

**Strukturelle und funktionelle Genomanalysen
an *Listeria monocytogenes* EGD-e**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**vorgelegt von
H. Ulrich von Both
aus Bremen**

Gießen 2003

**Strukturelle und funktionelle Genomanalysen
an *Listeria monocytogenes* EGD-e**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von: H. Ulrich von Both
aus: Bremen

Gießen 2003

Aus dem Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie,
Institut für Medizinische Mikrobiologie

Leiter: Prof. Dr. T. Chakraborty

des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. T. Chakraborty

Gutachter: Prof. Dr. E. Beck

Tag der Disputation: 28.11.2003

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Bedeutung der Infektionskrankheiten - ein Überblick	6
1.2	<i>L. monocytogenes</i> – ein Modell zum Studium der Pathogen-Wirt Interaktion	8
1.3	Taxonomie und natürliches Habitat	9
1.4	Listeriose - klinisches Bild und Pathogenese	11
1.5	Organisation und Evolution der Virulenzgene von <i>L. monocytogenes</i>	14
1.6	Strukturelle und funktionelle Genomik.....	16
1.7	Zielsetzung	18
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Material	20
2.1.1	Bakterienstämme	20
2.1.2	Plasmide und Oligonukleotide	20
2.1.3	Chemikalien, Enzyme und Antikörper	23
2.1.4	DNA-Größenstandard	23
2.1.5	Protein-Größenstandard.....	24
2.1.6	Anzuchtmedien.....	24
2.1.7	Lösungen und Puffer	25
2.1.8	Geräte	26
2.1.9	Computerprogramme.....	28
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Bestimmung von Nukleinsäuren	29
2.2.2	Automatische Sequenzierung mit dem ALFexpress	29
2.2.2.1	Sequenziergel und Laufparameter	29
2.2.2.2	Sequenzierung von Plasmiden und DNA-Fragmenten mit markierten Primern ..	29
2.2.3	Automatische Sequenzierung mit dem MegaBACE 2000	30
2.2.4	Herstellung von Deletionsmutanten	30
2.2.4.1	Isolierung und Reinigung genomischer DNA aus <i>Listeria spp.</i>	31
2.2.4.2	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Expand PCR-System High Fidelity von Roche Diagnostics	32
2.2.4.3	Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	32

Inhaltsverzeichnis

2.2.4.4	Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit dem Qiaquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen.....	33
2.2.4.5	Verdau und Phenolextraktion von DNA-Fragmenten.....	33
2.2.4.6	Dephosphorylierung des Klonierungsvektors und Ligation der DNA-Fragmente	34
2.2.4.7	Klonierung von DNA-Fragmenten mit dem pCR-XL-Topo Cloning Kit von Invitrogen	35
2.2.4.8	Transformation in <i>E. coli</i>	35
2.2.4.9	Identifizierung positiver Transformanten durch PCR	37
2.2.4.10	Isolierung von Plasmid-DNA mit dem GFX Micro Plasmid Prep Kit von Pharmacia	38
2.2.4.11	Klonierung in den Suizidvektor pAUL-A	38
2.2.4.12	Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Jetstar 2.0 Midiprep Kit von Genomed..	39
2.2.4.13	Protoplasten-Transformation von Listerien nach Wuenscher (1991)	39
2.2.4.14	Integration und Excision des Suizidvektors pAUL-A.....	41
2.2.4.15	Anlegen von Glycerinkonserven	42
2.2.5	Pulsfeld-Gelelektrophorese großer genomischer DNA-Fragmente.....	42
2.2.5.1	Anzucht der Isolate.....	42
2.2.5.2	Präparation der Agaroseblöckchen (plugs)	42
2.2.5.3	Lyse der in den Agarose-Blöckchen eingebetteten <i>Listerien</i>	43
2.2.5.4	Deproteinisierung	44
2.2.5.5	Restriktionsverdau.....	45
2.2.5.6	Das PFGE-System	45
2.2.5.7	Herstellen und Bestücken des Laufgels.....	46
2.2.5.8	PFGE-Lauf und verschiedene Auflösungsfenster	46
2.2.5.9	Laufende, Auswertung und Größenbestimmung der Fragmente.....	47
2.2.6	Southern-Blot-Hybridisierung.....	47
2.2.6.1	Southern-Blot von CHEF-Gelen	48
2.2.6.2	Gewinnung DIG-markierter Sonden für genomische <i>L. monocytogenes</i> -DNA mittels PCR	49
2.2.6.3	Prähybridisierung und Hybridisierung	49
2.2.6.4	Detektion	50
2.2.7	Klonierung großer funktioneller DNA-Abschnitte in BAC-Vektoren.....	50
2.2.7.1	Isolierung und Restriktionsverdau genomischer DNA von <i>Listeria monocytogenes</i>	50
2.2.7.2	PFGE-Lauf und Exzision von DNA-Fragmenten definierter Größe.....	51
2.2.7.3	Extraktion der DNA-Fragmente mittels Agaraseverdau	53
2.2.7.4	Präparation des BAC-Vektors	54

2.2.7.5	Klonierung der DNA-Fragmente in den BAC-Vektor und Transformation	55
2.2.7.6	elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen mittels Elektroporation	55
2.2.7.7	Isolierung rekombinanter BACs für anschließenden Restriktionsverdau und PFGE Analyse	56
2.2.7.8	Herstellung elektrokompetenter Zellen von <i>Listeria spp.</i>	57
2.2.7.9	Anlegen einer Genbank in 96-well-Platten	57
2.2.8	Präparation von Zellwand-assoziierten Proteinen	58
2.2.9	Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	59
2.2.10	Immun-Blot	61
3	Ergebnisse	63
3.1	Strukturelle Genomanalysen und Genkartierung	63
3.1.1	Makrorestriktionsanalyse und Bestimmung der Genomgröße von <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> EGD-e	63
3.1.2	Physikalische Kartierung des Chromosoms von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e	64
3.1.2.1	Klonierung der 8 <i>NotI</i> -Schnittstellen des Chromosoms und deren flankierender Bereiche in den Plasmidvektor pGATA.....	64
3.1.2.2	Sequenzierung der klonierten Fragmente und Abgleich mit Datenbanken des World Wide Web	66
3.1.2.3	Generierung DIG-markierter Sonden für die acht <i>NotI</i> -Bereiche des Chromosoms von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e.....	67
3.1.2.4	Anordnung der acht <i>NotI</i> -Fragmente durch Southern-Blot-Hybridisierung und Erstellung einer physikalischen Karte	68
3.1.3	Kartierung von Virulenzgenen auf dem Chromosom	71
3.1.3.1	<i>NotI</i> -Restriktionsverdau und PFGE-Analyse genomischer DNA verschiedener <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> EGD-e -Deletionsmutanten	71
3.1.3.2	Genkartierung der fünf Gen-Loci auf der chromosomalen Karte und Bestimmung der relativen Lage dieser Loci zueinander.....	73
3.2	Funktionelle Genomanalysen und Komplementationsexperimente	76
3.2.1	Klonierung großer, funktioneller chromosomaler DNA-Abschnitte mit Hilfe des BAC-Systems	76
3.2.1.1	Restriktionsverdau genomischer DNA von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e mit <i>HindIII</i> und Fragmentauftrennung mittels PFGE.....	76
3.2.1.2	Extraktion von DNA-Fragmenten definierter Größe aus dem PF-Gel durch Agaraseverdau und Klonierung in pBeloBAC11	78

3.2.1.3	Überprüfung der Fragmentgrößen beider BAC-Genbanken mittels BAC-Isolierung und anschließender PFGE-Analyse.....	79
3.2.2	Herstellung eines Shuttle-BAC-Vektors (pUvBBAC) für Gram positive und Gram negative Bakterien – Skizzierung des experimentellen Protokolls	81
3.2.2.1	Konstruktion des BAC-Vektors pUvBBAC auf der Grundlage der Vektoren pBeloBAC11 und pSOG7 und Expression in DH10 β	81
3.2.2.2	Überprüfung des neuen Konstrukts mit PCR und Restriktionsverdau; Bestimmung der relativen Orientierung des neuen ori.....	82
3.2.2.3	Transformation von <i>L. innocua</i> Protoplasten mit pUvBBAC und Überprüfung des Konstrukts auf Funktion des Gram positiven ori	83
3.2.3	Erstellung einer BAC-Genbank von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e in pUvBBAC und Klonierung des vollständigen Virulenzgenclusters (vgc) – empirische Entwicklung eines experimentellen Protokolls	86
3.2.3.1	Restriktionverdau chromosomaler EGD-e DNA mit <i>Bam</i> HI mit anschließender PFGE-Auftrennung und Extraktion von Fragmenten der Größe 80 – 160 kb	86
3.2.3.2	Bestimmung der Fragmentgrößen der BACIII-Bank mittels BAC-Isolierung und anschließender PFGE-Analyse	88
3.2.3.3	PCR-Screening der Genbank auf Listeriolysin O (<i>hly</i>)	89
3.2.3.4	Isolierung zweier <i>hly</i> -positiver Konstrukte von 96,6 und 84,5 kb Größe	89
3.2.4	Virulenztransfer - Komplementation von <i>L. innocua</i> mit pUvBBAC+vgc1 bzw. pUvBBAC+vgc2	91
3.2.4.1	Transformation des <i>L. innocua</i> Wildtyps mit den Konstrukten pUvBBAC+ vgc1 und pUvBBAC+vgc2	91
3.2.4.2	Überprüfung der komplementierten <i>L. innocua</i> -Stämme mittels PCR	92
3.2.4.3	Test der vgc-Komplementanten auf Hämolyse	92
3.2.4.4	Nachweis der Expression zweier Genprodukte der vgc-Komplementanten im Immuno-Blot	94
3.2.4.5	Wachstumseigenschaften der neuen Konstrukte im Vergleich zum Wildtyp	94
3.2.4.6	BAC-Endsequenzierung der vgc-Konstrukte und Abgleich der Sequenzen mit der <i>Listeria</i> -Datenbank.....	96

4	Diskussion	98
4.1	<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e verfügt über ein einzelnes Ringchromosom mit einer Molekülgröße von 3000 ± 50 kb	98
4.2	Die listeriellen Virulenzgene sind über das gesamte Chromosom verteilt, mit einer wesentlichen Ausnahme: dem <i>prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB</i> -Kluster.....	99
4.3	PFGE – ein potentes Werkzeug zur Erstellung physikalischer und genetischer Karten im Rahmen von Genomanalysen und molekularer Epidemiologie	101
4.4	BAC-Vektoren – eine wesentliche Bereicherung für Genomsequenzierungsprojekte sowie für das Feld der funktionellen Genomik	103
4.5	pUvBBAC – der erste BAC-Vektor für den Einsatz in Gram negativen und Gram positiven Wirten	106
4.6	Das Virulenzgenkluster (<i>vgc</i>) – ein austauschbarer Genabschnitt zum Virulenztransfer zwischen pathogenen und apathogenen <i>Listeriae</i>	107
4.7	Funktionelle Genomik und das pUvBBAC-Modell – Vor- und Nachteile dieses Systems und Vergleich mit anderen Ansätzen	111
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	116
6	Literaturverzeichnis.....	118
7	Anhang	138
7.1	Abkürzungsverzeichnis	138
7.2	Plasmidkarten und tabellarischer Anhang.....	141
7.3	Lebenslauf	145
7.4	Danksagung	147

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Infektionskrankheiten - ein Überblick

Infektionskrankheiten stellten in den vergangenen Jahrhunderten der Menschheitsgeschichte eine stets allgegenwärtige Bedrohung dar. Zahllose Seuchen und Epidemien löschten mehr Menschenleben aus als viele kriegerische Auseinandersetzungen zusammen. Typhus, Pest, Pocken oder die Cholera sind nur einige bekannte Beispiele für Krankheitsbilder, die zu derartig verheerenden Auswirkungen führten. Fast ein Drittel der Bevölkerung Europas fiel der großen Pestepidemie von 1347 bis 1352 zum Opfer. Das Bakterium *Yersinia pestis* löschte in Form des „Schwarzen Todes“ ganze Städte und Gemeinden aus.

Die Entwicklung auf dem Gebiet der Infektionskrankheiten sei kurz am Beispiel der Tuberkulose (TB) skizziert. Die Tuberkulose ist eine der am längsten bekannten Infektionskrankheiten. Die Entdeckung Pottscher Läsionen an Skeletten bis hin zum Neolithikum (6000 bis 1.800 v. Chr.) oder an ägyptischen Mumien berechtigen zu der Annahme, dass die Menschheit schon immer an der TB gelitten hat. Aber erst die letzten 150 Jahre, und vor allem die Identifizierung des spezifischen Erregers durch Robert Koch im Jahre 1882, haben der Tuberkuloseforschung eine wissenschaftliche Grundlage verschafft. Die Entdeckung potenter Chemotherapeutika, wie Isoniazid (1950), Pyrazinamid (1952) oder Rifampicin (1960), ermöglichte eine Heilung von bis dahin unbekannter Qualität und Schnelligkeit. Zudem halfen umfassende hygienische und soziale Massnahmen, beginnend mit der Meldepflicht bis hin zur Verbrennung kontaminierter Kleidungs- und Möbelstücke der Patienten, die Schwindsucht einzudämmen. Schließlich gelang Calmette und Guérin die Entwicklung eines attenuierten Lebendimpfstoffes, der seit 1921 eingesetzt wurde (Oury, 1986), so dass man schließlich glaubte, die TB besiegen, oder zumindest kontrollieren zu können. Vor dem Hintergrund dieser und vergleichbarer Entwicklungen bei der Bekämpfung anderer Erreger war man in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts der euphorischen Meinung, die Infektionskrankheiten bald gänzlich besiegt zu haben. „Das Buch der Infektionskrankheiten kann geschlossen werden“ verkündete William Stewart in dieser Zeit (Domann, 1997). Entgegen dieser Annahmen führten unsachgemäße Therapie der TB und die damit verbundene Entwicklung resistenter Tuberkulosestämmen, sowie sozio-ökonomische Probleme, vor allem in den Entwicklungsländern, sowie vermehrte Fälle von Immunsuppression infolge des HIV dazu, dass die Tuberkulose immer noch ein globales Problem darstellt. So werden wir heute mit 1.5 Millionen TB-Toten pro Jahr konfrontiert, und

fast ein Drittel der Weltbevölkerung (2 Milliarden Menschen) weisen eine latente TB Infektion auf (WHO Infectious Disease Report 2001).

Während der Kampf zur Eindämmung der Infektionskrankheiten weiter andauert, sind neue Bedrohungen in Form von neuen, todbringenden Erregern aufgetaucht, von denen viele oft weder vermeidbar noch behandelbar sind. HIV/AIDS, das Ebola hämorrhagische Fieber, die Legionärskrankheit oder die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung seien an dieser Stelle erwähnt. Eine Infektionskrankheiten-Krise globalen Ausmaßes bedroht heute die Fortschritte auf den Gebieten der Gesundheit und Lebenserwartung. Infektionskrankheiten stellen aktuell die häufigste Todesursache für Kinder und junge Erwachsene dar. Sie sind jedes Jahr für mehr als dreizehn Millionen Todesfälle verantwortlich, wobei jeder zweite davon in Entwicklungsländern auftritt und erhebliche soziale und ökonomische Konsequenzen nach sich zieht. Die Ursachen für diese aktuelle Situation sind sehr vielschichtig. In dem Maße, in dem die Welt heute zusammenwächst, steigen auch die damit verbundenen Risiken. So haben der verstärkte Flug-Reiseverkehr und Massenmigrationsprozesse, sowie eine zunehmende Impfmüdigkeit einen Vormarsch der Mikroorganismen ermöglicht. Auch der Transport von lebenden Tieren oder Tierprodukten trug Erkrankungen in Gebiete, in denen sie zuvor nie aufgetreten waren. So ist für mehr als zwei Drittel der im vergangenen Jahrzehnt neu aufgetretenen Erkrankungen bekannt, dass sie ihren Ursprung von Tieren, sowohl wilder als auch domestizierter Art, nahmen (WHO Infectious Disease Report 2001).

Veränderungen der Lebensgewohnheiten in den Industrieländern wie der Trend hin zu ökologischen, naturbelassenen und nicht künstlich veränderten Produkten, der auch den Verzehr von nicht konservierten Rohmilch-Produkten beinhaltet, gibt pathogenen Keimen wie *Listerien* und Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) gute Möglichkeiten, sich ungehindert in diesen „gesunden“ Naturprodukten zu vermehren und in der Folge zu schweren Erkrankungen zu führen. Zudem führen kontaminierte Lebensmittel aufgrund der Großproduktion in der Lebensmittelindustrie und der weltweiten Auslieferung nicht mehr nur zu lokalen Ereignissen, sondern stellen ein globales Problem dar.

Auch die enormen sozialen Probleme in Ländern der Dritten Welt (Armut, Unterernährung, Hygienemangel, fehlende Erziehung), sowie die Folgen kriegerischer Konflikte mit damit verbundenen Massenfluchten bieten einen idealen Nährboden für eine Vielzahl von Seuchenerregern. Als Beispiel seien hierfür die Typhus Epidemie in Burundi von 1996 bis 1998, die bis zu hunderttausend Menschen betraf, sowie der Ausbruch der Cholera in Lateinamerika im Jahre 1991, bei der über fünfhunderttausend Menschen infiziert wurden (WHO Infectious Disease Report 2001) genannt. Darüber hinaus führen Infektionen mit Erregern wie zum Beispiel HIV zu einer deutlichen Einschränkung der individuellen

1 Einleitung

Abwehrmechanismen des Wirts, wodurch besonders sogenannte opportunistische Infektionserreger deutlich an Bedeutung gewonnen haben. Von zentraler Bedeutung ist auch das vermehrte Auftreten resistenter Bakterienstämme, für deren Entwicklung der Mensch durch unsachgemäßen und zu häufigen Einsatz von Antibiotika selbst einen großen Teil der Verantwortung trägt, und die eine Therapie unmöglich machen. Sowohl das zu frühe Absetzen von Antibiotika durch den Patienten nach subjektiver Besserung als auch eine zu häufige Applikation können zu Resistenzentwicklungen führen. Auch zum breiten Einsatz von Antibiotika im Rahmen der Tierzucht und Lebensmittelindustrie konnte ein deutlicher Zusammenhang zur Entstehung Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) aufgezeigt werden (Witte, 1998). So wird dem Futter vieler Masttiere Avoparcin, ein Glykopeptidantibiotikum, beigefügt, um das Wachstum der Tiere zu beschleunigen. Die Resistenz der Enterokokkenisolate aus diesen Tierställen richtet sich gegen beide Vertreter der Glykopeptide, Vancomycin und Avoparcin. Besondere Gefahr geht in diesem Kontext von sogenannten methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* Stämmen (MRSA) aus, die derzeit nur noch mit Vancomycin zu bekämpfen sind, und die sich nach Resistenzaustausch mit den oben genannten VRE zu einem Keim entwickeln könnten, der uns in die prä-antibiotische Zeit zurückversetzen würde. Da zudem die Bakterien wesentlich schneller Resistenzen entwickeln und austauschen können als die Industrie in der Lage ist, mit hohem finanziellen Aufwand neue Wirkstoffe zu entdecken und zu produzieren, ist dies zusammengenommen ein wahrhaft alarmierendes Szenario (Russel, 2002). Es bedarf daher besonderer Anstrengungen, nicht nur die Prävention von Infektionskrankheiten, sondern auch die diagnostischen sowie therapeutischen Methoden und Ansätze zu verbessern und um neue Aspekte zu erweitern. Einfache und kostengünstige Maßnahmen sind erstrebenswert, um auch in ärmeren Ländern eine medizinische Versorgung sicherzustellen. Die Grundlagenforschung hilft u.a. bei der Entwicklung neuer Vakzinen, für die ein genaueres Verständnis der Lebensprozesse der pathogenen Erreger bis auf die molekulare Ebene des Genoms unerlässlich ist.

1.2 *L. monocytogenes* – ein Modell zum Studium der Pathogen-Wirt Interaktion

Pathogene intrazelluläre Bakterien sind weltweit für eine Vielzahl oft schwerster Erkrankungen mit erschreckenden Morbiditäts- und hohen Mortalitätsraten verantwortlich. Obwohl vielen Vertretern der Gruppe der fakultativ intrazellulären Erreger eine große medizinische Bedeutung sowohl bei Erkrankungen des Menschen wie auch des Tieres zukommt, ist doch die Frage, wie sich diese Organismen an ihre Umgebung anpassen und Strategien zum Überleben und zur Vermehrung entwickeln konnten, noch wenig verstanden. Als Beispiele seien hier Yersinien, Chlamydien, Rickettsien oder Mykobakterien angeführt.

Die Untersuchung dieser Bakterien wird durch mehrere Faktoren erschwert. So stellt zum Beispiel allein schon die Kultivierung solcher, meist anspruchsvoller, Bakterien ein häufiges Problem dar. Dennoch sind genauere Untersuchungen sowohl der frühen Interaktion dieser Parasiten mit der Wirtszelle als auch der das intrazelluläre Überleben regulierenden Virulenzfaktoren und deren Lokalisation innerhalb des Bakteriengenoms besonders interessant, da sich aus diesen Studien neue Ansätze zur Prävention und Behandlung dieser Erkrankungen ergeben könnten.

Vor diesem Hintergrund stellt das human- und tierpathogene Bakterium *L. monocytogenes* in seiner Eigenschaft als fakultativ intrazelluläres Pathogen heute ein wichtiges Modell zur Untersuchung vieler Aspekte von Infektionen dar, die durch intrazelluläre Erreger verursacht werden (Chakraborty & Wehland, 1997; Cossart & Mengaud, 1989). *L. monocytogenes* gehört zur Gruppe der Gram positiven, nicht-sporenbildenden, regelmäßig geformten Stäbchen, wächst bei Temperaturen von 0 bis 45 °C (Grau & Vanderlinde, 1990) und ist fakultativ anaerob (Juntilla *et al.*, 1988; Walker & Stringer, 1987). Das Bakterium besitzt die Fähigkeit, sich bei extremen pH-Werten und hohen Salz-Konzentrationen (10 % NaCl) zu vermehren (Buchanan & Phillips, 1990; Parish & Higgins, 1989) und zeigt auf Blutagarplatten eine β -Hämolyse. Die Generationzeiten variieren von 5 bis 7 Tagen bei 0 °C auf Rindfleisch bis zu 52 Minuten bei 45 °C in Tryptic Soy Broth (Petran & Zottola, 1989). Darüber hinaus erweist sich *L. monocytogenes* als Katalase-positiv und Oxidase-negativ, ist peritrich begeißelt und zeigt eine herabgesetzte Produktion von Flagellin bei 37 °C (Peel *et al.*, 1988).

1.3 Taxonomie und natürliches Habitat

Das Genus *Listeria* wurde erstmals im Jahre 1957 in die große Gruppe der coryneformen Bakterien aufgenommen (Adler *et al.*, 2001; Rocourt, 1988). Im Jahre 1986 konnte es eindeutig dem Unterzweig *Clostridium* zugeordnet werden, zusammen mit den Genera *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* und *Brochothrix* (Ludwig *et al.*, 1985). Diese phylogenetische Position des Genus *Listeria* steht im Einklang mit einem niedrigen Guanin und Cytosin (G+C) Gehalt der DNA (< 40%). Phylogenetische Untersuchungen auf der Grundlage von 16S rRNA- und 23S rRNA-Sequenzierungen haben gezeigt, dass dieses Genus aus zwei Abstammungslinien besteht (Abb. 1): eine Linie umfasst *L. monocytogenes* und die genomisch eng verwandten Spezies *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* und *L. seeligeri*, während *L. grayi* zu einer zweiten, weiter entfernten Linie zählt (Boerlin *et al.*, 1991; Collins *et al.*, 1991; Rocourt, 1988; Rocourt *et al.*, 1992). Diese Struktur des Genus *Listeria* wurde auch durch eine Klassifikation auf der Grundlage von Ergebnissen aus Multilocus

1 Einleitung

Enzymelektrophoresen (MLEE) bestätigt (Boerlin *et al.*, 1991). Nur zwei Vertreter dieser Spezies, *L. monocytogenes* und *L. ivanovii*, sind potentiell pathogen. Innerhalb der Spezies *L. monocytogenes* konnte eine Heterogenität in Bezug auf das Virulenzpotential gezeigt werden. So sind nur drei Serotypen, 1/2a, 1/2b und 4b, für mehr als 90% aller Infektionen mit *L. monocytogenes* verantwortlich, auch wenn andere Serotypen, wie 1/2c oder 4a, oft in kontaminierten Lebensmitteln nachgewiesen werden konnten (Faber & Peterkin, 1991; Rocourt *et al.*, 1989).

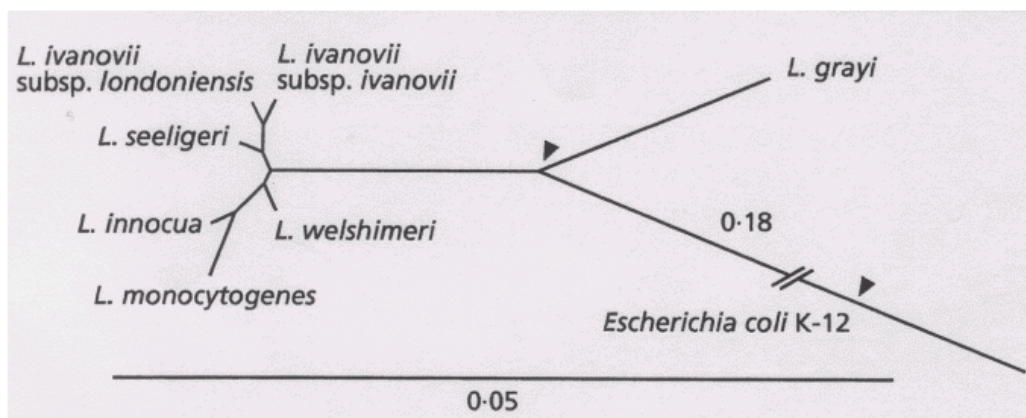


Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der *Listeria* spp. auf der Grundlage von 16S-rRNA Analysen

Durch Methoden der molekularen Epidemiologie, wie Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE, (Brosch *et al.*, 1994), Ribotypisierung, Virulenzgenpolymorphismus (Rasmussen *et al.*, 1995) und MLEE (Piffaretti *et al.*, 1989), ließen sich die *L. monocytogenes* Isolate in drei verschiedene evolutionäre Zweige unterteilen, die mit den Serotypen korrespondieren. So umfasst der erste Zweig (Serotyp 1/2b und 4b) Stämme, die für alle durch Lebensmittel übertragenen epidemischen Erkrankungen des Menschen, sowie auch für einige Einzelfälle bei Mensch und Tier, verantwortlich sind. Dem zweiten Zweig (Serotyp 1/2a, 1/2c und 3a) werden klinische Isolate aus Mensch und Tier zugeordnet, die jedoch nie mit einem epidemischen Auftreten der Erkrankung assoziiert sind. Schließlich werden die Stämme des dritten Zweiges (Serotyp 4a) fast ausschließlich aus tierischen Wirten isoliert (Wiedmann *et al.*, 1997).

Listeria Spezies sind in der Umwelt weit verbreitet. Sie wurden aus Erdboden, Pflanzen, Fäzes, vergehendem Gemüse, Wasserproben, tierischer Nahrung wie frischem und gefrorenem Geflügel oder frischem und verarbeitetem Fleisch, Rohmilch Produkten, Käse sowie aus asymptomatischen menschlichen und tierischen Trägern isoliert (Seeliger & Jones, 1986; Weiss & Seeliger, 1975). Aufgrund dieses ubiquitären Vorkommens hat *L.*

monocytogenes vielfältige Möglichkeiten, in das Umfeld von Lebensmittelproduktion und –verarbeitung zu gelangen.

1.4 Listeriose - klinisches Bild und Pathogenese

Der erste Fall humaner Listeriose wurde im Jahre 1929 aus Dänemark berichtet (481), wobei die erste *Listeria*-Kultur aus dem Isolat eines an Meningitis erkrankten Patienten schon acht Jahre zuvor in Frankreich gewonnen wurde (Dumont & Cotoni, 1921). *L. monocytogenes* hat, ähnlich wie *E. coli* O157:H7, in den letzten Jahren vor allem durch Infektionen aufgrund von Lebensmittelkontaminationen für Aufmerksamkeit gesorgt. Seit 1983 gewann die Listeriose durch eine Serie von epidemischen Ausbrüchen in Nord-Amerika und Europa als wichtige Lebensmittelinfektion an Bedeutung (Bille, 1990). Erkrankungen nach dem Verzehr kontaminierter Lebensmittel fordern in den USA jährlich mehrere Tausend Todesopfer (Tauxe, 1997). Zudem bleibt die mit diesem Erreger kontaminierte Nahrung äußerlich meist unverändert, so dass dies für den Verbraucher kaum zu erkennen ist. McLauchlin berichtete 1990 von einer Zunahme von lebensmittelbedingten Infektionen mit *L. monocytogenes*, während einige Jahre darauf aus den USA Daten über rückläufige Erkrankungszahlen vorliegen (Tauxe, 1997). In Deutschland liegt die Inzidenz der Listeriose mit ca. 2 bis 3 vereinzelt Fällen pro Jahr auf eine Million Einwohner sehr niedrig (RKI, 2002). Am häufigsten sind die Serovare 1/2a, 1/2b und 4b von *L. monocytogenes* für diese Infektionskrankheit verantwortlich (Faber & Peterkin, 1991). Die Inkubationszeit variiert zwischen wenigen Tagen und mehreren Wochen (Schuchat *et al.*, 1991). Asymptomatische Träger konnten durch Erregernachweis im Stuhl mit einem Anteil von 5 – 10 % in der Bevölkerung identifiziert werden. (Faber & Peterkin, 1991). Das Auftreten einer klinisch manifesten *Listeria* Infektion hängt von drei grundlegenden Variablen ab: Erstens von der Anzahl der mit der Nahrung aufgenommenen Erreger, zweitens von den pathogenetischen Eigenschaften des jeweiligen Stammes und drittens vom Immunstatus des Wirtsorganismus. Der Großteil aller Infektionen immunkompetenter Personen ohne Risikofaktoren verlaufen bei Aufnahme einer niedrigen *Listerien* Dosis inapparent. Neben der zellulären Immunabwehr bietet auch das saure Milieu des Magens einen Infektionsschutz (Schlech, 1990). Ältere Patienten sowie Personen mit prädisponierenden Faktoren, die zur Minderung der zellvermittelten Immunität führen, wie zum Beispiel Krebspatienten (speziell Lymphome), an dem AIDS Syndrom erkrankte Personen oder auch Transplantationspatienten unter immunsuppressiver Therapie, sind besonders gefährdet. Auch weitere Systemerkrankungen wie Diabetes mellitus, Herz-, Leber- und Lungenerkrankungen stellen solche Risikofaktoren dar (Faber & Peterkin, 1991; McLauchlin, 1990; Rocourt, 1996; Rocourt & Brosch, 1992;

1 Einleitung

Schuchat *et al.*, 1991). Die klinischen Zeichen einer Infektion mit *L. monocytogenes* sind in allen empfänglichen Wirtsorganismen sehr ähnlich. Man unterscheidet zwei grundlegende Erscheinungsformen: die Listeriose des Erwachsenen und die perinatale Listeriose. In beiden Fällen stehen die vorherrschenden klinischen Symptome im Zusammenhang mit einer generalisierten oder lokalen Entzündung des Zentralen Nervensystems (ZNS). Dieser Tropismus von *L. monocytogenes* für das ZNS lässt die Listeriose in der Regel zu einer sehr schweren Erkrankung werden. Die durchschnittliche Mortalitätsrate liegt beim Menschen bei 20 bis 30 % oder höher, und dies trotz frühzeitiger antibiotischer Therapie. Bei Erwachsenen ist *L. monocytogenes* in erster Linie für eine Septikämie oder für eine Meningoenzephalitis, die von schweren Persönlichkeits- und Bewusstseinsveränderungen sowie Bewegungsstörungen und z. T. auch Hirnnervenlähmungen begleitet sein kann, verantwortlich. (Nieman & Lorber, 1980; Schuchat *et al.*, 1991). Fokale Manifestationen treten gelegentlich nach vorheriger Bakteriämie auf und können sich vielfältig in Form einer Endokarditis, Arthritis, Osteomyelitis, Pleuritis, Pneumonie, Peritonitis, Endophthalmitis, Cholezystitis oder eines Leberabszesses manifestieren. Jede Fokalinfection kann nachfolgend zu einer Sepsis führen (Faber & Peterkin, 1991).

Die fetomaternale oder neonatale Listeriose wird nach dem zeitlichen Auftreten der klinischen Symptome in eine „early-onset“ und eine seltenere (10 bis 15 % der Fälle perinataler Infektionen) „late-onset“ Form unterteilt. Bei der häufigeren „early-onset“ Form treten die Symptome innerhalb der beiden ersten Lebensstage, spätestens aber innerhalb der ersten Lebenswoche auf. Eine mütterliche Infektion während der Schwangerschaft kann in jedem Trimenon auftreten und wird durch die in dieser Zeit reduzierte zellvermittelte Immunität der Mutter unterstützt (Weinberg, 1984). Die Infektion des Feten bei Erkrankung der Mutter muss jedoch nicht in jedem Fall erfolgen (Cruikshank & Warenski, 1989; Smith *et al.*, 1983). Die infizierte Mutter zeigt für gewöhnlich einen weitgehend asymptomatischen Verlauf, gegebenenfalls auch leichte Grippe-ähnliche Symptome wie Fieber, Abgeschlagenheit, Kopfschmerzen sowie Gelenk- und Muskelschmerzen. Die „early-onset“ Form der perinatalen Listeriose resultiert meist aus einer von der Plazenta ausgehenden Infektion des Feten bei Bakteriämie der Schwangeren, wobei sich eine Chorioamnionitis entwickelt (Lorber, 1997; Schuchat, 1997). Dieser Vorgang wird vermutlich auch durch die lokale plazentäre Suppression der zellvermittelten Immunität begünstigt. Ein anderer Infektionsweg besteht durch ascendierende Erreger aus der Vagina. Auch eine Aspiration von infektiösem Fruchtwasser trägt möglicherweise zur Pathogenese bei (Redline & Lu, 1987; Schuchat *et al.*, 1991).

Auf dem Boden einer sich entwickelnden Choriomeningitis kann die Listeriose ab dem fünften Monat nach der Gestation zum Abort führen. Zudem kann sie sich in Form von Früh- oder Totgeburten, sowie durch Hautläsionen, schwere Pneumonie, Sepsis oder eine

generalisierte Infektion des Neugeborenen manifestieren. Im letzteren Fall spricht man auch von dem klinischen Syndrom der Granulomatosis infantiseptica, das durch disseminierte Abszesse in verschiedenen Organen wie Leber, Milz, Lunge und Plazenta charakterisiert ist (Faber & Peterkin, 1991). Die „late-onset“ Form ist durch ein Auftreten der Krankheit nach Ablauf der ersten Lebenswoche definiert. Meist zeigt sich hier 1 bis 8 Wochen post partum das klinische Bild einer Meningitis. Die Pathogenese dieser Form ist noch unklar. Die Infektion erfolgt hierbei vermutlich über eine Aspiration von kontaminiertem mütterlichem Exsudat unter der Geburt oder nosokomial. Die Letalität liegt bei der späten Form mit 10-20 % niedriger als bei der „early-onset“ Form (15-50 %). *L. monocytogenes* ist eine der drei Hauptursachen der bakteriellen Neugeborenenmeningitis (Lorber, 1997; Rocourt & Brosch, 1992; Synnott *et al.*, 1994).

Die sichere Diagnose der Listeriose wird durch den bakteriologischen Erregernachweis mittels Kultivierung aus physiologisch sterilen Proben (Blut, Liquor, Amnionflüssigkeit) gestellt. Stuhlproben sind hierfür weniger geeignet, da asymptomatische Träger vorkommen. Die Immunität gegen *L. monocytogenes* beruht hauptsächlich auf einer T-Zell-vermittelten Aktivierung von Makrophagen durch Lymphokine. Die humorale Antwort von an Listeriose erkrankten Patienten richtet sich gegen eine Reihe von Antigenen (LLO, IrpA, ActA und InlA). Diagnostisch wertvoll ist in diesem Kontext die Tatsache, dass gesunde Personen mit früherem Kontakt zu *L. monocytogenes* nur Antikörper gegen LLO und IrpA aufweisen, während man bei entsprechenden Personen ohne Erregerkontakt keine der genannten Antikörper nachweisen kann (Grenningloh *et al.*, 1997).

Als Therapie der Wahl gilt die Kombination eines β -Laktam-Antibiotikums (Ampicillin) und eines Aminoglykosids (Gentamycin) mit synergistischem Effekt (Boisivon *et al.*, 1990). Diese Therapie wird entsprechend der Schwere des Krankheitsbildes für 2 bis 6 Wochen durchgeführt (Gellin & Broome, 1989). Die Möglichkeit einer Impfung ist nicht gegeben, so dass der Prophylaxe eine große Bedeutung zukommt. Besonders gefährdeten Personen wird empfohlen, nur pasteurisierte Milch zu verwenden, Fleisch vor dem Verzehr immer vollständig zu garen und Gemüse sorgfältig zu reinigen (Buchdahl, 1990; Schuchat *et al.*, 1991). Da kontaminierte Lebensmittel die Hauptinfektionsquelle sowohl für epidemische als auch für sporadisch auftretende Fälle der Listeriose sind (Faber & Peterkin, 1991), stellt der Gastrointestinaltrakt die erste Station für den Eintritt pathogener *Listerien* dar. Von dort dringen die Erreger vermutlich über die M-Zellen im Bereich um die Peyer'schen Plaques in das Darmgewebe ein (Jensen *et al.*, 1997; Racz *et al.*, 1972) und gewinnen so Anschluss an das Lymphsystem oder die Blutbahn. Über diesen Weg gelangen sie über die mesenterialen Lymphknoten in Milz und Leber, wo sie von ortsansässigen Makrophagen zu großen Teilen

1 Einleitung

aus dem Blut gefiltert und eliminiert werden (Dalton *et al.*, 1997). Die überlebenden *Listerien* vermehren sich primär in den Hepatozyten (Conlan & North, 1992; Cousens & Wing, 2000; Gaillard *et al.*, 1996; Gregory & Liu, 2000). Von dort erreichen die Erreger auf dem Blutweg eine Vielzahl von Organen, wobei ihre Fähigkeit, die Blut-Hirn-Schranke sowie die Plazentarschranke zu überwinden, eine zentrale Rolle für das weitere Infektionsgeschehen spielt. So sind vor allem die Beteiligung des ZNS und auch die Infektion des Feten über die Plazenta für das eigentliche klinische Bild der beiden o.g. Formen der Listeriose verantwortlich. Auch die Fähigkeit von *L. monocytogenes*, in nicht-phagozytierende Zellen einzudringen, stellt ein besonderes Kennzeichen für das erfolgreiche intrazelluläre Überleben dar (Chakraborty, 1999; Chakraborty & Wehland, 1997). Denn im Gegensatz zu apathogenen Bakterien sind die pathogenen in der Lage, ihre eigene Aufnahme in die Wirtszelle zu induzieren. Diese besonderen Virulenzeigenschaften und Pathogenitätsmechanismen von *L. monocytogenes* und deren genomische Grundlage stellen ein wichtiges und interessantes Feld für weitere Untersuchungen dar.

1.5 Organisation und Evolution der Virulenzgene von *L. monocytogenes*

Alle bislang bekannten Virulenzgene von *L. monocytogenes* sind chromosomal codiert, auch wenn das Vorkommen von Plasmiden innerhalb der *Listeria* Spezies, z. B. bei *L. innocua*, berichtet wurde (Glaser *et al.*, 2001; Perez-Diaz *et al.*, 1982; Poyart-Salmeron *et al.*, 1990). Diese Virulenzgene sind meist in Form einzelner genetischer Einheiten, sogenannter Pathogenitätsinseln (PAIs), organisiert. Derartige Strukturen wurden schon für mehrere andere Gram negative (*Salmonella*, *H. pylori*) und Gram positive (*C. difficile*, *S. aureus*) pathogene Bakterien beschrieben (Hacker & Heesemann, 1997). Diese PAIs haben sich in den Genomen vieler pathogener Bakterien, vermutlich durch von Plasmiden oder Bakteriophagen initiierte Transfer- und Rekombinationsprozesse, gebildet. Dieser horizontale Gentransfer, also der Austausch genetischen Materials zwischen Stämmen einer Art, aber auch zwischen Bakterien unterschiedlicher Spezies, Gattungen und Familien, stellt für die Evolution der Pathogenität einen Schlüsselmechanismus dar (Blum *et al.*, 1994; Groisman & Ochman, 1996; Hacker & Heesemann, 1997).

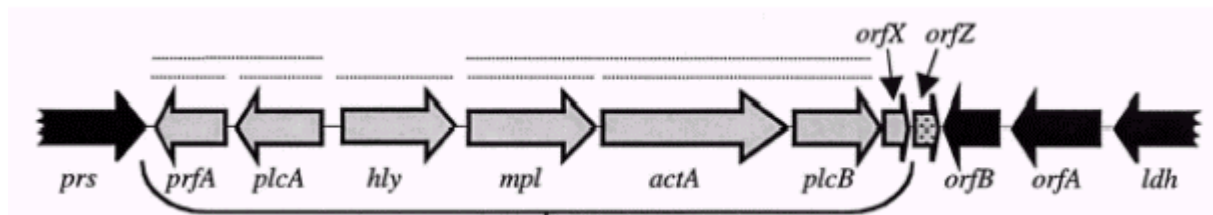


Abb. 2: Schematische Darstellung des Virulenzgenclusters (vgc, LIPI-1) aus *L. monocytogenes*. Die in Grau gehaltenen Gene gehören zum vgc, während die flankierenden Gen-Loci schwarz dargestellt sind. Bekannte Transkripte sind durch gepunktete Linien gekennzeichnet (Vasquez-Boland *et al.*, 2001).

Sechs der Virulenzfaktoren, die für das intrazelluläre Überleben von *L. monocytogenes* eine wesentliche Rolle spielen (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB*), liegen auf einem 9 kb großen chromosomalen DNA-Abschnitt, der früher als PrfA-reguliertes Virulenzgencluster (vgc) bekannt war und mittlerweile auch als LIPI-1 (*Listeria* Pathogenitätsinsel 1) bezeichnet wird (Vásquez-Boland *et al.*, 2001). Abb. 2 veranschaulicht die physikalische Struktur und Organisation dieses Genabschnitts. Auch die Internaline (wie z. B. InlA und InlB), denen eine Schlüsselrolle bei der Aufnahme des Erregers in nicht-phagozytierende Wirtszellen zukommt, sind in Gruppen chromosomal angeordnet (Chakraborty & Wehland, 1997). Diese Proteine gehören einer Familie sezernierter Proteine, den internalin related proteins in *Listeria monyotogenes*, an, von der bislang sieben Vertreter beschrieben wurden (Schubert *et al.*, 2001). Zwei weitere Gene (*irpA*, *flaR*), für die eine Assoziation mit der Virulenz nachgewiesen wurde, sind als einzelne Gene auf dem Chromosom organisiert (Sanchez-Campillo *et al.*, 1995).

Ein tieferes Verständnis für die Entstehung solcher PAIs bzw. Gengruppen und deren genauere Lokalisation innerhalb des Genoms der jeweiligen Spezies stellen nicht nur für die evolutionäre Infektionsbiologie, sondern auch im Hinblick auf ein besseres Verständnis der Genregulation, eine bedeutende Herausforderung für weitere Untersuchungen dar. Vor diesem Hintergrund erscheinen die Methoden der strukturellen Genomanalyse, vor allem die Genomkartierung und Sequenzierung, sowie der funktionellen Genomik als ein äußerst hilfreiches und wichtiges Instrument.

1.6 Strukturelle und funktionelle Genomik

Schon seit Beginn des 20. Jahrhunderts ist die Erstellung von Karten ganzer Chromosomen eine zentrale Aufgabe der Genetik. Für ein besseres Verständnis der Gene, ihrer Funktion und ihrer Evolution sind sie sehr wichtig. Lange Zeit wurden diese Karten auf genetischem Wege angefertigt, indem man sie von Geschlechtskreuzungen ableitete. In den vergangenen zwei Jahrzehnten hat es die Verbreitung der rekombinanten DNA-Technologie ermöglicht, molekulare und physikalische Genomkarten zu erstellen. Unterschiedliche DNA-Fragmente wurden hierbei hinsichtlich ihrer Position auf dem Chromosom angeordnet. Mittlerweile fand bereits eine Vielzahl physikalischer Kartierungen von Genomen statt; die Spannbreite der Projekte reicht hierbei von Pflanzen bis hin zum menschlichen Genom. Mehrere Methoden werden zur Erstellung einer physikalischen Genomkarte eingesetzt, wobei diese Entwicklung 1980 durch eine erste Verwendung von DNA-Sonden zur Identifizierung polymorpher DNA-Sequenzen ihren Anfang nahm (Botstein *et al.*, 1980). Längenunterschiede bei DNA-Fragmenten nach einer Spaltung mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen waren die ersten nachgewiesenen DNA-Polymorphismen dieser Art. Man spricht hier von Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP). Der Einsatz der Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE) in Kombination mit dem o.g. Verfahren hat sich als ein wichtiges epidemiologisches Instrument zur Aufdeckung von Unterschieden zwischen eng miteinander verwandten Stämmen von *L. monocytogenes* bewährt. Auf diese Weise konnten einerseits die phylogenetischen Beziehungen innerhalb dieser Spezies näher untersucht werden (Brosch *et al.*, 1991; Brosch *et al.*, 1994; Carriere *et al.*, 1991; Howard *et al.*, 1992); andererseits war es möglich, Infektionswege nachzuzeichnen und einzelne Infektionsquellen zu identifizieren (Brosch *et al.*, 1996; Buchrieser *et al.*, 1993). Nach dem Verdau der genomischen DNA stellt sich aber das Problem, die gewonnenen DNA-Fragmente zu einer vollständigen physikalischen Karte zusammenzufügen. Um dies zu ermöglichen, stehen ebenfalls mehrere Techniken zur Verfügung. Ein Beispiel stellt das sogenannte *chromosome walking* dar. Bei dieser Methode wird zur Erstellung einer Genomkarte ein einzelnes kloniertes Fragment ausgewählt. Dies wird als Sonde eingesetzt, mit der sich durch Hybridisierung andere überlappende Klone in der Bibliothek nachweisen lassen. Dieser *walking*-Schritt, der auf dem Chromosom in beide Richtungen ablaufen kann, wird viele Male wiederholt. Das Problem dieser Methode stellen zum einen mögliche repetitive Sequenzen innerhalb des Genoms, aber vor allem der hohe Arbeits- und Zeitaufwand dar. Als Alternativen wurden daher DNA-Fingerprintinganalysen mit Restriktionsendonukleasen, Hybridisierungen sowie die

Verwendung von Markern entwickelt. Da diese Methoden alle ihre Grenzen haben, ist man heutzutage meist bemüht, sie zur physikalischen Kartierung miteinander zu kombinieren (Primrose, 1996).

