

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

Untersuchungen zur Kälteanpassung bei *Listeria monocytogenes*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Naturwissenschaftlichen Fachbereichs
der Justus-Liebig Universität Gießen

vorgelegt von
Ekaterina Kuchmina
aus Kasan

Gießen 2007

Betreuer: Prof. Dr. T. Chakraborty
Dr. rer. nat. T. Hain

Gutachter vom naturwissenschaftlichen Fachbereich: Prof. Dr. A. Baniahmad

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Das Phänomen der Temperaturadaptation bei Bakterien.....</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Mechanismen der Adaptation an niedrige Temperaturen</i>	<i>2</i>
1.2.1	Synthese der Kälteschockproteine	3
1.2.2	Anpassung des Translationsapparates	5
1.2.3	Aufnahme von Osmolyten in die Zelle	8
1.2.4	Aufrechterhaltung der Fluidität der Membranlipide	9
1.2.5	Veränderungen im allgemeinen Metabolismus	12
1.2.6	Übersicht über <i>Listeria monocytogenes</i>	14
1.2.7	Virulenzfaktoren, Verbreitung, Infektion	15
1.3	<i>Bekannte Mechanismen der Kälteadaptation bei L. monocytogenes</i>	<i>18</i>
1.3.1	Die Erhaltung des richtigen Fliessvermögens.....	18
1.3.2	Osmolytenaufnahme	19
1.3.3	Oberflächenproteine	20
1.3.4	Synthese der Kälteschockproteine	20
1.4	<i>Ziel der Arbeit</i>	<i>22</i>
2	MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	<i>Bakterienstämme und Plasmide</i>	<i>24</i>
2.2	<i>Chemikalien.....</i>	<i>29</i>
2.3	<i>Nährmedien, Medienzusätze, Puffer und Lösungen</i>	<i>30</i>
2.3.1	Standardpuffer	30
2.4	<i>Verwendete Geräte</i>	<i>34</i>
2.5	<i>Arbeit mit den Bakterienstämmen</i>	<i>36</i>
2.5.1	Anzucht und Lagerung der Kulturen	36
2.6	<i>Arbeiten mit Nukleinsäuren.....</i>	<i>36</i>
2.6.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>Listeria</i>	36
2.6.2	Isolierung der Plasmide	37
2.6.3	Isolierung der RNA	38
2.6.4	Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren	39
2.7	<i>Nukleinsäure Analytik</i>	<i>39</i>
2.7.1	PCR	39

2.7.2	High Fidelity PCR	40
2.7.3	Agarosegel-Elektrophorese.....	40
2.7.4	Restriktion von DNA mittels Restriktionsendonukleasen	41
2.7.5	Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit Alkalischer Phosphatase	41
2.7.6	Aufreinigung von PCR und Restriktionsansätzen	42
2.7.7	DNA-Elution aus dem Agarosegel	42
2.7.8	Ligation von DNA- Fragmenten mit Vektor-DNA	42
2.7.9	Klonierung von DNA-Fragmenten mit dem pCR-Blunt-Cloning Kit und pCR 2.1-Topo Cloning Kit von Invitrogen.....	43
2.7.10	DNA- Sequenzierung.....	43
2.7.11	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> - Zellen nach Hanahan (1991).....	45
2.7.12	Chemische Transformation in <i>E. coli</i>	45
2.7.13	Elektroporation der <i>E. coli</i> - Zellen	45
2.7.14	Herstellung elektrokompenter <i>L. monocytogenes</i> -Zellen.....	46
2.7.15	Elektroporation elektrokompenter <i>L. monocytogenes</i>	46
2.8	Herstellung der Deletionsmutanten von <i>L. monocytogenes</i>	47
2.9	Proteinextraktion aus <i>L. monocytogenes</i>	48
2.9.1	Überstand.....	48
2.9.2	Zellwand.....	48
2.9.3	Cytoplasmatischer Extrakt.....	49
2.9.4	SDS- PAGE.....	49
2.9.5	Coomassie-Färbung	50
2.9.6	Immuno-Blot	50
2.10	Microarray Analyse.....	51
2.11	Northern Blot Analyse	51
2.11.1	Sonden für Northern Blot.....	52
2.11.2	Hybridisierung und Entwicklung	52
2.11.3	RACE.....	53
2.11.4	RT-PCR	54
3	ERGEBNISSE.....	55
3.1	Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e bei 37°C und nach dem Kälteschock auf 15°C.....	55
3.2	Expression des <i>cspLA</i> Promotors	55
3.3	Proteinexpressionsprofile nach dem KS	56
3.4	Microarray-Analyse der Kälteschockantwort	57

3.5	<i>Microarray-Untersuchung zur Kälteadaptation beim dauerhaften Wachstum bei 15°C</i>	59
3.6	<i>Northern Blot</i>	61
3.7	<i>RT-PCR</i>	63
3.8	<i>RACE</i>	65
3.9	<i>Herstellung der Deletionsmutanten</i>	67
3.9.1	Klonierung der Fragmenten für die Herstellung von den Deletionsmutanten	67
3.9.2	Wachstum der Mutanten.....	69
3.9.3	Vergleich der exprimierten Proteine des Wildtyp EGD-e und der Deletionsmutanten	70
3.9.4	Motilitätstest	71
3.9.5	Western Blot mit anti-FlaA Antikörper	72
3.9.6	Bildung der Biofilme	73
3.9.7	Herstellung der Komplementanten	73
4	DISKUSSION	75
4.1	<i>Transkriptomantwort von L. monocytogenes auf Kälteschock</i>	75
4.1.1	Osmolyten-Aufnahme nach Kälteschock	76
4.1.2	Transport und Metabolismus der Aminosäuren.....	77
4.1.3	Protein Transport nach dem Kälteschock	77
4.1.4	Einfluss des Kälteschocks auf die Zellwand.....	78
4.1.5	Flagellinproduktion nach dem Kälteschock	80
4.1.6	Veränderungen des Lipidenmetabolismus nach dem Kälteschock	82
4.1.7	Regulation der Gene durch Antitermination der Transkription	82
4.1.8	Anpassung der ribosomalen Prozesse an die Kälte.....	83
4.1.9	GTPasen	85
4.1.10	RNA-Helikasen nach dem Kälteschock.....	87
4.1.11	Kälteschockproteine.....	88
4.1.12	Transkriptionsregulatoren nach dem Kälteschock	90
4.1.13	Zwei-komponenten Systeme.....	93
4.1.14	Beteiligung der Sigma Faktoren an der Anpassung nach dem Kälteschock	95
4.2	<i>Reprimierte Gene nach dem Kälteschock</i>	97
4.2.1	Hitzeschock Gene	97
4.2.2	Reprimierte Transporter nach Kälteschock	98
4.2.3	Repression der Atmungskette und Kohlenwasserstoff-Metabolismus.....	99
4.2.4	Repression der Virulenz-assoziierten Gene	100
4.3	<i>Kälteadaptation beim dauerhaften Wachstum bei 15°C</i>	100

4.4	<i>Komparative Analyse</i>	102
4.5	<i>Rolle der RNA-Helikasen an der Kälteadaptation</i>	103
4.5.1	<i>Rolle von RNA-Helikasen für die Expression von FlaA</i>	105
4.6	<i>Übersicht der Prozesse bei der Kälteschockantwort von L. monocytogenes</i>	106
5	ZUSAMMENFASSUNG	108
6	LITERATUR.....	110
7	ANHANG	127

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom- 4-chlor-3-indolylphosphat- <i>p</i> -toluidinsalz
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
C-terminal	carboxy-terminal
CS	Cold shock (Kälteschock)
Cy3	Indocarbocyanin
Cy5	Indodicarbocyanin
2D	zweidimensional
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
Fa.	Firma
GFP	Green fluorescent
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kb	Kilobasenpaar(e)
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
kD	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani-Medium
LLO	Listeriolysin

M	molar (mol/l)
MCS	Multiple cloning site
MEM	Minimal essential medium
MM	Minimalmedium
NCBI	National Center for Biomedical Information
N-terminal	amino-terminal
o. g.	oben genannt
OD	Optische Dichte
ONPG	<i>o</i> -Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
ORF	Open reading frame
ori	Origin of replication
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-buffered
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
RBS	Ribosomen-Bindestelle
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borat/EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSS	Transformation and storage solution
U	Unit
X-Gal	5-Brom-4-chlorindoxyl- β -D-galactosid
z. B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1 Das Phänomen der Temperaturadaptation bei Bakterien

Viele Mikroorganismen sind in ihrem natürlichen Umfeld erheblichen Schwankungen von Umweltfaktoren ausgesetzt. Die Temperatur ist einer der Umweltfaktoren, die sich sehr schnell gravierend ändern können.

