

LUIGI LA PIETRA

Regulation des porenbildenden Toxins Listeriolysin O durch die enzymatische Aktivität der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C von *Listeria monocytogenes*



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



edition scientia
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2020

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2020

© 2020 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Regulation des porenbildenden Toxins Listeriolysin O
durch die enzymatische Aktivität der Phosphatidylcholin-
spezifischen Phospholipase C von
*Listeria monocytogenes***

INAUGURALDISSERTATION

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

vorgelegt von

La Pietra, Luigi
aus Frankfurt am Main

Gießen 2020

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. rer. nat. Trinad Chakraborty

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Trinad Chakraborty

Gutachter: PD Dr. med. Ferdinand Hugo

Tag der Disputation: 19.10.2020

Für meine Eltern und Geschwister

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	V
2	Einleitung	1
2.1	Die Gattung <i>Listeria</i>	1
2.2	<i>Listeria monocytogenes</i> - Vom Saprophyten zum intrazellulärem Pathogen	2
2.3	Pathogenese von <i>Listeria monocytogenes</i>	4
2.4	Der Infektionszyklus von <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2.5	Porenbildende Toxine	8
2.5.1	Entdeckung	8
2.5.2	Listeriolysin O von <i>Listeria monocytogenes</i>	9
2.5.2.1	Die Struktur von Cholesterin-abhängigen Cytolysinen anhand von Listeriolysin O	9
2.5.2.2	Die Bindung, Insertion und Oligomerisierung von Cholesterin-abhängigen Cytolysinen in Cholesterin-haltigen biologischen Membranen	11
2.5.2.3	Abwehr- und Reparaturmechanismen der Wirtszelle auf porenbildende Toxine	14
2.5.2.3.1	Schadenserkenkung durch die Wirtszelle	14
2.5.2.3.2	Schadensreparatur durch die Wirtszelle	15
2.5.2.4	Die Funktion von Listeriolysin O	18
2.5.2.4.1	Funktionen von Listeriolysin O in intrazellulären Vakuolen	18
2.5.2.4.2	Funktionen von Listeriolysin O im Cytosol der Wirtszelle	19
2.5.2.4.3	Funktion von Listeriolysin O im extrazellulären Milieu	20
2.5.2.5	Die Regulation von Listeriolysin O	21
2.5.2.5.1	Regulation von Listeriolysin O auf bakterieller Ebene	21
2.5.2.5.2	Regulation von Listeriolysin O durch die Wirtszelle	23
2.6	Bakterielle Phospholipasen	25
2.6.1	Die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase von <i>Listeria monocytogenes</i>	27
2.6.2	Die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase von <i>Listeria monocytogenes</i>	29
2.7	Die Assoziation von Listeriolysin O und Phospholipasen C	30
3	Zielstellung	32
4	Material	34
4.1	Geräteliste	34

4.2	Verbrauchsmaterialien	36
4.3	Chemikalien, Inhibitoren, Enzyme	37
4.4	Antibiotika	38
4.5	Komplettausrüstungen	39
4.6	Antikörper	39
4.6.1	Primärantikörper	39
4.6.2	Sekundärantikörper	40
4.7	Zellkulturmedien und Fetales Kälberserum (FKS)	40
4.8	Lösungen und Puffer	41
5	Methoden	48
5.1	Arbeiten mit Bakterien	48
5.1.1	Verwendete Bakterienstämme	48
5.1.2	Kultivierung von Bakterien	48
5.1.3	Wachstumskurven von Bakterien	49
5.1.4	Bestimmung der Anzahl an Bakterien bei einer optischen Dichte von 1	49
5.1.5	Fraktionierung von bakteriellen Proteinen	50
5.1.6	Vorbereitung von Bakterien für Infektionen	50
5.2	Arbeiten mit eukaryotischen Zellen	51
5.2.1	Verwendete Zelllinien	51
5.2.2	Kultivierung von Zelllinien	51
5.2.3	Passagieren und Subkultivieren von Zellen	51
5.2.4	Lagerung und Auftauen von Zellen	52
5.2.5	Infektion von eukaryotischen Zellen	53
5.2.6	Adhäsion von Bakterien an die zelluläre Oberfläche	53
5.2.7	Behandlung von Zellen mit porenbildenden Toxinen	53
5.2.8	Durchflusszytometrie	54
5.2.8.1	Translokation von Chaperonen zur zellulären Oberfläche	55
5.2.8.2	Detektion der mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies-Produktion	55
5.2.8.3	Detektion der mitochondrialen Fragmentierung	56
5.2.8.4	Detektion der Phosphatidylserin Umlagerung	56
5.2.8.5	Detektion von Apoptose über Caspase 3/7 Aktivierung	57
5.2.9	Calcium Messungen	57
5.2.10	Immunfluoreszenz Mikroskopie	58
5.2.11	Small interfering RNA silencing	58
5.2.12	Bestimmung der hämolytischen Aktivität von porenbildenden Toxinen	59
5.2.12.1	Bestimmung über die Lyse von Erythrozyten	59

5.2.12.2 Bestimmung über Calcein-gefüllte Liposomen	59
5.3 Proteinbiochemische Methoden	60
5.3.1 Arbeiten mit Proteinen	60
5.3.2 Lagerung von Proteinen	60
5.3.3 Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen	60
5.3.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Test	61
5.3.5 SDS-PAGE nach Laemmli	61
5.3.6 Coomassie Brilliant Blau-Färbung	63
5.3.7 Western Blot	63
5.3.8 Immunfärbung und Chemilumineszenz-Nachweis	64
5.3.9 Entfernen von Antikörpern von Trägermembranen ("Strippen")	65
5.4 Herstellung von „erythrocyte ghosts“	65
5.5 Isolierung von Virulenzfaktoren aus <i>Listeria monocytogenes</i>	66
5.5.1 Isolierung von Listeriolysin O aus <i>Listeria monocytogenes</i>	66
5.5.2 Isolierung von Listeriolysin O heterolog aus <i>Escherichia coli</i>	66
5.5.3 Isolierung von Listeriolysin O C484S aus <i>Listeria monocytogenes</i>	66
5.5.4 Isolierung von PlcA und PlcB	66
5.6 Isolierung von Pneumolysin aus <i>Streptococcus pneumoniae</i>	67
5.7 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von PlcB	67
5.7.1 Nachweis über Massenspektroskopie	67
5.7.2 Nachweis über Lecithin Agar Platten	68
5.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	68
5.9 Glykan-Microarray	69
5.10 Fragmentierung von eukaryotischen Zellen in cytosolische- und mitochondriale Fraktion	70
5.11 Methoden der Liposomen-Präparation	70
5.11.1 Präparation von Liposomen	70
5.11.2 Präparation von Calcein-gefüllten Multilamellaren Vesikeln	71
5.11.3 Präparation von Calcein-gefüllten Großen Unilamellaren Vesikeln	72
5.11.4 Präparation von Großen Unilamellaren Vesikeln ohne Calcein	72
5.12 Biophysikalische Methoden	72
5.12.1 Dünnschichtchromatographie Immunfärbung	72
5.12.2 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	73
5.13 Statistische Auswertung	74
5.14 Graphische Abbildungen	74

6	Ergebnisse	75
6.1	Die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C von <i>Listeria monocytogenes</i> ist ein Regulator von Listeriolysin O-abhängigen Zellantworten	75
6.1.1	Die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C ist ein negativer Regulator der Translokation von Endoplasmatischen Retikulum-residenten Chaperonen an die zelluläre Oberfläche	76
6.1.1.1	Translokation von Endoplasmatisches Retikulum-residenten Chaperonen an die zelluläre Oberfläche durch Listeriolysin O	76
6.1.1.2	Putativer Mechanismus der Listeriolysin O-induzierten Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche	79
6.1.1.3	Translokation von weiteren Endoplasmatisches Retikulum-residenten Chaperonen und vom mitochondrialen Chaperon Hsp60	83
6.1.1.4	Die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C von <i>Listeria monocytogenes</i> beeinflusst die Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche	85
6.2	PlcB interferiert mit dem durch Listeriolysin O induzierten und nach innen gerichteten Ca ²⁺ -Strom	88
6.3	PlcB inhibiert Listeriolysin O-induzierte pathologische Veränderungen der mitochondrialen Struktur und Integrität	90
6.4	PlcB antagonisiert die Listeriolysin O-induzierte Apoptose in Abhängigkeit von Cytochrom c und Caspase 3/7	94
6.5	Interaktionsstudien von Listeriolysin O mit wirtseigenen Molekülen	96
6.5.1	Interaktionsstudien von Phosphocholin und Listeriolysin O	97
6.5.1.1	Die hämolytische Aktivität von Listeriolysin O wird durch die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C inhibiert	97
6.5.1.2	Die hämolytische Aktivität von Listeriolysin O wird durch ChoP konzentrationsabhängig inhibiert	98
6.5.1.3	Die inhibierende Eigenschaft von Phosphocholin auf die hämolytische Aktivität von Listeriolysin O ist unabhängig vom Redox-Status des Toxins	102
6.5.1.4	Phosphocholin ist ein direkter Interaktionspartner von Listeriolysin O	103
6.5.2	Interaktionsstudien von Phospholipiden und Listeriolysin O	104
6.5.2.1	Phospholipide modulieren die hämolytische Aktivität von Listeriolysin O	105
6.5.2.2	Phosphatidylcholin ist ein spezifischer Interaktionspartner von Listeriolysin O	106
6.5.3	Interaktionsstudien von Heparin und Listeriolysin O	109
6.6	Wechselwirkung von Phosphocholin und <i>Listeria monocytogenes</i> während der Infektion	115
6.6.1	Phosphocholin verstärkt die Invasion von <i>Listeria monocytogenes</i> in nicht-phagozytierenden Zellen	115

6.6.2	Die Phosphocholin-verstärkte Invasion ist spezifisch für <i>Listeria</i> und die Folge einer verstärkten Adhäsion an die zelluläre Oberfläche	120
6.6.3	Die endogene Produktion von Phosphocholine über die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C führt zu einer reduzierten Invasion von <i>Listeria monocytogenes</i>	122
6.6.4	Der Plättchenaktivierende Faktor-Rezeptor ist ein möglicher Rezeptor für die Phosphocholin-vermittelte Invasion von <i>Listeria monocytogenes</i>	125
7	Diskussion	128
7.1	Die Regulation der Aktivität von Listeriolysin O durch Phosphocholin	128
7.1.1	Funktionsweise der Listeriolysin O Regulation durch die enzymatische Aktivität der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C	129
7.1.2	Modulation der hämolytischen Aktivität von Listeriolysin O durch Phosphocholin	133
7.1.3	Regulation von Listeriolysin O-induzierten zellulären Wirtszellantworten durch die enzymatische Aktivität der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C	135
7.1.3.1	Regulation des mitochondrialen Netzwerks und der Induktion von apoptotischen Vorgängen durch die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C	139
7.1.3.2	Veränderung der Kinetik des Listeriolysin O-induzierten Calcium-Einstroms	142
7.1.3.3	Die Regulation der Translokation von Endoplasmatischen Retikulum-residenten Chaperonen zur zellulären Oberfläche	144
7.2	Die Regulation der Aktivität von Listeriolysin O durch Heparin	147
7.2.1	Putativer Bindungsmechanismus von Heparin an Listeriolysin O	147
7.2.2	Implikationen für die Pathogenese von <i>Listeria monocytogenes</i> durch die Regulation von Listeriolysin O durch Heparin/Heparansulfat	151
7.3	Modulation des Invasionsverhaltens von <i>Listeria monocytogenes</i> durch Phosphocholin	153
8	Zusammenfassung	159
9	Summary	161
10	Abkürzungsverzeichnis	163
11	Abbildungsverzeichnis	166
12	Tabellenverzeichnis	169
13	Literaturverzeichnis	170
14	Publikationen, Patente und Tagungsbeiträge	XI
14.1	Publikationen	XI
14.2	Patente	XI

14.3 Tagungsbeiträge	XII
14.3.1 Posterbeiträge	XII
14.3.2 Vorträge	XII
15 Erklärung zur Dissertation	XIII
16 Danksagung	XIV
17 Lebenslauf	XV

2 Einleitung

2.1 Die Gattung *Listeria*

Im August 2019 kam es in Spanien zu einem Ausbruch der sog. Listeriose, einer Infektionskrankheit, welche durch den pathogenen Erreger *Listeria monocytogenes* ausgelöst wird. Dieser Ausbruch ereignete sich in mehreren Provinzen der spanischen Region Andalusien und war eine Folge des Verzehrs von kontaminierten, verarbeiteten Fleischerzeugnissen. In Folge dieses Ausbruchs kam es bis heute zu 222 bestätigten Fällen von diagnostizierter Listeriose. Unter den Betroffenen befanden sich 38 schwangere Frauen, wovon bei acht Frauen die Infektion zu Fehlgeburten führte. Drei Menschen starben in Folge der Erkrankung (*WHO | Listeriosis– Spain, 2019*). Obwohl diese Zahlen beunruhigend sind und von den spanischen Behörden eine internationale Warnung ausgesprochen wurde, sind Spanien und Europa bis jetzt glimpflich davongekommen. In anderen Teilen der Welt gibt es diesbezüglich große Probleme. So kämpfte Südafrika von 2017 bis 2018 mit einem massiven Listeriose Ausbruch, der sich bis heute zum größten Ausbruch, einer durch lebensmittelübertragenen Krankheit, entwickelt hat. Zwischen dem 01.01.2017 und dem 14.03.2018 wurden 978 Fälle an Listeriose diagnostiziert, wovon bei 674 Patienten die Infektionskrankheit ausbrach. 183 (27%) dieser erkrankten Personen starben. Besonders tragisch hierbei ist, dass es sich bei 42% der Verstorbenen um Neugeborene handelte, welche sich während der Schwangerschaft oder während der Geburt infiziert hatten (*WHO | Listeriosis – South Africa, 2018*). Untersuchungen ergaben, dass der Ausbruch seinen Ursprung in verarbeitetem Fleisch hatte, welches von dem Unternehmen „Enterprise Foods“ vertrieben wurde.

Beide Beispiele verdeutlichen, dass unsere moderne Gesellschaft und die Art und Weise wie unsere Nahrung produziert und verarbeitet wird sehr anfällig gegenüber lebensmittelübertragbaren Krankheiten ist und deshalb stetige Qualitätskontrolle und hohe hygienische Standards verpflichtend sind. Beiden Ausbrüchen ist gemeinsam, dass sie von einer bakteriellen Art ausgelöst wurden, welche zur Gattung *Listeria* gehört.

Bei der Gattung *Listeria* handelt es sich um Gram-positive Bakterien, die zum Phylum der Firmicutes gehören und damit u.a. eng verwandt sind mit den Gattungen *Streptococcus*, *Clostridium*, *Staphylococcus* und *Bacillus*. Die stäbchenförmigen Bakterien, mit einem fakultativ anaeroben Stoffwechsel, haben eine Größe von ca. 0,4 bis 1,5 µm, bilden keine Sporen oder Kapsel aus und sind bei einer Temperatur zwischen 10°C und 25°C begeißelt. *Listeria* kann sich außerdem in einem Temperaturbereich von -0,4°C bis 45°C (Optimale Temperatur: 30°C bis 37°C) vermehren (Vázquez-Boland et al., 2001).

Bis heute sind insgesamt 20 unterschiedliche *Listeria* Arten bekannt. Die meisten Arten sind nicht human-pathogen. Nur *L. monocytogenes* ist als human-pathogen bekannt und kann eine Listeriose auslösen. Eine Ausnahme bildet *L. ivanovii*, welches als tier-pathogen beschrieben ist, aber in seltenen Fällen auch human-pathogen wirken kann (Abbildung 1). Im Fall des Listeriose-Ausbruchs in Südafrika konnte mittels *whole genome sequencing* in 91% der registrierten Fälle *L. monocytogenes* mit dem Sequenztyp ST6 als Ursache identifiziert werden (Allam et al., 2018).

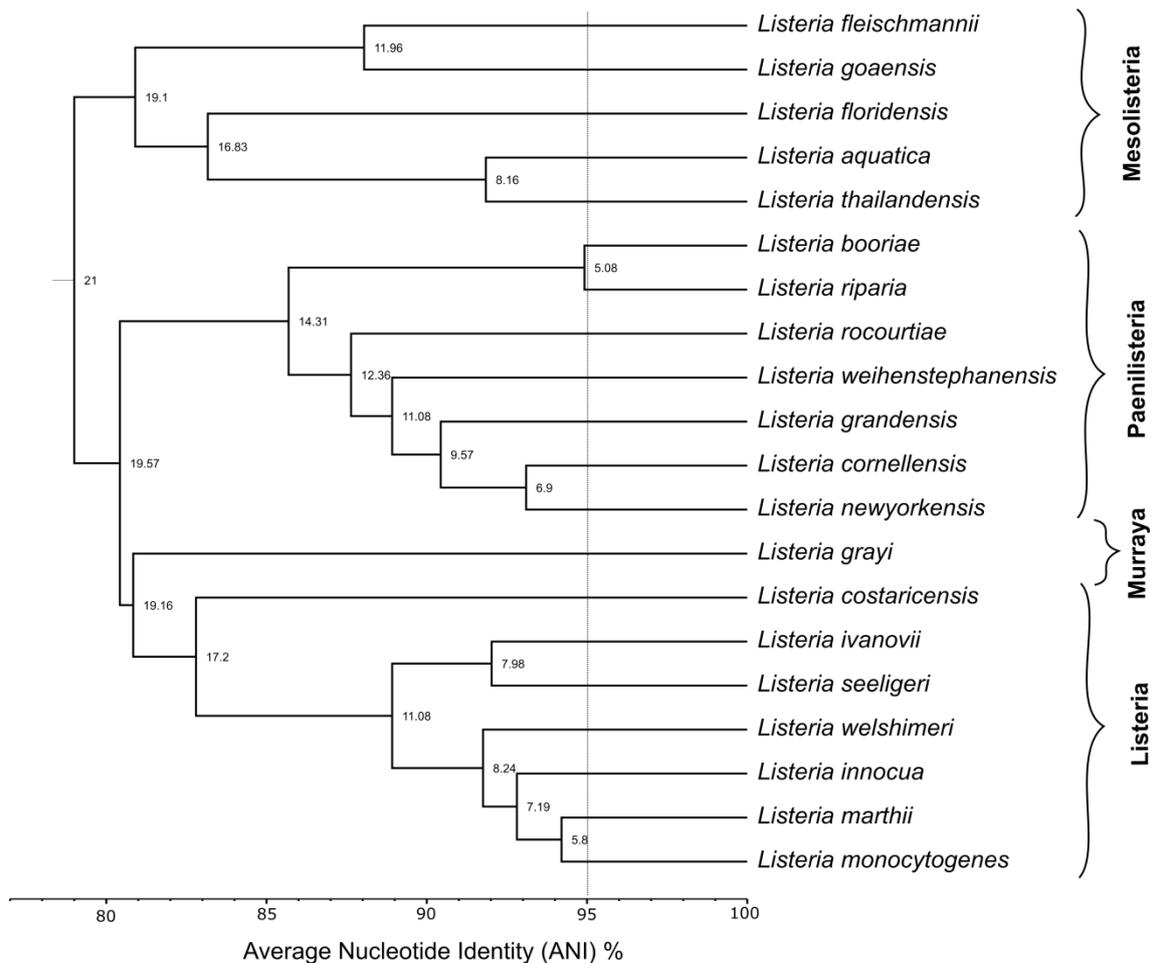


Abbildung 1 Phylogenetischer Stammbaum der Gattung *Listeria* anhand einer Genom-basierten Analyse (Abbildung von Dr. Swapnil Doijad).

2.2 *Listeria monocytogenes* - Vom Saprophyten zum intrazellulärem Pathogen

Die erste Aufzeichnung von *Listeria monocytogenes* geht auf das Jahr 1921 zurück, wo es von Dumont und Cotoni in Frankreich von einem Patienten mit Meningitis isoliert wurde. Seine offizielle Entdeckung datiert jedoch auf das Jahr 1924 zurück, wo es von Murray, Webb und Swann als Ursache für eine septische Krankheit in Kaninchen und

Meerschweinchen identifiziert wurde. Die Veröffentlichung der Daten folgte 1926. Benannt wurde *Listeria* 1940 durch Pirie nach dem britischen Mediziner Joseph Lister (1. Baron Lister), dem Vater und Pionier der antiseptischen Chirurgie. Heute zählt *L. monocytogenes* zu den wichtigsten human-pathogenen Erregern, da die vom Bakterium verursachte Listeriose zu den meldepflichtigen Erkrankungen mit der höchsten Letalität zählt.

Trotz seines gefährlichen Potenzials als human-pathogenes Bakteriums ist *L. monocytogenes* auch ubiquitär in der Umwelt verbreitet und an ein Leben in der Umwelt angepasst. Man findet es insbesondere in der Erde und im Wasser (Weis & Seeliger, 1975). Als das natürliche Habitat wird dabei verrottendes Pflanzenmaterial angesehen, in dem es als Saprophyt lebt. Hierdurch gelangt es in den landwirtschaftlichen Bereich, v.a. in verdorbenen Silagen der Nutztiere, und damit auch in die Nahrungskette des Menschen. Damit ist *Listeria* auch im Kot von Tieren und Menschen anzutreffen und dementsprechend auch in Abwässern. Folglich muss *L. monocytogenes* in der Lage sein zwischen unterschiedlichen Lebensstilen zu wechseln und sich den gegebenen Bedingungen anzupassen. Während sein saprophytischer Lebensstil eine hohe Stressresistenz voraussetzt, steht während seines pathogenen Lebensstils mehr das intrazelluläre Überleben in der Wirtszelle im Vordergrund. Diesen Wechsel vollbringt *L. monocytogenes* durch eine komplexe, transkriptionelle Regulation, die im Wesentlichen auf zwei prominenten regulatorischen Mechanismen beruht (Abbildung 2). Hierbei handelt es sich zum einen um den alternativen und stressinduzierbaren *sigma factor sigma B* (σ^B) und zum anderen um das regulierende Protein PrfA (*positive regulatory factor A*). σ^B spielt eine entscheidende Rolle für den saprophytischen Lebensstil von *L. monocytogenes*, da es Stresstoleranz, Homöostase, Biofilmbildung, Zellwandaufbau, Überleben im gastrointestinalen Trakt und Reaktionen auf Licht mitsteuert. Insgesamt umfasst das Regulon von σ^B ca. 300 Gene (Tiensuu et al., 2019).

Nach der Invasion von *L. monocytogenes* in die Wirtszelle hängt das intrazelluläre Wachstum, Überleben und Motilität des Bakteriums von einer Vielzahl an Virulenzfaktoren ab, deren Expression zeitlich und räumlich koordiniert werden muss. Diese Aufgabe wird von PrfA übernommen. PrfA selbst gehört zur Familie von Crp (*cAMP receptor protein*)/Fnr (*Fumarate nitrate reductase regulator*) bakterieller Transkriptionsfaktoren und hat ein Molekulargewicht von ca. 27 kDa. PrfA bindet dabei als Dimer an eine palindromische Konsensus-Sequenz (TTAACANNTGTTAA), welche als PrfA-Box bezeichnet wird. Diese liegt ca. 40 bp stromaufwärts des Transkriptionsstarts des jeweiligen Gens (Sheehan et al., 1995). Die Wichtigkeit von PrfA für die Virulenz von *L. monocytogenes* wurde dabei durch PrfA-knockout Mutanten gezeigt. Diese zeigten eine, um den log-Faktor drei, erhöhte Letale Dosis 50% (Chakraborty et al., 1992).

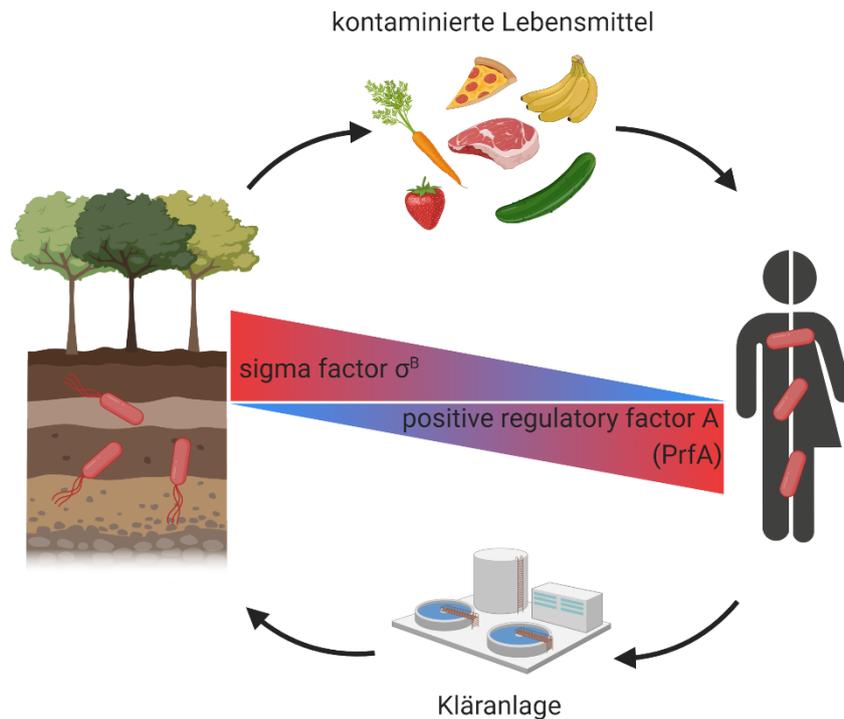


Abbildung 2 Schematische Darstellung des Wechsels von *Listeria monocytogenes* zwischen einem saprophytischem oder intrazellulärem Lebensstil.

2.3 Pathogenese von *Listeria monocytogenes*

Eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* erfolgt in der Regel durch die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln. Hierzu zählen in erster Linie Fertiggerichte, Wurst, nicht-pasteurisierte Milch und die daraus hergestellten Milcherzeugnissen wie z.B. Weichkäse, sowie Pasteten und Salate (Farber & Losos, 1988). Risikogruppen für eine Infektion mit *L. monocytogenes* sind dabei immunsupprimierte Personen, ältere Menschen, sowie schwangere Frauen und neugeborene Kinder. Der Ausbruch einer Listeriose kann sich dabei als Gastroenteritis, Bakteriämie, Encephalitis, Meningitis oder Fehlgeburt manifestieren (Vázquez-Boland et al., 2001). Nach der Aufnahme kontaminierter Lebensmittel gelangt *L. monocytogenes* über den Gastrointestinaltrakt, der primären Eintrittsstelle des Bakteriums, in den Organismus. Dort ist es in der Lage die Darmbarriere zu überwinden. Über die Blutbahn und das lymphatische System gelangt *L. monocytogenes* anschließend zu den Lymphknoten, der Leber und Milz (Abbildung 3). Bakterien, die von residenten Makrophagen im Lebergewebe (Kupffer-Zellen) nicht eliminiert werden, gelangen in die Hepatozyten der Leber, dem primären Replikationsort. *L. monocytogenes* bewegt sich dabei von Zelle zu Zelle, sodass es zu keinem Kontakt mit dem humoralen Immunsystem kommt. Wird keine weitere ausreichend starke Immunantwort ausgelöst, gelangt das Bakterium erneut in den

Blutkreislauf (Bakteriämie). Von dort aus infiziert es weitere Gewebe. Dabei kann es sogar die Blut-Hirn-Schranke überwinden und somit das zentrale Nervensystem infizieren (Meningitis, Enzephalitis). Außerdem ist das Bakterium in der Lage bei schwangeren Frauen die Plazenta-Schranke zu überwinden, was zu Fehlgeburten und Sepsis des neugeborenen Kindes führen kann (Vázquez-Boland et al., 2001).

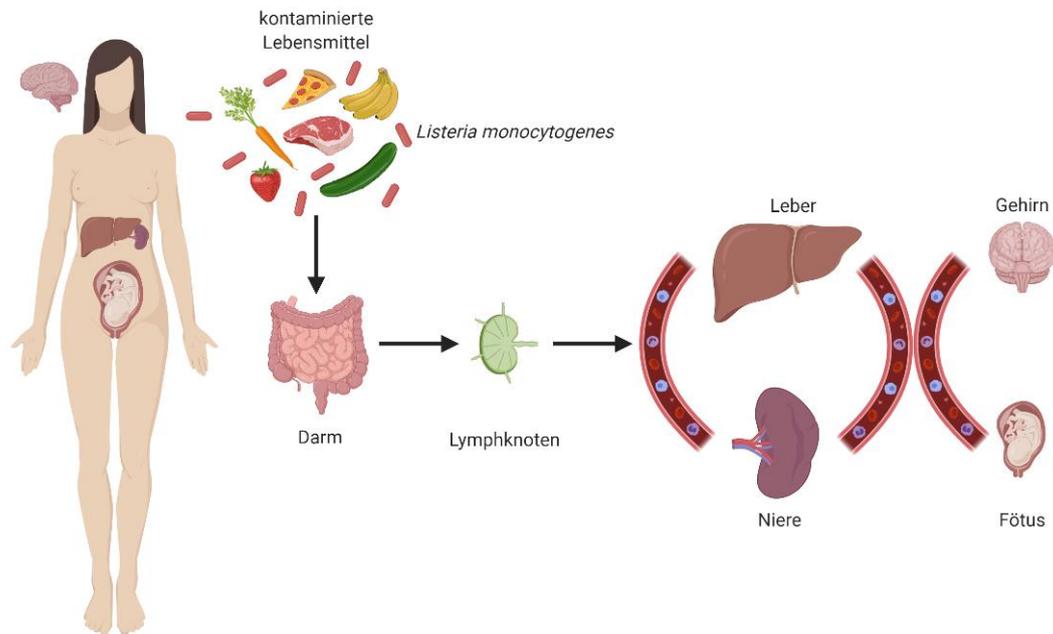


Abbildung 3 Schematische Darstellung der Infektion eines menschlichen Wirtes mit *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* gelangt durch die Aufnahme kontaminierter Lebensmittel in den Gastrointestinaltrakt. Von dort breitet sich das Bakterium über das lymphatische System in den Blutkreislauf aus und befällt innere Organe, wie Leber, Niere oder Gehirn, oder infiziert den Fötus schwangerer Frauen (Abbildung nachgezeichnet von folgender Publikation: (Radoshevich & Cossart, 2018)).

2.4 Der Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes ist in der Lage aktiv in Säugerzellen zu invadieren und sich in diesen zu replizieren. Die Invasion kann dabei sowohl in Makrophagen als auch in nicht-phagozytierenden Zellen stattfinden. Bekannte, nicht-phagozytierende Zelltypen, die von *L. monocytogenes* infiziert werden können, sind Epithelzellen (Gaillard et al., 1987), Fibroblasten (Kuhn et al., 1988), Hepatozyten (Dramsi et al., 1995), Endothelzellen (Drevets et al., 1995) und Nervenzellen (Dramsi et al., 1998).

Der erste Schritt im Invasionsprozess ist dabei die Adhäsion des Bakteriums an die zelluläre Oberfläche der Wirtszelle. Die anschließende Aufnahme des Bakteriums in die Wirtszelle erfolgt bei phagozytierenden Zellen passiv. Bei nicht-phagozytierenden Zellen erfolgt der Invasionsprozess hingegen über einen rezeptorvermittelten Zipper-Mechanismus, bei dem

die Zellmembran der Wirtszelle das Bakterium umschlingt (Mengaud et al., 1996). Mechanistisch betrachtet interagieren Oberflächenliganden des Bakteriums mit Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle. Diese Interaktion führt zu posttranslationellen Modifikationen der Rezeptoren und Rekrutierung von Wirts-Adapterproteinen, welche ihrerseits Aktin rekrutieren, sodass eine Umstrukturierung der Plasmamembran um das Bakterium stattfinden kann. Zu den wichtigsten Oberflächenliganden von *L. monocytogenes* gehören Internalin A (InIA) und Internalin B (InIB). Beide Liganden gehören der Familie der Internaline an, welche durch das Vorhandensein von N-terminalen Leucin-reichen Wiederholungen (*leucin-rich repeats*, LRR) charakterisiert sind (Gaillard et al., 1991). Beide Proteine werden von den PrfA-regulierten Genen *inIA* und *inIB* kodiert, welche sich auf einem einzigen Locus auf dem Genom des Bakteriums befinden. InIA trägt eine C-terminale LPXTG-Domäne, die es dem Protein erlaubt kovalent an der Zellwand des Bakteriums zu binden. Bei genügend räumlicher Nähe zwischen dem Bakterium und der Wirtszelle findet über die LRR-Domäne von InIA eine Interaktion mit dem zellulären Rezeptor Epitheliales (E)-Cadherin statt (Mengaud et al., 1996). *L. monocytogenes* nutzt dabei die Bindung an E-Cadherin zur Umstrukturierung des Cytoskeletts aus, sodass es zu einer Neuordnung der Plasmamembran und damit zur Aufnahme des Bakteriums kommt. Mit dem zweiten wichtigen Invasionsliganden, InIB, ist *L. monocytogenes* in der Lage auch nicht-polarisierte Epithelzellen zu infizieren (Lingnau et al., 1995). Verankert wird InIB nur lose über seine C-terminale Region. Dort befinden sich Glycin-Tryptophan (GW)-Wiederholungen, durch die InIB an Lipoteichonsäuren und Teichonsäuren des Peptidoglykans bindet (Braun et al., 1997; Jonquières et al., 1999). Mit Hilfe seiner N-terminalen LRR-Domäne bindet InIB am Hepatozytenwachstumsfaktorrezeptor (*hepatocyte growth factor receptor*; HGFR) c-Met, was zu einer Rekrutierung von Aktinfilamenten und zu Umlagerungen in der Plasmamembran führt (Shen et al., 2000).

Nach dem Invasionsprozess ist *L. monocytogenes* in einer primären Vakuole eingeschlossen (Gaillard et al., 1987). Da diese mit einem Lysosom verschmelzen kann, muss das Bakterium zügig das Kompartiment verlassen. Deshalb beginnt *L. monocytogenes* innerhalb von 30 Minuten die primäre Vakuole zu perforieren. Hierfür exprimiert das Bakterium das porenbildende Toxin Listeriolysin O (LLO), sowie die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PlcA) (Camilli et al., 1993; Gaillard et al., 1987). Dem Bakterium kommt v.a. das saure Milieu der primären Vakuole zugute, da LLO ein saures pH-Optimum besitzt (Beauregard et al., 1997; De Chastellier & Berche, 1994). Sobald sich *L. monocytogenes* nun im Cytosol befindet, beginnt es mit der Replikation. Dabei hat es eine Verdopplungszeit von ca. einer Stunde (Gaillard et al., 1987). Zur intrazellulären Fortbewegung rekrutiert *L. monocytogenes* wirtseigene Aktinfilamente an die bakterielle Oberfläche und bildet einen „Kometenschweif“ (*comet tail*) aus (Tilney & Portnoy, 1989). Hierfür ist der Virulenzfaktor

ActA verantwortlich (Domann et al., 1992; Kocks et al., 1992). Durch die so hinzugewonnene intrazelluläre Beweglichkeit kann sich *L. monocytogenes* auf benachbarte Zellen ausbreiten. Dieser Vorgang wird als Zell-zu-Zell Ausbreitung (*cell-to-cell spread*) bezeichnet. Dabei gelangt das Bakterium über ungerichtete Bewegung zur Zellmembran der Wirtszelle und drückt diese nach außen. Die so entstandenen Pseudopodien-ähnlichen Strukturen ragen in benachbarte Zellen hinein und werden über Phagozytose in diese aufgenommen. Hierdurch bildet sich eine sekundäre Vakuole, in der *L. monocytogenes* erneut eingefangen ist. Anders als die primäre Vakuole wird die sekundäre Vakuole nun von zwei Membranen umschlossen. Mit Hilfe der Virulenzfaktoren LLO, PlcA und der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (PlcB) kann das Bakterium auch aus dieser Vakuole entkommen und erneut in das Cytosol der Wirtszelle gelangen (Gedde et al., 2000; Smith et al., 1995; Vázquez-Boland et al., 1992). Auf diese Weise kann *L. monocytogenes* vom Immunsystem der Wirtszelle nicht detektiert werden und auch sehr enge zelluläre Barrieren, wie die Darmbarriere, die Blut-Hirn-Schranke oder die Plazenta-Schranke, überwinden (Vázquez-Boland et al., 2001).

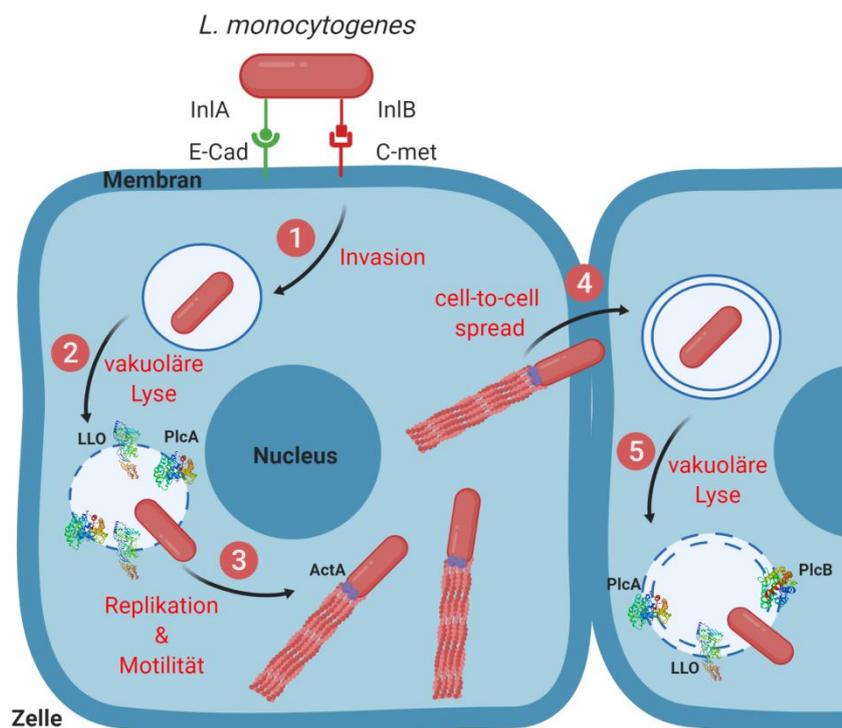


Abbildung 4 Schematische Darstellung des Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes* in nicht-phagozytierenden Zellen. *L. monocytogenes* exprimiert die Oberflächenproteine InlA und InlB. Diese binden an ihre Oberflächenrezeptoren E-Cadherin (E-Cad) bzw. C-met und induzieren hierdurch einen Invasionsprozess über einen Rezeptor-vermittelten Zipper-Mechanismus, bei dem die Zellmembran der Wirtszelle das Bakterium umschlingt (1). Nach Internalisierung ist das Bakterium in einer primären Vakuole gefangen. Durch die Expression der Virulenzfaktoren LLO und PlcA findet eine Lyse der Vakuole statt, sodass eine Freisetzung des Bakteriums in das Wirtszell-Cytosol

ermöglicht wird (2). Die anschließende Expression des Virulenzfaktors ActA ermöglicht dem Bakterium durch die Rekrutierung von Wirtszell-Aktinfilamenten und der Ausbildung eines „Kometenschweifs“ intrazelluläre Motilität und Ausbreitung auf benachbarte Zellen (4). Dort wird, durch Expression der Virulenzfaktoren LLO, PlcA und PlcB, die Freisetzung aus sekundären Vakuolen ermöglicht (5).

2.5 Porenbildende Toxine

2.5.1 Entdeckung

Porenbildende Toxine (*pore forming toxins*, PFT) lassen sich aufgrund ihrer Struktur in α -PFT und β -PFT unterteilen. Während α -PFTs aus helikalen Hairpin-Strukturen aufgebaut sind, bestehen β -PFTs hauptsächlich aus β -Faltblatt-Strukturen (Gouaux, 1997). Innerhalb der β -PFT bildet die Familie der Cholesterin-abhängigen Cytolysine (*cholesterol-dependent cytolysin*, CDC) die größte Gruppe. Weitere Familien sind die Hämolyisin- und Aerolysin-Familien (Peraro & Van Der Goot, 2016). Ihre Entdeckung geht auf die Inkubation von Erythrozyten mit Überständen von bakteriellen Kulturen zurück und einer damit verbundenen Hämolyse. Auch die Beobachtung der Bildung von hämolytischen Zonen um bakterielle Kolonien auf Blutagarplatten gilt als Grundlage der Entdeckung von CDCs. Die erste schriftlich festgehaltene Beobachtung diesbezüglich geht auf Paul Ehrlich 1898 zurück, welcher von der Anwesenheit eines hämolytischen Faktors im bakteriellen Überstand von *Clostridium tetani* berichtete. Tetanolysin (TLY) war damit das erste entdeckte CDC. 1902 folgte anschließend von Marmorek die erste Beschreibung von Streptolysin O (SLO) aus *Streptococcus pyogenes* (Marmorek, 1902) und Pneumolysin (PLY) aus *Streptococcus pneumoniae* von Tizzoni und Panichi (Prevot, 1950). In den nachfolgenden Jahren wurden anschließend eine Vielzahl an CDCs entdeckt. Bis heute wurden in Gram-positiven Bakterien 33 unterschiedliche CDCs identifiziert (Heuck et al., 2010; Rosado et al., 2008) (Tabelle 1). Sie alle teilen sich dabei eine Sequenzidentität von 40-70%, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sie ähnliche Tertiärstrukturen ausbilden (Tveten et al., 2001). Daneben wurden in den letzten Jahren ebenfalls Vertreter der CDC-Toxinfamilie innerhalb der Gruppe Gram-negativer Bakterien gefunden. Hierzu zählen Desulfolysin (DLY) aus *Desulfobulbus propionicus*, Enterolysin (ELY) aus *Enterobacter lignolyticus* und Oxalolysin (OLY) aus *Oxalobacter formigenes* (Hotze et al., 2013).

Tabelle 1 Mitglieder der CDC-Toxinfamilie.

Gattung	Spezies	Toxin	Abkürzung
<i>Arcanobacterium</i>	<i>A. pyogenes</i>	Pyolysin	PLO
<i>Bacillus</i>	<i>B. cereus</i>	Cereolysin	CLO
	<i>B. thuringensis</i>	Thuringiolysin	TLO
	<i>B. anthracis</i>	Anthrolysin	ALO
	<i>B. sphaericus</i>	Sphaericolysin	SPH
	<i>B. weihenstephanensis</i>	Weihenstephansilysin	WLO
<i>Brevibacillus</i>	<i>B. laterosporus</i>	Laterosporolysin	LSL
	<i>B. brevis</i>	Brevilysin	BVL
<i>Clostridium</i>	<i>C. chauvoei</i>	Chauveolysin	CVL
	<i>C. botulinum</i>	Botulinolysin	BLY
	<i>C. butyricum</i>	Butyriculysin	BRY
	<i>C. tetani</i>	Tetanolysin	TLY
	<i>C. bifermentans</i>	Bifermentolysin	BFL
	<i>C. histolyticum</i>	Histolyticolysin O	HTL
	<i>C. novyi A (oedematiens)</i>	Novyilysin (NVL)	NVL
	<i>C. perfringens</i>	Perfringolysin O	PFO
	<i>C. septicum</i>	Septicolysin O	SPL
	<i>C. sordellii</i>	Sordellilysin	SDL
<i>Desulfobulbus</i>	<i>D. propionicus</i>	Desulfolysin	DLY
<i>Enterobacter</i>	<i>E. lignolyticus</i>	Enterolysin	ELY
<i>Gardnerella</i>	<i>G. vaginalis</i>	Vaginolysin	VLY
<i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Listeriolysin O	LLO
	<i>L. ivanovii</i>	Ivanolysin O	ILO
	<i>L. seeligeri</i>	Seeligerolysin O	LSO
<i>Lysinibacillus</i>	<i>L. sphaericus</i>	Sphaericolysin	SPH
<i>Oxalobacter</i>	<i>O. formigenes</i>	Oxalolysin	OLY
<i>Paenibacillus</i>	<i>P. alvei</i>	Alveolysin	ALV
<i>Streptococcus</i>	<i>S. canis</i>	Streptolysin O	SLO
	<i>S. dysgalactiae subsp. equisimilis</i>	Streptolysin O	SLO
	<i>S. intermedius</i>	Intermedilysin	ILY
	<i>S. mitis</i>	Mitilysin	MLY
		Lectinolysin	LLY
	<i>S. pneumoniae</i>	Pneumolysin	PLY
	<i>S. pseudopneumoniae</i>	Pseudopneumolysin	PSY
	<i>S. pyogenes</i>	Streptolysin O	SLO
<i>S. suis</i>	Suilysin	SLY	

2.5.2 Listeriolysin O von *Listeria monocytogenes*

2.5.2.1 Die Struktur von Cholesterin-abhängigen Cytolysinen anhand von Listeriolysin O

Listeriolysin O (LLO) gehört zu den wichtigsten Virulenzfaktoren von *Listeria monocytogenes* und wird den porenbildenden Toxinen (PFT) zugeordnet. Die ersten schriftlich

festgehaltenen Arbeiten zu LLO gehen auf das Jahr 1941 von Harvey und Faber zurück, wo zum ersten Mal die Produktion eines löslichen Hämolytins in *L. monocytogenes* beschrieben wurde (Harvey & Faber, 1941). Die ersten biochemischen Identifizierungen und Reinigungen von LLO erfolgten anschließend 1963-1964 (Jenkins et al., 1964; Njoku-Obi et al., 1963). Den endgültigen Beweis erbrachte Geoffroy 1987, indem er zeigte, dass das Hämolytin aus *L. monocytogenes* ein SLO-ähnliches Toxin ist und somit den CDCs angehört (Geoffroy et al., 1987). Die erste Kristallstruktur eines CDCs wurde anschließend 1998 anhand von PFO entschlüsselt (Rossjohn et al., 1997). Die Kristallstruktur von LLO wurde ebenfalls entschlüsselt (Köster et al., 2014). Diese zeigt, wie erwartet, große Ähnlichkeiten mit den Kristallstrukturen von PFO (Rossjohn et al., 1997), ALO (Bourdeau et al., 2009), ILY (Polekhina et al., 2005), SLY (Xu et al., 2010) und SLO (Feil et al., 2014) (Tabelle 1).

LLO kann in vier verschiedenen Domänen unterteilt werden, welche als Domäne 1-4 (D1-D4) bezeichnet werden. Die Domäne D1 hat dabei eine α/β -Struktur, bestehend aus einem fünfsträngigen β -Faltblatt, welches von sechs α -Helices umgeben wird. Die Domäne D2 besteht hingegen aus vier β -Strängen, welche ein drei-strängiges antiparalleles β -Faltblatt ausbilden. Sie dient als Verbindungsglied zwischen D1 und D3. Die Domäne 3 hat, in ähnlicher Weise wie D1, ein zentrales β -Faltblatt, welches aus fünf antiparallel angeordneten Strängen besteht und von sechs α -Helices in einer $\alpha/\beta/\alpha$ Anordnung umgeben wird. Zuletzt besteht die Domäne D4 aus zwei vier-strängigen β -Faltblättern, welche eine kompakte Struktur ausbilden, die – anders als D1-D3 – nicht mit den anderen Domänen ineinander verschlungen ist (Köster et al., 2014) (Abbildung 5 A). Als Mitglied der CDCs bindet LLO an Cholesterin-haltige Membranen. Die Bindung erfolgt dabei über ein Cholesterin Erkennungs- und Bindemotiv, bestehend aus drei Threonin/Leucin-Paaren, welche Schleifenstrukturen ausbilden, sowie dem stark konservierten Undecapeptid (ECTGLAWEWWR) (Dowd & Tweten, 2012). Der N-Terminus des Toxins trägt, neben einem Signalpeptid, welches für die Sekretion des Toxins über das Sec-Sekretionssystem verantwortlich ist (Trost et al., 2005), auch eine PEST (Prolin, Glutamat, Serin, Threonin)-ähnliche Sequenz. Eine solche Sequenz wurde ursprünglich in eukaryotischen Proteinen mit kurzen Halbwertszeiten gefunden, sodass ihr eine Rolle in der Degradation von Proteinen zugesprochen wird (Rechsteiner & Rogers, 1996). Die PEST-Sequenz befindet sich dabei innerhalb einer Polyprolin Type II-Helix Domäne (PPII Helix), welche eine mögliche Rolle für die Protein-Protein-Interaktion spielt (Köster et al., 2014). Das Tragen einer solchen PEST-ähnlichen Sequenz macht LLO einzigartig unter den CDCs. Diese Sequenz führt bei LLO jedoch nicht zu proteasomaler Degradation, sondern dient der Kontrolle der LLO Produktion im Cytosol (Schnupf et al., 2006).

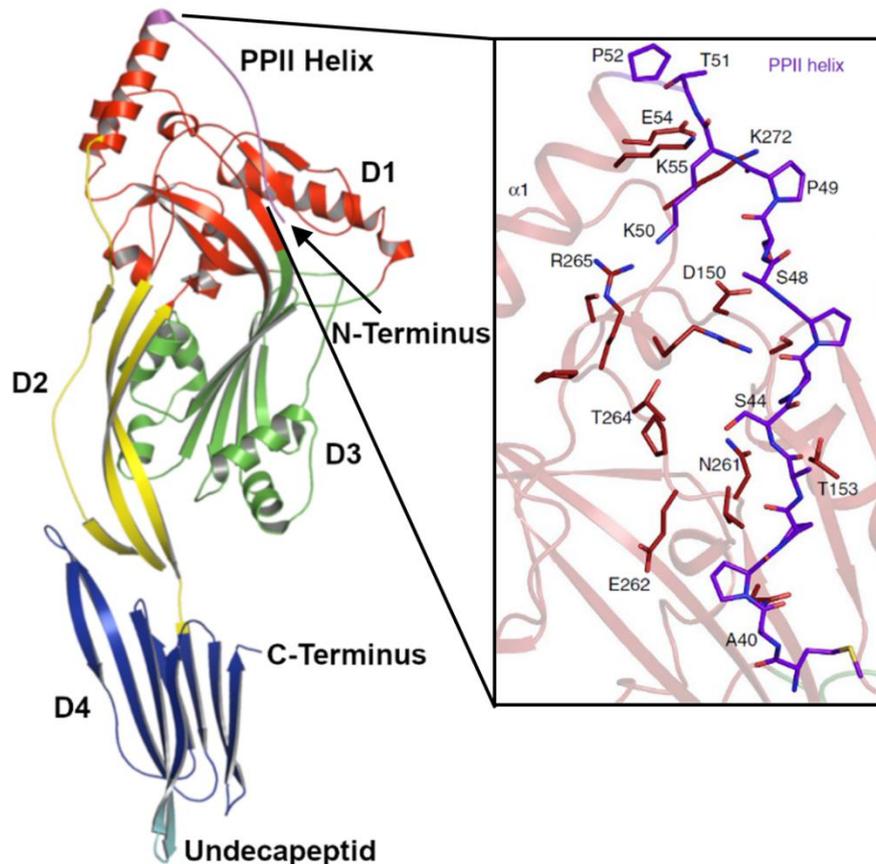


Abbildung 5 Kristallstruktur von Listeriolysin O mit einer Auflösung von 2,15 Å. Die PEST-Sequenz innerhalb der PPII Helix (violett) ist vergrößert dargestellt. (Köster et al., 2014).

2.5.2.2 Die Bindung, Insertion und Oligomerisierung von Cholesterin-abhängigen Cytolysinen in Cholesterin-haltigen biologischen Membranen

Die Ausbildung einer funktionsfähigen Pore ist ein außerordentlich komplexer Prozess, dem eine Vielzahl an strukturellen Umlagerungen zugrunde liegen und der bis heute nicht vollständig aufgeklärt ist. Dieser komplexe Vorgang der Porenbildung lässt sich jedoch in vier grundlegende Schritte gliedern: Membranbindung, Oligomerisierung, Ringausbildung und Insertion in die Membran.

Der erste Schritt besteht in der Bindung des Toxins an Cholesterin-haltigen Membranen. Im Fall der Familie von Cholesterin-haltigen Cytolysinen (CDC) spielt die Domäne D4 eine entscheidende Rolle, da sie den ersten Kontakt mit der Membran herstellt. Für diese erste Kontaktaufnahme ist das Vorhandensein von Cholesterin in der Membran essenziell (Bavdek et al., 2007). Die Kontaktaufnahme erfolgt dabei über zwei unterschiedliche strukturelle

Elemente innerhalb der Domäne D4. Hierzu zählen zum einen das Tryptophan-reiche Undecapeptid und zum anderen die Schleifenstrukturen L1-3, die auf der entgegengesetzten Seite der Domäne D4 liegen. Die Schleifenstruktur L1 bildet dabei mit ihrem Threonin/Leucin-Paar das wichtigste Cholesterin-Bindemotiv (Farrand et al., 2010). Die Domäne D4 durchzieht die Membran nicht vollständig, sondern tritt nur mit der Spitze des β -Sandwichs, dem nicht-polaren Teil der Membran, in Kontakt (Ramachandran et al., 2002). Diese Domäne D4-Cholesterin-Interaktion ist dabei nur transient. Für Pneumolysin wurde nämlich gezeigt, dass die Tryptophane W435 und W436 kurz nach der Bindung an Cholesterin erneut dissoziieren und sich anschließend neu anordnen, um das Protein in der Membran zu verankern (Vögele et al., 2019).

Nach der Cholesterin-Bindung folgt die Oligomerisierung. Auch hier ist der zugrundeliegende Mechanismus noch nicht eindeutig geklärt. Dennoch gibt es zwei mögliche Mechanismen, welche auch von unterschiedlichen CDCs verwendet werden. Studien bezüglich PFO und PLY legen nahe, dass zirkuläre Prä-Poren gebildet werden, welche anschließend in die Membran inserieren und eine Pore ausbilden (Shepard et al., 2000; Tilley et al., 2005a). Andere Studien bezüglich SLO und SLY legen dagegen nahe, dass zunächst Monomere in die Membran inserieren und es zur Porenbildung ohne einen vollständigen Ringschluss kommt (Leung et al., 2014; Palmer et al., 1998). Für LLO wird ebenfalls ein ähnliches Modell wie für SLO und SLY bevorzugt, da gezeigt werden konnte, dass LLO in bogen- und spaltenförmigen Strukturen oligomerisiert, die zu vollständigen Ringen fusionieren. Dabei können alle Toxin-Formen Transmembran-Poren ausbilden (Mulvihill et al., 2015). Wichtig für die Oligomerisierung ist, dass ein intermolekularer Kontakt zwischen zwei benachbarten Monomeren ermöglicht wird. Dieser intermolekulare Kontakt hängt dabei von der Ladungskomplementarität zwischen den Domänen D1 und D3 ab. Für LLO konnten einige Aminosäuren identifiziert werden, welche für dieses Interface eine entscheidende Rolle spielen. Hierzu zählen die Aminosäuren K175, S176 und E262. Ein Fehlen dieser Aminosäuren führt dazu, dass eine vollständige Oligomerisierung nicht mehr stattfinden kann und keine Ringstrukturen ausgebildet werden können (Köster et al., 2014).

Damit eine funktionsfähige Pore entstehen kann, muss in einem letzten Schritt das Toxin in die Membran inserieren. Während einer großen strukturellen Umlagerung falten sich die sechs α -Helices der Domäne D3, welche in je zwei Bündel mit jeweils drei α -Helices angeordnet sind, und als HB1 bzw. HB2 (*helix bundle 1*, *helix bundle 2*) bezeichnet werden, zu zwei β -Hairpin-Strukturen, welche in die Membran inserieren und so eine β -Fass ausbilden (Abbildung 6 A-B) (Tilley et al., 2005b). Diese Umstrukturierung erfordert Energie und wird von Neuaneordnungen der verbleibenden Domänen begleitet. Für die Erzeugung der benötigten Energie spielen intermolekulare Interaktionen eine entscheidende Rolle. Studien anhand von PFO konnten die benötigten intermolekularen Interaktionen aufdecken. Hierbei

handelt es sich um intermolekulare π - π -Wechselwirkungen und elektrostatische Interaktionen. Die Ausbildung dieser elektrostatischen Interaktionen löst das Wassernetzwerk, welches das Interface zwischen HB1 und HB2 stabilisiert, auf und ermöglicht damit die Transition von HB1 bzw. HB2 zu β -Hairpin-Strukturen. Der Bildung einer solchen elektrostatischen Interaktion geht eine π - π -Wechselwirkung zwischen dem β -Strang 1 des zentralen β -Faltblattes der Domäne 3 und dem β -Strang 4 eines benachbarten Monomers voraus. Hierbei handelt es sich um eine nicht-kovalente Interaktion zwischen den delokalisierten Elektronen aromatischer Ringe. Diese Wechselwirkung ist nötig um eine konservierte Triade aus Methionin-Methionin-Phenylalanin, welche das zentrale β -Faltblatt der Domäne 3 in einer verdrehten Position hält, zu destabilisieren. Die Folge ist, dass sich das zentrale β -Faltblatt abflacht. Dabei löst sich die Interaktion zwischen HB2 und dem zentralen β -Faltblatt auf. Hierdurch wird eine nachfolgende elektrostatische Interaktion ermöglicht, die zur Auflösung der Wechselwirkung zwischen HB1 und Domäne D1 bzw. D2 führt und sich zu einer β -Hairpin-Struktur neu organisieren kann (Burns et al., 2019; Wade et al., 2015). Interessanterweise ist im Fall von LLO die intermolekulare π - π -Wechselwirkung zwar konserviert, jedoch nicht die Methionin-Methionin-Phenylalanin-Triade und die intermolekulare elektrostatische Interaktion, sodass die Frage nach dem Insertionsmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist.

Nach Insertion des Toxins in die Membran müssen in einem letzten Schritt überschüssige Lipide, die sich innerhalb der ausgebildeten Pore befinden und den Durchgang blockieren, entfernt werden. Im Fall von PLY konnte gezeigt werden, dass hierfür die geladene Oberfläche der inserierten β -Hairpin-Strukturen eine entscheidende Rolle spielt. Während die Außenseite dieser Strukturen hydrophob ist und den Kontakt zu den restlichen Toxindomänen hält, ist die Innenseite hydrophil. Dadurch dringen Wassermoleküle in die Pore ein, welche überschüssige Lipide verdrängen. Dieser Lipid-Stopfen kann anschließend, entweder über die Membraninnenseite oder durch Öffnung der Poren aufgrund eines Knickens der Membran, entweichen (Vögele et al., 2019). Auch ein enzymatischer Abbau des Lipid-Stopfens über bakterielle oder zelluläre Phospholipasen wäre denkbar, wurde jedoch noch nicht gezeigt. Eine so gebildete Pore kann bis zu 50 Monomere umfassen und eine Größe von ca. 300 Å erreichen (Hotze & Tweten, 2012). Die so ausgebildeten Poren sind für einen Calcium (Ca^{2+})-Einwärtsstrom in die Wirtszelle und einen nach außen gerichteten Kalium (K^+)-Ausstrom permeabel (Hamon & Cossart, 2011; Repp et al., 2002).

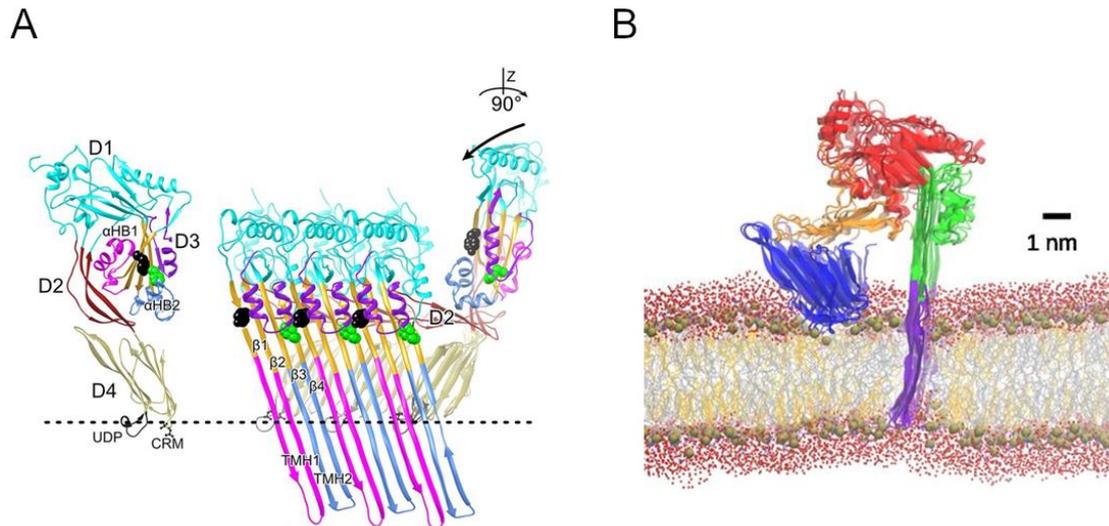


Abbildung 6 Die Membranbindung, Oligomerisierung und Insertion von Cholesterin-abhängigen Cytolysinen in Cholesterin-haltigen biologischen Membranen. A-B: Insertion eines Monomers in die Membran durch strukturelle Umlagerung der HB1 bzw. HB2 Helices zu zwei β -Hairpin-Strukturen. Diese Umlagerung wird durch eine Konformationsänderung der übrigen Domänen begleitet (Vögele et al., 2019).

2.5.2.3 Abwehr- und Reparaturmechanismen der Wirtszelle auf porenbildende Toxine

2.5.2.3.1 Schadenserkenkung durch die Wirtszelle

Die Primäraufgabe von porenbildenden Toxinen liegt naturgemäß in der Perforierung biologischer Membranen, welche eine natürliche und selektive Barriere von Zellen gegenüber dem extrazellulären Milieu durch ihre Unversehrtheit bilden und von besonderer Bedeutung zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase sind. Die Insertion und Porenbildung von porenbildenden Toxinen ist dementsprechend ein gravierender Eingriff in die Integrität der Zelle und kann zum apoptotischen oder nekrotischen Zelltod führen. Deshalb ist eine zügige Reparatur und Eliminierung von porenbildenden Toxinen zur Aufrechterhaltung von zellulärem Leben zwingend erforderlich. Für die Einleitung von Reparaturmechanismen der Plasmamembran ist es jedoch zuerst nötig den durch porenbildende Toxine induzierten Schaden zu detektieren. Als Sensor fungiert dabei die Perturbation der intrazellulären Ionen Zusammensetzung, welche beispielsweise durch Einwirkung von porenbildenden Toxinen aus dem Gleichgewicht gebracht werden kann. So ist ein Calcium (Ca^{2+})-Einwärtsstrom ein Aktivator von Plasmamembran-Reparaturmechanismen, da eine zu stark erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($> 20 \mu\text{M}$) zytotoxisch wirkt (Babiychuk et al., 2009; Wolfmeier et al., 2015). Dies äußert sich in desensibilisierten Immunzellen, destabilisierten Gewebsbarrieren und zuletzt im Zelltod (Brito

et al., 2019). Ein nach außen gerichteter Kalium (K^+)-Ausstrom hingegen ist ein Aktivator von MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) Signaltransduktionswegen, welche protektiv gegenüber porenbildenden Toxinen wirken, gleichzeitig aber auch den zellulären Metabolismus verändern, das angeborene Immunsystem aktivieren und einen pro-inflammatorischen Zelltod auslösen (Brito et al., 2019). Wie stark die intrazelluläre Ionen-Homöostase dabei pertubiert wird, hängt von der Stöchiometrie und Größe der ausgebildeten Poren ab. Interessanterweise werden Reparaturmechanismen von porenbildenden Toxinen, die nur kleine Poren ausbilden, weniger effizient aktiviert, als von porenbildenden Toxinen, die große Poren ausbilden (Peraro & Van Der Goot, 2016). Wahrscheinlich hängt dies mit dem generierten Ca^{2+} -Einwärtsstrom zusammen. Dieser ist bei kleineren Poren geringer als bei großen Poren. Einige porenbildende Toxine induzieren außerdem einen sekundären Ionen-Strom aus intrazellulären Ca^{2+} -Lagern, wie beispielsweise dem Endoplasmatischen Retikulum (Gekara et al., 2007). In der Regel führt die Öffnung dieser intrazellulären Lager zu einer extrazellulären Sekretion von ATP, welches wiederum die Perturbation der intrazellulären Ionen-Homöostase verstärkt. Dies geschieht durch Bindung des ATPs an den P_2X_7 Rezeptor, welcher gleichzeitig als Kationen-Kanal fungiert (Skals et al., 2011). Weiterhin hängt die Aktivierung von Reparaturmechanismen davon ab, welche Strukturen die Toxine in der Membran ausbilden. Während voll ausgebildete Poren eine starke Aktivierung der Reparaturmechanismen induzieren, sind diese bei bogen- und spaltenförmigen Strukturen deutlich schwächer ausgeprägt (Brito et al., 2019).

2.5.2.3.2 Schadensreparatur durch die Wirtszelle

Um Schaden von der Zelle abzuwenden muss ein Austritt von cytosolischem Inhalt schnellstmöglich verhindert werden, indem die Plasmamembran repariert wird. Auch hier ist ein unkontrollierter Einstrom von Calcium (Ca^{2+}) in die Zelle der Signalgeber. Dieser induziert nämlich zum einen die Exocytose von kortikalen Vesikeln, z.B. Lysosomen, und zum anderen die Rekrutierung von cytosolischen Proteinen zur Plasmamembran. Dabei fusionieren in einem Ca^{2+} -abhängigen Prozess Lysosomen mit der Plasmamembran und „flicken“ die Plasmamembran-Wunde (Brito et al., 2019). Dieser Prozess ist *per se* kein notwendiger Prozess der Plasmamembranreparatur. Dennoch führt die Fusion von intrazellulären Membranen mit der Plasmamembran für sich genommen zu einer Reduktion der Membranspannung, welche wiederum das Schließen der Wunde begünstigt. Dies wird als „*tension release hypothesis*“ bezeichnet (Togo et al., 2000). Bei cytosolischen Proteinen, welche zur Plasmamembran-Läsion rekrutiert werden, handelt es sich hauptsächlich um Annexine, welche als zentrale Moleküle zum „Stopfen“ von verwundeten Membranen

bereitgestellt werden. Bei diesen handelt es sich um cytosolische Ca^{2+} -Sensoren, welche die Fähigkeit besitzen zu aggregieren, an Phospholipiden (insbesondere an Phosphatidylserin) zu binden und eine Membranfusion zu fördern (Boye & Nylandsted, 2016; Gerke et al., 2005). Die Translokation zur Läsion erfolgt dabei in Abhängigkeit von der Konzentration an einströmendem Ca^{2+} (Potez et al., 2011). So sensieren unterschiedliche Annexine unterschiedlich hohe Ca^{2+} -Konzentrationen. Die Annexine A2 und A6 sensieren beispielsweise hohe Ca^{2+} -Konzentrationen, während die Annexine A1 und A5 leicht erhöhte Ca^{2+} -Konzentrationen sensieren. Damit werden die Annexine A2 und A6 sehr schnell zur Plasmamembran-Wunde rekrutiert, während die Annexine A1 und A5 erst später an der Plasmamembran erscheinen. Die Zelle kann somit gezielt die Größe der Membran-Läsion „wahrnehmen“. So bindet beispielsweise Annexin A6 nur an Plasmamembran-Läsionen mit vergleichbar geringem Schaden, da eine Rekrutierung nur bei sehr niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen induziert wird ($\leq 5 \mu\text{M}$), während Annexin A1 nur an Membran-Läsionen bindet, bei denen Ca^{2+} -Konzentrationen von 10-20 μM vorliegen (Brito et al., 2019). Der genaue Mechanismus des „Stopfens“ einer beschädigten Membran ist jedoch bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Dennoch ist beschrieben, dass sich Annexine A1 und A2 an durch porenbildende Toxine-beschädigte Membranen anlagert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Annexin A1 Inhibition oder Depletion zu einer erhöhten Empfindlichkeit von HeLa Zellen gegenüber porenbildenden Toxinen führt (McNeil et al., 2006; Monastyrskaya et al., 2013).

Nach der Ausbildung eines provisorischen „Stopfens“ an der Plasmamembran-Wunde besteht der nächste Schritt der Reparatur in der Isolierung des betreffenden Membran-Teilabschnitts durch Ausstülpung und Bläschenbildung (*bleb*). Hierunter versteht man eine Actomyosin-Kontraktion, welche zu einer Destabilisierung der Plasmamembran-Cytoskelett-Interaktion führt. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der Plasmamembranspannung, sodass eine nach außen gerichtete Expansion stattfinden kann. Wie auch für die vorausgegangenen Prozesse ist auch dieser Prozess Ca^{2+} -abhängig (Brito et al., 2019). In PLY- und SLO-beschädigten Zellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine solche Bläschenbildung in einem begrenzten Bereich mit erhöhter Ca^{2+} -Konzentration stattfindet und dadurch der beschädigte Membran-Abschnitt in eine Quarantäne versetzt und gleichzeitig die restliche Zelle vor toxischen Ca^{2+} -Konzentrationen geschützt wird (Babiychuk et al., 2011; Wolfmeier et al., 2015). Die ausgebildeten Bläschen können dabei entweder wieder eingefahren oder aber auch nach außen abgestoßen werden. Letzteres tritt v.a. dann ein, wenn der beschädigte Membran-Abschnitt nicht repariert werden kann (Mesquita, Brito, Cabanes et al., 2017; Wolfmeier et al., 2016). Auch wird das Abstoßen zur Entfernung der porenbildenden Toxine aus der Plasmamembran genutzt. *Listeria monocytogenes* hat sich

diesen Mechanismus sogar zu Eigen gemacht und nutzt ihn zur Zell-zu-Zell Ausbreitung (Czuczman et al., 2014).

Für ein Abstoßen (*shedding*) beschädigter Membranbestandteile ist die vorausgegangene Bläschenbildung zwingend notwendig. Dieses Abstoßen von beschädigten Membranen gilt dabei als der Hauptmechanismus zur Reparatur lädierter Membranen und wird sogar durch die Bindung von CDCs an Cholesterin-reiche Plasmamembran-Domänen weiter verstärkt (Brito et al., 2019). Das Abschnüren von Vesikeln, welche in das extrazelluläre Milieu abgegeben werden, ist dabei abhängig von der ESCRT-III (*endosomal sorting complex required for transport*) Maschinerie. Dabei werden durch Perturbation der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase die Adapterproteine ALG-2 (*apoptosis linked gene*) und ALIX (*ALG-2-interacting protein X*) an die Plasmamembran rekrutiert, welche wiederum den ESCRT-III-Komplex zur Plasmamembran-Wunde führen. Anschließend wird auch das Protein Vps4 (*adenosine triphosphatase*) zum Komplex rekrutiert, wo es für die Auflösung des ESCRT-III-Komplexes verantwortlich ist und zum ATP-abhängigen Abschnüren der Vesikel beiträgt (Jimenez et al., 2014). Im Fall von LLO konnte anhand von Toxin-behandelten Zellen gezeigt werden, dass Komponenten des ESCRT-III-Komplexes punktuell an der Plasmamembran rekrutiert werden (Jimenez et al., 2014).

Neben der Exocytose beschädigter Membranabschnitte kann eine Reparatur der Membran auch über eine Endocytose stattfinden. Für diesen Prozess spielen Lysosomen eine wichtige Rolle, da sie neben dem „Flicken“ der beschädigten Membran auch eine Vielzahl an Enzymen sekretieren, die eine Endocytose der lädierten Membran begünstigen. Hierzu zählen v.a. Enzyme, die die Membranzusammensetzung verändern können. Darunter fällt u.a. die saure Sphingomyelinase (*acid sphingomyelinase*), die Sphingomyelin in Ceramid und Phosphocholin (ChoP) hydrolysiert. Dabei wird eine Ceramid-Plattform gebildet, welche eine Invagination der betroffenen Membran begünstigt und als Caveolae bezeichnet wird (Draeger & Babiychuk, 2013). Hierdurch werden v.a. Poren von porenbildenden Toxinen mit kleinem Durchmesser aufgenommen (Idone et al., 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Zellen ohne saure Sphingomyelinase in ihrer Fähigkeit Membran-Läsionen, die durch porenbildende Toxine ausgelöst werden, aufzunehmen, stark eingeschränkt sind (Schoenauer et al., 2019). Eine *in vitro* extrazelluläre Zugabe der sauren Sphingomyelinase führt dagegen zu einer Internalisierung betroffener Membranabschnitte, wie für SLO gezeigt werden konnte (Tam et al., 2010). Andere Bakterien wiederum nutzen dieses System auch zur Internalisierung. So führt beispielsweise die Sekretion und Porenbildung von LLO zu einer Endocytose von *L. monocytogenes* (Vadia et al., 2011; Vadia & Seveau, 2014). Die so gebildeten endosomalen Strukturen können entweder mit Lysosomen fusionieren, sodass es zu einem proteolytischen Verdau des Inhaltes kommt, oder in das extrazelluläre Milieu sekretiert werden.

2.5.2.4 Die Funktion von Listeriolysin O

Die Primärfunktion von Listeriolysin O (LLO) *in vivo* liegt in der Freisetzung von *Listeria monocytogenes* aus primären Vakuolen nach Infektion (Kingdon & Sword, 1970) sowie aus sekundären Vakuolen während der Ausbreitung des Bakteriums in benachbarte Zellen (Gedde et al., 2000). Die erfolgreiche Aktivierung von LLO und die damit verbundene Perforierung der vakuolären Membran und Freisetzung von *L. monocytogenes* in das Cytosol ist dabei abhängig von der Azidifizierung reifender Vakuolen (De Chastellier & Berche, 1994). Eine Freisetzung von *L. monocytogenes* durch aktives LLO findet nämlich erst bei einem pH-Wert zwischen 4,9 und 6,7 statt (Beauregard et al., 1997). Dies hängt damit zusammen, dass das pH-Optimum von LLO bei einem pH-Wert von 5,5 liegt (Geoffroy et al., 1987; Portnoy et al., 1992). Als pH-Sensor wurden dabei die Aminosäuren D208, E247 und D320 identifiziert. Bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 und in Kombination von Temperaturen über 30°C wird das Toxin schnell und irreversibel zu einer nicht-funktionalen Form aggregiert und hat das Potenzial zu denaturieren, was zu einer partiellen Reduktion seiner Aktivität führt (Schuerch et al., 2005). Neben der Rolle von LLO in der Freisetzung des Bakteriums aus den intrazellulären Vakuolen, sind weitere Funktionen von LLO, im Hinblick auf die Pathogenität von *L. monocytogenes*, im Laufe der Zeit hinzugekommen. Diese lassen sich in intrazelluläre-, extrazelluläre- und vakuoläre Funktionen unterteilen.

2.5.2.4.1 Funktionen von Listeriolysin O in intrazellulären Vakuolen

Im Hinblick auf vakuoläre Funktionen zählen, neben der bereits beschriebenen Funktion der Perforierung der vakuolären Membran, auch die Regulation der NOX2 NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat)-Oxidase innerhalb von intrazellulären Vakuolen, bei welcher gezeigt werden konnte, dass sie *in vitro* die Freisetzung der Bakterien aus den Vakuolen limitiert (Myers et al., 2003). Bei NOX2 handelt es sich um ein Enzym, das in der Lage ist reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) zu produzieren. Dabei wird molekularer Sauerstoff zu Superoxid-Anionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) konvertiert, welches anschließend zu weiteren reaktiven Sauerstoffspezies mit anti-mikrobiellen Aktivitäten, wie beispielsweise Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxyl-Anionen (OH^{\cdot}), umgesetzt werden kann (Singel & Segal, 2016). *Listeria monocytogenes* nutzt LLO zur Unterdrückung der Aktivität von NOX2 indem es die Lokalisation mit intrazellulären Vakuolen verhindert (Lam et al., 2011).

L. monocytogenes induziert eine Autophagie-Antwort in infizierten Zellen, einem zellulären Prozess zum Abbau von zellulären Bestandteilen (Py et al., 2007). Durch Autophagie kann die Infektion von *L. monocytogenes in vivo* in der Maus und *Drosophila* limitiert werden (Yano et al., 2008; Zhao et al., 2008). Dabei wirkt LLO als ein Induktor zellulärer Autophagie

indem es die Lipidierung des Adapter-Protein LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) induziert. (Birmingham et al., 2007; Meyer-Morse et al., 2010). Außerdem führt LLO zur Hochregulierung der Expression von Optineurin, einem Autophagie Adapter-Protein, in HeLa Zellen, was zu einer Restriktion des intrazellulären, bakteriellen Wachstums führt (Puri et al., 2017). LLO induziert auch die Oligomerisierung von NLRX1 (*nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat containing X1*), welches über ein LIR (*LC3-interacting region*)-Motiv an LC3 bindet und hierdurch Mitophagie (Autophagie der Mitochondrien) induziert (Zhang et al., 2019). Ebenso fördert vakuoläres LLO die Bildung von „spacious *Listeria*-containing phagosomes“ (SLAPs). Hierbei handelt es sich um große Vakuolen, die nicht der Eliminierung von *L. monocytogenes* dienen, sondern ein langsames Wachstum der Bakterien ermöglichen und im Zusammenhang mit anhaltenden Infektionen stehen (Birmingham et al., 2008).