Bis heute sind zwei Stämme von *L. monocytogenes*, LO28 (Serotyp 1/2c) und Scott A (Serotyp 4b), physikalisch kartiert worden (He & Luchansky, 1997; Michel & Cossart, 1992). Obwohl das Genom von LO28 mit 3,15 Mb eine ähnliche Größe wie das von Scott A (3,21 Mb) aufwies, zeigten sich doch bedeutende Unterschiede bezüglich der Anzahl und der Orientierung der durch Makrorestriktion erhaltenen DNA-Fragmente. In beiden Fällen wurde die genomische DNA der Stämme unter anderem mit der relativ selten schneidenden Restriktionsendonuklease *NotI* verdaut und mittels PFGE aufgetrennt. Die Analyse ergab für LO28 acht *NotI*-Fragmente, während das Genom von Scott A sich in nur fünf *NotI*-Fragmente zerlegen ließ. Zudem wurden bekannte Virulenzgene für beide Stämme auf unterschiedlichen *NotI* Fragmenten lokalisiert, wodurch frühere Untersuchungen mit Hilfe von MLEE bestätigt wurden, die diese Isolate zwei verschiedenen genomischen Gruppen zuordneten.

Vor diesem Hintergrund steigt das Interesse, mit *L. monocytogenes* EGD-e einen Vertreter des Serotyps 1/2a im Hinblick auf seine Struktur und Genanordnung genauer zu analysieren. Da dieser Stamm zudem als Referenzstamm für das Projekt der Sequenzierung des Genoms von *L. monocytogenes* ausgewählt wurde, gewinnen diese Untersuchungen zusätzlich an Bedeutung.

Die Erstellung physikalischer Karten mit einer anschließenden genauen Lokalisation einzelner Gene auf dem Chromosom hat auch im Hinblick auf das Gebiet der funktionellen Genomik eine große Bedeutung. Vor dem Hintergrund der rasch wachsenden Anzahl an sequenzierten bakteriellen Genomen steigt das Interesse an deren funktioneller Charakterisierung. Zudem bieten neue methodische und technologische Entwicklungen zunehmend Möglichkeiten, große genomische Bereiche exakt zu manipulieren. Diese können anschließend gezielt zur Komplementation eingesetzt werden, um im jeweiligen Wirtsorganismus wertvolle neue Erkenntnisse über deren Funktion und Regulationsmechanismen zu gewinnen. Auch Pathogenitätsinseln können auf diese Weise genauer untersucht werden, um somit Virulenz in ihrer Entstehung näher zu verstehen (Rondon *et al.*, 1999).

Die Klonierung und Kartierung komplexer Genome wurde durch die Entwicklung der BAC-Vektoren (*bacterial artificial chromosome*) um eine potentes Werkzeug erweitert. Diese Vektorsysteme leiten sich von low copy replicons ab, die entweder auf dem F Plasmid von *E. coli* (Shizuya *et al.*, 1992) oder dem Bakteriophagen P1 (Ioannou *et al.*, 1994; Sternberg,

1 Einleitung

1990) basieren. Sie können DNA-Fragmente von mehreren Hundert kb aufnehmen und stabil vermehren und sind als Plamide einfach zu handhaben. Eines der Hauptanwendungsgebiete des BAC-Systems beinhaltet bislang die Konstruktion von Genbanken unspezifischer Umweltkeime, um auf diese Weise lokale metagenomische Untersuchungen durchführen zu können (Rondon *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001). Zur Klonierung genomischer DNA von *Bacillus cereus* wurde ebenfalls ein BAC-Vektor eingesetzt, und die Expression dieser großen, heterologen DNA-Fragmente in *E. coli* ermöglichte die Identifizierung von antibiotischen und anderen enzymatischen Aktivitäten (Rondon *et al.*, 1999). Schließlich wurden BAC-Vektoren unlängst auch erfolgreich als shuttle-System zum Transfer großer DNA-Fragmente zwischen Bakterien Spezies verwendet (Sosio *et al.*, 2001). Allerdings sind alle bisher verfügbaren BAC-Vektoren lediglich in Gram negativen Bakterien, speziell in *E. coli*, einsetzbar. Es wäre daher erstrebenswert, die Einsatzmöglichkeiten dieses Systems um den Gram positiven Bereich zu erweitern, um so die Verfahren der Klonierung, Sequenzierung und Kartierung mit anschließenden funktionellen Genomanalysen in einem entsprechenden Wirtsorganismus zu kombinieren.

1.7 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit sollte eine genauere Untersuchung des Stammes *L. monocytogenes* EGD-e 1/2a im Hinblick auf dessen Genomstruktur sowie die Anordnung und Funktion einzelner Gene sein, die mit der Virulenz dieses Erregers assoziiert sind. Zu diesem Zweck sollte zunächst eine physikalische und genetische Genomkarte erstellt werden, auf deren Grundlage genaue Aussagen über die Lagebeziehungen aller bislang bekannten Virulenzgene von *L. monocytogenes* EGD-e 1/2a erhalten werden könnten.

Als molekularbiologisches Instrument sollte hierfür die Kombination von Verdauung genomischer DNA mit selten schneidenden Restriktionsendonukleasen (*NotI*, u.a.) und einer anschließenden Auftrennung der Fragmente durch Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE) eingesetzt werden. Die Anordnung der Makrorestriktionsfragmente sollte mit Hilfe einer erstmalig angewandten Strategie erreicht werden: Durch Klonierung der die Restriktionsschnittstellen flankierenden Bereiche sollten die Fragmente zu einer vollständigen physikalischen Karte zusammengesetzt werden, wobei zur Bestimmung der relativen Orientierung der Fragmente DNA-Hybridisierungsanalysen genutzt werden. Darüber hinaus sollten alle bislang bekannten Virulenzgene durch den Einsatz von isogenen Mutanten, die mit zusätzlichen *NotI* Schnittstellen in diesen Gen-Loci versehen waren, genau auf dem Chromosom lokalisiert werden.

Mit Hilfe des BAC-Systems (*bacterial artificial chromosome*) sollte die Erstellung von BAC-

Genbanken möglich werden, die 50 – 100 kb große Inserts umfassen.

Vor dem Hintergrund der o.g. Ergebnisse war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, erstmalig das Virulenzgenkluster (vgc) von *L. monocytogenes* EGD-e gezielt als großes, funktionelles DNA-Fragment mit seinen flankierenden Bereichen in einen neu zu entwickelnden BAC-Vektor zu klonieren, der das BAC-System um das Gram positive Spektrum erweitert. In einem nächsten Schritt sollte dieses vgc-BAC-Konstrukt schließlich zur Komplementation des eng verwandten, jedoch apathogenen, Stammes *L. innocua* eingesetzt werden. Dieser Ansatz einer funktionellen Genomanalyse sollte einen tieferen und selektiven Einblick in den Einfluss der Gene dieser speziellen Pathogenitätsinsel auf einen zuvor apathogenen Organismus erlauben. Da auf diese Weise Wechselwirkungen mit anderen bekannten Virulenzgenen von *L. monocytogenes* ausgeschlossen werden könnten, erscheint die Anwendung dieser Strategie besonders interessant.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Escherichia coli:

DH10 β (Gibco BRL)

Genotyp: F', *mcrA* Δ -(*mrr*-*hsdRMS*-*mcrBC*), ϕ 80*dlacZ* Δ M15, Δ *lacX174*, *deoR*, *recA1*, ϕ *paraD139* Δ (*ara*, *leu*)7697, *galU*, *galK*, λ^- , *rpsL*, *endA1*, *nupG*

INV α F' (Invitrogen)

Genotyp: F', *endA1*, *recA1*, *hsdRI7*(r^K, m^{+K}), *supE44*, λ^- , *thi-1*, *gyrA*, *reIA1*, ϕ 80, *lacZ* α Δ M15 Δ (*lacZYA*-*argF*), *deoR*+

Listeria spp:

Listeria monocytogenes EGD-e 1/2

Listeria innocua 6 NCTC 11288

Listeria monocytogenes-Deletionsmutanten

Bezeichnung	Herkunft
PprfABox(<i>inlAB</i>)	A. Darbouche
Δ <i>actA-plcB</i>	A. Darbouche
Δ <i>inlFDE</i>	A. Darbouche
Δ <i>irpA3</i>	Domann <i>et al.</i> (1997)
Δ <i>flaR</i>	E. Busch (1998)
PprfABox(<i>inlAB</i>) Δ <i>inlFDE</i>	A. Darbouche
Δ <i>actA-plcB</i> Δ <i>inlFDE</i>	A. Darbouche
PprfABox(<i>inlAB</i>) Δ <i>actA-plcB</i>	A. Darbouche
PprfABox(<i>inlAB</i>) Δ <i>actA-plcB</i> Δ <i>inlFDE</i>	diese Arbeit

2.1.2 Plasmide und Oligonukleotide

Vektoren	Herkunft
pGATA QanTox™	Quantum Biotechnologies
pCR-Blunt	Invitrogen
pCR 2.1-Topo	Invitrogen
pCR-XL-TOPO	Invitrogen
pSOG7	Otten, S. (2001)
pAUL-A	M. Hartl
pBeloBAC 11	Shizuya, H. <i>et al.</i> (1992)
pUvBBAC	diese Arbeit (Accession Number AJ509853, EMBL)

Rekombinante Plasmide

Rekombinantes Plasmid	Vektor	Insert	Herkunft	Applikation
pUvBNotI-1	pGATA	1,0 kb	diese Arbeit	Klonierung
pUvBNotI-2	pGATA	1,2 kb	diese Arbeit	Klonierung
pUvBNotI-3	pGATA	1,1 kb	diese Arbeit	Klonierung
pUvBNotI-4	pGATA	1,1 kb	diese Arbeit	Klonierung
pUvBNotI-5	pGATA	1,6 kb	diese Arbeit	Klonierung
pUvBNotI-6	pGATA	500 bp	diese Arbeit	Klonierung
pUvBNotI-7	pGATA	700 bp	diese Arbeit	Klonierung
pUvBNotI-8	pGATA	800 bp	diese Arbeit	Klonierung
pUvBBAC(vgc1)	pUvBBAC	96.6 kb	diese Arbeit	Klonierung
pUvBBAC(vgc2)	pUvBBAC	84,5 kb	diese Arbeit	Klonierung

2 Material und Methoden

Oligonukleotide

Name	5'-3'-Sequenz	Position	Notiz
U1	GATGTCCCACCTAACGATATCGTCGCGGG		<i>inlAB</i> , Δ <i>prfAB</i> Box
U2	CCCTAATCTATCCGCCTGAAGCGTTG	1793-1768	<i>inlAB</i> , Δ <i>prfAB</i> Box
U3	CGGATCCAGAATTTAGTTCCGCAGTGG		Δ <i>actA-plcB</i>
U4 (<i>EcoRI</i>)	ATAACGGAATTCTAATGGTCACTG		Δ <i>actA-plcB</i> (<i>EcoRI</i>)
U5	CTGACGGCGTAGATCTAATGGGTTAC	extern	Δ <i>inlFDE</i>
U6	AATAGCAGCAAGATCTCAATCGCATTC	extern	Δ <i>inlFDE</i>
U7 (<i>BglII</i>)	TAGCTATGCGTTAGATCTCGGAGCCGGGGACT		Δ <i>irpA3</i> (<i>BglII</i>)
U8	GCAACAAGCACTAGATCTAGATTAGCCT		Δ <i>irpA3</i> (<i>BglII</i>)
U9	ATCCAAGAAGTTGGTGTAGC		Δ <i>flaR</i>
U10	ATCCAATTCTTAGTAAGATAG		Δ <i>flaR</i>
U11 (<i>XhoI</i>)	AATTCCTCGAGTGTAGAAGGAGGGTGAAACC		<i>Hly</i> (<i>XhoI</i>)
U12 (<i>BamHI</i>)	CGGGATCCCGTGTGGGAACTAAATTATACG		<i>Hly</i> (<i>BamHI</i>)
U13	CGTAAGTGTTTCGTGATGCAGCTTATG	extern	<i>vgc</i> , <i>plcB</i>
U14	GGAGTTAGAGCAGTTTTG	extern	<i>vgc</i>
U15	TCCAAGGCTATAAAGAAGTTTC		<i>plcB</i> (Δ <i>orf Z2</i>)
U16	CGACTATCACTAAACTGG		upstream der <i>inlFDE-NotI</i> -site
U17	CAGTCATCTTGGTCTACG		
U18	TCAATGGCTTGGCTTCTG		downstream der <i>inlFDE-NotI</i> -site
U19	ACGCTCTTAGCAATGTGG		
U20	AAGATGTCCCACCTAACG		upstream der <i>prfAB</i> Box- <i>NotI</i> -site
U21	TCAATGGCATAGGCGACG		

Name	5'-3'-Sequenz	Position	Notiz
U22 (<i>Xho</i> I)	AATTCCTCGAGTGGTGAACCAAAGTGAAACC		<i>Xho</i> I
U23 (<i>Xho</i> I)	AATTCCTCGAGAATTTACACAGGAAACAGC		<i>Xho</i> I
U24 (<i>Xho</i> I)	AATTCCTCGAGCGATCACTCATCATGTTC		<i>Xho</i> I
U25	GCAAGCTACCTGAAATGCTG		Sequ. in pGATA
T7	TAATACGACTCACTATAGGG		NEB
SP6	ATTAGGTGACACTATAG		NEB

2.1.3 Chemikalien, Enzyme und Antikörper

Die verwendeten Chemikalien, Enzyme und Antikörper wurden von den Firmen Amersham-Buchler, New England Biolabs (NEB), Bio-Rad, Boehringer Mannheim, Dianova, Difco, Fermentas, Fluka, Gerbu, Gibco BRL, Merck, Oxoid, PAA Laboratories, Pharmacia, Riedel de Haen, ICN, Roth, Serva und Sigma bezogen.

Antikörper

M275 (monoklonal, Hly-spezifisch):

K. Niebuhr-Ebel

N81 / N111 (monoklonal, ActA-spezifisch):

K. Niebuhr-Ebel

2.1.4 DNA-Größenstandard

1kb-Leiter (Gibco BRL):

12,2; 11,2; 10,2; 9,2; 8,1; 7,1; 6,1; 5,1; 4,1; 3,1; 2,0; 1,6; 1,0; 0,5; 0,4; 0,34; 0,3; 0,22; 0,2; 0,16; 0,13; 0,08

2 Material und Methoden

Yeast Chromosome PFG Marker (New England Biolabs):

1900, 1640, 1120, 1100, 945, 915, 815, 785, 745, 680, 610, 555, 450, 375, 295, 225 kb

Lambda Ladder PFG Marker (New England Biolabs):

1018,5; 970,0; 921,5; 873,0; 824,5; 776,0; 727,5; 679,0; 630,5; 582,0; 533,5; 485,0; 436,5; 388,0; 339,5; 291,0; 242,5; 194,0; 145,5; 97,0; 48,5 kb

Low Range PFG marker (New England Biolabs):

194,0; 145,5; 97,0; 48,5; 23,1; 9,42; 6,55; 4,36; 2,32; 2,03; 0,56; 0,13 kb

2.1.5 Protein-Größenstandard

Prestained SDS Marker™ (Bio-Rad)

2.1.6 Anzuchtmedien

Listeria spp.

BHI (Gibco BRL):	38 g BHI, ad 1 l ddH ₂ O	für die Anzucht auf Agarplatten
BHI (Difco):	37 g BHI, ad 1 l ddH ₂ O	zur Kultivierung in Flüssigmedium

E. coli

LB: 10 g Casein Hydrolysate (Pepton No.140), 5 g Yeast-Extract, 10 g NaCl, ad 1 l ddH₂O

Genbankmedium: 10 g Trypton, 5 g Hefe, 5 g NaCl, 6.3 g, K₂HPO₄, 1,8 g KH₂PO₄,
0,45 g Tri.Na-Citrat, 0,09 g MgSO₄ 7 H₂O, 0,9 g (NH₄)₂SO₄,
44 g Glycerin ad 1 Liter ddH₂O

Um Agarplatten herzustellen, werden 15 g Agar in 1 l des entsprechenden Mediums eingewogen und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50°C können Antibiotikastammlösungen zugegeben und die Platten gegossen werden.

DM3 Regenerationsplatten:

200 ml 5 % Agar
500 ml 1 M Bernsteinsäure
100 ml 5 % Casein Hydrolysate (Gibco BRL)
60 ml 10 % Yeast Extract (Gibco BRL)
100 ml K_2HPO_4 (3, 5 %)/ KH_2PO_4 (1,5 %)
10 ml 50 % Glucose
20 ml 1 M $MgCl_2$
10 ml 5 % BSA (kurz erwärmen)

Fusogen:

40 g PEG 6000
50 ml 2 x SMM
ad 100 ml ddH₂O
pH 6,8
autoklavieren

Alle Einzelkomponenten für DM3 Regenerationsplatten werden getrennt autoklaviert, vor Gebrauch auf 50°C erwärmt und zusammenpipettiert. Unmittelbar vor dem Gießen der Platten wird Erythromycin (Endkonzentration 5 µg/ml) hinzugegeben.

2.1.7 Lösungen und Puffer

Antibiotikastammlösungen:

Ampicillin: 100 mg Ampicillin-Natriumsalz (Sigma), 1 ml MQ-H₂O, sterilfiltrieren, bei -20°C lagern

Erythromycin: 50 mg Erythromycin (Sigma), 1 ml 96 % EtOH, bei -20°C lagern

Chloramphenicol: 20 mg/ml Chloramphenicol (Sigma), bei -20 °C lagern

Standardpuffer:

1 x TE: 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0

10 x TBE: 108 g Tris; 55 g Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

10 x TBS: 0,2 M Tris; 1,37 M NaCl, pH 7,6

2 Material und Methoden

10 x PBS: 80 g NaCl; 2 g KCl; 7,6 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O; 2 g KH₂PO₄; ad 1 l ddH₂O,
pH 7,4 mit NaOH

Puffer für Pulsfeld-Gelelektrophorese:

TEN Zellwäsche-Puffer: 0,1 mM Tris-HCl; 0,1 M; 0,15 M NaCl, pH 8,0
EC Blöckchen-Puffer: 6 mM Tris-HCl; 1 M NaCl; 0,1 M EDTA, pH 8,0
Lysepuffer: 6 mM Tris-HCl; 1 M NaCl; 0,1 M EDTA;
0,5 % Natrium-Desoxycholat; 1,0 % N-Lauroylsarkosin, pH 8,0
Deproteinisierungspuffer: 0,5 M EDTA, pH 8,0
TE Lagerungspuffer: 10 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA, pH 7,5

Agarosen für Pulsfeld Gelelektrophorese:

PF-Certified Agarose (Bio-Rad)
InCert FMC Low Melting Agarose (Biozym)

Ethidium-Bromid Bad:

2,5 mg Ethidium-Bromid werden auf 1 Liter 0,5 X TBE-Laufpuffer gegeben und in einer lichtgeschützten Plastikschaale bei RT aufbewahrt.

2.1.8 Geräte

Gerät	Firma
ALFexpress	Pharmacia
Autoklav	Wolf
Bildverarbeitung	Mitsubishi
Blotkammer	Eigenbau der Institutswerkstatt
Brutschrank	Forma Scientific, Inkubator 3250
Dreh- Schüttelapparat	Rettberg
DRII CHEF Mapper	Bio-Rad
Eismaschine	Icematic F90 Compact Eletronic
Elektrophoresekammer für	Biometra, Phase

Proteingele	
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Eigenbau der Institutswerkstatt
Feinwaage	Mettler H54
French Press	SLM AMINCO
Gefriertruhen	Heraeus
GeneQuant	Pharmacia
Gene Pulser Elektroporationsgerät	Bio-Rad
Hybridisierungsöfen	Biometra
Inkubations-Wasserbad	Digitherm
Kamera	Nikon
Laborzentrifugen	Heraeus, Biofuge 15, 15R, Megafuge1.0R
Leuchttisch	Ewem-Janus
Magnetrührer	Ikamag, RCT
MegaBACE 2000	Amersham Bioscience
Mikroskop	Zeiss, Standard 25
Mikrowellenofen	Moulinex
Multipipette	Matrix, Independent 6-Kanal
pH-Meter	Knick
Photometer	Pharmacia, Ultrospec 3000
Pipetten	Gilson
Plattiergerät	BioSys, Autoplate 3000
Reinstwassersystem	Seral
Sorvall-Zentrifuge	Du-Pont de Nemours, Superspeed RC2-B
Spannungsgeräte	Pharmacia MultiDrive XL, Consort E455 und E865
Speedvac-Konzentrator	Bachofer
Sterilbank	Karl Bleyemehl
Stereoskop	Zeiss, 1003
Thermocycler	Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400 & 9700
Thermomixer	Eppendorf, Comfort
Tischinkubator/Thermoblock	Eigenbau der Institutswerkstatt
Tischzentrifuge/Picofuge	Tomy Kogyo
UV-Lampe	Camac
UV-Transilluminator	Micro Bio Tec Brand
Vortex	Janke & Kunkel, Ika Vibrofix VF1
Waagen	Mettler
Wasserbäder	GFL, Infors

2 Material und Methoden

2.1.9 Computerprogramme

MAP 98, LASERGENE, SigmaPlot, HUSAR, CorelDRAW, MS Office, WinCam 2.2 (Cybertech, Berlin), DNASTar, Clone-Manager

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Qualität von isolierten Nukleinsäuren wird durch die spektrophotometrische Messung bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Der gemessene Wert bei 260 nm erlaubt die Kalkulation der Nukleinsäure in der Probe. Eine OD von 1 entspricht ungefähr 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis des gemessenen Wertes OD_{260}/OD_{280} lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der Nukleinsäure zu. Der optimale Werte für die DNA-Reinheit ist ein Verhältnis von 1,8. Die Nukleinsäure wird unverdünnt bzw. 1:10 verdünnt und gegen den Leerwert gemessen.

2.2.2 Automatische Sequenzierung mit dem ALFexpress

Das automatische Sequenziergerät ALFexpress von Pharmacia dient zur Bestimmung der Basensequenzabfolge von DNA-Molekülen. Das Detektionssystem beruht auf einem Helium-Neon-Laser (633 nm). Der Laser regt DNA-Moleküle zur Fluoreszenz an, die mit dem Carbocyaninfarbstoff Cy5 markiert sind. Diese markierten Moleküle werden mit einem 6 % PAA-Sequenziergel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Fluoreszenzsignal wird von einer Photodiode aufgenommen und von einer Analysesoftware ausgewertet.

2.2.2.1 Sequenziergel und Laufparameter

Für die Sequenzierung der DNA-Moleküle wurde ein 6 % Sequenziergel (FMC, HydroLink-LongRanger) hergestellt und die Elektrophorese mit 0,5 x TBE-Laufpuffer bei 1500 V, 60 mA, 25 W, sampling intervall von 2 bei 55 °C für 800 min. durchgeführt.

2.2.2.2 Sequenzierung von Plasmiden und DNA-Fragmenten mit markierten Primern

Die Sequenzierung von Plasmiden und DNA-Fragmenten mit markierten Primern wurde mit dem „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ von Amersham durchgeführt. Diese zyklische Sequenziermethode hat den Vorteil, dass mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase eine lineare Vermehrung der Ziel-DNA

2 Material und Methoden

stattfindet. Dazu sind als Vorzüge der Methode der Einsatz von geringen Mengen an Plasmid, Cosmid oder PCR-Produkten durch Amplifikation der Ziel-DNA und die gute Auflösung von GC-reichen- und AT-reichen-Kompressionen durch die zyklische Denaturierung, Anlagerung und Vermehrung bei hohen Temperaturen zu nennen.

Reaktionsbedingungen:

- 1) 5 min. 95°C (first delay)
- 2) 30 sek. 98°C (Denaturierung)
- 3) 40 sek. 60°C (Hybridisierung)
- 4) 5 min. 60°C (last delay)

Die Schritte 2 und 3 werden insgesamt 25 x wiederholt.

Im Anschluss an die Sequenzierreaktion werden zu jedem einzelnen Ansatz 5µl - Sequenzierauftragspuffer gemischt und bei -20°C eingefroren.

Die Sequenzierung wird wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben durchgeführt.

2.2.3 Automatische Sequenzierung mit dem MegaBACE 2000

Die Sequenzierung mit Hilfe des Kapillar Sequenzierers MegaBACE 2000 erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers.

2.2.4 Herstellung von Deletionsmutanten

Die Deletion von Genen oder Genabschnitten auf chromosomaler Ebene ermöglicht die Untersuchung zur Funktion dieser Gene oder Genabschnitte im direkten Vergleich mit den im Wildtyp vorliegenden intakten Genen. Die folgenden Methoden erläutern die Vorgehensweise, wie Deletionsmutanten von *L. monocytogenes* hergestellt werden.

2.2.4.1 Isolierung und Reinigung genomischer DNA aus *Listeria spp.*

GES-Reagenz: 5 M Guanidiumthiocyanat/GDTC (Sigma)

100 mM EDTA (Stock: 0,5 M in ddH₂O, pH 8,0)

0,5 % (v/v) Sarcosyl (Fluka, Stock: 10 %)

Zur EDTA-Stocklösung wird das abgewogene GDTC gegeben und durch Erwärmen bei 65°C gelöst. Hiernach wird zu der abgekühlten Lösung das Sarcosyl zugefügt, mit ddH₂O aufgefüllt und bei RT lichtgeschützt gelagert.

20 ml einer Listerien-ÜN-Kultur (BHI-Medium von Difco, 37°C, OD₆₀₀ = 2,0) werden in sterile Reaktionsgefäße (1,8 ml) zu 1,5 ml-Aliquots aufgeteilt und bei 4000 rpm, 5 min. bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet in 0,5 ml 0,85 % NaCl-Lösung (in ddH₂O) resuspendiert. Die Bakterien werden bei 1200 rpm, RT für 5 min. pelletiert, der Überstand verworfen und in je 100 µl Lysozym (50 mg/ml in 1 x TE-Puffer) aufgenommen. Nach der Inkubation bei 37°C für 30 min. und bei RT für weitere 5 min. werden je 1 µl RNase-DNase frei (10 U/µl; Roche Diagnostics) hinzugegeben und wieder 5 min. bei RT inkubiert. Die Lyse der Bakterien erfolgt durch Zugabe von je 0,5 ml GES-Reagenz, fünfmaligem vorsichtigen Invertieren und Inkubation bei RT für 5 min. Die Proben werden dann 2 min. auf Eis gestellt, je 250 µl kaltes 7,5 M Na-Acetat (in ddH₂O) hinzugegeben, durch viermaliges Invertieren gemischt und wiederum für 10 min. auf Eis gestellt. Zur Extraktion werden anschließend je 0,5 ml Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1) dazugegeben und die Proben 15 min. invertiert. Die obere, wässrige Phase wird nach der Zentrifugation (14000 rpm, 4°C, 15 min.) mit abgeschnittenen Pipetten-Spitzen (um eine Scherung der chromosomalen DNA zu vermeiden) in jeweils ein neues Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Zur Präzipitation wird zu jeder Probe 0,5 ml Isopropanol gegeben, das Reaktionsgefäß in horizontale Lage gebracht und 1-2 min. vorsichtig gedreht, wobei die ausfallende DNA als Schlieren sichtbar wird. Dann wird vorsichtig invertiert bis Luftblasen in der Lösung aufsteigen. Anschließend wird das Reaktionsgefäß für ca. 5 sec kräftig geschüttelt. Die ausgefallene DNA wird als Knäuel sichtbar. Die Proben werden bei 14000 rpm, 4°C für 5 min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNA-Pellets vorsichtig 5 x mit 1 ml

2 Material und Methoden

kaltem 70 % EtOH gewaschen. Das Pellet wird im Speed-Vac-Konzentrator getrocknet und in je 100 µl 1 x TE-Puffer ÜN bei RT gelöst.

2.2.4.2 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Expand PCR-System High Fidelity von Roche Diagnostics

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein zyklisches Verfahren, bei dem sich in jeder neuen Runde die Anzahl der DNA-Kopien verdoppelt. Man trennt die Stränge der Ziel-DNA durch Erhitzen und kühlt die Reaktion anschließend ab, damit sich die Primer spezifisch an die Zielregion anlagern können. Eine hitzestabile DNA-Polymerase verlängert die Primer (Oligonukleotide), wenn alle vier dNTPs, im entsprechenden Reaktionspuffer vorliegend, vorhanden sind. Es entstehen ab dem vierten Zyklus exponentiell Kopien der Zielregion. Das Expand PCR-System zeichnet sich besonders durch seine hohe Kopiergenauigkeit bei der DNA-Amplifikation von PCR-Produkten bis zu 10 kb aus. Dafür ist ein Enzymmix aus Taq-Polymerase (hohe Amplifikationsrate) und Pwo-Polymerase (hohe Kopiergenauigkeit) verantwortlich. Die DNA-Amplifikation wird wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben durchgeführt.

2.2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Auftragspuffer: 0,25 % Bromphenolblau

 25 % Ficoll (Typ 400, Pharmacia)

 in ddH₂O lösen, bei RT lagern

In Agarose-Gelen unterschiedlicher Konzentrationen lassen sich DNA und RNA-Moleküle in einem Größenbereich zwischen 0,5 kb und 20 kb im elektrischen Feld auftrennen.

Für ein 0,8 % Standardgel werden 0,8 g Agarose (Gibco BRL) durch Aufkochen in einem Mikrowellengerät in 100 ml 1 x TBE-Puffer gelöst. Wenn sich die Lösung auf Handwärme abgekühlt hat, werden 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Roth) hinzugegeben und in die Gelkammer gegossen. Nach 30 minütigem Auspolymerisieren des Gels kann es in die Elektrophoresekammer mit 1 x TBE Laufpuffer gelegt werden. Die DNA-Proben werden mit 5 µl Auftragspuffer gemischt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 150 V, 500 mA für 1 h.

2.2.4.4 Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit dem Qiaquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen

Der Qiaquick PCR Purification Kit dient zur schnellen Aufreinigung von DNA-Fragmenten (PCR-Produkte) aus einer PCR-Reaktion. Das Prinzip des Qiaquick PCR Purification Kit beruht auf der Bindung der durch ein chaotropes Salz gefällten PCR-Produkte an eine feste Silica-Matrix. Die gebundenen PCR-Produkte werden durch Wasch- und Zentrifugationsschritte von Proteinen, Primern, Nukleotiden und Salzen getrennt und mit MQ-H₂O oder 1 x TE-Puffer von der Silica-Matrix eluiert. Die Aufreinigung wird wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben durchgeführt.

2.2.4.5 Verdau und Phenolextraktion von DNA-Fragmenten

10 x TA-Restriktionspuffer: 330 mM Tris-Acetat, pH 7,9

660 mM KAc, pH 7,5

100 mM MgAc

5 mM DTT

1 mg/ml BSA

Restriktionendonukleasen ermöglichen aufgrund ihrer spezifischen Erkennungssequenz, DNA zu schneiden. Sie arbeiten als molekulare Scheren und helfen, DNA-Moleküle zu analysieren und in Vektoren zu klonieren.

Für einen Standard-Restriktionsansatz werden 200-300 ng DNA, 5-10 U Restriktionsendonuklease und 2 µl 10 x Puffer (TA-Puffer oder der vom Hersteller mitgelieferte enzymespezifische Puffer) in einem Gesamtvolumen von 20 µl zusammenpipettiert. Der Ansatz wird 2 h bei der für das Restriktionsenzym entsprechenden Temperatur verdaut. Manche Restriktionendonukleasen lassen sich bei 65°C innerhalb von 10 min. hitzeinaktivieren, wodurch der Verdau wirkungsvoll abgestoppt wird. Der Restriktionsansatz wird anschließend im Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung analysiert.

2 Material und Methoden

Restriktionsansätze sind nach dem Verdau für weitere molekularbiologische Anwendungen von Restriktionsenzymen und Salzen aufzureinigen. Dazu wird eine Phenolextraktion durchgeführt. Der Ansatz wird mit einer Suspension aus Roti-Phenol (Roth)/Isoamylalkohol (1:1) gemischt und bei 13000 rpm für 3 min. bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen und mit 2,5 Volumen absolut EtOH, 0,1 Volumen 3 M NaAc, pH 4,5 für 30 min. bei -20°C präzipitiert. Nach einer Zentrifugation bei 4°C, 15000 rpm, 15 min. und einmaligem Waschen mit 70 % EtOH kann das unter Vakuum getrocknete DNA-Pellet in einem beliebigen Volumen MQ-H₂O aufgenommen werden.

Der aufgereinigte Restriktionsansatz wird anschließend im Agarosegel analysiert.

2.2.4.6 Dephosphorylierung des Klonierungsvektors und Ligation der DNA-Fragmente

Ein durch Restriktionsspaltung mit einem Enzym geschnittener und somit linearisierter Vektor wird zunächst durch eine Phenolextraktion (Kap. 2.2.4.5) aufgereinigt. Der so aufgereinigte Vektor wird mit einer alkalischen Phosphatase modifiziert, damit der Vektor nicht durch die DNA-Ligationsreaktion rezirkularisiert wird. Dabei werden die 5'-Phosphatenden des linearisierten Vektors entfernt, die für die Katalyse der Rezirkularisierung notwendig sind.

5 µl des aufgereinigten Vektors werden mit 2 µl 10 x CIP-Puffer (Roche Diagnostics), 1 µl (1U/µl) CIP (calf intestinal alkaline phosphatase, Roche Diagnostics) und 12 µl MQ-H₂O versetzt. Der Ansatz wird für eine Stunde bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl EGTA (200 mmol/l) und Erhitzen auf 65°C für 10 Minuten wird die Reaktion gestoppt. Ein entsprechender Roti-Phenol/Isoamylalkohol-Ansatz (1:1) wird für 1 min. auf 65°C erwärmt und dem gestoppten Reaktionsansatz zugeführt. Für weitere 90 Sekunden wird bei 65°C inkubiert und alle 30 Sekunden das 1,5 ml Reaktionsgefäß geschneipst. Durch erneutes Phenolisieren wird die Phosphatase entfernt.

In einer Ligation werden zwei getrennte DNA-Stränge miteinander verknüpft, die vorher mit Restriktionsenzymen behandelt wurden. Die Ligase verbindet die OH-Gruppe am 3'-Strangende mit einer Phosphat-Gruppe am 5'-Strangende. Das Enzym wird durch ATP adenyliert und adenyliert daraufhin selbst das endständige 5'-Phosphat der Verbindungsstelle, wodurch es über einen nukleophilen Angriff eine Phosphodiesterbindung ermöglicht.

Für eine Ligrationsreaktion werden die beteiligten Partner (vorbereiteter Vektor und DNA-Fragment) im Verhältnis 1:3 gemischt. Für ein Gesamtvolumen von 20 µl werden 4 µl 5 x Ligationpuffer (Gibco BRL) und 1µl (1U/µl) T4 DNA Ligase (Gibco BRL) zum

Reaktionsansatz gegeben. Die Ligation erfolgt bei 14°C über Nacht im Wasserbad und kann anschließend zur Transformation eingesetzt werden (Kap. 2.2.4.8).

2.2.4.7 Klonierung von DNA-Fragmenten mit dem pCR-XL-Topo Cloning Kit von Invitrogen

Mit dem pCR-XL-Topo Cloning Kit können PCR-Produkte mit 3'-A-Überhängen innerhalb von 5 min. bei RT direkt in den 5'-T-Überhänge tragenden pCR-XL-Topo Vektor kloniert werden. Der Kit hat die Besonderheit, daß keine Ligase bei der Verknüpfung von PCR-Produkt und Vektor benutzt wird. Der linearisierte Vektor wird durch die an seinen 3'-T-Überhängen bindende Topoisomerase aktiviert, die nach der Ligation des PCR-Produktes mit dem Vektor von der DNA dissoziiert.

Die PCR-Produkte, die bei der Expand-PCR entstehen (Kap. 2.2.4.2) enthalten aufgrund des verwandten Enzymmixes zu 50 % glatte und zu 50 % klebrige Enden. Für die glatten Enden ist die Pwo-DNA-Polymerase verantwortlich. Die klebrigen Enden der PCR-Produkte entstehen durch die Fähigkeit der Taq-DNA-Polymerase, ein Adenosintriphosphat an das 3'-Ende der PCR-Produkte anzuhängen. Für den Cloning-Kit können die Amplifikate aus der Expand-PCR verwendet werden. Die Klonierung wird wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben durchgeführt.

2.2.4.8 Transformation in *E. coli*

Herstellung von ultra-kompetenten *E. coli* Zellen nach Inoue (1990):

SOB-Medium:	2 % Bacto Tryptone
	0,5 % Bacto Yeast Extract
	10 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
	pH 6,7-7,0
TB:	10 mM Pipes
	55 mM MnCl ₂
	15 mM CaCl ₂

2 Material und Methoden

250 mM KCl
pH 6,7

Zunächst wird die benötigte Menge für 10 mM Pipes in 800 ml MQ-H₂O gelöst. Der pH-Wert von 6,95 wird mit 15-20 ml KOH (1 M) eingestellt. Jedes Salz wird einzeln hinzugegeben und mit MQ-H₂O auf 1 l aufgefüllt. Der Puffer wird sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

10 ml SOB-Medium, in einem 100 ml Erlenmeyerkolben, werden mit dem gewünschten Stamm (10 µl aus Glycerinkonserve) beimpft und 14 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wird diese ÜN-Kultur 1:50 in SOB-Medium (250 ml) verdünnt und im 1000 ml Erlenmeyerkolben bei 18°C im Wasserbad inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht ist. Die Kultur wird in sterilen GS3-Zentrifugenbecher überführt und 10 min. auf Eis abgekühlt. Nach einer Zentrifugation (2500 g, 4°C, 10 min.) wird das Pellet in 80 ml eiskaltem TB vorsichtig resuspendiert und erneut 10 min. auf Eis inkubiert. Die Zellen werden wiederum durch Zentrifugation bei 2500 g, 4°C, 10 min. pelletiert; der Überstand wird vollständig entfernt und die Zellen werden in 20 ml eiskaltem TB aufgenommen. Es werden 1,4 ml DMSO (Endkonzentration 7 %) zupipettiert und der Ansatz wieder 10 min. auf Eis stengelassen. Die kompetenten Zellen werden zu 500 µl aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zu einem halben Jahr lang gelagert.

Hitzeschocktransformation in kompetente *E. coli* Zellen nach Hanahan (1991):

SOC-Medium:

- 2 % Bacto Tryptone
- 0,5 % Bacto Yeast Extract
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄
- 20 mM Glucose

Ein Volumen von 100 µl kompetenten *E. coli* (DH10β, DH5α oder INVαF') wird mit dem Ligationsansatz oder reinem Plasmid (maximal 50-1000 ng DNA) gemischt und für 30 min. auf Eis inkubiert. Die Zellen werden nun für 90 sek. einer Temperatur von 42°C im Thermoblock ausgesetzt und anschließend weitere 2 min. auf Eis stehen gelassen, bevor 400 µl SOC-Medium hinzupipettiert werden. Je nach zu transformierendem Plasmid erfolgt die Regeneration bei 30°C oder 37°C für 1-3 h. Danach wird der Transformationsansatz auf

Antibiotikaplatten ausplattiert, die der Antibiotikaresistenz des transformierten Plasmids entsprechen.

2.2.4.9 Identifizierung positiver Transformanten durch PCR

Puffer A (10 x): 200 mM Tris/HCl, pH 8,3
 20 mM MgCl₂
 250 mM KCl
 0,5 % Tween 20
 1 mg/ml Gelatine

dNTP-Mix (5 mM dNTP): 10 µl dTTP (100 mM)
 10 µl dGTP (100 mM)
 10 µl dATP (100 mM)
 10 µl dCTP (100 mM)
 160 µl MQ-H₂O

Template: Als Template können Einzelkolonien (von den Agarplatten mit sterilen Zahnstochern abgenommen), chromosomale DNA, Plasmid-DNA oder aufgereinigte PCR-Produkte dienen.

Primer: Die Oligonukleotide werden je nach Template und zu amplifizierendem Produkt ausgewählt. Jeweils 1 µl eines Sense- und Antisense-Primers (20 pmol/µl; in MQ-H₂O verdünnt) werden zu dem Ansatz pipettiert.

dNTP-Mix: 4 µl des dNTP-Mixes werden zugegeben.

PCR-Puffer: Je 10 µl des 10 x PCR-Puffer A werden zum Reaktionsansatz pipettiert.

Taq-DNA-Polymerase: 0,5 µl (entsprechen 2,5 U Enzym von Gibco BRL).

MQ-H₂O: ad 100 µl

2 Material und Methoden

Reaktionsbedingungen:

- 1) 2 min. 94°C (first delay)
- 2) 20 sek. 94°C (Denaturierung)
- 3) 30 sek. 50°C (Hybridisierung)
- 4) 1,5 min. 72°C (Auffüllreaktion)
- 5) 3 min. 72°C (last delay)

Die Schritte 2 bis 4 werden insgesamt 25 x wiederholt.

Im Anschluss an die PCR werden 5 µl des einzelnen Ansatzes mit 5 µl Ficoll-Auftragspuffer gemischt und auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.4.10 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem GFX Micro Plasmid Prep Kit von Pharmacia

Der GFX Micro Plasmid Prep-Kit dient zur schnellen Isolierung und Aufreinigung von hochgradig sauberer Plasmid DNA (bis zu 15 µg) aus 1-3 ml *E. coli*-ÜN-Kulturen. Die aufgereinigte Plasmid DNA ist in ihrer Qualität vergleichbar mit der aus einem CsCl-Gradienten aufgereinigten DNA und ist für jede molekularbiologische Anwendung nutzbar. Das Prinzip des Plasmidisolierungskits beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Bakterien, Fällung der im Lyseansatz befindlichen bakteriellen Proteine und selektiven Bindung der freien Plasmid DNA an eine feste Silica-Matrix. Die gebundene Plasmid DNA wird durch Waschstschritte von Kontaminationen und Salzen gereinigt und mit MQ-H₂O oder 1 x TE-Puffer von der Silica-Matrix eluiert. Die Plasmidisolierung wird entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.2.4.11 Klonierung in den Suizidvektor pAUL-A

Um Deletionen eines Gens im Chromosom des Bakteriums etablieren zu können, müssen zuvor zusammengefügte flankierende DNA-Abschnitte des zu deletierenden Gens auf den Suizidvektor pAUL-A in *E. coli* kloniert werden. Nach Plasmidisolierung und Protoplasten-Transformation in Listerien wird mit der Integration und Exzision begonnen (Kap. 2.2.4.14).

2.2.4.12 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Jetstar 2.0 Midiprep Kit von Genomed

Der Jetstar 2.0 Midiprep Kit dient zur schnellen Isolierung und Aufreinigung von ultra sauberer Plasmid DNA (bis zu 100 µg) aus 25-100 ml *E. coli*-ÜN-Kulturen. Die Qualität der aufgereinigten Plasmid DNA entspricht der aus einem 2 x CsCl-Gradienten gereinigten Plasmid DNA. Das Prinzip der Aufreinigung gleicht dem in Kapitel 2.2.4.10 beschriebenen. Ein genereller Unterschied besteht in der Säulenmatrix, an der die Plasmid DNA gebunden wird. In diesem Fall handelt es sich um eine Anionenaustauschermatrix. Die Plasmidisolierung wird wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben durchgeführt.

2.2.4.13 Protoplasten-Transformation von Listerien nach Wuenscher (1991)

2 x SMM:	1 M Sucrose	SMMP:	55 ml 2 x SMM
	0,02 M Tris		40 ml 4 x PAB
	0,01 M MgCl ₂		5 ml 5 % BSA
	0,04 M Maleinsäure		
	pH 6,8 mit 10 N NaOH		

1 M Bernsteinsäure:	135,05 g Bernsteinsäure-Na-Salz ad 500 ml ddH ₂ O, pH 7,3
---------------------	---

4 x Bacto Perassau Broth (PAB):	16 g Nutrient Broth (Gibco BRL) 14 g Bacto Tryptone (Difco) 12,4 g Yeast Extract (Gibco BRL) ad 1 l ddH ₂ O pH 6,8
---------------------------------	---

2 Material und Methoden

5 % BSA: 5 g BSA (Gerbu Fraktion V)
ad 100 ml ddH₂O
pH 7,5 mit NaOH
sterilfiltrieren

Eine ÜN-Kultur (BHI mit 0,2% Glycin) von *Listeria monocytogenes* EGD-e wird 1:100 in 30 ml BHI-Medium verdünnt und bei 200 rpm im Schüttelwasserbad bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 inkubiert. Von der Kultur werden 25 ml in ein steriles Greiner-Röhrchen überführt und bei 5000 rpm für 10 min. zentrifugiert. Die Bakterien werden mit 25 ml sterilem MQ-H₂O einmal gewaschen, anschließend in 2,5 ml SMMP (frisch!) resuspendiert und in ein steriles 50 ml Greiner-Röhrchen überführt. Von einer frisch angesetzten Lysozymbelösung in 2 x SMM (100 mg/ml) werden 250 µl hinzupipettiert. Die Bakterien werden ohne Schütteln für 12 bis 22 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Protoplasten unter dem Mikroskop überprüft und bei 5000 rpm für 10 min. zentrifugiert. Das Pellet wird einmal mit 10 ml frischem SMMP gewaschen und nach der Zentrifugation in 2,5 ml SMMP resuspendiert. Die Protoplasten werden in sterile 1,5 ml Schraubgefäße zu jeweils 300 µl aliquotiert und bei -80°C gelagert.