In einem Großteil der Erde erreichen die Temperaturen nie mehr als 5°C, aber auch hier wurden signifikante Mengen an Biomasse per Satellitenaufnahmen nachgewiesen. Man findet eine große Vielfalt an Algen, Archea, Pilzen und vor allem Bakterien in diesen Lebensräumen. Dank ihrer Vielfalt, sind die Vertreter des Reichtums „Bakterien“ in fast allen möglichen Ökosystemen mit sehr unterschiedlichen Bedingungen anzutreffen. Das Temperaturspektrum reicht in diesen Ökosystemen von – 15°C in antarktischen salzigen Gewässern bis zu 115°C in Thermalquellen auf dem Ozeanboden. Psychrophile Mikroorganismen spielen auch bei den biotechnologischen Fermentationsprozessen, wie die Herstellung von Milchprodukten eine entscheidende Rolle. Andererseits sind psychrophile und psychrotolerante Bakterien, wie *Brochothrix thermospaca* und *Pseudomonas fragii* für das Verderben gekühlt gelagerter Lebensmittel verantwortlich. Auch psychrophile pathogene Bakterien können über gekühlte Lebensmittel verbreitet werden. Das gilt für humanpathogene Bakterien, wie *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* und *Salmonella* Stämme oder pflanzenpathogene Bakterien, wie *Pseudomonas syringae* und diverse *Erwinia* Stämme.

In Bezug auf das Wachstum bei unterschiedlichen Temperaturen werden die Bakterien in folgende Kategorien unterteilt: Psychrophile, Mesophile und Thermophile. Die minimale Wachstumstemperatur für psychrophile (auch „kryophil“ genannte) Bakterien beträgt 0°C oder niedriger, die maximale Wachstumstemperatur ist ca. 20°C und das optimale Wachstum erreichen sie bei ca. 15°C. Zu den Vertretern dieser Gruppe zählen sowohl die z.B. in Böden und Gewässern verbreiteten *Shewanella oneidensis*, *Arthrobacter globiformis*, *Pseudomonas fragii*, *Bacillus cereus* und *Brochothrix thermospacta*, als auch humanpathogene Erreger wie *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* und *Salmonella enterica*.

Psychrotolerante Bakterien mit ähnlichen Eigenschaften zeichnen sich dadurch aus, dass sie unter 3-5°C nicht wachsen können. Mesophile Bakterien haben den Wachstumstemperaturbereich bei 20-42°C mit dem Wachstumsoptimum bei 30°-37°C und sind bei Temperaturen un-

ter 15°C gehemmt. Am besten untersuchte Beispiele von dieser Gruppe sind *E. coli* und *B. subtilis*.

Die Mikroorganismen, die höhere Temperaturen bevorzugen, werden Thermophile genannt. Vertreter diese Gruppe, wie z.B. *B. stearothermophilus*, erlangen ihre maximale Wachstumsrate erst oberhalb von 40°C und werden bei ca. 70°C in ihrem Wachstum gehemmt. Als extrem thermophil bezeichnet man die Mikroorganismen (z.B. *Thermotoga maritima*, *Pyrococcus furiosus*), deren Temperaturoptimum für das Wachstum oberhalb von 65°C und deren maximale Wachstumstemperatur bei 70-80°C liegt. Bacteria und Archea, die erst bei 80-90°C ein ausreichendes Wachstum erreichen (*Methanopyrus kandleri*) bezeichnet man als hyperthermophil.

1.2 Mechanismen der Adaptation an niedrige Temperaturen

Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene Mechanismen entwickelt, um den niedrigen Temperaturen und schnellen Temperatursenkungen entgegenzutreten. Die wichtigsten Probleme, mit denen die bakterielle Zelle bei niedriger Temperatur konfrontiert wird, sind mit der verminderten molekularen Beweglichkeit und der damit verbundenen Fehlfunktion vieler Prozesse verbunden. Der aktuellste Stand der Forschung auf dem Gebiet Kälteadaptation bei Bakterien wurde in den Reviews von Weber und Marahiel (2003) und Chattopadhyay (2006) diskutiert.

Bei Senkung der Temperatur werden alle wichtigen Zellfunktionen beeinflusst: Enzymnetzwerke; zellmembrannassoziierte Prozesse wie Transport, Zellteilung und Energieproduktion; Prozesse mit Beteiligung von DNA und RNA Molekülen (Translation, Transkription, mRNA-Folding, Nukleoid-Verpackung). Verschiedene Studien zeigten, dass bei der abrupten Senkung der Temperatur nicht so sehr die erreichte Endtemperatur, sondern die Differenz zwischen der ursprünglichen und der erreichten Temperatur von Bedeutung ist. Bei den Studien an mesophilen Bakterien haben sich viele Labore für Kälteschock von 37°C auf 15°C entschieden.

Im Betracht auf die physiologische Vielfältigkeit der Bakterien ist es schwierig, die Kälteschockantwort zu generalisieren. Aber es lassen sich die gemeinsamen Phasen der Antwort darauf identifizieren. Die Phase I tritt direkt nach der subletalen Senkung der Umwelttemperatur an und kann abhängig von dem Mikroorganismus bis zu mehreren Stunden dauern, in der

eine erhebliche Verminderung der Wachstumsrate und Reprogrammierung der Proteinsynthese beobachtet werden. In der Phase II („Erholungsphase“) wachsen die Zellen von vielen Bakterien schneller und zeigen veränderte Proteinmuster im Vergleich zu Phase I. Die Bakterienzellen werden an die Kälte adaptiert und treten danach in die Phase III ein, die durch stationäres Wachstum charakterisiert ist.

Die Proteine, die nach dem KS synthetisiert werden, können in zwei Gruppen geteilt werden: CIPs („cold induced proteins“) – kälteinduzierte Proteine, und CAPs („cold acclimatization protein“) – Kälteakklimatisierungsproteine. CIPs werden nur vorübergehend induziert, und die CAPs sind dauerhaft nach dem KS auf erhöhtem Niveau vorhanden. Abhängig von der Induktionszeit, können die Proteine in die „frühen“ und „späten“ CIPs und CAPs unterteilt werden. Es wird vermutet, dass die CIPs und CAPs einige interne regulatorische Elemente besitzen, wie Sequenzen im 5'-untranslatierten Bereich, die ihre Affinität zum Ribosom erhöhen (Neuhaus, 2003, Phadtare, 1999) und damit die Synthese nach dem Kälteschock begünstigen. Z.B. kann *B. subtilis* die Sequenz im 5'-Bereich der mRNA nutzen, die zum Teil dem einzelstrangigen Abschnitt der 16S RNA komplementär ist, und als zusätzliches Interaktions-site dient (Weber, Marahiel 2002).

1.2.1 Synthese der Kälteschockproteine

Eine besondere Gruppe der CIPs bilden die Csp's („cold shock proteins“) - Kälteschockproteine, eine Familie der weit verbreiteten konservierten Proteine, die eine Bindungsdomäne für Nukleinsäuren, die CSD („cold shock domaine“) tragen.

Zu den Csps zählen z.B. das „major cold shock protein“ CspB bei *B. subtilis*, CspA bei *E. coli* und ihre Homologe bei anderen Spezies. Als Csp's wurde die Familie der kleinen (ca. 60-70 Aminosäuren großen) Proteine bezeichnet, die die so genannte konservative „cold shock domain“ CSD tragen, die von den Bakterien bis hin zum Mensch konserviert ist. Mit wenigen Ausnahmen wie *Helicobacter pylori* und *Mycoplasma genitalium* tragen alle Bakterien Homologe des Csp Proteins (Graumann, 1996).

Die Struktur der CSD Domäne wurde für CspB aus *B. subtilis* (Schindelin, 1993), CspA aus *E. coli* (Schindelin, 1994), TmCsp aus dem hypertermophilen *Thermotoga maritima* (Kremer, 2001) und für das humane Y-Box Protein YB-1 (Kloks, 2002) mit Hilfe der NMR oder Kristallographie identifiziert. Alle untersuchten Csps haben eine ähnliche Faltung und bestehen

aus fünf antiparallelen β -Sheets, die die β -Barrel Struktur bilden. Auf den β -Strängen zwei und drei befinden sich die Motive RNP-1 und RNP-2, die aus aromatischen und basischen Aminosäuren bestehen und an der Nukleinsäurebindung teilnehmen. Manche dieser aromatischen Reste beeinflussen auch die Stabilität und Faltung der Csp Proteine (Schindler, 1998, Hillier 1998). Daraus folgt, dass sie schnell gefaltet werden und so besitzen sie abhängig von dem Ursprungsorganismus eine niedrige oder hohe thermodynamische Stabilität. In *B. subtilis* wurden drei kälteinduzierte Csp Proteine identifiziert: CspB-CspC-CspD (Graumann, 1997), wohingegen in *E. coli* nur vier (CspA, CspB, CspG und CspI) von insgesamt neun Csp Proteinen kälteinduziert sind (Yamanaka, 1999).

