene Effluxpumpen, durch die Antibiotika verschiedener Klassen aktiv aus der Zelle transportiert werden können. Dieser Mechanismus trägt wesentlich zur schnellen Antibiotikaresistenzbildung von *P. aeruginosa* bei. Bei antibiotikaresistenten Stämmen sind häufig einzelne oder mehrere Effluxpumpen überexprimiert (Dreier und Ruggerone 2015). Das komplette Genom von *P. aeruginosa* zeigte eine Länge von 6,3 Mbp (Megabasenpaare). Damit ist es länger und komplizierter als das Genom anderer gramnegativer Bakterien wie beispielsweise *Escherichia coli* (4,6 Mbp) (Stover et al. 2000). *P. aeruginosa* bildet als Virulenzfaktor unter anderem Exotoxin A, das in dieser Arbeit verwendet wurde.

### **1.6.1 *P. aeruginosa* Exotoxin A**

Exotoxin A (ETA) ist ein von *P. aeruginosa* produziertes Toxin mit einer Länge der Primärstruktur von 638 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 66 kDa. Im Sekretionsprozess wird ein hydrophobes Signalpeptid mit einer Länge von 25 Aminosäuren abgespaltet, sodass das endgültige Protein eine Länge von 613 Aminosäuren aufweist (Gray et al. 1984). Die Tertiärstruktur des Proteins besteht aus drei funktionell unterschiedlichen Domänen (Abb. 6). Die N-terminale Domäne Ia besteht aus antiparallelen Betafaltblattstrukturen und umfasst die Aminosäuren 1-252, die mittlere Domäne II besteht aus sechs Alpha-Helices und umfasst die Aminosäuren 253-364. Die C-terminale Domänen Ib und III enthalten die ADP-Ribosyltransferasedomäne, die für die Toxizität des Proteins verantwortlich ist. Domäne Ib umfasst die Aminosäuren 365-404, Domäne III 405-613 (Allured et al. 1986). Die N-terminale Domäne Ia wird auch als Rezeptor-bindende Domäne bezeichnet und ist für die Aufnahme des Toxins in die eukaryotische Zelle verantwortlich. Die Domäne II wird Translokationsdomäne genannt. Sie wird benötigt, damit ETA nach der Internalisierung in die eukaryotischen Zellen aus dem Membranvesikel an den eigentlichen Wirkort im Zytosol der Zelle transferiert wird. Die ADP-Ribosyltransferasedomäne Ib+III ist für die enzymatische Aktivität des Toxins verantwortlich (Hwang et al. 1987). Es konnte gezeigt werden, dass die Domäne Ib nicht essenziell für die ADP-Ribosylierung ist, und dass das Protein ohne Domäne Ib keine verminderte Zytotoxizität aufweist (Siegall et al. 1989).

## Einleitung



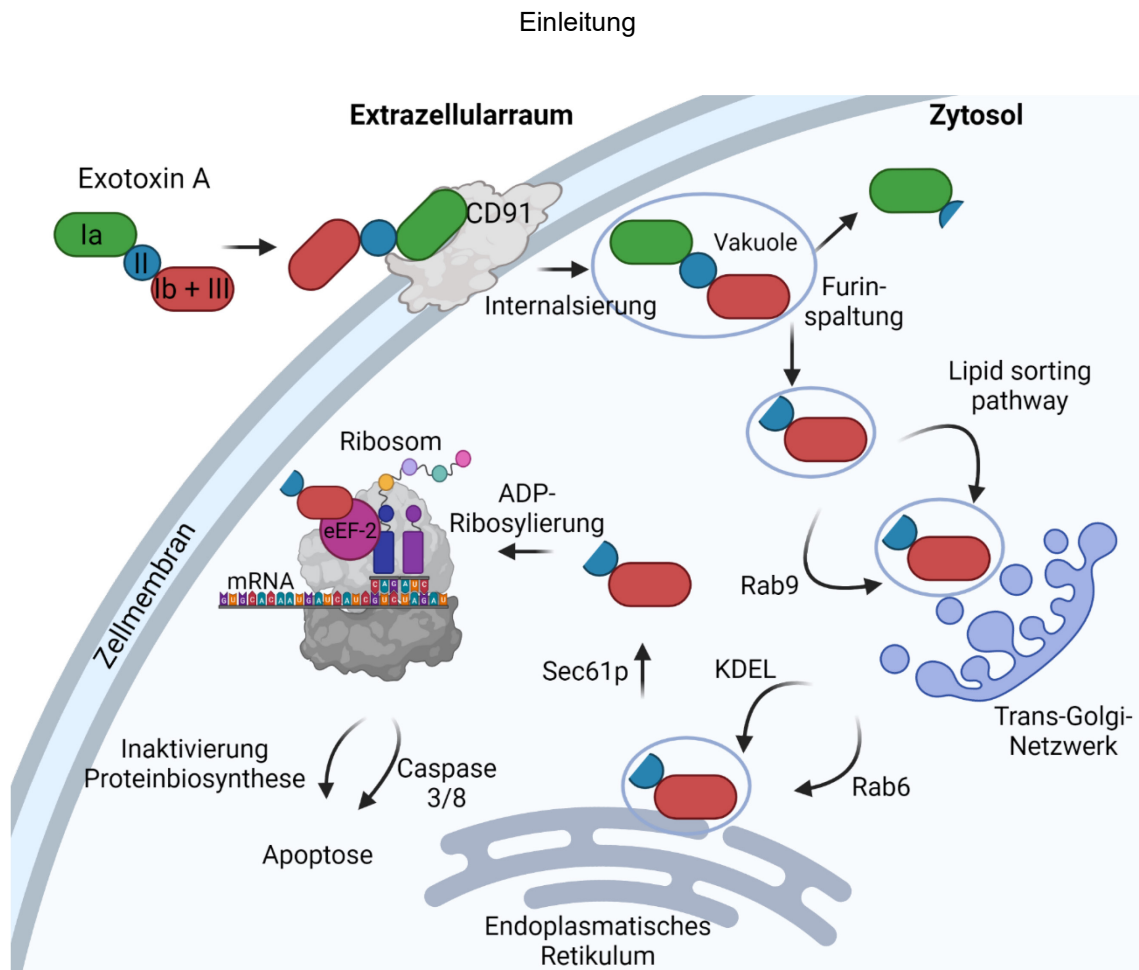
**Abbildung 6: Primärstruktur von *P. aeruginosa* Exotoxin A (ETA).** Am N-terminalen Ende des Proteins ist die Rezeptor-bindende Domäne lokalisiert (Ia), die für die Bindung des Proteins an eukaryotische Zellen verantwortlich ist. Richtung C-Terminus befindet sich die Translokationsdomäne II, die für das Verlassen des Endosoms essenziell ist. Am C-terminalen Ende befindet sich die ADP-Ribosyltransferasedomäne Ib + III, die für die Inaktivierung des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (eEF2) der infizierten Zelle sorgt. Abbildung in Anlehnung an (Michalska und Wolf 2015), erstellt mit *BioRender.com*.

ETA wird von *P. aeruginosa* mittels einer Typ II-Proteinsekretion sezerniert. Die Primärstruktur von ETA wird mittels Signalpeptid am N-Terminus und SecA-abhängig in den periplasmatischen Raum der Bakterien sezerniert (Douglas et al. 1987). Im periplasmatischen Raum wird mittels Signalpeptidase das Signalpeptid abgespalten. Teile der Region Ia und ein Alpha-Helix der Region II scheinen im periplasmatischen Raum essenziell für die weitere Sekretion zu sein (Lu et al. 1993; Voulhoux et al. 2000). Aus dem periplasmatischen Raum wird ETA mit einem für *P. aeruginosa* bei Typ II-Proteinsekretion typischen Xcp-Sekretin in den Extrazellulärraum sezerniert (Filloux et al. 1990; Gérard-Vincent et al. 2002).

ETA bindet an eukaryotischen Zellen mit der rezeptorbindenden Domäne Ia an den  $\alpha_2$ -Makroglobulinrezeptor/Low-Density-Lipoproteinrezeptor (CD91) und wird zur Aufnahme in die Zellen gemeinsam mit dem Rezeptor internalisiert (Kounnas et al. 1992). Nach der Aufnahme wird das Toxin innerhalb der Translokationsdomäne gespalten. Es entsteht ein 37 kDa großes C-terminales Fragment, das aus einem Teil der Translokationsdomäne II sowie aus der ADP-Ribosyltransferasedomäne besteht (Ogata et al. 1990). Diese Spaltung, an der die Protease Furin beteiligt ist, ist für die Toxizität von ETA essenziell (Inocencio et al. 1994). Der Weitertransport des C-terminalen 37 kDa Fragments von ETA findet im Endosom statt. Es wird über den *Ras-related in brain 9* (Rab9-) regulierten Signalweg retrograd in das Trans-Golgi-Netzwerk des Golgi-Apparates transportiert (Smith et al. 2006). Am C-terminalen Ende von ETA ist ein Arginin-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Leucin (RDEL-) Signalmotiv lokalisiert. Ohne dieses Signalmotiv ist eine deutlich verminderte Zytotoxizität zu verzeichnen. Wenn das RDEL- Signalmotiv durch ein Lysin-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Leucin (KDEL-) Signalmotiv ersetzt wird, kann die Toxizität des Proteins wiederhergestellt werden (Chaudhary et al. 1990). KDEL ist ein Signalmotiv, das für eine Retention von Proteinen im endoplasmatischen Retikulum (ER) sorgt (Munro und Pelham 1987). Wie

auch das KDEL-Signalmotiv, sorgt das RDEL-Signalmotiv für einen Transfer in das ER, indem es an den KDEL-Rezeptor bindet (Kreitman und Pastan 1995; Jackson et al. 1999). Eine andere Möglichkeit für ETA, in das endoplasmatische Retikulum zu gelangen, geschieht über den *Ras-related in brain 6* (Rab6-) Signalweg. Hier wird das Endosom mittels des *Lipid-sorting-pathways* unabhängig vom Rab9-Signalweg in das Trans-Golgi-Netzwerk und anschließend mittels des Rab6-Signalweges in das endoplasmatische Retikulum transferiert (Smith et al. 2006). Im endoplasmatischen Retikulum wird das 37 kDa große, aus der Translokationsdomäne und der ADP-Ribosyltransferasedomäne bestehende Fragment über einen retrograden Proteintransport in das Zytosol der Zelle überführt. Die Translokationsdomäne II interagiert mit Sec61p und sorgt so für den retrograden Transport in das Zytosol und für das Verlassen des Endosoms (Theuer et al. 1993; Koopmann et al. 2000). Sec61p ist in den Prozess der *endoplasmatic reticulum associated degradation* (ERAD) involviert, der physiologischerweise für den Rücktransport missgefalteter Proteine in das Zytosol sorgt (Pilon et al. 1997; Schäfer und Wolf 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die Translokationsdomäne direkt an Sec61p bindet (Schäuble et al. 2014).

Im Zytosol entfaltet ETA seine Toxizität über die ADP-Ribosylierung des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (eEF2) (Iglewski et al. 1977; Li et al. 1996). eEF2 ist ein für die Proteinbiosynthese von eukaryotischen Zellen essenzielles Protein. Es fördert die GTP-abhängige Translokation der Polypeptidkette von der A-Stelle zur P-Stelle am Ribosom während der Translation. Nach der Inaktivierung von eEF2 durch ETA kommt die Proteinbiosynthese der Zelle zum Erliegen. Zusätzlich werden durch ETA Zytokine freigesetzt, die zur Apoptose führen (Morimoto und Bonavida 1992; Komatsu et al. 1998). Es kommt unter anderem zu einer Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 8 (Jenkins et al. 2004). Der intrazelluläre Signalweg ist in Abb. 7 dargestellt. Die Aktivität von Caspase 3 als Markerprotein der Apoptose wurde in dieser Arbeit verwendet.



**Abbildung 7: Intrazellulärer Signalweg von *P. aeruginosa* Exotoxin A (ETA).** ETA bindet mit der rezeptorbindenden Domäne Ia an den  $\alpha_2$ -Makroglobulinrezeptor/Low-Density Lipoproteinrezeptor (CD91). Es wird gemeinsam mit dem Rezeptor internalisiert. Nach der Aufnahme wird das Toxin innerhalb der Translokationsdomäne II furinabhängig gespalten. Der Weitertransport des C-terminalen 37 kDa Fragments von ETA findet im Endosom statt. Es wird über den Rab9-Signalweg retrograd in das Trans-Golgi-Netzwerk des Golgi-Apparates transportiert. Alternativ wird das Endosom mittels des *Lipid-sorting-pathways* unabhängig vom Rab9-Signalweg in das Trans-Golgi-Netzwerk transportiert. Von dort wird das Endosom mittels des KDEL-Signalmotivs in das endoplasmatische Retikulum überführt. Im alternativen Signalweg wird das Endosom über den Rab6-Signalweg in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Die Translokationsdomäne II interagiert mit Sec61p und sorgt so für den retrograden Transport in das Zytosol und für das Verlassen des Endosoms. Im Zytosol findet die ADP-Ribosylierung des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (eEF2) statt. eEF2 wird inaktiviert und die Proteinbiosynthese der Zelle kommt zum Erliegen. Zusätzlich werden proapoptische Zytokine (Caspase 3/8) aktiviert. Die Zelle geht in die Apoptose über. Abbildung in Anlehnung an (Michalska und Wolf 2015), erstellt mit *BioRender.com*.

ETA ist als Teil von Immunotoxinen seit Jahren Forschungsgegenstand in der Therapie von Krebserkrankungen. Es wurde mit monoklonalen Antikörpern konjugiert (FitzGerald et al. 1983). In der weiteren Entwicklung erfolgte die rekombinante Konjugation von Teilen von ETA an *single chain variable fragment* (scFv) Antikörperfragmente (Chaudhary et al. 1989). Auch die in dieser Arbeit verwendeten scFv-Antikörperfragmente wurden in der Vergangenheit rekombinant mit ETA konjugiert. Über die Bindung der scFv-ETA Fusionsproteine an spezifische Oberflächenantigene wurde ETA in die Krebszellen transportiert und es wurde die vermehrte Apoptose der Krebszellen beobachtet (Klimka et al. 1999; Haaf et al. 2015). In der Behandlung der therapieresistenten Haarzelleukämie wurde das Medikament Moxetumumab Pasudotox 2018 von der Federal Drug Administration in den USA zugelassen (Dhillon

2018). Moxetumumab Pasudotox besteht aus einem gegen CD22 gerichteten Disulfidstabilisierten scFv, das mit einem 38 kDa großen Fragment von ETA konjugiert ist (Salvatore et al. 2002).

### 1.7 Monoklonale Antikörper und Antikörperfragmente

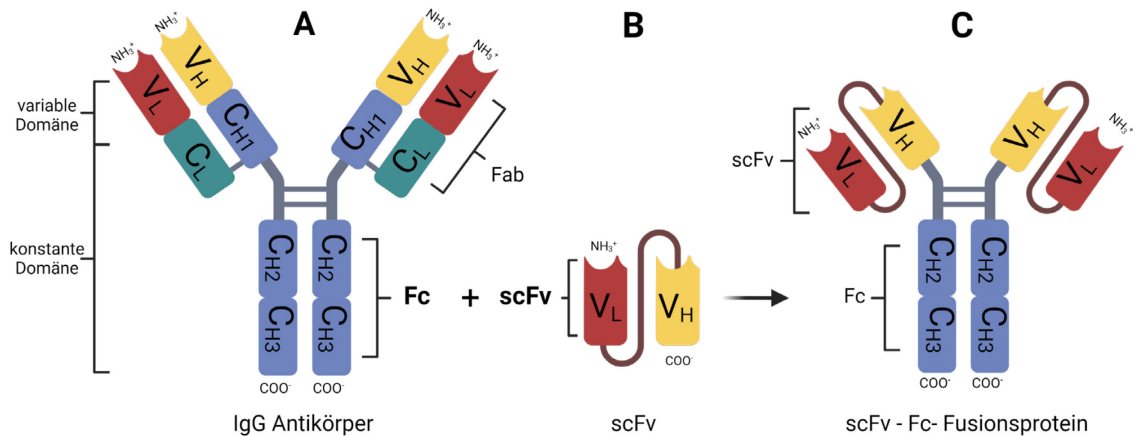
Die Erstbeschreibung von Antikörpern (Immunglobulinen, Ig) erfolgte Ende des 19. Jahrhunderts durch Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato. (Behring und Kitasato 1890) Sie sind Bestandteil der adaptiven Immunantwort und binden spezifisch an Oberflächenantigene auf verschiedenen Strukturen wie Oberflächenproteinen von Zellen, Bakterien und Viren. Im Menschen existieren 5 Klassen von Antikörpern: IgG, IgA, IgD, IgE und IgM. Diese Klassen erfüllen in der adaptiven Immunantwort unterschiedliche Funktionen. Seit der Entwicklung der Hybridom-Technik, mit der Antikörper gegen zuvor ausgewählte spezifische Zielstrukturen (Antigene) hergestellt werden können, (Köhler und Milstein 1975) werden Antikörper in vielen diagnostischen und therapeutischen Ansätzen verwendet. Hier kommen meist Antikörper der Klasse IgG zum Einsatz.

IgG-Antikörper sind Proteine mit einer molekularen Masse von ca. 150 kDa. Sie bestehen aus zwei konstanten schweren Ketten ( $C_H$ , *constant heavy chain*) und zwei konstanten leichten Ketten ( $C_L$ , *constant light chain*). Die schweren Ketten sind an der so genannten *hinge region* über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden (Abb. 8A). Das konstante Fc-Fragment (*fragment crystallizable*, Fc) besteht aus je zwei  $C_{H3}$  und  $C_{H2}$  Domänen. An das Fc-Fragment des Antikörpers sind zwei konstante  $C_{H1}$ -Domänen der schweren Kette gebunden, an die wiederum der variable Teil der schweren Kette ( $V_H$ , *variable heavy chain*) angeschlossen ist.  $C_{H1}$  und  $V_H$  bilden gemeinsam mit dem konstanten Teil der leichten Kette ( $C_L$ ) und dem variablen Teil der leichten Kette ( $V_L$ , *variable light chain*) das Fab-Fragment (*antigen-binding fragment*) des Antikörpers. Die leichte und schwere Kette des Fab-Fragments sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Während das Fc-Fragment des Antikörpers konserviert und somit konstant ist und nicht an der Antigenerkennung teilnimmt, werden Antigene durch den variablen Teil ( $V_H$  und  $V_L$ ) erkannt.  $V_H$  und  $V_L$  sind in ihrer Konformation sehr variabel und können eine Vielzahl von Antigenen binden (Murphy und Weaver 2018).

Neben der Hybridom-Technik wurden weitere Methoden zur Herstellung von Antikörpern entwickelt. Es besteht die Möglichkeit, Antikörperfragmente rekombinant herzustellen. Die ersten Versuche der Herstellung rekombinanter Antikörper in *E. coli* resultierten zwar in einer Herstellung, konnten jedoch nicht über die äußere Membran transportiert werden (Boss et al. 1984). Es konnte jedoch ein funktionelles variables Antikörperfragment ( $F_V$ ) rekombinant in *E. coli* hergestellt und in den periplasmatischen

Raum transportiert werden. Der variable Teil der leichten und der schweren Kette ( $V_H$  und  $V_L$ ) wurden unabhängig voneinander in den periplasmatischen Raum transportiert. Dort bildeten beide Fragmente ein funktionell intaktes Heterodimer (Skerra und Pluckthun 1988).

Eine weitere Neuerung in der Herstellung rekombinanter Antikörper ist die Herstellung von *single chain variable fragments* (scFv). Ein scFv ist ein Fusionsprotein aus  $V_H$  und  $V_L$  (Abb. 8B). Beide Domänen sind über eine Polypeptikette miteinander verbunden. Ein scFv ist mit einer molekularen Masse von ca. 25 kDa deutlich leichter als ein IgG-Antikörper. Die Antigenerkennung ist bei scFv nicht beeinträchtigt (Bird et al. 1988). ScFv wurden zunächst mithilfe der Hybridom-Technik hergestellt, indem die für die Antikörper kodierende mRNA mithilfe einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben wurde. Anschließend konnte die für  $V_H$  und  $V_L$  kodierende Basensequenz sowie die Basensequenz des Linker Peptides in *E. coli* transformiert werden (Huston et al. 1988). Ein Meilenstein in der Herstellung spezifischer scFv stellt die *phage display* Technologie dar. Es konnte gezeigt werden, dass funktionale scFv auf der Oberfläche von Inoviren (filamentöse Bakteriophagen) exprimiert werden können (McCafferty et al. 1990). Es wurden Phagen-Bibliotheken erstellt, die eine Vielzahl verschiedener scFv exprimieren. Mithilfe dieser Phagen-Bibliotheken können scFv gegen verschiedenste Antigene hergestellt werden. Die scFv exprimierenden Phagen werden mit dem Zielantigen inkubiert. Das Zielantigen wird anschließend mehrmalig gewaschen, sodass nur noch Phagen an das Antigen binden, die ein für das Antigen spezifisches scFv besitzen. Die DNA der an das Antigen bindenden Phagen kann extrahiert werden. Anschließend können mithilfe der Basensequenz rekombinante scFv hergestellt werden (Carmen 2002). Eines der in dieser Arbeit verwendeten scFv-Fc-Fusionsproteine wurde mittels *phage display* hergestellt (Haaf et al. 2015). Zur Herstellung eines rekombinanten Fusionsproteins aus scFv und dem konstanten Fc-Fragment eines Antikörpers (Abb. 8C) wurden an das Fc-Fragment eines murinen IgG2a-Antikörpers an jede der zwei schweren Ketten am N-Terminus je ein scFv gebunden. Die Expression des scFv-Fc-Fusionsproteins erfolgte in HEK293T Zellen (Haaf et al. 2015).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Antikörpers der Klasse IgG, eines scFv und eines scFv-Fc-Fusionsproteins. A:** IgG-Antikörper. **B:** *Single-chain variable fragment* (scFv) **C:** scFv-Fc-Fusionsprotein. **A:** Antikörper der Klasse IgG bestehen aus zwei schweren und zwei leichten Ketten. Die schweren Ketten sind miteinander an der so genannten *hinge region* über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die Domänen CH<sub>2</sub> und CH<sub>3</sub> der schweren Kette bilden gemeinsam das Fc-Fragment des Antikörpers. Dieser Teil des Antikörpers ist konserviert und nimmt nicht an der Antigenerkennung des Antikörpers teil. Das Fc-Fragment kann von SPA gebunden werden. Die Fab-Fragmente des Antikörpers bestehen aus je einer leichten und einer schweren Kette, die wiederum jeweils aus einem konstanten und einem variablen Teil bestehen. Leichte und schwere Kette sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Die variablen Teile von leichter und schwerer Kette (V<sub>L</sub> und V<sub>H</sub>) bilden gemeinsam die Antigenbindungsstelle des Antikörpers. Sie sind variabel, um eine Vielzahl von Antigenen erkennen zu können. IgG-Antikörper haben eine molekulare Masse von ca. 150 kDa. **B:** *Single chain variable fragments* (scFv) bestehen aus den variablen Domänen der leichten Kette (V<sub>L</sub>) und der schweren Kette (V<sub>H</sub>). Die beiden Domänen sind über eine Polypeptidkette miteinander verbunden. Die Fähigkeit des Antikörperfragmentes Antigene zu erkennen bleibt erhalten. Im Gegensatz zu IgG-Antikörpern sind sie mit einer molekularen Masse von ca. 25 kDa wesentlich leichter. **C:** Die in dieser Arbeit verwendeten scFv-Fc-Fusionsproteine bestehen aus dem Fc-Fragment eines murinen IgG2a Antikörpers und einem scFv. Beide schweren Ketten des Fc-Fragments sind an der *hinge region* über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die schwere Kette der scFv (V<sub>H</sub>) wird am N-Terminus des Fc-Fragments gebunden. Da an beiden Teilen des Fc-Fragments je eine scFv gebunden wird, entsteht ein bivalentes scFv-Fc-Fusionsprotein mit zwei Antigenbindungsstellen. Die Molekülmasse des gesamten Proteins beträgt ca. 100 kDa. Abbildung erstellt mit *BioRender.com*.

### 1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Das breite Spektrum der malignen Erkrankungen ist trotz weitreichender Erforschung von neuen Therapiemöglichkeiten nach wie vor die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Die Wissenschaft arbeitet aktuell an einer Vielzahl von Therapieansätzen auf diesem Gebiet. Ein Ansatz in der Therapie maligner Erkrankungen ist die Krebstherapie mittels Bakterien.

*Listeria monocytogenes* ist ein grampositives Bakterium, das durch die Expression verschiedener Virulenzfaktoren in der Lage ist, phagozytierende und nicht phagozytierende Zellen zu infizieren und sich von der Vakuole zu befreien, sodass es das Zytoplasma erreicht. Seit Jahren wird die Möglichkeit erforscht, *L. monocytogenes* in der Therapie maligner Erkrankungen einzusetzen. In diesem Zusammenhang werden verschiedene Ansätze verfolgt. *In vivo* löst eine Infektion mit *L. monocytogenes* eine T-Zell vermittelte Immunantwort aus. Diese Immunantwort wird dazu verwendet, das Immunsystem des Wirtes gegen Krebszellantigene zu sensibilisieren und somit die maligne

Erkrankung zu bekämpfen. Ein weiterer Ansatz in der Therapie maligner Erkrankungen ist die direkte Infektion von malignen Zellen mit *L. monocytogenes*.

In dieser Arbeit wird der Ansatz verfolgt, Zelllinien eines Hodgkin-Lymphoms und Zellen eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms *in vitro* direkt mit *L. monocytogenes* zu infizieren. Diese Infektion soll spezifisch erfolgen. Hierzu soll das *Staphylococcus aureus* Protein A (SPA) auf der Zellwand von *L. monocytogenes* exprimiert werden. SPA ist ein Oberflächenprotein, das in der Lage ist, das konstante Fc-Fragment von Antikörpern zu binden, sodass die Antigenbindungsstellen am variablen Teil des Antikörpers nicht besetzt sind. Rekombinante Antikörperfragmente in Form von scFv-Fc-Fusionsproteinen, die gegen Oberflächenantigene auf den malignen Zellen gerichtet sind, sollen in dieser Arbeit über SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* gebunden werden. Die auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* an SPA gebundenen scFv-Fc-Fusionsproteine sollen dann über eine spezifische Antikörper-Antigen Interaktion an Oberflächenantigene auf malignen Zellen binden. Die malignen Zellen sollen so spezifisch mit *L. monocytogenes* infiziert werden. Die spezifische Infektion soll in dieser Arbeit mit verschiedenen Infektionsversuchen untersucht werden. *L. monocytogenes* exprimiert verschiedene Internalin A und B, mit denen es in der Lage ist, nicht phagozytierende Zellen zu infizieren. Um eine Internalin unabhängige spezifische Infektion der Krebszellen zu untersuchen, wurde mit der Internalin Deletionsmutante  $\Delta inIAB$  gearbeitet.

In einem weiteren Schritt sollen die spezifisch mit *L. monocytogenes* infizierten malignen Zellen durch ein von den Bakterien produziertes Toxin direkt geschädigt werden. Hierzu soll die genetische Information für einen Teil von *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA) in *L. monocytogenes* transformiert werden. ETA ist ein Toxin, das über eine ADP-Ribosylierung den eukaryotischen Elongationsfaktor 2 inaktiviert und somit die Proteinbiosynthese inhibiert. Die eukaryontische Zelle geht anschließend in die Apoptose über. ETA, das rekombinant an Antikörperfragmente gebunden wird, ist ein in der Forschung zur Behandlung maligner Erkrankungen etabliertes Immunotoxin. Für die Klonierung von ETA in *L. monocytogenes* wurde der Promotor des Aktinakkumulierenden Faktors A (ActA) verwendet. Damit wird sichergestellt, dass ETA erst induziert wird, wenn sich das Bakterium im Zytosol der infizierten Zelle befindet. So sollen die mit *L. monocytogenes* spezifisch infizierten malignen Zellen durch die intrazelluläre Produktion von ETA direkt geschädigt werden. Diese Schädigung von eukaryontischen Zellen soll mit Mikroskopie, mit der Untersuchung der metabolischen Aktivität der infizierten Zellen und mit Durchflusszytometrie untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 1: Liste der verwendeten Bakterienstämme.

Name	Herkunft der Bakterienstämme
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e 1/2a	(Glaser et al. 2001)
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e 1/2a $\Delta$ <i>inlAB2</i>	(Parida et al. 1998)
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e 1/2a_pIMK2 + <i>spa</i>	Y. Yin, am Institut für Medizinische Mikrobiologie der JLU Gießen
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e 1/2a $\Delta$ <i>inlAB2</i> _pIMK2 + <i>spa</i>	Diese Arbeit
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e 1/2a $\Delta$ <i>inlAB2</i> _pIMK2	Diese Arbeit
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e 1/2a_pERL3 + <i>eta</i>	Diese Arbeit
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e 1/2a $\Delta$ <i>inlAB2</i> _pERL3 + <i>eta</i>	Diese Arbeit
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e 1/2a $\Delta$ <i>inlAB2</i> _pIMK2 + <i>spa</i> _pERL3 + <i>eta</i>	Diese Arbeit
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e 1/2a_pERL3	Hartl (1990); Leimeister-Wächter et al. (1990)
<i>Escherichia coli</i> DH10 $\beta$	(Durfee et al. 2008)

#### 2.1.2 Verwende Zelllinien

Tabelle 2: Liste der verwendeten Zelllinien.

Abkürzung	Kurzbeschreibung	Spezies	Zellherkunft
KM-H2 (Kamesaki et al. 1986)	Hodgkin Lymphom	Human	Pleuraerguss
DMS-273	Kleinzelliges Bronchialkarzinom	Human	Pleuraerguss
P388D1	Makrophagen	Murin	Lymphom

#### 2.1.3 Verwendete Plasmide

Zur Klonierung von *S. aureus* Protein A (*spa*) in *L. monocytogenes* wurde als Vektor das Plasmid pIMK2 verwendet. Die Besonderheit dieses Plasmides ist die Integration in das Genom von *L. monocytogenes*. (Monk et al. 2008) Dieser Umstand macht es möglich, zusätzlich zu pIMK2 weitere Plasmide in *L. monocytogenes* zu klonieren, wie es in dieser Arbeit durchgeführt wurde.

Material und Methoden

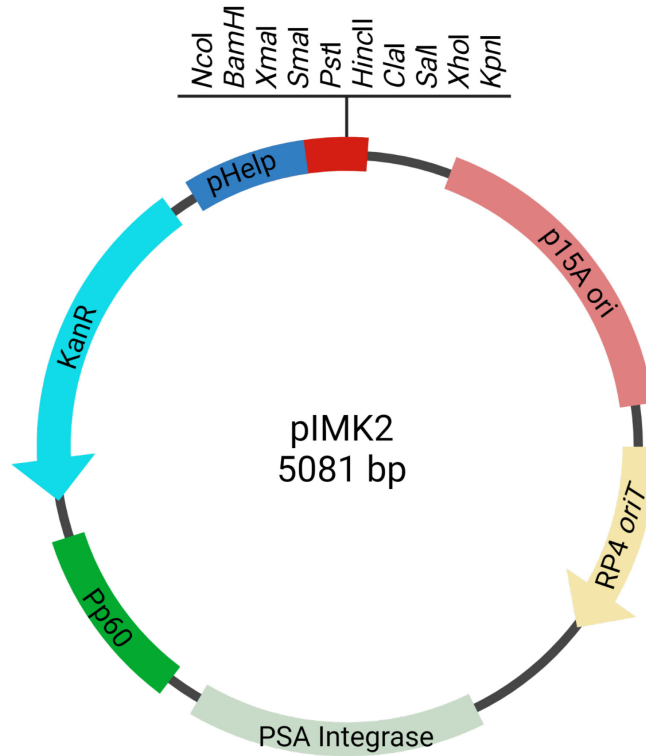


Abbildung 9: : Plasmidkarte des Vektors pIMK 2 Abbildung in Anlehnung an (Monk et al. 2008) erstellt mit BioRender.com.

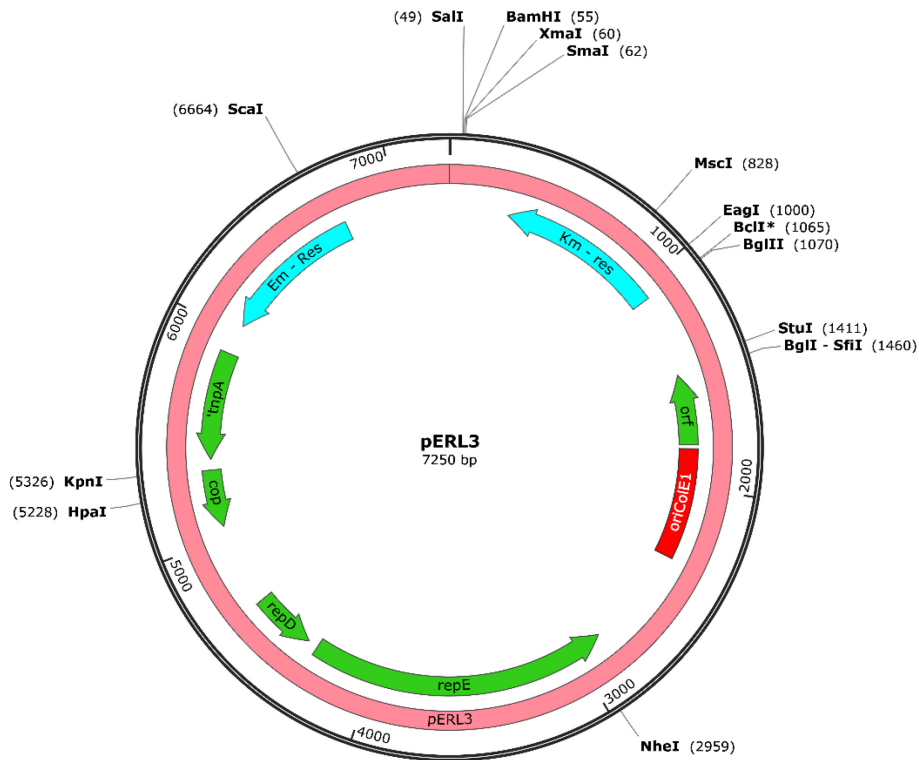
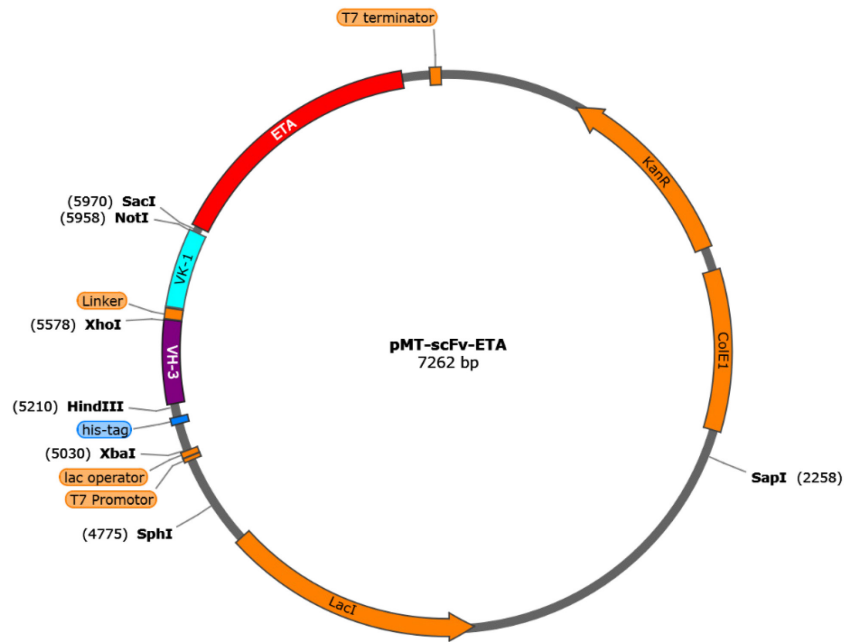


Abbildung 10: Plasmidkarte des Vektors pERL3. (Abb. erstellt mit SnapGene®)



**Abbildung 11: Plasmidkarte des Plasmides pMT-scFv-ETA (Institut für Pathologie der JLU Gießen)**  
(Abb. erstellt mit SnapGene®)

### 2.1.4 Oligonukleotide (Primer)

Die verwendeten Primer wurden bei Eurofins Genomics bestellt. Die Bereiche der Überhänge zur Klonierung sowie der eingefügten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Die Primer wurden nach Herstellerangaben mit Reinstwasser (MQ-H<sub>2</sub>O) verdünnt.

**Tabelle 3: Primer zur Klonierung von pIMK2 + spa.**

Name Primer	Sequenz (5'-3')
HM-pIMK-Pp1 for	<u>GGTAGTATCAT</u> GAAAAAGAAAAACATTTATTCAATTCGT
HM-pIMK-Pp2 rev	<u>GCAGATGTCGACG</u> TGTTAATCAACGTATATAAG

Die eingefügten Überhänge für die Klonierung und zum Einfügen von Restriktionsenzymen sind unterstrichen.

**Tabelle 4: Primer zur Sequenzierung von pIMK2 + spa.**

Name Primer	Sequenz (5'-3')
HM-SpaPrim 1 rev	CTTGGGTCATCTTTTAAGCTTTGG
HM-SpaPrim 2 rev	GTTGCCGTCTTCTTTGCCAGG

**Tabelle 5: Primer zur Klonierung von pERL3 + eta.**

Name Primer	Sequenz (5'-3')
HM_ActA Prom for	<u>GCGCCTCGAG</u> TTAACAAATGTTAGAGAAAAA
HM_ActA Prom rev	TTTTTTTCAITTTATACTCCCTCCTCGTGATACG
HM_hly Sign for	<u>GGGAGTATAA</u> ATGAAAAAATAATGCTAG
HM_hly ETA rev	<u>CGCCCTCGGG</u> CTTTGCTTCAGTTTGTTGCGC

HM_ETA Gen for	<u>CTGAAGCAAAGCCCGAGGGCGGCAGCCTGG</u>
LT_ETA-Spel for	<u>GCGCACTAGTTTGTAAAAGTAATAAAAAATTAAG</u>
LT_ETA-Spel rev	<u>GCGCACTAGTTTACTTCAGGTCCTCGC</u>
HM_Term Bam rev	<u>GCGCGGATCCGGCTTATATTATATGGATAAAC</u>

Die eingefügten Überhänge für die Klonierung und zum Einfügen von Restriktionsenzymen sind unterstrichen.

**Tabelle 6: Liste der verwendeten Primer zur Sequenzierung von pERL3 + eta.**

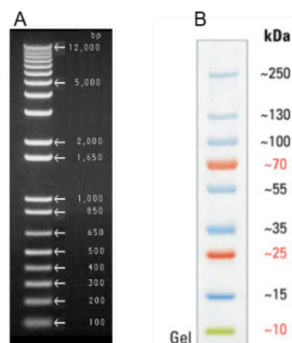
Name Primer	Sequenz (5'-3')
HM_ETA Seq 1	GCTGGCCAGGGCGTTGCG
HM_ETA Seq 2	CGCCGGTGAATGCGCGGG
HM_ETA Seq 3	GTTTCTATATCGCCGGCGATC
HM_ETA Seq 4	CTGGAGACCATTCTCGGC

### 2.1.5 Verwendete Antikörper

**Tabelle 7: Liste der verwendeten Antikörper.**

Name	Herkunft	Verwendung
Ki-4-scFv-Fc	Institut für Pathologie der JLU Gießen (Klimka et al. 1999)	Infektionsversuche, Durchflusszytometrie
SCBC-scFv-Fc	Institut für Pathologie der JLU Gießen (Haaf et al. 2015)	Infektionsversuche
Monoclonal Anti Protein A antibody produced in mouse P2921	Sigma-Aldrich	Western Blot Primäran-tikörper
TC-1 Anti ETA	(Galloway et al. 1984), zur Verfügung gestellt vom Institut für Pathologie der JLU Gießen	Western Blot Primäran-tikörper
m-IgGk BP-HRP (anti-mouse IgG-HRP)	Santa Cruz Biotech	Western Blot Sekundäran-tikörper
Alexa Fluor 448 rabbit anti mouse	Abcam	Durchflusszytometrie Sekundäran-tikörper
Anti Protein A antibody (Texas Red)	Abcam	Durchflusszytometrie

### 2.1.6 DNA- und Proteingrößenstandards



**Abbildung 12: Verwendete DNA- und Proteingrößenstandards. A:** 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen 10787-018) **B:** PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa (Thermo Fisher 26619)

## 2.1.7 Verwendete Chemikalien

Tabelle 8: Liste der verwendeten Chemikalien.

Name	Hersteller	Katalognummer
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	63689-100ML-F
2-Propanol (Isopropanol)	Sigma-Aldrich	33539-2.5L-M
6-Aminohexansäure	Sigma-Aldrich	A2504-100G
Acetic acid, glacial	Sigma-Aldrich	A-6283
Agarose Standard	Roth	3810.1
Ameisensäure 98-100%	Merck	100264
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck	101201
Borsäure	Merck	1001651000
Bovine Serum Albumin	Sigma-Aldrich	A9647-50G
Bromphenol Blue	SERVA	15375
Calciumchlorid	Roth	CN92.2
Coomassie Brilliant Blue R	GERBU	1097
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck	1065801000
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck	1.09678.0100
EDTA-disodium	SERVA	11280
Erythromycin	Sigma-Aldrich	E-6376
Ethanol	Sigma-Aldrich	32205-2.5L-M
Ethidiumbromidlösung 0,5% i.d.	Roth	HP46.1
Ficoll 400	Roth	CN90.3
Gentamicin sulfate salt	Sigma-Aldrich	G1264-250MG
Glucose	Roth	X997.1
Glycerol	Merck	1040921000
HEPES	SERVA	25245
Kaliumacetat	Roth	T874.1
Kaliumchlorid	Roth	P017.1
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	1048731000
Kanamycin sulfate from Streptomyces kanamyceticus	Sigma-Aldrich	K4000-50G
Luminol	Sigma-Aldrich	A8511-5G
Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat	Roth	T881.1
Magnesiumchlorid	Merck	814733
Magnesiumsulfat	Merck	106067
Methanol	Sigma-Aldrich	32213-2.5L-M
MTT	Merck	1.11714
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich	31434-1KG-M
Natriumchlorid	Roth	3957.1
Natriumhydroxid	Roth	6771.1
p-Coumaric acid (Parahydroxycumarinsäure)	Sigma-Aldrich	C9008-25G

Penicillin G sodium salt	Sigma-Aldrich	PENNA-10MU
Saccharose	Roth	9097.1
Salzsäure 32% reinst	Merck	3132500
Natriumdodecylsulfat (SDS) ultra pure	Roth	2326.2
Skim Milk Powder	Sigma-Aldrich	70166-500G
Trichloroacetic acid	SERVA	36910.03
TRIS	Roth	4855.2
Triton X-100	SERVA	37240
Tween 20	SERVA	37470
Wasserstoffperoxidlösung 30%	Sigma-Aldrich	H1009

### 2.1.8 Verwendete gebrauchsfertige Chemikalien

**Tabelle 9: Liste der verwendeten gebrauchsfertigen Chemikalien.**

Name	Hersteller	Katalognummer
Acrylamide/Bis Solution, 37.5:1 (30 % w/v), 2.6 %	SERVA	10688.01
BD FACSClean	Becton Dickinson	340345
BD FACSTlow	Becton Dickinson	342003
dNTP-Set (100 mM)	Thermo Fisher	10297018
EDTA-Lösung (0,5 M; pH = 8,0)	Thermo Fisher	10135423
Protease Inhibitor Cocktail (100 x)	Bioutil	B14001
Protein Assay Dye Reagent	Bio - Rad	5000006
TEMED	SERVA	35925.01

### 2.1.9 Verwendete Kits

**Tabelle 10: Liste der verwendeten Kits.**

Name	Hersteller	Katalognummer
BD Accuri C6 Flow Cytometer Fluid Kit	Becton Dickinson	653158
CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit	Thermo Fisher	C10740
FastDigest Bcul (SpeI Isoschizomer)	Thermo Fisher	FD1253
FastDigest NcoI	Thermo Fisher	FD0573
FastDigest PglI (BspHI Isoschizomer)	Thermo Fisher	FD1284
FastDigest Sall	Thermo Fisher	FD0644
FastDigest XhoI	Thermo Fisher	FD0695
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher	K0691
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen	27104
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	28106
T4-DNA-Ligase	Thermo Fisher	15224041
Taq-DNA-Polymerase	Thermo Fisher	EP0401
XmaI (Cfr9I)	Thermo Fisher	ER0171

### 2.1.10 Chemikalien zur Herstellung von Medien zur Bakterienkultivierung

Tabelle 11: Liste der verwendeten Chemikalien zur Bakterienkultivierung.

Name	Hersteller	Katalognummer
Bacto Agar	Becton Dickinson	214010
Bacto Brain Heart Infusion	Becton Dickinson	237500
Hefeextrakt	Becton Dickinson	212750
PBS Dulbecco	Biochrom	L1825
Trypton	Becton Dickinson	211705

### 2.1.11 Medien und Puffer zur Kultivierung eukaryontischer Zellen

Tabelle 12: Liste der verwendeten Medien und Puffer zur Kultivierung eukaryontischer Zellen.

Medium	Hersteller	Katalognummer
Waymouth's MB 752/1 Medium (1X)	Thermo Fisher	31220-023
RPMI Medium 1640	Thermo Fisher	21875-034
Trypsin/EDTA Solution (0,05%/0,02%) in PBS	Biochrom	L2143
PBS Dulbecco	Biochrom	L1825
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom	SO115

### 2.1.12 Herstellung von Medien und Puffern zur Kultivierung von Bakterien

#### Luria Bertani-Medium (LB Medium)

Reagenz	Masse
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g

Ad 1 | H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden in vollentsalztem Wasser (VE-H<sub>2</sub>O) gelöst. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde der Lösung 15 g/l Bactoagar hinzugesetzt. Die Lösung wurde anschließend autoklaviert und steril in 92 x 16 mm Petrischalen mit ca. 20 ml pro Schale abgefüllt.

#### Brain Heart Infusion Medium (BHI Medium)

Reagenz	Masse
Bacto Brain Heart Infusion	37 g

Ad 1 | H<sub>2</sub>O

Es wurden 37 g Bacto Brain Heart Infusion in 1 l VE-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Lösung wurde anschließend autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde der Lösung vor dem Autoklavierungsprozess 15 g/l Bactoagar hinzugesetzt. Die Lösung wurde anschließend autoklaviert und steril in 92 x 16 mm Petrischalen mit ca. 20 ml pro Schale abgefüllt.

### BHI 0,5 + 0,5 M Saccharose

Reagenz	Masse/Volumen
2 x BHI Medium	250 ml
1 M Saccharose in H <sub>2</sub> O	250 ml

BHI Medium in doppelter Konzentration (74 g Bacto Brain Heart Infusion /l) wurde 1:1 mit 1 M Saccharose in VE-H<sub>2</sub>O gemischt und anschließend autoklaviert.

### SOC Medium

Zur Herstellung von SOC Medium wurde Super Optimal Broth (SOB Medium) hergestellt und anschließend mit 20 mM Glucose versetzt.

Reagenz	Masse/Volumen
Trypton	10 g
Hefeextrakt	2,5 g
NaCl	0,29 g
KCl	0,093 g
MgCl <sub>2</sub>	0,48 g
MgSO <sub>4</sub>	0,6 g
Glucose	1,8 g

Ad 500 ml H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden in VE-H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde die Lösung autoklaviert.