DM3 Regenerationsplatten:

200 ml 5 % Agar
500 ml 1 M Bernsteinsäure
100 ml 5 % Casein Hydrolysate (Gibco BRL)
60 ml 10 % Yeast Extract (Gibco BRL)
100 ml K₂HPO₄ (3, 5 %)/KH₂PO₄ (1,5 %)
10 ml 50 % Glucose
20 ml 1 M MgCl₂
10 ml 5 % BSA (kurz erwärmen)

Fusogen:

40 g PEG 6000
50 ml 2 x SMM
ad 100 ml ddH₂O
pH 6,8
autoklavieren

Alle Einzelkomponenten für DM3 Regenerationsplatten werden getrennt autoklaviert, vor Gebrauch auf 50°C erwärmt und zusammenpipettiert. Unmittelbar vor dem Gießen der Platten wird Erythromycin (Endkonzentration 5 µg/ml) hinzugegeben.

In ein 15 ml Greiner-Röhrchen werden 300 µl Protoplasten überführt und mit 0,5-1,0 µg des zu transformierenden Plasmids vorsichtig gemischt. Unter der Sterilbank werden vorsichtig 2

ml Fusogen hinzupipettiert und der Ansatz wird für exakt 1 min. im Kreis schnell hin und her geschwenkt. Nach einer weiteren Minute stehender Inkubation werden 7 ml frisches SMMP zugegeben, der Ansatz wird 5 x vorsichtig invertiert und bei 5000 rpm für 20 min. bei RT zentrifugiert. Wegen des sehr kleinen Pellets wird der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Die Zellen werden in 1 ml SMMP resuspendiert und für 3 h bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Jeweils 333 µl der Protoplasten werden auf eine DM3-Platte (vorgetrocknet) vorsichtig ausplattiert. Die Platten werden für ca. 4-8 Tage im Brutschrank bei 30°C inkubiert.

2.2.4.14 Integration und Excision des Suizidvektors pAUL-A

Bei der Integration des Suizidvektors pAUL-A mit den klonierten flankierenden Deletionsabschnitten wird durch den thermosensitiven Replikationsstart des Plasmides die Integration ermöglicht. Durch homologe Rekombination zwischen Wildtypgen und den flankierenden Deletionsabschnitten des Genes kommt es zur Etablierung der Deletion im bakteriellen Chromosom (Schäferkordt, 1995).

Positive Transformanten aus der Protoplasten-Transformation werden 3 x auf BHI/5EM-Agar-Platten ausgestrichen und ÜN bei 42°C inkubiert. Es folgt eine Inkubation bei 30°C ÜN in 10 ml BHI-Medium. Am nächsten Tag wird die Kultur 1:1000 in BHI verdünnt und bis zu einer $OD_{600} = 0,3-0,5$ bei 30°C wachengelassen. Danach wird die Kultur 1:20 in vorgewärmtes BHI/10EM-Medium verdünnt und für 2 h bei 30°C geschüttelt. Es wird Ampicillin (200µg/ml) dazupipettiert und ÜN bei 30°C inkubiert. Bei dieser Behandlung wird der Suizidvektor exzidiert. Nach der ÜN-Inkubation wird die Kultur zu 10^{-2} , 10^{-3} , und 10^{-4} in Medium oder 1 x PBS verdünnt und pro Verdünnung werden jeweils drei BHI-Agarplatten mit 100 µl ausplattiert und bei 30°C bebrütet. Am nächsten Tag werden die Kolonien auf BHI/5EM-Agarplatten überstempelt und bei 30°C inkubiert. Die Erythromycin positiven Kolonien entsprechen den gewünschten Deletionsmutanten. Sie können mittels PCR und Sequenzierung überprüft werden.

2.2.4.15 Anlegen von Glycerinkonserven

Von einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur wird 1 ml in ein steriles 2 ml Einfriergefäß pipettiert. Nach Zugabe von 500 µl 100 % Glycerin (autoklaviert) werden die Glycerinkonserven gut durchmischt und bei -20°C bzw. -80°C gelagert.

2.2.5 Pulsfeld-Gelelektrophorese großer genomischer DNA-Fragmente

2.2.5.1 Anzucht der Isolate

Die zu untersuchenden Isolate werden in 10 ml nicht supplementiertes BHI-Flüssigmedium in einem 100 ml Kolben eingerieben und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Morgen wird der Ansatz photometrisch untersucht, wobei eine OD von 1,5 - 2,0 angestrebt werden soll. Ist dies der Fall, so wird jeweils 1 ml der Übernachtskultur in ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und zentrifugiert (10 min., 5.400 rpm, RT). Das Pellet wird in 1 ml TEN-Puffer (Kap. 2.1.8) resuspendiert und erneut zentrifugiert (4 min., 15.000 rpm, RT). Nach zwei weiteren identischen Waschschritten wird das Pellet in 200 µl EC-Puffer vorsichtig resuspendiert.

2.2.5.2 Präparation der Agaroseblöckchen (plugs)

Vorbereitung der Agarose:

Verwendet wurde die InCert Low Melting Agarose FMC der Firma Biozym.

Um eine 1 %ige Agaroselösung zu erhalten, werden 0,5 mg InCert Agarose in 50 ml MQ-Wasser gelöst. Anschließend wird die Lösung schonend bis zu einem kurzen Aufkochen erhitzt, worauf die fertige Lösung glasklar sein muß.

Gießen der Blöckchen:

Nachdem die erhitzte Agarose auf etwa 45 - 50 °C abgekühlt ist, werden die 200 µl Bakteriensuspension mit jeweils 800 µl Low Melting Agarose durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gleichmäßig durchmischt. Wichtig ist, dass bei mehreren Ansätzen jeder Ansatz einzeln behandelt wird. Anschließend wird die Mischung in die zuvor vorbereiteten Blöckchenformen, die der Größe der Taschen im Laufgel entsprechen, pipettiert. Die Agarose erstarrt innerhalb weniger Minuten auf Eis. Überstehende Agarosereste können mit einem abgeflammtten Skalpell korrigiert werden. Zu diesem Zeitpunkt wird ein Blöckchen der Serie mit einem sterilen Skalpell halbiert und in einem Gefäß in TE-Lagerungspuffer, zur Kontrolle der nun folgenden Schritte, unbehandelt mitgeführt.

2.2.5.3 Lyse der in den Agarose-Blöckchen eingebetteten *Listerien*

Frisch angesetzter Lysepuffer:	Mutanolysin-Stocklösung (5000 U/ml)	8 µl
	Lysozym-Stocklösung (100 mg/ml)	100 µl
	<u>Lysepuffer (2.1.7)</u>	<u>892 µl</u>
	=	1000 µl

Fünf Blöckchen werden in je ein steriles 12 ml Reaktionsgefäß (Greiner), das mit 1 ml frisch angesetztem Lysepuffer gefüllt ist, überführt. Alle Blöckchen müssen vollständig mit Puffer bedeckt sein. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C unter leichtem Schütteln über Nacht. Nach Abschluß des Lyseschrittes erscheinen die Blöckchen transparent, aber nicht immer völlig klar. Der Vergleich mit dem zuvor aufbewahrten plug in TE-Puffer zeigt nun deutlich den Unterschied.

2 Material und Methoden

2.2.5.4 Deproteinisierung

Vollständiger Deproteinisierungspuffer (Ansatz pro Reaktionsgefäß/ pro 5 plugs):

Proteinase K Stocklösung (10 mg/ml)	100	µl
N-Lauroylsarkosin Stocklösung (0,1 g/ml)	100	µl
<u>0,5 M EDTA</u>	<u>800</u>	<u>µl</u>
	=	1000 µl

Der Lysepuffer wird steril abgezogen und der Überstand in einen Erlenmeyerkolben pipettiert, um anschließend autoklaviert zu werden. Nun werden die Blöckchen zweimal für mind. 1 h in 4 ml 0,5 M EDTA bei RT gewaschen. Auch die hierbei anfallenden Überstände werden anschließend autoklaviert. Schließlich wird in jedes Reaktionsgefäß (5 plugs) 1 ml vollständiger Deproteinisierungspuffer gegeben und der Ansatz 8 - 48 h (über Nacht) bei 55 °C aufrecht stehend inkubiert.

Proteinase K zerlegt als eiweißspaltendes Enzym Bakterienmembran und Zellbestandteile. Detergentien wie N-Lauroylsarkosin setzen die Oberflächenspannung der Lösung herab und erleichtern somit die Diffusion durch das Agaroseblöckchen. Nach erfolgreicher Proteolyse erscheinen die zuvor leicht trüben Blöckchen klar und bilden einen deutlichen Kontrast zur Trübung des in TE mitgeführten Kontrollblöckchens.

Dauert diese Deproteinisierung länger als 18 h, so kann eine Inaktivierung der Proteinase K entfallen, da es sich hier um eine Serinprotease handelt, die sich schließlich selbst verdaut. Um die Spaltprodukte auszuwaschen, werden die Proben anschließend dreimal 30 Minuten in einem größeren Volumen (z. B. 20 - 25 ml) TE-Puffer gewaschen. Dazu überführt man die 5 Blöckchen aus ihrem 12 ml Reaktionsgefäß mit Hilfe eines abgeflamten Spatels in ein 50 ml Reaktionsgefäß. Die drei Waschschrte erfolgen unter leichtem Schwenken bei RT. Zu kurze Waschschrte wirken sich negativ auf die Aktivität des anschließend verwendeten Restriktionsenzym aus. Die so aufbereiteten Blöckchen können nun direkt für einen Restriktionsverdau eingesetzt oder aber in einigen Millilitern TE-Puffer in einem 12 ml-Reaktionsgefäß problemlos für einige Monate bei 4°C gelagert werden.

2.2.5.5 Restriktionsverdau

Um den Restriktionsverdau zu optimieren, werden die Blöckchen einzeln viermal für jeweils 1 h in 1 ml des entsprechenden Restriktionspuffers äquilibriert. Dieser Schritt erfolgt unter leichtem Schwenken bei RT. Danach wird der eigentliche Restriktionsansatz gestartet. Nachdem der zum Äquilibrieren benutzte Puffer sorgfältig abgesaugt worden ist, werden Restriktionspuffer und Enzymmenge (Erfahrungswert, z. B. *NotI*-Verdau genomischer Listerien-DNA: 30 U) in einem Gesamtvolumen von 200 µl zugegeben. Die Inkubation erfolgt unter leichtem Schütteln über Nacht bei der für die jeweils verwendete Restriktionsendonuklease optimalen Reaktionstemperatur (*NotI*: 37°C). Daraufhin wird der Restriktionsverdauansatz vorsichtig abgezogen und durch einen neuen Ansatz ersetzt, wobei in diesem Fall 20 U *NotI* eingesetzt werden. Dadurch gelingt es, den Anteil ungeschnittener genomischer DNA möglichst gering zu halten. Dieser zweite *NotI*-Verdau wird für weitere 4 - 6 h unter identischen Bedingungen inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wird die Restriktionslösung vorsichtig abpipettiert und das Blöckchen anschließend für 15 - 30 Minuten in 0,5 M EDTA gewaschen. Bis zum geplanten Gellauf kann das verdaute Blöckchen in 1 ml 0,5 M EDTA bei 4°C gelagert werden.

2.2.5.6 Das PFGE-System

Zur Anwendung kommt ein CHEF - DR II (Clamped Homogenous Electric Field plus Dynamic Regulation) - System (Bio-Rad). 24 hexagonal in der Elektrophoresekammer angeordnete Elektroden bauen ein elektrisches Feld auf, in dessen Richtung die im Laufgel eingebetteten DNA-Moleküle wandern. Sobald nun das erste Feld ab- und ein zweites angeschaltet wird, das in einem definierten Winkel von 120° zum ersten steht, müssen sich die DNA-Moleküle umorientieren. Je größer ein DNA-Molekül ist, desto länger benötigt es für diese Reorientierungsphase. Daraus resultiert bei der PFGE eine Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Die Intervalle, nach denen die beiden elektrischen Felder einander abwechseln, werden als sogenannte Pulszeit (switch time) programmiert. Weitere Faktoren, die die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente beeinflussen, sind die Spannung, die Ionenkonzentration des Gels und des Laufpuffers, die Agarosekonzentration und die Temperatur des zirkulierenden Laufpuffers. Je nach elektrischer Feldstärke und gewählter Pulszeit wird ein anderer Molekulargewichtsbereich aufgetrennt. Bei konstanter Feldstärke werden Banden größerer Kilobasenbereiche sichtbar, wenn die Pulszeit ansteigt.

2 Material und Methoden

2.2.5.7 Herstellen und Bestücken des Laufgels

Verwendete Agarose: PF-certified Agarose (Bio-Rad)

Die Agarose wird 1 %ig in 0,5 x TBE-Laufpuffer gelöst und das Gel im vom Hersteller mitgelieferten Rahmen gegossen. Die benötigte Menge richtet sich nach der Größe des Rahmens. Um ein Verziehen des Kunststoffrahmens zu vermeiden lässt man die Agarose vor dem Gießen etwas abkühlen. Der Kamm, der die Geltaschen formt, wird sofort eingesetzt und erst herausgezogen, wenn die Agarose vollständig erstarrt ist. Jedes restriktionsverdaute Agaroseblöckchen wird zunächst für 1 Stunde in Laufpuffer (0,5 x TBE) unter leichtem Schwenken bei RT äquilibriert, um optimale Laufbedingungen herzustellen. Daraufhin werden die Blöckchen unter Zuhilfenahme eines abgeflamnten Spatels und eines sterilen Skalpell in die Geltaschen eingebracht. Es ist auch möglich, einzelne Blöckchen mit dem Skalpell zu halbieren und nur die halbe Menge an DNA in einer Gelspur laufen zu lassen (Erfahrungswert). Zwischen den Wänden der Geltaschen dürfen sowohl in Laufrichtung, also vorne, als auch hinten, keine Luftblasen eingeschlossen sein, da sonst der Lauf behindert wird. Seitliche Luftblasen stören dagegen nicht. Wenigstens eine Spur wird für einen Marker reserviert, der fertig geliefert wird (Kap. 2.1.5) und nur noch, entsprechend portioniert, in die Geltasche eingebracht werden muss. Mit 1 %iger Low-melting-Agarose werden die Geltaschen versiegelt, um einen Verlust der Blöckchen während des Gellaufs zu vermeiden.

2.2.5.8 PFGE-Lauf und verschiedene Auflösungsfenster

Als Laufpuffer wird 0,5 x TBE in die Elektrophoresekammer eingefüllt und die Pumpe für den Kühlkreislauf gestartet. Während des Laufes ist eine Puffertemperatur von 12 – 13 °C einzuhalten. Der Laufpuffer wird nach jedem zweiten Lauf gewechselt, um einen möglichst konstanten Stromfluß (ca. 130 - 160 mA) zu gewährleisten. Das bestückte Gel wird in den passenden Rahmen in der vorgekühlten Kammer plaziert und der Lauf gestartet.

Im Rahmen der *NotI*-Kartierung wurden in dieser Arbeit folgende Auflösungsfenster durch Variation der initialen und finalen Pulszeit sowie der Laufzeit bei konstanter Spannung (6 V/cm) gewählt, um verschiedene Fragmentgrößen präziser auftrennen zu können:

Fenster 1	<u>Fragmentgrößen:</u>	450 kb bis zu 2 Mb
	<u>Laufzeit:</u>	15 h mit konstanter Pulszeit von 60 sek. gefolgt von 9 h mit konstanter Pulszeit von 120 sek.
Fenster 2	<u>Fragmentgrößen:</u>	40 kb bis zu 550 kb
	<u>Laufzeit:</u>	24 h mit initialer Pulszeit von 15 sek. und finaler Pulszeit von 35 sek.
Fenster 3	<u>Fragmentgrößen:</u>	5 kb bis zu 150 kb
	<u>Laufzeit:</u>	15 h mit initialer Pulszeit von 1 sek. und finaler Pulszeit von 12 sek.

2.2.5.9 Laufende, Auswertung und Größenbestimmung der Fragmente

Nach Beendigung des Laufs wird das Gel vorsichtig von der Graffitplatte des Rahmens gehoben und 10 - 15 Minuten in einem Ethidiumbromid-Bad (2,5 mg/l Ethidiumbromid in 0,5 x TBE) gefärbt. Gearbeitet wird nur mit Handschuhen, da Ethidiumbromid ein Mutagen ist.

Nachdem das Gel dann für 10 - 20 Minuten, oder bei Bedarf auch länger, in reinem Laufpuffer entfärbt worden ist, kann man die DNA-Banden im Durchlicht auf dem UV-Lampentisch betrachten und ggf. mit geeigneter Kamera dokumentieren.

Die Auswertung erfolgt mit Hilfe der mitgelaufenen DNA-Größenstandards. In dieser Arbeit wurde zudem noch das Auswertungsprogramm WinCam 2.2 der Firma Cybertech verwendet.

2.2.6 Southern-Blot-Hybridisierung

Zur Southern-Blot Hybridisierung wurde in dieser Arbeit das DIG Nonradioactive Nucleic Acid Labelling and Detection System von Roche Diagnostics verwendet. Dieses System beruht auf dem Prinzip, DNA, RNA oder Oligonukleotide mit Hilfe von Digoxigenin-markierten Nukleotiden zu versehen, die anschließend, nach einer drei Schritte umfassenden

2 Material und Methoden

Aufbereitung, anhand spezifischer Lichtsignale infolge einer Chemilumineszenz-Reaktion mit einem Röntgenfilm detektiert werden können. Die Verwendung nichtradioaktiver Proben bringt mehrere Vorteile mit sich. So fällt zum einen die Strahlenbelastung früherer Verfahren weg, und die Proben können zudem problemlos bis zu einem Jahr aufbewahrt werden. Des Weiteren ist ein mehrfacher Einsatz der Hybridisierungslösungen möglich.

Depurinierungslösung:	0,25 M HCl
Denaturierungslösung:	0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl
Neutralisationslösung:	0,5 M Tris-HCl, pH 7,5; 3 M NaCl
20 x SSC-Puffer:	3 M NaCl; 0,3 M Tri-Natriumcitrat, pH 7,0
Standard Hybridisierungspuffer : (SHP)	5 x SSC; 0,1 % N-Lauroylsarkosin; 0,02 % SDS; 1 % Blockierungsreagenz (Roche Diagnostics)
2 x Waschlösung:	2 x SSC mit 0,1 % SDS
0,5 x Waschlösung:	0,5 x SSC mit 0,1 % SDS

2.2.6.1 Southern-Blot von CHEF-Gelen

Das CHEF-Gel wird nach dem PFGE-Lauf zunächst, wie unter 2.2.5.9 beschrieben, dokumentiert. Nachdem das Gel auf die kleinstmöglich Größe mit einem Skalpell zugeschnitten worden ist, wird eine Saran-Folie vorsichtig und faltenfrei über das auf dem UV-Tisch liegende Gel gelegt. Auf dieser Klarsichtfolie werden nun bei UV-Durchleuchtung die Begrenzungen des Gels und alle zu erkennenden Banden mit einem Stift markiert, so dass ein genaues Abbild des Gels auf der Folie entsteht. Es ist wichtig, zügig zu arbeiten, um einerseits einer unnötigen UV-Exposition zu entgehen und andererseits einem Verblässen, insbesondere kleinerer Banden, zuvorzukommen. Nun wird das Gel für 30 Minuten in Laufpuffer entfärbt, worauf mit den Vorbereitungen für den Blot begonnen wird. Nach 10-minütigem Schwenken des Gels in Depurinierungslösung wird es für 2 Minuten in reinem Aqua dest. gewaschen. Dem schließt sich eine zweimalige Behandlung in Denaturierungslösung an, wobei jeder Schritt 15 Minuten dauert und jeweils von einem 2-minütigen Waschschrift in Aqua dest. gefolgt wird. Auf dieselbe Art wird das Gel daraufhin zweimal für je 15 Minuten in Neutralisationslösung geschwenkt. Die Nylonmembranen von Roche Diagnostics werden ohne spezielle Vorbehandlung entsprechend der Angaben des Hersteller verwendet, und das so vorbereitete Gel wird über Nacht durch Kapillartransfer auf die Membran geblottet, wobei 20 x SSC-Puffer eingesetzt wird. Am nächsten Morgen wird das Gel erneut kurz auf dem UV-Schirm betrachtet, um die Effizienz des Blots zu überprüfen. Es sollten keine Banden mehr erkennbar sein. Anschließend verwirft man das Gel. Die

Membran wird, noch feucht, von jeder Seite für je zwei Minuten zur Fixierung auf den UV-Schirm gelegt und anschließend an der Luft getrocknet. Es ist darauf zu achten, die Membran stets nur mit Pinzetten am Rand zu berühren. Nach 5-minütigem Schwenken in 2 x SSC-Puffer und anschließendem Waschen in Aqua dest. (2 x 15 Minuten) kann die Membran luftgetrocknet zwischen zwei Whatman-Papieren und in Alu-Folie eingeschlagen bei 4°C gelagert oder direkt zur Prähybridisierung eingesetzt werden.

2.2.6.2 Gewinnung DIG-markierter Sonden für genomische *L. monocytogenes*-DNA mittels PCR

Digoxigenin-11-dUTP kann durch Taq-Polymerase während einer PCR in das DNA-Produkt eingebaut werden. Die dadurch entstehende Sonde ist sehr sensitiv und die Ausbeute dieser Reaktion recht hoch. Mittels spezifischer forward- und reverse-primer wird der gewünschte DNA-Abschnitt des Chromosoms von *L. monocytogenes* amplifiziert und gleichzeitig DIG-markiert. Die Reaktion wird entsprechend den Angaben des Herstellers angesetzt.

2.2.6.3 Prähybridisierung und Hybridisierung

Die Prähybridisierung bereitet die Membran für die Sonden-Hybridisierung vor, indem unspezifische Bindungsstellen für Nukleinsäuren auf der Membran blockiert werden. Dies dient letztlich einer Reduzierung des Hintergrundes. Zur Prähybridisierung wird die Membran zwei Stunden in SHP bei 68 °C im Hybridisierungssofen inkubiert. Die Menge des verwendeten Puffers richtet sich nach der Größe der Membran (20 ml SHP für ca. 10 x 10 cm). Die Vorbereitung der Sonden erfolgt durch 10-minütiges Erhitzen in einem 95 °C heißen Heizblock. Anschließend werden sie nach kurzem Zentrifugieren für weitere zwei Minuten auf Eis gelegt. Die Prähybridisierungslösung wird verworfen und durch Hybridisierungslösung (SHP mit 5 ng/ml denaturierte Sonde) ersetzt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 68 °C im Hybridisierungssofen. Am darauffolgenden Morgen wird die Hybridisierungslösung in ein steriles Greiner-Plastikgefäß überführt und bei -20 °C bis zu einer späteren Wiederverwendung gelagert. Die Membran wird nun zweimal fünf Minuten in 2 x Waschlösung bei RT geschwenkt. Dem schließt sich eine Inkubation in 0,5 x Waschlösung schwenkend bei 68 °C an.

2 Material und Methoden

2.2.6.4 Detektion

Die Chemilumineszenz-Detektion erfolgt in drei aufeinanderfolgenden Schritten entsprechend den Angaben des Herstellers. Im ersten Schritt wird die Membran mit Blockierungslösung behandelt, um eine unspezifische Bindung der Anti-DIG-Antikörper an die Membran zu verhindern. Dem schließt sich eine Inkubation mit einer Lösung von Anti-DIG-Antikörpern, die mit einer Alkalischen Phosphatase konjugiert sind, an. Im dritten Schritt läßt man schließlich die Membran, die mit der hybridisierten Sonde und dem daran gebundenen Antikörper-Konjugat verbunden ist, mit einem chemilumineszierenden Substrat (CSDP, Roche Diagnostics) reagieren. Das resultierende Lichtsignal wird anschließend durch Belichtung eines Röntgenfilms detektiert.

2.2.7 Klonierung großer funktioneller DNA-Abschnitte in BAC-Vektoren

2.2.7.1 Isolierung und Restriktionsverdau genomischer DNA von *Listeria monocytogenes*

Genomische DNA von *Listeria monocytogenes* wird wie unter 2.2.5.2 beschrieben in Agaroseblöckchen präpariert, isoliert und anschließend wie folgt weiter behandelt:

Ein fertiges Agaroseblöckchen wird mit einem sterilen Skalpell in 12 gleichgroße Teile geschnitten, in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und zweimal in je 100 µl Restriktionspuffer inkubiert, wobei jedes Blöckchen näherungsweise mit einem Volumen von weiteren 100 µl gleichgesetzt wird, so daß sich ein Gesamtvolumen von 200 µl für diesen Ansatz ergibt. Der Ansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

2 x Vorinkubation in RV-Puffer (Ansatz für ein Blöckchen):

ddH ₂ O	39 µl
100 nM Spermidin	40 µl
1 M DTT	1 µl
<u>10 x RV-Puffer</u>	<u>20 µl</u>
	= 100µl

Der Ansatz wird zunächst 30 Minuten lang auf Eis gestellt. Danach wird der erste RV-Puffer mit einer sterilen Pipettenspitze abgezogen und anschließend durch einen identischen ersetzt; dieser Ansatz verbleibt weitere 30 Minuten auf Eis. Dieser Vorinkubation schließt sich der eigentliche Restriktionsverdau direkt an; er setzt sich zusammen aus:

Restriktionsverdau (Ansatz für ein Blöckchen):

ddH ₂ O	80 µl
100 mM Spermidin	4 µl
1 M DTT	0,1 µl
100 x BSA	4 µl
<u>10 x RV-Puffer</u>	<u>10 µl</u>
	= 98,1 µl

Der gesamte Ansatz wird auf Eis zusammenpipettiert, und nach Zugabe einer gewünschten Menge an Restriktionsenzym, direkt bei einer dem verwendeten Enzym entsprechenden Temperatur auf einen Heizblock gestellt. Die optimale Dauer des Verdaus ergibt sich aus Erfahrungswerten infolge mehrerer notwendiger Vorversuche, bei denen jeweils verschiedene Mengen an Enzym in Kombination mit unterschiedlichen Restriktionsdauern verwendet wurden und das Ergebnis anschließend durch PF-Gellauf dokumentiert wurde. Der Verdau wird schließlich durch Zugabe von 100 µl 0,5 M EDTA abgestoppt und auf Eis gelagert.

2.2.7.2 PFGE-Lauf und Exzision von DNA-Fragmenten definierter Größe

Die verwendeten Agarosegele werden 1 %ig mit 0,5 x TBE-Puffer gegossen, wobei für ein erstes Gel die PF-certified Agarose der Firma BioRad und für das zweite Gel die Sea-Plaque Agarose der Firma Biozym verwendet wird. Vor dem Gießen des Gels werden mehrere (3-4) Zähne des Kamms zusammengeklebt, um in dem anschließend erstarrenden Gel eine große Tasche zu erhalten. In diese große Tasche werden alle plug-Stückchen vorsichtig eingebracht und mit LMA beschwert. Luftblasen an der Vorderkante der Geltasche in Laufrichtung sind zu vermeiden. Folgende Laufparameter wurden näherungsweise verwendet, wobei auch hier wieder auf notwendige Vorversuche verwiesen werden muss:

2 Material und Methoden

1. Gellauf:	18 h, 90 sek. Pulszeit,	6 V/cm, 12 °C
2. Gellauf:	7- <u>16</u> h 5 sek. Pulszeit,	4 V/cm, 12 °C

Nach Beendigung des ersten Gellaufes werden die beiden seitlichen Anteile des Gels vorsichtig mit Hilfe eines sterilen Skalpell abgetrennt, wobei ein ca. 3,5 cm breiter mittlerer Gelstreifen, der den größten Anteil an isolierten und aufgetrennten DNA-Fragmenten enthält, zurückbleibt. Während der mittlere Gelstreifen bis zu weiteren Bearbeitungsschritten in einer Schale mit gekühltem Laufpuffer verbleibt, werden die beiden Seitenstreifen für je 15 Minuten in einem Ethidium-Bromidbad gefärbt und anschließend für je 10 Minuten in Laufpuffer entfärbt. Unter UV-Kontrolle wird nun der gewünschte Größenbereich der DNA-Fragmente mit Hilfe des mitgelaufenen Markers erkannt und durch Einschneiden der Gelstreifen von der Mitte her dreiteilig markiert, wodurch der gewünschte Größenbereich in einen "unteren", einen "mittleren" und einen "oberen" Bereich unterteilt wird (Abb. 3 A und B). Beide so markierten Gelstreifen werden in Saran-Folie gewickelt und am Arbeitsplatz an den mittleren Streifen angelegt. Entsprechend der drei markierten Bereiche werden nun drei entsprechende Gelstücke aus dem mittleren Streifen möglichst sauber ausgeschnitten und in die speziell hierfür vorbereiteten drei Geltaschen des zweiten Agarosegels eingebracht. Die drei Bereiche "unten", "mitte" und "oben" laufen somit im zweiten Gel nebeneinander. Durch diese Methode ist es möglich, einen genau gewünschten Bereich an DNA-Fragmenten zu treffen, ihn von restlichen Fragmenten anderer Größe zu trennen und, ohne Kontakt mit Ethidium-Bromid, in ein weiteres Gel einzubringen. Zur Kontrolle wird das restliche Gel anschließend ebenfalls mit Ethidium-Bromid gefärbt und die Exzision auf dem UV-Schirm dokumentiert (Abb. 3C).

Das zweite Gel wird mit den o.g. Laufparametern gestartet und nach Ende des Laufes in entsprechender Art präpariert. Wie nach dem ersten Gellauf, werden erneut die die Laufspuren flankierenden Gelstreifen mit dem Skalpell abgetrennt, gefärbt, kurz entfärbt, unter UV-Kontrolle markiert, in Saran-Folie eingeschlagen und nach Anlegen an die ungefärbten Gelstreifen zum Ausschneiden der drei Größenbereiche aus dem Gel als Markierung zu Hilfe genommen. Auch in diesem Fall wird das Restgel zur Kontrolle der Exzision gefärbt und dokumentiert (Abb. 3D). Die drei ausgeschnittenen DNA-Streifen (entsprechend den drei Bereichen "unten", "mitte" und "oben") werden jeweils halbiert und in je ein 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäß, das zuvor ausgewogen wurde, gegeben. Die Gelstücke werden in diesen Gefäßen gewogen, um die Agarosemenge für einen anschließenden Agaraseverdau abzuschätzen.

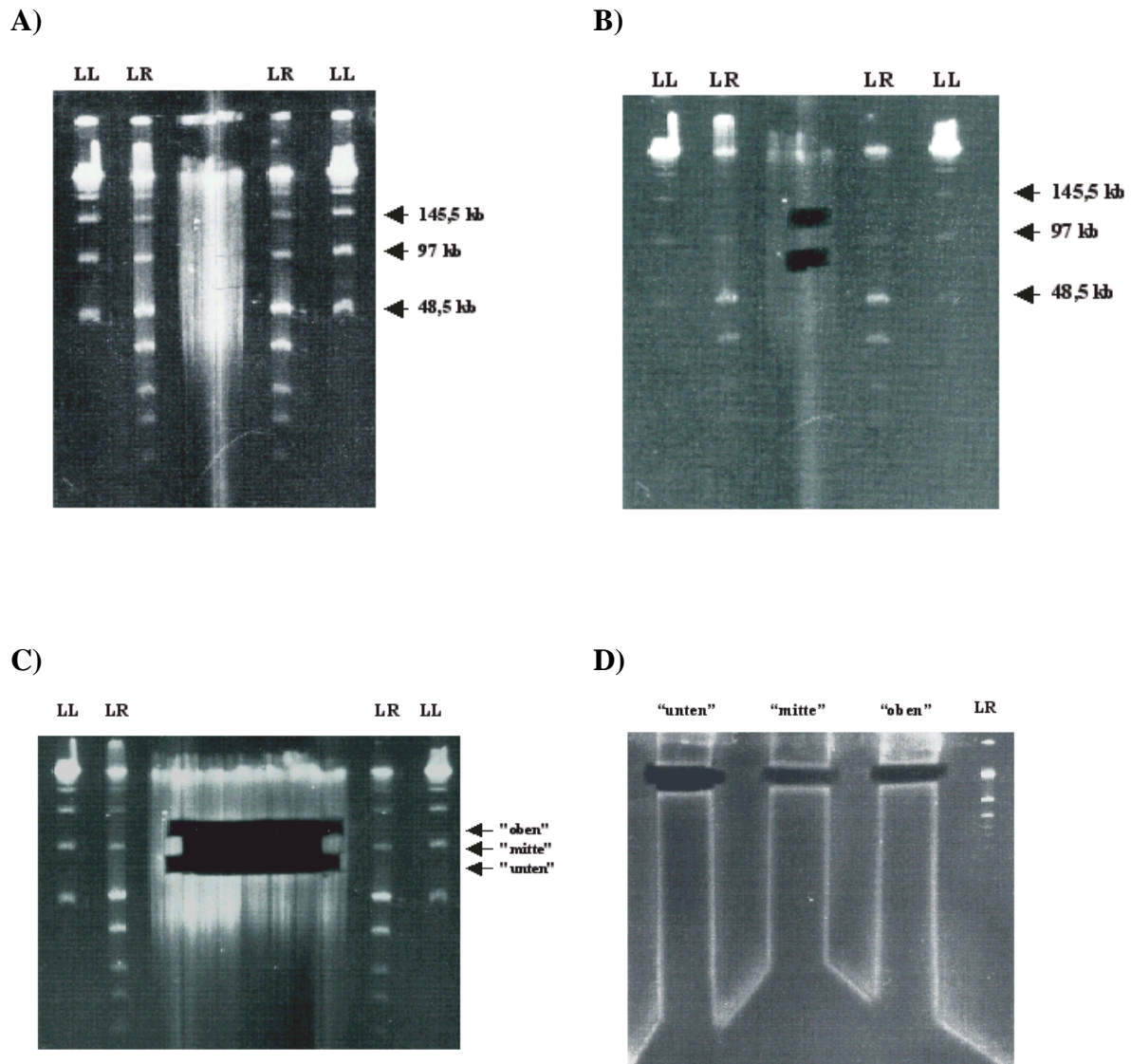


Abb. 3: BAC-Klonierung:

Bild A bis C: Dokumentation der Auftrennung und anschließenden Exzision eines definierten Bereiches an DNA-Fragmenten (hier: ca. 60 – 140 kb) nach einem HindIII Verdau genomischer DNA von *L. m. EGD-e*.
Bild D: Kontrolle einer erfolgreichen Exzision der drei Bereiche „unten“, „mitte“ und „oben“ aus dem 2. PF-Gel. Der Lambda Ladder und der Low Range PFG Marker (LL, LR) dienen als Größenstandards.

2.2.7.3 Extraktion der DNA-Fragmente mittels Agaraseverdau

Für den Agaraseverdau wurde die Gelase der Firma Biozym/Eppicenter verwendet. Zunächst werden zwei Heizblöcke auf 67°C bzw. 45°C vorgeheizt. Das Agarosestückchen wird in dem Reaktionsgefäß zweimal für je 30 Minuten in TNE-Puffer auf Eis vorinkubiert. Dieser Schritt dient der Stabilisierung der großen zu klonierenden DNA-Fragmente während

2 Material und Methoden

der folgenden Schritte, da NaCl die DNA durch Förderung einer molekularen Kondensation schützt. Darüberhinaus wirkt NaCl auf die DNA während des Agaroseverdaus ebenfalls schützend, da es die Schmelztemperatur der DNA erhöht (Gnirke *et al.*, 1993). Aus diesem Grunde sollte 50 mM NaCl, dessen Anwesenheit mit jedem Schritt der BAC-Klonierung kompatibel ist, in allen Lösungen vorhanden sein. Dies sollte vom Zeitpunkt der Exzision der zu klonierenden großen DNA-Fragmente aus dem letzten präparativen Agarosegel bis zum Einsatz der Proben zur abschließenden Elektroporation der Fall sein. Danach wird der Ansatz nacheinander zuerst bei 67 °C und danach bei 45 °C für je 10 Minuten inkubiert. Der erste Schritt dient der Verflüssigung der Low-melting Agarose, der zweite bringt den Ansatz auf die optimale Arbeitstemperatur der Gelase. Diese wird nun in einer der ausgewogenen Agarosemenge entsprechender Enzymmenge dazugegeben und der komplette Verdau-Ansatz für eine Stunde bei 45 °C stehend inkubiert. Nach Ablauf dieser Stunde werden 8 µl des Ansatzes vorsichtig entnommen und zur Kontrolle eines vollständigen Agaroseabbaus in ein PCR-Cap gegeben und auf Eis gestellt. Erstarrt der Ansatz nicht mehr sondern läßt sich stattdessen leicht auf- und abpipettieren, so ist der Verdau erfolgreich beendet; andernfalls beläßt man den Ansatz bei 45 °C und kontrolliert wie beschrieben bis zu einem befriedigenden Ergebnis. Ist dieser Schritt erfolgreich abgeschlossen, gibt man weitere 20 µl des Ansatzes auf ein kleines Agarosegel und startet einen Kontrolllauf, um die DNA-Ausbeute zu testen. Der Ansatz wird nun für weitere 10 Minuten bei 67 °C inkubiert, wodurch die Gelase hitzeinaktiviert wird, und anschließend 15 Minuten auf Eis gestellt.

2.2.7.4 Präparation des BAC-Vektors

Mit Hilfe des Mega-Prep-Systems der Firma Qiagen wird der BAC-Vektor (z. B. pBeloBAC11; pUvBBAC) aus insgesamt 2 Liter Übernachtskultur entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert und die DNA anschließend in 200 µl ddH₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der Probe wird im GeneQuant gemessen, um anschließend genaue DNA-Mengen einsetzen zu können. Eine gewünschte Menge an Vektor-DNA wird nun für einen Restriktionsverdau eingesetzt. Diesem schließt sich nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion eine Alkalische Phosphatase (AP) Behandlung (CIP, Roche Diagnostics) an. Um den Ansatz anschließend von der Alkalischen Phosphatase und Salzen zu befreien, wird eine heiße Phenolextraktion durchgeführt. Hierbei wird der AP-Ansatz, nach Reaktionsabstoppen mit 200 mM EGTA, für 10 Minuten bei 65 °C inkubiert und daraufhin mit einer ebenfalls auf 65 °C erhitzten Mischung aus Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und eine weitere Minute inkubiert. Die weiteren Reaktionsschritte entsprechen den Angaben unter 2.2.4.5. Die so aufgereinigte DNA wird nun in einer angemessenen Menge

ddH₂O aufgenommen; einige Mikroliter werden auf ein Agarosegel gegeben, um die Ausbeute und Güte der vorigen Präparationsschritte zu beurteilen.

2.2.7.5 Klonierung der DNA-Fragmente in den BAC-Vektor und Transformation

2.2.7.6 elektrokompetenter *E. coli*-Zellen mittels Elektroporation

Der unter 2.2.7.3 erhaltene auf Eis lagernde Gelase-verdaute Ansatz geschnittener DNA-Fragmente wird zu folgendem Ligationsansatz zusammenpipettiert, wobei ein Geasamtvolumen des Ansatzes von 250 µl angestrebt wird:

5 µl	T4-Ligase (Fa. Amersham)
25 µl	10 x Ligasepuffer
2 µl	BAC-Vektor DNA (ca. 50 ng DNA)
<u>218 µl</u>	<u>DNA-Fragmente aus Gelaseverdau</u>
=	250 µl

Beim Zusammenpipettieren dieses Ansatzes ist darauf zu achten, dass zunächst nur der geschnittene BAC-Vektor zu dem Gelase-verdauten Ansatz gegeben wird. Diese zusammen werden für 10 Minuten bei 67 °C erhitzt, was dazu führen soll, dass sich eventuell aneinandergelagerte Enden der großen DNA-Fragmente wieder voneinander entfernen und sich somit aus sterischen Gründen die anschließende Klonierung in den BAC-Vektor effizienter gestaltet. Der Ansatz wird schließlich wieder vorsichtig abgekühlt, indem man ihn 10 Minuten bei RT und schließlich 5 Minuten auf Eis lagert. Nun werden Ligase und Ligasepuffer dazugegeben und der Ligationsansatz bei 14 °C in ein Ligationsbad gestellt; er kann dort bis zu zwei Tage lang belassen werden.

Für die sich nun anschließende Elektroporation wurden der Gene-Pulser der Firma BioRad sowie elektrokompetente *E.coli*-Zellen des Stammes DH10β der Firma Gibco verwendet. Die 50 µl Elektroporationsküvetten werden trocken und sauber auf Eis vorgekühlt. Nun werden 30 µl elektrokompetente DH10β-Zellen mit je 2,25 µl Ligationsansatz versetzt und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß kurz auf Eis gestellt.

2 Material und Methoden

Parameter Einstellung am Gene-Pulser:

1,3 kV

200 Ω

25 μ F

Nun wird der Elektroporationsansatz vorsichtig in eine vorgekühlte Küvette gegeben, wobei darauf zu achten ist, keine Luftblasen zwischen den Elektrodenflächen der Küvette und außen keine Feuchtigkeit an der Küvette zu hinterlassen. Nun wird die Küvette in die entsprechende Vorrichtung des Geräts eingesetzt und die Spannung angesetzt, bis ein akustisches Signal das Ende der erfolgreichen Elektroporation anzeigt. Nun gilt es, zügig weiterzuarbeiten und den Ansatz vorsichtig und möglichst vollständig in ein mit 1 ml SOC-Medium gefülltes 12 ml-Reaktionsgefäß zu überführen und für eine Stunde bei 37 °C unter leichtem Schütteln zu inkubieren. Nach Ablauf dieser Stunde wird der Ansatz auf Selektionsagarplatten, wie bereits beschrieben, ausplattiert und über Nacht in den Brutschrank gestellt.

2.2.7.7 Isolierung rekombinanter BACs für anschließenden Restriktionsverdau und PFGE Analyse

Lösungen: Lösung I: 25 mM Tris-HCl; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA,
pH 8,0 + 2,5 mg/ml Lysozym (frisch) + 0,1 mg/ml RNase

Lösung II: 0,2 N NaOH; 1 % SDS (immer frisch)

Lösung III: 5 M Kaliumacetat; pH 4,8

Die Zellen einer 1,5 ml-Übernachtskultur werden durch Zentrifugation (11.700 rpm, 1 min., RT) geerntet und in 100 μ l eisgekühlter Lösung I resuspendiert. Der Ansatz wird mit Lysozym und RNase versetzt und auf Eis gestellt. Nun werden je 200 μ l frisch angesetzte Lösung II auf jeden Ansatz gegeben, jedes Reaktionsgefäß 8-10 mal vorsichtig invertiert und der Ansatz wieder auf Eis gestellt. In diesem Schritt werden die Zellen lysiert; die Suspension wird klarer. Nach nur wenigen Minuten werden je 150 μ l eisgekühlter Lösung III zu jedem Ansatz gegeben und erneut 8-10 mal vorsichtig invertiert. Es ist unbedingt erforderlich, bei diesen Schritten behutsam zu invertieren, da die BACs nun frei, und damit anfällig für Scherkräfte, in

der Suspension vorliegen. Es folgt eine Zentrifugation der Proben für 6 Minuten bei 11.700 rpm und RT, nach deren Ende der Überstand sorgfältig abpipettiert und in ein frisches Reaktionsgefäß gegeben wird. Dem schließt sich eine DNA-Fällung durch Zugabe von 1 ml 100 % Ethanol, ein darauf folgendes Invertieren und eine sofortige Zentrifugation (11.700 rpm, 6 min., RT) an. Nun wird das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen und anschließend in der Speed Vac getrocknet. Das Pellet wird schließlich in 15 µl ddH₂O resuspendiert und direkt zum Restriktionsverdau eingesetzt.

2.2.7.8 Herstellung elektrokompenter Zellen von *Listeria spp.*

2ml einer Listerien-Übernachtskultur (OD 2-3) werden auf 200 ml BHI + 0,5 M Sucrose gegeben und bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer OD von 0,2 - 0,3 inkubiert. Dann wird dem Ansatz Penicillin G in einer Endkonzentration von 10 µg/ml hinzugefügt und weiter unter den gleichen Bedingungen für 2 Stunden inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wird der Gesamtansatz in einen GSA-Becher überführt und für 10 Minuten bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird daraufhin sorgfältig auf Eis abgezogen, das Pellet anschließend in 50 ml HEPES-Puffer (1mM HEPES, 0,5 M Sucrose, pH 7,0) resuspendiert und in ein 50 ml Greiner-Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wird nun 15 min. bei 6000 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und das Pellet erneut in HEPES resuspendiert. Dieser Schritt wird ein weiteres Mal wiederholt. Im Anschluß daran wird das Pellet in der Hälfte des ursprünglichen Volumens (jetzt 25 ml) gewaschen, wobei die Zentrifugationsschritte unter den gleichen Bedingungen ablaufen wie zuvor. Letzlich wird das Pellet vorsichtig in 0,5 ml 1 mM HEPES-Puffer (pH 7,0, 0,5 M Sucrose, 10 % Glycerin) resuspendiert, auf Eis in Aliquots à 50 µl in 1,5 ml-Reaktionsgefäße gegeben und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so präparierten Zellen können nun entweder direkt zur Elektroporation eingesetzt oder bei -80 °C gelagert werden.