Csps binden mit unterschiedlicher Affinität und Sequenzselektivität präferentiell eher an den einzelsträngigen, als an den doppelsträngigen Nukleinsäuren (Graumann, 1997, Graumann, 1994). Manche Csps, z. B. CspB aus *B. subtilis*, bilden Dimere *in vitro* (Yamanaka, 2001, Machatadze, 1994). Das dem CspB sehr homologe Protein CspA aus *E. coli* existiert dagegen nur als Monomer (Schindelin, 1994). An dem gereinigten CspB Protein aus *B. subtilis* wurde gezeigt, dass die Bindung an die Nukleinsäuren die Resistenz des Proteins gegen die proteolytische Degradierung erhöht (Schindler, 1999).

Die Funktion der Csp Proteine bleibt weitgehend ungeklärt. Für CspA aus *E. coli* wurde die Funktion als Transkriptionsaktivator für den Promotor des Gens *h-n*s, das für ein histonähnliches Protein kodiert, (La Teana, 1991) oder den *gyr* Promoter (Jones, 1994) vermutet.

Desweiteren wurde für CspA bei *E. coli* die Funktion eines RNA-Chaperons demonstriert, dank dessen die Sekundärstrukturen der RNA destabilisiert und eröffnet werden können. (Jiang, 1997) Dieses Protein besitzt auch die Antiterminatorfunktion, so wie auch seine Homologe CspC und CspE. CspA bindet an den Terminator und ermöglicht so das Durchlesen des Operons *inf-rbf-pnp*, das die Gene für die Adaptation des Translationsapparatus an die Kälte enthält (Bae, 2000).

Es wurde versucht, eine kombinierte Deletionsmutante aller Csp Gene herzustellen, aber die Deletion von vier von diesen führte zu schweren physiologischen Defekten (Xia, 2001). Die einzige Kopie des CspA-ähnlichen Gens wurde auch für das Überleben des psychrophilen Bakteriums *Arthrobacter globiformis* demonstriert (Hebraud, 1999). Die Notwendigkeit mindestens einer Kopie des Csp Gens in *B. subtilis* für das Überleben auch unter normalen Bedingungen (Graumann, 1997) weist darauf hin, dass Csp Proteine auch an weiteren Prozessen

außer der Kälteadaptation beteiligt sind. Die Doppeldeletion der Gene *cspB/cspC* in *B. subtilis* führte zu mehreren Defekten: Veränderte Proteinsynthese, Zellyse beim Eintreten der stationären Wachstumsphase, Abänderung der Nukleoidstruktur und Unfähigkeit, Endosporen zu bilden (Weber, 2001, Weber, 2001). Stationäres Wachstum und Kälteschock charakterisieren sich durch schnelle Inaktivierung der Ribosomen, und dies ist ein mögliches Signal zur Aktivierung der Csp Proteine. Vor kurzem ist es gelungen, phänotypische Defekte in der Doppelmutante *cspB/cspC* durch heterologe Expression des IF-1 Initiationsfaktors aus *E. coli* zu kompensieren (Weber, 2001). Das beweist, dass diese Proteine außer der gleichen Faltung zum Teil überlappende Funktionen haben. Die Bindung des Initiationsfaktors IF-1 an die 30S Untereinheit des Ribosoms ist für die Initiation der Translation bei Bakterien notwendig, und dies könnte auf eine Verbindung zwischen Csp Proteinen und der Initiation der Translation deuten, die momentan als die kritische Stelle in der Kälteanpassung angesehen wird. Für die Beteiligung der Csp an den ribosomalen Prozessen spricht auch die Beobachtung von Weber et al., dass das GFP-CspB Fusionsprotein mit den Ribosomen kolokalisiert ist und die Kolo-kalisierung von der aktiven Transkription abhängig ist. Außerdem wurde mit Hilfe der FRET Technik demonstriert, dass CspB mit der kälteinduzierten Helikase CshB interagiert und damit die einzelsträngige RNA stabilisiert (Hunger, 2006).

Basierend auf der Tatsache, dass nach dem Kälteschock unter der totalen Blockade der Translation mit 100 mg/ml Kanamycin oder 200 mg/ml Chloramphenicol ausschließlich Csp Proteine synthetisiert werden (Etchegaray, 1999), haben Marahiel und Weber folgendes Model vorgeschlagen: Erst werden von den Kälteschock-beschädigten Ribosomen dank der internen Strukturen, wie z.B. der Sekundärstruktur der mRNA, die Csps produziert, die danach die Struktur des Ribosoms ändern und damit die Synthese der anderen CIPs, wie der Helikase CsdA oder RbfA, ermöglichen. Alternativ dienen sie als Antiterminatoren, um die Expression der CIPs auf der Transkriptionsebene zu induzieren. Möglich ist auch, dass diese Funktionen sich ergänzen.

1.2.2 Anpassung des Translationsapparates

Die Störung der Proteinsynthese ist eines der größten Probleme, mit denen die Bakterien nach dem Kälteschock konfrontiert werden. Dabei wird sowohl die Struktur der Ribosomen, als auch die Sekundärstruktur der mRNAs beeinflusst. Studien zeigen, dass die Fraktion der CIPs

und CAPs viele ribosomale Proteine, Translationsfaktoren und mit den Ribosomen assoziierte Proteine beinhalten (Graumann, 1996; Jones, 1996), die wahrscheinlich der Wiederherstellung der normalen Proteinsynthese dienen sollen. Bei Kälte wird die Funktion des Ribosoms erstmal angehalten und die Hauptproteinsynthese solange blockiert, bis die Faktoren synthetisiert werden, die die Proteinsynthese wieder ermöglichen.

Nach der Arrhenius-Gleichung wird die Transkription bei niedriger Temperatur verlangsamt, und so bleibt mehr Zeit bis zur Bindung des Ribosoms an der Ribosomen-Bindungsstelle (RBS), in der sich Sekundärstrukturen bilden können und dadurch den Zugang zur RBS und regulatorischen Motiven verhindern. Unerwünschte Sekundärstrukturen innerhalb des kodierenden Bereichs der mRNA können die Elongation der Translation stören. Die Fehlfaltung des 3'-Endes kann zu unerwünschten Effekten wie Maskierung des Stop-Kodons führen oder die Peptidauflösung und Wiederverwendung von Ribosomuntereinheiten beeinträchtigen (Weber und Marahiel, 2003).

Das Ribosom ist ein komplexes Gebilde aus rRNA und Proteinen und vollzieht sich in seiner Biogenese der Reifung unter Beteiligung verschiedener Proteine (Gualerzi, 2003). Bei *E. coli* wurde demonstriert, dass nach der Senkung der Temperatur auf 15°C oder 5°C der Anteil an Polysomen stark abnimmt und gleichzeitig die Fraktion von einzelnen Ribosomen und 30S und 50S Untereinheiten zunimmt (Broeze, 1978, Jones, 1999). Diese Daten zeigen, dass die Reaktivierung der Translationsinitiation ein Engpass bei der Kälteadaptation ist.

Um die korrekte Transkription und Translation zu ermöglichen, gibt es zwei Möglichkeiten, der Bildung der unerwünschten Sekundärstrukturen entgegenzuwirken: Die kooperative Bindung von Csp Proteinen an dem wachsenden Transkript (Grauman, 1997) oder die Wirkung der RNA-Helikasen, die bei *E. coli* (Jones, 1996), *Anabaena* PCC7120 (Chamot, Owttrim, 2000) und *B. subtilis* nach dem Kälteschock identifiziert wurden. Die RNA-Helikasen entfernen nicht nur die Sekundärstrukturen, sondern schützen die RNA auch vor dem Abbau durch RNAsen, besonders unter den Bedingungen der Entkopplung von Transkription und Translation (Iost, 1994). Für einige RNA-Helikasen wird auch eine Funktion an der Ribosombiogenese diskutiert.