### Selektive Medien

BHI und LB Medien wurden wie oben beschrieben hergestellt. Anschließend wurden sie nach dem Autoklavierungsprozess mit einem der folgenden Antibiotika versetzt:

Antibiotikum	Nährmedium	Konzentration	Lösungsmittel
Erythromycin	BHI	5 µg/ml	96 % Ethanol
Erythromycin	LB	300 µg/ml	96 % Ethanol
Kanamycin	BHI	50 µg/ml	MQ-H <sub>2</sub> O
Kanamycin	LB	50 µg/ml	MQ-H <sub>2</sub> O

### Puffer zur Herstellung kompetenter Bakterien

#### CCMB80 Puffer

Reagenz	Masse/Volumen
CaCl <sub>2</sub>	11,76 g
MnCl <sub>2</sub>	3,96 g
MgCl <sub>2</sub>	2,03 g
Kaliumacetat 1M pH = 7,0	10 ml
Glycerin	100 ml

Ad 1 l H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden in VE-H<sub>2</sub>O gelöst. Es wurde mit HCl pH = 6,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung in eine zuvor autoklavierte Flasche steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

#### HEPES-Saccharose Puffer

Reagenz	Masse/Volumen
10 mM HEPES pH = 7	50 mL
1 M Saccharose	250 mL

Ad 500 ml H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden in VE-H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde die Lösung in eine zuvor autoklavierte Flasche steril filtriert und bei 4 °C gelagert.

#### HEPES-Saccharose-Glycerin

Reagenz	Masse/Volumen
10 mM HEPES pH = 7	50 ml
1 M Saccharose	250 ml
Glycerin	50 ml

Ad 500 ml H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden in VE-H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde die Lösung in eine zuvor autoklavierte Flasche steril filtriert und bei 4° C gelagert.

### 2.1.13 Antibiotikastammlösungen

**Tabelle 13:** Liste der verwendeten Antibiotikastammlösungen.

Antibiotikum	Konzentration	Lösungsmittel
Erythromycin	30 mg/ml	Ethanol 70%
Gentamicin	50 mg/ml	MQ-H <sub>2</sub> O
Kanamycin	50 mg/ml	MQ-H <sub>2</sub> O
Penicillin	10 mg/ml	MQ-H <sub>2</sub> O

Die Antibiotika wurden in dem entsprechenden Lösungsmittel gelöst und anschließend steril filtriert. Die Lagerung von Erythromycin und Penicillin erfolgte bei -20 °C. Die Lagerung von Kanamycin und Gentamicin erfolgte bei 4 °C.

### 2.1.14 Herstellung von Puffern und Lösungen

#### 1 x Phosphat gepufferte Saline (PBS)

Reagenz	Masse/Volumen
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,78 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,27 g

Ad 1 l H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden in 1 l VE-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Lösung wurde anschließend autoklaviert.

**5 x TBE Puffer**

Reagenz	Masse/Volumen
TRIS	54 g
Borsäure	27,5 g
EDTA 0,5 M pH = 8,3	10 ml

Ad 1 l H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden zunächst in VE-H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend autoklaviert. Zur Herstellung von 1 x TBE Puffer wurde die hergestellte Lösung 1:5 in VE-H<sub>2</sub>O verdünnt.

**10 x TBS Puffer pH = 7,5**

Reagenz	Masse
TRIS	12,1 g
NaCl	90 g

Ad 1 l H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden in 1 l MQ-H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde durch Zugabe von HCl pH = 7,5 eingestellt

**1 x TBS/Tween 20**

Reagenz	Masse/Volumen
10 x TBS	100 ml
Tween 20	1 ml

Ad 1 l H<sub>2</sub>O

**TE Puffer**

Reagenz	Masse/Volumen
TRIS	1,21 g
0,5 M EDTA pH = 8,0	2 ml

Ad 1 l H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden in VE-H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde mit HCl pH = 8,0 eingestellt.

**Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese**

Reagenz	Masse/Volumen
Ficoll 400	2,5 g
Bromphenolblau	0,25 g
TE Puffer	Ad 10 ml

**Puffer für SDS-PAGE und Western Blot**

**10 x Laufpuffer pH = 8,3**

Reagenz	Masse
TRIS	30,3 g
Glycerin	144 g
Natriumdodecylsulfat (SDS)	10 g

Ad 1 l H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden in MQ-H<sub>2</sub>O gelöst, anschließend wurde mit HCl pH = 8,3 eingestellt. Um 1 x Laufpuffer zu erhalten, wurde die hergestellte Lösung 1:10 mit MQ-H<sub>2</sub>O verdünnt.

**1,5 M TRIS pH = 8,8**

Reagenz	Masse
TRIS	36,36 g

Ad 200 ml H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden in MQ-H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde mit HCl pH = 8,8 eingestellt.

**1,0 M TRIS pH = 8,8**

Reagenz	Masse
TRIS	24,22 g

Ad 200 ml H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden in MQ-H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde mit HCl pH = 8,0 eingestellt.

**0,5 M TRIS pH = 6,8**

Reagenz	Masse
TRIS	12,11 g

Ad 200 ml H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden in MQ-H<sub>2</sub>O gelöst. Anschließend wurde mit HCl pH = 6,8 eingestellt.

**25 % Ammoniumperoxiddisulfat (APS)**

Reagenz	Masse
APS	2,5 g

Ad 10 ml H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden in MQ-H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei – 20 °C gelagert.

### 10 % Natriumdodecylsulfat (SDS) in H<sub>2</sub>O

Reagenz	Masse
SDS	25 g

Ad 250 ml H<sub>2</sub>O

SDS Pulver wurde in VE-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur (RT).

### Coomassie Brilliant Blue Färbelösung

Reagenz	Masse/Volumen
Methanol	200 ml
Essigsäure	50 ml
Coomassie Brilliant Blue	8 Tabletten

Ad 500 ml H<sub>2</sub>O

### Blitzentfärbelösung

Reagenz	Volumen
Methanol	400 ml
Essigsäure	100 ml

Ad 1 l H<sub>2</sub>O

### Western Blot Puffer I

Reagenz	Masse/Volumen
TRIS	1,817 g
Methanol	50 ml

Ad 500 ml H<sub>2</sub>O

### Western Blot Puffer II

Reagenz	Masse/Volumen
TRIS	1,514 g
Methanol	50 ml

Ad 500 ml H<sub>2</sub>O

### Western Blot Puffer III

Reagenz	Masse/Volumen
6-Amino-N- Hexansäure	2,624 g
Methanol	50ml

Ad 500 ml H<sub>2</sub>O

### TBS-Tween

Reagenz	Volumen
10 x TBS	100 ml
Tween 20	1 ml

Ad 1 l H<sub>2</sub>O

Die Lagerung erfolgte bei RT.

**5 % Milch in TBS-Tween**

Reagenz	Masse/Volumen
Skim milk powder	1,5 g
TBS - Tween	Ad 30 ml

Das Milchpulver wurde in TBS-Tween gelöst. Die Lösung wurde vor jedem Experiment frisch angesetzt.

**8 x Probenladepuffer (Laemmli 1970)**

Reagenz	Volumen
Glycerin	4 ml
10 % SDS in H <sub>2</sub> O	2 ml
B-Mercapto-Ethanol	800 µl
0,5 M TRIS, pH = 6,8 in H <sub>2</sub> O	145 µl
Bromphenolblau	350 µl

Ad 10 ml H<sub>2</sub>O

Die Reagenzien wurden in MQ-H<sub>2</sub>O gelöst und anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

**Herstellung von Gelen zur Polyacrylamid Proteinelektrophorese**

**Sammelgel (10 %)**

Reagenz	Volumen
1,5 M TRIS pH = 8,8	3,8 ml
MQ-H <sub>2</sub> O	6,1 ml
30 % Acrylamid, 2,6 % Bisacrylamid	5,0 ml
10 % SDS in H <sub>2</sub> O	150 µl
TEMED	20 µl
25 % APS	20 µl

**Trenngel (4 %)**

Reagenz	Volumen
0,5 M TRIS pH = 6,8	1,25 ml
MQ-H <sub>2</sub> O	2,9 ml
30 % Acrylamid, 2,6 % Bisacrylamid	850 µl
10 % SDS in H <sub>2</sub> O	50 µl
TEMED	10 µl
25 % APS	10 µl

**Western Blot ECL Detektionsreagenz**

**ECL Lösung A**

Reagenz	Masse/Volumen
0,1 M TRIS – HCl pH = 8,6	200 ml
Luminol	50 mg

Lagerung im Kühlschrank

### ECL Lösung B

Reagenz	Masse/Volumen
Para – Hydroxycoumarinsäure	11 mg
Dimethylsulfoxid	10 ml

Lagerung im Dunkeln bei RT.

### Herstellung von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Stocklösung

Reagenz	Masse/Volumen
MTT	5 mg
PBS	Ad 1 ml

Lagerung bei -20 °C.

### Puffer für die Durchflusszytometrie

#### PBS + 0,2 % BSA

Reagenz	Masse/Volumen
Bovines Serumalbumin (BSA)	20 mg
PBS	Ad 10 ml

BSA wurde in PBS gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

#### PBS + 2 % BSA

Reagenz	Masse/Volumen
Bovines Serumalbumin (BSA)	200 mg
PBS	Ad 10 ml

BSA wurde in PBS gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

## 2.1.15 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 14: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Name	Hersteller	Katalognummer
0,2 mL Thin-walled 8 Tube Strips	Thermo Fisher	AB-0264
0,2 mL Thin-walled Tubes with Flat Caps	Thermo Fisher	AB-0622
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare	28906837
Cell Scraper 16cm	Sarstedt	831832
Cell Scraper 25cm	Sarstedt	831830
Cryogenic Vial 2,0 ml	Thermo Fisher	5000 - 0020
Filtropur V50 500ml 0.22µm	Sarstedt	83.1823.001
Elektroporationsküvette	Biozym	748011
Erlenmeyerkolben 100 ml	Kimble KIMAX	66650
Erlenmeyerkolben 300 ml	ILMABOR TGI	33.527.509
Erlenmeyerkolben 1000 ml	ILMABOR TGI	33.527.514
Filterspitze natur 0,1-10µl	nerbe plus	07-613-8300
Filtropur BT50 500 ml	Sarstedt	833941101
Flat 8 Cap Strips	Thermo fisher	AB-0784

## Material und Methoden

Gel Blot Paper	Whatman	10426892
Impfeschlinge 10 µl, blau	Sarstedt	861562050
Küvetten Schichtdicke 1 cm	SARSTEDT	67742
Lysing Matrix B	MPBio	6911-100
Microplate 96 Well F-Boden	Greiner bio-one	655101
Microplate 96 Well U-Boden	Greiner bio-one	650101
Mikro-Schraubröhre 1,5 ml	Sarstedt	72692005
Mikro-Schraubröhre 2 ml	Sarstedt	72694006
Millex® 33mm syringe filter unit PVDF 0,22 µm, steril	Millipore	SLGV033R
Millex® 33mm syringe filter PES 0,22µm steril	Millipore	SLGPR33RB
Petrischalen 92x16mm	Sarstedt	821473
Pipette 10ml	Greiner bio-one	607180
Pipette 25 ml	Greiner bio-one	760180
Pipette 2 ml	Greiner bio-one	710180
Pipette 50 ml	Greiner bio-one	768180
Pipette 5 ml	Greiner bio-one	606180
Pipettenspitze blau 1000 µl	Sarstedt	70762010
Pipettenspitze farblos 10 µl	Sarstedt	701114105
Pipettenspitze gelb 200 µl	Sarstedt	70760012
PVDF Western Blotting Membranes	Roche	3010040001
Röhrchen 12 mL 17/77 mm runder Boden	Greiner bio-one	184261
Röhrchen 15 mL 17/120 mm, konischer Boden	Greiner bio-one	188271
Röhrchen 50 mL 30/115 mm, konischer Boden	Greiner bio-one	227261
Röhrchen 50 mL 30/115 mm, konischer Boden, Stehrand	Greiner bio-one	210261
SafeSeal Gefäß 1,5ml	Sarstedt	72706
SafeSeal Gefäß 2ml	Sarstedt	72695500
Spritze Injekt 20 ml	Sarstedt	4606205V
Tissue culture Dish 100x20 mm	Greiner bio-one	353003
Tissue culture Plate 24 Well	Falcon	353226
UNIMATIC-D Entwicklerlösung	Calbe Chemie	10091
UNIMATIC-F Entwicklerlösung	Calbe Chemie	10094
Vasco Nitril White Handschuhe	B. Braun	9208437
Zahnstocher	Roth	EC48.1

### 2.1.16 Verwendete Geräte

**Tabelle 15: Verwendete Geräte.**

Name	Modellbezeichnung	Hersteller
Abzug		Wesemann
Agarosegeldokumentationsgerät	Gene Doct <sup>TM</sup> -System	Bio-Rad

Material und Methoden

Autoklav		Schlumbohm
Bunsenbrenner	Fireboy Eco	Integra Bioscience
CO <sub>2</sub> – Inkubator	Incubator C16	Labotect
CO <sub>2</sub> – Inkubator	Model 3035	Forma Scientific
Digitalkamera		Nikon
Drehtisch zum Ausplattieren		Schuett Biotec
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson
Durchflusszytometer	C6 Accuri	Becton Dickinson
Einfrierkammer für eukaryontische Zellen	5100 - 0001	Nalgene
Eismaschine		Ziegra
Erlenmeyerkolben 100 ml	66650	Kimble KIMAX
Erlenmeyerkolben 300 ml	33.527.509	ILMABOR TGI
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE		Biometra
Elektrophoresekammer für Agarosegele		Eigenbau des Instituts
Elektrophoresekammer für Western Blot		Eigenbau des Instituts
Elektroporationsgerät	Pulse Controller, Capacitance Extender, Gene Pulser	Bio - Rad
Entwicklungsgerät für Röntgenfilme	CURIX 60	AGFA
Gefrierschrank -20 °C	GP 3513	Liebherr
Gefrierschrank -80 °C	HERAfreeze HFU T Ultra Low Temperature Freezer	Thermo Fisher
Heizblock	ThermoMixer C®	Eppendorf
Hochgeschwindigkeitshomogenisierer	FastPrep-24™	MP Biomedicals
Inkubator 37 °C	Modell 30-1060	Memmert
Kolonienzähler	Scan 500	Interscience
Kühlschrank 4 °C	KSR38A01	Bosch
Lichtmikroskop	Wilovert S	Hund (Wetzlar)
Magnetrührer	IKAMAG RCT	IKA Labortechnik
Mikroliterpipetten	1000 µl, 200 µl, 100 µl, 10 µl	Eppendorf
Mikrowelle		AEG
NanoDrop	ND-100 UV-Vis Spectrophotometer	Thermo Fisher
Neubauer-Zählkammer		Labor - Optik
PCR - Thermocycler	2720 Thermal cycler	Applied Biosystems
pH – Meter	SevenEasy	Mettler - Toledo
Photometer (Küvetten)	Ultrospec 10 Cell Density Meter	Amersham

Photometer (Platten)	NanoQuant, infinite M200 (Pro)	Magellan™, Tecan
Pipettiergerät	Pipetboy acu	IBS Integra
Plattenschüttler	Heidolph Polymax 1040	Heraeus
Reinstwasseranlage	Millipore MilliQ	Millipore
Röntgenfilmkassette	Hypercassette	Amersham
Rotor für 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße	Rotor FA-45-24-11	Eppendorf
Rotor für 15 ml, 50 ml Reaktionsgefäße	BS 4402/A	Heraeus Instruments
Schüttelinkubator	KS4000 iconrol	IKA Labortechnik
Schüttelinkubator	Certomat® BS - 1	Sartorius
Sicherheitswerkbank S2	HS 18	Heraeus
Sicherheitswerkbank Zellkultur	NU 440 401E	Nuaire
Spannungsquelle für Agarosegelelektrophorese	E 455 Microcomputer	Consort
Spannungsquelle für SDS – PAGE	E 865 Microcomputer	Consort
Taumler		Heidolph
Tischzentrifuge	MiniStar silverline	VWR
UV – Tisch	ECX – F20.L	Vilber Lourmat
Vakuumpumpe	N820	Neuberger
Vortexer	Vortex Genie II	IKA Labortechnik
Wasserbad 42 °C	E100	Lauda
Waage		Kern
Zentrifuge für 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße	5424	Eppendorf
Zentrifuge für 1,5 ml und 2,0 ml Reaktionsgefäße mit Kühlfunktion	5424R	Eppendorf
Zentrifuge für 15 ml und 50 ml Reaktionsgefäße	Megafuge 1.0 R	Heraeus Instruments

### 2.1.17 Verwendete Software

Tabelle 16: Verwendete Software.

Name	Verwendungszweck
BD Accuri C6 Software 1.0.264.21	Durchflusszytometrie Datenerhebung und Analyse
Bio Render (BioRender.com)	Abbildungserstellung
DNASTAR Lasergene 8 Pack	Software Pack für Arbeiten mit DNA
DNASTAR SeqBuilder V. 8.0.2	Erstellung, Bearbeitung und Visualisierung von DNA - Sequenzen
DNASTAR SeqMan Pro Version 8.0.2	Analyse der DNA-Sequenzierung
FACStation Software Pack 7.5.3	Durchflusszytometrie Datenerhebung und Analyse
Microsoft Excel 2010	Abbildungserstellung, Tabellen, Datenanalyse

Sigma Plot V. 10.0	Statistische Analyse
SnapGene	Erstellung von Plasmidkarten
Quantity One (Bio-Rad) Version 4.6.3	Dokumentation bei der Agarosegelelektrophorese

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit DNA

#### 2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die Amplifizierung von DNA wurde mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) gearbeitet. Die PCR ist ein thermozyklisches Verfahren, mit dessen Hilfe ausgewählte DNA-Sequenzen amplifiziert werden können. Die zu amplifizierende DNA wird zunächst durch Hitze bei einer Temperatur von 95°C denaturiert und somit in Einzelstränge aufgespaltet. Anschließend wird die Temperatur abgesenkt, sodass sich zu der aufgebrochenen DNA komplementäre Oligonukleotidsequenzen (Primer) anlagern können. Die Sequenz der Primer wurde so gewählt, dass sie sich beiden Enden der zu amplifizierenden DNA-Sequenz anlagern. Im nächsten Schritt der Reaktion erfolgt die DNA-Synthese durch eine hitzestabile DNA-Polymerase, zum Beispiel aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Diese so genannte *Taq*-Polymerase arbeitet bei einer Temperatur von 72°C und benutzt die der Reaktion zugefügten Primer als Startsequenz. Die Synthese der DNA erfolgt nun von beiden Enden der zu amplifizierenden Sequenz jeweils von 5' in 3' Richtung unter Verwendung der der Reaktion zugeführten Desoxyribonukleotidtriphosphaten (dNTPs). Durch Wiederholungen dieses Zyklus erfolgt die Amplifikation des ausgewählten Bereiches, da die Produkte aus vorherigen Zyklen als *template* dienen. Bei diesen *templates* gibt es im Gegensatz zur ursprünglichen DNA-Sequenz einen durch die Primer der vorherigen Zyklen festgelegten Endpunkt. Bei diesem Endpunkt bricht die Reaktion aufgrund von fehlenden folgenden Nukleotiden ab. Die gewünschte DNA-Sequenz wird so mit jedem Zyklus exponentiell vermehrt. Zu lange Sequenzen, bei denen die ursprüngliche DNA als *Template* dient nehmen mit jedem Zyklus nur linear zu.

PCR Reaktionen wurden mit dem *Taq DNA-Polymerase, recombinant Kit* (Invitrogen) in einem Thermocycler folgendermaßen durchgeführt:

#### Reaktionsansatz

Reagenz	Masse/Volumen
DNA-Template	50-100 ng
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µL)	0,15 µl
10x <i>Taq</i> DNA Polymerase Puffer	5 µl

MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl
dNTP-Mix (1,25 mM)	3 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Backward Primer (10 µM)	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

**PCR-Zyklus:**

Schritt	Beschreibung	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	95 °C	300 s
2	Denaturierung	95 °C	20 s
3	Annealing	Individuell nach Primer	30 s
4	Amplifizierung	72 °C	Individuell nach PCR-Produkt
5	Ende	4 °C	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden 30-mal wiederholt. Je nach Länge und Zusammensetzung des verwendeten Primers unterscheidet sich die *annealing*-Temperatur. Sie liegt knapp unter der Schmelztemperatur des Primers, diese kann in den Herstellerangaben nachgelesen oder mithilfe der Wallace-Regel ( $T_M = 2 * (A + T) + 4 * (G + C)$ ) berechnet werden und liegt meist im Bereich zwischen 50 - 60 °C. Die Dauer der Amplifizierung richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz und beträgt etwa 60 Sekunden je 1000 Basenpaare.

**2.2.1.2 Klonierung mittels PCR**

Das Design der Primer kann dazu verwendet werden, PCR-Produkte aus verschiedenen Reaktionen mittels erneuter PCR zu einer Sequenz zu fusionieren. Hierzu müssen die Primer an ihrem 5' Ende einen Überhang aufweisen, der zur eigentlichen Amplifizierung des Produkts nicht benötigt wird. Dieser Überhang ist so ausgewählt, dass er komplementär zu dem 3' Ende der zu fusionierenden Sequenz ist. Die *Taq*-Polymerase amplifiziert den Überhang regulär, sodass die amplifizierte Sequenz um die durch den Primer gewählten Basenpaare verlängert wird. In einer Fusions-PCR kann nun mit beiden zu fusionierenden Produkten als Template gearbeitet werden. Als *forward* Primer wird der *forward* Primer von Produkt 1 genutzt, als *backward* Primer der *backward* Primer von Produkt 2. Während der *annealing* Phase lagert sich das durch den Überhang komplementäre 3'-Ende von Produkt 1 an das 5'-Ende von Produkt 2 an, und die Polymerase amplifiziert die entstandene Sequenz als ein einziges PCR-Produkt. So können beliebige DNA-Sequenzen miteinander fusioniert oder Schnittstellensequenzen für spezifische Restriktionsenzyme an den Anfang oder das Ende von PCR-Produkten hinzugefügt werden.

### 2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese

Agarose ist ein Polysaccharid bestehend aus D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-galactose. Gelöst bildet es Polymere, die ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Die Porengröße dieses Netzwerkes nimmt mit zunehmender Agarosekonzentration ab. In der Agarosegelelektrophorese wird es dazu verwendet, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. DNA ist aufgrund ihres Phosphatrückgrates negativ geladen, sodass es sich in einer Elektrophoresekammer in Richtung der Anode bewegt. Aufgrund der Porengröße im Agarosegel bewegen sich kürzere DNA-Fragmente schneller zur Anode als größere, sodass eine Auftrennung erreicht werden kann.

In dieser Arbeit wurde die Agarosegelelektrophorese mit Gelen, die 1 % Agarose (m/v) enthielten, durchgeführt. Zur Herstellung wurde 1 % Agarose in 1 x TBE Puffer in einem Erlenmeyerkolben suspendiert und durch Aufkochen in einer Mikrowelle in Lösung gebracht. Zur späteren Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht wurde der Lösung Ethidiumbromid in flüssiger Form hinzugefügt. Die Lösung wurde anschließend in eine horizontale Gelschablone mit Kamm zur Herstellung von Taschen gegossen und bei Raumtemperatur für eine Stunde aushärten gelassen. Das feste Gel wurde in eine horizontale mit 1 x TBE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. 10 µl DNA-haltige Lösung wurde mit 6 µl Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese mittels Pipettieren vermischt und in die Taschen des Elektrophoresegels pipettiert. Die Elektrophorese wurde für 1 Stunde bei folgenden Einstellungen durchgeführt: 100 W, 150 V, 150 mA.

Ethidiumbromid interkaliert in DNA-Doppelsträngen. Dabei verändert es sein Absorptionsspektrum. Die Intensität der Fluoreszenz nimmt bei interkaliertem Ethidiumbromid deutlich zu, sodass DNA-Fragmente im Gel unter UV-Licht als Banden sichtbar gemacht werden können.

Nach der Elektrophorese erfolgte die Visualisierung in einer UV-Kammer, das Ergebnis wurde als Foto dokumentiert. Als Größenvergleich diente der DNA - Größenstandard *1 Kb Plus DNA Ladder*, (invitrogen, Abb. 12).

### 2.2.1.4 Aufreinigung von DNA

Zur Aufreinigung von DNA wurde das *MinElute PCR Purification Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben angewendet.

Die DNA enthaltende Probe wurde zunächst mit Binding Buffer vermischt. Für Ansätze bis 50 µl DNA enthaltender Probe wurden 250 µl Binding Buffer, für Ansätze von 50 µl - 100 µl DNA enthaltender Probe wurden 500 µl Binding Buffer hinzugefügt. Die Proben wurden mit dem Vortexer gründlich vermischt. Anschließend wurde die Probe in die dafür vorgesehenen Säulen pipettiert. Die Säulen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße gesteckt und bei 13200 *relative centrifugal force* (rcf) für 3 min und

Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der in den Reaktionsgefäßen aufgefangene DNA-freie Durchlauf wurde verworfen. Die Säulen wurden anschließend erneut bei 13200 rcf für 3 min bei RT zentrifugiert und danach in frische Reaktionsgefäße überführt. Es wurde zur Elution 20 µl MQ-H<sub>2</sub>O auf die Säulen pipettiert und für 1 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 13200 rcf für 1 Minute bei RT. Die in den Reaktionsgefäßen aufgefangene eluierte DNA wurde zur Konzentrationsbestimmung am *NanoDrop* gemessen und anschließend bei – 20 °C gelagert.

#### **2.2.1.5 Isolierung von DNA aus Agarosegel**

Während der PCR kann es durch unspezifische Bindung der Primer am *template* zur Amplifizierung von Nebenprodukten kommen. Die Sequenz dieser Nebenprodukte entspricht nicht der Sequenz der eigentlich zu amplifizierenden DNA-Fragmente. Um diese Nebenprodukte für die weitere Klonierung zu eliminieren, gibt es die Möglichkeit, die DNA aus der Bande mit der gewünschten Länge nach der Agarosegelelektrophorese zu extrahieren.

Hierzu wurde das *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben verwendet. Die Bande mit der gewünschten Länge wurde unter Zuhilfenahme eines DNA-Größenstandards auf einem UV-Tisch identifiziert und mit einem Skalpell ausgeschnitten. Das Gel wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Mit einer Waage wurde das Gewicht des extrahierten Gelstückes bestimmt. Anschließend wurde pro 1 µg Gelgewicht 1 µl Binding Buffer zu dem Gel pipettiert. Danach wurde das Gel auf einem 55 °C warmen Heizblock erwärmt, bis es sich komplett gelöst hatte. Während der Wärmephase wurde die Probe mehrfach mit dem Vortexer gemischt. Die Lösung wurde auf die im Kit enthaltenen Säulen pipettiert und bei 13200 rcf für 1 min bei RT zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Auf die Säulen mit der gebundenen DNA wurde 700 µl Wash Buffer pipettiert. Die Säulen wurden erneut bei gleichen Einstellungen zentrifugiert, der Durchlauf wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, um möglichst viele Reste des Puffers zu entfernen. Die Säulen wurden in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Elution wurde 50 µl MQ-H<sub>2</sub>O auf die Säulen pipettiert und für 1 min inkubiert. Die Säulen wurden dann bei 13200 rcf für 1 min bei RT zentrifugiert. Die Konzentration der DNA wurde am *NanoDrop* bestimmt.

#### **2.2.1.6 Verdau mit Restriktionsenzymen**

Um die hergestellten DNA-Sequenzen in die verwendeten Plasmide zu integrieren wurde mit Restriktionsenzymen gearbeitet. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen erkennen und schneiden. Die verwendeten Enzyme erzeugen so genannte *sticky ends*, bei denen an der

Schnittstelle überhängige Einzelstränge entstehen, die mit komplementär geschnittenen DNA-Sequenzen ligiert werden können.

Für den Restriktionsverdau wurden *FastDigest* Enzyme von Thermo Fisher wie folgt verwendet:

Reagenz	Masse/Volumen
10 x <i>FastDigest</i> Puffer	2 µl
<i>FastDigest</i> Restriktionsenzym 1	1 µl
<i>FastDigest</i> Restriktionsenzym 2	1µl
Isoliertes Plasmid bzw. PCR Produkt	400 ng
MQ-H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Der Restriktionsansatz wurde durch Pipettieren vermischt und anschließend auf einem Heizblock bei 37° C für 2 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Aufreinigung wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben. Zur Kontrolle wurde eine Visualisierung mittels Agarosegelelektrophorese durchgeführt (2.2.1.3).

Für die Herstellung des Konstruktes pIMK2 + *spa* wurde zunächst die *spa*-kodierende Sequenz mit den Restriktionsenzymen *BspHI* und *SalI* geschnitten. Anschließend wurde das Plasmid pIMK2 mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *SalI* geschnitten. *BspHI* und *NcoI* erzeugen mit der Sequenz 5' - CATG den gleichen Überhang, sodass die verdauten Produkte miteinander ligiert werden können. Die Klonierung wurde von Y. Yin (Institut für med. Mikrobiologie der JLU Gießen) durchgeführt.

Für die Herstellung des Konstruktes pERL3 + *eta* wurde zunächst eine mittels Fusions-PCR hergestellte DNA-Sequenz bestehend aus Promoter, Signalsequenz und *eta* – Sequenz mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *XhoI* geschnitten. Die Terminatorsequenz wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *XmaI* geschnitten. Das Plasmid pERL3 wurde mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *XmaI* geschnitten. *XmaI* ist ein Restriktionsenzym mit einem für das Enzym spezifischen Puffer. Es wurde daher nicht gleichzeitig mit *FastDigest* in einem Ansatz verwendet. Der Reaktionsansatz ist analog zu der Verwendung von *FastDigest* und dem oben beschriebenen Pipettierschema. Statt des 10 x *FastDigest* Puffers wurde 10 x *XmaI* Puffer verwendet. Zwischen dem Verdau mit *XmaI* und einem *FastDigest* Restriktionsenzym wurde die DNA wie in 2.2.1.4 beschrieben aufgereinigt.

### 2.2.1.7 Ligation

Die DNA-Sequenzen mit den durch den Restriktionsverdau entstandenen *sticky ends* wurden mittels Ligation zusammengefügt. Es wurde das *T4-DNA-Ligase-Kit* (Thermo Fisher) verwendet. Hierbei lagern sich die hergestellten zueinander komplementären *sticky ends* einander an. Durch die T4-DNA-Ligase wird eine Phosphodiesterbrücke

zwischen der 3'-Phosphatgruppe und der 5'-OH-Gruppe der jeweiligen Sequenzen geschaffen. Die zu ligierenden DNA-Sequenzen werden kovalent gebunden und zu einer einzigen DNA-Sequenz zusammengefügt.

Das *T4-DNA-Ligase-Kit* wurde folgendermaßen verwendet:

Reagenz	Masse/Volumen
T4-DNA-Ligase	1,5 µl
10 x T4-DNA-Ligase-Puffer	2 µl
Plasmid aus Restriktionsverdau	300 ng
PCR-Produkt aus Restriktionsverdau	120 ng
MQ-H <sub>2</sub> O	Ad 20 µl

Der Ligationsansatz wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt und anschließend über Nacht bei 16° C im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Ligase durch Hitze inaktiviert. Hierzu wurde der Reaktionsansatz für 20 min bei 65 °C auf dem Heizblock erhitzt. Anschließend erfolgte die Transformation des ligierten Plasmids in chemisch kompetente *E. coli* DH10β.

#### 2.2.1.8 Plasmidisolierung aus *E. coli* DH10β

Zur Plasmidisolierung wurde zunächst eine Übernachtskultur (ÜNK) in LB-Selektivmedium mit einem der Antibiotikaresistenz des Plasmids entsprechenden Antibiotikazusatz hergestellt. Für die Isolierung wurde das Kit *QIAprep Spin MiniPrep* (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet.

4 ml der ÜNK wurden in zwei 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei 14764 rcf für 3 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets in je 125 µl Puffer P1 resuspendiert. Die Proben wurden zusammengeführt und mit 250 µl Lyse Puffer P2 versetzt, zum Vermischen 6-8 mal invertiert und bei RT für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Lysereaktion durch Zugabe von 350 µl Neutralisationspuffer N3 gestoppt. Zum Vermischen wurde die Probe 6-8 mal invertiert. Das Lysat wurde bei 14764 rcf für 10 min bei RT zentrifugiert. Der DNA-enthaltende Überstand wurde auf die *QIAprep 2.0 Spin Column* Zentrifugationssäule überführt und die Säule bei 11000 rcf für 1 min bei RT zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Die Säule wurde anschließend mit 750 µl PE Puffer beladen und bei 11000 rcf für 1 min bei RT zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Der Durchlauf wurde jeweils verworfen. Um Reste des Waschpuffers aus der Säule zu entfernen, wurde die Säule ohne Zugabe von Puffer bei 14764 rcf für 1 min bei RT zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt. Zur Elution der Plasmid-DNA wurde 50 µl MQ-H<sub>2</sub>O auf die Säule pipettiert und für 1 min bei RT inkubiert. Die Säule

wurde bei 14764 rcf für 1 min bei RT zentrifugiert. Die DNA-Konzentration wurde am *NanoDrop* bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

#### **2.2.1.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Um die Konzentration der durch PCR, Plasmidisolierung, Restriktionsverdau oder DNA-Isolierung aus Agarosegel gewonnenen DNA in Lösung zu bestimmen wurde der *NanoDrop* (Thermo Fisher) verwendet. Im *NanoDrop* können sehr kleine Volumina (1 µl) DNA-haltiger Flüssigkeiten analysiert werden. Es wird das Absorptionsmaximum der DNA bei 260 nm gemessen, um die Konzentration der DNA in Lösung zu bestimmen. Gleichzeitig wird die Absorption bei 280 nm gemessen, die dem Absorptionsmaximum von proteinhaltigen Lösungen entspricht. So kann die Kontamination mit proteinhaltigen Lösungen überprüft werden. Eine ausreichende Reinheit der DNA-Lösung wurde bei einem Quotienten von  $A_{260}/A_{280} > 1,8$  angenommen.

#### **2.2.1.10 Sequenzierung**

Die durch Ligation hergestellten Plasmide wurden nach der Transformation in *E. coli* DH10β sequenziert. Dies dient dazu, um eine korrekte Basenabfolge in den hergestellten DNA-Konstrukten sowie einen korrekten Übergang dieser in das ligierte Plasmid sicherzustellen. Die Sequenzierung erfolgte im hauseigenen Sequenzierungslabor durch die Didesoxymethode nach Sanger. Es wurden jeweils ca. 600 ng Plasmid-DNA sequenziert.

### **2.2.2 Arbeiten mit Bakterien**

#### **2.2.2.1 *Listeria monocytogenes* EGD-e (1/2a)**

Bakterien des Serotyps *Listeria monocytogenes* EGD-e (1/2a) (Glaser et al. 2001) wurden in BHI Medium kultiviert. Zur Herstellung einer Übernachtskultur (ÜNK) wurden 10 ml BHI Medium in einen 100 ml fassenden sterilen Erlenmeyerkolben gegeben und mit einem Bakterienstamm beimpft. Hierzu wurde mit einer sterilen Impföse eine *colony forming unit* (CFU) Bakterien von einer Agarplatte gesammelt und in dem Medium im Erlenmeyerkolben gelöst. Anschließend wurde die Suspension über Nacht bei 37 °C in einem Inkubator bei 180 rpm Schüttelbewegung inkubiert. Zur Vergleichbarkeit der Experimente wurden die Versuche mit Bakterien durchgeführt, die sich in demselben Stadium ihrer logarithmischen Wachstumsphase befanden. Um dies sicherzustellen, wurden die ÜNK am Morgen des Experiments 1:50 in frischem BHI Medium verdünnt. Dazu wurden 200 µl ÜNK zu 10 ml frischem BHI Medium gegeben und bei 37°C und 180 rpm geschüttelt bis die Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm eine optische Dichte (OD) von 1,0 aufwies ( $OD_{600} = 1,0$ ). In dieser Phase des Wachstums wurde durch Ausplattieren eine Bakterienanzahl von  $1,5 \cdot 10^9$  /ml bestimmt. Diese Zahl wurde

zur Berechnung des zur Infektion von eukaryotischen Zellen benötigten Volumens herangezogen.

#### 2.2.2.2 *Escherichia coli* DH10 $\beta$

*E. coli* DH10 $\beta$  wurden in LB Medium angezüchtet. Die Herstellung von ÜNK erfolgte analog zu *L. monocytogenes*.

#### 2.2.2.3 Messungen der optischen Dichte von Bakterienkulturen

Um die optische Dichte von Bakterienkulturen zu bestimmen, wurde 1 ml der Kultur in eine Mikroküvette (Sarstedt) mit einer Schichtdicke von 1 cm überführt. Die Absorption in der Küvette wurde anschließend am *Ultrospec 10 Cell Density Meter* bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Zur Kalibrierung wurde das für die Kultur verwendete Medium ohne Bakterienwachstum benutzt. Lag die optische Dichte über  $OD_{600} = 1,2$ , wurde die Bakterienkultur 1:2 in dem jeweiligen Nährmedium verdünnt und erneut gemessen.

#### 2.2.2.4 Selektive Nährmedien

Zur Kultivierung von *L. monocytogenes* und *E. coli* mit zuvor transformiertem Plasmid wurde entsprechend der durch das Plasmid kodierten Antibiotikaresistenz ein Antibiotikum zum Nährmedium hinzugefügt. Dies gilt sowohl für die Kultivierung in Flüssigmedium als auch für die Kultivierung von Agarplatten.

Spezies	Transformiertes Plasmid	Antibiotikakonzentration
<i>L. monocytogenes</i>	pIMK2	Kanamycin 50 $\mu$ g/ml
<i>L. monocytogenes</i>	pERL3	Erythromycin 5 $\mu$ g/ml
<i>E. coli</i>	pIMK2	Kanamycin 50 $\mu$ g/ml
<i>E. coli</i>	pERL3	Erythromycin 300 $\mu$ g/ml

#### 2.2.2.5 Herstellung kompetenter Bakterien

Bakterien bestimmter Spezies wie zum Beispiel *Bacillus subtilis* besitzen die Fähigkeit, in Lösung befindliche DNA aufzunehmen. Diese Fähigkeit wird Kompetenz genannt. Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli* und *L. monocytogenes* besitzen diese Fähigkeit natürlicherweise nicht. Um Plasmid-DNA in sie zu transformieren, müssen die Bakterien zunächst kompetent gemacht werden.

#### 2.2.2.6 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* (Hanahan et al. 1991) wurde zunächst eine ÜNK in LB Medium angelegt. Die ÜNK wurde am folgenden Tag 1:50 in 50 ml LB Medium verdünnt und bei 37 °C und 180 rpm im Schüttler bis zu einer  $OD_{600} = 0,3$  inkubiert. Die Kultur wurde anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß transferiert und für

10 min auf Eis gekühlt. Danach wurde die Kultur bei 2770 rcf für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 17 ml CCMB80 Puffer durch Pipettieren resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 2772 rcf für 10 min bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde in 4,2 ml CCMB80 Puffer durch Pipettieren resuspendiert. Die Suspension wurde in 200 µl je Aliquot in 1,5 ml Cryoröhrchen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

#### **2.2.2.7 Herstellung elektrokompetenter *L. monocytogenes***

Zur Herstellung elektrokompetenter *L. monocytogenes* (Park und Stewart 1990) wurde zunächst eine ÜNK in BHI Medium angefertigt. Diese wurde 1:100 in 200 ml BHI + 0,5 M Saccharose verdünnt und bei 37° C und 180 rpm bis zum Erreichen einer  $OD_{600} = 0,2$  inkubiert. Anschließend wurde der Kultur Penicillin hinzugefügt, um eine Konzentration von 10 µg/ml Penicillin zu erreichen. Die Kultur wurde dann bei 37° C und 180 rpm für 2 h inkubiert und anschließend in 4 Aliquots zu je 50 ml in sterile 50 ml Reaktionsgefäße pipettiert und bei 2772 rcf für 10 min bei 4° C zentrifugiert. Ab diesem Schritt wurde auf Eis gearbeitet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in je 20 ml HEPES-Saccharose Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde erneut bei 2772 rcf für 10 min bei 4° C zentrifugiert und anschließend in 10 ml HEPES-Saccharose Puffer resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 mal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Suspensionen zusammengeführt und bei 2772 rcf für 10 min bei 4° C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml HEPES-Saccharose-Glycerin resuspendiert und zu je 50 µl in 1,5 ml Cryoröhrchen aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

#### **2.2.2.8 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli***

Die zuvor hergestellten chemisch kompetenten *E. coli* (2.2.2.6) wurden auf Eis schonend aufgetaut. Anschließend wurde 2 µl des hergestellten Ligationsansatzes (2.2.1.7) hinzugefügt und durch Pipettieren vermischt. Der Ansatz wurde für 10 min auf Eis und danach für 90 s bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Danach erfolgte eine erneute Inkubation für 10 min auf Eis. Der Ansatz wurde in einem 12 ml Reaktionsgefäß in 500 µl SOC Medium aufgenommen und für 1 h bei 37° C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz fraktioniert (10 µl, 20 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl, Rest) mit einem Drigalskispatel auf Agarplatten ausplattiert. Die Agarplatten enthielten ein der Antibiotikaresistenz des Plasmids entsprechendes LB Selektivmedium. Nach Inkubation über Nacht wurden einzelne CFU auf den Agarplatten mit einem Zahnstocher gepickt und auf einer frischen Agarplatte ausgestrichen. Nach erfolgtem

Wachstum wurden die Klone einzeln mittels PCR auf das Vorhandensein des Inserts überprüft. Positive Klone wurden zur Plasmidisolierung (2.2.1.8) verwendet. Das isolierte Plasmid wurde dann sequenziert (2.2.1.10).

#### **2.2.2.9 Transformation von Plasmid-DNA in elektrokompetente *L. monocytogenes***

Die hergestellten elektrokompetenten *L. monocytogenes* (2.2.2.7) wurden auf Eis aufgetaut. Es wurde 100ng Plasmid-DNA hinzugefügt und der Ansatz in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Im Elektroporationsgerät (*Bio-Rad electroporation system*) wurde die Elektroporation mit folgenden Einstellungen durchgeführt: 400  $\Omega$ , 125  $\mu$ F, 1 V. Der Ansatz wurde anschließend in einem 12 ml Reaktionsgefäß in 500  $\mu$ l BHI + 0,5 M Saccharose aufgenommen und für 3 h bei 37 °C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz fraktioniert (10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 50  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, Rest) mit einem Drigalskispatel auf Agarplatten ausplattiert. Die Agarplatten enthielten ein der Antibiotikaresistenz des Plasmids entsprechendes BHI Selektivmedium. Nach Inkubation über Nacht wurden einzelne CFU auf den Agarplatten mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und auf einer frischen Agarplatte ausgestrichen. Nach erfolgreichem Wachstum wurden die Klone einzeln mittels PCR auf das Vorhandensein des Inserts überprüft.

#### **2.2.2.10 Erstellen von Wachstumskurven**

Um Wachstumskurven zu erstellen, wurden ÜNK von *L. monocytogenes* hergestellt. Die ÜNK wurde 1:50 in 5 ml BHI Medium verdünnt und anschließend bei 14.926 rcf für 2 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 5 ml frischem BHI Medium resuspendiert. Je 200  $\mu$ l der so hergestellten Bakteriensuspension wurde in eine Mikrotitrierplatte überführt. Die Messung erfolgte alle 20 Minuten photometrisch bei einer Absorptionswellenlänge von 600 nm. Die Inkubation erfolgte bei 37° C. Vor jeder Messung erfolgte ein Schütteln für 200 s bei einer Amplitude von 4 mm. Zur Erstellung der Nullwerte wurde nicht beimpftes Medium verwendet. Es erfolgte jeweils eine Dreifachbestimmung.

#### **2.2.2.11 Herstellung von Glycerinkulturen**

Zur dauerhaften Lagerung von Bakterienstämmen wurden Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurde eine ÜNK des entsprechenden Stammes hergestellt. 1 ml der ÜNK wurde in ein 2 ml Cryoröhrchen pipettiert und mit 500  $\mu$ l sterilem Glycerol mit dem Vortexer vermischt. Das Cryoröhrchen wurde anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C.

### 2.2.2.12 Auftauen von Glycerinkulturen

Die bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen wurden auf Eis aufgetaut. Von der angetauten Glycerinkultur wurde mit einer sterilen Impföse ein Teil der Kultur entnommen und auf einer Agarplatte mit einem für den aufgetauten Bakterienstamm geeignetem Nährmedium fraktioniert ausgestrichen. Die Bakterien wurden auf Agarplatten im Kühlschrank für maximal 4 Wochen gelagert. Sie wurden dann entweder auf frischen Agarplatten erneut ausgestrichen oder als Glycerinkultur gelagert.

### 2.2.3 Arbeiten mit Proteinen

#### 2.2.3.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Bradfordmethode

Um die Konzentration der gewonnenen Proteinlösungen zu bestimmen, wurde mit der Bradfordmethode gearbeitet (Bradford 1976). Mithilfe einer 1 mg/ml BSA in PBS Stammlösung wurde zunächst eine Standardreihe mit definierten Proteinkonzentrationen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen hergestellt.

PBS [ $\mu$ l]	BSA 1 mg/ml in PBS [ $\mu$ l]	Konzentration BSA [mg/ml]
24	0	0
22,8	1,2	0,05
21,6	2,4	0,1
19,2	4,8	0,2
16,8	7,2	0,3
14,4	9,6	0,4
12,0	12,0	0,5
9,6	14,4	0,6

Anschließend wurde die zu messende Probe 1:5 in PBS verdünnt, sodass 24  $\mu$ l verdünnte Probe entstand. Je 10  $\mu$ l der Eichreihe und der zu untersuchenden Probe wurden in einer Doppelbestimmung in eine 96 Well Platte mit U-Boden pipettiert. Das *Protein Assay Dye Reagent*-Konzentrat (Bio-Rad) wurde 1:5 in MQ-H<sub>2</sub>O verdünnt. Anschließend wurden je 200  $\mu$ l 1 x *Protein Assay Dye Reagent* zu den vorgelegten Proben in die 96 Well Platte pipettiert. Die Platte wurde auf dem Schüttler bei 6000 rpm für 30 s geschüttelt und danach für 10 min im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgte am Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm.

Durch die bekannten Konzentrationen in der Standardreihe konnte eine lineare Regressionsgerade mit den gemessenen Absorptionswerten erstellt werden. Die Absorption der zu untersuchenden Proben wurde mit Hilfe dieser Regressionsgerade in eine Konzentration umgerechnet.