2.2.7.9 Anlegen einer Genbank in 96-well-Platten

Das Genbankmedium wird entsprechend der Angaben unter 2.1.7 eingewogen und autoklaviert. Nachdem es abgekühlt ist, wird eine entsprechende Menge Medium unter der Sterilbank mit dem jeweils zur Selektion verwendeten Antibiotikum versetzt und in eine sterile Nunc-Schale (flacher Boden) gegeben. Eine 96-well Mikrotiterplatte wird mit Genbankmedium befüllt. Daraufhin wird mit einem sterilen Zahnstocher je eine Kolonie von der Agarplatte gepickt und in einen well gegeben. Auf diese Art werden nacheinander alle

2 Material und Methoden

wells beimpft, wobei man pro Mikrotiterplatte zwei Kontroll-wells unbeimpft beläßt. Nachdem die gesamte Platte beimpft worden ist, wird sie mit dem Deckel verschlossen und in Saran-Folie eingeschlagen. Die so verpackte Platte wird dann in eine mit feuchten Tücher ausgelegte Styropor-Box gelegt, die ebenfalls mit Folie abgedeckt wird. Dies dient der Aufrechterhaltung einer hohen Luftfeuchtigkeit während der folgenden Inkubation bei 37 °C im Brutraum und verhindert so eine zu starke Verdunstung der Flüssigkeit aus den wells der Mikrotiterplatten. Am nächsten Morgen werden die Platten auf das Anwachsen aller Klone kontrolliert, wobei besonders auf die beiden Kontroll-wells zu achten ist, die weiterhin klar sein müssen, um eine Kontamination oder andere Fehler ausschließen zu können. Die fertigen Platten werden dann gutverschlossen bei -80 °C eingefroren, so daß sie für spätere Analysen der Genbank jederzeit wieder verfügbar sind.

2.2.8 Präparation von Zellwand-assoziierten Proteinen

Zur Präparation der Kulturüberstände und wandständigen bakteriellen Proteine wird eine 50 ml Kultur entsprechend verdünnt und bis zu einer optischen Dichte von (OD_{600}) 1,0 kultiviert. Nach Zentrifugation (15 min., 6000 rpm, 4°C) wird der Kulturüberstand in ein steriles 50 ml Greiner Röhrchen überführt und mit TCA versetzt (Endkonzentration 10 %). Zur Präparation der zellwandständigen Proteine wird das Pellet in 1,8 ml 1 % SDS (in 1 x PBS) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 45 min. bei 37°C und 200 rpm wird die Suspension in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (14000 rpm, 15 min., 4°C). Der klare Überstand wird schließlich ebenfalls mit 10 % TCA versetzt.

Die Präzipitation beider Ansätze erfolgt für mindestens 12 bis 24 h bei 4°C. Die präzipitierten Proteine werden durch Zentrifugation bei 4°C, 6000 rpm, 15 min. pelletiert, zweimal mit 25 ml Aceton gewaschen und schließlich in 200 µl 1 M Tris/HCl, pH 8,8 gelöst. Die Proteinlösung wird mit 80 µl 4 x Roti-Load und 3,2 µl 100 mM Pefabloc SC versetzt und bei -20°C gelagert. Für eine SDS-PAGE (Kap. 2.2.8) wurden je 10 µl Prestained SDS Marker (Bio-Rad) als Protein-Größenstandard und 20 µl der Proteinlösung des jeweiligen Stammes aufgetragen.

2.2.9 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Polyacrylamidgele:

4 x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

4 x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

10 x SDS-Laufpuffer: 30,3 g Tris
144 g Glycin
20 g SDS
ad 1 l ddH₂O

2 x Probenpuffer: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,5
10 % SDS
22 % Glycerin
10 % β -Mercaptoethanol
8 M Harnstoff
0,25 % Bromphenolblau

Coomassie R250: 0,2 % Coomassie R250
45 % Methanol
10 % Eisessig
lange rühren lassen, filtrieren

Blitzentfärber: 400 ml Methanol
100 ml Eisessig
ad 1 l ddH₂O

2 Material und Methoden

ÜN-Entfärber: 50 ml Methanol
 75 ml Eisessig
 ad 1 l ddH₂O

Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels:

Trenngel (10 %):

3,8 ml 4 x Trenngelpuffer
5,0 ml Rotiphoresegel 30 (Roth)
6,1 ml ddH₂O
150 µl 10 % SDS
20 µl TEMED
20 µl 25 % APS

Sammelgel (5 %):

2,5 ml 4 x Sammelgelpuffer
1,7 ml Rotiphoresegel 30 (Roth)
5,8 ml ddH₂O
100 µl 10 % SDS
20 µl TEMED
20 µl 25 % APS

Die Lösung für das Trenngel wird in zwei durch Spacer getrennte Glasplatten (Bio-Rad oder Phase) bis ca. 1,5 cm unterhalb des oberen Randes gegossen und vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wird das Wasser entfernt, der Kamm zwischen den Glasplatten platziert und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Die Proteinproben werden mit 2 x Probenpuffer oder 4 x Roti-Load gemischt (1:1 bzw. 1:4) und für 5 min. bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt mit 1 x SDS-Laufpuffer bei 150 V, 500 mA. Im Anschluß an die Elektrophorese wird das Polyacrylamidgel entweder mittels Immun-Blot (Kap. 2.2.10) auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) übertragen oder mit Coomassie R250 angefärbt. Die Entfärbung erfolgt mit Blitzentfärber innerhalb von 1-2 Stunden oder ÜN mit ÜN-Entfärber. Das Gel kann in 2 % Essigsäure mehrere Wochen bis Monate gelagert werden.

2.2.10 Immun-Blot

10 x Blotpuffer:	58 g Tris	1 x Blotpuffer:	50 ml 10 x Blotpuffer
	29 g Glycin		150 ml Methanol
	3,7 g SDS		300 ml ddH ₂ O
	ad 1 l ddH ₂ O		

Proteine, die im Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt worden sind, können im Anschluß an die Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden (Immun-Blot). Der Blot erfolgt semi-dry mit Hilfe einer von der Institutswerkstatt gebauten Blotkammer. Dazu werden 2 Lagen Whatmanpapier 3MM 5 min. in 1 x Blotpuffer getränkt und auf die untere Graphitplatte der Apparatur aufgelegt. Auf das Whatmanpapier wird eine für 5 min. in Methanol eingeweichte Immobilonmembran luftblasenfrei aufgelegt und mit dem Polyacryl-amidgel bedeckt. Zwei Lagen für 5 min. in 1 x Blotpuffer getränktes Whatmanpapier 3MM werden aufgelegt und die obere Graphitplatte angebracht. Der Blot erfolgt für 2 Stunden bei 30 V und 500 mA.

Immun-Blot-Detektion mit alkalischer Phosphatase-konjugierten Antikörpern:

Glycinpuffer:	0,1 M Glycin
	1 mM ZnCl
	1 mM MgCl ₂
	pH 10

1 x TBS/Tween (TBST): Zugabe von 0,1 % Tween 20 zu 1 x TBS

Die Membran, auf die durch Immun-Blot das Proteinmuster des Polyacrylamidgels übertragen worden ist, wird für die Durchführung eines Immun-Blots in 1 x Roti-Block in ddH₂O abgesättigt (mindestens 30 min. bis 1 Stunde bei RT oder ÜN bei 4°C). Anschließend wird sie dreimal für 10 min. mit 25 ml TBST gewaschen, bevor der erste Antikörper (mono- oder polyklonaler) in TBST (1:2000 verdünnt) zugegeben wird. Die Inkubation erfolgt für mindestens 2 Stunden auf dem Taumler bei RT. Hiernach wird die Membran dreimal für 10

2 Material und Methoden

min. mit 25 ml TBST gewaschen und der zweite Antikörper (z.B.: alkalische Phosphatase gekoppelter Anti-Maus- oder Anti-Kaninchen- IgG, 1:1000 in TBST verdünnt) zugegeben. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei RT auf dem Taumler wird die Membran erneut dreimal für 10 min. mit 25 ml TBST gewaschen und in Glycinpuffer äquilibriert. Die Detektion erfolgt durch Zugabe von 1 mg/ml BCIP. Die Stellen auf der Membran, die von den ersten und zweiten Antikörpern erkannt wurden, werden durch die Umsetzung des Substrates BCIP durch die alkalische Phosphatase als blaue Banden (Niederschlag von Indigo) sichtbar. Die Reaktion wird durch mehrmaliges Spülen mit Wasser abgestoppt. Die Membran wird getrocknet und lichtdicht zwischen Whatmanpapier und Alufolie aufbewahrt.

3 Ergebnisse

3.1 Strukturelle Genomanalysen und Genkartierung

3.1.1 Makrorestriktionsanalyse und Bestimmung der Genomgröße von *L. monocytogenes* EGD-e

Zur Makrorestriktionsanalyse der Genomgröße wurden aufgrund des relativ geringen G+C-Gehaltes der DNA die GC-reichen 8 Erkennungsbasen umfassenden Restriktionsendonukleasen *NotI* und *AscI* verwendet. Genomische DNA von *Listeria monocytogenes* EGD-e wurde nach Präparation in Agaroseblöckchen mit jeder der beiden Restriktionsendonukleasen verdaut und die resultierenden Fragmente anschließend mittels PFGE aufgetrennt (Kap. 2.2.5). Diese Auftrennung erfolgte zur besseren Differenzierung der einzelnen Fragmentgrößen unter zu Hilfenahme dreier verschiedener PFGE-Auflösungsfenster (Kap. 2.2.5.8). Das WinCam 2.2 Programm diente der anschließenden Analyse der erhaltenen Fragmentgrößen und Bandenmuster. Der *NotI*-Verdau resultierte, mehrfach reproduzierbar, in 8 Fragmenten der Größen 1100 (NotA), 850 (NotB), 365 (NotC), 320 (NotD), 275 (NotE), 40 (NotF), 30 (NotG) und 20 (NotH) kb, wie aus Abb. 4 ersichtlich.

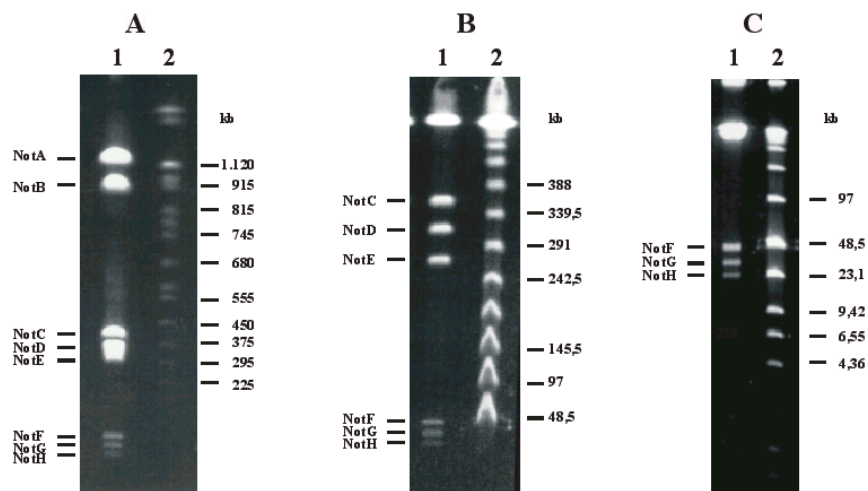


Abb. 4: PFGE-Auftrennung eines *NotI* Restriktionsverdauens genomischer DNA von *L. monocytogenes* EGD-e. Dargestellt sind drei verschiedenen Auflösungsfenster (A, B, C). Die Namen der acht *NotI* Fragmente sind am linken Rand jedes Bildes aufgeführt. Yeast Chromosome-, Lambda Ladder- und Low Range PFG Marker dienen als Größenstandard (A2, B2 bzw. C2).

3 Ergebnisse

Diese Fragmente summieren sich auf eine Gesamtgenomgröße von 3000 kb. Der Restriktionsverdau mit *AscI* führte zu 11 Fragmenten von 860 (*AscA*), 470 (*AscB*), 410 (*AscC*), 360 (*AscD*), 320 (*AscE*), 250 (*AscF*), 110 (*AscG*), 80 (*AscH*), 50 (*AscI*), 30 (*AscJ*) und 20 (*AscK*) kb Größe. Die Summe dieser Fragmente ergibt eine Gesamtgenomgröße von 2960 kb.

Auf der Grundlage dieser Daten ließ sich die Größe des Genoms von *Listeria monocytogenes* EGD-e Serotyp 1/2a mit 3000 ± 50 kb bestimmen.

3.1.2 Physikalische Kartierung des Chromosoms von *L. monocytogenes* EGD-e

3.1.2.1 Klonierung der 8 *NotI*-Schnittstellen des Chromosoms und deren flankierender Bereiche in den Plasmidvektor pGATA

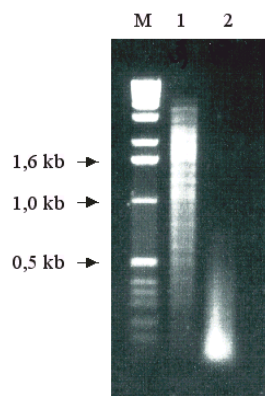


Abb. 5: Testverdau genomischer DNA von *L. m.* EGD-e mit *Sau3AI* (1) und *Tsp509I* (2).

Um die 8 genomischen *NotI* Fragmente innerhalb des Chromosoms von *L. monocytogenes* EGD-e zu einer vollständigen Genomkarte zusammen zu fügen, wurden alle *NotI*-Schnittstellen des Genoms inklusive deren flankierender Bereiche kloniert. Genomische DNA von EGD-e wurde isoliert (Kap. 2.2.4.1) und anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *Sau3AI* (*gatc*) und *Tsp509I* (*aatt*) verdaut (Abb. 5). Ziel dieser Verdaue war es, Fragmente von 500 bp bis 2 kb Größe zu erhalten, die sich in weiteren Schritten gut klonieren ließen. Eine Probe beider Verdaue wurde zur Abschätzung der erhaltenen Fragmentgrößen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die erhaltenen

Sau3AI-Fragmente wiesen Größen von 0,4 bis 2,5 kb auf, während ein *Tsp509I*-Verdau 50 – 500 bp große DNA-Fragmenten ergab.

Der nächste Schritt der Klonierungsstrategie (Abb. 6) bestand in einem Religationsschritt, in dem jeder Verdau mit sich selbst ligiert wurde. Hierbei wurden Reaktionsbedingungen geschaffen, die vorzugsweise zu monomeren zirkulären Molekülen führen und entsprechend die Anzahl konkatemerer Ligationsprodukte minimieren sollten (Sambrook *et al.*, 1978). Die hieraus resultierenden Konstrukte wurden nach Aufreinigung mittels einer Phenol-Chloroformextraktion mit *NotI* erneut linearisiert. Nur Moleküle, die eine der 8 verschiedenen *NotI*-Schnittstellen des Chromosoms von *L. monocytogenes* EGD-e enthielten, wurden auf

diese Weise wieder linearisiert und konnten anschließend in die *NotI*-site des positiven Selektionsvektors pGATA QuantTox™ kloniert werden.

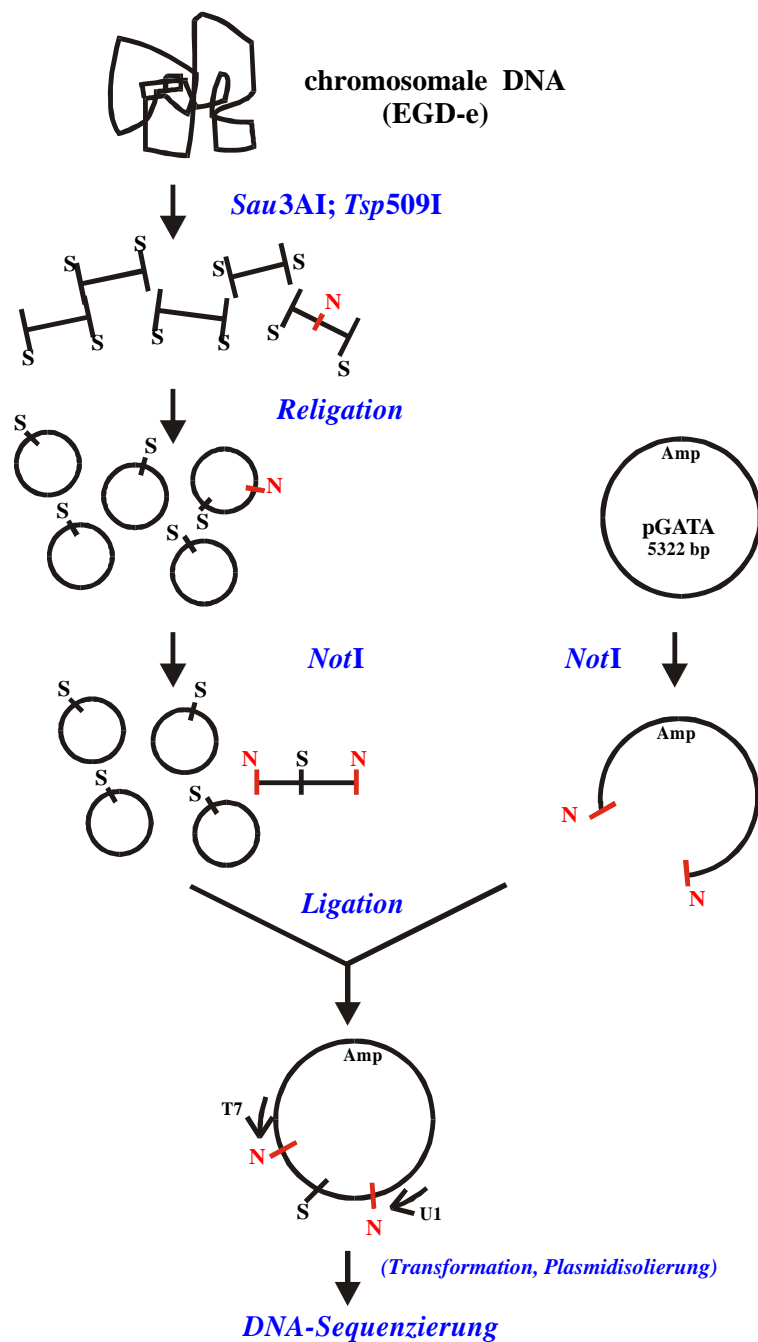


Abb. 6: Strategie zur Klonierung der acht *NotI* Schnittstellen des EGD-e Chromosoms und deren flankierender Bereiche mit Hilfe des positiven Selektionsvektors pGATA.

3 Ergebnisse

3.1.2.2 Sequenzierung der klonierten Fragmente und Abgleich mit Datenbanken des World Wide Web

Im Anschluss an ein Screening der rekombinanten Plasmide durch Restriktionsverdau mit *NotI* führte die automatische Sequenzierung zur komplette Nukleotidsequenz der Inserts bis zu jeder der beiden *Sau3AI*- (bzw. *Tsp509I*-) Schnittstellen jenseits der *NotI*-Schnittstellen. Die Daten, die als Ergebnis der Sequenzierung von 18 Rekombinanten gewonnen wurden, ließen acht nicht-redundante rekombinante Plasmide zusammenfügen, von denen jedes den flankierenden Bereichen einer *NotI*-Schnittstelle des *Listeria monocytogenes* EGD-e Chromosoms entsprach (NotI-1, NotI-2, ..., NotI-8, siehe Anhang). Sieben dieser Plasmide entstammten der *Sau3AI*-Bibliothek, das achte ergab sich aus der *Tsp509I*-Klonierung.

Mit Hilfe des „blastp“-Programms der nicht-redundanten Datenbank von NCBI wurden die acht *NotI*-flankierenden Sequenzen auf Homologien zu bereits bekannten Sequenzen überprüft. Signifikante Homologien ergaben sich für vier der acht Sequenzen in dieser Datenbank. So wies die translatierte NotI-4 Sequenz eine Homologie zu einem Protein auf, das hypothetisch als ein Hämolyysin charakterisiert worden ist, das sich in *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Treponema pallidum*, *Streptococcus mutans*, *E. coli* und anderen Spezies findet. Demgegenüber war die NotI-5 Sequenz streng homolog zu der Anfangssequenz einer Isopropylmalatisomerase aus *Lactococcus lactis*. Die NotI-7 Sequenz konnte mit einem hypothetischen 84.1 kDa Protein in Beziehung gesetzt werden, das sich in der *hemY-gltT* intergenetischen Region (ORFB) von *Bacillus subtilis* findet. Schließlich wies die NotI-8 Sequenz eine deutliche Homologie zu Proteinen des Ethanolamin-Stoffwechsels von *Salmonella typhimurium* und *E. coli* auf. Keinerlei Ähnlichkeiten konnten jedoch für die Sequenzen NotI-1, NotI-2, NotI-3 und NotI-6 aufgedeckt werden.

Durch einen abschließenden Vergleich der 8 *NotI*-Sequenzen mit der *Listeria*-Datenbank konnte darüber hinaus die genaue Position der klonierten Fragmente innerhalb dieser Genomdatenbank ermittelt werden. Die Ergebnisse dieses Abgleichs sind in Tab.1 dargestellt. Eine blastn-Suche der EGD-e-*NotI*-Sequenzen innerhalb der Genomsequenz von *L. innocua* (Glaser *et al.*, 2001) zeigten für sechs der *NotI*-Sequenzen, fast über die gesamte Länge der jeweiligen Sequenzen, stark homologe Bereiche mit Übereinstimmungen von 88 bis 93 %, wobei die spezifische *NotI*-Schnittstelle (gcggccgc) nur noch in einem der sechs Fälle vorhanden war. Der Abgleich der NotI-1 und NotI-3 Sequenz mit dem *L. innocua* Genom ließ im Gegensatz dazu keine spezifische Homologie für die gesamten Sequenzlängen erkennen, obwohl die spezifische *NotI* Schnittstelle für NotI-3 vollständig innerhalb einer 340 kb langen,

und zu 87 % homologen Sequenz, im *L. innocua* Genom nachweisbar war.

Ein ähnliches Bild zeigte sich beim Abgleich der Sequenzen mit dem Genom von *L. monocytogenes* 4b (www.tigr.org). Für sechs der acht EGDe-NotI-Sequenzen fand sich eine deutliche Homologie über die vollständige Sequenzlänge mit Übereinstimmungen von 84 bis 96 %. In drei dieser sechs Fälle waren zudem die spezifischen NotI Schnittstellen nachweisbar. Im Gegensatz dazu konnten die beiden Sequenzen NotI-2 und NotI-3 innerhalb des *L. monocytogenes* 4b Genoms keinem spezifischen Bereich als homolog zugeordnet werden. Die hier beschriebenen Daten veranschaulicht Tab. 1 in einem Überblick.

<i>L. monocytogenes</i> EGDe (1/2a) NotI-Sequenzen		<i>L. monocytogenes</i> 4b Genom		<i>L. innocua</i> Genom	
Name	Länge	Übereinstimmungen	NotI SS (gcggccgc) +/-	Übereinstimmungen	NotI SS (gcggccgc) +/-
NotI-1	924 bp	842 / 924 (91 %)	Gctgctgc	440 / 504 (87 %)	-
NotI-2	1072 bp	-	-	985 / 1072 (92 %)	gcagccgc
NotI-3	996 bp	-	-	297 / 340 (87 %)	+
NotI-4	430 bp	411 / 430 (95 %)	+	359 / 430 (83 %)	gctgctgc
NotI-5	1121 bp	1032 / 1121 (92 %)	gctgctgc	993 / 1118 (88 %)	gccgctgc
NotI-6	506 bp	486 / 506 (96 %)	+	410 / 500 (82 %)	gtggacgg
NotI-7	765 bp	727 / 765 (95 %)	+	680 / 747 (91 %)	+
NotI-8	255 bp	215 / 255 (84 %)	gccgctgc	212 / 255 (83 %)	gccgctgc

Tab. 1: Abgleich der *L. monocytogenes* EGD-e NotI Sequenzen mit den Genomsequenzen von *L. innocua* und *L. monocytogenes* 4b

3.1.2.3 Generierung DIG-markierter Sonden für die acht NotI-Bereiche des Chromosoms von *L. monocytogenes* EGD-e

Die erhaltenen Sequenzen der flankierenden Bereiche aller acht NotI-Schnittstellen des Chromosoms von *L. monocytogenes* dienten zur Auswahl spezifischer Oligonukleotide, um jeden dieser DNA-Abschnitte zu amplifizieren. Die einzelnen Primer, und die als Vorlagen dienenden Sequenzen inklusive deren Länge und Accession Numbers, können der Tabelle im Anhang entnommen werden; Abb. 7 zeigt die acht Sonden als Ergebnis einer Test-PCR mit diesen Oligonukleotiden. Die Sonden wurden wie unter 2.2.6.2 beschrieben im Rahmen einer

3 Ergebnisse

PCR gewonnen und für die anschließende Southern-Blot-Hybridisierung verwendet.

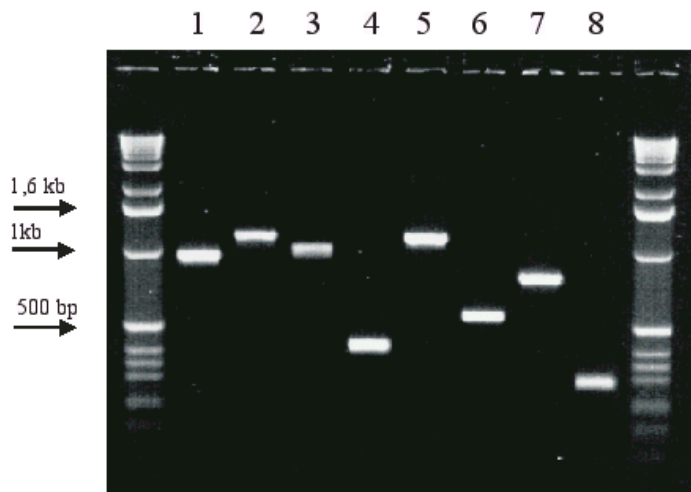


Abb. 7: *NotI* Sonden NotI-1* bis NotI-8*; PCR zur Darstellung der unterschiedlichen Sondenlängen. Als DNA-Größenstandard diente der 1 kb-DNA Ladder.

3.1.2.4 Anordnung der acht *NotI*-Fragmente durch Southern-Blot-Hybridisierung und Erstellung einer physikalischen Karte

Zwei CHEF-Gele wurden unter den optimalen Laufparametern für die Auftrennung eines *NotI*-Verdaus genomischer *L. monocytogenes* EGD-e DNA gestartet und nach Beendigung des Gellaufes dokumentiert (Abb. 8 zeigt beispielhaft das Gelbild im Fenster 2).

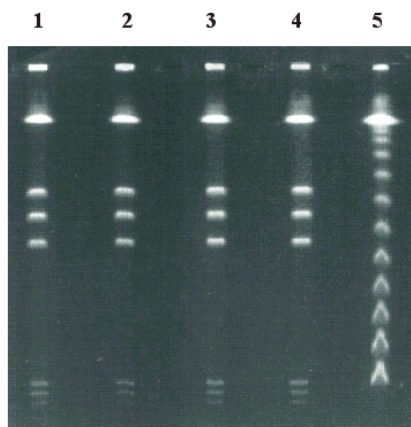


Abb. 8: PFGE eines *NotI* Verdaus genomischer DNA von *L. m. EGD-e* (Spur 1-4) im Auflösungsfenster 2. Spur 5: Lambda Ladder PFG Marker. Weiterverwendung dieses Gels zur Southern Blot Hybridisierung.

Die beiden Gele wurden jeweils nur mit vier halben Agaroseblöckchen desselben Präparationsansatzes von genomischer EGD-e DNA bestückt, wobei an einer Seite außen ein DNA-Größenstandard mitgeführt und dann ein je einspuriger Abstand zwischen den einzelnen Proben eingehalten wurde. Dies sollte die anschließende Trennung der einzelnen Spuren voneinander für die folgenden Hybridisierungsschritte erleichtern. Nach weiterer Behandlung, wie unter 2.2.6.1 dargelegt, wurde das Gel entsprechend auf eine Nylonmembran geblottet, die einzelnen Spuren gekennzeichnet und voneinander abgetrennt. Je ein Nylonmembranstreifen diente daraufhin zur Hybridisierung mit einer NotI-Sonde. Durch Detektion jeweils zweier korrespondierender Fragmente, die beide mit der gleichen Sonde hybridisierten, konnten schließlich alle 8 NotI-Fragmente zusammengefügt werden (Abb. 10). Daraus ergab sich eine vollständige physikalische Karte von *L. monocytogenes* EGD-e, die verdeutlicht, dass dieses Bakterium ein einzelnes Ring-Chromosom beinhaltet, in dem sich die acht NotI-Fragmente, wie in Abb. 9 angegeben, anordnen.

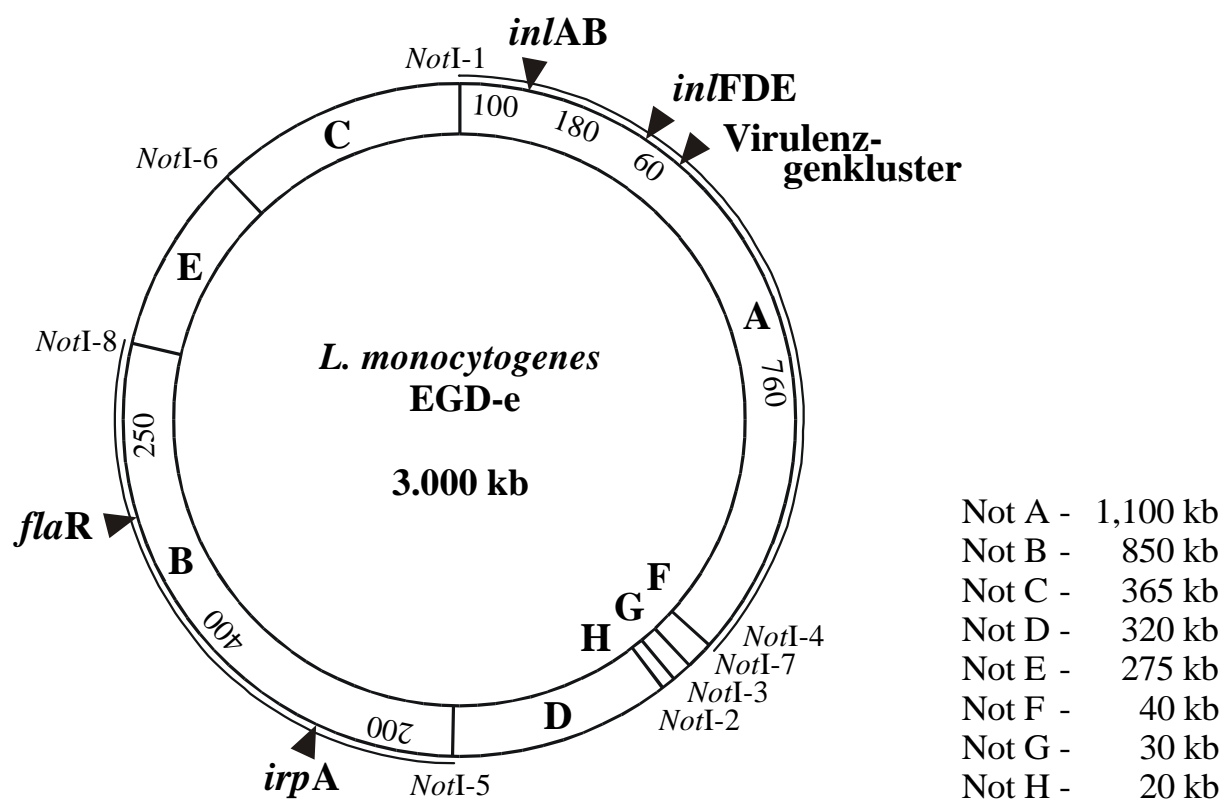


Abb. 9: Physikalische und genetische Karte des Chromosoms von *L. monocytogenes* EGD-e. Die genaue Lokalisation der kartierten Virulenzgene ist durch Dreiecke gekennzeichnet. Die Abstände (in kb) zwischen diesen Loci sind innerhalb des Kreises aufgeführt.

3 Ergebnisse

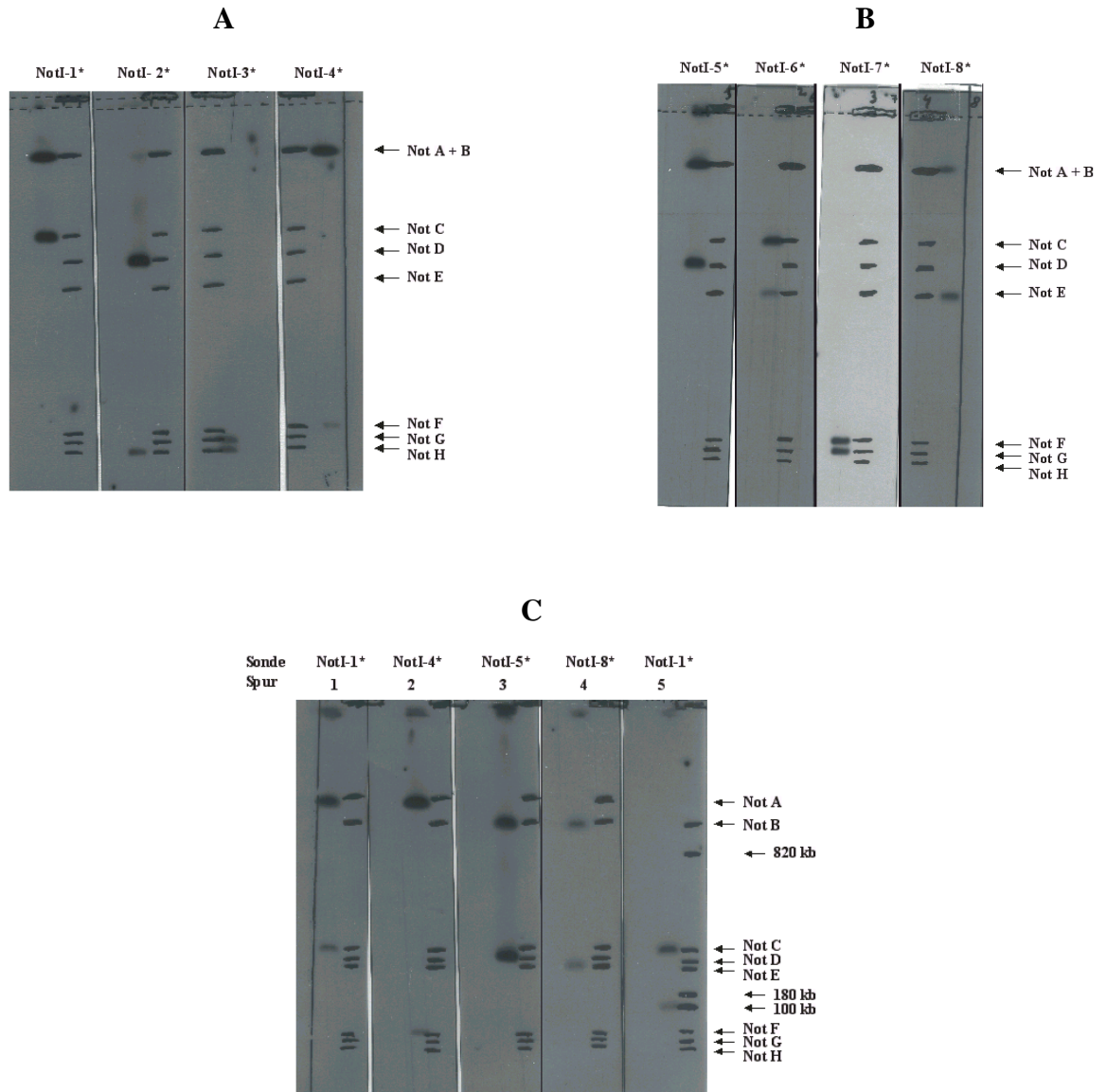


Abb. 10:

A) Röntgen-Detektion nach Southern Blot Hybridisierung von *NotI* Verdauis genomischer *L. m.* EGD-e DNA mit den Sonden NotI-1*, NotI-2*, NotI-3* und NotI-4*. Jede Sonde hybridisierte mit zwei verschiedenen *NotI* Fragmenten (Not A bis Not H); Not A und Not B hier noch nicht zu differenzieren.

B) Entsprechend Abb. 7A, jedoch mit den Sonden NotI-5* bis NotI-8*.

C) Spur 1 –4: Genaue Differenzierung der Signale der Fragmente Not A und Not B nach Hybridisierung mit den Sonden NotI-1*, NotI-4*, NotI-6* und NotI-8*. In Spur 5 diente die Hybridisierung von *NotI* verdauter genomischer DNA der Deletionsmutante *PprfABox(inLAB)DinIFDE* mit NotI-1* der genauen Orientierung des Not A Fragments innerhalb der Genomkarte von *L. m.* EGD-e.

3.1.3 Kartierung von Virulenzgenen auf dem Chromosom

Bis heute sind drei verschiedene Gen-Kluster für *L. monocytogenes* beschrieben worden, die für einzelne Virulenzfaktoren kodieren; zu diesen zählen zum einen der *prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB*-Bereich sowie die *inlAB*- und *inlFDE*-Gene auf dem Chromosom von *L. monocytogenes* (Vasquez-Boland *et al.*, 2001). Für zwei weitere Gene, *flaR* und *irpA*, konnte eine Assoziation mit der Virulenz nachgewiesen werden; diese sind jedoch als individuelle Gene auf dem Chromosom von *L. monocytogenes* EGD-e organisiert. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die genaue Lokalisation dieser Genorte auf dem Chromosom und ihre relative Anordnung zueinander zu bestimmen. Um dies zu erreichen, wurden Deletionsmutanten von *L. monocytogenes* EGD-e verwendet, bei denen künstliche *NotI*-Schnittstellen in die Gene aller oben erwähnten Loci eingebracht worden waren, um auf diese Weise isogene Mutanten von EGD-e mit neuen *NotI*-Schnittstellen auf dem Chromosom zu erhalten. Die Herstellung dieser Deletionsmutanten von EGD-e ist unter 2.2.3 ausführlich dargelegt.

Im einzelnen handelte es sich um folgende Deletionsmutanten (Kap. 2.1.1):

PprfABox(inlAB)

$\Delta actA-plcB$

$\Delta inlFDE$

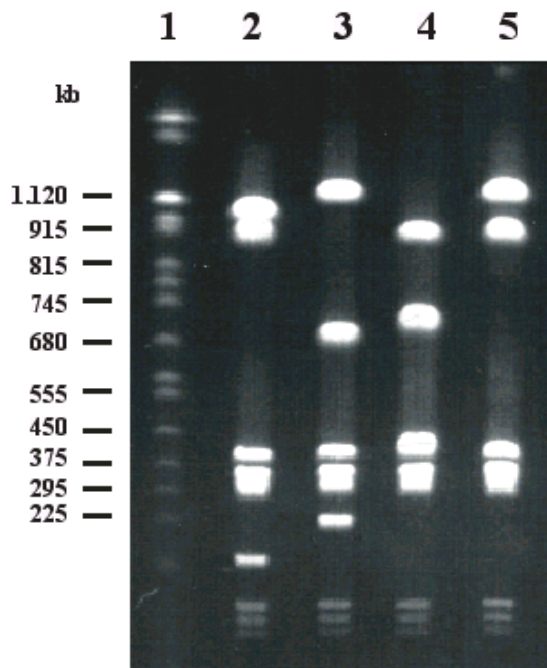
$\Delta irpA3$

$\Delta flaR$

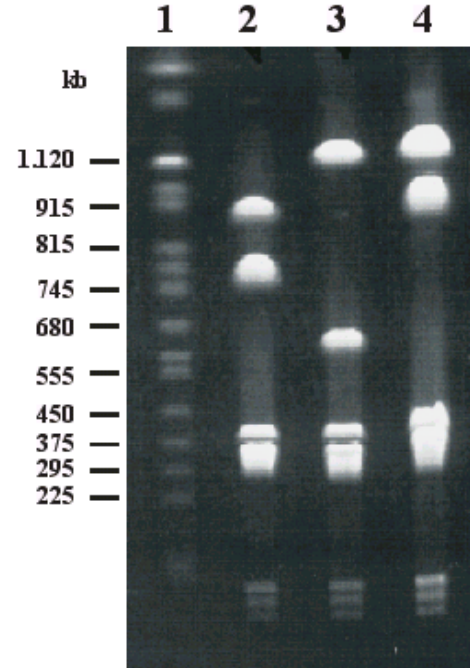
3.1.3.1 *NotI*-Restriktionsverdau und PFGE-Analyse genomischer DNA verschiedener *L. monocytogenes* EGD-e -Deletionsmutanten

NotI-Verdaue der in Agarose eingebetteten genomischen DNA aller dieser Deletionsmutanten zeigten nach PFGE Auftrennung das in Abb. 11 dargestellte Ergebnis.

A



B



C

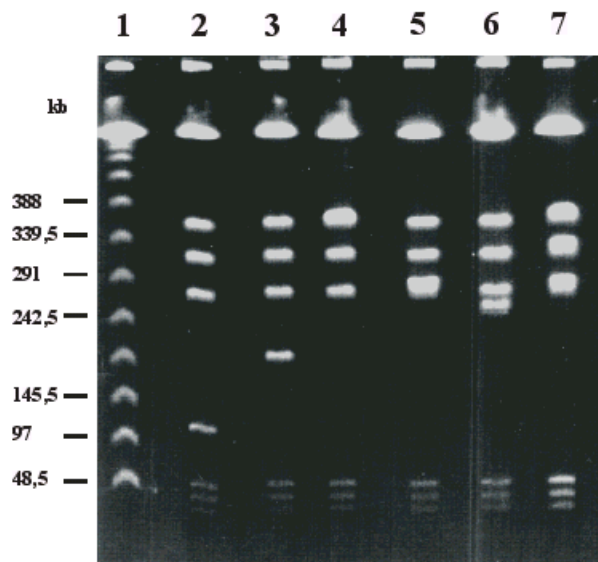


Abb. 11: PFGE *NotI* verdauter genomischer DNA fünf verschiedener EGD-e Deletions-mutanten.

Bild A und B entsprechen dem Auflösungsfenster 1, Bild C entspricht Fenster 2.

A2 & C2: *PprfA*Box(*inlA*B)

A3 & C3: *DirpA*3

A4 & C4: *DactA-plcB*

B2 & C5: *DinI*FDE

B3 & C6: *DflaR*

A5, B4, C6: EGD-e Wildtyp

A1 & B1: Yeast Chromosome PFG Marker

C1: Lambda Ladder PFG Marker

Auf diese Weise konnten die einzelnen Gen-Loci den jeweiligen Fragmenten Not A bzw. Not B zugeordnet werden.

Das Fragmentmuster des Stammes $\Delta actA-plcB$ wies zwei neue *NotI*-Fragmente von 760 und 340 kb Größe anstelle des ursprünglich 1100 kb großen *NotA* Fragments auf, so dass das Virulenzgen-Cluster von *L. monocytogenes* EGD-e auf dem *NotA* Fragment lokalisiert werden konnte. In ähnlicher Weise konnten das *inlAB* Operon und das *inlFDE* Operon ebenfalls dem *NotA* Fragment zugeordnet werden, da der Verdau genomischer DNA des Stammes *PprfABox(inlAB)* das *NotA* Fragment auch in zwei neue Fragmente teilte, in diesem Falle jedoch mit den Größen 1000 und 100 kb; das Bandenmuster des Stammes $\Delta inlFDE$ ergab zwei neue Fragmente, die 820 und 280 kb umfaßten und gleichfalls aus dem *NotA* Fragment hervorgingen. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen drei Genen konnten *irpA* und *flaR* auf dem *NotB* Fragment lokalisiert werden. Die Makrorestriktion der $\Delta irpA3$ -Mutante ergab zwei neue Fragmente von 650 und 200 kb Größe anstelle des ehemaligen 850 kb großen *NotB* Fragments, während der *NotI* Verdau genomischer $\Delta flaR$ -DNA zu je einem 600 und 250 kb großen neuen Fragment führte, die zusammen das ursprüngliche *NotB* Fragment repräsentierten.