In einigen Studien wird über eine verstärkte Expression der Proteine, die an der normalen Ribosombiogenese oder Translationsmaschinerie beteiligt sind, berichtet. In *S. meliloti* wurde eine vorübergehende Induktion des rRNA-Operons nach dem Kälteschock beobachtet

(O'Connel, 2000). Das kann auf den *de novo* Aufbau von Ribosomen deuten. Die ribosomasoziierten Proteine CsdA und RbfA (Dammel, 1995) wurden in *E. coli* auch als kälteinduziert beschrieben.

RbfA („ribosome binding factor A“) wurde als Mehrfachkopien-Supressor einer kältesensitiven 16S RNA Mutation entdeckt und bindet ausschließlich an die 30S Untereinheiten und nicht an 70S Ribosomen oder Polysomen. Die Deletion dieses Gens führt bei Kälte zu schweren physiologischen Defekten in der Zelle und beeinträchtigt die Wiederaufnahme der Protein-synthese am Ende der Akklimatisierungsphase. Die Überexpression von RbfA verkürzt die Dauer der Adaptation im Vergleich zum Wildtyp *E. coli*. Studien zeigen, dass RbfA an der Initiation der Translation und an der Ribosombiogenese eine Rolle spielt (Moll, 2002).

CsdA (früher DeaD), ein Protein der RNA-Helikasenfamilie, wird mit den 30S, 50S und 70S Ribosomenuntereinheiten assoziiert und entwindet ATP-abhängig die Sekundärstrukturen. Es wurde ursprünglich als Mehrfachkopien-Supressor der temperatursensitiven Mutation im Gen für das S2 ribosomale Protein *rpsB* isoliert (Toone, 1991). Bei nichtpermissiver Temperatur kann die Mutante kein S2 und anschließend kein (in *E. coli* essentielles) S1 Protein rekrutieren, und die Überexpression von CsdA bringt die beiden Proteine zurück. Somit ist CsdA wie auch RbfA an der Biogenese der Ribosomen bei *E. coli* beteiligt. In *B. subtilis* wurde auch eine erhöhte Menge von mRNA dieser Proteine nach dem Kälteschock nachgewiesen (Beckerling, 2002, Kaan, 2002), was darauf schließen lässt, dass dieser Mechanismus nicht nur *E. coli* spezifisch ist.

Die meisten Arbeiten vermuten die passive Inaktivierung der Ribosomfunktion, aber man kann nicht ausschließen, dass die Zelle aktiv die Translation blockiert. Bei *E. coli* wurde zum Beispiel ein kälteinduziertes pY Protein (kodiert durch *yfiA* Gen) identifiziert, welches sich in dem 70S Ribosom zwischen die 30S und 50S Untereinheit setzt und die Translation durch Blockieren der Bindung der Aminoacyl-tRNA an der A-Site inhibiert (Agafonov, 1999 PNAS). Dieses Protein verschwindet zum Ende der Anpassungsphase parallel zur Wiederaufnahme des Wachstums und ähnelt damit den Csp Proteinen.

70S Ribosomen können bei Kälte ziemlich effektiv die so genannten Leaderless-mRNAs translatieren, die keinen 5'-Bereich und keine Shine-Dalgarno Sequenz beinhalten. Bei normaler Temperatur ist die Effizienz der Translation von diesen viel geringer, als von den kanonischen mRNAs, bei niedriger Temperatur werden sie dagegen relativ effektiver translatiert.

Die effektive Translation von diesen mRNAs unter der Blockade von der Initiation der Translation (z.B. durch Kasugamycin) bringt sie den CSPs näher. In Gegenwart von erhöhten Mengen von dem IF2 Initiationsfaktor, wie es bei *E. coli* nach dem Kälteschock der Fall ist (Jones, 1987) oder bei reduzierten Aktivitäten von dem S1 Protein oder IF3, wird diese Klasse der mRNAs verstärkt translatiert. Man kann vermuten, dass bei Kälte die Leaderless-mRNA der ungewöhnlichen Gene, die bei der Genomanalyse unentdeckt bleiben, translatiert wird und eine wichtige Rolle bei der Kälteadaptation spielt.

1.2.3 Aufnahme von Osmolyten in die Zelle

Die Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Osmolyten in der Zelle ist ein bekannter Mechanismus der Adaptation an den osmotischen Schock. Als Osmolyten dienen die niedermolekularen Stoffe wie Polyole, Polyamine, Zucker, Aminosäure und ihre Derivate. Obwohl ihre genaue Funktion unbekannt bleibt, wird eine Funktion als „chemische Chaperone“ für diese Stoffe vermutet. Sie stabilisieren die Proteine und vermeiden damit die Denaturierung und Aggregation oder neutralisieren die Radikale. Die Bakterien haben zwei Möglichkeiten, die Konzentration der Osmolyten in der Zelle zu erhöhen: Entweder durch *de novo*-Synthese oder durch Aufnahme aus der Umgebung.

Am Beispiel von einigen Bakterienspezies wurde gezeigt, dass der Transport von Osmolyten in die Zelle auch beim Überleben des Kälteschocks eine wichtige Rolle spielt (Kandror, 2002). Die Ähnlichkeit des Kälteschocks und des osmotischen Schocks liegt in der Änderung der Wasserverhältnisse und Löslichkeit der löslichen Substanzen. Die Osmolyten erhöhen die Viskosität und senken den Gefrierpunkt des Zytoplasmas und vermindern die Diffusionsraten der löslichen Komponenten. In *E. coli* führt die Senkung der Temperatur von 37°C auf 16°C zur Akkumulation des Disaccharids Trehalose, das von den Proteinen des *otsAB* Operon synthetisiert wird. Die mRNA dieses Operons wurde in der Zelle auf erhöhtem Niveau nachgewiesen. Die $\Delta otsA$ Mutante war bei 16°C unauffällig, wies aber bei 4°C einen erheblichen Wachstumsdefekt auf. Die Backhefe aktiviert einen ähnlichen Mechanismus der Trehalosebiosynthese als Antwort auf Hitze- und Kältestress (Sola-Penna, 1997).

Andere Bakterien, wie zum Beispiel, *L. monocytogenes*, nehmen die Osmolyten von der Umgebung auf. Dabei werden Glycin, Betain und Carnitin in die Zelle unter Verwendung der Energie von ATP-Hydrolyse oder Phosphorylierung transportiert. In *Corynebacterium gluta-*

micum wurde der Glycin-Betain Transporter *BetP* als das einzige von den vier vorhandenen Osmolytaufnahmesystemen spezifisch als Antwort auf Kältestress induziert (Ozcan, 2005). Ähnliche Transportsysteme existieren in vielen Bakterienspezies und sind möglicherweise auch bei der Adaptation der anderen Bakterienspezies an die Kälte beteiligt.

1.2.4 Aufrechterhaltung der Fluidität der Membranlipide

Die Zellmembran ist die äußerste Grenze der Zelle und trägt wichtige Funktionen, wie Formhaltung, Transport, Atmung und Signalaufnahme, die durch die veränderte Fluidität der Lipide nach der Temperatursenkung beeinträchtigt werden. Das optimale Fließvermögen der Membran ist für die Beweglichkeit von eingebetteten Proteinmolekülen und damit für die effektive Funktion der Proteinkomplexe notwendig. Um den Schmelzpunkt der Lipide zu senken, bauen die Bakterien Spezies-abhängig Fettsäuren mit niedrigerem Schmelzpunkt in die Lipide ein. Drei allgemeine Strategien existieren, um der Verhärtung der Membran entgegenzuwirken: Verkürzung der Acylkette, Verzweigung der Kette und Einführung von *cis*-Doppelbindungen. Sie alle führen zur Abschwächung der Van-der-Waals-Interaktionen zwischen den benachbarten Lipidmolekülen. Die Verkürzung der Kette und die Methyl-Verzweigung sind streng von der *de novo* Synthese abhängig. Dagegen können die Doppelbindungen anaerob während der Synthese eingeführt werden, wie es für *E. coli* (Suutari, 1994) und *S. pneumoniae* (Marrakchi, 2002) demonstriert wurde, oder bei der aeroben Modifizierung durch das Enzym Desaturase entstehen. Diesen Weg nutzen Cyanobakterien (Los, 1999) und *Bacilli* (Los, 1998). *E. coli* hat die einfachste Zusammensetzung der Lipid-Doppelschicht, die in der Natur gefunden wurde. Die Membran von *E. coli* besteht aus einer gesättigten Palmitinsäure (Hexadekansäure) und zwei ungesättigten Säuren: Palmitoleinsäure (*cis* 9-Hexadekaensäure) und Vaccensäure (*cis* 11-Oktadekaensäure). Die Senkung der Temperatur führt zur Erhöhung des Gehalts an Vaccensäure und zur Minderung des Gehalts an Palmitinsäure in den Membranlipiden (Marr, 1962). *E. coli* besitzt drei Enzyme, die für die Synthese der Fettsäuren zuständig sind und welche von den Genen *fabA*, *fabB* und *fabF* kodiert werden. FabA ist die β -Hydroxydecanoiltransferase, das Schlüsselenzym der anaeroben Synthese der Fettsäuren, das die *cis*-Doppelbindung ins 10-Kohlenstoffintermediat einführt. Dieses Zwischenprodukt wird dann durch die Ketoacylcarrier-Protein-Synthasen FabB und FabF in jedem Schritt um eine zwei-Kohlenstoffeinheit verlängert, bis die Kette 12, 14, 16

oder 18 Kohlenstoffatome hat. Bei niedriger Temperatur wird *cis*-Vaccensäure in höheren Mengen produziert, als bei 37°C. Das liegt an der Reaktivität zu den Substraten der β -Ketoacyl-ACP Synthase FabF, die Palmitoleinsäure zu Vaccensäure konvertiert und bei 25°C höhere Aktivität aufweist und damit als Kontrollmechanismus der Temperaturanpassung der Zytoplasmamembran bei *E. coli* dient.