### **2.2.3.2 Isolierung von Proteinen aus der Zellwand von *L. monocytogenes***

Zur Isolierung von Proteinen aus der Zellwand von *L. monocytogenes* wurde zunächst eine ÜNK in BHI Selektivmedium hergestellt. Die ÜNK wurde 1:50 in 50 ml BHI Selektivmedium verdünnt und auf dem Schüttler bei 37 °C und 180 rpm bis zu einem Wachstum von  $OD_{600} = 1,0$  inkubiert. Die Kultur wurde anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 6238 rcf für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Ab diesem Schritt wurde auf Eis gearbeitet. Der Überstand wurde abgenommen und zur Proteinisolierung aus der Überstandsfraktion (2.2.3.3) verwendet. Das Pellet wurde in 10 ml sterilem PBS resuspendiert und bei 6238 rcf bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde insgesamt dreimal wiederholt. Das Pellet wurde in 1,8 ml 1% SDS in PBS resuspendiert und für 1 h bei 37 °C und 180 rpm für 45 min auf dem Schüttler inkubiert. Die Suspension wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß gefüllt und mit 200 µl Trichloressigsäure (TCA) durch Vortexen vermischt. Der Ansatz wurde über Nacht auf Eis inkubiert, um die enthaltenen Proteine zu fällen. Am Folgetag wurde die Probe für 30 min bei RT angewärmt und anschließend bei 14764 rcf für 20 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 200 µl 1 M TRIS-HCl pH = 8,8 gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **2.2.3.3 Isolierung von Proteinen aus dem Überstand von *L. monocytogenes***

Der Überstand aus einer Bakterienkultur von *L. monocytogenes* wurde wie in Abschnitt 2.2.3.2 gewonnen. Es wurde auf Eis gearbeitet. 45 ml des Überstandes wurde mit 5 ml TCA gemischt und über Nacht auf Eis inkubiert, um die Proteine zu fällen. Die Probe wurde am nächsten Tag bei 6238 rcf bei 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl 1 M TRIS-HCl pH = 8,8 gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **2.2.3.4 Proteinisolierung aus dem Zytosol von *L. monocytogenes***

Am Vortag des Experimentes wurde eine ÜNK von *L. monocytogenes* hergestellt. Diese wurde am Tag des Experimentes 1:50 in 100 ml BHI Selektivmedium verdünnt und bis zu einem Wachstum von  $OD_{600} = 1$  bei 37 °C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen in zwei 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 6238 rcf für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Ab diesem Schritt wurde auf Eis gearbeitet. Das Pellet wurde in 10 ml PBS aufgenommen und die Proben wurden zusammengeführt. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei gleichen Einstellungen. Das Pellet wurde insgesamt 3 mal in 10 ml PBS gewaschen und nach dem letzten Zentrifugationsschritt in 5 ml PBS aufgenommen. Es wurde 50 µl 100x Proteaseinhibitorcocktail (Biotool) hinzugegeben. Die Suspension wurde in 5 Aliquots zu je 1 ml in

*Lysing MatrixB* Reaktionsgefäße pipettiert und durch Vortexen vermischt. Die Bakterien wurden anschließend mit dem Hochgeschwindigkeitshomogenisierer (FastPrep24) insgesamt 3 mal bei 6000 rpm für 30 s behandelt und so mechanisch aufgebrochen. Zwischen den Schritten wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gekühlt, um eine wärmebedingte Denaturierung der Proteine zu verhindern. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend bei 21000 rcf für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die cytosolische Proteinfraction enthielt, wurde abgenommen und durch einen *Millipore Express PES Filter* (Porengröße 0,22 µm) steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

### **2.2.3.5 Natriumdodecylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE (Laemmli 1970) ist eine Methode, um Proteine elektrophoretisch aufzutrennen. Durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine entfaltet und negativ geladen. Die Ladung ist hierbei proportional zur Masse des Proteins. Durch Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden zusätzlich Disulfidbrücken aufgebrochen. Die Denaturierung erfolgt nicht allein durch das zugesetzte SDS, sondern zusätzlich thermisch bei 95 °C. Die so linearisierten Proteine werden dann in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt.

Zur Fokussierung der Probe mit nachfolgender elektrophoretischer Auftrennung wurde eine Kombination aus Sammel- und Trenngel verwendet. Es wurde zunächst das Trenngel (10 % Acrylamid) hergestellt und in eine horizontale Gelkammer aus 2 Glasplatten gefüllt. Nach der Aushärtung wurde das Sammelgel (4 % Acrylamid) hergestellt und auf das Trenngel gegossen. Zur Bildung von Taschen, in die die Probe pipettiert werden konnte, wurde ein Plastikamm mit in das Sammelgel eingegossen. Die hergestellten Gele wurden in einer horizontalen Gelkammer (Biometra) in 1x Laufpuffer gestellt.

Von den verwendeten Proteinen wurden nach der Bestimmung der Konzentration (2.2.3.1) jeweils 20 µg in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Anschließend wurde entsprechend des verwendeten Volumens 8x Laemmlipuffer hinzugefügt, sodass der Puffer auf einfache Konzentration verdünnt wurde. Die Proben wurden auf einem Heizblock für 5 min bei 95 °C und 380 rpm inkubiert, um die Proteine zu denaturieren. Die Proben wurden anschließend in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Als Vergleich diente ein Proteingrößenstandard (Abb. 12). Die Elektrophoresekammer wurde mit folgenden Einstellungen betrieben: 125 V, 50 mA, 50 W.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele aus der Kammer entfernt. Die Weiterverarbeitung erfolgte entweder mit einer Coomassie-Färbung oder mit Western Blot.

### **2.2.3.6 Coomassie Brilliant Blue Färbung**

Nach der SDS-PAGE wurde das Gel zur Färbung in Coomassie Brilliant Blue Lösung über Nacht auf dem Taumler bei 4 °C gefärbt. Am Folgetag wurde das Gel mit Blitzentfärbelösung entfärbt, um eine möglichst klare Differenzierung der Proteine zu erreichen. Die Dokumentation erfolgte mittels Fotografie. Die Gele wurden anschließend im Kühlschrank gelagert.

### **2.2.3.7 Western Blot**

Der Western Blot (Renart et al. 1979; Burnette 1981) ist ein Verfahren, um Proteine, die zuvor durch SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt wurden, auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran zu übertragen. Die auf die Membran übertragenen Proteine können anschließend mit für das untersuchte Protein spezifischen Antikörpern genauer charakterisiert werden. Um die aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Membran zu übertragen, wird ein elektrisches Feld senkrecht zum Gel angelegt. Die durch die Behandlung mit SDS negativ geladenen Proteine wandern in Richtung der Anode und werden auf der PVDF-Membran über hydrophobe und polare Wechselwirkungen gebunden.

Für den Western Blot wurden die PVDF-Membran und 7 Lagen Filterpapier (Whatman) auf die Größe des Polyacrylamidgels zugeschnitten. 3 der Filterpapiere wurden in Blotpuffer I, 1 Filterpapier in Blotpuffer II und 3 Filterpapiere in Blotpuffer III eingeweicht. Die PVDF-Membran wurde für 10 s in Methanol aktiviert und kurz in MQ-H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde sie bis zur Verwendung in Blotpuffer II gelagert. Die vorbereiteten Materialien wurden in einer Western Blot Elektrophoresekammer (institutseigene Herstellung) zwischen zwei mit Graphit beschichtete Elektroden in folgender Reihenfolge eingelegt: Anode, 3 Filterpapiere mit Blotpuffer I, 1 Filterpapier mit Blotpuffer II, PVDF-Membran, Polyacrylamidgel, 3 Filterpapiere mit Blotpuffer III, Kathode. Die Elektrophorese wurde mit folgenden Einstellungen für 90 min betrieben: 125 V, 54 mA, 100 W.

### **2.2.3.8 Chemilumineszenz mit proteinspezifischen Antikörpern**

Die durch Western Blot auf eine PVDF-Membran fixierten Proteine wurden mit proteinspezifischen Antikörpern untersucht. Hierzu wurde die Membran nach dem Western Blot zunächst für eine Stunde in 5 % Milch in TBS-Tween blockiert, um freie Bindungsstellen für Proteine zu besetzen. Anschließend wurde die Membran 3 mal in 10 ml TBS-Tween gewaschen. Der proteinspezifische Primärantikörper wurde in 10 ml 5 % Milch in TBS-Tween zwischen 1:1000 und 1:10000 je nach Antikörperpotenz verdünnt und die Membran darin über Nacht bei 4 °C auf dem Taumler inkubiert. Um Proteine,

an die der Primärantikörper gebunden hat, zu visualisieren, wurde mit einem mit *horse radish peroxidase* (HRP) konjugierten Sekundärantikörper und verbesserter Chemilumineszenz (ECL) gearbeitet. Die HRP katalysiert die Oxidation von Luminol, dabei werden Photonen emittiert, die auf einem Röntgenfilm als Bande sichtbar gemacht werden können. Der Sekundärantikörper *anti-mouse IgG-HRP* (Santa Cruz) wurde 1:1000 in 10 ml Milch TBS-Tween verdünnt. Die Membran wurde in der Antikörperlösung für eine Stunde bei RT auf dem Taumler inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 mal für 10 min bei RT in je 10 ml TBS-Tween gewaschen. Die ECL Entwicklerlösung wurde folgendermaßen hergestellt: 1 ml ECL Lösung A, 100 µl ECL Lösung B und 0,3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt. Die Membran wurde anschließend gleichmäßig mit der Entwicklerlösung benetzt und für 2 min inkubiert. Überschüssige Lösung wurde abgetropft und die Membran in eine Röntgenkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm in die Röntgenkassette gelegt und je nach Signalstärke unterschiedlich lange belichtet. Anschließend erfolgte die Entwicklung in einem Entwicklungsgerät für Röntgenfilme (AGFA).

### **2.2.4 Kultivierung von eukaryotischen Zellen**

#### **2.2.4.1 Kultivierung von KM-H2 Zellen**

Zellen der Linie KM-H2 wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie der JLU Gießen zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden in RPMI-Medium mit 10 % FKS in 10 cm Kulturschalen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. KM-H2 ist eine nicht adhärenz wachsende Zelllinie. Die Zellen wurden alle 3 Tage in frischem Medium verdünnt. Hierzu wurden sie mit einer Pipette aus der Kulturschale abgezogen und in ein steriles 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 250 rcf für 2 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml sterilem PBS durch Pipettieren gewaschen und erneut bei 250 rcf für 2 min bei RT zentrifugiert. Es wurde in 3 frische 10 cm Kulturschalen je 7 ml RPMI + 10 % FKS vorgelegt. Das Zellpellet wurde in 9 ml RPMI + 10 % FKS aufgenommen und je 3 ml in die frischen Kulturschalen pipettiert. Die Kultur wurde durch Schwenken vermischt.

Für die Durchführung von Infektionsversuchen wurden am Tag des Experimentes insgesamt 20 ml Zellkultur in einem 50 ml Reaktionsgefäß aufgenommen und bei 250 rcf für 2 min bei RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml sterilem PBS durch Pipettieren gewaschen und erneut bei 250 rcf für 2 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml RPMI + 10 % FKS aufgenommen. In einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl pro ml bestimmt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit RPMI + 10 % FKS so verdünnt, dass eine Zellzahl von  $4-6 \cdot 10^5$  /ml entstand. In eine

24 Well Zellkulturplatte wurden je Well 1 ml Zellsuspension pipettiert. Anschließend wurde zur genauen Bestimmung der Zellzahl 1 Well abpipettiert und mit der Neubauer Zählkammer erneut gezählt.

#### **2.2.4.2 Kultivierung von DMS-273 Zellen**

Zellen der Linie DMS-273 wurden freundlicherweise vom Institut für Pathologie der JLU Gießen zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden in Waymouth's Medium mit 10 % FKS in 10 cm Kulturschalen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. DMS-273 ist eine semiadhärent wachsende Zelllinie. Die Zellen wurden alle 3 Tage in frischem Medium verdünnt. Hierzu wurde das Medium aus den Schalen mit dem Vakuumsauger abgezogen. Die Zellen wurden vorsichtig mit 5 ml PBS gewaschen, die PBS wurde anschließend abgezogen. Um die Zellen von der Oberfläche der Kulturschalen zu lösen, wurde 1 ml Trypsin/EDTA Solution (0,05%/0,02%) in PBS zugegeben und die Schale für 2 min in den Inkubator gelegt. In 3 frischen Zellkulturschalen wurde je 7 ml frisches Medium vorgelegt. Das Trypsin/EDTA wurde mit 8 ml Medium inaktiviert und die Zellen durch Pipettieren in Lösung gebracht. Anschließend wurden je 3 ml Zellsuspension in die vorbereiteten neuen Kulturschalen pipettiert und durch Schwenken vermischt.

Für die Durchführung von Infektionsversuchen wurden am Vortag des Experiments 2 Kulturschalen mit konfluent gewachsenen Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA gelöst. Die Zellen wurden in insgesamt 10 ml Medium aufgenommen und in einer Neubauer Zählkammer wurde die Zellzahl pro ml bestimmt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit Waymouth's + 10% FKS so verdünnt, dass eine Zellzahl von  $4 \cdot 10^5$  /ml entstand. In eine 24 Well Zellkulturplatte wurden je Well 1 ml Zellsuspension pipettiert, die Platte wurde über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Tag des Experimentes wurde das Medium aus den Wells mit dem Vakuumsauger vorsichtig abgezogen und durch frisches Medium ersetzt. Zur genauen Bestimmung der Zellzahl wurde 1 Well vom Medium befreit, die Zellen mit 100 µl Trypsin/EDTA gelöst, in 900 µl Medium aufgenommen und mit der Neubauer Zählkammer gezählt.

#### **2.2.4.3 Kultivierung von P388D1 Zellen**

Zellen der Linie P388D1 (Makrophagen) wurden in RPMI-Medium mit 10 % FKS in 10 cm Kulturschalen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. P388D1 ist eine adhärent wachsende Zelllinie. Die Zellen wurden alle 3 Tage in frischem Medium verdünnt. Hierzu wurde das Medium aus den Schalen mit dem Vakuumsauger abgezogen. Die Zellen wurden vorsichtig mit 5 ml PBS gewaschen, die PBS wurde anschließend abgezogen. Es wurde 3 ml frisches Medium in die Kulturschale pipettiert. Die Zellen wurden

anschließend mit einem 16 cm Zellschaber von der Kulturschale gelöst. In 3 frischen Zellkulturschalen wurde je 9 ml Medium vorgelegt. Die zuvor mit dem Zellschaber gelösten Zellen wurden durch Pipettieren in eine gleichmäßige Suspension gebracht und je 1 ml Zellsuspension wurde zu dem vorgelegten Medium in die Zellkulturschalen pipettiert. Die Zellen wurden durch Schwenken gleichmäßig vermischt.

Für die Durchführung von Infektionsversuchen wurden am Vortag des Experimentes 2 Kulturschalen mit konfluent gewachsenen Zellen mit 5 ml PBS gewaschen und mit je 5 ml frischem Medium versetzt. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber gelöst und die Suspensionen zusammengeführt. Die Zellsuspension wurde anschließend mit RPMI + 10 % FKS so verdünnt, dass eine Zellzahl von  $4 \cdot 10^5$  /ml entstand. In eine 24 Well Zellkulturplatte wurden je Well 1 ml Zellsuspension pipettiert, die Platte wurde über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am Tag des Experimentes wurde das Medium aus den Wells mit dem Vakuumsauger vorsichtig abgezogen und durch frisches Medium ersetzt. Zur genauen Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen in einem Well mit dem Zellschaber gelöst und durch Pipettieren in Suspension gebracht. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt.

#### **2.2.4.4 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen**

Die dauerhafte Lagerung von eukaryotischen Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Um eukaryotische Zellen einzufrieren, wurden die Zellen einer vollständig bewachsenen Zellkulturschale wie in den vorigen Abschnitten gewaschen, von der Platte gelöst und in einem 15 ml Reaktionsgefäß bei 250 rcf für 2 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml FKS + 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt. Das Kryoröhrchen wurde anschließend in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierkammer für eukaryotische Zellen (Nalgene) gestellt und im -80 °C Gefrierschrank langsam eingefroren. Ab dem Folgetag wurde das Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurde das Kryoröhrchen im 37 °C warmen Wasserbad möglichst schnell aufgetaut. In einem 15 ml Reaktionsgefäß wurden 10 ml für die jeweiligen Zellen geeignetes Medium vorgelegt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde in das vorgelegte Medium überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 250 rcf für 2 min bei RT, um das DMSO aus dem Medium zu entfernen. Das Pellet wurde in 10 ml frischem Medium aufgenommen und in eine 10 cm Zellkulturschale überführt. Anschließend wurde die Zellkultur bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

## 2.2.5 Durchführung von Infektionsversuchen

### 2.2.5.1 Infektionsassay der Zelllinie KM-H2 mit *L. monocytogenes*

Die Ki-4-scFv-Fc-haltige Überstandslösung wurde freundlicherweise vom Institut für Pathologie zur Verfügung gestellt (Klimka et al. 1999).

Am Vortag der Infektion wurde eine ÜNK von *L. monocytogenes* hergestellt. Die eukaryotischen Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben vorbereitet und die Zellzahl bestimmt. Die ÜNK wurde am Tag des Experimentes 1:50 verdünnt und bis zu einem Wachstum von  $OD_{600} = 1$  inkubiert. Es wurde pro Bakterienstamm 0,5 ml Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bei 14926 rcf für 2 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen, erneut bei 14926 rcf für 2 min bei RT zentrifugiert und anschließend in 400 µl RPMI + 10 % FKS aufgenommen. Es wurden 100 µl der Ki-4-scFv-Fc-haltigen Überstandslösung hinzugefügt. In die Reaktionsgefäße der Kontrollgruppe wurden statt der scFv-Fc-haltigen Lösung 100 µl RPMI + 10 % FKS Medium pipettiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend für 45 min bei 300 rpm und RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 14.926 rcf für 2 min bei RT. Das Pellet wurde insgesamt 3 mal mit je 1 ml PBS gewaschen und bei gleichen Einstellungen zentrifugiert. Für die eigentliche Infektion wurde das Pellet in 0,5 ml RPMI + 10 % FKS Medium aufgenommen. In Bezug auf die zuvor bestimmte Zellzahl erfolgte die Infektion in einer Dreifachbestimmung in der 24 Well Platte mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 100. Zur genauen Bestimmung der MOI wurden die zur Infektion verwendeten Proben in einer Verdünnungsreihe in PBS verdünnt und auf BHI Platten mit dem Drigalskispatel ausplattiert. Die Infektion erfolgte für 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator. Nach der Infektion wurden die Proben in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und bei 587 rcf für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet in 1 ml PBS durch Pipettieren resuspendiert. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei gleichen Einstellungen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 mal durchgeführt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 1 ml RPMI + 10 % FKS + 50 µg/ml Gentamicin aufgenommen, um extrazellulär verbliebene Bakterien zu eliminieren. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation für 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in der 24 Well Platte im Inkubator. Die Proben wurden anschließend abpipettiert und in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 587 rcf für 5 min bei RT. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und je 100 µl Überstand wurden auf BHI Platten mit dem Drigalskispatel ausplattiert um die Wirksamkeit des Gentamicins zu überprüfen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und bei gleichen Einstellungen erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 mal wiederholt. Nach

dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 1 ml kalter 0,2 % Triton X-100-Lösung aufgenommen und für 10 min inkubiert um die Zellen zu lysieren. Es erfolgte eine Verdünnungsreihe in PBS. Anschließend wurde pro Probe und Verdünnungsreihe in einer Dreifachbestimmung je 100 µl Lysat mit einem Drigalskispatel auf BHI Platten ausplattiert. Alle ausplattierten Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde zur Auswertung die CFU jeder Platte gezählt.

#### **2.2.5.2 Infektionsassay der Zelllinie KM-H2 mit *L. monocytogenes* mit verschiedenen FKS-Konzentrationen**

Zellen der Zelllinie KM-H2 wurden analog zum Infektionsversuch 2.2.5.1 mit *L. monocytogenes* infiziert. Um die Auswirkung von verschiedenen FKS-Konzentrationen im verwendeten Medium zu untersuchen, wurde dieser Infektionsassay modifiziert. Die Zellen wurden vor dem Versuch in RPMI Medium mit verschiedenen FKS-Konzentrationen aufgenommen. Es wurde RPMI + 0%, 5%, 10%, 20% und 40% FKS untersucht. Die weitere Durchführung des Infektionsversuches erfolgte im Medium mit der entsprechenden FKS-Konzentration analog zum Infektionsversuch 2.2.5.1.

#### **2.2.5.3 Infektionsassay der Zelllinie DMS-273 mit *L. monocytogenes***

Die SCBC-scFv-Fc-haltige Überstandslösung wurde freundlicherweise vom Institut für Pathologie zur Verfügung gestellt (Haaf et al. 2015).

Die eukaryotischen Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben vorbereitet und die Zellzahl bestimmt. Die Bakterien wurden analog zu dem in Abschnitt 2.2.5.1 beschriebenen Verfahren mit der SCBC-scFv-Fc-haltigen Überstandslösung behandelt, hierbei wurde statt RPMI + 10 % FKS das für DMS-273 verwendete Waymouth's + 10 % FKS Medium verwendet.

Die Infektion der Zellen wurde in der 24 Well Platte in einer Dreifachbestimmung mit einer MOI von 100 durchgeführt. Zur genauen Bestimmung der MOI wurden die zur Infektion verwendeten Proben in einer Verdünnungsreihe in PBS verdünnt und auf BHI Platten mit dem Drigalskispatel ausplattiert. Die Infektion erfolgte für 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator. Der Überstand der semiadhärenten Zellen wurde vorsichtig mit dem Vakuumsauger abgezogen. Es wurde pro Well 500 µl PBS auf die Zellen pipettiert und anschließend mit dem Vakuumsauger abgezogen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 mal wiederholt. Nach dem Waschen wurde je 1 ml Waymouth's + 10 % FKS + 50 µg/ml Gentamicin in die Wells pipettiert und die Zellen für 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und je 100 µl Überstand wurden auf BHI Platten mit dem Drigalskispatel ausplattiert, um die Wirksamkeit des Gentamicins zu überprüfen. Die semiadhärenten Zellen wurden erneut 3 mal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde 1 ml kalte

0,2 % Triton X 100 Lösung in die Wells pipettiert und für 10 min inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Es erfolgte eine Verdünnungsreihe in PBS. Anschließend wurden pro Probe und Verdünnungsreihe in einer Dreifachbestimmung je 100 µl Lysat mit einem Dreigalskispatel auf BHI Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am Folgetag wurde zur Auswertung die CFU jeder Platte gezählt.

#### **2.2.5.4 Infektionsassay der Zelllinie P388D1 mit *L. monocytogenes***

Am Vortag der Infektion wurde eine ÜNK von *L. monocytogenes* hergestellt. Die eukaryotischen Zellen wurden wie in Abschnitt 2.2.4.3 beschrieben vorbereitet und die Zellzahl bestimmt. Die ÜNK wurde am Tag des Experimentes 1:50 verdünnt und bis zu einem Wachstum von  $OD_{600} = 1$  inkubiert. Es wurde pro Bakterienstamm 0,5 ml Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bei 14926 rcf für 2 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen, erneut bei 14926 rcf für 2 min bei RT zentrifugiert und anschließend in 500 µl RPMI + 10 % FKS aufgenommen. In Bezug auf die zuvor bestimmte Zellzahl erfolgte die Infektion in einer Dreifachbestimmung in der 24 Well Platte mit verschiedener MOI (100, 200, 500). Die Infektionszeit betrug 45 min. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig mit dem Vakuumsauger abgezogen. Es wurde pro Well vorsichtig 500 µl PBS auf die Zellen pipettiert und anschließend mit dem Vakuumsauger abgezogen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 mal wiederholt. Nach dem Waschen wurde je 1 ml RPMI + 10 % FKS + 50 µg/ml Gentamicin in die Wells pipettiert und die Zellen wurden je nach durchgeführtem Experiment für 8h oder 24h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### **2.2.5.5 Auswertung des Infektionsversuches in P388D1 Zellen mit Lichtmikroskopie**

Makrophagen der Zelllinie P388D1 wurden wie in Abschnitt 2.2.5.4 mit *L. monocytogenes* infiziert. Die Infektion erfolgte mit MOI 100, 200 und 500. Die Infektionszeit betrug 45 min, die Zeit der Gentamicinbehandlung betrug 24 h. Anschließend wurde die 24 Well Platte lichtmikroskopisch mit dem Durchlichtmikroskop untersucht und mittels Fotografie dokumentiert.

#### **2.2.5.6 Infektionsversuch in P388D1 Zellen mit MTT Test**

Der 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT-) Test ist ein Verfahren, um Zellen hinsichtlich ihrer Stoffwechselaktivität zu untersuchen. Metabolisch aktivere Zellen reduzieren durch vermehrten Anfall von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP) mehr MTT zu (E,Z)-5-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-1,3-Diphenylformazan. Dieses Formazan kann anschließend mit Isopropanol +

5 % Ameisensäure aus den Zellen gelöst und photometrisch bei einer Absorptionswellenlänge von 562 nm gemessen werden. Eine stärkere Absorption korreliert mit einer höheren Stoffwechselaktivität der Zellen.

Makrophagen der Zelllinie P388D1 wurden wie in Abschnitt 2.2.5.4 mit *L. monocytogenes* infiziert. Es wurde mit MOI 100, 200 und 500 infiziert. Die Infektionszeit betrug 45 min, die Zeit der Gentamicinbehandlung betrug 24 h. Für die Herstellung der MTT-haltigen Lösung wurde die MTT-Stocklösung in RPMI + 10 % FKS Medium 1:10 verdünnt. Der Überstand aus den Wells wurde vorsichtig abgezogen und durch 500 µl des MTT-haltigen Mediums ersetzt. Die 24 Well Platte wurde für 2 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Der MTT-haltige Überstand wurde abgezogen und durch 500 µl Isopropanol + 5 % Ameisensäure ersetzt, um das Formazan zu lösen. Die 24 Well Platte wurde bei 600 rpm für 10 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Es wurden je Well in einer Dreifachbestimmung 100 µl abgenommen und in eine 96 Well Platte pipettiert. Die Absorptionsmessung erfolgte am Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm.

### **2.2.6 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, um in einer Suspension befindliche Zellen einzeln zu untersuchen. Hierzu werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom fokussiert, sodass sie einzeln durch eine Messkammer geführt werden. In dieser Messkammer werden sie von mehreren Lasern aus unterschiedlichen Richtungen bestrahlt. Das durch die Zellen emittierte Licht gibt Aufschluss über die Größe und Granularität der einzelnen Zellen. Durch einen Laser in Richtung des Zellflusses (*forward scatter*, FSC) gibt die Beugung des Lasers durch die bestrahlte Zelle Aufschluss über die Größe der Zelle. Durch einen Laser, der rechtwinklig zum Fluss der Zellen ausgerichtet ist (*side scatter*, SSC) wird das Licht durch die Zellen gebrochen, der SSC gibt Aufschluss über die Granularität der Zellen.

Zusätzlich zu den Lasern, die FSC und SSC erzeugen, und somit Aufschluss über die Morphologie der Zellen geben, werden in Durchflusszytometern Laser mit bestimmter Wellenlänge verwendet, die fluorochrommarkierte Antikörper oder Partikel anregen können. Durch Lichtemission dieser angeregten Fluorochrome können zum Beispiel Proteine der Zellen durch Antikörperbindung oder anderweitige Fluorochrommarkierung spezifisch nachgewiesen werden.

Zellfragmente und Dupletten wurden durch geeignetes Gating von der Messung ausgeschlossen. Die Auswertung der Fluoreszenzmarkierung wurde je nach verwendetem Fluorochrom mit einem Laser mit der entsprechenden Wellenlänge durchgeführt.

### **2.2.6.1 Durchflusszytometrie von KM-H2 Zellen mit Ki-4-scFv-Fc-Fusionsproteinen**

Zellen der Linie KM-H2 wurden wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben analog zu einem Infektionsversuch vorbereitet. Am Tag des Experimentes wurden die Zellen aus je einem Well in einer Dreifachbestimmung in 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert. Die Zellen wurden bei 587 rcf für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet in PBS + 0,2 % BSA aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation bei gleichen Einstellungen wurde das Pellet in 100 µl PBS + 0,2 % BSA aufgenommen und mit 100 µl der Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein-haltigen Überstandslösung durch Pipettieren vermischt. Die Inkubation erfolgte für 30 min auf Eis. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei gleichen Einstellungen. Das Pellet wurde in 1 ml PBS + 0,2 % BSA aufgenommen und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 mal durchgeführt. Der verwendete Sekundärantikörper *Alexa Fluor 448 rabbit anti mouse* (abcam) wurde 1:250 in PBS + 0,2 % BSA verdünnt. Das Pellet wurde nach der letzten Zentrifugation in 200 µl Sekundärantikörperlösung aufgenommen und im Dunkeln für 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgten eine erneute Zentrifugation bei gleichen Einstellungen und 3 Waschschriffe in jeweils 1 ml PBS + 0,2 % BSA. Das Pellet wurde nach der letzten Zentrifugation in 500 µl PBS aufgenommen. Als Negativkontrolle wurden KM-H2 Zellen benutzt, die nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden. Zusätzlich wurden KM-H2 Zellen, die weder mit Primär- noch mit Sekundärantikörper gefärbt wurden, untersucht. Die Probe wurde am *FACSCalibur* (BD Biosciences) Durchflusszytometer bei folgenden Einstellungen gemessen: FSC: E01 7,21 lin; SSC: 300/6,55 lin; FI2-H 550 log; FI-1 560 log.

### **2.2.6.2 Durchflusszytometrie von *L. monocytogenes* zum Nachweis von *S. aureus* Protein A (SPA)**

Am Vortag des Versuches wurden ÜNK von *L. monocytogenes* hergestellt. Diese wurden am Tag des Experimentes 1:50 in BHI Selektivmedium verdünnt und bis zu einem Wachstum von  $OD_{600} = 1$  bei 180 rpm und 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

Anschließend wurde 1 ml Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bei 14926 rcf für 2 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen und erneut bei 14926 rcf für 2 min bei RT zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 mal durchgeführt. Das Pellet wurde in 1 ml PBS aufgenommen. Von dieser Bakteriensuspension wurden 50 µl abgenommen und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der polyklonale Antikörper *Anti Protein A antibody (Texas Red) ab7247* (abcam) wurde 1:250 in PBS + 0,2 % BSA verdünnt. Zu jeder Probe wurden 100 µl Antikörperlösung pipettiert. Die Proben wurden für 45 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Zum Waschen wurde die Suspension bei 14926 rcf für 2 min bei 4 °C

zentrifugiert, das Pellet wurde anschließend in 1 ml PBS + 0,2 % BSA aufgenommen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 mal wiederholt. Das Pellet wurde in 500 µl PBS aufgenommen und am *FACSCalibur* (BD Biosciences) Durchflusszytometer bei folgenden Einstellungen gemessen: FSC: E01 4,43 lin; SSC: 705/1,00 lin; FL-1 700 log; FI-2 405 log; FI-3 990 log; FI-4 900 log.

### **2.2.6.3 Durchflusszytometrie von P388D1 Zellen nach Infektion mit *L. monocytogenes***

Die P388D1 Zellen wurden analog zu Abschnitt 2.2.5.4 mit *L. monocytogenes* infiziert. Die MOI betrug 500, die Infektionszeit betrug 45 min und die Zeit der Gentamicinbehandlung betrug 8 h. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber gelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Suspension wurde bei 587 rcf für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS durch Pipettieren resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde 3 mal durchgeführt. Zur Detektion von Caspase 3/7 als Markerprotein für die Apoptose wurde das CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben verwendet. Das Caspase 3/7 Green Detection Reagent wurde 1:1000 in PBS + 2 % BSA verdünnt. Das Pellet der Probe wurde in je 500 µl dieser Lösung aufgenommen und für 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung ohne weitere Waschschriffe am Durchflusszytometer *C6 Accuri* (BD Biosciences)

### **2.2.6.4 Durchflusszytometrie von KM-H2 Zellen nach Infektion mit SPA- und ETA-produzierenden *L. monocytogenes* in Kombination mit Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein**

KM-H2 Zellen wurden analog zum Infektionsversuch in Abschnitt 2.2.5.1 mit *L. monocytogenes* in Kombination mit dem Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein infiziert. Die MOI betrug 200, die Infektionszeit betrug 45 min und die Zeit der Gentamicinbehandlung betrug 8 h. Die Zellen wurden aus der 24 Well Platte abpipettiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Suspension wurde bei 587 rcf für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt 3 mal durchgeführt. Zur Detektion von Caspase 3/7 als Markerprotein für die Apoptose wurde das CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher) nach Herstellerangaben verwendet. Das Caspase-3/7 Green Detection Reagent wurde 1:1000 in PBS + 2 % BSA verdünnt. Das Pellet wurde in je 500 µl dieser Lösung aufgenommen und für 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Es erfolgte die Messung ohne weitere Waschschriffe am Durchflusszytometer *C6 Accuri* (BD Biosciences).

### **2.2.7 Statistische Auswertung**

Statistische Analysen wurden für näherungsweise normalverteilte Stichproben mit dem ungepaarten studentischen T-Test durchgeführt. Für nicht normalverteilte Stichproben wurde der Wilcoxon-Rangsummentest (Mann-Whitney-U-Test) verwendet. Die Daten sind in Balkendiagrammen mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Ein p-Wert  $< 0,05$  (\*) wurde als signifikant angesehen. p-Werte  $> 0,05$  sind mit „n.s.“ (nicht signifikant) gekennzeichnet.

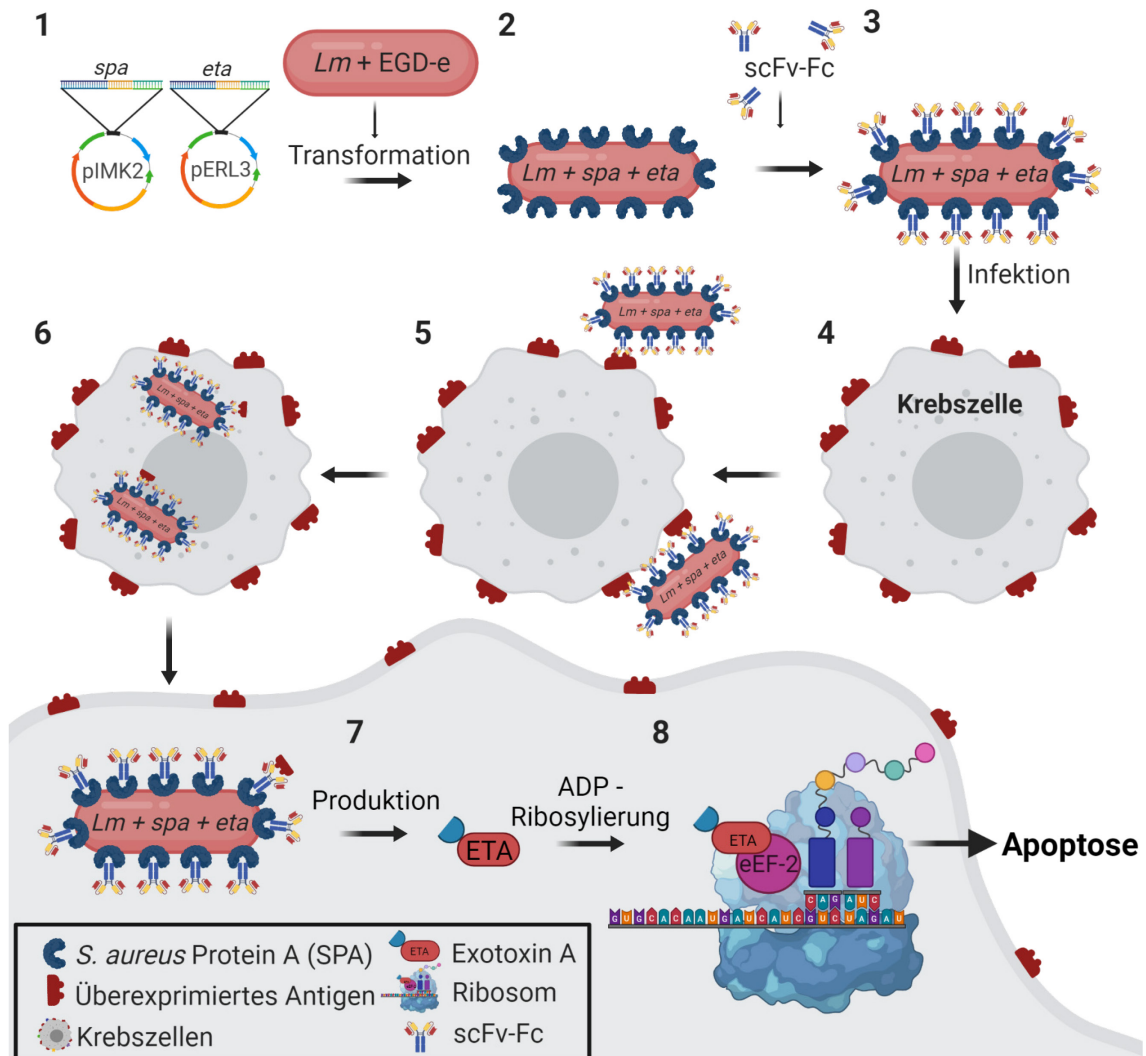
Weiter Bezeichnungen für p-Werte:  $p < 0.01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*)

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Strategie der gezielten Infektion von Krebszellen mit *L. monocytogenes*

Ziel dieser Arbeit ist die gezielte Infektion von Krebszellen mit Bakterien der Spezies *Listeria monocytogenes* mit Hilfe einer Antikörper-Antigen Interaktion. Hierzu wurde das antikörperbindende Protein A aus *Staphylococcus aureus* (SPA) in *L. monocytogenes* kloniert. SPA verfügt über ein proteineigenes LPXTG-Motiv (Aminosäuremotiv aus Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin) und eine hydrophobe Region am C-Terminus, durch die das Protein in der Zellwand der Bakterien kovalent verankert wird (Schneewind et al. 1992). SPA hat die Eigenschaft, Antikörper am konstanten *fragment crystallizable* (Fc-Fragment) zu binden (Forsgren und Sjöquist 1966). Die so hergestellten SPA-tragenden *L. monocytogenes* wurden mit Antikörperfragmenten (*single chain variable fragment*-Fc-Fusionsprotein, scFv-Fc-Fusionsprotein) inkubiert, um diese über das Fc-Fragment auf der Zellwandoberfläche der Bakterien an SPA zu binden. Die so gebundenen scFv-Fc-Fusionsproteine sind mit den variablen scFv-Teilen in der Lage, spezifische Antigene zu binden. Die verwendeten scFv-Fc-Fusionsproteine sind gegen Antigene gerichtet, die auf Krebszellen überexprimiert werden. Anschließend erfolgte die Infektion der Krebszellen mit den scFv-Fc-Fusionsprotein tragenden *L. monocytogenes*, um eine gesteigerte Infektionsrate zu untersuchen. In einem weiteren Schritt sollten die so gezielt infizierten Krebszellen mit Hilfe eines von den Bakterien produzierten Toxins eliminiert werden. Um dies zu erreichen, wurde die genetische Information für einen Teil des *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA) in *L. monocytogenes* kloniert. ETA wurde unter die Kontrolle des intrazellulär vermehrt exprimierten Aktin-akkumulierenden Faktor A (*actA*)-Promotors gestellt, um das Protein produzieren zu lassen, wenn sich die Bakterien im Intrazellularraum der infizierten Zelle befinden. ETA ist ein Toxin, das den eukaryotischen Elongationsfaktor 2 (eEF2) über eine ADP-Ribosylierung inaktiviert und somit die Proteinproduktion der eukaryotischen Zelle verhindert. Die Zelle geht daraufhin in die Apoptose über. Die Strategie ist in Abbildung 13 verdeutlicht.

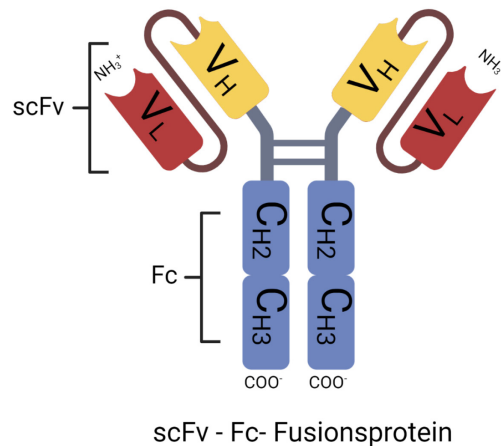
## Ergebnisse



**Abbildung 13: Strategie der gezielten Infektion von Krebszellen mit *L. monocytogenes* (*Lm*) mit Hilfe von *S. aureus* Protein A (SPA) und einem scFv-Fc-Fusionsprotein (scFv-Fc) sowie der anschließenden Eliminierung der Krebszellen mithilfe von *P. aeruginosa* Exotoxin A (ETA).** 1: Zunächst erfolgt die Klonierung der genetischen Information von *spa* in das Plasmid pIMK2. Die genetische Information von *eta* wird in das Plasmid pERL3 kloniert. Anschließend erfolgt die Transformation der Plasmide in *Lm*. 2: SPA wird in *Lm* exprimiert und mit dem proteineigenen Anker auf der Zellwandoberfläche verankert. Danach werden die SPA-tragenden *Lm* mit einem an ein Krebszellantigen bindenden scFv-Fc-Fusionsprotein inkubiert. 3: Die *Lm* binden das scFv-Fc-Fusionsprotein mit Hilfe von SPA auf ihrer Oberfläche. 4: Die Krebszellen der Zelllinien KM-H2 und DMS-273 werden *in vitro* mit den jeweils gegen sie gerichteten scFv-Fc-Fusionsproteinen-tragenden *Lm* infiziert. 5: Mit dem auf der Oberfläche der *Lm* gebundenen scFv-Fc-Fusionsprotein und dem spezifischen Antigen auf KMH2 und DMS-273 kommt es zu einer spezifischen Bindung der *Lm* an die Krebszelloberfläche. 6: Die Bakterien werden gemeinsam mit dem über das scFv-Fc gebundenen Antigen internalisiert. 7: Mit Hilfe eines intrazellulär induzierten *Lm* Promotors wird *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA) produziert und sezerniert. 8: ETA bindet an den eukaryotischen Elongationsfaktor 2 (eEF-2). eEF-2 wird von ETA durch eine ADP-Ribosylierung inaktiviert, wodurch die Proteinbiosynthese inhibiert wird und die Zelle in die Apoptose übergeht. Abbildung erstellt mit BioRender.com.

In dieser Arbeit wurden scFv-Fc-Fusionsproteine verwendet (Abb. 14). An das Fc-Fragment eines murinen IgG2a-Antikörpers sind an jede der zwei schweren Ketten am N-Terminus je ein scFv gebunden. Das Fc-Fragment des Fusionsproteins soll verwendet werden, um von SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* gebunden zu werden. Die verwendeten scFv-Fc-Fusionsproteine wurden von HEK-293 Zellen produziert

und in den Überstand des Kulturmediums sezerniert (Haaf et al. 2015; Klimka et al. 1999).



**Abbildung 14: Schematische Darstellung eines scFv-Fc-Fusionsproteins.** Die in dieser Arbeit verwendeten scFv-Fc-Fusionsproteine bestehen aus dem Fc-Fragment eines murinen IgG2a-Antikörpers und einem scFv. Die beiden schweren Ketten des Fc-Fragments sind an der *hinge region* über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die schwere Kette der scFv ( $V_H$ ) wird am N-Terminus des Fc-Fragments gebunden. Da an beiden Teilen des Fc-Fragments je eine scFv gebunden wird, entsteht ein bivalentes scFv-Fc-Fusionsprotein mit zwei Antigenbindungsstellen. Die Molekülmasse des gesamten Proteins beträgt ca. 100 kDa. Abbildung erstellt mit *BioRender.com*.

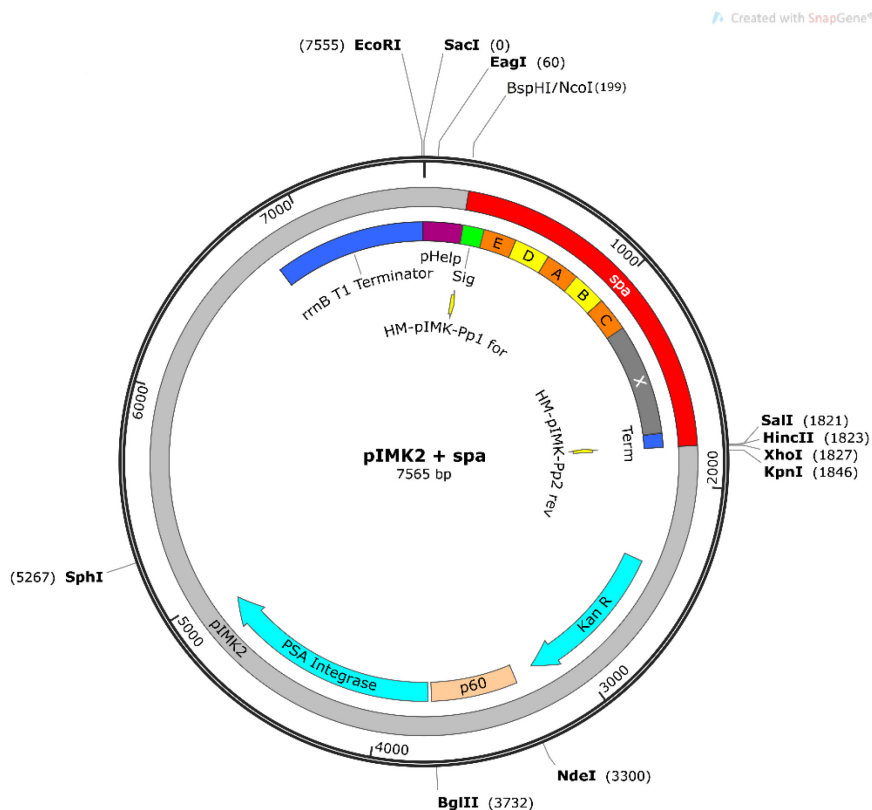
### 3.2 Klonierung von *Staphylococcus aureus* Protein A (SPA) in *Listeria monocytogenes*

Protein A (SPA) ist ein von *Staphylococcus aureus* produzierter Virulenzfaktor, der auf der Zellwandoberfläche der Bakterienzelle verankert wird. Dies geschieht durch ein proteineigenes LPXTG-Motiv, eine hydrophobe Region am C-Terminus sowie ein geladenes Ende (Schneewind et al. 1992). SPA hat die Eigenschaft Antikörper unspezifisch an deren konstanten Fc-Fragment zu binden (Forsgren und Sjöquist 1966). Durch die Bindung am konstanten Teil bleibt die Fähigkeit der Antikörper, Antigene mit dem variablen Teil spezifisch zu binden, erhalten. Diese Eigenschaft von SPA wird sich in dieser Arbeit zu Nutze gemacht.

SPA ist ein Protein, das in *L. monocytogenes* nicht vorkommt. Um dieses Protein auf der Zellwandoberfläche von *L. monocytogenes* zu exprimieren, musste das für SPA kodierende Gen in *L. monocytogenes* transformiert werden. Hierzu wurde zunächst eine PCR mit spezifischen Primern durchgeführt, um *spa* inklusive der proteineigenen Signalsequenz, der Zellwandankersequenz und der Terminatorregion aus der chromosomalen DNA von *S. aureus* „NCTC 8325“ zu amplifizieren. Die Primer „HM-pIMK-Pp1 for“ und „HM-pIMK-Pp2 rev“ (Tabelle 3, 2.1.4) wurden so gewählt, dass an beiden Enden des entstehenden PCR-Produktes Überhänge mit Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *BspHI* und *SalI* hergestellt wurden, die anschließend mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten werden konnten (Tabelle 10, 2.1.9). Das so amplifizierte DNA-Fragment konnte danach mithilfe der eingeführten Schnittstellen in das

## Ergebnisse

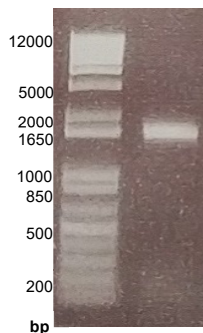
Plasmid pIMK2 (Abb. 9, 2.1.3) ligiert werden. Das amplifizierte *spa*-kodierende PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Bsp*HI und *Sal*I geschnitten. Das Plasmid pIMK2 wurde mit Enzymen für die Schnittstellen *Nco*I und *Sal*I geschnitten (2.2.1.6). Anschließend wurden das verdaute PCR-Produkt und das verdaute Plasmid ligiert (2.2.1.7). *Bsp*HI und *Nco*I bilden nach dem Schneiden identische *sticky ends*, sodass eine Ligation der beiden Schnittstellen möglich ist. Nach der Ligation ist die Basensequenz der ehemaligen Schnittstelle 5'-3':CCATGA und kann weder von *Bsp*HI noch von *Nco*I geschnitten werden. Als Promotor wurde *pHelp* (*highly expressed Listeria promoter*) aus pIMK2 verwendet, der der Schnittstelle *Nco*I vorgeschaltet ist (Abb. 9, 2.1.3). Die ligierte DNA wurde in chemisch kompetente Bakterien der Spezies *Escherichia coli* DH10 $\beta$  transformiert (2.2.2.8). Die Klonierung wurde von Y. Yin (am Institut für med. Mikrobiologie der JLU Gießen) durchgeführt. Abbildung 15 zeigt die Plasmidkarte des ligierten Plasmides pIMK2 + *spa*.