3.1.3.2 Genkartierung der fünf Gen-Loci auf der chromosomalen Karte und Bestimmung der relativen Lage dieser Loci zueinander

Um die Orientierung der drei Gen-Loci auf dem *NotA* Fragment zu bestimmen, wurden drei Doppel-Deletionsmutanten generiert, die alle möglichen Kombinationen der oben beschriebenen Mutationen repräsentieren. So entstanden durch Einführung der $\Delta actA-plcB$ -Deletion bzw. der *PprfABox(inlAB)*-Deletion in den Mutantenstamm $\Delta inlFDE$ die Doppelmutantenstämme $\Delta actA-plcB\Delta inlFDE$ bzw. *PprfABox(inlAB)* $\Delta inlFDE$. In ähnlicher Weise wurde der neue Stamm *PprfABox(inlAB)* $\Delta actA-plcB$ durch Einbringung der $\Delta actA-plcB$ -Deletion in den Stamm *PprfABox(inlAB)* generiert. Darüberhinaus wurde eine dritte Deletion ($\Delta inlFDE$) in den letztgenannte Doppelmutantenstamm eingeführt, was zu dem Trippelmutantenstamm *PprfABox(inlAB)* $\Delta actA-plcB\Delta inlFDE$ führte. Ziel war es, mit Hilfe der verschiedenen Bandenmuster nach einem *NotI* Verdau all dieser mutierten Stämme, die exakte Anordnung der drei auf dem *NotA* Fragment lokalisierten Gene kombinieren zu können. *NotI* Verdau und Auftrennung der Fragmente aller aufgeführten Stämme ergab das in Abb. 12 dargestellte Bild. Wiederum dienten die beiden unterschiedlichen Auflösungsfenster 1 und 2 einer optimalen Bestimmung der Größen aller erhaltenen Fragmente. Jeder *NotI* Verdau der genomischen DNA aller drei Doppelmutanten ließ drei neue *NotI*-Fragmente

3 Ergebnisse

anstelle des 1100 kb großen NotA Fragments erkennen, wobei die Länge der einzelnen Fragmente den Abständen zwischen den verschiedenen Gen-Loci entsprechen musste. Der *NotI* Verdau der Trippeldeletionsmutante diente der Bestätigung dieser Daten, indem sich hiernach vier neue Fragmente nachweisen ließen, die zusammen dem ehemaligen NotA Fragment entsprachen. Die Kombination all dieser Verdau erlaubte es schließlich, die drei Gene ihrer exakten Lage entsprechend auf dem NotA Fragment anzuordnen. Demzufolge ergab sich ein Abstand von 180 kb zwischen dem *inlAB*- und dem *inlFDE*-Locus, sowie eine Distanz von 60 kb zwischen dem *inlFDE*-Locus und dem Virulenzgencluster (*vgc*) *prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB*. Um das gesamte NotA Fragment in der korrekten Orientierung in die physikalische Karte einzufügen zu können, wurde ein Verdau genomischer DNA der *PprfABox(inlAB)ΔinlFDE* Mutante mit der *NotI*-1* Sonde hybridisiert. Das Ergebnis dieses Southern-Blots ist in der rechten äußeren Spur in Abb. 10C zu sehen und ließ zwei Signale erkennen. Eines dieser beiden Signale konnte dem NotC Fragment zugeordnet werden, während das zweite eindeutig auf das 100 kb große, dem NotA Fragment zuzuordnende, Fragment hinwies. Mit Hilfe dieses Experiments konnte das NotA Fragment, wie in Abb. 9 dargestellt, in die physikalische Karte des EGD-e Chromosoms eingebracht werden.

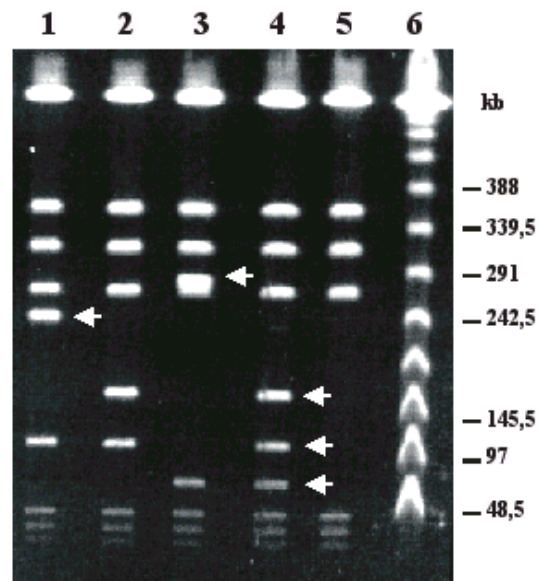


Abb. 12: PFGE *NotI* verdauter DNA dreier Doppeldeletionsmutanten und einer Trippeldeletionsmutante des *L. m.* Wildtpys EGD-e.

1: *PprfABox(inlAB)DactA-plcB*, 2: *PprfABox(inlAB)DinlFDE*, 3: *DactA-plcBDinlFDE*,

4: *PprfABox(inlAB)DactA-plcBDinlFDE*, 5: EGD-e, 6: Lamda Ladder PFG Marker. Die zusätzlichen Banden, die aus den künstlich eingefügten *NotI* Schnittstellen resultieren und Fragmenten der Größe 280, 240, 180, 100 und 60 kb entsprechen, sind mit Pfeilen markiert.

Die relative Lage der *irpA* und *flaR* Gene zueinander wurde ebenfalls mit Hilfe der Southern Blot-Hybridisierung bestimmt. *NotI* Verdau von in Agarose eingebetteter genomischer DNA jeder Mutante wurden auf eine Nylonmembran transferiert und die beiden flankierenden Sonden des NotB Fragments, NotI-5* und NotI-8*, für die Hybridisationsanalyse verwendet. Mit dieser Strategie konnte gezeigt werden, daß das 250 kb Fragment, das im *NotI* Verdau der Δ *flaR*-Deletionsmutante zu sehen war, mit der NotI-8* Sonde hybridisierte, während das 200 kb Fragment aus dem *NotI* Verdau der Δ *irpA3*-Deletionsmutante mit der NotI-5* Sonde hybridisierte. Umgekehrt ergab die Hybridisierung des 600 kb Δ *flaR*-Fragments mit der Sonde NotI-5*, und die des 650 kb Δ *irpA3*-Fragment mit der NotI-8* Sonde, ein Signal bei der anschließenden Entwicklung des Röntgenfilmes. Die Ergebnisse dieser Hybridisationsanalyse zeigt Abb. 13. Somit ergab sich zwischen den beiden auf NotB liegenden Fragmenten ein Abstand von 400 kb.

Mit Hilfe all dieser gewonnenen Daten wurde schließlich die in Abb. 9 dargestellten physikalische und genetische Karte des Chromosoms von *Listeria monocytogenes* EGD-e Serotyp 1/2a konstruiert.

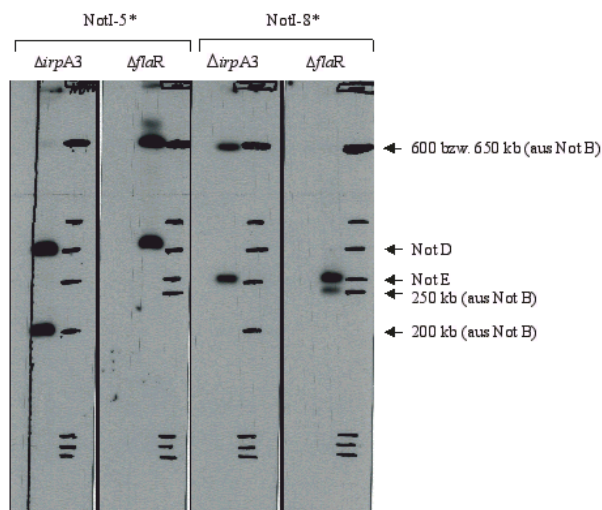


Abb. 13: Röntgen-Detektion nach Southern Blot Hybridisierung *NotI* verdauter DNA der mutierten Stämme *DirpA3* und *DflaR* mit den Sonden NotI-5* und NotI-8*. Dies ermöglichte die genaue Kartierung des Not B Fragments. Das 650 kb Fragment der *DirpA3* Mutante und das 600 kb Fragment von *DflaR* laufen in diesem Auflösungsfenster annähernd auf der gleichen Höhe.

3.2 Funktionelle Genomanalysen und Komplementationsexperimente

3.2.1 Klonierung großer, funktioneller chromosomaler DNA-Abschnitte mit Hilfe des BAC-Systems

In dieser Arbeit kam das von Shizuya *et al.* (1992) entwickelte BAC-System (*bacterial artificial chromosome*), ein bakterielles Klonierungssystem für die Kartierung und Analyse komplexer Genome, zur Anwendung. BAC-Vektoren wurden mit dem Ziel entwickelt, die Klonierung großer (> 100 kb) DNA-Regionen und deren anschließende Stabilität innerhalb des entstandenen Konstrukts in der *E. coli* Wirtszelle zu gewährleisten. Ihre Stabilität und die leichte Manipulation der BACs in nachfolgenden Analyseschritten haben diese Vektoren für die Konstruktion von Genbanken verschiedener mikrobieller, pflanzlicher und tierischer Genome zunehmend beliebter gemacht. Im Gegensatz zu Plasmiden, die zur Klonierung weniger Kilobasenpaare umfassender DNA-Fragmente verwendet werden, wie zum Beispiel die pUC-Vektoren (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), leiten sich bakterielle Vektoren, mit deren Hilfe große (≤ 300 kb) DNA-Fragmente kloniert werden sollen, von Molekülen ab, die gewöhnlich lange DNA-Regionen replizieren und auf der Grundlage von low copy replicons in einer sehr niedrigen Kopienzahl innerhalb der Zelle gehalten werden (Rondon *et al.*, 1999). Der in dieser Arbeit verwendete BAC-Vektor pBeloBAC11 (Shizuya *et al.*, 1992) und der von diesem abgeleitete pUvBBAC (diese Arbeit) wurden auf der Basis des single-copy-Sex-Faktors F von *E. coli* entwickelt. pBeloBAC11 ist ein mini-F-basierter BAC-Vektor der zweiten Generation, der über das *lacZ α* verfügt, so dass positive Rekombinanten anhand der üblichen Blau-weiß-Selektion identifiziert werden können, wenn die Kolonien auf X-gal Selektionsplatten unter Zugabe des Induktors IPTG bebrütet werden. Das *cat* Gen dient darüber hinaus der Selektion transformierter Klone. Wesentlich zur Regulierung seiner eigenen Replikation sowie zur Kontrolle der Kopienzahl sind die auf dem F Faktor codierten Gene. Das *oriS* und *RepE* gewährleisten die unidirektionale Replikation des F Faktors, während *SopA* und *SopB* das Plasmid stabil in einer Kopienzahl von ein bis zwei pro Zelle halten. Eine ausführliche Karte von pBeloBAC11 ist im Anhang zu finden.

3.2.1.1 Restriktionsverdau genomischer DNA von *L. monocytogenes* EGD-e mit *HindIII* und Fragmentauftrennung mittels PFGE

Da der BAC-Vektor pBeloBAC11 über die beiden Klonierungsstellen *Bam*HI und *Hind*III verfügt, wurden Testverdaus genomischer DNA von *Listeria monocytogenes* EGD-e mit diesen beiden Restriktionsendonukleasen und verschiedenen Enzymmengen durchgeführt, um die daraus resultierenden Fragmentgrößen mittels PFGE abschätzen zu können. Die DNA wurde wie unter 2.2.7 beschrieben präpariert, verdaut und aufgetrennt.

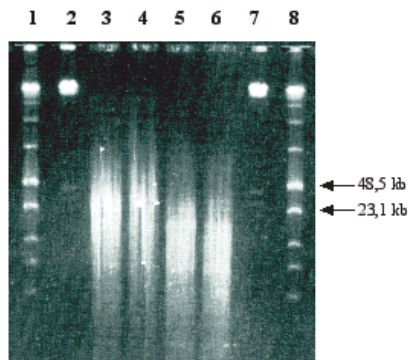


Abb. 14: PFGE der *Hind*III Verdaus von vier Agaroseblöckchen mit genomischer EGD-e DNA. 3: 5 Units, 4: 10 Units, 5: 20 Units, 6: 30 Units, 1 & 8: Lambda Ladder PFG Marker. 2 & 7: *Not*I Verdaus genomischer EGD-e DNA.

Konstruiert werden sollten zwei BAC-Genbanken mit unterschiedlich großen Insertionen genomischer *L. monocytogenes* EGD-e DNA: eine erste BAC-Bank mit Fragmentgrößen von ca. 25 – 50 kb und eine weitere, die Fragmentgrößen von ca. 60 – 140 kb umfassen sollte. Die Testverdaus mit *Hind*III (Abb. 14) entsprachen am ehesten diesen gestellten Forderungen, so dass die Folgeversuche ausschließlich mit diesem Enzym durchgeführt wurden. Nach mehreren Vorversuchen wurden schließlich die optimalen Verdau-Parameter für die beiden BAC-Klonierungen festgelegt:

BAC I-Bank (25 - 50 kb):

Von insgesamt fünf Blöckchen mit isolierter genomischer DNA von *L. monocytogenes* wurden zwei mit 2,5 U, zwei weitere mit 5 U und das letzte mit 10 U *Hind*III bei 37 °C für je 2 Stunden inkubiert. Der anschließende 1. PFGE-Lauf dauerte 15 Stunden, bei Pulszeiten von 1 – 12 Sekunden ansteigend und einer Feldstärke 6 V/cm; der Laufpuffer wurde dabei ständig auf 12 °C gekühlt.

BAC II-Bank (60 - 140 kb):

In diesem Fall wurden alle fünf präparierten Blöckchen mit je 2,5 Units *Hind*III für nur 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Für den sich anschließenden 1. PFGE-Lauf galten die gleichen Laufparameter wie für die BAC I-Bank.

3 Ergebnisse

3.2.1.2 Extraktion von DNA-Fragmenten definierter Größe aus dem PF-Gel durch Agaraseverdau und Klonierung in pBeloBAC11

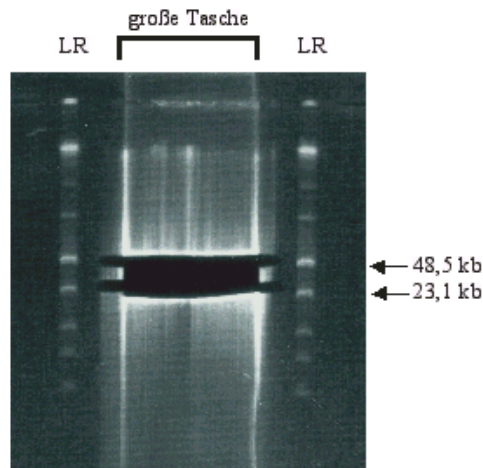


Abb. 15: *Hind*III Verdau von fünf Agaroseblöckchen mit genomischer EGD-e DNA, die in eine große gemeinsame Geltasche geladen wurden. Verwendete Enzymmengen: 2 x 2,5 Units, 2 x 5 und 1 x 10 Units. Dokumentiert ist hier die dreiteilige Exzision eines Bereiches 25-50 kb großer Fragmenten. LR: Low Range PFG Marker.

Die jeweils interessierenden Bereiche wurden, wie unter 2.2.7.3 ausführlich beschrieben, aus dem ersten CHEF Gel dreiteilig (oben, mitte unten) exzidiert (Abb. 15) und in ein zweites vorbereitetes Gel geladen. Für diesen zweiten Gellauf galten die folgenden Parameter:

Eine fixe Pulszeit von 5 Sekunden, eine Feldstärke von 4 V/cm und eine konstant bei 12 °C gehaltene Temperatur des Laufpuffers. Für die BACI-Bank dauerte der Lauf 16 und für die BACII-Bank 17 Stunden. Nach Exzision der aufgetrennten DNA-Fragmente und anschließendem Gelase Verdau wurden 20 µl der DNA Probe auf ein Standardagarosegel gegeben, um so die Ausbeute an DNA beurteilen zu können. Daraufhin wurden 50 ng DNA des Vektors pBeloBAC11,

der zuvor ebenfalls *Hind*III verdaut und anschließend mit Alkalischer Phosphatase behandelt und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt worden war, zu je 218 µl des Gelaseverdauten Ansatzes genomischer DNA-Fragmente gegeben. Damit ergab sich, nach weiterer Zugabe der Ligase und des dazugehörigen Ligasepuffers, ein 250 µl Ligationsansatz, der dann bei 14 °C für 3 Tage inkubiert wurde (Kap. 2.2.7.5). Schließlich wurden elektrokompente Zellen des Laborstammes DH10β mit diesen Ligationsansätzen transformiert, wobei je 2,25 µl jedes Ligationsansatzes auf 30 µl Zellen gegeben wurden. DH10β wird üblicherweise als Wirtsorganismus bei dieser Art von Klonierungen verwendet, da er sich sehr gut mit großmolekularer DNA transformieren läßt und zudem über einen im Hinblick auf Rekombination, Restriktion und Modifikation günstigen Genotyp verfügt (Sheng et al., 1995). Die Elektroporation verlief entsprechend der Angaben unter 2.2.6.5, wobei festzustellen ist, daß der Ligationsansatz direkt, d.h. ohne einen vorherigen entsalzenden Dialyseschritt, zur Elektroporation eingesetzt wurde, was problemlos möglich war.

Die positiven Transformanten konnten nach Inkubation bei 37 °C auf speziellen Selektionsplatten (LB, 20 Cm, X-gal, IPTG) mit Hilfe der klassischen Blau-weiß Selektion vorläufig identifiziert werden. Dabei ergaben sich für die einzelnen BAC-Genbanken die folgenden Raten an positiven Klonen, jeweils aufgeteilt nach den Bereichen „oben“, „mitte“ und „unten“, wobei in beiden Fällen, wie oben aufgeführt, je 2,25 µl Ligationsansatz auf 30 µl DH10β Zellen gegeben wurden:

<u>BACI-Bank:</u>	„oben“ (40 – 50 kb):	650 Klone
	„mitte“ (30 – 40 kb):	2000 Klone
	„unten“ (20 – 30 kb):	350 Klone
<u>BACII-Bank:</u>	„oben“ (110 – 140 kb):	70 Klone
	„mitte“ (80 – 110 kb):	180 Klone
	„unten“ (60 – 80 kb):	50 Klone

Die Anzahl der Klone der BACII-Bank für die drei Bereiche betrug im Mittel 11,4 % der Rate der BACI-Klonierung:

„oben“:	10,8 % (70 / 650)
„mitte“:	9,0 % (180 / 2000)
„unten“:	14,3 % (50 / 350)

Auf diese Weise wurden zwei BAC-Genbanken des Genoms von *Listeria monocytogenes* EGD-e generiert (BACI und BACII); die Größe der jeweils in ihnen enthaltenen DNA-Fragmente wurden in den folgenden Schritten untersucht.

3.2.1.3 Überprüfung der Fragmentgrößen beider BAC-Genbanken mittels BAC-Isolierung und anschließender PFGE-Analyse

Um die Insertgrößen der beiden BAC-Banken zu bestimmen, wurden je 1,5 ml einer Übernachtskultur, wie unter 2.2.7.7 beschrieben, zur Isolierung der rekombinanten BACs eingesetzt. Anschließend wurden je 5 µl des in 15 µl ddH₂O resuspendierten Ansatzes zu einem *EcoRI*- bzw. *NotI*-Verdau eingesetzt und daraufhin aufgetrennt. Abb. 16 zeigt

3 Ergebnisse

beispielhaft für diese Präparation die Ergebnisse für die BACI-Bank. Hierbei war deutlich zu erkennen, dass große klonierte Fragmente chromosomaler DNA von *Listeria monocytogenes* EGD-e in eine Vielzahl kleiner *EcoRI*-Fragmente zerteilt worden waren. Da der Vektor pBeloBAC11 über zwei die mcs flankierende *NotI* Schnittstellen verfügt, ließen sich die klonierten Fragmente mittels eines *NotI*-Verdaus komplett aus dem Vektor exzidieren. Das Ergebnis dieses Verdaus zeigen Abb. 16C und Abb. 17.

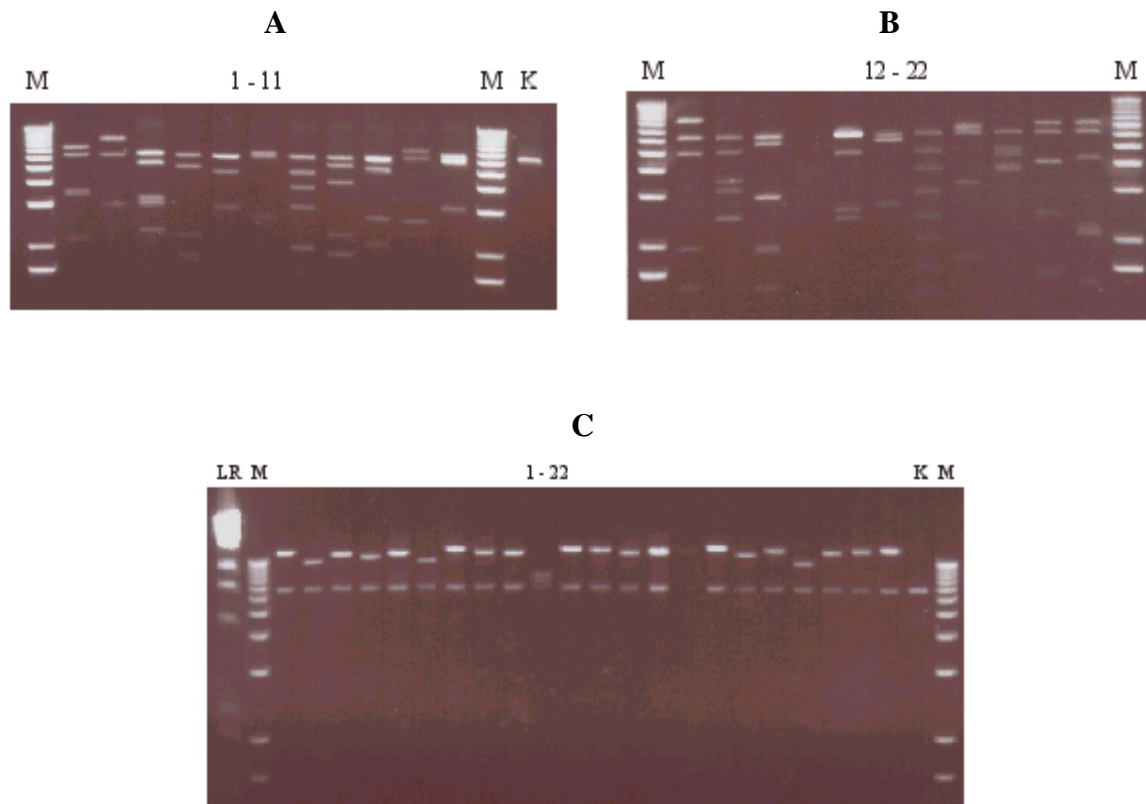


Abb. 16: *EcoRI* und *NotI* Verdau von 22 Klonen der BACI-Bank zum Test auf Inserts.
M: 1 kb DNA Marker; LR: Low Range PFG Marker; K: Kontrolle (pBeloBAC11).

Für die BACI-Bank errechnete sich zum einen aus der Summe der verschiedenen *EcoRI* Fragmente wie auch durch Bestimmung der *NotI*-Fragmentgrößen anhand des PF-Gels eine durchschnittliche Größe der Fragmente von ca. 25 bis 50 kb. Der Anteil der im PCR-Test positiven Klone war 100 % und verdeutlichte damit die hohe Effektivität der klassischen Blau-weiß Selektion in diesem Klonierungsmodell, da ausschließlich weiße Klone zur BAC-Isolierung eingesetzt wurden. Der Vorteil dieser BAC-Isolierungsmethode lag eindeutig in ihrer Schnelligkeit und leichten Handhabbarkeit, so dass ein Screening einer großen Anzahl von Klonen in relativ kurzer Zeit und effektiv möglich war. Auf gleiche Weise konnten für

die BACII-Bank Fragmentgrößen von ca. 60 bis 140 kb aufgezeigt werden.

Die BACI-Bank fand aufgrund ihrer zahlreich positiven Klone und ihrer günstigen Fragmentgrößen von 25 – 50 kb eine wichtige Anwendung im Rahmen des *Listeria*-Genomprojektes, das von einem europäischen Konsortium im Anschluss an diese Arbeit durchgeführt wurde.

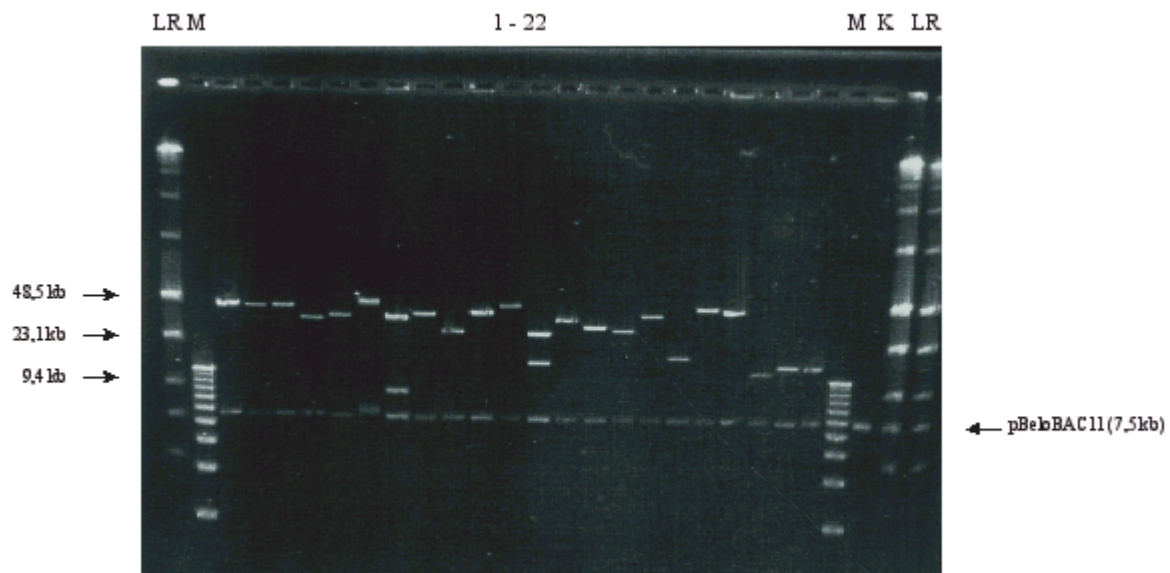


Abb. 17: PFGE Auftrennung eines *NotI* Verdau der rekombinanten Konstrukte aus 22 Klonen der BACI-Bank zur Bestimmung der genauen Insert-Größen. M: 1 kb DNA Marker; LR: Low Range PFG Marker; K: Kontrolle (pBeloBAC11).

3.2.2 Herstellung eines Shuttle-BAC-Vektors (pUvBBAC) für Gram positive und Gram negative Bakterien – Skizzierung des experimentellen Protokolls

3.2.2.1 Konstruktion des BAC-Vektors pUvBBAC auf der Grundlage der Vektoren pBeloBAC11 und pSOG7 und Expression in DH10b

Da das BAC-System die Klonierung großer funktioneller DNA-Abschnitte ermöglicht, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, einen Shuttle-Vektor mit einem um den Gram positiven Bereich erweiterten Spektrum auf der Basis eines herkömmlichen BAC-Vektors zu generieren, um anschließend Komplementationsversuche zwischen pathogenen und

3 Ergebnisse

apathogenen *Listeria* Stämmen durchführen zu können. Das deutlich erweiterte Spektrum eines solchen shuttle-Vektors macht ein solches Konstrukt besonders für Untersuchungen im Rahmen der funktionellen Genomik interessant. Vor allem die molekularbiologischen Analysen an Gram positiven Organismen, wie z.B. *Listeria spp.*, könnten erleichtert werden, da ein rekombinantes Konstrukt jederzeit problemlos in einem *E. coli*-Laborstamm repliziert und analysiert werden könnte.

Zur Konstruktion des Shuttle-BAC-Vektors wurde ein 4,3 kb großes Fragment amplifiziert, das über ein Erythromycin Resistenz Gen, *ermC*, sowie über die Replikationselemente (*oriR*, *repR* und *copR*) von pIP501 aus *Streptococcus agalactiae* verfügt. Während das *oriR* den Ausgangspunkt der DNA-Synthese darstellt, regelt RepR den Start der Replikation des Plasmids. Demgegenüber hat *copR* einen negativ regulierenden Einfluss auf die Kopienzahl des Plasmids. All diese Faktoren ermöglichen pIP501 ein ausgedehntes Wirtsspektrum in Gram positiven Erregern (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Listeria*) und sorgen für eine niedrige Kopienzahl des Plasmids von 5 bis 10 pro Zelle. Der Plasmidvektor pSOG7 (Otten, 2001) diente als Grundlage der PCR-Amplifizierung des beschriebenen 4,3 kb großen DNA-Fragments mit den Oligonukleotiden U23(XhoI) und U24(XhoI). Das gewonnene DNA-Fragment wurde anschließend in den pCR-XL-Topo Cloning Vektor kloniert (Kap. 2.2.4.7). Mit diesem Ligationsansatz wurden der Laborstamm Inv α F' durch Hitzeschock transformiert und die Zellen anschließend auf LB 50 Km-Selektionsplatten ausplattiert. Ein PCR-Screening von 23 Klonen unter zu Hilfenahme der o. g. Oligonukleotide ergab ein ausnahmslos positives Ergebnis. Zwei der positiven Klone wurden für eine Übernachtskultur in LB 50 Km angesetzt, aus der am nächsten Tag das rekombinante Plasmid isoliert werden konnte. Da das 4,3 kb große DNA-Fragment von zwei durch die spezifischen Primer angehängten *XhoI* Schnittstellen flankiert wurde, konnte es nach einem *XhoI* Verdau mit pBeloBAC11 ligiert werden. Dieser Ligationsansatz diente zur Elektroporation des Laborstamms DH10 β (Invitrogen) unter den folgenden Parametern: 1,1 kV, 200 Ω und 25 μ F. Die transformierten Zellen wurden anschließend auf LB 20 CM 300 Em X-gal Selektionsplatten ausplattiert.

3.2.2.2 Überprüfung des neuen Konstrukts mit PCR und Restriktionsverdau; Bestimmung der relativen Orientierung des neuen ori

Fünf Klone wurden mittels PCR auf das Vorhandensein des DNA-Fragments aus pSOG7 getestet, wobei die bereits unter 3.2.2.1 aufgeführten Oligonukleotide zur Anwendung kamen.

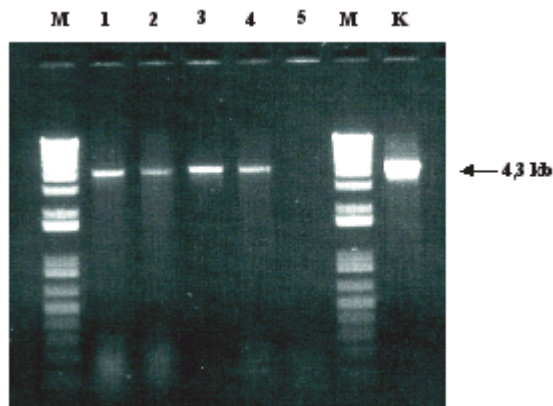


Abb. 18: PCR Test des neuen pUvBBAC Konstruktes auf das Vorhandensein des 4,3 kb Fragments aus pSOG7. 1-5: Klone 1-5; M: 1 kb DNA Marker; K: Kontrolle: pSOG7.

Nachdem dieser erste Test für vier Klone positiv ausfiel (Abb. 18), wurde die relative Orientierung des klonierten Fragments innerhalb des neuen BAC-Konstrukts bestimmt. Zu diesem Zweck wurden Restriktionsverdauungen mit *XhoI*, *BamHI*, *HindIII* und *KpnI* durchgeführt. Mit Hilfe der nach diesen Verdauen erhaltenen unterschiedlichen Fragmentgrößen konnte, vor dem Hintergrund der bekannten Schnittstellen im neuen Plasmid, die Orientierung des Fragments innerhalb des Vektors für alle vier getesteten Konstrukte bestimmt werden. Bei den Klonen 1 und 3 war das Fragment entgegen der Leserichtung des *cat* Gens des ursprünglichen Vektors pBeloBAC11 eingesetzt worden. Eine

in Bezug auf dieses Gen gleichsinnige Orientierung konnte für die Konstrukte der Klone 2 und 4 gezeigt werden.

Die Ergebnisse dieser Tests bestätigten so die erfolgreiche Konstruktion des Shuttle-Vektors pUvBBAC als Hybrid des BAC-Vektors pBeloBAC11 und eines Fragments des Plasmidvektors pSOG7. Die weiteren Experimente wurden mit einem der bezüglich des *cat*-kodierenden Gens gleichläufig orientierten Konstrukte (Klon 2) durchgeführt. Eine vollständige Karte von pUvBBAC zeigt Abb. 20.

3.2.2.3 Transformation von *L. innocua* Protoplasten mit pUvBBAC und Überprüfung des Konstrukts auf Funktion des Gram positiven ori

Nach Protoplasten-Herstellung eines plasmidfreien Serotyp 6a Stammes von *Listeria innocua* entsprechend der Angaben unter 2.2.4.13 und Isolierung von pUvBBAC aus DH10 β mit dem GFX Micro Plasmid Prep Kit der Firma Pharmacia (Kap. 2.2.4.10), wurde die Protoplastentransformation wie unter 2.2.4.13 beschrieben durchgeführt. Bei dieser Transformation wurden jedoch nur 150 ng Vektor-DNA eingesetzt, der Ansatz anschließend vier Stunden lang bei 30 °C inkubiert und die Zellen daraufhin auf 5 DM3-Platten à 200 μ l ausplattiert. Nach 4 – 5 Tagen waren mehrere Klone zu sehen. Dies war der erste Hinweis auf ein funktionstüchtiges pIP501 ori, da der rekombinante *L. innocua*-Stamm andernfalls nicht in

3 Ergebnisse

der Lage gewesen wäre, das Em-Resistenzgen abzulesen und auf den DM3-Platten zu wachsen.

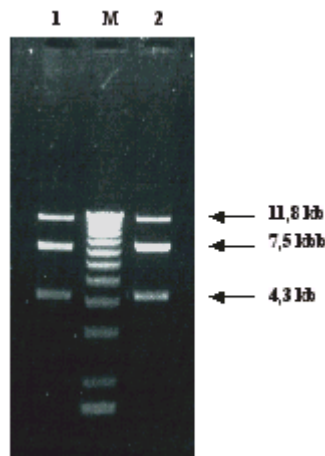


Abb. 19: Testverdau des neuen pUvBBAC Konstrukts mit *XhoI* nach Isolierung aus zwei transformierten *L. i.* Stämmen. Man erkennt die 11,8 kb Bande, die dem ungeschnittenen Vektor entspricht sowie die pBeloBAC11 entsprechende 7,5 kb Bande und das 4,3 kb große Fragment aus pSOG7.

Zur weiteren Bestätigung dieses Ergebnisses wurde pUvBBAC aus zwei rekombinanten *L. innocua*-Klonen mittels Mini Prep isoliert und das Isolat anschließend mit *XhoI* verdaut, um das komplette aus pSOG7 stammende DNA-Fragment zu exzidieren. Das Ergebnis dieses Verdau zeigt Abb. 19. Deutlich war die 11,8 kb-Bande des ungeschnittenen Vektors pUvBBAC sowie eine 7,5 kb große Bande, die pBeloBAC11 entsprach, und eine noch kleinere Bande, die mit 4,3 kb das Fragment aus pSOG7 darstellte, zu erkennen. Schließlich wurde von vier weiteren Klonen eine zusätzliche Test-PCR mit den unter 3.2.2.1 aufgeführten Oligonukleotiden durchgeführt.

Nachdem all diese Tests positiv ausgefallen waren, konnte abschließend die einwandfreie Funktion des neuen Konstrukts in dem rekombinanten *L. innocua*

Stamm bewiesen werden. Die komplette Sequenz von pUvBBAC ist über die EMBL-Datenbank unter der Accession Number AJ509853 zugänglich.

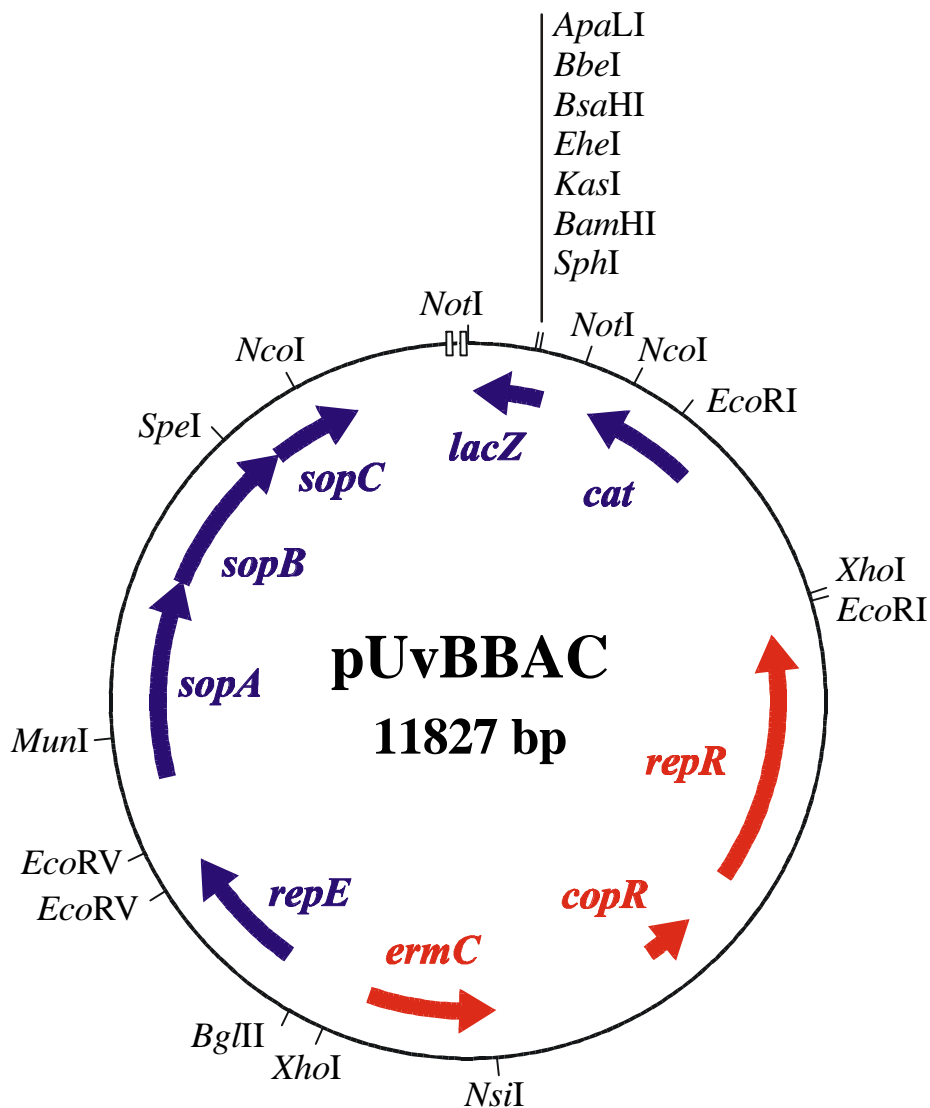


Abb. 20: Plasmidkarte von pUvBBAC. Dieser Hybrid BAC-Vektor entstand auf der Grundlage von pBeloBAC11 und ist, im Gegensatz zu diesem, neben der Verwendung in *E. coli* auch in Gram positiven Wirten einsetzbar. Als Selektionsmarker stehen sowohl eine Chloramphenicol- als auch eine Erythromycin-Resistenz zu Verfügung. Der Vektor liegt in Gram positiven Wirten mit einer Anzahl von 5-10 Kopien/Zelle vor. Die blau dargestellten Regionen entsprechen pBeloBAC 11, während die rot markierten Bereiche aus pSOG7 stammen.

3.2.3 Erstellung einer BAC-Genbank von *L. monocytogenes* EGD-e in pUvBBAC und Klonierung des vollständigen Virulenzgenclusters (vgc) – empirische Entwicklung eines experimentellen Protokolls

Mit dem neuen BAC-Vektor pUvBBAC war nun die Möglichkeit gegeben, große funktionelle DNA-Abschnitte aus dem Chromosom von *Listeria monocytogenes* EGD-e in einen Vektor zu klonieren, der anschließend Expressionsstudien der jeweiligen Genabschnitte innerhalb anderer Gram positiver, verwandter Bakterienstämme zuließ. Einen für solche Studien sehr interessanten Bereich innerhalb des *L. monocytogenes* Chromosoms stellt das Virulenzgencluster (vgc) dar. Dieser 9 kb große Bereich sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf einem möglichst großen Fragment (80 - 100 kb) in pUvBBAC kloniert werden, um einen großen Anteil der flankierenden DNA-Sequenzen im Rahmen einer funktionellen Genanalyse miterfassen zu können.

3.2.3.1 Restriktionverdau chromosomaler EGD-e DNA mit *Bam*HI mit anschließender PFGE-Auftrennung und Extraktion von Fragmenten der Größe 80 – 160 kb

Fünf Agaroseblöckchen wurden zu dieser dritten BAC-Klonierung eingesetzt, wobei drei Blöckchen mit je 5 Units und die beiden anderen mit je 2,5 Units *Bam*HI verdaut wurden. Bei der Herstellung dieser BACIII-Bank wurde die Restriktionsendonuklease *Bam*HI verwendet, da für *Hind*III nach Einsetzen des Fragments aus pSOG7 in pBeloBAC11 nun in pUvBBAC keine einzelne *Hind*III Schnittstelle mehr existierte; für *Bam*HI war dies jedoch noch der Fall. Um möglichst große DNA-Fragmente zu erhalten, war ein Partialverdau mit diesem Enzym das Mittel der Wahl. Die Vorbereitungen sowie der Ablauf des Verdau sind in Kapitel 2.2.7.1 beschrieben.

Die Parameter für den ersten PF-Gellauf waren wie folgt:

15 h Laufzeit; ansteigende Pulszeiten von 1 – 12 Sek.; 6 V/cm; 12 °C

Nach Dokumentation des Gellaufs und Markierung des zu klonierenden Größenabschnitts (80 – 160 kb), wurde der entsprechende Bereich, wie unter 2.2.7.2 erläutert, dreiteilig („oben“,

„mitte“ und „unten“) aus dem Agarosegel exzidiert und in das zweite PF-Gel geladen.

Für den zweiten PF-Gellauf galten die folgenden Parameter:

16 h Laufzeit; konstante Pulszeit von 7,5 Sek.; 4 V/cm; 12 °C

Die drei Gelstreifen wurden nach Laufende und genauer Markierung aus dem Gel geschnitten, jeweils halbiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Von jedem Bereich („oben“, „mitte“, „unten“) gab es somit 2 Ansätze (A und B). Während die B-Ansätze für eine spätere Weiterverwendung bei 4 °C gelagert wurden, schloss sich für die A-Ansätze ein Agaraseverdau an (Kap. 2.2.7.3).

3.2.3.2 Klonierung der isolierten Fragmente in pUvBBAC und Expression der BACIII-Bank in DH10b

Parallel zur oben aufgezeigten Präparation wurden 5 µg eines Midi Preps von pUvBBAC zum *Bam*HI-Verdau eingesetzt. Diesem Verdau schlossen sich eine Phenolchloroformextraktion, eine Behandlung mit Alkalischer Phosphatase sowie eine weitere, diesmal „heiße“, Phenolextraktion zur Aufreinigung des geschnittenen Vektors an. Der so aufbereitete BAC-Vektor wurde daraufhin mit den isolierten Fragmenten chromosomaler *L. monocytogenes* DNA ligiert, wobei je 50 ng Vektor-DNA auf jeden der drei Ansätze gegeben wurden. Näheres beschreibt Kap. 2.2.7.5. Die Ligationsansätze wurden 4 Tage bei 14 °C im Ligationsbad inkubiert und dienten am fünften Tag zur Transformation elektrokompenter DH10β-Zellen mittels Elektroporation. Wie schon bei den ersten beiden BAC-Klonierungen, so wurden auch diesmal je 2,25 µl Ligationsansatz auf je 30 µl Zellen gegeben, ohne dass dieser zuvor dialysiert wurde.

Unter den folgenden Parametern war die Elektroporation erfolgreich möglich:

1,3 kV; 200 Ω; 25 µF

Die anschließende Inkubation der elektroporierten Zellen in SOC-Medium bei 37 °C und 155 rpm wurde wegen der bekannt langsamen phänotypischen Expression der Em-Resistenz auf drei Stunden verlängert. Erst nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Zellen der drei

3 Ergebnisse

Ansätze auf je vier Selektionsplatten in verschiedenen Konzentrationen ausplattiert (LB, 20 Cm, 300 Em, IPTG, X-gal) und bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach zwei Tagen waren erste Klone zu sehen. Da es sich aber im Vergleich zu den beiden vorangegangenen BAC-Klonierungen nur um eine sehr geringe Anzahl von Klonen handelte, wurde der Rest des ursprünglichen A-Ansatzes (A2) zu einer erneuten Ligation mit dem Vektor eingesetzt. Hierbei wurde jedoch die Menge des Vektors halbiert , d.h. es wurden nur noch 25 ng pUvBBAC eingesetzt. Darüberhinaus wurde auch der B-Ansatz Agarase-verdaut und in zwei Ligationsansätze (B1 und B2) aliquotiert, die sich ebenfalls im Hinblick auf die eingesetzte Vektormenge unterschieden. Während der B1-Ansatz mit 25 ng Vektor ligiert wurde, dienten im B2-Ansatz nur noch 12,5 ng pUvBBAC zu Ligation.

Alle diese Ansätze lieferten zusammen 350 positive (d.h. „weiße“) Klone auf den Selektionsplatten, von denen der A1-Ansatz mit knapp 300 Klonen den größten Anteil ausmachte.

3.2.3.2 Bestimmung der Fragmentgrößen der BACIII-Bank mittels BAC-Isolierung und anschließender PFGE-Analyse

Als erste Kontrolle der BACIII-Klonierung wurden insgesamt 15 Klone des A1-Ansatzes auf Inserts und deren Größe getestet. In diesem ersten Screening war jeder Bereich („oben“, „mitte“, „unten“) mit je fünf Klonen vertreten. Die einzelnen Konstrukte wurden entsprechend den Angaben unter 2.2.7.7 isoliert und anschließend in je 20 µl ddH₂O resuspendiert. Von diesen Ansätzen wurden je 10 µl für einen *EcoRI* Verdau eingesetzt, der daraufhin auf einem Standardagarosegel aufgetrennt wurde. Dieser *EcoRI*-Verdau zeigte als erstes Ergebnis fünf positive Klone des Bereiches „oben“, während aus dem mittleren Bereich nur ein positiver und aus dem unteren nur zwei positive Klone aufzufinden waren. Hierbei war bemerkenswert, dass dieses Ergebnis genau dem Bild der Blau-weiß-Selektion entsprach, da die in dieser ersten *EcoRI*-Analyse positiven Klone dort auch als weiß-positive Klone auffielen, während die im *EcoRI*-Verdau negativen Klone auch auf den Selektionsplatten blau-negativ erschienen.