2.5.2.4.2 Funktionen von Listeriolysin O im Cytosol der Wirtszelle

Die Infektion von Epithelzellen mit *Listeria monocytogenes* führt zu einer schnellen Veränderung des mitochondrialen Netzwerks der Zelle. Dabei kommt es bereits eine Stunde nach Infektion, in Abhängigkeit von Listeriolysin O (LLO), zu einer starken mitochondrialen Fragmentierung, die jedoch reversibel ist (Stavru et al., 2011, 2013). Der genaue Wirkmechanismus ist bislang nicht eindeutig geklärt. Es wird angenommen, dass die mitochondriale Fragmentierung keine Folge eines direkten Kontakts zwischen LLO und Mitochondrium ist, sondern vielmehr eine Folge des LLO-induzierten Calcium (Ca^{2+})-Stroms (Stavru et al., 2011). Das Mitochondrium ist dabei nicht das einzige Organell, welches von LLO manipuliert wird. Die Sekretion von LLO hat auch einen Einfluss auf das Endoplasmatische Retikulum (ER). Auf morphologischer Ebene induziert LLO, in Abhängigkeit vom Ca^{2+} -Einstrom, eine Vesikularisierung des ERs (Gekara et al., 2007). Außerdem führt LLO zur Aktivierung der ungefalteten Proteinantwort (*unfolded protein response*, UPR), eine zelluläre Stressantwort auf die Ansammlung von ungefalteten Proteinen im ER (Pillich et al., 2012). Weiterhin führt LLO zu einer Dysregulation der SUMO-Maschinerie der Wirtszelle. Bei der SUMOylierung handelt es sich um eine reversible, posttranslationelle Modifikation von Proteinen durch kovalente Verknüpfung von SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) (Gareau & Lima, 2010). *L. monocytogenes* induziert, in Abhängigkeit von LLO, eine Reduktion von SUMOylierten Proteinen. Mechanistisch geschieht das durch den LLO-abhängigen Abbau von Ubc9 (Ribet et al., 2010). Hierbei ist das entscheidende Signal der Kalium (K^+)-Ausstrom aus den von LLO gebildeten Poren (Li et al., 2017). Sobald *L. monocytogenes* die primäre Vakuole verlässt und in das Cytosol gelangt, tritt es in Kontakt mit der zellulären Immunantwort. Dabei induziert LLO u.a. die

Aktivierung verschiedener Inflammasome (NLRP3, AIM2, NALP3, IPAF, NLRC4), welche alle zur Aktivierung von Caspase-1 und zur Reifung der pro-inflammatorischen Cytokine Interleukin (IL)-1 β und IL-18, aber auch zur Induktion von Pyroptose führt (Eitel et al., 2011; Kim et al., 2010; Meixenberger et al., 2010; Rathinam et al., 2010; Warren et al., 2014). Das maßgebliche Signal zur Aktivierung der Caspase-1 ist dabei der K⁺-Ausstrom aus den von LLO gebildeten Poren (Hamon et al., 2007).

2.5.2.4.3 Funktion von Listeriolysin O im extrazellulären Milieu

Auch Listeriolysin O (LLO), welches vor der Infektion im extrazellulären Milieu sekretiert wird, übt einen Einfluss auf die Wirtszelle aus. Die Porenbildung von LLO induziert einen Calcium (Ca²⁺)-Einwärtsstrom in die Wirtszelle, welcher die Ionen-Homöostase der Wirtszelle pertubiert (Repp et al., 2002). Im Vergleich zur extrazellulären Ca²⁺-Konzentration (ca. 1 mM) halten eukaryotische Zellen normalerweise eine sehr niedrige cytosolische Ca²⁺-Konzentration (ca. 100 nM), da es in Organellen gespeichert wird. Solche Ca²⁺-Lager befinden sich innerhalb des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Mitochondriums. Diese strikte Kompartimentierung des Ca²⁺ erlaubt es der Zelle schnelle Änderungen der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration als Signal für nachgeschaltete Signaltransduktionswege zu nutzen. Mit Hilfe des durch LLO induzierten Ca²⁺-Einstroms ist *Listeria monocytogenes* in der Lage solche Signaltransduktionswege für die eigenen Zwecke zu nutzen. So wurde gezeigt, dass LLO über diesen Ca²⁺-Strom in der Lage ist eine Internalisierung von *L. monocytogenes* in HepG2 (humanes Leberkarzinom) zu begünstigen (Shaynoor Dramsi & Cossart, 2003). Ein ähnlicher Internalisierungsmechanismus findet auch in J774 Makrophagen statt. Auch hier induziert der Ca²⁺-Einwärtsstrom eine Aufnahme der Bakterien und ermöglicht den Ausbruch aus den intrazellulären Vakuolen (Goldfine & Wadsworth, 2002). Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um einen cPKC/Rac1/Arp2/3-abhängigen Mechanismus. (Lam et al., 2018). Mit Hilfe von LLO beeinflusst *L. monocytogenes* aber nicht nur den extrazellulären Einstrom von Ca²⁺. Extrazelluläres LLO beeinflusst nämlich auch den Ausstrom von Ca²⁺ aus intrazellulären Lagern, wie beispielsweise dem ER (Gekara et al., 2007). Daneben aktiviert extrazelluläres LLO eine Vielzahl an Signaltransduktionswegen der Wirtszelle. Hierzu zählen die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1, ERK-2 und p38, sowie von c-Jun (Tang et al., 1996, 1998). Außerdem erfolgt die Aktivierung des Raf-MEK-MAP-Kinase Signaltransduktionsweges ebenfalls über LLO (Weiglein et al., 1997). LLO beeinflusst aber auch die Translokation von NF κ B in den Nucleus, sowie die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine wie Interleukin (IL)-6, IL-8, GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor) und IL-1 α (Dewamitta et al., 2010; Kayal et al., 1999; Rose et al., 2001). Neben dem nach innen gerichteten Ca²⁺-Strom führt die Porenbildung von LLO

auch zu einem nach außen gerichteten Kalium (K^+)-Ausstrom, welcher zu einer Dephosphorylierung des Histons H3 und einer Deacetylierung von Histon H4 führt. Die Konsequenz ist, dass eine Vielzahl von Genen, welche für eine Immunantwort benötigt werden, herunterreguliert werden (Hamon et al., 2007; Hamon & Cossart, 2011). Weiterhin induziert *L. monocytogenes*, in Abhängigkeit von LLO, die Translokation des ER-lokalisierten Chaperons Gp96 (*Heat shock protein 90kDa beta member 1*) zur zellulären Oberfläche (Mesquita, Brito, Moya, et al., 2017). Dort dient es als Oberflächenrezeptor für den Virulenzfaktor Vip. Diese Ligand-Rezeptor-Interaktion führt in manchen Zelllinien zum Eintritt des Bakteriums in die Wirtszelle (Cabanés et al., 2005; Martins et al., 2012). Gleichzeitig interagiert Gp96 mit NMHCIIA (*non-muscle myosin heavy chain IIA*) und kontrolliert dadurch die Blasenbildung der Plasmamembran (*blebs*), welche sich protektiv auf die Membranintegrität während der Infektion auswirkt (Mesquita, Brito, Mazon Moya, et al., 2017). Zuletzt hat LLO auch das Potenzial Apoptose in infizierten Zellen zu induzieren (Rogers et al., 1996). Dabei kann LLO sowohl Caspase-abhängige (Caspase-3, -6, -9), als auch Caspase-unabhängige Signaltransduktionswege anschalten, welche zu einer Apoptose führen. Zeitgleich findet eine Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf die äußere Plasmamembranseite, mitochondriale Depolarisierung und DNA Fragmentierung statt (Carrero et al., 2004).

2.5.2.5 Die Regulation von Listeriolysin O

2.5.2.5.1 Regulation von Listeriolysin O auf bakterieller Ebene

Alle Virulenzfaktoren von *Listeria monocytogenes*, denen für die Pathogenität des Bakteriums eine entscheidende Rolle zugesprochen wird (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*), sind auf dem Chromosom des Bakteriums kodiert. Dabei liegen sie jedoch nicht verstreut vor, sondern als organisierte Struktur in Form einer 9 kbp großen Insel, welche als *Listeria Pathogenicity Island-1* (LIPI-1) bezeichnet wird (Vázquez-Boland et al., 2001). Dieser Virulenzlocus ist in drei verschiedene transkriptionelle Einheiten unterteilt. Zentral liegt das Listeriolysin O-kodierende Gen *hly*. Stromabwärts befindet sich das Lecithinase Operon, bestehend aus den Genen *mpl*, *actA*, *plcB*, *Imo0206* und *Imo0207*. Stromaufwärts von *hly* befindet sich dagegen das *plcA-prfA* Operon (Mengaud, Geoffroy, et al., 1991) (Abbildung 7). Die transkriptionelle Regulation von LIPI-1 ist ein sehr komplexer Prozess, der von einer Reihe unterschiedlicher Promotoren gesteuert wird. Die Gene des Lecithinase Operons werden beispielsweise unter der Kontrolle des *mpl*-Promotors als große mRNA transkribiert, die alle Gene enthält, oder als zwei kürzere Transkripte, die entweder nur *mpl* beinhalten oder *actA* und *plcB*. Letzteres steht zusätzlich unter der Kontrolle des *actA*-Promotors

(Bohne et al., 1994). Auch das *plcA-prfA* Operon kann als polycistronische oder als monocistronische mRNA transkribiert werden (Mengaud, Dramsi, et al., 1991). *Hly* wird hingegen über einen eigenen Promotor reguliert (Mengaud et al., 1989). All diese Promotoren agieren aber nicht unabhängig voneinander, sondern werden durch PrfA, welches von *prfA* kodiert wird, koordiniert. Somit fungiert PrfA als Master-Regulator (Chakraborty et al., 1992; de las Heras et al., 2011; Mengaud, Dramsi, et al., 1991). Für die Aktivität von PrfA ist sein Redox-Status von entscheidender Bedeutung. So müssen die Thiol-Reste des Master-Regulators vollständig reduziert vorliegen, um eine effiziente Bindung an die Ziel-DNA zu ermöglichen. Zusätzlich findet eine allosterische Aktivierung von PrfA über eine post-translationelle S-Glutathionylierung statt, indem reduziertes Glutathion an PrfA gekoppelt wird. Die Produktion von Glutathion kann dabei vom Bakterium selbst über die Expression einer Glutathionsynthase (*gshF*) oder über zelluläre Prozesse erfolgen. Die S-Glutathionylierung führt dabei zu einer leichten strukturellen Veränderung von PrfA, welche seine Bindung an die DNA vereinfacht (Reniere et al., 2015). Diese Redox-abhängige Regulation der Expression von LLO erfolgt jedoch nicht nur auf Ebene der PrfA-Aktivierung, sondern findet auch direkt an LLO statt. Denn auch hier konnte eine S-Glutathionylierung des Toxins beschrieben werden. Anders als für die Aktivierung von PrfA, führt die Bindung von Glutathion, am unter Cholesterin-abhängigen Cytolysinen (CDC) konservierten Cystein (C484), zu einer vollständigen Inaktivierung des Toxins. Erst eine Reduktion des Toxins führt zu einem Ablösen von Glutathion und damit zu einer Aktivierung. Das hierfür benötigte Glutathion kann auch hier ebenfalls durch die bakterielle Glutathionsynthase oder durch die endogene Produktion der Wirtszelle erfolgen (Abbildung 7) (Portman et al., 2017b).

Neben der Regulation auf transkriptioneller Ebene findet eine Regulation von LLO auch auf Proteinebene statt. Damit LLO vom Bakterium in seine Umgebung abgegeben werden kann, muss es aktiv nach außen sekretiert werden. Dies geschieht durch das Sec-Sekretionssystem von *L. monocytogenes* (Burg-Golani et al., 2013). Von besonderer Bedeutung sind dabei die Proteine SecD und SecF, da ihre Deletion zu einer stark eingeschränkten Sekretion von LLO führt (Abbildung 7) (Burg-Golani et al., 2013).

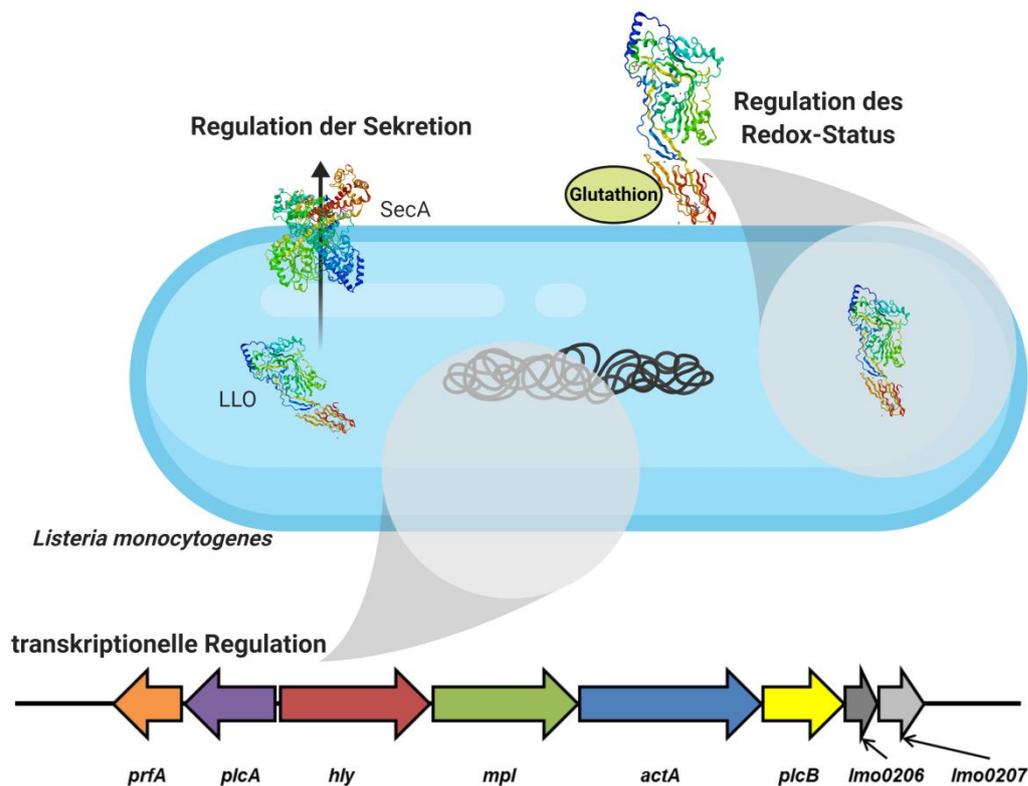


Abbildung 7 Schematische Darstellung der bakteriellen Regulation von Listeriolysin O. Die Regulation von Listeriolysin O (LLO) durch das Bakterium findet durch die Regulation der Sekretion und/oder Transkription statt. Zudem kann eine Regulation durch Modulation des Redox-Status des Toxins erreicht werden.

2.5.2.5.2 Regulation von Listeriolysin O durch die Wirtszelle

Neben der Bakterien-eigenen Regulation kann Listeriolysin O (LLO) auch durch verschiedene Wirtszellantworten reguliert werden. Dies spielt insbesondere während der Infektion eine zentrale Rolle, da eine unkontrollierte Perforierung von anderen Organellen oder der Plasmamembran aus dem Cytosol heraus, zur Zerstörung der bakteriellen replikativen Nische führen könnte (Glomski et al., 2003). So sind *Listeria monocytogenes* Mutanten, die nicht in der Lage sind die Aktivität von LLO zu kompartimentieren, cytotoxisch, avirulent und nicht in der Lage dem Immunsystem der Wirtszelle zu entgehen (Glomski et al., 2003). Ein solcher Mechanismus der Kompartimentierung beruht auf dem pH-Wert des umgebenden Milieus. Während LLO bei saurem pH-Wert seine höchste Aktivität aufweist, ist das Toxin bei neutralem pH-Wert nur wenig aktiv (Schuerch et al., 2005) (Abbildung 8). Neben dem pH-Status des umgebenden Milieus spielt auch der Redox-Status des Toxins in seiner Regulation eine zentrale Rolle, da beispielsweise oxidiertes Toxin durch S-Glutathonylierung in einer inaktiven Konformation gehalten wird (Portman et al., 2017b). Eine Aktivierung des Toxins über die Wirtszelle durch Reduktion kann beispielsweise über

die Thiol-Oxidoreduktase GILT (*γ-interferon-inducible lysosomal thiol reductase*) erfolgen. *In vitro* Experimente haben nämlich gezeigt, dass eine Reduktion von LLO am konservierten Cystein 484 eine wichtige Rolle für die Aktivierung von LLO spielt. Diese Funktion wird *in vivo* von GILT übernommen. LLO wird dabei innerhalb der intrazellulären Vakuolen reduziert. Diese Toxin-Aktivierung erlaubt einen effektiven Eintritt des Bakteriums in das Cytosol der Wirtszelle. Bakterien, die sich innerhalb von Vakuolen von GILT^{-/-} Knochenmarksmakrophagen befinden, zeigen deshalb auch eine verringerte Fähigkeit in das Cytosol der Wirtszellen zu gelangen (Singh et al., 2008). Die besondere Bedeutung des Cysteins 484 für die Aktivität und Regulation von LLO zeigt sich auch daran, dass eine S-Glutathionylierung, als posttranslationelle Modifikation, an diesem Cystein zu einer Inhibition der Aktivität von LLO führt (Portman et al., 2017a) (Abbildung 8). Folglich spielen oxidierende Agenzien eine Rolle in der Regulation von LLO. So können sowohl reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche durch die NOX2 NADPH-Oxidase der Wirtszelle produziert werden, als auch reaktive Stickstoffspezies (NOS), welche durch die iNOS (NO-Synthase) produziert werden, zu einer Oxidation von LLO führen und damit zu seiner Inaktivierung (Myers et al., 2003) (Abbildung 8). Ein weiterer regulatorischer Mechanismus besteht in der Degradierung des Toxins über das Wirtszell-Proteasom nach Phosphorylierung und Ubiquitinierung innerhalb von 15 min (Schnupf et al., 2006; Villanueva et al., 1995) (Abbildung 8). Diesem Mechanismus wird jedoch nur eine nicht-signifikante Bedeutung zugesprochen, da die Inhibition der Proteasom-Funktion keine signifikante Rolle im intrazellulären Überleben der Bakterien spielt und somit die Limitierung der LLO Aktivität über diesen Mechanismus nur eine untergeordnete Rolle spielt (Schnupf et al., 2006). Weiterhin findet eine Regulation von LLO während des Prozesses der Membranreparatur durch die Wirtszelle statt. So wurde erst kürzlich gezeigt, dass das Adapter-Protein Ap2a2 (*adaptor protein complex 2 subunit alpha-2*), welches in der Endocytose involviert ist, an die PEST-Sequenz von LLO bindet. Diese Interaktion führt dazu, dass das Toxin durch Endocytose von der Plasmamembran entfernt wird und somit die Zelle vor weiteren cytotoxischen Effekten geschützt wird (Chen et al., 2018) (Abbildung 8). Zuletzt wird LLO auch von freiem Cholesterin inhibiert. Dabei inhibiert die Cholesterin-LLO Interaktion nicht die Bindung des Toxins an die Plasmamembran der Wirtszelle, sondern hat einen negativen Einfluss auf die nachfolgende Porenbildung (Jacobs et al., 1998) (Abbildung 8).

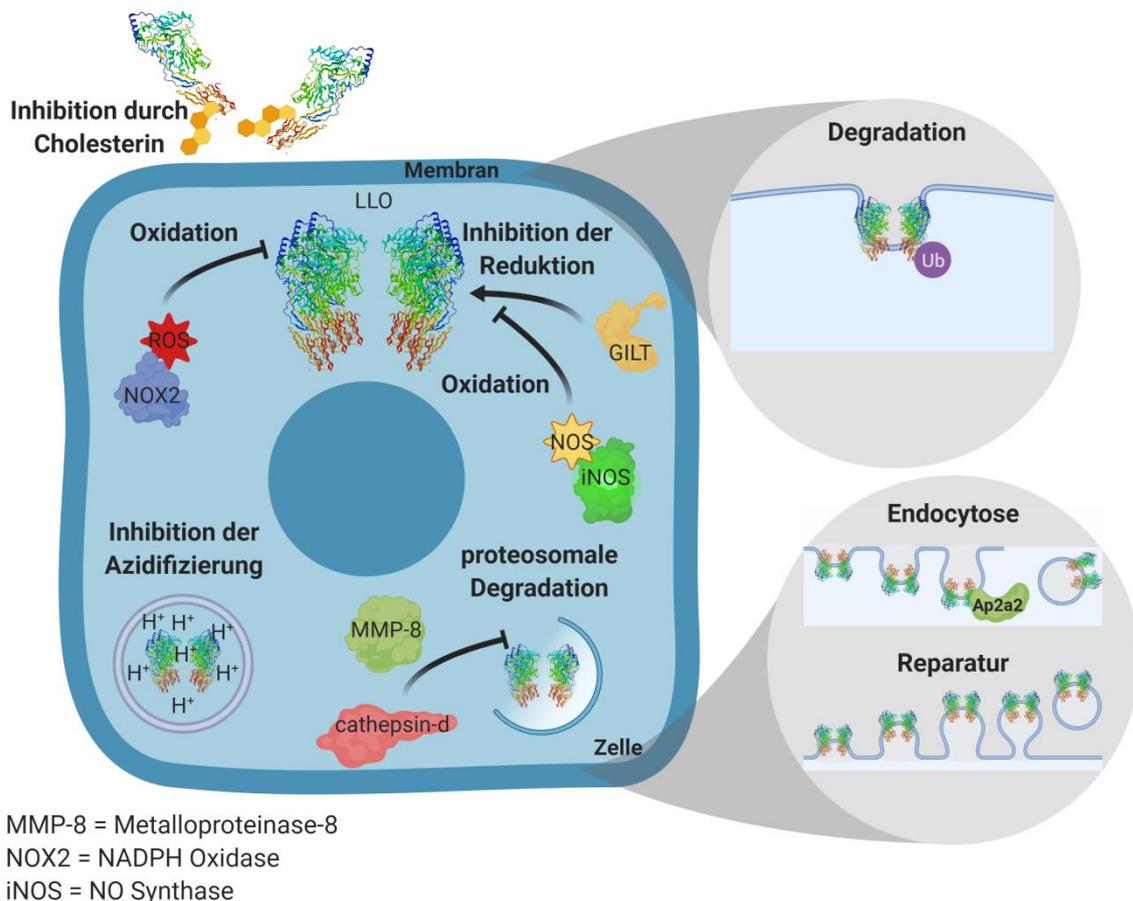


Abbildung 8 Schematische Darstellung der zellulären Regulation von Listeriolysin O. Listeriolysin O (LLO) kann durch die Wirtszelle auf verschiedene Weisen reguliert werden. Hierzu zählt die Inhibition der Porenbildung durch Cholesterin, die Inhibition der GILT-induzierten Reduktion durch NOX2- bzw. iNOS-produziertes ROS/NOS, aber auch die Inhibition der Azidifizierung vakuolärer Strukturen. LLO kann zudem durch Ubiquitinierung an der Plasmamembran degradiert werden oder über Reparatur-Mechanismen bzw. endocytotische Vorgänge aus dieser entfernt werden.

2.6 Bakterielle Phospholipasen

Phospholipasen zählen zu den wichtigsten Virulenzfaktoren von Bakterien. Sie gehören, neben Sphingomyelinasen, zu einer sehr heterogenen Gruppe von Esterasen. In der Regel sind diese Enzyme entweder in der Zelloberfläche Gram-negativer- und positiver Bakterien verankert oder werden von diesen sekretiert. Dabei spielen sie v.a. bei pathogenen Bakterien eine wichtige Rolle während der Infektion, da sie beispielweise einen Beitrag zur Freisetzung aus den intrazellulären Vakuolen oder bei der Evasion des Immunsystems leisten. Ihre Entdeckung geht zurück auf die Demonstration einer Lecithinase-Aktivität des α -Toxins aus *Clostridium perfringens* (Macfarlane & Knight, 1941). Bei dem Substrat von Phospholipasen handelt es sich um Glycerophospholipide, welche den Haupt-Lipidbestandteil eukaryotischer Zellen ausmachen. Je nach Kopfgruppe wird das

Glycerophospholipid einer Phospholipid-Klasse zugeteilt: Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylinositol (PI). Phospholipasen werden anhand ihrer Spaltstelle im Phospholipid klassifiziert. Diese umfassen Carboxylesteracyl Hydrolyasen, Phospholipase C (PLC) und Phospholipase D (PLD). Carboxylesteracyl Hydrolyasen werden weiter unterteilt in Phospholipase A (PLA), Phospholipase B (PLB) und Lysophospholipase A (LPLA). PLAs hydrolysieren den Fettsäureester zwischen einer Fettsäure und dem Glycerin. Wird die Fettsäure an der Position *sn-1* abgespalten handelt es sich um eine PLA₁. Wird dagegen die Fettsäure an der Position *sn-2* abgespalten, spricht man von einer PLA₂. PLB kann hingegen sowohl an Position *sn-1*, als auch an Position *sn-2* hydrolysieren. Nach PLA₁- und PLA₂-Hydrolyse kann mittels der LPLA die verbleibende Fettsäure abgespalten werden. Bei PLC und PLD handelt es sich hingegen um Phosphorsäurediester Hydrolyasen. Sie spalten entweder die Phosphodiesterbindungen zwischen Glycerin und Phosphatgruppe (PLC) oder die Phosphodiesterbindungen zwischen Phosphatgruppe und der Kopfgruppe (PLD) (Flores-Díaz et al., 2016) (Abbildung 9).

Phospholipasen produzieren aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität eine große Bandbreite an biologisch aktiven Reaktionsprodukten. Carboxylesteracyl Hydrolyasen produzieren beispielsweise über die Spaltung von PC, PE und PI Arachidonsäure, welche selbst ein wichtiges *second messenger* Molekül ist, aber auch zur Produktion von weiteren Signalmolekülen wie Prostaglandine dient (Hanna & Hafez, 2018). Das pathogene Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* nutzt ExoU, eine PLA₂, als Virulenzfaktor zur Induktion des Zusammenbruchs des Cytoskeletts der Wirtszelle. Bei späteren Zeitpunkten induziert ExoU eine Bläschenbildung der Membran und letztendlich den Verlust der Plasmamembranintegrität (Sato & Frank, 2014).

PLD produziert dagegen aufgrund ihrer Spalteigenschaften eine freie Kopfgruppe und eine Phosphatidsäure, ein Signalmolekül, welches zu Diacylglycerin (DAG) weiter konvertiert werden kann. Auch PLDs spielen für einige pathogene Bakterien eine wichtige Rolle während der Infektion. PLDs aus *Acinetobacter baumannii* und *Neisseria gonorrhoeae* beispielsweise fördern die Invasion der Bakterien in die Wirtszelle (Edwards et al., 2003; Jacobs et al., 2010).

Durch die enzymatische Aktivität von PLC entsteht DAG und eine freie Kopfgruppe, welche eine Phosphatgruppe trägt. PLCs werden anhand ihrer Spezifität für die Hydrolyse verschiedener Kopfgruppen des Glycerophospholipids bestimmt. Dabei unterscheidet man zwischen Phosphatidylinositol (PI)-spezifische PLCs, Phosphatidylcholin (PC)-spezifische PLCs oder unspezifische PLCs. Handelt es sich bei dem Glycerophospholipid um Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) wird dieses zu Inositoltrisphosphat (IP₃) und DAG hydrolysiert. IP₃ spielt dabei als Signalmolekül eine wichtige Rolle in der Ca²⁺-

Homöostase der Wirtszelle, da es durch die Bindung am IP₃-Rezeptor des Endoplasmatischen Retikulums (ER) eine Freisetzung von ER-lokalisiertem Calcium (Ca²⁺) regulieren kann (Streb et al., 1983). PI-PLCs werden von einer Reihe von Gram-positiven Bakterien, wie beispielweise *Bacillus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium* spp. oder *Streptomyces* spp., produziert und katalysieren die Spaltung von Phosphatidylinositol und seinen phosphorylierten Derivaten zu DAG und phosphoryliertem *myo*-Inositol. Sie können aber auch Glykosyl-PI (GPI) schneiden und somit GPI-verankerte Proteine aus der Membran herauslösen (Griffith & Ryan, 1999). PC-PLCs lassen sich ebenfalls in einer Reihe von Gram-positiven Bakterien, wie beispielsweise in *Bacillus* spp. und *Listeria monocytogenes* finden. Sie katalysieren die Hydrolyse zu Phosphocholin (ChoP) und DAG (Flores-Díaz et al., 2016).

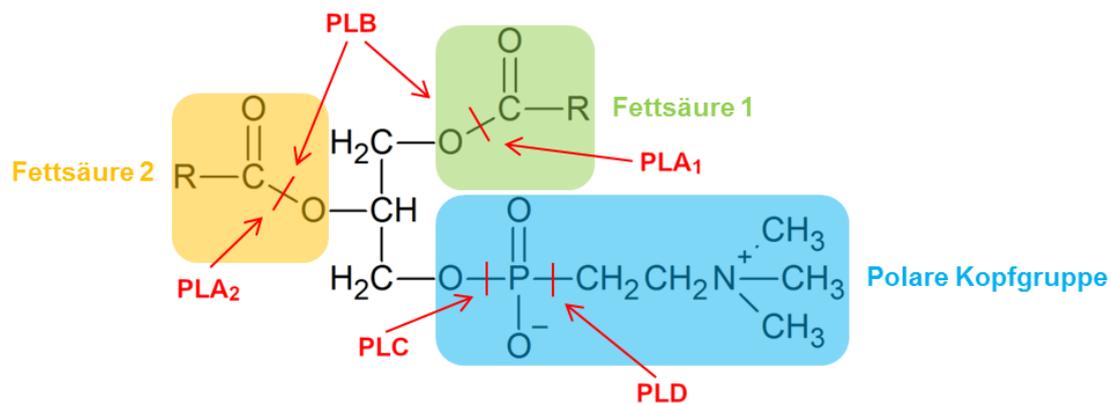


Abbildung 9 Spaltstellen von Phospholipasen, gezeigt anhand von Phosphatidylcholin.

2.6.1 Die Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase von *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes produziert zwei unterschiedliche Phospholipasen. Während es sich bei einer der beiden Phospholipasen um eine Phosphatidylinositol (PI)-PLC handelt, ist die zweite Phospholipase eine Phosphatidylcholin (PC)-PLC. Die Entdeckung der PI-PLC geht auf das Jahr 1991 zurück und wurde als PlcA bezeichnet, da es sich um die erste entdeckte Phospholipase in *L. monocytogenes* handelte (Leimeister-Wächter et al., 1991; Mengaud, Braun-Breton et al., 1991). Bei PlcA handelt es sich um ein sekretiertes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 36 kDa und zeigt eine Homologie von ca. 30% in der Primärstruktur mit den PI-PLCs von *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*. Außerdem zeigt sie einige Homologien zu eukaryotischen PI-PLCs, wie beispielsweise der PI-PLC aus *Trypanosoma brucei*, *Drosophila* und höheren Vertebraten, wie der Ratte (Mengaud, Braun-Breton, et al., 1991). Die Kristallstruktur von PlcA wurde entschlüsselt (Abbildung 10). PlcA

besteht aus einer einzelnen globulären Domäne, die sich zu einen $(\beta\alpha)_8$ -Fass (*TIM-barrel*) faltet. Dabei liegen die β -Stränge parallel im Zentrum des Proteins und bilden das „Fass“. Die α -Helices liegen auf der Außenseite zwischen den benachbarten β -Strängen. Anders als klassische *TIM-barrel*-Strukturen ist PlcA jedoch kein geschlossenes „Fass“, sondern hat eine Öffnung zwischen dem β -Strang V und VI. Außerdem fehlt je eine α -Helix zwischen den β -Strängen V und VI bzw. IV und VI. Das aktive Zentrum liegt am C-Terminus des Enzyms (Moser et al., 1997). Das pH-Optimum von PlcA liegt zwischen 5,5 und 6,5 und der isoelektrische Punkt liegt zwischen 9,2 und 9,6. Das Enzym ist sehr spezifisch für PI und zeigt sehr geringe, bis keine enzymatische Aktivität bei Verwendung von PC, Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PIP) oder Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP₂) als Substrat (Goldfine & Knob, 1992). Phosphatidylinositol (PI) wird von PlcA zu DAG und Inositol-1,2-zyklischesphosphat gespalten (Camilli, 2004). Außerdem ist das Enzym in der Lage GPI-verankerte Proteine in der eukaryotischen Membran zu hydrolysieren (Mengaud, Braun-Breton, et al., 1991). Diese Eigenschaft ist jedoch sehr schwach ausgeprägt aufgrund eines Fehlens des Vb β -Stranges, welcher für den Kontakt mit GPI verantwortlich ist (Gandhi et al., 1993; Wei et al., 2005).

PlcA unterstützt Listeriolysin O (LLO) für eine effiziente Freisetzung aus den intrazellulären Vakuolen nach Internalisierung. Dies ist jedoch nicht essentiell, da eine Deletion des PlcA-kodierenden Gens (*plcA*) keinen Einfluss auf die vakuoläre Freisetzung der Bakterien hat (Camilli et al., 1993). Wahrscheinlich unterstützt PlcA LLO durch die Hydrolyse von PI in der vakuolären Membran. Das Ausüben dieser Funktion wird durch das saure pH-Optimum von PlcA unterstützt und bestätigt (Goldfine & Knob, 1992). Mechanistisch führt die enzymatische Aktivität von PlcA zur Produktion von DAG, welches wiederum die Translokation der Wirtszellen Proteinkinase C Isoform β (PKC β) in intrazellulären Vakuolen induziert und mit ihrer Reifung interferiert (Poussin et al., 2009; Wadsworth & Goldfine, 2002). PlcA scheint ebenfalls eine Rolle während der intrazellulären Replikation zu spielen. Eine heterologe Expression von PlcA im nicht-pathogenen *Listeria innocua* zeigte nämlich ein erhöhtes intrazelluläres Überleben und Wachstum (Schwan et al., 1994). *L. monocytogenes* reguliert durch die Expression von PlcA auch Wirtszell-Signaltransduktionskaskaden. So führt die Produktion von DAG zur Aktivierung von Wirtszell-eigenen sauren Sphingomyelinasen, die ihrerseits durch die Hydrolyse von Sphingomyelin Ceramid produzieren. Ceramid selbst wirkt als *second Messenger*-Molekül indem es NF κ B-abhängig die Expression von E-Selektin erhöht (Hauf et al., 1997; Schwarzer et al., 1998). Weiterhin ist eine Rolle von PlcA in der Veränderung der inflammatorischen Antwort der Wirtszelle beschrieben. In diesem Zusammenhang induziert PlcA die Aktivierung der NOX2 NADPH-Oxidase in primären Vakuolen (Lam et al., 2011). Außerdem induziert PlcA die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (Sibeliu et al., 1999a). Zuletzt wurde kürzlich auch ein Zusammenhang

zwischen PlcA und der Autophagie-Maschinerie der Wirtszelle beschrieben. Eine Reduktion des PIP₃-Levels durch die enzymatische Aktivität von PlcA in der Wirtszelle führt nämlich zu einem Stillstand der prä-autophagosomalen Strukturenbildung (Tattoli et al., 2013).

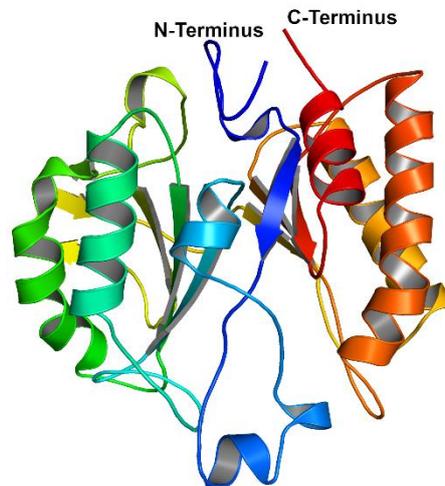


Abbildung 10 Kristallstruktur der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C aus *Listeria monocytogenes* (PDB 1AOD).

2.6.2 Die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase von *Listeria monocytogenes*

Neben PlcA exprimiert *Listeria monocytogenes* eine weitere Phospholipase. Bei dieser handelt es sich um die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase (PC-PLC), die auch als PlcB bezeichnet wird. Anders als bei PlcA handelt es sich bei PlcB um eine Zink (Zn²⁺)-abhängige Metallophospholipase, welche nach proteolytischer Spaltung ein Molekulargewicht von ca. 29 kDa hat. Die Hauptaufgabe von PlcB besteht in der Hydrolyse von Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE) und Phosphatidylserin (PS). Zu einem geringeren Maß kann auch Sphingomyelin (SM) hydrolysiert werden, jedoch kaum PI. Im Falle von PC als Substrat wird dieses in Diacylglycerin (DAG) und Phosphocholin (ChoP) gespalten (Geoffroy et al., 1991). Das pH-Optimum des Enzyms liegt zwischen 5,5 und 8,0 (Goldfine et al., 1993). Anders als für PlcA ist für PlcB bis heute keine Kristallstruktur entschlüsselt worden. Dennoch hat PlcB eine hohe Homologie zu den Metallophospholipasen von *Bacillus cereus* (39% Sequenzidentität) und *Clostridium perfringens* (22% Sequenzidentität), die beide kristallisiert wurden (Hough et al., 1989; Naylor et al., 1998; Vázquez-Boland et al., 1992). PlcB wird als inaktives Pro-Enzym mit einem Molekulargewicht von ca. 33 kDa synthetisiert und sekretiert. Erst durch proteolytische Spaltung wird PlcB unter sauren Bedingungen aktiviert (Marquis & Hager, 2000). Für diese proteolytische Spaltung ist die Metalloproteinase (Mpl) verantwortlich (Poyart et al., 1993; Raveneau et al., 1992). Mpl ist ein Zn²⁺-abhängiges Enzym, welches als ein ca. 57 kDa Prä-

Protein exprimiert wird. Die Aktivierung des Enzyms erfolgt erst im sauren Milieu durch einen autokatalytischen Prozess, sodass ein aktives Enzym mit einem Molekulargewicht von ca. 35 kDa gebildet wird (Bitar et al., 2008; Domann et al., 1991; Forster et al., 2011). Nach Aktivierung spaltet Mpl PlcB zwischen den Aminosäuren Serin 51 und Tyrosin 52 (Poyart et al., 1993). Mpl spielt ebenfalls eine Rolle in der Translokation von PlcB über die bakterielle Zellwand (Yeung et al., 2005). PlcB kann aber auch über eine Mpl-unabhängige Art und Weise aktiviert werden. Hierfür sind Wirtszell-eigene Cystein-Proteasen verantwortlich (Marquis et al., 1997).

Die Funktion von PlcB liegt in erster Linie darin *L. monocytogenes* die Freisetzung aus der sekundären Vakuole zu ermöglichen. Damit unterstützt das Enzym das Bakterium bei der Verbreitung in benachbarte Zellen (*cell-to-cell spread*) (Vázquez-Boland et al., 1992). Insbesondere bei Meningoenzephalitis, die durch *L. monocytogenes* induziert wird, spielt PlcB eine entscheidende Rolle im *cell-to-cell spread* (Schlüter et al., 1998). Weiterhin induziert PlcB durch die Produktion von DAG und Ceramid, in ähnlicher Weise wie auch PlcA, eine persistente Aktivierung von NFκB, welches wiederum die Expression von E-Selektin positiv reguliert (Hauf et al., 1997; Schwarzer et al., 1998). PlcB ist ebenfalls als Modulator von Ca²⁺-Signaltransduktionswegen beschrieben (Wadsworth & Goldfine, 1999). Außerdem übt PlcB einen Einfluss auf die zelluläre ROS-Produktion aus, da es als Aktivator der NOX2 NADPH-Oxidase in intrazellulären Vakuolen beschrieben wurde. (Lam et al., 2011). PlcB wurde auch, ebenso wie PlcA, eine Rolle in der Inhibition der Autophagie-Maschinerie zugesprochen, indem es prä-autophagosomale Strukturen arretiert. Hierfür verantwortlich ist die Reduktion des PIP₃-Levels durch PlcB (Tattoli et al., 2013).

2.7 Die Assoziation von Listeriolysin O und Phospholipasen C

Sowohl porenbildende Toxine als auch Phospholipasen C sind wichtige Virulenzfaktoren, die pathogenen Bakterien einen entscheidenden Vorteil in ihrer Pathogenese liefern. Dies liegt darin begründet, dass beide Protein-Familien in erster Linie das Ziel haben biologische Membranen zu überwinden. Im Falle von porenbildenden Toxinen geschieht dies durch Porenbildung und hieraus resultierender Destabilisierung der Membran. Bei Phospholipasen C geschieht dies hingegen durch enzymatischen Abbau der Membran. Obwohl beide Protein-Familien in dieser Hinsicht redundant in ihrer Hauptfunktion sind, exprimieren eine Vielzahl an pathogenen Bakterien sowohl ein porenbildendes Toxin als auch eine Phospholipase C. Hierzu zählen in erster Linie die Gattungen *Listeria*, *Bacillus* und *Clostridium*. Dabei können beide Protein-Familien entweder zusammenarbeiten und ihre Wirkung auf Membranen potenzieren oder aber auch entgegenwirken und sich somit regulieren. Im Fall von *Listeria monocytogenes* zeigen Studien, dass beides in der Tat der

Fall ist. So unterstützen beispielsweise Listeriolysin O (LLO) und PlcA das Bakterium in der Adhäsion an Int407 Zellen. Hierbei spielt zwar LLO die tragende Rolle, dennoch hat aber auch PlcA eine wichtige Rolle, da es den beobachteten Effekt potenziert (Krawczyk-Balska & Bielecki, 2005). Ein solcher Effekt der Aktivitätssteigerung zeigt sich ebenfalls an der durch LLO induzierten Efferozytose als alternativer *cell-to-cell spread*. Auch hier erhöhen sowohl PlcA als auch PlcB die Aktivität von LLO und inhibieren wahrscheinlich gleichzeitig auch Membranreparaturmechanismen (Czuczman et al., 2014). Gleichzeitig scheint aber auch während der Efferozytose sowohl PlcA als auch PlcB die Ausbildung von Phosphatidylserin-positiven Strukturen zu inhibieren (Czuczman et al., 2014). Ebenso regulieren die Phospholipasen LLO Aktivitäten, die nachteilig für die Zelle sein könnten. So schützt beispielsweise die Expression von PlcB vor LLO-induzierter mitochondrialer Fragmentierung und sowohl PlcA als auch PlcB reduzieren den durch LLO-induzierten Autophagie-Flux, indem sie prä-autophagosomale Strukturen vor ihrer vollständigen Ausbildung arretieren und somit dem Bakterium die Flucht vor Autophagie ermöglichen (Blank et al., 2014; Tattoli et al., 2013). Interessanterweise scheint PlcA ebenfalls die Aktivität von LLO in sekretierten, biologischen, extrazellulären Vesikeln zu reduzieren (Coelho et al., 2019). Ebenso kann aber auch die Aktivität von LLO die Phospholipasen regulieren. So ist beispielsweise bekannt, dass LLO die PlcB-abhängige Aktivierung NOX2 negativ reguliert (Lam et al., 2011).

Trotz der immer wieder beschriebenen wechselseitigen Interaktion beider Protein-Familien wurde dieses Phänomen immer nur am Rand beobachtet, jedoch nie intensiver untersucht. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass nur sehr wenig über die zugrundeliegenden Mechanismen bekannt ist.

3 Zielstellung

Listeria monocytogenes ist ein human-pathogenes Bakterium, welches die außerordentliche Fähigkeit besitzt in Wirtszellen zu invadieren und sich dort zu replizieren. Durch dieses Prinzip schafft es das Bakterium dem Immunsystem des Wirtsorganismus zu entgehen, da es sich ungesehen von einer Wirtszelle auf eine benachbarte Wirtszelle ausbreiten kann. Für diesen Prozess spielt das porenbildende- und Cholesterin-abhängige Toxin Listeriolysin O (LLO) eine entscheidende Rolle, da es die Freisetzung des Bakteriums aus primären Vakuolen ermöglicht und damit der Cytolyse durch die Wirtszelle entgeht. Interessanterweise führt die Sekretion von LLO, trotz seiner membranschädigenden- und cytotoxischen Eigenschaften, zu keiner nennenswerten Zerstörung der infizierten Zelle *in vivo*. Aus bakterieller Sicht ist das ein zentrales Prinzip der Infektion, da eine Zerstörung der Wirtszelle auch unmittelbar zu einer Zerstörung der replikativen Nische führen würde. Deshalb ist es erforderlich die Aktivität von LLO zu regulieren. Während eine Vielzahl an unterschiedlichen, regulatorischen Mechanismen der Wirtszelle auf LLO bekannt und charakterisiert wurden, sind nur wenige Bakterien-eigene regulatorische Mechanismen bekannt. Hierzu zählen die Regulation auf transkriptioneller Ebene und die Regulation der LLO-Sekretion.

Die hier vorliegende Arbeit hat sich in ihrem ersten Abschnitt mit der Frage nach bakteriellen Mechanismen der LLO Regulation beschäftigt mit dem Ziel neuartige und nicht charakterisierte bakterielle Mechanismen der LLO-Regulation aufzudecken.

Dieser Untersuchung zugrunde liegen allgemeine Prinzipien, welche bereits von anderen pathogenen Bakterien, wie beispielsweise von *Streptococcus pneumoniae*, verwendet werden. Diese binden beispielsweise Phosphocholin (ChoP) an ihren Oberflächenproteinen oder Glykanen und nutzen dieses aktiv für die Immunsuppression und für die Evasion zellulärer Immunantworten. Für *L. monocytogenes* ist ein solcher Mechanismus bisher nicht bekannt. Da das Bakterium jedoch eine Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PlcB) exprimiert, kann es u.a. die Hydrolyse von Phosphatidylcholin zu ChoP katalysieren. Somit könnte auch lösliches ChoP, produziert durch die enzymatische Aktivität von PlcB, während der Infektion mit *L. monocytogenes* inhibitorisch wirken und vom Bakterium zur Evasion von zellulären Antworten genutzt werden. Da *L. monocytogenes* solche Wirtszellantworten maßgeblich durch die Sekretion von LLO induziert, soll untersucht werden, ob ChoP als ein regulatorisches Molekül für LLO fungieren könnte.

Eine mögliche regulatorische Funktion von PlcB soll dabei durch eine Kombination aus *in vitro* Infektionsmodellen mit *L. monocytogenes* Wildtyp und dazugehörigen isogenen Mutanten sowie mit biochemischen Experimenten mit gereinigten Proteinen (LLO, PlcA, PlcB) untersucht werden. Hierbei sollen vor allem LLO-abhängige Wirtszellantworten, wie

physiologische und morphologische Veränderungen von Organellen, aber auch apoptotische Veränderungen untersucht werden. In diesem Kontext soll auch untersucht werden, ob weitere körpereigene Moleküle, wie Phospholipide und Heparin eine mögliche regulatorische Funktion auf LLO ausüben.

Weiterhin ist für *S. pneumoniae* gezeigt, dass ChoP, neben seinen immunsuppressiven Eigenschaften, auch als Adhäsionsmolekül für die Anheftung der Bakterien an die zelluläre Oberfläche genutzt wird. Deshalb soll in einem zweiten Teil, der hier vorliegenden Arbeit, ebenfalls untersucht werden, ob ChoP auch während der Infektion mit *L. monocytogenes* eine Rolle in der Adhäsion und/oder Invasion der Wirtszelle spielt. Zur Beantwortung dieser Frage sollen *in vitro* Infektionsmodelle mit unterschiedlicher Zelllinien unter Verwendung von *L. monocytogenes* Wildtyp und isogenen Mutanten sowie durch Zugabe von löslichem ChoP verwendet werden. Bei einer möglichen Beteiligung von ChoP soll in einem weiteren Schritt ein putativer Rezeptor für eine ChoP-Rezeptor-Interaktion ermittelt werden.

4 Material

4.1 Geräteliste

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Geräte verwendet.

Tabelle 2 In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
8-Kanalpipette	Biozym
Absaugpumpe	KNF
Abzug	Wesemann Laboreinrichtungen
Agarose Gelkammer	Konstruktion der Werkstatt
Analysewaage	Kern
Autoklav	Schlumbohm Tuttenauer System (Tischautoklav)
Biacore X-100-Spektroskop	GE Healthcare
Biacore T-100-Spektroskop	GE Healthcare
Bunsenbrenner (Fireboy Eco)	Integra Bioscience
Brutschrank (37°C)	Memmert
Brutschrank (37°C und 5% CO ₂)	Thermo Fisher Scientific (S2) Heraeus (Zellkultur)
Digitalkamera	Nikon
Durchflusszytometer → C6 Accuri → FACSCalibur	BD Biosciences
Einfrierkammer für eukaryotische Zellen	Nalgene
Eismaschine	Ziegra
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	Biometra
Elektroporationsküvette	Invitrogen
Elektroporator	Bio-Rad Laboratories
Entwicklermaschine	Syngene (digital) AGFA (Röntgenfilme)
Feinwaage	Kern
Gefrierschrank (-20°C)	Bosch
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher Scientific
Geldokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories

Gerät	Hersteller
Heizblock	Jumo
Kolonienzähler	Interscience
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop	Leica Zeiss
Kühlschrank (4°C)	Liebherr
Lichtmikroskop (invers)	Hund Wetzlar
Magnetrührer	IKA
Mikroliterpipette	VWR Sartorius
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Tecan
Mikrovolumen-Spektrometer	Thermo Fisher Scientific
Mikrowelle	Sharp
Multipipette	Sartorius
Ofen	MWG-Biotech
pH-Meter	Mettler Toledo
Photometer	Biochrom
Pipettierhilfe	Integra Bioscience
Plattiertisch	Schuett Biotec
Plattenschüttler	IKA
Reinstwasseranlage	Merck Millipore
Rotationsverdampfer	Büchi
Röntgenfilmkassette	Amersham Bioscience
Schüttelinkubator	Sartorius
Schweißgerät	Polystar
Schwenktisch	Heidolph
Semi-Dry Blotter	Konstruktion der Werkstatt
Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific
Spannungsquelle	Consort
Sterilwerkbank	Nuaire
Thermocycler	Biometra
Thermomixer	Eppendorf
Thermo-Schüttelschrank (Certomat BS-1)	Sartorius
Vortexer	Scientific Industries
Wasserbad	Haake (S2)

Gerät	Hersteller
	Grant (Zellkultur)
Zentrifugen → Tischzentrifuge → Eppendorf-Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Eppendorf
Zählkammer (Neubauer)	Marienfeld

4.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3 In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien.

Materialien	Hersteller
12-well Zellkulturplatte	Falcon
24-well Zellkulturplatte	Falcon
6-well Zellkulturplatte	Falcon
96-well Rundboden Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One
96-well V-Boden Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One
Deckgläschen	Langenbrinck
Durchflusszytometerröhrchen	Sarstedt
Einmalkanülen	BD Terumo
Einmalspritzen	Braun
ELISA-Platten	Thermo Fisher Scientific
Extruder	T&T
Folie für 96-well Mikrotiterplatten	Excel Scientific
Glaspipette	Hirschmann
Impfösen	Sarstedt
Kryoröhrchen	Sarstedt (Bakterien) Nalgene (Zellkultur)
Küvetten	Sarstedt
Laborglaschflaschen	Schott
Messbecher	Vitlab
Messzylinder	Brand
Nitrilhandschuhe	Braun
Objektträger	Langenbrinck
Papiertücher (fusselfrei)	Kimberly-Clark
Parafilm	Bemis

Materialien	Hersteller
Pasteurpipette	Sarstedt
PCR-Streifen	Thermo Fisher Scientific
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
PVDF-Membran	Roche
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (15 und 50 ml)	Sarstedt
Röntgenfilme	GE Healthcare
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One
Sterilfilter (0,22 µM)	Merck Millipore
Whatman-Papier	Sigma-Aldrich
Zellkulturschalen (10 cm)	Falcon
Zellschaber	Sarstedt
Zetasizer	Malvern

4.3 Chemikalien, Inhibitoren, Enzyme

Tabelle 4 In dieser Arbeit verwendete Chemikalien, Inhibitoren und Enzyme.

Materialien	Hersteller	Katalognummer
2-Aminoethyldiphenylborat (2-APB)	Sigma-Aldrich	D9754
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich	T0565
A23187	Tocris	1234
Alkalische Phosphatase Substrat	Sigma-Aldrich	S0942
BAPTA-AM	Sigma-Aldrich	A1076
Betain	Sigma-Aldrich	B-2629
Carnitin	Sigma-Aldrich	C-9500
Cholesterin	Merck	3670
	Avanti Polar Lipids	700000
Cholin	Sigma-Aldrich	C7017
Coomassie Brilliant Blue R	Gerbu	1097
Digitonin	Fluka	37006
Dithiothreitol (DTT)	Roth	6908.3
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck	67-68-5
EGTA	Sigma-Aldrich	E4378
Fluo-4 AM	Thermo Fisher Scientific	F14217

Materialien	Hersteller	Katalognummer
Fluticasonpropionat	Tocris	2007
Glucuronsäure	Carbosynth	MG04046
Hanks' Balanced Salt Solution	Merck	L204S
Heparin	Santa Cruz Biotechnology	sc-203075
HiPerfect	Qiagen	301705
N-Acetylglykosamin	Sigma-Aldrich	A4106
N-Acetylglucosamin-2-Sulfat	Carbosynth	38899-05-7
N-Acetylglucosamin-6-Sulfat	Sigma-Aldrich	44001
Ly294002	Calbiochem	440202
PCA 4248	Tocris	0571
Phalloidin (Alexa Fluor 488-Konjugat)	Thermo Fisher Scientific	A12379
Phosphatylcholin	Sigma-Aldrich	P3556
Phosphocholin	Sigma-Aldrich	P0378
Phosphoserin	Sigma-Aldrich	P0878
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka	78830
POPC	Avanti Polar Lipids	850457C
ProLong Gold Antifade	Invitrogen	P36935
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich	P0914
Sphingomyelin	Santa Cruz Biotechnology	sc-201384
Staurosporin	Calbiochem	569397
Thapsigargin	Sigma-Aldrich	T9033
Trypsin/EDTA-Lösung	Merck	L2143
Triton X-100	Serva	37240.01
Tween-20	Serva	37470.01
U73122	Tocris	1268
Wasserstoffperoxid (30%)	Roth	8070

4.4 Antibiotika

Tabelle 5 In der vorliegenden Arbeit verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Verwendete Konzentration
Gentamicin	50 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml

4.5 Komplettausrüstungen

Tabelle 6 Komplettausrüstungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Komplettausrüstung	Hersteller	Katalognummer
Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit	Thermo Fisher Scientific	V13241
Bacto™ Dehydrated Agar	Becton Dickinson	214010
Bradford-Stammlösung	Bio-Rad Laboratories	500-0006
Brilliance™ Listeria Differential Supplement	Oxoid	SR0228E
CellEvent™ Caspase-3/7 Green Flow Cytometry Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	C10740
Free Cholesterol E kit	Wako Diagnostics	993-02501
MitoSOX™ Red Mitochondrial Superoxide Indicator	Thermo Fisher Scientific	M36008
MitoProbe™ JC-1 Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	M34152
Phospholipids C kit	Wako Diagnostics	997-01801
Proteinase-Inhibitor Cocktail	Calbiochem	539134

4.6 Antikörper

4.6.1 Primärantikörper

Tabelle 7 Liste der verwendeten Primärantikörper.

Antikörper	Herkunft	Hersteller	Katalognummer
anti-BiP	Kaninchen	Cell Signaling	3183
anti-Calnexin	Kaninchen	Abcam	ab10286
anti-Calreticulin	Kaninchen	Abcam	ab4
anti-CoxIV	Kaninchen	Abcam	ab16056
anti-Cytochrom c	Maus	BD Biosciences	556433
anti-GAPDH	Kaninchen	Cell Signaling	2118
anti-Gp96	Kaninchen	Enzo Life Sciences	ADI-SPA-851
anti-Gp96 [Phycoerythrin (PE)-konjugiert]	Ratte	Enzo Life Sciences	ADI-SPA-850PE
anti-Hsp60	Maus	Santa Cruz Biotechnology	sc-13115
anti-LLO	Kaninchen	Abcam	ab200538

Antikörper	Herkunft	Hersteller	Katalognummer
anti-LLO	Maus	Eigene Herstellung	/
anti-Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Kaninchen	GeneTex	GTX22872
anti-PAF	Kaninchen	Biorbyt	orb11225
anti-PDI	Maus	Enzo Life Sciences	SPA-891
anti-PlcA	Maus	Eigene Herstellung	/
anti-PlcB	Maus	Eigene Herstellung	/

4.6.2 Sekundärantikörper

Tabelle 8 Liste der verwendeten Sekundärantikörper.

Antikörper	Herkunft	Hersteller	Katalognummer
anti-Kaninchen IgG (488)	Ziege	Cell Signaling	4412
anti-Kaninchen IgG (674)	Ziege	Cell Signaling	4414
anti-Kaninchen IgG (AP)	Ziege	Jackson ImmunoResearch	111-055-003
anti-Kaninchen IgG (HRP)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	sc-2004
anti-Maus IgG (488)	Ziege	Cell Signaling	4408
anti-Maus IgG (674)	Ziege	Cell Signaling	4410
anti-Maus IgG (AP)	Ziege	Jackson ImmunoResearch	115-055-003
anti-Maus IgG (HRP)	Ziege	Santa Cruz Biotechnology	sc-2005

4.7 Zellkulturmedien und Fetales Kälberserum (FKS)

Tabelle 9 Liste der verwendeten Zellkulturmedien.

Medium/Serum	Hersteller	Katalognummer
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco	31885
Minimum Essential Medium Eagle (MEM)	Gibco	31095
Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640)	Gibco	21875
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom	SO115

4.8 Lösungen und Puffer

Äquibrier-Puffer:

Tris	10 mM
NaCl	140 mM

Brain-Heart-Infusion (BHI)-Flüssigmedium:

BHI (Becton Dickinson)	3,7% (w/v)
------------------------	------------

BHI-Agarplatten:

BHI-Flüssigmedium	1x
Agar (Becton Dickinson)	1,5% (w/v)

Blotpuffer 1:

Tris	30 mM
Methanol	10% (v/v)

Blotpuffer 2:

Tris	25 mM
Methanol	10% (v/v)

Blotpuffer 3:

6-Amino-N-Hexansäure	40 mM
Methanol	10% (v/v)

Ca²⁺-Puffer:

NaCl	140 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂	1,2 mM
CaCl ₂	1,3 mM
Glukose	5,5 mM
HEPES	10 mM
	pH 7,4

Calcein-Puffer:

Calcein	80 mM
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	150 mM

Coomassie Brilliant Blau-Entfärber:

Methanol	40% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)

Coomassie Brillant Blau-Färber:

Methanol	40% (v/v)
Eisessig	10% (v/v)
Coomassie Brillant Blue R	8 Tabletten

Elektrochemilumineszenz (ECL)-Detektionsreagenz:**Lösung A:**

Tris-HCl, pH 8,6 (0,1 M)	200 ml
Luminol	1,4 mM

Lösung B:

para-Hydroxycoumarinsäure	6,7 mM
---------------------------	--------

In DMSO lösen

ELISA-Entwickler:

MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5 mM
Diethanolamin	9,7% (v/v)

frisch dazu: 1 Tablette alkalische Phosphatase Substrat (S0942; Sigma-Aldrich)

IF-Puffer:

PBS	1x
BSA	1%
Triton X-100	0,3%

Lysogeny Broth (LB)-Flüssigmedium :

Trypton	10% (w/v)
Hefeextrakt	5% (w/v)
NaCl	170 mM

LB-Agarplatten:

LB	1x
Agar	1,5% (w/v)

LUV/MLV-Puffer:

Tris	10 mM
NaCl	140 mM
	pH 7,4

Phosphat-gepufferte Saline (PBS) (1x):

NaCl	139 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,8 mM
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	10 mM

Plasmamembran-Permeabilisierungs-Puffer:

PBS	1x
KCl	80 mM

frisch dazu: 200 µg/ml Digitonin

RIPA-Lysepuffer:

Tris HCl, pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	1%
Na-Deoxycholat	1%
SDS	0,1 %

frisch dazu: 1 mM PMSF; 1:80 Proteinase-Inhibitor Cocktail

SDS-Acrylamidgele:**Trenngel:**

Für 2 Gele	7,5%	10%	12,5%
Tris (1,5 mM, pH 8,8)	3,3 ml	3,3 ml	3,3 ml
Acrylamid-Lösung (30%)	3,3 ml	4,2 ml	5,6 ml
SDS (10%)	133,3 µl	133,3 µl	133,3 µl
H ₂ O	6,5 ml	5,4 ml	4,2 ml
TEMED	6,7 µl	6,7 µl	6,7 µl
APS (10%)	100 µl	100 µl	100 µl

Sammelgel:

Für 2 Gele	5,7%
Tris (0,5 mM, pH 6,8)	1,7 ml
Acrylamid-Lösung (30%)	1,3 ml
SDS (10%)	66,7 µl
H ₂ O	3,6 ml
TEMED	2,3 µl
APS (10%)	66,7 µl

SDS-Laufpuffer (10x):

Tris	300 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1% (w/v)

SDS-Probenpuffer (5x):

Tris-HCl, pH 6,8	62,5 mM
Glycerin	20% (v/v)
SDS	2% (w/v)
β -Mercaptoethanol	20% (v/v)
Bromphenolblau	0,125% (w/v)

Stripp-Puffer:

NaOH	10 mM
DTT	0,5% (w/v)
SDS	2% (w/v)

Tris-gepufferte Saline (TBS) (10x):

Tris-HCl, pH 8,0	100 mM
NaCl	1500 mM

TBS-T (1x):

TBS	1x
Tween-20	0,1% (v/v)

Zellyse-Puffer:

Tris-HCl, pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
EGTA	2 mM
Triton X-100	0,2%
Tween-20	0,3%

frisch dazu: 1:80 Proteinase-Inhibitor Cocktail

5 Methoden

5.1 Arbeiten mit Bakterien

Alle Arbeiten mit Bakterien erfolgten unter einer Sterilwerkbank unter Verwendung von sterilen Puffern und Medien, sowie Reaktionsgefäßen und Glaswaren.

5.1.1 Verwendete Bakterienstämme

In Tabelle 10 sind alle Bakterienstämme aufgelistet, welche Relevanz für diese Arbeit haben.

Tabelle 10 In dieser Arbeit verwendete Bakterien.

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e	Serotyp 1/2a	(Glaser et al., 2001)
<i>Listeria monocytogenes</i> $\Delta actA$	Serotyp 1/2a, $\Delta actA$	(Chakraborty et al., 1995)
<i>Listeria monocytogenes</i> Δhly	Serotyp 1/2a, Δhly	(Guzman et al., 1995)
<i>Listeria monocytogenes</i> $\Delta inIA$	Serotyp 1/2a, $\Delta inIA$	(Lingnau et al., 1995)
<i>Listeria monocytogenes</i> $\Delta inIB$	Serotyp 1/2a, $\Delta inIB$	(Lingnau et al., 1995)
<i>Listeria monocytogenes</i> $\Delta plcA$	Serotyp 1/2a, $\Delta plcA$	(Schwarzer et al., 1998)
<i>Listeria monocytogenes</i> $\Delta plcB$	Serotyp 1/2a, $\Delta plcB$	(Guzman et al., 1995)
<i>Listeria monocytogenes</i> $\Delta plcA$ $\Delta plcB$	Serotyp 1/2a, $\Delta plcA$ $\Delta plcB$	[*]
<i>Listeria innocua</i>	Serotyp 6a, CLIP11262	(Glaser et al., 2001)
<i>Listeria innocua</i> $\Delta lgt::plcA$	Serotyp 6a, CLIP11262, <i>plcA</i>	(La Pietra et al., 2020)
<i>Listeria innocua</i> $\Delta lgt::plcB$	Serotyp 6a, CLIP11262, <i>plcB</i>	(La Pietra et al., 2020)
<i>Escherichia coli</i>	DH10 β (K12)	GIBCO
<i>Bacillus subtilis</i>	Stamm 168	(Kunst et al., 1997)

* Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig Universität Gießen.

5.1.2 Kultivierung von Bakterien

Alle verwendeten *Listeria* und *Bacillus subtilis*-Stämme wurden in BHI-Flüssigmedium kultiviert. *Escherichia coli*-Stämme wurden in LB-Flüssigmedium kultiviert. Zur Vermehrung

von *Listeria*, *E. coli* und *B. subtilis* wurden 10 ml des jeweiligen Mediums mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. Zur Langzeitaufbewahrung wurden 500 µl einer bakteriellen Übernachtskultur zu 500 µl Glycerin gegeben und in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aufbewahrung erfolgte in einem -80°C Gefrierschrank.

5.1.3 Wachstumskurven von Bakterien

Wachstumskurven wurden mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes durchgeführt. Dabei wurde zunächst eine Übernachtskultur der Bakterien angesetzt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 1:50 in 5 ml Nähmedium verdünnt und bei 6000 rpm für 5 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet im gleichen Volumen in Nähmedium aufgenommen. Je 200 µl der Bakteriensuspension wurden in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Nähmedium ohne Zugabe von Bakterien wurde als Nullwert verwendet. Für jeden Ansatz wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 600 nm in einem kinetischen Intervall von 20 min und einer Temperatur von 37°C. Vor jeder Messung wurde die Mikrotiterplatte 200 s mit einer Amplitude von 4 mm geschüttelt.

5.1.4 Bestimmung der Anzahl an Bakterien bei einer optischen Dichte von 1

Für die Infektion von eukaryotischen Zellen mit *E. coli* und *B. subtilis* ist es notwendig die absolute Anzahl an Bakterien bei einer bestimmten optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$) zu kennen. Um die Anzahl der Bakterien bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 1 zu bestimmen, wurden Übernachtskulturen von *E. coli* und *B. subtilis* angesetzt und am Folgetag 50 ml Nähmedium 1:50 mit diesen inokuliert. Anschließend wurden diese Tageskulturen bei 37°C und 180 rpm in einem Schüttelinkubator inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurde 1 ml der Bakteriensuspension abgenommen und mit Hilfe eines Photometers die OD bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Bei Erreichen einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 1 wurde die Bakteriensuspension in 1x PBS verdünnt und auf Agarplatten mit dem jeweiligen Nähmedium plattiert. Abschließend wurden die Agarplatten über Nacht bei 37°C inkubiert und durch Auszählen der Kolonien die Anzahl an lebenden Bakterien pro Milliliter bestimmt.

5.1.5 Fraktionierung von bakteriellen Proteinen

Zur Isolierung von sekretierten Proteinen und Zellwandproteinen wurden zunächst Übernachtskulturen von Bakterien, wie in 5.1.2 beschrieben, angesetzt. Am darauffolgenden Tag wurde, ausgehend von der Übernachtskultur, eine 20 ml Tageskultur von BHI-Medium 1:200 inokuliert und bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 180 rpm für 12 h inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde anschließend auf zwei 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt, bei 6000 rpm für 20 min und 4°C zentrifugiert und die Überstände zusammengeführt. Durch Zugabe von 10% Trichloressigsäure (TCA) und Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die sekretierten Proteine aus der Lösung gefällt. Die gefällten Proteine wurden am darauffolgenden Tag bei 600 rpm für 20 min und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 200 µl 1 M Tris-Puffer (pH 8,8) gelöst und die sekretierten Proteine bei -20°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Die Isolierung von Zellwandproteinen erfolgte durch Resuspension des bakteriellen Pellets aus dem 50 ml Reaktionsgefäß in 5 ml 1x PBS. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 6000 rpm für 20 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 0,9 ml 1% (w/v) SDS in 1x PBS (sterilfiltriert mit einem 0,22 µm Filter) resuspendiert. Diese Bakteriensuspension wurde nun in einem Schüttelinkubator bei 180 rpm für 45 min bei 37°C inkubiert. Die SDS-behandelte Bakteriensuspension wurde anschließend bei 13000 rpm für 20 min bei RT zentrifugiert, 900 µl des Überstandes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und Zellwandproteine durch Zugabe von 10% TCA über Nacht bei 4°C gefällt. Am darauffolgenden Tag wurde die Proteinlösung bei 13000 rpm für 20 min bei RT zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Proteinpellet luftgetrocknet. Durch Zugabe von 50 µl 1 M Tris-Puffer (pH 8,8) wurden die Zellwandproteine abschließend gelöst und bei -20°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

5.1.6 Vorbereitung von Bakterien für Infektionen

Bakterien, welche für Infektionsversuche verwendet wurden, wurden ausgehend von einer 10 ml Übernachtskultur in Nährmedium am Tag der Infektion in 10 ml BHI-Medium 1:50 inokuliert und bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,8-1,0 bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde für Listerien die Anzahl an Bakterien pro Milliliter Nährmedium über Formel 1 bestimmt und das entsprechende Volumen an Bakteriensuspension abgenommen. Für *E. coli* und *B. subtilis* wurde dagegen die zuvor ermittelte Anzahl an Bakterien bei einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 1 zur Berechnung des benötigten Volumens verwendet (5.1.4). Die errechneten Volumina an Bakteriensuspensionen wurden anschließend in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das bakterielle Pellet in 500 µl 1x Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) resuspendiert. Nach

einem weiteren Waschschrift wurde abschließend das Pellet in Zellkulturmedium mit 0,5% FKS aufgenommen und für die Infektion der Zellen verwendet.

Bestimmung der bakteriellen Zellzahl von Listerien pro Milliliter Nährmedium:

Formel:

$$(629,59 \times OD_{600\text{ nm}})^2 + 331,69 \times OD_{600\text{ nm}} + 109,22$$

5.2 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

5.2.1 Verwendete Zelllinien

In Tabelle 11 sind alle Zelllinien aufgelistet, welche Relevanz für diese Arbeit haben.

Tabelle 11 In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	Verwendetes Medium
CaCo2	Epithelzellen eines Colonkarzinoms (<i>H. sapiens</i>)	MEM, 10% FKS
HeLa	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (<i>H. sapiens</i>)	DMEM; 10% FKS
L929	Fibroblasten (<i>M. musculus</i>)	RPMI 1640; 10% FKS
MCF-7	Epithelzellen eines Brustkarzinoms (<i>H. sapiens</i>)	DMEM; 10% FKS
P388D1	Makrophagen eines Lymphoma (<i>M. musculus</i>)	RPMI 1640; 10% FKS
Vero	Epithelzellen aus der Niere (<i>Chlorocebus</i>)	DMEM; 10% FKS

5.2.2 Kultivierung von Zelllinien

Die Zellen wurden in 10 cm-Schalen in Medium, angereichert mit 10% FKS, bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Für Versuche wurden diese in Zellkulturschalen mit unterschiedlichen Kavitätsgrößen überführt und bis zu einer Konfluenz von 90-100% kultiviert.

5.2.3 Passagieren und Subkultivieren von Zellen

Zur Passage/Subkultivierung der Zellen wurde zunächst das Zellkulturmedium abgesaugt. Die adhärennten Zellen wurden anschließend mit 1x HBSS gewaschen und durch Zugabe von 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C und 5% CO₂ solange inkubiert bis sich diese von der

Zellkulturschale lösten (Abrundung der Zellen im mikroskopischen Bild). Die Reaktion wurde durch Zugabe des gleichen Volumens an FKS-haltigem Zellkulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen überführt. Durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 2 min bei RT wurden die Zellen anschließend pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in frischem, FKS-haltigem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellen konnten nun im gewünschten Verhältnis passagiert werden. Zum Subkultivieren der Zellen wurde die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt, die gewünschte Zellzahl eingestellt und die Zellsuspension in Zellkulturschalen mit unterschiedlichen Kavitätsgrößen verteilt (Tabelle 12). Die Inkubation der Zellen erfolgte dabei weiterhin bei 37°C und 5% CO₂ bis die gewünschte Konfluenz erreicht wurde.

Tabelle 12 Ausgesäte Zellzahl zum Erreichen von konfluenten 12-well Zellkulturplatten nach der angegebenen Inkubationszeit.

Zelllinie	Zellzahl pro well einer 12-well Zellkulturplatte	Inkubation
CaCo2	2,8 x 10 ⁵	16-20 h
HeLa	2,4 x 10 ⁵	16-20 h
L929	2,0 x 10 ⁵	16-20 h
MCF-7	6,0 x 10 ⁵	16-20 h
P388D1	6,0 x 10 ⁵	16-20 h
Vero	4,6 x 10 ⁵	16-20 h

5.2.4 Lagerung und Auftauen von Zellen

Die Langzeitlagerung von eukaryotischen Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Hierzu wurden die Zellen einer konfluenten 10 cm-Zellkulturschale durch Zugabe von 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung von der Oberfläche gelöst. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in einer Lösung aus 90% FKS und 10% DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen in eine Einfrierkammer überführt. Diese wurde anschließend für 24 h bei -80% zunächst schonend eingefroren. Abschließend wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der eingefrorenen Zellen erfolgte in einem Wasserbad bei 37°C. Die Zellsuspension wurde in 10 ml frisches Zellkulturmedium mit 10% FKS überführt und bei 37°C und 5% CO₂ für 1-2 h inkubiert. Nach Absetzen der Zellen auf der Oberfläche der Zellkulturschale wurde zur Entfernung des DMSO (cytotoxisch) das Zellkulturmedium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt.

5.2.5 Infektion von eukaryotischen Zellen

Für die Infektion von humanen Zellen mit Bakterien wurden diese einen Tag vor Infektion in geeignete Zellkulturschalen ausgesät (Kapitel 5.2.3). Sobald die Zellen eine Konfluenz von 90-100% erreicht hatten, wurden diese für Versuche verwendet. Zwei Stunden vor Infektion wurden die Zellen einmal mit 1x HBSS gewaschen und frisches Zellkulturmedium zugegeben. Gleichzeitig wurde die Zellzahl, durch Verwendung einer Neubauer Zählkammer, bestimmt. Abschließend wurden die Zellen kurz vor Infektion dreimal mit HBSS gewaschen und 0,5% FKS-haltiges Zellkulturmedium zugegeben. Infektionen erfolgten bei einer Multiplizität der Infektion von zehn (MOI 10) für unterschiedliche Zeitpunkte bei 37°C und 5% CO₂. Für Infektionsversuche in Anwesenheit von unterschiedlichen Chemikalien wurden diese entweder mit den Zellen vorinkubiert oder zeitgleich mit den Bakterien zu den Zellen hinzugegeben. Nach gewünschter Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen dreimal mit HBSS gewaschen und mit Zellkulturmedium, welches 50 µg/ml des bakterizides Gentamicin enthielt, für 15 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Gentamicin-Behandlung wurden die Zellen dreimal mit 1x HBSS gewaschen und durch Zugabe von H₂O mit 0,1% Triton X-100 für 20 min bei RT lysiert. Anschließend wurde das Zelllysate, welches die intrazellulären Bakterien enthielt, auf BHI-Agarplatten ausplattiert und die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert. Als interne Kontrolle wurde zusätzlich das Inokulum ausplattiert. Zur Bestimmung der Anzahl an intrazellulären Bakterien wurde die Anzahl der Kolonien ausgezählt und die koloniebildende Einheit (*colony forming unit*, CFU) ermittelt.

5.2.6 Adhäsion von Bakterien an die zelluläre Oberfläche

Die Bestimmung des Adhäsionsverhaltens von Bakterien an die zelluläre Oberfläche erfolgte in ähnlicher Weise wie für die Infektion von humanen Zellen beschrieben (Kapitel 5.1.6; 5.2.5). Hier wurde zusätzlich ein zweiter Ansatz durchgeführt. Bei diesem wurde nach der Infektionszeit das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen viermal mit 1x HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von H₂O mit 0,1% Triton X-100 für 20 min bei RT lysiert. Die Bestimmung der adhärenenten Bakterien erfolgte durch Subtraktion der CFU der intrazellulären Bakterien von der CFU der Oberflächen-Bakterien.

5.2.7 Behandlung von Zellen mit porenbildenden Toxinen

Zur Behandlung von Zellen mit verschiedenen porenbildenden Toxinen wurden die Zellen vor Zugabe in geeignete Zellkulturschalen ausgesät (Kapitel 5.2.3). Zwei Stunden vor

Toxinbehandlung wurden die Zellen einmal mit 1x HBSS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium (+ 10% FKS) versetzt. Direkt vor Toxinzugabe wurden die Zellen nochmals fünfmal mit 1x HBSS gewaschen und das Zellkulturmedium durch solches ohne FKS ersetzt, da freies Cholesterin, welches sich im FKS befindet, zur Inaktivierung der porenbildenden Toxine führt (Jacobs et al., 1998). Die Toxine selbst wurden vor Zugabe mit 5 mM DTT in Zellkulturmedium ohne FKS für 10 min bei RT reduziert und anschließend für die Behandlung von Zellen verwendet.

5.2.8 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, welches es erlaubt in kurzer Zeit eine große Anzahl an Zellen zu quantifizieren und zu analysieren. Dabei lassen sich eine Vielzahl an physikalischen Merkmalen von Zellen oder anderen Partikeln, wie z.B. Mikroorganismen, Nuclei und Chromosomen (DNA) untersuchen. Die Grundlage hierfür bildet ein Flüssigkeitsstrom, in dem sich die zu untersuchenden Zellen oder Partikel fokussieren. Dieser Flüssigkeitsstrom setzt sich dabei aus dem Hüllstrom einer Laufflüssigkeit (z.B. PBS) und dem Probenstrom zusammen. Aus der Druckdifferenz zwischen dem Hüllstrom und dem Probenstrom ergibt sich ein Koaxialstrom. Dabei ist der Druck des Probenstroms immer höher als der Druck des Hüllstroms, sodass sich die zu untersuchenden Zellen oder Partikel hintereinander aufreihen und somit einzeln nacheinander durch den Messbereich eines Laserstrahls geführt werden. Damit ist eine uniforme Belichtung der Zellen oder Partikel möglich, welche als hydrodynamisches Fokussieren bezeichnet wird. Das Licht, welches dabei auf die Zellen oder Partikel trifft, wird gestreut, was als Lichtstreuung bezeichnet wird. Für die Lichtstreuung sind dabei Membranen, Nucleus, Granularität der Zelle, Form der Zelle und/oder die Oberflächentopographie verantwortlich. Dabei werden zwei unterschiedliche Arten an Lichtstreuung unterschieden: das Vorwärtsstreulicht (Forward side scatter; FSC) und das Seitwärtsstreulicht (Side scatter; SSC). Bei dem FSC handelt es sich um die Beugung des Lichtes entlang der Achse der Lichtquelle und ist ein Maß für die Größe der Zelle oder des Partikels. Bei dem SSC handelt es sich hingegen um die Brechung des Lichtes im rechten Winkel zur Lichtquelle und ist ein Maß für die Granularität der Zelle oder des Partikels. Als Lichtquelle werden dabei Laser mit unterschiedlichen Intensitäten verwendet. In der Regel besitzen Durchflusszytometer einen Argonlaser (Anregungswellenlänge von 488 nm), sowie eine Diode für den Infrarotbereich (Anregungswellenlänge 640 nm). Mit Hilfe dieser Laser können neben FSC und SSC auch Fluorochrome angeregt werden. Dadurch lassen sich neben Form, Größe und Granularität auch Fluoreszenzeigenschaften, entweder aus Eigenfluoreszenz oder Fluoreszenz von Fluorophor-gekoppelten Antikörpern oder Farbstoffen, detektieren. Sowohl FSC als auch

SSC und Fluoreszenzemission werden anschließend von einem Detektor registriert und ausgewertet. Dies führt zu einer großen Anzahl an quantitativen Informationen in einer kurzen Zeit, sodass schnell repräsentative Informationen über eine gesamte Zellpopulation erhalten werden können.