**Abbildung 15: Plasmidkarte des für *spa* kodierenden Plasmids pIMK2 + *spa*.** In die Multiple cloning site des Plasmids pIMK2 wurde mittels enzymatischem Verdau und Ligation die genetische Information für *spa* ligiert. Hierzu wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Sal*I, die amplifizierte DNA mit den Enzymen *Bsp*HI und *Sal*I verdaut. Die Restriktionsschnittstellen wurden anschließend enzymatisch ligiert. Signalsequenz (Sig), Zellankersequenz (X), die proteinbindenden Regionen E, D, A, B und C und der Terminator (Term) sind im klonierten Abschnitt des *spa*-Gens enthalten. ***spa***: kodierender Abschnitt von *S. aureus* Protein A, **pHelp**: *highly expressed Listeria promoter* aus pIMK2, **Sig**: *spa* eigene Signalsequenz, **E**: Region E, **D**: Region D, **A**: Region A, **B**: Region B, **C**: Region C. Die Regionen E,D,A,B,C sind für die Antikörperbindung verantwortlich. **X** zur Zellwandverankerung, **Term**: proteineigener Terminator. **KanR**: Resistenzgen gegen Kanamycin, **p60**: Promotor aus pIMK2. Primer: „HM-pIMK-Pp1 for“ und „HM-pIMK-Pp2 rev“ (Tabelle 3, 2.1.4) (Abb. erstellt mit SnapGene®)

## Ergebnisse

Das Plasmid pIMK2 mit der ligierten genetischen Information von *spa* wurde nach der Transformation aus *E. coli* DH10 $\beta$  isoliert (2.2.1.8). Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung von *spa* in das Plasmid, wurde zunächst eine PCR mit den oben genannten *spa*-spezifischen Primern durchgeführt. Hierbei zeigt sich eine korrekte Länge des amplifizierten PCR-Produktes von 1638 Basenpaaren (bp) (Abb. 16).



**Abbildung 16: Nachweis der Amplifikation des *spa* Inserts im Plasmid pIMK2 + *spa*.** Primer: „HM-pIMK-Pp1 for“ und „HM-pIMK-Pp2 rev“ (2.1.4) Nach Transformation des für SPA kodierenden Plasmids wurde eine PCR mit für *spa* spezifischen Primern „HM-pIMK-Pp1 for“ und „HM-pIMK-Pp2 rev“ (2.1.4) mit dem isolierten Plasmid pIMK2 + *spa* als *template* durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden nach ihrer Größe in 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Quantifizierung wurde ein DNA-Größenstandard eingesetzt. Die Bande zeigt eine Länge des spezifisch amplifizierten PCR-Produkts auf der Höhe der 1650 Basenpaar (bp)-Markierung des Größenstandards, entsprechend der Länge des kodierenden Abschnittes von *spa* (1638 bp).

Abbildung 16 zeigt eine Länge des spezifisch amplifizierten PCR-Produkts, die der Länge des kodierenden Abschnittes von *spa* inklusive der proteineigenen Terminatorregion (1638 bp) entspricht. Die erfolgreiche Ligation des Plasmides pIMK2 + *spa* ist somit nachgewiesen.

Um eine korrekte Basenfolge des für *spa* kodierenden Abschnittes des Plasmids zu überprüfen, wurde das Plasmid pIMK2 + *spa* sequenziert (2.2.1.10). Die Ergebnisse der Sequenzierung zeigen, dass der klonierte *spa*-kodierende Abschnitt der ursprünglichen *spa* Sequenz von *S. aureus* „NCTC 8325“ entspricht und eine identische Basenabfolge vorweist (Anhang Abb. 1).

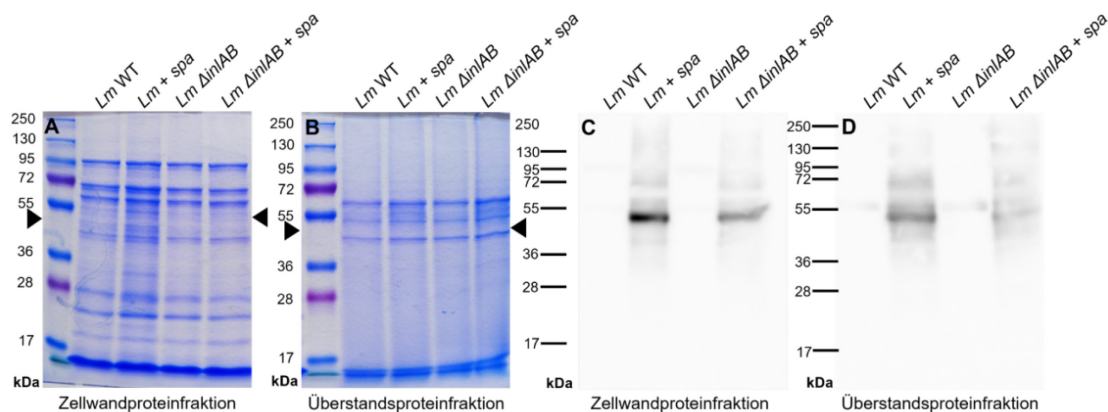
Das Plasmid pIMK2 + *spa* wurde anschließend durch Elektroporation in elektrokompetente *L. monocytogenes* EGD-e 1/2a Wildtyp (WT) transformiert (2.2.2.9). Zusätzlich wurde das Plasmid in die Internalin AB-Deletionsmutante *L. monocytogenes* EGD-e 1/2a  $\Delta$ *inIAB* (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inIAB*) transformiert, um eine Internalin-unabhängige Infektion der Zielzellen zu untersuchen.

Mittels PCR wurde der Erfolg der Transformation von pIMK2 + *spa* in *L. monocytogenes* nachgewiesen. Hierzu wurden Kolonien der mit pIMK2 + *spa* transformierten *L. monocytogenes* von Agarplatten gepickt und es wurde eine PCR mit den *spa* spezifischen Primern „HM-pIMK-Pp1 for“ und „HM-pIMK-Pp2 rev“ (Tabelle 3, 2.1.4) durchgeführt, um den Erfolg der Transformation nachzuweisen. Die hergestellten *spa*-DNA enthaltenden Stämme werden im Folgenden *L. monocytogenes* EGD-e\_pIMK2 + *spa* (*L. monocytogenes* + *spa*) und *L. monocytogenes* EGD-e  $\Delta$ *inIAB*\_pIMK2 + *spa* (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inIAB* + *spa*) genannt.

### 3.3 Nachweis der erfolgreichen Expression von SPA in *L. monocytogenes* + *spa* und *L. monocytogenes* $\Delta$ *inlAB* + *spa*

#### 3.3.1 Nachweis von SPA in *L. monocytogenes* + *spa* und *L. monocytogenes* $\Delta$ *inlAB* + *spa* mittels Western Blot

Nach dem Nachweis der Amplifikation der *spa*-haltigen Plasmide in *L. monocytogenes* + *spa* und *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* auf DNA-Ebene erfolgte als nächster Schritt der Nachweis von SPA auf Protein-Ebene. Hierzu wurden Proteine aus der Zellwand und dem Überstand von *L. monocytogenes* + *spa* und *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* isoliert. SPA wird mittels eines LPXTG-Motivs, einer hydrophoben Region am C-Terminus und eines geladenen Endes in der Zellwand verankert (Schneewind, Model et al. 1992). Des Weiteren konnte von Becker et al. gezeigt werden, dass SPA zusätzlich zur Verankerung in der Zellwand zu einem geringeren Anteil in den Überstand des Mediums sezerniert wird (Becker et al. 2014). Aus diesem Grund wurden die Zellwand- und die Überstandsproteinfraktion untersucht (2.2.3.2), (2.2.3.3). Die Proteinkonzentrationen wurden mittels Bradford-Methode bestimmt (2.2.3.1). Anschließend wurde eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (2.2.3.5), um die Proteine elektrophoretisch nach ihrer Größe aufzutrennen. Das Gel wurde mit der Coomassie-Färbung gefärbt (2.2.3.6). Außerdem wurden die Proteine mittels Western Blot mit einem monoklonalen Anti-SPA Antikörper (Tabelle 7, 2.5.1) mittels Chemilumineszenz untersucht (2.2.3.8).



**Abbildung 17: Nachweis von SPA in der Zellwandproteinfraktion und der Überstandsproteinfraktion von *L. monocytogenes* + *spa* und *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* mittels Western Blot (WB).** **A:** SDS-PAGE der Zellwandproteinfraktion mit Coomassie-Färbung. **B:** SDS-PAGE der Überstandsproteinfraktion mit Coomassie-Färbung. **C:** SDS-PAGE der Zellwandproteinfraktion und WB mit Anti-SPA Antikörper (Tabelle 7). **D:** SDS-PAGE der Überstandsproteinfraktion und WB mit Anti-SPA Antikörper (Tabelle 7). In der SDS-PAGE mit Coomassie Färbung ist sowohl in der Zellwandproteinfraktion (A) als der Überstandsproteinfraktion (B) kein Nachweis einer spezifischen Bande in den Proben, in die zuvor pIMK2 + *spa* transformiert wurde, erfolgt. Der Größenbereich, in dem SPA erwartet wird, ist mit Pfeilspitzen markiert. Der WB zeigt in der Zellwandfraktion (C) von *Lm* + *spa* und *Lm*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* eine Bande knapp unter der 55 kDa-Marke. Dies entspricht der erwarteten Größe von SPA (52,8 kDa). Diese Bande zeigt sich nur in den Zellwandproteinen der *Lm*, in die das für *spa* kodierende Plasmid pIMK2 + *spa* transformiert wurde. In der Kontrolle mit Proteinen aus Wildtyp *Lm* und *Lm*  $\Delta$ *inlAB* ist keine Bande zu sehen. In der Überstandsproteinfraktion (D) der Stämme, in die pIMK2 + *spa* transformiert wurde ist ebenfalls eine Bande entsprechender Größe sichtbar, die in den Stämmen ohne erfolgte Transformation von pIMK2 + *spa* fehlt. Des Weiteren stellt sich bei allen Stämmen in der Überstandsproteinfraktion (D) eine unspezifische Bande über der 55 kDa-Marke dar.

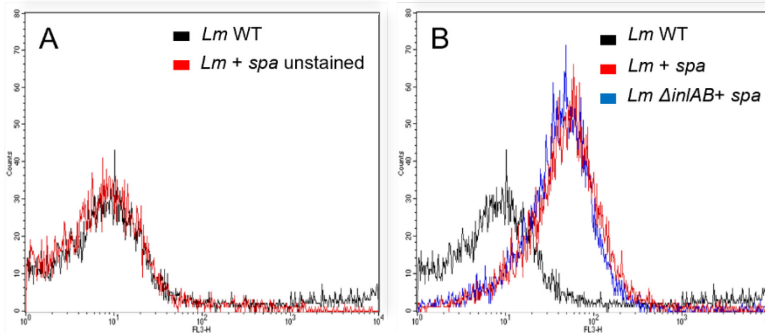
In der SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung ist weder in der Zellwandproteinfraktion (Abb. 17 A) noch in der Überstandsproteinfraktion (Abb. 17 B) eine spezifische Bande in *L. monocytogenes* + *spa* und *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* mit der erwarteten Größe von SPA (52,8 kDa) zu erkennen. Der zu erwartende Größenbereich wurde mit Pfeilspitzen markiert.

Der Western Blot zeigt nach Inkubation mit einem monoklonalen, gegen SPA gerichteten Antikörper in der Zellwandproteinfraktion (Abb. 17 C) eine einzelne Bande knapp unter der 55 kDa-Marke des Größenstandards bei den Stämmen, in die das Plasmid pIMK2 + *spa* transformiert wurde. Diese Größe entspricht der erwarteten Größe von SPA (52,8 kDa). SPA weist eine große Variabilität hinsichtlich der Größe zwischen verschiedenen Stämmen auf (Cheung et al. 1987). Die hier verwendete kodierende Sequenz besteht aus 1440 Basenpaaren (Anhang Abb. 1), entsprechend einer Primärstruktur von 480 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 52,8 kDa. In der Überstandsproteinfraktion (Abb. 17 D) ist in den Stämmen, in die pIMK2 + *spa* transformiert wurde, ebenfalls eine Bande mit SPA-entsprechender Größe zu verzeichnen. Die Zellwandproteinfraktion (Abb. 17 C) und Proteine aus dem Überstand (Abb. 17 D) von *L. monocytogenes* Wildtyp und *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* zeigen erwartungsgemäß keine Banden, die der Größe von SPA entsprechen. Des Weiteren ist eine schwache, unspezifische Bande bei ca. 55 kDa in allen untersuchten Überstandsproben (Abb. 17 D) zu erkennen. Durch den Western Blot erfolgt der Nachweis von SPA in der Zellwandproteinfraktion sowie in der Überstandsproteinfraktion der *L. monocytogenes*, in die pIMK2 + *spa* transformiert wurde.

### **3.3.2 Nachweis von SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* + *spa* und *L. monocytogenes* $\Delta$ *inlAB* + *spa* mittels Durchflusszytometrie**

Der im vorigen Abschnitt durchgeführte Proteinnachweis mittels Western Blot ist nicht ausreichend, um die Lokalisation von SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* nachzuweisen. Für diesen Nachweis wurden lebende Bakterien in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase mit dem fluoreszenzmarkierten, polyklonalen Antikörper *Anti Protein A antibody* (Texas Red) (Tabelle 7, 2.1.5) inkubiert. Die Inkubation mit dem Antikörper (Verdünnung 1:250) erfolgte für 45 min auf Eis. Die so behandelten Bakterien wurden dann mittels Durchflusszytometrie im Hinblick auf das antikörpermarkierte SPA auf ihrer Oberfläche untersucht (2.2.6.2).

## Ergebnisse



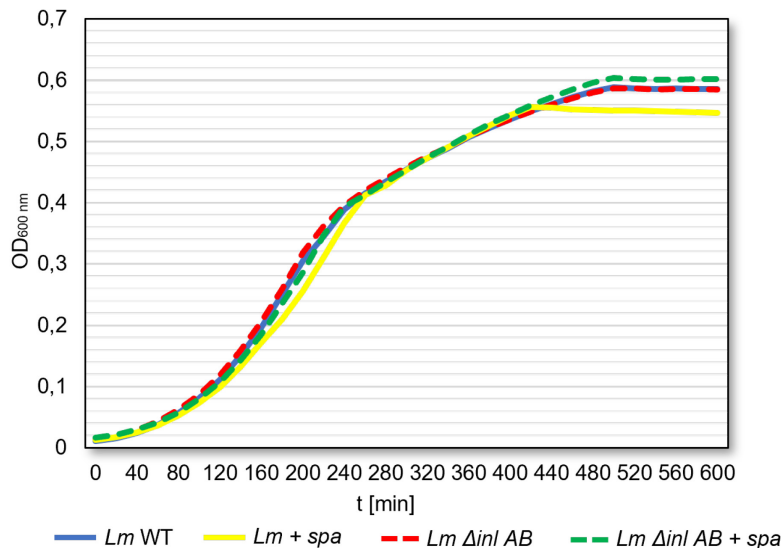
**Abbildung 18: Nachweis von SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* + *spa* und *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* mittels Durchflusszytometrie.** Die verschiedenen *Lm* wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bei  $OD_{600} = 1,0$  mit polyklonalen, fluoreszenzmarkierten, gegen SPA gerichteten Antikörpern „Anti Protein A antibody (Texas Red) ab7247“ (Tabelle 7, 2.1.5) für 45 min auf Eis inkubiert. Nach dem Waschen wurde das Fluoreszenzmuster der verschiedenen Stämme im Durchflusszytometer untersucht. **A:** Die Histogramme zeigen keine unterschiedliche Fluoreszenz von antikörpergefärbten *Lm* WT und ungefärbten *Lm* + *spa*. **B:** Hier lässt sich eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz bei den Stämmen, in die pIMK2 + *spa* transformiert wurde (*Lm* + *spa*, *Lm*  $\Delta$ *inlAB* + *spa*), feststellen. Als Kontrolle diente *Lm* WT. Zwischen den Stämmen *Lm* + *spa* und *Lm*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* zeigt sich kein wesentlich unterschiedliches Fluoreszenzmuster. Darstellung eines repräsentativen Experimentes aus einer Dreifachbestimmung.

Die Abbildung 18 zeigt in Teil A keinen Unterschied hinsichtlich der Fluoreszenz von ungefärbten Bakterien aus dem Stamm *L. monocytogenes* + *spa* und mit dem polyklonalen Anti-SPA Antikörper gefärbten *L. monocytogenes* Wildtyp (Abb. 18 A). Hier erfolgt kein Nachweis von SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes*. In Abbildung 18 B erkennt man hingegen eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz der mit dem Antikörper gefärbten Stämme *L. monocytogenes* + *spa* sowie *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* im Vergleich zu dem gefärbten Wildtyp Stamm *L. monocytogenes* WT. Hinsichtlich der Fluoreszenzzunahme von *L. monocytogenes* + *spa* und *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* zeigen sich keine deutlichen Unterschiede untereinander. Die Zunahme der Fluoreszenz der SPA-exprimierenden Stämme im Vergleich zur Kontrolle deutet darauf hin, dass SPA von den mit pIMK2 + *spa* transformierten *L. monocytogenes* produziert und auf der Zelloberfläche verankert wird.

### 3.3.3 SPA exprimierende *L. monocytogenes* wachsen extrazellulär ähnlich wie Wildtyp *L. monocytogenes*

Um das extrazelluläre Wachstum von *L. monocytogenes* zu untersuchen, wurden Wachstumskurven der verschiedenen Stämme in BHI Selektivmedium angefertigt. Die Wachstumskurven wurden mit einem Mikroplatten Lesegerät erstellt (2.2.2.10).

## Ergebnisse



**Abbildung 19: Wachstumskurven von SPA exprimierenden *L. monocytogenes* und *L. monocytogenes* Wildtyp.** Wachstumskurven von *Lm* WT und *Lm ΔinlAB* wurden in BHI Medium erstellt. Zum Vergleich wurden Wachstumskurven von *Lm + spa* und *Lm ΔinlAB + spa* in den entsprechenden Selektivmedien hergestellt. *Lm + spa* tritt im Vergleich zu den anderen Stämmen früher in die stationäre Wachstumsphase ein. Sonst zeigen die verschiedenen Stämme kein wesentlich unterschiedliches Wachstumsverhalten. Darstellung eines repräsentativen Experimentes aus einer Dreifachbestimmung.

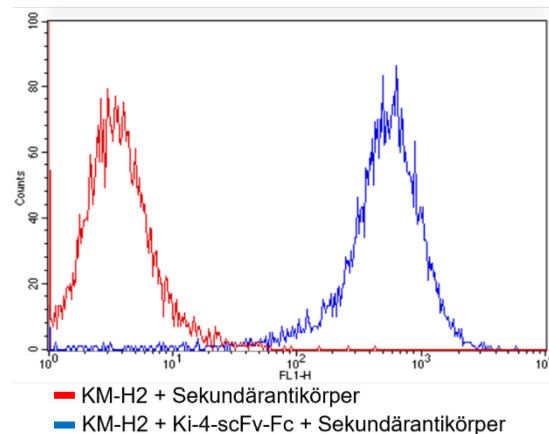
Abbildung 19 zeigt Wachstumskurven von *L. monocytogenes* WT und der Deletionsmutante *ΔinlAB* sowie die korrespondierenden SPA exprimierenden Stämme *L. monocytogenes + spa* und *L. monocytogenes ΔinlAB + spa*. *L. monocytogenes + spa* tritt im Vergleich zu den anderen Stämmen früher in die stationäre Wachstumsphase ein. Sonst zeigt sich zwischen den verschiedenen Stämmen kein wesentlicher Unterschied.

### 3.4 Infektionsversuche mit *L. monocytogenes* in Krebszelllinien

#### 3.4.1 Nachweis der Bindung von Ki-4-scFv-Fc an der Zelllinie KM-H2

Für die Infektionsversuche wurden zunächst suspendierte Krebszellen eines Hodgkin-Lymphoms in Zellkultur untersucht. Es wurde die Zelllinie KM-H2 verwendet, die das Oberflächenprotein CD30 überexprimiert (Kamesaki et al. 1986). Um eine gezielte Infektion der Krebszellen zu erreichen, wurde mit dem an dieses Oberflächenprotein bindenden scFv-Fc-Fusionsprotein Ki-4 (Ki-4-scFv-Fc) gearbeitet. Ki-4 bindet an CD30 (Klimka et al. 1999), das auf der Oberfläche von KM-H2 überexprimiert wird (Kamesaki et al. 1986). Die verwendeten scFv-Fc-Fusionsproteine wurden von HEK-293 Zellen produziert und in den Überstand des Kulturmediums sezerniert (Haaf et al. 2015; Klimka et al.). Der Ki-4-scFv-Fc-haltige Überstand wurde für die folgenden Infektionsversuche verwendet. Um die Bindung des Ki-4-scFv-Fc an Zellen der Linie KM-H2 zu überprüfen, wurde zunächst eine Durchflusszytometrie mit den KM-H2 Zellen, dem Ki-4-scFv-Fc und einem an das konstante Fc-Fragment des Ki-4-scFv-Fc bindenden

fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper *Alexa Fluor 448 rabbit anti mouse* (Tabelle 7, 2.5.1) durchgeführt.



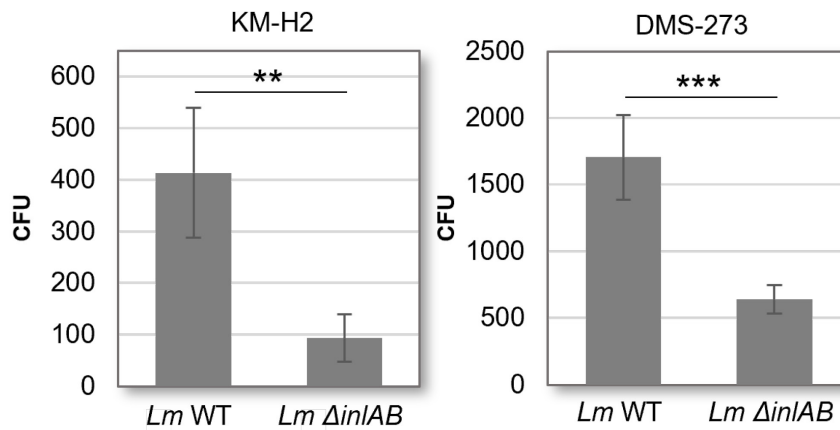
**Abbildung 20: Nachweis der Bindung des Ki-4-scFv-Fc an Zellen der Linie KM-H2 mittels Durchflusszytometrie.** Die KM-H2 Zellen wurden mit dem gegen CD30 gerichteten Ki-4-scFv-Fc und einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper *Alexa Fluor 448 rabbit anti mouse* (Tab. 7, 2.5.1) inkubiert. Als Kontrolle (rote Kurve) dienten Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden. Nach dem Waschen erfolgte die Messung des Fluoreszenzmusters im Durchflusszytometer. Zellen, die sowohl mit dem Ki-4-scFv-Fc als auch mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurden, weisen eine deutlich stärkere Fluoreszenz auf (blaue Kurve) als die Kontrolle. Darstellung eines repräsentativen Experimentes aus einer Dreifachbestimmung.

Abbildung 20 zeigt in der roten Kurve KM-H2 Zellen, die nur mit Sekundärantikörper inkubiert wurden (Kontrollgruppe). Im Vergleich dazu zeigt sich nach Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc und anschließend mit dem Sekundärantikörper eine deutliche Zunahme des Fluoreszenzsignals FL1-H. Das Ki-4-scFv-Fc bindet an die KM-H2 Zellen, und diese Bindung lässt sich durch eine Zunahme der Fluoreszenz nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper nachweisen.

### 3.4.2 Die Internalisierung von *L. monocytogenes* in KM-H2 und DMS-273 Zellen ist Internalin AB abhängig

Es erfolgte die Infektion mit *L. monocytogenes* in der Zelllinie KM-H2 sowie in DMS-273, einer Zelllinie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms. Die Infektion wurde mit *L. monocytogenes* WT und der Deletionsmutante *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inIAB* durchgeführt. Es wurden  $5 \cdot 10^5$  Zellen mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 100 über eine Dauer von einer Stunde infiziert. Zur Elimination der extrazellulär gebliebenen *L. monocytogenes* folgte anschließend eine einstündige Behandlung mit 50  $\mu$ g/ml Gentamicin. Die Zellen wurden danach in PBS gewaschen und durch Behandlung mit kalter 0,2 % Triton X-100-Lösung in H<sub>2</sub>O lysiert. Das Zelllysate wurde auf Agarplatten ausplattiert, um die Anzahl der intrazellulären *L. monocytogenes* zu ermitteln. Die MOI wurde durch Ausplattieren einer Inokulum Kontrolle bestätigt.

## Ergebnisse



**Abbildung 21:** *L. monocytogenes* WT weist höhere Infektionszahlen in eukaryotischen KM-H2 sowie DMS-273 Zellen auf als die Deletionsmutante *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inIAB*. Infektionsversuch in KM-H2 und DMS-273 Zellen mit *Lm* WT und der Deletionsmutante *Lm*  $\Delta$ *inIAB*. *Lm* WT weist in beiden Zelllinien eine höhere Invasionsrate auf als die Deletionsmutante *Lm*  $\Delta$ *inIAB*. MOI 100. Gentamicinbehandlung 1h. Zellzahl  $5 \cdot 10^5$ /Well. (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

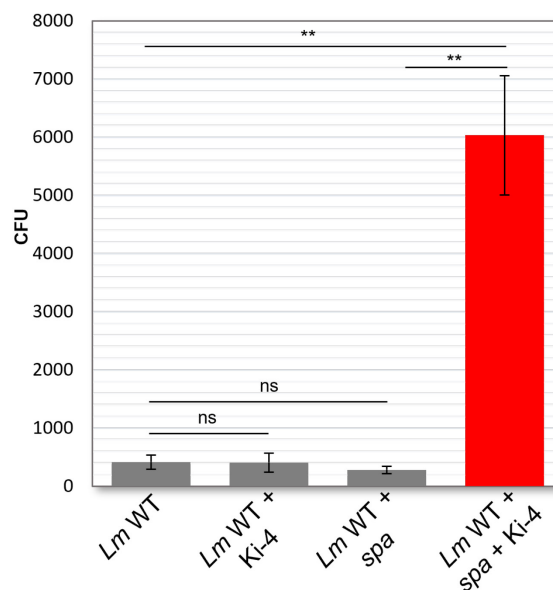
Abbildung 21 zeigt einen Infektionsversuch in KM-H2 und DMS-273 Zellen mit *L. monocytogenes* WT und *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inIAB*. Der Wildtyp hat in beiden Zelllinien eine höhere Invasionsrate als die Deletionsmutante  $\Delta$ *inIAB*. In KM-H2 ist bei *L. monocytogenes* WT im Vergleich zu *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inIAB* eine vierfach erhöhte Anzahl der intrazellulären Bakterien festzustellen. In DMS-273 ist bei *L. monocytogenes* WT im Vergleich zu *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inIAB* eine dreifach erhöhte Anzahl der intrazellulären Bakterien festzustellen. Internalin AB scheint einen Einfluss auf die Fähigkeit von *L. monocytogenes* zu haben, den Intrazellularraum von KM-H2 und DMS-273 Zellen zu erreichen. Die Ergebnisse entsprechen den Erwartungen, da Internalin von *L. monocytogenes* benötigt wird, um eukaryotische Zellen zu infizieren (Mengaud et al. 1996; Shen et al. 2000).

### 3.4.3 Infektionsversuche in KM-H2 Zellen mit *L. monocytogenes* + *spa* und *L. monocytogenes* $\Delta$ *inIAB* + *spa*

Um eine gezielte Infektion der KM-H2 Zellen zu erreichen, wurde ein Infektionsversuch etabliert, der mit Stämmen von *L. monocytogenes* durchgeführt wurde, die SPA auf ihrer Oberfläche exprimieren (*L. monocytogenes* + *spa* und *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inIAB* + *spa*) (3.3.1, 3.3.2) *L. monocytogenes* wurde zunächst mit dem gegen das von KM-H2 Zellen überexprimierte Oberflächenantigen CD30 gerichteten Ki-4-scFv-Fc für 45 min bei RT und 300 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion der KM-H2 Zellen mit einer MOI von 100 für eine Stunde. Zur Eliminierung der extrazellulär verbliebenen *L. monocytogenes* erfolgte eine einstündige Inkubation mit 50  $\mu$ g/ml Gentamicin. Als Kontrolle dienten die korrespondierenden Stämme ohne das für SPA kodierende Plasmid pIMK2 + *spa* (*L. monocytogenes* WT und *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inIAB*).

### 3.4.3.1 Nachweis der vermehrten Infektion von *L. monocytogenes* + *spa* und *L. monocytogenes* $\Delta$ *iniAB* + *spa* in Kombination mit Ki-4-scFv-Fc in Zellen der Linie KM-H2

Abbildung 22 zeigt die Auswertung der Infektionsversuche mit verschiedenen *L. monocytogenes* in Kombination mit Ki-4-scFv-Fc. Die Stämme mit und ohne SPA auf der Oberfläche wurden jeweils mit und ohne Ki-4-scFv-Fc inkubiert. Bei *L. monocytogenes* ohne SPA auf der Oberfläche (*L. monocytogenes* WT) zeigen sich nach Inkubation mit und ohne Ki-4-scFv-Fc keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der intrazellulären Bakterien (413 vs. 405 CFU). Das Ki-4-scFv-Fc scheint hier keinen Einfluss auf die Infektionsrate zu haben. Auch *L. monocytogenes* mit SPA auf der Oberfläche, die nicht mit Ki-4-scFv-Fc inkubiert wurden (*L. monocytogenes* + *spa*) zeigen eine ähnliche Anzahl der gezählten intrazellulären Bakterien (287 CFU). Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen, die als Kontrollgruppe gelten, festzustellen. Nur die Kombination aus SPA auf der Oberfläche und Inkubation mit Ki-4-scFv-Fc (*L. monocytogenes* + *spa* + Ki-4) führt zu einem deutlichen Anstieg der Infektionsrate. Im Vergleich zu *L. monocytogenes* + *spa* ist ein 22-facher Anstieg der intrazellulären Bakterien zu verzeichnen (6073 CFU).



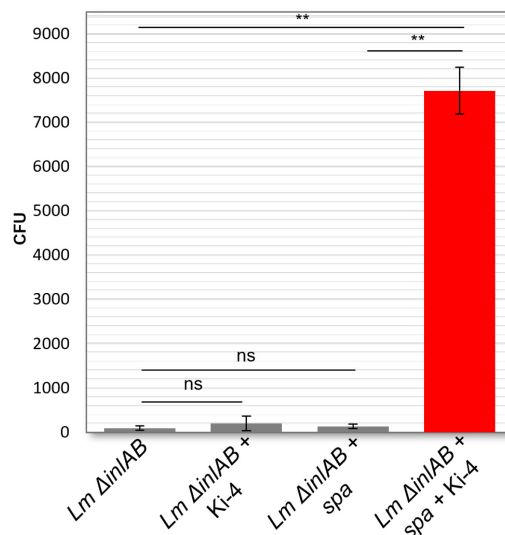
**Abbildung 22: Nachweis der vermehrten Infektion der Kombination von *L. monocytogenes* + *spa* mit Ki-4-scFv-Fc in eukaryotischen Zellen der Linie KM-H2.** Lymphozyten der Zelllinie KM-H2 wurden mit *Lm* Stämmen mit und ohne SPA auf der Oberfläche jeweils mit und ohne gegen CD30 gerichtetes Ki-4-scFv-Fc infiziert. MOI: 100. Infektionszeit: 1 h. Gentamicinbehandlung: 1h. Zellzahl:  $5 \cdot 10^5$ /Well. Nur die Kombination aus SPA auf der Oberfläche und dem Ki-4-scFv-Fc führt zu einem signifikanten Anstieg der Infektionsrate. Alle anderen Kombinationen weisen keine signifikant unterschiedlichen Infektionsraten auf. Die Infektionsrate bei Kombination aus SPA und Ki-4-scFv-Fc steigt auf das 22-fache. (\*\* $p < 0,01$ ; ns = nicht signifikant)

Die Daten zeigen, dass die Kombination Ki-4-scFv-Fc und SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* für eine 22-fach erhöhte Infektionsrate verantwortlich ist.

## Ergebnisse

Um eine Internalin-unabhängige Infektion in die Zellen zu untersuchen, wurde der Infektionsversuch mit der Deletionsmutante *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* durchgeführt. Hier wurden analog zum zuvor beschriebenen Infektionsversuch (Abb. 22) *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* mit und ohne SPA auf der Oberfläche jeweils mit und ohne Ki-4-scFv-Fc untersucht.

In Abbildung 23 zeigen die untersuchten Deletionsmutanten *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* untereinander eine ähnliche Invasionsrate wie die nicht mutierten Stämme (Abb. 22). Die Zahl der intrazellulär gezählten Bakterien von *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* zeigt im Vergleich zu *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + Ki-4 keine signifikant erhöhte Infektion (93 vs. 201 CFU). Auch der Stamm mit SPA auf der Oberfläche ohne Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa*) präsentiert eine Anzahl intrazellulärer Bakterien ohne signifikanten Unterschied zu *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* und *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + Ki-4 (136 CFU). Nur die Kombination aus SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* und Ki-4-scFv-Fc (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* + Ki-4) führt zu einer signifikant höheren Anzahl intrazellulärer Bakterien (7714 CFU), ähnlich wie bei der Infektion mit *L. monocytogenes* + *spa* + Ki-4 (Abb. 22). Die Anzahl intrazellulärer Bakterien steigt bei Kombination von SPA mit Ki-4-scFv-Fc auf das 56-fache. Im Vergleich zwischen *L. monocytogenes* WT und der Deletionsmutante *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* jeweils mit der Kombination aus SPA auf der Bakterienoberfläche und Ki-4-scFv-Fc lassen sich eine ähnliche Anzahl an gezählten CFU feststellen (6073 vs. 7714 CFU).

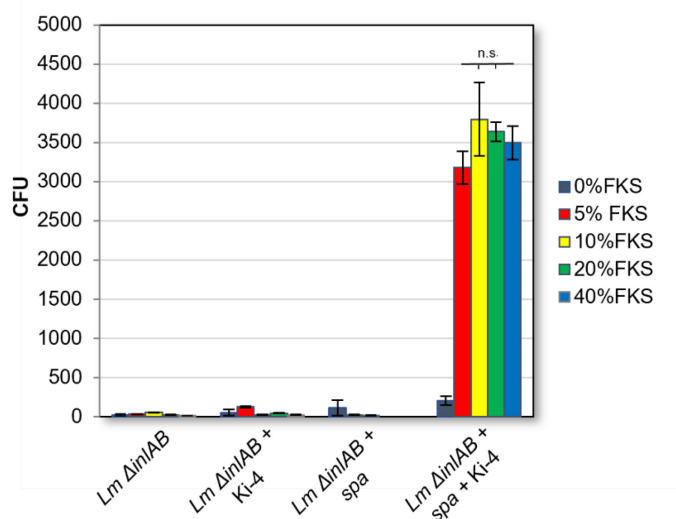


**Abbildung 23: Nachweis der vermehrten Infektion der Kombination von *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* mit Ki-4-scFv-Fc in eukaryotischen Zellen der Linie KM-H2.** Lymphozyten der Zelllinie KM-H2 wurden mit *Lm*  $\Delta$ *inlAB* Deletionsmutationsstämmen mit und ohne kloniertes SPA auf der Oberfläche jeweils mit und ohne Ki-4-scFv-Fc infiziert. MOI: 100 Infektionszeit: 1 h. Gentamicinbehandlung: 1h. Zellzahl:  $5 \cdot 10^5$ /Well. *Lm*  $\Delta$ *inlAB* mit und ohne Ki-4-scFv-Fc weisen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der ermittelten intrazellulären Bakterien auf. *Lm*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* ohne Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc zeigen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Die Kombination aus *Lm*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* und Ki-4-scFv-Fc lässt die Zahl der CFU auf das 56-fache ansteigen. (\*\* $p < 0,01$ ; ns = nicht signifikant)

Die Ergebnisse zeigen, dass Internalin keinen positiven Einfluss auf die gesteigerte Invasionsrate von *L. monocytogenes* mit der Kombination aus SPA und Ki-4-scFv-Fc hat. Da Internalin zwar einen Einfluss auf die Fähigkeit von *L. monocytogenes* hat, Zellen der Linie KM-H2 zu infizieren (Abb. 21), die gesteigerte Infektionsrate nach der Kombination aus SPA und Ki-4-scFv-Fc jedoch unabhängig von Internalin AB ist (Abb. 22, Abb. 23), wurden die folgenden Infektionsversuche mit der Deletionsmutante  $\Delta$ *inlAB* durchgeführt.

### 3.4.3.2 Unterschiedlich hohe FKS Konzentrationen im Infektionsversuch zeigen keinen Einfluss auf die Anzahl der intrazellulären *L. monocytogenes*

Die bisher beschriebenen Infektionsversuche wurden in RPMI + 10 % Fetales Kälberserum (FKS) im Medium durchgeführt. FKS wird für das Wachstum der eukaryotischen Zellen *in vitro* benötigt. FKS enthält Antikörper, die SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* binden könnten. Die Bindung dieser Antikörper könnte die Infektionsrate der Bakterien in die Krebszellen bei den durchgeführten Infektionsversuchen beeinflussen. Um den Einfluss der FKS Konzentration im Medium auf die Anzahl der intrazellulären *L. monocytogenes* zu untersuchen, wurden Infektionsversuche in Medien mit verschiedenen FKS Konzentrationen (0 %, 5 %, 10 %, 20 %, 40 %) durchgeführt. Der sonstige Ablauf der Versuche entspricht den in den vorherigen Abschnitten beschriebenen Infektionsversuchen (3.4.3.1).



**Abbildung 24: Verschiedene FKS-Konzentrationen im Infektionsversuch zeigen keinen direkten Zusammenhang mit der Anzahl der intrazellulären *L. monocytogenes*.** Zellen der Linie KM-H2 wurden mit *Lm ΔinlAB* mit und ohne SPA auf der Oberfläche jeweils mit und ohne Ki-4-scFv-Fc infiziert. Um einen Einfluss von verschiedenen FKS-Konzentrationen in den Zellkulturmedien zu untersuchen, wurden in diesem Versuch Medien mit verschiedenen FKS Konzentrationen verwendet. MOI: 100. Infektionszeit: 1 h. Gentamicinbehandlung: 1h. Zellzahl:  $5 \cdot 10^5$ /Well. *Lm ΔinlAB*, *Lm ΔinlAB* + Ki-4 und *Lm ΔinlAB* + *spa* zeigen nur eine geringe Anzahl intrazellulärer CFU. Bezüglich der verschiedenen FKS-Konzentration ist kein Unterschied in der Anzahl der CFU festzustellen. Bei *Lm ΔinlAB* + *spa* + Ki-4 ist eine deutlich höhere Infektionsrate erkennbar. Dies gilt für alle FKS-Konzentrationen außer 0 % FKS. Hier zeigt sich eine mit den anderen untersuchten Stämmen vergleichbare Zahl an intrazellulären CFU. Bei den übrigen FKS-Konzentrationen ist die Zahl der intrazellulären CFU mehr als zehnfach erhöht, ohne signifikante Unterschiede untereinander.

Abbildung 24 beschreibt den Infektionsversuch in Anwesenheit von unterschiedlichen FKS-Konzentrationen in den Zellkulturmedien. Bei den Stämmen *L. monocytogenes*  $\Delta inIAB$ , *L. monocytogenes*  $\Delta inIAB$  + Ki-4 und *L. monocytogenes*  $\Delta inIAB$  + *spa* sind ebenso wie in den vorherigen Infektionsversuchen (Abb. 22 und Abb. 23) nur geringe Anzahlen intrazellulärer Bakterien zu verzeichnen. Dies gilt für 10 % FKS Konzentration, wie in den vorherigen Infektionsversuchen verwendet, ebenso wie für alle anderen getesteten FKS-Konzentrationen. Wie bereits in Infektionsversuchen (Abb. 22 und 23) festgestellt, führt nur die Kombination aus SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* und der Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc zu einem deutlichen Anstieg der intrazellulären Bakterien. Bezüglich der verschiedenen FKS-Konzentrationen bei diesen Proben zeigt sich bei 0 % FKS nur eine sehr geringe Anzahl intrazellulärer Bakterien. Im Verlauf des Versuchs war bei den Proben mit 0 % FKS mikroskopisch eine deutlich geringere Zellzahl gegenüber höherer FKS-Konzentrationen feststellbar. Die KM-H2 Zellen schienen zu lysieren, da ein Großteil der Zellen bereits vor dem Ende des Experimentes zugrunde gegangen war. Die Probe mit 0 % FKS kann somit nicht als vergleichbar angesehen werden, da ohne Anwesenheit von FKS keine Kultivierung der KM-H2 Zellen möglich ist. Bezüglich der höheren FKS Konzentrationen (5 %, 10 %, 20 %, 40 %) ist eine ähnlich hohe Anzahl an intrazellulären Bakterien zu verzeichnen (Abb. 24). Es zeigt sich kein direkter Zusammenhang zwischen FKS-Konzentration und der Anzahl der intrazellulären Bakterien. Die Daten zeigen, dass die in den Experimenten standardmäßig eingesetzte FKS-Konzentration (10 %) keinen Einfluss auf das Ergebnis der Infektionsversuche hat.

#### **3.4.4 Infektionsversuche mit *L. monocytogenes* in der Zelllinie DMS-273**

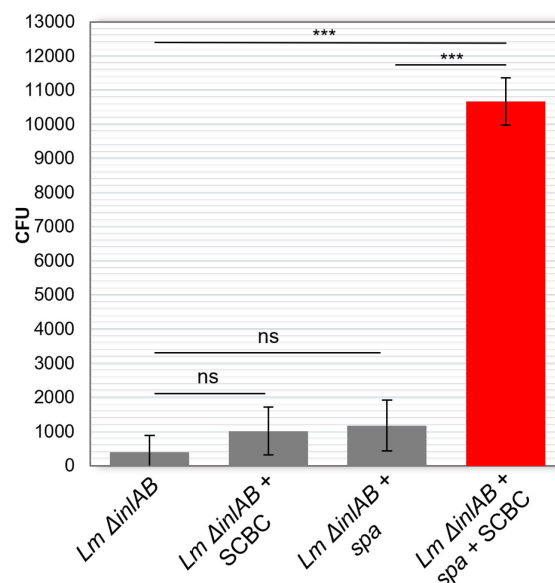
Um das Konzept der gezielten Infektion von Krebszellen auch in einer anderen Zelllinie zu untersuchen, wurden Infektionsversuche in der Zelllinie DMS-273 durchgeführt. Diese Zelllinie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCBC) wurde in Kombination mit einem gegen ein bisher unbekanntes Zielantigen gerichtetes scFv-Fc-Fusionsprotein infiziert (Haaf et al. 2015). Dieses scFv-Fc-Fusionsprotein wird der Übersicht halber SCBC-scFv-Fc genannt.

##### **3.4.4.1 Nachweis der vermehrten Infektion von *L. monocytogenes* $\Delta inIAB$ + *spa* mit SCBC-scFv-Fc in Zellen der Linie DMS-273**

Analog zu den in Abschnitt 3.4.3.1 beschriebenen Infektionsversuchen in KM-H2 Zellen wurde die Infektion mit *L. monocytogenes* mit und ohne SPA auf der Oberfläche in Kombination mit dem gegen DMS-273 gerichteten SCBC-scFv-Fc durchgeführt. *L. monocytogenes* wurde zunächst mit dem gegen das von DMS-273 Zellen überexprimierten Oberflächenantigen gerichteten SCBC-scFv-Fc für 45 min bei RT und 300 rpm

## Ergebnisse

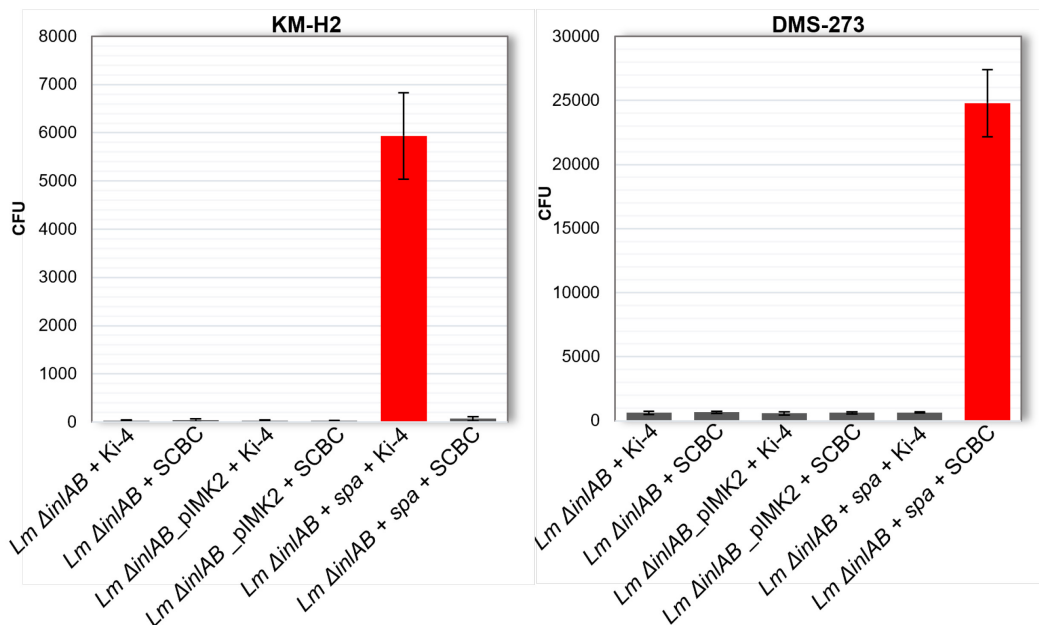
inkubiert. Die anschließende Infektion erfolgte wie in KM-H2 Zellen (3.4.3.1) beschrieben (2.2.5.3). In Abbildung 25 zeigt sich in den DMS-273 Zellen ein ähnliches Infektionsverhalten wie in den zuvor untersuchten KM-H2 Zellen (Abb. 22, 23, 24). Bei *L. monocytogenes* ohne SPA auf der Oberfläche (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB*) hat die Inkubation mit dem SCBC-scFv-Fc (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + SCBC) keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der intrazellulären Bakterien. Diese ist gleichbleibend auf einem niedrigen Niveau (403 vs. 1092 CFU). Auch *L. monocytogenes* mit SPA auf der Oberfläche, die nicht mit dem SCBC-scFv-Fc inkubiert wurden (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa*) zeigen keine signifikant höhere Infektionsrate als *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* (1182 CFU). Nur bei der Kombination aus SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* mit der Inkubation des SCBC-scFv-Fc (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* + SCBC) lässt sich eine signifikant höhere Anzahl der intrazellulären Bakterien feststellen. Es ist ein Anstieg auf das Zehnfache der anderen untersuchten Stämme zu verzeichnen (10681 CFU). Der Anstieg der intrazellulären Bakterien bei dieser Kombination ist vergleichbar zu den Versuchen mit der Zelllinie KM-H2 bei der entsprechenden Kombination aus SPA und scFv-Fc-Fusionsprotein. Bei beiden ist ein hochsignifikanter Anstieg auf das 10-fache bzw. 56-fache des Ausgangswertes festzustellen (Abb. 23, 25).