Zur genaueren Größenbestimmung der Fragmente, insbesondere der Klone des oberen Bereichs, wurden die restlichen 10 µl jedes Ansatzes für einen *NotI*-Verdau eingesetzt. Um die erwarteten Fragmentgrößen von 80 bis zu über 100 kb gut auftrennen zu können, wurde der *NotI* Verdau mittels PFGE analysiert. Hierbei wurde der gesamte *NotI* Verdau einer Probe direkt nach Ende der zweistündigen Inkubation mit einem gleichen Anteil von Low-melting

Agarose vorsichtig vermischt und darauf sofort in eine Geltasche geladen. Als DNA-Größenstandard dienten sowohl der Low Range PFG Marker als auch der Lamda Ladder PFG Marker. Nach einem Gellauf von 15 h mit ansteigenden Pulszeiten von 5 bis 20 Sekunden bei 6 V/cm und einer ständigen Kühlung auf 12 °C zeigte sich das in Abb. 21 dargestellte Bild. Dieses Ergebnis entsprach dem des *EcoRI* Verdau, da die dort als positiv selektionierten Klone auch im *NotI*-Verdau positiv waren. Ferner konnte man dem Gelbild entnehmen, dass zumindest der obere Bereich DNA-Fragmente der Größe von 90 bis 120 kb umfasste.

3.2.3.3 PCR-Screening der Genbank auf Listeriolysin O (*hly*)

Zur Identifizierung derjenigen Rekombinanten, die das Virulenzgenklusters (*vgc*) trugen, wurde die BACIII-Bank einer speziellen PCR-basierten Screening Methode unterzogen. Zunächst wurden die 350 Klone, die zu jeweils vier in einem well einer 96 well Mikrotiter Platte gepoolt worden waren, mit Hilfe der Oligonukleotide U11(*XhoI*) und U12(*BamHI*) (Kap. 2.1.2) auf das *hly* Gen getestet. Listeriolysin O diente in diesem Fall als Markergen für das Virulenzgenkluster. Eine Kontrolle in Form des *L. monocytogenes* Wildtyps EGD-e wurde bei der PCR mitgeführt. Für zwei der gepoolten Ansätze konnte das *hly*-spezifische 1873 bp große PCR Produkt nachgewiesen werden. Diese Klone wurden erneut vereinzelt, und nach einer zweiten PCR mit den gleichen Primern konnten schließlich zwei positive Klone identifiziert werden, die das *hly* Gen trugen. Zur weiteren Bestätigung wurde das komplette Virulenzgenkluster mit Hilfe des HF-Expand-20 kb plus-PCR Systems der Firma Roche Diagnostics erfolgreich amplifiziert, wobei *L. monocytogenes* EGD-e erneut als Kontrolle diente.

3.2.3.4 Isolierung zweier *hly*-positiver Konstrukte von 96,6 und 84,5 kb Größe

Nachdem das Vorhandensein des kompletten Virulenzgenklusters auf den beiden oben beschriebenen Konstrukten nachgewiesen worden war, wurden die Konstrukte in großer Menge mit Hilfe des Quiagen Large Construct Kits isoliert. Die Isolierung wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Ende dieser Präparation lag für beide Konstrukte ein je 150 µl-Ansatz vor, dessen Reinheit und Konzentration mit Hilfe des Gene Quants spektrophotometrisch bestimmt wurde. Das *vgc1*-Konstrukt (96,6 kb) war mit 600 ng/µl mehr als doppelt so hoch konzentriert als das 84,5 kb große *vgc2*-Konstrukt (250 ng/µl). Dies war auf ein deutlich langsames Wachstum der Kultur zurückzuführen gewesen,

3 Ergebnisse

so dass die Menge an eingesetzten Zellen unterschiedlich war. Die Reinheit beider Konstrukte war mit 95 bzw. 96 % zufriedenstellend. Die auf diese Weise isolierten Konstrukte sollten anschließend zur Komplementation des *Listeria innocua* Wildtyps eingesetzt werden.

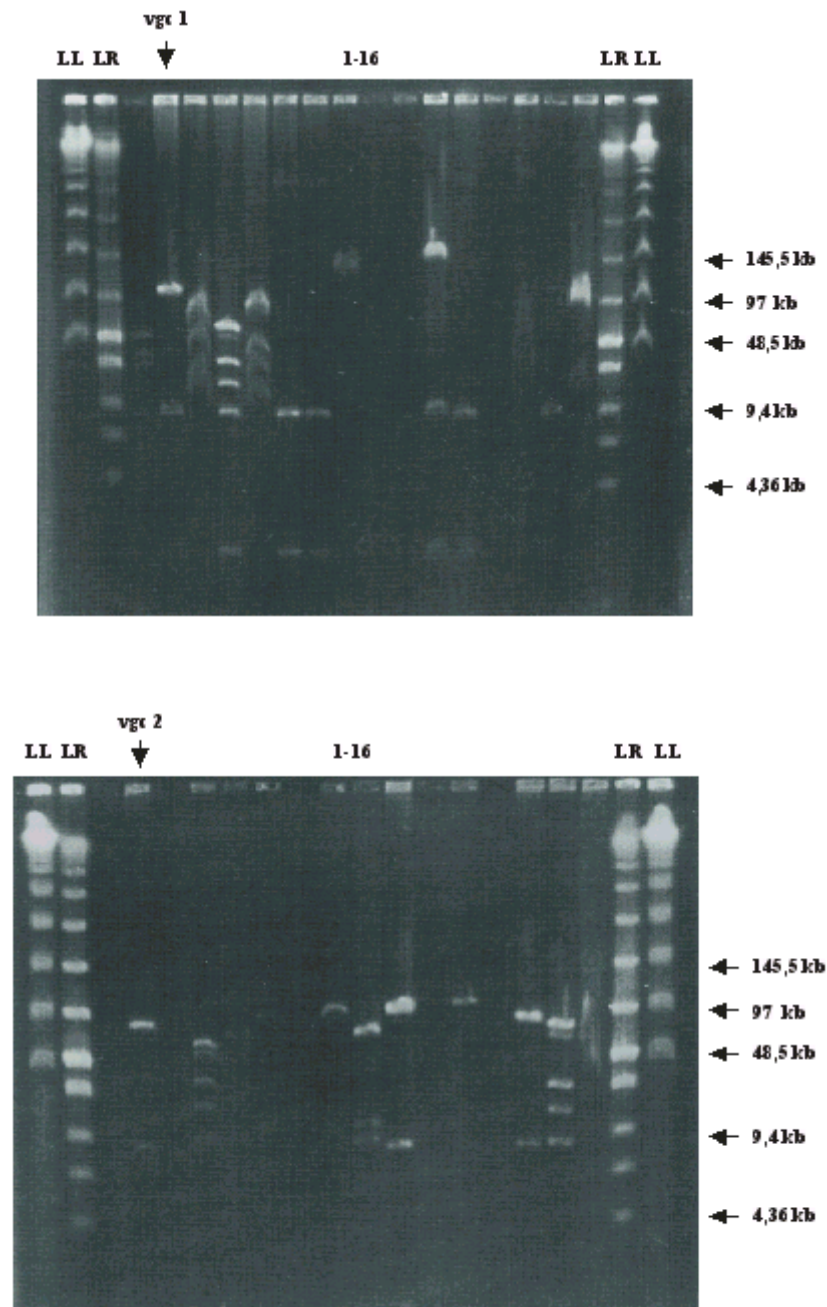


Abb. 21: PFGE eines *NotI* Verdau der rekombinanten pUvBBAC-Konstrukte aus 2 x 16 Klonen der BACIII-Bank zum Test auf Inserts. Die Konstrukte vgc1 (96,6 kb) und vgc2 (84,5 kb) sind durch Pfeile gekennzeichnet. LL: Lambda Ladder PFG Marker; LR: Low Range PFG Marker.

3.2.4 Virulenztransfer - Komplementation von *L. innocua* mit pUvBBAC+vgc1 bzw. pUvBBAC+vgc2

Als erster Schritt im Rahmen einer funktionellen Genomanalyse sollte das BAC-System, speziell der neue Vektor pUvBBAC, in einem Komplementationsexperiment Anwendung finden. Ziel war es, durch Einbringen des Virulenzgenklusters (vgc) von *L. monocytogenes* EGD-e in den nicht humanpathogenen Stamm *L. innocua* einen Virulenztransfer zu erreichen. Mit Hilfe des Shuttle-Vektors pUvBBAC sollte nach erfolgreicher Komplementation eine Expression der verschiedenen auf dem vgc lokalisierten Gene in *L. innocua* nachweisbar sein. Die Konstellation dieses Experiments machte es möglich, allein die Funktion des Virulenzgenklusters auf die Ausprägung der Virulenz, isoliert von allen weiteren Co-Virulenzfaktoren, zu untersuchen. Aus diesem Grund sollten die Ergebnisse richtungsweisend sein.

3.2.4.1 Transformation des *L. innocua* Wildtyps mit den Konstrukten pUvBBAC+ vgc1 und pUvBBAC+vgc2

Nach Herstellung elektrokompenter *L. innocua* Zellen, entsprechend den Angaben unter 2.2.6.7, wurden je 50 µl Zellen für die Elektroporation mit 2,5 µg pUvBBAC, pUvBBAC+vgc1 und pUvBBAC+vgc2 eingesetzt. Die Parameter für die Elektroporation waren wie folgt:

1,0 kV, 400 Ω, 25 µF

Nach einer 2,5-stündigen Inkubation in BHI+0,5 M Sucrose bei 37 °C und 150 rpm wurden die transformierten Zellen auf BHI + 5 Em-Selektionsplatten ausplattiert und für 48 h bei 37°C inkubiert. Da nach Ablauf dieser zwei Tage nur die mit pUvBBAC transformierten Klone zahlreich und deutlich zu sehen waren (3×10^4 Klone pro Platte), wurden die Platten mit den pUvBBAC+vgc1 bzw. pUvBBAC+vgc2 enthaltenden Klonen weiter inkubiert. Am dritten Tag nach Transformation waren auch diese Klone, jedoch deutlich weniger zahlreich, gewachsen. Es fanden sich 80 Klone auf den vgc1-Platten und 5 Klone auf den vgc2-Platten.

3 Ergebnisse

3.2.4.2 Überprüfung der komplementierten *L. innocua*-Stämme mittels PCR

Zehn *vgc1*-Klone, sowie alle fünf *vgc2*-Klone, wurden mit einer EGD-e -Kontrolle zu einer PCR auf Listeriolysin O eingesetzt. Hierbei erwiesen sich alle Klone als positiv.

Von jedem Konstrukt wurden zwei Klone ausgewählt, die für die weiteren Untersuchungen verwendet werden sollten. Diese vier Klone (*vgc1.1*; *vgc1.2*, *vgc2.1*; *vgc2.2*) wurden auf BHI + 5 Em + 5 Cm Selektionsplatten vereinzelt. Alle Klone wuchsen, im Vergleich zu dem auf BHI + 5 Em Platten beobachteten Wachstum, auf diesen Selektionsplatten deutlich langsamer.

3.2.4.3 Test der *vgc*-Komplementanten auf Hämolyse

Nachdem das Vorhandensein des *vgc* aus *L. monocytogenes* EGD-e in beiden rekombinanten Stämmen, *L. innocua*(pUvBBAC+*vgc1*) und *L. innocua*(pUvBBAC+*vgc2*), bestätigt werden konnte, wurden Expression sowie die Aktivität einzelner Virulenzfaktoren mittels weiterer Methoden untersucht.

Um eine hämolytische Aktivität der mit dem Virulenzgencluster komplementierten *L. innocua* Klone nachzuweisen, wurden die Stämme auf Waschblut-Agarplatten (Oxoid) ausgestrichen. Zur Kontrolle dienten *L. monocytogenes* EGD-e und der *L. innocua* Wildtyp Stamm. Das Ergebnis dieses Test zeigt Abb. 22. Beide komplementierten *L. innocua* Stämme zeigten eine deutliche hämolytische Aktivität, die sogar den *L. monocytogenes* EGD-e Wildtypstamm übertraf. Die deutlichste Hämolyse war für den das pUvBBAC+*vgc1*-Konstrukt enthaltenden Stamm nachzuweisen.

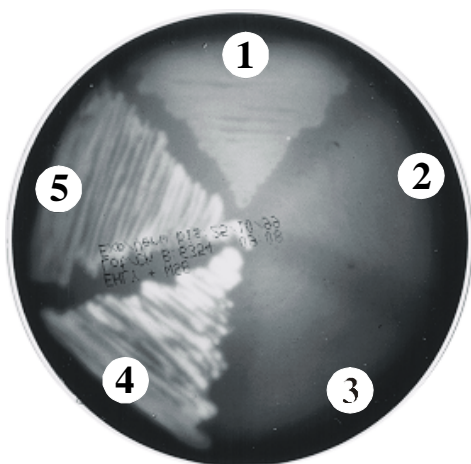


Abb. 22: Testung der beiden *vgc*-komplementierten *L. innocua* Stämme auf ihre hämolytische Aktivität im Vergleich zu den Wildtyp Stämmen von *Listeria monocytogenes* und *L. innocua* (S. Otten).

- 1: *L. monocytogenes* EGD-e**
- 2: *L. innocua***
- 3: *L. innocua*(pUvBBAC)**
- 4: *L. innocua*(pUvBBAC+*vgc1*)**
- 5: *L. innocua*(pUvBBAC+*vgc2*)**

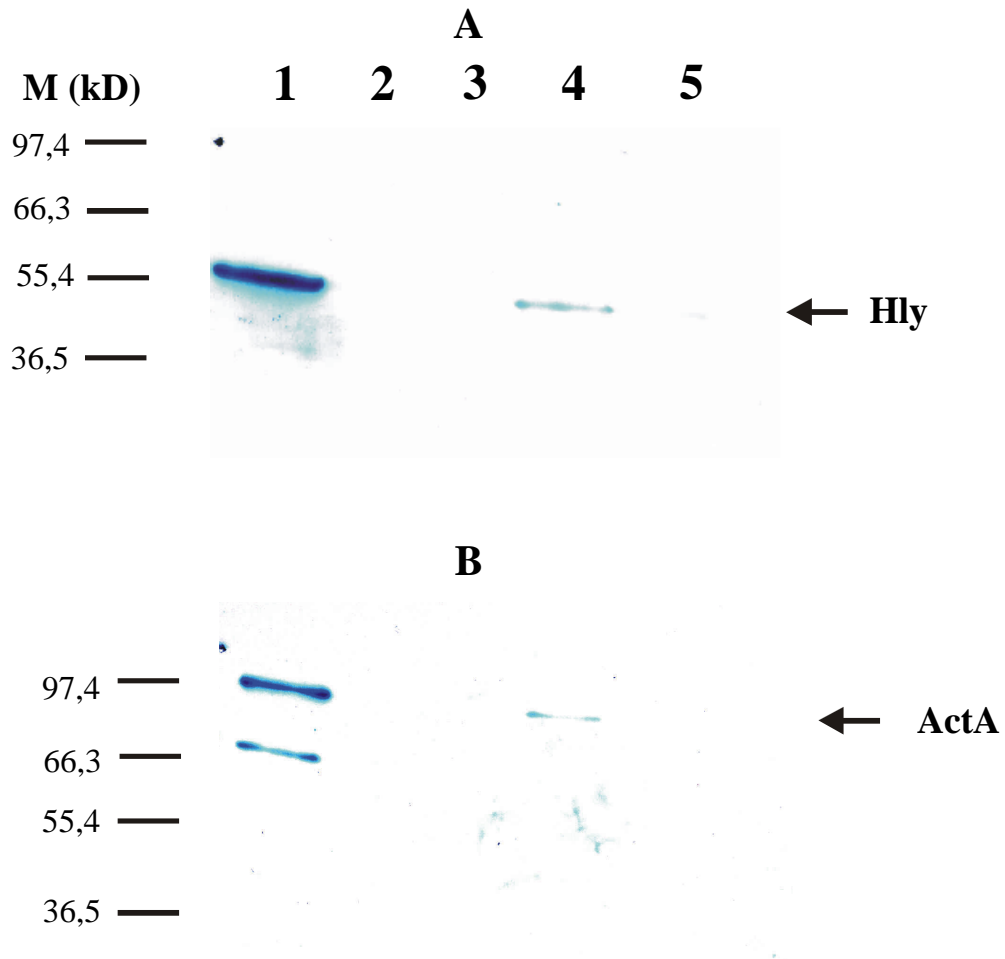


Abb. 23: Immunoblot mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen Hly (LLO) und ActA.

A: α-Hly, Kulturüberstand; B: α-ActA, Zellwandextrakte. Die etwas schwächeren Banden der Rekombinante *L. innocua*(pUvBBAC+vgc2) sind auf diesen Bildern leider kaum erkennbar, im Original jedoch vorhanden.

1: *L. monocytogenes* EGD-e, 2: *L. innocua*, 3: *L. innocua*(pUvBBAC), 4: *L. innocua*(pUvBBAC+vgc1), 5: *L. innocua*(pUvBBAC+vgc2).

3.2.4.4 Nachweis der Expression zweier Genprodukte der vgc-Komplementanten im Immuno-Blot

Die Expression von Listeriolysin O und ActA, zweier wesentlicher Faktoren für das Überleben und die Motilität von *L. monocytogenes* in infizierten Zellen, wurde daraufhin im Immuno-Blot untersucht. Dabei fanden die monoklonalen Antikörper M275 (für α -Hly) und je zur Hälfte N81 und N111 (für α -ActA) Anwendung, wobei M275 1:5 in TBS-Tween verdünnt und N81 bzw. N111 unverdünnt eingesetzt wurden. Hly (58 KD) konnte im Kulturüberstand, sowie in deutlich geringerer Masse auch in den Zellwandextrakten, beider vgc-komplementierten *L. innocua* Stämme nachgewiesen werden. In gleicher Weise wurde ActA (90 KD), entsprechend seiner bekannt Zellwand-ständigen Lokalisation in *L. monocytogenes* EGD-e, in den Zellwandextrakten beider Stämme detektiert. Der *L. innocua* Wildtyp Stamm mit oder ohne pUvBBAC wies, wie erwartet, keine Expression dieser beiden Virulenzfaktoren auf. Die Ergebnisse dieser Blots zeigt Abb. 23.

3.2.4.5 Wachstumseigenschaften der neuen Konstrukte im Vergleich zum Wildtyp

Um einen eventuellen Einfluß der neuen Konstrukte auf die Wachstumseigenschaften der sie tragenden Stämme zu untersuchen, wurden deren Wachstumskurven mit denen des Wildtyps von *L. monocytogenes* EGD-e und *L. innocua* verglichen. Eine Übernachtskultur eines jeden Klones wurde auf 20 ml Flüssigmedium mit Antibiotikumzusatz mit einer OD_{600} von 0,1 verdünnt und die Messreihe gestartet. Im einzelnen wurden die folgenden sechs Klone in diese Untersuchung aufgenommen:

1: *L. monocytogenes* EGD-e

2: *L. innocua*

3: *L. monocytogenes* EGD-e(pUvBBAC)

4: *L. innocua*(pUvBBAC)

5: *L. innocua*(pUvBBAC+ vgc1)

6: *L. innocua*(pUvBBAC+vgc2)

Die Wachstumsbedingungen:

BHI bzw. BHI + 5 Em, 20 ml Flüssigkultur in 100 ml Reaktionsgefäßen:

37 °C, 184 rpm

Wachstumskurve

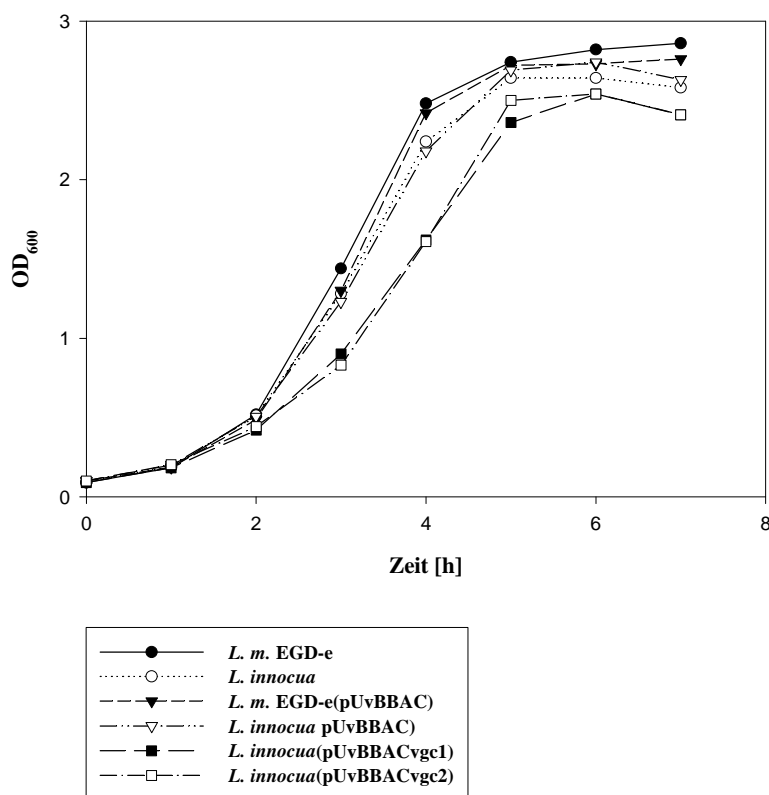


Abb. 24: Die hier dargestellte Wachstumskurve verdeutlicht das verzögerte Wachstum der beiden vgc Komplementanten im Vergleich zu den Wildtypstämmen.

3 Ergebnisse

Vor Verdünnung der Übernachtskulturen fiel auf, dass alle Klone relativ gleich dicht gewachsen waren (OD_{600} von 2,6 im Durchschnitt); nur die beiden das pUvBBAC+vgc1- bzw. das pUvBBAC+vgc2-Konstrukt tragenden Klone waren deutlich dünner gewachsen (OD_{600} von 1,8 bzw. 1,9). Im Vergleich der Messungen zeigte sich eine deutlich verzögert einsetzende und langsamere Log-Phase dieser vgc-Konstrukte; auch wurde ein niedrigeres Plateau erreicht als bei den Kontrollklonen. Das genaue Ergebnis dieser Messung zeigt Abb. 24.

3.2.4.6 BAC-Endsequenzierung der vgc-Konstrukte und Abgleich der Sequenzen mit der *Listeria*-Datenbank

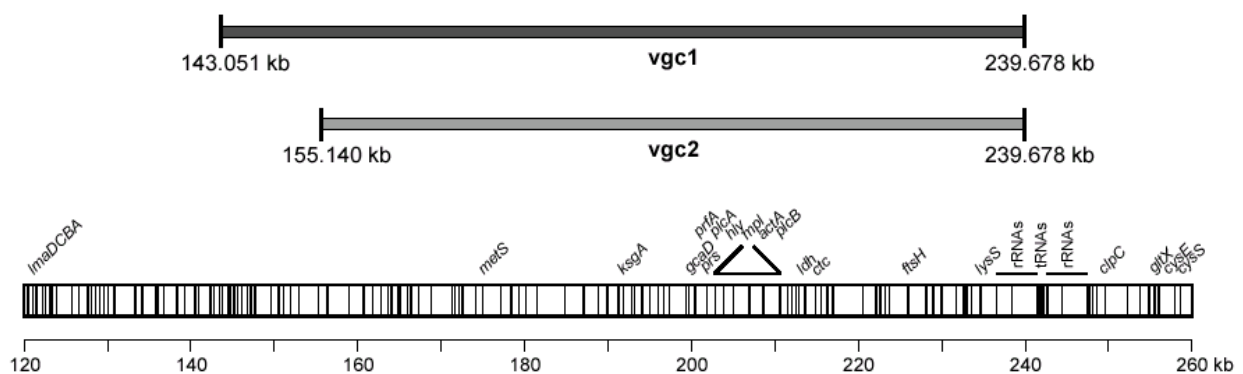


Abb. 25: Schematische Darstellung der genauen Position der chromosomalen Inserts vgc1 und vgc2 innerhalb des Genoms von *L. monocytogenes* EGD-e. Alle innerhalb dieser Region bekannten Open Reading Frames (ORFs) sind als Balken dargestellt. Die Abbildung verdeutlicht, dass vgc1 über ein ca. 12 kb größeres Insert verfügt.

Schließlich war es möglich, nach Isolierung und Aufreinigung, die BAC-Konstrukte vgc1 und vgc2 mit Hilfe der in pUvBBAC bindenden universellen Primer T7 und SP6 mehrfach anzusequenzieren. Die gewonnenen Sequenzen wurden abschließend mit den Daten der *Listeria*-Datenbank verglichen, wobei die genaue Position und Länge der beiden klonierten Fragmente ermittelt werden konnte. Das vgc1-Fragment umfasst entsprechend dieser Daten den Bereich von Position 143.051 bis 239.678 (in kb) innerhalb der *Listeria*-Datenbank, während das vgc2 Konstrukt dem Bereich von Position 155.140 bis 239.678 (in kb) zugeordnet werden konnte. Die Differenz zwischen diesen beiden inserierten Bereichen umfasste also einen Bereich von ca. 12 kb. Abb. 25 zeigt diese Ergebnisse in einem

Überblick. Gemäß dieser Daten beinhalten beide Fragmente das komplette Virulenzgenkluster sowie dessen weitläufig flankierende Bereiche. Somit konnte die erfolgreiche Komplementation des *L. innocua* Wildtypstammes mit dem Virulenzgenkluster von *L. monocytogenes* EGD-e sowie ein gelungener Virulenztransfer vom Pathogen zum Apathogen *in vitro* bestätigt werden.

Für eine weitere Charakterisierung dieses 12 kb-Fragments wurde ein zusätzlicher Sequenzabgleich mit der NCBI-Datenbank mittels BLAST-Suche durchgeführt (Tab. 2). Darüber hinaus konnte innerhalb der Genomsequenz von *L. innocua* CLIP11262 für den Bereich von Position 148.359 bis 152.609 (entsprechend der *L. monocytogenes* EGD-e Sequenz) eine mit 90 % deutliche Homologie über diesen gesamten ca. 4,2 kb umfassenden DNA-Abschnitt nachgewiesen werden. Wie aus Tab. 2 hervorgeht, finden sich damit die beschriebenen Zink-Transporter auch im *L. innocua* Genom.

	Position in der <i>L. monocytogenes</i> EGD-e Genomsequenz	Strang	Gen-Bezeichnung	Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen in der NCBI-Datenbank
Gesamte 12kb Sequenz	143.051 - 155.140	+/-	lmo0141 - lmo0156	keine Homologien für lmo0141 - lmo0151, 0156
1	148.354 – 150.009	-	lmo0152	Oligopeptid-ABC-Transporter Bindungsprotein
2	150.232 – 151.173	+	lmo0153	Hoch-affiner Zink-ABC-Transporter (ZnII-bindendes Lipoprotein)
3	151.186 – 151.890	+	lmo0154	Hoch-affiner Zink-ABC-Transporter (ATP-Bindungsprotein)
4	151.839 – 152.645	+	Lmo0155	Hoch-affiner Zink-ABC-Transporter (Membranprotein)

Tab. 2: Abgleich der 12 kb-Sequenz mit der NCBI-Datenbank. Ergebnisse der BLAST-Suche

4 Diskussion

4.1 *Listeria monocytogenes* EGD-e verfügt über ein einzelnes Ringchromosom mit einer Molekülgröße von 3000 ± 50 kb

Vorausgehende Arbeiten haben bereits die besondere Bedeutung der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) als wichtiges Werkzeug im Rahmen genomischer Charakterisierungen und Unterteilung von *Listeria monocytogenes* aufgezeigt (Brosch *et al.*, 1994; Carriere *et al.*, 1991; He & Luchansky, 1997; Howard *et al.*, 1992; Michel & Cossart, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurden die Techniken der PFGE mit denen der molekularen Genetik in Form einer neuen Strategie kombiniert. So wurde die genomische DNA von *L. monocytogenes* EGD-e zunächst mit den selten schneidenden Restriktionsendonukleasen *NotI* und *AscI* verdaut und mit Hilfe des PFGE-Systems aufgetrennt. Die Verwendung dreier verschiedener Auflösungsfenster für den Gellauf ermöglichte eine besonders exakte Bestimmung der einzelnen Fragmentgrößen (Kap. 3.1.1). Daraufhin wurden alle die chromosomalen *NotI* Schnittstellen flankierenden Bereiche des Genoms kloniert und sequenziert (Kap. 3.1.2.1 und 3.1.2.2). Auf der Grundlage dieser Informationen wurden *NotI*-flankierende Sonden hergestellt, die schließlich im Rahmen einer DNA Hybridisierungsanalyse die relative Anordnung der acht *NotI* Fragmente auf dem *Listeria* Chromosom ermöglichten. Das Auftreten von vier der *NotI*-flankierenden Sequenzen innerhalb von Strukturgenen konnte aufgezeigt werden, nachdem die entsprechenden translatierten Sequenzen Homologien zu Proteinsequenzen innerhalb der NCBI Datenbank aufwiesen. Es ist anzunehmen, dass sich die noch verbleibenden vier Schnittstellen in intergenen Regionen bzw. in noch nicht näher differenzierten ORFs befinden. Aus den so gewonnenen Daten wurde deutlich, dass *L. monocytogenes* EGD-e ein einzelnes Ringchromosom mit einer Molekülgröße von 3000 ± 50 kb besitzt und damit ein etwas kleineres Genom aufweist als dies aus den bislang bekannten Genomkarten der Stämme LO28 Serotyp 1/2c (3150 kb) (Michel & Cossart, 1992) und Scott A Serotyp 4b (3235 kb) (He & Luchansky, 1997) hervorging. Darüber hinaus konnte das Vorhandensein eines Plasmids vor dem Hintergrund der Daten dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

Das Genom des hier analysierten Stammes *L. monocytogenes* EGD-e Serotyp 1/2a wurde nach Abschluss der vorliegenden Arbeit von einem europäischen Konsortium mit Beteiligung unserer Arbeitsgruppe sequenziert und die in dieser Arbeit ermittelte Genomgröße von ca. 3000 ± 50 kb konnte mit genau 2.944.528 bp bestätigt werden (Glaser *et al.*, 2001). Die nun

vorliegenden vollständigen Genomsequenzen von *L. monocytogenes* EGD-e Serotyp 1/2a und *L. innocua* CLIP 11262 (Serotyp 6a) (3.011.209 bp), sowie die Daten des fast komplett sequenzierten Genoms eines Vertreters des Serotyps 4b von *L. monocytogenes* (www.tigr.org), wurden zu weiteren Vergleichsanalysen herangezogen. So enthält das Genom von *L. innocua* CLIP 11262 (Serotyp 6a) im Unterschied zu EGD-e ein 81.905 bp umfassendes Plasmid. Darüber hinaus spiegeln die unter 3.1.2.2 beschriebenen deutlichen Homologien innerhalb des *L. monocytogenes* Serotyp 4b Genoms zu sechs von acht der in dieser Arbeit sequenzierten *NotI*-Sequenzen eine engere Verwandtschaft zu EGD-e wider als dies für den *L. innocua* Stamm gelten kann. Alle im *L. monocytogenes* Serotyp 4b Genom aufzufindenden homologen Sequenzen zeigten eine signifikant hohe Übereinstimmung von bis zu 96 % über die gesamte Länge der jeweiligen EGD-e *NotI* Sequenzen. Zudem waren die spezifischen *NotI* Schnittstellen in dreien dieser Sequenzen ebenfalls enthalten. Demgegenüber waren die Homologien innerhalb des *L. innocua* Genoms mit 82–92 % deutlich geringer ausgeprägt und zudem in einem Großteil der Fälle nur für einen Teil der Sequenzlängen nachweisbar. Schließlich war auch nur eine einzige spezifische *NotI* Schnittstelle innerhalb eines deutlich homologen Genabschnitts aufzufinden. Vor dem Hintergrund dieser Daten wird die engere verwandtschaftliche Beziehung zwischen den beiden Vertretern der pathogenen Spezies *L. monocytogenes* (Serotyp 1/2a und Serotyp 4b) im Vergleich zum Vertreter der apathogenen Spezies *L. innocua* unterstrichen. Ziel dieser Arbeit war es nicht nur, alle bislang bekannten virulenzassoziierten Sequenzen auf dem Chromosom von *L. monocytogenes* EGD-e zu lokalisieren; vielmehr sollten zusätzlich deren relative Positionen zueinander sowie die Abstände zwischen diesen Gen-Loci genauer bestimmt werden.

4.2 Die listeriellen Virulenzgene sind über das gesamte Chromosom verteilt, mit einer wesentlichen Ausnahme: dem *prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB*-Kluster

Um das oben skizzierte Ziel zu erreichen, wurden Deletionsmutanten von *L. monocytogenes* EGD-e verwendet, bei denen künstliche *NotI* Schnittstellen in Gene eingebracht worden waren, die sich entweder innerhalb eines Genklusters oder als individuelle Gene auf dem Chromosom befanden. Auf diese Weise erhielt man isogene Mutanten von *L. monocytogenes* EGD-e, die neue *NotI* Schnittstellen auf dem Chromosom enthalten (Kap. 3.1.3). Um ferner die relativen Positionen der einzelnen Gen-Loci und deren entsprechende Abstände bestimmen zu können, wurden zusätzlich Doppeldeletionsmutanten hergestellt, wodurch isogene Stämme mit zwei zusätzlichen *NotI* Schnittstellen auf dem *Listeria* Chromosom entstanden. Die aus dem Restriktionsverdau dieser Mutanten und anschließenden PFGE-

4 Diskussion

Auftrennung der Fragmente erhaltenen Daten wurden durch eine weitere Trippelmutante mit drei künstlich eingebrachten *NotI* Schnittstellen sowie durch DNA-Hybridisierung der Fragmente mit den entsprechenden *NotI*-flankierenden Sonden zusätzlich bestätigt (Kap. 3.1.3.2). Diese Untersuchungen machten deutlich, dass die Virulenzgene bzw. virulenzassoziierten Gene von *Listeria monocytogenes* EGD-e über das ganze Genom verteilt vorliegen, wobei nur das Virulenzgenkluster (vgc) eine wesentliche Ausnahme darstellt. Die in dieser Arbeit angewandte Strategie ermöglichte es, das *prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB*-Kluster, sowie die *inlAB* und *inlFDE* Gene auf dem 1100 kb *NotA* Fragment von *L. monocytogenes* EGD-e zu lokalisieren. Diese Gen-Loci liegen auf einer 240 kb umfassenden Region auf dem Chromosom und weisen dabei die Reihenfolge *inlAB/inlFDE/ prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB* mit intergenen Abständen von 180 kb und 60 kb auf (Abb.). Demgegenüber konnten die *irpA*- und die *flaR*- Sequenz auf dem 850 kb *NotB* Fragment kartiert werden, wobei diese Gen-Loci durch 400 kb von einander getrennt sind. Interessant ist vor dem Hintergrund dieser Daten der Gedanke, dass es sich bei der 240 kb umfassenden *inlAB/inlFDE/ prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB* Region um eine gigantische Pathogenitätsinsel handeln könnte, zumal die Funktion vieler in den intergenen Bereichen von 180 kb und 60 kb lokalisierten Gene noch nicht abschließend determiniert werden konnte. Einige dieser Gen-Loci könnten durchaus in spezifischer Art und Weise im Rahmen der Virulenz eine noch unbekannt Rolle spielen. Auch wenn die meisten beschriebenen Pathogenitätsinseln von deutlich kleinerem Umfang sind, so wurde doch erst kürzlich eine ca. 150 kb große entsprechende genetische Einheit bei einem Vancomycin resistenten Stamm von *Enterococcus faecalis* beschrieben (Shankar *et al.*, 2002). Weitere Untersuchungen dieses speziellen Genomanschnitts in Bezug auf typische Eigenschaften von Pathogenitätsinseln im allgemeinen, wie z. B. eine Assoziation zu tRNA-codierenden Genen, ein vom übrigen Genom abweichender GC-Gehalt oder auch das Vorhandensein vieler funktioneller, verkürzter und noch nicht näher charakterisierter open reading frames (ORFs), könnten diese Fragen beantworten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es in dieser Arbeit gelungen ist, alle bislang bekannten Virulenzgene auf dem 3000 ± 50 kb großen Chromosom von *L. monocytogenes* EGD-e ihrer jeweiligen Position entsprechend genau zu kartieren. Trotz der relativ guten Übereinstimmungen der in dieser Arbeit entwickelten Karte mit den Daten des Stammes LO28 in Bezug auf die physikalische Organisation der *NotI* Schnittstellen sowie der ermittelten Genomgröße, legt ein genauerer Vergleich aller drei Genomkarten doch einige Differenzen offen. So lassen die Karten von LO28 und Scott A deutliche Unterschiede bezüglich der Anzahl und Orientierung der Makrorestriktionsfragmente erkennen. Von noch größerer Bedeutung erscheinen die Differenzen in Bezug auf die Positionen von

virulenzassoziierten Genen auf diesen genetischen Karten. So wurde das *prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB*-Kluster in den Karten von EGD-e und LO28 auf dem 1100 kb NotA Fragment lokalisiert, während es sich bei Scott A auf dem 890 kb NotB Fragment befindet. Die hier aufgezeigten Daten lassen die Vermutung zu, dass die genetische Struktur von *Listeria monocytogenes* Stämmen des Serotyps 1, wie zum Beispiel LO28 und EGD-e, sehr ähnlich ist und sich von der Struktur der Stämme, die dem Serotyp 4 angehören, wie zum Beispiel Scott A, deutlich unterscheiden. Dies wurde bereits durch verschiedene anderweitige Untersuchungen, wie Multilokus Enzymanalysen (Piffaretti *et al.*, 1989), DNA Hybridisierungsanalysen auf der Basis des *hly* Gens (Rasmussen *et al.*, 1995) oder auch im Rahmen von Oberflächenprotein-Analysen (Tabouret *et al.*, 1992) deutlich.

4.3 PFGE – ein potentes Werkzeug zur Erstellung physikalischer und genetischer Karten im Rahmen von Genomanalysen und molekularer Epidemiologie

Epidemiologische Untersuchungen dienen dazu, die Ausbreitung von Krankheitserregern zu verfolgen, Infektionsquellen aufzuspüren und Erregerübertragungen von einem Individuum auf ein anderes festzustellen. Für eine effektive Seuchenbekämpfung ist daher der Einsatz epidemiologischer Methoden unabdingbar. Typisierungssysteme basieren auf der Prämisse, dass klonal verwandte Isolate die selben Charakteristika teilen, wodurch sie wiederum von nicht verwandten Isolaten differenziert werden können. Hierbei unterscheidet man prinzipiell zwei verschiedene Klassen der Typisierung basierend auf phänotypischen, d.h. Detektion von Charakteristika, die durch den Mikroorganismus exprimiert werden, und genotypischen Techniken (Analysen chromosomaler und extrachromosomaler genetischer Elemente). Die ursprünglichen phänotypischen Methoden der klassischen Mikrobiologie wie Antibiotikaresistenztestung, Biotypisierung oder Serotypisierung, wurden durch zusätzliche Methoden der Proteinanalytik ergänzt. Hierzu zählen zum Beispiel die Multilokus Enzymelektrophorese (MLEE), die Analyse zellulärer Proteine, besonders von Membranproteinen, sowie auch das *immunoblot fingerprinting*. Doch erst der Einsatz von genotypischen Methoden schuf die Möglichkeit, individuelle Klone zu beschreiben und ihre Verbreitung zu analysieren (Primrose, 1996). Neben dem *plasmid fingerprinting*, einer Methode, die auf der Analyse extrachromosomaler DNA fußt, und den sogenannten Restriktionsfragment Längenpolymorphismen (RFLP) hat sich die Pulsfeld Gelelektrophorese (PFGE) als Goldstandard molekularer Epidemiologie etabliert (Hacker & Heesemann, 1997). Auf der Grundlage der spezifischen Bandenmuster der jeweils untersuchten Erreger lassen sich eindeutige Aussagen über Verwandtschaftsbeziehungen zu anderen Stämmen sowie evolutionäre Zusammenhänge aufzeigen. Entsprechende Untersuchungen sind innerhalb der

4 Diskussion

Listeria Spezies bereits ausführlich beschrieben (Brosch *et al.*, 1996; Brosch *et al.*, 1991; Buchrieser *et al.*, 1991) Auch ein genaues Aufspüren von Infektionsquellen und das Nachzeichnen der entsprechenden Infektionswege ist mit Hilfe dieser Methode effektiv möglich, indem die Bandenmuster verschiedener Isolate aus unterschiedlichen Quellen miteinander verglichen werden (Buchrieser *et al.*, 1993).

Um evolutionäre Entwicklungen besser verstehen zu können, müssen vergleichende Analysen eher von Genomen als nur von individuellen Genen durchgeführt werden. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, ist eine orientierende Kartierung mittels PFGE besonders im Rahmen genauer Genomanalysen äußerst hilfreich. So können zum Beispiel Fehler in der Fragmentanordnung, wie sie bei *shotgun*-Klonierungen und nachfolgender Sequenzierung auftreten, durch eine solche mittels PFGE entwickelte Übersichtskarte korrigiert werden. Repetitive Sequenzen (zum Beispiel für rRNA codierende Bereiche) innerhalb des Genoms können im Rahmen solcher Sequenzierungsprojekte zu Verwechslungen bei der orientierenden Anordnung der einzelnen sequenzierten Fragmente führen. Auf eben diese Art und Weise unterstützte die hier vorgestellte physikalische und genetische Karte von *Listeria monocytogenes* EGD-e die Fragmentanordnung im Rahmen des im Anschluss an diese Arbeit begonnenen europäischen *Listeria*-Sequenzierungsprojekts. Schließlich schaffen Genomkarten, wie sie sich aus einer PFGE-Analyse ergeben, eine optimale Voraussetzung, um große, funktionelle Genabschnitte gezielt zu klonieren. Diese Möglichkeit wurde im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit genutzt und wird an entsprechender Stelle eingehender diskutiert werden.

In diesem Zusammenhang soll noch etwas detaillierter auf die in dieser Arbeit angewandte Methodik zur exakten Größenbestimmung der Makrorestriktionsfragmente sowie auf die Strategie zu deren anschließender Anordnung zu einer vollständigen Genomkarte eingegangen werden. So ist die Feststellung, dass die Analyse der erwähnten isogenen *NotI* Doppel- und Trippelmutanten eine genauere Größenbestimmung der beiden großen Makrorestriktionsfragmente NotA and NotB ermöglichte, ein weiteres Ergebnis dieser Arbeit. Das Problem, dass sehr große DNA-Fragmente in der PFGE relativ schwierig, und daher auch ungenauer, aufgetrennt und mit Hilfe weniger Markerbanden entsprechender Größe bestimmt werden können, ließ sich durch die Aufteilung in mehrere kleinere, und daher besser charakterisierbare, Fragmente lösen. Fragmente dieser geringeren Größe trennen sich in einem Gellauf zum einen leichter auf, andererseits hat man in der Regel zudem eine höhere Anzahl verschieden großer Markerbanden, um den exakten Größenbereich gut abgrenzen zu können. Die rechnerisch bestimmte Gesamtgröße dieser Einzelfragmente entsprach daher exakter den

tatsächlichen Fragmentgrößen des NotA bzw. NotB Fragments.

Wie schon in Kap. 1.6 aufgezeigt, stehen verschiedene Methoden zu Verfügung, um die einzelnen, ungeordneten DNA-Fragmente zu einer zusammenhängenden Karte zusammenzufügen. Das *chromosome walking*, DNA-Fingerprintinganalysen mit Restriktionsendonukleasen, Hybridisierungen oder auch die Möglichkeit von Partialverdau der genomischen DNA stellen mehrere Alternativen zum Erreichen dieses Ziels dar (Primrose, 1996). Die in dieser Arbeit erstmalig angewandte Strategie einer Kombination aus PFGE und molekularer Genetik (Abb. 6) hat sich als eine elegante, weitere Methode erwiesen. Nach Isolierung und Verdau genomischer DNA von *L. monocytogenes* EGD-e mit den beiden Restriktionsendonukleasen *Sau3AI* (*gatc*) und *Tsp509I* (*aatt*) wurden die 500 bp bis 2 kb großen DNA-Fragmente religiert (Kap. 3.1.2.1). Ein anschließender Verdau mit *NotI* linearisierte alle zirkulären DNA Moleküle, die über eine entsprechende *NotI* Schnittstelle verfügten. Nach Klonierung und Sequenzierung dieser *NotI*-flankierenden Bereiche war die Anordnung der acht Makrorestriktionsfragmente aus dem *NotI* Verdau der genomischen *L. monocytogenes* DNA mittels generierter Sonden zur DNA Hybridisierung elegant, schnell und eindeutig möglich (Kap. 3.1.2.4). Problematisch war bei dieser Methode lediglich die äußerst sorgfältige Handhabung bei der Isolierung der chromosomalen DNA, die bei jedem Präparationsschritt der Gefahr des *shearing* unterliegt. Auch die zur Präparation eingesetzte Menge an DNA musste in einigen Vorexperimenten ermittelt werden. Zusammenfassend kann diese hier vorgestellte Methode zur Erstellung chromosomaler Karten als effektive Alternative zu den bislang in der Literatur beschriebenen Verfahren empfohlen werden.