5.2.8.1 Translokation von Chaperonen zur zellulären Oberfläche

Für Untersuchungen des Translokationsverhaltens von unterschiedlichen Chaperonen an die zelluläre Oberfläche wurden HeLa Zellen einen Tag vor Versuchsdurchführung in geeignete Zellkulturschalen ausgesät und bei 37°C und 5% CO₂ bis zu einer Konfluenz von 90-100% inkubiert (siehe 5.2.3). Am Versuchstag wurden die Zellen einmal mit 1x HBSS gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium mit 10% FKS für weitere 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den DTT-aktivierten porenbildenden Toxinen LLO (100 ng/ml oder 150 ng/ml) bzw. PLY (400 ng/ml), mit PlcA (1-20 µg/ml), PlcB (1-20 µg/ml), A23187 (10 µM) oder H₂O₂ (50 mM) behandelt. Für Infektionen wurden die Zellen mit *Listeria monocytogenes* Wildtyp (wt) bzw. isogenen Mutanten für unterschiedliche Zeitpunkte und ohne Gentamicin-Zugabe bei 37°C und 5% CO₂ infiziert. Für Versuche mit Vorbehandlungen wurden HeLa Zellen mit BAPTA-AM (60 µM), EGTA (750 µM), Thapsigargin (TG, 200 nM), 2-APB (100 µM) oder U73122 (5 µM, 10 µM) für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ vorbehandelt. Nach Behandlung oder Infektion wurden die Zellen mit einem Zellschaber von den Kavitäten der Zellkulturschale gelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 0,7 x g für 2 min bei 4°C pelletiert und insgesamt dreimal mit 1x PBS 0,1% BSA gewaschen. Anschließend wurden diese mit spezifischen primären Antikörpern für 30 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit PBS 0,1% BSA wurden die Zellen mit Fluorochrom-markierten sekundären Antikörpern für 30 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen weitere dreimal mit 1x PBS 0,1% BSA gewaschen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Datenpunkte wurden als Funktion der Fluoreszenzintensität (FL1 oder FL2) gegen das Vorwärtsstreulicht (FSC) aufgenommen. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating ausgeschlossen. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Behandlung oder Infektion analysiert.

5.2.8.2 Detektion der mitochondrialen reaktiven Sauerstoffspezies-Produktion

Zur Untersuchung der mitochondrialen Superoxid Produktion durch LLO, wurden HeLa Zellen entweder mit LLO und PlcA/PlcB behandelt oder mit *L. monocytogenes* wt und isogenen Mutanten infiziert. Für Toxinbehandlungen erfolgte die Inkubation mit LLO und

PlcB für 10 min bei 37°C und 5% CO₂. Für Infektionen wurden die Zellen für 4 h mit den Bakterien und ohne Gentamicin-Behandlung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Superoxid Induktion wurden die Zellen einmal mit warmen 1x HBSS gewaschen und anschließend mit 5 µM MitoSox in 1x HBSS für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1x HBSS gewaschen und von der Zellkulturschale abgeschabt. Mittels Durchflusszytometrie wurde die mitochondriale Superoxid Produktion analysiert. Zellen ohne bakterielle Infektion oder Toxinbehandlung wurden als Negativkontrolle verwendet. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating ausgeschlossen. Eine Zunahme des FL2-Signals wurde als Zunahme der ROS Produktion gewertet.

5.2.8.3 Detektion der mitochondrialen Fragmentierung

Die Detektion von mitochondrialer Fragmentierung in HeLa Zellen nach LLO und PlcB Behandlung oder nach Infektion mit *L. monocytogenes* wt und isogenen Mutanten erfolgte mittels MitoProbe™ JC-1 Assay Kit. Die Behandlungs- oder Infektionsdauer entsprach dabei den Zeitpunkten für die Detektion der mitochondrialen Superoxid Produktion (Kapitel 5.2.8.2). Nach Induktion mitochondrialer Fragmentierung wurden die Zellen von der Zellkulturschale abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 700 x g für 2 min und bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 1 ml DMEM ohne FKS mit 2 µM JC-1 für 20 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Bei JC-1 handelt es sich um einen membranpermeablen und mitochondrienspezifischen Farbstoff. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 1x HBSS gewaschen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zellen ohne bakterielle Infektion oder Toxinbehandlung wurden als Negativkontrolle verwendet. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon (CCCP, 50 µM) für 5 min bei 37°C und 5% CO₂ behandelt. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating ausgeschlossen. Eine Verschiebung der Fluoreszenzemission von rot zu grün zeigte einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (Ψ) als Marker für mitochondriale Fragmentierung an.

5.2.8.4 Detektion der Phosphatidylserin Umlagerung

Die Detektion einer Phosphatidylserin (PS) Umlagerung von der intrazellulären Membranseite zur extrazellulären Membranseite erfolgte mittels Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit. Diese Umlagerung kann nämlich durch spezifische Bindung von Annexin V an PS nachgewiesen werden. Für die Induktion der PS Umlagerung wurden die

Zellen mit *L. monocytogenes* wt oder isogenen Mutanten infiziert. Die Infektionsdauer entsprach dabei den Zeitpunkten für die Detektion der mitochondrialen Superoxid Produktion (Kapitel 5.2.8.2). Nach Infektion wurden die Zellen von der Zellkulturschale abgeschabt und mit 1x PBS gewaschen. Die anschließende Färbung erfolgte nach Herstellerangaben.

5.2.8.5 Detektion von Apoptose über Caspase 3/7 Aktivierung

Die Detektion von Apoptose in HeLa Zellen erfolgte durch Untersuchung der Aktivierung der Caspasen 3 und 7. Für die Induktion von Apoptose wurden die Zellen entweder mit LLO und PlcB behandelt oder mit *L. monocytogenes* wt und isogenen Mutanten infiziert. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 1,2 µM Staurosporin 1,5 h vor Ende der Infektionszeit behandelt. Die Behandlungs- und Infektionsdauer entsprach dabei den Zeitpunkten für die Detektion der mitochondrialen Superoxid Produktion (Kapitel 5.2.8.2). Nach Toxinbehandlung oder Infektion wurden die Zellen von der Zellkulturschale abgeschabt und mit 1 µl CellEvent® Caspase-3/7 Green Detektionsreagenz für 25 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Nachweis von Apoptose erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Zellen ohne bakterielle Infektion oder Toxinbehandlung wurden als Negativkontrolle verwendet. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating ausgeschlossen. Eine Zunahme des FL1-Signals wurde als Zunahme der Apoptose gewertet.

5.2.9 Calcium Messungen

Für Calcium (Ca²⁺)-Messungen wurden HeLa Zellen zunächst auf Deckgläschen und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Messungen einer Änderung der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration erfolgte mittels Fluo-4-AM (Anregung/Emission: 494/506). Hierfür wurden HeLa Zellen mit 2 µM Fluo-4-AM in Ca²⁺-Puffer für 30-90 min bei 37°C und 5% CO₂ beladen. Anschließend wurden die Zellen mit Ca²⁺-Puffer für 10 min gewaschen und die Deckgläschen in ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop eingespannt. Die Stimulation der Zellen mit LLO (150 ng/ml) erfolgte in Anwesenheit oder Abwesenheit von PlcB (20 µg/ml). Änderungen in der cytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration wurden durch Aufnahme eines Bildes alle 2 s verfolgt. Dabei wurde jede Zelle einzeln verfolgt und die relative Fluoreszenzintensität über die Zeit aufgetragen.

5.2.10 Immunfluoreszenz Mikroskopie

Für Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden HeLa Zellen in 24-well Platten, in welchen zuvor ein Deckgläschen (Ø 12 mm, Stärke 0,13-0,16 mm) gesetzt wurde, subkultiviert. Nach Infektion mit *L. monocytogenes* (MOI 10) für verschiedene Zeitpunkte in An- und Abwesenheit von Phosphocholin (3,6 mM) oder Behandlung mit LLO (50 ng/ml) bzw. PlcB (5 µg/ml) für 10 min bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit 1x HBSS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 3,7% Formaldehyd in 1x PBS für 20 min bei RT fixiert. Zur Detektion intrazellulärer Bakterien wurden die fixierten Zellen nun für 1 h bei RT mit IF-Puffer (zum blockieren und permeabilisieren) inkubiert. Zur Untersuchung von Veränderungen an der zellulären Oberfläche wurden die freien Bindungsstellen der Zellen stattdessen nur mit 1x PBS mit 0,1% BSA blockiert. Es erfolgte keine Permeabilisierung. Die so fixierten und blockierten/permeabilisierten Zellen wurden nun in eine befeuchtete Kammer mit einem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen auf den Deckgläschen in 1x PBS dreimal gewaschen und in eine befeuchtete Kammer mit einem Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörper (1:2000) bzw. Phalloidin (1:40) für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift (dreimal mit 1x PBS) wurden die Deckgläschen mit den gefärbten Zellen mit Hilfe von ProLong Gold DAPI auf Objektträger eingedeckt und mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert.

5.2.11 Small interfering RNA silencing

Die Reduktion der Expression des Plättchenaktivierenden Faktor-Rezeptors (PAF-Rezeptor) bzw. des c-Met Rezeptors erfolgte mittels *small interfering RNA silencing* (siRNA). Hierfür wurden HeLa Zellen zunächst mittels einer siRNA, welche sich gegen die mRNA von *PTAFR* bzw. *c-Met* richtete, transfiziert. HeLa Zellen wurden am Tag der Transfektion in einer 12-well Platte in einem Volumen von 1100 µl mit einer Konfluenz von ca. 40% ausgesät. Nach tröpfchenweiser Zugabe von 100 µl der Transfektionslösung wurden die Zellen für 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für die Transfektionslösung wurden 20 nM siRNA, welche sich gegen die mRNA von *PTAFR* richtete (PTAFR1 = SI00019075; Qiagen) bzw. 10 nM siRNA, welche sich gegen die mRNA von *c-Met* richtete (MET_9 = SI00604821; Qiagen), mit 3 µl HiPerfect Transfektionsreagenz in einem Volumen von 100 µl (Zellkulturmedium ohne FKS) vermischt (Vortex) und für 5 min bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle wurde die siRNA AllStars Negative (SI03650318, Qiagen) verwendet, während als Positivkontrolle die siRNA AllStars Hs Cell Death (SI04381048, Qiagen) verwendet wurde.

5.2.12 Bestimmung der hämolytischen Aktivität von porenbildenden Toxinen

5.2.12.1 Bestimmung über die Lyse von Erythrozyten

Die Bestimmung der hämolytischen Aktivität verschiedener Toxine erfolgte durch Lyse von Erythrozyten. Hierzu wurde zunächst frisches Heparin-Blut vom Schaf bei 3800 rpm für 3 min und 4°C zentrifugiert. Von den pelletierten Zellen wurde das Blutplasma dekantiert, durch 20 ml 1x PBS ersetzt und erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde sooft wiederholt bis der Überstand nach Zentrifugation vollständig klar war. Das gewaschene Blut wurde dann zur Herstellung einer Erythrozytensuspension (1:100) in 1x PBS mit 5 mM DTT verwendet. Für die Versuchsdurchführung wurde in einer Mikrotiterplatte mit V-förmigen Boden und 96 Kavitäten die erste Kavität mit 100 µl der zu untersuchenden porenbildenden Toxine befüllt, welche 1:100-1:500 in PBS mit 5 mM DTT verdünnt wurden. Die Toxine wurden anschließend in einer seriellen Verdünnungsreihe (1:2) mit 1x PBS mit 5 mM DTT verdünnt. Das Gesamtvolumen betrug 50 µl. Für Studien zur Untersuchung der Änderung in der hämolytischen Aktivität durch Zugabe verschiedener Chemikalien wurden die Toxine zusätzlich für 30 min bei RT mit unterschiedlichen Konzentrationen an Phosphocholin, Betain, Carnitin, Cholin, Phosphatidylserin, Heparin, N-Acetylglykosamin, N-Acetylglykosamin-2-Sulfat, N-Acetylglykosamin-6-Sulfat und Glucuronsäure vorbehandelt. Als Negativkontrolle wurde dabei Toxin ohne Zugabe der jeweiligen Substanzen verwendet. Für Studien zur Vorbehandlung der Schaferythrozyten mit Phospholipasen wurden diese 30 min vor Zugabe der porenbildenden Toxine mit PlcB (20 µg/ml) bzw. Phospholipase C aus *B. cereus* (10 U) für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ vorbehandelt. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Schaferythrozyten verwendet. Abschließend wurde zu allen Kavitäten 50 µl der Erythrozytensuspension zugegeben und die Mikrotiterplatte für 1 h bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde anstelle von 1x PBS mit 5 mM DTT reines H₂O verwendet. Daten wurden mittels Mikrotiterplatten-Leser durch Bestimmung der OD bei einer Wellenlänge von 405 nm erhoben. Als hämolytische Einheit wurde dabei die Konzentration an porenbildendem Toxin definiert, die einer 50 % Hämolyse durch H₂O entspricht.

5.2.12.2 Bestimmung über Calcein-gefüllte Liposomen

Die Bestimmung der hämolytischen Eigenschaften von porenbildenden Toxinen über Liposomen erfolgte in Kooperation mit dem Nationalen Institut für Chemie in Ljubljana (Slowenien).

Zur Untersuchung des Einflusses von Phosphocholin auf die hämolytische Aktivität von porenbildenden Toxinen wurden Calcein-gefüllte multilamellare Vesikel (MLVs) oder große unilamellare Vesikel (*large unilamellar vesicles*; LUVs) (5.11.1) verwendet. Die Durchführung

erfolgte in schwarzen Mikrotiterplatten mit 96 Kavitäten, welche nur eine halbe Fläche besaßen. Zunächst wurden die verwendeten porenbildenden Toxine durch Zugabe von 5 mM DTT für 10 min bei RT reduziert. Als Puffer wurde entweder MLV-Puffer oder LUV-Puffer verwendet. Anschließend wurde je 100 nM reduziertes Toxin in die Mikrotiterplatte vorgelegt und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Phosphocholin für 30 min bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurde dabei Toxin ohne Zugabe von Phosphocholin verwendet. Nach Zugabe von 20 µM Calcein-gefüllten MLVs oder LUVs wurde die Messung sofort gestartet. MLVs oder LUVs ohne Toxin oder Phosphocholin-Behandlung wurden als Negativkontrolle mitgeführt. Das Gesamtvolumen betrug 50 µl. Die Messung des Calcein-Ausstroms aus den Liposomen erfolgte durch Anregung des Calceins bei einer Wellenlänge von 485 nm und Detektion der Emission bei einer Wellenlänge von 520 nm. Der kinetische Verlauf des Calcein-Ausstroms wurde dabei für 10 min aufgenommen. Anschließend wurde durch Zugabe von 40 mM Triton X-100 eine vollständige Lyse der Liposomen herbeigeführt und der kinetische Verlauf für weitere 2 min aufgenommen.

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 Arbeiten mit Proteinen

Alle Arbeiten mit reinen Proteinen erfolgten bei 4°C oder auf Eis, um eine mögliche Denaturierung zu verhindern.

5.3.2 Lagerung von Proteinen

Die Lagerung von gereinigten Proteinen erfolgte in 1x PBS bei -80°C. Antikörper wurden, je nach Herstellerangaben, bei 4°C oder -20°C gelagert. Antikörper aus Zellkultur-Überständen wurden bei 4°C gelagert.

5.3.3 Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen

Zur Herstellung von Proteinextrakten wurden eukaryotische Zellen nach Infektion oder Behandlung mit porenbildenden Toxinen von der Zellkulturplatte abgeschabt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zentrifugation bei 800 x g für 2 min bei 4°C wurden die Zellen anschließend pelletiert und der Überstand dekantiert. Nach einem zweimaligen Waschschrift mit 1x PBS wurde das Pellet in 12 µl RIPA-Lysepuffer resuspendiert und für 30 min bei 4°C auf einen Thermomixer lysiert. Nach abschließender Zentrifugation bei maximaler Zentrifugengeschwindigkeit für 10 min bei 4°C wurde der proteinhaltige Überstand

in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C bis zu seiner Verwendung gelagert.

5.3.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Test

Bei dem Bradford-Test handelt es sich um ein photometrisches Nachweisverfahren zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration einer Proteinlösung. Die Grundlage des Nachweisverfahrens beruht dabei auf den Farbstoff Coomassie Brilliant Blau, welcher zur Gruppe der Triphenylmethanfarbstoffe gehört. Dieser bildet in einem sauren Milieu mit unpolaren und kationischen Seitenketten von Proteinen einen Komplex. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 470 nm auf 595 nm, welches photometrisch gemessen werden kann. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist dabei direkt proportional zur Menge an gebundenem Farbstoff an den Seitenketten der Proteine, sodass eine Quantifizierung der Proteinkonzentration möglich wird.

Für den Bradford-Test wurde zunächst eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) in RIPA-Lysepuffer erstellt. Hierzu wurde eine 1 mg/ml BSA-Stammlösung entsprechend verdünnt. Weiterhin wurden die zu messenden Proteinlösungen ebenfalls in RIPA-Puffer verdünnt. Je 10 µl der Eichgeradenlösung (200-1000 µg/ml) und je 10 µl der verdünnten Proteinlösungen wurden in eine Mikrotiterplatte mit Flachboden und 96 Kavitäten gegeben. Jede Probe wurde dabei doppelt aufgetragen (Doppelbestimmung). Anschließend wurden je 200 µl einer Bradford-Arbeitslösung zu der Eichgeradenlösung und den Proteinproben gegeben. Die Bradford-Arbeitslösung wurde dabei durch Verdünnung einer Bradford-Stammlösung hergestellt (1:5). Die Mikrotiterplatte wurde mittels einer Adhäsionsfolie abgedeckt und auf einer Rüttelplatte bei 800 rpm für 10 s gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei RT wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde nach Abzug der Hintergrundabsorption (Lysepuffer ohne Protein) und unter Zuhilfenahme der Eichgeraden errechnet.

5.3.5 SDS-PAGE nach Laemmli

Die Natrium Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zum Auftrennen von Proteinen anhand ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld. Hierzu wird ein Polyacrylamid-Gel verwendet. Zur Trennung der Proteine anhand ihrer Größe ist es nötig ihre Eigenladung zu überdecken. Die Proteine werden deshalb mittels Natrium Dodecylsulfat (SDS) denaturiert und vollständig negativ geladen. Die Überlagerung der Eigenladung gewährleistet, dass alle zu untersuchenden Proteine während der

Elektrophorese, nach Anlegen einer elektrischen Spannung, die gleiche Laufrichtung haben. Da das SDS eine negative Eigenladung aufweist, bedeutet dies, dass die Proteine zur Anode wandern. Das Polyacrylamid-Gel selbst besteht aus einem Sammel- und Trenngel. Deshalb wird dieses System auch als diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli bezeichnet. Während das Sammelgel die Aufgabe hat die Proteine an der Lauffront zu konzentrieren, dient das Trenngel dem eigentlichen Trennungsprozess. Durch Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen an Acrylamid und Bisacrylamid lassen sich die Porengrößen des Sammel- und Trenngels variieren. Für das Trenngel werden meist höhere Konzentrationen an Acrylamid verwendet, was zu einer stärkeren Vernetzung des Gels führt und somit zu einer kleineren Porenbildung führt. Als Laufpuffer für die Elektrophorese dient ein kombiniertes Tris-Glycin System. Im Sammelgel liegt dabei ein pH-Wert von 6,8 vor. Bei diesem pH-Wert liegen die meisten Glycin-Moleküle als Zwitterionen vor. Sie können deshalb den Strom nur schlecht leiten und werden deshalb als Folge-Ionen bezeichnet, während Chlorid-Ionen vorauslaufen (Leit-Ionen). Die Proteine ordnen sich zwischen Leit- und Folge-Ionen an und bewegen sich somit im elektrischen Feld Richtung Trenngelfront. Dadurch wird eine Konzentrierung der Proteine erreicht, sodass die Auflösung im Trenngel erheblich verbessert wird. Treten die Proteine vom Sammelgel in das Trenngel über, werden sie aufgrund der kleineren Poren verlangsamt. Sobald die Glycin-Ionen vom Sammelgel in das basische Trenngel überwechseln (pH-Wert 8,8), erhalten sie eine negative Ladung und überholen die Proteine.

Für die SDS-PAGE wurde ein vertikales Flachbettgelelektrophorese-System von Biometra verwendet. Dafür wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten, welche mittels Klammern und Gummidichtung abgedichtet wurden, gegossen. Das noch flüssige Trenngel wurde zur Kantenglättung mit 96°C Ethanol überschichtet und für ca. 1,5 h auspolymerisiert. Der Alkohol wurde anschließend dekantiert und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Abschließend wurde zur Bildung von Probenaschen ein Kamm luftblasenfrei in das Sammelgel gesteckt. Das Sammelgel wurde für ca. 30 min polymerisiert. Anschließend wurde der Kamm aus dem Sammelgel gezogen. Die Gelkassette wurde in die Gelelektrophoreseapparatur montiert, die Probenaschen mit SDS-Laufpuffer ausgespült und die Kammer mit SDS-Laufpuffer befüllt.

Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit SDS-Probenpuffer versehen und bei 99°C für 5 min denaturiert. Nach Abkühlen der Proben wurden diese bei 13000 rpm für 1 min und RT zentrifugiert und in die Probenaschen des Sammelgels aufgetragen. Die Elektroden wurden an die Spannungsquelle angeschlossen. Die Elektrophorese erfolgte bei 125 V im Sammelgel und 150 V im Trenngel mit je 25 mA pro Gel. Als Größenstandard wurde der PageRuler Plus (10-250 kDa; Thermo Scientific) verwendet.

5.3.6 Coomassie Brilliant Blau-Färbung

Bei der Coomassie Brilliant Blau-Färbung handelt es sich um eine Färbemethode zur Darstellung von Proteinen nach SDS-PAGE. Dabei lagert sich der Farbstoff an basische Seitenketten der Aminosäuren an.

Für die Färbung wurden die Acrylamidgele, nach Beendigung der SDS-PAGE, über Nacht in eine Coomassie-Färbelösung gegeben. Am darauffolgenden Tag wurde überschüssiger Farbstoff mittels einer Entfärbelösung aus dem Gel herausgewaschen.

5.3.7 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots können Proteine, welche mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt wurden, auf eine Nitrozellulose- oder Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran für weitere Untersuchungen immobilisiert werden. Auf diese Weise können beispielsweise Proteine aus einem Proteinextrakt spezifisch nachgewiesen werden. Die Technik des Western Blots entwickelte sich dabei aus den vorangegangenen Techniken des Southern Blots, welcher zum Nachweis von geelektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten genutzt wird, sowie aus der Technik des Northern Blots, welcher zum Nachweis von geelektrophoretisch aufgetrennten RNA-Fragmenten genutzt wird.

Zur Durchführung eines Western Blots müssen zunächst Proteinextrakte hergestellt werden, die im Anschluss mittels SDS-PAGE anhand ihres Molekulargewichtes elektrophoretisch aufgetrennt werden. Nach Abschluss der SDS-PAGE können die aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran übertragen werden. Als Trägermembranen werden hierbei am häufigsten entweder Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen verwendet. Trägermembranen können aber auch aus positiv geladenem Nylon oder aus mit Polybren beschichteten Glasfasern bestehen (Hubert & Thomas, 2011). Das Immobilisieren der Proteine auf den Trägermembranen erfolgt dabei für PVDF- und Nylon-Membranen primär über hydrophobe und polare Wechselwirkungen, während für Nitrozellulose-Membranen und Glasfasern primär ionische und polare Interaktionen von besonderer Bedeutung sind. Der Übertragungsprozess erfolgt dabei durch Diffusion oder mittels eines elektrischen Feldes, welches senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichtet ist. Durch die negative Ladung des SDS wandern die Proteine dadurch in Richtung Anode.

Für den Elektrotransfer wurde hierbei das Semi-Dry-System verwendet. Hierfür wurden zunächst sieben Filterpapiere und eine PVDF-Membran entsprechend der Polyacrylamidgel-Größe zurechtgeschnitten. Anschließend wurden je drei Filterpapiere in Blotpuffer I und III und ein Filterpapier in Blotpuffer II eingeweicht. Parallel hierzu wurde die PVDF-Membran für 10 s in Methanol aktiviert und anschließend in destilliertem Wasser kurz geschwenkt. Die

Membran wurde bis zu ihrer Verwendung in Blotpuffer II abgelegt. Für den Elektrotransfer wurden die drei Filterpapiere, welche in Blotpuffer I eingeweicht wurden, auf die Oberfläche der Graphit-Anode gelegt. Auf diese wurde die in Blotpuffer II äquilibrierte PVDF-Membran luftblasenfrei gelegt und mit dem in Blotpuffer II äquilibrierten Polyacrylamidgel luftblasenfrei bedeckt. Zuletzt wurden die drei Filterpapiere, welche in Blotpuffer III äquilibriert wurden, auf das Polyacrylamidgel gelegt. Zum Herausdrücken von Luftblasen wurde eine Glaspipette mit leichtem Druck über den Aufbau gerollt. Durch das Aufsetzen der Graphit-Kathode wurde anschließend der elektrische Kreislauf geschlossen. Der Elektrotransfer erfolgte bei einem elektrischen Strom von 1 mA/cm² der Blotmembran für 1,5 h.

5.3.8 Immunfärbung und Chemilumineszenz-Nachweis

Proteine, welche auf Trägermembranen übertragen wurden, lassen sich mittels Immunfärbung nachweisen. Hierfür werden primäre Antikörper verwendet, welche spezifisch das zu untersuchende Protein erkennen und an diesem binden. Durch Zugabe eines Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelten sekundären Antikörpers, welcher das kristallisierbare Fragment (Fc) des primären Antikörpers erkennt, wird der Western Blot entwickelt und auf diese Weise die Position des Zielproteins sichtbar gemacht. Der Nachweis des Zielproteins wird dabei erst durch die Produktion eines messbaren Reaktionsprodukts durch die enzymatische Aktivität der Meerrettichperoxidase ermöglicht.

Für die Immunfärbung müssen zunächst freie Bindungsstellen auf der Trägermembran durch "Blocken" besetzt werden. Das Blocken der Trägermembran erfolgte dabei mit 12 ml Block-Puffer (5% Magermilch in TBS-T) für 1 h bei RT auf einem Schwenktisch. Anschließend wurde die Trägermembran zwischen zwei Folien eingeschweißt und mit 1 ml einer primären Antikörper-Lösung in Block-Puffer oder in 5% (w/v) BSA in TBS-T über Nacht bei 4°C auf einem Schwenktisch inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Trägermembran aus der Folie herausgenommen und dreimal mit TBS-T für 5-10 min auf einem Schwenktisch gewaschen. Anschließend wurden 12 ml einer sekundären Antikörper-Lösung in Block-Lösung hinzugegeben und für 2 h bei RT auf einem Schwenktisch inkubiert. Die Art des sekundären Antikörpers richtete sich dabei nach dem Tier, aus welchem der primäre Antikörper isoliert wurde. Abschließend wurde die Trägermembran erneut dreimal mit TBS-T für 5-10 min auf einem Schwenktisch gewaschen und entwickelt.

Die Entwicklung der Western Blots erfolgte mittels Chemilumineszenz. Dabei wurden HRP-gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet. Die HRP katalysiert dabei, unter alkalischen Bedingungen und in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid (H₂O₂), die Oxidation von Luminol unter Lichtemission. Die Visualisierung der Lichtemission erfolgte durch die Verwendung von Röntgenfilmen. Dazu wurde das ECL-Detektionsreagenz frisch durch Mischen von Lösung A

(1 ml) mit H₂O₂ (0,3 µl) und Lösung B (100 µl) hergestellt und auf die Trägermembran gegeben. Anschließend wurde, nach einer Inkubationszeit von 2 min, die Trägermembran abgetropft und luftblasenfrei in eine Röntgenfilmkassette zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Die Detektion der entstehenden Chemilumineszenz erfolgte durch das Auflegen eines Röntgenfilms auf die Trägermembran in einer Dunkelkammer oder digital an einem Blotentwickler. Die Belichtungsdauer variierte dabei je nach Intensität des Signals. Das Entwickeln der Röntgenfilme erfolgte anschließend mittels Entwicklermaschine innerhalb der Dunkelkammer. Dabei wurde der Röntgenfilm auf einem Laufband zunächst durch eine Entwicklerlösung, dann durch eine Fixierlösung und zuletzt durch destilliertes Wasser geführt. Nach einem abschließenden Trocknungsvorgang konnten die Chemilumineszenz-Signale auf dem Röntgenfilm ausgewertet werden. Die Proteingröße wurde durch Vergleich mit dem Größenstandard ermittelt.

5.3.9 Entfernen von Antikörpern von Trägermembranen (“Strippen”)

Der Vorteil der Verwendung einer Trägermembran, im Vergleich zu Polyacrylamidgelen, liegt in der Wiederverwendbarkeit. Daneben besteht ein weiterer Vorteil darin, dass verschiedene Zielproteine nacheinander detektiert werden könnten. Hierfür müssen die Trägermembranen nach der Immunfärbung und dem Chemilumineszenz-Nachweis jedoch von den verwendeten primären und sekundären Antikörpern befreit werden. Dieser Vorgang wird als “Strippen” bezeichnet.

Zum „Strippen“ wurde die Trägermembran mit 12 ml Stripp-Puffer überdeckt und für 15 min bei 60°C inkubiert. Diese wurde anschließend fünfmal mit TBS-T für 5-10 min auf einem Schwenktisch gewaschen und erneut mit 12 ml Block-Puffer für 1 h bei RT inkubiert. Die Trägermembran konnte nun für weitere Immunfärbungen verwendet werden.

5.4 Herstellung von „erythrocyte ghosts“

Die Herstellung von „erythrocyte ghosts“ erfolgte von Martina Hudel (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig Universität Gießen). Die Herstellung ist aus folgender Publikation zu entnehmen (Köster et al., 2014).

5.5 Isolierung von Virulenzfaktoren aus *Listeria monocytogenes*

Alle nachfolgenden Klonierungen und Proteinreinigungen wurden von Martin Hudel (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig Universität Gießen) bzw. Besim Berisha (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig Universität Gießen) durchgeführt.

5.5.1 Isolierung von Listeriolysin O aus *Listeria monocytogenes*

Die Isolierung von Listeriolysin O erfolgte wie aus folgender Publikation zu entnehmen ist (Pillich et al., 2012).

5.5.2 Isolierung von Listeriolysin O heterolog aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Listeriolysin O heterolog aus *E. coli* erfolgte wie aus folgender Publikation zu entnehmen ist (Lucas et al., 2012).

5.5.3 Isolierung von Listeriolysin O C484S aus *Listeria monocytogenes*

Die Isolierung von Listeriolysin O C484S erfolgte wie aus folgender Publikation zu entnehmen ist (Guzman et al., 1995).

5.5.4 Isolierung von PlcA und PlcB

Zur Isolierung von PlcA und PlcB wurde zunächst aus *L. monocytogenes* EGD-e durch PCR mit Hilfe der Primer PlcA-F (5'-GCGCGCCTCGAGTTCCCATTAGGCGGA-3') und PlcA-R (5'-GCGCGGTACCGTTGAATTTATTGTT-3') bzw. PlcB-F (5'-GCGCGCCTCGAGTGGTCCGCGGATAAC-3') und PlcB-R (5'-GCGCGGTACCTTCATTTGTTTTTTTAGACCAA-3') das jeweilige kodierende Gen amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Kpn*I verdaut und in einen *Xho*I/*Kpn*I-verdauten pIMK2 Vektor ligiert (Monk et al., 2008). Dies führte zur Konstruktion von PlcA/PlcB, welches C-terminal einen His-Tag trug. Die Expression des finalen Konstrukts erfolgte mit Hilfe des konstitutiven Promotors P_{Help} (Riedel et al., 2007) und trug zusätzlich ein Signalpeptid zur Proteinsekretion. *E. coli* DH10 β wurde mit diesem Plasmid transformiert. Nach Plasmidisolierung wurde die Korrektheit des Konstrukts durch Sanger Sequenzierung überprüft. Das finale Konstrukt wurde anschließend in das Chromosom von *L. innocua* Δ *lgt* integriert.

Zur Isolierung der Proteine wurde BHI-Flüssigmedium mit je 1% einer Übernachtskultur (30°C, 180 rpm) von *L. innocua* Δ lgt::plcA oder *L. innocua* Δ lgt::plcB inokuliert und bis zu einer OD_{600 nm} von 1 inkubiert. Diese Tageskulturen (in BHI-Flüssigmedium) wurden zum Inkulieren einer zweiten Übernachtskultur (in BHI-Flüssigmedium, 30°C, 180 rpm) genutzt. Am darauffolgenden Tag wurden diese Übernachtskulturen bei 14300 x g für 30 min und 4°C zentrifugiert und die Überstände mit Hilfe eines Sterilfilters (cut-off von 0,2 µm) sterilfiltriert. Die Proteine aus den sterilen Überständen wurden nun durch Zugabe von 80% (w/v) Ammoniumsulfat für 2 h präzipitiert und in 200 ml 20 mM NaH₂PO₄ und 500 mM NaCl (pH 7.2) resuspendiert. Anschließend wurden über Tangentialfiltration die Proteinlösungen konzentriert, erneut steril filtriert und 10 mM Imidazol hinzugegeben. Im darauffolgenden Schritt wurden PlcA und PlcB mit Hilfe einer 5 ml HisSelect® Säule (#17-5248-02, GE Healthcare) nach Herstellerangaben mittels His-Tag Affinitätschromatographie gereinigt. Die Elution der Proteine erfolgte mit Elutionspuffer (20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl und 500 mM Imidazol, pH 7.2). Die Reinheit der Proteine wurde mittels SDS-PAGE überprüft. Die eluierten Proteine wurde mittels Zentrifugalfilter (10 kDa Centrifugal Filter Units; #UFC901024, Merck Millipore) konzentriert und gleichzeitig in 1x PBS umgepuffert.

5.6 Isolierung von Pneumolysin aus *Streptococcus pneumoniae*

Die Isolierung von Pneumolysin heterolog aus *Listeria innocua* erfolgte wie aus folgender Publikation zu entnehmen ist (Li et al., 2018).

5.7 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von PlcB

5.7.1 Nachweis über Massenspektroskopie

Die enzymatische Aktivität von reinem PlcB wurde durch den Nachweis des Reaktionsproduktes (Phosphocholin) über Massenspektroskopie bestimmt. Hierzu wurden "erythrocyte ghosts" in vorgewärmten PBS (37°C) auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml verdünnt. Anschließend wurden 20 µg/ml PlcB zugegeben und bei 37°C für verschiedene Zeitpunkte inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min und 180 min wurden jeweils 100 µl entnommen und die Reaktion durch Denaturieren bei 99°C für 5 min gestoppt. Die gesammelten Proben wurden bei 16000 x g für 2 min und 4°C zentrifugiert und die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Je 20 µl der Reaktionsprodukte wurde anschließend über Massenspektroskopie untersucht (durchgeführt von Prof. Dr. Günter Lochnit, Biochemie Institut, Justus-Liebig Universität Gießen) Als Negativkontrolle wurden "erythrocyte ghosts" ohne Zugabe von PlcB mitgeführt.

5.7.2 Nachweis über Lecithin Agar Platten

Die enzymatische Aktivität von gereinigtem PlcB wurde ebenfalls durch Lecithin-haltige Agarplatten sichtbar gemacht. Hierzu wurde Bacto™ Dehydrated Agar mit Brilliance™ Listeria Differential Supplement supplementiert. Anschließend wurde dieser Selektionsagar bei 121°C für 20 min autoklaviert. Nach Abkühlen des Agars auf ca. 50-60°C wurde dieser in 15-20 ml Portionen in Petrischalen gegossen und bei geschlossenem Deckel auf der Laborbank erkalten gelassen. Nach Erstarren des Agars wurden Löcher in diesen gestanzt und mit 16 µg PlcA bzw. PlcB befüllt. Die Agarplatten wurden anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert. Als Hydrolyse von Lecithin wurde die Bildung eines Hofes um das gestanzte Loch gewertet.

5.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Als Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bezeichnet man ein immunologisches Nachweisverfahren, welches als Weiterentwicklung des Radioimmunoassays gilt. Möglich wurde die Entwicklung des ELISAs durch die Kopplung der Meerrettichperoxidase an einen Antikörper, sodass nach Zugabe geeigneter Substrate (z.B. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) durch einen Farbumschlag ein messbares Signal erzeugt wird (Engvall & Perlmann, 1971; Van Weemen & Schuurs, 1971). Mit Hilfe eines ELISA lässt sich beispielsweise ein bestimmtes Antigen in einer Mikrotiterplatte nachweisen. Hierfür wird zunächst entweder das Antigen (direkter ELISA) oder der Antikörper an die Oberfläche der Mikrotiterplatte gebunden (feste Phase). Anschließend werden freie Bindungsstellen blockiert und das zu untersuchende Antigen (wenn der Antikörper an die feste Phase adsorbiert wird) oder der Antikörper (wenn das Antigen an die feste Phase adsorbiert wird) hinzugegeben. Erfolgte zunächst die Bindung eines Antikörpers an die Mikrotiterplatte, wird ein weiterer spezifischer Antikörper hinzugegeben, welcher an das Antigen bindet. Auf diese Weise wird das Antigen zwischen zwei spezifischen Antikörpern gebunden. Diese spezielle ELISA-Technik wird als indirekter Sandwich-ELISA bezeichnet. Hierbei ist es wichtig, dass beide Antikörper an unterschiedlichen Epitopen an das Antigen binden, da sie sich sonst gegenseitig behindern würden. Anschließend erfolgt die Zugabe eines sekundären Antikörpers, welcher mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt ist. Dieser bindet unspezifisch an den Fc-Teil der primären Antikörper und katalysiert eine enzymatische Farbreaktion, welche quantifizierbar ist.

Zur Bestimmung der Bindung von porenbildenden Toxinen an Cholesterin, Phosphatidylcholin oder Sphingomyelin wurden Sandwich-ELISAs durchgeführt, wobei anstelle eines primären Antikörpers die Lipide/Sphingoside auf die Mikrotiterplatte adsorbiert wurden. Es wurden 50 µl von je 15 mM Phosphatidylcholin (in Ethanol), Sphingomyelin (in

Ethanol) und Cholesterin (in Ethanol) auf eine ELISA-Platte gegeben und bei 1000 rpm für 1 min und RT zentrifugiert. Anschließend wurde die ELISA-Platte bei 4°C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde diese dreimal mit 150 µl TBS gewaschen und freie Bindungsstellen durch Zugabe von 150 µl einer 10 mg/ml BSA-Lösung in TBS für 1 h bei RT blockiert. Im Anschluss wurde die BSA-Lösung entfernt und 100 µl einer Lösung mit porenbildendem Toxin (1 µg/ml; verdünnt in BSA-Lösung) hinzugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrritten mit TBS erfolgte die Zugabe von 50 µl des anti-LLO/anti-PLY Antikörpers, welcher 1:3000 in der BSA-Lösung verdünnt wurde. Die Inkubation erfolgte bei RT für 1 h. Nach der Inkubationszeit wurde die Antikörper-Lösung weggeschüttet und die ELISA-Platte dreimal mit TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl eines mit alkalischer Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörpers (1:1000 in TBS) für 1 h bei RT. Zuletzt wurde der ELISA dreimal mit TBS gewaschen und durch Zugabe von 50 µl ELISA-Entwickler entwickelt. Der ELISA wurde durch Messungen der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm quantifiziert.

5.9 Glykan-Microarray

Die Durchführung von Glykan-Microarrays erfolgte in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung (Prof. Dr. Peter H. Seeberger). Glykan-Microarrays wurden auf „Objekträgern“, welche mit Acrylamid beschichtet waren, gedruckt. Hierbei wurden die „Objekträger“ in eine Maschine gegeben, die über einen Roboterarm die Zucker tropfenweise aufdruckte (dieser Schritt wurde bereits von Herrn Andreas Geißner im Vorfeld durchgeführt). Dabei waren die Glykane über einen Linker mit Amin-Gruppen funktionalisiert, sodass sie an Acrylamid binden konnten (Geissner et al., 2014). Der Glykan-Microarray konnte bei 4°C gelagert werden. Versuchestag wurden die „Objekträger“ mit 1x PBS mit 3% BSA für 30-60 min blockiert. Im Anschluss wurden diese zweimal mit 1x PBS gewaschen und durch Zentrifugation bei 300 x g für 3 min und RT getrocknet. Anschließend wurde der Microarray in eine Schablone eingespannt, welche es erlaubte Protein-Lösungen zu inkubieren. Nach Zugabe der Protein-Lösungen wurde der Microarray in einer befeuchteten Kammer für 1 h bei RT inkubiert und anschließend dreimal mit TBS-T (0,1% Tween-20; pH 7,4) gewaschen. Nach Inkubation des primären Antikörpers (anti-LLO, ab200538, 1:200) erfolgte eine weitere Inkubation in einer befeuchteten Kammer bei RT für 30-60 min. Anschließend wurde der Microarray erneut dreimal mal TBS-T gewaschen und ein Fluorophor-gekoppelter sekundärer Antikörper hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte ebenfalls in einer befeuchteten Kammer im Dunkeln bei RT für 1 h. Zuletzt wurde der Microarray zweimal mit TBS-T, einmal mit TBS und zweimal mit H₂O gewaschen. Der

Microarray wurde durch Zentrifugation (300 x g, 3 min, RT) getrocknet und die emittierte Fluoreszenz an einem Fluorometer gemessen.

5.10 Fragmentierung von eukaryotischen Zellen in cytosolische und mitochondriale Fraktion

Zur Bestimmung des Cytochrom *c*-Ausstroms aus Mitochondrien in das Cytosol wurden die Zellen auf 10 cm-Zellkulturschalen kultiviert und für 4 h mit einer MOI von 10 infiziert (siehe Kapitel 5.2.5). Anschließend wurden die Zellen bei 800 x g und RT für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 100 µl eiskaltem Plasmamembran-Permeabilisierung-Puffer resuspendiert und für 8 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 800 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand (cytosolische Fraktion) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C eingefroren. Das Pellet wurde dagegen in 100 µl eiskaltem Zellyse-Puffer aufgenommen und bei 4°C und unter leichtem schütteln für 10 min inkubiert. Das Lysat wurde anschließend bei 10000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand (mitochondriale Fraktion) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C eingefroren.

5.11 Methoden der Liposomen-Präparation

5.11.1 Präparation von Liposomen

Die Präparation von Liposomen erfolgte in Kooperation mit dem Nationalen Institut für Chemie in Ljubljana (Slowenien).

Bei Liposomen handelt es sich um sphärische Vesikel, welche aus mindestens einer Lipiddoppelschicht zusammengesetzt sind. Die Bildung einer Lipiddoppelschicht ist die Folge des amphiphilen Charakters der Lipide. Diese bestehen nämlich aus einem polaren (hydrophil) und einem unpolaren (lipophil) Anteil. Lipide bilden deshalb in polaren Lösungsmitteln, wie z.B. Wasser, Doppelmembranen. Der hydrophile Anteil ist dabei stets zum polaren Lösungsmittel gewandt, während die lipophilen Anteile nach innen zeigen. Liposomen werden häufig als Modell für biologische Membranen, wie z.B. die Plasmamembran verwendet. Der Vorteil mit artifiziellen Liposomen zu arbeiten ist, dass die Lipidzusammensetzung- und -verteilung frei wählbar ist. Auf diese Weise lässt sich ein Membran-Ersatz erzeugen, welcher an die vorliegenden Fragestellungen angepasst werden kann. Es werden unterschiedliche Arten von Liposomen unterschieden. Hierzu zählen sog. multilamellare Vesikel (MLV), kleine unilamellare Vesikel (SUV) und große unilamellare

Vesikel (LUV). LUVs bestehen dabei nur aus einer Lipiddoppelschicht, während MLVs aus mehreren Lipiddoppelschichten aufgebaut sind.

5.11.2 Präparation von Calcein-gefüllten multilamellaren Vesikeln

Für die Herstellung von multilamellaren Vesikeln (MLV) wurde zunächst ein Lipidfilm in einen Rundkolben hergestellt. Hierfür wurden jeweils 40 mM von 1-Palmitoyl-2-Oleoyl-Sn-Glycero-3-Phosphocholin (POPC) und Cholesterin in einem 6:4-Verhältnis gemischt. Die Herstellung der Lipidfilme erfolgte anschließend mit Hilfe eines Rotationsverdampfers für 2 h bei einem Druck von 20 mbar. Durch die Rotation bildete sich ein Lipidfilm an der Wand des Rundkolbens. Für eine bessere Evaporation des Lösungsmittels wurde der Rundkolben während des Prozesses in ein 40°C warmes Wasserbad getaucht. Der Rotationsdampfer wurde hingegen auf 4°C gekühlt. Nach der Lipidfilm-Präparation wurden 300 µl Calcein-Puffer hinzugegeben und die Rundkolben mit Hilfe eines Vortexers auf maximaler Stufe kräftig gemischt. Anschließend wurde das Lipidgemisch durch fünfmaliges Einfrieren und Auftauen in flüssigem Stickstoff hydratisiert. Auf diese Weise bildeten sich MLVs, welche eine Größe von 0,5-3 µm aufwiesen und in ihrem Inneren Calcein einschlossen. Zur Trennung der Calcein-befüllten MLVs von überschüssigem, extravasikulärem Calcein wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Dafür wurde eine Gelfiltrationssäule aus Dextran-Epichlorhydrin-Copolymer mit einem Trennbereich von 1500–30000 Da verwendet. Zunächst wurde die Säule mit destilliertem Wasser und Äquibrier-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die MLV-Lösung auf die Säule gegeben und je 50 µl Elutionsfraktionen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Durch die poröse Struktur des verwendeten Säulenmaterials konnten kleine Moleküle im Material leichter eindringen. Dadurch vergrößert sich ihr Diffusionsvolumen und sie haben somit eine vergrößerte Retentionszeit, wodurch diese länger in der Säule zurückgehalten werden. Größere Moleküle konnten dagegen nur durch die Zwischenräume des Polymergranulats diffundieren. Ihr Diffusionsvolumen und somit auch ihre Retentionszeit war dadurch verringert. Durch dieses Prinzip konnten MLVs vom extravasikulären Calcein getrennt werden. Die Bestimmung derjenigen Elutionsfraktion mit den meisten MLVs erfolgte durch Messung der Lipidkonzentration mittels eines Phospholipid- und Cholesterin-Kits nach Herstellerangaben. Zusätzlich wurde die Größe und Uniformität der MLVs durch dynamische Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Die Lagerung der MLVs erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

5.11.3 Präparation von Calcein-gefüllten großen unilamellaren Vesikeln

Die Präparation von großen unilamellaren Vesikeln (LUV) erfolgte auf ähnliche Weise wie bereits für MLVs beschrieben (Kapitel 5.11.2). Nach Hydratisierung der MLVs wurden jedoch durch Extrusion LUVs erzeugt. Hierfür wurde die MLV-Lösung in eine 1 ml Spritze überführt und 21 Mal durch einen Extruder mit einer Polycarbonatmembran (Porengröße 100 nm) in eine zweite 1 ml Spritze gedrückt. Durch den erzeugten Druck entstanden aus den MLVs kleine, unilamellare Vesikel mit einer definierten Größe von 100 nm. Die Trennung von extravesikulärem Calcein erfolgte wie bereits für die Calcein-gefüllten MLVs beschrieben. Die Lagerung der LUVs erfolgte bei 4°C im Dunkeln.

5.11.4 Präparation von großen unilamellaren Vesikeln ohne Calcein

Die Präparation von ungefüllten großen unilamellaren Vesikeln (LUV) erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie bereits beschrieben (5.11.3), jedoch wurden die MLVs in LUV-Puffer aufgenommen. Die Durchführung einer Gelfiltration war nach Extrusion hierbei nicht nötig. Die Lagerung der LUVs erfolgte bei 4°C.

5.12 Biophysikalische Methoden

5.12.1 Dünnschichtchromatographie Immunfärbung

Zum Nachweis der Bindung von LLO an Phosphatidylcholin und Cholesterin wurden die Lipide zunächst auf einer Kieselgelplatte aufgebracht, welche zuvor mittels Glasschneider auf eine entsprechende Größe geschnitten wurde. Je 2 µl von Phosphatidylcholin (30 mg/ml) und Cholesterin (100 mM) wurden auf die Kieselgelplatte getropft und luftgetrocknet. Anschließend wurde diese für 30 s in 1:100 (v/v) Chloroform/Hexan mit 0,01% Polyisobutylmethacrylat eingetaucht. Die Kieselgelplatte wurde im Anschluss luftgetrocknet und für 5 min in 1x PBS eingeweicht. Anschließend wurden freie Bindungsstellen der Kieselgelplatte für 1 h mit 1x PBS 1% BSA blockiert und mit LLO (1 µg/ml in 20 ml 1x PBS 1% BSA) über Nacht bei RT schüttelnd inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Kieselgelplatte mit 1x PBS 1% BSA dreimal für 5-10 min gewaschen und mit 20 ml 1x PBS 1% BSA mit einem primären polyklonalen Antikörper gegen LLO (1:3000 verdünnt) für 2 h bei RT inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS 1% BSA entfernt. Die Kieselgelplatte wurde anschließend mit einem HRP-konjugierten sekundären Antikörper (in 10 ml 1x PBS 1% BSA; 1:1000 verdünnt) für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit 1x PBS 1% BSA wurde die Kieselgelplatte durch Zugabe einer 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung, entwickelt.

5.12.2 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR-Spektroskopie) erfolgte in Kooperation mit dem Nationalen Institut für Chemie in Ljubljana (Slowenien).

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie ist ein spektroskopisches Messverfahren zum direkten Nachweis von molekularen Interaktionen. Die SPR-Spektroskopie basiert dabei auf dem physikalischen Prinzip der Plasmonenresonanz. Dieses physikalische Phänomen entsteht, wenn planar-polarisiertes Licht in einem Winkel der Totalreflexion auf einen dünnen Metallfilm (i.d.R. Gold) trifft. Planar-polarisiertes Licht entsteht, wenn das Licht einer Lichtquelle in einen kritischen Winkel auf einen Gegenstand mit einem hohen Brechungsindex (z.B. Prisma) trifft. Unter diesen Bedingungen entsteht dabei eine sogenannte evaneszente Welle, welche in den Metallfilm dringt. Die direkte Interaktion zwischen der evaneszenten Welle mit frei oszillierenden Elektronen (Plasmonen) an der Oberfläche des Metallfilms führt dabei zu deren Anregung. Dieses Phänomen wird als Oberflächenplasmonenresonanz bezeichnet und führt zu einer Änderung der Intensität des reflektierten Lichts. Bei Verwendung eines genau definierten Winkels, dem sogenannten Resonanzwinkel, verursacht diese Interaktion ein Minimum in der Reflexion des Lichtes. Findet nun in der Nähe der Metalloberfläche eine Interaktion zwischen zwei Molekülen statt, kommt es zu einer Änderung des Brechungsindex und damit zu einer Änderung des Resonanzwinkels. Diese Änderung wird mittels eines optischen Detektors ermittelt und in Resonanzeinheiten (RU) ausgedrückt. (Anderluh et al., 2003; Beseničar et al., 2006; Hodnik & Anderluh, 2009).

Zur Untersuchung einer Veränderung der Interaktion zwischen LLO und LUVs in Anwesenheit von freiem Phosphocholin wurde ein Biacore X100-Spektroskop in Kombination mit einem L1 Sensorchip (GE Healthcare) verwendet. Zunächst wurde das System mit Hilfe eines Laufpuffers (10 mM Tris, 40 mM NaCl, pH 7.4) initialisiert und der Sensorchip mittels einer 60 s Injektion bei einer Durchflussrate von 10 μ l/min mit 40 mM Octyl- β -D-Glucopyranosid (OG) regeneriert. Anschließend wurden LUVs (1 mM) in 200 μ l für 600 s und bei einer Durchflussrate von 5 μ l/min auf den Sensorchip geladen. Das Sensorgramm sollte danach bei ca. 7000 RU liegen. Zusätzlich wurden die freien Bindungsstellen mit Laufpuffer mit 100 μ g/ml BSA für 2 min bei einer Durchflussrate von 5 μ l/min blockiert. Anschließend wurde die Assoziation von LLO (50 nM) alleine oder nach Phosphocholin-Vorbehandlung (1,8 mM oder 3,6 mM) an den LUVs für 90 s bei einer Durchflussrate von 10 μ l/min gemessen. Durch Messung von weiteren 240 s wurde ebenfalls die Dissoziation verfolgt. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Oberfläche des Sensorchips mit einer Injektion von 0,5% SDS (60 s) und eine nachfolgende Injektion von 40 mM OG (60 s) regeneriert.

Zum Nachweis einer direkten Interaktion von LLO und Phosphocholin wurde ein Biacore T100-Spektroskop mit einem NTA Sensorchip (GE Healthcare) verwendet. Zunächst wurde das System mit Hilfe des Laufpuffers (supplementiert mit 50 μ M EDTA) initialisiert. Die Regeneration des Sensorchips erfolgte mit 0,5 mM EDTA in Laufpuffer. Die Aktivierung erfolgte hingegen mit 0,5 mM NiCl₂ in Laufpuffer. Zunächst wurde His-markiertes LLO (200 nM) für 90 s bei einer Durchflussrate von 5 μ l/min auf den Sensorchip gebunden. Anschließend wurden verschiedene Konzentrationen an Phosphocholin (0,9 mM, 1,8 mM, 3,6 mM, 7,2 mM oder 14,4 mM) in das System gegeben und eine direkte Interaktion zwischen LLO und Phosphocholin untersucht.

5.13 Statistische Auswertung

Informationen bezüglich der Anzahl an biologischen Replikaten sind aus den Bildunterschriften zu entnehmen. Für die statistische Auswertung wurde für den Vergleich von zwei Versuchsgruppen entweder ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test (bei einer Normalverteilung der Proben) oder ein ungepaarter zweiseitiger Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (bei einer nicht gegebenen Normalverteilung) verwendet. Für die Auswertung von mehreren Versuchsgruppen wurde entweder eine Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) (Normalverteilung) oder ein Kruskal-Wallis Test (keine Normalverteilung) verwendet. Eine Normalverteilung der Proben wurde mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft. Für die statistische Auswertung wurde das Programm SigmaPlot 11 (System Software) verwendet. Ein p -Wert von $*\leq 0,05$; $**\leq 0,01$ und $***\leq 0,001$ wurde als statistisch signifikant angenommen. Ein p -Wert von $> 0,05$ wurde als statistisch nicht signifikant angenommen.

5.14 Graphische Abbildungen

Alle graphischen Abbildungen wurden unter Verwendung von BioRender (<https://biorender.com/>) erstellt.

6 Ergebnisse

6.1 Die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C von *Listeria monocytogenes* ist ein Regulator von Listeriolysin O-abhängigen Zellantworten

Für die Pathogenität von *Listeria monocytogenes* gilt Listeriolysin O (LLO) als wichtigstes Virulenzprotein des Bakteriums. Als essentielles Werkzeug von *L. monocytogenes* unterstützt LLO das Bakterium während des Invasionsprozesses, aber auch in der Aktivierung und Repression von Wirtszell-eigenen Signaltransduktionswegen, um eine erfolgreiche Invasion und Persistenz in der Wirtszelle zu ermöglichen. Trotz seiner zentralen Rolle im Invasionsprozess kann eine uneingeschränkte Aktivität von LLO jedoch zum Zelltod der Wirtszelle und somit zur Zerstörung der replikativen Nische führen.

In den letzten Jahrzehnten wurden eine Vielzahl an Regulationsmechanismen durch die Wirtszelle beschrieben. Dagegen ist eine Regulation von LLO auf bakterieller Seite bisher nur auf einem transkriptionellen Niveau, der Regulation des Redox-Status und durch die aktive Sekretion über das Sec-Sekretionssystem bekannt (Burg-Golani et al., 2013; Chakraborty et al., 1992). Überraschenderweise konnte zuletzt aber gezeigt werden, dass ein rekombinanter *L. monocytogenes* Stamm, welcher konstitutiv aktive Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PlcB) produziert, in seiner Virulenz *in vivo* stark attenuiert und anfällig für die Beseitigung durch das zelluläre Immunsystem ist (Blank et al., 2014; Yeung et al., 2007). Gleichzeitig wirkt die erhöhte Produktion von aktivem PlcB protektiv auf die durch LLO induzierte mitochondriale Fragmentierung (Blank et al., 2014; Stavru et al., 2011). Beide Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass PlcB in der Lage ist die Aktivität von LLO zu kontrollieren. Die Möglichkeit einer Interaktion zwischen beiden Virulenzfaktoren zeigt sich auch darin, dass LLO die mikrobizide Aktivität der phagozytotischen Nikotinamid Adenin Dinukleotidphosphat (NADPH)-Oxidase, welche von der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PlcA) und PlcB aktiviert wird, inhibiert (Lam et al., 2011). PlcB inhibiert außerdem Membran Reparaturmechanismen, die nach Membranschädigungen durch LLO induziert werden (Czuczman et al., 2014).

Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob die Aktivität von LLO über die Phospholipasen PlcA oder PlcB reguliert werden kann.

6.1.1 Die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C ist ein negativer Regulator der Translokation von Endoplasmatischen Retikulum-residenten Chaperonen an die zelluläre Oberfläche

6.1.1.1 Translokation von Endoplasmatisches Retikulum-residenten Chaperonen an die zelluläre Oberfläche durch Listeriolysin O

Zur Untersuchung der Hypothese, dass die Phospholipasen PlcA oder PlcB von *L. monocytogenes* die Aktivität von LLO regulieren können, wurde zunächst das durch LLO induzierte Translokationsverhalten des im Endoplasmatischen Retikulum (ER)-gelegenen *Heat shock protein 90 kDa beta member 1* (HSP90B1, Endoplasmin, Gp96, Grp94 oder ERp99) an die zelluläre Oberfläche näher untersucht.

Die Invasion von *L. monocytogenes* in nicht-phagozytierenden Zellen ist ein komplexer und vielschichtiger Prozess, der durch eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptor-Liganden-Interaktionen ermöglicht wird. Neben den kanonischen Internalisierungsmechanismen über die bakteriellen Proteine Internalin A (InIA) und Internalin B (InIB) kann *L. monocytogenes* ebenfalls über unkonventionellere Mechanismen in die Wirtszelle gelangen. Ein solcher nicht-kanonischer Internalisierungsmechanismus involviert Gp96. Für Gp96 wurde nämlich gezeigt, dass die Infektion von Caco-2 Zellen (*human epithelial colorectal adenocarcinoma*) und L2071 Zellen (Mausfibroblasten) mit *L. monocytogenes* zu einer Neuverteilung von Gp96 aus dem ER an die zelluläre Oberfläche führt (Martins et al., 2012). Dort fungiert Gp96 als Rezeptor für Vip (*virulence protein*), einem Oberflächenprotein von *L. monocytogenes* (Cabanes et al., 2005). Durch Infektion mit einer LLO-Deletionsmutante konnte gezeigt werden, dass LLO für diesen Translokationsprozess verantwortlich ist (Martins et al., 2012). Ebenso führte die Behandlung von HeLa Zellen (*human cervical cancer*) mit reinem LLO zu einer erhöhten Menge an Oberflächen-Gp96 (Mesquita, Brito, Moya, et al., 2017). Da jedoch der genaue Translokationsmechanismus noch unbekannt ist, wurde dieser zunächst näher untersucht.

Dabei wurde überprüft, ob LLO tatsächlich für die Induktion der Gp96-Translokation verantwortlich ist. Diese Überprüfung erfolgte, weil die Aufdeckung des Translokationsprozesses von Gp96 mit aus *Escherichia coli* heterolog produziertem LLO durchgeführt worden ist. Eine Kontamination mit Lipopolysaccharid (LPS) und einer damit verbundenen Verfälschung der Resultate war deshalb nicht auszuschließen. Für die Überprüfung der Translokation von Gp96 wurden HeLa Zellen mit einer sublytischen Konzentration von LLO (100 ng/ml) für eine Stunde behandelt. Die Isolierung von LLO erfolgte homolog aus *L. monocytogenes*, um LPS-freies Toxin zu erhalten. Die Produktion und Reinigung des Toxins erfolgte ausschließlich durch Martina Hudel und Besim Berisha

(Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig Universität Gießen, Deutschland). Eine Überprüfung der Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche erfolgte mittels Durchflusszytometrie. LLO behandelte HeLa Zellen zeigten im Vergleich zu unbehandelten Zellen (CTRL) eine erhöhte Menge an Oberflächen-Gp96 (Abbildung 11 A). Damit konnte bestätigt werden, dass LLO für die Re-Lokalisation von Gp96 an die zelluläre Oberfläche verantwortlich ist. Zur weiteren Überprüfung, ob dieser Translokationsprozess spezifisch für LLO ist oder ob weitere porenbildende Toxine ebenfalls eine solche Translokation induzieren können, wurde dieser Versuch mit dem porenbildenden Toxin Pneumolysin (PLY) aus *Streptococcus pneumoniae* wiederholt. Auch hier konnte gezeigt werden, dass PLY ebenfalls eine Neuverteilung von Gp96 an die zelluläre Oberfläche induzierte (Abbildung 11 B). Für diesen Prozess wurde jedoch eine höhere Konzentration des Toxins benötigt (400 ng/ml).

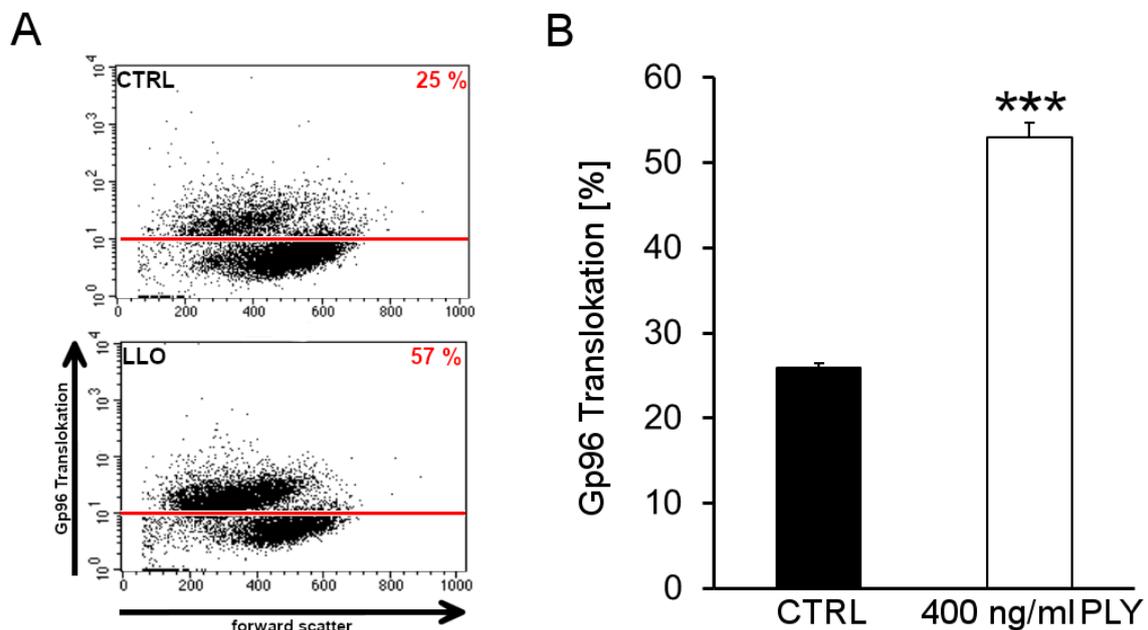


Abbildung 11 Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche. A, B: Behandlung von HeLa Zellen mit LLO (100 ng/ml) oder PLY (400 ng/ml) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ und anschließender Markierung mit einem Phycoerythrin-markierten primären Antikörper gegen Gp96. Die anschließende Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Als Kontrolle (CTRL) wurden unbehandelte Zellen verwendet. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. LLO (A) bzw. PLY (B) führten zu einer Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (A: Gezeigt ist ein Experiment von drei unabhängigen Experimenten; B: ***p ≤ 0,001; t-Test).

Mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie konnte ebenfalls bestätigt werden, dass LLO die Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche induziert. Während in nicht-behandelten Zellen (CTRL) Gp96 diffus in der ganzen Zellen verteilt war, führte die LLO-Behandlung zur Ko-Lokalisation von Gp96 mit der zellulären Natrium-Kalium-ATPase

(Na^+/K^+ -ATPase), welche als Oberflächenmarker fungiert. Interessanterweise war nach LLO-Behandlung Gp96 nicht gleichmäßig auf der Zellmembran verteilt, sondern konzentriert sich in sphärischen Strukturen (Abbildung 12).

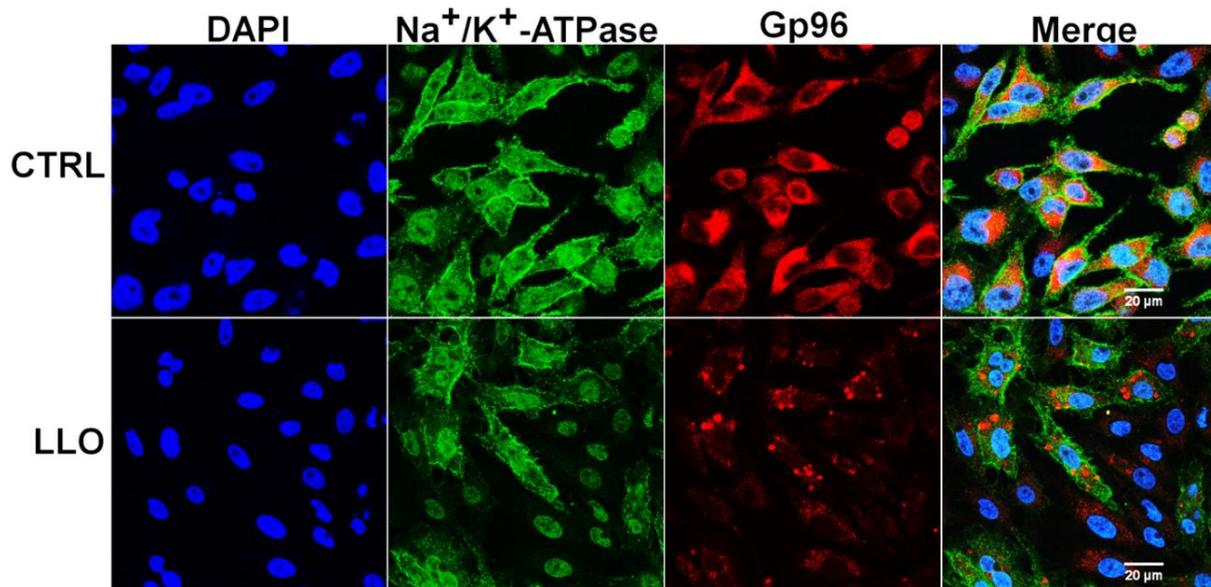


Abbildung 12 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von HeLa Zellen nach Listeriolysin O Behandlung. Behandlung von HeLa Zellen mit LLO (100 ng/ml) und anschließender Markierung mit primären Antikörpern gegen Gp96 und Na^+/K^+ -ATPase. Nach anschließender Inkubation mit Fluorophor-markierten sekundären Antikörpern wurden die Zellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Die Behandlung führte zu einer sphärischen Lokalisation von Gp96 an der zellulären Oberfläche. Blau = DAPI, Grün = Na^+/K^+ -ATPase, Rot = Gp96.

Um zu überprüfen ob es sich bei der Translokation von Gp96 um eine persistente oder transiente Translokation handelt, wurde nach einer einstündigen LLO-Behandlung von HeLa Zellen das Medium mit Toxin-freiem Medium ersetzt und bis zu 24 h weiter inkubiert. Die Analyse erfolgte ebenfalls nach Immunfärbung mittels Phycoerythrin-markierten anti-Gp96 Antikörper über Durchflusszytometrie. Anhand von Abbildung 13 ist zu erkennen, dass sich über die Zeit die Menge an Oberflächen-Gp96 nicht signifikant veränderte.

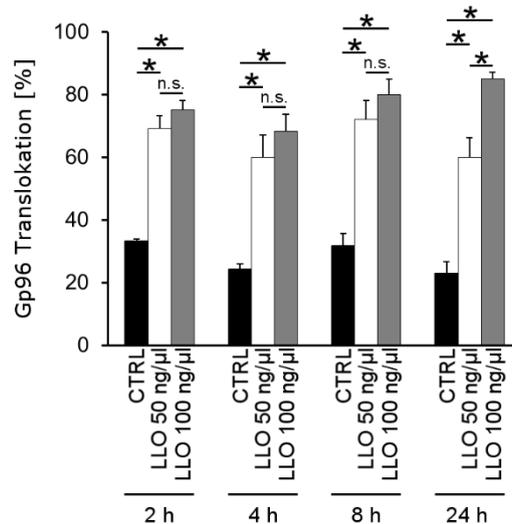


Abbildung 13 Translokation von Gp96 nach Listeriolysin O Behandlung zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Behandlung von HeLa Zellen mit LLO (100 ng/ml) für unterschiedliche Zeitpunkte bei 37°C und 5% CO₂ und anschließender Markierung mit einem Phycoerythrin-markierten primären Antikörper gegen Gp96. Die anschließende Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (* $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Kruskal-Wallis Test und Student-Newman-Keuls post-hoc Test).

6.1.1.2 Putativer Mechanismus der Listeriolysin O-induzierten Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche

Die wichtigste signalerzeugende Eigenschaft von LLO ist der nach innen gerichtete Calcium (Ca²⁺)-Strom. Da es sich beim ER um das wichtigste Speicherorganell für Ca²⁺ handelt und LLO auch die Mobilisierung des dort gespeicherten Ca²⁺ induzieren kann (Gekara et al., 2007), wurde angenommen, dass die intrazelluläre Veränderung der Ca²⁺-Homöostase als ein mögliches Signal für die Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche fungieren könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die LLO-Varianten LLO^{K175E}, LLO^{S176W} und LLO^{E262W} sowie nur Domäne D4, verwendet. Diese Varianten sind alle nicht mehr in der Lage die intrazelluläre Ca²⁺-Homöostase zu beeinflussen (Köster et al., 2014). Hierfür wurden HeLa Zellen mit LLO Wildtyp (wt) und den beschriebenen Varianten für eine Stunde behandelt und nach Immunfärbung mittels Durchflusszytometrie analysiert. Während LLO wt in der Lage war die Translokation von Gp96 zu induzieren, konnte keine Umverteilung von Gp96 an die zelluläre Oberfläche bei Verwendung dieser LLO-Varianten festgestellt werden (Abbildung 14 A). Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurde, unter Zuhilfenahme von Ca²⁺-Chelatoren und Inhibitoren, versucht extrazelluläres Ca²⁺, intrazelluläres Ca²⁺ sowie im ER-gespeichertes Ca²⁺ aus dem System zu entfernen. Für die Depletion von extrazellulärem Ca²⁺ wurden HeLa Zellen 30 min vor LLO-Zugabe mit EGTA (Ethylenglycol-

bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure) behandelt. Zur Depletion von intrazellulärem Ca^{2+} wurden die Zellen 30 min vor LLO-Behandlung mit BAPTA-AM vorbehandelt und für die Depletion von im ER-gespeicherten Ca^{2+} wurden die Zellen 30 min vor LLO-Zugabe mit Thapsigargin (TG) vorbehandelt. Während die Zugabe von LLO wt ohne jegliche Vorbehandlung zu einer Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche führte, konnte diese durch Verwendung der extra- und intrazellulären Chelatoren/Inhibitoren reduziert werden (Abbildung 14 B-D).

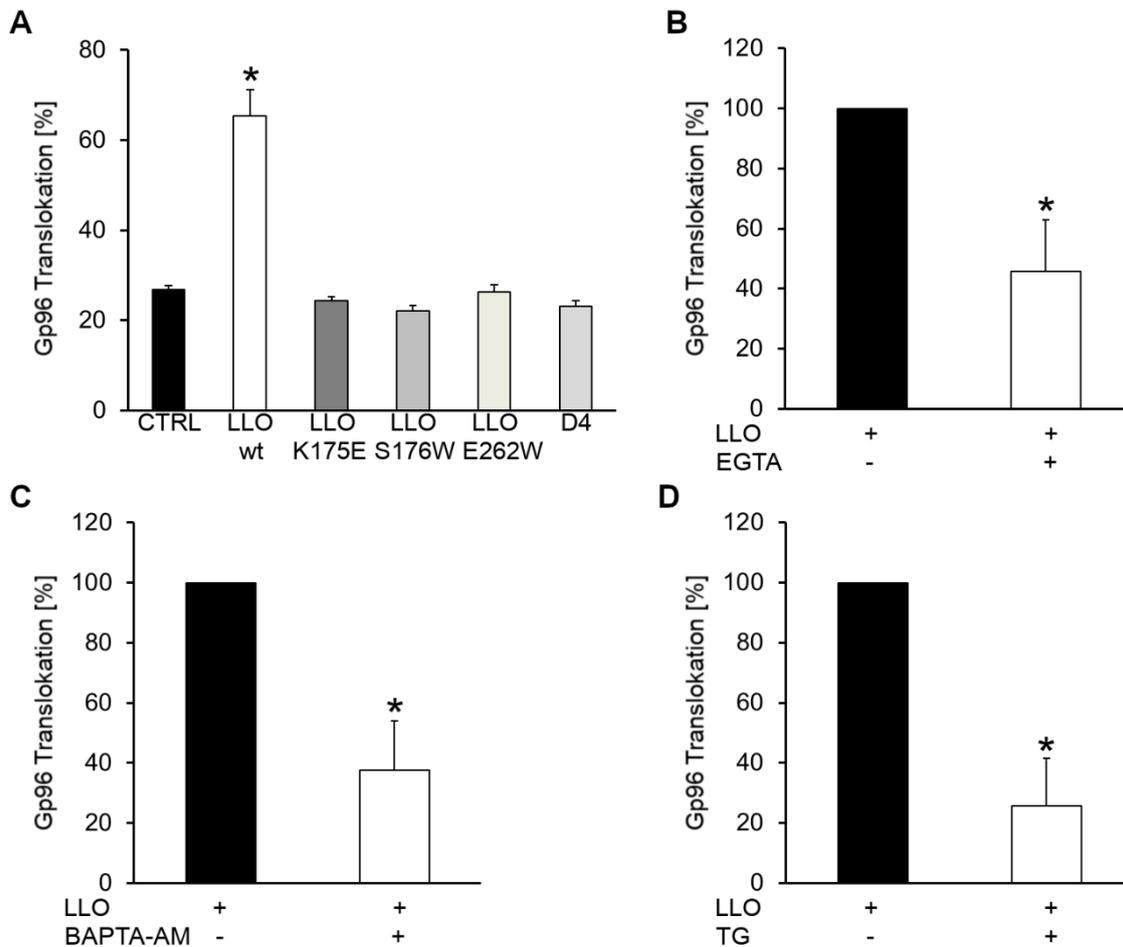


Abbildung 14 Ca^{2+} -Abhängigkeit der Listeriolysin O-induzierten Gp96 Translokation zur zellulären Oberfläche. A: Behandlung von HeLa Zellen mit LLO wt, LLO^{K175E}, LLO^{S176W}, LLO^{E262W} und D4 (150 ng/ml) für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 und anschließender Markierung mit einem Phycoerythrin-markierten primären Antikörper gegen Gp96. Die anschließende Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die Verwendung aller LLO-Varianten führte zu einer Inhibition der Gp96 Translokation (A: * $p \leq 0,05$; Kruskal-Wallis Test und Student-Newman-Keuls post-hoc Test). B-D: Vorbehandlung von HeLa Zellen mit 750 μM EGTA (B), 60 μM BAPTA-AM (C) und 200 nM Thapsigargin (TG) (D) für 30 min bei 37°C und 5% CO_2 und anschließender LLO (150 ng/ml) Behandlung für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 . Nach Markierung mit einem Phycoerythrin-markierten primären Antikörper gegen Gp96 wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Verwendung aller getesteten Ca^{2+} -Chelatoren/Inhibitoren führten zu einer Inhibition der Gp96 Translokation. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei (A) bzw. vier (B-D) unabhängigen Experimenten gezeigt (B-D: * $p \leq 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test).

Zur weiteren Überprüfung, ob Ca^{2+} allein maßgeblich für den Translokationsprozess eine entscheidende Rolle spielt, wurden HeLa Zellen, unabhängig von LLO, mit A23187, einem Ionophor, welches in der Lage ist divalente Kationen über die Membran in das Zellinnere zu transportieren, behandelt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen allein für den Translokationsprozess von entscheidender Bedeutung ist (Abbildung 15 A). Zur weiteren Überprüfung, ob die Mobilisierung von Ca^{2+} -Ionen allein für den Translokationsprozess verantwortlich ist, wurden HeLa Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an Wasserstoffperoxid (H_2O_2) behandelt, welches ebenfalls als Molekül für die Ca^{2+} -Mobilisierung aus intrazellulären Kompartimenten beschrieben ist (Görlach et al., 2015). Dies ist insofern interessant, da andere pathogene Bakterien, wie beispielsweise *Streptococcus pneumoniae*, H_2O_2 produzieren (Spellerberg et al., 1996). In der Tat führte die Behandlung von HeLa Zellen mit H_2O_2 ebenfalls zur Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche (Abbildung 15 B).

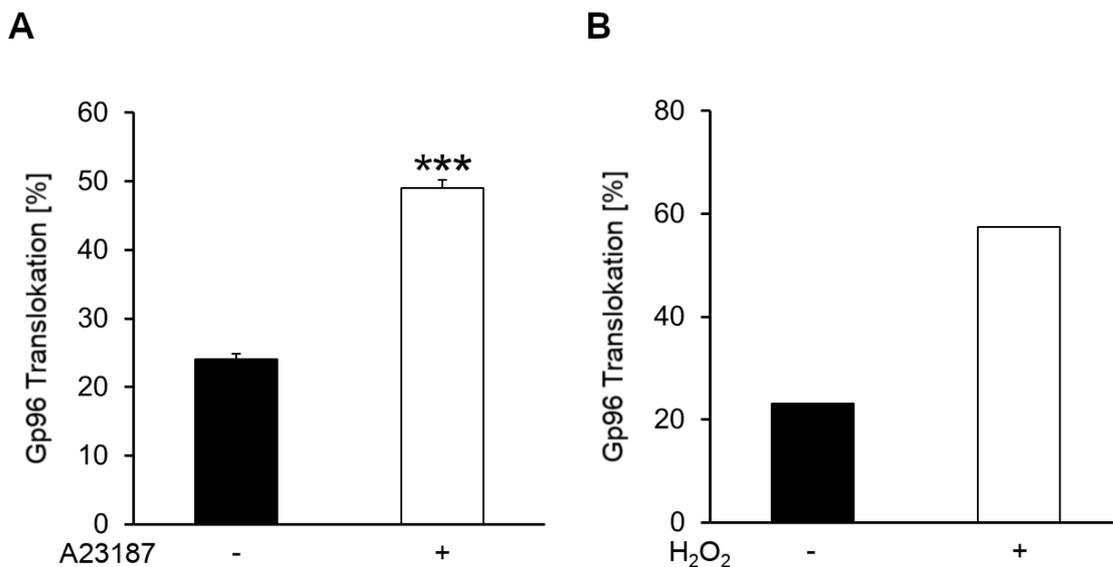


Abbildung 15 Induktion der Gp96 Translokation durch zellulären Stress. A, B: Behandlung von HeLa Zellen mit 10 μM Ionophor A23187 (A) oder 50 mM Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (B) für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 . Nach anschließender Markierung mit einem Phycoerythrin-markierten primären Antikörper gegen Gp96 wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die Induktion von zellulärem Stress führte zur Induktion der Gp96 Translokation. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (A:*** $p \leq 0,001$; t-Test).