Über die Anpassung der äußeren Membran der gram-negativen Bakterien gibt es nur wenige Daten. Die Hauptkomponente des Lipopolysaccharid ist Lipid A, das als Träger für die Verankerung des immunologisch bedeutsamen O-Antigen Polysaccharids dient. Für *E. coli* und *Salmonella* wurde gezeigt, dass die *de novo* Synthese des Lipids A unter Kälteschock verändert wird. Nach dem Kälteschock wird die Palmitoleil-ACP-abhängige Acyltransferase LpxP induziert, und ihre Aktivität ersetzt den LpxL-abhängigen Einbau von Laurat durch den Einbau von ungesättigtem Palmitoleat, das eine wesentlich niedrigere Schmelztemperatur hat (Carty, 1999). LpxP ist das erste Protein, für welches eine anpassende Funktion an der Zelloberfläche von *E. coli* berichtet wurde (Vorachek-Warren, 2002). Außerdem wurden die Homologe des *lpxP* Gens in den gram-negativen Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella enterica* identifiziert, die längere Zeit in der Außenwelt überleben müssten. Diese fehlen bei den pathogenen Arten, die direkt von Wirt zu Wirt übertragen werden.

Die Diffusionsrate für viele Stoffe ist bei niedriger Temperatur auch verändert. In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass die Porene (Proteine von den Diffusionsporen auf der Außenmembran der *E. coli*) OmpF und OmpC auch temperaturreguliert werden. Die Anzahl der Poren bleibt konstant, aber das größere Porenbildende Protein OmpF wird stärker exprimiert, während die Synthese von OmpC inhibiert wird, was die beeinträchtigte Diffusion ausgleichen soll (Lundrigan, 1984).

Manche antarktische marine psychrophile Bakterien sowie die Cyanobakterien wie *Synechocystis* sp. PCC6803 enthalten mehrfach ungesättigte Fettsäuren in den Lipiden ihrer Zellmembran. Die Einführung von mehr als zwei Doppelbindungen in die Acylkette hat nur minimalen Einfluss auf die Schmelztemperatur des Lipids, aber dieses beeinflusst die Verpackung der Lipide und verhindert die Bildung von Nicht-Doppelschicht-Strukturen in der Membran. Die mehrfach ungesättigten Fettsäuren scheinen für die richtige Funktion der Photosynthesemaschinerie wichtig zu sein (Tasaka, 1996) Für die Synthese der Lipide mit mehrfach ungesät-

tigten Fettsäuren besitzt *Synechocystis* sp. PCC6803 vier Desaturasen, die nacheinander je eine Doppelbindung in ihre Substratlipide positions-spezifisch einführen (Los, 1999).

Die gram-positiven Bakterien besitzen alternative Möglichkeiten, die optimale Fluidität der Membran aufrechtzuerhalten, weil sie im Gegensatz zu *E. coli* mehr iso- und anteiso-verzweigten Fettsäuren enthalten.

B. subtilis hat zwei Möglichkeiten, das Fliessvermögen der Membran nach dem Kälteschock wiederherzustellen: Erhöhung der Proportion von *anteiso*-verzweigten C-15-C17 Fettsäuren durch *de novo* Synthese (Klein, 1999) oder Entsättigung der vorhandenen gesättigten Fettsäuren mit Hilfe der Desaturase. Die Lipide mit *anteiso*-verzweigten Fettsäuren haben einen niedrigeren Schmelzpunkt als die mit den *iso*-verzweigten Formen. Wenn die ungesättigten Fettsäuren neu synthetisiert werden, dienen die aus den Aminosäuren Isoleucin, Leucin und Valin gewonnene α -keto-Säuren als Primer. Dabei ist Isoleucin ein Vorläufer der *anteiso*-verzweigten Fettsäuren, und Leucin und Valin der *iso*-verzweigten (Kaneda, 1962).

Der Vergleich von Transkriptomanalysen bei *B. subtilis* nach dem Kälteschock zeigte signifikante stammspezifische Unterschiede in den Mechanismen der Anpassung der Membranfluidität an die Kälte. Der Stamm *B. subtilis* Marburg 168 induzierte das *bkd* Operon, das die Gene für den Abbau der nicht-polaren Aminosäuren und den Einschluss von Isoleucin in die Lipidbiosynthese kodiert (Kaan, 2002). Im Stamm *B. subtilis* JN642 war dieses Operon runterreguliert (Beckering, 2002). Das stimmt mit den früheren Ergebnissen überein, die zeigten, dass die Kälteanpassung durch Synthese von *anteiso*-verzweigten Fettsäuren ohne exogene Isoleucinquellen beeinträchtigt ist (Klein, 1999, Weber, 2001). Dafür wurde in diesem Stamm das *desKR* Operon verstärkt transkribiert, das ein Zweikomponentensystem für die Regulation der Fettsäure-Desaturase *desA* kodiert. Es wurde vermutet, dass das *desRK* Zweikomponentensystem als ein allgemeiner Termosensor in *B. subtilis* funktioniert, aber nähere Untersuchungen zeigten, dass seine regulatorische Aktivität sich nur auf die *desA* Desaturase bezieht (Beckering, 2002). *DesA* ist die einzige Desaturase, die für die Doppelbindungen bei der Synthese aller Arten der ungesättigten Fettsäuren in *B. subtilis* zuständig ist (Weber, 2001). Sie führt *cis* Doppelbindungen an der $\Delta 5$ Position verschiedener gesättigten Fettsäuren direkt an der Membran ein, was den *B. subtilis* - Zellen eine schnelle Veränderung der vorhandenen Lipide ermöglicht. Nach dem Kälteschock führt die Induktion auf der Transkriptionsebene und nicht die mRNA Stabilisierung des *desA* Gens zur Anreicherung des *desA* Transkripts (Aguilar, 1999). Die

anteiso-verzweigten Fettsäuren haben für die Kälteadaptation der Zellmembran eine vergleichbare Bedeutung wie die ungesättigten Fettsäuren, und diese zwei Mechanismen können sich kompensieren. Das ist durch die Experimente bestätigt, wo eine $\Delta desA$ Mutante zwar im reichhaltigen Medium unverändertes Wachstum bei Kälte aufwies, dagegen aber in Abwesenheit der externen Isoleucinquellen im Wachstum stark beeinträchtigt war (Aguilar, 1998, Weber, 2001)

DesA unterliegt der strengen Kontrolle des *desKR* Zweikomponentensystems. *DesK* (*yocF*) kodiert das Protein mit vier transmembranen Segmenten, die eine Sensordomäne bilden, und einem langen C-terminalen Schwanz, der einen Histidinrest trägt, der autophosphoryliert werden kann. Die C-terminale Kinasedomäne untergeht der Autophosphorylierung und dient danach als Phosphat-Donor für das Effektor-Protein DesR, das in der phosphorylierten Form an der DNA in Positionen -28 bis -77 vor *desA* bindet. Damit ist das DesR Protein ein direkter Transkriptionsaktivator für *desA*.

Das oben beschriebene System der Desaturierung der Fettsäuren ist nicht nur für *Bacillus* spezifisch. Im Cyanobakterium *Synechocystis* (Suzuki, 2000, Suzuki, 2001) wurde eine andere Histidinkinase Hik33 beschrieben, die aber in Kontrast zu DesK nicht nur die Desaturase *desD*, sondern auch 17 andere kälteinduzierte Gene reguliert und als globaler Kältesensor angesehen wird (Inaba, 2003). In anderen Studien mit Cyanobakterien wurde gezeigt, dass das veränderte Fließvermögen der Zellmembran als Kältesensor bei Bakterien dient. Eine künstlich durch Pb-Ionen hervorgerufene Verhärtung der Membran führte auch zur Expression des *desA* Gens, das die $\Delta 12$ Desaturase kodiert.