**Abbildung 25: Nachweis der vermehrten Infektion von *L. monocytogenes* + *spa* in Kombination mit SCBC-scFv-Fc in DMS-273 Zellen.** SCBC Zellen der Linie DMS-273 wurden mit *Lm*  $\Delta$ *inlAB* Deletionsmutante mit und ohne SPA auf der Oberfläche jeweils mit und ohne SCBC-scFv-Fc infiziert. MOI: 100 Infektionszeit: 1 h. Gentamicinbehandlung: 1h. Zellzahl:  $5 \cdot 10^5$ /Well. Bei *Lm*  $\Delta$ *inlAB* und *Lm*  $\Delta$ *inlAB* + SCBC zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Zahlen der intrazellulär gewachsenen Bakterien. Auch bei *Lm*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* ist im Vergleich zu *Lm*  $\Delta$ *inlAB* kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der intrazellulären CFU feststellbar. Bei der Kombination von kloniertem SPA auf der Oberfläche von *Lm*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* mit dem zu den SCBC Zellen korrespondierenden SCBC-scFv-Fc (*Lm*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* + SCBC) zeigt sich ein signifikanter Anstieg der intrazellulären Bakterien auf das Zehnfache der anderen untersuchten Proben. (\*\*\*) $p < 0,001$ ; ns = nicht signifikant)

### 3.4.5 Nachweis der Spezifität und der gezielten Infektion von Krebszellen mit dem jeweils gegen sie gerichteten scFv und SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes*

Die oben genannten Infektionsversuche wurden nur mit den jeweils gegen die untersuchten Krebszellen gerichteten scFv-Fc-Fusionsproteinen durchgeführt. Um zu untersuchen, ob diese scFv-Fc-Fusionsproteine zu einer gezielten Infektion in die gegen sie gerichteten Zellen führen, wurde ein gekreuzter Infektionsversuch durchgeführt. Zellen der Linie KM-H2 wurden sowohl mit *L. monocytogenes* und dem gegen sie gerichteten Ki-4-scFv-Fc als auch mit dem nicht gegen sie gerichteten SCBC-scFv-Fc untersucht. Die DMS-273 Zellen wurden in gleicher Weise mit dem nicht gegen sie gerichteten Ki-4-scFv-Fc sowie mit dem gegen sie gerichteten SCBC-scFv-Fc untersucht. Um auszuschließen, dass das Plasmid pIMK2 einen Einfluss auf die Infektiosität hat, wurden außerdem *L. monocytogenes* verwendet, in die das Plasmid ohne *spa-insert* (leeres Plasmid) transformiert wurde (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* \_pIMK2).



**Abbildung 26: Nachweis der gezielten Infektion von Krebszellen der Linien KM-H2 und DMS-273 mit dem jeweils gegen sie gerichteten scFv-Fc-Fusionsproteinen in Kombination SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes*.** Gekreuzter Infektionsversuch von Zellen der Linien KM-H2 und DMS-273 mit den jeweils gegen sie gerichteten scFv-Fc und dem gegen die jeweils andere Zelllinie gerichteten scFv-Fc als Kontrolle. MOI: 100. Infektionszeit: 1 h. Gentamicinbehandlung: 1h. Zellzahl:  $5 \cdot 10^5$ /Well. Die Stämme ohne SPA auf der Oberfläche weisen in beiden Zelllinien nach Inkubation mit beiden scFv-Fc eine mit den Vorversuchen (Abb.23, 25) vergleichbar niedrige Anzahl intrazellulärer Bakterien auf. Dies gilt auch für *Lm*, in die das Plasmid pIMK2 ohne *spa-insert* transformiert wurde. KM-H2 Zellen, die mit dem nicht gegen sie gerichteten SCBC-scFv-Fc und *Lm* + *spa* infiziert wurden weisen eine ähnlich geringe Infektiosität auf wie die Kontrollgruppen. Gleiches gilt für DMS-273 Zellen, die mit *Lm*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* + Ki-4 infiziert wurden. Nur die Kombination aus SPA auf der Oberfläche von *Lm* und dem jeweils spezifisch gegen die Krebszellen gerichteten scFv-Fc zeigen einen deutlichen Anstieg der Infektiosität. Die Infektion der Krebszellen erfolgt gezielt durch die Kombination aus *Lm* mit SPA auf der Oberfläche und dem jeweils gegen die Zellen gerichteten scFv-Fc.

Abbildung 26 zeigt den gekreuzten Infektionsversuch in den Zelllinien KM-H2 und DMS-273 mit *L. monocytogenes*, die jeweils mit dem gegen sie und dem nicht gegen sie gerichteten scFv-Fc-Fusionsprotein als Kontrolle inkubiert wurden. Der

Infektionsversuch in KM-H2 zeigt eine mit dem vorherigen Infektionsversuch (Abb. 22, 23) vergleichbare Anzahl der intrazellulären Bakterien. Bei *L. monocytogenes* ohne SPA auf der Oberfläche (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + Ki-4, *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + SCBC) und bei *L. monocytogenes* in die das Plasmid pIMK2 ohne Insert kloniert wurde (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB*\_pIMK2 + Ki-4, *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB*\_pIMK2 + SCBC) zeigt sich eine vergleichbar niedrige Anzahl intrazellulärer Bakterien. Das Plasmid pIMK2 ohne Insert scheint keinen Einfluss auf die Infektiosität zu haben.

Die in allen Infektionsversuchen verwendeten scFv-Fc-Fusionsproteine wurden von HEK-293 Zellen produziert und in den Überstand des Kulturmediums sezerniert. (Haaf et al. 2015; Klimka et al.) Diese Überstände wurden anschließend mit *L. monocytogenes* inkubiert. Der Infektionsversuch zeigt durch die Verwendung des SCBC-scFv-Fc als Kontrolle, dass außerdem in den Überstand sezernierte Proteine und Wachstumsfaktoren sowie Antibiotika in den Überständen der scFv-Fc-Lösungen keinen Einfluss auf die Anzahl intrazellulärer Bakterien hat. Wie in den anderen Infektionsversuchen führt nur die Kombination aus SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* und dem scFv-Fc zu einer höheren Invasionsrate. Dies gilt hier allerdings nur für das gegen die KM-H2 Zellen gerichtete Ki-4-scFv-Fc (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* + Ki-4). Hier sind 5933 CFU zu beobachten. Das gegen die Zelllinie DMS-273 gerichtete SCBC-scFv-Fc führt nicht zu einer vermehrten Infektion der KM-H2-Zellen. Die Anzahl der intrazellulären Bakterien ist hier mit denen der anderen Kontrollgruppen (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB*+ Ki-4, *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + SCBC) vergleichbar.

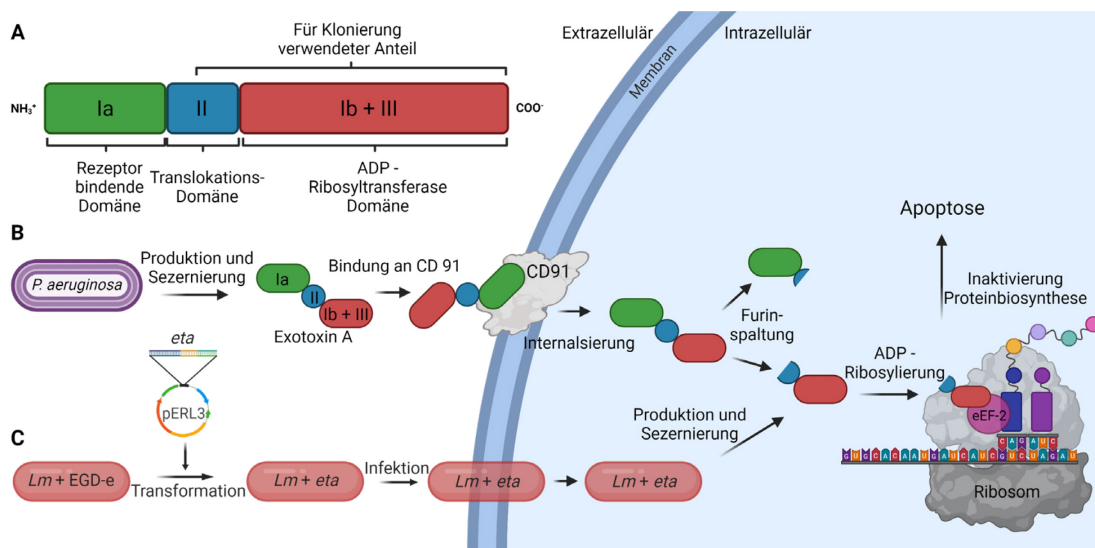
Ein ähnliches Bild zeigt sich bei dem Infektionsversuch in der Zelllinie DMS-273. Auch hier zeigen alle Kontrollgruppen (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB*+ Ki-4, *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + SCBC, *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB*\_pIMK2+Ki-4, *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB*\_pIMK2+SCBC) eine vergleichbar niedrige Anzahl intrazellulärer Bakterien. Nur die Kombination aus SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* und dem gegen die DMS-273 Zellen gerichteten SCBC-scFv-Fc (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* + SCBC) führt zu deutlich größeren Infektionszahlen von 24788 CFU. Für die Kombination mit dem nicht gegen die DMS-273 Zellen gerichteten Ki-4scFv-Fc ergibt sich dagegen keine nennenswerte Erhöhung der Infektionsrate. Die vermehrte Infektion der Krebszellen scheint spezifisch für das jeweils gegen sie gerichtete scFv-Fc in Kombination mit SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* zu sein. Es erfolgt jeweils eine gezielte Infektion der Krebszellen.

### 3.5 Klonierung von *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A in *L. monocytogenes*

Nach dem Nachweis der gezielten Infektion von *L. monocytogenes* in verschiedenen Krebszelllinien in Abschnitt 3.4 sollte mittels eines in *L. monocytogenes* produzierten

Toxins die Apoptose der infizierten Krebszellen induziert werden. Hierzu wurde ein Teil von *P. aeruginosa* Exotoxin A (ETA) in *L. monocytogenes* kloniert.

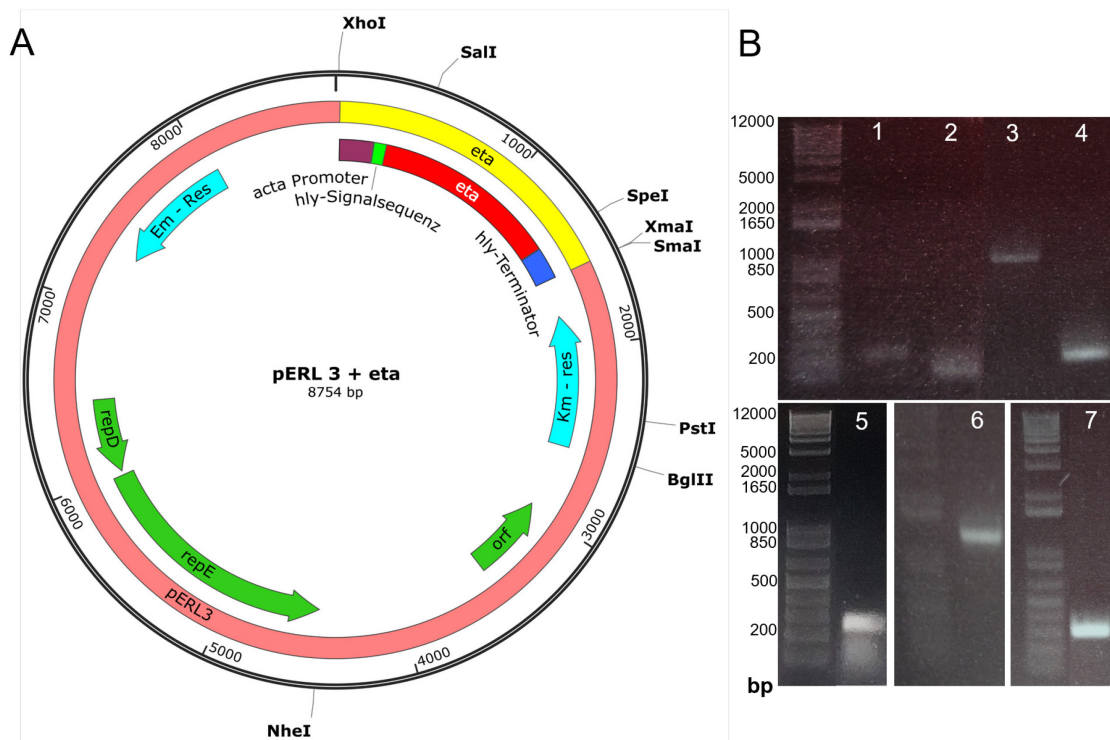
ETA ist ein von *P. aeruginosa* produziertes Toxin, das aus drei Domänen besteht: Rezeptor bindende Domäne Ia, Translokationsdomäne II und ADP-Ribosyltransferasedomäne Ib + III (Abb. 27 A). Die Rezeptor-bindende Domäne Ia bindet spezifisch an den  $\alpha_2$ -Makroglobulinrezeptor/Low-Density Lipoproteinrezeptor (CD91) und sorgt für die intrazelluläre Aufnahme des Toxins in eukaryotische Zellen. Die Domäne Ib + III katalysiert eine ADP-Ribosylierung des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (eEF-2), inaktiviert diesen und sorgt so für einen Abbruch der Proteinbiosynthese. Die Zelle geht daraufhin in die Apoptose über (Abb. 27 B). Um eine unkontrollierte Aufnahme des Toxins in die Zellen zu verhindern, wurde für die Klonierung nur die Translokationsdomäne II und die ADP-Ribosyltransferasedomäne Ib + III verwendet (Abb. 27 A). ETA soll von *L. monocytogenes* in der eukaryotischen Zelle produziert und sezerniert werden. Wie in nativem ETA sorgt die ADP-Ribosyltransferasedomäne Ib+III für die Inaktivierung der Proteinbiosynthese und die infizierte Zelle geht in die Apoptose über (Abb. 27 C).



**Abbildung 27: Funktionsweise der Klonierung von *P. aeruginosa* Exotoxin A in *L. monocytogenes*.**

**A:** Schematische Darstellung von Exotoxin A. **B:** Funktionsweise von Exotoxin A, das von *P. aeruginosa* sezerniert wird. **C:** Funktionsweise von Exotoxin A, das via Klonierung in *Lm* nach intrazellulär gelangt. **A:** *P. aeruginosa* Exotoxin A (ETA) besteht aus 3 Domänen, der Rezeptor-bindenden Domäne Ia, der Translokationsdomäne II und der ADP-Ribosyltransferasedomäne Ib + III. Für die Klonierung von ETA in *Lm* wurde ein Teil der Translokationsdomäne sowie die ADP-Ribosyltransferasedomäne verwendet. **B:** ETA wird von *P. aeruginosa* produziert und sezerniert. Über eine Bindung der Rezeptor-bindenden Domäne Ia an CD91 wird es in die eukaryotische Zelle aufgenommen. Dort wird die Rezeptor-bindende Domäne und ein Teil der Translokationsdomäne II mittels einer Furin-spaltung entfernt. Die ADP-Ribosyltransferasedomäne Ib + III sorgt für eine ADP-Ribosylierung des eukaryotischen Elongationsfaktors II (eEF-2). Die Proteinbiosynthese wird so inaktiviert und die eukaryotische Zelle geht in die Apoptose über. **C:** Die genetische Information von ETA wird in das Plasmid pERL3 kloniert und anschließend in *Lm* transformiert. Um eine unkontrollierte Aufnahme des Toxins in eukaryotische Zellen zu verhindern, wurde für die Klonierung nur ein Teil der Translokationsdomäne II und die ADP-Ribosyltransferasedomäne Ib + III verwendet. *Lm* wird verwendet, um eukaryotische Zellen zu infizieren. Die intrazellulären *Lm* produzieren und sezernieren den transformierten Teil von ETA. Die ADP-Ribosyltransferasedomäne bindet an eEF-2 und die Proteinbiosynthese wird so inhibiert. Die Zelle geht daraufhin in die Apoptose über. Erstellt mit BioRender.com.

In der Klonierung wurde der *actA*-Promotor aus *L. monocytogenes* verwendet. Der Aktin-akkumulierende Faktor A (ActA) induziert in *L. monocytogenes* eine Aktinpolymerisierung, die für die intrazelluläre Fortbewegung verwendet wird. ActA wird von *L. monocytogenes* fast ausschließlich intrazellulär produziert und ist der am stärksten intrazellulär induzierte Promotor (Moors et al. 1999). Der intrazellulär stark exprimierte *actA*-Promotor wurde ausgewählt, um eine kontrollierte Expression von ETA zu erreichen, die nur bei intrazellulären Bakterien stattfindet. Die Basensequenz des *actA*-Promotors wurde mittels PCR mit den Primern „HM\_ActA Prom for“ und „HM\_ActA Prom rev“ (Tab. 5, 2.1.4) amplifiziert (Abb. 28 „1“). Als Template diente chromosomale DNA aus *L. monocytogenes* EGD-e 1/2a. Um für eine Sekretion des produzierten Toxins zu sorgen, wurde in der Klonierung die *hly*-Signalsequenz des von *L. monocytogenes* produzierten Toxins Listeriolysin O (LLO) mit PCR amplifiziert, die für eine Sezernierung des Proteins sorgt (Abb. 29). Es wurden die Primer „HM\_hly Sign for“ und „HM\_hly ETA rev“ (Tab. 5, 2.1.4) verwendet (Abb. 28 „2“). Als Template diente chromosomale DNA aus *L. monocytogenes* EGD-e 1/2a. Die verwendete *eta*-Sequenz wurde aus dem Plasmid pMT-scFv-ETA (Abb. 11, 2.1.3) mit den Primern „HM\_ETA Gen for“ und „LT\_ETA-Spel“ (Tab. 5, 2.1.4) amplifiziert (Abb. 28 „3“). Promotor, Signalsequenz und *eta*-Gen wurden mittels PCR fusioniert (Abb. 28 „5+6“) und enzymatisch mit dem Restriktionsenzym *SpeI* verdaut (2.2.1.6). Als Terminatorsequenz (Abb. 29) wurde der *hly*-Terminator aus *L. monocytogenes* EGD-e 1/2a mit den Primern „LT\_ETA-Spel for“ und „Term- rev“ (Tab. 5, 2.1.4) amplifiziert (Abb. 28 „4“) und ebenfalls mit *SpeI* verdaut. Die *hly*-Terminatorsequenz wurde mit der zuvor verdauten Fusionssequenz über die Schnittstelle *SpeI* ligiert (2.2.1.7). Anschließend wurde das gesamte Konstrukt mit den Restriktionsenzymen *XmaI* und *XhoI* verdaut. Mithilfe dieser Schnittstellen erfolgte die Ligation des gesamten Konstruktes in das Plasmid pERL3 (Abb. 10, 2.1.3). Das ligierte Plasmid wurde anschließend in chemisch kompetente *E. coli* DH10 $\beta$  transformiert (2.2.2.8).



**Abbildung 28: Plasmidkarte des für *eta* kodierenden Plasmids pERL3 + *eta* und Agarosegelelektrophorese der zur Klonierung verwendeten PCR-Produkte. A:** Plasmidkarte des für *eta* kodierenden Plasmids pERL3 + *eta*. In die *multiple cloning site* des Plasmids pERL3 wurde mittels enzymatischer Ligation die genetische Information für *eta* kloniert. Das Insert, bestehend aus *actA*-Promotor, *hly*-Signalsequenz und *eta* wurde zunächst enzymatisch mit der Schnittstelle *SpeI* geschnitten und anschließend an den *hly*-Terminator ligiert. Danach erfolgte der Verdau des Inserts sowie des Plasmids mit den Restriktionsenzymen *XmaI* und *XhoI* und die Ligation. *eta*: Translokationsdomäne II und ADP-Ribosyltransferasedomäne Ib + III aus *P. aeruginosa* Exotoxin A (ETA). Km-Res: Kanamycin Resistenzgen. Em-Res: Erythromycin Resistenzgen. repD: *Replication initiation Protein D*. repE: *Replication initiation protein E*. **B:** Agarosegelelektrophorese der zur Klonierung verwendeten PCR-Produkte **1:** Amplifizierung des *actA*-Promotors aus dem EGD-e 1/2a Chromosom. Verwendete Primer: HM\_ActA Prom for, HM\_ActA Prom rev, Länge des PCR-Produkts: 204 Basenpaare (bp). **2:** Amplifizierung der *hly*-Signalsequenz. Template: EGD-e 1/2a. Verwendete Primer: HM\_hly Sign for, HM\_hly ETA rev. Länge des PCR Produkts: 85 bp. **3:** Amplifizierung des *eta*-Gens. Template: pMT-scFv-ETA. Verwendete Primer: HM\_ETA Gen for, LT\_ETA-SpeI rev. Länge des PCR-Produkts: 1109 bp. **4:** Amplifizierung des *hly*-Terminators. Template: EGD-e 1/2a. Verwendete Primer: LT\_ETA-SpeI for, Term- rev. Länge des PCR-Produkts: 192 bp **5:** Fusionierung von *actA*-Promotor und *hly*-Signalsequenz. Template: Aufgereinigtes PCR-Produkt von 1 und 2. Verwendete Primer: HM\_ActA Prom for, HM\_hly ETA rev. Länge des PCR-Produkts: 279 bp. **6:** Fusion von *actA*-Promotor, *hly*-Signalsequenz und *eta*-Gen. Template: Aufgereinigtes PCR-Produkt aus 3 und 5. Primer: HM\_ActA Prom for, LT\_ETA-SpeI rev. Länge des PCR-Produkts: 1377 bp **7:** Kontrolle auf Vorhandensein des klonierten *eta*-Inserts. Template: Kolonie PCR nach Transformation in *E. coli* DH10 $\beta$ . Primer: pERL3-5', HM\_ActA Prom rev. Länge des PCR-Produkts: 326 bp. (Plasmidkarte erstellt mit SnapGene  $\text{\textcircled{R}}$ )

Das Plasmid pERL3 mit dem klonierten *eta* Konstrukt wurde aus *E. coli* DH10 $\beta$  isoliert. Um zu überprüfen, ob das Insert gemeinsam mit dem Plasmid amplifiziert wurde, wurde zunächst eine PCR mit für das *eta* Konstrukt spezifischen Primern „pERL3-5“ und „HM\_ActA Prom rev“ (Tab. 5, 2.1.4) durchgeführt. Es war eine Bande mit der von den verwendeten Primern abhängige zu erwartenden Länge von 326 Basenpaaren (bp) sichtbar (Abb. 28 „7“). Um eine korrekte Basenabfolge des klonierten Konstrukts zu gewährleisten, wurde das Plasmid anschließend sequenziert.

# Ergebnisse



**Abbildung 29: Basensequenz des klonierten *eta*.** Basensequenz des klonierten *P. aeruginosa* Exotoxin A (ETA). Base 1-6 entsprechen der Schnittstelle *XhoI*. Basen 7 - 204 entsprechen der Intergenregion von *actA*, in der der *actA*-Promoter enthalten ist. Basen 205 – 279 entsprechen der Listeriolysin O (*hly*) - Signalsequenz. Das erste Codon des endgültigen Proteins beginnt an Base 280 und hat eine Länge von 1089 Basenpaaren exklusive des Stopcodons. Basen 1372 - 1377 entsprechen der Schnittstelle *SpeI*, mit der der *hly*-Terminator an das Konstrukt ligiert wurde. Dem *hly*-Terminator entsprechen Base 1378 – 1557. Basen 1558 – 1563 entsprechen der Schnittstelle *XmaI*. Die Primer sind entsprechend ihrer Ableserichtung mit Pfeilspitzen markiert. (Abbildung erstellt mit SnapGene®)

Abbildung 29 zeigt die Basensequenz des klonierten Genkonstruktes, das die genetische Information von *eta* enthält. Die Schnittstelle *XmaI* entspricht Base Nr. 1-6. Basen 7-204 entsprechen der Intergenregion von *actA*, in der der *actA*-Promoter enthalten ist.

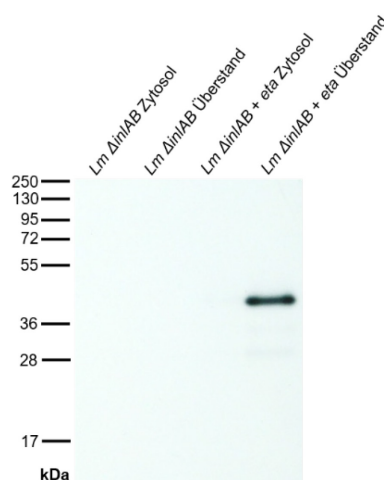
## Ergebnisse

Die verwendete *hly*-Signalsequenz, die für eine Sezernierung des Proteins sorgen soll, entspricht den Basen 205-279. Der klonierte Anteil der für ETA kodiert entspricht Base 280-1371. Exklusive des Stopcodons hat die Sequenz eine Länge von 1089 Basenpaaren, entsprechend einer Länge von 363 Aminosäuren und einer errechneten molekularen Masse von 39,0 kDa. Die Schnittstelle *SpeI* wurde verwendet, um die *hly*-Terminatorsequenz (Basen 1378 – 1557) mit dem Genkonstrukt zu fusionieren. Die Basenfolge 1558–1563 entspricht der Schnittstelle *XmaI*. Nach der Sequenzierung wurde das Plasmid pERL3 + *eta* in *L. monocytogenes* transformiert. Die Transformation erfolgte in *L. monocytogenes* Wildtyp (*L. monocytogenes* + *eta*) und in die Internalin-Deletionsmutante  $\Delta$ *iniAB* (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *iniAB* + *eta*). Außerdem wurde das Plasmid pERL3 + *eta* in *L. monocytogenes* + *spa* transformiert, um sowohl SPA als auch ETA von einem Stamm produzieren zu lassen (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *iniAB* + *spa* + *eta*).

### 3.6 Nachweis der erfolgreichen Expression von ETA in *L. monocytogenes*

#### 3.6.1 Nachweis von ETA mittels Western Blot

Als nächster Schritt erfolgte der Nachweis von ETA auf Proteinebene. Hierzu wurden Proteine aus dem Überstand (2.2.3.3) und dem Zytosol (2.2.3.4) von *L. monocytogenes* isoliert. Da bei der Klonierung die *hly*-Signalsequenz verwendet wurde, die für eine Sekretion des Proteins sorgt, wurde die Zellwandproteinfraktion nicht untersucht. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (2.2.3.5). Die nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit dem gegen ETA gerichteten Antikörper „TC-1“ (Galloway et al. 1984) (Tab. 7, 2.1.5) mit Chemilumineszenz untersucht (2.2.3.8).



**Abbildung 30: Nachweis von ETA in der Überstandsproteinfraktion von *L. monocytogenes*  $\Delta$ *iniAB* + *eta* mittels Western Blot.** Proteine aus dem Zytosol und dem Überstand von *Lm*  $\Delta$ *iniAB* wurden isoliert und mittels SDS – PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte ein Western Blot mit dem gegen ETA gerichteten Antikörper „TC - 1“. Es zeigt sich eine einzelne Bande von ca. 40 kDa Größe, entsprechend dem klonierten Teil von ETA (errechnete Größe 39,0 kDa). Die Bande zeigt sich nur in der

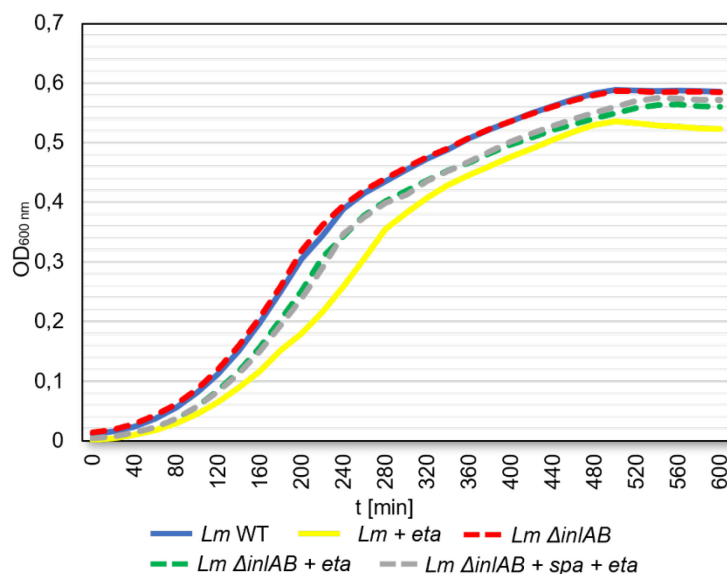
## Ergebnisse

Überstandsfraction von *Lm ΔinIAB + eta*. In der Kontrolle mit den aus *Lm ΔinIAB* isolierten Proteinen ist sowohl in der Zytosol- als auch in der Überstandsfraction keine Bande nachweisbar. Auch in der Zytosolfraction von *Lm ΔinIAB + eta* ist keine Bande zu erkennen.

Abbildung 30 zeigt im Western Blot eine einzelne Bande mit einer Größe von ca. 40 kDa in der Überstandsfraction von *L. monocytogenes ΔinIAB + eta*. Diese Größe entspricht der erwarteten Größe der klonierten Anteile von ETA (errechnete Größe 39,0 kDa). Die Bande ist ausschließlich in dieser Probe nachweisbar. In der als Kontrolle verwendeten Zytosol- sowie Überstandsfraction von *L. monocytogenes ΔinIAB* ist erwartungsgemäß keine Bande nachweisbar. Auch in der Zytosolfraction von *L. monocytogenes ΔinIAB + eta* ist keine Bande nachweisbar. Der Nachweis in der Überstandsfraction und der fehlende Nachweis in der Zytosolfraction deutet darauf hin, dass ETA von *L. monocytogenes + eta* produziert und vorwiegend sezerniert wird.

### 3.6.2 Extrazelluläres Wachstumsverhalten von ETA produzierenden *L. monocytogenes*

Um das extrazelluläre Wachstumsverhalten von ETA produzierenden *L. monocytogenes* zu untersuchen, wurden Wachstumskurven erstellt. Die Wachstumskurven wurden mit einem Mikroplatten Lesegerät erstellt (2.2.2.10).



**Abbildung 31: Wachstumskurven von ETA produzierenden *L. monocytogenes* und den jeweilig korrespondierenden Wildtyp Stämmen.** *Lm WT* und *Lm ΔinIAB* zeigen ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten. ETA produzierende *Lm + eta* weisen im Vergleich zu *Lm WT* ein langsames Wachstum auf. Auch erreichen sie in der stationären Wachstumsphase eine geringere optische Dichte. In der ETA produzierenden Deletionsmutante *Lm ΔinIAB + eta* ist im Vergleich zu *Lm ΔinIAB* ein langsames Wachstum zu beobachten. Im Vergleich zu *Lm + eta* ist das Wachstum bei *Lm ΔinIAB + eta* jedoch schneller. *Lm*, in die die genetische Information für SPA und ETA transformiert wurde (*Lm ΔinIAB + spa + eta*), weisen ein im Vergleich zu *Lm ΔinIAB + eta* sehr ähnliches Wachstumsverhalten auf.  $OD_{600nm}$ : Optische Dichte bei einer Absorptionswellenlänge von 600nm. Darstellung eines repräsentativen Experimentes aus einer Dreifachbestimmung.

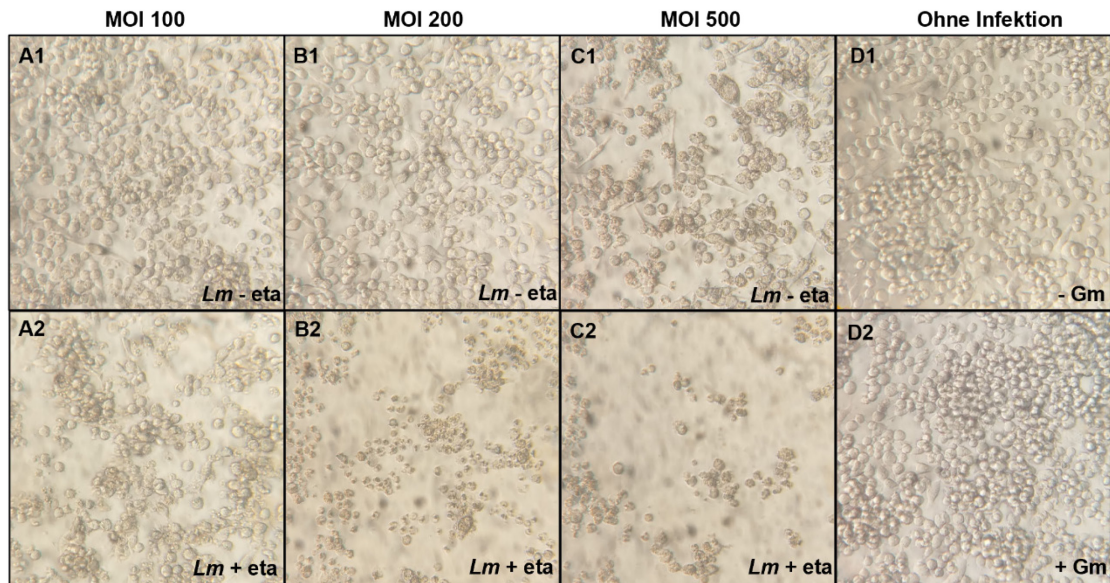
Abbildung 31 zeigt Wachstumskurven von ETA produzierenden *L. monocytogenes* und den korrespondierenden Wildtyp-Stämmen. Es ist zu beobachten, dass *L. monocytogenes* Wildtyp (Abb. 31 blaue Kurve) und *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* (Abb. 31 rote Kurve) ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten aufweisen. ETA produzierende *L. monocytogenes* + *eta* (Abbildung 31, gelbe Kurve) zeigen im Vergleich zu *L. monocytogenes* Wildtyp ein langsamerer Wachstum. Auch wird von *L. monocytogenes* + *eta* in der stationären Wachstumsphase nur eine geringere optische Dichte erreicht. In der ETA produzierenden Deletionsmutante *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *eta* (Abb. 31, grüne Kurve) zeigt sich im Vergleich zu *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* ein langsamerer Wachstum. Im Vergleich zu *L. monocytogenes* + *eta* ist das Wachstum der Internalin-Deletionsmutante *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *eta* jedoch schneller. *L. monocytogenes* in die die genetische Information für SPA und ETA transformiert wurde (*L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* + *eta*, Abb. 31, graue Kurve) weisen ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten wie *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *eta* auf. Es kann festgestellt werden, dass die Transformation der genetischen Information von ETA in *L. monocytogenes* zu einem langsameren Wachstum führt. Dieser Effekt ist bei *L. monocytogenes* + *eta* stärker ausgeprägt als bei der Deletionsmutante *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *eta*.

### **3.6.3 Wirkung der ETA Produktion von *L. monocytogenes* in eukaryotischen Zellen**

#### **3.6.3.1 Nachweis der erhöhten Toxizität von ETA produzierenden *L. monocytogenes* mittels Lichtmikroskopie**

Um die Wirkung von ETA sezernierenden *L. monocytogenes* zu untersuchen, wurden Makrophagen der Zelllinie P388D1 mit ETA produzierenden *L. monocytogenes* infiziert. Die Makrophagen wurden verwendet, da es sich um phagozytierende, adhärenz Zellen handelt. So kann sichergestellt werden, dass die *L. monocytogenes* von den Zellen durch Phagozytose aufgenommen werden. Durch die Adhärenz ist es möglich, die Zellen durch Mikroskopie hinsichtlich Zellschädigung durch Ablösung oder phänotypische Veränderung zu beurteilen. Nach einer Infektionszeit von 45 min mit verschiedenen MOI (100, 200 und 500) wurden die P388D1 Zellen über einen Zeitraum von 24 h mit 50 µg/ml Gentamicin in RPMI + 10 % FKS inkubiert, um die extrazellulär außerhalb der Makrophagen verbliebenen *L. monocytogenes* zu eliminieren. Anschließend erfolgte die Auswertung mittels Lichtmikroskopie. Als Kontrolle wurde *L. monocytogenes* mit dem für die Klonierung verwendeten Plasmid pERL3 ohne die ligierte genetische Information für *eta* (leeres Plasmid) verwendet. Dieser Stamm wird in den folgenden Abschnitten der Übersichtlichkeit halber *L. monocytogenes*\_pERL3 genannt.

## Ergebnisse



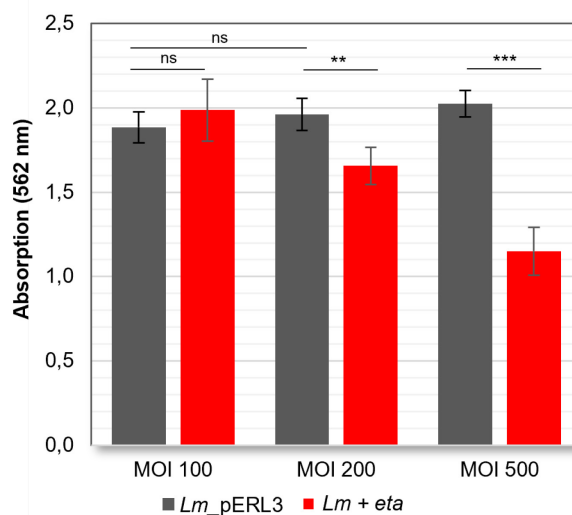
**Abbildung 32: Nachweis der erhöhten Toxizität von ETA produzierenden *L. monocytogenes* (*Lm*) mittels Lichtmikroskopie. A1: *Lm*\_pERL3 MOI 100 A2: *Lm* + *eta* MOI 100. B1: *Lm*\_pERL3 MOI 200. B2: *Lm* + *eta* MOI 200. C1: *Lm*\_pERL3 MOI 500. C2: *Lm* + *eta* MOI 500. D1: Kontrolle ohne Infektion ohne Gentamicin. D2: Kontrolle ohne Infektion mit Gentamicin. Makrophagen der Zelllinie P388D1 wurden mit *Lm* mit MOI 100 (A), MOI 200 (B) und MOI 500 (C) infiziert. Die Infektion erfolgte jeweils mit *Lm*\_pERL3 (A1, B1, C1) sowie mit *Lm* + *eta* (A2, B2, C2) für 45 min. Anschließend erfolgte eine 24-stündige Behandlung mit 50 µg/ml Gentamicin. Zur Kontrolle wurden außerdem nicht infizierte Zellen in gleicher Weise mit Gentamicin behandelt (D1) und Zellen weder infiziert noch mit Gentamicin behandelt (D2). Im Vergleich verschiedener MOI von *Lm*\_pERL3 (A1, B1, C1) ist bei MOI 500 (C1) eine verminderte Adhärenz der Zellen zu erkennen. Dies deutet auf eine verminderte Viabilität der Zellen hin. Auch bei *Lm* + *eta* (A2, B2, C2) ist bei höherer MOI von 200 (B2) und MOI 500 (C2) eine verminderte Adhärenz im Vergleich zu MOI 100 feststellbar. Im Vergleich zwischen *Lm*\_pERL3 und *Lm* + *eta* haben sich bei jeweils gleicher MOI nach Infektion mit *Lm* + *eta* im Vergleich zu *Lm*\_pERL3 mehr Zellen abgelöst. Der Effekt ist schon bei MOI 100 (A1, A2) sichtbar, wird jedoch bei MOI 200 (B1, B2) und MOI 500 (C1, C2) noch deutlicher. In den Kontrollen ohne Infektion (D1, D2) zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der Adhärenz der Zellen untereinander. Vergrößerung 100 x.**

Abbildung 32 zeigt lichtmikroskopische Bilder von Makrophagen der Zelllinie P388D1 nach Infektion mit *L. monocytogenes*. Bei Infektion mit *L. monocytogenes*\_pERL3 ist bei einer MOI von 500 (Abb. 32 C1) im Vergleich zu geringeren MOI 100 und MOI 200 (Abb. 32 A1, B1) eine vermehrte Ablösung der Zellen von der Kulturschale festzustellen. Auch bei Infektion mit dem ETA produzierenden Stamm *L. monocytogenes* + *eta* ist im Vergleich der verschiedenen MOI untereinander bei MOI 500 (Abb. 32 C2) die größte Anzahl der abgelösten Zellen festzustellen. Vergleicht man bei gleicher MOI *L. monocytogenes*\_pERL3 mit *L. monocytogenes* + *eta*, so ist bei dem ETA produzierenden Stamm *L. monocytogenes* + *eta* eine vermehrte Ablösung der Zellen zu erkennen. Dieser Effekt ist schon bei MOI 100 und MOI 200 zu erkennen (Abb. 32 A1, A2 bzw. B1, B2) und wird bei MOI 500 (Abb. 32 C1, C2) noch deutlicher. Eine vermehrte Ablösung der Zellen von der Kulturschale deutet auf eine verminderte Viabilität der Zellen hin. Um auszuschließen, dass die Gentamicinbehandlung einen Einfluss auf die Ablösung der Zellen hat, wurden außerdem nicht infizierte Zellen in gleicher Weise mit Gentamicin behandelt wie die infizierten Zellen (Abb. 32 D1). Des Weiteren erfolgte ein Vergleich mit Zellen ohne Infektion und ohne Gentamicinbehandlung (Abb. 32 D2). Es

ist lichtmikroskopisch kein wesentlicher Unterschied festzustellen. Die Gentamicinbehandlung hat in diesem Versuchsaufbau keinen Einfluss auf die Viabilität der untersuchten Makrophagen. Es kann festgestellt werden, dass Zellen, die mit ETA produzierenden *L. monocytogenes* infiziert wurden, im Vergleich zur Infektion mit *L. monocytogenes\_pERL3* eine verminderte Viabilität aufweisen. ETA scheint auf die Zellen eine toxische Wirkung zu haben.

### 3.6.3.2 Nachweis der verminderten Viabilität von Makrophagen der Zelllinie P388D1 nach Infektion mit ETA produzierenden *L. monocytogenes* mittels MTT-Test

Da das im Abschnitt 3.6.3.1 verwendete Testverfahren der Lichtmikroskopie nicht quantifiziert werden kann, wurde die Viabilität der infizierten Zellen mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT-) Test untersucht. Hierzu wurden Makrophagen der Zelllinie P388D1 analog zum Infektionsversuch aus Abschnitt 3.6.3.1 infiziert und anschließend für 2 h in 10 % MTT im verwendeten Medium RPMI + 10 % FKS inkubiert. Metabolisch aktivere Zellen reduzieren durch vermehrten Anfall von Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP) mehr MTT zu (*E,Z*)-5-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-1,3-Diphenylformazan. Dieses Formazan kann anschließend mit Isopropanol + 5 % Ameisensäure aus den Zellen gelöst und photometrisch bei einer Absorption von 562 nm gemessen werden (2.2.5.6).



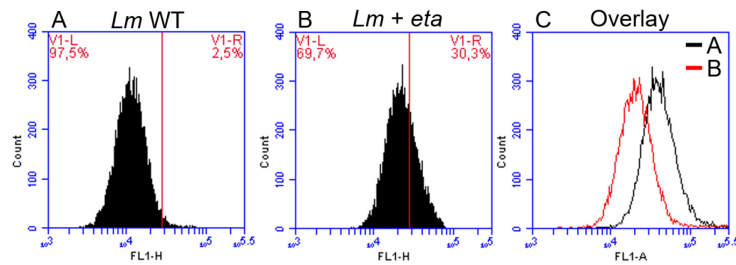
**Abbildung 33: Nachweis der erhöhten Toxizität von ETA produzierenden *L. monocytogenes* mittels MTT-Tests.** Makrophagen der Zelllinie P388D1 wurden mit *Lm* mit unterschiedlicher MOI infiziert. Die Infektion erfolgte jeweils mit *Lm\_pERL3* und ETA produzierenden *Lm + eta* für 45 min. Anschließend erfolgte eine 24 h Behandlung mit 50 µg/ml Gentamicin. Die Zellen wurden dann in 10 % MTT - Lösung im Zellkulturmedium für 2 h inkubiert. Das reduzierte Formazan wurde mit Isopropanol + 5 % Ameisensäure gelöst. Die Messung erfolgte im Photometer bei einer Wellenlänge von 562 nm. Bei einer MOI von 100 zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem ETA produzierenden Stamm *Lm + eta* und der Kontrolle mit *Lm\_pERL3*. Bei einer MOI von 200 zeigt sich eine signifikante Abnahme der Absorption bei *Lm + eta*, Die Absorption von *Lm\_pERL3* bleibt unverändert. Bei MOI 500 zeigt sich eine noch stärkere Abnahme der Absorption bei *Lm + eta* auf 57 % des Ausgangswertes. Auch hier ist der Unterschied signifikant. *Lm\_pERL3* zeigt bei MOI 500 eine zu den anderen MOI vergleichbare Absorption ohne signifikanten Unterschied. Die Absorption dient als Maß für die Viabilität der Zellen. (\*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; ns = nicht signifikant)

Abbildung 33 zeigt die Auswertung des MTT-Tests der mit *L. monocytogenes* infizierten Makrophagen der Zelllinie P388D1 bei verschiedener MOI. Die Absorption bei 562 nm korreliert mit der Konzentration des durch NADP reduzierten Formazans. Eine stärkere Absorption korreliert mit einer vermehrten Viabilität der untersuchten Zellen. Bei MOI 100 lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen ETA produzierenden *L. monocytogenes* + *eta* und der Kontrolle mit *L. monocytogenes*\_pERL3 feststellen. Bei MOI 200 zeigt sich bei *L. monocytogenes* + *eta* im Vergleich zur Kontrolle mit *Lm*\_pERL3 eine signifikante Abnahme der Absorption um 15%. In der Kontrolle mit *L. monocytogenes*\_pERL3 ist bei MOI 200 im Vergleich zu MOI 100 keine signifikante Abnahme der Absorption feststellbar. ETA produzierende *L. monocytogenes* + *eta* scheinen bei MOI 200 zu einer geringeren Viabilität der Zellen zu führen als die Kontrolle mit *L. monocytogenes*\_pERL3. Gleichzeitig scheint bei *L. monocytogenes*\_pERL3 eine höhere MOI keinen Einfluss auf die Viabilität der Zellen zu haben. Bei MOI 500 zeigt sich bei *L. monocytogenes* + *eta* im Vergleich zur Kontrolle mit *L. monocytogenes*\_pERL3 eine noch deutlichere Abnahme der Absorption auf 57 % des Ausgangswertes. Die Absorption der Kontrolle mit *L. monocytogenes*\_pERL3 ist im Vergleich zu den Kontrollen mit *L. monocytogenes*\_pERL3 bei MOI 100 und MOI 200 unverändert. Der geringere Umsatz von MTT zu dessen Formazan nach Infektion mit ETA produzierenden *L. monocytogenes* deutet auf eine geringere Viabilität dieser Zellen hin. Dieser Effekt ist bei MOI 200 und noch deutlicher bei MOI 500 feststellbar. Zellen, die mit ETA produzierenden *L. monocytogenes* infiziert wurden, weisen ab einer MOI von 200 und höher eine geringere Viabilität auf als Zellen, die bei jeweils gleicher MOI mit *L. monocytogenes*\_pERL3 infiziert wurden. Die Ergebnisse des MTT-Tests (Abb. 33) korrelieren mit der zuvor durchgeführten Auswertung mittels Lichtmikroskopie (Abb. 32) und zeigen eine verstärkte Toxizität von ETA-produzierenden *L. monocytogenes*.