Neben einer passiven Veränderung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase kann diese ebenfalls durch das Aktivieren von Signalwegen beeinflusst werden. Bezüglich der Mobilisierung von zellinternen Ca^{2+} -Ionen, insbesondere aus dem ER, ist für *L. monocytogenes* bekannt, dass dies in Abhängigkeit von LLO über den Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3)-Signalweg läuft

(Gekara et al., 2007). Da dieser Signalweg zum Ausstrom von ER-lokalisiertem Ca^{2+} in das Cytosol führt und da es sich bei Gp96 um ein ER-lokalisiertes Chaperon handelt, wurde überprüft, ob dieser Signalweg eine mögliche Rolle für den Translokationsprozess spielt. Um eine solche Beteiligung zu überprüfen, wurden HeLa Zellen mit dem IP_3 -Rezeptor Inhibitor 2-APB vor LLO-Zugabe vorbehandelt. Während ohne Inhibitor-Vorbehandlung LLO eine Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche induzierte, führte die Vorbehandlung der Zellen mit 2-APB zu einer Reduktion vom Oberflächen-Gp96 (Abbildung 16 A) (Versuch durchgeführt von Dr. Helena Pillich, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig Universität Gießen). Für die Aktivierung des IP_3 -Rezeptors, welcher zur selben Zeit ein Liganden-aktivierter Ca^{2+} -Kanal ist, muss zunächst IP_3 produziert werden. Dies geschieht über eine zelluläre Phospholipase C, welche die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu IP_3 und Diacylglycerol (DAG) katalysiert (Streb et al., 1983). Durch die Verwendung des Inhibitors U73122 kann diese Hydrolyse inhibiert und somit untersucht werden, ob bereits bei der Produktion von IP_3 mit der LLO-induzierten Translokation von Gp96 interferiert werden kann. In der Tat führte eine Vorbehandlung von HeLa Zellen mit U73122, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, zu einer leicht verminderten LLO-abhängigen Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche (Abbildung 16 B).

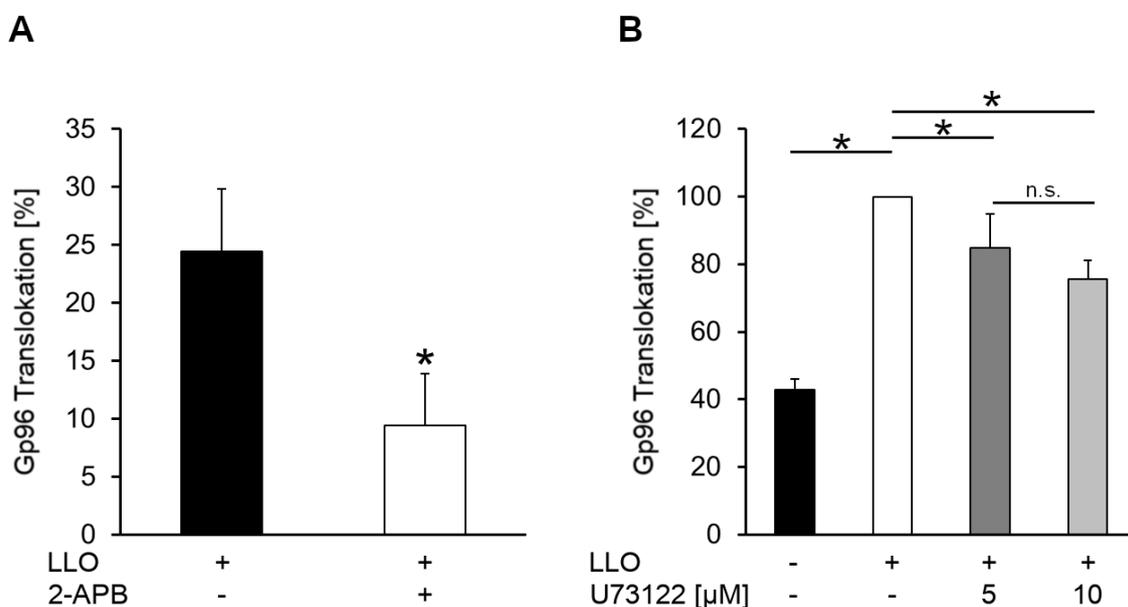


Abbildung 16 Abhängigkeit der Gp96 Translokation vom IP_3 -Signalweg. A, B: Vorbehandlung von HeLa Zellen mit 100 μM 2-APB (A) oder unterschiedlichen Konzentrationen an U73122 (B) für 30 min bei 37°C und 5% CO_2 und anschließender LLO (100 ng/ml) Behandlung für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 . Nach abschließender Markierung mit einem Phycoerythrin-markierten primären Antikörper gegen Gp96 wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Inhibition des IP_3 -Signalweges führte zu einer Reduktion der Gp96 Translokation zur zellulären Oberfläche. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von vier (A) bzw. drei (B) unabhängigen Experimenten gezeigt (A: $*p \leq 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; B: $*p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Kruskal-Wallis Test und Student-Newman-Keuls post-hoc Test).

6.1.1.3 Translokation von weiteren Endoplasmatisches Retikulum-residenten Chaperonen und vom mitochondrialen Chaperon Hsp60

Die Translokation von Endoplasmatisches Retikulum (ER)-residenten Chaperonen zur zellulären Oberfläche ist nicht nur auf Gp96 beschränkt, sondern ist ein allgemeiner Prozess, insbesondere nach Zellschädigung, wie beispielsweise durch UV-Strahlung oder durch bakterielle Virulenzfaktoren (Wiersma et al., 2015). Deshalb wurde untersucht, ob weitere ER-residente Chaperone, aber auch andere zelluläre Chaperone durch LLO-Stimulus an die zelluläre Oberfläche translozieren können. Hierfür wurden HeLa Zellen mit LLO behandelt und nach Immunfärbung mit Antikörpern, welche gegen BiP (*Binding immunoglobulin protein*), Calnexin, Calreticulin, PDI (*Protein disulfide-isomerase*) und Hsp60 (*Heat shock proteins 60*) gerichtet sind, mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Behandlung der Zellen mit LLO wt führte im Vergleich zu unbehandelten Zellen (CTRL) zur Translokation aller getesteten Chaperone. Auch hier war die Translokation abhängig von dem nach innen gerichteten Ca^{2+} -Stroms, da die Stimulation der Zellen mit den LLO-Varianten LLO^{K175E}, LLO^{S176W} und LLO^{E262W} zu keiner signifikanten Translokation der Chaperone zur zellulären Oberfläche führte (Abbildung 17 A-E).

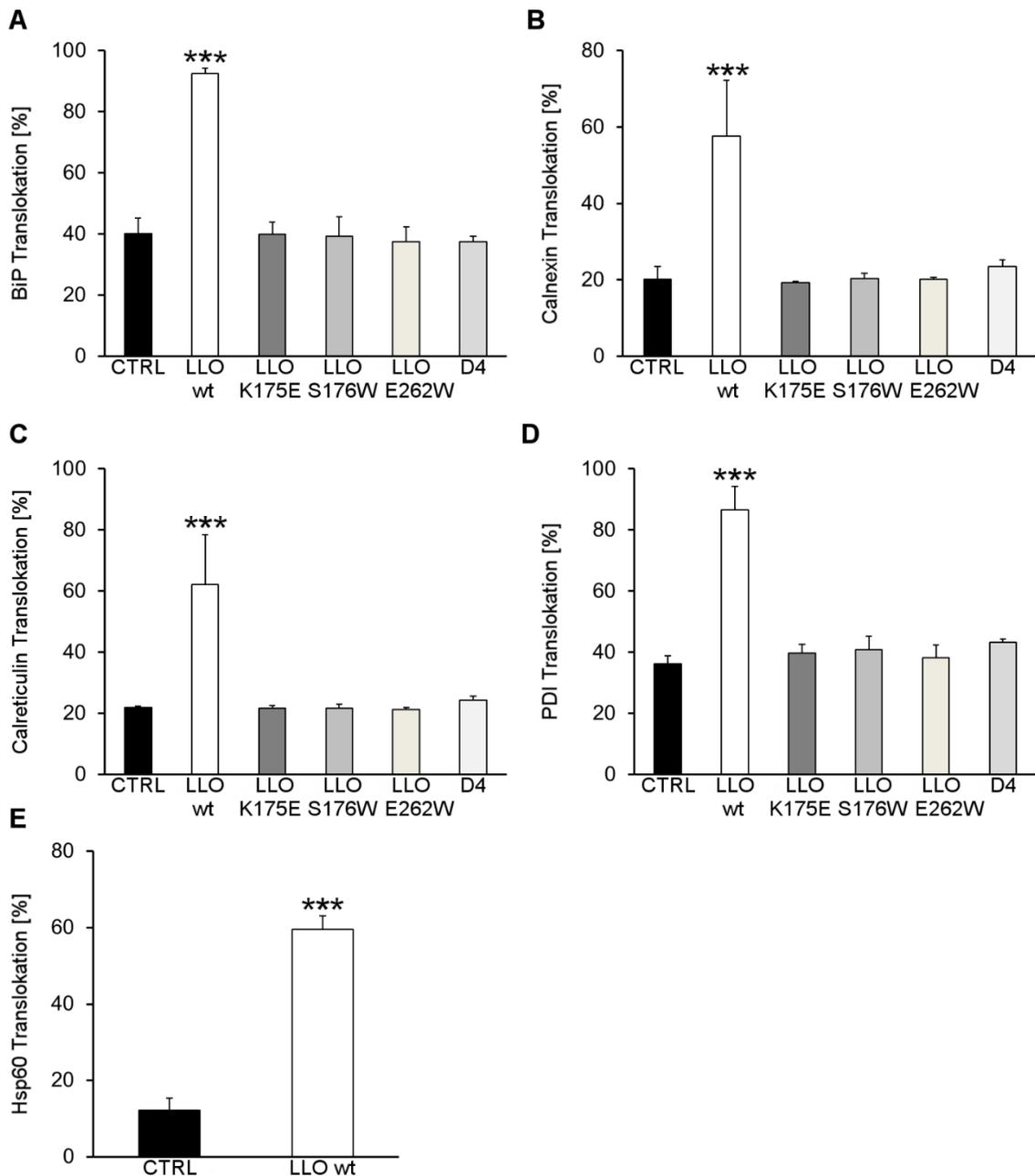


Abbildung 17 Listeriolysin O-induzierte Translokation von ER-residenten und mitochondrialen Chaperonen zur zellulären Oberfläche. A-D: Behandlung von HeLa Zellen mit LLO wt, LLO^{K175E}, LLO^{S176W}, LLO^{E262W} und D4 (150 ng/ml) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ und anschließender Markierung mit Chaperon-spezifischen primären Antikörpern und Fluorophor-markierten sekundären anti-Maus oder anti-Kaninchen Antikörpern. Die anschließende Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die Verwendung aller LLO-Varianten führte zu einer Inhibition der Translokation aller getesteten Chaperone. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei (A, D, E) bzw. vier (B, C) unabhängigen Experimenten gezeigt (***) $p \leq 0,001$; one-way ANOVA und Holm-Šidák post-hoc Test gegen CTRL als Kontrollgruppe). E: Behandlung von HeLa Zellen mit LLO wt (150 ng/ml) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ und anschließender Markierung mit Hsp60-spezifischem primären Antikörper und Fluorophor-markierten sekundären anti-Maus Antikörpern. Die anschließende Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die LLO Behandlung führte zu einer Translokation von Hsp60 zur zellulären Oberfläche. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von unabhängigen Experimenten gezeigt (***) $p \leq 0,001$; t-Test).

6.1.1.4 Die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C von *Listeria monocytogenes* beeinflusst die Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche

Um eine mögliche Rolle der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PlcA) und der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (PlcB) von *Listeria monocytogenes* für die Regulation von LLO zu untersuchen, wurde das LLO-induzierte Translokationsverhalten von Gp96 an die zelluläre Oberfläche näher untersucht. Hierfür wurden HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt, *L. monocytogenes* Δhly , *L. monocytogenes* $\Delta plcA$ oder *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ für sechs Stunden infiziert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Infektion der Zellen mit *L. monocytogenes* wt führte im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen (CTRL), den Erwartungen entsprechend, zu einer Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche. Dieses Translokationsverhalten konnte für die Zellen, welche mit *L. monocytogenes* Δhly infiziert wurden, nicht beobachtet werden (Abbildung 18 A). Interessanterweise führte die Infektion der Zellen mit *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ zu einer signifikant stärkeren Translokation von Gp96 im Vergleich zu den mit *L. monocytogenes* wt infizierten Zellen. Bei den mit *L. monocytogenes* $\Delta plcA$ infizierten Zellen konnte dagegen kein signifikanter Unterschied in der Gp96-Translokation festgestellt werden (Abbildung 18 A). Um sicherzustellen, dass der hier beobachtete Effekt nicht aufgrund einer Verschiebung der Expression der Virulenzfaktoren innerhalb der Mutanten zurückzuführen war, wurde die Sekretion einiger Virulenzfaktoren im Überstand und die Expression in der Zellwandfraktion mittels Western Blot untersucht. Hier konnte kein Unterschied in der Sekretion und Expression festgestellt werden (Abbildung 18 B).

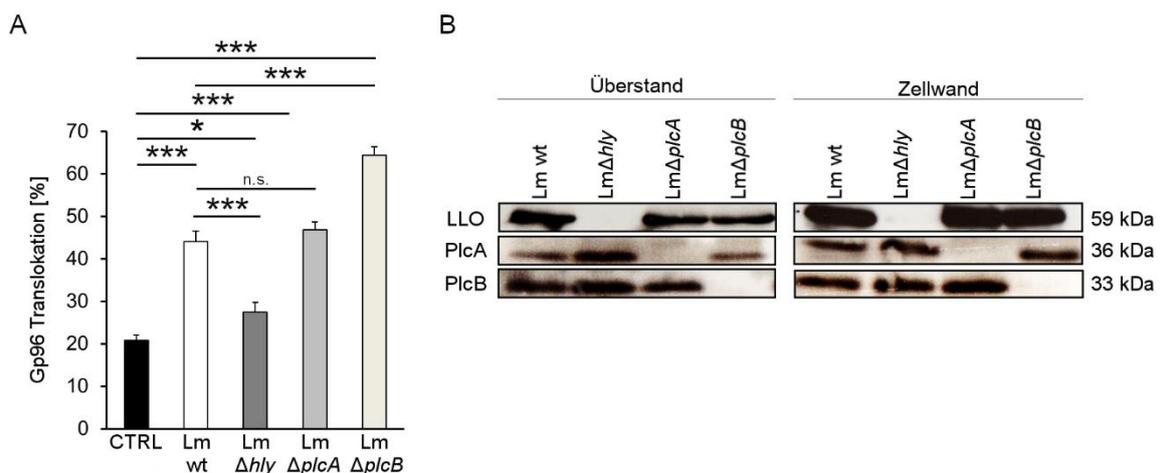


Abbildung 18 Gp96 Translokation nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*. A: Infektion von HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt (Lm wt), *L. monocytogenes* Δhly (Lm Δhly), *L. monocytogenes* $\Delta plcA$ (Lm $\Delta plcA$) oder *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ (Lm $\Delta plcB$) für 6 h. Nach anschließender Immunfärbung mit einem Phycoerythrin-markierten anti-Gp96 Antikörper wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die Infektion

fürhte zu einer LLO-abhängigen, jedoch nicht PlcA-abhängigen, Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche. Die Deletion von PlcB führte sogar zu einer weiteren Erhöhung von Oberflächen-Gp96. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt ($***p \leq 0,001$; $*p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; one-way ANOVA und Student-Newman-Keuls post-hoc Test). B: Western Blot Analyse der Expression der Virulenzfaktoren LLO, PlcA und PlcB in Proteinextrakten aus Lm wt, Lm Δhly , Lm $\Delta plcA$ oder Lm $\Delta plcB$ nach Zellfraktionierung. Gezeigt sind der bakterielle Überstand und die Zellwandfraktion. Die Detektion erfolgte mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen das jeweilige Protein. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Expression der getesteten Virulenzfaktoren nachgewiesen werden. Gezeigt ist ein Experiment von drei unabhängigen Experimenten.

Zur weiteren Überprüfung der Hypothese, dass PlcB in der Lage ist die LLO-induzierte Translokation von Gp96 zu inhibieren, wurden HeLa Zellen mit den gereinigten Proteinen behandelt. Dies hat den Vorteil, dass die auf diese Weise abgeleiteten Effekte nur auf LLO und PlcB zurückzuführen sind, da keine weiteren Virulenzfaktoren, welche ebenfalls eine mögliche Rolle spielen könnten, vorhanden sind. Die Reinigung von PlcA und PlcB erfolgte ausschließlich durch Martina Hudel und Besim Berisha (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig Universität Gießen). Die Produktion erfolgte dabei heterolog im nicht-pathogenen *Listeria innocua* Δlgt unter Verwendung eines C-terminalen His-Tags (Abbildung 19 A). Außerdem erfolgte die Reinigung ohne Propeptid, um ein aktives Protein zu gewährleisten. Nach Reinigung wurde zunächst überprüft, ob die enzymatische Aktivität von PlcA und PlcB weiterhin gegeben ist. Hierfür wurden in Lecithin-Agar Platten kleine Löcher gestanzt und eine PlcA oder PlcB-haltige Lösung hineingegeben. Als Kontrolle wurde PBS verwendet. Die Agar-Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Da es sich bei Lecithin um eine Mischung verschiedener Phosphatidylcholin-haltiger Phospholipide handelt, können diese durch PlcA und PlcB hydrolysiert werden. Findet eine solche Hydrolyse statt, kommt es auf den Lecithin-Agarplatte zu einer Hof-Bildung. Wie auf den verwendeten Lecithin-Agar Platten zu sehen ist, führt die Zugabe von PlcA oder PlcB im Vergleich zur PBS Kontrolle zu einer klar sichtbaren Hof-Bildung (Abbildung 19 B). Weiterhin wurde mit Hilfe eines massenspektrometrischen Verfahrens die enzymatische Aktivität von PlcB ein weiteres Mal geprüft. Hierfür wurden *erythrocyte ghosts* als Substrat verwendet. Dabei handelt es sich um versiegelte und gewaschene Erythrozyten-Membranen, die der Struktur natürlich vorkommender eukaryotischer Membranen entsprechen und sich somit hervorragend als Substrat für PlcB eignen. Es konnte festgestellt werden, dass PlcB in Abhängigkeit von der Zeit Phosphocholin (ChoP) produziert und somit enzymatisch aktiv ist. Die ChoP-Produktion nahm über die Zeit zu und erreichte nach ca. 120 min eine Sättigung (Abbildung 19 C) (Massenspektroskopie erfolgte durch Prof. Dr. Günter Lochnit, Biochemie Institut, Justus-Liebig Universität Gießen).

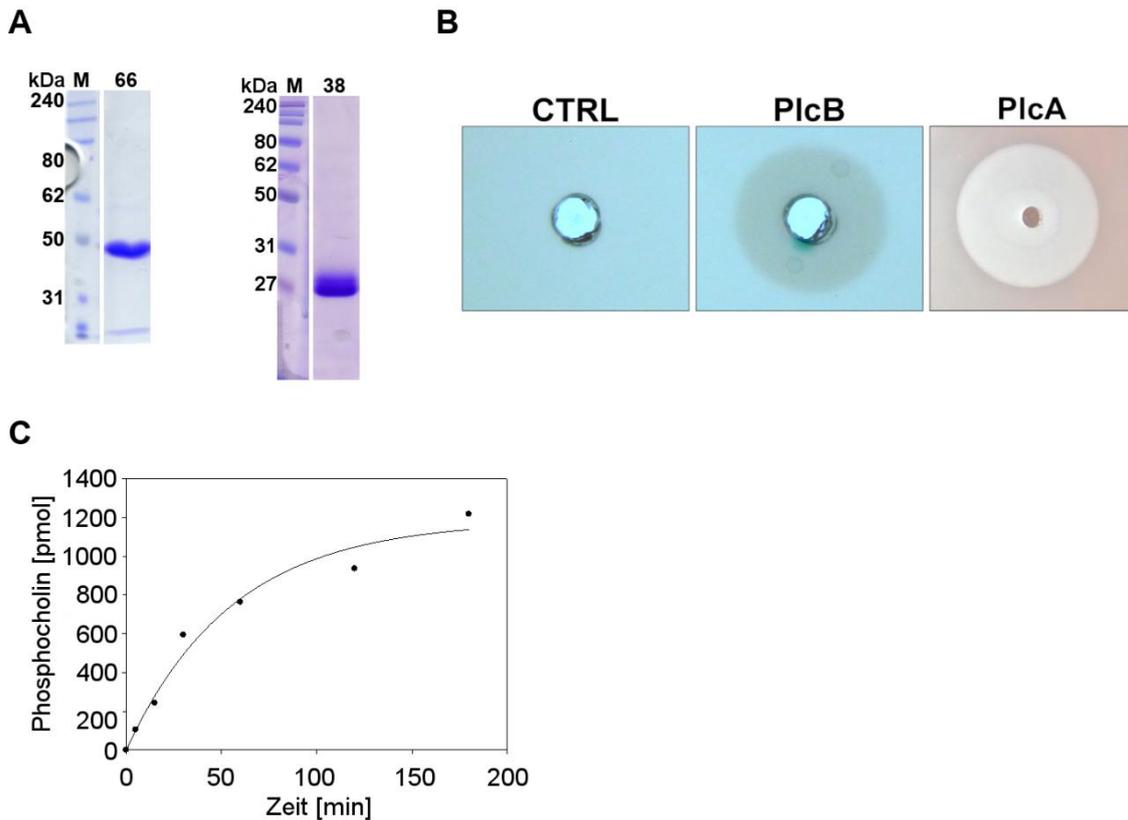


Abbildung 19 Reinigung und Bestimmung der enzymatischen Aktivität von PlcA und PlcB. A: Coomassie Brilliant Blau-Färbung nach Proteinreinigung von PlcA (links) und PlcB (rechts). Gezeigt sind die Elutionsfraktionen 66 (PlcA) und 38 (PlcB). M = Marker. B: Nachweis der Phospholipase Aktivität von PlcA und PlcB durch Inkubation der gereinigten Proteine auf Lecithin-Agarplatten. Die Hofbildung zeigt die Hydrolyse von Lecithin und somit die enzymatische Aktivität von PlcA und PlcB an. C: Bestimmung der enzymatischen Aktivität von PlcB durch Phosphocholin (ChoP)-Produktion unter Verwendung von *erythrocyte ghosts* als Substrat. Über die Zeit findet eine ChoP-Produktion statt, die bei späteren Zeitpunkten sättigt.

Zur Überprüfung der inhibitorischen Wirkung von PlcB auf die Translokation von Gp96 wurden HeLa Zellen mit reinem LLO und PlcB zeitgleich für eine Stunde behandelt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Eine simultane Behandlung der Zellen mit LLO und PlcB führte zu einer Reduktion von Oberflächen-Gp96 im Vergleich zu den nur mit LLO behandelten HeLa Zellen. Die dabei beobachtete Reduktion der Translokation war abhängig von der eingesetzten PlcB-Konzentration (Abbildung 20 A). Die Verwendung von gereinigtem PlcA zeigte dagegen keine signifikanten Unterschiede in der Gp96 Translokation (Abbildung 20 B). Damit konnte bestätigt werden, dass PlcB in der Tat LLO-induzierte Wirtzellantworten negativ regulieren kann.

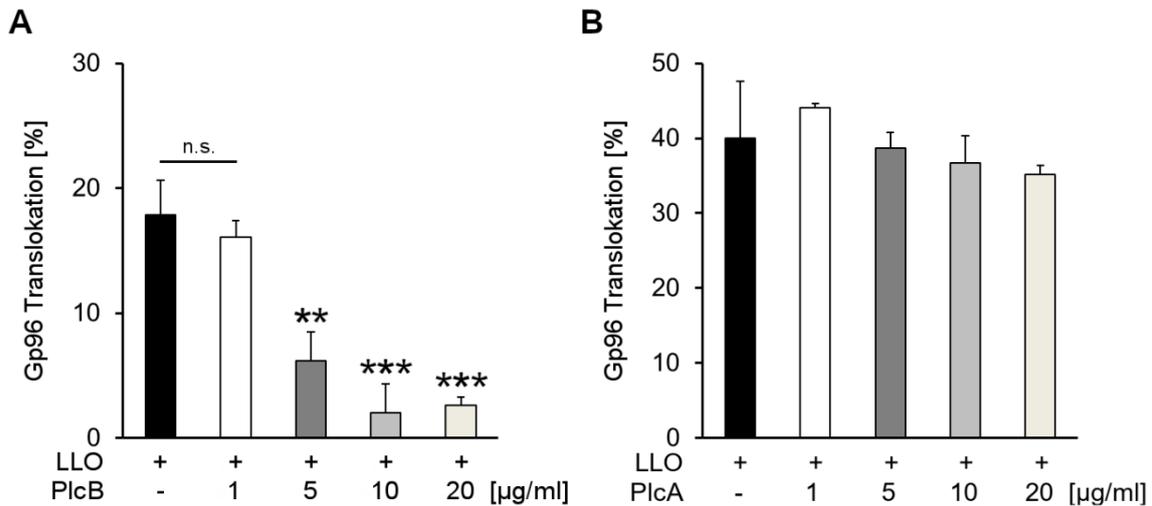


Abbildung 20 PlcB-abhängige Reduktion der Listeriolysin O-abhängigen Gp96 Translokation zur zellulären Oberfläche. A, B: Simultane Behandlung von HeLa Zellen mit LLO (100 ng/ml) und unterschiedlichen Konzentrationen an PlcB (A) und PlcA (B) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ und anschließender Markierung mit einem Phycoerythrin-markierten primären Antikörper gegen Gp96. Die anschließende Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die simultane Behandlung mit PlcB führte zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der Gp96 Translokation. Die Behandlung mit PlcA zeigte dagegen keinen signifikanten Effekt. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei (A) bzw. zwei (B) unabhängigen Experimenten gezeigt (A: *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; n.s. = nicht signifikant; one-way ANOVA und Holm–Šidák post-hoc Test gegen LLO als Kontrollgruppe).

6.2 PlcB interferiert mit dem durch Listeriolysin O induzierten und nach innen gerichteten Ca²⁺-Strom

Extrazelluläres LLO induziert durch seine Membranbindung und porenbildenden Eigenschaften einen nach innen gerichteten Ca²⁺-Strom, der eine Vielzahl unterschiedlicher Ca²⁺-abhängiger Signalwege in der Wirtszelle induziert. Da in dieser Arbeit bereits gezeigt wurde, dass die durch LLO induzierte Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche ein Ca²⁺-abhängiger Prozess ist, welcher zudem durch die Wirkungsweise von PlcB inhibiert wird, wurde vermutet, dass PlcB durch Veränderungen des Ca²⁺-Stroms aktiv Einfluss auf die Wirkungsweise von LLO nimmt. Zur Beantwortung dieser Frage wurde, in Kooperation mit dem Institut für Anatomie der Justus-Liebig Universität Gießen, *live cell imaging* zur Bestimmung von Änderungen im LLO-induzierten und nach innen gerichteten Ca²⁺-Strom durchgeführt. Hierfür wurden HeLa Zellen auf Objektträgern ausgesät und mit Fluo-4-AM, einem Ca²⁺-sensitiven Farbstoff, beladen. Nach Aufnahme einer Grundlinie der physiologischen Ca²⁺-Ströme wurden die Zellen mit LLO allein oder in Kombination mit PlcB behandelt und die Intensität der Fluoreszenz von Fluo4-AM, welche durch den Einstrom von Ca²⁺ zunimmt, verfolgt. Die Behandlung der Zellen mit LLO alleine führte im Vergleich zur

Kontrolle (Verwendung eines Ca^{2+} -freien Zellkulturmediums) zu einen schnellen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} , gefolgt von einer moderaten Wiederherstellung des Grundzustandes (Abbildung 21 A). Die simultane Behandlung der Zellen mit LLO und PlcB zeigte ebenfalls einen raschen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} . Die Amplitude zeigte jedoch eine geringere Intensität im Vergleich zu Zellen, welche nur mit LLO behandelt wurden. Außerdem zeigte sich eine deutlich schnellere Wiederherstellung des Grundzustandes (Abbildung 21 B).

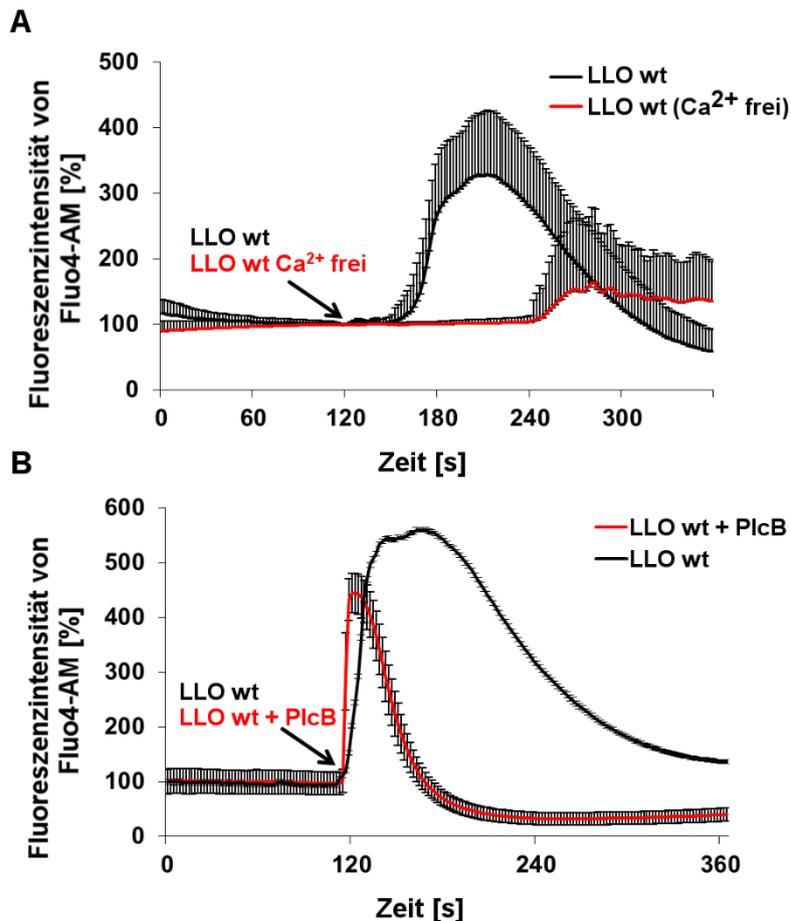


Abbildung 21 Modulation des Listeriolysin O-abhängigen und nach innen gerichteten Ca^{2+} -Stroms durch PlcB. A: Behandlung von Fluo4-AM-beladenen HeLa Zellen mit LLO (150 ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von extrazellulärem Ca^{2+} . Änderungen im Ca^{2+} -Strom wurden über die Zeit verfolgt. Die Behandlung der Zellen mit LLO induziert einen nach innen gerichteten Ca^{2+} -Strom. In Abwesenheit von Ca^{2+} war dies nicht mehr zu beobachten. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Es wurden insgesamt 51 (Medium mit Ca^{2+}) bzw. 136 (Medium ohne Ca^{2+}) Zellen analysiert. B: Simultane Behandlung von Fluo4-AM-beladenen HeLa Zellen mit LLO (150 ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von PlcB (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Änderungen im Ca^{2+} -Strom wurden über die Zeit verfolgt. In Anwesenheit von PlcB war der LLO-induzierte Ca^{2+} -Strom reduziert und die Wiederherstellung des Grundzustandes beschleunigt. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. Es wurden insgesamt 236 (LLO wt) bzw. 164 (LLO wt + PlcB) Zellen analysiert.

6.3 PlcB inhibiert Listeriolysin O-induzierte pathologische Veränderungen der mitochondrialen Struktur und Integrität

Um weiter einschätzen zu können, ob PlcB eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität von LLO ausübt, wurden mögliche Veränderungen innerhalb des mitochondrialen Netzwerks, welches durch LLO beeinflusst wird, untersucht. Hierfür wurde zunächst die Produktion von mitochondrialen Superoxiden untersucht. Dafür wurden HeLa Zellen mit *Listeria monocytogenes* wt, *L. monocytogenes* Δhly , *L. monocytogenes* $\Delta plcA$, oder *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ für vier Stunden infiziert. Nach anschließender Färbung mit MitoSOX™ Red, einem fluoreszierenden Farbstoff, welcher in Gegenwart von mitochondrialen Superoxiden oxidiert, wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Infektion der Zellen mit *L. monocytogenes* wt führte im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrolle (UI), den Erwartungen entsprechend, zu einer erhöhten Produktion von mitochondrialen Superoxiden. Die Infektion mit *L. monocytogenes* Δhly führte dagegen zu keiner Produktion von mitochondrialen Superoxiden. Bei den Zellen, welche mit *L. monocytogenes* $\Delta plcA$ infiziert wurden, war eine Produktion von mitochondrialen Superoxiden zu beobachten. Diese lag in einem ähnlichen Bereich wie für die mit *L. monocytogenes* wt infizierten Zellen. Interessanterweise führte die Infektion von HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ zu einer stark erhöhten Produktion von mitochondrialen Superoxiden (Abbildung 22 A). Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass PlcB ein möglicher Antagonist für die von LLO-induzierten Wirtszellantworten ist. Da während einer bakteriellen Infektion mit *L. monocytogenes* eine Vielzahl verschiedener sekretierter Proteine gegenwärtig sind und dadurch weitere Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Proteinen nicht ausgeschlossen werden können, wurde dieser Versuch unter Zuhilfenahme von gereinigten Proteinen wiederholt. Dafür wurden HeLa Zellen mit reinem LLO alleine oder in Kombination mit reinem PlcB für 10 min behandelt. Während die Zugabe von LLO im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (CTRL) zu einer starken Produktion von mitochondrialen Superoxiden führte, zeigte die simultane Behandlung der Zellen mit LLO und PlcB eine verminderte Produktion von mitochondrialen Superoxiden. Die Behandlung mit PlcB alleine zeigte dagegen keine Produktion von mitochondrialen Superoxiden (Abbildung 22 B). Um zu prüfen, ob ein ähnliches Ergebnis ebenfalls mit PlcA erzielt werden kann, wurde dieses anstelle von PlcB verwendet. Anders als die simultane Behandlung von HeLa Zellen mit LLO und PlcB führte die Behandlung mit LLO und PlcA zu keiner signifikanten Veränderung der von LLO induzierten Wirtszellantwort (Abbildung 22 B).

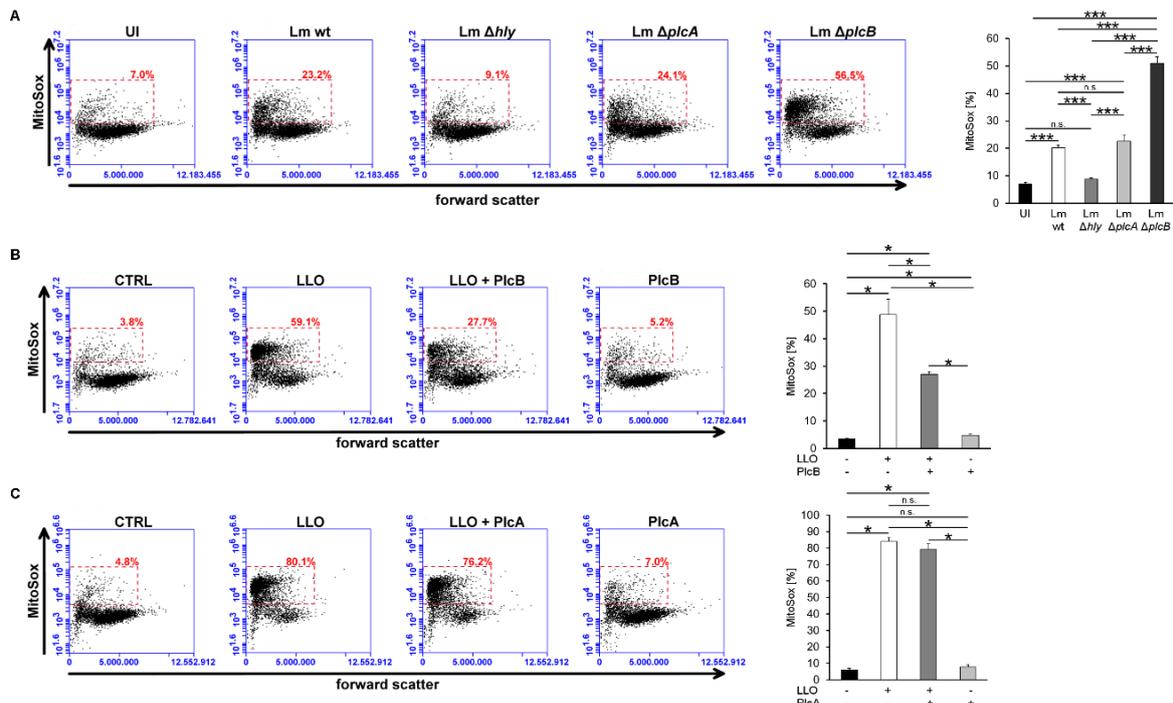


Abbildung 22 PlcB-induzierte Reduktion der Listeriolysin O-abhängigen mitochondrialen Superoxid Produktion. A: Infektion von HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt (Lm wt), *L. monocytogenes* Δhly (Lm Δhly), *L. monocytogenes* $\Delta plcA$ (Lm $\Delta plcA$), *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ (Lm $\Delta plcB$) oder nicht infiziert (UI) für 4 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Färbung mit MitoSox bei 37°C für 10 min wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zellen, welche mit Lm wt und mit Lm $\Delta plcA$ infiziert wurden, zeigten im Vergleich zu Zellen, welche mit Lm Δhly infiziert wurden, eine verstärkte mitochondriale Superoxid Produktion. Zellen, welche mit Lm $\Delta plcB$ infiziert wurden, zeigten sogar eine noch stärkere Produktion an mitochondrialen Superoxiden. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (** $p \leq 0,001$; n.s. = nicht signifikant; one-way ANOVA und Student-Newman-Keuls post-hoc Test). B, C: Behandlung von HeLa Zellen mit LLO (50 ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von PlcB (5 μ g/ml) (B) oder PlcA (5 μ g/ml) (C) für 10 min bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Färbung mit MitoSox bei 37°C für 10 min wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zellen, welche mit LLO behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu unbehandelten Zellen (CTRL) eine verstärkte Produktion von mitochondrialen Superoxiden. Simultane Behandlung mit PlcB, aber nicht mit PlcA, führte zu einer Reduktion der LLO-induzierten mitochondrialen Superoxid Produktion. Die Behandlung mit PlcB oder PlcA alleine zeigte im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante mitochondriale Superoxid Produktion. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (* $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Kruskal-Wallis Test und Student-Newman-Keuls post-hoc Test).

Bei Mitochondrien handelt es sich um sehr dynamische Organellen, welche sich in einem ständig wechselnden Zustand zwischen Fission und Fusion befinden. Da gezeigt wurde, dass *L. monocytogenes* mit Hilfe von LLO in der Lage ist dieses dynamische Netzwerk transient zu fragmentieren (Stavru et al., 2011), wurde untersucht, ob PlcB diesen LLO-abhängigen Prozess mildern kann. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden HeLa Zellen

mit *L. monocytogenes* wt, *L. monocytogenes* Δhly oder *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ für vier Stunden infiziert. Die mitochondriale Fragmentierung wurde durch Beobachtung von Änderungen im mitochondrialen Membranpotenzial ($\Delta\Psi$) bestimmt. Hierfür wurden die Zellen nach Infektion mit MitoProbe™ JC-1 markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon (CCCP) behandelt, welches zu einer Störung des $\Delta\Psi$ führt. Die Infektionen haben gezeigt, dass *L. monocytogenes* wt, im Vergleich zur nicht infizierten (UI) Zellen, zu einer leichten Steigerung der mitochondrialen Fragmentierung führte. In Zellen, welche mit *L. monocytogenes* Δhly infiziert wurden, war eine solche Steigerung nicht zu beobachten. Die Infektion mit *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ führte dagegen zu einer signifikant verstärkten mitochondrialen Fragmentierung (Abbildung 23 A). Die Bestimmung der mitochondrialen Fragmentierung unter Verwendung von reinem LLO und PlcB führten zu einem ähnlichen Ergebnis. Während diejenigen HeLa Zellen, welche nur mit LLO behandelt wurden, eine Steigerung der mitochondrialen Fragmentierung zeigten, führte die simultane Behandlung der Zellen mit LLO und PlcB zu einer Verminderung dieses Effekts. Die Behandlung mit PlcB alleine hatte dagegen keinen signifikanten Effekt auf das mitochondriale Netzwerk (Abbildung 23 B).

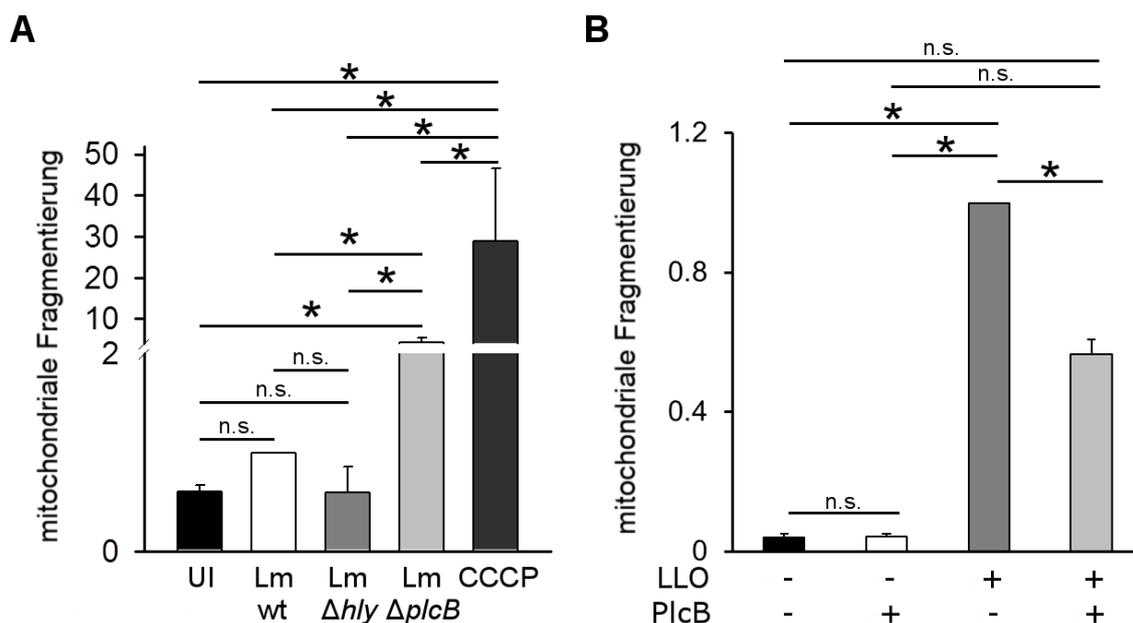


Abbildung 23 PlcB-abhängige Reduktion der Listeriolysin O-induzierten mitochondrialen Fragmentierung. A: Infektion von HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt (Lm wt), *L. monocytogenes* Δhly (Lm Δhly), *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ (Lm $\Delta plcB$) oder nicht infiziert (UI) für 4 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Färbung mit MitoProbe™ JC-1 bei 37°C für 20 min wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit Carbonylcyanid-*m*-chlorphenylhydrazon (CCCP) für 5 min bei 37°C inkubiert. Zellen, welche mit Lm wt, Lm Δhly oder Lm $\Delta plcA$ infiziert wurden, zeigten im Vergleich zu Zellen, welche nicht infiziert wurden (UI), keine signifikante mitochondriale Fragmentierung. Zellen, welche mit Lm $\Delta plcB$ infiziert wurden, zeigten dagegen eine verstärkte mitochondriale Fragmentierung. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (* $p \leq$

0,05; n.s. = nicht signifikant; Kruskal-Wallis Test und Student-Newman-Keuls post-hoc Test). B: Behandlung von HeLa Zellen mit LLO (50 ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von PlcB (5 µg/ml) für 10 min bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Färbung mit JC-1 bei 37°C für 20 min wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Gezeigt ist das Verhältnis von rotem (nicht fragmentiert) und grünem (fragmentiert) Fluoreszenzkanal. Zellen, welche mit LLO behandelt wurden, zeigen im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine verstärkte mitochondriale Fragmentierung. Simultane Behandlung mit PlcB führte zu einer signifikanten Reduktion der LLO-induzierten mitochondrialen Fragmentierung. Die Behandlung mit PlcB alleine zeigte keinen signifikanten Effekt. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (* $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Kruskal-Wallis Test und Student-Newman-Keuls post-hoc Test).

Zur weiteren Bestätigung der Hypothese, dass PlcB LLO-induzierte Wirtszellantworten inhibiert, wurde die Veränderung des mitochondrialen Netzwerkes mit Hilfe von konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie untersucht. Hierfür wurden auf Deckgläschen ausgesäte HeLa Zellen mit LLO alleine oder in Kombination mit PlcB behandelt. Zur Darstellung des mitochondrialen Netzwerkes wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen Cox IV (Cytochrom-c-Oxidase) immungefärbt. Während die unbehandelten Zellen (CTRL) ein klares filamentöses mitochondriales Netzwerk zeigten, führte die Behandlung mit LLO zu einer starken Fragmentierung der Mitochondrien. Diese Fragmentierung konnte durch PlcB wieder aufgehoben werden (Abbildung 24). Diese konfokalen Aufnahmen unterstützen somit ebenfalls die Hypothese, dass PlcB antagonistisch auf LLO wirkt und protektiv auf den von LLO induzierten Verlust der mitochondrialen Integrität wirkt.

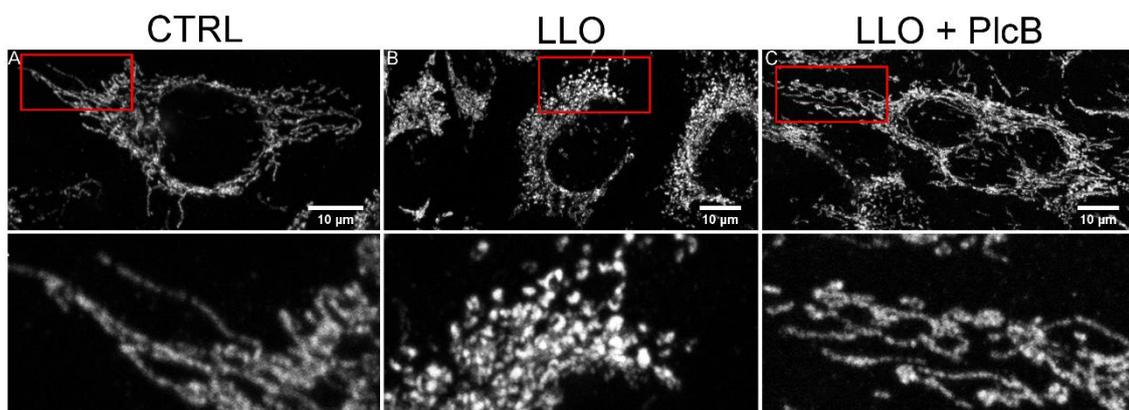


Abbildung 24 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie der PlcB-induzierten Inhibition der Listeriolysin O-abhängigen mitochondrialen Fragmentierung. Behandlung von HeLa Zellen mit LLO (50 ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von PlcB (5 µg/ml) für 10 min bei 37°C und 5% CO₂. Die Mitochondrien wurden mittels eines primären Antikörpers gegen Cox IV und eines Fluorophor-gekoppelten sekundären Antikörpers gefärbt. Die Analyse der Proben erfolgte mittels eines konfokalen Laser-Scanning Mikroskops (Zeiss LSM 710, Jena, Deutschland). Im Vergleich zur unbehandelten Probe (CTRL), zeigten die LLO behandelten Zellen eine Fragmentierung der Mitochondrien. Simultane Behandlung mit LLO und PlcB führte zur Wiederherstellung der tubulären Struktur der Mitochondrien.

6.4 PlcB antagonisiert die Listeriolysin O-induzierte Apoptose in Abhängigkeit von Cytochrom c und Caspase 3/7

Eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* kann bei den betroffenen Zellen Apoptose auslösen. Die Induktion erfolgt dabei maßgeblich durch die Sekretion von LLO und kann in einen Caspase-abhängigen- und unabhängigen Signalweg geschehen (Carrero et al., 2004). Wird Apoptose induziert, findet eine Re-Lokalisation von Phosphatidylserin (PS) von der Membranınnenseite auf die Membranaußenseite statt (Fadell & Xue, 2009). Das nach außen gerichtete PS kann anschließend mittels spezifischer Bindung von Annexin V visualisiert werden. Zur Überprüfung ob PlcB ebenfalls die durch LLO induzierte Apoptose von Zellen mildern kann, wurden HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt, *L. monocytogenes* Δhly und *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ infiziert und anschließend mit Fluorophor-markiertem Annexin V inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Infektion mit *L. monocytogenes* wt führte, im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (UI), zu einer Exposition von PS auf der Membranaußenseite. Die Infektion mit *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ führte sogar zu einer signifikant höheren Annexin V Bindung im Vergleich zur Infektion mit *L. monocytogenes* wt (Abbildung 25 A). Zur weiteren Überprüfung des antagonisierenden Effekts wurden HeLa Zellen auf Veränderungen in der Cytochrom c-Lokalisation untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit *L. monocytogenes* wt, *L. monocytogenes* Δhly oder *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ infiziert und anschließend lysiert und fraktioniert. Zur Überprüfung der Reinheit der Fraktionen wurde Cox IV als Marker-Protein für die mitochondriale Fraktion verwendet. Außerdem wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) als Ladekontrolle verwendet. Eine Infektion mit *L. monocytogenes* wt, aber nicht mit *L. monocytogenes* Δhly , führte zu einer verringerten Cytochrom c-Freisetzung in das Cytosol der Wirtszelle. Die Infektion mit *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ führte dagegen zu einer verstärkten Freisetzung von Cytochrom c (Abbildung 25 B).

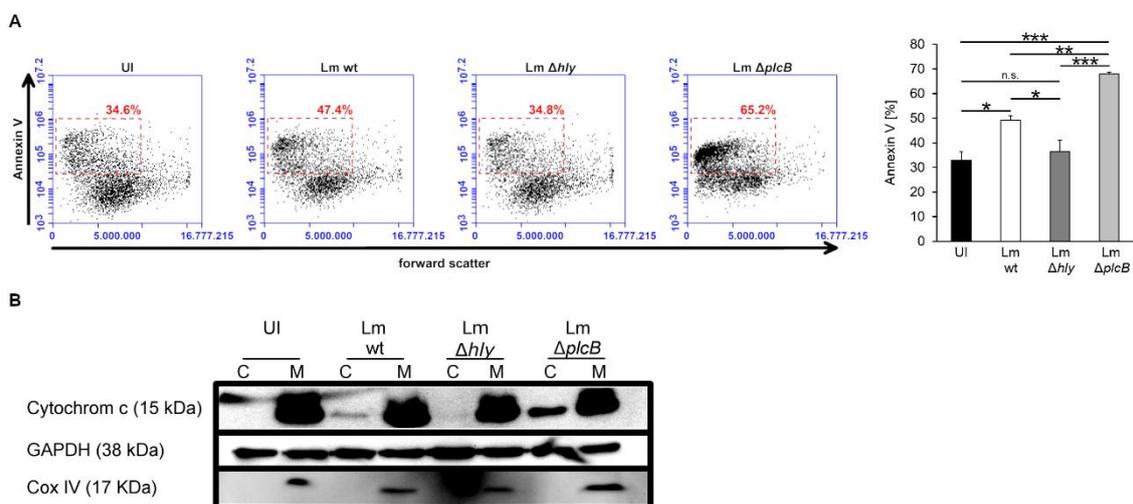


Abbildung 25 PlcB-induzierte Reduktion der Listeriolysin O-abhängigen Induktion der Apoptose. A: Infektion von HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt (Lm wt), *L. monocytogenes* Δhly (Lm Δhly), *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ (Lm $\Delta plcB$) oder nicht infiziert (UI) für 4 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Färbung mit Fluorophor-markiertem Annexin V bei RT für 15 min wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zellen, welche mit Lm wt infiziert wurden, zeigten im Vergleich zu nicht infizierten Zellen und Zellen, welche mit Lm Δhly infiziert wurden, eine verstärkte Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der Membranaußenseite. Bei Zellen, welche mit Lm $\Delta plcB$ infiziert wurden, war diese Exposition signifikant erhöht. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt ($***p \leq 0,001$; $**p \leq 0,01$; $*p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; one-way ANOVA und Student-Newman-Keuls post-hoc Test). B: Western Blot von HeLa Zellen, welche mit Lm wt, Lm Δhly oder Lm $\Delta plcB$ für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ infiziert wurden. Nach der Infektionsdauer wurden die Zellen in eine cytosolische Fraktion (C) und eine Membranfraktion (M) fraktioniert und der Gehalt an Cytochrom c untersucht. GAPDH wurde dabei als Ladekontrolle und Cox IV als Reinheitskontrolle der Präparation verwendet. Die Zellen, welche mit Lm wt infiziert wurden, zeigten einen geringen Cytochrom c-Austritt aus den Mitochondrien. Bei Zellen, welche mit Lm $\Delta plcB$ infiziert wurden, war der Cytochrom c-Austritt dagegen deutlich ausgeprägter. Gezeigt ist ein Experiment von drei.

Zur weiteren Überprüfung eines möglichen protektiven Effekts von PlcB auf die von LLO induzierte Apoptose wurde die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 untersucht. Dafür wurden HeLa Zellen, in ähnlicher Weise wie für die Bestimmung der Cytochrom c-Lokalisation, mit *L. monocytogenes* wt sowie *L. monocytogenes* Δhly oder *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ infiziert. Anschließend wurden die Zellen mit CellEvent™ Caspase-3/7 Green angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit Staurosporin, einem allgemeinen Inhibitor von Protein Kinasen, behandelt. Anhand der gewonnenen Daten ist festzustellen, dass weder in den Zellen, welche mit *L. monocytogenes* wt infiziert wurden, noch in den Zellen, welche mit *L. monocytogenes* Δhly infiziert wurden, eine signifikante Aktivierung der Caspasen 3 und 7 stattfand. Dagegen zeigten die Zellen, welche mit *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ infiziert wurden, im Vergleich zu Zellen, welche mit *L. monocytogenes* wt infiziert wurden, eine signifikante Aktivierung der Caspasen 3 und 7 (Abbildung 26 A). Diese Beobachtung konnte durch Verwendung der reinen Proteine bestätigt werden. Hierfür wurden HeLa Zellen mit LLO allein oder in Kombination mit PlcB behandelt und die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 verfolgt. Während LLO-behandelte Zellen, im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen, eine Aktivierung der Caspasen zeigten, führte die simultane Behandlung von LLO mit PlcB zu einer signifikanten Reduktion der Caspase-Aktivierung (Abbildung 26 B).

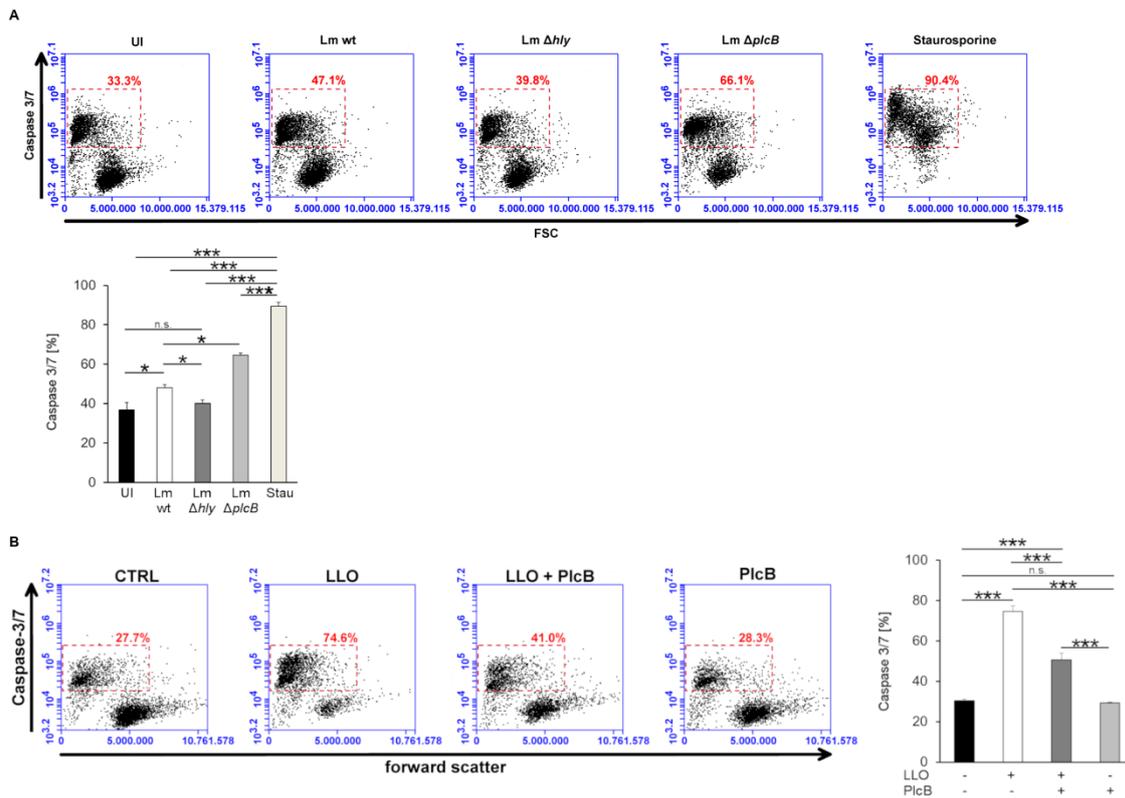


Abbildung 26 PlcB-induzierte Reduktion der Listeriolysin O-abhängigen Induktion der Caspase 3/7-Aktivierung. A: Infektion von HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt (Lm wt), *L. monocytogenes* Δhly (Lm Δhly), *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ (Lm $\Delta plcB$) oder nicht infiziert (UI) für 4 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Färbung mit CellEvent Caspase-3/7 bei 37°C für 25 min wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Staurosporin behandelt. Zellen, welche mit Lm wt infiziert wurden, zeigten im Vergleich zu Zellen, welche mit Lm Δhly infiziert wurden, eine verstärkte Aktivierung der Caspasen 3 und 7. Bei Zellen, welche mit Lm $\Delta plcB$ infiziert wurden, war diese Aktivierung im Vergleich zu Lm wt signifikant erhöht. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; one-way ANOVA und Student-Newman-Keuls post-hoc Test). B: Behandlung von HeLa Zellen mit LLO (50 ng/ml) in Anwesenheit oder Abwesenheit von PlcB (5 μ g/ml) für 10 min bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Färbung mit CellEvent Caspase-3/7 bei 37°C für 25 min wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zellen, welche mit LLO behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu unbehandelten Zellen (CTRL) eine verstärkte Aktivierung der Caspasen 3 und 7. Simultane Behandlung mit PlcB führte zu einer signifikanten Reduktion der LLO-induzierten Aktivierung der Caspasen 3 und 7. Die Behandlung mit PlcB alleine zeigte keinen signifikanten Effekt. Tote Zellen wurden durch geeignetes Gating entfernt. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (** $p \leq 0,001$; n.s. = nicht signifikant; one-way ANOVA und Student-Newman-Keuls post-hoc Test).

6.5 Interaktionsstudien von Listeriolysin O mit wirtseigenen Molekülen

Nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* gelangen die Bakterien in das Kreislaufsystem des Wirtes was zu einer Bakteriämie führt. Von dort aus kann sich das Bakterium über den ganzen Organismus ausbreiten und weitere Zellen infizieren. Dabei ist es stets in Kontakt mit wirtseigenen Molekülen, insbesondere mit solchen, die im Blut vorkommen. Hierzu zählt u.a.

Cholin, welches sowohl als freies wasserlösliches Molekül als auch als Teil Cholin-haltiger Phospholipide und wasserlösliche Cholin Metabolite, wie beispielsweise Phosphocholin (ChoP), vorkommt. Freie Cholin-Konzentrationen werden dabei bei einem erwachsenen Menschen bei ca. 10 µM gehalten. Dies kann jedoch nach Lebenslage und Alter stark variieren. So haben beispielsweise Neugeborene einen Cholingehalt von ca. 40 µM und schwangere Frauen einen Cholin-Gehalt von bis zu ca. 20 µM (Wurtman et al., 2009).

Daneben kann das Bakterium ebenfalls mit Heparin, nach Sekretion aus Granula von Mastzellen, in Kontakt kommen. Bezüglich der Pathogenität von *L. monocytogenes* spielt das nah verwandte Heparansulfat eine Rolle in alternativen Adhäsions- und Invasionswegen. So ist *Listeria monocytogenes* in der Lage, mittels der Expression von ActA, an Heparansulfaten der zellulären Oberfläche zu binden. Diese Bindung lässt sich durch Zugabe von Heparin inhibieren (Alvarez-Domínguez et al., 1997).

Weil das Bakterium auch im Blut weiterhin Listeriolysin O (LLO) sekretiert, ist hier eine Interaktion zwischen diesem und den wirtseigenen Molekülen möglich. Da im Zuge dieser Arbeit gezeigt wurde, dass die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C von *L. monocytogenes* (PlcB) in der Lage ist die Aktivität von LLO zu regulieren und ChoP ein Reaktionsprodukt der enzymatischen Aktivität von PlcB ist, wurde im Folgenden untersucht, ob eine direkte Interaktion von ChoP mit LLO die beobachteten Effekte erklärt. Zusätzlich wurde untersucht, ob ebenfalls eine Interaktion zwischen Heparin und LLO stattfindet, da es außerdem einen Zusammenhang zwischen der Pathogenität von *L. monocytogenes* und Heparin/Heparansulfat gibt.

6.5.1 Interaktionsstudien von Phosphocholin und Listeriolysin O

6.5.1.1 Die hämolytische Aktivität von Listeriolysin O wird durch die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C inhibiert

LLO gehört zur Familie der Cholesterin-abhängigen porenbildenden Toxine (CDC). Durch Oligomerisierung und Anlagerung an Membranen können die Proteine dieser Familie Poren ausbilden. Bei sublytischen Konzentrationen sind diese Poren Calcium (Ca^{2+})-permeabel. Verwendet man jedoch höhere Konzentrationen wirken sie lytisch. Mit Hilfe dieser Charakteristika wurde untersucht, ob PlcB einen Einfluss auf die lytische Eigenschaft von LLO hat.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Schaferythrozyten mit gereinigtem, LPS-freiem PlcB vorbehandelt. Anschließend wurden vorbehandelte und unbehandelte Schaferythrozyten mit gereinigtem LPS-freiem LLO inkubiert. Während LLO die unbehandelten Schaferythrozyten ohne Einschränkungen lysierte, führte die Vorbehandlung

der Schaferythrozyten mit PlcB zu einer signifikanten Reduktion der LLO-induzierten Hämolyse (Abbildung 27 A). Diese Beobachtung konnte ebenfalls bei Verwendung unterschiedlicher pH-Werte gemacht werden (Abbildung 26 B). Zur Überprüfung, ob diese Beobachtung spezifisch für PlcB ist oder ob es sich um einen generellen Mechanismus von Phospholipasen C handelt, wurde der Versuch unter Verwendung der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C aus *Bacillus cereus* (Plc) wiederholt. PlcB und Plc teilen sich eine Sequenzidentität von 37% und beide Enzyme sind in der Lage Lecithine zu Diacylglyceriden und Phosphocholin (ChoP) zu hydrolysieren. Auch hier konnte beobachtet werden, dass LLO die unbehandelten Schaferythrozyten ohne Einschränkungen zur Lyse brachte, während bei Verwendung der vorbehandelten Schaferythrozyten auch hier eine signifikante Reduktion der Hämolyse zu beobachten war (Abbildung 27 C).

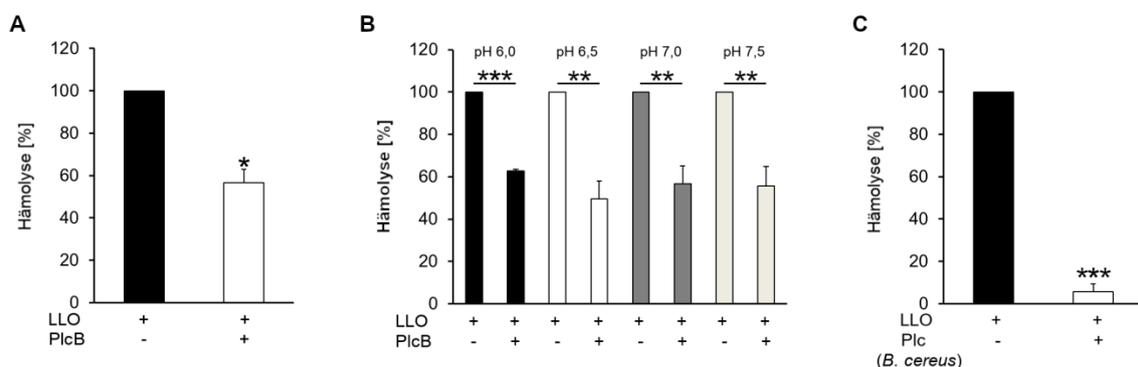


Abbildung 27 Inhibition der Listeriolysin O-induzierten Hämolyse durch Phospholipasen C. A-C: Behandlung von Schaferythrozyten mit PlcB (20 µg/ml) (A, B) oder Plc (10 U) (C) aus *Bacillus cereus* bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 (A, C) oder unterschiedlichen pH-Werten (B) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Inkubation mit einer seriellen Verdünnung von LLO (Startkonzentration: 20 µg/ml) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Überstand photometrisch gemessen (OD_{405 nm}). Gezeigt ist die relative Hämolyse bei der Konzentration an LLO, welche einer 50% Hämolyse durch H₂O entspricht. PlcB und Plc aus *B. cereus* inhibierte, unabhängig vom pH-Wert, die LLO-induzierte Lyse der Schaferythrozyten. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von vier (A) bzw. drei (B, C) unabhängigen Experimenten gezeigt (A: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; B: ** $p \leq 0,005$; *** $p \leq 0,001$; t-Test; C: *** $p \leq 0,001$; t-Test).

6.5.1.2 Die hämolytische Aktivität von Listeriolysin O wird durch ChoP konzentrationsabhängig inhibiert

Da im Zuge dieser Arbeit beobachtet werden konnte, dass PlcB die hämolytische Eigenschaft von LLO negativ beeinflussen kann, wurde ebenfalls überprüft, ob ChoP, als Reaktionsprodukt von PlcB, ebenso in der Lage ist die LLO-induzierte Hämolyse zu inhibieren. Hierfür wurde LLO mit unterschiedlichen Konzentrationen an ChoP vorbehandelt und anschließend mit Schaferythrozyten inkubiert. Während LLO ohne weitere Zugabe von ChoP zu einer Hämolyse der Schaferythrozyten führte, induzierte ChoP eine

konzentrationsabhängige Inhibition der Hämolyse (Abbildung 28 A). Diese Beobachtung konnte ebenfalls bei Verwendung unterschiedlicher pH-Werte gemacht werden (Abbildung 28 B). Zur Überprüfung, ob es sich bei dem hier beobachteten Effekt um eine LLO-spezifische Eigenschaft handelt oder ob auch andere Mitglieder der Familie von CDC-Toxinen inhibiert werden können, wurde dieser Versuch mit Pneumolysin (PLY) aus *Streptococcus pneumoniae* und Streptolysin O (SLO) aus *Streptococcus pyogenes* wiederholt. Hierbei wurde die ChoP-Konzentration, welche in Zusammenhang mit LLO die höchste Inhibition zeigte, verwendet. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass ChoP ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die hämolytische Eigenschaft von PLY und SLO nahm (Abbildung 28 C-D).

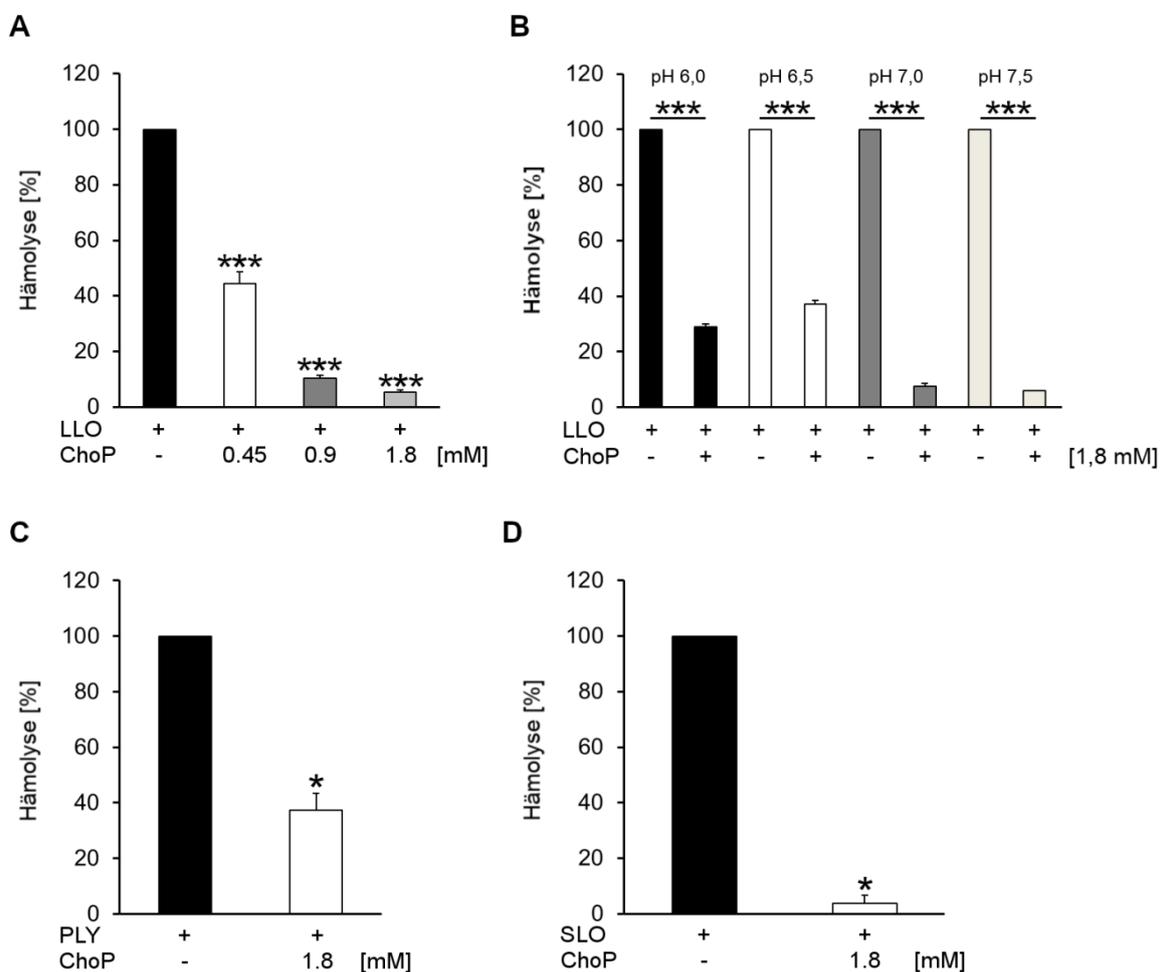


Abbildung 28 Phosphocholin-abhängige Inhibition der durch CDC-Toxine induzierten Hämolyse. A-D: Vorbehandlung einer seriellen Verdünnung von LLO (Startkonzentration: 20 µg/ml) (A, B), PLY (Startkonzentration: 2,5 µg/ml) (C) oder SLO (Startkonzentration: 125 kU/ml) (D) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Phosphocholin (ChoP) bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 (A, C, D) oder unterschiedlichen pH-Werten (B) für 30 min bei RT. Nach anschließender Inkubation mit Schaferythrozyten für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Überstand photometrisch gemessen (OD_{405 nm}). Gezeigt ist die relative Hämolyse bei der Konzentration an LLO/PLY/SLO, welche einer 50% Hämolyse durch H₂O entspricht. Eine Vorbehandlung mit ChoP führte bei allen drei verwendeten porenbildenden Toxinen, unabhängig vom pH-Wert, zu einer Inhibition der Lyse der

Schaferythrozyten. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei (A, B, D) bzw. vier (C) unabhängigen Experimenten gezeigt (A: $***p \leq 0,001$; one-way ANOVA und Holm-Šidák post-hoc Test gegen LLO als Kontrollgruppe; B: $***p \leq 0,001$; t-Test; C: $*p \leq 0,05$; $***p \leq 0,001$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test; D: $***p \leq 0,001$; t-Test).

Zur Bestätigung dieser Daten wurde in Kooperation mit dem Nationalen Institut für Chemie in Ljubljana (Slowenien, Prof. Dr. Gregor Anderluh) Versuche zur Calcein-Freisetzung aus artifiziellen Liposomen durchgeführt. Hierfür wurden zunächst Calcein-befüllte multilamellare Vesikel (*Multilamellar Vesicles*; MLV) bzw. große unilamellare Vesikel (*Large unilamellar vesicle*; LUV) hergestellt. Anschließend wurden diese mit LLO, PLY und Perfringolysin O (PFO) aus *Clostridium perfringens* inkubiert und die Calcein-Freisetzung über die Zeit verfolgt. Den Erwartungen entsprechend führte die Behandlung der MLV mit LLO zu einer Calcein-Freisetzung über die Zeit. Diese Freisetzung konnte konzentrationsabhängig durch Vorinkubation des LLOs mit ChoP reduziert werden. Eine ähnliche Konzentrationsabhängigkeit konnte ebenfalls für PLY und PFO beobachtet werden (Abbildung 29 A). Bei Verwendung von LUV konnte ein ähnliches Bild beobachtet werden. Auch hier induzierte die Zugabe von LLO eine Calcein-Freisetzung, welche durch ChoP negativ reguliert werden konnte. Dies konnte auch hier für PLY und PFO beobachtet werden, wobei dieser Effekt bei PFO im Vergleich zum LLO bei Verwendung der LUV deutlich schwächer war (Abbildung 29 B).

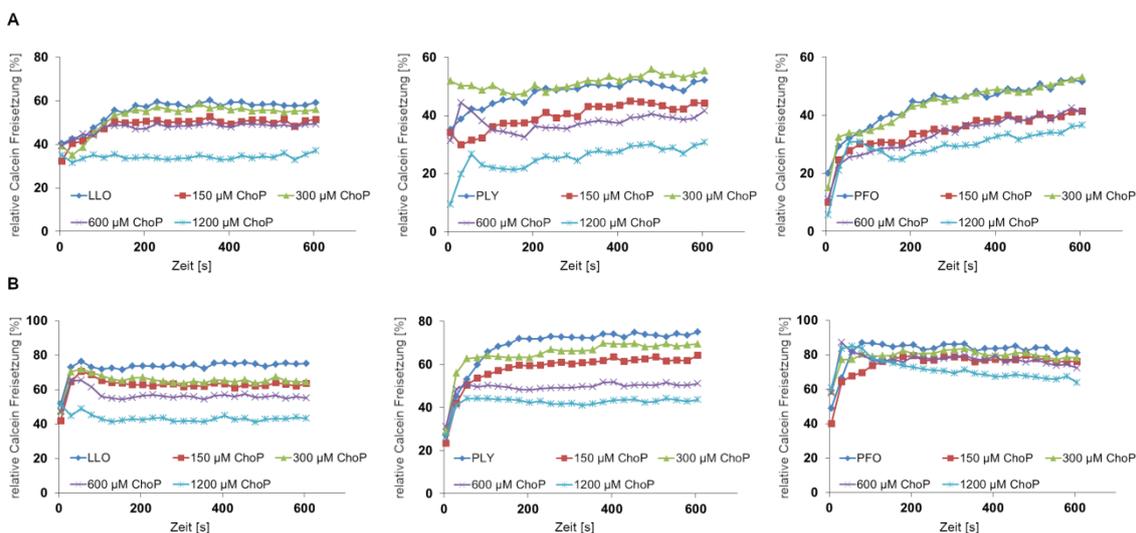


Abbildung 29 Phosphocholin-abhängige Inhibition der durch CDC-Toxine induzierten Ausschüttung von Calcein. A, B: Vorbehandlung von LLO, PLY oder PFO (100 nM) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Phosphocholin (ChoP) für 30 min bei RT und anschließende Zugabe von MLVs (A) oder LUVs (B) (20 μ M). Die Messung des Calcein-Ausstroms erfolgte photometrisch durch Anregung des Calceins bei einer Wellenlänge von 485 nm und Detektion der Emission bei einer Wellenlänge von 520 nm. Der kinetische Verlauf wurde dabei für 10 min aufgenommen. Anschließend wurde durch Zugabe von 40 mM Triton X-100 eine vollständige Lyse der

Liposomen herbeigeführt. Alle getesteten CDC-Toxine konnten durch Vorinkubation mit ChoP konzentrationsabhängig inhibiert werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde überprüft, ob es sich bei der durch ChoP induzierten Inhibition der hämolytischen Aktivität von porenbildenden Toxinen um einen spezifischen Effekt handelt oder ob Derivate von ChoP eine ähnliche modulatorische Funktion ausüben könnten. Hierfür wurden LLO oder PLY vor Zugabe der Schafererythrozyten mit Cholin, Betain und Carnitin vorinkubiert. Dabei konnte für keines der verwendeten ChoP-Derivate eine signifikante Änderung im hämolytischen Verhalten der Toxine festgestellt werden (Abbildung 30 A-F). Erst bei Verwendung einer weiteren Phospholipid-Kopfgruppe konnte ein ähnlicher modulatorischer Effekt beobachtet werden. So führte die Vorinkubation von LLO mit Phosphoserin (PhoS), der polaren Kopfgruppe von Phosphatidylserin, zu einer Steigerung der hämolytischen Aktivität von LLO (Abbildung 30 G).