1.2.5 Veränderungen im allgemeinen Metabolismus

Obwohl die Kälteschockantwort in letzter Zeit ziemlich intensiv untersucht wurde, gibt es nicht viel Information über den Zellmetabolismus nach der Senkung der Temperatur. Es gibt keine Untersuchungen zu der Energieladung der Zelle, die durch das Verhältnis ATP/ADP oder den GTP Gehalt abgeschätzt werden kann. Beide Parameter dienen als metabolische Signale für die Regulation und Modulation der Gene. Es ist aber offensichtlich, dass mit der Veränderung der Diffusionsraten und Konformationsänderungen der Zellstrukturen komplexe Netzwerke umorganisiert werden.

Unter optimalen Bedingungen sind die Bakterien auf schnelle Zellteilung programmiert und enthalten entsprechende Mengen an Enzymen, Nährstoffen und Metabolyten, um diese Funktion zu erfüllen. Die Temperatursenkung führt zu der Verzögerung der Reaktionsraten nach der Arrhenius Gleichung, und das bringt die Zelle nach dem Kälteschock in die Situation des Metabolytenüberschusses. Bei *E. coli* Zellen wurde nach dem Kälteschock eine verminderte Konzentration von (p)ppGpp demonstriert, das auf einen Überschuss an geladenen tRNAs über nichtgeladenen tRNAs deutet. (Mackow, 1983).

In Anlehnung an diese Tatsache wird die globale Repression der metabolytisch relevanten Gene erwartet, begleitet von der selektiven Induktion der Gene für die Regulation der kritischen Engpässe. Diese Vermutung wurde auch durch zwei Microarray-basierte Studien über Kälteschock bei *B. subtilis* (Beckering, 2002, Kaan, 2002) und Proteomanalysen (Graumann, 1996, Mohavedi, 2002) bestätigt. Während die Gene für Metabolismusprozesse wie Glykolyse, Zitronensäurezyklus und Biosynthese der Aminosäuren, Nukleotide und Cofaktoren reprimiert werden, werden die Gene von Proteinen induziert, die das Fliessvermögen der Membran wiederherstellen, den Transport, den Lipidmetabolismus und die Funktion der Translationsmaschinerie gewährleisten. Eine Studie zur Kälteadaptation bei der Käsefermentation bei *Lactococcus lactis* demonstrierte die Limitierung der Enzymaktivitäten für die meisten Glykolyse-schritte, während die Gene der alternativen metabolischen Wege, die von den Glykolyse-zwischenprodukten abgeleitet werden, induziert waren (Raynaud, 2005).

Der allgemeine Stickstoffmetabolismus weist auch eine Temperaturabhängigkeit auf. Am Beispiel von dem breiten Spektrum von Bakterien und Algen wurde eine unterschiedliche Affinität zu anorganischen Stickstoffquellen bei unterschiedlichen Temperaturen demonstriert (Reay, 1999). Nitrat und Ammonium sind die wichtigsten Stickstoffquellen in den meisten natürlichen Ökosystemen. Ammonium wird auch bei niedrigeren Konzentrationen gegenüber Nitrat stark bevorzugt und inhibiert die Nitrataufnahme. Nitrat wird durch das aktive ATP-anhängige Transportsystem aufgenommen, Ammonium dagegen kann auch frei durch die Zellmembran diffundieren, und eine passive Aufnahme trägt zu der Stickstoffversorgung bei. Der aktive Transport von Nährstoffen, in diesem Fall Nitrat, kann durch die niedrige Temperatur beeinträchtigt werden, indem entweder die Konformation der Trägerproteine verändert wird, welches die Interaktion mit den anderen Membranproteinen verhindert, oder die

Substratzufuhr zu den Transportproteinen vermindert. Die passive Aufnahme von Ammonium wird durch die niedrige Temperatur weniger beeinflusst.

1.2.6 Übersicht über *Listeria monocytogenes*

Der Genus *Listeria* ist eine Gruppe von gram-positiven nicht sporulierenden Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt. Taxonomisch ist die Gattung *Listeria* den Genera *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* und *Staphylococcus* nah verwandt. Morphologisch sind sie Stäbchen ohne Kapsel, die bei Temperaturen unter 25-30°C durch peritrich angeordnete Flagellen beweglich sind (Collins, 1991). In der Natur werden sie aus mehreren Habitaten isoliert, wie z.B. Böden, Gewässer und verfaulendem Pflanzenmaterial, wo sie als Saprophyten leben. Aus Meeresfrüchten, Milch- und Fleischprodukten und asymptomatischen humanen Trägern und Tieren konnten auch einige *Listeria* Stämme isoliert werden (Seeliger, 1970). *Listeria* können im pH Bereich von 4,5 bis 9, bei Salzkonzentrationen bis 10% NaCl und bei Temperaturen zwischen 0 und 45°C wachsen (Duffi, 1994).

Der Genus *Listeria* besteht aus 6 Spezies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* und *L. grayi*. Nur zwei von diesen, *L. monocytogenes* und *L. ivanovii*, sind pathogen. *L. ivanovii* steht fast nur in Verbindung mit Infektionen bei Tieren, und *L. monocytogenes* kann schwere Erkrankungen bei Tier und Mensch verursachen. Bei den Tieren ist *L. monocytogenes* hauptsächlich mit neurologischen und reproduktiven Erkrankungen assoziiert (Czuprynski, 2005). Beim Mensch tritt Listeriose in Form von Gastroenteritis, Meningoenzephalitis, Septikämie, Frühgeburten und pränatalen Infektionen auf (Vazquez-Boland, 2001). Mit 2 bis 10 Fällen pro einer Million Einwohner ist Listeriose beim Menschen in Europa nicht so häufig vertreten. Trotzdem ist sie für die höchste Rate der Krankenhauseinweisungen (bis 91%) unter den Lebensmittel-verursachten Erkrankungen verantwortlich und verursacht sowohl Einzelfallerkrankungen, als auch Ausbrüche (Jimmi et al, 2006). Sie ist durch eine hohe Mortalitätsrate von 20-30 % bei den Personen gekennzeichnet, bei den sich die Infektion entwickelt (Mead, 1999). Dieses macht Listeriose zu einer gefährlichen Erkrankung. Listeriose ist überwiegend eine Lebensmittelinfektion und 99 % der Fälle entstehen durch Verzehr kontaminierter Lebensmittel (Mead, 1999). Natürliche Widerstandfähigkeit und Allgegenwärtigkeit ermöglichen es *L. monocytogenes* an allen Stufen der Lebensmittelproduktionskette einzutreten und sich auch während der Bearbeitung und Lagerung zu vermehren. In

den meisten Fällen ist rohes Fleisch wenig oder moderat kontaminiert, aber die Lebensmittel, die mit den Erkrankungsausbrüchen in Verbindung gestellt wurden, haben Kontaminationslevel über 1000 KBE/g⁻¹. Bei der Massenproduktion, z.B. des Schweinefleisches, in den großen Fabriken ist das Kontaminationsrisiko durch Kreuzkontamination höher, als in den individuellen Bauernhöfen (Thevenot, 2006). *Listeria* wird aber überwiegend in Käse, Fleisch- und Milchwaren nachgewiesen. Desweiteren wurde gezeigt, dass Backwaren mit hoher Feuchtigkeit auch gelegentlich mit *Listeria* kontaminiert sind (Smith, 2004).

Das Vorhandensein der Sequenzdaten ermöglicht detaillierte Studien über die Anpassung der Listerien an unterschiedliche Umweltfaktoren und den Virulenzmechanismus, durch z.B. die Entwicklung von Ganzgenom-DNA-Arrays (Chattrejee, 2006). Es wurden bereits die vollständigen Genomsequenzen von *L. monocytogenes* EGD-e (Serotyp 1/2a) (Glaser et al., 2001), *L. monocytogenes* F2365 (Serotyp 4b) (Nelson, 2004), *L. innocua* CLIP 11262 (Serotyp 6a) (Glaser, 2001) und die inkomplette Genomsequenzen von *L. monocytogenes* F6854 (Serotyp 1/2a) und *L. monocytogenes* H7858 (Serotyp 161 4b) (Nelson, 2004) publiziert. Die Sequenzierung der Genome der apathogenen *L. welshimeri* SLCC 5334 (Serotyp 6b), *L. seeligeri* SLCC 3954 (Serotyp 1/2b) und *L. ivanovii* 164PAM 55 (Serotyp 5) wurde auch beendet. Auf der Basis dieser Daten wurden Rückschlüsse über Herkunft und Evolution der Pathogenität des Genus *Listeria* gezogen (Hain, 2006).