### **3.7.1 Nachweis der vermehrten Apoptose von Makrophagen der Zelllinie P388D1 nach Infektion mit ETA produzierenden *L. monocytogenes* mittels Durchflusszytometrie**

In den Abschnitten 3.6.3.1 und 3.6.3.2 wurden infizierte Zellen hinsichtlich ihrer Viabilität untersucht. Um den Mechanismus der verminderten Viabilität zu untersuchen, wurden infizierte Zellen im Hinblick auf das Vorhandensein von Marker-Proteinen der Apoptose getestet. Hierzu wurden Makrophagen der Zelllinie P388D1 mit *L. monocytogenes*, die ETA produzieren, infiziert und anschließend mit dem CellEvent® Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher) im Durchflusszytometer untersucht. Der Nachweis von aktivierter Caspase 3/7 stellt ein etabliertes Verfahren zum Nachweis von Apoptose dar.

## Ergebnisse



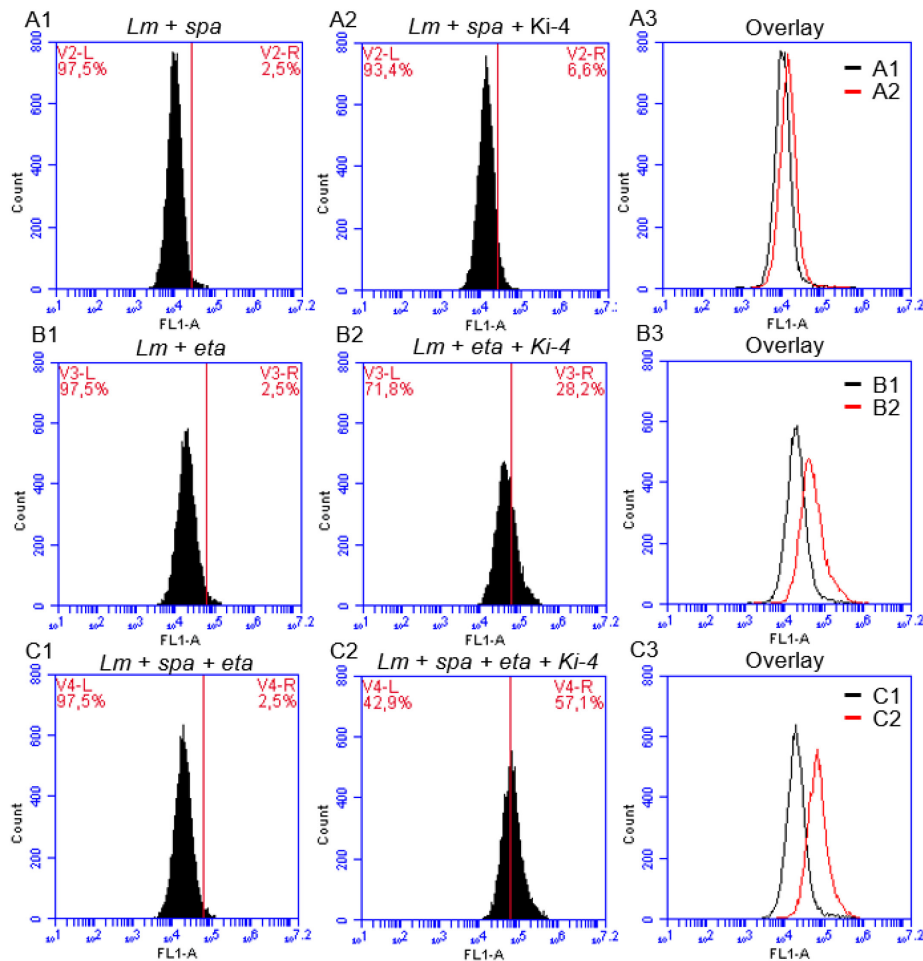
**Abbildung 34: Vermehrter Nachweis von aktivierter Caspase 3/7 in mit ETA-produzierenden *L. monocytogenes* infizierten Makrophagen.** **A:** P388D1 Zellen nach Infektion mit *Lm* Wildtyp (WT); **B:** P388D1 Zellen nach Infektion mit *Lm* + *eta*; **C:** Histogramm – overlay von A und B. Makrophagen der Zelllinie P388D1 wurden mit *Lm* mit MOI 500 infiziert. Die Infektion erfolgte jeweils mit *Lm* WT und ETA produzierenden *Lm* + *eta* für 45 min. Anschließend erfolgte eine 8 h Behandlung mit 50 µg/ml Gentamicin und die Messung mit CellEvent® Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher) am Durchflusszytometer. Im Vergleich zur Kontrolle nach Infektion mit *Lm* WT (A) zeigt sich nach der Infektion mit *Lm* + *eta* (B) eine Zunahme der Fluoreszenz. Die Histogramme verschieben sich auf der X-Achse nach rechts. Nach Infektion mit *Lm* + *eta* ist diese Zunahme der Fluoreszenz auf 30,3 % über dem in der Kontrolle festgelegten Schwellenwert. C dient zur Veranschaulichung als Darstellung in einem Histogramm-overlay. Darstellung eines repräsentativen Experimentes aus einer Dreifachbestimmung.

Abbildung 34 zeigt die Auswertung der Durchflusszytometrie zum Nachweis der aktivierten Caspase 3/7 der mit *L. monocytogenes* infizierten Makrophagen der Zelllinie P388D1. *L. monocytogenes* Wildtyp (Abb. 34 A) dient als Kontrolle sowie zur Festlegung des Schwellenwertes. Die Grenze des Fluoreszenzsignals wurde so gewählt, dass sich 2,5 % der Ereignisse der Kontrolle über dem Schwellenwert befinden. Nach Infektion mit *L. monocytogenes* + *eta* zeigt sich eine Zunahme des Fluoreszenzsignals FL1-A, die Histogrammkurve verschiebt sich auf der X-Achse nach rechts (Abb. 34 B). Es werden 30,3 % der Einzelsignale über dem festgelegten Schwellenwert registriert. Hiermit kann eine im Vergleich zur Kontrolle vermehrte Aktivität von aktivierter Caspase 3/7 als Markerprotein der Apoptose festgestellt werden. Dieser Effekt wird mit einem Histogramm-overlay der beiden Histogramme (Abb. 34 C) verdeutlicht. Makrophagen, die mit *L. monocytogenes* + *eta* infiziert wurden, zeigen im Vergleich zur Kontrolle mit *L. monocytogenes* Wildtyp ein stärkeres Fluoreszenzsignal und eine vermehrte Aktivität an aktivierter Caspase 3/7 als Markerprotein für die Apoptose.

### 3.7.2 Nachweis der vermehrten Apoptose von Zellen der Linie KM-H2 nach Infektion mit der Kombination aus SPA- und ETA- produzierenden *L. monocytogenes* und Ki-4 scFv-Fc-Fusionsproteinen

Nach dem Nachweis der erhöhten Toxizität von ETA produzierenden *L. monocytogenes* in phagozytierenden Zellen der Linie P388D1 soll die erhöhte Toxizität auch in gezielt infizierten Krebszellen nachgewiesen werden. Um Zellen der Zelllinie KM-H2 gezielt zu infizieren und anschließend die Apoptose zu induzieren, wurden *L. monocytogenes* sowohl mit dem für *spa* als auch mit dem für *eta* kodierenden Plasmid transformiert. Der daraus resultierende Stamm *L. monocytogenes* EGD-e 1/2a  $\Delta$ *iniAB*<sub>pIMK2</sub> + *spa*<sub>pERL3</sub> + *eta* wird im Folgenden *L. monocytogenes*

*ΔiniAB + spa + eta* genannt. Bakterien dieses Stammes wurden mit dem gegen KM-H2 Zellen gerichteten Ki-4-scFv-Fc inkubiert. Anschließend wurden die so behandelten *L. monocytogenes* benutzt, um Zellen der Linie KM-H2 zu infizieren. Kontrollen erfolgten mit *L. monocytogenes + spa* und *L. monocytogenes + eta*, jeweils mit und ohne Behandlung mit dem Ki-4-scFv-Fc. Die Auswertung erfolgte durchflusszytometrisch nach Färbung mit dem CellEvent® Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher).



**Abbildung 35: Durchflusszytometrie mit Nachweis von Caspase 3/7 in KM-H2 Zellen mit verschiedenen Stämmen von *L. monocytogenes* in Kombination mit Ki-4-scFv-Fc.** Zellen der Linie KM-H2 wurden mit verschiedenen Stämmen von *Lm* infiziert. MOI 200; Infektionszeit 45 min; 8h Behandlung in 50 µg/ml Gentamicin in RPMI + 10 % FKS. Anschließend Färbung mit CellEvent® Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit (Thermo Fisher) und Messung am Durchflusszytometer. A1: *Lm ΔiniAB + spa*; A2: *Lm ΔiniAB + spa + Ki-4*; B1: *Lm ΔiniAB + eta*; B2: *Lm ΔiniAB + eta + Ki-4*; C1: *Lm ΔiniAB + spa + eta*; C2: *Lm ΔiniAB + spa + eta + Ki-4*. Der festgelegte Schwellenwert bezieht sich auf die jeweilige Kontrolle ohne Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc. Nach Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc zeigt sich bei *Lm ΔiniAB + spa + Ki-4* ein Anstieg der Fluoreszenz von 6,1 % (A2). A3 stellt ein Histogramm *overlay* von A1 und A2 dar. Nach Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc ist bei *Lm ΔiniAB + eta + Ki-4* (B2) ein Anstieg der Fluoreszenz von 28,2 % über dem festgelegten Schwellenwert zu verzeichnen. B3 stellt ein Histogramm *overlay* von B1 und B2 dar. Bei *Lm ΔiniAB + spa + eta + Ki-4* (C2) zeigt sich nach Inkubation mit Ki-4-scFv-Fc mit 57,1% über dem festgelegten Schwellenwert der größte Anstieg der Fluoreszenz der untersuchten Proben. C3 zeigt ein Histogramm *overlay* von C1 und C2. Darstellung eines repräsentativen Experimentes aus einer Dreifachbestimmung.

Abbildung 35 zeigt die Auswertung der Durchflusszytometrie zum Nachweis der aktivierten Caspase 3/7 Aktivität der mit *L. monocytogenes* infizierten Zellen der Linie

## Ergebnisse

KM-H2. Die Grenze des Fluoreszenzsignals wurde so gewählt, dass sich 2,5 % der Ereignisse der jeweiligen Kontrolle ohne Inkubation mit Ki-4- scFv-Fc über dem Schwellenwert befinden.

Bei Infektion mit *L. monocytogenes* + *spa* (Abb. 35 A1) zeigt sich nach Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc (Abb. 35 A2) eine leichte Zunahme der Fluoreszenz FL1-A. Die Histogrammkurve verschiebt sich auf der X-Achse nach rechts. Nach Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc werden 6,6 % der Signale über dem festgelegten Schwellenwert verzeichnet. Bei *L. monocytogenes* + *eta* (Abb. 35 B1) sind nach Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc im Vergleich zur Kontrolle ohne Inkubation mit Ki-4- scFv-Fc 28,2 % der Signale über dem festgelegten Schwellenwert festzustellen (Abb. 35 B2). Im Vergleich zu den anderen untersuchten Proben zeigt sich nach Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc bei *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* + *eta* + Ki-4 die größte Zunahme der Fluoreszenz von 57,1 % über dem festgelegten Schwellenwert (Abb. 35 C2). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die gezielte Infektion von Krebszellen mithilfe von SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* in Kombination mit dem Ki-4-scFv-Fc bei zusätzlicher Produktion von ETA durch *L. monocytogenes* zur größten Aktivierung von Caspase 3/7 als Markerprotein für die Apoptose in den untersuchten Proben führt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Expression von *Staphylococcus aureus* Protein A in *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* ist durch seine Eigenschaften als fakultativ intrazelluläres Bakterium und als Auslöser einer starken adaptiven Immunantwort ein nützliches Werkzeug in der Therapie maligner Erkrankungen. Um eine gezielte Infektion in Krebszellen zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer Antikörper- Antigenreaktion gearbeitet. Krebszellen sollen durch ihre auf der Oberfläche überexprimierten Antigene durch *L. monocytogenes* erkannt werden und so spezifisch infiziert werden. Zu diesem Zweck wurde Protein A (SPA) aus *S. aureus* auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* exprimiert. SPA ist ein Protein, das Antikörper an deren konstanten Fc-Fragment bindet. Auf diese Weise können Antikörper auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* gebunden werden und über den freien variablen Teil weiterhin Antigene erkennen. Als Antikörperäquivalent wurden in dieser Arbeit rekombinante Antikörperfragmente in Form von scFv-Fc-Fusionsproteinen verwendet. ScFv-Fc-Fusionsproteine sind rekombinant hergestellte Antikörperfragmente, die aus einem konstanten *fragment crystallizable* (Fc-Fragment) und jeweils zwei Antigen erkennenden *single chain variable fragments* (scFv) bestehen.

SPA ist ein Protein, das im Genom von *L. monocytogenes* nicht vorkommt. Um es von *L. monocytogenes* produzieren zu lassen, wurde das für das Protein kodierende Gen in *L. monocytogenes* kloniert. Für die Klonierung wurde das Plasmid pIMK2 verwendet (Abb. 9), das genetische Information in das Chromosom von *L. monocytogenes* integrieren kann. Es beinhaltet zudem den Promotor *pHelp* (*highly expressed Listeria promoter*) (Riedel et al. 2007), der für eine starke konstitutive Überexpression des dahinter klonierten Proteins sorgt (Monk et al. 2008). Die korrekte Abfolge der Basensequenz von *spa* wurde mittels Sequenzierung überprüft (Anhang Abb. 1) und mit der Basensequenz von *spa* aus dem für die Klonierung verwendeten *S. aureus* Stamm „NCTC 8325“ verglichen (Uhlén et al. 1984). Die erfolgreiche Transformation des Plasmids pIMK2 mit der genetischen Information für *spa* (pIMK2 + *spa*) konnte in *L. monocytogenes* mittels PCR nachgewiesen werden (Abb. 16).

*S. aureus* und *L. monocytogenes* sind grampositive Bakterien. Beide Spezies exprimieren Oberflächenproteine, die kovalent an die Peptidoglykanschicht der Zellwand gebunden sind. Die Verankerung von SPA in *S. aureus* erfolgt über ein C-terminales LPXTG-Signalmotiv (Aminosäuremotiv aus Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin), eine hydrophobe Region und eine geladene Region (Anhang Abb. 1) (Schneewind et al. 1992; Schneewind et al. 1993). Das LPXTG-Signalmotiv wird von dem Protein Sortase A gebunden, das die kovalente Bindung an die Pentaglycinstruktur in der Zellwand von

*S. aureus* katalysiert (Navarre und Schneewind 1994; Schneewind et al. 1995; Mazmanian et al. 1999). Auch *L. monocytogenes* exprimiert das Protein Sortase A, um Oberflächenproteine kovalent an dessen Zellwand zu binden. Das Protein Internalin A wird beispielsweise von *L. monocytogenes* über ein LPXTG-Signalmotiv Sortase A-abhängig an dessen Zellwand gebunden. Die kovalente Bindung findet hier an der Aminogruppe von Diaminopimelinsäure der Zellwand statt (Dhar et al. 2000; Garandeau et al. 2002). *L. monocytogenes* bietet also die Voraussetzungen, um SPA über die proteineigene zellwandbindende Region X (Abb. 3) an der Zellwandoberfläche zu binden. Die erfolgreiche Expression von SPA in *L. monocytogenes* konnte in dieser Arbeit mittels eines SPA-spezifischen Antikörpers (Monoclonal Anti Protein A, Tab. 7) in der Zellwandproteinfraktion nachgewiesen werden, außerdem erfolgte auch der Nachweis von SPA in der Überstandsproteinfraktion (Abb. 17). In *S. aureus* liegt SPA sowohl auf der Zellwandoberfläche gebunden als auch in sezernierter Form im umgebenden Medium vor (Becker et al. 2014). Das Vorkommen von SPA auf der Oberfläche von lebenden *L. monocytogenes* wurde durch das Verfahren der Durchflusszytometrie nachgewiesen. *L. monocytogenes* wurde mit einem gegen SPA gerichteten, fluoreszenzmarkierten Antikörper (Anti Protein A antibody Texas Red, Tab. 7) inkubiert. Hierbei konnte in den Stämmen, in die *spa* exprimiert wurde, eine vermehrte Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 18).

#### **4.2 Die Produktion von SPA auf der Zellwandoberfläche von *L. monocytogenes* ermöglicht eine gezielte, Internalin-unabhängige Infektion in KM-H2 und DMS-273 Zellen**

*L. monocytogenes* ist in der Lage, das Zytosol von eukaryotischen Zellen zu infizieren. Die Infektion in verschiedene Arten von Zellen wird hauptsächlich von den Oberflächenproteinen Internalin A und Internalin B vermittelt. Internalin A ist für die Infektion von epithelialen Zellen verantwortlich (Gaillard et al. 1991). Es bindet an E-Cadherin auf epithelialen Zellen (Mengaud et al. 1996). Internalin B bindet an den *hepatocyte growth factor receptor* (c-Met) (Shen et al. 2000) und vermittelt so die Infektion verschiedener nicht epithelialer Zellen (Dramsi et al. 1995; Lingnau et al. 1995; Gaillard et al. 1996). Es konnte nachgewiesen werden, dass sowohl Internalin A als auch Internalin B ausreichend ist, um eine Internalisierung in entsprechende nicht phagozytierende Zellen zu erzeugen. Dies galt, selbst wenn aufgereinigte Internaline an Latexkugeln gebunden waren (Lecuit et al. 1997; Braun et al. 1998).

Infektionsexperimente in den Zelllinien KM-H2 (Morbus Hodgkin) und DMS-273 (kleinzelliges Bronchialkarzinom, SCBC) mit der *L. monocytogenes* Deletionsmutante  $\Delta inIAB$ , die Internalin A und B nicht produziert, zeigten eine starke Abnahme der Anzahl an intrazellulären Bakterien im Vergleich zum Wildtyp. Ohne das Vorhandensein

von Internalin A und B ist die Invasionsrate in der Zelllinie KM-H2 auf ca. 25 % und in der Zelllinie DMS-273 auf 33 % reduziert (Abb. 21). In Hepatozyten der Zelllinie HepG2 ist die Anzahl intrazellulärer *L. monocytogenes* in Abwesenheit von Internalin A und B ebenfalls auf ca. 25 % reduziert (Vadia et al. 2011).

Die reduzierte Infektionsrate von *L. monocytogenes* in die Zelllinien KM-H2 und DMS-273 war angesichts der entscheidenden Rolle von Internalin A und B im Infektionsmechanismus von *L. monocytogenes* zu erwarten. In der Literatur sind bisher keine vergleichbaren Infektionsversuche mit *L. monocytogenes* in den verwendeten Zelllinien KM-H2 und DMS-273 durchgeführt worden. In dieser Arbeit war trotz geringerer Anzahl intrazellulärer Bakterien auch bei der  $\Delta inlAB$  Deletionsmutante eine gewisse Infektiosität nachzuweisen. Es scheint in diesen Infektionsversuchen einen Internalin-unabhängigen Infektionsmechanismus zu geben. Dies deckt sich mit Forschungsergebnissen, in denen gezeigt werden konnte, dass verschiedene andere Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes* in der Infektion eukaryotischer Zellen eine Rolle spielen. *L. innocua* ist eine *Listeria* Spezies, in dessen Genom im Vergleich zu *L. monocytogenes* die Virulenzgene fehlen. Dies betrifft unter anderem die Virulenzfaktoren Internalin A, Internalin B, Listeriolysin O (LLO) und den Aktin-akkumulierenden Faktor A (ActA) (Glaser et al. 2001). Suarez et al. wiesen nach, dass *L. innocua*, die nach Transformation der genetischen Information ActA produzieren konnten, in der Lage waren, eukaryotische epitheliale Zellen zu infizieren (Suárez et al. 2001). Weiterhin wurde festgestellt, dass LLO einen Einfluss auf die Infektionszahlen von *L. monocytogenes* in Hepatozyten hat. So konnte in Infektionsversuchen mit Mutanten und Komplementanten nachgewiesen werden, dass *L. monocytogenes* die LLO produzierende erhöhte Infektionsraten aufweisen, auch wenn kein Internalin A und B vorhanden ist. Selbst Polystyrol Kugeln, die LLO auf der Oberfläche trugen, waren nach Inkubation mit Hepatozyten intrazellulär nachweisbar. (Vadia et al. 2011). Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse (Abb. 21) decken sich mit der Annahme, dass Internalin A und B zwar eine vermehrte Infektion in eukaryotischen Zellen vermitteln, jedoch nicht ausschließlich für die Infektion verantwortlich sind. Die Reduktion der Invasionsrate in Abwesenheit von Internalin A und B ist mit den in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuchen in den Zelllinien KM-H2 und DMS-273 vergleichbar.

Zur gezielten Infektion von KM-H2 Zellen wurden *L. monocytogenes*, die SPA auf der Oberfläche exprimieren, mit gegen CD30 gerichteten Ki-4-scFv-Fc-Fusionsproteinen inkubiert. Die Bindung von Ki-4-scFv-Fc-Fusionsproteinen an SPA ist über die im Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein enthaltene IgG2a möglich. Wir konnten nachweisen, dass das Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein an CD30 auf der Zelllinie KM-H2 bindet (Abb. 20). *L. monocytogenes* mit der Kombination von SPA auf der Oberfläche und dem

Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein wiesen eine deutlich erhöhte Invasionsrate auf als die Kontrollen. Es konnte eine 22-fach höhere Anzahl intrazellulärer *L. monocytogenes* in KM-H2 Zellen festgestellt werden (Abb. 22). CD30, auch Ki-1 genannt, wird unter anderem von Zellen des Hodgkin Lymphoms exprimiert (Schwab et al. 1982). Von der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie KM-H2 wird CD30 ebenso exprimiert (Kamesaki et al. 1986). Es ist ein Protein aus der Tumornekrosefaktor (TNF)-Superfamilie und weist Homologien zu TNF- $\alpha$  auf (Smith et al. 1993). Nach der Bindung von Ki-4-scFv an CD30 kommt es zu einer Internalisierung des Proteinkomplexes. Es konnte gezeigt werden, dass die Affinität und die Internalisierung von Ki-4-scFv ähnlich zu einem monoklonalen Ki-4 IgG-Antikörper ist (Klimka et al. 1999). Auch andere gegen CD30 gerichtete monoklonale Antikörper werden nach der Bindung an CD30 internalisiert. Dies konnte beispielsweise für den monoklonalen Anti CD30-Antikörper cAC10 in der Zelllinie L540cy nachgewiesen werden (Sutherland et al. 2006). Es ist denkbar, dass die spezifische Infektion von *L. monocytogenes* mit den auf der Oberfläche gebundenen Ki-4-scFv-Fc-Fusionsproteinen über die Internalisierung von CD30 beispielsweise durch eine Clathrin-vermittelte Endozytose stattfindet. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Internalin-vermittelte Infektion der Zellen, die durch eine Bindung an CD30 verursachte räumliche Nähe von *L. monocytogenes* verstärkt wird. Gegen die letztere Hypothese spricht die Tatsache, dass die KM-H2 Zellen nicht epithelialen Ursprunges sind und somit kein E-Cadherin als Rezeptor für Internalin A exprimieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass KM-H2 Zellen nur eine minimale Expression von c-met zeigen, der als Rezeptor für Internalin B fungiert (Xu et al. 2012).

Um eine Internalin-unabhängige Infektion von *L. monocytogenes* in KM-H2 und DMS-273 Zellen zu überprüfen, wurden die Infektionsversuche mit der Internalin Deletionsmutante  $\Delta inIAB$  durchgeführt. Es zeigte sich, dass *L. monocytogenes*  $\Delta inIAB + spa$  nach der Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein eine im Vergleich zu dem Wildtyp-Pendant ähnlich hohe Anzahl intrazellulärer Bakterien aufweist, und damit die oben beschriebene starke Abnahme der Anzahl an intrazellulären Bakterien ( $\Delta inIAB$ ) im Vergleich zum Wildtyp durch SPA in  $\Delta inIAB$  aufgehoben werden konnte (Abb. 22, 23). Der relative Anstieg der Invasionsrate bei der Internalin Deletionsmutante *L. monocytogenes*  $\Delta inIAB + spa$  war sogar höher als bei *L. monocytogenes* + *spa*. Während bei *L. monocytogenes* + *spa* nach Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein ein Anstieg der Invasionsrate um das 22-fache zu beobachten war (Abb. 22), zeigte sich bei *L. monocytogenes*  $\Delta inIAB + spa$  nach Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein ein Anstieg um das 56-fache (Abb. 23). Wenn davon ausgegangen wird, dass die spezifische Infektion unabhängig von Internalin ist, ist die höhere Invasionsrate bei der Internalin Deletionsmutante auf den geringeren Ausgangswert

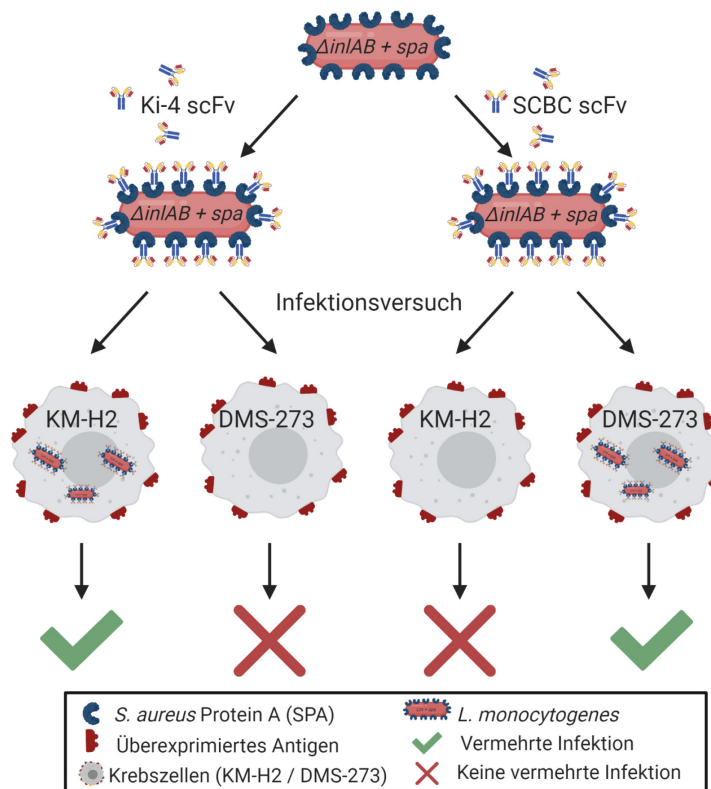
intrazellulärer Bakterien im Vergleich zum Wildtyp zurückzuführen. Der genaue Mechanismus der gezielten Infektion von *L. monocytogenes* + *spa* nach Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein ist aus den erhobenen Daten nicht abzuleiten und bedarf weiterer Forschung.

Die gezielte Infektion von Krebszellen mit *L. monocytogenes* wurde in dieser Arbeit auch für die Zelllinie DMS-273 untersucht. DMS-273 ist eine Zelllinie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms (SCBC). Diese Zellen sind epithelialen Ursprunges, während die zuvor untersuchte Zelllinie KM-H2 lymphozytären Ursprunges ist. Das gegen DMS-273 gerichtete scFv-Fc-Fusionsprotein mit der Phage Display Technologie hergestellt. Im Gegensatz zum Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein, das gegen CD30 gerichtet ist, ist das Zielantigen des gegen DMS-273 gerichteten scFv-Fc-Fusionsproteins unbekannt (Haaf et al. 2015).

Auch in den Infektionsversuchen in der Zelllinie DMS-273 konnten in dieser Arbeit bei den verwendeten Kontrollgruppen ähnliche Invasionsraten festgestellt werden. So zeigte *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* mit und ohne Inkubation mit dem gegen die DMS-273 Zellen gerichteten SCBC-scFv-Fc-Fusionsprotein keine signifikant unterschiedliche Invasionsrate (Abb. 25). Auch *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* ohne Inkubation mit dem SCBC-scFv-Fc-Fusionsprotein zeigte eine ähnlich niedrige Invasionsrate ohne signifikanten Unterschied. Nur *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* in Kombination mit dem SCBC-scFv-Fc-Fusionsprotein führte zu einer signifikant höheren Invasionsrate mit einer 10-fach erhöhten Anzahl intrazellulärer Bakterien (Abb. 25). Der relative Anstieg der Invasionsrate im Vergleich zur Kontrolle ohne Inkubation mit dem scFv-Fc-Fusionsprotein fällt in DMS-273 geringer aus als in KM-H2 (10-fach vs. 56-fach) (Abb. 23, Abb. 25). Eine Internalisierung der verwendeten SCBC-scFv-Fc-Fusionsproteine in DMS-273 konnte von Haaf et al. nachgewiesen werden (Haaf et al. 2015). Die SCBC-scFv-Fc-Fusionsproteine verhalten sich diesbezüglich also ähnlich wie die Ki-4-scFv-Fc-Fusionsproteine. Da das Zielantigen des gegen DMS-273 gerichteten SCBC-scFv-Fc-Fusionsproteins unbekannt ist, wäre es denkbar, dass die Expression des Zielantigens auf der Oberfläche der DMS-273 Zellen geringer ist als die Expression von CD30 auf der Oberfläche von KM-H2.

Die in den Infektionsversuchen verwendeten scFv-Fc-Fusionsprotein Lösungen wurden rekombinant hergestellt. Nach der Identifizierung der entsprechenden Basensequenz wurden die kodierende Basensequenz in den Vektor pMS2 kloniert, der anschließend in HEK293T Zellen transfiziert wurde. Die scFv-Fc-Fusionsproteine wurden dann von den Zellen produziert und in das umgegebene Medium sezerniert. Das Medium mit den enthaltenen scFv-Fc Fusionsproteinen wurde mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich

der Bindungsfähigkeit an deren Zielzellen überprüft (Haaf et al. 2015). Das Medium mit den enthaltenen scFv-Fc-Fusionsproteinen wurde anschließend für die Infektionsversuche verwendet. Diese Methode zur Herstellung der scFv-Fc-Fusionsproteine mit der Verwendung des Mediums birgt hinsichtlich der in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuche einige Herausforderungen. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass das verwendete scFv-Fc-Fusionsprotein-haltige Medium selbst eine vermehrte Infektion in eukaryotischen Zellen auslöst, wurden weitere Infektionsversuche durchgeführt. Eine durch das Medium vermittelte vermehrte Infektion wäre beispielsweise durch Wachstumsfaktoren oder weitere unbekannte Komponenten in der verwendeten Lösung denkbar. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden Infektionsversuche in KM-H2 Zellen und DMS-273 Zellen sowohl mit den gegen die jeweiligen Zellen gerichteten scFv-Fc-Fusionsproteinen als auch mit den nicht gegen die jeweiligen Zellen gerichteten scFv-Fc-Fusionsproteinen als Kontrolle durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass eine größere Invasionsrate nur bei dem spezifisch gegen die jeweiligen Zellen gerichteten scFv-Fc-Fusionsprotein zu beobachten war. Es konnte kein Unterschied zu den Kontrollgruppen mit *L. monocytogenes* ohne SPA auf der Oberfläche und *L. monocytogenes*  $\Delta$ *iniAB* + *spa* nach Inkubation mit dem nicht gegen die jeweiligen Zellen gerichteten scFv-Fc-Fusionsprotein nachgewiesen werden (Abb. 26). Es kann festgestellt werden, dass nur die Kombination aus der verwendeten Zelllinie mit dem jeweils gegen sie gerichteten spezifischen scFv-Fc-Fusionsprotein zu einer vermehrten Infektionsrate führt (Abb. 36). Somit können andere Komponenten des scFv-Fc-Fusionsprotein enthaltenden Mediums als Ursache für eine vermehrte Infektion ausgeschlossen werden.



**Abbildung 36. Nur die Kombination aus der verwendeten Zelllinie mit dem jeweiligen spezifischen scFv-Fc-Fusionsprotein führt zu einer gezielten Infektion von *L. monocytogenes*  $\Delta inlAB + spa$  in KM-H2 und DMS-273 Zellen.** *L. monocytogenes*  $\Delta inlAB + spa$  wurde mit verschiedenen scFv-Fc-Fusionsproteinen inkubiert. Anschließend erfolgte die Infektion der Zelllinien KM-H2 und DMS-273. Nach der Inkubation mit dem Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein konnte nur in der Zelllinie KM-H2, gegen die das Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein gerichtet ist, eine vermehrte Infektion festgestellt werden. Nach der Inkubation mit dem SCBC-scFv-Fc-Fusionsprotein konnte in KM-H2 keine vermehrte Infektion beobachtet werden. Nach der Inkubation mit dem SCBC-scFv-Fc-Fusionsprotein konnte in der Zelllinie DMS-273, gegen die das SCBC-scFv-Fc-Fusionsprotein gerichtet ist, eine vermehrte Infektion nachgewiesen werden. In der Zelllinie KM-H2 war dagegen keine vermehrte Infektion feststellbar. Die gezielte Infektion in KM-H2 und DMS-273 erfolgte nur in Kombination mit den jeweils gegen sie gerichteten scFv-Fc-Fusionsproteinen. Abbildung erstellt mit *BioRender.com*.

In den verschiedenen Infektionsversuchen wurden teilweise unterschiedlich hohe Anzahlen an intrazellulären Bakterien nach der Infektion mit *L. monocytogenes* + *spa* in Kombination mit dem scFv-Fc-Fusionsprotein beobachtet (Abb. 25, Abb. 26). In der Infektion von DMS-273 Zellen konnte in Abbildung 25 ein 10-facher Anstieg, in Abbildung 26 ein 38-facher Anstieg der Invasionsrate festgestellt werden. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Die Infektionsversuche wurden zu verschiedenen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen Chargen der scFv-Fc-Fusionsprotein enthaltenden Überstandslösungen durchgeführt. Die genaue Konzentration der scFv-Fc-Fusionsproteine in der verwendeten Überstandslösung ist nicht bekannt. Es ist anzunehmen, dass die Konzentrationen der unterschiedlichen Chargen sich unterschieden, und somit für die unterschiedlich hohen Infektionsraten verantwortlich waren. Dennoch bleibt festzustellen, dass sich auch bei den unterschiedlichen Chargen zwar ein quantitativer, jedoch kein qualitativer Unterschied zeigte. Die signifikant höhere Infektiosität

bei der Kombination aus *L. monocytogenes* und dem spezifisch gegen die infizierten Zellen gerichteten scFv-Fc-Fusionsprotein war in allen durchgeführten Versuchen zu beobachten. Diese Arbeit kann somit als *proof of principle* angesehen werden. Für zukünftige Untersuchungen könnten die scFv-Fc-Fusionsproteine beispielsweise mit SPA haltigen Säulen aufgereinigt werden, um anschließend eine genauere quantitative Untersuchung durchzuführen. Eine weitere Möglichkeit wäre beispielsweise die genaue Quantifizierung der scFv-Fc-Fusionsproteine mit *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

In den durchgeführten Infektionsversuchen wurde fetales Kälberserum (FKS) als Zusatz verwendet. FKS enthält im Gegensatz zu adulten Seren einen geringeren Anteil an Immunglobulinen (Gstraunthaler und Lindl 2021). Laut Herstellerangaben beträgt die Konzentration von bovinem Immunglobulin G (IgG) weniger als 1 mg/ml, das Serum ist jedoch nicht frei von Antikörpern. Die im Zellkulturmedium enthaltenen IgG-Antikörper könnten in den Infektionsversuchen an SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* binden. Um auszuschließen, dass diese Antikörper zu einer vermehrten Infektion in den eukaryotischen Zellen beitragen könnten, wurde ein Infektionsversuch mit verschiedenen Konzentrationen von FKS im verwendeten Medium durchgeführt. Hierbei konnte kein FKS-dosisabhängiger Anstieg an intrazellulären Bakterien festgestellt werden. Auch bei 40% FKS Konzentration konnte bei *L. monocytogenes* + *spa* ohne Inkubation mit dem scFv-Fc-Fusionsprotein keine vermehrte Infektiosität nachgewiesen werden (Abb. 24). Immunglobuline im verwendeten Medium scheinen demnach keinen Einfluss auf die gezielte Infektion zu haben. Zu erwähnen sei hier, dass die eukaryotischen Zellen in Abwesenheit von FKS kein Wachstum zeigten und lysierten, und somit keine Infektionsversuche in serum- und somit antikörperfreiem Medium durchgeführt werden konnten.

In der Literatur sind bisher keine Infektionsversuche mit *L. monocytogenes* in Kombination mit SPA und scFv-Fc-Fusionsproteinen beschrieben. Auch wurden bisher keine Infektionsversuche in den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien KM-H2 und DMS-273 durchgeführt, ein direkter Vergleich mit der Literatur gestaltet sich also schwierig. Die einzigen Ergebnisse einer spezifischen Infektion von Tumorzellen mit *L. monocytogenes* und mit einer Antikörper-Antigen Reaktion wurden von Heisig et al. im Jahr 2011 publiziert. In der Arbeit wurden SPA in *L. monocytogenes* kloniert und eine erfolgreiche SPA Produktion bestätigt. Anschließend wurden Zelllinien des Mammakarzinoms untersucht. Die Zelllinie 4T1-HER2, die das Oberflächenprotein *human epidermal growth factor receptor 2* (HER2) überexprimiert, wurde mit *L. monocytogenes* + *spa* infiziert. Dafür wurde unter anderem der monoklonale Antikörper Trastuzumab verwendet, der gegen HER2 gerichtet ist. Es konnte gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* + *spa*

nach der Inkubation mit Trastuzumab in der Lage war, Zellen 4T1-HER2 spezifisch zu infizieren. (Heisig et al. 2011). Diese Ergebnisse decken sich mit den in dieser Arbeit erhobenen Ergebnissen, in denen auch nur die Kombination aus dem spezifisch gegen eine Zelllinie gerichteten scFv-Fc-Fusionsprotein und *L. monocytogenes* + *spa* zu einer signifikant größeren Infektionsrate führt.

#### 4.3 Produktion von *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A in *L. monocytogenes*

Nachdem gezeigt werden konnte, dass eine gezielte Infektion von *L. monocytogenes* in Krebszellen möglich ist, sollten die infizierten Zellen in einem weiteren Schritt vermehrt geschädigt werden. Zu diesem Zweck sollte ein Teil von Exotoxin A (ETA) aus *P. aeruginosa* in *L. monocytogenes* produziert werden. Hierzu wurde die genetische Information für *P. aeruginosa* ETA in *L. monocytogenes* kloniert. ETA ist ein bakterielles Toxin, das den eukaryotischen Elongationsfaktor 2 (eEF2) inhibiert und eine Apoptose der Wirtszellen auslöst (Abb. 7). ETA stellt im Forschungsfeld der Therapie maligner Erkrankungen ein etabliertes Immunotoxin dar und wurde bereits in diversen präklinischen und klinischen Studien eingesetzt (Wolf und Elsässer-Beile 2009).

Für die Produktion von ETA in *L. monocytogenes* wurde eine zweigeteilte Strategie verfolgt. Zum einen wurde die für ETA kodierende Sequenz mit einer Signalsequenz fusioniert, die nach der Expression für die Sekretion von ETA aus den Bakterienzellen sorgt. Zum anderen wurde die Expression von ETA unter die Kontrolle eines intrazellulär stark induzierten Promotors gestellt. Damit ETA von *L. monocytogenes* vorwiegend während der Infektion, also intrazellulär in der Wirtszelle, produziert wird, wurde es in dieser Arbeit in der Klonierung unter die Kontrolle des Promotors des Aktinakkumulierenden Faktors A (ActA) gestellt. Der *actA*-Promotor ist der von *L. monocytogenes* am stärksten intrazellulär induzierten Promotor. Im Vergleich zum extrazellulären Milieu erfolgt intrazellulär eine 226-fach verstärkte Induktion des *actA*-Promotors (Moors et al. 1999). Die vorwiegend intrazelluläre Expression des Proteins wurde angestrebt, um ETA von *L. monocytogenes* erst produzieren zu lassen, nachdem die Bakterien gezielt die Krebszelle infiziert haben. Um für eine Sezernierung des Proteins zu sorgen, wurde für die Klonierung die *hly*-Signalsequenz verwendet (Abb. 29). Listeriolysin O (LLO), das von dem Gen *hly* kodiert wird, ist ein von *L. monocytogenes* sezerniertes porenbildendes Toxin. Es sorgt als Virulenzfaktor während der Infektion von *L. monocytogenes* für einen Ausbruch aus dem Phagosom, damit die Bakterien das Zytosol der infizierten Zelle erreichen, wo sie sich vermehren und fortbewegen können (Kingdon und Sword 1970; Gedde et al. 2000). ETA besteht aus verschiedenen Domänen, die unterschiedliche Aufgaben übernehmen (für eine Übersicht über die Domänen vgl. 1.6.1, Abb. 6, Abb. 7). Die Rezeptor-bindende Domäne Ia bindet an den

$\alpha_2$ -Makroglobulinrezeptor/Low-Density Lipoproteinrezeptor (CD91) an eukaryotischen Zellen. Das Toxin wird anschließend gemeinsam mit dem Rezeptor internalisiert (Kounnas et al. 1992). Nach der Aufnahme wird das Toxin innerhalb der Translokationsdomäne II gespalten. So entsteht am C-Terminus ein Fragment mit einer Größe von 37 kDa, das aus einem Teil der Translokationsdomäne II sowie aus der ADP-Ribosyltransferasedomäne Ib + III besteht (Ogata et al. 1990). Für die Klonierung in *L. monocytogenes* wurde ausschließlich das 37 kDa große C-terminale Fragment und nicht die rezeptorbindende Domäne Ia verwendet. So konnte sichergestellt werden, dass das extrazellulär von *L. monocytogenes* produziertes ETA keine Möglichkeit hat, nach intrazellulär zu gelangen und so seine Toxizität unabhängig von der Infektion zu entfalten. Zum Nachweis des Proteins wurde der ETA etablierte monoklonale Antikörper „TC-1“ verwendet (Galloway et al. 1984). Mittels elektrophoretischer Auftrennung, Western Blot und Chemilumineszenz konnte gezeigt werden, dass ETA von *L. monocytogenes* produziert und vorwiegend sezerniert wird (Abb. 30). In der Literatur sind bislang keine Arbeiten beschrieben, in der ETA in *L. monocytogenes* kloniert und sezerniert wurde.

Nach der Produktion von ETA in *L. monocytogenes* folgte im nächsten Schritt die Untersuchung der Funktionalität des Proteins. Um die Toxizität von *L. monocytogenes* produziertem ETA zu untersuchen, wurden zunächst Infektionsversuche in P388D1 Makrophagen durchgeführt. Die Viabilität der infizierten Zellen wurde mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT-) Test untersucht (2.2.5.6). Der MTT-Test stellt ein etabliertes Verfahren zur Untersuchung der Viabilität von Zellpopulation *in vitro* dar (Stepanenko und Dmitrenko 2015). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Viabilität der P388D1 Zellen (Makrophagen) nach der Infektion mit *L. monocytogenes* + *eta* vermindert wird. Eine Erhöhung der MOI (*multiplicity of infection* / Zahl der Bakterien pro infizierter Zelle) von 100 auf 200 bzw. 500 führte zur deutlichen Abnahme der Makrophagenviabilität um 15 % bzw. 43 % während bei der Infektion mit *L. monocytogenes* ohne genetische Information für ETA bei höher MOI keine Abnahme der Viabilität festgestellt wurde. Dies konnte sowohl mikroskopisch als auch mittels MTT-Tests gezeigt werden (Abb. 32, 33). Ähnliche Ergebnisse konnten in der Zelllinie A431 (EGFR überexprimierendes Plattenepithelkarzinom) mit einem ETA basierten Toxin von Falahatgar et al. erhoben werden (Falahatgar et al. 2018). Auch Rezaie et al. stellten eine konzentrationsabhängige verminderte Viabilität von MDA-MB-231 Zellen (Mammakarzinom) fest, die mit einem gegen sie gerichteten ETA-basierten Immunotoxin behandelt wurden (Rezaie et al. 2020).

Im Zytosol entfaltet ETA seine Toxizität über die ADP-Ribosylierung des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (eEF2) (Iglewski et al. 1977; Li et al. 1996). eEF2 ist für die

GTP-abhängige Translokation der Polypeptidkette von der A-Stelle zur P-Stelle am Ribosom während der Translation essenziell. Nach der Inaktivierung von eEF2 durch ETA kommt die Proteinbiosynthese der Zelle zum Erliegen. Zusätzlich werden durch ETA Zytokine freigesetzt, die zur Apoptose der Zelle führen (Morimoto und Bonavida 1992; Komatsu et al. 1998). Es kommt unter anderem zu einer Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 8 (Jenkins et al. 2004). Um den Mechanismus der Toxizität nach der Infektion von *L. monocytogenes* genauer zu charakterisieren, wurde die Aktivität von Caspase 3 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Infektion mit *L. monocytogenes* + *eta* im Vergleich zu *L. monocytogenes* WT zu einer erhöhten Caspase 3-Aktivität in P388D1 Makrophagen führte (Abb. 34). Es kann also angenommen werden, dass nach der Infektion der Zellen eine ETA-vermittelte Apoptose induziert wurde (Abb. 34). Diese Ergebnisse decken sich mit der im MTT-Test erhobenen verminderten Viabilität der P388D1 Makrophagen, die mit *L. monocytogenes* + *eta* infiziert wurden (Abb. 33).

Um zu überprüfen, ob die Kombination aus zielgerichteter Infektion von Tumorzellen und anschließend von den verwendeten Bakterien produziertes ETA zu einer vermehrten Apoptose führt, wurden weitere Infektionsversuche durchgeführt. Die genetische Information für die ETA-Produktion wurde zunächst in *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* transformiert, um SPA und ETA in einem einzelnen Stamm von *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* zu exprimieren. *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* + *eta* wurde anschließend mit dem zuvor in den Infektionsversuchen verwendeten Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein inkubiert. Danach erfolgte die Infektion von KM-H2 Zellen mit *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* + *eta*. Um die Aktivität von Caspase 3 als Markerprotein der Apoptose zu untersuchen, wurde analog zu den oben erwähnten Infektionsversuchen in P388D1 Zellen die Durchflusszytometrie verwendet.

Die Kombination aus *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* + *eta* mit dem Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein führte in den durchgeführten Experimenten zum größten Anstieg der Apoptoseaktivität. Es lagen 57,1 % der Ereignisse über dem festgelegten Schwellenwert (Abb. 35 C). Es konnte festgestellt werden, dass nach gezielter Infektion mit der Kombination aus *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* + *eta* und dem Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein die größte Apoptoseaktivität zu verzeichnen war, die über den Effekt von *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *eta* (ohne SPA) in Kombination mit dem Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein hinausging (57,1% vs. 28,2 %) (Abb. 35 B und C). Die Kombination aus *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inlAB* + *spa* + *eta* und dem Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein könnte also ein vielversprechender Kandidat für eine Untersuchung *in vivo* sein.