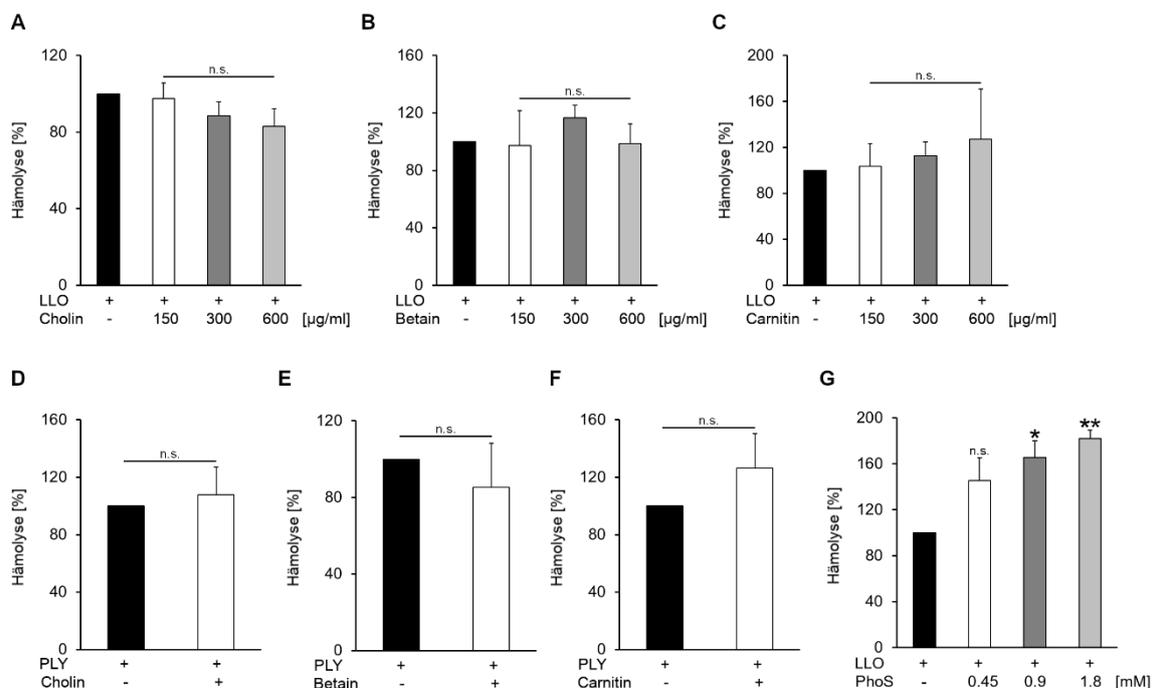


Abbildung 30 Auswirkung von Phosphocholin-Derivaten auf die Listeriolysin O-induzierte Hämolyse. A-C: Vorbehandlung einer seriellen Verdünnung von LLO (Startkonzentration: 20 µg/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cholin, Betain oder Carnitin für 30 min bei RT. Nach anschließender Inkubation mit Schafererythrozyten für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Überstand photometrisch gemessen (OD_{405 nm}). Gezeigt ist die relative Hämolyse bei der Konzentration an LLO, welche einer 50% Hämolyse durch H₂O entspricht. Eine Vorbehandlung mit Cholin, Betain oder Carnitin führte zu keiner signifikanten Änderung der LLO-abhängigen Hämolyse. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (n.s. = nicht signifikant; one-way ANOVA). D-F: Vorbehandlung einer seriellen Verdünnung von PLY (Startkonzentration: 2,5 µg/ml) mit Cholin, Betain oder Carnitin (600 µg/ml) für 30 min bei RT. Nach anschließender Inkubation mit Schafererythrozyten für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Überstand photometrisch gemessen (OD_{405 nm}). Gezeigt ist die relative Hämolyse bei der Konzentration an PLY, welche einer 50% Hämolyse durch H₂O entspricht. Eine Vorbehandlung mit Cholin, Betain oder Carnitin führte zu keiner

signifikanten Änderung der PLY-abhängigen Hämolyse. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (n.s. = nicht signifikant; t-Test). G: Vorbehandlung einer seriellen Verdünnung von LLO (Startkonzentration: 20 μ g/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Phosphoserin (PhoS) für 30 min bei RT. Nach anschließender Inkubation mit Schaferythrozyten für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Überstand photometrisch gemessen (OD_{405 nm}). Gezeigt ist die relative Hämolyse bei der Konzentration an LLO, welche einer 50% Hämolyse durch H₂O entspricht. Eine Vorbehandlung mit PhoS führte zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der LLO-induzierten Hämolyse. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; one-way ANOVA und Holm-Šidák post-hoc Test gegen LLO als Kontrollgruppe).

6.5.1.3 Die inhibierende Eigenschaft von Phosphocholin auf die hämolytische Aktivität von Listeriolysin O ist unabhängig vom Redox-Status des Toxins

In einer weiteren Versuchsreihe wurde überprüft, ob die inhibitorische Wirkung von ChoP auf die hämolytische Aktivität von LLO auf eine Veränderung des Redox-Status des Toxins zurückzuführen ist. Da der Redox-Status von LLO maßgeblich durch den Cystein-Rest an Position 484 bestimmt wird, wurden die hämolystischen Aktivitäten von LLO wt und LLO C484S in Anwesenheit oder Abwesenheit von Dithiothreitol (DTT) als reduzierendes Agens durchgeführt. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Inhibition des Toxins durch ChoP bei Verwendung von LLO C484S im Vergleich zur Verwendung von LLO wt beobachtet werden. Dieser Effekt war zudem unabhängig vom Redox-Status des Toxins, da die An- oder Abwesenheit von DTT, als reduzierendes Agens, keine Auswirkung auf die ChoP-induzierte Inhibition hatte (Abbildung 31 A-B).

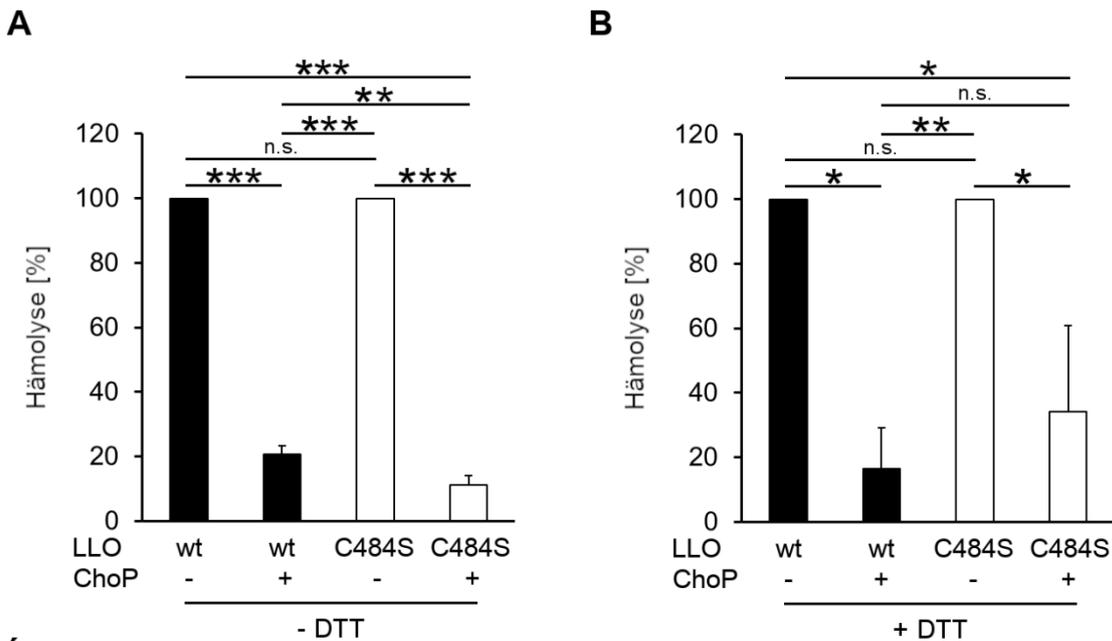


Abbildung 31 Unabhängigkeit der Phosphocholin-abhängigen Inhibition von LLO vom Redox-Status des Toxins. Vorbehandlung einer seriellen Verdünnung von LLO wt oder LLO C484S (Startkonzentration: 20 µg/ml) mit Phosphocholin (ChoP) (1,8 mM) für 30 min bei RT in Abwesenheit (A) oder Anwesenheit (B) von Dithiothreitol (DTT). Nach anschließender Inkubation mit Schafererythrozyten für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Überstand photometrisch gemessen (OD_{405 nm}). Gezeigt ist die relative Hämolyse bei der Konzentration an LLO, welche einer 50% Hämolyse durch H₂O entspricht. Eine Vorbehandlung mit ChoP führt unabhängig vom Redox-Status des Toxins zu einer Inhibition der Lyse der Schafererythrozyten. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (A, B: *** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; one-way ANOVA und Student-Newman-Keuls post-hoc Test).

6.5.1.4 Phosphocholin ist ein direkter Interaktionspartner von Listeriolysin O

Da die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen gezeigt haben, dass ChoP die hämolytische Aktivität von porenbildenden Toxinen negativ beeinflussen kann, wurde überprüft, ob es eine direkte Interaktion zwischen LLO und ChoP gibt. Hierfür wurden in Kooperation mit dem Nationalen Institut für Chemie in Ljubljana (Slowenien, Prof. Dr. Gregor Anderluh) Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie-Untersuchungen (*surface plasmon resonance spectroscopy*, SPR-Spektroskopie) durchgeführt. Für diesen Zweck wurde der Sensor-Chip L1, welcher lipophile Gruppen kovalent an carboxymethyliertes Dextran trägt, mit LUVs beladen. Anschließend wurde LLO oder LLO, welches mit ChoP vorinkubiert wurde, in das System gegeben und sowohl die Bindung als auch die Dissoziation des Toxins in einem zeitlichen Verlauf untersucht. Während in der Assoziationsphase nur geringe Unterschiede zwischen der Bindung von LLO und ChoP-behandeltem LLO an den LUVs zu beobachten waren, konnten im Dissoziationsverhalten dagegen starke Unterschiede beobachtet werden. Obwohl die LLO-LUV-Interaktion sehr stabil war, führte die

Vorinkubation mit ChoP zu einer konzentrationsabhängigen, beschleunigten Dissoziation des Toxins von den LUVs (Abbildung 32 A). Da diese Beobachtung mit einer möglichen direkten Interaktion von LLO und ChoP zusammenhängen könnte, wurde mittels SPR-Spektroskopie eine direkte Bindung gesucht. Hierfür wurde His-Tag LLO an den Sensor-Chip L12 gebunden. Anschließend wurden unterschiedliche Konzentrationen an ChoP in das System gegeben und nach einer möglichen direkten Interaktion geschaut. Es konnte gezeigt werden, dass eine direkte konzentrationsabhängige Interaktion zwischen LLO und ChoP stattfand. Aus den hier gewonnenen Beobachtungen lässt sich schließen, dass ChoP durch eine direkte Interaktion mit LLO eine erhöhte Dissoziation des Toxins von biologischen Membranen induziert (Abbildung 32 B).

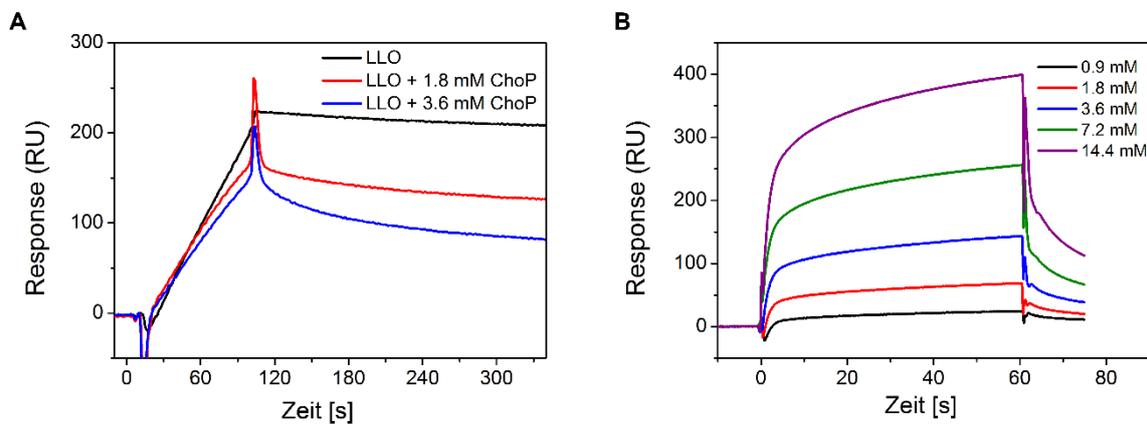


Abbildung 32 Phosphocholin erhöht durch direkte Interaktion die Dissoziationsrate von Listeriolysin O von Membranen. A: Vorbehandlung von LLO mit unterschiedlichen Konzentrationen an Phosphocholin (ChoP) und anschließende Injektion auf einen mit LUV-beladenen Sensorchip. Die Bindung von LLO an den LUVs wurde mittels SPR-Spektroskopie analysiert. Sowohl LLO alleine als auch ChoP-vorbehandeltes LLO zeigten ein ähnliches Bindungsverhalten an den LUVs. LLO, welches mit ChoP vorbehandelt wurde, zeigte jedoch konzentrationsabhängig eine schnellere Dissoziation von den LUVs. B: Bindung von His-Tag LLO an der Sensoroberfläche und Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an ChoP. ChoP band konzentrationsabhängig an LLO.

6.5.2 Interaktionsstudien von Phospholipiden und Listeriolysin O

Für die Bindung von Listeriolysin O (LLO) an Membranen ist eine Interaktion zwischen dem Undecapeptid des Toxins und dem Membranbestandteil Cholesterin nötig. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass eine LLO-Cholesterin-Wechselwirkung essenziell ist für die Bindung des Toxins an Membranen (Dowd & Tweten, 2012). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Vorinkubation von LLO mit Cholesterin die Bindung von LLO an Membranen vollständig inhibiert, da die Cholesterinbindungsstelle (Undecapeptid) bereits vollständig beladen ist. Damit konnte freies Cholesterin als erster putativer Inhibitor von LLO beschrieben werden (Jacobs et al., 1998).

Die vorausgegangenen Daten dieser Arbeit haben gezeigt, dass Phosphocholin (ChoP) in der Lage ist die hämolytische Eigenschaft von LLO durch eine direkte LLO-ChoP-Wechselwirkung zu inhibieren. ChoP kommt dabei sowohl als freies lösliches Molekül als auch als polare Kopfgruppe von Phospholipiden, wie beispielsweise Phosphatidylcholin (PC), vor. Da PC eine der wichtigsten Komponenten von Membranen darstellt und vorausgegangene Daten gezeigt haben, dass ChoP LLO binden kann, wurde die Hypothese aufgestellt, dass PC ebenfalls in der Lage ist die hämolytische Eigenschaft von LLO durch eine direkte Interaktion zu modulieren.

6.5.2.1 Phospholipide modulieren die hämolytische Aktivität von Listeriolysin O

Zur Überprüfung einer möglichen Modulation der hämolytischen Aktivität von LLO durch Phospholipide, insbesondere PC, wurde LLO mit unterschiedlichen Konzentrationen an PC vorinkubiert und anschließend mit Schaferythrozyten inkubiert. Die Verwendung von LLO ohne Vorinkubation mit PC führte erwartungsgemäß zu einer Hämolyse der Schaferythrozyten. Dagegen führte die PC-Vorbehandlung zu einer Steigerung der Hämolyse (Abbildung 33 A). Die Zugabe von PC alleine (ohne LLO Zugabe) hatte keinen Effekt auf die Integrität der Schaferythrozyten (Daten nicht gezeigt). Zur Überprüfung, ob es sich hierbei um ein allgemeines Prinzip von Cholesterin-abhängigen, porenbildenden Toxinen (CDC) handelt, wurde der gleiche Versuch unter Verwendung von Pneumolysin (PLY) aus *Streptococcus pneumoniae* und Streptolysin (SLO) aus *Streptococcus pyogenes* wiederholt. Für PLY und SLO konnte ebenfalls gezeigt werden, dass PC eine steigernde Wirkung auf die hämolytische Eigenschaft dieser CDCs ausübt (Abbildung 33 B-C).

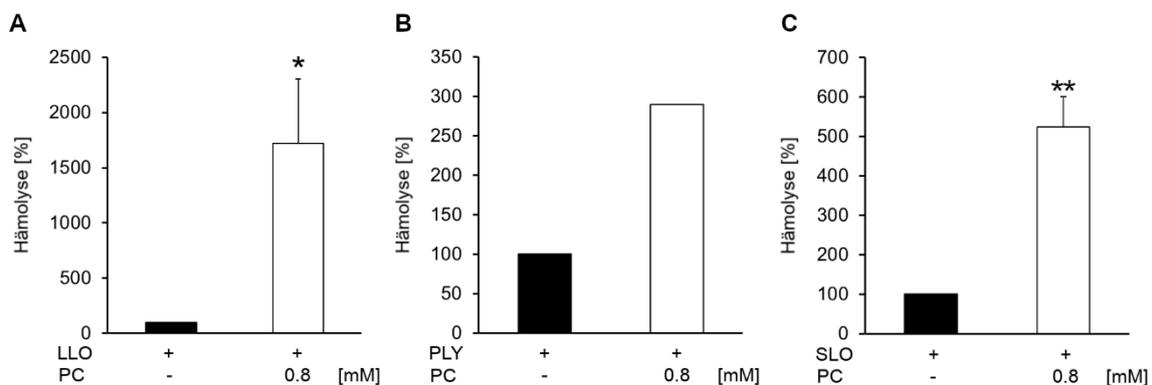


Abbildung 33 Phosphatidylcholin-abhängige Erhöhung der durch CDC-Toxine induzierten Hämolyse. A-C: Vorbehandlung einer seriellen Verdünnung von LLO (Startkonzentration: 20 µg/ml), PLY (Startkonzentration: 2,5 µg/ml) oder SLO (Startkonzentration: 125 kU/ml) mit Phosphatidylcholin (PC) für 30 min bei RT. Nach anschließender Inkubation mit Schaferythrozyten für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ wurde der Überstand photometrisch gemessen (OD_{405 nm}). Gezeigt ist die relative Hämolyse

bei der Konzentration an LLO/PLY/SLO, welche einer 50% Hämolyse durch H₂O entspricht. Eine Vorbehandlung mit PC führte bei allen drei verwendeten CDC-Toxinen zu einer Erhöhung der Lyse der Schaferythrozyten. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei (A, C) unabhängigen Experimenten gezeigt (A, C: ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$; t-Test).

6.5.2.2 Phosphatidylcholin ist ein spezifischer Interaktionspartner von Listeriolysin O

Da die vorausgegangenen Daten gezeigt haben, dass PC in der Lage ist die hämolytische Aktivität von LLO zu modulieren, wurde nun überprüft, ob ähnlich zu ChoP, eine mögliche direkte Interaktion zwischen LLO und PC stattfindet. Hierfür wurden Mikrotiterplatten für ELISA mit Cholesterin, PC und Sphingomyelin (SM), einem Sphingolipid, welches ChoP als polare Gruppe trägt, beschichtet. Nach Zugabe von LLO wurde, unter Verwendung eines primären polyklonalen Antikörpers gegen LLO und einen sekundären Antikörper (konjugiert an einer Alkalischen Phosphatase), eine mögliche Interaktion untersucht. Für Cholesterin, welches als Positivkontrolle verwendet wurde, konnte konzentrationsabhängig eine Bindung nachgewiesen werden. Ebenso konnte bei der Verwendung von PC eine konzentrationsabhängige Wechselwirkung mit LLO nachgewiesen werden. Diese war jedoch im Vergleich zu Cholesterin deutlich schwächer. Für SM konnte dagegen keine signifikante Interaktion mit LLO nachgewiesen werden (Abbildung 34 A). Da bekannt ist, dass die Bindung von Cholesterin an LLO maßgeblich innerhalb der D4 Domäne des Proteins stattfindet, wurde überprüft, ob eine LLO-PC-Wechselwirkung ebenfalls innerhalb der Domäne D4 stattfindet. Hierfür wurde der Versuch unter Verwendung einer LLO Variante, welche nur die Domäne D4 exprimiert, wiederholt. Für Cholesterin konnte, den Erwartungen entsprechend, eine Bindung an die Domäne D4 nachgewiesen werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Domäne D4 für die Bindung von PC an LLO ausreichend ist. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Verwendung von Cholesterin festgestellt werden (Abbildung 34 B).

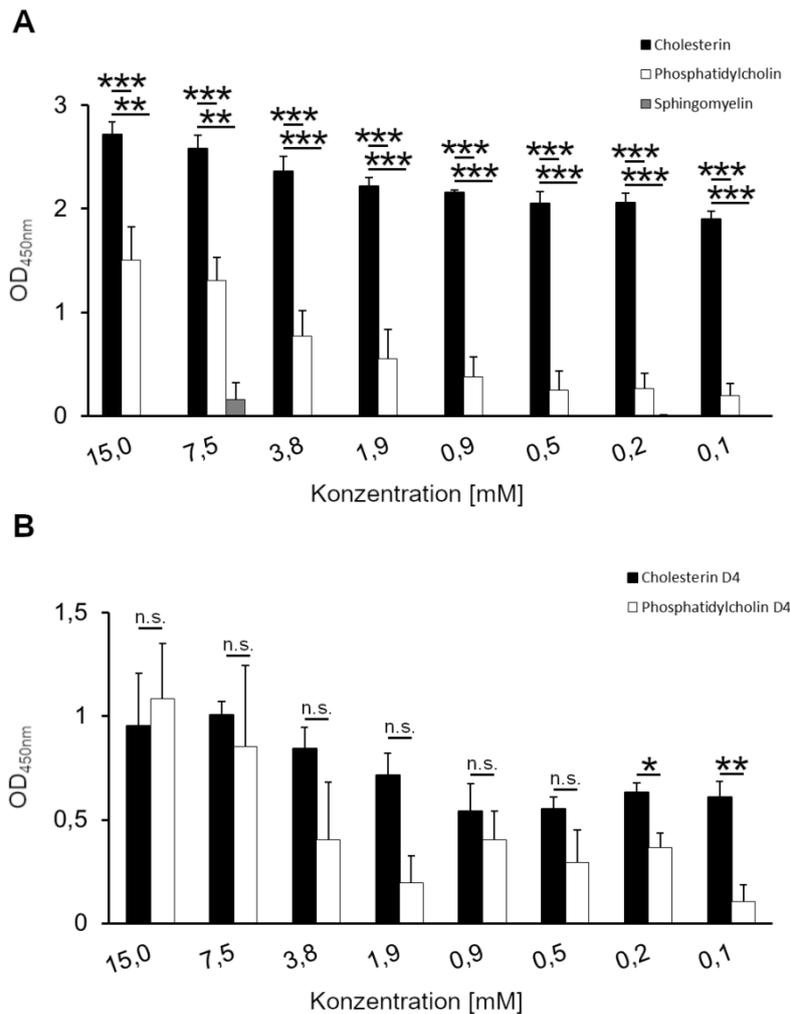


Abbildung 34 Phosphatidylcholin ist ein spezifischer Interaktionspartner von Listeriolysin O. A, B: Beschichtung von Mikrotiterplatten mit einer seriellen Verdünnung von Cholesterin, Phosphatidylcholin (PC) oder Sphingomyelin (SM) (Startkonzentration: 15 mM) und Inkubation mit LLO/D4 (1 µg/ml) für 1 h bei RT. Nach Zugabe eines spezifischen primären Antikörpers gegen LLO und eines alkalische Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörpers wurde der ELISA entwickelt. Die Quantifizierung erfolgte durch Messungen der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm. Sowohl Cholesterin, als auch PC, aber nicht SM, zeigten eine Bindung an LLO/D4. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (A: ***p ≤ 0,001; **p ≤ 0,01; one-way ANOVA und Holm–Šidák post-hoc Test gegen Cholesterin als Kontrollgruppe; B: **p ≤ 0,05; *p ≤ 0,05, n.s. = nicht signifikant, t-Test).

Zur weiteren Überprüfung, ob es sich bei der hier beschriebenen Wechselwirkung um eine spezifische Eigenschaft von LLO handelt oder auch weitere porenbildende Toxine in der Lage sind PC zu binden, wurde das Experiment mit PLY aus *S. pneumoniae* wiederholt. Auch hier konnte eine Bindung von PC an PLY nachgewiesen werden. Diese war, ebenso wie für LLO, schwächer ausgeprägt als im Vergleich zur Cholesterin-Bindung. Für SM konnte, ähnlich zum LLO, keine Wechselwirkung festgestellt werden (Abbildung 35).

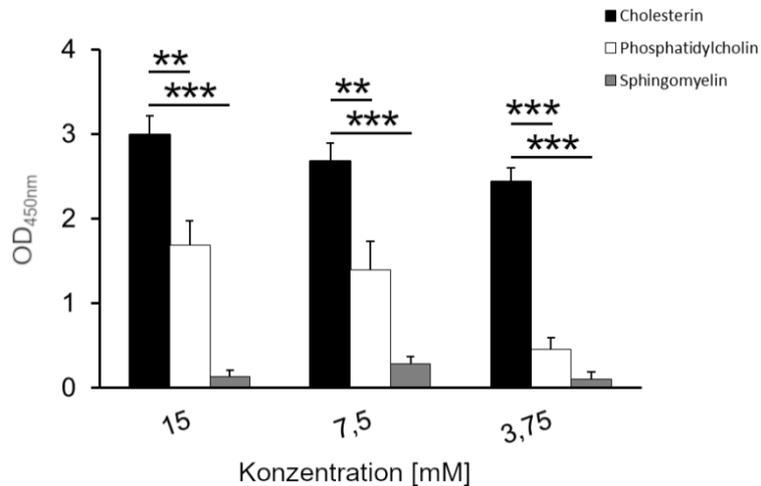


Abbildung 35 Phosphatidylcholin ist ein Interaktionspartner von Pneumolysin. A, B: Beschichtung von Mikrotiterplatten mit einer seriellen Verdünnung Cholesterin, Phosphatidylcholin (PC) oder Sphingomyelin (SM) (Startkonzentration: 15 mM) und Inkubation mit PLY (1 µg/ml) für 1 h bei RT. Nach Zugabe eines spezifischen primären Antikörpers gegen PLY und eines alkalische Phosphatase-gekoppelten sekundären Antikörpers wurde der ELISA entwickelt. Die Quantifizierung erfolgte durch Messungen der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm. Sowohl Cholesterin, als auch PC, aber nicht SM, zeigten eine Bindung an PLY. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; one-way ANOVA und Holm–Šidák post-hoc Test gegen Cholesterin als Kontrollgruppe).

Zur weiteren Bestätigung einer Interaktion zwischen LLO und PC wurden Dünnschichtchromatographien durchgeführt. Hierfür wurden zunächst Cholesterin, PC und SM auf Kieselgelplatten fixiert und anschließend mit LLO inkubiert. Unter Verwendung eines primären polyklonalen Antikörpers gegen LLO und eines sekundären Antikörpers (Meerrettichperoxidase-konjugiert) wurde eine mögliche Wechselwirkung untersucht. Es konnte sowohl für Cholesterin als auch für PC eine Wechselwirkung mit LLO nachgewiesen werden. Dabei war die Wechselwirkung zwischen LLO und PC auch hier deutlich schwächer als zwischen LLO und Cholesterin (Abbildung 36).

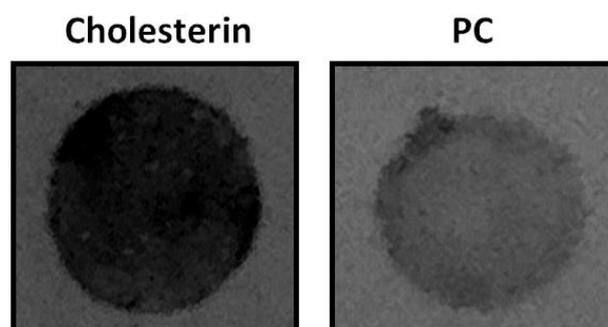


Abbildung 36 Nachweis einer LLO-Phosphatidylcholin-Interaktion mittels Dünnschichtchromatographie. Fixierung von Cholesterin und Phosphatidylcholin (PC) auf einer

Kieselgelplatte und anschließende Inkubation mit LLO (1 µg/ml). Nach Zugabe eines spezifischen primären Antikörpers gegen LLO und eines HRP-konjugierten sekundären Antikörpers wurde die Platte durch Zugabe einer TMB-Lösung entwickelt. Sowohl Cholesterin als auch PC zeigten eine Bindung an LLO. Die LLO-PC-Wechselwirkung war jedoch schwächer ausgeprägt als die LLO-Cholesterin-Wechselwirkung.

6.5.3 Interaktionsstudien von Heparin und Listeriolysin O

Im Zuge der Erforschung der Wechselwirkung von Listeriolysin O (LLO) mit verschiedenen Makromolekülen wurde auch die Wechselwirkung zwischen LLO und Heparin, einem Glykosaminglykan, welches sich in Granula von Mastzellen befindet und durch diese sekretiert werden kann, untersucht (erste Versuche und die Entdeckung dieser Wechselwirkung erfolgten durch Dr. Helena Pillich, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen). Eine Wiederholung dieser Experimente zeigte, dass Heparin die hämolytische Aktivität von LLO steigern kann. Hierfür wurde zu LLO unterschiedliche Konzentrationen an Heparin gegeben und anschließend mit Schafererythrozyten inkubiert. Während LLO ohne weitere Zugabe von Heparin erwartungsgemäß zu einer Hämolyse der Schafererythrozyten führte, war die Hämolyse in Anwesenheit von Heparin konzentrationsabhängig erhöht (Abbildung 37).

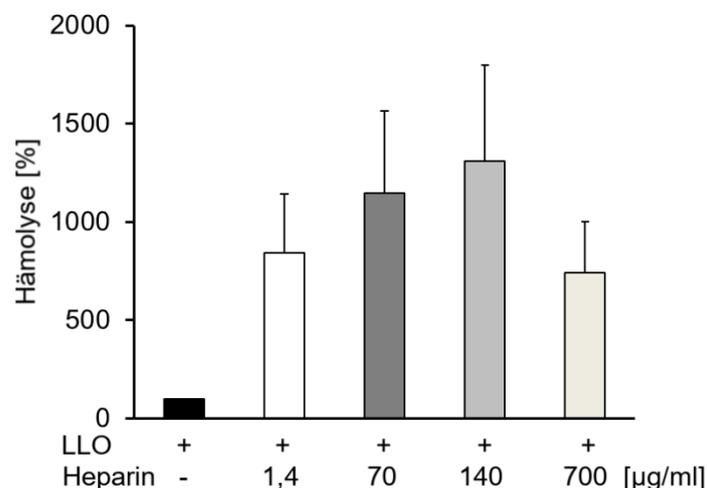


Abbildung 37 Modulation der Listeriolysin O-induzierten Hämolyse durch Heparin. Inkubation einer seriellen Verdünnung von LLO (Startkonzentration: 2,25 µg/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Heparin und anschließende Zugabe von Schafererythrozyten für 1 h bei 37°C und 5% CO₂. Der Überstand wurde photometrisch gemessen (OD_{405 nm}). Gezeigt ist die relative Hämolyse bei der Konzentration an LLO, welche einer 50% Hämolyse durch H₂O entspricht. Die Inkubation von LLO mit Heparin führte zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Hämolyse.

Bei Heparinen handelt es sich um komplexe Moleküle bestehend aus Glykosaminglykanen, welche durch Esther-Verbindungen miteinander verbunden sind. Bei Glykosaminglykanen

handelt es sich wiederum um Polysaccharide, welche aus einer sich wiederholenden Abfolge von Disacchariden bestehen. Im Falle von Heparinen bestehen diese Disaccharide aus Uronsäuren (i.d.R. Glucuronsäure oder Iduronsäure) und N-Acetylglykosamin (NAG) (Casu et al., 2015). Zur Überprüfung, welche Bestandteile des Heparins für die Veränderungen in der hämolytischen Aktivität von LLO verantwortlich sind, wurden einige dieser Komponenten im Hinblick auf ihre LLO-modulierenden Eigenschaften mit Hilfe von Hämolyse-Tests untersucht. Hierfür wurde LLO mit Glucuronsäure, NAG, NAG-2-Sulfat oder NAG-6-Sulfat vorinkubiert und anschließend Schaferythrozyten hinzugegeben. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Glucuronsäure konzentrationsabhängig zu einer Steigerung der hämolytischen Aktivität von LLO führte (Abbildung 38 A). Dagegen führte die Anwesenheit von NAG, NAG-2-Sulfat oder NAG-6-Sulfat zu keiner signifikanten Änderung in der hämolytischen Aktivität (Abbildung 38 B).

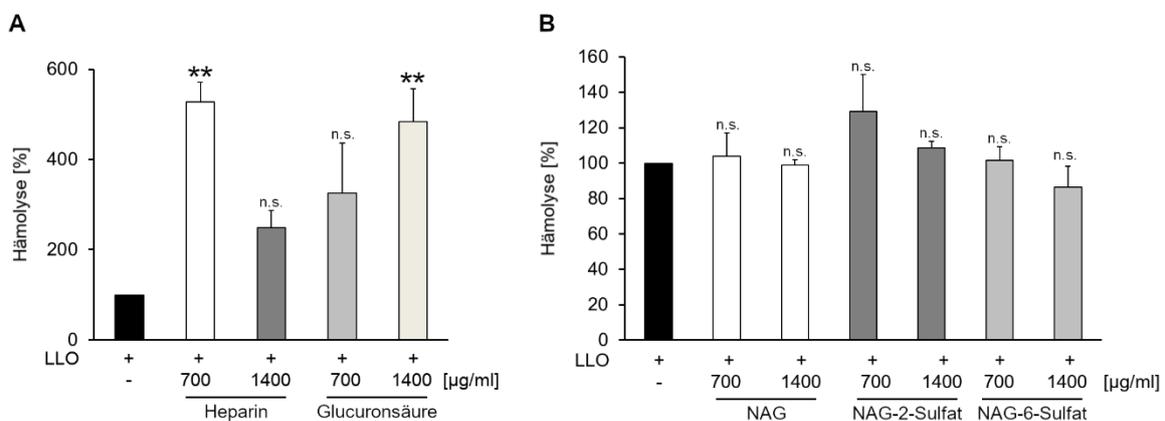


Abbildung 38 Modulation der Listeriolysin O-induzierten Hämolyse durch Heparin-Bausteine. A: Inkubation einer seriellen Verdünnung von LLO (Startkonzentration: 2,25 µg/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Heparin oder Glucuronsäure und anschließender Zugabe von Schaferythrozyten für 1 h bei 37°C und 5% CO₂. Der Überstand wurde photometrisch gemessen (OD_{405 nm}). Gezeigt ist die relative Hämolyse bei der Konzentration an LLO, welche einer 50% Hämolyse durch H₂O entspricht. Die Inkubation von LLO mit Heparin führte zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Hämolyse. Die Inkubation von LLO mit Glucuronsäure zeigte einen ähnlichen Hämolysesteigernden Effekt. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (***p* ≤ 0,01; n.s. = nicht signifikant; one-way ANOVA und Holm-Šidák post-hoc Test gegen LLO als Kontrollgruppe). B: Inkubation einer seriellen Verdünnung von LLO (Startkonzentration: 2,25 µg/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glykosaminen und anschließender Zugabe von Schaferythrozyten für 1 h bei 37°C und 5% CO₂. Der Überstand wurde photometrisch gemessen (OD_{405 nm}). Gezeigt ist die relative Hämolyse bei der Konzentration an LLO, welche einer 50% Hämolyse durch H₂O entspricht. Die Inkubation von LLO mit den gezeigten Glykosaminen führte zu keiner Änderung des hämolytischen Verhaltens. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (n.s. = nicht signifikant; Kruskal-Wallis Test).

Da die hier aufgezeigten Beobachtungen gezeigt haben, dass Heparin die hämolytische Aktivität von LLO beeinflussen kann, wurde in einer weiteren Versuchsreihe überprüft, ob es

eine direkte Interaktion zwischen LLO und Heparin gibt. Hierfür wurden, in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung (Prof. Dr. Peter H. Seeberger), Glykan-Microarrays durchgeführt. Hierbei wurden verschiedene Konzentrationen an LLO auf einen ECM-Array, welcher hauptsächlich verschiedene Heparin-Strukturen trägt, zugegeben (Abbildung 39).

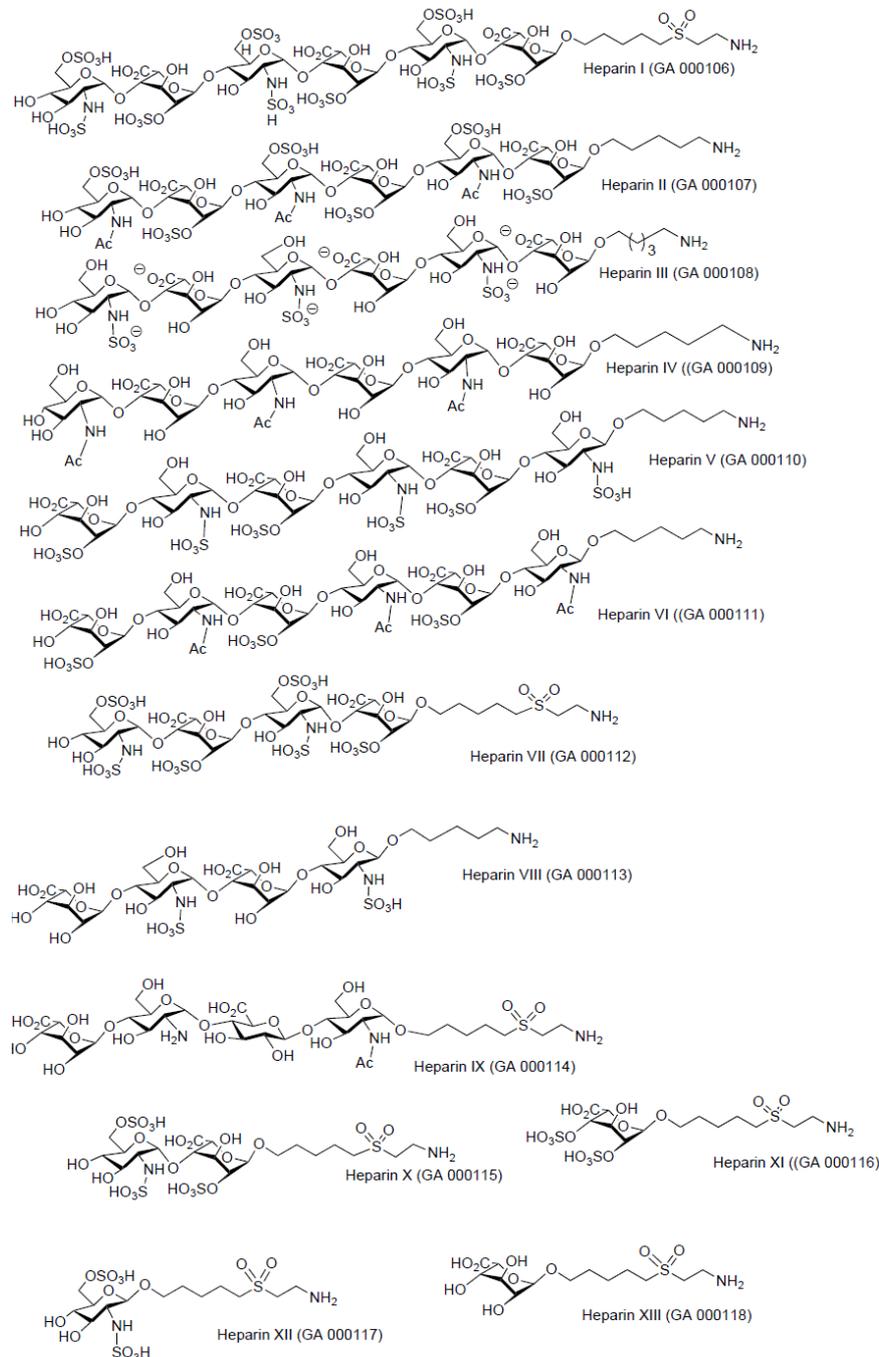


Abbildung 39 Heparin-Strukturen, welche auf dem ECM-Array aufgedruckt waren.

Hierdurch konnte für eine hohe Konzentration an LLO (50 µg/ml) eine Bindung an den Heparin-Strukturen mit der IDs 106, 107, 110, 112, 116 und NatHep (natürliches Heparin) gezeigt werden (Abbildung 40 A). Mit abnehmender Konzentration an LLO nahm die Anzahl der gebundenen Heparin-Strukturen ab. Bei einer LLO Konzentration von 5 µg/ml band das Toxin nur noch an den Heparin-Strukturen mit der IDs 106, 112, 116 und NatHep (Abbildung 40 B), bei einer LLO Konzentration von 0,5 µg/ml fand nur noch eine Bindung an die Heparin-Strukturen mit den IDs 106 und NatHep statt (Abbildung 40 C).

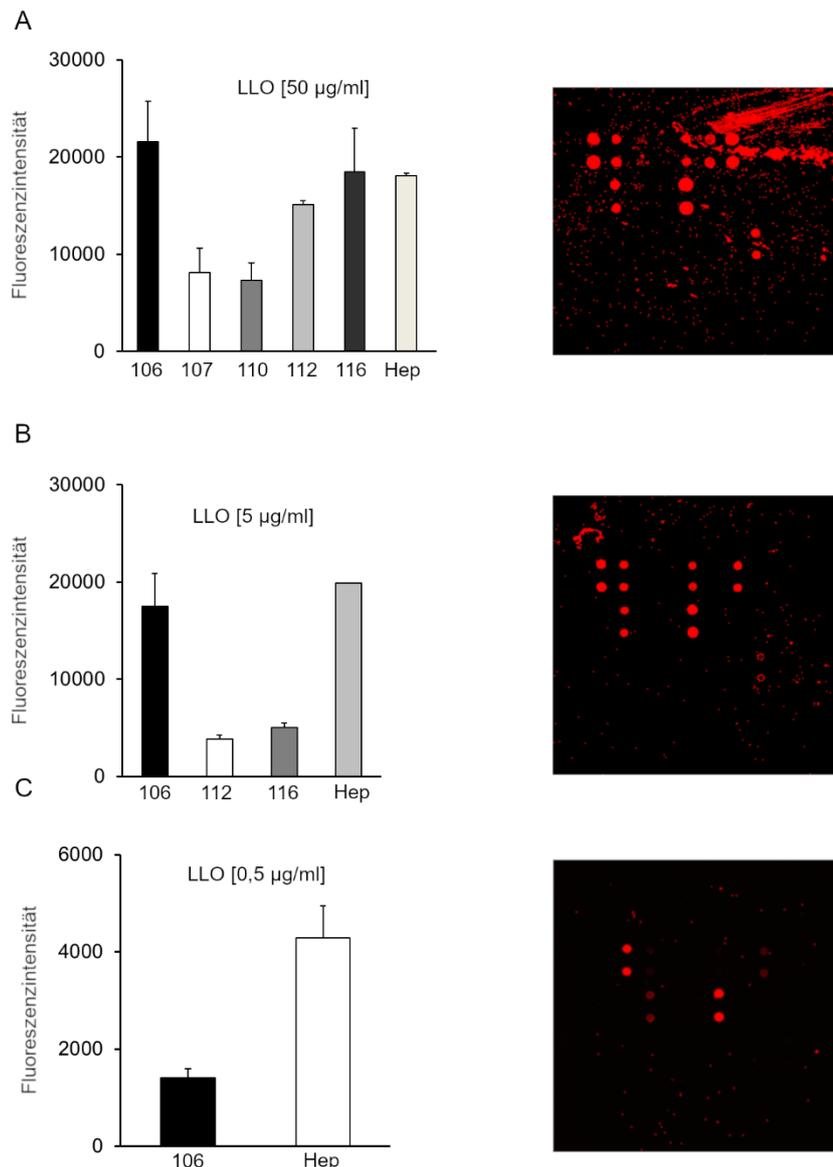


Abbildung 40 Nachweis einer direkten Listeriolysin O-Heparin-Wechselwirkung mittels Glykan-Microarray. A-C: Inkubation eines Heparin-Glykan-Microarrays mit 50 µg/ml (A), 5 µg/ml (B) oder 0,5 µg/ml (C) LLO und anschließender Analyse mittels eines Fluorometers. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml band LLO an den Heparin-Strukturen mit den IDs 106, 107, 110, 112, 116 und NatHep (A), bei einer Konzentration von 5 µg/ml an den Heparin-Strukturen mit den IDs 106, 112, 116 und NatHep (B) und bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml an den Heparin-Strukturen mit den IDs 106 und NatHep (C).

(C). Die Werte werden als Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten mit je zwei technischen Replikaten gezeigt.

Ein ähnliches Bild zeigte sich auch für die LLO-Variante, welche nur die Domäne D4 exprimiert. Es konnte eine Bindung an den Glykosaminglykanen mit den IDs 106, 116 und NatHep nachgewiesen werden. Dabei schien die Bindung an den Glykosaminglykanen 106 und 116 besser zu sein als an natürlichem Heparin (Abbildung 41).

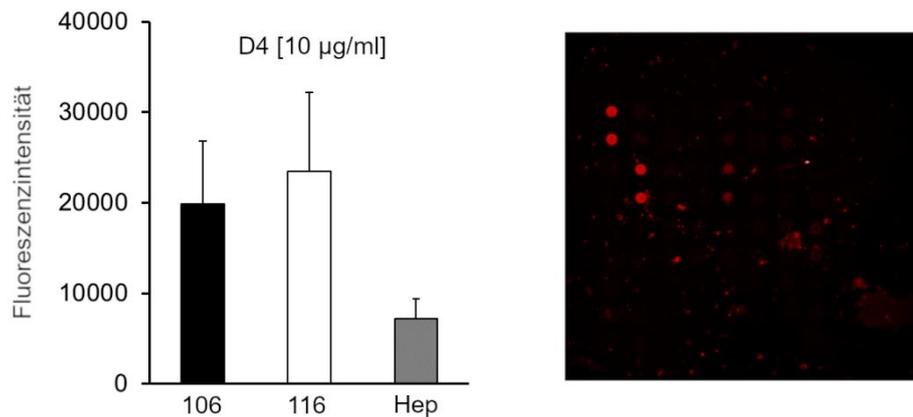


Abbildung 41 Nachweis einer direkten Domäne D4-Heparin-Wechselwirkung mittels Glykan-Microarray. A-C: Inkubation eines Heparin-Glykan-Microarrays mit D4 (10 µg/ml) und anschließender Analyse mittels eines Fluorometers. D4 band an den Heparin-Strukturen mit den IDs 106, 116 und NatHep. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten mit je zwei technischen Replikaten gezeigt.

Zur weiteren Überprüfung einer LLO/D4-Heparin-Wechselwirkung wurden Kompetitionassays durchgeführt. Dabei wurden LLO bzw. D4 mit Heparin vorinkubiert und anschließend zum Microarray hinzugegeben. Für LLO konnte konzentrationsabhängig die Bindung an der Heparin-Struktur mit der ID 106 inhibiert werden. Für natürliches Heparin war eine Inhibition nicht möglich (Abbildung 42 A-B).

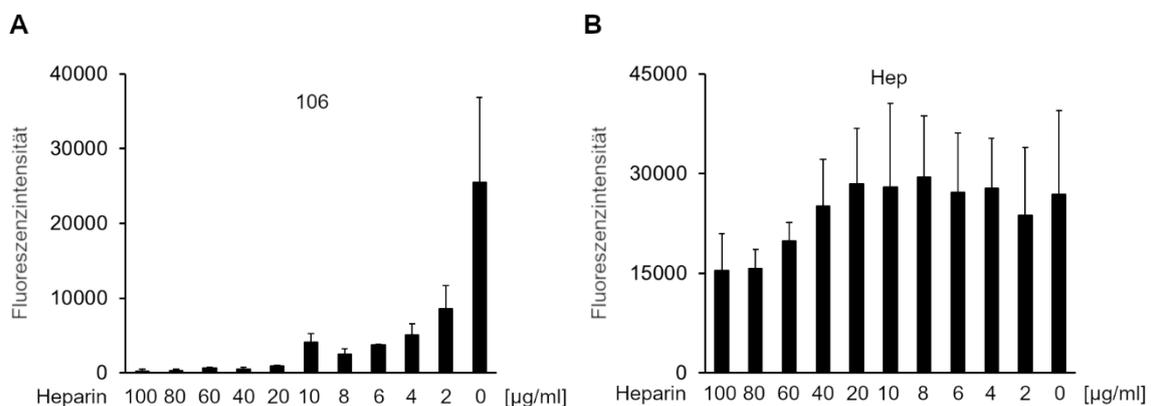


Abbildung 42 Inhibition der Listeriolysin O-Glykan-Array-Wechselwirkung nach Sättigung von Listeriolysin O mit Heparin. A, B: Vorbehandlung von LLO (50 µg/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Heparin für 30 min bei RT und anschließender Inkubation eines Glykan-Microarrays, welcher die Heparin-Struktur mit der ID 106 (A) oder mit der ID NatHep (B) trägt. Die Analyse erfolgte mittels eines Fluorometers. Für den Glykan-Microarray, welcher die Heparin-Struktur mit der ID 106 trug, führte die Vorbehandlung zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der Bindung (A). Für den Glykan-Microarray, welcher die Heparin-Struktur mit der ID NatHep trug, hatte die Vorbehandlung dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Bindung. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten mit je zwei technischen Replikaten gezeigt.

Erst bei Verwendung höherer Heparin-Konzentrationen konnte auch für natürliches Heparin eine Inhibition beobachtet werden (Abbildung 43 A-B).

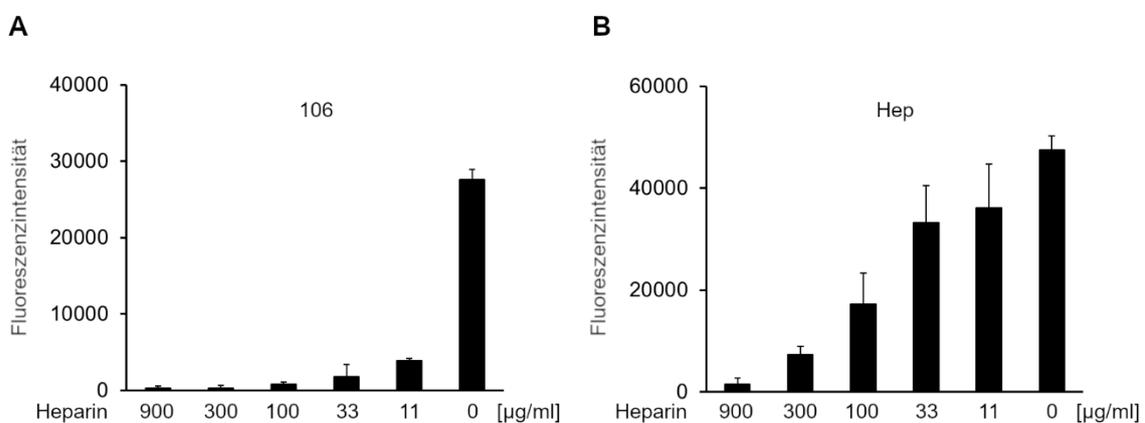


Abbildung 43 Inhibition der Listeriolysin O-Glykan-Array-Wechselwirkung nach Sättigung von Listeriolysin O mit höheren Heparin-Konzentrationen. A, B: Vorbehandlung von LLO (50 µg/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Heparin für 30 min bei RT und anschließender Inkubation eines Glykan-Microarrays, welcher die Heparin-Struktur mit der ID 106 (A) oder mit der ID NatHep (B) trug. Die Analyse erfolgte mittels eines Fluorometers. Für die Verwendung beider Glykan-Microarrays führte die Vorbehandlung zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der Bindung. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten mit je zwei technischen Replikaten gezeigt.

Bei Verwendung der LLO Variante, welche nur die Domäne D4 exprimiert, konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Für natürliches Heparin konnte eine konzentrationsabhängige Inhibition festgestellt werden. Eine solche Tendenz war auch für die Heparin-Struktur 106 und 116 erkennbar. Diese war aber weniger stark ausgeprägt als wie für das natürliche Heparin (Abbildung 44 A-C).

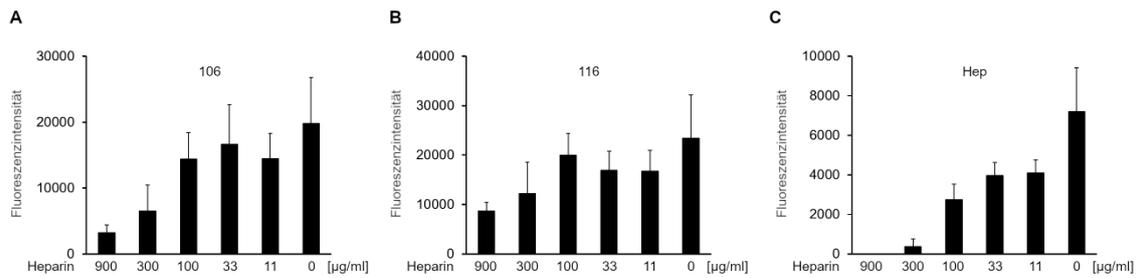


Abbildung 44 Inhibition der D4-Glykan-Array-Wechselwirkung nach Sättigung von D4 mit Heparin. A-C: Vorbehandlung von D4 (10 µg/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen an Heparin für 30 min bei RT und anschließender Inkubation eines Glykan-Microarrays, welcher die Heparin-Struktur mit der ID 106 (A), mit der ID 116 (B) oder mit der ID NatHep (C) trug. Die Analyse erfolgte mittels eines Fluorometers. Für die Verwendung aller Glykan-Microarrays führte die Vorbehandlung zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der Bindung. Diese war jedoch für den Glykan-Microarray, welcher die Heparin-Struktur mit der ID 116 trug, am wenigsten ausgeprägt. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten mit je zwei technischen Replikaten gezeigt.

6.6 Wechselwirkung von Phosphocholin und *Listeria monocytogenes* während der Infektion

Eine Reihe von Organismen verwenden Phosphocholin (ChoP) während der Infektion. Dabei handelt es sich zum einen um parasitär-lebende Nematoden und zum anderen um kommensale oder pathogene Bakterien, die in erster Linie den oberen respiratorischen Trakt besiedeln. ChoP wird dabei kovalent an Oberflächenproteinen und an Glykanen der Zellwand gebunden. Pathogene Bakterien, wie beispielsweise *Streptococcus pneumoniae*, nutzen eine solche modifizierte ChoP-Oberfläche, um ihre Adhäsion an Wirtszellen zu erhöhen (Cundell et al., 1995). Da im Zusammenhang mit dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass ChoP die Aktivität von LLO modifizieren kann, wurde im Folgenden auch untersucht, ob ChoP ebenfalls eine Rolle während der Adhäsion und Infektion von *Listeria monocytogenes* spielt.

6.6.1 Phosphocholin verstärkt die Invasion von *Listeria monocytogenes* in nicht-phagozytierenden Zellen

Zur Bestimmung inwieweit ChoP das Invasionverhalten von *L. monocytogenes* beeinflusst, wurden Gentamicin-Protektions-Assays durchgeführt. Zunächst wurden hierfür HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* Wildtyp (wt) in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an ChoP infiziert. Als Kontrolle wurden HeLa Zellen ohne Zugabe von ChoP infiziert. Die Zugabe von ChoP während der Infektion führte zu einer konzentrationsabhängigen und signifikanten Zunahme von intrazellulären Bakterien. Bei Verwendung einer ChoP-

Konzentration von 1,8 mM konnte die Anzahl der intrazellulären Bakterien verdoppelt werden. Bei Verwendung einer ChoP-Konzentration von 3,6 mM konnte diese sogar um das 20-fache erhöht werden (Abbildung 45 A). Um zu überprüfen, ob ChoP tatsächlich die Invasion der Bakterien erhöht oder der beobachtete Effekt nicht auf eine verstärkte bakterielle Replikation zurückzuführen ist, wurden Wachstumskurven von *L. monocytogenes* in Ab- bzw. Anwesenheit von ChoP aufgenommen. Dabei konnte festgestellt werden, dass ChoP keinen Einfluss auf die bakterielle Replikation nimmt (Abbildung 45 B).

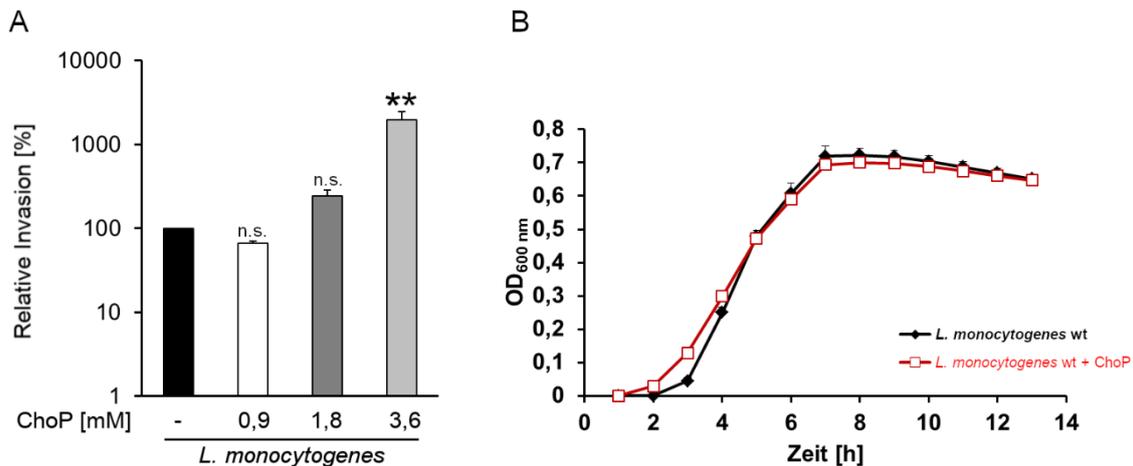


Abbildung 45 Phosphocholin-abhängige Verstärkung der Invasion von *Listeria monocytogenes* in nicht-phagozytierenden Zellen. A: Infektion von HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen an Phosphocholin (ChoP) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Zugabe von Gentamicin-haltigem Zellkulturmedium (50 µg/ml) für 15 min bei 37°C zum Abtöten extrazellulärer Bakterien wurden die Zellen lysiert und die intrazellulären Bakterien auf BHI-Agarplatten plattiert. Gezeigt ist die relative CFU der intrazellulären Bakterien. Die Zugabe von ChoP führte zu einer konzentrationsabhängigen Verstärkung der Invasion von *L. monocytogenes* wt. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (** $p \leq 0,01$; n.s. = nicht signifikant; one-way ANOVA und Holm-Šidák post-hoc Test gegen Infektion ohne ChoP Zugabe als Kontrollgruppe). B: Wachstumskurve von *L. monocytogenes* in Ab- bzw. Anwesenheit von ChoP (3,6 mM). Die Zugabe von ChoP hatte keinen Einfluss auf die bakterielle Replikation. Die Werte werden als Mittelwerte ± SD von zwei unabhängigen Experimenten mit gezeigt.

Zur qualitativen Überprüfung, ob ChoP in der Lage ist die Anzahl an intrazellulären Bakterien massiv zu erhöhen, wurden konfokalmikroskopische Aufnahmen gemacht. Auch hier war deutlich zu erkennen, dass durch ChoP-Zugabe die Anzahl der intrazellulären Bakterien deutlich erhöht war im Vergleich zur Kontrollinfektion. Ebenso war zu erkennen, dass in der ChoP-behandelten Probe die von den Bakterien ausgebildeten Aktin-Schweife deutlich verlängert waren (Abbildung 46). Dies lässt darauf schließen, dass durch ChoP-Zugabe die zeitliche Aufnahme der Bakterien beschleunigt wird.

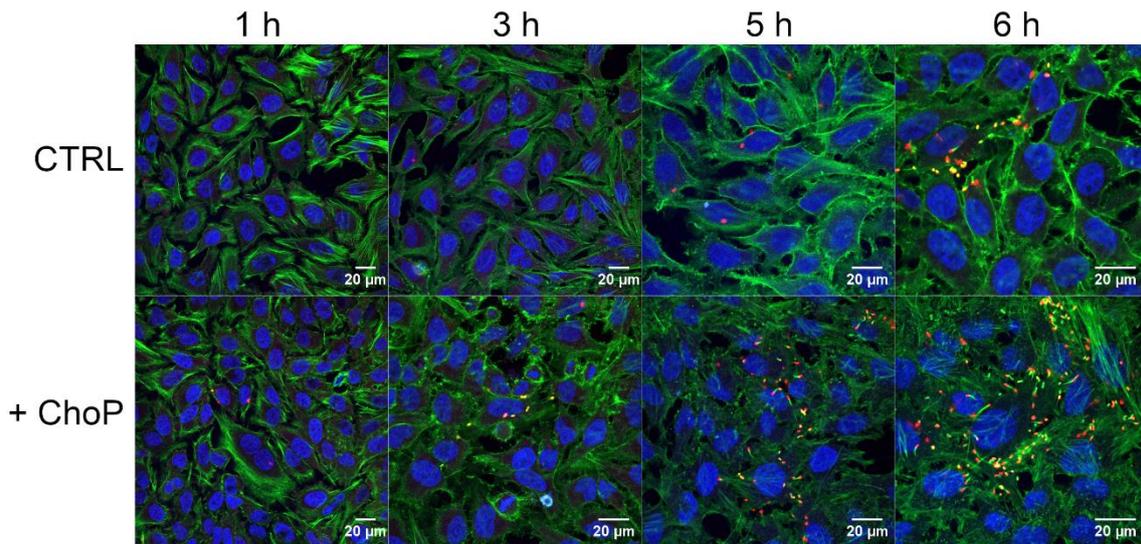


Abbildung 46 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* wt in Anwesenheit von Phosphocholin. Infektion von HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt (MOI 10) in Ab- bzw. Abwesenheit von Phosphocholin (ChoP) (3,6 mM) für unterschiedliche Zeitpunkte und anschließender Markierung mit einem primären Antikörper gegen *L. monocytogenes* (anti-Lm; M108, eigene Herstellung). Nach anschließender Inkubation mit einem Fluorophor-markierten sekundären Antikörper wurden die Zellen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie analysiert. Die Anwesenheit von ChoP führte über die Zeit zu einer erhöhten Anzahl an intrazellulären Bakterien. Aktin-Filamente wurden mittels Zugabe von Phalloidin visualisiert. Blau = DAPI, Grün = Aktin-Filamente, Rot = *L. monocytogenes*.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden HeLa Zellen in Anwesenheit von ChoP für unterschiedliche Zeitpunkte infiziert. Während nach 15 min und 30 min nur eine tendenzielle Steigerung der intrazellulären Bakterienzahl zu erkennen war, konnte hingegen nach 45 min eine signifikante Erhöhung der intrazellulären Bakterienzahl in der ChoP-behandelten Probe festgestellt werden.

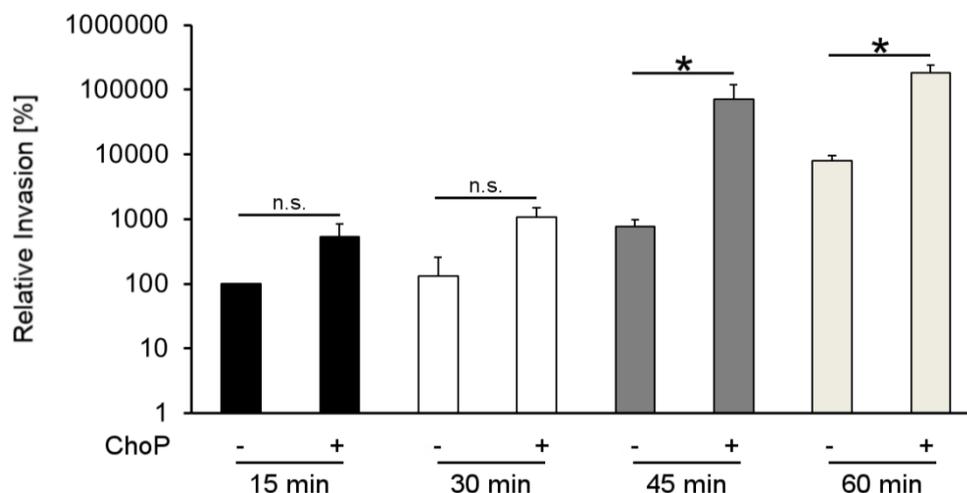


Abbildung 47 Zeitabhängigkeit der Phosphocholin-abhängigen Verstärkung der Invasion von *Listeria monocytogenes* in nicht-phagozytierenden Zellen. Infektion von HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt mit simultaner Zugabe von Phosphocholin (ChoP) (3,6 mM) und Inkubation für unterschiedliche Zeitpunkte bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Zugabe von Gentamicin-haltigem Zellkulturmedium (50 µg/ml) für 15 min bei 37°C zum Abtöten extrazellulärer Bakterien wurden die Zellen lysiert und die intrazellulären Bakterien auf BHI-Agarplatten plattiert. Gezeigt ist die relative CFU der intrazellulären Bakterien. Erst nach 45 min führte die Zugabe von ChoP zu einer signifikanten Verstärkung der Invasion von *L. monocytogenes* wt. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (* $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; t-Test).

Weiterhin wurde überprüft, ob der beobachtete Effekt einer erhöhten bakteriellen Invasion ChoP-spezifisch ist, oder auch ChoP-Derivate einen solchen Effekt hervorrufen könnten. Hierfür wurden HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen an ChoP, Cholin, Betain, Carnitin oder Phosphoserin (PhoS) infiziert. Als Kontrolle wurden HeLa Zellen ohne Zugabe von ChoP oder ChoP-Derivaten infiziert. Keines der getesteten ChoP-Derivate hatte einen Einfluss auf das Invasionsverhalten von *L. monocytogenes*. Hieraus wurde geschlossen, dass der beobachtete Effekt ChoP-spezifisch ist (Abbildung 48 A-B).

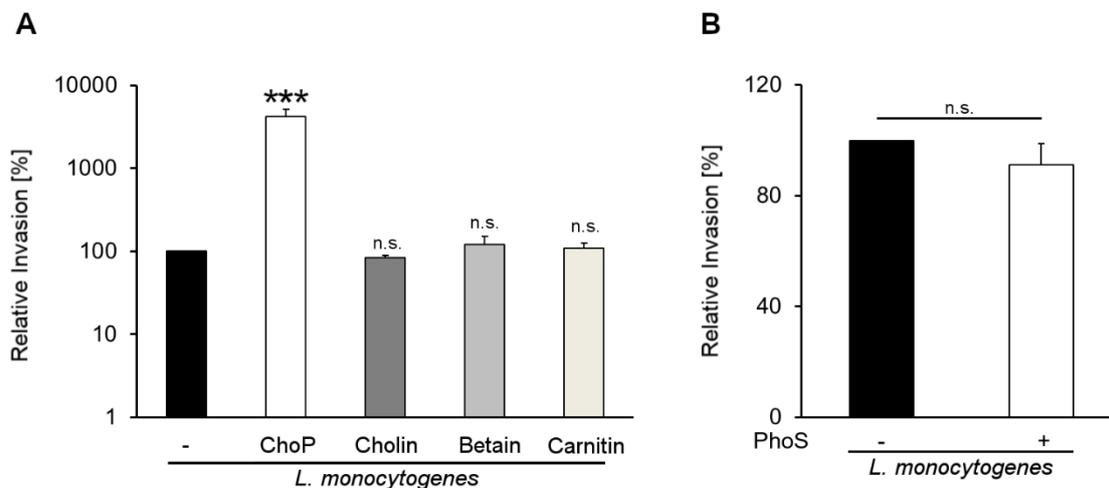


Abbildung 48 Invasionsverhalten von *Listeria monocytogenes* in nicht-phagozytierenden Zellen bei Zugabe von Phosphocholin-Derivaten. A, B: Infektion von HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt in Kombination mit Phosphocholin (ChoP) (3,6 mM), Cholin (1,2 mg/ml), Betain (1,2 mg/ml), Carnitin (1,2 mg/ml) oder Phosphoserin (PhoS) (3,6 mM) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Zugabe von Gentamicin-haltigem Zellkulturmedium (50 µg/ml) für 15 min bei 37°C zum Abtöten extrazellulärer Bakterien wurden die Zellen lysiert und die intrazellulären Bakterien auf BHI-Agarplatten plattiert. Gezeigt ist die relative CFU der intrazellulären Bakterien. Die Zugabe von ChoP führte zu einer Verstärkung der Invasion von *L. monocytogenes* wt. Alle getesteten ChoP-Derivate führten dagegen zu keiner signifikanten Veränderung des Invasionsverhaltens von *L. monocytogenes* wt. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (A: *** $p \leq 0,001$; n.s. = nicht signifikant; one-way ANOVA und Holm-Šidák post-hoc Test gegen Infektion ohne Molekül Zugabe als Kontrollgruppe; B: n.s. = nicht signifikant).

In diesem Zusammenhang wurde außerdem überprüft, ob der beobachtete Effekt einer verstärkten Invasion von *L. monocytogenes* durch ChoP nur spezifisch für HeLa Zellen ist oder ob es sich hierbei um ein allgemeineres Phänomen handelt. Hierfür wurden P388D1 Makrophagen, CaCo2 Zellen, L929 Zellen, MCF-7 Zellen und Vero Zellen mit *L. monocytogenes* wt in Anwesenheit von ChoP infiziert. Als Kontrolle wurden Zellen ohne Zugabe von ChoP infiziert. Die Auswertung ergab, dass für L929 Zellen und MCF-7 Zellen ein ähnlicher Effekt wie für HeLa Zellen zu beobachten war (Abbildung 49 C-D). Ebenso war eine leichte Tendenz der Invasionssteigerung in CaCo2 Zellen zu beobachten (Abbildung 49 B). Diese war jedoch nicht signifikant. Für P388D1 Makrophagen konnte hingegen kein invasionssteigernder Effekt beobachtet werden (Abbildung 49 A). Dies könnte damit zusammenhängen, dass es sich hierbei um eine phagozytierende Zelllinie handelt. Interessanterweise führte die ChoP-Zugabe bei Vero Zellen zu einer Umkehrung des beobachteten Effekts. Hier führte die Zugabe von ChoP zu einer stark verminderten Invasion (Abbildung 49 E).

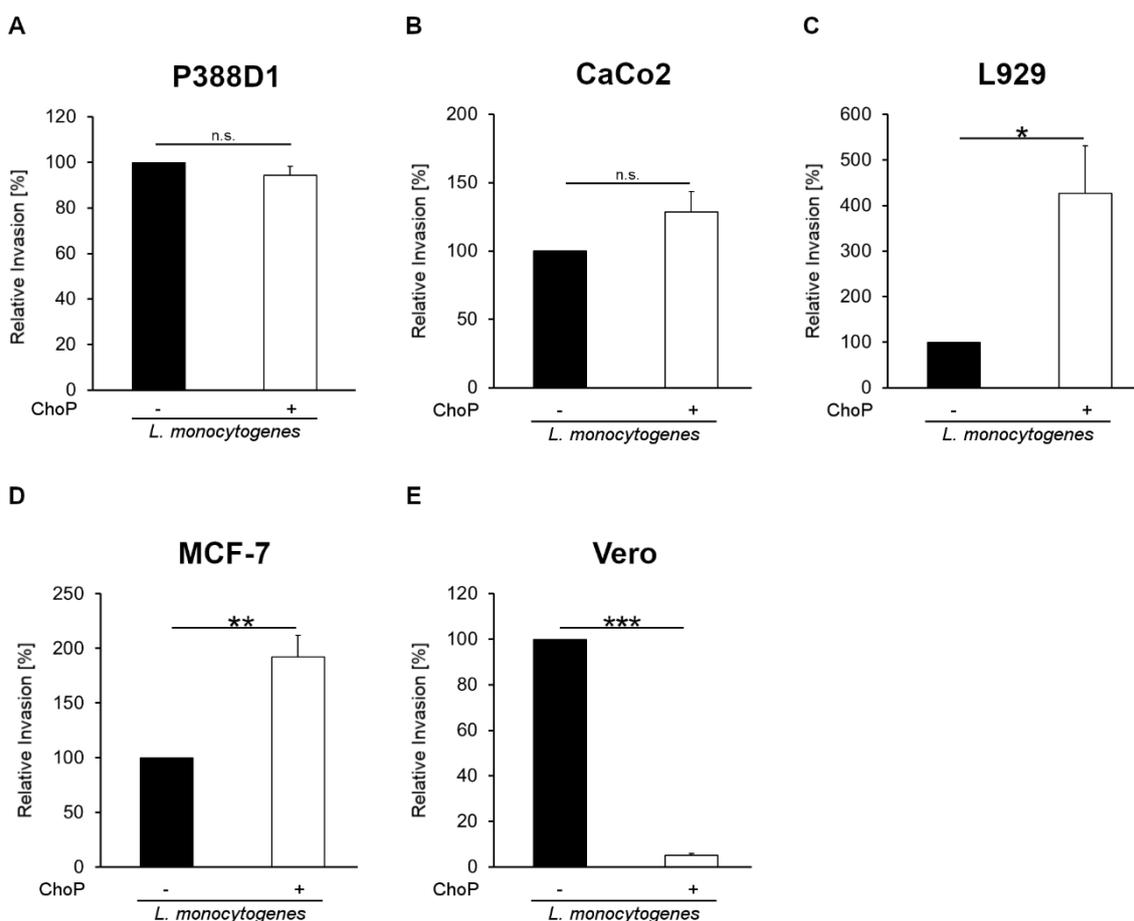


Abbildung 49 Phosphocholin-abhängige Verstärkung der Invasion von *Listeria monocytogenes* in unterschiedlichen Zelllinien. A-E: Infektion von P388D1 (A), CaCo2 (B), L929 (C), MCF-7 (D) oder Vero Zellen (E) mit *L. monocytogenes* wt in Kombination mit Phosphocholin (ChoP) (3,6 mM) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Zugabe von Gentamicin-haltigem Zellkulturmedium (50 µg/ml) für 15 min bei 37°C zum Abtöten extrazellulärer Bakterien wurden die Zellen lysiert und die

intrazellulären Bakterien auf BHI-Agarplatten plattiert. Die Zugabe von ChoP zu P388D1 Makrophagen und zu CaCo2 Zellen führte zu keiner Verstärkung der Invasion von *L. monocytogenes* wt. Eine solche verstärkte Invasion war jedoch in L929 und MCF-7 Zellen zu beobachten. In Vero Zellen führte die Zugabe von ChoP zu einer Inhibition der Invasion von *L. monocytogenes*. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei (A, C, E) bzw. vier (B, D) unabhängigen Experimenten gezeigt (** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,005$; * $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; t-Test).

6.6.2 Die Phosphocholin-verstärkte Invasion ist spezifisch für *Listeria* und die Folge einer verstärkten Adhäsion an die zelluläre Oberfläche

Zur weiteren Überprüfung, ob es sich bei der durch ChoP verstärkten Invasion nur um einen *L. monocytogenes*-spezifischen Effekt handelt oder ob eine ähnliche Invasion ebenfalls für weitere Bakterien nachgewiesen werden kann, wurden im Folgenden HeLa Zellen mit invasiven und nicht-invasiven Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien infiziert. Für die Invasion wurden *Listeria monocytogenes* wt, *Listeria innocua*, *Bacillus subtilis* oder *Escherichia coli* K12 verwendet. Die Infektionen erfolgten mit den Bakterien alleine oder in Anwesenheit von ChoP. Bei der Infektion mit *L. monocytogenes* wt führte die Zugabe von ChoP, den Erwartungen entsprechend, zu einer stark erhöhten Invasion der Bakterien. Ein ähnliches Phänomen konnte ebenfalls für *L. innocua* beobachtet werden. Bei Verwendung von *B. subtilis* und *E. coli* konnte hingegen keine Änderung im Invasionsverhalten festgestellt werden (Abbildung 50). Anhand dieser Daten lässt sich vermuten, dass die Erhöhung der intrazellulären Bakterienzahl durch ChoP ein Listerien-spezifischer Effekt ist.

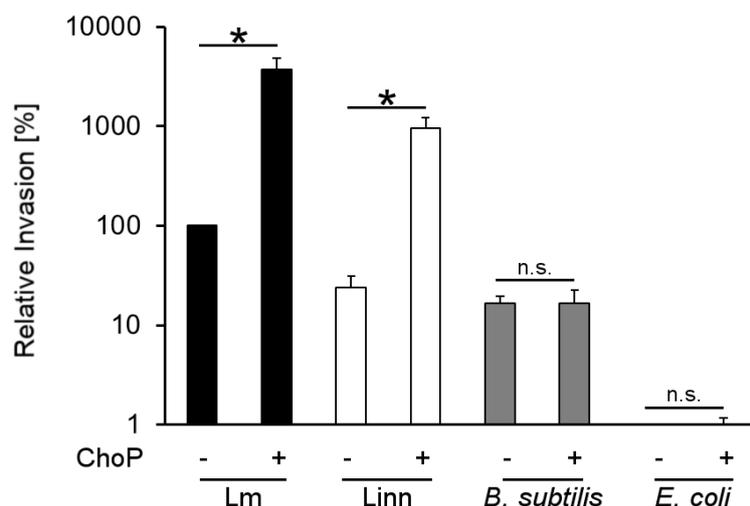


Abbildung 50 Invasionsverhalten von unterschiedlichen Bakterien in nicht-phagozytierenden Zellen in Anwesenheit von Phosphocholin. Infektion von HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt (Lm), *L. innocua* (Linn), *B. subtilis* und *E. coli* in Kombination mit Phosphocholin (ChoP) (3,6 mM) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Zugabe von Gentamicin-haltigem Zellkulturmedium (50 µg/ml) für 15 min bei 37°C zum Abtöten extrazellulärer Bakterien wurden die Zellen lysiert und die intrazellulären Bakterien auf BHI-Agarplatten plattiert. Die Zugabe von ChoP führte zu einer Verstärkung der Invasion von Lm und Linn, jedoch nicht von *B. subtilis* und *E. coli*. Die Werte werden

als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (* $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; t-Test).