1.2.7 Virulenzfaktoren, Verbreitung, Infektion

Gesunde Erwachsene sind trotz dauernder Exposition mit *L. monocytogenes* recht selten von Krankheitssymptomen betroffen. Die natürliche Trägerrate beträgt ca. 30 % (Kampelmacher, 1969). Listeriose betrifft vor allem immunkomprimierte Personen, Kleinkinder, ältere Menschen, Krebskranke, Alkoholiker, sowie Schwangere (Gellin, 1989). Nachdem die Bakterien die Blut-Hirnschranke überwunden haben, tritt Meningitis auf. Im weiteren Verlauf der zerebralen Infektion kann es zu einer Meningoenzephalitis kommen. Die massive Infektion kann zu Sepsis (Blutvergiftung) führen. Bei schweren Fällen der Listerien-Meningitis beträgt die Letalitätsrate bis zu 30 %, bei Inkubationszeiten von wenigen Tagen bis zu einigen Wochen (Schuchat, 1991). Bei Schwangeren wird durch die Übertragung des Bakteriums über die Plazenta-Schranke den Fötus geschädigt. Es kommt zur pränatalen Infektion (Granulomatosis infantiseptica). Hierbei entwickeln sich in fast allen Gewebetypen und Organen des Fötus

oder Neugeborenen multiple Abszesse und Granulome, so dass es durch die bakterielle Infektion zu Fehl- und Totgeburten kommt.

L. monocytogenes wird hauptsächlich durch Lebensmittel übertragen und oral aufgenommen. Nach oraler Aufnahme der Listerien in den Magen-Darm-Trakt vermehren sie sich vorzugsweise in den Peyer'schen-Plaques im Dünndarm (Pron, 1998; Jensen 1998) und treten dadurch in den Wirtskörper ein. Der andere nicht weniger effektive Aufnahmemechanismus ist durch die Intestinalvilli apikal (Karunasagar, 1994). Über die M-Zellen der Peyer'schen-Plaques können Listerien benachbarte Enterozyten (Mengaud, 1996) des Darmepithels invadieren, oder über die Lymph- und Blutbahn extrazellulär in andere Organe, wie Leber und Milz, eindringen. In der Leber werden sie von den Kupfferschen Zellen, residenten Makrophagen der Leber, aufgenommen und abgetötet (Lepay, 1985). Die noch überlebenden Listerien dringen in Hepatozyten ein. Die Eliminierung der befallenen Hepatozyten erfolgt durch Neutrophile (Rogers, 1993).

L. monocytogenes ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium und umgeht dadurch die humorale Immunantwort des Wirtes. Das bietet im auch Schutz vor Antibiotika während der Behandlung. Es kann sich in Phagozyten und nicht phagozytierenden Zellen vermehren (Vazquez-Boland, 2001). Die Aufnahme in die eukariotische Zelle durch die membran-gebundene Vakuole wird durch die Proteine InlA und InlB auf der Oberfläche des Bakteriums ausgelöst (Gaillard , 1991; Lecuit, 1997). Nach der Aufnahme in die Zelle wird die Lipidmembran durch Aktivierung von zwei Enzymen (Hämolysin LLO und Phospholipase PlcA) im niedrigen pH Milieu lysiert und die Listerien treten ins Cytosol aus, wo sie sich vermehren. Das ActA Protein dient der intra- und interzellulären Bewegung der Bakterien. Dieses geschieht durch Bildung eines Aktinschweifes und Invasion in die Nachbarzellen, wobei die doppelte Membran mit Hilfe von LLO und Phospholipase C (PlcB) lysiert wird und die Bakterien auf diese Art die Nachbarzelle infizieren.

Die Virulenzfaktoren sind bei *L. monocytogenes* in getrennte Cluster organisiert. Das Internalin-Lokus exprimiert die Proteine InlA und InlB, die an Adhäsion und Internalisation des Erregers beteiligt sind (Lingnau 1991) Diese Proteine gewährleisten den Tropismus zu den spezifischen Wirtszellen durch Bindung von InlA an humanem E-Cadherin und InlB an dem Rezeptor für den Komplement-Faktor C1q (gC1q-R), den Rezeptor für den Hepatozytenwachstumsfaktor (c-Met) und Glykosaminoglykanen (Pizarro-Cerda 2004).

Das zweite Cluster wurde früher als VGC („virulence gene cluster“) bezeichnet und beinhaltet die Gene *prfA*, *plcA*, *hly*, *actA*, und *plcB*, die intrazelluläres Überleben ermöglichen. Dazu gehören auch drei offene Leseraster *orf X,Y,Z* deren genaue Funktion unbekannt ist. Es befindet sich auf dem Chromosom von *L. monocytogenes* zwischen *prs* und *ldh* und wurde später in LIPI-1 umbenannt („Listeria pathogenicity island“) (Vazques-Borland et al., 2001). Dieser Lokus wurde bei der humanpathogenen Spezies *L. monocytogenes* und bei dem tierpathogenen *L. ivanovii* identifiziert und ist bei den apathogenen Spezies mit Ausnahme von *L. seeligeri* abwesend (Gouin 1994, Leimeister-Wächter 1989, Haas 1992). Bei *L. seeligeri* trägt es allerdings eine Insertion zwischen den *prfA* und *plcA* Genen in Form von einem ORF in der entgegengesetzten Orientierung, welches die positive Autoregulation der Gene zerstört, die für die Regulation der *prfA*-abhängigen Virulenzgene notwendig ist (Karunasagar, 1997). Das 22 kb große Virulenzcluster LIPI-2 ist nur für *L. ivanovii* spezifisch und enthält Gene von Internalinen und SmcL (Sphingomielase) (Dominquez-Bernal, 2006). Es spielt wichtige Rolle in der Pathogenität und Wirtsspezifität von *L. ivanovii*.

Der „Positive regulatory factor A“ PrfA ist der Regulator, der die Expression der Pathogenitätsfaktoren reguliert und für intrazelluläres Überleben essentiell ist (Leimeister-Wächter, 1990). Unter seiner Kontrolle stehen Gene des Virulenzgenclusters, *inlA*, *inlB*, *inlC*, und des Hexosephosphattransporters *uhpT*. Die Microarray-Analyse der Deletionsmutante $\Delta prfA$ hat insgesamt 73 Gene gezeigt, die in der Mutante anders reguliert wurden (Milohanic, 2003). *PlcA* (kodiert die Phosphatidilinositol- spezifische Phospholipase) und *hlyA* (kodiert das porenbildende Toxin Listeriolysin) ermöglichen den Bakterien das Entkommen aus der Vakuole. Anschließend vermehren sich die Bakterien im Zytosol. Das Oberflächenprotein ActA gewährleistet die Aktin-basierte intrazelluläre Bewegung und Verbreitung in die Nachbarzelle durch die Bildung eines Aktinschweifs beim Kontakt mit der Zellmembran.

Es wurde gezeigt, dass die Virulenzfaktoren nur während der Infektion in einem Wirt exprimiert werden. Es wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen, wie das Bakterium seine Lage innerhalb oder außerhalb des Wirtes erkennt. Das am besten untersuchte Model ist die Erkennung der Außentemperatur durch Bildung der alternativen Sekundärstrukturen in der nicht-translatierten Region (UTR) der mRNA des PrfA Regulators (Johansson, 2001). Bei 30°C wird eine Sekundärstruktur gebildet, die die Ribosombindungsstelle verdeckt und damit die

Translation von PrfA verhindert. Bei 37°C dagegen wird die Sekundärstruktur geöffnet und für das Ribosom zugänglich gemacht.