Da die Ki-4-scFv-Fc-Fusionsproteine auf der Oberfläche von *L. monocytogenes*  $\Delta$ *inIAB* + *spa* + *eta* nicht kovalent gebunden sind, besteht die Möglichkeit, dass sie bei einer Infektion *in vivo* durch Antikörper im Serum des infizierten Organismus verdrängt werden. Heisig et al. konnten zeigen, dass der Effekt der gezielten Infektion von Krebszellen mittels dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab und *L. monocytogenes* + *spa* durch die vorherige Behandlung mit murinem Serum sowohl *in vivo* als auch *in vitro* deutlich eingeschränkt war. Nach Behandlung mit Dimethyl-Pimelindiimidat-Dihydrochlorid (DMP), das verwendet wird, um Antikörper kovalent an SPA zu binden, konnte der negative Effekt von murinem Serum *in vitro* und *in vivo* minimiert werden (Heisig et al. 2011). Eine vorherige Behandlung mit DMP zur Stabilisierung der Verbindung von scFv-Fc-Fusionsprotein wäre für zukünftige Untersuchungen *in vivo* wahrscheinlich ebenfalls notwendig.

ETA ist Bestandteil von vielen in der Tumorthherapie etablierten Immunotoxinen. Es gibt Forschungsergebnisse mit gegen diverse Tumorantigene gerichteten Antikörperfragmenten, an die ETA kovalent gebunden ist. Als Beispiele seien hier das hepatozelluläre Karzinom mit dem Zielantigen Glypican-3 (Wang et al. 2017), das Pankreaskarzinom mit dem Zielantigen Mesothelin (Hollevoet et al. 2014) und das Hodgkin Lymphom mit dem Zielantigen CD30 (Klimka et al. 1999) genannt. In der Therapie der therapierefraktären Haarzelleukämie ist mit Moxetumumab Pasudotox ein Fusionsprotein aus einem gegen CD22 gerichteten monoklonalen Antikörper, der mit ETA fusioniert wurde, zur Therapie zugelassen worden (Dhillon 2018).

Die Verwendung von Immunotoxinen auf der Basis monoklonaler Antikörper beinhaltet *in vivo* einige Herausforderungen. Bei der Verwendung von murinen Antikörpern kommt es zur Bildung von Antikörpern durch das Immunsystem, so genannten *human anti mouse antibodies* (HAMA) (Tjandra et al. 1990). Auch die Verwendung chimersierter Antikörper führt zur Ausbildung von *human anti chimeric antibodies* (HACA). Gleiches gilt bei der Verwendung humanisierter Antikörper, bei der durch das Immunsystem so genannte *human anti human antibodies* (HAAA) ausgebildet werden (Hwang und Foote 2005). Auch scFv-basierte Immunotoxine, die auf Basis von ETA hergestellt wurden, führten zur Bildung von neutralisierenden Antikörpern. Bei Tumorerkrankungen, die das Immunsystem kompromittieren, wurden nur in seltenen Fällen neutralisierende Antikörper nachgewiesen (Kreitman et al. 2000). Bei der Therapie solider Tumoren, die Mesothelin auf der Oberfläche exprimieren, wie dem Mesotheliom, Ovarialkarzinom und Pankreaskarzinom konnten bei der Verwendung von einem ETA-basierten scFv-Immunotoxin bereits nach dem ersten Therapiezyklus bei 88% der untersuchten Patienten neutralisierende Antikörper festgestellt werden (Hassan et al. 2007). Der in dieser Arbeit verwendete Ansatz, ETA von *L. monocytogenes* erst produzieren zu

lassen, nachdem die Bakterien das Zytosol von Tumorzellen infiziert haben, könnte eine Immunreaktion gegen das Toxin verhindern. Ob die in dieser Arbeit verwendeten scFv-Fc-Fusionsproteine, die an SPA auf der Oberfläche von *L. monocytogenes* gebunden sind, *in vivo* zu einer Immunreaktion mit der Bildung von HAMA oder anderen neutralisierenden Antikörpern führen, muss in zukünftigen Arbeiten erforscht werden.

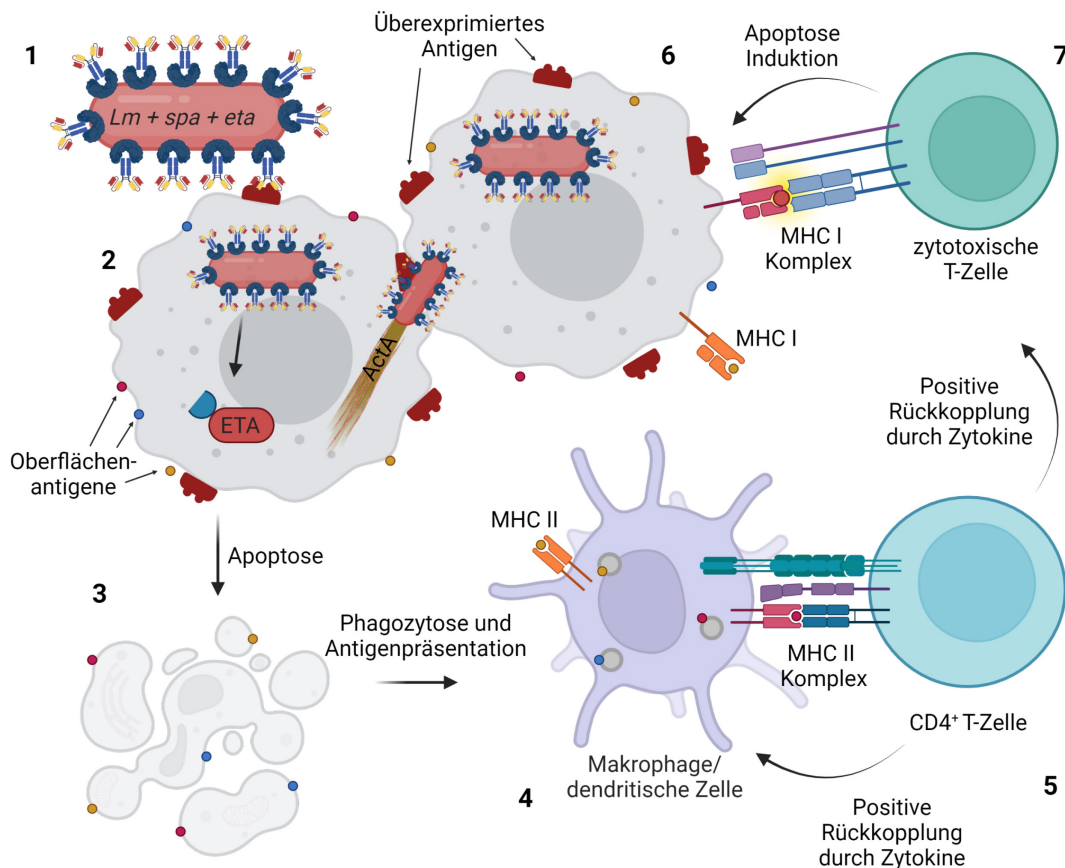
#### **4.4 *L. monocytogenes* in der Therapie maligner Erkrankungen**

Bereits seit Jahren ist die *L. monocytogenes*-vermittelte Therapie maligner Erkrankungen Gegenstand der Forschung. Grundsätzlich werden dabei verschiedene Ansätze verfolgt. Ein Ansatz umfasst eine von *L. monocytogenes* vermittelte Immunantwort gegen maligne Zellen. Hierbei werden tumorspezifische Antigene rekombinant in *L. monocytogenes* exprimiert. Nach der Infektion mit *L. monocytogenes* wird eine Immunantwort des infizierten Organismus ausgelöst. Gemeinsam mit den Antigenen von *L. monocytogenes* wird auch das tumorspezifische Antigen, das zuvor in *L. monocytogenes* kloniert wurde, von Makrophagen und dendritischen Zellen präsentiert. So kommt es zu einer Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen, die gegen die Tumorzellantigene gerichtet sind (Ikonomidis et al. 1994; Pan et al. 1995a; Pan et al. 1995b). Es gibt verschiedene Studien mit unterschiedlichen Tumorentitäten und Antigenen, gegen die eine *L. monocytogenes*-vermittelte Immuntherapie entwickelt wurde. Beispiele für Zielantigene sind HER2 auf Mammakarzinomen und anderen Tumoren (Seavey et al. 2009), das Melanom assoziierte Antigen (Mage) (Kim et al. 2009), Mesothelin auf Pleuramesotheliomen, Pankreaskarzinomen und verschiedenen gastrointestinalen Tumoren (Le et al. 2012), das prostataspezifische Antigen (PSA) (Shahabi et al. 2008) und das humane Papilloma Virus Antigen (HPV-16 E7) (Gunn et al. 2001). Mehrere dieser Immuntherapien befinden sich aktuell in unterschiedlichen Phasen der klinischen Erprobung (Oladejo et al. 2021).

Ein weiterer Ansatz besteht in der direkten, unspezifischen Infektion von malignen Zellen durch *L. monocytogenes*. Nachweislich hält sich *L. monocytogenes* vermehrt im Mikroenvironment von Tumoren auf, ohne dass es gleichzeitig zu einer systemischen Infektion kommt (Yu et al. 2004; Kim et al. 2009). Die Infektion mit *L. monocytogenes* bei Mäusen mit Ovarialkarzinom sorgt für eine Rekrutierung Tumor assoziierter Makrophagen im Umfeld des Tumors. Es konnte eine Schädigung der Tumorzellen durch Stickstoffmonoxid (NO) nachgewiesen werden (Lizotte et al. 2014).

Der in dieser Arbeit untersuchte Ansatz der gezielten Infektion könnte synergistische Effekte dieser beiden Ansätze aufweisen. Nach der gezielten Infektion der Tumorzellen kommt es einerseits durch intrazellulär produziertes ETA zu einer direkten Schädigung der Tumorzellen. Weiterhin kommt es durch die Rekrutierung von Tumor assoziierte

Makrophagen über die Bildung von NO zu einer weiteren Schädigung. In mit *L. monocytogenes* infizierten Zellen kommt es zudem zu einer Antigenpräsentation von Bestandteilen von *L. monocytogenes* durch den *major histocompatibility complex I* (MHC I) (Finelli et al. 1999). Diese Antigenpräsentation sorgt für eine Immunantwort durch CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen. Durch die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch *L. monocytogenes*, denen Antigene von dendritischen Zellen und Makrophagen über *major histocompatibility complex II* (MHC II) präsentiert werden, wird diese Wirkung noch verstärkt. Es konnte gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* bei direkter Infektion von dendritischen Zellen und Makrophagen nur zu einer geringen Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt. Bei einer Präsentation von phagozytierten *L. monocytogenes*-Antigenen durch Makrophagen und dendritische Zellen, die nicht direkt infiziert waren kommt es jedoch zu einer starken Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Skoberne et al. 2002). Bei direkter Infektion der Tumorzellen mit anschließender durch ETA vermittelter Apoptose könnte es also durch die Aktivierung von Makrophagen mit anschließender Antigenpräsentation zu einer CD4<sup>+</sup> T-Zell-vermittelten Verstärkung der Immunreaktion durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen *L. monocytogenes* Antigene führen, die durch infizierte Tumorzellen an MHC I präsentiert werden. Der Ansatz der gezielten Infektion mit anschließender durch ETA vermittelter Toxizität vereint also die Vorteile der direkten Schädigung der Tumorzellen und die Schädigung der Tumorzellen durch eine spezifische Immunreaktion.



**Abbildung 37 Mechanismen einer direkten Schädigung durch Toxizität und einer Schädigung durch eine Immunreaktion in spezifisch mit *L. monocytogenes* infizierten Tumorzellen.** 1: *Lm + spa + eta* wird mit gegen Tumorzellen gerichtete scFv-Fc-Fusionsproteine inkubiert und bindet an die Tumorzellen. 2: Nach der gezielten Infektion kommt es zur Produktion von ETA durch *Lm + spa + eta*. Zusätzlich führt die Bildung von ActA zu einem *cell to cell spread* 3: Die Produktion von ETA induziert die Apoptose der infizierten Zelle. 4: Die Apoptosekörperchen mit den enthaltenen Antigenen von *Lm + spa + eta* werden durch Makrophagen und dendritische Zellen phagozytiert. Antigene von *Lm + spa + eta* werden von Makrophagen und dendritische Zellen an MHC II präsentiert. 5: CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden durch den MHC II Komplex aktiviert und schütten Zytokine aus, die für eine vermehrte Aktivierung zytotoxischer T-Zellen sorgen. 6: Durch *Lm + spa + eta* infizierte Tumorzellen präsentieren *Lm + spa + eta*-Antigene an MHC I auf ihrer Oberfläche. 7: Die an MHC I präsentierten Antigene werden durch zytotoxische T-Zellen mittels MHC I Komplex erkannt und eine Apoptose der Tumorzelle wird induziert. Die Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen wird durch aktivierte CD4<sup>+</sup>-Zellen zusätzlich verstärkt (5). Abbildung erstellt mit BioRender.com.

Die Verwendung von *L. monocytogenes* in der Tumorthherapie, in der Patienten mit lebenden *L. monocytogenes* infiziert werden, birgt die Gefahr des Krankheitsbildes der invasiven Listeriose. Patienten mit malignen Erkrankungen, bei denen das Immunsystem geschwächt ist, sind für die invasive Listeriose anfälliger (Nieman und Lorber 1980). In der Literatur zur Tumorthherapie wurden daher einige der folgenden attenuierten Stämme von *L. monocytogenes* benutzt, um die Gefahr der invasiven Listeriose zu minimieren: Es wurde unter anderem der Stamm *L. monocytogenes* XFL-7 verwendet, der den positiven Regulationsfaktor A (PrfA) nicht exprimiert, um eine Immunotherapie gegen das Zervixkarzinom zu entwickeln. Hierbei wurde das Protein E7 des Humanen Papilloma Virus 16 (HPV-16-E7) mit Listeriolysin O fusioniert (Gunn et al. 2001). Gunn et al. haben für die Herstellung von *Lm-LLO-E7* ein Plasmid in *L. monocytogenes*

XFL-7 kloniert, das ebenfalls für eine abgeschwächte Variante von PrfA kodiert und einen attenuierten Stamm hergestellt (Gunn et al. 2001). PrfA sorgt für eine Expression der wichtigsten Virulenzgene in *L. monocytogenes*, die die Invasion, intrazelluläre Vermehrung und Verbreitung des Bakteriums ermöglichen (Leimeister-Wächter et al. 1990; Leimeister-Wächter et al. 1991; Chakraborty et al. 1992). In einer Phase II Studie mit *Lm*-LLO-E7 konnten bei 98% der untersuchten Patienten mindestens eine unerwünschte Nebenwirkung beobachtet werden. Die häufigsten Nebenwirkungen waren Schüttelfrost (58%), Müdigkeit (54%), Fieber (36%), Kopfschmerzen (36%), und Übelkeit (32%). Bei 19 Patientinnen (38%) waren diese Nebenwirkungen dritten Grades und bei zwei Patientinnen (4%) vierten Grades nach der *Common Terminology Criteria for Adverse Events, Version 3.0* (CTCAE v3.0) (Huh et al. 2020).

Eine weitere Möglichkeit der Attenuierung von *L. monocytogenes* zur Verwendung in der Tumorthherapie ist die Deletion von *actA*. Es konnte gezeigt werden, dass die  $\Delta actA$  Mutante eine unverminderte Immunität auslöste (Starks et al. 2004). Zusätzlich zur  $\Delta actA$  Deletionsmutante zeigte auch eine Deletion von Internalin B eine unverminderte Immunreaktion, bei gleichzeitig verminderter Infektion von Hepatozyten (Brockstedt et al. 2004). Dieser  $\Delta actA \Delta inIB$  Stamm wurde in einer Phase I Studie in der Behandlung von Mesothelin exprimierenden Tumoren verwendet. Es konnte eine Immunisierung ohne schwerwiegende Nebenwirkungen erreicht werden (Le et al. 2012).

Die in dieser Arbeit verwendete Attenuierung mit der Deletion von *inIAB* wurde bezüglich schwerwiegender Nebenwirkungen, die durch eine invasive systemische Infektion bedingt sind, bisher nicht untersucht. Hinsichtlich ActA wäre eine Produktion aufgrund des durch das Protein vermittelten *cell to cell spread* mit der Infektion von benachbarten Tumorzellen (Tilney und Portnoy 1989; Mounier et al. 1990) durchaus wünschenswert. Auch im Hinblick auf die in dieser Arbeit in *L. monocytogenes* zusätzlich eingebrachten Virulenzfaktoren SPA und ETA muss in zukünftigen Untersuchungen *in vivo* eine genaue Beobachtung möglicher infektionsbedingter Nebenwirkungen erfolgen und gegebenenfalls eine zusätzliche Attenuierung der Bakterienstämme durchgeführt werden.

## 5 Zusammenfassung

Die Therapie maligner Erkrankungen ist aufgrund der klinischen Relevanz Gegenstand der Forschung. Ein Therapieansatz ist die Verwendung von Bakterien in der Krebstherapie. *Listeria monocytogenes* ist aufgrund seiner Fähigkeiten viele Zellarten zu infizieren und eine starke adaptive Immunantwort zu erzeugen gut für diese Art von Therapie geeignet. In dieser Arbeit wurde der Therapieansatz verfolgt, Krebszellen gezielt mit *L. monocytogenes* zu infizieren. Hierzu wurde das Protein A (SPA) aus *Staphylococcus aureus* auf der Zellwandoberfläche von *L. monocytogenes* produziert. SPA ist ein Oberflächenprotein, das Antikörper an deren konstanten Fc-Fragment bindet. So bleibt der variable Teil des Antikörpers in der Lage, Antigene zu binden. Anschließend wurden als Antikörperäquivalente rekombinante scFv-Fc-Fusionsproteine verwendet, die aus einem konstanten Fc-Fragment sowie zwei *single chain variable fragments* (scFv) bestehen. Diese gegen auf Krebszellen überexprimierte Oberflächenantigene gerichteten scFv-Fc-Fusionsproteine wurden über SPA auf der Zellwandoberfläche von *L. monocytogenes* gebunden. Anschließend erfolgte die Infektion von zwei verschiedenen Krebszelllinien. CD30 exprimierende Zellen eines Hodgkin Lymphoms (KM-H2) wurden gezielt und unabhängig von Internalin A und B mit *L. monocytogenes* in Kombination mit dem gegen CD30 gerichteten Ki-4-scFv-Fc-Fusionsprotein, das über SPA gebunden wurde, infiziert. Weiterhin erfolgte der Nachweis einer spezifischen, Internalin unabhängigen Infektion von *L. monocytogenes* in einer Zelllinie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms (DMS-273) in Kombination mit SPA und einem gegen ein unbekanntes Zielantigen gerichteten scFv-Fc-Fusionsprotein. Um die spezifisch infizierten Krebszellen zu schädigen, wurde Exotoxin A (ETA) aus *Pseudomonas aeruginosa* in *L. monocytogenes* unter der Kontrolle des intrazellulär stark exprimierten *actA* Promotors produziert. ETA bindet an den eukaryotischen Elongationsfaktor 2, inhibiert so die Proteinbiosynthese und sorgt für eine Apoptose der eukaryotischen Zelle. Der Nachweis einer erhöhten Toxizität der Toxin-produzierenden Bakterien erfolgte in Makrophagen der Zelllinie P388D1. Zudem wurden KM-H2 Zellen mit gezielt mit *L. monocytogenes* infiziert, die sowohl SPA auf ihrer Oberfläche exprimieren als auch ETA sezernieren. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Kombination dieser Bakterien mit dem spezifisch gegen die zu infizierenden Krebszellen gerichteten scFv-Fc-Fusionsprotein zu einer deutlichen Steigerung der Apoptoseaktivität der untersuchten Zellen führt.

## 6 Summary

The therapy of malignant diseases is subject of research due to its clinical relevance. One therapeutic approach is the use of bacteria in cancer therapy. *Listeria monocytogenes* is well suited for this type of therapy due to its ability to infect many cell types and generate a strong adaptive immune response. In this work, the therapeutic approach was to specifically infect cancer cells with *L. monocytogenes*. For this purpose, protein A (SPA) from *Staphylococcus aureus* was produced on the cell wall surface of *L. monocytogenes*. SPA is a surface protein that binds antibodies to their constant Fc-fragment. Thus, the variable part of the antibody remains able to bind antigens. Subsequently, recombinant scFv-Fc fusion proteins consisting of a constant Fc-fragment and two single chain variable fragments (scFv) were used as antibody equivalents. These scFv-Fc fusion proteins directed against surface antigens overexpressed on cancer cells were bound on the cell wall surface of *L. monocytogenes* via SPA. Subsequently, two different cancer cell lines were infected. CD30-expressing cells of a Hodgkin's lymphoma (KM-H2) were infected specifically and independently of internalin A and B with *L. monocytogenes* in combination with the Ki-4 scFv-Fc fusion protein directed against CD30, which was bound via SPA. Furthermore, a specific, internalin-independent infection of *L. monocytogenes* was detected in a cell line of a small cell lung carcinoma (DMS-273) in combination with SPA and a scFv-Fc fusion protein directed against an unknown target antigen on the cells. To damage the specifically infected cancer cells, exotoxin A (ETA) from *Pseudomonas aeruginosa* was produced in *L. monocytogenes* under the control of the intracellularly highly expressed *actA*-promoter. ETA binds to eukaryotic elongation factor 2, thus inhibiting protein biosynthesis and causing apoptosis of the eukaryotic cell. Evidence of increased toxicity of toxin-producing bacteria was obtained in macrophages of the cell line P388D1. In addition, KM-H2 cells were specifically infected with *L. monocytogenes*, which both express SPA on their surface and secrete ETA. It could be demonstrated that the combination of these bacteria with the scFv-Fc fusion protein specifically directed against the cancer cells to be infected, leads to a considerable increase in the apoptosis activity of the cells examined.

**7 Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Infektionszyklus von <i>Listeria monocytogenes</i> ( <i>Lm</i> ).....	5
Abbildung 2: Strategien von <i>L. monocytogenes</i> ( <i>Lm</i> ) in der Therapie maligner Erkrankungen. A: Immunotherapie.....	9
Abbildung 3: Primärstruktur von <i>S. aureus</i> Protein A (SPA).....	12
Abbildung 4: Bindung von <i>S. aureus</i> Protein A an die Peptidoglykanschicht der Zellwand. ....	13
Abbildung 5: Virulenz von <i>S. aureus</i> Protein A.....	15
Abbildung 6: Primärstruktur von <i>P. aeruginosa</i> Exotoxin A (ETA). ....	17
Abbildung 7: Intrazellulärer Signalweg von <i>P. aeruginosa</i> Exotoxin A (ETA).....	19
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Antikörpers der Klasse IgG, eines scFv und eines scFv-Fc-Fusionsproteins. ....	22
Abbildung 9: Plasmidkarte des Vektors pIMK 2.....	25
Abbildung 10: Plasmidkarte des Vektors pERL3.....	25
Abbildung 11: Plasmidkarte des Plasmides pMT-scFv-ETA .....	26
Abbildung 12: Verwendete DNA- und Proteingrößenstandards.....	27
Abbildung 13: Strategie der gezielten Infektion von Krebszellen mit <i>L. monocytogenes</i> ( <i>Lm</i> ) mit Hilfe von <i>S. aureus</i> Protein A (SPA) und einem scFv-Fc-Fusionsprotein (scFv-Fc) sowie der anschließenden Eliminierung der Krebszellen mithilfe von <i>P. aeruginosa</i> Exotoxin A (ETA). ....	66
Abbildung 14: Schematische Darstellung eines scFv-Fc-Fusionsproteins.....	67
Abbildung 15: Plasmidkarte des für <i>spa</i> kodierenden Plasmids pIMK2 + <i>spa</i> . ....	68
Abbildung 16: Nachweis der Amplifikation des <i>spa</i> Inserts im Plasmid pIMK2 + <i>spa</i> . ....	69
Abbildung 17: Nachweis von SPA in der Zellwandproteinfraktion und der Überstandsproteinfraktion von <i>L. monocytogenes</i> + <i>spa</i> und <i>L. monocytogenes</i> $\Delta$ <i>inlAB</i> + <i>spa</i> mittels Western Blot (WB). ....	70
Abbildung 18: Nachweis von SPA auf der Oberfläche von <i>L. monocytogenes</i> + <i>spa</i> und <i>L. monocytogenes</i> $\Delta$ <i>inlAB</i> + <i>spa</i> mittels Durchflusszytometrie. ....	72
Abbildung 19: Wachstumskurven von SPA exprimierenden <i>L. monocytogenes</i> und <i>L. monocytogenes</i> Wildtyp. ....	73
Abbildung 20: Nachweis der Bindung des Ki-4-scFv-Fc an Zellen der Linie KM-H2 mittels Durchflusszytometrie. ....	74
Abbildung 21: <i>L. monocytogenes</i> WT weist höhere Invasionszahlen in eukaryotischen KM-H2 sowie DMS-273 Zellen auf als die Deletionsmutante <i>L. monocytogenes</i> $\Delta$ <i>inlAB</i> . ....	75

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 22: Nachweis der vermehrten Infektion der Kombination von <i>L. monocytogenes</i> + <i>spa</i> mit Ki-4-scFv-Fc in eukaryotischen Zellen der Linie KM-H2. ....	76
Abbildung 23: Nachweis der vermehrten Infektion der Kombination von <i>L. monocytogenes</i> $\Delta$ <i>inlAB</i> + <i>spa</i> mit Ki-4-scFv-Fc in eukaryotischen Zellen der Linie KM-H2 .....	77
Abbildung 24: Verschiedene FKS-Konzentrationen im Infektionsversuch zeigen keinen direkten Zusammenhang mit der Anzahl der intrazellulären <i>L. monocytogenes</i> . ....	78
Abbildung 25: Nachweis der vermehrten Infektion von <i>L. monocytogenes</i> + <i>spa</i> in Kombination mit SCBC-scFv-Fc in DMS-273 Zellen. ....	80
Abbildung 26: Nachweis der gezielten Infektion von Krebszellen der Linien KM-H2 und DMS-273 mit dem jeweils gegen sie gerichteten scFv-Fc in Kombination SPA auf der Oberfläche von <i>L. monocytogenes</i> . ....	81
Abbildung 27: Funktionsweise der Klonierung von <i>P. aeruginosa</i> Exotoxin A in <i>L. monocytogenes</i> . ....	83
Abbildung 28: Plasmidkarte des für <i>eta</i> kodierenden Plasmids pERL3 + <i>eta</i> und Agarosegelelektrophorese der zur Klonierung verwendeten PCR-Produkte. ....	85
Abbildung 29: Basensequenz des klonierten <i>eta</i> . ....	86
Abbildung 30: Nachweis von ETA in der Überstandsproteinfraktion von <i>L. monocytogenes</i> $\Delta$ <i>inlAB</i> + <i>eta</i> mittels Western Blot. ....	87
Abbildung 31: Wachstumskurven von ETA produzierenden <i>L. monocytogenes</i> und den jeweilig korrespondierenden Wildtyp Stämmen .....	88
Abbildung 32: Nachweis der erhöhten Toxizität von ETA produzierenden <i>L. monocytogenes</i> ( <i>Lm</i> ) mittels Lichtmikroskopie. ....	90
Abbildung 33: Nachweis der erhöhten Toxizität von ETA produzierenden <i>L. monocytogenes</i> mittels MTT-Tests. ....	91
Abbildung 34: Vermehrter Nachweis von aktivierter Caspase 3/7 in mit ETA-produzierenden <i>L. monocytogenes</i> infizierten Makrophagen. ....	93
Abbildung 35: Durchflusszytometrie mit Nachweis von Caspase 3/7 in KM-H2 Zellen mit verschiedenen Stämmen von <i>L. monocytogenes</i> in Kombination mit Ki-4-scFv-Fc. ....	94
Abbildung 36. Nur die Kombination aus der verwendeten Zelllinie mit dem jeweiligen spezifischen scFv-Fc-Fusionsprotein führt zu einer gezielten Infektion von <i>L. monocytogenes</i> $\Delta$ <i>inlAB</i> + <i>spa</i> in KM-H2 und DMS-273 Zellen. ....	102
Abbildung 37: Mechanismen einer direkten Schädigung durch Toxizität und einer Schädigung durch eine Immunreaktion in spezifisch mit <i>L. monocytogenes</i> infizierten Tumorzellen. ....	110

**8 Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Liste der verwendeten Bakterienstämme..... 24

Tabelle 2: Liste der verwendeten Zelllinien. .... 24

Tabelle 3: Primer zur Klonierung von pIMK2 + *spa*. .... 26

Tabelle 4: Primer zur Sequenzierung von pIMK2 + *spa*. .... 26

Tabelle 5: Primer zur Klonierung von pERL3 + *eta*. .... 26

Tabelle 6: Primer zur Sequenzierung von pERL3 + *eta*..... 27

Tabelle 7: Liste der verwendeten Antikörper. .... 27

Tabelle 8: Liste der verwendeten Chemikalien..... 28

Tabelle 9: Liste der verwendeten gebrauchsfertigen Chemikalien..... 29

Tabelle 10: Liste der verwendeten Kits. .... 29

Tabelle 11: Liste der verwendeten Chemikalien zur Bakterienkultivierung. .... 30

Tabelle 12: Liste der verwendeten Medien und Puffer zur Kultivierung  
 eukaryontischer Zellen..... 30

Tabelle 13: Liste der verwendeten Antibiotikastammlösungen. .... 32

Tabelle 14: Verwendete Verbrauchsmaterialien. .... 37

Tabelle 15: Verwendete Geräte. .... 38

Tabelle 16: Verwendete Software. .... 40

## 9 Abkürzungsverzeichnis

4T1-HER2	Zelllinie eines Mammakarzinoms mit Expression von HER-2
A549	Zelllinie eines Adenokarzinoms der Lunge
ActA	Aktin-akkumulierender Faktor A
<i>actA</i>	Für ActA kodierendes Gen
<i>actA</i> -Promotor	Promotorsequenz von ActA
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
ARP2/3	<i>actin related protein 2/3</i> Komplex
BHI Medium	Brain Heart Infusion Medium
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CACO-2	Zelllinie eines Kolonkarzinoms
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD30	Ki-1, auf KM-H2 überexprimiertes Antigen
CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	CD4 positive T-Lymphozyten
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	CD8-positive T-Lymphozyten
CD91	$\alpha_2$ -Makroglobulinrezeptor/Low-Density Lipoproteinrezeptor
c-di-AMP	zyklisches Di-Adenosinmonophosphat
CFU	<i>colony forming unit</i>
C <sub>H</sub>	<i>constant heavy chain</i> , konstante Region der schweren Kette
C <sub>L</sub>	<i>constant light chain</i> , konstanter Teil der leichten Kette
c-Met	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>
CMV	Cytomegalievirus
DMP	Dimethyl-Pimelindiimidat-Dihydrochlorid
DMS-273	Zelllinie eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
Domäne Ia	Rezeptor-bindende Domäne von ETA
Domäne Ib + III	ADP-Ribosyltransferasedomäne von ETA
Domäne II	Translokationsdomäne von ETA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , verbesserte Chemilumineszenz
eEF2	Eukaryotischer Elongationsfaktor 2
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>endoplasmatic reticulum associated degradation</i>
ETA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Exotoxin A
<i>eta</i>	Für ETA kodierendes Gen
Fab	<i>antigene-binding fragment</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FKS	fetales Kälberserum
FSC	<i>forward scatter</i>
Fv	<i>variable fragment</i>

## Abkürzungsverzeichnis

GTP	Guanosintriphosphat
GzmB	Granzym B
H <sub>2</sub> O	Wasser
HACA	<i>human anti chimeric antibodies</i>
HAHA	<i>human anti human antibodies</i>
HAMA	<i>human anti mouse antibodies</i>
HEp-2	Zelllinie eines Larynxkarzinoms
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
<i>hly</i> -Signalsequenz	Signalsequenz von LLO
<i>hly</i> -Terminator	Terminatorsequenz von LLO
HPV-16 E7	humanes Papilloma Virus 16 Antigen E7
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
IFN- $\gamma$	Typ II Interferon- $\gamma$
IgA	Immunglobulin A
IgD	Immunglobulin D
IgE	Immunglobulin E
IgG (1-4)	Immunglobulin G (1-4)
IgM	Immunglobulin M
INF- $\beta$	Typ I Interferon- $\beta$
inIA	Internalin A
inIB	Internalin B
kDa	Kilodalton
KDEL-Signalmotiv	Aminosäuremotiv aus Lysin-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Leucin
Ki-1	CD30, auf KM-H2 überexprimiertes Antigen
Ki-4-scFv-Fc	An CD 30 bindendes scFv-Fc-Fusionsprotein
KM-H2	Zelllinie eines Hodgkin-Lymphoms
LB Medium	Luria Bertani Medium
LIPI-1 (-4)	<i>Listeria pathogenicity island 1 (-4)</i>
LLO	Listeriolysin O
<i>Lm</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LPTTG-Signalmotiv	Aminosäuremotiv aus Leucin-Prolin-Threonin-Threonin-Glycin
LPXTG-Motiv	Aminosäuremotiv aus Leucin-Prolin-X-Threonin-Glycin.
Mage	Melanom assoziiertes Antigen
Mbp	Megabasenpaare
MCF-7	Zelllinie eines Mammakarzinoms
MHC I	<i>major histocompatibility complex I</i>
MHC II	<i>major histocompatibility complex II</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPL	Metalloprotease
MQ-H <sub>2</sub> O	Reinstwasser
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid

## Abkürzungsverzeichnis

NP	Influenza-Nukleoprotein
OD	optische Dichte
P388D1	Zelllinie von Makrophagen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFN	Perforine
<i>pHelp</i>	<i>highly expressed Listeria promoter</i>
PI-PLC	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PrfA	Positiver Regulationsfaktor A
PSA	prostata-spezifisches Antigen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rab6	<i>Ras-related in brain 6</i>
Rab9	<i>Ras-related in brain 9</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i> , relative Zentrifugalbeschleunigung, g
RDEL-Signalmotiv	Aminosäuremotiv Arginin-Glutaminsäure-Asparaginsäure-Leucin
Region E, D, A, B, C	<i>Antikörper bindende Domänen von SPA</i>
Region X	Zellwand bindende Domäne von SPA
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCBC	kleinzelliges Bronchialkarzinom
SCBC-scFv-Fc	An DMS-273 bindendes scFv-Fc-Fusionsprotein
scFv	<i>single chain variable fragment</i>
scFv-Fc-Fusionsprotein	Fusionsprotein aus Fc-Fragment und <i>single chain variable fragment</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SecA	Sekretorisches Protein A
SecDF	Sekretorisches Protein D/F
Sec-Transportweg	sekretorischer Transportweg
SOB Medium	Super optimal broth
SOC Medium	Super optimal broth + 20 mM Glucose
SPA	<i>Staphylococcus aureus</i> Protein A
<i>spa</i>	SPA kodierendes Gen
sRNA	kleine, nicht kodierende RNA
SSC	<i>side scatter</i>
<i>Taq</i> -Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> -Polymerase
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
T-Zellen	T-Lymphozyten
ÜNK	Übernachtkultur
UV-Licht	ultraviolettes Licht
VE-H <sub>2</sub> O	Vollentsalztes Wasser

## Abkürzungsverzeichnis

V <sub>H</sub>	schwere Kette des variablen Teils, <i>variable heavy chain</i>
V <sub>L</sub>	Leichte Kette des variablen Teils, <i>variable light chain</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
X <sub>c</sub>	C-terminaler Part von Region X
X <sub>r</sub>	repetitiver Part von Region X
$\Delta InIAB$	Internalin A B-Deletionsmutante

**10 Literaturverzeichnis**

- Abdullah, Zeinab; Schlee, Martin; Roth, Susanne; Mraheil, Mobarak Abu; Barchet, Winfried; Böttcher, Jan et al. (2012): RIG-I detects infection with live *Listeria* by sensing secreted bacterial nucleic acids. In: *The EMBO Journal* 31 (21), S. 4153–4164. DOI: 10.1038/emboj.2012.274.
- Abrahmsén, L.; Moks, T.; Nilsson, B.; Hellman, U.; Uhlén, M. (1985): Analysis of signals for secretion in the staphylococcal protein A gene. In: *The EMBO Journal* 4 (13B), S. 3901–3906.
- Albert, M. L.; Sauter, B.; Bhardwaj, N. (1998): Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. In: *Nature* 392 (6671), S. 86–89. DOI: 10.1038/32183.
- Allured, V. S.; Collier, R. J.; Carroll, S. F.; McKay, D. B. (1986): Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom resolution. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (5), S. 1320–1324. DOI: 10.1073/pnas.83.5.1320.
- Anderson, Amy L.; Sporic, Romeo; Lambris, John; LaRosa, David; Levinson, Arnold I. (2006): Pathogenesis of B-Cell Superantigen-Induced Immune Complex-Mediated Inflammation. In: *Infection and immunity* 74 (2), S. 1196–1203. DOI: 10.1128/IAI.74.2.1196-1203.2006.
- Auerbuch, Victoria; Brockstedt, Dirk G.; Meyer-Morse, Nicole; O'Riordan, Mary; Portnoy, Daniel A. (2004): Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*. In: *The Journal of Experimental Medicine* 200 (4), S. 527–533. DOI: 10.1084/jem.20040976.
- Becker, Samuel; Frankel, Matthew B.; Schneewind, Olaf; Missiakas, Dominique (2014): Release of protein A from the cell wall of *Staphylococcus aureus*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (4), S. 1574–1579. DOI: 10.1073/pnas.1317181111.
- Behring, E. von; Kitasato, Shibasaburo (1890): Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. In: *Dtsch med Wochenschr* 16 (49), S. 1113–1114. DOI: 10.1055/s-0029-1207589.
- Biester, H. E.; Schwarte, L. H. (1939): Studies on *Listerella* Infection in Sheep. In: *Journal of Infectious Diseases* 64 (2), S. 135–144. DOI: 10.1093/infdis/64.2.135.
- Bird, R.; Hardman, K.; Jacobson, J.; Johnson, S.; Kaufman, B.; Lee, S. et al. (1988): Single-chain antigen-binding proteins. In: *Science (New York, N.Y.)* 242 (4877), S. 423–426. DOI: 10.1126/science.3140379.
- Boss, Michael A.; Kenten, John H.; Wood, Clive R.; Emtage, J. Spencer (1984): Assembly of functional antibodies from immunoglobulin heavy and light chains synthesised in *E. coli*. In: *Nucl Acids Res* 12 (9), S. 3791–3806. DOI: 10.1093/nar/12.9.3791.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical biochemistry* 72, S. 248–254. DOI: 10.1006/abio.1976.9999.
- Braun, L.; Ohayon, H.; Cossart, P. (1998): The InIB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. In: *Molecular microbiology* 27 (5), S. 1077–1087. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00750.x.
- Brockstedt, Dirk G.; Giedlin, Martin A.; Leong, Meredith L.; Bahjat, Keith S.; Gao, Yi; Luckett, William et al. (2004): *Listeria*-based cancer vaccines that segregate immunogenicity from toxicity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (38), S. 13832–13837. DOI: 10.1073/pnas.0406035101.

- Brunt, L. M.; Portnoy, D. A.; Unanue, E. R. (1990): Presentation of *Listeria monocytogenes* to CD8+ T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 145 (11), S. 3540–3546.
- Burnette, W. Neal (1981): "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. In: *Analytical biochemistry* 112 (2), S. 195–203. DOI: 10.1016/0003-2697(81)90281-5.
- Camilli, A.; Goldfine, H.; Portnoy, D. A. (1991): *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. In: *The Journal of Experimental Medicine* 173 (3), S. 751–754. DOI: 10.1084/jem.173.3.751.
- Camilli, Andrew; Tilney, Lewis G.; Portnoy, Daniel A. (1993): Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. In: *Molecular microbiology* 8 (1), S. 143–157.
- Carmen, S. (2002): Concepts in antibody phage display. In: *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 1 (2), S. 189–203. DOI: 10.1093/bfgp/1.2.189.
- Carrero, Javier A.; Calderon, Boris; Unanue, Emil R. (2004): Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to *Listeria* infection. In: *The Journal of Experimental Medicine* 200 (4), S. 535–540. DOI: 10.1084/jem.20040769.
- Chakraborty, T.; Leimeister-Wächter, M.; Domann, E.; Hartl, M.; Goebel, W.; Nichterlein, T.; Notermans, S. (1992): Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. In: *Journal of Bacteriology* 174 (2), S. 568–574. DOI: 10.1128/jb.174.2.568-574.1992.
- Chatterjee, Som Subhra; Hossain, Hamid; Otten, Sonja; Kuenne, Carsten; Kuchmina, Katja; Machata, Silke et al. (2006): Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. In: *Infection and immunity* 74 (2), S. 1323–1338. DOI: 10.1128/IAI.74.2.1323-1338.2006.
- Chaudhary, V. K.; Jinno, Y.; FitzGerald, D.; Pastan, I. (1990): *Pseudomonas* exotoxin contains a specific sequence at the carboxyl terminus that is required for cytotoxicity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (1), S. 308–312.
- Chaudhary, V. K.; Queen, C.; Junghans, R. P.; Waldmann, T. A.; FitzGerald, D. J.; Pastan, I. (1989): A recombinant immunotoxin consisting of two antibody variable domains fused to *Pseudomonas* exotoxin. In: *Nature* 339 (6223), S. 394–397. DOI: 10.1038/339394a0.
- Cheung, A. L.; Bayer, A. S.; Peters, J.; Ward, J. I. (1987): Analysis by gel electrophoresis, Western blot, and peptide mapping of protein A heterogeneity in *Staphylococcus aureus* strains. In: *Infection and immunity* 55 (4), S. 843–847.
- Cole, M. B.; Jones, M. V.; Holyoak, C. (1990): The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. In: *The Journal of applied bacteriology* 69 (1), S. 63–72. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb02912.x.
- Coley, W. B. (1893): THE TREATMENT OF MALIGNANT TUMORS BY REPEATED INOCULATIONS OF ERYSIPELAS. In: *The American Journal of the Medical Sciences* 105 (5), S. 487–510. DOI: 10.1097/00000441-189305000-00001.
- Conlan, J. W. (1996): Early pathogenesis of *Listeria monocytogenes* infection in the mouse spleen. In: *Journal of medical microbiology* 44 (4), S. 295–302. DOI: 10.1099/00222615-44-4-295.
- Conlan, J. W.; North, R. J. (1994): Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a gra-

- nulocyte-depleting monoclonal antibody. In: *The Journal of Experimental Medicine* 179 (1), S. 259–268. DOI: 10.1084/jem.179.1.259.
- Cordy, D. R.; Osebold, J. W. (1959): The neuropathogenesis of listeria encephalomyelitis in sheep and mice. In: *Journal of Infectious Diseases* 104 (2), S. 164–173. DOI: 10.1093/infdis/104.2.164.
- Cotter, Paul D.; Draper, Lorraine A.; Lawton, Elaine M.; Daly, Karen M.; Groeger, David S.; Casey, Pat G. et al. (2008): Listeriolysin S, a novel peptide haemolysin associated with a subset of lineage I *Listeria monocytogenes*. In: *PLoS Pathogens* 4 (9), e1000144. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000144.
- Deisenhofer, Johann (1981): Crystallographic refinement and atomic models of a human Fc fragment and its complex with fragment B of protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å resolution. In: *Biochemistry* 20 (9), S. 2361–2370. DOI: 10.1021/bi00512a001.
- Dhanda, Aaron S.; Yu, Connie; Lulic, Katarina T.; Vogl, A. Wayne; Rausch, Valentina; Yang, Diana et al. (2020): *Listeria monocytogenes* Exploits Host Caveolin for Cell-to-Cell Spreading. In: *mBio* 11 (1). DOI: 10.1128/mBio.02857-19.
- Dhar, G.; Faull, K. F.; Schneewind, O. (2000): Anchor structure of cell wall surface proteins in *Listeria monocytogenes*. In: *Biochemistry* 39 (13), S. 3725–3733. DOI: 10.1021/bi992347o.
- Dhillon, Sohita (2018): Moxetumomab Pasudotox: First Global Approval. In: *Drugs* 78 (16), S. 1763–1767. DOI: 10.1007/s40265-018-1000-9.
- Dietrich, G.; Bubert, A.; Gentschev, I.; Sokolovic, Z.; Simm, A.; Catic, A. et al. (1998): Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. In: *Nature Biotechnology* 16 (2), S. 181–185. DOI: 10.1038/nbt0298-181.
- Domann, E.; Wehland, J.; Rohde, M.; Pistor, S.; Hartl, M.; Goebel, W. et al. (1992): A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. In: *The EMBO Journal* 11 (5), S. 1981–1990.
- Domínguez-Bernal, Gustavo; Müller-Altrock, Stefanie; González-Zorn, Bruno; Scotti, Mariela; Herrmann, Petra; Monzó, Héctor J. et al. (2006): A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins. In: *Molecular microbiology* 59 (2), S. 415–432. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04955.x.
- Douglas, C. M.; Guidi-Rontani, C.; Collier, R. J. (1987): Exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa*: active, cloned toxin is secreted into the periplasmic space of *Escherichia coli*. In: *Journal of Bacteriology* 169 (11), S. 4962–4966. DOI: 10.1128/jb.169.11.4962-4966.1987.
- Dramsi, S.; Biswas, I.; Maguin, E.; Braun, L.; Mastroeni, P.; Cossart, P. (1995): Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inlB, a surface protein of the internalin multigene family. In: *Molecular microbiology* 16 (2), S. 251–261. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02297.x.
- Dreier, Jürg; Ruggerone, Paolo (2015): Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Frontiers in microbiology* 6. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00660.
- Durfee, Tim; Nelson, Richard; Baldwin, Schuyler; Plunkett, Guy; Burland, Valerie; Mau, Bob et al. (2008): The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse ▽ †. In: *Journal of Bacteriology* 190 (7), S. 2597–2606. DOI: 10.1128/JB.01695-07.