ChoP spielt für andere pathogene Bakterien, wie beispielsweise für *Streptococcus pneumoniae*, eine wichtige Rolle während des Invasionsprozesses, da es eine Adhäsion des Bakteriums an die Wirtszelle ermöglicht. Dabei interagiert ChoP mit Oberflächenrezeptoren, wie beispielsweise mit dem Plättchenaktivierenden Faktor-Rezeptor (PAF-Rezeptor) (Cundell et al., 1995). Diese Interaktion ermöglicht dem Bakterium eine effiziente Anlagerung an die Wirtszelle, gefolgt von ihrer Infektion. Da die hier dargestellten Daten gezeigt haben, dass ChoP eine mögliche Rolle im Invasionsprozess von *L. monocytogenes* spielt, wurde im Folgenden untersucht, ob die durch ChoP-induzierte verstärkte Invasion auf eine Verbesserung der Adhäsion der Bakterien an die Wirtszelle zurückzuführen ist.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden Adhäsions-Assays durchgeführt. Hierfür wurden HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt, *L. innocua*, *B. subtilis*, oder *E. coli* infiziert. Bei einer Infektion mit *L. monocytogenes* wt konnte in Anwesenheit von ChoP eine erhöhte Adhäsion an die zelluläre Oberfläche im Vergleich zu Infektion ohne ChoP-Zugabe beobachtet werden (Abbildung 51 A). Ein ähnliches Bild zeigte sich nach Infektion mit *L. innocua* und *B. subtilis*. Auch hier führte die simultane Behandlung mit ChoP zu einer erhöhten Adhäsion (Abbildung 51 B-C). Für *E. coli* konnte dagegen kein signifikanter Unterschied nach ChoP-Behandlung festgestellt werden (Abbildung 51 D).

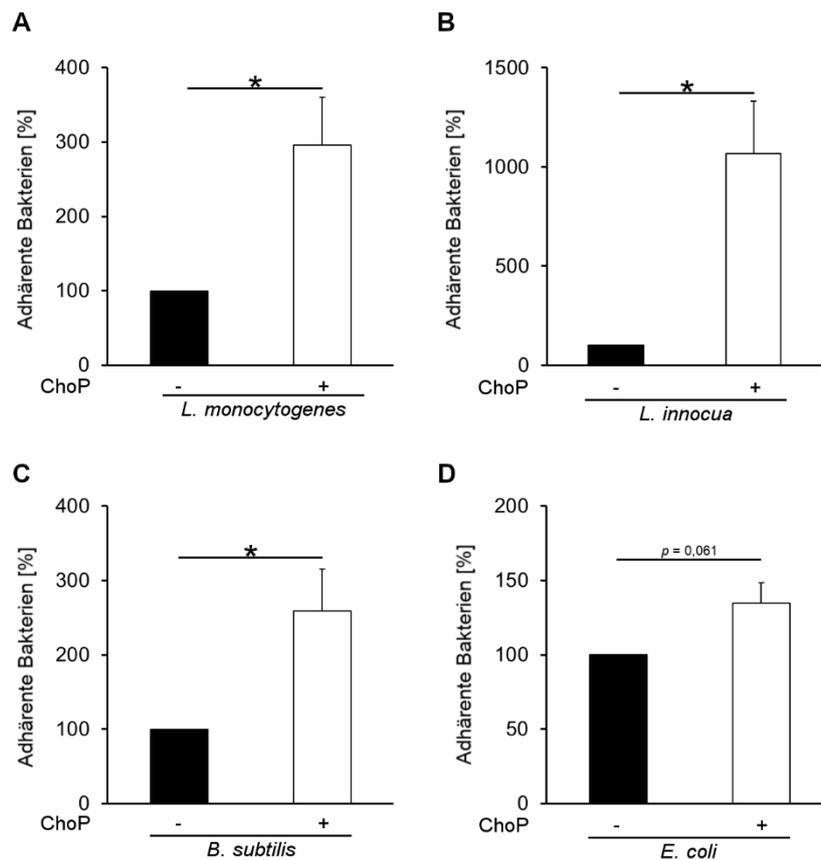


Abbildung 51 Adhäsionsverhalten von unterschiedlichen Bakterien in nicht-phagozytierenden Zellen in Anwesenheit von Phosphocholin. Infektion von HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt (Lm) (A), *L. innocua* (Linn) (B), *B. subtilis* (C) und *E. coli* (D) in Kombination mit Phosphocholin (ChoP) (3,6 mM) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂. Die Zugabe von ChoP führte zu einer signifikanten Verstärkung der Adhäsion der Bakterien an die zelluläre Oberfläche. Die Werte werden als Mittelwerte ± SEM von vier (A) bzw. drei (B, C, D) unabhängigen Experimenten gezeigt (* $p \leq 0,05$; t-Test).

6.6.3 Die endogene Produktion von Phosphocholin über die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C führt zu einer reduzierten Invasion von *Listeria monocytogenes*

Da durch die enzymatische Aktivität der Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PlcB) von *Listeria monocytogenes* eine endogene ChoP-Produktion durch *L. monocytogenes* stattfindet, wurde untersucht, ob PlcB eine Rolle für die Invasion des Bakteriums in nicht-phagozytierenden Zellen spielt. Hierfür wurden HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt, *L. monocytogenes* $\Delta plcA$, *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ oder *L. monocytogenes* $\Delta plcAB$ infiziert. Bei Verwendung der *L. monocytogenes* Mutante, welche kein PlcA mehr exprimiert, konnte kein signifikanter Unterschied im Invasionsverhalten im Vergleich zu *L. monocytogenes* wt beobachtet werden. Dagegen waren die *L.*

monocytogenes $\Delta plcB$ und $\Delta plcAB$ Mutanten in ihrem Invasionsverhalten signifikant attenuiert (Abbildung 52 A).

Weiterhin wurde in diesem Zusammenhang überprüft, ob die ChoP-vermittelte verstärkte Invasion in Abhängigkeit zu anderen Virulenzfaktoren steht. Um dies zu überprüfen wurden HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt, *L. monocytogenes* Δhly , *L. monocytogenes* $\Delta inlA$, *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ oder *L. monocytogenes* $\Delta actA$ infiziert. Die Analyse der Daten ergab, dass nach ChoP-Zugabe bei allen verwendeten Mutanten eine signifikant verstärkte Invasion stattfand (Abbildung 52 B). Dies würde für einen Virulenzfaktor-unabhängigen Invasionsmechanismus sprechen.

Da in HeLa Zellen die Invasion hauptsächlich über InlB stattfindet, wurde diese im Zusammenhang mit ChoP genauer untersucht. Hierfür wurde in HeLa Zellen ein siRNA knockdown des kodierenden Gens für c-Met durchgeführt. Anschließend wurden sowohl Wildtyp-Zellen als auch Zellen mit Knockdown mit *L. monocytogenes* wt in An- oder Abwesenheit von ChoP infiziert. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Invasionsverhalten zwischen ChoP-behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden (Abbildung 52 C). Die Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung zwischen InlB und c-Met führt zur Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K), welche eine Signalkaskade induziert, die zu einer Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle führt (Gessain et al., 2016). Zur Überprüfung, ob die ChoP-vermittelte, verstärkte Invasion von *L. monocytogenes* in Abhängigkeit zu diesem Signalweg steht, wurden HeLa vor Infektion mit *L. monocytogenes* wt mit einem spezifischen PI3K-Inhibitor (Ly294002) behandelt. Als Kontrolle wurden ebenfalls HeLa Zellen ohne Inhibitor-Zugabe mitgeführt. Auch hier konnte kein signifikanter Unterschied im Invasionsverhalten zwischen ChoP-behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden (Abbildung 52 D).

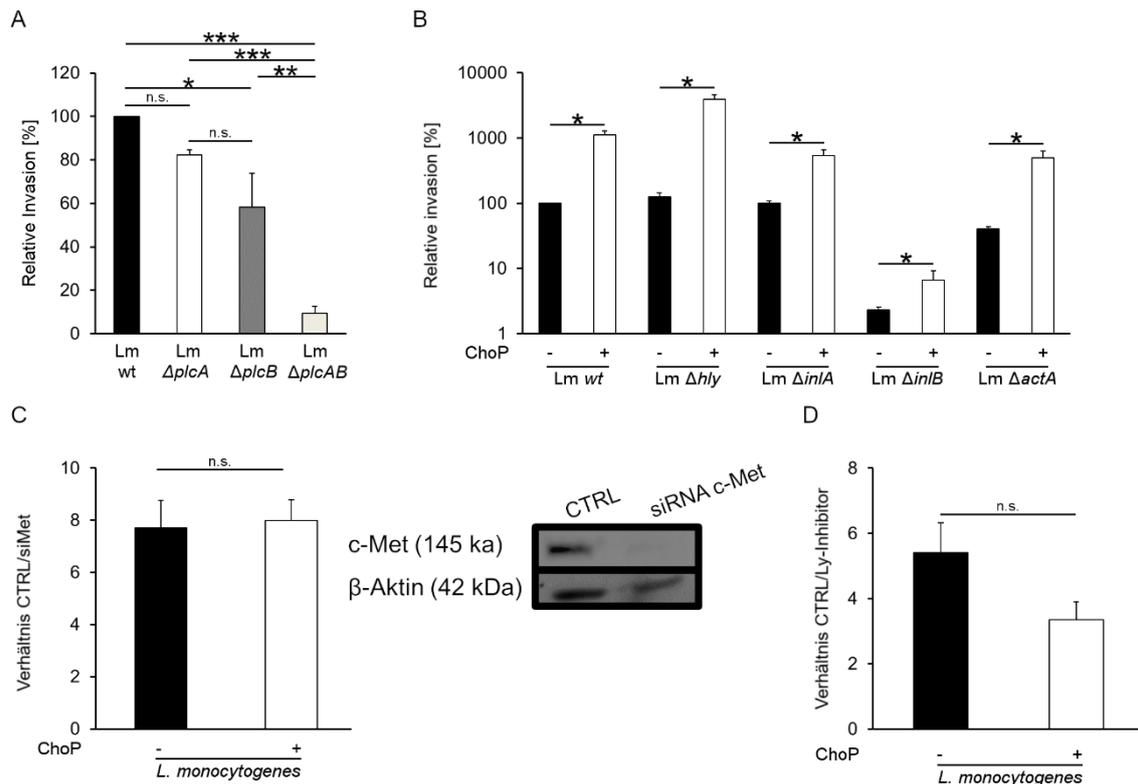


Abbildung 52 Die Phosphocholin-abhängige Verstärkung der Invasion von *Listeria monocytogenes* ist abhängig von PlcB, aber nicht von weiteren Virulenzfaktoren. A, B: Infektion von HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt (Lm wt), *L. monocytogenes* $\Delta plcA$ (Lm $\Delta plcA$), *L. monocytogenes* $\Delta plcB$ (Lm $\Delta plcB$) und *L. monocytogenes* $\Delta plcAB$ (Lm $\Delta plcAB$) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ (A) oder mit *L. monocytogenes* wt (Lm wt), *L. monocytogenes* Δhly (Lm Δhly), *L. monocytogenes* $\Delta inlA$ (Lm $\Delta inlA$), *L. monocytogenes* $\Delta inlB$ (Lm $\Delta inlB$) und *L. monocytogenes* $\Delta actA$ (Lm $\Delta actA$) in Kombination mit Phosphocholin (ChoP) (3,6 mM) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ (B). Nach anschließender Zugabe von Gentamicin-haltigem Zellkulturmedium (50 µg/ml) für 15 min bei 37°C zum Abtöten extrazellulärer Bakterien wurden die Zellen lysiert und die intrazellulären Bakterien auf BHI-Agarplatten plattiert. Lm $\Delta plcB$ und Lm $\Delta plcAB$, jedoch nicht Lm $\Delta plcA$, waren in ihrem Invasionsverhalten signifikant attenuiert (A). Die ChoP Zugabe führte bei allen verwendeten Mutanten zu einer signifikant verstärkten Invasion (B). Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei (A) bzw. vier (B) unabhängigen Experimenten gezeigt (A: *** $p \leq 0,001$; * $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; one-way ANOVA und Student-Newman-Keuls post-hoc Test; B: * $p \leq 0,05$; Wilcoxon-Mann-Whitney-Test). C, D: siRNA Knockdown des kodierenden Gens für c-Met (10 nM siRNA; 3 µl HiPerFect) (C) oder Vorbehandlung mit Ly294002 (50 µM, 45 min) (D) und anschließende Infektion von HeLa Zellen mit *L. monocytogenes* wt in Kombination mit ChoP (3,6 mM) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Zugabe von Gentamicin-haltigem Zellkulturmedium (50 µg/ml) für 15 min bei 37°C zum Abtöten extrazellulärer Bakterien wurden die Zellen lysiert und die intrazellulären Bakterien auf BHI-Agarplatten plattiert. Gezeigt ist das Verhältnis von siRNA (C) oder Inhibitor (D) behandelten und unbehandelten Zellen (C). Es konnte kein signifikanter Unterschied im Invasionsverhalten zwischen ChoP-behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei (C) bzw. fünf (D) unabhängigen Experimenten gezeigt (n.s. = nicht signifikant; t-Test).

6.6.4 Der Plättchenaktivierende Faktor-Rezeptor ist ein möglicher Rezeptor für die Phosphocholin-vermittelte Invasion von *Listeria monocytogenes*

Es ist bekannt, dass eine Vielzahl von pathogenen Bakterien Phosphocholin (ChoP) an Oberflächenproteinen oder Glykanen binden. *Streptococcus pneumoniae* beispielsweise koppelt ChoP an Zellwand-assoziierten Teichon- und Lipoteichonsäuren. Eine ähnliche Modifikation wurde ebenfalls für *Haemophilus influenzae* beschrieben. Diese Modifikation wird bei diesen pathogenen Bakterien zur Verbesserung der Adhäsion an die Wirtszellen, sowie zur Unterdrückung von Immunantworten und Vermeidung von Wirtszellantworten genutzt. Sowohl *S. pneumoniae* als auch *H. influenzae* und *Neisseria* ssp. nutzen ChoP zur Bindung an dem Plättchenaktivierendem Faktor-Rezeptor (PAF-Rezeptor) (Young et al., 2013). Dadurch verbessern diese Bakterien ihre Adhäsion zur Wirtszelle und erleichtern damit die Infektion. Zur Überprüfung, ob ein ähnlicher Mechanismus ebenfalls bei Infektion von *Listeria monocytogenes* zum Tragen kommt, wurde mittels unterschiedlicher Methoden die Expression des PAF-Rezeptors in HeLa Zellen reduziert und anschließend das Invasionsverhalten von *L. monocytogenes* untersucht. Zunächst jedoch wurde überprüft, ob HeLa Zellen generell den PAF-Rezeptor exprimieren und somit eine geeignete Zelllinie zur Untersuchung dieser Hypothese sind. Hierfür wurde in einem Proteinextrakt von HeLa Zellen der PAF-Rezeptor detektiert. Das Proteinextrakt zeigte ein spezifisches Signal zwischen der 55 kDa und 35 kDa Markerbande (Abbildung 53 A). Da der PAF-Rezeptor ein Molekulargewicht von ca. 38 kDa hat und das Signal spezifisch war, wurde angenommen, dass es sich hierbei tatsächlich um den PAF-Rezeptor handelt. Weiterhin wurde das Vorhandensein des PAF-Rezeptors auf der Oberfläche von HeLa Zellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Damit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass HeLa Zellen den PAF-Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen (Abbildung 53 B).

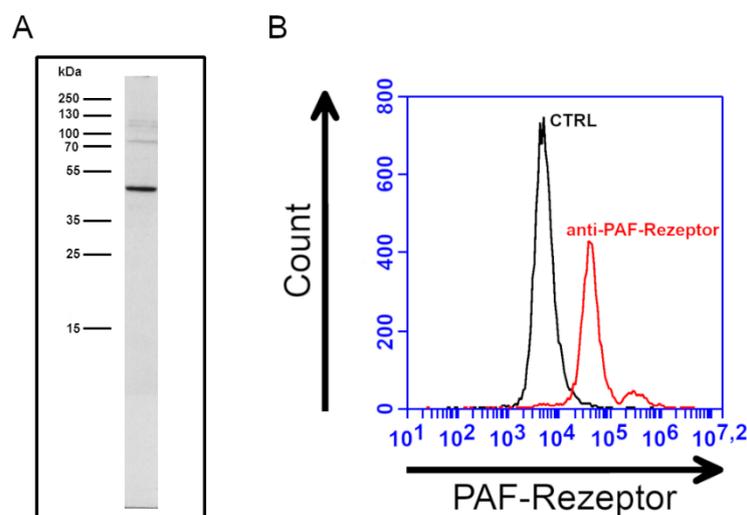


Abbildung 53 Nachweis des Plättchenaktivierenden Faktor-Rezeptors auf der zellulären Oberfläche von HeLa Zellen. A: Nachweis des Plättchenaktivierenden Faktor-Rezeptors (PAF-Rezeptor) im Proteinextrakt von HeLa Zellen mittels Western Blot unter Verwendung eines spezifischen

primären Antikörper gegen den PAF-Rezeptor. Es wurden 30 µg des Proteinextraktes mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Proteinextrakt der HeLa Zellen zeigte ein spezifisches Signal zwischen der 55 kDa und 35 kDa Markerbande. B: Nachweis des PAF-Rezeptors auf der zellulären Oberfläche von HeLa Zellen mittels Durchflusszytometrie. Der Nachweis des PAF-Rezeptors erfolgte durch Inkubation der HeLa Zellen mit einem spezifischen Antikörper, welcher sich gegen diesen richtet (anti-PAF-Rezeptor). Als Negativkontrolle wurden nicht-markierte HeLa Zellen verwendet (CTRL). Unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers wurde mittels Gating entfernt.

Zur Überprüfung, ob der PAF-Rezeptor von *L. monocytogenes* für eine Invasion in die Wirtszelle genutzt werden kann, wurden HeLa Zellen zunächst mit Fluticasonpropionat, einem Glukokortikoid, welches die Expression des PAF-Rezeptors inhibiert (Barbier et al., 2008), vier Stunden vor Infektion vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen mit *L. monocytogenes* infiziert. In HeLa Zellen, welche mit Fluticasonpropionat vorbehandelt wurden, konnte eine signifikant verringerte Anzahl an intrazellulären Bakterien nachgewiesen werden (Abbildung 54 A). Zur Verifizierung der PAF-Rezeptor-abhängigen Invasion wurden außerdem die Expression des PAF-Rezeptors mittels siRNA Knockdown verringert. HeLa Zellen, welche mit der siRNA behandelt wurden, zeigten nach Infektion mit *L. monocytogenes* wt eine verringerte Invasion im Vergleich zu HeLa Zellen, welche mit einer „scrambled“ siRNA (Negativkontrolle) behandelt wurden (Abbildung 54 B). In einem weiteren Versuchsansatz wurde zudem der PAF-Rezeptor mittels des spezifischen PAF-Rezeptor Antagonisten PCA 4248 blockiert. Hierfür wurden HeLa Zellen mit diesem vorinkubiert und anschließend mit *L. monocytogenes* wt in Ab- und Anwesenheit von ChoP infiziert. Die Vorbehandlung der HeLa Zellen mit PCA 4248 führte zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Reduktion der intrazellulären Bakterien. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der ChoP-vermittelten verstärkten Invasion. Auch hier zeigten die Zellen, welche mit PCA 4248 vorbehandelt wurden, eine geringere bakterielle Last (Abbildung 54 C).

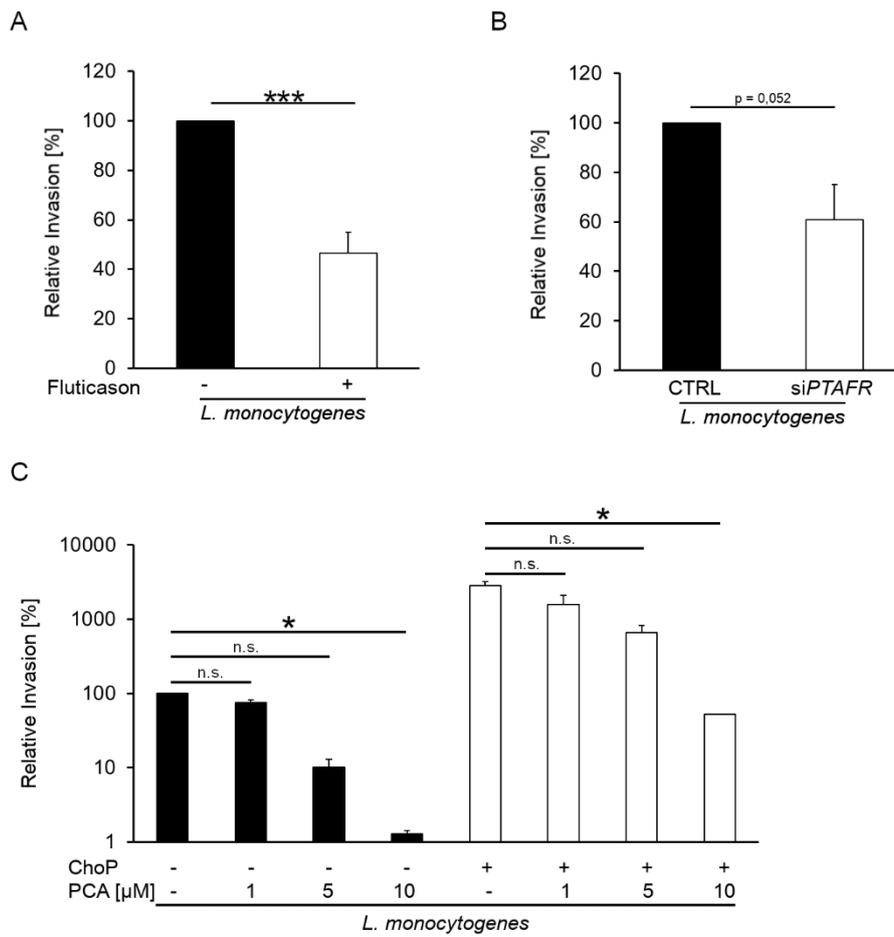


Abbildung 54 Abhängigkeit der Invasion von *Listeria monocytogenes* in nicht-phagozytierenden Zellen vom Plättchenaktivierenden Faktor-Rezeptor. A: Vorbehandlung von HeLa Zellen mit Fluticasonpropionat (0,1 μ M) für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ und anschließender Infektion mit *L. monocytogenes* wt für 1 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Zugabe von Gentamicin-haltigem Zellkulturmedium (50 μ g/ml) für 15 min bei 37°C zum Abtöten extrazelluläre Bakterien wurden die Zellen lysiert und die intrazellulären Bakterien auf BHI-Agarplatten plattiert. In HeLa Zellen, welche mit Fluticasonpropionat behandelt wurden, war die Invasion signifikant vermindert. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (A: *** $p \leq 0,001$; t-Test). B: siRNA-abhängiger Knockdown von *PTAFR* in HeLa Zellen und anschließender Infektion mit *L. monocytogenes* wt für 1 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Zugabe von Gentamicin-haltigem Zellkulturmedium (50 μ g/ml) für 15 min bei 37°C zum Abtöten extrazelluläre Bakterien wurden die Zellen lysiert und die intrazellulären Bakterien auf BHI-Agarplatten plattiert. In HeLa Zellen mit verminderter PAF-Rezeptor Expression war die Invasion vermindert. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (AB $p = 0,052$; t-Test). C: Vorbehandlung von HeLa Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an PCA 4248 (0,1 μ M) für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ und anschließender Infektion mit *L. monocytogenes* wt in Kombination mit Phosphocholin (ChoP) (3,6 mM) für 1 h bei 37°C und 5% CO₂. Nach anschließender Zugabe von Gentamicin-haltigem Zellkulturmedium (50 μ g/ml) für 15 min bei 37°C zum Abtöten extrazellulärer Bakterien wurden die Zellen lysiert und die intrazellulären Bakterien auf BHI-Agarplatten plattiert. Die Vorbehandlung der HeLa Zellen mit PCA 4248 führte zu einer signifikanten, konzentrationsabhängigen Verringerung der Invasion. Die Werte werden als Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten gezeigt (C: * $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; Kruskal-Wallis Test und Student-Newman-Keuls post-hoc Test).

7 Diskussion

7.1 Die Regulation der Aktivität von Listeriolysin O durch Phosphocholin

Das porenbildende Toxin Listeriolysin O (LLO) wird oftmals als das „Schweizer Taschenmesser“ von *Listeria monocytogenes* bezeichnet (Hamon et al., 2012). Die Verwendung dieser Umschreibung dient meistens dazu die Vielfältigkeit an Funktionen, welches LLO während der Infektion von *L. monocytogenes* einnimmt, zu beschreiben. In der Tat spielt LLO eine zentrale Rolle für eine erfolgreiche Infektion der Wirtszellen durch das Bakterium. Die Natur von LLO als Cholesterin-abhängiges Cytolysin (CDC) ist in der Lyse von Membranen begründet (Dickenson et al., 2013). Diese Funktion ist für eine erfolgreiche Infektion auch unabdingbar, da es erst einen Übertritt des Bakteriums aus einer feindseligen Umgebung vakuolärer Strukturen in das Cytosol, seiner eigentlichen replikativen Nische, ermöglicht. Dabei aktiviert es jedoch durch eben dieser Natur der Porenbildung und des daraus resultierenden Ionen-Ungleichgewichts (Hamon & Cossart, 2011; Repp et al., 2002) eine Reihe von Signaltransduktionswegen, die auf der einen Seite Schutzmechanismen der Wirtszelle aktivieren, auf der anderen Seite aber auch von Relevanz für eine erfolgreiche Infektion des Bakteriums sind. Das Bakterium muss also immer zwischen Nutzen und Folgen der Aktivität von LLO abwägen und in Abhängigkeit davon, in welchem Kompartiment es sich gerade befindet, die Aktivität des Toxins streng regulieren.

In der hier vorliegenden Arbeit konnten neue, bakterielle Regulationsmechanismen der Aktivität von LLO aufgedeckt werden, welche auf die enzymatische Aktivität der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (PlcB) und der Anlagerung von Heparin an das Toxin beruhen. Dabei konnte gezeigt werden, dass PlcB LLO-induzierte Wirtszellantworten, wie die Translokation von Endoplasmatisches Retikulum (ER)-residenten Chaperonen zur zellulären Oberfläche, den Calcium (Ca^{2+})-Einstrom, mitochondrialer Schaden und die Induktion von apoptotischen Signalwegen, reduzieren kann. Mechanistisch betrachtet, beruht dies auf der Produktion von Phosphocholin (ChoP), welches sich an LLO anlagert und die gebildete Membranpore destabilisiert. Im Gegensatz hierzu führt eine Interaktion von LLO mit Phosphatidylcholin (PC) und Heparin zu einer starken Steigerung der hämolytischen Eigenschaft. Der genaue Wirkmechanismus konnte jedoch nicht im Detail aufgeklärt werden.

Diese neu gewonnen Erkenntnisse sind dabei außerordentlich interessant, weil gezeigt werden konnte, dass die Aktivität eines Virulenzfaktors (PlcB) die Aktivität eines weiteren (LLO) beeinflussen kann und ein solcher Mechanismus für *L. monocytogenes* in der Regulation von LLO noch nicht beschrieben wurde. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass LLO aktiv durch Anlagerung körpereigener Moleküle in seiner Aktivität beeinflusst werden

kann. Diese Erkenntnis verdeutlicht, dass LLO nicht isoliert als sekretierter Virulenzfaktor betrachtet werden darf, sondern immer im Kontext mit dem umgebenden Milieu betrachtet werden muss.

7.1.1 Funktionsweise der Listeriolysin O Regulation durch die enzymatische Aktivität der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C

Während der Infektion von *Listeria monocytogenes* ist Listeriolysin O (LLO) nach Sekretion immer umgeben von wirtseigenen Molekülen. Die Möglichkeit einer direkten Interaktion besteht dabei in der Regel am LLO-Oberflächen-Interface. Dabei ist eine Interaktion sowohl zwischen LLO und Membranen als auch zwischen LLO und Molekülen der extrazellulären Matrix denkbar. Ein besonderes Augenmerk lag dabei in der Vergangenheit stets auf die Interaktion von LLO mit Wirtszellmembranen. Dies liegt in der Natur des Toxins begründet. Als porenbildendes und Cholesterin-abhängiges Cytolysin (CDC) bindet LLO nämlich an solchen, oligomerisiert und inseriert in diesen. Dabei findet eine direkt Interaktion zwischen LLO und Cholesterin statt. Die Bindung erfolgt dabei über ein Cholesterin Erkennungs- und Bindemotiv bestehend aus drei Threonin/Leucin-Paaren, welche Schleifenstrukturen ausbilden, sowie dem unter CDCs stark konservierten Undecapeptid (ECTGLAWEWWR) (Dowd & Tweten, 2012). Aufgrund der prominenten Rolle von Cholesterin für die Bindung der CDC-Toxinfamilie an Membranen von Wirtszellen wurde lange Zeit angenommen, dass es als einziger Rezeptor für CDCs fungiert. Diese Annahme wurde dadurch weiter bestärkt, weil freies Cholesterin in der Lage ist die Oligomerisierung von LLO zu inhibieren (Jacobs et al., 1998). In den letzten Jahren jedoch wurde aufgrund von neueren Studien das Paradigma, dass Cholesterin für eine Membranbindung zwingend notwendig ist, in Frage gestellt. So erkennt und bindet beispielsweise das CDC Intermedilysin (ILY) von *Streptococcus intermedius* zusätzlich humanes CD59 (Giddings et al., 2004). Die Bindung erfolgt dabei über eine Interaktion der Domäne D4 von ILY und der Aminosäuren-Reste 42-58 der α -helicalen Region von CD59. Dennoch wird Cholesterin für eine hämolytische Aktivität weiterhin benötigt, da nach Cholesterin-Depletion eine Insertion des Toxins in die Membran nicht mehr möglich ist. Die Bindung an CD59 wird nach Depletion jedoch nicht beeinträchtigt (Giddings et al., 2003). Ähnlich könnte es sich demnach auch für weitere Komponenten der Membran verhalten. Biologische Membranen setzen sich aus einer Lipiddoppelschicht zusammen, bestehend aus einer Vielzahl an unterschiedlichen Phospho- und Sphingolipiden und darin eingelagerten membranständigen Proteinen. Dabei zeigen biologische Membranen keine symmetrische Verteilung der einzelnen Membrankomponenten. Vielmehr findet eine asymmetrische Verteilung der Lipide und Proteine statt, sodass Membranen eine klare Polarität aufweisen. So sind auf der Membraninnenseite v.a. die Phospholipide

Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS) und Phosphatidylethanolamin (PE) anzutreffen, während sich die Membranaußenseite v.a. aus Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) zusammensetzt (Devaux & Morris, 2004). So konnte sowohl für das α -Hämolysin als auch für Leukozidin F (LukF) von *Staphylococcus aureus*, welche beide zur Familie der β -porenbildenden Toxine (β -PFT) gehören, jedoch nicht zu den CDC-Toxinen, gezeigt werden, dass die äußere *rim*-Region der ausgebildeten Poren mit polaren Kopfgruppen von Membranen, insbesondere mit Phosphocholin (ChoP), interagieren und binden kann (Olson et al., 1999; Song et al., 1996). Ein ähnliches Prinzip könnte auch für CDC-Toxine gelten. In der Tat konnte im Rahmen dieser Arbeit eine direkte Interaktion zwischen LLO und PC nachgewiesen werden (Abbildung 34 A). Diese Bindung beruht wahrscheinlich auf einer direkten Interaktion der Domäne D4 mit PC (Abbildung 34 B). Dies ist nicht weiter verwunderlich, da die erste Kontaktaufnahme des Toxins mit Membranen über zwei unterschiedliche strukturelle Elemente innerhalb der Domäne D4 stattfindet. Hierzu zählen zum einen das Tryptophan-reiche Undecapeptid und zum anderen die Schleifenstrukturen L1-3, die auf der entgegengesetzten Seite der Domäne D4 liegen. Die Schleifenstruktur L1 bildet dabei mit seinem Threonin/Leucin-Paar das wichtigste Cholesterin-Bindemotiv (Farrand et al., 2010). Die Domäne D4 durchzieht dabei die Membran nicht vollständig, sondern tritt nur mit der Spitze des β -Sandwiches mit dem nicht-polaren Teil der Membran in Kontakt (Ramachandran et al., 2002). Diese D4-Cholesterin-Interaktion ist dabei nur von transienter Natur und Vorinkubation des Toxins mit Cholesterin führt zwar zu einer Inhibition der Oligomerisierung, jedoch nicht zu einer Inhibition der Membranbindung (Jacobs et al., 1998). Dies lässt den Schluss zu, dass eine weitere LLO-Membran-Wechselwirkung stattfinden muss.

In der Tat konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch die Zugabe von freiem ChoP, welches die Kopfgruppe von PC bildet, die hämolytische Aktivität von CDC-Toxinen inhibiert werden kann (Abbildung 28 A). Bestärkt wird diese Hypothese durch direkte Interaktionsmessungen mittels SPR-Spektroskopie (Abbildung 32 B). Dabei scheint nicht die Bindung von LLO an die Membran beeinträchtigt zu sein, sondern die Stabilität des Toxins innerhalb der Membran, da LLO leichter dissoziiert (Abbildung 28 A). Der genaue Bindungsmechanismus konnte jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden. Interessanterweise führt in diesem Zusammenhang die Bindung von freiem PC an LLO zu einer Verstärkung der hämolytischen Aktivität (Abbildung 33). Wahrscheinlich führt die Bindung von freiem PC an LLO dazu, dass das Toxin leichter in die Membran verankert wird. Obwohl der genaue Bindungsmechanismus von ChoP an LLO nicht eindeutig geklärt werden konnte, können anhand der Struktur von LLO Spekulationen angestellt werden. Da ChoP die Membranbindung und Porenbildung von LLO zu beeinflussen scheint, kommen zwei unterschiedliche Domänen für eine Interaktion in Frage: ChoP könnte zum einen an die

Domäne D4, welche für einen ersten Kontakt von LLO mit biologischen Cholesterin-haltigen Membranen verantwortlich ist, binden oder zum anderen mit der Domäne D3 interagieren, welche eine zentrale Rolle während der Porenbildung einnimmt (Köster et al., 2014). Eine ähnliche Frage der Bindung von ChoP an β -PFTs wurde bereits für α -Hämolyisin von *S. aureus* gestellt. Auch hier konnte eine Bindung von millimolaren Konzentrationen von ChoP an das Toxin beobachtet werden (Valeva et al., 2006). Die Autoren dieser Studie erklärten sich die hohen Konzentrationen an ChoP damit, dass die Affinität von α -Hämolyisin zu ChoP sehr gering ist. Dennoch wurde für α -Hämolyisin gezeigt, dass ChoP-haltige Phospholipide, wie beispielsweise PC und SM, eine zentrale Rolle in der Bindung des Toxins an die zelluläre Membran spielen. Jedes ChoP-haltige Phospholipid bildet für sich gesehen eine Bindungsstelle für monomeres α -Toxin mit einer nur sehr geringen Affinität. Erst durch das Bündeln von einer großen Zahl an ChoP-haltigen Phospholipiden in Cholesterin-haltigen Mikrodomänen bildet sich eine Bindungsstelle mit einer hohen Affinität aus (Valeva et al., 2006). Die Autoren dieser Studie vermuten, dass die Bindungsstelle innerhalb der *rim*-Region liegt (Olson et al., 1999). α -Hämolyisin gehört ebenso wie LLO zu den β -PFTs, jedoch nicht zur Familie der CDCs. Ein Vergleich zwischen diesen beiden Toxinen ist deshalb nur bedingt möglich. Ebenso ist bekannt, dass Actinoporine, welche zur Familie der α -PFTs gehören und von Seeanemonen produziert werden, ebenfalls hohe Affinitäten zu ChoP-haltigen Lipiden, wie beispielsweise PC oder SM haben (Soto et al., 2017). Ein ähnliches Bindungsprinzip könnte auch für LLO gelten.

Die Vorinkubation von LLO mit millimolaren Konzentrationen an ChoP führt zu einer Beeinträchtigung der Toxin-Aktivität (Abbildung 28). Ähnliche Beobachtungen wurden auch für das β -PFT Aerolysin des Gram-negativen Bakteriums *Aeromonas hydrophila* gemacht. Im Falle von Aerolysin konnte nämlich gezeigt werden, dass das Toxin an Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-verankerte Proteine in Cholesterin-Glykolipid Mikrodomänen bindet und damit die lokale Toxin-Konzentration an der Membran erhöht wird (Abrami et al., 1998). Ähnlich könnte es sich auch für LLO verhalten. Die Ansammlung einer hohen Menge an ChoP könnte in seiner Gesamtheit eine Bindungsstelle für LLO darstellen.

Für die Insertion von CDC-Toxinen in die Membran spielen intermolekulare π - π -Wechselwirkungen eine entscheidende Rolle (Burns et al., 2019; Wade et al., 2015). Hierbei handelt es sich um nicht-kovalente Interaktionen zwischen den delokalisierten Elektronen aromatischer Ringe. Gleichzeitig ist bekannt, dass Kationen- π -Interaktionen zwischen PC und Proteinen eine Möglichkeit der Protein-Membran-Interaktion darstellen (Cheng et al., 2013). Es ist deshalb denkbar, dass eben diese intermolekularen Wechselwirkungen, die von großer Bedeutung für die Toxin-Insertion sind, auch eine Bedeutung für eine transiente Bindung des LLOs an die Membran haben. Dies hätte direkte Konsequenzen für die heutige Sichtweise auf die Familie der Cholesterin-abhängigen Cytolysine, da damit die Frage

aufgeworfen werden würde, ob Cholesterin tatsächlich alleine für die Bindung der CDCs an die Membran verantwortlich ist. Begründet wird dies damit, dass bei Abwesenheit von Cholesterin keine Bindung von CDCs an Membranen feststellbar ist (Bavdek et al., 2007). Ebenso führt eine Vorinkubation von LLO mit Cholesterin zu einer Inhibition der Porenbildung, jedoch nicht der Membranbindung (Jacobs et al., 1998). Letzteres spräche aber dafür, dass Cholesterin nicht alleine für die Bindung des Toxins an die Membran verantwortlich sein kann. Neuere Studien legen ebenfalls die Vermutung nahe, dass Cholesterin nicht alleine für die Bindung verantwortlich sein kann, da LLO auch an Liposomen, welche aus Lipiden von Archaea zusammengesetzt sind, in Abwesenheit von Cholesterin binden kann (Rezelj et al., 2018). Während in Eukaryoten und Prokaryoten für die Synthese von Phospholipiden eine Glycerin-3-Phosphat Stereoisometrie verwendet wird, werden von Archaea Glycerin-1-Phosphat Stereoisometrien verwendet. Außerdem werden bei Archaea keine Fettsäuren mit dem Glycerin-Molekül verestert, sondern es werden Isoprenoid-Seitenketten über Ether-Verbindungen an das Glycerin-Molekül gebunden (Rezelj et al., 2018). Die Autoren dieser Studie schlussfolgerten, dass LLO an Kohlenhydrat-Kopfgruppen der archaealen Lipide binden muss, da die verwendeten archaealen Lipide Inositol als Kopfgruppe tragen.

Welche Aminosäuren-Reste des Toxins für eine LLO-ChoP-Interaktion von Bedeutung sind, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Eine mögliche Bindungsstelle konnte jedoch auf die Domäne D4 des Toxins eingegrenzt werden, da eine Interaktion zwischen ChoP (in Form von PC) und LLO nachgewiesen werden konnte (Abbildung 34 B). Weitere Studien konnten außerdem ausschließen, dass die Bindung von ChoP an D4 nicht auf eine direkte Interaktion zwischen ChoP und dem Cystein-Rest an Position 484 von LLO zurückzuführen ist. Die Verwendung einer LLO-Variante, welche eine Substitution von Cystein zu Serin trägt (C484S) wies nämlich ebenfalls in Anwesenheit von ChoP eine starke Inhibition der hämolytischen Aktivität auf (Abbildung 31). Die Position 484 innerhalb von LLO spielt eine wichtige Rolle für die Aktivität des Toxins, da dort der Redox-Zustand des Toxins bestimmt wird. Vorausgegangene Studien haben nämlich gezeigt, dass die Aktivität des Toxins durch Reduktion des Cysteins gesteigert und durch Oxidation reduziert werden kann (Portman et al., 2017a; Singh et al., 2008). Hieraus ist zu schließen, dass weder die Bindung von ChoP an LLO noch seine inhibitorische Wirkung eine Folge einer Veränderung des Redox-Zustandes des Toxins sind. Demensprechend handelt es sich hierbei um einen noch nicht beschriebenen Regulationsmechanismus der Aktivität von LLO.

7.1.2 Modulation der hämolytischen Aktivität von Listeriolysin O durch Phosphocholin

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Phosphocholin (ChoP) inhibitorisch auf die hämolytische Aktivität von LLO wirkt (Abbildung 28 A). Mechanistisch betrachtet beruht dieser Wirkmechanismus wahrscheinlich auf die Destabilisierung der LLO-Pore durch eine direkte LLO-ChoP-Interaktion (Abbildung 32 A).

Als wichtigster Virulenzfaktor von *Listeria monocytogenes* nimmt LLO eine zentrale Rolle in der Pathogenität des intrazellulären Bakteriums ein. Eine dauerhafte Inhibition von LLO hätte dementsprechend gravierende Konsequenzen für die Pathogenität des Bakteriums, da die Aktivität von LLO für die Freisetzung aus intrazellulären Kompartimenten und die Aktivierung von zahlreichen Signaltransduktionswegen verantwortlich ist (Osborne & Brumell, 2017). Dennoch ist die Aktivität von LLO ein zweiseitiges Schwert, da ein ungebremstes Wirken zu irreparablen Schäden an der Wirtszelle führen würde. Die Aktivität von LLO muss also zeitlich und örtlich flexibel reguliert werden und in Abhängigkeit zum Infektionszyklus des Bakteriums stehen.

Ein solcher flexibler Regulationsmechanismus wäre durch die endogene ChoP-Konzentration gegeben, da es in der Wirtszelle nicht gleichmäßig verteilt vorliegt. Die Verteilung von ChoP als Teil von Membranen in Form von Phosphatidylcholin (PC) folgt nämlich einem von innen nach außen gerichteten Gradienten mit höchster PC-Konzentration im Endoplasmatischen Retikulum (ER), moderaten Konzentrationen im Golgi Apparat und niedriger Konzentration innerhalb der Plasmamembran. Anders herum verhält es sich hingegen für Cholesterin. Dieses ist innerhalb der Plasmamembran am höchsten und im ER am niedrigsten konzentriert (Warschawski et al., 2011) (Abbildung 55). *L. monocytogenes* könnte sich diesen natürlichen Gradienten in der Membranzusammensetzung zunutze machen während es sich seinen Weg durch die Wirtszelle bahnt. Damit jedoch ChoP seine inhibitorische Eigenschaft entfalten kann, muss es von PC aktiv abgespalten werden. Für diese Abspaltung bringt *L. monocytogenes* sein eigenes Enzym in Form der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (PlcB) mit, welches vor fast 30 Jahren als ein Lecithin-hydrolysierendes Enzym beschrieben wurde und in erster Linie eine wichtige Funktion für die Freisetzung aus sekundären Vakuolen in der Dissemination des Bakteriums spielt (Vázquez-Boland et al., 1992).

Sowohl LLO als auch PlcB sind auf der *Listeria Pathogenicity Island-1* (LPI-1) kodiert und ihre Expression wird durch das Master-Regulatorprotein PrfA zeitlich reguliert (Vázquez-Boland et al., 2001). So werden zu Beginn der Infektion große Mengen an LLO exprimiert während PlcB erst im späteren Verlauf der Infektion graduell exprimiert wird. Dies hängt damit zusammen, dass der LLO-Promotor sofort aktiviert wird, während der ActA-Promotor, welcher ebenfalls für die Regulation von PlcB verantwortlich ist, erst zu einem späteren

Zeitpunkt (Cytosol) aktiv ist (Moors et al., 1999; Shetron-Rama et al., 2002). Auf diese Weise sekretiert *L. monocytogenes* zunächst große Mengen an LLO und erst im späteren Verlauf der Infektion große Mengen an PlcB (Abbildung 55). Chatterjee und Kollegen konnten dies anhand von Transkriptom-Analysen bestätigen (Chatterjee et al., 2006). Aufgrund dieser Regulationsstrategie von LLO und PlcB und der Menge an vorliegendem PC entlang eines Membrangradienten ergeben sich für das Bakterium, je nach Kompartiment indem es sich während seines Infektionszyklus aufhält, unterschiedliche Mengen an verfügbarem ChoP. Vakuoläre Strukturen enthalten beispielsweise aufgrund ihres Plasmamembran Ursprunges geringe Mengen an PC. Dieses geringe Angebot an PC kann dementsprechend nur zu geringen Mengen an ChoP hydrolysiert werden. Hinzu kommt, dass PlcB zu diesem Zeitpunkt weniger stark exprimiert ist. Auf diese Weise schafft *L. monocytogenes* im vakuolärem Kompartiment eine Umgebung, in der LLO seine membranschädigende Funktion ausüben kann und dem Bakterium hierdurch die Freisetzung in das Cytosol der Wirtszelle ermöglicht wird. Anders verhält es sich dagegen unter cytosolischen Bedingungen. Hier ist die Expression von PlcB im Cytosol deutlich erhöht, sodass erhöhte Mengen an freiem ChoP zur Verfügung stehen. Hierdurch kann LLO in seiner Aktivität im Cytosol der Wirtszelle ausgebremst werden, sodass mögliche cytotoxische Nebeneffekte negiert werden können. Durch die koordinierte Expression seiner Virulenzfaktoren und des natürlichen Gradienten an PC innerhalb der Wirtszelle hat *L. monocytogenes* also eine Strategie entwickelt die Aktivität von LLO an das jeweilige Kompartiment, indem es sich gerade befindet, anzupassen.

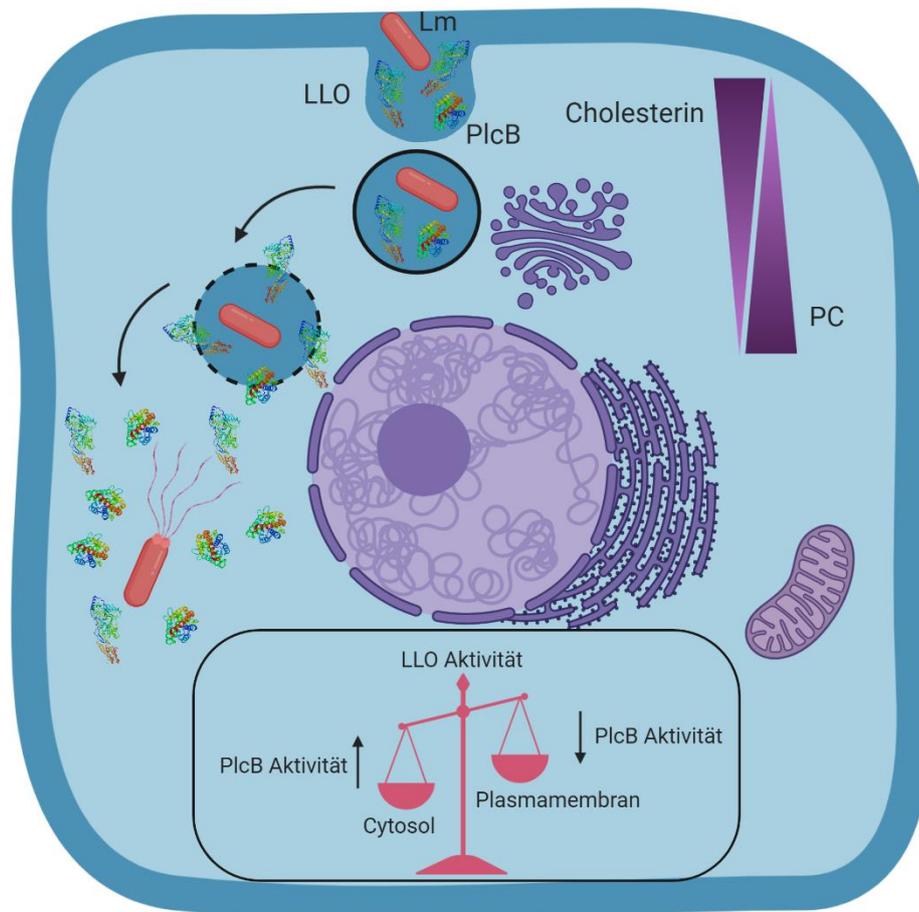


Abbildung 55 Veränderung der Expression von Listeriolysin O und der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle. Die Aktivität von LLO steht in Abhängigkeit zu der verfügbaren Menge an freiem Phosphocholin (ChoP). PlcB kann durch Hydrolyse von Phosphatidylcholin (PC) die Menge an verfügbarem ChoP aufgrund seiner Regulation durch PrfA und seines ActA-Promotors kompartimentspezifisch regulieren. Hierdurch ergeben sich Kompartimente mit hoher LLO-Aktivität (Vakuole) und Kompartimente mit niedriger LLO Aktivität (Cytosol).

7.1.3 Regulation von Listeriolysin O-induzierten zellulären Wirtszellantworten durch die enzymatische Aktivität der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C

Die Hauptaufgabe der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (PlcB) besteht darin *Listeria monocytogenes* die Ausbreitung zu benachbarten Zellen zu ermöglichen (*cell-to-cell spread*). Diese Funktion findet in der wissenschaftlichen Gemeinschaft auch eine generelle Akzeptanz, da PlcB Deletionsmutanten von *L. monocytogenes* in ihrer Fähigkeit der Dissemination zu benachbarten Zellen stark eingeschränkt sind (Vázquez-Boland et al., 1992). Anstrengungen zur Aufdeckung weiterer möglicher Funktionen des Proteins für die Pathogenität von *L. monocytogenes* wurden kaum vorangetrieben, da LLO, als wichtigstes

Virulenzprotein, die Forschung anführte. Ein Enzym jedoch, welches in der Lage ist Komponenten von biologischen Membranen zu hydrolysieren, könnte auch in Wechselwirkung mit LLO treten, da beide Proteine an biologischen Membranen ihre Aktivitäten entfalten. In einer solchen Situation wären zwei unterschiedliche Wechselwirkungen denkbar: Auf der einen Seite können sich LLO und PlcB in ihrer Wirkung verstärken und additiv auf die Lyse zellulärer Membranen wirken. Auf der anderen Seite können sich beide Proteine aber in ihrer Wirkung behindern, da beispielsweise PlcB durch die Hydrolyse von Membrankomponenten die Stabilität der LLO-Pore innerhalb der Membran vermindern könnte. Hierbei lag der Fokus in der Vergangenheit hauptsächlich auf Seiten der additiven Effekte beider Proteine. So sind sowohl PlcB als auch LLO an der Lyse vakuolärer Strukturen beteiligt (Vázquez-Boland et al., 2001). Interessanterweise übernimmt PlcB nicht nur eine unterstützende Funktion während der Lyse zellulärer Membranen, sondern ist in manchen Zelllinien sogar ausreichend für die vakuoläre Freisetzung des Bakteriums in Abwesenheit von LLO (Marquis et al., 1995).

Neuere Studien legen aber auch die Vermutung nahe, dass sich beide Proteine auch in ihren Funktionen gegenseitig behindern können. Damit käme es zu einer Regulation auf Ebene der Virulenzfaktoren. *L. monocytogenes* Mutanten beispielsweise, die PlcB konstitutiv produzieren, sind hundertfach *in vivo* in Mausmodellen attenuiert, induzieren eine verringerte mitochondriale Fragmentierung und werden leichter durch neutrophile Granulozyten eliminiert (Blank et al., 2014). Sowohl die Aktivierung neutrophiler Granulozyten als auch die Induktion mitochondrialer Fragmentierung sind LLO induzierte Wirtszellantworten auf die Infektion (Sibelius et al., 1999b; Stavru et al., 2011). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Aktivität von PlcB LLO reguliert. Ein weiteres Indiz hierfür ist, dass die LLO-abhängige Ausbildung von Phosphatidylserin-positiven Strukturen während der Efferozytose des Bakteriums u.a. durch PlcB inhibiert wird (Czuczman et al., 2014). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigen die inhibitorische Wirkung von PlcB auf LLO und schlagen ein Modell vor wie eine solche Regulation mechanistisch möglich wäre (siehe Kapitel 7.1.1).

LLO ist sowohl in seiner Struktur als auch in seiner Funktion ein komplexes Molekül. Als Cholesterin-abhängiges Cytolysin (CDC) führt es zu einer Permeabilisierung von Cholesterin-haltigen Membranen und einer hieraus resultierenden Veränderung der Ionen-Homöostase. Dies hat wiederum Konsequenzen für zelluläre Vorgänge. Zu diesen Veränderungen zählen die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen, wie beispielsweise ERK-1, ERK-2, p38, c-Jun und Raf-MEK-MAP-Kinase Signalwege (Osborne & Brumell, 2017). Daneben induziert LLO auch eine Veränderung der Organellen-Homöostase. So führt die Aktivität von LLO beispielsweise zu einer transienten Fragmentierung von Mitochondrien und zu einer Induktion von Endoplasmatischem Retikulum Stress (Pillich et al., 2012; Stavru et al., 2011). Unkontrolliertes Wirken von LLO

und hieraus resultierende starke Veränderungen der zellulären Homöostase haben weitreichende negative Folgen sowohl für die Wirtszelle als auch für *L. monocytogenes*, da die Sekretion von LLO auch zur Induktion von Autophagie, Inflammasom-Bildung und letztendlich Apoptose führt (Birmingham et al., 2007; Eitel et al., 2011; Meixenberger et al., 2010; Meyer-Morse et al., 2010; Rathinam et al., 2010; Rogers et al., 1996). *L. monocytogenes* muss deshalb Strategien entwickelt haben, die es dem Bakterium erlauben die Aktivität von LLO zu kanalisieren und dabei Kollateralschäden möglichst zu minimieren. Die hier vorliegende Arbeit schlägt eine solche neue Strategie vor. Dabei wird angenommen, dass durch die enzymatische Aktivität von PlcB Phosphocholin (ChoP) durch Hydrolyse von Membranen produziert wird. Dieses bindet wahrscheinlich an die Domäne D4 von LLO und induziert dadurch eine Destabilisierung der LLO-Pore, sodass das Toxin von der Membran dissoziiert. Die Folge ist eine Reduktion der LLO Aktivität, welche sich in einer Inhibition der hämolytischen Aktivität des Toxins, der Reduktion des Calcium (Ca^{2+})-Einwärtsstroms sowie der Inhibition von mitochondrialen Schaden und der damit verbundenen Reduktion apoptotischer Vorgänge manifestiert (Abbildung 56).

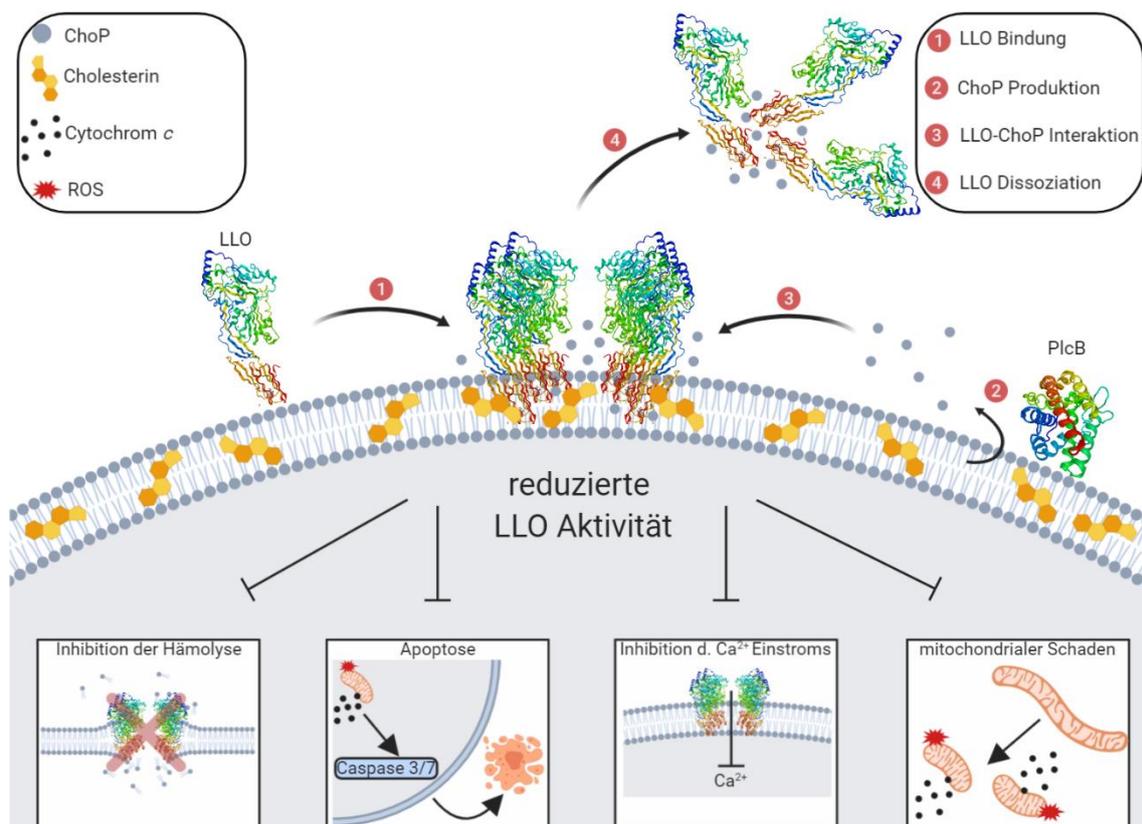


Abbildung 56 Modell der Phosphocholin-abhängigen Repression von Listeriolysin O-induzierten Wirtszellantworten. *L. monocytogenes* sekretiert LLO, welches an Cholesterin-reiche Plasmamembranen bindet. Diese Bindung führt zur Induktion von mitochondrialem Schaden. Induktion eines Ca^{2+} -Einwärtsstroms, Zerstörung der Wirts-Plasmamembran durch die hämolytische

Aktivität des Toxins und letzten endlich zur Induktion von apoptotischen Vorgängen. Freies Phosphocholin (ChoP) oder PlcB-produziertes ChoP bindet direkt an die Domäne D4 von LLO und induziert damit eine Dissoziation der LLO-Poren von der Plasmamembran. Hierdurch findet eine Inhibition von LLO-induzierten Wirtszellantworten statt.

Eine Vielzahl an Gram-positiven pathogenen Bakterien wie beispielsweise *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens*, *C. tetani* oder *C. botulinum* exprimieren sowohl ein CDC-Toxin als auch eine Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC) (Fatmawati et al., 2013; Flores-Díaz et al., 2004; Heffernan et al., 2006; Temaru et al., 2005). Demnach könnte es sich hierbei um eine evolutionär konservierte Co-Expression beider Virulenzfaktoren handeln. Ähnlich könnte es sich auch für die Co-Expression von CDC-Toxinen und Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipasen C (PI-PLC) handeln. Damit hätten pathogene Bakterien eine allgemeine Strategie entwickelt die Aktivität ihrer porenbildenden Toxine über einen eigenen Mechanismus zu regulieren. Um dies zu überprüfen wurde eine BLAST-Analyse durchgeführt. Hierfür wurde Listeriolysin O als Grundlage für die Suche nach strukturähnlichen CDC-Toxinen und PlcA bzw. PlcB als Grundlage für die Suche nach strukturähnlichen Phospholipasen verwendet. Die so erhaltenen Daten wurden anschließend nach solchen bakteriellen Gattungen sortiert, welche sowohl ein CDC-Toxin als auch eine PC-PLC bzw. PI-PLC exprimieren. In der Tat konnten eine Vielzahl an unterschiedlichen Bakterien identifiziert werden, die sowohl für ein porenbildendes Toxin als auch für eine Phospholipase C kodieren. Interessanterweise handelt es sich bei denjenigen Bakterien, welche sowohl ein CDC-Toxin als auch eine PC-PLC exprimieren, ausschließlich um Gram-positive Bakterien (Tabelle 13). Die einzige Ausnahme bildet *Labilithrix luteola*. Die BLAST-Analyse ergab hingegen für die Co-Expression von CDC-Toxinen und PI-PLC ein breites Spektrum an Gram-positiven- und negativen Bakterien (Tabelle 13). Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass eine evolutionäre Co-Expression von CDC-Toxin und PC-PLC wahrscheinlich eher innerhalb von Gram-positiven Bakterien vorzufinden ist.

Tabelle 13 Bakterielle Gattungen, welche sowohl ein Cholesterin-abhängiges Cytolysin als auch eine Phosphatidylcholin- bzw. Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C exprimieren (BLAST-Analyse).

Gattung	CDC + PC-PLC	Gattung	CDC + PI-PLC
Bacillus	<i>B. albus</i>	<i>Acetivibrio</i>	<i>A. ethanolgignen</i>
	<i>B. anthracis</i>	<i>Bacillus</i>	<i>B. anthracis str. Ames</i>
	<i>B. anthracis str. Ames</i>	<i>Chryseobacterium</i>	<i>C. angstadtii</i>
	<i>B. anthracis str. Sterne</i>		<i>C. indoltheticum</i>
	<i>B. cereus</i>	<i>Clostridium</i>	<i>C. tagluense</i>
	<i>B. gaemokensis</i>		<i>C. uliginosum</i>
	<i>B. luciferensis</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>F. columnare</i>
	<i>B. luti</i>	<i>Leptospira</i>	<i>L. selangorensis</i>
	<i>B. mobilis</i>	<i>Listeria</i>	<i>L. ivanovii</i>
	<i>B. mycoide</i>		<i>L. monocytogenes</i>
	<i>B. nitratireducens</i>		<i>L. seeligeri</i>
	<i>B. paramycoides</i>	<i>Owenweeksia</i>	<i>O. hongkongensis</i>
	<i>B. proteolyticus</i>	<i>Paenibacillus</i>	<i>P. tianmuensis</i>
	<i>B. pseudomycoides</i>	<i>Prevotella</i>	<i>P. ihumii</i>
	<i>B. thuringiensis</i>	<i>Stigmatella</i>	<i>S. erecta</i>
	<i>B. toyonensis</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>S. roseochromogenus</i>
<i>B. wiedmannii</i>			
Clostridium	<i>C. argentinens</i>		
	<i>C. botulinum</i>		
	<i>C. culturomicum</i>		
	<i>C. histolyticum</i>		
	<i>C. hydrogeniformans</i>		
	<i>C. lundense</i>		
	<i>C. massiliodiemoense</i>		
	<i>C. novyi</i>		
	<i>C. perfringens</i>		
	<i>C. tepidiprofundii</i>		
	<i>C. tetani</i>		
<i>C. uliginosum</i>			
<i>Labilithrix</i>	<i>L. luteola</i>		
<i>Listeria</i>	<i>L. ivanovii</i>		
	<i>L. monocytogenes</i>		
	<i>L. seeligeri</i>		
<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i>		
<i>Romboutsia</i>	<i>R. lituseburensis</i>		

7.1.3.1 Regulation des mitochondrialen Netzwerks und der Induktion von apoptotischen Vorgängen durch die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C

Die Morphologie der Mitochondrien ist sehr dynamisch und befindet sich in einem steten Gleichgewicht zwischen Fusion und Fission. Während eine Fusion zur Aufrechterhaltung mitochondrialer DNA (mtDNA) und Zellatmung eine wichtige Rolle spielt, wird eine Fission der Mitochondrien für die zelluläre Neuverteilung sowohl innerhalb der Zelle als auch

zwischen den Tochterzellen benötigt. Auch können durch Fission beschädigte Mitochondrien abgebaut werden. Pathophysiologische Veränderungen dieses empfindlichen Gleichgewichts können dementsprechend gravierende Folgen für die Vitalität der Zellen haben. So ist eine pathologische Fission der Mitochondrien assoziiert mit zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise Parkinson, Alzheimer oder Chorea Huntington (Sprenger & Langer, 2019). Da *Listeria monocytogenes* in der Lage ist das zentrale Nervensystem, insbesondere das Gehirn durch Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, zu infizieren, wäre es denkbar, dass eine Infektion auch eine solche Erkrankung begünstigt. In der Tat könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen neuronalen Erkrankungen und einer Infektion mit *L. monocytogenes* bestehen. In einer Studie konnte nämlich gezeigt werden, dass die Aktivität von LLO zur Bildung von Proteinaggregaten führt, die in Autophagosom-ähnlichen Strukturen akkumulieren (Viala et al., 2008). *L. monocytogenes* ist zudem nicht das einzige Bakterium, welches eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes begünstigt. So konnte auch für *Legionella pneumophila* gezeigt werden, dass eine Infektion zur Fragmentierung führt. Diese induziert eine Veränderung des zellulären Metabolismus und begünstigt dadurch die bakterielle Replikation (Escoll et al., 2017). Ähnlich verhält es sich auch für *L. monocytogenes*. Hier führt eine mitochondriale Fission zu einer Verlangsamung des zellulären Stoffwechsels. So wird die intrazelluläre ATP-Produktion um 50% gesenkt (Stavru et al., 2011, 2013). Der genaue Mechanismus dieser Interaktion ist jedoch nicht genau geklärt. Es kann jedoch spekuliert werden, dass die LLO-induzierte transiente mitochondriale Fission eine Reprogrammierung des zellulären Stoffwechsels einleitet und damit eine effektive Infektion der Wirtszelle fördert, da zum einen Wirtszellantworten gemildert werden und zum anderen der zelluläre Stoffwechsel an die Bedürfnisse des bakteriellen Metabolismus angepasst wird. So zeigen beispielsweise infizierte murine Knochenmarksmakrophagen eine stark erhöhte Aktivität der Glykolyse und eine gleichzeitige Verlangsamung des TCA-Zyklus (Gillmaier et al., 2012). Dies würde die stark verminderte ATP-Produktion erklären, da das meiste ATP während der oxidativen Phosphorylierung produziert wird. Für diesen Vorgang sind jedoch die gebildeten Reduktionsäquivalente ($\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2) aus dem TCA-Zyklus unabdingbar. Ein Grund für diese bakterielle Umprogrammierung des zellulären Stoffwechsels ist die Präferenz von Glycerin und Glukose-6-phosphat als Kohlenstoffquelle (Eylert et al., 2008). Die Verfügbarkeit beider Quellen hängt dabei von der Glykolyse ab. In diesem Zusammenhang sei auch erwähnt, dass tumorale Zellen ihre Energie anstelle aus der oxidativen Phosphorylierung hauptsächlich durch Glykolyse mit anschließender Ausscheidung von Laktat gewinnen (Warburg Effekt) (Warburg et al., 1927). Da diese Art der Energiegewinnung jedoch sehr ineffizient ist, findet eine erhöhte Aufnahme von Glukose und eine Erhöhung des Glykolyse-Umsatzes statt. Da unter Laborbedingungen grundsätzlich mit

immortalisierten oder Tumor-abgeleiteten Zelllinien gearbeitet wird, findet *L. monocytogenes* bereits Zellen mit einem erhöhten Glykolyse-Umsatz vor, sodass bereits optimale Bedingungen für eine Infektion vorherrschen (Gillmaier et al., 2012) und deshalb mögliche Mitochondrien-induzierte Veränderungen des zellulären Metabolismus durch das Bakterium vielleicht nicht beobachtet werden. Dennoch konnte in vorausgegangenen Studien festgestellt werden, dass eine Infektion in Zellen mit bereits gespaltenen Mitochondrien stark eingeschränkt ist. Im Gegensatz hierzu wird die Infektion durch bereits hyper-fusionierte Mitochondrien verstärkt (Stavru et al., 2011). Was zunächst paradox erscheint lässt sich auf den Zeitpunkt von Fusion und Fission zurückführen. Für eine Verstärkung der Infektion und einer erfolgreichen Umprogrammierung der Wirtszelle durch *L. monocytogenes* wird eine aktive mitochondriale Fission durch LLO benötigt (Stavru et al., 2011). Liegen bereits fragmentierte Mitochondrien vor, ist dieser Effekt nicht mehr zu beobachten. Das Bakterium muss also für die Fission und Fusion der Mitochondrien ein geeignetes Gleichgewicht in Abhängigkeit zum Zeitpunkt der Infektion finden. Durch die Sekretion der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (PlcB) und seiner inhibitorischen Wirkung auf LLO könnte ein solches Gleichgewicht erreicht werden. LLO wird zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion aufgrund des LLO-Promotors in großen Mengen produziert und sekretiert. Dies führt zu einer aktiven Fission der Mitochondrien und einer damit verbundenen metabolischen Umprogrammierung der Wirtszelle zum Vorteil des Bakteriums. Zu einer späteren Phase der Infektion findet hingegen eine vermehrte Produktion und Sekretion von PlcB statt. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich das Bakterium im Cytosol und hat sich intrazellulär etabliert und repliziert. Durch die inhibitorische Wirkung von PlcB auf LLO wird das Toxin in seiner fragmentierenden Aktivität eingeschränkt. Die Folge wäre, dass die Mitochondrien erneut fusionieren. Dies würde die nur transiente Fragmentierung der Mitochondrien erklären. Durch die erneute Fusion der Mitochondrien würde sich der umprogrammierte zelluläre Stoffwechsel wahrscheinlich normalisieren. Dies hätte wahrscheinlich eine verminderte Bereitstellung von Kohlenstoffquellen und dadurch eine verschlechterte Replikationsrate für das Bakterium zur Folge. Hierdurch würde eine „Überladung“ der Wirtszelle mit *L. monocytogenes* verhindert werden.

Die mitochondriale Fission ist aber auch ein frühes Ereignis während der Induktion der intrinsischen Apoptose, da sie zur Ausschüttung von Cytochrom *c* und zur Aktivierung von Caspasen führt (Suen et al., 2008). Es ist auch deshalb im eigenen Interesse von *L. monocytogenes* eine unkontrollierte, mitochondriale Fragmentierung zu verhindern, da sonst eine Zerstörung der replikativen Nische die Folge wäre.

Bei der Apoptose handelt es sich um eine Form des programmierten Zelltodes, welche durch ein Schrumpfen der Zelle, der Kondensation von Chromatin und der Ausbildung von Membranbläschen charakterisiert ist (Kerr et al., 1972). Dabei wird zwischen einer

intrinsischen und extrinsischen Aktivierung unterschieden. Die extrinsische Aktivierung erfolgt dabei durch die Erkennung spezifischer Liganden, wie beispielsweise den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α). Dieser bindet an den sog. *Death Receptors* und induziert deren Oligomerisierung und einer hieraus resultierenden Aktivierung der Caspase-8 (Thorburn, 2004). Die intrinsische Aktivierung erfolgt hingegen durch intrazelluläre pathologische Veränderungen, wie beispielsweise der Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) oder DNA-Schaden. Dies führt wiederum zur Permeabilisierung der mitochondrialen Membran, dem Austritt von Cytochrom *c* und der Aktivierung der Caspase-9 (Riedl & Salvesen, 2007). Beide Signalwege münden letztendlich in die Aktivierung der Caspasen-3 und -7, die ihrerseits zur Reorganisation des Cytoskeletts, dem Abbau der DNA und der Ausbildung sog. *apoptotic bodies* führen (Elmore, 2007). Durch die Sekretion und die Wirkung von LLO auf das mitochondriale Netzwerk induziert auch *L. monocytogenes* Apoptose über den intrinsischen Signalweg (McDougal & Sauer, 2018). Es ist deshalb im eigenen Interesse des Bakteriums die Vitalität der Wirtszelle durch das Verhindern einer Induktion von programmierten und nicht programmierten Zelltod-Signaltransduktionswegen zu gewährleisten.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass *L. monocytogenes* in Abhängigkeit von der Expression von LLO die Ausschüttung von Cytochrom *c*, die Aktivierung der Caspasen-3 und -7, sowie die Exposition von Phosphatidylserin auf die zelluläre Oberfläche induziert (Abbildung 25 und Abbildung 26). Durch die Wirkung von PlcB konnten diese apoptotischen Vorgänge vermindert werden. Diese Funktion von PlcB liegt wahrscheinlich darin begründet, dass es die LLO-induzierte Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks inhibiert. Indem die Fission der Mitochondrien unterbunden werden würde, fände eine geringere Produktion von ROS und Ausschüttung von Cytochrom *c* statt. Bei beiden handelt es sich um mögliche Apoptose Induktoren.

7.1.3.2 Veränderung der Kinetik des Listeriolysin O-induzierten Calcium-Einstroms

Zentrales Element für die Aktivität von Listeriolysin O ist die Veränderung der Ionen-Homöostase der Wirtszelle. Durch die Insertion des Toxins in die Membran der Wirtszelle entsteht nämlich eine Calcium (Ca^{2+})- und Kalium (K^+)-permeable Pore. Die hieraus resultierende Ionen-Imbalance hat dabei selbst eine Reihe von Konsequenzen für die Wirtszelle, aber auch für *Listeria monocytogenes*. So werden durch Perturbation der intrazellulären Ionen-Homöostase eine Vielzahl an unterschiedlichen Signaltransduktionswegen aktiviert, welche in erster Linie in der Einleitung einer Stressantwort, der Induktion von Reparaturmechanismen der Membran oder der Etablierung

einer immunologischen Antwort auf die Infektion münden. Gleichzeitig werden diese Veränderungen aber auch von *L. monocytogenes* zum eigenen Vorteil genutzt. So ist beispielsweise *L. monocytogenes*, mit Hilfe des LLO induzierten Ca^{2+} -Einstroms, in der Lage eine Internalisierung des Bakteriums in HepG2 Zellen (humaner Leberkarzinom) zu begünstigen (Shaynoor Dramsi & Cossart, 2003). Ein ähnlicher Internalisierungsmechanismus findet auch in J774 Makrophagen statt. Auch hier induziert der Ca^{2+} -Einwärtsstrom eine Aufnahme der Bakterien und den Ausbruch aus den intrazellulären Vakuolen (Goldfine & Wadsworth, 2002). Mit Hilfe von LLO beeinflusst *L. monocytogenes* aber nicht nur den extrazellulären Einstrom von Ca^{2+} . LLO beeinflusst nämlich auch den Ausstrom von Ca^{2+} aus intrazellulären Lagern, wie beispielsweise dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) (Gekara et al., 2007). Dieser sekundäre Ca^{2+} -Strom spielt, ebenso wie der primäre Ca^{2+} -Strom, eine wichtige Rolle für die Translokation ER-lokalisierter Chaperone zur zellulären Oberfläche, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abbildung 11 und Abbildung 17). Daneben aktiviert LLO in Abhängigkeit des Ca^{2+} -Einstroms eine Vielzahl an Signaltransduktionswegen der Wirtszelle. Hierzu zählen die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1, ERK-2 und p38, sowie von c-Jun (Tang et al., 1996, 1998). Außerdem erfolgt die Aktivierung des Raf-MEK-MAP-Kinase Signaltransduktionsweges ebenfalls über LLO (Weiglein et al., 1997). LLO beeinflusst aber auch die Translokation von NF κ B in den Nucleus, sowie die Sekretion pro-inflammatorischer Cytokine wie Interleukin (IL)-6, IL-8, GM-CSF und IL-1 α (Dewamitta et al., 2010; Kayal et al., 1999; Rose et al., 2001).

Obwohl der Ca^{2+} -Einstrom eine wichtige Rolle für die Pathogenität von *L. monocytogenes* spielt, liegt es dennoch im eigenen Interesse des Bakteriums diesen zu limitieren, da ein unkontrollierter Anstieg intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen unweigerlich zum Zelltod führen würde (Pinton et al., 2008). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PlcB) von *L. monocytogenes* den LLO-induzierten Ca^{2+} -Einstrom regulieren kann. Durch die Aktivität von PlcB ist der Ca^{2+} -Einstrom moderater und zeigt eine deutlich verkürzte Kinetik zum Erreichen des Grundzustandes (Abbildung 21). Mechanistisch betrachtet erfolgt die Regulation wahrscheinlich durch die Produktion von Phosphocholin (ChoP) und dessen Bindung an LLO, da SPR-Spektroskopie-Studien gezeigt haben, dass eine direkte Interaktion zwischen LLO und ChoP zu einer beschleunigten Dissoziation des Toxins von Cholesterin-haltigen Membranen führt (Abbildung 32). Vor allem die kinetische Reduktion der Ca^{2+} -Einstrom durch die Destabilisierung der LLO-Pore kann dem Bakterium einen Vorteil während der Infektion verschaffen, da ein verkürzter Ca^{2+} -Einstrom noch immer zur Aktivierung von Signaltransduktionswegen beitragen kann, jedoch negative Folgen durch eine langandauernde Veränderung der Ionen-Homöostase begrenzt werden könnten. Gleichzeitig reduziert das Bakterium aber auch die Kapazität der Wirtszelle Reparaturmechanismen der

Plasmamembran einzuleiten, da diese Prozesse in Abhängigkeit zu Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase stehen (Brito et al., 2019; Etxaniz et al., 2018). Damit würde jedoch verhindert werden, dass LLO-Poren aus der Plasmamembran entfernt werden könnten. Die Folge wäre, dass die Wirtszelle mit zu vielen Poren konfrontiert werden würde. Dies hätte negative Konsequenzen für das Bakterium, da eine Zerstörung der replikativen Nische wahrscheinlich wäre. Neuere Studien legen jedoch die Vermutung nahe, dass das Entfernen von LLO-Poren aus der Plasmamembran ohnehin nicht durch das Abstoßen beschädigter Membranbestandteile stattfindet (Maurer et al., 2018). Die Folgen der Inhibition des Ca^{2+} -Einstrom durch PlcB auf die Reparatur der Plasmamembran zeigen sich auch im Hinblick auf die Reparatur von Plasmamembran-Läsionen. Hier werden nämlich Annexine an die Membran rekrutiert, welche die Fähigkeit besitzen an Phospholipiden (insbesondere an Phosphatidylserin) zu binden und eine Membranfusion zu fördern (Boye & Nylandsted, 2016; Gerke et al., 2005). Die Translokation zur Läsion erfolgt dabei in Abhängigkeit von der Konzentration an einströmenden Ca^{2+} -Ionen. Durch die Regulation des Ca^{2+} -Einstrom über die enzymatische Aktivität von PlcB fände auch eine verringerte Rekrutierung von Annexinen zur Plasmamembraninnenseite statt und damit auch eine verschlechterte Membranreparatur. Dies konnte in dieser Arbeit indirekt durch Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin auf der äußeren Plasmamembranseite nachgewiesen werden (Abbildung 25 A). Indem also PlcB einen Einfluss auf den LLO-induzierten Ca^{2+} -Einstrom ausübt, beeinflusst es auch indirekt die zelluläre Membranreparaturmaschinerie. In diesem Zusammenhang konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* Stämme, welche weder PlcA noch PlcB exprimieren, erhöhte Phosphatidylserin-positive Membranstrukturen zeigten (Czuczman et al., 2014). Interessanterweise konnten Bakterien innerhalb dieser Strukturen nachgewiesen werden. Die Autoren dieser Studie postulieren, dass es sich dabei um einen *cell-to-cell-spread*-Mechanismus handelt, welcher es den Bakterien ermöglicht innerhalb von Phosphatidylserin-positiven Strukturen benachbarte Zellen zu infizieren. Im Falle der PlcB-abhängigen Regulation des Ca^{2+} -Einstrom würde dies jedoch bedeuten, dass dieser Mechanismus der Dissemination erschwert werden würde. Inwiefern also die Regulation von zellulären Membranreparaturmechanismen durch PlcB für die Pathogenität von *L. monocytogenes* von Bedeutung ist bleibt deshalb schwer fassbar.