4.4 BAC-Vektoren – eine wesentliche Bereicherung für Genomsequenzierungsprojekte sowie für das Feld der funktionellen Genomik

Zur vollständigen Genomanalyse zählt neben der physikalischen Kartierung notwendigerweise die komplette Sequenzierung des Genoms. Hierfür ist nach der Fragmentierung des Genoms die Vervielfältigung der Fragmente unerlässlich. Ein entsprechendes Vektorsystem ist also gefragt, das es ermöglicht, große DNA-Fragmente stabil aufzunehmen, problemlos zu vervielfältigen und über lange Zeiträume zu lagern. Die ersten Genbibliotheken wurden mit Hilfe von λ -Vektoren hergestellt, wobei die Größe der klonierten DNA-Fragmente etwa 25 kb nicht überstieg. Als ein weiteres Vektorsystem folgten dann Cosmidvektoren, die mit Insertionen von 35 – 45 kb über eine durchweg höhere Kapazität als ihre Vorgänger verfügten. Allerdings lassen sich Bakteriophagen-Banken im Vergleich zu Bibliotheken von Bakterien mit Cosmidrekombinanten deutlich länger lagern und auch ein *screening* der λ -Bibliotheken erscheint vielen Anwendern als günstiger (Primrose, 1996). Auf der weiteren

4 Diskussion

Suche nach Vektorsystemen, die deutlich größere Insertionen erlauben, wurde das YAC-System (*yeast artificial chromosome*) entwickelt, mit dessen Hilfe Fragmente, die mindestens zehnmal größer als in Bibliotheken aus λ - oder Cosmidvektoren waren, kloniert werden konnten (Burke *et al.*, 1987). Anand *et al.* (1990) gelang es, die Größe der Insertionen auf 350 kb zu erhöhen und diese Entwicklung setzte sich mit den Arbeiten von Bellanné-Chantelot *et al.* (1992) fort, die eine humane Bibliothek mit einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 810 kb konstruierten. Allerdings ergeben sich bei der Verwendung von YACs eine Vielzahl von Schwierigkeiten (Kouprina *et al.*, 1994; Monaco & Larin, 1994), von denen der große Anteil chimärer DNA-Sequenzen eines der Hauptprobleme darstellt. Diese Sequenzen verschiedenen regionalen Ursprungs innerhalb des Genoms können bei schätzungsweise bis zu 60 Prozent der Klone in YAC-Bibliotheken nachgewiesen werden. Viele YACs neigen zudem zu Deletionen innerhalb ihrer Insertionen und entsprechen daher nicht den Ansprüchen an ein stabiles, und damit repräsentatives, Vektorsystem. Ein weiteres großes Problem stellt die Trennung der YACs von dem 15 Mb großen Wirtsgenom dar, die entweder durch PFGE-Aufreinigung oder durch Subklonierung des gesamten Hefegenoms in Bakteriophagen- oder Cosmidvektoren und anschließende Identifizierung der YAC-Insertionen erreicht werden muss. Die Gruppe der Fosmid-Vektoren basiert demgegenüber auf dem F Faktor *replicon* aus *E. coli* und zeichnet sich durch eine hohe Stabilität der bis zu 40 kb großen klonierten Fragmente aus (Birren *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1992). Neben der Entwicklung sogenannter PACs, einem Vektorsystem, das auf der Grundlage des temperenten Phagen P1 entwickelt wurde (Coren & Sternberg, 2001; Ioannou *et al.*, 1994; Sternberg, 1990) und Insertionen von 100–300 kb aufnehmen kann, hat sich ein weiteres, bakterielles Klonierungssystem als eine neue Alternative zunehmend bewährt: Das BAC-System (*bacterial artificial chromosome*) basiert auf dem single-copy-Sex-Faktor von *E. coli* und wurde mit dem Ziel entwickelt, große (≤ 300 kb) DNA-Fragmente zu klonieren und eine gute Stabilität innerhalb des neuen Konstrukts im *E. coli*-Wirt zu gewährleisten (Shizuya *et al.*, 1992). Ihre besondere Stabilität und leichte Manipulation in weiteren experimentellen Schritten macht diese Vektoren für die Konstruktion von Genbanken verschiedener komplexer Genome interessant. Shizuya (1992) und Woo (1994) konnten zeigen, dass BACs genomische humane und pflanzliche Fragmente in einer Größenordnung von mehr als 300 kb vermehren können, wobei sie einen sehr hohen Grad an Stabilität über mehr als 100 Generationen aufweisen. BAC-basierende Genbanken wurden bereits von zahlreichen Viren (Adler *et al.*, 2001; McGregor & Schleiss, 2001; Messerle *et al.*, 1997; Monaco & Larin, 1994), Pilzen (Hamer *et al.*, 2001; Randall & Judelson, 1999), Pflanzen (Budiman *et al.*, 2000; Gentzbittel *et al.*, 2002; Mozo *et al.*, 1999) und tierischen Spezies (Cai *et al.*, 1995; Osoegawa *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2000; Zimmer *et al.*, 1997) konstruiert und haben sich im Rahmen vieler großer Sequenzierungsprojekte etabliert. Auf dem Gebiet der bakteriellen Genomanalysen ist dieses System bislang nur

vereinzelt zum Einsatz gekommen, obwohl sich aus der Generierung von Genbanken, die große Fragmente genomischer DNA enthalten, vielversprechende Möglichkeiten zur raschen und übersichtlicheren Genomsequenzierung von bakteriellen Krankheitserregern ergeben. So fand der *E. coli* BAC-Vektor pBeloBAC11 bei der Konstruktion von Genbanken der Genome von *Mycobacterium tuberculosis* und *Treponema pallidum* Verwendung (Brosch *et al.*, 1998; Smajs *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit wurden drei BAC-Genbanken des Genoms von *Listeria monocytogenes* EGD-e konstruiert, wobei den beiden ersten der Vektor pBeloBAC11 (Shizuya *et al.*, 1992) zu Grunde gelegt wurde (Kap. 3.2.1.2). Die BACIII-Bank wurde mit dem in dieser Arbeit neu entwickelten BAC-Vektor pUvBBAC erstellt (Kap. 3.2.3). Die beiden ersten BAC-Genbanken umfassen Insertionen von bis zu 100 kb, wobei einzelne Rekombinanten sogar Inserts mit Größen von bis zu 150 kb aufwiesen. Aus BAC-Endsequenzierung dieser *L. monocytogenes* EGD-e Genbanken ließ sich abschätzen, dass eine Anzahl von ca. 150 Klonen eine minimale Abdeckung des gesamten ca. 3 Mb großen Genoms gewährleisten sollte. Die BACI-Bank fand unter anderem im Rahmen des europäischen *Listeria* Genomprojekts Verwendung.

Die technische Durchführung der Klonierung von großen, funktionellen DNA Abschnitten in das BAC-System konfrontiert den Untersucher mit einigen Schwierigkeiten. Große (100 kb), linearisierte DNA Moleküle sind zwangsläufig permanent physikalischen Scherkräften ausgesetzt, die in dieser Arbeit dadurch minimiert werden konnten, dass die verdaute genomische DNA so lange wie möglich in Agarose präpariert wurde. Aber spätestens ab dem Schritt des Gelase-Verdaus lassen sich diese Kräfte nur durch sorgfältigstes Pipettieren verringern. In diesem Zusammenhang sei nochmals erwähnt, dass die Behandlung der aus dem Pulsfeld-Gel exzidierten Agarosestückchen (Kap. 2.2.7.3) mit TNE-Puffer ebenfalls der Stabilisierung der großen zu klonierenden DNA-Fragmente während der folgenden Schritte dient, da NaCl die DNA durch Förderung einer molekularen Kondensation schützt (Fang & Hoh, 1998; Lewis *et al.*, 2000). Darüberhinaus hat NaCl auf die DNA während des Gelase Verdaus eine zusätzlich schützende Wirkung, da es die Schmelztemperatur der DNA erhöht (Gnirke *et al.*, 1993). Aus diesem Grunde sollte 50-100 mM NaCl, dessen Anwesenheit mit allen Schritten der BAC-Klonierung kompatibel ist, in allen Lösungen vorhanden sein. Dies sollte vom Zeitpunkt der Exzision der zu klonierenden großen DNA-Fragmente aus dem letzten präparativen Agarosegel bis zum Einsatz der Proben zur abschließenden Elektroporation der Fall sein.

Die Elektroporation hat sich im Verlauf dieser Arbeit erstmalig als effektive Methode zur Transformation des *E. coli*-Wirtsstammes DH10 β mit rekombinanten BACs erwiesen. Auch

4 Diskussion

wenn die Literatur empfiehlt, den Ligationsansatz vor dem Einsatz zur Elektroporation zu fällen bzw. zu dialysieren (Sambrook *et al.*, 1978), ist es in dieser Arbeit problemlos möglich gewesen, die notwendige Menge an Ligationsansatz direkt zur Transformation von DH10 β mittels Elektroporation einzusetzen (Kap. 3.2.1.2). Hiermit konnte eine weitere mechanische Manipulation der entstandenen großen BAC-Konstrukte sowie ein zusätzlicher, unnötiger Verlust an DNA Material vor der Transformation vermieden werden.

Während zur Genomsequenzierung in der Regel Bibliotheken mit relativ kleinen Fragmenten zu Anwendung kommen, wie zum Beispiel im Rahmen von *shotgun* Klonierungen (Fragmentgrößen von 1–3 kb), weist die Klonierung größerer DNA-Fragmente bei den in dieser Arbeit entwickelten BAC-Banken zwei wesentliche Vorteile auf. Da jedes dieser großen Fragmente separat und gezielt für die Sequenzierung subkloniert wird, und sich daraus eine überschaubarere Menge an Einzelsequenzen ergibt, ist die folgende Anordnung in *contigs* einfacher möglich; weiterhin bestehende Lücken innerhalb dieser *contigs* lassen sich auf der Grundlage der *primer walking* Strategie gut schließen. Darüber hinaus können die separat sequenzierten großen DNA-Fragmente am Ende übersichtlicher zu einer kompletten Genomkarte zusammengesetzt werden.

Das BAC-System stellt, besonders in Kombination mit der PFGE, eine hervorragende Möglichkeit für Untersuchungen der Verwandtschaftsbeziehungen verschiedener Erreger sowie zur gezielten Klonierung und Analyse größerer funktioneller Genabschnitte im Sinne der funktionellen Genomik dar. Auch Experimente, die sich die Option eines Virulenz-Transfers zu Nutze machen, profitieren von diesem Klonierungssystem. Um diese Möglichkeiten jedoch optimal ausschöpfen zu können, muss das BAC-System um eine wichtige Komponente erweitert werden.

4.5 pUvBBAC – der erste BAC-Vektor für den Einsatz in Gram negativen und Gram positiven Wirten

Obwohl das BAC-System, wie beschrieben, bereits vielfältig bei der Erstellung von Genbanken verschiedenster Organismen Verwendung findet, sind die Berichte über Studien prokaryotischer Genome sehr begrenzt (Brosch *et al.*, 1998; Smajs *et al.*, 2002). Ein wichtiger Grund für diese Situation findet sich in der nachteiligen Tatsache, dass alle bislang verfügbaren BAC-Vektoren ausnahmslos nur für Gram negative Bakterien einsetzbar sind. Um jedoch die Vorteile dieses Systems für funktionelle Genomanalysen umfassend nutzen zu können, ist eine Erweiterung dieses Vektorspektrums in den Gram positiven Bereich von ganz besonderem Interesse. Nur ein Vektor, der sowohl in einem der vielen Gram negativen

Laborstämme als auch in experimentell komplementierten Gram positiven Erregern, wie zum Beispiel der *Listeria* Spezies, im Sinne eines Shuttle-BAC-Vektors exprimiert wird, erlaubt einen breiten und flexiblen Einsatz in der funktionellen Genomik.

In dieser Arbeit wurde das BAC-System erfolgreich durch die Konstruktion des Hybrid-BAC-Vektors pUvBBAC (Abb. 20) für den Einsatz in Gram positiven Wirten erweitert. Das *low copy replicon* pIP501 aus *Streptococcus agalactiae* ermöglicht den Einsatz des neuen Vektors in einer Vielzahl Gram positiver Bakterien (z.B. *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* und *Listeria*). Der Vektor pUvBBAC wurde auf der Grundlage des BAC-Vektors pBeloBAC11 und des Plasmidvektors pSOG7 (Kap. 3.2.2.1) generiert. Das neue Konstrukt enthält neben der kompletten Sequenz von pBeloBAC11 ein 4,3 kb großes DNA-Fragment aus pSOG7, das neben pIP501 noch die *repR* and *copR* Gene sowie ein Erythromycin-Resistenz-Gen (*ermC*) trägt. Zusammen mit dem *cat* Gen aus pBeloBAC11, das für eine Chloramphenicol-Transacetylase codiert, verfügt das neue Konstrukt somit über zwei potente Selektionsmarker beim Einsatz in Gram positiven und Gram negativen Wirten. Die komplette Sequenz des 11.827 bp großen Vektors pUvBBAC ist über die EMBL-Datenbank unter der Accession Number AJ509853 verfügbar.

Mit diesem Vektor eröffnen sich völlig neue Möglichkeiten auf dem Gebiet der funktionellen Genomik. So kann beispielsweise die Klonierung größerer funktioneller Genabschnitte aus dem Chromosom von *Listeria monocytogenes* EGD-e und die anschließende Analyse deren Expression in einem verwandten, jedoch apathogenen Stamm, wie *L. innocua*, wesentlich dazu beitragen, Virulenz in ihrer Entstehung besser zu untersuchen.

4.6 Das Virulenzgenkluster (*vgc*) – ein austauschbarer Genabschnitt zum Virulenztransfer zwischen pathogenen und apathogenen *Listeriae*

Sechs der Virulenzfaktoren von *L. monocytogenes*, die für das intrazelluläre Überleben dieses Keimes eine zentrale Rolle spielen (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, und *plcB*), sind auf einer, je nach Definition der genauen Grenzen, ca. 9 kb großen zusammenhängenden chromosomalen Region angeordnet (Abb. 2). Diese genetische Einheit ist als *hly*- bzw. PrfA-abhängiges Virulenzgenkluster bekannt und wird neuerdings auch als *Listeria* Pathogenitätsinsel (LIPI-1) bezeichnet (Vasquez-Boland *et al.*, 2001). Eine zentrale Stellung innerhalb dieses Gen-Locus nimmt das LLO-codierende *hly* Monocistron ein. In gleicher Orientierung transkribiert, und downstream des *hly* Locus gelegen, befindet sich das Lecithinase Operon mit *mpl*, *actA* und *plcB*. Demgegenüber ist das *plcA*-*prfA* Operon upstream des *hly* Locus lokalisiert und wird in entgegengesetzter Richtung abgelesen. Zusammengenommen stellt diese listerielle

4 Diskussion

Pathogenitätsinsel das wichtigste Element für die Virulenz und die parasitären Eigenschaften von *L. monocytogenes* dar.

In vorausgegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass ein Transfer von LLO auf andere Gram positive Bakterien, z. B. *Bacillus subtilis* oder *Bacillus anthracis*, diese Organismen zum intrazellulären Überleben und Vermehren befähigt (Bielecki *et al.*, 1990; Sirard *et al.*, 1997). Die Gruppe um Bielecki klonierte beispielsweise das *hly* Strukturgen in einen nicht-sporenbildenden Mutantenstamm von *B. subtilis* unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren Promotors. Hierbei bediente man sich des Vektors pAG58-ble-1, dessen SPAC-Kassette anschließend durch homologe Rekombination in das *Bacillus* Chromosom integriert wurde. Die Ergebnisse dieser Studien zeigten, dass allein der Transfer von LLO auf diesen normalen Bodenkeim dessen Umwandlung in einen parasitierenden Organismus bewirkte, der nun über die Fähigkeit zum intrazellulären Überleben verfügte. Um jedoch einen Transfer der speziellen Fähigkeiten von *L. monocytogenes* zur intrazellulären Beweglichkeit, wie z. B die Actin-Polymerisation, zu erreichen, müsste das gesamte Virulenzgenkluster zusammenhängend kloniert werden. Ein Transfer dieser Virulenzgen-Kassette auf eine verwandte apathogene *Listeria* Spezies könnte zudem wesentlich dazu beitragen, die besondere Bedeutung dieses Locus, isoliert von anderen, zusätzlichen Virulenzfaktoren, zu untersuchen.

Auch wenn, wie schon angedeutet, einzelne der Virulenzgene von *L. monocytogenes* bereits kloniert werden konnten (Beattie *et al.*, 1990; Lauer *et al.*, 2002), so wurde dies bislang noch nie für das komplette Virulenzgenkluster (vgc) realisiert. Mit dem BAC-System ist in dieser Arbeit erstmalig die Klonierung des *prfA-plcA-hly-mpl-actA-plcB*-Klusters inklusive dessen weitläufig flankierender Bereich auf einem zusammenhängenden chromosomalen DNA-Fragment in pUvBBAC gelungen. Im Rahmen funktioneller Genomanalysen dieses speziellen Genabschnitts von *L. monocytogenes* EGD-e war es ein wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit, durch Komplementation und Expression dieser Region in einem apathogenen Vertreter der *Listeria* Spezies, wie beispielsweise *L. innocua*, einen Virulenztransfer zu erreichen.

Der neu konstruierte Vektor pUvBBAC diente zur Erstellung einer weiteren Genbank von *L. monocytogenes* EGD-e, die anschließend in dem *E. coli* Laborstamm DH10 β exprimiert wurde. Nach Analyse der gewonnenen rekombinanten Konstrukte konnten Fragmente von bis zu 120 kb Größe determiniert werden. Unter Zuhilfenahme einer speziellen, unter 3.2.3.3 beschriebenen, PCR-screening Methode wurden die rekombinanten Konstrukte der BACIII-

Bank auf das Vorhandensein des Virulenzgenklusters (vgc) überprüft, wobei das Listeriolysin O (*hly*) als Markergen diente. Hierbei konnten zwei *hly*-positive Rekombinanten (vgc1 und vgc2) identifiziert werden, für die in anschließenden Untersuchungen die vollständige Klonierung des vgc bewiesen werden konnte (Kap. 3.2.3.4). Ein sich daran anschließender PFGE-Lauf zur Größenbestimmung der Insertionen beider Klone zeigte ein 96,6 kb großes vgc1- und ein vgc2-Konstrukt von 84,5 kb Größe. Nach Isolierung und Aufreinigung dieser beiden Konstrukte wurden sie mittels Elektroporation in einen apathogenen und Plasmidfreien *L. innocua* Serotyp 6a Stamm transferiert. Damit wurde erstmalig die Untersuchung der Funktion des Virulenzgenklusters auf die Ausprägung der Virulenz, isoliert von allen weiteren Co-Virulenzfaktoren (wie zum Beispiel den Internalinen) möglich. Hintergrund dieses Komplementationsexperiments war die Annahme, dass die Expression der Virulenzgene von *L. monocytogenes* EGD-e in *L. innocua* zu einem Transfer spezifischer virulenter Eigenschaften führen werde. Dies konnte mit den Daten der hier vorgestellten Arbeit bestätigt werden, wobei sie sich auf die entsprechenden *in vitro* Experimente beschränken und somit den Ausblick auf weiterführende *in vivo* Untersuchungen eröffnen.

Die beiden komplementierten *L. innocua* Stämme *Listeria innocua*(pUvBBAC+vgc1) und *Listeria innocua*(pUvBBAC+vgc2) zeigten auf Waschblut-Agarplatten eine deutliche, im Vergleich zum *L. monocytogenes* EGD-e Wildtyp sogar stärkere, hämolytische Aktivität (Kap. 3.2.4.3). Der reine *L. innocua* Wildtyp sowie der nur mit pUvBBAC komplementierte *L. innocua* Wildtyp zeigten im Gegensatz dazu erwartungsgemäß keine Hämolyse. Diese deutlichere hämolytische Aktivität der *L. innocua* Komplementanten im Vergleich zu EGD-e lässt sich vermutlich auf die Tatsache zurückführen, dass das *hly* Gen, wie auch das gesamte Konstrukt, in diesen Stämmen mit 5 – 10 Kopien/Zelle vorliegt, was der durchschnittlichen Kopienzahl des pIP501 regulierten Vektors pUvBBAC entspricht. Interessant ist zudem die Beobachtung, dass das größere vgc1-Konstrukt (96,6 kb) scheinbar eine stärkere Genexpression des vgc vermittelt, was im o.g. Experiment durch eine deutlichere Hämolyse im Vergleich zu dem kleineren vgc2-Konstrukt (84,5 kb) erkennbar war. Die Frage nach der Ursache für diesen positiv regulativen Einfluß des 12 kb großen DNA-Fragments auf die Expression oder Funktion der listeriellen Virulenzgene, speziell LLO, ist eventuell mit den folgenden theoretischen Überlegungen zu beleuchten.

Der dem 12 kb Fragment entsprechende Bereich auf dem Chromosom von *L. monocytogenes* EGD-e befindet sich zwischen den Positionen 143.051 und 155.140. Ein Sequenzabgleich dieser Region mit dem Genom von *L. innocua* CLIP11262 wies über einen Bereich von ca. 4,2 kb deutliche Homologien (90 %) auf. Dieser nahezu identische Bereich auf dem *L. innocua* Genom liegt zwischen Position 148.359 und 152.609 der *L. monocytogenes* EGD-e

4 Diskussion

Genomsequenz (Kap. 3.2.4.6). Genau auf diesem Abschnitt konnten mit Hilfe einer BLAST Suche in der NCBI-Datenbank die einzigen Gen-Loci des 12 kb Fragments aufgezeigt werden, die deutliche Homologien zu bereits bekannten Genen aufweisen. So fanden sich dort mehrere ABC-Transporter-Bindungsproteine, von denen die meisten eine hohe Affinität für Zink zu haben scheinen (Kap. 3.2.4.6, Tab. 2). Vor dem Hintergrund dieser Information ließe sich spekulieren, ob Zink (Zn^{2+}) einen direkten oder indirekten positiv regulatorischen Einfluß auf die untersuchte hämolytische Aktivität ausübt. Zink als Virulenz-Co-Faktor wurde bereits für bestimmte Bakterien postuliert (Sugarman *et al.*, 1982), wengleich sich der dort beschriebenen Einfluß auf eine gesteigerte Adhärenzfähigkeit der Mikroorganismen an bestimmte eukaryotische Zelllinien bezieht. Auch ein Einfluß der möglicherweise gesteigerten Menge an Zink im *L. innocua*-Wirt, aufgrund der zusätzlich auf dem *vgc1*-Konstrukt vorhandenen codierenden Sequenzen für die Zink-Transporter-Proteine, wäre in diesem Zusammenhang denkbar.

Als weiterer Erklärungsansatz könnte auch ein Eingriff in die Regulation der Kopienanzahl des Vektors herangezogen werden. Möglicherweise sorgt ein bestimmtes Protein dafür, dass das *vgc1*-Konstrukt in einer höheren Anzahl an Kopien/Zelle im Wirtsorganismus vorliegt als das *vgc2*-Konstrukt. Da im Falle des pIP501-basierten pUvBBAC bekannt ist, dass die Kopienanzahl des Plasmids unter anderem auch durch Repressorproteine reguliert wird (del Solar & Espinosa, 2000), wäre ein solcher Mechanismus zumindest denkbar. Da die verschiedenen schon bekannten, aber zum Teil auch noch unbekannt, Mechanismen dieser Kontrolle der Plasmid Kopienanzahl eng ineinander greifen, muss an dieser Stelle offen bleiben, ob und, wenn ja, in welcher Form ein oder mehrere der auf dem 12 kb großen DNA-Fragment codierten Genprodukte einen Einfluß auf diese Regulation haben.

Darüber hinaus ist auch eine Beeinflussung der Genexpression einzelner oder mehrerer Virulenzgene durch eventuell als *enhancer* fungierende Proteine denkbar. Auch könnte ein spezifisches Genprodukt des 12 kb Fragments post-translational mit LLO interferieren und dessen Wirkung dadurch steigern. Um diesen Fragen weiter nachzugehen, wäre es interessant, die Folgen einer Mutation bzw. einer kompletten Deletion des entsprechenden 12 kb Fragments im Chromosom des *L. monocytogenes*-Wildtyps EGD-e zu evaluieren. Möglicherweise ergeben sich aus solchen Experimenten neue Aufschlüsse über bislang noch unbekannte Co-Faktoren, welche die Funktion der listeriellen Virulenzgene mitbeeinflussen.

Wenn man davon ausgeht, dass der Vektor, entsprechend der Regulierung durch das pIP501 low copy replicon, mit einer maximalen Kopienzahl von 10 Kopien/Zelle vorliegt, bedeutet dies eine erhebliche Belastung für den Wirtsorganismus (*L. innocua*). So müsste der Wirtsstamm nach Komplementation mit dem *vgc1*-Konstrukt (96.6 kb + 11,8 kb pUvBBAC; zehnfach vorliegend: 1,084 Mb) mehr als ein Drittel seiner eigenen Genomgröße (ca. 3,01 Mb

für *L. innocua*) zusätzlich replizieren. Für das *vgc2*-Konstrukt liegt der Wert bei einem zehnfachen Vorliegen des Plasmids mit 0,963 Mb etwas niedriger. Diese Überlegung bestätigte sich anhand vergleichender Wachstumsstudien. Im Vergleich zu den lediglich mit pUvBBAC transformierten Wildtyp Stämmen von *L. monocytogenes* EGD-e und *L. innocua*, zeigten die beiden Komplementanten *L. innocua*(pUvBBAC+vgc1) und *L. innocua*(pUvBBAC+vgc2) ein deutlich verlangsamtes Wachstum (Kap. 3.2.4.5). So blieben schon die Übernachtskulturen der beiden *vgc*-Stämme in diesem Experiment mit einer OD₆₀₀ von 1,8 bzw. 1,9 deutlich hinter den Kontrollstämmen zurück (OD₆₀₀ von 2,6 im Durchschnitt). Die im Verlauf der Messungen verzögert einsetzende und langsamere *Log*-Phase sowie das niedriger ausfallende erreichte Plateau dieser *vgc*-Komplementanten lieferte somit das praktische Korrelat für die theoretisch-rechnerisch höhere Replikationsbelastung dieser Stämme im Vergleich zu den Wildtypstämmen. Trotz ihres langsameren Wachstums wiesen die *vgc*-Stämme jedoch keinerlei Instabilitäten, Deletionen oder gar einen Verlust des Konstruktes über 100 Generationen auf. Um die *in vitro* Untersuchungen der beiden Komplementanten zu vervollständigen, wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die exprimierten Genprodukte zweier auf dem Virulenzgencluster lokalisierter Gene im Immunoblot direkt nachgewiesen. So konnten sowohl Listeriolysin O (LLO, 58 KD) als auch ActA (90 KD) im Kulturüberstand sowie in den Zellwandextrakten detektiert werden, wobei die LLO-Banden im Kulturüberstand erwartungsgemäß deutlicher zu sehen waren als in den Zellwandextrakten (Kap. 3.2.4.4). Entsprechend war ActA als wandständiges Protein deutlicher im Immunoblot der Zellwandextrakte zu sehen.

4.7 Funktionelle Genomik und das pUvBBAC-Modell – Vor- und Nachteile dieses Systems und Vergleich mit anderen Ansätzen

Das Gesamtbild wäre unvollständig, ginge man nicht auch auf die natürlichen Grenzen des vorgestellten BAC-Systems ein. Der Shuttle-Vektor pUvBBAC hat als Plasmidvektor generell den Nachteil, dass jeder mit seiner Hilfe zur Komplementation eingesetzte Genabschnitt zwangsläufig extrachromosomal organisiert ist. Damit weicht die Situation im Empfängerstamm von der ursprünglich im Geberstamm vorliegenden Konstellation ab, da die meisten experimentell eingesetzten Gen-Loci dort auf dem Chromosom lokalisiert sind. Darüber hinaus liegt pUvBBAC, wie oben ausführlich beschrieben, mit 5-10 Kopien pro Zelle innerhalb Gram positiver Wirtstämmen vor, während dieser F-Plasmid-basierte BAC-Vektor in *E. coli* lediglich eine einzige Kopie pro Zelle aufweist. Diese unphysiologisch hohe Kopienzahl der großen rekombinanten BAC-Konstrukte manifestiert sich nicht nur in reduzierten Wachstumseigenschaften der Gram positiven Wirte (3.2.4.5); sie muss auch bei

4 Diskussion

der Auswertung der entsprechenden Komplementationsexperimente berücksichtigt werden. Ein direkter Vergleich zu den Bedingungen der Genexpression im Geberstamm wird dadurch zumindest komplexer, wenn nicht auch schwieriger. Diese Problematik wird z. B. an der unter Kap. 3.2.4.3 beschriebenen deutlicheren hämolytischen Aktivität der vgc-Rekombinanten *L. innocua*(pUvBBAC+vgc1) und *L. innocua*(pUvBBAC+vgc2) deutlich, die sich unter anderem auch auf eine gesteigerte Expression von *hly* aufgrund der höheren Kopienzahl in den rekombinanten Stämmen zurückführen lassen könnte. Eine chromosomale Komplementation könnte ein vielversprechender Ansatz sein, um diese Schwierigkeit anzugehen.

Ein System, das diesen Ansatz einer chromosomalen Integration näher verfolgt, stellen die Arbeiten von Lauer *et al.* (2002) dar. Bei dem von diesen Untersuchern konstruierten Vektorsystem handelt sich um zwei Shuttle-Vektoren (pPL1 und pPL2) mit zwei verschiedenen chromosomalen Bakteriophagen-Integrationstellen innerhalb des Genoms von *Listeria monocytogenes*. Während pPL1 sich der Integrase des Listeriophagen U153 und einer *attachment site* innerhalb des *comK* Gens zur chromosomalen Insertion in das Genom von *L. monocytogenes* bedient, stützt sich der Vektor pPL2 auf eine entsprechende *attachment site* des Listeriophagen PSA (Phage von ScottA), um an dieser Stelle in das Chromosom zu integrieren. Beide Vektoren replizieren, ähnlich wie pUvBBAC, in *E. coli* und können anschließend auf den *Listeria* Stamm übertragen werden. Allerdings war diese Übertragung, im Gegensatz zu den Erfahrungen in der vorliegenden Arbeit und entsprechenden Literaturangaben (Park & Steward, 1990), nicht durch rasche Elektroporation sondern nur durch das aufwendigere Verfahren der Konjugation möglich. Dieses System von spezifisch im listeriellen Chromosom integrierenden Vektoren hat per se den Vorteil, ein chromosomal-basierter Komplementationsansatz zu sein. Die entsprechenden so transferierten Gen-Loci werden also physiologisch exprimiert und repliziert; die Situationen in Geber- und Empfängerstamm sind somit ähnlicher. Auch bei einem eventuellen Einsatz der Komplementanten in einer selektionsfreien Umgebung, werden chromosomal integrierte Gene vermutlich länger persistieren, während das Risiko für den Verlust eines Plasmidvektors größer wäre.

Dennoch weist das pPL1- bzw. pPL2-System im Vergleich zu dem in dieser Arbeit beschriebenen BAC-System andere entscheidende Nachteile auf. So setzt schon allein die Tatsache, dass ein potentieller Empfängerstamm über eine *comK*- bzw. PSA- *attachment site* verfügen muss, diesem Ansatz erste Grenzen. Die Experimente von Lauer *et al.* beschränkten sich nur auf Vertreter der *Listeria monocytogenes* Serotypen 1/2 und 4, wenngleich darauf hingewiesen wurde, dass eine Integration in das Genom des sequenzierten Stammes *Listeria*

innocua CLIP11262 vor dem Hintergrund seiner bekannten Genomsequenz möglich sein sollte. Darüber hinaus ist das gesamte experimentelle Vorgehen sehr aufwendig, da das Genom des Wirtstammes, nach Detektion der spezifischen chromosomalen Integrationsstelle zunächst von dem entsprechenden Phagen befreit werden muss, bevor eine stabile Integration der pPL-Vektoren erfolgen kann. Der Shuttle-Vektor pUvBBAC hingegen ist nicht nur völlig unabhängig von chromosomalen Determinanten des Wirtstammes; er ist zudem direkt und ohne weitere Vorexperimente mittels Elektroporation auf eine Fülle von Gram positiven Wirten transferierbar.

Einen weiteren entscheidenden Punkt stellt die Tatsache dar, dass pPL1 und pPL2 lediglich zur Klonierung und zum anschließenden Transfer einzelner Virulenzgene, speziell *hly* und *actA*, eingesetzt wurden. Dabei handelt es sich also um sehr kleine DNA-Fragmente (2,9 kb und 2,22 kb), bei denen man nicht von einer Komplementation im Sinne der funktionellen Genomik sprechen kann, wie dies für das BAC-System gilt. Während diese Tatsache für Untersuchungen der Genexpression von LLO weniger problematisch erscheint, weist sie für die Analysen von ActA größere Schwierigkeiten auf, da die ActA-Expression über zwei verschiedenen Promotoren gesteuert wird, von denen der eine direkt vor dem *actA* ORF liegt, während der zweite etwas weiter upstream von *actA* vor dem *mpl* Gen-Locus liegt (Vazquez-Boland *et al.*, 1992). Dieser Bereich ist jedoch bei der isolierten Klonierung des *actA* Locus nicht vorhanden, und somit fällt die Expression von ActA in den Rekombinanten geringer aus als dies für den Wildtyp beschrieben ist. Da Experimente anderer Arbeitsgruppen zudem zeigen konnten, dass für die *actA*-vermittelte intrazelluläre Motilität ein bestimmter Schwellenwert von an der Zelloberfläche vorhandenen ActA Proteinen notwendig ist (Smith *et al.*, 1996), wurden die Grenzen des pPL Systems in den entsprechenden Zellkulturversuchen deutlich (Lauer *et al.*, 2002). Der pUvBBAC Ansatz wird demgegenüber nicht mit dieser Problematik konfrontiert, da dieses System, wie ausführlich dargelegt, den Einsatz sehr großer DNA-Fragmente (≤ 300 kb) zur Komplementation ermöglicht, womit deren funktionelle Einheit, entsprechend der Situation im Geberstamm, weitgehend erhalten bleibt.

4 Diskussion

Das pPL-Modell wurde von Dancz *et al.* (2002) noch um einen zusätzlichen, vielversprechenden Ansatz erweitert, indem man ein induzierbares System auf der Grundlage des *E. coli lac* Repressor/Operator Systems konstruierte. Die entsprechenden klonierten Virulenzgene (z.B. LLO) werden hierbei einer genau induzierbaren Kontrolle mittels des Induktors IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) unterstellt. Dies ermöglicht gewissermaßen dynamische Untersuchungen der Bedeutung von LLO und anderen listeriellen Virulenzgenen im zeitlichen Verlauf des Infektionsgeschehens und gibt wesentliche Aufschlüsse über die Expression dieser Gene während der einzelnen Phasen des intrazellulären Lebenszyklus von *L. monocytogenes*.

Dennoch, auch dieses Modell bleibt momentan als pPL1- bzw. pPL2-Vektor-basierter Ansatz auf den Einsatz in einigen wenigen *Listeria* Stämmen begrenzt. Eine Kombination dieses induzierbaren Systems mit den Eigenschaften des hier vorgestellten pUvBBAC-Ansatzes könnte vielversprechend sein. Eine kontrollierte Expression der listeriellen Virulenzgene und eine demzufolge gezielt zu dosierende Virulenz wäre ein wertvolles Instrument zur Ergänzung der in der vorliegenden Arbeit diskutierten Komplementationsexperimente in *L. innocua*, sowie im Zusammenhang neu zu erwägender Vakzinierungsstrategien. Auch das Problem der in höherer Kopienzahl pro Zelle vorliegenden Gene auf dem BAC-Konstrukt und deren daraus resultierender Überexpression könnte durch eine solche IPTG-Kontrolle eventuell ausgeglichen werden. Andererseits ließe sich das von Dancz *et al.* entwickelte Modell durch Kombination mit dem BAC-System auf ein viel größeres Spektrum an potentiellen Wirten erweitern und somit den Blick über die Grenzen der *Listeria spp.* hinaus ausdehnen.

Zusammenfassend haben die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur ersten erfolgreichen Klonierung der kompletten LIPI-1 (*Listeria* Pathogenitätsinsel 1) und deren Expression in einem apathogenen Wirt geführt. Das *vgc* stellt somit einen austauschbaren Genabschnitt zum Virulenztransfer zwischen pathogenen und apathogenen *Listeriae* dar. Weiterführende *in vivo* Untersuchungen der hier beschriebenen rekombinanten Stämme, *L. innocua*(pUvBBAC+vgc1) und *L. innocua*(pUvBBAC+vgc2) müssen nun zeigen, in wie weit sich entsprechende spezifische Eigenschaften der pathogenen Spezies *L. monocytogenes*, wie zum Beispiel Evasion aus dem Phagolysosom, intrazelluläres Wachstum und Motilität oder auch die Ausbreitung von Zelle zu Zelle (Chakraborty & Wehland, 1997) auch auf diese Stämme haben übertragen lassen. Schließlich könnte eine weitere Manipulation bzw. eine gezielte Aufrüstung dieser *vgc*-Stämme mit virulenten Eigenschaften auch im Rahmen der Impfstoffentwicklung eine interessante Rolle spielen. Während in der Vergangenheit meist ein *reduktorischer* Ansatz im Sinne einer Deletion von Wildtypstämmen (sogenannte attenuierte Erreger) zur Entwicklung von Lebend-Impfstoffen gewählt wurde, bietet die hier vorgestellte

Strategie die Möglichkeit eines *rekonstruktiven* Ansatzes. Dieser stützt sich, im Gegensatz zu der ehemaligen Deletion, nun auf eine Reorganisation von Virulenzsystemen. Ein Virulenztransfer von einem pathogenen Stamm auf einen apathogenen Stamm führt bei diesem Ansatz zur Entwicklung eines Erregers, der gezielt nur bestimmte virulente Eigenschaften des Keimes enthält, gegen den eine Immunabwehr im Wirtsorganismus bezweckt werden soll. Mit vergleichbaren Absichten wurde bereits in vorausgegangenen Arbeiten ein Transfer von LLO auf verschiedene bakteriellen Vektoren vorgenommen (Beattie *et al.*, 1990; Bouwer *et al.*, 1992; Sirard *et al.*, 1997). Auch wenn LLO für den Aufbau einer spezifischen T-Zell-Immunität von entscheidender Bedeutung ist (Mengaud *et al.*, 1989), haben auch andere *Listeria*-spezifische Epitope einen vergleichbarer Effekt (Bouwer *et al.*, 1994). Durch die Möglichkeit der gleichzeitigen Expression solcher listerieller Virulenzgene in einem entsprechenden Wirtsorganismus, z. B. *L. innocua*, ließe sich dieser beschriebene Weg und dessen Bedeutung für die Entwicklung neuer Impfstoffe ergänzen und damit deutlich aufwerten. Die Verwendung des BAC-Systems hat sich als sogenannte BAC-VAC (Suter *et al.*, 1999) im Rahmen ähnlich strukturierter Versuchsmodelle bereits als eine effektive Methode erwiesen. Die dafür notwendige gezielte und spezifische Stimulation der Immunantwort im eukaryoten Wirt stellt ein vielversprechendes Untersuchungsfeld, z. B. unter Verwendung des Mausmodells, dar.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das fakultativ intrazelluläre Bakterium *L. monocytogenes* stellt v.a. für immunsupprimierte Personen und Feten einen gefährlichen Erreger dar. Die Listeriose ist besonders aufgrund ihrer relativ unspezifischen Klinik sowie der Fähigkeit des Keimes, sich anspruchslos in Lebensmitteln zu vermehren, eine ernstzunehmende Erkrankung mit zahlreichen Manifestationsformen. Darüber hinaus kann der Erreger verschiedene Gewebe bzw. Gewebsschranken innerhalb des Körpers überwinden. So stellen zum Beispiel weder die Blut-Hirn-Schranke noch die Plazentaschranke eine unüberwindbare Barriere für *Listeria monocytogenes* dar, was die verschiedenen Krankheitsbilder einer Infektion mit diesem Bakterium erklärt.

Listeria monocytogenes hat sich als ein hilfreicher Modellorganismus zur Erforschung von Invasionsstrategien und Virulenzeigenschaften intrazellulärer Krankheitserreger erwiesen. Erstes Ergebnis dieser Arbeit war die Bestimmung der Genomgröße und die Erstellung einer chromosomalen Karte von *L. monocytogenes* EGD-e Serotyp 1/2a. Alle bislang bekannten Virulenzgene konnten darüber hinaus exakt auf dem 3000 kb großen Genom kartiert werden. Ein Vergleich dieser Karte mit bereits vorhandenen Genomkarten der *Listerien* Stämme LO28 (Michel & Cossart, 1992) und Scott A (He & Luchansky, 1997) unterstrich die Vermutung, dass näher verwandte Serotypen (EGD-e: Serotyp 1/2a; LO28: Serotyp 1/2c) auch in Bezug auf ihre Genomstruktur und die Anordnung von Virulenzgenen deutliche Übereinstimmungen aufweisen und sich damit von anderen Serotypen (Scott A: Serotyp 4b) unterscheiden. Diese Ergebnisse demonstrieren die Bedeutung der Genkartierung für die vergleichende Genomik. Durch die Kartierung mehrerer Stämme und die Analyse ihrer individuellen Genorganisation bzw. -anordnung lassen sich im Vergleich solcher Stämme untereinander wertvolle Daten für die Epidemiologie wie auch für das Verständnis der Evolution gewinnen. Die hier vorgestellten Daten leisten hierfür einen wichtigen Beitrag und eröffnen gleichzeitig weitere Perspektiven im Hinblick auf das Feld der funktionellen Genomik.

Die in dieser Arbeit angewandte Strategie zur Erstellung einer physikalischen und genetischen Karte stellt durch die Kombination von Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) und molekularer Genetik eine elegante Alternative zu den bisher verwendeten Verfahren dar.

Das BAC-System (*bacterial artificial chromosome*) wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit zur Erstellung mehrerer BAC-Genbanken von *L. monocytogenes* EGD-e eingesetzt und um einen neu entwickelten shuttle-BAC-Vektor (pUvBBAC) erweitert. Eine der erstellten Genbanken fand im Anschluss an diese Arbeit im Rahmen des europäischen *L. monocytogenes* EGD-e Genomprojekts Verwendung (Glaser *et al.*, 2001). Das BAC-System

erlaubt es, große (≤ 300 kb) funktionelle Genabschnitte zu klonieren und die jeweiligen Genprodukte im *E. coli* Wirt zu exprimieren. Der neue Vektor pUvBBAC erweitert das ursprüngliche Spektrum der BAC-Vektoren um den Gram positiven Bereich und eröffnet somit die Möglichkeit für Komplementationsexperimente mit verwandten *Listeria* Stämmen oder anderen Gram positiven Erregern.

In dieser Arbeit ist es erstmals gelungen, das Virulenzgencluster (vgc) von *L. monocytogenes* EGD-e, vor dem Hintergrund der vorherigen Kartierung, auf einem großen (<100 kb) funktionellen DNA-Fragment mit Hilfe des Vektors pUvBBAC zu klonieren. Die anschließende Komplementation des verwandten, apathogenen Stammes *L. innocua* mit den neuen Konstrukten (pUvBBAC+vgc1: 96,6 kb; pUvBBAC+vgc2: 84,5 kb) führte *in vitro* nachweislich zu einem Transfer virulenter Eigenschaften. So konnte unter anderem eine deutliche hämolytische Aktivität der mit den vgc-Konstrukten komplementierten *L. innocua* Stämme im Vergleich zum apathogenen Wildtyp aufgezeigt werden. Die *in vivo* Auswirkungen dieses Virulenztransfers müssen mit Hilfe von Infektionsmodellen (Zellkultur, Maus) weiter abgeklärt werden.

Diese vorgestellten Komplementationsexperimente mit *Listeria innocua* könnten in ähnlicher Weise weiter verfolgt werden. Es wäre zum Beispiel interessant, individuelle Virulenzgene oder die Virulenzgencluster verschiedener Stämme ebenso zur Komplementation von *L. innocua* einzusetzen und zu testen. Auch eine Ergänzung des BAC-Modells durch weitere Strategien, wie z. B. induzierbare Systeme (Dancz *et al.*, 2002), wäre in diesem Zusammenhang interessant und sinnvoll. Auf diese Weise ergäbe sich eine vielversprechende Möglichkeit, separate Gene in ihrer Wirkung besser zu verstehen. Darüber hinaus kann die hier vorgestellte Methode der Komplementation mit Hilfe des BAC-Systems auch eine wertvolle Grundlage für additive Analysen im Sinne einer evolutionären Infektionsbiologie bilden. Durch sukzessive Komplementation mit immer weiteren Virulenzfaktoren wäre hiermit ein Ansatz gegeben, der es erlaubt, Virulenz in ihrer Entstehung zu verstehen. Es wird zudem interessant sein, zu sehen, welche Möglichkeiten sich aus diesen Ansätzen für die Entwicklung von potenten Vakzinen gegen wichtige bakterielle Krankheitserreger ergeben.

Die Bedeutung der PFGE-Kartierung im Zusammenhang mit epidemiologischen Untersuchungen und Genomanalysen wird durch die hier vorgestellten Ergebnisse unterstrichen. Darüber hinaus eröffnen sich durch die Erweiterung des BAC-Systems und den Einsatz des neuen Vektors pUvBBAC neue Ausblicke auf dem Feld der funktionellen Genomik.

6 Literaturverzeichnis

Adler, H., M. Messerle, and U. H. Koszinowski. 2001. Virus reconstituted from infectious bacterial artificial chromosome (BAC)-cloned murine gammaherpesvirus 68 acquires wild-type properties in vivo only after excision of BAC vector sequences. *J.Virol.* 75:5692-5696.

Anand, R., J. H. Riley, R. Butler, J. C. Smith, and A. F. Markham. 1990. A 3.5 genome equivalent multi access YAC library: construction, characterisation, screening and storage. *Nucleic Acids Res.* 18:1951-1956.