- Falahatgar, Dianoush; Farajnia, Safar; Zarghami, Nosratollah; Tanomand, Asghar; Khosroshahi, Shiva Ahdi; Akbari, Bahman; Farajnia, Hadi (2018): Expression and Evaluation of HuscFv Antibody -PE40 Immunotoxin for Target Therapy of EGFR-Overexpressing Cancers. In: *Iranian journal of biotechnology* 16 (4), e1743. DOI: 10.21859/ijb.1743.
- Falugi, Fabiana; Kim, Hwan Keun; Missiakas, Dominique M.; Schneewind, Olaf (2013): Role of Protein A in the Evasion of Host Adaptive Immune Responses by *Staphylococcus aureus*. In: *mBio* 4 (5). DOI: 10.1128/mBio.00575-13.
- Filloux, A.; Bally, M.; Ball, G.; Akrim, M.; Tommassen, J.; Lazdunski, A. (1990): Protein secretion in gram-negative bacteria: transport across the outer membrane involves common mechanisms in different bacteria. In: *The EMBO Journal* 9 (13), S. 4323–4329. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07881.x.
- Finelli, A.; Kerksiek, K. M.; Allen, S. E.; Marshall, N.; Mercado, R.; Pilip, I. et al. (1999): MHC class I restricted T cell responses to *Listeria monocytogenes*, an intracellular bacterial pathogen. In: *Immunologic research* 19 (2-3), S. 211–223. DOI: 10.1007/BF02786489.
- FitzGerald, D. J.; Trowbridge, I. S.; Pastan, I.; Willingham, M. C. (1983): Enhancement of toxicity of antitransferrin receptor antibody-Pseudomonas exotoxin conjugates by adenovirus. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (13), S. 4134–4138. DOI: 10.1073/pnas.80.13.4134.
- Forsgren, A.; Quie, P. G. (1974): Effects of staphylococcal protein A on heat labile opsonins. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 112 (3), S. 1177–1180.
- Forsgren, A.; Sjöquist, J. (1966): "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human gamma-globulin. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 97 (6), S. 822–827.
- Fox, Proinnsias G.; Schiavetti, Francesca; Rappuoli, Rino; McLoughlin, Rachel M.; Bagnoli, Fabio (2021): Staphylococcal Protein A Induces Leukocyte Necrosis by Complexing with Human Immunoglobulins. In: *mBio* 12 (3). DOI: 10.1128/mBio.00899-21.
- Frantz, Renate; Teubner, Lisa; Schultze, Tilman; La Pietra, Luigi; Müller, Christin; Gwozdziński, Konrad et al. (2019): The secRNome of *Listeria monocytogenes* Harbors Small Noncoding RNAs That Are Potent Inducers of Beta Interferon. In: *mBio* 10 (5). DOI: 10.1128/mBio.01223-19.
- Gaillard, J. L.; Berche, P.; Mounier, J.; Richard, S.; Sansonetti, P. (1987): In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. In: *Infection and immunity* 55 (11), S. 2822–2829. DOI: 10.1128/iai.55.11.2822-2829.1987.
- Gaillard, J. L.; Jaubert, F.; Berche, P. (1996): The inlAB locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes in vivo. In: *The Journal of Experimental Medicine* 183 (2), S. 359–369. DOI: 10.1084/jem.183.2.359.
- Gaillard, J.-L.; Berche, P.; Frehel, C.; Goulin, E.; Cossart, P. (1991): Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. In: *Cell* 65 (7), S. 1127–1141. DOI: 10.1016/0092-8674(91)90009-N.
- Galloway, D. R.; Hedstrom, R. C.; Pavlovskis, O. R. (1984): Production and characterization of monoclonal antibodies to exotoxin A from *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Infection and immunity* 44 (2), S. 262–267.
- Garandeau, Caroline; Réglie-Poupet, Hélène; Dubail, Iharilalao; Beretti, Jean-Luc; Berche, Patrick; Charbit, Alain (2002): The sortase SrtA of *Listeria monocytogenes* is

- involved in processing of internalin and in virulence. In: *Infection and immunity* 70 (3), S. 1382–1390. DOI: 10.1128/IAI.70.3.1382-1390.2002.
- Gedde, M. M.; Higgins, D. E.; Tilney, L. G.; Portnoy, D. A. (2000): Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. In: *Infection and immunity* 68 (2), S. 999–1003. DOI: 10.1128/IAI.68.2.999-1003.2000.
- Gellin, B. G.; Broome, C. V.; Bibb, W. F.; Weaver, R. E.; Gaventa, S.; Mascola, L. (1991): The epidemiology of listeriosis in the United States--1986. Listeriosis Study Group. In: *American journal of epidemiology* 133 (4), S. 392–401. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a115893.
- Geoffroy, C.; Gaillard, J. L.; Alouf, J. E.; Berche, P. (1987): Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. In: *Infection and immunity* 55 (7), S. 1641–1646. DOI: 10.1128/iai.55.7.1641-1646.1987.
- Gérard-Vincent, Manon; Robert, Viviane; Ball, Geneviève; Bleves, Sophie; Michel, Gérard P. F.; Lazdunski, Andrée; Filloux, Alain (2002): Identification of XcpP domains that confer functionality and specificity to the *Pseudomonas aeruginosa* type II secretion apparatus. In: *Molecular microbiology* 44 (6), S. 1651–1665. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02991.x.
- Glaser, P.; Frangeul, L.; Buchrieser, C.; Rusniok, C.; Amend, A.; Baquero, F. et al. (2001): Comparative genomics of *Listeria* species. In: *Science (New York, N.Y.)* 294 (5543), S. 849–852. DOI: 10.1126/science.1063447.
- Gómez, Marisa I.; Lee, Aram; Reddy, Bharat; Muir, Amanda; Soong, Grace; Pitt, Alyson et al. (2004): *Staphylococcus aureus* protein A induces airway epithelial inflammatory responses by activating TNFR1. In: *Nat Med* 10 (8), S. 842–848. DOI: 10.1038/nm1079.
- Goodyear, Carl S.; Silverman, Gregg J. (2003): Death by a B Cell Superantigen. In: *The Journal of Experimental Medicine* 197 (9), S. 1125–1139. DOI: 10.1084/jem.20020552.
- Gray, G. L.; Smith, D. H.; Baldrige, J. S.; Harkins, R. N.; Vasil, M. L.; Chen, E. Y.; Heyneker, H. L. (1984): Cloning, nucleotide sequence, and expression in *Escherichia coli* of the exotoxin A structural gene of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (9), S. 2645–2649. DOI: 10.1073/pnas.81.9.2645.
- Gstraunthaler, Gerhard; Lindl, Toni (2021): Zell- und Gewebekultur. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. 8. Aufl. 2021. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg S. 99-100. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1901895>.
- Gunn, George R.; Zubair, Abba; Peters, Christian; Pan, Zhen-Kun; Wu, Tzyy-Choou; Paterson, Yvonne (2001): Two *Listeria monocytogenes* Vaccine Vectors That Express Different Molecular Forms of Human Papilloma Virus-16 (HPV-16) E7 Induce Qualitatively Different T Cell Immunity That Correlates with Their Ability to Induce Regression of Established Tumors Immortalized by HPV-16. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (11), S. 6471–6479. DOI: 10.4049/jimmunol.167.11.6471.
- Guss, Bengt; Uhlen, Mathias; Nilsson, Bjorn; Lindberg, Martin; Sjoquist, John; Sjodal, Jorgen (1984): Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. In: *European journal of biochemistry* 138 (2), S. 413–420. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb07931.x.
- Haaf, Andre ten; Pscherer, Sibylle; Fries, Katharina; Barth, Stefan; Gattenlöhner, Stefan; Tur, Mehmet Kemal (2015): Phage display-based on-slide selection of tumor-

- specific antibodies on formalin-fixed paraffin-embedded human tissue biopsies. In: *Immunology letters* 166 (2), S. 65–78. DOI: 10.1016/j.imlet.2015.05.013.
- Halbedel, Sven; Wilking, Hendrik; Holzer, Alexandra; Kleta, Sylvia; Fischer, Martin A.; Lüth, Stefanie et al. (2020): Large Nationwide Outbreak of Invasive Listeriosis Associated with Blood Sausage, Germany, 2018-2019. In: *Emerging infectious diseases* 26 (7), S. 1456–1464. DOI: 10.3201/eid2607.200225.
- Hanahan, Douglas; Jessee, Joel; Bloom, Fredric R. (1991): [4] Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. In: *Bacterial Genetic Systems*, Bd. 204: Elsevier (Methods in Enzymology), S. 63–113.
- Hassan, Raffit; Bullock, Susie; Premkumar, Ahalya; Kreitman, Robert J.; Kindler, Hedy; Willingham, Mark C.; Pastan, Ira (2007): Phase I study of SS1P, a recombinant anti-mesothelin immunotoxin given as a bolus I.V. infusion to patients with mesothelin-expressing mesothelioma, ovarian, and pancreatic cancers. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13 (17), S. 5144–5149. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0869.
- Havell, E. A. (1986): Augmented induction of interferons during *Listeria monocytogenes* infection. In: *Journal of Infectious Diseases* 153 (5), S. 960–969. DOI: 10.1093/infdis/153.5.960.
- Heijne, Gunnar von (1985): Signal sequences. In: *Journal of molecular biology* 184 (1), S. 99–105. DOI: 10.1016/0022-2836(85)90046-4.
- Heisig, Martin; Frentzen, Alexa; Bergmann, Birgit; Galmbacher, Katharina; Gentschev, Ivaylo; Hotz, Christian et al. (2011): Specific antibody-receptor interactions trigger In-*IAB*-independent uptake of *Listeria monocytogenes* into tumor cell lines. In: *BMC microbiology* 11, S. 163. DOI: 10.1186/1471-2180-11-163.
- Hense, Marc; Domann, Eugen; Krusch, Stefan; Wachholz, Petra; Dittmar, Kurt E. J.; Rohde, Manfred et al. (2001): Eukaryotic expression plasmid transfer from the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes* to host cells. In: *Cellular microbiology* 3 (9), S. 599–609. DOI: 10.1046/j.1462-5822.2001.00138.x.
- Hillson, J. L.; Karr, N. S.; Oppliger, I. R.; Mannik, M.; Sasso, E. H. (1993): The structural basis of germline-encoded VH3 immunoglobulin binding to staphylococcal protein A. In: *The Journal of Experimental Medicine* 178 (1), S. 331–336. DOI: 10.1084/jem.178.1.331.
- Hollevoet, Kevin; Mason-Osann, Emily; Liu, Xiu-fen; Imhof-Jung, Sabine; Niederfellner, Gerhard; Pastan, Ira (2014): In vitro and in vivo activity of the low-immunogenic anti-mesothelin immunotoxin RG7787 in pancreatic cancer. In: *Molecular cancer therapeutics* 13 (8), S. 2040–2049. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0089-T.
- Huang, S.; Hendriks, W.; Althage, A.; Hemmi, S.; Bluethmann, H.; Kamijo, R. et al. (1993): Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. In: *Science (New York, N.Y.)* 259 (5102), S. 1742–1745. DOI: 10.1126/science.8456301.
- Huh, Warner K.; Brady, William E.; Fracasso, Paula M.; Dizon, Don S.; Powell, Matthew A.; Monk, Bradley J. et al. (2020): Phase II study of axalimogene filolisbac (ADXS-HPV) for platinum-refractory cervical carcinoma: An NRG oncology/gynecologic oncology group study. In: *Gynecologic oncology* 158 (3), S. 562–569. DOI: 10.1016/j.ygyno.2020.06.493.
- Huston, J. S.; Levinson, D.; Mudgett-Hunter, M.; Tai, M. S.; Novotny, J.; Margolies, M. N. et al. (1988): Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (16), S. 5879–5883. DOI: 10.1073/pnas.85.16.5879.

- Hwang, J.; FitzGerald, D. J.; Adhya, S.; Pastan, I. (1987): Functional domains of Pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in E. coli. In: *Cell* 48 (1), S. 129–136. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90363-1.
- Hwang, William Ying Khee; Foote, Jefferson (2005): Immunogenicity of engineered antibodies. In: *Methods (San Diego, Calif.)* 36 (1), S. 3–10. DOI: 10.1016/j.ymeth.2005.01.001.
- Iglewski, B. H.; Liu, P. V.; Kabat, D. (1977): Mechanism of action of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A: adenosine diphosphate-ribosylation of mammalian elongation factor 2 in vitro and in vivo. In: *Infection and immunity* 15 (1), S. 138–144.
- Ikonomidis, G.; Paterson, Y.; Kos, F. J.; Portnoy, D. A. (1994): Delivery of a viral antigen to the class I processing and presentation pathway by Listeria monocytogenes. In: *The Journal of Experimental Medicine* 180 (6), S. 2209–2218. DOI: 10.1084/jem.180.6.2209.
- Inganäs, M. (1981): Comparison of mechanisms of interaction between protein A from Staphylococcus aureus and human monoclonal IgG, IgA and IgM in relation to the classical FC gamma and the alternative F(ab')<sub>2</sub> epsilon protein A interactions. In: *Scandinavian journal of immunology* 13 (4), S. 343–352. DOI: 10.1111/j.1365-3083.1981.tb00143.x.
- Inocencio, N. M.; Moehring, J. M.; Moehring, T. J. (1994): Furin activates Pseudomonas exotoxin A by specific cleavage in vivo and in vitro. In: *Journal of Biological Chemistry* 269 (50), S. 31831–31835. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)31770-8.
- Jackson, M. E.; Simpson, J. C.; Girod, A.; Pepperkok, R.; Roberts, L. M.; Lord, J. M. (1999): The KDEL retrieval system is exploited by Pseudomonas exotoxin A, but not by Shiga-like toxin-1, during retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. In: *Journal of cell science* 112 (Pt 4), S. 467–475.
- Jenkins, Christopher E.; Swiatonowski, Ania; Issekutz, Andrew C.; Lin, Tong-Jun (2004): Pseudomonas aeruginosa exotoxin A induces human mast cell apoptosis by a caspase-8 and -3-dependent mechanism. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (35), S. 37201–37207. DOI: 10.1074/jbc.M405594200.
- Jensen, Klaus (1958): A normally occurring Staphylococcus antibody in human serum. In: *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 115 (5), 533-9; discussion 540-1. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2007.apm\_731a.x.
- Jonquière, R.; Bierne, H.; Fiedler, F.; Gounon, P.; 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. In: *Molecular microbiology* 34 (5), S. 902–914. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01652.x.
- Jung, Steffen; Unutmaz, Derya; Wong, Phillip; Sano, Gen-Ichiro; los Santos, Kenia de; Sparwasser, Tim et al. (2002): In Vivo Depletion of CD11c+ Dendritic Cells Abrogates Priming of CD8+ T Cells by Exogenous Cell-Associated Antigens. In: *Immunity* 17 (2), S. 211–220. DOI: 10.1016/s1074-7613(02)00365-5.
- Kamesaki, H.; Fukuhara, S.; Tatsumi, E.; Uchino, H.; Yamabe, H.; Miwa, H. et al. (1986): Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. In: *Blood* 68 (1), S. 285–292. DOI: 10.1182/blood.V68.1.285.285.
- Kaufmann, S. H.; Hug, E.; Libero, G. de (1986): Listeria monocytogenes-reactive T lymphocyte clones with cytolytic activity against infected target cells. In: *The Journal of Experimental Medicine* 164 (1), S. 363–368. DOI: 10.1084/jem.164.1.363.
- Kim, Sun Hee; Castro, Francisco; Paterson, Yvonne; Gravekamp, Claudia (2009): High Efficacy of a Listeria -Based Vaccine against Metastatic Breast Cancer Reveals a Dual

- Mode of Action. In: *Cancer research* 69 (14), S. 5860–5866. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4855.
- Kingdon, G. Charles; Sword, C. P. (1970): Effects of *Listeria monocytogenes* Hemolysin on Phagocytic Cells and Lysosomes. In: *Infection and immunity* 1 (4), S. 356–362.
- Klimka, A.; al, et: An anti-CD30 single-chain Fv selected by phage display and fused to Pseudomonas exotoxin A (Ki-4(scFv)-ETA $\alpha$ ) is a potent immunotoxin against a Hodgkin-derived cell line.
- Klimka, A.; Barth, S.; Matthey, B.; Roovers, R. C.; Lemke, H.; Hansen, H. et al. (1999): An anti-CD30 single-chain Fv selected by phage display and fused to Pseudomonas exotoxin A (Ki-4(scFv)-ETA $\alpha$ ) is a potent immunotoxin against a Hodgkin-derived cell line. In: *British journal of cancer* 80 (8), S. 1214–1222. DOI: 10.1038/sj.bjc.6690488.
- Kobayashi, Scott D.; DeLeo, Frank R. (2013): Staphylococcus aureus Protein A Promotes Immune Suppression. In: *mBio* 4 (5). DOI: 10.1128/mBio.00764-13.
- Kocks, C.; Gouin, E.; Tabouret, M.; Berche, P.; Ohayon, H.; Cossart, P. (1992): *Listeria monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. In: *Cell* 68 (3), S. 521–531. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90188-i.
- Köhler, G.; Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. In: *Nature* 256 (5517), S. 495–497. DOI: 10.1038/256495a0.
- Komatsu, N.; Oda, T.; Muramatsu, T. (1998): Involvement of both caspase-like proteases and serine proteases in apoptotic cell death induced by ricin, modeccin, diphtheria toxin, and pseudomonas toxin. In: *Journal of biochemistry* 124 (5), S. 1038–1044. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022197.
- Koopmann, Jens-Oliver; Albring, Jörn; Hüter, Eva; Bulbuc, Nadja; Spee, Pieter; Neefjes, Jacques et al. (2000): Export of Antigenic Peptides from the Endoplasmic Reticulum Intersects with Retrograde Protein Translocation through the Sec61p Channel. In: *Immunity* 13 (1), S. 117–127. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)00013-3.
- Kounnas, M. Z.; Morris, R. E.; Thompson, M. R.; FitzGerald, D. J.; Strickland, D. K.; Saelinger, C. B. (1992): The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. In: *The Journal of biological chemistry* 267 (18), S. 12420–12423.
- Kreitman, R. J.; Pastan, I. (1995): Importance of the glutamate residue of KDEL in increasing the cytotoxicity of Pseudomonas exotoxin derivatives and for increased binding to the KDEL receptor. In: *The Biochemical journal* 307 (Pt 1), S. 29–37. DOI: 10.1042/bj3070029.
- Kreitman, R. J.; Wilson, W. H.; White, J. D.; Stetler-Stevenson, M.; Jaffe, E. S.; Giardina, S. et al. (2000): Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 18 (8), S. 1622–1636. DOI: 10.1200/JCO.2000.18.8.1622.
- Kronvall, Göran; Williams, Ralph C. (1969): Differences in Anti-Protein a Activity among IgG Subgroups. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 103 (4), S. 828–833. Online verfügbar unter <https://www.jimmunol.org/content/103/4/828>.
- Kuhn, M.; Kathariou, S.; Goebel, W. (1988): Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. In: *Infection and immunity* 56 (1), S. 79–82. DOI: 10.1128/iai.56.1.79-82.1988.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0.

- Le, Dung T.; Brockstedt, Dirk G.; Nir-Paz, Ran; Hampl, Johannes; Mathur, Shruti; Nemunaitis, John et al. (2012): A Live-Attenuated *Listeria* Vaccine (ANZ-100) and a Live-Attenuated *Listeria* Vaccine Expressing Mesothelin (CRS-207) for Advanced Cancers: Phase I Studies of Safety and Immune Induction. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18 (3), S. 858–868. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-2121.
- Lebrun, M.; Mengaud, J.; Ohayon, H.; Nato, F.; Cossart, P. (1996): Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. In: *Molecular microbiology* 21 (3), S. 579–592. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1996.tb02566.x.
- Lecuit, M.; Ohayon, H.; Braun, L.; Mengaud, J.; Cossart, P. (1997): Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. In: *Infection and immunity* 65 (12), S. 5309–5319. DOI: 10.1128/iai.65.12.5309-5319.1997.
- Leimeister-Wächter, M.; Domann, E.; Chakraborty, T. (1991): Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. In: *Molecular microbiology* 5 (2), S. 361–366. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1991.tb02117.x.
- Leimeister-Wächter, M.; Haffner, C.; Domann, E.; Goebel, W.; Chakraborty, T. (1990): Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (21), S. 8336–8340. DOI: 10.1073/pnas.87.21.8336.
- Li, M.; Dyda, F.; Benhar, I.; Pastan, I.; Davies, D. R. (1996): Crystal structure of the catalytic domain of *Pseudomonas* exotoxin A complexed with a nicotinamide adenine dinucleotide analog: implications for the activation process and for ADP ribosylation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (14), S. 6902–6906. DOI: 10.1073/pnas.93.14.6902.
- Lindmark, R.; Movitz, J.; Sjöquist, J. (1977): Extracellular protein A from a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. In: *European journal of biochemistry* 74 (3), S. 623–628. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11431.x.
- Lingnau, A.; Domann, E.; Hudel, M.; Bock, M.; Nichterlein, T.; Wehland, J.; Chakraborty, T. (1995): Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inIA and inIB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. In: *Infection and immunity* 63 (10), S. 3896–3903. DOI: 10.1128/iai.63.10.3896-3903.1995.
- Lizotte, Patrick H.; Baird, Jason R.; Stevens, Cynthia A.; Lauer, Peter; Green, William R.; Brockstedt, Dirk G.; Fiering, Steven N. (2014): Attenuated *Listeria monocytogenes* reprograms M2-polarized tumor-associated macrophages in ovarian cancer leading to iNOS-mediated tumor cell lysis. In: *Oncoimmunology* 3, e28926. DOI: 10.4161/onci.28926.
- Lofdahl, S.; Guss, B.; Uhlen, M.; Philipson, L.; Lindberg, M. (1983): Gene for staphylococcal protein A. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (3), S. 697–701. DOI: 10.1073/pnas.80.3.697.
- Lu, H. M.; Mizushima, S.; Lory, S. (1993): A periplasmic intermediate in the extracellular secretion pathway of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. In: *Journal of Bacteriology* 175 (22), S. 7463–7467. DOI: 10.1128/jb.175.22.7463-7467.1993.
- Mackaness, G. B. (1962): Cellular resistance to infection. In: *The Journal of Experimental Medicine* 116, S. 381–406. DOI: 10.1084/jem.116.3.381.

- Maury, Mylène M.; Tsai, Yu-Huan; Charlier, Caroline; Touchon, Marie; Chenal-Francisque, Viviane; Leclercq, Alexandre et al. (2016): Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. In: *Nature genetics* 48 (3), S. 308–313. DOI: 10.1038/ng.3501.
- Mazmanian, S. K.; Liu, G.; Ton-That, H.; Schneewind, O. (1999): Staphylococcus aureus sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. In: *Science (New York, N.Y.)* 285 (5428), S. 760–763. DOI: 10.1126/science.285.5428.760.
- Mazmanian, S. K.; Ton-That, H.; Schneewind, O. (2001): Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. In: *Molecular microbiology* 40 (5), S. 1049–1057. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02411.x.
- McCafferty, John; Griffiths, Andrew D.; Winter, Greg; Chiswell, David J. (1990): Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. In: *Nature* 348 (6301), S. 552–554. DOI: 10.1038/348552a0.
- Mengaud, Jérôme; Ohayon, Hélène; Gounon, Pierre; Mège, René-Marc; Cossart, Pascale (1996): E-Cadherin Is the Receptor for Internalin, a Surface Protein Required for Entry of *L. monocytogenes* into Epithelial Cells. In: *Cell* 84 (6), S. 923–932. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81070-3.
- Michalska, Marta; Wolf, Philipp (2015): *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. In: *Frontiers in microbiology* 6, S. 963. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00963.
- Migula (1894): Über ein neues System der Bakterien, Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe 1:235-238. Karlsruhe: Verlag von Otto Nemnich.
- Moks, T.; Abrahmsén, L.; Nilsson, B.; Hellman, U.; Sjöquist, J.; Uhlén, M. (1986): Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains. In: *European journal of biochemistry* 156 (3), S. 637–643. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1986.tb09625.x.
- Monk, Ian R.; Gahan, Cormac G. M.; Hill, Colin (2008): Tools for functional postgenomic analysis of *Listeria monocytogenes*. In: *Applied and environmental microbiology* 74 (13), S. 3921–3934. DOI: 10.1128/AEM.00314-08.
- Moors, M. A.; Levitt, B.; Youngman, P.; Portnoy, D. A. (1999): Expression of listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*. In: *Infection and immunity* 67 (1), S. 131–139. DOI: 10.1128/IAI.67.1.131-139.1999.
- Morimoto, H.; Bonavida, B. (1992): Diphtheria toxin- and *Pseudomonas* A toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor-alpha. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 149 (6), S. 2089–2094.
- Mounier, J.; Ryter, A.; Coquis-Rondon, M.; Sansonetti, P. J. (1990): Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. In: *Infection and immunity* 58 (4), S. 1048–1058. DOI: 10.1128/iai.58.4.1048-1058.1990.
- Mraheil, Mobarak A.; Billion, André; Mohamed, Walid; Mukherjee, Krishnendu; Kuenne, Carsten; Pischmarov, Jordan et al. (2011): The intracellular sRNA transcriptome of *Listeria monocytogenes* during growth in macrophages. In: *Nucl Acids Res* 39 (10), S. 4235–4248. DOI: 10.1093/nar/gkr033.
- Munro, Sean; Pelham, Hugh R.B. (1987): A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. In: *Cell* 48 (5), S. 899–907. DOI: 10.1016/0092-8674(87)90086-9.
- Murphy, Kenneth; Weaver, Casey (2018): *Janeway Immunologie*, S. 179–184. DOI: 10.1007/978-3-662-56004-4.

- Murray, E. G. D.; Webb, R. A.; Swann, M. B. R. (1926): A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus-*Bacterium monocytogenes* (n.sp.). In: *J. Pathol.* 29 (4), S. 407–439. DOI: 10.1002/path.1700290409.
- Navarre, W. W.; Schneewind, O. (1994): Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. In: *Molecular microbiology* 14 (1), S. 115–121. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb01271.x.
- Nieman, R. E.; Lorber, B. (1980): Listeriosis in adults: a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. In: *Reviews of infectious diseases* 2 (2), S. 207–227. DOI: 10.1093/clinids/2.2.207.
- O'Connell, Ryan M.; Saha, Supriya K.; Vaidya, Sagar A.; Bruhn, Kevin W.; Miranda, Gustavo A.; Zarnegar, Brian et al. (2004): Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. In: *The Journal of Experimental Medicine* 200 (4), S. 437–445. DOI: 10.1084/jem.20040712.
- Ogata, M.; Chaudhary, V. K.; Pastan, I.; FitzGerald, D. J. (1990): Processing of *Pseudomonas* exotoxin by a cellular protease results in the generation of a 37,000-Da toxin fragment that is translocated to the cytosol. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (33), S. 20678–20685.
- Ogston, A. (1880): "On Abscesses". In: *Clinical Infectious Diseases* 6 (1), S. 122–128. DOI: 10.1093/clinids/6.1.122.
- Oladejo, Mariam; Paterson, Yvonne; Wood, Laurence M. (2021): Clinical Experience and Recent Advances in the Development of *Listeria*-Based Tumor Immunotherapies. In: *Front. Immunol.* 12. DOI: 10.3389/fimmu.2021.642316.
- Osborne, Suzanne E.; Sit, Brandon; Shaker, Andrew; Currie, Elissa; Tan, Joël M. J.; van Rijn, Jorik et al. (2017): Type I interferon promotes cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. In: *Cellular microbiology* 19 (3). DOI: 10.1111/cmi.12660.
- Pan, Z. K.; Ikonomidis, G.; Lazenby, A.; Pardoll, D.; Paterson, Y. (1995a): A recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine expressing a model tumour antigen protects mice against lethal tumour cell challenge and causes regression of established tumours. In: *Nat Med* 1 (5), S. 471–477. DOI: 10.1038/nm0595-471.
- Pan, Z. K.; Ikonomidis, G.; Pardoll, D.; Paterson, Y. (1995b): Regression of established tumors in mice mediated by the oral administration of a recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine. In: *Cancer research* 55 (21), S. 4776–4779.
- Parida, S. K.; Domann, E.; Rohde, M.; Müller, S.; Darji, A.; Hain, T. et al. (1998): Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. In: *Molecular microbiology* 28 (1), S. 81–93. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1998.00776.x.
- Park, Simon F.; Stewart, Gordon S.A.B. (1990): High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. In: *Gene* 94 (1), S. 129–132. DOI: 10.1016/0378-1119(90)90479-b.
- Peterson, P. K.; Verhoef, J.; Sabath, L. D.; Quie, P. G. (1977): Effect of protein A on staphylococcal opsonization. In: *Infection and immunity* 15 (3), S. 760–764. DOI: 10.1128/iai.15.3.760-764.1977.
- Pilon, M.; Schekman, R.; Römisch, K. (1997): Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. In: *The EMBO Journal* 16 (15), S. 4540–4548. DOI: 10.1093/emboj/16.15.4540.

Portnoy, D. A.; Jacks, P. S.; Hinrichs, D. J. (1988): Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. In: *The Journal of Experimental Medicine* 167 (4), S. 1459–1471. DOI: 10.1084/jem.167.4.1459.

Poyart, C.; Abachin, E.; Razafimanantsoa, I.; Berche, P. (1993): The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation. In: *Infection and immunity* 61 (4), S. 1576–1580.

Rayamajhi, Manira; Humann, Jessica; Penheiter, Kristi; Andreassen, Karl; Lenz, Laurel L. (2010): Induction of IFN- $\alpha$  enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN- $\gamma$ . In: *The Journal of Experimental Medicine* 207 (2), S. 327–337. DOI: 10.1084/jem.20091746.

Renart, J.; Reiser, J.; Stark, G. R. (1979): Transfer of proteins from gels to diazobenzylloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (7), S. 3116–3120. DOI: 10.1073/pnas.76.7.3116.

Rezaie, Ehsan; Amani, Jafar; Bidmeshki Pour, Ali; Mahmoodzadeh Hosseini, Hamideh (2020): A new scfv-based recombinant immunotoxin against EPHA2-overexpressing breast cancer cells; High in vitro anti-cancer potency. In: *European journal of pharmacology* 870, S. 172912. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.172912.

Riedel, Christian U.; Monk, Ian R.; Casey, Pat G.; Morrissey, David; O'Sullivan, Gerald C.; Tangney, Mark et al. (2007): Improved luciferase tagging system for *Listeria monocytogenes* allows real-time monitoring in vivo and in vitro. In: *Applied and environmental microbiology* 73 (9), S. 3091–3094. DOI: 10.1128/AEM.02940-06.

Rogers, H. W.; Unanue, E. R. (1993): Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. In: *Infection and immunity* 61 (12), S. 5090–5096. DOI: 10.1128/iai.61.12.5090-5096.1993.

Rosenbach, F. J. (1884): *Mikroorganismen bei den Wundinfektionskrankheiten des Menschen*. Wiesbaden: J. F. Bergmann.

Salvatore, Giuliana; Beers, Richard; Margulies, Inger; Kreitman, Robert J.; Pastan, Ira (2002): Improved cytotoxic activity toward cell lines and fresh leukemia cells of a mutant anti-CD22 immunotoxin obtained by antibody phage display. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 8 (4), S. 995–1002.

Sarotra, Pooja; Medhi, Bikash (2016): Use of Bacteria in Cancer Therapy. In: *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer* 209, S. 111–121. DOI: 10.1007/978-3-319-42934-2\_8.

Schafer, R.; Portnoy, D. A.; Brassell, S. A.; Paterson, Y. (1992): Induction of a cellular immune response to a foreign antigen by a recombinant *Listeria monocytogenes* vaccine. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 149 (1), S. 53–59.

Schäfer, Antje; Wolf, Dieter H. (2009): Sec61p is part of the endoplasmic reticulum-associated degradation machinery. In: *The EMBO Journal* 28 (19), S. 2874–2884. DOI: 10.1038/emboj.2009.231.

Schäuble, Nico; Cavalié, Adolfo; Zimmermann, Richard; Jung, Martin (2014): Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A with the human Sec61 complex suppresses passive calcium efflux from the endoplasmic reticulum. In: *Channels* 8 (1), S. 76–83. DOI: 10.4161/chan.26526.

Schindler, C. A.; Schuhardt, V. T. (1964): LYSOSTAPHIN: A NEW BACTERIOLYTIC AGENT FOR THE STAPHYLOCOCCUS. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51, S. 414–421. DOI: 10.1073/pnas.51.3.414.

- Schlech, W. F.; Lavigne, P. M.; Bortolussi, R. A.; Allen, A. C.; Haldane, E. V.; Wort, A. J. et al. (1983): Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. In: *The New England journal of medicine* 308 (4), S. 203–206. DOI: 10.1056/NEJM198301273080407.
- Schneewind, O.; Fowler, A.; Faull, K. F. (1995): Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus*. In: *Science (New York, N.Y.)* 268 (5207), S. 103–106. DOI: 10.1126/science.7701329.
- Schneewind, O.; Mihaylova-Petkov, D.; Model, P. (1993): Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. In: *The EMBO Journal* 12 (12), S. 4803–4811.
- Schneewind, O.; Model, P.; Fischetti, V. A. (1992): Sorting of protein A to the staphylococcal cell wall. In: *Cell* 70 (2), S. 267–281. DOI: 10.1016/0092-8674(92)90101-h.
- Schwab, U.; Stein, H.; Gerdes, J.; Lemke, H.; Kirchner, H.; Schaadt, M.; Diehl, V. (1982): Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. In: *Nature* 299 (5878), S. 65–67. DOI: 10.1038/299065a0.
- Seavey, Matthew M.; Pan, Zhen-Kun; Maciag, Paulo C.; Wallecha, Anu; Rivera, Sandra; Paterson, Yvonne; Shahabi, Vafa (2009): A Novel Human Her-2/neu Chimeric Molecule Expressed by *Listeria monocytogenes* Can Elicit Potent HLA-A2 Restricted CD8-positive T cell Responses and Impact the Growth and Spread of Her-2/neu-positive Breast Tumors. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (3), S. 924–932. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2283.
- Shahabi, Vafa; Reyes-Reyes, Mariela; Wallecha, Anu; Rivera, Sandra; Paterson, Yvonne; Maciag, Paulo (2008): Development of a *Listeria monocytogenes* based vaccine against prostate cancer. In: *Cancer Immunol Immunother* 57 (9), S. 1301–1313. DOI: 10.1007/s00262-008-0463-z.
- Shen, Yang; Naujokas, Monica; Park, Morag; Ireton, Keith (2000): InIB-Dependent Internalization of *Listeria* Is Mediated by the Met Receptor Tyrosine Kinase. In: *Cell* 103 (3), S. 501–510. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)00141-0.
- Siegall, C. B.; Chaudhary, V. K.; FitzGerald, D. J.; Pastan, I. (1989): Functional Analysis of Domains II, Ib, and III of *Pseudomonas* exotoxin. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (24), S. 14256–14261. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)71671-2.
- Sjodahl, J. (1977): Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus*. Arrangement of five regions within the protein, four being highly homologous and Fc-binding. In: *European journal of biochemistry* 73 (2), S. 343–351. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11324.x.
- Sjödahl, J. (1977): Structural studies on the four repetitive Fc-binding regions in protein A from *Staphylococcus aureus*. In: *European journal of biochemistry* 78 (2), S. 471–490. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1977.tb11760.x.
- Sjödahl, Jörgen (1976): Repetitive sequences in protein a from *Staphylococcus aureus* : Three highly homologous Fc-binding regions. In: *FEBS Letters* 67 (1), S. 62–67. DOI: 10.1016/0014-5793(76)80871-X.
- Sjöquist, J.; Movitz, J.; Johansson, I. B.; Hjelm, H. (1972): Localization of protein A in the bacteria. In: *European journal of biochemistry* 30 (1), S. 190–194. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1972.tb02086.x.
- Skerra, A.; Pluckthun, A. (1988): Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. In: *Science (New York, N.Y.)* 240 (4855), S. 1038–1041. DOI: 10.1126/science.3285470.

- Skoberne, Mojca; Schenk, Simone; Hof, Herbert; Geginat, Gernot (2002): Cross-presentation of *Listeria monocytogenes*-derived CD4 T cell epitopes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 169 (3), S. 1410–1418. DOI: 10.4049/jimmunol.169.3.1410.
- Smith, Craig A.; Gruss, Hans-Juergen; Davis, Terri; Anderson, Dirk; Farrah, Terry; Baker, Elizabeth et al. (1993): CD30 antigen, a marker for Hodgkin's lymphoma, is a receptor whose ligand defines an emerging family of cytokines with homology to TNF. In: *Cell* 73 (7), S. 1349–1360. DOI: 10.1016/0092-8674(93)90361-S.
- Smith, Daniel C.; Spooner, Robert A.; Watson, Peter D.; Murray, James L.; Hodge, Thomas W.; Amessou, Mohamed et al. (2006): Internalized *Pseudomonas* exotoxin A can exploit multiple pathways to reach the endoplasmic reticulum. In: *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7 (4), S. 379–393. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2006.00391.x.
- Smith, G. A.; Marquis, H.; Jones, S.; Johnston, N. C.; Portnoy, D. A.; Goldfine, H. (1995): The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. In: *Infection and immunity* 63 (11), S. 4231–4237. DOI: 10.1128/iai.63.11.4231-4237.1995.
- Starks, Holly; Bruhn, Kevin W.; Shen, Hao; Barry, Ronald A.; Dubensky, Thomas W.; Brockstedt, Dirk et al. (2004): *Listeria monocytogenes* as a vaccine vector: virulence attenuation or existing antivector immunity does not diminish therapeutic efficacy. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 173 (1), S. 420–427. DOI: 10.4049/jimmunol.173.1.420.
- Stepanenko, A. A.; Dmitrenko, V. V. (2015): Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. In: *Gene* 574 (2), S. 193–203. DOI: 10.1016/j.gene.2015.08.009.
- Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, A. L.; Mizoguchi, S. D.; Warren, P.; Hickey, M. J. et al. (2000): Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. In: *Nature* 406 (6799), S. 959–964. DOI: 10.1038/35023079.
- Suárez, M.; González-Zorn, B.; Vega, Y.; Chico-Calero, I.; Vázquez-Boland, J. A. (2001): A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. In: *Cellular microbiology* 3 (12), S. 853–864. DOI: 10.1046/j.1462-5822.2001.00160.x.
- Sun, A. N.; Camilli, A.; Portnoy, D. A. (1990): Isolation of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. In: *Infection and immunity* 58 (11), S. 3770–3778.
- Sutherland, May S. Kung; Sanderson, Russell J.; Gordon, Kristine A.; Andreyka, Jamie; Cerveny, Charles G.; Yu, Changpu et al. (2006): Lysosomal trafficking and cysteine protease metabolism confer target-specific cytotoxicity by peptide-linked anti-CD30-auristatin conjugates. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (15), S. 10540–10547. DOI: 10.1074/jbc.M510026200.
- Theuer, C. P.; Buchner, J.; FitzGerald, D.; Pastan, I. (1993): The N-terminal region of the 37-kDa translocated fragment of *Pseudomonas* exotoxin A aborts translocation by promoting its own export after microsomal membrane insertion. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (16), S. 7774–7778. DOI: 10.1073/pnas.90.16.7774.
- Tilney, L. G.; DeRosier, D. J.; Tilney, M. S. (1992a): How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. I. Formation of a tail and how that tail might be involved in movement. In: *The Journal of cell biology* 118 (1), S. 71–81. DOI: 10.1083/jcb.118.1.71.
- Tilney, L. G.; DeRosier, D. J.; Weber, A.; Tilney, M. S. (1992b): How *Listeria* exploits host cell actin to form its own cytoskeleton. II. Nucleation, actin filament polarity, fila-

- ment assembly, and evidence for a pointed end capper. In: *The Journal of cell biology* 118 (1), S. 83–93. DOI: 10.1083/jcb.118.1.83.
- Tilney, L. G.; Portnoy, D. A. (1989): Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. In: *The Journal of cell biology* 109 (4 Pt 1), S. 1597–1608. DOI: 10.1083/jcb.109.4.1597.
- Tjandra, J. J.; Ramadi, L.; McKenzie, I. F. (1990): Development of human anti-murine antibody (HAMA) response in patients. In: *Immunology and cell biology* 68 (Pt 6), S. 367–376. DOI: 10.1038/icb.1990.50.
- Toledo-Arana, Alejandro; Dussurget, Olivier; Nikitas, Georgios; Sesto, Nina; Guet-Revillet, Hélène; Balestrino, Damien et al. (2009): The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. In: *Nature* 459 (7249), S. 950–956. DOI: 10.1038/nature08080.
- Tripp, C. S.; Wolf, S. F.; Unanue, E. R. (1993): Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (8), S. 3725–3729. DOI: 10.1073/pnas.90.8.3725.
- Uhlén, M.; Guss, B.; Nilsson, B.; Gatenbeck, S.; Philipson, L.; Lindberg, M. (1984): Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. A gene evolved through multiple duplications. In: *The Journal of biological chemistry* 259 (3), S. 1695–1702.
- Vadia, Stephen; Arnett, Eusondia; Haghighat, Anne-Cécile; Wilson-Kubalek, Elisabeth M.; Tweten, Rodney K.; Seveau, Stephanie (2011): The pore-forming toxin listeriolysin O mediates a novel entry pathway of *L. monocytogenes* into human hepatocytes. In: *PLoS Pathogens* 7 (11), e1002356. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002356.
- van Pijkeren, Jan Peter; Morrissey, David; Monk, Ian R.; Cronin, Michelle; Rajendran, Simon; O'Sullivan, Gerald C. et al. (2010): A Novel *Listeria monocytogenes* -Based DNA Delivery System for Cancer Gene Therapy. In: *Human Gene Therapy* 21 (4), S. 405–416. DOI: 10.1089/hum.2009.022.
- Vazquez-Boland, J. A.; Kocks, C.; Dramsi, S.; Ohayon, H.; Geoffroy, C.; Mengaud, J.; Cossart, P. (1992): Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. In: *Infection and immunity* 60 (1), S. 219–230. DOI: 10.1128/iai.60.1.219-230.1992.
- Vázquez-Boland, J. A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Domínguez-Bernal, G.; Goebel, W. et al. (2001): *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. In: *Clinical microbiology reviews* 14 (3), S. 584–640. DOI: 10.1128/CMR.14.3.584-640.2001.
- Verwey, W. F. (1940): A TYPE-SPECIFIC ANTIGENIC PROTEIN DERIVED FROM THE STAPHYLOCOCCUS. In: *The Journal of Experimental Medicine* 71 (5), S. 635–644. DOI: 10.1084/jem.71.5.635.
- Voulhoux, R.; Taupiac, M. P.; Czjzek, M.; Beaumelle, B.; Filloux, A. (2000): Influence of deletions within domain II of exotoxin A on its extracellular secretion from *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Journal of Bacteriology* 182 (14), S. 4051–4058. DOI: 10.1128/JB.182.14.4051-4058.2000.
- Walker, S. J.; Archer, P.; Banks, J. G. (1990): Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. In: *The Journal of applied bacteriology* 68 (2), S. 157–162. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb02561.x.

- Wang, Chunguang; Gao, Wei; Feng, Mingqian; Pastan, Ira; Ho, Mitchell (2017): Construction of an immunotoxin, HN3-mPE24, targeting glypican-3 for liver cancer therapy. In: *Oncotarget* 8 (20), S. 32450–32460. DOI: 10.18632/oncotarget.10592.
- Weis, J.; Seeliger, H. P. R. (1975): Incidence of *Listeria monocytogenes* in Nature. In: *Applied Microbiology* 30 (1), S. 29–32.
- Welch, M. D.; Iwamatsu, A.; Mitchison, T. J. (1997): Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. In: *Nature* 385 (6613), S. 265–269. DOI: 10.1038/385265a0.
- Wolf, Philipp; Elsässer-Beile, Ursula (2009): *Pseudomonas* exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 299 (3), S. 161–176. DOI: 10.1016/j.ijmm.2008.08.003.
- Woodward, Joshua J.; Iavarone, Anthony T.; Portnoy, Daniel A. (2010): c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. In: *Science (New York, N.Y.)* 328 (5986), S. 1703–1705. DOI: 10.1126/science.1189801.
- Xu, Chuanhui; Plattel, Wouter; van den Berg, Anke; Rütther, Nele; Huang, Xin; Wang, Miao et al. (2012): Expression of the c-Met oncogene by tumor cells predicts a favorable outcome in classical Hodgkin's lymphoma. In: *Haematologica* 97 (4), S. 572–578. DOI: 10.3324/haematol.2011.056101.
- Yu, Wenqi; Missiakas, Dominique; Schneewind, Olaf (2018): Septal secretion of protein A in *Staphylococcus aureus* requires SecA and lipoteichoic acid synthesis. In: *eLife Sciences Publications, Ltd*, 14.05.2018. Online verfügbar unter <https://elifesciences.org/articles/34092>, zuletzt geprüft am 20.08.2021.
- Yu, Yong A.; Shabahang, Shahrokh; Timiryasova, Tatyana M.; Zhang, Qian; Beltz, Richard; Gentshev, Ivaylo et al. (2004): Visualization of tumors and metastases in live animals with bacteria and vaccinia virus encoding light-emitting proteins. In: *Nat Biotechnol* 22 (3), S. 313–320. DOI: 10.1038/nbt937.

11 Anhang



**Anhang Abbildung 1: Basensequenz des klonierten Proteins SPA.** Basenabfolge des klonierten und sequenzierten *S. aureus* Protein A (*spa*) aus dem klonierten Plasmid pIMK2 + *spa*. Base 1 – 203 entspricht dem Promoter pHelp aus dem Plasmid pIMK2. Base 204 - 311 entspricht der Signalsequenz, die für die Verankerung des Proteins in der Zellwand sorgt. Das erste Codon des endgültigen Proteins beginnt an Base 312. Regionen E, D, A, B und C sind für die Bindung der Antikörper verantwortlich. Region X, beginnend ab Base 1185 sorgt für die Verankerung in der Zellwand. Die kodierende Sequenz endet mit dem Stopcodon TAA an Base 1752. Es ergibt sich eine Gesamtlänge des Proteins von 480 Aminosäuren mit einer errechneten Masse von 52,8 kDa. (Abbildung erstellt mit SnapGene®)

## 12 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Trinad Chakraborty für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit bedanken, in dem von ihm bereitgestellten gut ausgestatteten Labor daran zu arbeiten. Die Ideen und Diskussionen haben wertvolle Denkanstöße zu dieser Arbeit gegeben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Mobarak Abu Mraheil für die kontinuierliche Betreuung dieser Arbeit. Die unermüdliche Unterstützung im Labor, bei vielen Gesprächen und die hilfreichen Korrekturen haben wesentlich zu dieser Arbeit beigetragen.

Auch möchte ich mich bei dem Verein zur Förderung der Krebsforschung in Deutschland für die Bereitstellung von Mitteln zur Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Dem Institut für Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner und insbesondere Dr. Mehmet Kemal Tur und Dr. André Ten Haaf möchte ich für die Bereitstellungen der Antikörperfragmente, der Zelllinien KM-H2 und DMS-273, der Exotoxin A Sequenz und dem Exotoxin A-Antikörper sowie für die anregenden Gespräche danken.

Bei Prof. Dr. Yuelan Yin der Yangzhou University möchte ich mich für die Verwendung der von ihr klonierten Protein A-exprimierenden *L. monocytogenes* bedanken.

Ein großes Dankeschön möchte ich Dr. Lisa Teubner aussprechen, die mich im Labor eingearbeitet hat, und mir während der gesamten Zeit im Labor und insbesondere bei der Klonierung von Exotoxin A mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Die ausführlichen Gespräche, die vielen Lacher und die nette Zusammenarbeit werde ich in guter Erinnerung behalten.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kollegen im Institut für Medizinische Mikrobiologie bedanken: Bei Dr. Renate Frantz und Dr. Luigi La Pietra für die vielen wertvollen Tipps und Diskussionen, bei Nelli Schlarenko für die viele praktische Hilfe im Labor und das gemeinsame Ausplattieren und bei Sylvia Krämer für die Hilfe mit Antikörpern und Western Blots sowie für die Bereitstellung unzähliger Agarplatten. Auch bei Martina Hudel, Christina Gerstmann und Alexandra Amend bedanke ich mich herzlich.

Meiner Mutter Sigrid Macke danke ich für das mühevollen Korrekturlesen. Ein großer Dank geht auch an meinen Freund Chen Cen für die Unterstützung in IT-Fragen.

Meiner Freundin Beatrice Schubotz danke ich für die unermüdliche Unterstützung und dafür, dass sie mir während dieser gesamten Zeit immer den Rücken freigehalten hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern Prof. Dr. Eugen Macke und Sigrid Macke, meiner gesamten Familie und meinen Freunden bedanken, die mich in allen Lebenslagen unterstützt und diese Arbeit so erst möglich gemacht haben. Danke, dass ihr mich immer ermutigt und immer an mich geglaubt habt!

### **13 Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

---

Ort/Datum

---

Unterschrift