7.1.3.3 Die Regulation der Translokation von Endoplasmatischen Retikulum-residenten Chaperonen zur zellulären Oberfläche

Zelluläres Leben basiert auf der Produktion und Interaktion von einer Vielzahl an diversen Makromolekülen, wie Nukleinsäuren, Kohlenhydraten oder Proteinen. Letztere sind dabei die vielseitigsten und strukturell komplexesten Makromoleküle. Dabei werden Proteine als eine

Abfolge von Aminosäuren, die über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, produziert. In einem solchen linearen Zustand (Primärstruktur) sind Proteine aber nicht in Lage mit anderen Makromolekülen zu interagieren oder komplexe katalytische Prozesse durchzuführen. Hierfür wird eine komplexere 3-dimensionale Struktur benötigt. Diese Strukturierung kann entweder spontan erfolgen oder wird von einer Protein-Familie, die als Chaperone bezeichnet wird, vorgenommen (Hartl et al., 2011). Die meisten dieser Chaperone sind dabei am Ort der Proteinsynthese, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER), lokalisiert. Hierzu zählen u.a. die Chaperone Gp96, BiP, Calnexin, Calreticulin und PDI. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Faltung wachsender Polypeptidketten. Gleichzeitig übernehmen sie aber auch Funktionen in der ER-Homöostase, der Sensierung von ER-Stress und der Induktion der ungefalteten Proteinantwort (UPR). In Folge einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* wird genau ein solcher ER-Stress induziert, der zwangsläufig zur Aktivierung solcher ER-residenten Chaperonen führt (Pillich et al., 2012). Dabei induziert die Infektion mit *L. monocytogenes*, in Abhängigkeit von Listeriolysin O (LLO), die Translokation von Chaperonen zur zellulären Oberfläche (Abbildung 11 und Abbildung 17). Aus zellulärer Sicht fungieren solche exponierten Chaperone als Signal dafür, dass beschädigte Zellen durch das Immunsystem eliminiert werden („eat-me signal“). So kann Oberflächen-Gp96 beispielsweise mit CD91, einem Oberflächenrezeptor von Antigen-präsentierenden Zellen, interagieren. Dabei werden exogene Antigene, die von Gp96 gefaltet werden, von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen und mit Hilfe des *major histocompatibility complex I* (MHC-I) erneut an der Oberfläche präsentiert. Hierdurch wird eine Immunantwort ausgelöst (Kreuz-Präsentation) (Binder et al., 2000). Gp96 aktiviert aber auch dendritische Zellen über Toll-like Rezeptor 2/4-Signalwege (Vabulas et al., 2002). Sie können aber auch in das extrazelluläre Milieu abgegeben werden. Eine Entartung dieses Mechanismus ist auch ein Auslöser zahlreicher Krebserkrankungen, wie beispielsweise Brustkrebs oder Krebs im zentralen Nervensystem, sowie rheumatischer Erkrankungen (Wiersma et al., 2015).

L. monocytogenes nutzt diesen natürlichen Translokationsprozess während zellulärer Stresssituationen für die Invasion aus, indem es Oberflächen-Gp96 als Rezeptor für die Invasion in nicht-phagozytierenden Zellen nutzt. Dies geschieht durch die Bindung des Oberflächen-Virulenzfaktors Vip (*virulence protein*) an Gp96 (Cabanès et al., 2005; Martins et al., 2012). Damit gelingt es dem Bakterium zum einen die Zelle und damit seine replikative Nische vor Eliminierung zu schützen und zum anderen die Vip-Gp96-Interaktion als Invasionsmechanismus zu nutzen. Interessanterweise wird dieser Translokationsprozess durch die Aktivität von LLO ausgelöst und zeigt eindrucksvoll wie Wirtszelle und Pathogen gleiche Mechanismen für unterschiedliche Verwendungszwecke nutzen können. Von entscheidender Bedeutung ist dabei der LLO-induzierte Ca^{2+} -Einwärtsstrom, da die Translokation auch in Abwesenheit von LLO, aber durch Zugabe eines Ca^{2+} -Ionophors

induziert werden konnte (Abbildung 15 A). Umgekehrt führte die Verwendung von LLO-Varianten, die keine Pore mehr ausbilden können, zu keiner Translokation (Abbildung 14 A). Dies ist jedoch nicht das einzige Signal, welches den Translokationsprozess auslösen kann. Ebenso induziert eine Behandlung von Zellen mit Wasserstoffperoxid eine Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche (Abbildung 15 B). Dies zeigt, dass nicht LLO *per se* diesen Prozess auslöst, sondern die Induktion von ER-Stress der entscheidende Faktor ist. Durch die Expression und Sekretion von LLO hat *L. monocytogenes* aber eine Stress-Quelle erzeugt, die diesen Prozess in Gang setzen kann. In anderen Studien wurde außerdem gezeigt, dass Oberflächen-Gp96 mit NMHC-IIA (*non-muscle myosin heavy chain IIA*) an der zellulären Oberfläche interagiert. Diese Interaktion schützt vor LLO-induzierten Membranschäden, da Gp96 auch an der Regulation der Bläschenbildung beteiligt ist und damit zelluläre Reparaturmechanismen fördert (Mesquita, Brito, Moya, et al., 2017). In Infektionen mit *E. coli* K12 wird ein ähnlicher Mechanismus ausgelöst. Dort interagiert OmpA (*outer membrane protein A*) des Bakteriums mit Ecgp, einem Gp96 Homolog, während der Infektion von humanen HBMEC Zellen (*human brain micro-vascular endothelial cell*) und induziert dadurch strukturelle Umlagerungen des Cytoskeletts, die eine Aufnahme des Bakteriums in die Wirtszelle ermöglicht (Prasadarao et al., 2003; Reddy et al., 2000).

Da die Induktion der Chaperon-Translokation ein Wirtszellmechanismus der bakteriellen Bekämpfung ist, dieser Prozess jedoch von eben jenen ausgenutzt wird, ist es aus bakterieller Sicht wichtig diesen Translokationsprozess zu regulieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (PlcB) diesen Translokationsprozess inhibieren kann. Hierbei muss *L. monocytogenes* zwischen dem Nutzen der Vip-abhängigen Invasion und den negativen Folgen der Antigenpräsentation abwägen. Die Produktion und Wirkungsweise von ChoP auf LLO könnte als solch ein Mechanismus fungieren. Zu Beginn der Infektion führt die hohe Produktion und Sekretion von LLO zur Induktion von ER-Stress (Pillich et al., 2012) und damit zu einer Induktion der Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche (Mesquita, Brito, Moya, et al., 2017). Auf diese Weise können „Pionier“-Bakterien die Invasion von nachfolgenden Bakterien in nicht-phagozytierenden Zellen begünstigen. Durch die später einsetzende Expression und Sekretion von PlcB wird dieser Translokationsprozess negativ reguliert. Damit könnte das Bakterium die Folgen einer Antigenpräsentation aufgrund einer Gp96-CD91-Interaktion unterbinden und damit eine Immunevasion einleiten. Gleichzeitig würde aber auch der Invasionsprozess über Vip beeinträchtigt werden. Da es hierbei jedoch um einen alternativen Invasionsmechanismus handelt, der nur eine untergeordnete Rolle spielt, ist aus bakterieller Sicht eine Inhibition einer Immunantwort von größerer Bedeutung.

7.2 Die Regulation der Aktivität von Listeriolysin O durch Heparin

7.2.1 Putativer Bindungsmechanismus von Heparin an Listeriolysin O

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Heparin an Listeriolysin O (LLO) binden kann (Abbildung 37). Diese Bindung führt dabei zu einer Steigerung der hämolytischen Aktivität des Toxins. Während einer Infektion von *Listeria monocytogenes* wird LLO aus dem Bakterium sekretiert. Je nach Zeitpunkt und Fortschritt der Infektion ist LLO dabei umgeben von einer Vielzahl an wirtseigenen Molekülen. Zu diesen zählt auch Heparin. Heparin besteht aus hoch-sulfatierten Glykosaminglykanen. Deshalb weist es eine stark negative Ladung auf (Paluck et al., 2016). Hierdurch ist Heparin in der Lage eine Vielzahl an unterschiedlichen Proteinen zu binden, welche als Heparin-Bindeproteine (*heparin binding protein*, hbp) bezeichnet werden. Eine Bindung kann dabei entweder unspezifisch über elektrostatische Interaktionen oder über ein spezifisches Heparin-Bindemotiv erfolgen. Deshalb müssen im Fall einer LLO-Heparin-Interaktion eben diese beiden Bindungstypen näher betrachtet werden. Für ersteres muss hierzu die Oberflächenladung von LLO näher beleuchtet werden. Diese ist nämlich zwischen den einzelnen Domänen nicht einheitlich. So weisen die verschiedenen Domänen von LLO unterschiedliche Oberflächenladungen auf. Während die Domänen D2 und D3 eine negative Netto-Oberflächenladung aufweisen, ist die Oberfläche der Domänen D1 und D4 positiv geladen (Köster et al., 2014). Eine LLO-Heparin-Interaktion über elektrostatische Wechselwirkungen wäre dementsprechend nur zwischen Heparin und der Domäne D1 bzw. D4 möglich. In der Tat kann durch Zuhilfenahme von ClusPro, einem Docking-Server zur Identifizierung von Heparin-Bindungsstandorten auf Proteinen (<https://cluspro.bu.edu/login.php>) (Mottarella et al., 2014), eine putative Interaktion von Heparin mit den Domänen D1 oder D4 *in silico* modelliert werden. Unerwarteterweise zeigten, bei Verwendung der vollständigen LLO-Struktur, alle Modellierungen eine Bindung von Heparin in direkter Nachbarschaft zur Polyprolin Type II-Helix Domäne (PPII Helix) innerhalb der Domäne D1 und demnach auch in räumlicher Nähe zur PEST-ähnlichen Sequenz, welche sich innerhalb dieser Helix befindet (Köster et al., 2014) (Abbildung 57 A). Erst bei Verwendung der Domäne D4-Mutante zur Modellierung einer möglichen Heparin-Bindestelle konnte auch hier eine mögliche Bindung berechnet werden (Abbildung 57 B). Die PEST-ähnliche Sequenz spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der LLO Aktivität während der Infektion von *L. monocytogenes*, da sie an der Kontrolle der LLO Produktion im Cytosol der Wirtszelle beteiligt ist (Schnupf et al., 2006). Dementsprechend führt das Entfernen der PEST-ähnlichen Sequenz zu Stämmen, welche extrem toxisch für die Wirtszelle sind, gleichzeitig aber auch 10.000-fach weniger virulent in einem Mausmodell (Dacatur & Portnoy, 2000). Außerdem führt eine Deletion der PEST-ähnlichen Sequenz zu

einer stark erhöhten hämolytischen Aktivität von LLO, wie in PPII Helix-Deletionsmutanten gezeigt wurde (Köster et al., 2014). Folglich könnte eine Bindung von Heparin in räumlicher Nähe zur PPII Helix zu einer Verdeckung der PEST-ähnlichen Sequenz führen, sodass eine Regulierung des Toxins auf zellulärer Ebene eingeschränkt ist und die in dieser Arbeit aufgezeigten Daten erklären würden. Daneben zeigt die *in silico* Modellierung aber auch eine Bindung an die Domäne D4. Durch eine direkte Bindung von Heparin an diese könnte eine LLO-Membran-Interaktion gefördert werden. Dies wirft aber auch die Frage auf, ob LLO neben einer Cholesterin- und Phosphatidylcholin (PC)-Interaktion ebenfalls mit Glykanen auf der Oberfläche von Zellen interagieren könnte. Dies ist deshalb interessant, weil Heparin in Form des verwandten Heparansulfats Teil der Oberflächenstruktur von Zellen ist. Anders als Heparin ist Heparansulfat jedoch nicht nur auf der Oberfläche von Mastzellen vorzufinden, sondern kann auf fast allen zellulären Oberflächen vorgefunden werden. Dort wirkt es ebenfalls als Antikoagulant. Diese Eigenschaft ist jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als für exogenes Heparin (Onishi et al., 2016). Bezüglich der Erkennung und Bindung von Membranen durch porenbildende Toxine ist dies besonders interessant, da zelluläre Oberflächenglykane auch als Rezeptoren für eine solche Bindung assoziiert werden. So ist beispielsweise bekannt, dass Cholesterin-abhängige Cytolysine (CDC) wie Pneumolysin (PLY) von *Streptococcus pneumoniae*, Streptolysin O (SLO) von *S. suis* und Lectinolysin von *S. mitis* neben Cholesterin auch Oberflächenglykane erkennen und binden (Bouyain & Geisbrecht, 2012; Farrand et al., 2008; Feil et al., 2012; Shewell et al., 2014). Weiterhin finden sich innerhalb der Familie der β -porenbildenden Toxine (β -PFT), jedoch nicht der CDC, Vertreter, welche in der Lage sind Glykane zu binden. So ist beispielsweise bekannt, dass *Vibrio cholerae* Cytolysin (VCC) neben Lipiden auch an Glykanen bindet (De et al., 2015; Levan et al., 2013). Glykan-bindende porenbildende Toxine finden sich aber auch in ganz anderen Toxin-Familien. So erkennt der Translokationsapparat von Cholera toxin, welches zur Familie der Hitze-labilen Enterotoxine zählt, Zucker-Reste des Gangliosids GM1 (Turnbull et al., 2004) und das β -PFT Aerolysin von *Aeromonas hydrophila* wird durch Erkennen von N-Glykanen von membranassoziierten Proteinen sowie von der Glykan-Region von GPI-verankerten Proteinen zur zellulären Membran rekrutiert (Abrami et al., 2000). Trotz der Bekanntheit von Toxin-Glykan-Interaktionen bleibt der genaue Bindungsmechanismus verborgen. Im Fall von PLY konnten jedoch einige Aminosäuren-Reste innerhalb der Domäne D4 identifiziert werden, welche eine zentrale Rolle in der Bindung zu LewisX und Sialyl-LewisX, Glykane des Lewis Antigen Systems, spielen (Shewell et al., 2014). Für eine solche Bindung konnten die Aminosäuren-Reste PLY306, PLY460, PLY433, PLY374 und PLY376 identifiziert werden. In der gleichen Arbeit konnte ebenfalls eine Bindung von SLO an Glykanen nachgewiesen werden. Interessanterweise konnte sogar eine Bindung an N-Acetylglykosamin aufgezeigt werden, welches ebenfalls als

Baustein von Heparin und Heparansulfat vorkommt. Damit wäre es durchaus denkbar, dass LLO ebenfalls in der Lage wäre innerhalb der Domäne D4 Oberflächenglykane zu binden. Indizien hierfür finden sich in einer Studie, bei welcher gezeigt werden konnte, dass LLO in Abwesenheit von Cholesterin auch an Liposomen, welche aus Lipiden von Archaea zusammengesetzt sind, bindet. (Rezelj et al., 2018). Die Autoren dieser Studie schlussfolgerten, dass LLO an Kohlenhydrat-Kopfgruppen der archaealen Lipide binden muss.

Als putative Aminosäuren-Reste, welche von Bedeutung für eine solche Interaktion wären, kämen dabei die Aminosäuren-Reste LLO Q430, LLO W489 und LLO L516 in Frage, da es sich hierbei um die analogen konservierten Aminosäure-Reste handelt, welche für die Bindung von PLY an Glykanen identifiziert wurden (Abbildung 57 D). Dabei ist jedoch auszuschließen, dass eine Heparin/Heparansulfat-LLO-Interaktion über ein Heparin-Bindemotiv erfolgt, da es sich bei den hier aufgezeigten konservierten putativen Aminosäuren-Resten nicht um basische Aminosäuren handelt und solche auch nicht in direkter Nachbarschaft vorhanden sind. Als Konsensus-Sequenz für ein Heparin-Bindemotiv gilt nämlich eine spezifische Aneinanderreihung an hydrophoben und basischen Aminosäuren in einer XBBXBX oder XBBBXXBX Anordnung (X = hydrophobe Aminosäure und B = basische Aminosäure) (Muñoz & Linhardt, 2004). Eine solche ähnliche Anordnung fände sich in LLO zwischen den Aminosäuren 88 und 94 (PRKGYKD) (Abbildung 57 C). Diese liegen jedoch im β -Faltblatt 2 der Domäne D2, welche überwiegend negativ geladen ist. Eine Bindung von Heparin/Heparansulfat wäre also an dieser Stelle unwahrscheinlich und eine solche Bindungsstelle konnte mittels ClusPro nicht identifiziert werden.

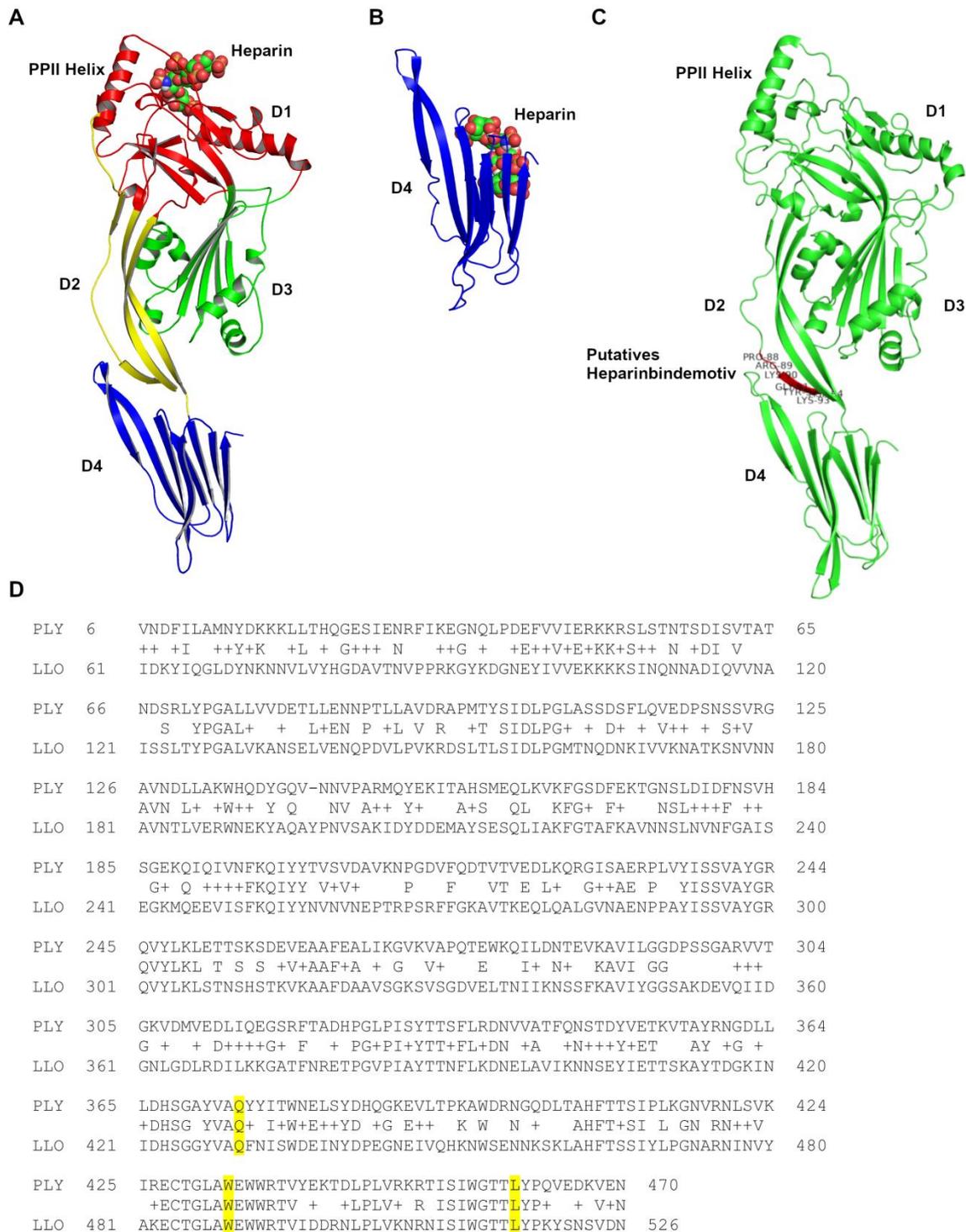


Abbildung 57 Putative Heparinbindestellen anhand von *in silico* Analysen mittels ClusPro und BLAST-Alignment zwischen Listeriolysin O und Pneumolysin. A-B: Kristallstruktur von LLO (A) oder Domäne D4 von LLO (B) mit modellierter Heparinstruktur nach *in silico* Analyse mittels ClusPro. Heparin kann entweder innerhalb von Domäne D1 in räumlicher Nähe zur Polyprolin Type II-Helix Domäne (PPII Helix) binden oder innerhalb der Domäne D4. C: Putatives Heparin-Bindemotiv innerhalb der Domäne D2 von LLO. D: Protein Alignment der Aminosäuresequenz von LLO und PLY zur Identifikation von Aminosäuren-Resten, welche Heparin binden könnten. Als solche kommen die Aminosäuren-Reste LLO Q430, LLO W489 und LLO L516 (gelb) in Frage, da es sich hierbei um konservierte Aminosäuren handelt, welche in PLY für die Bindung an Glykanen identifiziert wurden.

7.2.2 Implikationen für die Pathogenese von *Listeria monocytogenes* durch die Regulation von Listeriolysin O durch Heparin/Heparansulfat

Bei Heparinen handelt es sich um hoch-sulfatierte und lineare Moleküle bestehend aus Glykosaminglykane, welche durch Esther-Verbindungen miteinander verbunden sind. Bei Glykosaminglykanen handelt es sich wiederum um Polysaccharide, welche aus einer sich wiederholenden Abfolge von Disacchariden bestehen. Im Falle von Heparinen bestehen diese Disaccharide aus Uronsäuren (i.d.R. Glucuronsäure oder Iduronsäure) und N-Acetylglykosamin (NAG) (Casu et al., 2015). Die Synthese von Heparin erfolgt im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat von Mastzellen, welche v.a. in Leber, Darm und Lunge anzutreffen sind (Onishi et al., 2016). Heparin wird in sog. Granula bis zu seiner Verwendung gelagert. Dort spielt es eine essentielle Rolle in der Lagerung von Granula-spezifischen Proteasen und Histamin (Forsberg et al., 1999; Humphries et al., 1999). Anders als vermutet, spielt endogenes Heparin jedoch keine Rolle im Koagulationsprozess, da es unter physiologischen Bedingungen nur in den Granula der Mastzellen vorzufinden ist. Anders sieht es dagegen für exogenes Heparin aus. Von außen hinzugegeben, wirkt Heparin als Anticoagulans. Dabei bindet es an Antithrombin. Hierdurch bindet Antithrombin verstärkt an die Gerinnungsfaktoren Xa und IIa und inhibiert dadurch die Gerinnungskaskade (Onishi et al., 2016). Es hat aber auch Funktionen in der Freisetzung von Lipoprotein und der hepatischen Triglycerid-Lipase, sowie in der Inhibition der Angiogenese und in der Inhibition von Tumorwachstum (Rabenstein, 2002). Nichtsdestotrotz wurden im Laufe der Zeit hunderte von verschiedenen Proteinen identifiziert, die eine Wechselwirkung mit Heparin eingehen und als Heparin-Bindeproteine bezeichnet werden. Obwohl solche Interaktionen aufgrund der limitierten Lokalisation von Heparin in einem physiologischen Kontext zweifelhaft sind, können solche Studien als Grundlage für das Verständnis von Interaktionen des nahe verwandten Heparansulfats mit Proteinen genutzt werden.

Mastzellen spielen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung einer Infektion mit *Listeria monocytogenes*. So tragen Mastzellen-depletierte Mäuse eine erhöhte bakterielle Last in Leber, Milz und Peritoneum (Gekara & Weiss, 2008). Dabei aktiviert *L. monocytogenes* während der Infektion diese und induziert ihre Degranulierung (Campillo-Navarro et al., 2017; Gekara & Weiss, 2008). Die Folge ist eine Ausschüttung von pro-inflammatorischen Cytokinen wie beispielsweise Interleukin (IL)-6 und IL-1 β (Edelson et al., 2004; McCall-Culbreath et al., 2008). Dieser Vorgang steht dabei in Abhängigkeit von Listeriolysin O (LLO) (Jobbings et al., 2013). Trotz dieses Induktionspotentials ist eine Infektion von Mastzellen durch das Bakterium jedoch ineffizient (Jobbings et al., 2013).

In einem solchen pathophysiologischen Kontext der Infektion wäre es denkbar, dass die LLO-abhängige Ausschüttung der Granula auch eine Ausschüttung von Heparin zur Folge

hätte. Die Folge wäre eine lokal erhöhte Konzentration an Heparin im umliegenden Gewebe. Diese lokal erhöhte Heparin-Konzentration würde zu einer Aktivitätssteigerung von LLO führen. Interessanterweise ist bekannt, dass LLO für eine effiziente Internalisierung in Hepatozyten benötigt wird, welche gleichzeitig als primärer Replikationsort des Bakteriums *in vivo* angesehen wird (Vadia et al., 2011). Durch die Wirkung von LLO auf Mastzellen und die daraus resultierende Ausschüttung von Heparin könnte also die Infektion durch das Bakterium begünstigt werden (Abbildung 58 A). Eine übersteuerte Internalisierung in Hepatozyten könnte jedoch auch zu einer Zerstörung der replikativen Nische durch eine zu hohe bakterielle Last führen. Dem könnte durch die Wirkung der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (PlcB) auf LLO entgegengewirkt werden.

Anders als Heparin ist das strukturell nahverwandte Heparansulfat ubiquitär präsent. Dieses kommt in Form von Heparansulfat-Proteoglykane innerhalb der Glykokalyx nahezu aller Säugetier-Zellen vor (Bishop et al., 2007). Durch eine direkte LLO-Heparansulfat-Interaktion wäre *L. monocytogenes* in der Lage an jede Wirtszelle durch eine direkte Interaktion zu adhären. Demensprechend wäre es denkbar, dass Heparansulfat-Proteoglykane als unspezifische Rezeptoren zur Adhäsion von LLO fungieren um zunächst eine Annäherung des Toxins an die Membran zu ermöglichen (Abbildung 58 B). Bei genügender Annäherung könnte schließlich eine Interaktion mit Cholesterin oder Phosphatidylcholin stattfinden und zu einer hieraus resultierenden Porenbildung führen. Frühere Studien haben gezeigt, dass *L. monocytogenes* Heparansulfat-Proteoglykane für die Adhäsion und Invasion von Wirtszellen nutzt. So konnte auch gezeigt werden, dass LLO eine Rolle in der Adhäsion von *L. monocytogenes* an Epithelzellen spielt (Krawczyk-Balska & Bielecki, 2005). Eine solche Funktion bei der Adhäsion des Bakteriums ließe sich durch eine Heparansulfat-LLO-Interaktion erklären.

Daneben konnte aber auch eine Interaktion von Heparansulfaten mit den Virulenzfaktoren InlB und ActA nachgewiesen werden (Alvarez-Domínguez et al., 1997; Hrtska et al., 2007). Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund zerebraler Listeriose außerordentlich interessant. Vorausgegangene Studien haben nämlich gezeigt, dass ActA eine entscheidende Rolle für die Translokation von *L. monocytogenes* in das zerebrale Gewebe spielt (Pägelow et al., 2018) Dabei könnte eine ActA-Heparansulfat-Interaktion diejenige Rezeptor-Liganden-Interaktion darstellen, welche zum Ausbruch einer Neurolisteriose führen würde. Die Autoren dieser Studie vermuten außerdem, dass das olfaktorische Epithel eine Eintrittsstelle für das Bakterium zum zentralen Nervensystem darstellt. Anders als vermutet spielt jedoch weder InlA noch InlB eine Rolle in der bakteriellen Adhäsion an das olfaktorische Epithel. Diese steht stattdessen in Abhängigkeit zur Aktivität von LLO (Pägelow et al., 2018). Dies läge die Vermutung nahe, dass ein solcher Prozess durch eine LLO-Heparansulfat-Interaktion mediert werden würde. Weitere Studien haben zudem gezeigt, dass PlcB von *L.*

monocytogenes, jedoch nicht InIA oder InIB, ein wichtiger Virulenzfaktor in zerebraler Listeriose ist (Schlüter et al., 1998). Vor dem Hintergrund dieser Arbeit wäre dies auf die regulatorische Wirkung von PlcB auf LLO zurückzuführen (Kapitel 7.1).

Die Fähigkeit an Oberflächen Heparansulfat-Proteoglykane zu binden ist jedoch keine spezifische Eigenschaft von *L. monocytogenes*, sondern ein weit verbreiteter Mechanismus zwischen Viren, Bakterien und Parasiten. So ist beispielsweise auch für *Bordetella pertussis*, *Borrelia burgdorferi* und *Neisseria gonorrhoeae* eine solche Interaktion bekannt (Hannah et al., 1994; Isaacs, 1994; van Putten & Paul, 1995). Eine Liste von pathogenen Organismen, die einen solchen Mechanismus nutzen, wurde von Chen und Kollegen zusammengestellt (Chen et al., 2008).

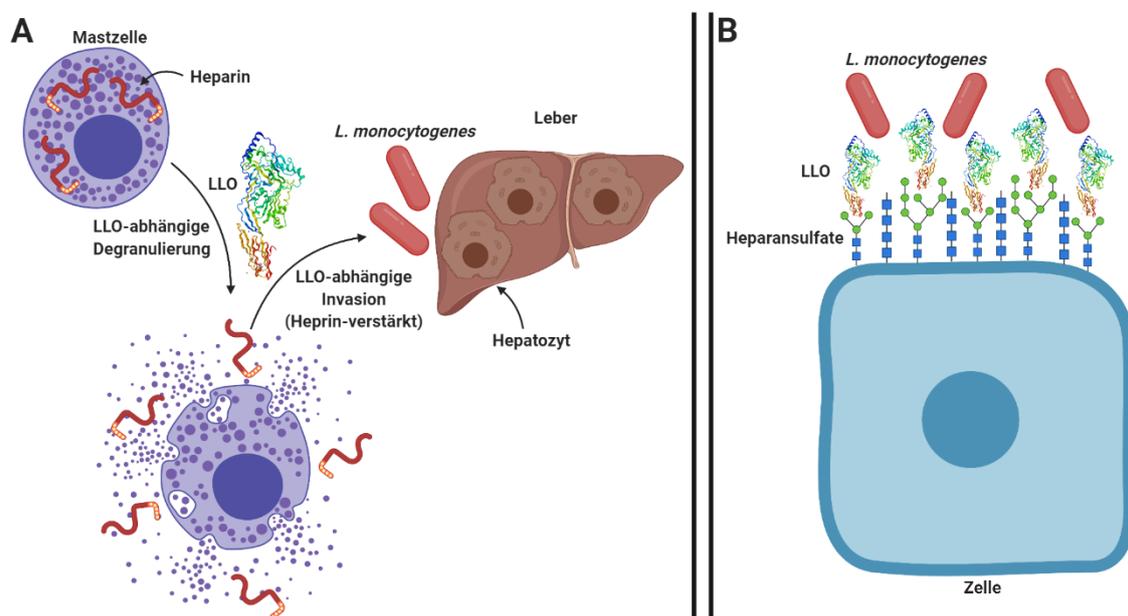


Abbildung 58 Listeriolysin O-abhängige Degranulierung von Mastzellen und Heparin-verstärkte Invasion/Adhäsion. A: LLO induziert eine Degranulierung von Mastzellen. Die Folge ist eine lokale Erhöhung der Heparin-Konzentration, welche wiederum zu einer Verstärkung der LLO-abhängigen Invasion von *L. monocytogenes* in Hepatozyten führt. B: LLO bindet an Oberflächen-Heparansulfate von Zellen und erhöht dadurch die Adhäsion von LLO an Zellen.

7.3 Modulation des Invasionsverhaltens von *Listeria monocytogenes* durch Phosphocholin

Listeria monocytogenes ist ein ubiquitär präsentenes Bakterium, welches man insbesondere in der Erde und im Wasser auffinden kann (Weis & Seeliger, 1975). Als solches hat es für den Menschen nur ein geringes Gefährdungspotenzial. Problematisch wird es erst, wenn das Bakterium über die Nahrung in den Organismus aufgenommen wird. Dort hat *L. monocytogenes* nämlich die herausragende Eigenschaft in wirtseigene Zellen einzudringen

und als replikative Nische zu nutzen. Hierbei besteht die außerordentliche Gefährlichkeit des Bakteriums darin, dass *L. monocytogenes* durch eben diesen intrazellulären Lebenszyklus in der Lage ist dem wirtseigenen Immunsystem zu entkommen und sich so ungehindert von einer Zelle zur benachbarten Zellen auszubreiten. Von der Internalisierung im Darmepithel bis hin zum Austritt in den Blutkreislauf befindet sich das Bakterium also „unter dem Radar“ und ist vom zellulären Immunsystem dementsprechend nicht detektierbar. Zum besseren Verständnis der Natur von *L. monocytogenes*, und einer damit verbundenen besseren Behandlung, sowohl der Infektion *per se* als auch der Behandlung einer Listeriose, ist es deshalb zwingend erforderlich den Mechanismus der Internalisierung zu verstehen.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das kleine und zwitterionische Molekül Phosphocholin (ChoP) in der Lage ist die Anzahl an intrazellulären Bakterien während der Infektion drastisch zu erhöhen. Dieses Phänomen konnte in erster Linie für Epithelzellen, jedoch nicht für Makrophagen beobachtet werden (Abbildung 45 und Abbildung 49). Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei dem hier beobachteten verstärkten Invasionsverhalten um einen aktiven Prozess handelt. Hieraus resultieren prinzipiell zwei unterschiedliche Wirkmechanismen: Entweder führt die Anwesenheit von ChoP zu einer erhöhten Adhäsion der Bakterien an die zelluläre Oberfläche oder es findet eine direkte Liganden-Rezeptor-Interaktion zwischen ChoP und einem Oberflächenmolekül der Wirtszelle statt. Letzteres würde für einen neuen Internalisierungsmechanismus sprechen. Für ersteres spricht dagegen, dass eine Vielzahl von pathogenen Organismen ChoP auf ihren zellulären Oberflächen tragen und damit u.a. eine Adhäsion an Wirtszellen begünstigen. Bei den am besten charakterisierten ChoP-verwendenden Organismen handelt es sich zum einen um parasitär-lebende Nematoden und zum anderen um kommensale oder pathogene Bakterien, die in erster Linie den oberen respiratorischen Trakt besiedeln. ChoP wird dabei kovalent an Oberflächenproteinen und an Glykane der Zellwand gebunden. *Streptococcus pneumoniae* war die erste bakterielle Art, bei der gezeigt werden konnte, dass es ChoP-modifizierte Teichon- und Lipoteichonsäuren trägt (Briles & Tomasz, 1973; Brundish & Baddiley, 1968; Tomasz, 1967). Auch in Gram-negativen Bakterien, wie beispielsweise *Haemophilus influenzae*, konnte ChoP-modifiziertes Lipopolysaccharid (LPS) nachgewiesen werden (Weiser et al., 1997). Pathogene Bakterien nutzen eine solche modifizierte ChoP-Oberfläche, um ihre Adhäsion an Wirtszellen zu erhöhen, einer Immunreaktion zu entfliehen und Wirtszell-Antworten auf eine Infektion zu umgehen. *Legionella pneumophila* ist beispielsweise in der Lage Wirtszell-Antworten durch eine Phosphocholinierung der Wirts GTPase Rab1 zu modulieren, was zu einer Fehlbildung von Endosomen führt (Mukherjee et al., 2011). *S. pneumoniae* und *H. influenzae* nutzen ChoP außerdem um einer Detektion durch neutrophile Granulozyten zu entfliehen (Hergott et al., 2015). Die generelle Dekoration der bakteriellen Oberfläche mit ChoP wird zudem als

Tarnfunktion gegenüber einer Immunantwort verwendet, da hierbei die polaren Kopfgruppen von Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) nachgeahmt werden (Lysenko et al., 2000). Diese Oberflächen-Dekorierung mit ChoP bringt für die Bakterien jedoch nicht nur Vorteile. ChoP wird beispielsweise auch vom C-reaktivem Protein (CRP) erkannt und gebunden. Hierdurch werden klassische Signaltransduktionswege zur Eliminierung pathogener Bakterien über das Komplementsystem aktiviert (Mold et al., 1982; Weiser & Pan, 1998). Eine weitere Detektion von ChoP über das Wirtszell-Immunsystem erfolgt durch die Produktion von anti-ChoP Antikörpern (Kenny et al., 1992; Lieberman, 2004). Hierdurch werden solche Bakterien erkannt, die ChoP-modifizierte Oberflächenstrukturen tragen (Goldenberg et al., 2004). Die Biosynthese von ChoP-Modifikationen erfolgt dabei durch Proteine, welche im *lic*-Gencluster exprimiert werden. Im Fall von *H. influenzae* besteht der *lic*-Locus aus den Genen *licA*, *licB*, *licC* und *licD*. Während LicA und LicB als Cholin-Kinase bzw. Cholin-Transporter fungieren, kodiert *licC* für eine CTP:Phosphocholin Cytidyltransferase. LicD ist anschließend für die Verknüpfung von ChoP und Glykane verantwortlich (Young et al., 2013). *L. monocytogenes* kodiert für keinen *lic*-Locus. Demensprechend konnte ChoP auch auf keinen Oberflächenstrukturen des Bakteriums nachgewiesen werden. Dennoch ist *L. monocytogenes* durch die Expression der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C (PlcB) in der Lage lösliches ChoP zu produzieren. In der Tat konnte gezeigt werden, dass eine Deletion von *plcB* zu einer verringerten Invasion des Bakteriums in Epithelzellen führt (Abbildung 52 A). Eine solche Rolle im Invasionsprozess wurde PlcB bereits in der Vergangenheit zugesprochen (Wadsworth & Goldfine, 1999). Diese verringerte Invasion könnte eine Folge einer verschlechterten Adhäsion des Bakteriums an die zelluläre Oberfläche sein. Denn *L. monocytogenes* exprimiert eine Vielzahl anderer Proteine, die einen Einfluss auf das Adhäsions- und Invasionsverhalten des Bakteriums zur Wirtszelle haben. Hierzu zählen beispielsweise die Internaline InIE, InIG und InIH, welche die InIA-abhängige Invasion unterstützen (Bergmann et al., 2002). Außerdem begünstigt InIJ eine Adhäsion des Bakteriums an die zelluläre Oberfläche der Wirtszelle (Sabet et al., 2008). Weiterhin wurden auch eine Vielzahl von Autolysinen entdeckt, die in der Lage sind Adhäsion oder Invasion zu modulieren. Hierzu zählen die Autolysine Ami, Auto und IspC (Cabanés et al., 2004; Milohanic et al., 2001; Wang & Lin, 2008). Auch Proteine, welche die Lipoteichonsäuren des Bakteriums modifizieren können, spielen eine Rolle im Adhäsions- und Invasionsverhalten des Bakteriums. Hierzu zählen die Proteine GtcA, DltA, LpeA, Lgt und MprF. Ihre Aufgabe besteht wahrscheinlich darin die Oberflächenladung des Bakteriums zu verändern oder in der Umstrukturierung von Oberflächenproteinen (Abachin et al., 2002; Machata et al., 2008; Promadej et al., 1999; Réglier-Poupet et al., 2003; Thedieck et al., 2006). Auch für den Virulenzfaktor ActA, welcher normalerweise für die Rekrutierung von Wirtszell-Aktin

verantwortlich ist, konnte eine Funktion im Invasionsprozess durch die Bindung an Heparansulfaten nachgewiesen werden (Alvarez-Domínguez et al., 1997; Suárez et al., 2001). Für die Proteine Lap, LapB und FbpA konnte ebenfalls eine Funktion in der Adhäsion des Bakteriums nachgewiesen werden (Burkholder & Bhunia, 2010; Dramsi et al., 2004; Jagadeesan et al., 2011; Reis et al., 2010). Die Funktion dieser vorgestellten Adhäsine und Invasionsfaktoren ist jedoch zellspezifisch, sodass sie nur eine untergeordnete Rolle während der Infektion von *L. monocytogenes* spielen. Anders sieht es hingegen für das bakterielle Adhäsionsverhalten durch ChoP aus. Dieser Prozess scheint eine größere Allgemeingültigkeit zu besitzen, da es auch die Adhäsion von nicht-pathogenen Bakterien, wie *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*, begünstigt (Abbildung 51). Interessanterweise induziert die ChoP-Zugabe auch eine Internalisierung vom nicht-pathogenem Bakterium *Listeria innocua* (Abbildung 50). Obwohl der Wirkmechanismus hierzu nicht näher beschrieben werden konnte, lässt dies darauf schließen, dass die ChoP-verstärkte Invasion in Abhängigkeit von einem weiteren Protein der Spezies *Listeria* stehen könnte. Anders als *L. monocytogenes* exprimiert *L. innocua* jedoch keine Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C, welche zur Produktion von ChoP in der Lage wäre. Damit wäre das Bakterium auf endogene Mengen an ChoP angewiesen. ChoP kommt in der Wirtszelle hauptsächlich, gebunden als Phosphatidylcholin, in Membranen vor. Mikromolare bis millimolare Konzentrationen an Cholin und seinen Derivaten kommen jedoch auch beispielsweise im Blutplasma, Urin, Fruchtwasser, Kolostrum, Muttermilch und Sperma vor (Wurtman et al., 2009). *L. monocytogenes* ist während einer Infektion also immer umgeben von Cholin-haltigen Flüssigkeiten. Interessanterweise ist die Konzentration an freiem Cholin, sowie an Phospholipid-gebundenem Cholin bei schwangeren Frauen stark erhöht, da es eine zentrale Rolle im Aufbau von Membranen des Embryos spielt (Ilcol et al., 2002). Durch die enzymatische Aktivität von PlcB könnte diese Menge an freiem ChoP lokal sogar weiter erhöht werden. Dementsprechend wäre die ChoP-vermittelte verstärkte Invasion von *L. monocytogenes* eine mögliche Erklärung für das erhöhte Infektionsrisiko schwangerer Frauen bzw. ihrer ungeborenen Kinder.

Der genaue Wirkmechanismus der ChoP-vermittelten, verstärkten Invasion konnte in dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Dennoch können Spekulationen dahingehend angestellt werden. Hierbei könnte ChoP entweder die Membranstruktur destabilisieren, sodass diese durchlässig für Bakterien werden würde, oder mit einem Oberflächenrezeptor der Wirtszelle interagieren, welche eine Signaltransduktionskaskade auslösen könnte, die wiederum zu einer Endocytose des betreffenden Membranabschnittes führen könnte. Für ersteres konnte erst kürzlich für *Mycobacterium tuberculosis* ein ähnliches Phänomen der Destabilisierung von Wirtsmembranen gezeigt werden (Augenstreich et al., 2019). So überträgt das Bakterium sog. Phthiocerol Dimyocerosat (DIM) auf die Membran der Wirtszelle, sodass es

zur Bildung einer invertierten hexagonalen Membranphase kommt und hierdurch eine Phagozytose des betreffenden Membranabschnittes begünstigt wird. Analog könnte für ChoP ein ähnliches Phänomen vorliegen. Eine lokal erhöhte ChoP-Konzentration könnte zu einer unspezifischen Insertion des Moleküls in die Plasmamembran führen. Dies könnte zu einer Induktion von elastischem Stress in der Membran führen, welches in der Bildung von asymmetrischem Druck auf einer Membranseite zurückzuführen ist. Die Folge wäre eine Krümmung der Membran. *L. monocytogenes* könnte eine solche Membrankrümmung zur Internalisierung nutzen. Dies könnte zusätzlich durch die geringe Größe von *L. monocytogenes* begünstigt werden. Während *L. monocytogenes* im Durchschnitt eine Größe von 0,4-1,5 µm hat, sind *E. coli* mit 1,1-1,5 µm und *B. subtilis* mit 4-10 µm deutlich größere Bakterien. Dies wäre außerdem eine Erklärung, wieso *L. monocytogenes* durch ChoP Zugabe eine erhöhte Invasion zeigt, *E. coli* und *B. subtilis* jedoch nicht (Abbildung 50).

Andererseits könnte ChoP auch mit einem Oberflächenrezeptor der Wirtszelle interagieren und durch eine Liganden-Rezeptor-Interaktion eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade induzieren, welche zu einer Internalisierung des Bakteriums führt. Als möglicher Rezeptor für eine erhöhte bakterielle Adhäsion an die Wirtszelle würde der Plättchenaktivierende Faktor-Rezeptor (PAF-Rezeptor) in Frage kommen. *H. influenzae*, *S. pneumoniae* und *Neisseria* Spezies nutzen beispielsweise ChoP zur Bindung am PAF-Rezeptor der Wirtszelle *in vitro*. Dies ist nur deshalb möglich, weil ChoP ein Teil der Erkennungs-Domäne von PAF, dem natürlichen Liganden des PAF-Rezeptors, ist. Dies führt zu einer erhöhten Adhäsion der Bakterien an die Wirtszelle und zum anderen zu einer erhöhten Invasionsrate (Barbier et al., 2008; Cundell et al., 1995; Swords et al., 2000). Pharmakologische Inhibition des PAF-Rezeptors und Verringerung der Rezeptor-Expression über siRNA haben gezeigt, dass im Falle von *L. monocytogenes* der PAF-Rezeptor ebenfalls als möglicher Bindungspartner von ChoP in Frage kommen würde, da die Inhibition zu einer signifikanten Reduktion der Invasion führte (Abbildung 54). Der PAF-Rezeptor wird in erster Linie von Plättchen (Thrombozyten) exprimiert. Diese „patrouillieren“ im Blut und überprüfen das kardiovaskuläre System nach möglichen Beschädigungen der endothelialen Oberfläche. Durch eine ChoP-vermittelte verstärkte Adhäsion von Bakterien an zellulären Oberflächen würden sich Thrombozyten demnach als exzellente „Reittiere“ für *L. monocytogenes* eignen, um sich in kurzer Zeit im ganzen Organismus auszubreiten. Dennoch wäre eine solche Strategie der Dissemination für das Bakterium risikoreich, da Thrombozyten auch als mechanische Fänger von Bakterien fungieren und hierdurch die Aktivität von professionellen Phagozyten verstärken (Gaertner et al., 2017).

Zusammengefasst kann die Erhöhung lokaler ChoP-Konzentrationen durch die enzymatische Aktivität von PlcB zu einer Erhöhung der bakteriellen Adhäsion an die Wirtszelle führen, sodass die Wahrscheinlichkeit einer Internalisierung über kanonische

Virulenzfaktoren, wie beispielsweise über InlA oder über InlB, erhöht wird. ChoP könnte jedoch selbst als Invasionsfaktor fungieren, indem es entweder durch Membraneinlagerung die Stabilität der Plasmamembran beeinträchtigt oder durch Bindung am PAF-Rezeptor eine Rezeptor-vermittelte Internalisierung induziert (Abbildung 59).

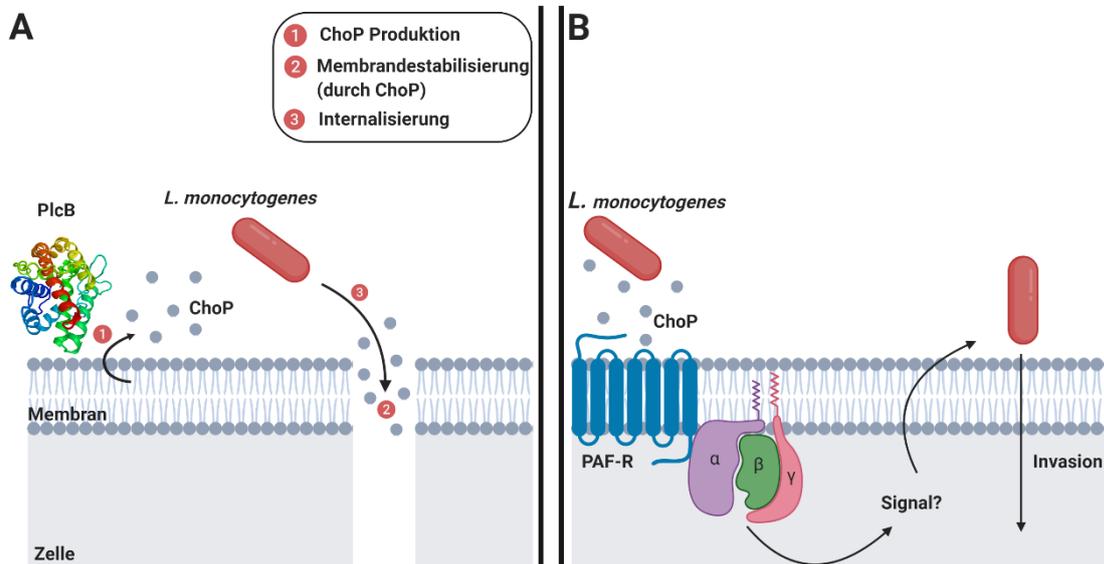


Abbildung 59 Hypothetische Wirkungsweise der ChoP-verstärkten Adhäsion/Invasion. A: Die enzymatische Aktivität von PlcB führt zur Produktion von Phosphocholin (ChoP). Dies könnte zu einer Induktion von elastischem Stress in der Membran führen, welcher auf Bildung von asymmetrischem Druck auf einer Membranseite zurückzuführen ist und dadurch die Membran permeabler für *L. monocytogenes* wird. B: ChoP-Bindung am Plättchenaktivierenden Faktor-Rezeptor (PAF-R) könnte eine unbekannt Signaltransduktionskaskade induzieren, welche wiederum zur Invasion von *L. monocytogenes* führen würde.

8 Zusammenfassung

Bakterielle porenbildende Toxine bilden eine außerordentlich heterogene Gruppe an Exotoxinen, welche ein gemeinsames Ziel verfolgen: Die Überwindung von biologischen Membranen. Dies kann zum einen durch direkte Zerstörung von Membranen durch Bindung und Oligomerisierung der Toxine oder zum anderen durch die Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden und daraus resultierender Internalisierung von pathogenen Bakterien in Zellen erfolgen. Bei einem dieser Toxine handelt es sich um das Cholesterin-abhängige Cytolysin Listeriolysin O, welches vom intrazellulärem pathogenem Bakterium *Listeria monocytogenes* produziert und sekretiert wird. Als zentraler Virulenzfaktor ermöglicht Listeriolysin O die Freisetzung des Bakteriums aus intrazellulären Vakuolen in das Cytosol der Wirtszelle, der replikativen Nische des Bakteriums.

Bemerkenswerterweise führt die membranlytische Aktivität von Listeriolysin O zu keiner offenkundigen Zerstörung der infizierten Wirtszelle. Ein Grund hierfür ist die strikte Kontrolle der cytolytischen Aktivität von Listeriolysin O durch wirtseigene Regulationsmechanismen, wie beispielsweise Veränderungen des pH-Wertes und des Redox-Status oder durch proteolytische Kontrolle. Im Vergleich hierzu sind kaum regulatorische Mechanismen der Kontrolle des Toxins aus bakterieller Sicht bekannt.

Durch die Verwendung einer Kombination aus isogenen *Listeria monocytogenes* Mutanten und biochemischen Untersuchungen mit gereinigten Phospholipasen des Bakteriums konnten in dieser Arbeit neue bakterielle und zelluläre regulatorische Mechanismen der Kontrolle von Listeriolysin O aufgedeckt werden.

So konnte gezeigt werden, dass Phosphocholin, ein Reaktionsprodukt der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C von *Listeria monocytogenes*, ein potenter Inhibitor von intra- und extrazellulären Listeriolysin O-Aktivitäten ist. Die Bindung von Phosphocholin ist unabhängig vom Redox-Status des Toxins und führt zu einer Inhibition des Listeriolysin O-induzierten Calcium-Einwärtsstroms, zu mitochondrialem Schaden und Apoptose. Außerdem konnte eine Inhibition der hämolytischen Aktivität des Toxins beobachtet werden, welche nicht nur auf Listeriolysin O beschränkt war, sondern auch bei weiteren Vertretern von Cholesterin-abhängigen Cytolysinen beobachtet wurde (Pneumolysin und Streptolysin O). Als möglicher Grund für die inhibitorische Wirkung konnte eine direkte Interaktion von Phosphocholin und Listeriolysin O ermittelt werden, welche zu einer erhöhten Dissoziation der Listeriolysin O-Pore von Membranen führte. Die Verwendung des Phosphocholin-haltigen Phospholipids Phosphatidylcholin führte hingegen zu einer Steigerung der hämolytischen Aktivität des Toxins. In diesem Zusammenhang wurde außerdem die Wirkungseise des Glykosaminglykans Heparin auf die hämolytische Aktivität

von Listeriolysin O untersucht. Erstaunlicherweise führte die Zugabe von Heparin ebenfalls zu einer Steigerung der hämolytischen Aktivität des Toxins.

Zuletzt konnte für Phosphocholin eine zusätzliche Funktion in der Adhäsion und Invasion von *Listeria monocytogenes* während der Infektion identifiziert werden. Die exogene Zugabe von Phosphocholin führte zu einer stark erhöhten Invasion des Bakteriums in Epithelzellen in einer viruelnzfaktorunabhängigen Art und Weise. Hierbei könnte es sich um einen neuen, bisher unbekanntem Mechanismus der Adhäsion von *Listeria monocytogenes* an Wirtszellen handeln.

Die vorgestellten Daten dieser Arbeit zeigen somit neue Strategien von *Listeria monocytogenes* auf, um die cytotoxische Aktivität von Listeriolysin O zu modulieren und an Epithelzellen zu adhären. Diese Mechanismen beruhen dabei sowohl auf die enzymatische Aktivität der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C als auch auf die Bindung von Heparin an Listeriolysin O.

Da eine Vielzahl an Bakterien sowohl ein porenbildendes Toxin als auch eine Phospholipase C exprimieren und Heparin in Form des nah verwandten Heparansulfat ubiquitär in Wirtszellen vorkommt, könnte es sich bei diesen Mechanismen um allgemeingültige bakterielle Prinzipien der Regulation handeln.

9 Summary

Bacterial pore forming toxins form an extraordinarily heterogeneous group of exotoxins that share a common goal: To cross biological membranes. This can be achieved either by direct disruption of membranes through binding and oligomerization of the toxins or by activation of intracellular signaling cascades, resulting in internalization of pathogenic bacteria in cells. One of these toxins is the cholesterol-dependent cytolysin listeriolysin O, which is produced and secreted by the intracellular pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes*. As a central virulence factor, listeriolysin O enables the bacterium to be released from intracellular vacuoles into the cytosol of the host cell, the replicative niche of the bacterium.

Remarkably, the membranolytic activity of listeriolysin O does not lead to an overt destruction of the infected host cell. One reason for this is the strict control of the cytolytic activity of listeriolysin O by host regulatory mechanisms, such as changes in pH and redox status or by proteolytic control. In comparison to that, hardly any regulatory mechanisms of controlling the toxin by the bacterium itself are known.

Using a combination of isogenic *Listeria monocytogenes* mutants and biochemical studies with purified phospholipases of the bacterium, this work uncovers new bacterial and cellular regulatory mechanisms of listeriolysin O-control.

It was shown that phosphocholine, a reaction product of the phosphatidylcholine-specific phospholipase C of *Listeria monocytogenes*, is a potent inhibitor of intra- and extracellular listeriolysin O activities. The binding of phosphocholine is independent of the redox status of the toxin and leads to inhibition of listeriolysin O-induced calcium influx, mitochondrial damage and apoptosis. In addition, an inhibition of the toxin's hemolytic activity was observed, which was not only limited to listeriolysin O, but was also observed in other representatives of cholesterol-dependent cytolysins (pneumolysin and streptolysin O). As a possible reason for the inhibitory effect, a direct interaction of phosphocholine and listeriolysin O was identified, which led to an increased dissociation of the listeriolysin O-pore from membranes. In contrast, the use of the phosphocholine-containing phospholipid phosphatidylcholine led to an increase in the hemolytic activity of the toxin. In this context, the effect of the glycosaminoglycan heparin on the hemolytic activity of listeriolysin O was also investigated. Surprisingly, the addition of heparin also led to an increase in the hemolytic activity of the toxin.

Finally, an additional function of phosphocholine in the adhesion and invasion of *Listeria monocytogenes* during infection was identified. The exogenous addition of phosphocholine led to a greatly increased invasion of the bacterium into epithelial cells in a virulence factor

independent manner pointing towards a new, previously unknown mechanism of adhesion of *Listeria monocytogenes* to host cells.

The data presented in this work thus reveal new strategies of *Listeria monocytogenes* to modulate the cytotoxic activity of listeriolysin O and to adhere to epithelial cells. These mechanisms are based both on the enzymatic activity of the phosphatidylcholine-specific phospholipase C and on the binding of heparin to listeriolysin O.

Since a large number of bacteria express both a pore forming toxin as well as a phospholipase C and heparin is ubiquitously present in host cells in form of the closely related heparan sulfate, these mechanisms could be general bacterial principles of regulation.

10 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure
°C	Grad Celsius	ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
μ	Mikro	ER	Endoplasmatisches Retikulum
2-APB	2-Aminoethyldiphenylborat	ESCRT-III	endosomal sorting complex required for transport
A	Amper	FKS	Fetales Kälberserum
Å	Ångström	Fnr	fumarate nitrate reductase regulator
ALG-2	apoptosis linked gene	FSC	forward side scatter
ALIX	ALG-2-interacting protein X	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
ANOVA	analysis of variance	GILT	γ-interferon-inducible lysosomal thiol reductase
AP	Alkalische Phosphatase	Gp96	Heat shock protein 90kDa beta member 1
Ap2a2	adaptor protein complex 2 subunit alpha-2	GPI	Glykosyl-PI
APS	Ammoniumperoxodisulfat	h	Stunde
BHI	Brain-Heart-Infusion	H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
BiP	binding immunoglobulin protein	HB1	helix bundle 1
bp	Basenpaar	HB2	helix bundle 2
BSA	Rinderserumalbumin	HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
ca.	circa	HRP	Meerrettichperoxidase
Ca ²⁺	Calcium	Hsp60	heat shock protein 60 kDa
CCCP	Carbonylcyanid-m- chlorphenylhydrazon	i.d.R.	in der Regel
CDC	Cholesterin-abhängiges Cytolysin (cholesterol-dependent cytolysin)	IL	Interleukin
CFU	colony forming unit	InIA	Internalin A
ChoP	Phosphocholin	InIB	Internalin B
Cox IV	Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 4 Isoform 1	IP ₃	Inositoltrisphosphat
Crp	cAMP receptor protein	K ⁺	Kalium
CTRL	Kontrolle	LB	Lysogeny Broth
Da	Dalton	LC3	microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
DAG	Diacylglycerin	LIPI-1	Listeria Pathogenicity Island-1
DMSO	Dimethylsulfoxid		
DNA	Desoxyribonucleinsäure		
DTT	Dithiothreitol		

LIR	<i>LC3-interacting region</i>	PlcA	<i>Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C</i>
LLO	<i>Listeriolysin O</i>	PlcB	<i>Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C</i>
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>	PLD	<i>Phospholipase D</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>	PLY	<i>Pneumolysin</i>
LRR	<i>leucin-rich repeats</i>	PMSF	<i>Phenylmethylsulfonylfluorid</i>
LUV	<i>large unilamellar vesicle</i>	POPC	<i>1-Palmitoyl-2-Oleoyl-Glycero-3-Phosphocholin</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>	PrfA	<i>positive regulatory factor A</i>
min	<i>Minute</i>	PS	<i>Phosphatidylserin</i>
MLV	<i>multilamellar vesicle</i>	PVDF	<i>Polyvinylidendifluorid</i>
MOI	<i>multiplicity of infection</i>	RNA	<i>Ribonucleinsäure</i>
Mpl	<i>Metalloproteinase</i>	ROS	<i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>	rpm	<i>rounds per minute</i>
NAG	<i>N-Acetylglykosamin</i>	RT	<i>Raumtemperatur</i>
NLRX1	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>	RU	<i>Resonanzeinheit</i>
nm	<i>Nanometer</i>	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
NMHCIIA	<i>non-muscle myosin heavy chain IIA</i>	SDS-PAGE	<i>Natrium Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese</i>
NOS	<i>reaktive Stickstoffspezies</i>	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
NOX2	<i>NADPH-Oxidase</i>	SLAP	<i>spacious Listeria-containing phagosomes</i>
OD	<i>Optische Dichte</i>	SLO	<i>Streptolysin O</i>
PAF-Rezeptor	<i>Plättchenaktivierender Faktor-Rezeptor</i>	SM	<i>Sphingomyelin</i>
PBS	<i>Phosphat-gepufferte Saline</i>	sog.	<i>sogenannt</i>
PC	<i>Phosphatidylcholin</i>	SPR-Spektroskopie	<i>Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie</i>
PDI	<i>Proteindisulfidisomerase</i>	SSC	<i>side scatter</i>
PE	<i>Phosphatidylethanolamin</i>	SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
PFT	<i>Porenbildendes Toxin (pore forming toxin)</i>	TBS	<i>Tris-gepufferte Saline</i>
PhoS	<i>Phosphoserin</i>	TCA	<i>Trichloressigsäure</i>
PI	<i>Phosphatidylinositol</i>	TEMED	<i>Tetramethylethylendiamin</i>
PI3K	<i>Phosphoinositid-3-Kinase</i>	TG	<i>Thapsigargin</i>
PIP	<i>Phosphatidylinositol 4-Phosphat</i>	TMB	<i>3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin</i>
PIP ₂	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat</i>	U	<i>unit</i>
PLA	<i>Phospholipase A</i>		
PLC	<i>Phospholipase C</i>		

u.a. *unter anderem*
UI *nicht-infizierte Kontrolle*
UPR *Ungefaltete Proteinantwort,*
(unfolded protein response)
V *Volt*
v.a. *vor allem*
Vip *virulence protein*
Vps4 *adenosine triphosphatase*
w/v *weight per volume*
Wt *Wildtyp*
x g *relative Zentrifugalbeschleunigung*
z.B. *zum Beispiel*
Zn²⁺ *Zink*
σ^B *sigma factor B*
Ψ *Membranpotential*

11 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Phylogenetischer Stammbaum der Gattung <i>Listeria</i> anhand einer Genom-basierten Analyse (Abbildung von Dr. Swapnil Doijad).	2
Abbildung 2	Schematische Darstellung des Wechsels von <i>Listeria monocytogenes</i> zwischen einem saprophytischem und intrazellulärem Lebensstil.	4
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Infektion eines menschlichen Wirtes mit <i>Listeria monocytogenes</i> .	5
Abbildung 4	Schematische Darstellung des Infektionszyklus von <i>Listeria monocytogenes</i> in nicht-phagozytierenden Zellen.	7
Abbildung 5	Kristallstruktur von Listeriolysin O mit einer Auflösung von 2,15 Å.	11
Abbildung 6	Die Membranbindung, Oligomerisierung und Insertion von Cholesterin-abhängigen Cytolysinen in Cholesterin-haltigen biologischen Membranen.	14
Abbildung 7	Schematische Darstellung der bakteriellen Regulation von Listeriolysin O.	23
Abbildung 8	Schematische Darstellung der zellulären Regulation von Listeriolysin O.	25
Abbildung 9	Spaltstellen von Phospholipasen, gezeigt anhand von Phosphatidylcholin.	27
Abbildung 10	Kristallstruktur der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C aus <i>Listeria monocytogenes</i> (PDB 1AOD).	29
Abbildung 11	Translokation von Gp96 zur zellulären Oberfläche.	77
Abbildung 12	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie von HeLa Zellen nach Listeriolysin O Behandlung.	78
Abbildung 13	Translokation von Gp96 nach Listeriolysin O Behandlung zu unterschiedlichen Zeitpunkten.	79
Abbildung 14	Ca ²⁺ -Abhängigkeit der Listeriolysin O-induzierten Gp96 Translokation zur zellulären Oberfläche.	80
Abbildung 15	Induktion der Gp96 Translokation durch zellulären Stress.	81
Abbildung 16	Abhängigkeit der Gp96 Translokation vom IP ₃ -Signalweg.	82
Abbildung 17	Listeriolysin O-induzierte Translokation von ER-residenten und mitochondrialen Chaperonen zur zellulären Oberfläche.	84
Abbildung 18	Gp96 Translokation nach Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> .	85
Abbildung 19	Reinigung und Bestimmung der enzymatischen Aktivität von PlcA und PlcB.	87
Abbildung 20	PlcB-abhängige Reduktion der Listeriolysin O-abhängigen Gp96 Translokation zur zellulären Oberfläche.	88
Abbildung 21	Modulation des Listeriolysin O-abhängigen und nach innen gerichteten Ca ²⁺ -Stroms durch PlcB.	89
Abbildung 22	PlcB-induzierte Reduktion der Listeriolysin O-abhängigen mitochondrialen Superoxid Produktion.	91
Abbildung 23	PlcB-abhängige Reduktion der Listeriolysin O-induzierten mitochondrialen Fragmentierung.	92
Abbildung 24	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie der PlcB-induzierten Inhibition der Listeriolysin O-abhängigen mitochondrialen Fragmentierung.	93
Abbildung 25	PlcB-induzierte Reduktion der Listeriolysin O-abhängigen Induktion der Apoptose.	94
Abbildung 26	PlcB-induzierte Reduktion der Listeriolysin O-abhängigen Induktion der Caspase 3/7-Aktivierung.	96

Abbildung 27 Inhibition der Listeriolysin O-induzierten Hämolyse durch Phospholipasen C.	98
Abbildung 28 Phosphocholin-abhängige Inhibition der durch CDC-Toxine induzierten Hämolyse.	99
Abbildung 29 Phosphocholin-abhängige Inhibition der durch CDC-Toxine induzierten Ausschüttung von Calcein.	100
Abbildung 30 Auswirkung von Phosphocholin-Derivaten auf die Listeriolysin O-induzierte Hämolyse.	101
Abbildung 31 Unabhängigkeit der Phosphocholin-abhängigen Inhibition von LLO vom Redox-Status des Toxins.	103
Abbildung 32 Phosphocholin erhöht durch direkte Interaktion die Dissoziationsrate von Listeriolysin O von Membranen.	104
Abbildung 33 Phosphatidylcholin-abhängige Erhöhung der durch CDC-Toxine induzierten Hämolyse.	105
Abbildung 34 Phosphatidylcholin ist ein spezifischer Interaktionspartner von Listeriolysin O.	107
Abbildung 35 Phosphatidylcholin ist ein Interaktionspartner von Pneumolysin.	108
Abbildung 36 Nachweis einer LLO-Phosphatidylcholin-Interaktion mittels Dünnschichtchromatographie.	108
Abbildung 37 Modulation der Listeriolysin O-induzierten Hämolyse durch Heparin.	109
Abbildung 38 Modulation der Listeriolysin O-induzierten Hämolyse durch Heparin-Bausteine.	110
Abbildung 39 Heparin-Strukturen, welche auf dem ECM-Array aufgedruckt waren.	111
Abbildung 40 Nachweis einer direkten Listeriolysin O-Heparin-Wechselwirkung mittels Glykan-Microarray.	112
Abbildung 41 Nachweis einer direkten Domäne D4-Heparin-Wechselwirkung mittels Glykan-Microarray.	113
Abbildung 42 Inhibition der Listeriolysin O-Glykan-Array-Wechselwirkung nach Sättigung von Listeriolysin O mit Heparin.	113
Abbildung 43 Inhibition der Listeriolysin O-Glykan-Array-Wechselwirkung nach Sättigung von Listeriolysin O mit höheren Heparin-Konzentrationen.	114
Abbildung 44 Inhibition der D4-Glykan-Array-Wechselwirkung nach Sättigung von D4 mit Heparin.	115
Abbildung 45 Phosphocholin-abhängige Verstärkung der Invasion von <i>Listeria monocytogenes</i> in nicht-phagozytierenden Zellen.	116
Abbildung 46 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie nach Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> wt in Anwesenheit von Phosphocholin.	117
Abbildung 47 Zeitabhängigkeit der Phosphocholin-abhängigen Verstärkung der Invasion von <i>Listeria monocytogenes</i> in nicht-phagozytierenden Zellen.	117
Abbildung 48 Invasionsverhalten von <i>Listeria monocytogenes</i> in nicht-phagozytierende Zellen bei Zugabe von Phosphocholin-Derivaten.	118
Abbildung 49 Phosphocholin-abhängige Verstärkung der Invasion von <i>Listeria monocytogenes</i> in unterschiedlichen Zelllinien.	119
Abbildung 50 Invasionsverhalten von unterschiedlichen Bakterien in nicht-phagozytierende Zellen in Anwesenheit von Phosphocholin.	120
Abbildung 51 Adhäsionsverhalten von unterschiedlichen Bakterien in nicht-phagozytierende Zellen in Anwesenheit von Phosphocholin.	122

Abbildung 52 Die Phosphocholin-abhängige Verstärkung der Invasion von <i>Listeria monocytogenes</i> ist abhängig von PlcB, aber nicht von weiteren Virulenzfaktoren.	124
Abbildung 53 Nachweis des Plättchenaktivierenden Faktor-Rezeptors auf der zellulären Oberfläche von HeLa Zellen.	125
Abbildung 54 Abhängigkeit der Invasion von <i>Listeria monocytogenes</i> in nicht-phagozytierenden Zellen vom Plättchenaktivierenden Faktor-Rezeptor.	127
Abbildung 55 Veränderung der Expression von Listeriolysin O und der Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle.	135
Abbildung 56 Modell der Phosphocholin-abhängigen Repression von Listeriolysin O-induzierten Wirtszellantworten.	137
Abbildung 57 Putative Heparinbindestellen anhand von <i>in silico</i> Analysen mittels ClusPro und BLAST-Alignment zwischen Listeriolysin O und Pneumolysin.	150
Abbildung 58 Listeriolysin O-abhängige Degranulierung von Mastzellen und Heparin-verstärkte Invasion/Adhäsion.	153
Abbildung 59 Hypothetische Wirkungsweise der ChoP-verstärkten Adhäsion/Invasion.	158

12 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Mitglieder der CDC-Toxinfamilie.	9
Tabelle 2	In dieser Arbeit verwendete Geräte.	34
Tabelle 3	In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien.	36
Tabelle 4	In dieser Arbeit verwendete Chemikalien, Inhibitoren und Enzyme.	37
Tabelle 5	In der vorliegenden Arbeit verwendete Antibiotika	38
Tabelle 6	Komplettausrüstungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.	39
Tabelle 7	Liste der verwendeten Primärantikörper.	39
Tabelle 8	Liste der verwendeten Sekundärantikörper.	40
Tabelle 9	Liste der verwendeten Zellkulturmedien.	40
Tabelle 10	In dieser Arbeit verwendete Bakterien.	48
Tabelle 11	In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.	51
Tabelle 12	Ausgesäte Zellzahl zum Erreichen von konfluenten 12-well Zellkulturplatten nach der angegebenen Inkubationszeit.	52
Tabelle 13	Bakterielle Gattungen, welche sowohl ein Cholesterin-abhängiges Cytolysin als auch eine Phosphatidylcholin- bzw. Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C exprimieren (BLAST-Analyse).	139

13 Literaturverzeichnis

- Abachin, E., Poyart, C., Pellegrini, E., Milohanic, E., Fiedler, F., Berche, P., & Trieu-Cuot, P. (2002). Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 43(1), 1–14. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02723.x>
- Abrami, L., Fivaz, M., Glauser, P. E., Parton, R. G., & Van Der Goot, F. G. (1998). A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, 140(3), 525–540. <https://doi.org/10.1083/jcb.140.3.525>
- Abrami, L., Fivaz, M., & Van Der Goot, F. G. (2000). Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. *Trends in Microbiology*, 8(4), 168–172. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01722-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01722-4)
- Allam, M., Tau, N., Smouse, S. L., Mtshali, P. S., Mnyameni, F., Khumalo, Z. T. H., Ismail, A., Govender, N., Thomas, J., & Smith, A. M. (2018). Whole-Genome Sequences of *Listeria monocytogenes* Sequence Type 6 Isolates Associated with a Large Foodborne Outbreak in South Africa, 2017 to 2018. *Genome Announcements*, 6(25), pii: e00538-18. <https://doi.org/10.1128/genomea.00538-18>
- Alvarez-Domínguez, C., Vázquez-Boland, J. A., Carrasco-Marín, E., López-Mato, P., & Leyva-Cobián, F. (1997). Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infection and Immunity*, 65(1), 78–88.
- Anderluh, G., Maček, P., & Lakey, J. H. (2003). Peeking into a secret world of pore-forming toxins: Membrane binding processes studied by surface plasmon resonance. *Toxicon*, 42(3), 225–228. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00197-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00197-1)
- Augenstreich, J., Haanappel, E., Ferré, G., Czaplicki, G., Jolibois, F., Destainville, N., Guilhot, C., Milon, A., Astarie-Dequeker, C., & Chavent, M. (2019). The conical shape of DIM lipids promotes Mycobacterium tuberculosis infection of macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(51), 25649–25658. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910368116>
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S., & Draeger, A. (2009). Intracellular Ca²⁺ operates a switch between repair and lysis of streptolysin O-perforated cells. *Cell Death and Differentiation*, 16(8), 1126–1134. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.30>
- Babiychuk, E. B., Monastyrskaya, K., Potez, S., & Draeger, A. (2011). Blebbing confers resistance against cell lysis. *Cell Death and Differentiation*, 18(1), 80–89. <https://doi.org/10.1038/cdd.2010.81>
- Barbier, M., Agustí, A., & Albertí, S. (2008). Fluticasone propionate reduces bacterial airway epithelial invasion. *European Respiratory Journal*, 32(5), 1283–1288. <https://doi.org/10.1183/09031936.00020608>
- Barbier, Mariette, Oliver, A., Rao, J., Hanna, S. L., Goldberg, J. B., & Albertí, S. (2008). Novel Phosphorylcholine-Containing Protein of *Pseudomonas aeruginosa* Chronic Infection Isolates Interacts with Airway Epithelial Cells. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(3), 465–473. <https://doi.org/10.1086/525048>
- Bavdek, A., Gekara, N. O., Priselac, D., Aguirre, I. G., Darji, A., Chakraborty, T., Maček, P.,

-
- Lakey, J. H., Weisse, S., & Anderluh, G. (2007). Sterol and pH interdependence in the binding, oligomerization, and pore formation of listeriolysin O. *Biochemistry*, *46*(14), 4425–4437. <https://doi.org/10.1021/bi602497g>
- Beauregard, K. E., Lee, K., Collier, R. J., & Swanson, J. A. (1997). pH-dependent Perforation of Macrophage Phagosomes by Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Experimental Medicine*, *186*(7), 1159–1163. <https://doi.org/10.1084/jem.186.7.1159>
- Bergmann, B., Raffelsbauer, D., Kuhn, M., Goetz, M., Hom, S., & Goebel, W. (2002). InIA- but not InIB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. *Molecular Microbiology*, *43*(3), 557–570. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02767.x>
- Beseničar, M., Maček, P., Lakey, J. H., & Anderluh, G. (2006). Surface plasmon resonance in protein-membrane interactions. *Chemistry and Physics of Lipids*, *141*(1–2), 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2006.02.010>
- Binder, R. J., Han, D. K., & Srivastava, P. K. (2000). CD91: a receptor for heat shock protein gp96. *Nature Immunology*, *1*(2), 151–155. <https://doi.org/10.1038/77835>
- Birmingham, C. L., Canadien, V., Gouin, E., Troy, E. B., Yoshimori, T., Cossart, P., Higgins, D. E., & Brumell, J. H. (2007). *Listeria monocytogenes* evades killing by autophagy during colonization of host cells. *Autophagy*, *3*(5), 442–451. <https://doi.org/10.4161/auto.4450>
- Birmingham, C. L., Canadien, V., Kaniuk, N. A., Steinberg, B. E., Higgins, D. E., & Brumell, J. H. (2008). Listeriolysin O allows *Listeria monocytogenes* replication in macrophage vacuoles. *Nature*, *451*(7176), 350–354. <https://doi.org/10.1038/nature06479>
- Bishop, J. R., Schuksz, M., & Esko, J. D. (2007). Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature*, *446*(7139), 1030–1037. <https://doi.org/10.1038/nature05817>
- Bitar, A. P., Cao, M., & Marquis, H. (2008). The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is activated by intramolecular autocatalysis. *Journal of Bacteriology*, *190*(1), 107–111. <https://doi.org/10.1128/JB.00852-07>
- Blank, B. S., Abi Abdallah, D. S., Park, J. J., Nazarova, E. V., Bitar, A. P., Maurer, K. J., & Marquis, H. (2014). Misregulation of the broad-range phospholipase C activity increases the susceptibility of *Listeria monocytogenes* to intracellular killing by neutrophils. *Microbes and Infection*, *16*(2), 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.10.014>
- Bohne, J., Sokolovic, Z., & Goebel, W. (1994). Transcriptional regulation of prfA and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, *11*(6), 1141–1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00390.x>
- Bourdeau, R. W., Malito, E., Chenal, A., Bishop, B. L., Musch, M. W., Villereal, M. L., Chang, E. B., Mosser, E. M., Rest, R. F., & Tang, W. J. (2009). Cellular functions and X-ray structure of anthrolysin O, a cholesterol-dependent cytolysin secreted by *Bacillus anthracis*. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(21), 14645–14656. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807631200>
- Bouyain, S., & Geisbrecht, B. V. (2012). Host glycan recognition by a pore forming toxin. *Structure*, *20*(2), 197–198. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.01.013>
- Boye, T. L., & Nylandsted, J. (2016). Annexins in plasma membrane repair. *Biological Chemistry*, *397*(10), 961–969. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0171>