Beattie, I. A., B. Swaminathan, and H. K. Ziegler. 1990. Cloning and characterization of T-cell-reactive protein antigens from *Listeria monocytogenes*. *Infect.Immun.* 58:2792-2803.

Bellanne-Chantelot, C., B. Lacroix, P. Ougen, A. Billault, S. Beauvils, S. Bertrand, I. Georges, F. Glibert, I. Gros, G. Lucotte, and . 1992. Mapping the whole human genome by fingerprinting yeast artificial chromosomes. *Cell* 70:1059-1068.

Bielecki, J., P. Youngman, P. Connelly, and D. A. Portnoy. 1990. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 345:175-176.

Bille, J. 1990. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In foodborn listeriosis. *A.J.Miller, J.L.Smith, and G.A.Somkuti, editors.Elsevier, New York* 71-74.

Birren, B. W., Y. Tachi-iri, U. J. Kim, M. Nguyen, H. Shizuya, J. R. Korenberg, and M. I. Simon. 1996. A human chromosome 22 fosmid resource: mapping and analysis of 96 clones. *Genomics* 34:97-106.

Blum, G., M. Ott, A. Lischewski, A. Ritter, H. Imrich, H. Tschape, and J. Hacker. 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an Escherichia coli wild-type pathogen. *Infect.Immun.* 62:606-614.

Boerlin, P., J. Rocourt, and J. C. Piffaretti. 1991. Taxonomy of the genus Listeria by using multilocus enzyme electrophoresis. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 41:59-64.

Boisivon, A., C. Guiomar, and C. Carbon. 1990. In vitro bactericidal activity of amoxicillin, gentamicin, rifampicin, ciprofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole alone or in combination against Listeria monocytogenes. *Eur.J.Clin.Microbiol Infect.Dis.* 9:206-209.

Borst, E. M., G. Hahn, U. H. Koszinowski, and M. Messerle. 1999. Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: a new approach for construction of HCMV mutants. *J.Virol.* 73:8320-8329.

Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am.J Hum.Genet.* 32:314-331.

Bouwer, H. G., C. S. Nelson, B. L. Gibbins, D. A. Portnoy, and D. J. Hinrichs. 1992. Listeriolysin O is a target of the immune response to Listeria monocytogenes. *J Exp.Med.* 175:1467-1471.

6 Literaturverzeichnis

Bouwer, H. G., B. L. Gibbins, S. Jones, and D. J. Hinrichs. 1994. Antilisterial immunity includes specificity to listeriolysin O (LLO) and non-LLO-derived determinants. *Infect.Immun.* 62:1039-1045.

Brosch, R., C. Buchrieser, and J. Rocourt. 1991. Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis. *Res.Microbiol* 142:667-675.

Brosch, R., J. Chen, and J. B. Luchansky. 1994. Pulsed-field fingerprinting of listeriae: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Appl Environ.Microbiol* 60:2584-2592.

Brosch, R., M. Brett, B. Catimel, J. B. Luchansky, B. Ojeniyi, and J. Rocourt. 1996. Genomic fingerprinting of 80 strains from the WHO multicenter international typing study of *Listeria monocytogenes* via pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). *Int.J.Food Microbiol* 32:343-355.

Brosch, R., S. V. Gordon, A. Billault, T. Garnier, K. Eiglmeier, C. Soravito, B. G. Barrell, and S. T. Cole. 1998. Use of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics. *Infect.Immun.* 66:2221-2229.

Buchanan, R. L. and J. G. Phillips. 1990. Response surface model for predicting the effects temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere of growth of *Listeria monocytogenes*. *J.Food Prot* 53:370-376.

Buchdahl, R., M. Hird, H. Gamsu, A. Tapp, D. Gibb, and C. Tzannatos. 1990. Listeriosis revisited: the role of the obstetrician. *Br.J.Obstet.Gynaecol.* 97:186-189.

Buchrieser, C., R. Brosch, and J. Rocourt. 1991. Use of pulsed field gel electrophoresis to compare large DNA-restriction fragments of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroups 1/2 and 3. *Int.J.Food Microbiol* 14:297-304.

Buchrieser, C., R. Brosch, B. Catimel, and J. Rocourt. 1993. Pulsed-field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. *Can.J.Microbiol* 39:395-401.

Budiman, M. A., L. Mao, T. C. Wood, and R. A. Wing. 2000. A deep-coverage tomato BAC library and prospects toward development of an STC framework for genome sequencing. *Genome Res.* 10:129-136.

Burke, D. T., G. F. Carle, and M. V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 236:806-812.

Cai, L., J. F. Taylor, R. A. Wing, D. S. Gallagher, S. S. Woo, and S. K. Davis. 1995. Construction and characterization of a bovine bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 29:413-425.

Capela, D., F. Barloy-Hubler, M. T. Gatiús, J. Gouzy, and F. Galibert. 1999. A high-density physical map of *Sinorhizobium meliloti* 1021 chromosome derived from bacterial artificial chromosome library. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:9357-9362.

6 Literaturverzeichnis

Carriere, C., A. Allardet-Servent, G. Bourg, A. Audurier, and M. Ramuz. 1991. DNA polymorphism in strains of *Listeria monocytogenes*. *J Clin.Microbiol* 29:1351-1355.

Chakraborty, T. and J. Wehland. 1997. The host cell infected with *Listeria monocytogenes*., p. 271-290. In S.H.E.Kaufmann (ed.), Host Response to Intracellular Pathogens. R.G. Landes Company.

Chakraborty, T. 1999. Molecular and cell biological aspects of infection by *Listeria monocytogenes*. *Immunobiology* 201:155-163.

Chakraborty, T., T. Hain, and E. Domann. 2000. Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. *Int.J.Med.Microbiol* 290:167-174.

Collins, M. D., S. Wallbanks, D. J. Lane, J. Shah, R. Nietupski, J. Smida, M. Dorsch, and E. Stackebrandt. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int.J.Syst.Bacteriol.* 41:240-246.

Conlan, J. W. and R. J. North. 1992. Early pathogenesis of infection in the liver with the facultative intracellular bacteria *Listeria monocytogenes*, *Francisella tularensis*, and *Salmonella typhimurium* involves lysis of infected hepatocytes by leukocytes. *Infect.Immun.* 60:5164-5171.

Coren, J. S. and N. Sternberg. 2001. Construction of a PAC vector system for the propagation of genomic DNA in bacterial and mammalian cells and subsequent generation of nested deletions in individual library members. *Gene* 264:11-18.

Cossart, P. and J. Mengaud. 1989. *Listeria monocytogenes*. A model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol.Biol.Med.* 6:463-474.

Cousens, L. P. and E. J. Wing. 2000. Innate defenses in the liver during *Listeria* infection. *Immunol.Rev* 174:150-159.

Cruikshank, D. P. and J. C. Warenski. 1989. First-trimester maternal *Listeria monocytogenes* sepsis and chorioamnionitis with normal neonatal outcome. *Obstet.Gynecol.* 73:469-471.

Dalton, C. B., C. C. Austin, J. Sobel, P. S. Hayes, W. F. Bibb, L. M. Graves, B. Swaminathan, M. E. Proctor, and P. M. Griffin. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N.Engl.J Med.* 336:100-105.

Dancz, C. E., A. Haraga, D. A. Portnoy, and D. E. Higgins. 2002. Inducible control of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*: temporal requirement of listeriolysin O during intracellular infection. *J Bacteriol* 184:5935-5945.

del Solar, G. and M. Espinosa. 2000. Plasmid copy number control: an ever-growing story. *Mol Microbiol* 37:492-500.

Dobrindt, U., G. Blum-Oehler, G. Nagy, G. Schneider, A. Johann, G. Gottschalk, and J. Hacker. 2002. Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I(536) to PAI IV(536)) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect.Immun.* 70:6365-6372.

Domann, E. 1997. Infektionskrankheiten heute. *Deutsche Apotheker Zeitung* 40:80-84.

6 Literaturverzeichnis

- Domann, E.** 1998. Pathogenitätsfaktoren bakterieller Krankheitserreger. *Dtsch Med.Wochenschr* 123:229-236.
- Dumont, J. and L. Coton.** 1921. Bacille semblable à celui du rouget du porc rencontré dans le L.C.R. d'un méningitique. *Ann.Inst.Pasteur* 35:625-633.
- Ericsson, H., H. Unnerstad, J. G. Mattsson, M. L. Danielsson-Tham, and W. Tham.** 2000. Molecular grouping of *Listeria monocytogenes* based on the sequence of the inIB gene. *J.Med.Microbiol* 49:73-80.
- Faber, J. M. and P.I.Peterkin.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-born pathogen. *Microbiol Rev* 55:476-511.
- Fang, Y. and J. H. Hoh.** 1998. Surface-directed DNA condensation in the absence of soluble multivalent cations. *Nucleic Acids Res.* 26:588-593.
- Gaillard, J. L., F. Jaubert, and P. Berche.** 1996. The inlAB locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes in vivo. *J Exp.Med.* 183:359-369.
- Gellin, B. G. and C. V. Broome.** 1989. Listeriosis. *JAMA* 261:1313-1320.
- Gentzbittel, L., A. Abbott, J. P. Galaud, L. Georgi, F. Fabre, T. Liboz, and G. Alibert.** 2002. A bacterial artificial chromosome (BAC) library for sunflower, and identification of clones containing genes for putative transmembrane receptors. *Mol.Genet.Genomics* 266:979-987.

Gillespie, D. E., S. F. Brady, A. D. Bettermann, N. P. Cianciotto, M. R. Liles, M. R. Rondon, J. Clardy, R. M. Goodman, and J. Handelsman. 2002. Isolation of antibiotics turbomycin a and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ.Microbiol* 68:4301-4306.

Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couve, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Dominguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dussurget, K. D. Entian, H. Fsihi, F. G. Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gomez-Lopez, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L. M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueno, A. Maitournam, J. M. Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J. C. Perez-Diaz, R. Purcell, B. Rimmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J. A. Vazquez-Boland, H. Voss, J. Wehland, and P. Cossart. 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294:849-852.

Gnirke, A., C. Huxley, K. Peterson, and M. V. Olson. 1993. Microinjection of intact 200- to 500-kb fragments of YAC DNA into mammalian cells. *Genomics* 15:659-667.

Grau, F. H. and P. B. Vanderlinde. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum packed beef. *J.Food Prot* 53:739-741.

Gregory, S. H. and C. C. Liu. 2000. CD8+ T-cell-mediated response to *Listeria monocytogenes* taken up in the liver and replicating within hepatocytes. *Immunol.Rev* 174:112-122.

Grenningloh, R., A. Darji, J. Wehland, T. Chakraborty, and S. Weiss. 1997. Listeriolysin and IrpA are major protein targets of the human humoral response against *Listeria monocytogenes*. *Infect.Immun.* 65:3976-3980.

6 Literaturverzeichnis

Groisman, E. A. and H. Ochman. 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87:791-794.

Hacker, J. and J. Heesemann. 1997. Molekulare Infektionsbiologie. Interaktion zwischen Mikroorganismen und Zellen. *Spektrum Akademischer Verlag* .

Hamer, L., H. Pan, K. Adachi, M. J. Orbach, A. Page, L. Ramamurthy, and J. P. Woessner. 2001. Regions of microsynteny in *Magnaporthe grisea* and *Neurospora crassa*. *Fungal.Genet.Biol.* 33:137-143.

Hanahan, D., J. Jessee, and F. R. Bloom. 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* 204:63-113.

He, W. and J. B. Luchansky. 1997. Construction of the temperature-sensitive vectors pLUCH80 and pLUCH88 for delivery of Tn917::NotI/SmaI and use of these vectors to derive a circular map of *Listeria monocytogenes* Scott A, a serotype 4b isolate. *Appl Environ.Microbiol* 63:3480-3487.

Howard, P. J., K. D. Harsono, and J. B. Luchansky. 1992. Differentiation of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri* by pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Environ.Microbiol* 58:709-712.

Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.

Ioannou, P. A., C. T. Amemiya, J. Garnes, P. M. Kroisel, H. Shizuya, C. Chen, M. A. Batzer, and P. J. de Jong. 1994. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat.Genet.* 6:84-89.

Jensen, E. R., R. Selvakumar, H. Shen, R. Ahmed, F. O. Wettstein, and J. F. Miller. 1997. Recombinant *Listeria monocytogenes* vaccination eliminates papillomavirus-induced tumors and prevents papilloma formation from viral DNA. *J Virol.* 71:8467-8474.

Juntilla, J. R., S. I. Niemela, and J. Hirn. 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J Appl Bacteriol* 65:321-327.

Kim, U. J., H. Shizuya, P. J. de Jong, B. Birren, and M. I. Simon. 1992. Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Res.* 20:1083-1085.

Kouprina, N., M. Eldarov, R. Moyzis, M. Resnick, and V. Larionov. 1994. A model system to assess the integrity of mammalian YACs during transformation and propagation in yeast. *Genomics* 21:7-17.

Lauer, P., M. Y. Chow, M. J. Loessner, D. A. Portnoy, and R. Calendar. 2002. Construction, characterization, and use of two *Listeria monocytogenes* site-specific phage integration vectors. *J Bacteriol* 184:4177-4186.

Lewis, J. S., T. J. Thomas, A. Shirahata, and T. Thomas. 2000. Self-assembly of an oligodeoxyribonucleotide harboring the estrogen response element in the presence of polyamines: ionic, structural, and DNA sequence specificity effects. *Biomacromolecules.* 1:339-349.

6 Literaturverzeichnis

Lorber, B. 1997. Listeriosis. *Clin.Infect.Dis.* 24:1-9.

Ludwig, W., E. Seewaldt, R. Kilpper-Balz, K. H. Schleifer, L. Magrum, C. R. Woese, G. E. Fox, and E. Stackebrandt. 1985. The phylogenetic position of Streptococcus and Enterococcus. *J Gen Microbiol* 131 (Pt 3):543-551.

McGregor, A. and M. R. Schleiss. 2001. Molecular cloning of the guinea pig cytomegalovirus (GPCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome (BAC) in Escherichia coli. *Mol.Genet.Metab* 72:15-26.

McLauchlin, J. 1990. Human listeriosis in Britain, 1967-85, a summary of 722 cases. 1. Listeriosis during pregnancy and in the newborn. *Epidemiol.Infect.* 104:181-189.

Mengaud, J., M. F. Vicente, J. Chenevert, C. Geoffroy, F. Baquero, J. C. Perez-Diaz, and P. Cossart. 1989. A genetic approach to demonstrate the role of listeriolysin O in the virulence of Listeria monocytogenes. *Acta Microbiol Hung.* 36:177-182.

Messerle, M., I. Crnkovic, W. Hammerschmidt, H. Ziegler, and U. H. Koszinowski. 1997. Cloning and mutagenesis of a herpesvirus genome as an infectious bacterial artificial chromosome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:14759-14763.

Michel, E. and P. Cossart. 1992. Physical map of the Listeria monocytogenes chromosome. *J.Bacteriol.* 174:7098-7103.

Monaco, A. P. and Z. Larin. 1994. YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Trends Biotechnol.* 12:280-286.

Mozo, T., K. Dewar, P. Dunn, J. R. Ecker, S. Fischer, S. Kloska, H. Lehrach, M. Marra, R. Martienssen, S. Meier-Ewert, and T. Altmann. 1999. A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nat.Genet.* 22:271-275.

Nieman, R. E. and B. Lorber. 1980. Listeriosis in adults: a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. *Rev Infect.Dis.* 2:207-227.

Nyfelt, A. 1929. Etiologie de la mononucléose infectieuse. *C.R.Soc Biol* 101:590-591.

Osoegawa, K., M. Tateno, P. Y. Woon, E. Frengen, A. G. Mammoser, J. J. Catanese, Y. Hayashizaki, and P. J. de Jong. 2000. Bacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. *Genome Res.* 10:116-128.

Otten, S. 2001. Charakterisierung und Identifizierung paeferenziell intrazellulaer exprimierter Gene aus *Listeria monocytogenes*. *Logos Verlag, Berlin* .

Oury, M. 1986. Geschichte der Tuberkulose. *Illustrierte Geschichte der Medizin.Andreas & Andreas Verlagsbuchhandel, Salzburg* 5:2735-2756.

Parish, M. E. and D. P. Higgins. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in low level pH model broth systems. *J.Food Prot* 52:144-147.

Park, S. F. and G. S. Stewart. 1990. High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. *Gene* 94:129-132.

6 Literaturverzeichnis

Peel, M., W. Donachi, and A. Shaw. 1988. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J.Gen Microbiol* 134 (Pt 8):2171-2178.

Perez-Diaz, J. C., M. F. Vicente, and F. Baquero. 1982. Plasmids in *Listeria*. *Plasmid* 8:112-118.

Petran, R. L. and E. A. Zottola. 1989. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* ScottA. *J.Food Sci.* 54:45-60.

Piffaretti, J. C., H. Kressebuch, M. Aeschbacher, J. Bille, E. Bannerman, J. M. Musser, R. K. Selander, and J. Rocourt. 1989. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:3818-3822.

Poyart-Salmeron, C., C. Carlier, P. Trieu-Cuot, A. L. Courtieu, and P. Courvalin. 1990. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet* 335:1422-1426.

Primrose, S. B. 1996. Genomanalyse. *Spektrum Akademischer Verlag* .

Racz, P., K. Tenner, and E. Mero. 1972. Experimental *Listeria* enteritis. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental listeria infection. *Lab Invest* 26:694-700.

Randall, T. A. and H. S. Judelson. 1999. Construction of a bacterial artificial chromosome library of *Phytophthora infestans* and transformation of clones into *P. infestans*. *Fungal.Genet.Biol.* 28:160-170.

Rasmussen, O. F., P. Skouboe, L. Dons, L. Rossen, and J. E. Olsen. 1995. *Listeria monocytogenes* exists in at least three evolutionary lines: evidence from flagellin, invasive associated protein and listeriolysin O genes. *Microbiology* 141 (Pt 9):2053-2061.

Redline, R. W. and C. Y. Lu. 1987. Role of local immunosuppression in murine fetoplacental listeriosis. *J Clin.Invest* 79:1234-1241.

Robert Koch Institut. 2002. *Epidemiologisches Bulletin.* 42 .

Rocourt, J. 1988. Taxonomy of the genus *Listeria*. *Infection* 16 Suppl 2:S89-S91.

Rocourt, J., E. P. Espaze, R. Minck, B. Catimel, B. Hubert, and A. L. Courtieu. 1989. Cluster of listeriosis isolates with different serovar and phagovar characteristics. *Lancet* 2:1217-1218.

Rocourt, J., P. Boerlin, F. Grimont, C. Jacquet, and J. C. Piffaretti. 1992. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int.J Syst.Bacteriol* 42:171-174.

Rocourt, J. and R. Brosch. 1992. Human Listeriosis 1990. Document WHO/HPP/FOS/92.4. *World Health Organization, Geneva, Switzerland* .

Rocourt, J. 1996. Risk factors for Listeriosis. *Food Control* 7:195-202.

Rondon, M. R., S. J. Raffel, R. M. Goodman, and J. Handelsman. 1999. Toward functional genomics in bacteria: analysis of gene expression in *Escherichia coli* from a bacterial artificial chromosome library of *Bacillus cereus*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:6451-6455.

Rondon, M. R., P. R. August, A. D. Bettermann, S. F. Brady, T. H. Grossman, M. R. Liles, K. A. Loiacono, B. A. Lynch, I. A. MacNeil, C. Minor, C. L. Tiong, M. Gilman, M. S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman, and R. M. Goodman. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ.Microbiol* 66:2541-2547.

Russel, A. D. 2002. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 31:1S-3S.

Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis. 1978. *Molecular Cloning - A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Editor Chris Nolan .

Sanchez-Campillo, M., S. Dramsi, J. M. Gomez-Gomez, E. Michel, P. Dehoux, P. Cossart, F. Baquero, and J. C. Perez-Diaz. 1995. Modulation of DNA topology by *flaR*, a new gene from *Listeria monocytogenes*. *Mol.Microbiol* 18:801-811.

Schaferkordt, S. and T. Chakraborty. 1995. Vector plasmid for insertional mutagenesis and directional cloning in *Listeria* spp. *Biotechniques* 19:720-725.

Schlech, W. F. 1990. *Listeria*, animals and man: aspects of virulence. In foodborn listeriosis. A.J.Miller, J.L.Smith, and G.A.Somkuti, editors.Elsevier, Amsterdam 51-54.

Schubert, W. D., G. Gobel, M. Diepholz, A. Darji, D. Kloer, T. Hain, T. Chakraborty, J. Wehland, E. Domann, and D. W. Heinz. 2001. Internalins from the human pathogen *Listeria monocytogenes* combine three distinct folds into a contiguous internalin domain. *J.Mol.Biol.* 312:783-794.

Schuchat, A., B. Swaminathan, and C. V. Broome. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin.Microbiol Rev* 4:169-183.

Schuchat, A. 1997. Listeriosis and pregnancy: food for thought. *Obstet.Gynecol.Surv.* 52:721-722.

Seeliger, H. P. R. and D. Jones. 1986. Genus *Listeria*. *P.H.A.Sneath, N.S.Mair, M.E.Sharpe, and J.G.Holt (ed.), Bergey's manual of sytematic bacteriology 2* Williams & Wilkins, Baltimore, Md.:1235-1245.

Shankar, N., A. S. Baghdayan, and M. S. Gilmore. 2002. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 417:746-750.

Sheng, Y., V. Mancino, and B. Birren. 1995. Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res.* 23:1990-1996.

Shizuya, H., B. Birren, U. J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri, and M. Simon. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:8794-8797.

6 Literaturverzeichnis

Sirard, J. C., C. Fayolle, C. de Chastellier, M. Mock, C. Leclerc, and P. Berche. 1997. Intracytoplasmic delivery of listeriolysin O by a vaccinal strain of *Bacillus anthracis* induces CD8-mediated protection against *Listeria monocytogenes*. *J Immunol.* 159:4435-4443.

Smajs, D., M. McKeivitt, L. Wang, J. K. Howell, S. J. Norris, T. Palzkill, and G. M. Weinstock. 2002. BAC library of *T. pallidum* DNA in *E. coli*. *Genome Res.* 12:515-522.

Smith, A. R., B. A. Lieberman, L. Allen, and A. J. Barson. 1983. Listeriosis and pregnancy. *Lancet* 2:1364.

Smith, G. A., J. A. Theriot, and D. A. Portnoy. 1996. The tandem repeat domain in the *Listeria monocytogenes* ActA protein controls the rate of actin-based motility, the percentage of moving bacteria, and the localization of vasodilator-stimulated phosphoprotein and profilin. *J Cell Biol* 135:647-660.

Sosio, M., E. Bossi, and S. Donadio. 2001. Assembly of large genomic segments in artificial chromosomes by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 29:E37.

Sternberg, N. 1990. Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87:103-107.

Sugarman, B., L. R. Epps, and W. A. Stenback. 1982. Zinc and bacterial adherence. *Infect.Immun.* 37:1191-1199.

Suter, M., A. M. Lew, P. Grob, G. J. Adema, M. Ackermann, K. Shortman, and C. Fraefel. 1999. BAC-VAC, a novel generation of (DNA) vaccines: A bacterial artificial chromosome (BAC) containing a replication-competent, packaging-defective virus genome induces protective immunity against herpes simplex virus 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:12697-12702.

Suzuki, K., S. Asakawa, M. Iida, S. Shimanuki, N. Fujishima, H. Hiraiwa, Y. Murakami, N. Shimizu, and H. Yasue. 2000. Construction and evaluation of a porcine bacterial artificial chromosome library. *Anim Genet.* 31:8-12.

Suzuki, M. T., O. Beja, L. T. Taylor, and E. F. Delong. 2001. Phylogenetic analysis of ribosomal RNA operons from uncultivated coastal marine bacterioplankton. *Environ.Microbiol* 3:323-331.

Synnott, M. B., D. L. Morse, and S. M. Hall. 1994. Neonatal meningitis in England and Wales: a review of routine national data. *Arch.Dis.Child* 71:F75-F80.

Tabouret, M., J. de Rycke, and G. Dubray. 1992. Analysis of surface proteins of *Listeria* in relation to species, serovar and pathogenicity. *J Gen Microbiol* 138 (Pt 4):743-753.

Tappero, J. M., A.Schuchat, K.A.Deaver, L.Mascola, and and J.D Wenger. 1995. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? The Listeriosis study group. *JAMA* 273:1118-1122.

Tauxe, R. V. 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg.Infect.Dis.* 3:425-434.

Vazquez-Boland, J. A., C. Kocks, S. Dramsi, H. Ohayon, C. Geoffroy, J. Mengaud, and P. Cossart. 1992. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect.Immun.* 60:219-230.

Vazquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Dominguez-Bernal, W. Goebel, B. Gonzalez-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin.Microbiol Rev* 14:584-640.

Walker, S. J. and M. F. Stringer. 1987. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. *J Appl Bacteriol* 63:R20.

Weinberg, E. D. 1984. Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. *Rev Infect.Dis.* 6:814-831.

Weis, J. and H. P. R. Seeliger. 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Nature. *Appl Microbiol* 30:29-32.

Weiss, S. and T. Chakraborty. 2001. Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells by bacterial carriers. *Curr.Opin.Biotechnol.* 12:467-472.

Wiedmann, M., J. L. Bruce, C. Keating, A. E. Johnson, P. L. McDonough, and C. A. Batt. 1997. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect.Immun.* 65:2707-2716.

Witte, W. 1998. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279:996-997.

Woo, S. S., J. Jiang, B. S. Gill, A. H. Paterson, and R. A. Wing. 1994. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res.* 22:4922-4931.

Wuenscher, M. D., S. Kohler, W. Goebel, and T. Chakraborty. 1991. Gene disruption by plasmid integration in *Listeria monocytogenes*: insertional inactivation of the listeriolysin determinant *lisA*. *Mol Gen Genet* 228:177-182.

Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.

Zimmer, R. and A. M. Verrinder Gibbins. 1997. Construction and characterization of a large-fragment chicken bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 42:217-226.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ActA/ <i>actA</i>	Aktinnukleationsfaktor/-Gen
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
AMP	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
BAC	bacterial artificial chromosome
BHI	brain heart infusion
BSA	bovine serum albumin
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CD	cluster of differentiation
CHEF	clamped homogeneous electric field
C-Terminus	Carboxy-terminales Ende eines Proteins
Cy	Carbocyaninfarbstoff
Da	Dalton
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
ddNTP	beliebige 2', 3'Dideoxy-Nucleosid-5'-Triphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	beliebige 3'Deoxy-Nucleosid-5'-Triphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EM	Erythromycin
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

G	Guanin
GST	Glutathion-S-Transferase
HIV	human immunodeficiency virus
<i>hly</i>	Gen für Listeriolysin O (LLO)
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactosid
IrpA/ <i>irpA</i>	Internalin related protein A/-Gen
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
LB	Luria Bertani
LLO	Listeriolysin O
M	molar
Mpl/ <i>mpl</i>	Metalloprotease/-Gen
mRNA	messenger RNA
MQ-H ₂ O	entmineralisiertes Wasser
N-Terminus	Amino-terminales Ende eines Proteins
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (Open Reading Frame)
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFGE	Pulsfeld Gelelektrophorese
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PlcA/ <i>plcA</i>	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C/-Gen
PlcB/ <i>plcB</i>	Phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C /-Gen
PrfA/ <i>prfA</i>	positiver Regulationsfaktor/-Gen
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecylsulfat
<i>spp.</i>	Spezies
T	Thymin
Tab.	Tabelle

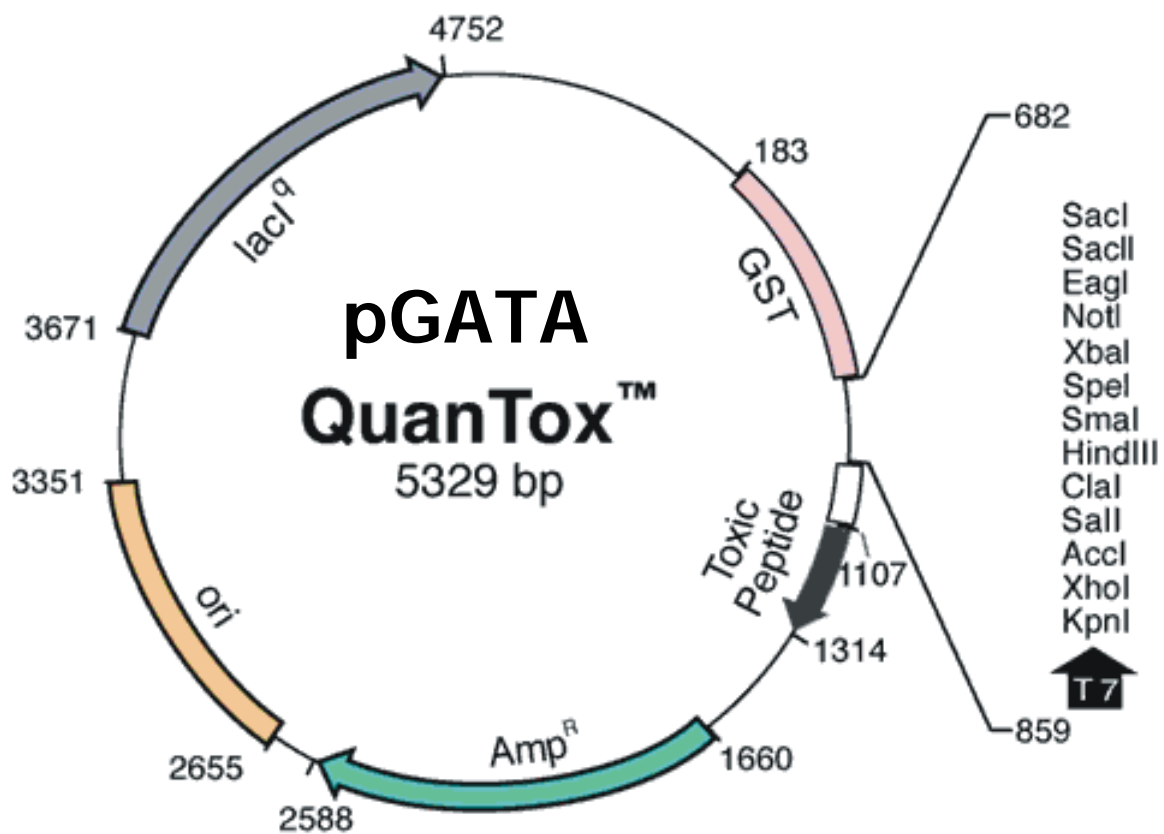
7 Anhang

TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloroacetic Acid
TEMED	N, N, N, N-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
ÜN	über Nacht
ÜNK	Übernachtkultur
UV	ultraviolett
v.a.	vor allem
WHO	World Health Organisation
<i>Y. pestis</i>	<i>Yersinia pestis</i>
z.B.	zum Beispiel

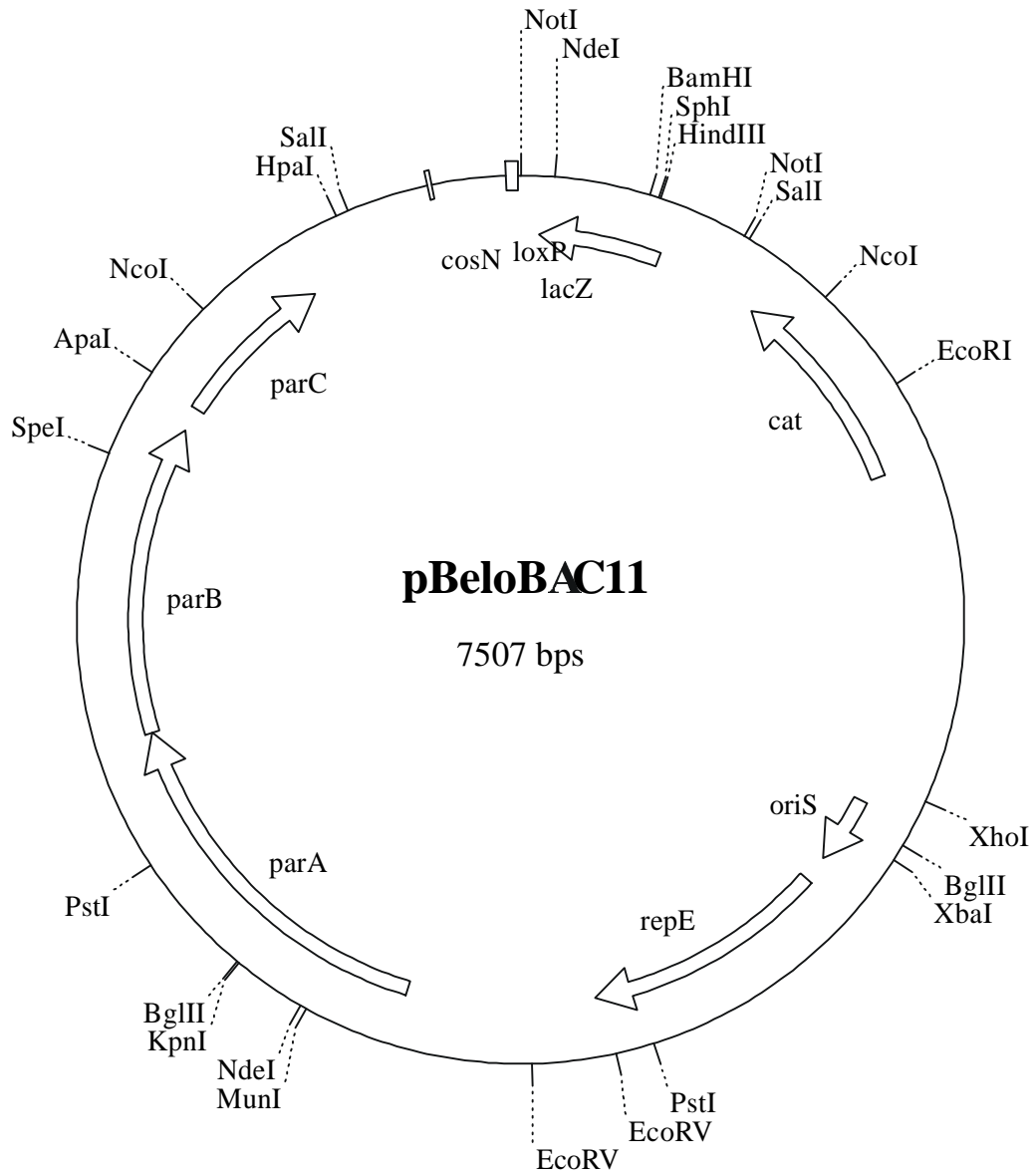
Einheiten

A	Amper
°C	Grad Celsius
F	Farad
h	Stunde
kg	Kilogramm
l	Liter
m	Meter
mol	Mol
min	Minute
Ω	Ohm
sec	Sekunde
V	Volt
W	Watt

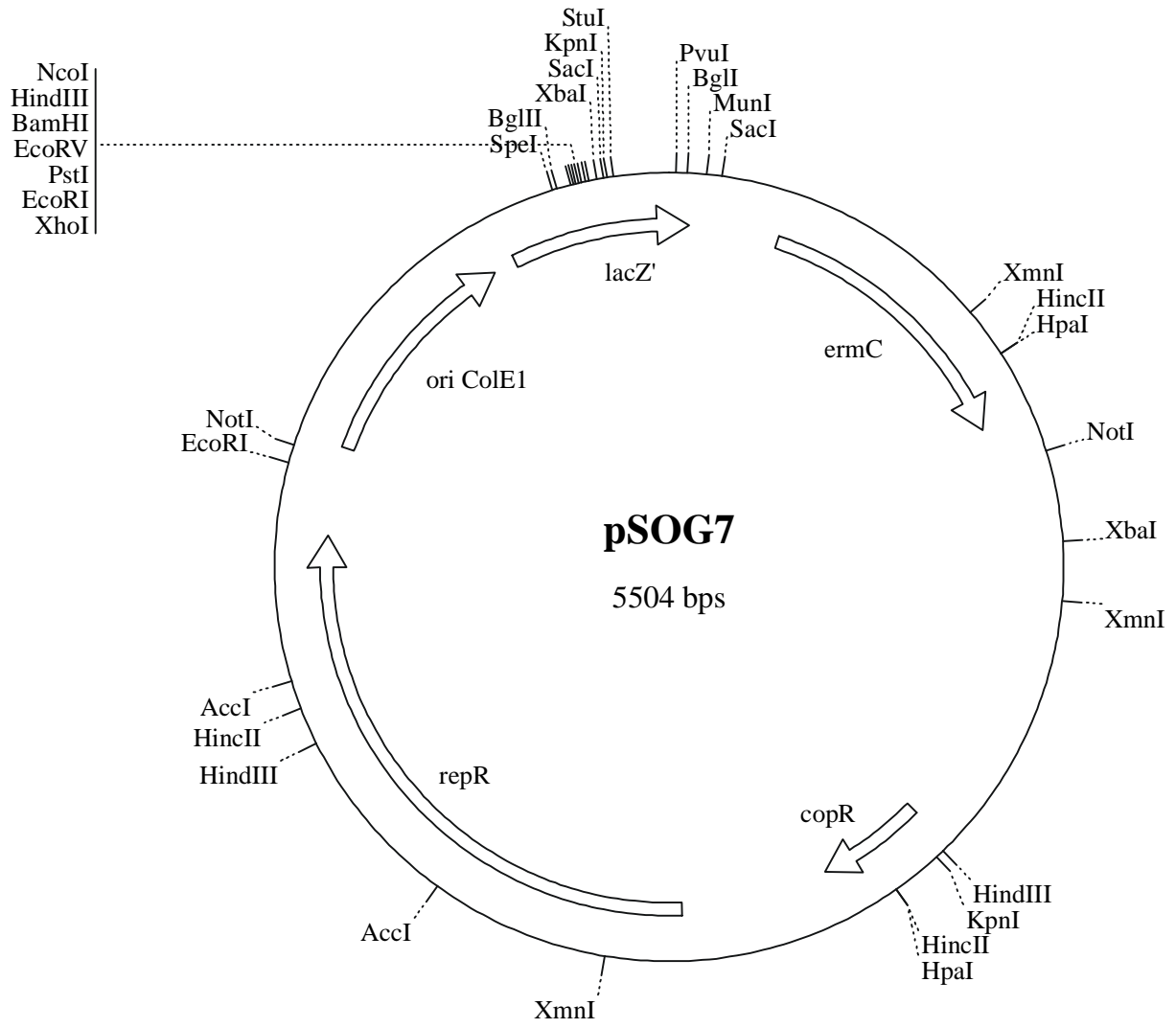
7.2 Plasmidkarten und tabellarischer Anhang



Plasmidkarte von pGATA QanTox™ der Firma Quantum Biotechnologies.



Plasmidkarte des BAC Vektors pBeloBAC 11 (Shizuya *et al.*, 1992).



Plasmidkarte von pSOG7 (Otten, 2001).

Tab. 1: Oligonukleotide, NotI-Sonden und deren korrespondierende NotI Fragmente

Name des Oligonukleotids	5' → 3'	gewonnen aus der Sequenz	Accession Number der Sequence	Position im Listeria Chromosom ¹	Name der probe	Länge der Sonde [bp]	hybridisierte mit den Fragmenten	Quelle
1f 1r	TTCTTCATTATGGCCG ATCATGCTGAATGTGCGG	NotI-1	AJ012337	565078 - 566001	NotI-1*	869	NotA + NotC	<i>Sau3AI</i> Bibliothek
2f 2r	GTGTGTCCTTCAAATGTG TCTCTGGAAAAGCTTATAA	NotI-2	AJ012338	2377678 - 2378745	NotI-2*	1053	NotD + NotH	"
3f 3r	ATACTCGCTTATATGGAGG TCTACTTCATCTGTTCCGG	NotI-3	AJ012339	2398897 - 2399887	NotI-3*	926	NotG + NotH	"
4f 4r	TGGATTTACCAAATTACGG GTGTTTCATACGTTATCAGG	NotI-4	AJ012340	2472760 - 2473189	NotI-4*	366	NotA + NotF	"
5f 5r	ATGTTCAAATGTAATGGCG GAACAAAATCCCGAAATGGG	NotI-5	AJ012341	2063073 - 2064709	NotI-5*	1050	NotB + NotD	"
6f 6r	TATGAACGATTTGGATGGC GATCTATCTTGCTCAAATGC	NotI-6	AJ012342	918338 - 918818	NotI-6*	498	NotC + NotE	"
7f 7r	GTAATCGTTCCATACCTTG AAAACAAAACGGCTCGCTG	NotI-7	AJ012343	2429665 - 2430427	NotI-7*	723	NotF + NotG	"
8f 8r	GCGAGTCTGTAGAAGTTG TTCCAGTTGTCCCACCG	NotI-8	AJ012344	1189162 - 1189416	NotI-8*	249	NotB + NotE	<i>Tsp509I</i> Bibliothek

entsprechend der Datenbank des Listeria World Wide Web Servers (www.berenice.pasteur.fr/Listeria)

7.3 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Hartwig Ulrich von Both
 geboren am: 04.07.1973
 Geburtsort: Bremen
 Familienstand: ledig
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Adresse: Kaiserstuhlstr. 24, 79106 Freiburg
 Telefon: 0761/5009996
 e-mail: both@kikil.ukl.uni-freiburg.de

Schulbildung:

1980-1984 Grundschule Boloh, Hagen
 1984-1993 Albrecht-Dürer-Gymnasium, Hagen; Abschluß: Abitur

Zivildienst:

07/1993-10/1994 Pflegedienst auf der Hämatologisch-onkologischen Station des St. Marien Hospitals, Hagen

Studium:

10/1994-11/2001 Studiengang Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
 Ärztliche Prüfung am 15.11.2001
 Ärztliche Vorprüfung am 11.09.1996
 Famulaturen: 03/1997 Chirurgie, AKH, Hagen
 09/1997 Inst. für Med. Mikrobiologie, JLU Gießen
 08/1999 Anästhesie, AKH Wien, Österreich
 09/1999 Innere Medizin/Chirurgie, Imphilo Clinic, Manzini, Swaziland
 Praktisches Jahr: 10/2000-02/2001 Pädiatrie, Red Cross Children's Hospital, Kapstadt, R.S.A.
 02-06/2001 Innere Medizin, KKH Bad Hersfeld, Univ. Gießen
 06-10/2001 Chirurgie, Kantonspital Luzern, Univ. Zürich, CH

7 Anhang

Dissertation: begonnen 10/1997 im Institut für Med. Mikrobiologie, Klinikum Gießen, unter Leitung von Prof. Dr. T. Chakraborty

weitere Laborerfahrung: 09/2000 Hospitation im Tropeninstitut der Universität Tübingen, Leiter: Prof. P. Kremser. Mitarbeit im molekularbiologischen Bereich auf dem Gebiet der Plasmodienforschung.

Publikationen/

Tagungsbeiträge:

von Both, U., S. Otten, A. Darbouche, E. Doman, and T. Chakraborty. 1999. Physical and genetic map of the *Listeria monocytogenes* EGD serotype 1/2a chromosome. *FEMS Microbiol Lett* 175:281-289.

Hain, T., S. Otten, U. von Both, E. Doman, T. Chakraborty. A novel vector for functional genomics studying the facultative intracellular human pathogen *Listeria monocytogenes*. Posterpräsentation auf der DECHEMA-Tagung "Functional Genomics", 1999, Frankfurt am Main.

von Both, U., M. Ruess, U. Mueller, K. Fluegge, A. Sander, R. Berner. A serotype V clone is predominant among erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* isolates in a southwestern region of Germany. 2003. *J Clin Microbiol* 41:2161-2169.

Arzt im Praktikum:

seit 05/2002

Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin, Universitäts-Klinikum Freiburg

Freiburg 2003

7.4 Danksagung

Mein erster besonderer Dank gilt Prof. Dr. T. Chakraborty, der in mir durch die Arbeit an diesem Thema unter ausgezeichneten Bedingungen das Interesse an der molekularbiologisch-infektiologischen Forschung geweckt hat. Seine fachlich hervorragende und im Detail oft sehr inspirierende Betreuung hat wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei PD Dr. E. Domann bedanke ich mich für seinen fachlichen Rat.

Dr. A. Darbouche und Dr. E. Busch danke ich für die Bereitstellung ihrer *Listeria monocytogenes* EGD-e-Deletionsmutanten.

Ebenso möchte ich auch allen Mitarbeitern des Instituts herzlich danken, die mich auf ganz unterschiedliche Weise bei dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt hierbei Dr. Sonja Otten, die mich mit ihrer ausgezeichneten fachlichen Kompetenz in viele für mich neue Zusammenhänge der Molekularbiologie eingeführt und den gesamten ersten Teil dieser Arbeit wesentlich begleitet hat.

Ganz herzlich danke ich vor allem Dr. Torsten Hain für seine vielen fachlichen und freundschaftlichen Ratschläge und die hervorragende Unterstützung im Zusammenhang mit der BAC-Klonierung im zweiten Teil der Arbeit sowie für das kritische Korrekturlesen des Manuskripts.

Alexandra Amend und Martina Hudel danke ich für die engagierte und geduldige Einführung in die Arbeit des Instituts während der ersten Wochen.

Die Anleitungen und Tips zum Umgang mit der Pulsfeld-Gelelektrophorese waren für diese Arbeit sehr entscheidend, so dass mein spezieller Dank hierfür an Dr. F. Wuppermann geht.

Meinen beiden Schwestern sowie allen Freunden und Verwandten danke ich für ihre vielfältige und ständige Unterstützung und für den Rückhalt, den sie mir geben.

Meinen Eltern gilt der abschließende ganz besondere Dank für die Ermöglichung meiner Ausbildung unter hervorragenden Bedingungen. Ihre fortwährende Unterstützung und gewissenhafte Vertrauenswürdigkeit werden mir ein ständiges Vorbild sein.