-
- Braun, L., Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G., & Cossart, P. (1997). InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Molecular Microbiology*, 25(2), 285–294.
- Briles, E. B., & Tomasz, A. (1973). Pneumococcal Forssman Antigen. A Choline-Containing Lipoteichoic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 248(18), 6394–6397.
- Brito, C., Cabanes, D., Sarmiento Mesquita, F., & Sousa, S. (2019). Mechanisms protecting host cells against bacterial pore-forming toxins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76(7), 1319–1339. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2992-8>
- Brundish, D. E., & Baddiley, J. (1968). Pneumococcal C-substance, a ribitol teichoic acid containing choline phosphate. *Biochemical Journal*, 110(3), 573–582. <https://doi.org/10.1042/bj1100573>
- Burg-Golani, T., Pozniak, Y., Rabinovich, L., Sigal, N., Paz, R. N., & Herskovits, A. A. (2013). Membrane chaperone SecDF plays a role in the secretion of *Listeria monocytogenes* major virulence factors. *Journal of Bacteriology*, 195(23), 5262–5272. <https://doi.org/10.1128/JB.00697-13>
- Burkholder, K. M., & Bhunia, A. K. (2010). *Listeria monocytogenes* uses *Listeria* adhesion protein (LAP) to promote bacterial transepithelial translocation and induces expression of LAP receptor Hsp60. *Infection and Immunity*, 78(12), 5062–5073. <https://doi.org/10.1128/IAI.00516-10>
- Burns, J. R., Morton, C. J., Parker, M. W., & Tweten, R. K. (2019). An Intermolecular π -Stacking Interaction Drives Conformational Changes Necessary to β -Barrel Formation in a Pore-Forming Toxin. *MBio*, 10(4), pii: e01017-19. <https://doi.org/10.1128/mbio.01017-19>
- Cabanes, D., Dussurget, O., Dehoux, P., & Cossart, P. (2004). Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. *Molecular Microbiology*, 51(6), 1601–1614. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2003.03945.x>
- Cabanes, D., Sousa, S., Cebriá, A., Lecuit, M., García-del Portillo, F., & Cossart, P. (2005). Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *The EMBO Journal*, 24(15), 2827–2838. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600750>
- Camilli, A. (2004). *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *Journal of Experimental Medicine*, 173(3), 751–754. <https://doi.org/10.1084/jem.173.3.751>
- Camilli, Andrew, Tilney, L. G., & Portnoy, D. A. (1993). Dual roles of plcA in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 8(1), 143–157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01211.x>
- Campillo-Navarro, M., Leyva-Paredes, K., Donis-Maturano, L., González-Jiménez, M., Paredes-Vivas, Y., Cebulo-Vázquez, A., Serafín-López, J., García-Pérez, B., Ullrich, S. E., Flores-Romo, L., Pérez-Tapia, S. M., Estrada-Parra, S., Estrada-García, I., & Chacón-Salinas, R. (2017). *Listeria monocytogenes* induces mast cell extracellular traps. *Immunobiology*, 222(2), 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2016.08.006>
- Carrero, J. A., Calderon, B., & Unanue, E. R. (2004). Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* Is a Lymphocyte Apoptogenic Molecule. *The Journal of Immunology*, 172(8), 4866–4874. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.8.4866>

-
- Casu, B., Naggi, A., & Torri, G. (2015). Re-visiting the structure of heparin. *Carbohydrate Research*, 403, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2014.06.023>
- Chakraborty, T., Ebel, F., Domann, E., Niebuhr, K., Gerstel, B., Pistor, S., Temm-Grove, C. J., Jockusch, B. M., Reinhard, M., & Walter, U. (1995). A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *The EMBO Journal*, 14(7), 1314–1321. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07117.x>
- 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. *Journal of Bacteriology*, 174(2), 568–574. <https://doi.org/10.1128/jb.174.2.568-574.1992>
- Chatterjee, S. S., Hossain, H., Otten, S., Kuenne, C., Kuchmina, K., Machata, S., Domann, E., Chakraborty, T., & Hain, T. (2006). Intracellular Gene Expression Profile of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 74(2), 1323–1338. <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.1323-1338.2006>
- Chen, C., Nguyen, B. N., Mitchell, G., Margolis, S. R., Ma, D., & Portnoy, D. A. (2018). The Listeriolysin O PEST-like Sequence Co-opts AP-2-Mediated Endocytosis to Prevent Plasma Membrane Damage during *Listeria* Infection. *Cell Host & Microbe*, 23(6), 786–795.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2018.05.006>
- Chen, Y., Götte, M., Liu, J., & Park, P. W. (2008). Microbial subversion of heparan sulfate proteoglycans. *Molecules and Cells*, 26(5), 415–426.
- Cheng, J., Goldstein, R., Gershenson, A., Stec, B., & Roberts, M. F. (2013). The cation- π box is a specific phosphatidylcholine membrane targeting motif. *Journal of Biological Chemistry*, 288(1), 14863–14873. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.466532>
- Coelho, C., Brown, L., Maryam, M., Vij, R., Smith, D. F. Q., Burnet, M. C., Kyle, J. E., Heyman, H. M., Ramirez, J., Prados-Rosales, R., Lauvau, G., Nakayasu, E. S., Brady, N. R., Hamacher-Brady, A., Coppens, I., & Casadevall, A. (2019). *Listeria monocytogenes* virulence factors, including listeriolysin O, are secreted in biologically active extracellular vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 294(4), 1202–1217. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006472>
- Cundell, D. R., Gerard, N. P., Gerard, C., Idanpaan-Heikkila, I., & Tuomanen, E. I. (1995). *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*, 377(6548), 435–438. <https://doi.org/10.1038/377435a0>
- Czuczman, M. A., Fattouh, R., Van Rijn, J. M., Canadien, V., Osborne, S., Muise, A. M., Kuchroo, V. K., Higgins, D. E., & Brumell, J. H. (2014). *Listeria monocytogenes* exploits efferocytosis to promote cell-to-cell spread. *Nature*, 509(7499), 230–234. <https://doi.org/10.1038/nature13168>
- Dacatur, A. L., & Portnoy, D. A. (2000). A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science*, 290(5493), 992–995. <https://doi.org/10.1126/science.290.5493.992>
- De Chastellier, C., & Berche, P. (1994). Fate of *Listeria monocytogenes* in murine macrophages: Evidence for simultaneous killing and survival of intracellular bacteria. *Infection and Immunity*, 62(2), 543–553.
- de las Heras, A., Cain, R. J., Bielecka, M. K., & Vázquez-Boland, J. A. (2011). Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology*, 14(2),

- De, S., Bubnys, A., Alonzo, F., Hyun, J., Lary, J. W., Cole, J. L., Torres, V. J., & Olson, R. (2015). The relationship between glycan binding and direct membrane interactions in *Vibrio cholerae* cytolysin, a channel-forming toxin. *Journal of Biological Chemistry*, 290(47), 28402–28415. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.675967>
- Devaux, P. F., & Morris, R. (2004). Transmembrane Asymmetry and Lateral Domains in Biological Membranes. *Traffic*, 5(4), 241–246. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2004.0170.x>
- Dewamitta, S. R., Nomura, T., Kawamura, I., Hara, H., Tsuchiya, K., Kurenuma, T., Shen, Y., Daim, S., Yamamoto, T., Qu, H., Sakai, S., Xu, Y., & Mitsuyama, M. (2010). Listeriolysin O-dependent bacterial entry into the cytoplasm is required for calpain activation and interleukin-1 α secretion in macrophages infected with *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 78(5), 1884–1894. <https://doi.org/10.1128/IAI.01143-09>
- Dickenson, N. E., Choudhari, S. P., Adam, P. R., Kramer, R. M., Joshi, S. B., Middaugh, C. R., Picking, W. L., & Picking, W. D. (2013). Oligomeric states of the *Shigella* translocator protein IpaB provide structural insights into formation of the type III secretion translocon. *Protein Science*, 22(5), 614–627. <https://doi.org/10.1002/pro.2245>
- Domann, E., Leimeister-Wachter, M., Goebel, W., & Chakraborty, T. (1991). Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infection and Immunity*, 59(1), 65–72.
- Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M., & Chakraborty, T. (1992). A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *The EMBO Journal*, 11(5), 1981–1990.
- Dowd, K. J., & Tweten, R. K. (2012). The cholesterol-dependent cytolysin signature motif: A critical element in the allosteric pathway that couples membrane binding to pore assembly. *PLoS Pathogens*, 8(7), e1002787. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002787>
- Draeger, A., & Babiychuk, E. B. (2013). Ceramide in Plasma Membrane Repair. In *Handbook of experimental pharmacology* (Issue 216, pp. 341–353). https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1511-4_17
- Dramsi, S., Bourdichon, F., Cabanes, D., Lecuit, M., Fsihi, H., & Cossart, P. (2004). FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. *Molecular Microbiology*, 53(2), 639–649. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04138.x>
- Dramsi, S., Lé VI, S., Triller, A., & Cossart, P. (1998). Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: An in vitro study. *Infection and Immunity*, 66(9), 4461–4468.
- Dramsi, Shaynoor, 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. *Molecular Microbiology*, 16(2), 251–261. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02297.x>
- Dramsi, Shaynoor, & Cossart, P. (2003). Listeriolysin O-mediated calcium influx potentiates entry of *Listeria monocytogenes* into the human Hep-2 epithelial cell line. *Infection and Immunity*, 71(6), 3614–3618. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.6.3614-3618.2003>

-
- Drevets, D. A., Sawyer, R. T., Potter, T. A., & Campbell, P. A. (1995). *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infection and Immunity*, 63(11), 4268–4276.
- Edelson, B. T., Li, Z., Pappan, L. K., & Zutter, M. M. (2004). Mast cell-mediated inflammatory responses require the $\alpha 2\beta 1$ integrin. *Blood*, 103(6), 2214–2220. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-08-2978>
- Edwards, J. L., Entz, D. D., & Apicella, M. A. (2003). Gonococcal Phospholipase D Modulates the Expression and Function of Complement Receptor 3 in Primary Cervical Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 71(11), 6381–6391. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.11.6381-6391.2003>
- Eitel, J., Suttorp, N., & Opitz, B. (2011). Innate immune recognition and inflammasome activation in *Listeria monocytogenes* infection. *Frontiers in Microbiology*, 1(149), eCollection 2010. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00149>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874. [https://doi.org/10.1016/0019-2791\(71\)90454-X](https://doi.org/10.1016/0019-2791(71)90454-X)
- Escoll, P., Song, O. R., Viana, F., Steiner, B., Lagache, T., Olivo-Marin, J. C., Impens, F., Brodin, P., Hilbi, H., & Buchrieser, C. (2017). *Legionella pneumophila* Modulates Mitochondrial Dynamics to Trigger Metabolic Repurposing of Infected Macrophages. *Cell Host and Microbe*, 22(3), 302–316.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.020>
- Etzaniz, A., González-Bullón, D., Martín, C., & Ostolaza, H. (2018). Membrane repair mechanisms against permeabilization by pore-forming toxins. *Toxins*, 10(6), pii: E234. <https://doi.org/10.3390/toxins10060234>
- Eylert, E., Schär, J., Mertins, S., Stoll, R., Bacher, A., Goebel, W., & Eisenreich, W. (2008). Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Molecular Microbiology*, 69(4), 1008–1017. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06337.x>
- Fadeel, B., & Xue, D. (2009). The ins and outs of phospholipid asymmetry in the plasma membrane: Roles in health and disease. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 44(5), 264–277. <https://doi.org/10.1080/10409230903193307>
- Farber, J. M., & Losos, J. Z. (1988). *Listeria monocytogenes*: a foodborne pathogen. *CMAJ: Canadian Medical Association Journal = Journal de l'Association Médicale Canadienne*, 138(5), 413–418. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3124948>
- Farrand, A. J., LaChapelle, S., Hotze, E. M., Johnson, A. E., & Tweten, R. K. (2010). Only two amino acids are essential for cytolysin recognition of cholesterol at the membrane surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(9), 4341–4346. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911581107>
- Farrand, S., Hotze, E., Friese, P., Hollingshead, S. K., Smith, D. F., Cummings, R. D., Dale, G. L., & Tweten, R. K. (2008). Characterization of a streptococcal cholesterol-dependent cytolysin with a Lewis y and b specific lectin domain. *Biochemistry*, 47(27), 7097–7107. <https://doi.org/10.1021/bi8005835>
- Fatmawati, N. N. D., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Oda, M., Shimizu, K., Yamamoto, Y., Sakurai, J., Matsushita, O., & Oguma, K. (2013). Phospholipase C Produced by *Clostridium botulinum* Types C and D: Comparison of Gene, Enzymatic, and Biological

-
- Activities with Those of *Clostridium perfringens* Alpha-toxin. *Acta Medica Okayama*, 67(1), 9–18. <https://doi.org/10.18926/AMO/49252>
- Feil, S. C., Ascher, D. B., Kuiper, M. J., Tweten, R. K., & Parker, M. W. (2014). Structural studies of *Streptococcus pyogenes* streptolysin O provide insights into the early steps of membrane penetration. *Journal of Molecular Biology*, 426(4), 785–792. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.11.020>
- Feil, S. C., Lawrence, S., Mulhern, T. D., Holien, J. K., Hotze, E. M., Farrand, S., Tweten, R. K., & Parker, M. W. (2012). Structure of the lectin regulatory domain of the cholesterol-dependent cytolysin lectinolysin reveals the basis for its lewis antigen specificity. *Structure*, 20(2), 248–258. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.11.017>
- Flores-Díaz, M., Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Girón, A., & Flieger, A. (2016). Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 597–628. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00082-15>
- Flores-Díaz, M., Thelestam, M., Clark, G. C., Titball, R. W., & Alape-Girón, A. (2004). Effects of *Clostridium perfringens* phospholipase C in mammalian cells. *Anaerobe*, 10(2), 115–123. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2003.11.002>
- Forsberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L., & Kjellén, L. (1999). Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. *Nature*, 400(6746), 773–776. <https://doi.org/10.1038/23488>
- Forster, B. M., Bitar, A. P., Slepokov, E. R., Kota, K. J., Sondermann, H., & Marquis, H. (2011). The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is regulated by pH. *Journal of Bacteriology*, 193(19), 5090–5097. <https://doi.org/10.1128/JB.05134-11>
- Gaertner, F., Ahmad, Z., Rosenberger, G., Fan, S., Nicolai, L., Busch, B., Yavuz, G., Luckner, M., Ishikawa-Ankerhold, H., Hennel, R., Benechet, A., Lorenz, M., Chandraratne, S., Schubert, I., Helmer, S., Striednig, B., Stark, K., Janko, M., Böttcher, R. T., ... Massberg, S. (2017). Migrating Platelets Are Mechano-scavengers that Collect and Bundle Bacteria. *Cell*, 171(6), 1368-1382.e23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.001>
- Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, C., Gouln, 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. *Cell*, 65(7), 1127–1141. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90009-N](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90009-N)
- 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. *Infection and Immunity*, 55(11), 2822–2829. <https://doi.org/10.1093/infdis/55.11.2822>
- Gandhi, A. J., Perussia, B., & Goldfine, H. (1993). *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol (PI)-specific phospholipase C has low activity on glycosyl-PI-anchored proteins. *Journal of Bacteriology*, 175(24), 8014–8017. <https://doi.org/10.1128/jb.175.24.8014-8017.1993>
- Gareau, J. R., & Lima, C. D. (2010). The SUMO pathway: Emerging mechanisms that shape specificity, conjugation and recognition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(12), 861–871. <https://doi.org/10.1038/nrm3011>

-
- 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*. *Infection and Immunity*, 68(2), 999–1003. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.2.999-1003.2000>
- Geissner, A., Anish, C., & Seeberger, P. H. (2014). Glycan arrays as tools for infectious disease research. *Current Opinion in Chemical Biology*, 18, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.11.013>
- Gekara, N. O., & Weiss, S. (2008). Mast cells initiate early anti-*Listeria* host defences. *Cellular Microbiology*, 10(1), 225–236. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01033.x>
- Gekara, N. O., Westphal, K., Ma, B., Rohde, M., Groebe, L., & Weiss, S. (2007). The multiple mechanisms of Ca²⁺ signalling by listeriolysin O, the cholesterol-dependent cytolysin of *Listeria monocytogenes*. *Cellular Microbiology*, 9(8), 2008–2021. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00932.x>
- 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*. *Infection and Immunity*, 55(7), 1641–1646. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.08.015>
- Geoffroy, C., Raveneau, J., Beretti, J.-L., Lecroisey, A., Vázquez-Boland, J.-A., Alouf, J. E., & Berche, P. (1991). Purification and Characterization of an Extracellular 29-Kilodalton Phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 59(7), 2382–2388.
- Gerke, V., Creutz, C. E., & Moss, S. E. (2005). Annexins: Linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(6), 449–461. <https://doi.org/10.1038/nrm1661>
- Gessain, G., Disson, O., & Lecuit, M. (2016). PI3-kinase activation is critical for host barrier permissiveness to *Listeria monocytogenes*. *Medecine/Sciences*, 32(6–7), 557–560. <https://doi.org/10.1051/medsci/20163206010>
- Giddings, K. S., Johnson, A. E., & Tweten, R. K. (2003). Redefining cholesterol's role in the mechanism of the cholesterol-dependent cytolysins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11315–11320. <https://doi.org/10.1073/pnas.2033520100>
- Giddings, K. S., Zhao, J., Sims, P. J., & Tweten, R. K. (2004). Human CD59 is a receptor for the cholesterol-dependent cytolysin intermedilysin. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(12), 1173–1178. <https://doi.org/10.1038/nsmb862>
- Gillmaier, N., Götz, A., Schulz, A., Eisenreich, W., & Goebel, W. (2012). Metabolic Responses of Primary and Transformed Cells to Intracellular *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE*, 7(12), e52378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052378>
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., Daruvar, A. de, Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., ... Cossart, P. (2001). Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science*, 294(5543), 849–852. <https://doi.org/10.1126/science.1063447>
- Glomski, I. J., Decatur, A. L., & Portnoy, D. A. (2003). *Listeria monocytogenes* Mutants That Fail To Compartmentalize Listeriolysin O Activity Are Cytotoxic, Avirulent, and Unable To Evade Host Extracellular Defenses. *Infection and Immunity*, 71(12), 6754–6765. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.12.6754-6765.2003>

-
- Goldenberg, H. B., McCool, T. L., & Weiser, J. N. (2004). Cross-Reactivity of Human Immunoglobulin G2 Recognizing Phosphorylcholine and Evidence for Protection against Major Bacterial Pathogens of the Human Respiratory Tract. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(7), 1254–1263. <https://doi.org/10.1086/424517>
- Goldfine, H., Johnston, N. C., & Knob, C. (1993). Nonspecific phospholipase C of *Listeria monocytogenes*: activity on phospholipids in Triton X-100-mixed micelles and in biological membranes. *Journal of Bacteriology*, 175(14), 4298–4306. <https://doi.org/10.1128/jb.175.14.4298-4306.1993>
- Goldfine, H., & Knob, C. (1992). Purification and characterization of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Infection and Immunity*, 60(10), 4059–4067.
- Goldfine, Howard, & Wadsworth, S. J. (2002). Macrophage intracellular signaling induced by *Listeria monocytogenes*. *Microbes and Infection*, 4(13), 1335–1343. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(02\)00011-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)00011-4)
- Görlach, A., Bertram, K., Hudecova, S., & Krizanova, O. (2015). Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biology*, 6, 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.010>
- Gouaux, E. (1997). Channel-forming toxins: tales of transformation. *Current Opinion in Structural Biology*, 7(4), 566–573. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(97\)80123-6](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(97)80123-6)
- Griffith, O. H., & Ryan, M. (1999). Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: Structure, function, and interaction with lipids. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1441(2–3), 237–254. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00153-5](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00153-5)
- Guzman, C. A., Rohde, M., Chakraborty, T., Domann, E., Hudel, M., Wehland, J., & Timmis, K. N. (1995). Interaction of *Listeria monocytogenes* with Mouse Dendritic Cells. *Infection and Immunity*, 63(9), 3665–3673.
- Hamon, M. A., Batsché, E., Régnault, B., Tham, T. N., Seveau, S., Muchardt, C., & Cossart, P. (2007). Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(33), 13467–13472. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702729104>
- Hamon, M. A., & Cossart, P. (2011). K⁺ Efflux Is Required for Histone H3 Dephosphorylation by *Listeria monocytogenes* Listeriolysin O and Other Pore-Forming Toxins. *Infection and Immunity*, 79(7), 2839–2846. <https://doi.org/10.1128/iai.01243-10>
- Hamon, M. A., Ribet, D., Stavru, F., & Cossart, P. (2012). Listeriolysin O: The Swiss army knife of *Listeria*. *Trends in Microbiology*, 20(8), 360–368. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.006>
- Hanna, V. S., & Hafez, E. A. A. (2018). Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *Journal of Advanced Research*, 11, 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.005>
- Hannah, J. H., Menozzi, F. D., Renauld, G., Locht, C., & Brennan, M. J. (1994). Sulfated glycoconjugate receptors for the *Bordetella pertussis* adhesin filamentous hemagglutinin (FHA) and mapping of the heparin-binding domain on FHA. *Infection and Immunity*, 62(11), 5010–5019.
- Hartl, F. U., Bracher, A., & Hayer-Hartl, M. (2011). Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*, 475(7356), 324–332. <https://doi.org/10.1038/nature10317>
- Harvey, P. C., & Faber, J. E. (1941). Studies on the Listerella Group: I. Biochemical and

Hemolytic Reactions. *Journal of Bacteriology*, 42(5), 677–687.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16560479>

- Hauf, N., Goebel, W., Fiedler, F., Sokolovic, Z., & Kuhn, M. (1997). *Listeria monocytogenes* infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF-kappaB (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by IkappaBalpha and IkappaBbeta degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17), 9394–9399. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.17.9394>
- Heffernan, B. J., Thomason, B., Herring-Palmer, A., Shaughnessy, L., McDonald, R., Fisher, N., Huffnagle, G. B., & Hanna, P. (2006). *Bacillus anthracis* Phospholipases C Facilitate Macrophage-Associated Growth and Contribute to Virulence in a Murine Model of Inhalation Anthrax. *Infection and Immunity*, 74(7), 3756–3764. <https://doi.org/10.1128/IAI.00307-06>
- Hergott, C. B., Roche, A. M., Naidu, N. A., Mesaros, C., Blair, I. A., & Weiser, J. N. (2015). Bacterial exploitation of phosphorylcholine mimicry suppresses inflammation to promote airway infection. *Journal of Clinical Investigation*, 125(10), 3878–3890. <https://doi.org/10.1172/JCI81888>
- Heuck, A. P., Moe, P. C., & Johnson, B. B. (2010). The cholesterol-dependent cytolysin family of Gram-positive bacterial toxins. *Sub-Cellular Biochemistry*, 51, 551–577. https://doi.org/10.1007/978-90-481-8622-8_20
- Hodnik, V., & Anderluh, G. (2009). Toxin detection by surface plasmon resonance. *Sensors*, 9(3), 1339–1354. <https://doi.org/10.3390/s9031339>
- Hotze, E. M., Le, H. M., Sieber, J. R., Bruxvoort, C., McInerney, M. J., & Tweten, R. K. (2013). Identification and characterization of the first cholesterol-dependent cytolysins from gram-negative bacteria. *Infection and Immunity*, 81(1), 216–225. <https://doi.org/10.1128/IAI.00927-12>
- Hotze, E. M., & Tweten, R. K. (2012). Membrane assembly of the cholesterol-dependent cytolysin pore complex. In *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1818, Issue 4, pp. 1028–1038). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.036>
- Hough, E., Hansen, L. K., Birknes, B., Jynge, K., Hansen, S., Hordvik, A., Little, C., Dodson, E., & Derewenda, Z. (1989). High-resolution (1.5 Å) crystal structure of phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Nature*, 338(6213), 357–360. <https://doi.org/10.1038/338357a0>
- Hrtska, S. C. L., Kemp, M. M., Muñoz, E. M., Azizad, O., Banerjee, M., Raposo, C., Kumaran, J., Ghosh, P., & Linhardt, R. J. (2007). Investigation of the mechanism of binding between internalin B and heparin using surface plasmon resonance. *Biochemistry*, 46(10), 2697–2706. <https://doi.org/10.1021/bi062021x>
- Hubert, R., & Thomas, L. (2011). *Der Experimentator Proteomics* (6th ed.). Spektrum Akademischer Verlag.
- Humphries, D. E., Wong, G. W., Friend, D. S., Gurish, M. F., Qiu, W. T., Huang, C., Sharpe, A. H., & Stevens, R. L. (1999). Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature*, 400(6746), 769–772. <https://doi.org/10.1038/23481>
- Idone, V., Tam, C., Goss, J. W., Toomre, D., Pypaert, M., & Andrews, N. W. (2008). Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *The Journal of Cell Biology*, 180(5), 905–914. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708010>
- Ilcol, Y. O., Uncu, G., & Ulus, I. H. (2002). Free and Phospholipid-Bound Choline Concentrations in Serum during Pregnancy, after Delivery and in Newborns. *Archives of*

- Isaacs, R. D. (1994). *Borrelia burgdorferi* bind to epithelial cell proteoglycans. *Journal of Clinical Investigation*, 93(2), 809–819. <https://doi.org/10.1172/JCI117035>
- Jacobs, A. C., Hood, I., Boyd, K. L., Olson, P. D., Morrison, J. M., Carson, S., Sayood, K., Iwen, P. C., Skaar, E. P., & Dunman, P. M. (2010). Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infection and Immunity*, 78(5), 1952–1962. <https://doi.org/10.1128/IAI.00889-09>
- Jacobs, T., Darji, A., Frahm, N., Rohde, M., Wehland, J., Chakraborty, T., & Weiss, S. (1998). Listeriolysin O: cholesterol inhibits cytolysis but not binding to cellular membranes. *Molecular Microbiology*, 28(6), 1081–1089. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00858.x>
- Jagadeesan, B., Fleishman Littlejohn, A. E., Amalaradjou, M. A. R., Singh, A. K., Mishra, K. K., La, D., Kihara, D., & Bhunia, A. K. (2011). N-Terminal Gly224–Gly411 Domain in *Listeria* Adhesion Protein Interacts with Host Receptor Hsp60. *PLoS ONE*, 6(6), e20694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020694>
- Jenkins, E. M., Njoku-Obi, A. N., & Adams, E. W. (1964). Purification of the Soluble Hemolysins of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology*, 88, 418–424.
- Jimenez, A. J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., & Perez, F. (2014). ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science*, 343(6174), 1247136. <https://doi.org/10.1126/science.1247136>
- Jobbings, C. E., Sandig, H., Whittingham-Dowd, J. K., Roberts, I. S., & Bulfone-Paus, S. (2013). *Listeria monocytogenes* Alters Mast Cell Phenotype, Mediator and Osteopontin Secretion in a Listeriolysin-Dependent Manner. *PLoS ONE*, 8(2), e57102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057102>
- Jonquières, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P., & Cossart, P. (1999). Interaction between the protein InIB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: A novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 34(5), 902–914. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01652.x>
- Kayal, S., Lilienbaum, A., Poyart, C., Memet, S., Israel, A., & Berche, P. (1999). Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: Activation of NF- κ B and upregulation of adhesion molecules and chemokines. *Molecular Microbiology*, 31(6), 1709–1722. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01305.x>
- Kenny, J. J., Moratz, C. M., Guelde, G., O'Connell, C. D., George, J., Dell, C., Penner, S. J., Weber, J. S., Berry, J., & Claflin, J. L. (1992). Antigen binding and idiotype analysis of antibodies obtained after electroporation of heavy and light chain genes encoding phosphocholine-specific antibodies: a model for T15-idiotype dominance. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(6), 1637–1643. <https://doi.org/10.1084/jem.176.6.1637>
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Kim, S., Bauernfeind, F., Ablasser, A., Hartmann, G., Fitzgerald, K. A., Latz, E., & Hornung, V. (2010). *Listeria monocytogenes* is sensed by the NLRP3 and AIM2 inflammasome. *European Journal of Immunology*, 40(6), 1545–1551.

<https://doi.org/10.1002/eji.201040425>

- Kingdon, G. C., & Sword, C. P. (1970). Effects of *Listeria monocytogenes* Hemolysin on Phagocytic Cells and Lysosomes. *Infection and Immunity*, 1(4), 356–362.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., & Cossart, P. (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell*, 68(3), 521–531. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90188-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90188-I)
- Köster, S., van Pee, K., Hudel, M., Leustik, M., Rhinow, D., Kühlbrandt, W., Chakraborty, T., & Yildiz, Ö. (2014). Crystal structure of listeriolysin O reveals molecular details of oligomerization and pore formation. *Nature Communications*, 5, 3690. <https://doi.org/10.1038/ncomms4690>
- Krawczyk-Balska, A., & Bielecki, J. (2005). *Listeria monocytogenes* listeriolysin O and phosphatidylinositol-specific phospholipase C affect adherence to epithelial cells. *Canadian Journal of Microbiology*, 51(9), 745–751. <https://doi.org/10.1139/W05-058>
- Kuhn, M., Kathariou, S., & Goebel, W. (1988). Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 56(1), 79–82.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A., Braun, M., Brignell, S. C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C. V., Caldwell, B., ... Danchin, A. (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657), 249–256. <https://doi.org/10.1038/36786>
- La Pietra, L., Hudel, M., Pillich, H., Abu Mraheil, M., Berisha, B., Aden, S., Hodnik, V., Lochnit, G., Rafiq, A., Perniss, A., Anderluh, G., & Chakraborty, T. (2020). Phosphocholine antagonizes listeriolysin O-induced host cell responses of *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Infectious Diseases*, 22(9), 1505–1516. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa022>
- Lam, G. Y., Fattouh, R., Muise, A. M., Grinstein, S., Higgins, D. E., & Brumell, J. H. (2011). Listeriolysin O suppresses phospholipase c-mediated activation of the microbicidal NADPH oxidase to promote *Listeria monocytogenes* infection. *Cell Host and Microbe*, 10(6), 627–634. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.11.005>
- Lam, J. G. T., Vadia, S., Pathak-Sharma, S., McLaughlin, E., Zhang, X., Swanson, J., & Seveau, S. (2018). Host cell perforation by listeriolysin O (LLO) activates a Ca²⁺-dependent cPKC/Rac1/Arp2/3 signaling pathway that promotes *Listeria monocytogenes* internalization independently of membrane resealing. *Molecular Biology of the Cell*, 29(3), 270–284. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-09-0561>
- 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*. *Molecular Microbiology*, 5(2), 361–366. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02117.x>
- Leung, C., Dudkina, N. V., Lukoyanova, N., Hodel, A. W., Farabella, I., Pandurangan, A. P., Jahan, N., Pires Damaso, M., Osmanović, D., Reboul, C. F., Dunstone, M. A., Andrew, P. W., Lonnen, R., Topf, M., Saibil, H. R., & Hoogenboom, B. W. (2014). Stepwise visualization of membrane pore formation by sulilysin, a bacterial cholesterol-dependent cytolysin. *ELife*, 3, e04247. <https://doi.org/10.7554/eLife.04247>
- Levan, S., De, S., & Olson, R. (2013). *Vibrio cholerae* cytolysin recognizes the

-
- heptasaccharide core of complex N-glycans with nanomolar affinity. *Journal of Molecular Biology*, 425(5), 944–957. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.12.016>
- Li, J., Lam, W. W. ling, Lai, T. wah, & Au, S. W. ngor. (2017). Degradation of nuclear Ubc9 induced by listeriolysin O is dependent on K⁺ efflux. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(2), 1115–1121. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.051>
- Li, X., Yu, Y., Gorshkov, B., Haigh, S., Bordan, Z., Weintraub, D., Rudic, R. D., Chakraborty, T., Barman, S. A., Verin, A. D., Su, Y., Lucas, R., Stepp, D. W., Chen, F., & Fulton, D. J. R. (2018). Hsp70 suppresses mitochondrial reactive oxygen species and preserves pulmonary microvascular barrier integrity following exposure to bacterial toxins. *Frontiers in Immunology*, 9, 1309. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01309>
- Lieberman, R. (2004). Genetics of a new IgVH (T15 idotype) marker in the mouse regulating natural antibody to phosphorylcholine. *Journal of Experimental Medicine*, 139(4), 983–1001. <https://doi.org/10.1084/jem.139.4.983>
- Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J., & Chakraborty, T. (1995). Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infection and Immunity*, 63(10), 3896–3903.
- Lucas, R., Sridhar, S., Rick, F. G., Gorshkov, B., Umapathy, N. S., Yang, G., Oseghale, A., Verin, A. D., Chakraborty, T., Matthay, M. A., Zemskov, E. A., White, R., Block, N. L., & Schally, A. V. (2012). Agonist of growth hormone-releasing hormone reduces pneumolysin-induced pulmonary permeability edema. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6), 2084–2089. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121075109>
- Lysenko, E., Richards, J. C., Cox, A. D., Stewart, A., Martin, A., Kapoor, M., & Weiser, J. N. (2000). The position of phosphorylcholine on the lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae* affects binding and sensitivity to C-reactive protein-mediated killing. *Molecular Microbiology*, 35(1), 234–245. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01707.x>
- Macfarlane, M. G., & Knight, B. C. (1941). The biochemistry of bacterial toxins: The lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *The Biochemical Journal*, 35(8–9), 884–902. <https://doi.org/10.1042/bj0350884>
- Machata, S., Tchatalbachev, S., Mohamed, W., Jänsch, L., Hain, T., & Chakraborty, T. (2008). Lipoproteins of *Listeria monocytogenes* are critical for virulence and TLR2-mediated immune activation. *The Journal of Immunology*, 181(3), 2028–2035. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.3.2028>
- Marmorek, A. (1902). La Toxine Streptococcique. *Ann. Inst. Pasteur*, 16, 169–178.
- Marquis, H., Doshi, V., & Portnoy, D. A. (1995). The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infection and Immunity*, 63(11), 4531–4534.
- Marquis, Hélène, Goldfine, H., & Portnoy, D. A. (1997). Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *Journal of Cell Biology*, 137(6), 1381–1392. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.6.1381>
- Marquis, Hélène, & Hager, E. J. (2000). pH-regulated activation and release of a bacteria-

-
- associated phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 35(2), 289–298. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01708.x>
- Martins, M., Custódio, R., Camejo, A., Almeida, M. T., Cabanes, D., & Sousa, S. (2012). *Listeria monocytogenes* Triggers the Cell Surface Expression of Gp96 Protein and Interacts with Its N Terminus to Support Cellular Infection. *Journal of Biological Chemistry*, 287(51), 43083–43093. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.422568>
- Maurer, J., Hupp, S., Pillich, H., Mitchell, T. J., Chakraborty, T., & Iliev, A. I. (2018). Missing elimination via membrane vesicle shedding contributes to the diminished calcium sensitivity of listeriolysin O. *Scientific Reports*, 8(1), 15846. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34031-4>
- McCall-Culbreath, K. D., Li, Z., & Zutter, M. M. (2008). Crosstalk between the alpha2beta1 integrin and c-met/HGF-R regulates innate immunity. *Blood*, 111(7), 3562–3570. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-08-107664>
- McDougal, C. E., & Sauer, J. D. (2018). *Listeria monocytogenes*: The impact of cell death on infection and immunity. *Pathogens*, 7(1), 8. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010008>
- McNeil, A. K., Rescher, U., Gerke, V., & McNeil, P. L. (2006). Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *Journal of Biological Chemistry*, 281(46), 35202–35207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606406200>
- Meixenberger, K., Pache, F., Eitel, J., Schmeck, B., Hippenstiel, S., Slevogt, H., N'Guessan, P., Witzenrath, M., Netea, M. G., Chakraborty, T., Suttorp, N., & Opitz, B. (2010). *Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1beta, depending on listeriolysin O and NLRP3. *J Immunol*, 184(2), 922–930. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901346> [pii]
- Mengaud, J., Braun-Breton, C., & Cossart, P. (1991). Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Molecular Microbiology*, 5(2), 367–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02118.x>
- Mengaud, J., Dramsi, S., Gouin, E., Vázquez-Boland, J. A., Milon, G., & Cossart, P. (1991). Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Molecular Microbiology*, 5(9), 2273–2283. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02158.x>
- Mengaud, J., Geoffroy, C., & Cossart, P. (1991). Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: Its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infection and Immunity*, 59(3), 1043–1049.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., R-M, M., & Cossart, P. (1996). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*, 84(6), 923–932.
- Mengaud, J., Vicente, M. F., & Cossart, P. (1989). Transcriptional mapping and nucleotide sequence of the *Listeria monocytogenes* hlyA region reveal structural features that may be involved in regulation. *Infection and Immunity*, 57(12), 3695–3701.
- Mesquita, F. S., Brito, C., Cabanes, D., & Sousa, S. (2017). Control of cytoskeletal dynamics during cellular responses to pore forming toxins. *Communicative and Integrative Biology*, 10(5–6), e1349582. <https://doi.org/10.1080/19420889.2017.1349582>
- Mesquita, F. S., Brito, C., Mazon Moya, M. J., Pinheiro, J. C., Mostowy, S., Cabanes, D., &

-
- Sousa, S. (2017). Endoplasmic reticulum chaperone Gp96 controls actomyosin dynamics and protects against pore-forming toxins. *EMBO Reports*, 18(2), 303–318. <https://doi.org/10.15252/embr.201642833>
- Meyer-Morse, N., Robbins, J. R., Rae, C. S., Mohegova, S. N., Swanson, M. S., Zhao, Z., Virgin, H. W., & Portnoy, D. (2010). Listeriolysin O is necessary and sufficient to induce autophagy during *Listeria monocytogenes* infection. *PLoS ONE*, 5(1), e8610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008610>
- Milohanic, E., Jonquières, R., Cossart, P., Berche, P., & Gaillard, J. L. (2001). The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria monocytogenes* to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1212–1224. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02208.x>
- Mold, C., Du Clos, T. W., Nakayama, S., Edwards, K. M., & Gewurz, H. (1982). C-reactive protein reactivity with complement and effects on phagocytosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 389, 251–262. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1982.tb22141.x>
- Monastyrskaya, K., Babiychuk, E. B., Draeger, A., & Burkhard, F. C. (2013). Down-regulation of annexin A1 in the urothelium decreases cell survival after bacterial toxin exposure. *Journal of Urology*, 190(1), 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.01.088>
- Monk, I. R., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2008). Tools for Functional Postgenomic Analysis of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(13), 3921–3934. <https://doi.org/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*. *Infection and Immunity*, 6(1), 131–139.
- Moser, J., Gerstel, B., Meyer, J. E. W., Chakraborty, T., Wehland, J., & Heinz, D. W. (1997). Crystal structure of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C from the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Journal of Molecular Biology*, 273(1), 269–282. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1997.1290>
- Mottarella, S. E., Beglov, D., Beglova, N., Nugent, M. A., Kozakov, D., & Vajda, S. (2014). Docking server for the identification of heparin binding sites on proteins. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(7), 2068–2078. <https://doi.org/10.1021/ci500115j>
- Mukherjee, S., Liu, X., Arasaki, K., McDonough, J., Galán, J. E., & Roy, C. R. (2011). Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase. *Nature*, 477(7362), 103–106. <https://doi.org/10.1038/nature10335>
- Mulvihill, E., Van Pee, K., Mari, S. A., Müller, D. J., & Yildiz, Ö. (2015). Directly Observing the Lipid-Dependent Self-Assembly and Pore-Forming Mechanism of the Cytolytic Toxin Listeriolysin O. *Nano Letters*, 15(10), 6965–6973. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.5b02963>
- Muñoz, E. M., & Linhardt, R. J. (2004). Heparin-binding domains in vascular biology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(9), 1549–1557. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000137189.22999.3f>
- Myers, J. T., Tsang, A. W., & Swanson, J. A. (2003). Localized Reactive Oxygen and Nitrogen Intermediates Inhibit Escape of *Listeria monocytogenes* from Vacuoles in Activated Macrophages. *The Journal of Immunology*, 171(10), 5447–5453.

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.10.5447>

- Naylor, C. E., Eaton, J. T., Howells, A., Justin, N., Moss, D. S., Titball, R. W., & Basak, A. K. (1998). Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nature Structural and Molecular Biology*, 5(8), 738–746. <https://doi.org/10.1038/1447>
- Njoku-Obi, A. N., Jenkins, E. M., Njoku-Obi, J. C., Adams, J., & Covington, V. (1963). Production and Nature of *Listeria monocytogenes* Hemolysins. *Journal of Bacteriology*, 86, 1–8.
- Olson, R., Nariya, H., Yokota, K., Kamio, Y., & Gouaux, E. (1999). Crystal structure of staphylococcal lukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel. *Nature Structural Biology*, 6(2), 134–140. <https://doi.org/10.1038/5821>
- Onishi, A., St Ange, K., Dordick, J. S., & Linhardt, R. J. (2016). Heparin and anticoagulation. *Frontiers in Bioscience*, 21, 1372–1392. <https://doi.org/10.2741/4462>
- Osborne, S. E., & Brumell, J. H. (2017). Listeriolysin O: From bazooka to Swiss army knife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1726), 1–10. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0222>
- Pägelow, D., Chhatbar, C., Beineke, A., Liu, X., Nerlich, A., van Vorst, K., Rohde, M., Kalinke, U., Förster, R., Halle, S., Valentin-Weigand, P., Hornef, M. W., & Fulde, M. (2018). The olfactory epithelium as a port of entry in neonatal neurolisteriosis. *Nature Communications*, 9(1), 4269. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06668-2>
- Palmer, M., Harris, R., Freytag, C., Kehoe, M., Tranum-Jensen, J., & Bhakdi, S. (1998). Assembly mechanism of the oligomeric streptolysin O pore: The early membrane lesion is lined by a free edge of the lipid membrane and is extended gradually during oligomerization. *EMBO Journal*, 17(6), 1598–1605. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.6.1598>
- Paluck, S. J., Nguyen, T. H., & Maynard, H. D. (2016). Heparin-Mimicking Polymers: Synthesis and Biological Applications. *Biomacromolecules*, 17(11), 3417–3440. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01147>
- Peraro, M. D., & Van Der Goot, F. G. (2016). Pore-forming toxins: Ancient, but never really out of fashion. *Nature Reviews Microbiology*, 14(2), 77–92. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.3>
- Pillich, H., Loose, M., Zimmer, K.-P., & Chakraborty, T. (2012). Activation of the unfolded protein response by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol*, 14(6), 949–964. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01769.x>
- Pinton, P., Giorgi, C., Siviero, R., Zecchini, E., & Rizzuto, R. (2008). Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis. *Oncogene*, 27(50), 6407–6418. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.308>
- Polekhina, G., Giddings, K. S., Tweten, R. K., & Parker, M. W. (2005). Insights into the action of the superfamily of cholesterol-dependent cytolysins from studies of intermedilysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(3), 600–605. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403229101>
- Portman, J. L., Huang, Q., Reniere, M. L., Iavarone, A. T., & Portnoy, D. A. (2017a). Activity of the Pore-Forming Virulence Factor Listeriolysin O Is Reversibly Inhibited by Naturally Occurring S-Glutathionylation. *Infection and Immunity*, 85(4), pii: e00959-16. <https://doi.org/10.1128/iai.00959-16>

-
- Portman, J. L., Huang, Q., Reniere, M. L., Iavarone, A. T., & Portnoy, D. A. (2017b). Activity of the pore-forming virulence factor listeriolysin O is reversibly inhibited by naturally occurring Sglutathionylation. *Infection and Immunity*, 85(4), pii: e00959-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00959-16>
- Portnoy, D. A., Tweten, R. K., Kehoe, M., & Bielecki, J. (1992). Capacity of listeriolysin O, streptolysin O, and perfringolysin O to mediate growth of *Bacillus subtilis* within mammalian cells. *Infection and Immunity*, 60(7), 2710–2717.
- Potez, S., Luginbühl, M., Monastyrskaya, K., Hostettler, A., Draeger, A., & Babiychuk, E. B. (2011). Tailored protection against plasmalemmal injury by annexins with different Ca²⁺ sensitivities. *Journal of Biological Chemistry*, 286(20), 17982–17991. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.187625>
- Poussin, M. A., Leitges, M., & Goldfine, H. (2009). The ability of *Listeria monocytogenes* PI-PLC to facilitate escape from the macrophage phagosome is dependent on host PKC β . *Microbial Pathogenesis*, 46(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.09.008>
- 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. *Infection and Immunity*, 61(4), 1576–1580.
- Prasadarao, N. V., Srivastava, P. K., Rudrabhatla, R. S., Kim, K. S., Huang, S. H., & Sukumaran, S. K. (2003). Cloning and expression of the *Escherichia coli* K1 outer membrane protein a receptor, a gp96 homologue. *Infection and Immunity*, 71(4), 1680–1688. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.1680-1688.2003>
- Prevot, A. R. (1950). Hémolysines et antihémolysines bactériennes. *Le Sang*, 21(6), 565–587.
- Promadej, N., Fiedler, F., Cossart, P., Dramsi, S., & Kathariou, S. (1999). Cell wall teichoic acid glycosylation in *Listeria monocytogenes* serotype 4b requires gtcA, a novel, serogroup-specific gene. *Journal of Bacteriology*, 181(2), 418–425.
- Puri, M., La Pietra, L., Mraheil, M. A., Lucas, R., Chakraborty, T., & Pillich, H. (2017). Listeriolysin O regulates the expression of optineurin, an autophagy adaptor that inhibits the growth of *Listeria monocytogenes*. *Toxins*, 9(9), pii: E273. <https://doi.org/10.3390/toxins9090273>
- Py, B. F., Lipinski, M. M., & Yuan, J. (2007). Autophagy limits *Listeria monocytogenes* intracellular growth in the early phase of primary infection. *Autophagy*, 3(2), 117–125. <https://doi.org/10.4161/auto.3618>
- Rabenstein, D. L. (2002). Heparin and heparan sulfate: Structure and function. *Natural Product Reports*, 19(3), 312–331. <https://doi.org/10.1039/b100916h>
- Radoshevich, L., & Cossart, P. (2018). *Listeria monocytogenes*: Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 16(1), 32–46. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126>
- Ramachandran, R., Heuck, A. P., Tweten, R. K., & Johnson, A. E. (2002). Structural insights into the membrane-anchoring mechanism of a cholesterol-dependent cytolysin. *Nature Structural Biology*, 9(11), 823–827. <https://doi.org/10.1038/nsb855>
- Rathinam, V. A. K., Jiang, Z., Waggoner, S. N., Sharma, S., Cole, L. E., Waggoner, L., Vanaja, S. K., Monks, B. G., Ganesan, S., Latz, E., Hornung, V., Vogel, S. N., Szomolanyi-Tsuda, E., & Fitzgerald, K. A. (2010). The AIM2 inflammasome is essential

-
- for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses. *Nature Immunology*, 11(5), 395–402. <https://doi.org/10.1038/ni.1864>
- Raveneau, J., Geoffroy, C., Beretti, J. L., Gaillard, J. L., Alouf, J. E., & Berche, P. (1992). Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. *Infection and Immunity*, 60(3), 916–921.
- Rechsteiner, M., & Rogers, S. W. (1996). PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(7), 267–271. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)10031-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)10031-1)
- Reddy, M. A., Prasadarao, N. V., Wass, C. A., & Kim, K. S. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase activation and interaction with focal adhesion kinase in *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36769–36774. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007382200>
- Réglier-Poupet, H., Pellegrini, E., Charbit, A., & Berche, P. (2003). Identification of LpeA, a PsaA-like membrane protein that promotes cell entry by *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 71(1), 474–482. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.474-482.2003>
- Reis, O., Sousa, S., Camejo, A., Villiers, V., Gouin, E., Cossart, P., & Cabanes, D. (2010). LapB, a Novel *Listeria monocytogenes* LPXTG Surface Adhesin, Required for Entry into Eukaryotic Cells and Virulence. *The Journal of Infectious Diseases*, 202(4), 551–562. <https://doi.org/10.1086/654880>
- Reniere, M. L., Whiteley, A. T., Hamilton, K. L., John, S. M., Lauer, P., Brennan, R. G., & Portnoy, D. A. (2015). Glutathione activates virulence gene expression of an intracellular pathogen. *Nature*, 517(7533), 170–173. <https://doi.org/10.1038/nature14029>
- Repp, H., Pamukçi, Z., Koschinski, A., Domann, E., Darji, A., Birringer, J., Brockmeier, D., Chakraborty, T., & Dreyer, F. (2002). Listeriolysin of *Listeria monocytogenes* forms Ca²⁺-permeable pores leading to intracellular Ca²⁺ oscillations. *Cellular Microbiology*, 4(8), 483–491. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00207.x>
- Rezelj, S., Kozorog, M., Švigelj, T., Ulrih, N. P., Žnidaršič, N., Podobnik, M., & Anderluh, G. (2018). Cholesterol Enriched Archaeosomes as a Molecular System for Studying Interactions of Cholesterol-Dependent Cytolysins with Membranes. *Journal of Membrane Biology*, 251(3), 491–505. <https://doi.org/10.1007/s00232-018-0018-y>
- Ribet, D., Hamon, M., Gouin, E., Nahori, M. A., Impens, F., Neyret-Kahn, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Dejean, A., & Cossart, P. (2010). *Listeria monocytogenes* impairs SUMOylation for efficient infection. *Nature*, 464(7292), 1192–1195. <https://doi.org/10.1038/nature08963>
- Riedel, C. U., Monk, I. R., Casey, P. G., Morrissey, D., O'Sullivan, G. C., Tangney, M., Hill, C., & Gahan, C. G. M. (2007). Improved Luciferase Tagging System for *Listeria monocytogenes* Allows Real-Time Monitoring In Vivo and In Vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9), 3091–3094. <https://doi.org/10.1128/AEM.02940-06>
- Riedl, S. J., & Salvesen, G. S. (2007). The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(5), 405–413. <https://doi.org/10.1038/nrm2153>
- Rogers, H. W., Callery, M. P., Deck, B., Unanue, E. R., Rogers, H. W., Gallery, M. P., Deck, B., & Unanue, E. R. (1996). *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J Immunol*, 156(2), 679–684.

-
- Rosado, C. J., Kondos, S., Bull, T. E., Kuiper, M. J., Law, R. H. P., Buckle, A. M., Voskoboinik, I., Bird, P. I., Trapani, J. A., Whisstock, J. C., & Dunstone, M. A. (2008). The MACPF/CDC family of pore-forming toxins. *Cellular Microbiology*, *10*(9), 1765–1774. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2008.01191.X>
- Rose, F., Zeller, S. A., Chakraborty, T., Domann, E., Machleidt, T., Kronke, M., Seeger, W., Grimminger, F., & Sibelius, U. (2001). Human endothelial cell activation and mediator release in response to *Listeria monocytogenes* virulence factors. *Infection and Immunity*, *69*(2), 897–905. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.2.897-905.2001>
- Rossjohn, J., Feil, S. C., McKinstry, W. J., Tweten, R. K., & Parker, M. W. (1997). Structure of a cholesterol-binding, thiol-activated cytolysin and a model of its membrane form. *Cell*, *89*(5), 685–692. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80251-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80251-2)
- Sabet, C., Toledo-Arana, A., Personnic, N., Lecuit, M., Dubrac, S., Poupel, O., Gouin, E., Nahori, M. A., Cossart, P., & Bierne, H. (2008). The *Listeria monocytogenes* virulence factor InJ is specifically expressed in vivo and behaves as an adhesin. *Infection and Immunity*, *76*(4), 1368–1378. <https://doi.org/10.1128/IAI.01519-07>
- Sato, H., & Frank, D. W. (2014). Intoxication of Host Cells by the T3SS Phospholipase ExoU: PI(4,5)P2-Associated, Cytoskeletal Collapse and Late Phase Membrane Blebbing. *PLoS ONE*, *9*(7), e103127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103127>
- Schlüter, D., Domann, E., Buck, C., Hain, T., Hof, H., Chakraborty, T., & Deckert-Schlüter, M. (1998). Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C from *Listeria monocytogenes* Is an Important Virulence Factor in Murine Cerebral Listeriosis. *Infection and Immunity*, *66*(12), 5930–5938.
- Schnupf, P., Portnoy, D. A., & Decatur, A. L. (2006). Phosphorylation, ubiquitination and degradation of listeriolysin O in mammalian cells: Role of the PEST-like sequence. *Cellular Microbiology*, *8*(2), 353–364. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00631.x>
- Schoenauer, R., Larpin, Y., Babiychuk, E. B., Drücker, P., Babiychuk, V. S., Avota, E., Schneider-Schaulies, S., Schumacher, F., Kleuser, B., Köffel, R., & Draeger, A. (2019). Down-regulation of acid sphingomyelinase and neutral sphingomyelinase-2 inversely determines the cellular resistance to plasmalemmal injury by pore-forming toxins. *FASEB Journal*, *33*(1), 275–285. <https://doi.org/10.1096/fj.201800033R>
- Schuerch, D. W., Wilson-Kubalek, E. M., & Tweten, R. K. (2005). Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(35), 12537–12542. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500558102>
- Schwan, W. R., Demuth, A., Kuhn, M., & Goebel, W. (1994). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Listeria monocytogenes* contributes to intracellular survival and growth of *Listeria innocua*. *Infection and Immunity*, *62*(11), 4795–4803. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7927757>
- Schwarzer, N., Nöst, R., Seybold, J., Parida, S. K., Fuhrmann, O., Krüll, M., Schmidt, R., Newton, R., Hippenstiel, S., Domann, E., Chakraborty, T., & Suttorp, N. (1998). Two Distinct Phospholipases C of *Listeria monocytogenes* Induce Ceramide Generation, Nuclear Factor-Kappa B Activation, and E-Selectin Expression in Human Endothelial Cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *161*(6), 3010–3018.
- Sheehan, B., Klarsfeld, A., Msadek, T., & Cossart, P. (1995). Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. *Journal of Bacteriology*, *177*(22), 6469–6476. <https://doi.org/10.1128/jb.177.22.6469-6476.1995>

-
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., & Ireton, K. (2000). InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*, *103*(3), 501–510. [https://doi.org/S0092-8674\(00\)00141-0](https://doi.org/S0092-8674(00)00141-0) [pii]
- Shepard, L. A., Shatursky, O., Johnson, A. E., & Tweten, R. K. (2000). The mechanism of pore assembly for a cholesterol-dependent cytolysin: Formation of a large prepore complex precedes the insertion of the transmembrane β -hairpins. *Biochemistry*, *39*(33), 10284–10293. <https://doi.org/10.1021/bi000436r>
- Shetron-Rama, L. M., Marquis, H., Bouwer, H. G. A., & Freitag, N. E. (2002). Intracellular induction of *Listeria monocytogenes* actA expression. *Infection and Immunity*, *70*(3), 1087–1096. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1087-1096.2002>
- Shewell, L. K., Harvey, R. M., Higgins, M. A., Day, C. J., Hartley-Tassell, L. E., Chen, A. Y., Gillen, C. M., James, D. B. A., Alonzo, F., Torres, V. J., Walker, M. J., Paton, A. W., Paton, J. C., & Jennings, M. P. (2014). The cholesterol-dependent cytolysins pneumolysin and streptolysin O require binding to red blood cell glycans for hemolytic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(49), E5312–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412703111>
- Sibeliuss, U., Schulz, E. C., Rose, F., Hattar, K., Jacobs, T., Weiss, S., Chakraborty, T., Seeger, W., & Grimminger, F. (1999a). Role of *Listeria monocytogenes* Exotoxins Listeriolysin and Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C in Activation of Human Neutrophils. *Infect Immun*, *67*(3), 1125–1130. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/Entrez/referer?http://iai.asm.org/cgi/content/full/67/3/1125>
- Sibeliuss, U., Schulz, E. C., Rose, F., Hattar, K., Jacobs, T., Weiss, S., Chakraborty, T., Seeger, W., & Grimminger, F. (1999b). Role of *Listeria monocytogenes* exotoxins listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C in activation of human neutrophils. *Infection and Immunity*, *67*(3), 1125–1130. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10024552>
- Singel, K. L., & Segal, B. H. (2016). NOX2-dependent regulation of inflammation. *Clinical Science*, *130*(7), 479–490. <https://doi.org/10.1042/cs20150660>
- Singh, R., Jamieson, A., & Cresswell, P. (2008). GILT is a critical host factor for *Listeria monocytogenes* infection. *Nature*, *455*(7217), 1244–1247. <https://doi.org/10.1038/nature07344>
- Skals, M., Leipziger, J., & Praetorius, H. A. (2011). Haemolysis induced by α -toxin from *Staphylococcus aureus* requires P2X receptor activation. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, *462*(5), 669–679. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-1010-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. *Infection and Immunity*, *63*(11), 4231–4237.
- Song, L., Hobaugh, M. R., Shustak, C., Cheley, S., Bayley, H., & Gouaux, J. E. (1996). Structure of staphylococcal α -hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science*, *274*(5294), 1859–1866. <https://doi.org/10.1126/science.274.5294.1859>
- Soto, C., del Valle, A., Valiente, P. A., Ros, U., Lanio, M. E., Hernández, A. M., & Alvarez, C. (2017). Differential binding and activity of the pore-forming toxin sticholysin II in model membranes containing diverse ceramide-derived lipids. *Biochimie*, *138*, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.04.003>

-
- Spellerberg, B., Cundell, D. R., Sandros, J., Pearce, B. J., Idänpään-Heikkilä, I., Rosenow, C., & Masure, H. R. (1996). Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 19(4), 803–813. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.425954.x>
- Sprenger, H.-G., & Langer, T. (2019). The Good and the Bad of Mitochondrial Breakups. *Trends in Cell Biology*, 29(11), 888–900. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.08.003>
- Stavru, F., Bouillaud, F., Sartori, A., Ricquier, D., & Cossart, P. (2011). *Listeria monocytogenes* transiently alters mitochondrial dynamics during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(9), 3612–3617. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100126108>
- Stavru, F., Palmer, A. E., Wang, C., Youle, R. J., & Cossart, P. (2013). Atypical mitochondrial fission upon bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(40), 16003–16008. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315784110>
- Streb, H., Irvine, R. F., Berridge, M. J., & Schulz, I. (1983). Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature*, 81(3), 241–253. <https://doi.org/10.1038/306067a0>
- 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*. *Cellular Microbiology*, 3(12), 853–864. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2001.00160.x>
- Suen, D. F., Norris, K. L., & Youle, R. J. (2008). Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes and Development*, 22(12), 1577–1590. <https://doi.org/10.1101/gad.1658508>
- Swords, W. E., Buscher, B. A., Ver Steeg li, K., Preston, A., Nichols, W. A., Weiser, J. N., Gibson, B. W., & Apicella, M. A. (2000). Non-typeable *Haemophilus influenzae* adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Molecular Microbiology*, 37(1), 13–27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01952.x>
- Tam, C., Idone, V., Devlin, C., Fernandes, M. C., Flannery, A., He, X., Schuchman, E., Tabas, I., & Andrews, N. W. (2010). Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201003053>
- Tang, P., Rosenshine, I., Cossart, P., & Finlay, B. B. (1996). Listeriolysin O activates mitogen-activated protein kinase in eucaryotic cells. *Infection and Immunity*, 64(6), 2359–2361.
- Tang, P., Sutherland, C. L., Gold, M. R., & Finlay, B. B. (1998). *Listeria monocytogenes* invasion of epithelial cells requires the MEK-1/ERK-2 mitogen-activated protein kinase pathway. *Infection and Immunity*, 66(3), 1106–1112.
- Tattoli, I., Sorbara, M. T., Yang, C., Tooze, S. A., Philpott, D. J., & Girardin, S. E. (2013). *Listeria* phospholipases subvert host autophagic defenses by stalling pre-autophagosomal structures. *EMBO Journal*, 32(23), 3066–3078. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.234>
- Temaru, E., Shimura, S., & Karasawa, T. (2005). *Clostridium tetani* Is a Phospholipase (Lecithinase)-Producing Bacterium. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(4), 2024–2025. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.2024-2025.2005>
- Thedieck, K., Hain, T., Mohamed, W., Tindall, B. J., Nimtz, M., Chakraborty, T., Wehland, J.,

-
- & Jänsch, L. (2006). The MprF protein is required for lysinylation of phospholipids in listerial membranes and confers resistance to cationic antimicrobial peptides (CAMPs) on *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 62(5), 1325–1339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05452.x>
- Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cellular Signalling*, 16(2), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2003.08.007>
- Tiensuu, T., Guerreiro, D. N., Oliveira, A. H., O'Byrne, C., & Johansson, J. (2019). Flick of a switch: regulatory mechanisms allowing *Listeria monocytogenes* to transition from a saprophyte to a killer. *Microbiology*, 165(8), 819–833. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000808>
- Tilley, S. J., Orlova, E. V., Gilbert, R. J. C., Andrew, P. W., & Saibil, H. R. (2005a). Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell*, 121(2), 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.033>
- Tilley, S. J., Orlova, E. V., Gilbert, R. J. C., Andrew, P. W., & Saibil, H. R. (2005b). Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.033>
- Tilney, L. G., & Portnoy, D. A. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Cell Biology*, 109(4 Pt 1), 1597–1608.
- Togo, T., Krasieva, T. B., & Steinhardt, R. A. (2000). A decrease in membrane tension precedes successful cell-membrane repair. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4339–4346. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4339>
- Tomasz, A. (1967). Choline in the Cell Wall of a Bacterium: Novel Type of Polymer-Linked Choline in Pneumococcus. *Science*, 157(3789), 694–697. <https://doi.org/10.1126/science.157.3789.694>
- Trost, M., Wehmhöner, D., Kärst, U., Dieterich, G., Wehland, J., & Jänsch, L. (2005). Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Proteomics*, 5(6), 1544–1557. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401024>
- Turnbull, W. B., Precious, B. L., & Homans, S. W. (2004). Dissecting the Cholera Toxin-Ganglioside GM1 Interaction by Isothermal Titration Calorimetry. *Journal of the American Chemical Society*, 124(4), 1047–1054. <https://doi.org/10.1021/ja0378207>
- Tweten, R. K., Parker, M. W., & Johnson, A. E. (2001). The cholesterol-dependent cytolysins. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 257, 15–33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11417120>
- Vabulas, R. M., Braedel, S., Hilf, N., Singh-Jasuja, H., Herter, S., Ahmad-Nejad, P., Kirschning, C. J., da Costa, C., Rammensee, H.-G., Wagner, H., & Schild, H. (2002). The Endoplasmic Reticulum-resident Heat Shock Protein Gp96 Activates Dendritic Cells via the Toll-like Receptor 2/4 Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), 20847–20853. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200425200>
- Vadia, S., Arnett, E., Haghghat, A. C., Wilson-Kubalek, E. M., Tweten, R. K., & Seveau, S. (2011). The pore-forming toxin listeriolysin o mediates a novel entry pathway of *L. monocytogenes* into human hepatocytes. *PLoS Pathogens*, 7(11), e1002356. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002356>
- Vadia, S., & Seveau, S. (2014). Fluxes of Ca²⁺ and K⁺ Are Required for the Listeriolysin O-

Dependent Internalization Pathway of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 82(3), 1084–1091. <https://doi.org/10.1128/iai.01067-13>

- Valeva, A., Hellmann, N., Walev, I., Strand, D., Plate, M., Boukhallouk, F., Brack, A., Hanada, K., Decker, H., & Bhakdi, S. (2006). Evidence That Clustered Phosphocholine Head Groups Serve as Sites for Binding and Assembly of an Oligomeric Protein Pore. *Journal of Biological Chemistry*, 281(36), 26014–26021. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601960200>
- van Putten, J. P., & Paul, S. M. (1995). Binding of syndecan-like cell surface proteoglycan receptors is required for *Neisseria gonorrhoeae* entry into human mucosal cells. *The EMBO Journal*, 14(10), 2144–2154. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07208.x>
- Van Weemen, B. K., & Schuurs, A. H. W. M. (1971). Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Letters*, 15(3), 232–236. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(71\)80319-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(71)80319-8)
- Vázquez-Boland, J-A, Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J., & Cossart, P. (1992). Nucleotide-Sequence of the Lecithinase Operon of *Listeria monocytogenes* and Possible Role of Lecithinase in Cell-to-Cell Spread. *Infection and Immunity*, 60(1), 219–230.
- Vázquez-Boland, J.-A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 14, Issue 3, pp. 584–640). <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.584-640.2001>
- Vázquez-Boland, J. A., Kocks, C., Dramsi, S., Ohayon, H., Geoffroy, C., Mengaud, J., & Cossart, P. (1992). Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infection and Immunity*, 60(1), 219–230.
- Vázquez-Boland, José A., Domínguez-Bernal, G., González-Zorn, B., Kreft, J., & Goebel, W. (2001). Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes and Infection*, 3(7), 571–584. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01413-7](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01413-7)
- Viala, J. P. M., Mochevova, S. N., Meyer-Morse, N., & Portnoy, D. A. (2008). A bacterial pore-forming toxin forms aggregates in cells that resemble those associated with neurodegenerative diseases. *Cellular Microbiology*, 10(4), 985–993. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01100.x>
- Villanueva, M. S., Sijts, A. J. A. M., & Pamer, E. C. (1995). Listeriolysin Is Processed Efficiently into an MHC Class I- Associated Epitope in *Listeria monocytogenes*-infected cells. *J Immunol*, 155(11), 5227–5233.
- Vögele, M., Bhaskara, R. M., Mulvihill, E., van Pee, K., Yildiz, Ö., Kühlbrandt, W., Müller, D. J., & Hummer, G. (2019). Membrane perforation by the pore-forming toxin pneumolysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(27), 13352–13357. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904304116>
- Wade, K. R., Hotze, E. M., Kuiper, M. J., Morton, C. J., Parker, M. W., Tweten, R. K., & Collier, R. J. (2015). An intermolecular electrostatic interaction controls the prepore-to-pore transition in a cholesterol-dependent cytolysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423754112>
- Wadsworth, S. J., & Goldfine, H. (1999). *Listeria monocytogenes* phospholipase C-

-
- dependent calcium signaling modulates bacterial entry into J774 macrophage-like cells. *Infection and Immunity*, 67(4), 1770–1778.
- Wadsworth, S. J., & Goldfine, H. (2002). Mobilization of protein kinase C in macrophages induced by *Listeria monocytogenes* affects its internalization and escape from the phagosome. *Infection and Immunity*, 70(8), 4650–4660.
- Wang, L., & Lin, M. (2008). A novel cell wall-anchored peptidoglycan hydrolase (autolysin), IspC, essential for *Listeria monocytogenes* virulence: Genetic and proteomic analysis. *Microbiology*, 154(Pt 7), 1900–1913. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/015172-0>
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). The metabolism of tumors in the body. *Journal of General Physiology*, 8(6), 519–530. <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>
- Warren, S. E., Mao, D. P., Rodriguez, A. E., Miao, E. A., & Aderem, A. (2014). Multiple Nod-Like Receptors Activate Caspase 1 during *Listeria monocytogenes* Infection. *The Journal of Immunology*, 180(1), 7558–7564. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7558>
- Warschawski, D. E., Arnold, A. A., Beaugrand, M., Gravel, A., Chartrand, É., & Marcotte, I. (2011). Choosing membrane mimetics for NMR structural studies of transmembrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1808(8), 1957–1974. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.03.016>
- Wei, Z., Zenewicz, L. A., & Goldfine, H. (2005). *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C has evolved for virulence by greatly reduced activity on GPI anchors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(26), 12927–12931. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501725102>
- Weiglein, I., Goebel, W., Troppmair, J., Rapp, U. R., Demuth, A., & Kuhn, M. (1997). *Listeria monocytogenes* infection of HeLa cells results in listeriolysin O-mediated transient activation of the Raf-MEK-MAP kinase pathway. *FEMS Microbiology Letters*, 148(2), 189–195. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00032-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00032-3)
- Weis, J., & Seeliger, H. P. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied Microbiology*, 30(1), 29–32.
- Weiser, J. N., & Pan, N. (1998). Adaptation of *Haemophilus influenzae* to acquired and innate humoral immunity based on phase variation of lipopolysaccharide. *Molecular Microbiology*, 30(4), 767–775. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01108.x>
- Weiser, J. N., Shchepetov, M., & Chong, S. T. H. (1997). Decoration of Lipopolysaccharide with Phosphorylcholine: A Phase- Variable Characteristic of *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity*, 65(3), 943–950.
- WHO | *Listeriosis– Spain*. (2019). WHO; World Health Organization. <https://www.who.int/csr/don/16-september-2019-listeriosis-spain/en/>
- WHO | *Listeriosis – South Africa*. (2018). WHO; World Health Organization. <https://www.who.int/csr/don/28-march-2018-listeriosis-south-africa/en/>
- Wiersma, V. R., Michalak, M., Abdullah, T. M., Bremer, E., & Eggleton, P. (2015). Mechanisms of Translocation of ER Chaperones to the Cell Surface and Immunomodulatory Roles in Cancer and Autoimmunity. *Frontiers in Oncology*, 5(7), eCollection 2015. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00007>
- Wolfmeier, H., Radecke, J., Schoenauer, R., Koeffel, R., Babychuk, V. S., Drücker, P., Hathaway, L. J., Mitchell, T. J., Zuber, B., Draeger, A., & Babychuk, E. B. (2016). Active

-
- release of pneumolysin prepores and pores by mammalian cells undergoing a *Streptococcus pneumoniae* attack. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1860(11 pt A), 2498–2509. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.07.022>
- Wolfmeier, H., Schoenauer, R., Atanassoff, A. P., Neill, D. R., Kadioglu, A., Draeger, A., & Babiychuk, E. B. (2015). Ca²⁺-dependent repair of pneumolysin pores: A new paradigm for host cellular defense against bacterial pore-forming toxins. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(9), 2045–2054. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.09.005>
- Wurtman, R. J., Cansev, M., & Ulus, I. H. (2009). Choline and Its Products Acetylcholine and Phosphatidylcholine. In A. Lajtha, G. Tettamanti, & G. Goracci (Eds.), *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* (pp. 443–501). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30378-9_18
- Xu, L., Huang, B., Du, H., Zhang, X. C., Xu, J., Li, X., & Rao, Z. (2010). Crystal structure of cytotoxin protein suliyisin from *Streptococcus suis*. *Protein and Cell*, 1(1), 96–105. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0012-3>
- Yano, T., Mita, S., Ohmori, H., Oshima, Y., Fujimoto, Y., Ueda, R., Takada, H., Goldman, W. E., Fukase, K., Silverman, N., Yoshimori, T., & Kurata, S. (2008). Autophagic control of *Listeria* through intracellular innate immune recognition in *Drosophila*. *Nature Immunology*, 9(8), 908–916. <https://doi.org/10.1038/ni.1634>
- Yeung, P. S. Marie, Zagorski, N., & Marquis, H. (2005). The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* controls cell wall translocation of the broad-range phospholipase C. *Journal of Bacteriology*, 187(8), 2601–2608. <https://doi.org/10.1128/JB.187.8.2601-2608.2005>
- Yeung, P. S M, Na, Y., Kreuder, A. J., & Marquis, H. (2007). Compartmentalization of the broad-range phospholipase C activity to the spreading vacuole is critical for *Listeria monocytogenes* virulence. *Infection and Immunity*, 75(1), 44–51. <https://doi.org/10.1128/IAI.01001-06>
- Young, N. M., Foote, S. J., & Wakarchuk, W. W. (2013). Review of phosphocholine substituents on bacterial pathogen glycans: Synthesis, structures and interactions with host proteins. *Molecular Immunology*, 56(4), 563–573. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.05.237>
- Zhang, Y., Yao, Y., Qiu, X., Wang, G., Hu, Z., Chen, S., Wu, Z., Yuan, N., Gao, H., Wang, J., Song, H., Girardin, S. E., & Qian, Y. (2019). *Listeria* hijacks host mitophagy through a novel mitophagy receptor to evade killing. *Nature Immunology*, 20(4), 433–446. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0324-2>
- Zhao, Z., Fux, B., Goodwin, M., Dunay, I. R., Strong, D., Miller, B. C., Cadwell, K., Delgado, M. A., Ponpuak, M., Green, K. G., Schmidt, R. E., Mizushima, N., Deretic, V., Sibley, L. D., & Virgin, H. W. (2008). Autophagosome-Independent Essential Function for the Autophagy Protein Atg5 in Cellular Immunity to Intracellular Pathogens. *Cell Host and Microbe*, 4(5), 458–469. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2008.10.003>

14 Publikationen, Patente und Tagungsbeiträge

14.1 Publikationen

La Pietra L, Hudel M, Pillich H, Mraheil MA, Berisha B, Aden S, Hodnik V, Lochnit G, Rafiq A, Perniss A, Anderluh G, Chakraborty T. (2020) Phosphocholine antagonizes listeriolysin O-induced host cell responses of *Listeria monocytogenes*. J Infect Dis. 222(9):1505-1516.

Abu Mraheil M, Toque HF, **La Pietra L**, Hamacher J, Phantok T, Gonzales J, Verin A, Su Y, Fulton D, Eaton D, Chakraborty T, Lucas R. (2020) Dual role of hydrogen peroxide as an oxidant in pneumococcal pneumonia. Antioxid Redox Sign. (Online ahead of print).

Frantz R, Teubner L, Schultze T, **La Pietra L**, Müller C, Gwozdinski K, Pillich H, Hain T, Weber-Gerlach M, Panagiotidis GD, Mostafa A, Weber F, Rohde M, Pleschka S, Chakraborty T, Abu Mraheil M. (2019) The secRNome of *Listeria monocytogenes* Harbors Small Noncoding RNAs That Are Potent Inducers of Beta Interferon. mBio 10(5).

Shehata MM, Mostafa A, Teubner L, Mahmoud SH, Kandeil A, Elshesheny R, Frantz R, **La Pietra L**, Pleschka S, Osman A, Kayali G, Chakraborty T, Ali MA, Mraheil MA. (2019) Bacterial Outer Membrane Vesicles (OMVs)-based Dual Vaccine for Influenza A H1N1 Virus and MERS-CoV. Vaccines (Basel) 7(2).

Puri M, **La Pietra L**, Mraheil MA, Lucas R, Chakraborty T, Pillich H. (2017) Listeriolysin O Regulates the Expression of Optineurin, an Autophagy Adaptor That Inhibits the Growth of *Listeria monocytogenes*. Toxins (Basel) 9(9).

14.2 Patente

„Nachweis von Cholesterin-bindenden Toxinen“, Aktenzeichen: EP17210338.4, Anmeldedatum: 22.12.2017

14.3 Tagungsbeiträge

14.3.1 Posterbeiträge

La Pietra L, Chakraborty T. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C antagonizes listeriolysin O-induced host cell responses of *Listeria monocytogenes*. International Symposium on Problems of *Listeria* and Listeriosis XX (ISOPOL XX), Toronto, Canada, 2019

La Pietra L, Pillich H, Lochnit G, Chakraborty T. *Listeria monocytogenes* produced phospholipase B dampens listeriolysin O-induced host cell responses. 10th GGL Conference on Life Sciences, Gießen, Deutschland, 2017

La Pietra L, Pillich H, Chakraborty T. The endoplasmic reticulum (ER) chaperone Gp96 translocation to the plasma membrane initiated by *Listeria monocytogenes* requires functional pore-formation of listeriolysin O. International Symposium on Problems of *Listeria* and Listeriosis XIX (ISOPOL XIX), Paris, Frankreich, 2016

La Pietra L, Pillich H, Chakraborty T. Listeriolysin O-induced translocation of endoplasmic reticulum chaperones. 8th GGL Conference on Life Sciences, Gießen, Deutschland, 2015

14.3.2 Vorträge

La Pietra L, Listeriolysin O-induced translocation of endoplasmic reticulum located chaperones to the plasma membrane. 9th GGL Conference on Life Sciences, Gießen, Deutschland, 2016

15 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, diewörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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.“

Gießen, 19.10.2020

Ort, Datum



Unterschrift

16 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank geht an meinem Doktorvater Prof. Dr. Trinad Chakraborty, der mir die Möglichkeit gegeben hat an diesem hochinteressanten Projekt zu arbeiten und mich unermüdlich darin bestärkt und unterstützt hat, immer weiter zu forschen. Dabei hat er mir auch die Möglichkeit eingeräumt, meine eigenen Ideen und Vorstellungen weitgehend zu verfolgen.

Mein Dank geht auch an meine Betreuerin Dr. Helena Pillich, die mich, vor allem in der Anfangszeit, stark gefördert hat und mir die Methoden auf dem Weg gegeben hat, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Vielen herzlichen Dank auch an meine Kooperationspartner Prof. Dr. Peter H. Seeberger (Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung), Prof. Dr. Gregor Anderluh (Nationales Institut für Chemie, Ljubljana) und Prof. Dr. Günter Lochnit (Biochemisches Institut, Justus-Liebig Universität Gießen) für die fruchtbare Zusammenarbeit, die mit ihren Expertisen diese Arbeit vorangebracht haben. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls bei Prof. Dr. Wolfgang Kummer und Dr. Martin Hardt (Institut für Anatomie und Imaging Unit, Justus-Liebig Universität Gießen) für die Bereitstellung von konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopen bedanken.

Ein besonderer Dank geht auch an Frau Martina Hudel und Herr Besim Berisha für die Isolierung und Bereitstellung von gereinigten Proteinen und an Frau Sylvia Krämer für die Bereitstellung unzähliger Agarplatten.

Ich möchte auf diesem Weg auch Frau Lisa Teubner danken, die immer für einen Rat – sei er wissenschaftlicher oder privater Natur – da war. Die vielen gemeinsamen Stunden sowohl im Labor als auch beim Mittagessen waren für mich ein wichtiger Anker während dieser Zeit.

Mein Dank geht auch an allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, insbesondere an PD. Dr. Mobarak Abu Mraheil, Dr. Renate Frantz, Frau Nelli Schklarenko, Frau Silke Zechel-Gran und Frau Julia Baldauf, für die kollegiale und schöne Zusammenarbeit.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und Freunden bedanken, die mich während dieser Zeit unterstützt haben und immer an mich geglaubt haben. Selbst wenn der Weg noch so steinig war, fühlte ich mich stets nie allein gelassen.

17 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Datenschutzgründen entfernt.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6905-6



Photo cover: © Paulista @ stock.adobe.com