1.3 Bekannte Mechanismen der Kälteadaptation bei *L. monocytogenes*

L. monocytogenes steht schon lange im Fokus des Interesses der Lebensmittelindustrie, weil die Kontaminationen zu erheblichen Schäden führen. Der Nachweis von *L. monocytogenes* ist einer der häufigsten mikrobiologischen Gründe für Rückrufe von Fleisch-, Fisch- und Milchwaren. Zu den klassischen Konservierungsmethoden in der Lebensmittelindustrie gehören Kühlung, Einfrieren, Behandlung mit hohen Temperaturen, Trocknen, Konservierung mit der Zugabe von Salz und Änderung des pH-Wertes. Sie dienen alle dazu, die Vermehrung der Mikroorganismen zu hemmen. Es wird versucht, sanfte Konservierungsmethoden zu verwenden, damit die ursprüngliche Eigenschaften der Produkte unverändert bleiben. Eine der modernen Konservierungsmethoden ist die Behandlung mit hohem Druck, der das Wachstum der Bakterien hemmt und den Geschmack, Vitamingehalt des Produktes und die Nährstoffe weitgehend unverändert lässt (Wemekamp-Kamhius, 2002). In den meisten Fällen werden verschiedene technologische Ansätze kombiniert, was dazu führt, dass die eventuell im Produkt vorhandenen Mikroorganismen gleichzeitig mehreren Stressarten wie hohe Osmolarität, niedriger pH-Wert, mangelnde Sauerstoffzufuhr und Dehydrierung ausgesetzt werden. Dabei ist es von besonderer Bedeutung zu untersuchen, ob die Adaptationsantwort auf einen Stress die Anfälligkeit zu den anderen Stressarten nicht verändert. Die Kühlung ist bei fast allen Konservierungsprozessen üblich. Die Fähigkeit der Mikroorganismen, sich bei Kühlschranktemperaturen zu vermehren, erhöht das Risiko der Kontamination bei längerer Lagerung. *L. monocytogenes* ist kein sporenbildendes Bakterium und hat damit keine Möglichkeit, die Stresssituation passiv zu überleben. Es wurden Studien durchgeführt, die einige Mechanismen der Kälteadaptation entschlüsseln. Der aktuelle Stand auf diesem Gebiet wurde im Review von Tasara und Stephan (2006) dargestellt.

1.3.1 Die Erhaltung des richtigen Fließvermögens

Die Erhaltung des richtigen Fließvermögens der Membran funktioniert bei *Listeria* durch Anpassung des Verhältnisses der Lipide mit C₁₇:C₁₅ –haltigen Fettsäuren mit Erhöhung des Anteils der C₁₅-haltigen. Dieser Effekt wurde in mehreren Studien unter unterschiedlichen

Bedingungen beobachtet (Puttmann, 1993, Jones, 1997). Annous et al., 1997 zeigten zusätzlich die veränderte Verzweigung der Fettsäuren von *iso* zu *anteiso* Varianten. Homologe des *desKR* Systems wurden in der Kälteadaptation der Membranen nicht beteiligt.

1.3.2 Osmolytenaufnahme.

Die Aufnahme der Osmolyten ist ein weiterer Mechanismus der Kälteadaptation bei Bakterien, der mit der Membran verbunden ist. *L. monocytogenes* hat keine Möglichkeit, die Osmolyten selbstständig zu synthetisieren, kann sie aber effektiv aus der Umgebung in die Zelle transportieren. In ihrer natürlichen Umwelt sind die Osmolyten in ausreichenden Mengen vorhanden, z.B. L-Carnitin in Lebensmitteln von tierischer Herkunft und Glyzin-Betain in pflanzlichen Lebensmitteln. So hat die Aufnahme zum Ziel, eine hohe intrazelluläre Konzentration der Osmolyten zu erreichen und wird sowohl beim dauerhaften Wachstum bei niedrigen Temperaturen (Bayles, 2000, Ko, 1994, Smith 1996), als auch nach dem Kälteschock aktiviert (Wemekamp-Kamphius, 2004, Angelidis, 2002, Mendum and Smith, 2002). Dykes und Moorhead. (2001) haben gezeigt, dass die Listerien, die in Gegenwart von Glycin und L-Carnitin und NaCl angezüchtet wurden, die Lagerung im Puffer bei 4°C über 4 Wochen besser überlebt haben, als die, die im Medium ohne Osmolyten angezogen wurden. Glycin betain wird hauptsächlich durch BetL Na⁺-Antiporter oder durch ATP-getriebenen GbuABC aufgenommen. Carnitin wird durch ATP-getriebenes OpuC in die Zelle transportiert. Bei der Kälte spielt GbuABC Operon die entscheidende Rolle. Die Hierarchie unter den Aufnahmesystemen unter verschiedenen Bedingungen wurde von Wemekampf-Kamphius (2004) und Sleator (2003) gezeigt.

Die andere wichtige Strategie zur Kälteadaptation bei Bakterien ist die Aufnahme von Di- und Tripeptiden, die als Osmoprotektante wirken. Bei *L. monocytogenes* wurden zwei Systeme, die die Akkumulation der Oligopeptide gewährleisten, entdeckt. Das erste ist *ntpT* (*lmo0555*) ein durch Proton-Kraft getriebenes System, welches die Akkumulation von Di- und Tripeptiden durchführt. Für *ntpT* wurde die Rolle bei der Adaptation an Salzstress und in der Pathogenität gezeigt (Wouters, 2005). Das zweite ist die Permease OppA, die zur Akkumulation der bis zu 8 Aminosäuren langen Oligopeptide führt. Die Rolle von OppA in der Kälteadaptation wurde zum ersten Mal von Borezee und Kollegen vermutet. Die hergestellte Deletionsmutante von diesem Gen im Stamm *L. monocytogenes* LO28 war unfähig, bei 5°C

zu wachsen, obwohl der Wildtyp unter verwendeten Bedingungen nach 15 Tagen die stationäre Phase erreichte (Borezee, 2000). Northern Blot Studien haben eine erhöhte Menge an Transkript dieses Gens bei 5°C im Vergleich zu 37°C gezeigt. Das dominante Transkript bei 5°C war kürzer, als bei 37°, was auf die Aktivierung eines zusätzlichen Promotors hinweist. Die genaue Rolle der Oligopeptide bei der Kälteadaptation ist nicht bekannt, aber es werden zwei Möglichkeiten diskutiert: Entweder aktivieren sie die anderen Signal-Transduktionsketten, die zu Kälteadaptation führen, oder sie dienen als Substrate für die Hydrolyse zu Aminosäurederivaten wie Prolin, die crioprotektive Eigenschaften besitzen.

1.3.3 Oberflächenproteine

Es wurde vermutet, dass auch einige andere Oberflächenproteine nach dem Kälteschock oder in der Kälteadaptation reguliert werden. Das Strukturprotein der Flagellen FlaA wird temperaturreguliert (Dons, 1992, Grundling, 2004). Die Motilität wurde bei anderen Bakterien mit Biofilmbildung als Anpassungsstrategie angesehen, oder kann der Translokation in die Umgebung mit den günstigeren Nährstoffen dienen. In der Studie von Liu (2002) wurde die mRNA des Fibronektinbindungsproteins Fbp hochreguliert.

1.3.4 Synthese der Kälteschockproteine

Die meisten Untersuchungen zur Kälteadaptation von *L. monocytogenes* wurden mit Hilfe zweidimensionaler Gelelektrophorese durchgeführt und sie identifizierten nach dem Vergleich der Proteomen vor und nach dem Kälteschock eine Gruppe der so genannten CSPs – („cold shock proteins“) Kälteschockproteinen. Nicht nur die Größe, sondern auch die Anzahl der CSPs variiert in verschiedenen Studien abhängig von den Stämmen, Bedingungen und ausgewählten Kriterien für CSPs. In der ältesten Studie von Phan-Thanh et al, 1995, wurden insgesamt 38 Proteine nach dem Kälteschock von 30°C auf 10°C induziert, 63-65 Proteine wurden reprimiert. Ein 18 kDa großes Peptid wurde nach Hitze- und Kälteschock induziert. Auf der Basis dieser Studie identifizierten Hebraud und Guzzo (2000) dieses durch Sequenzierung des N-Terminus als „ferritin like protein“ Flp. Dieses Protein wurde von anderen Arbeitsgruppen als Fri (dussurget, 2005), Dps (Polidoro, 2002) oder Frm (Mohamed, 2006) bezeichnet. Dieses Gen wurde auf der Transkriptionsebene nach beiden Hitze- und Kälteschocks

stark induziert. Sein Homolog Dps in *L. innocua* bildet einen 240 kDa großen Komplex, der anorganische Ione oxidiert und chelatiert, wobei aber in *L. monocytogenes* seine Funktion nicht identifiziert wurde (Bozzi, 1997). Erhöhte Expression des *flp* wurde auch bei konstantem Wachstum bei niedriger Temperatur nachgewiesen (Liu, 2002) und hier wurde auch die antioxidative Funktion bei der Kälteadaptation vermutet. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte auch die Beteiligung von *flp* (*fri*, Dps-like protein) an der Adaptation an oxidative Bedingungen und Eisen-Limitierung. In Mäuse-Infektionsversuchen und in J774 Makrophagen hatte die Deletionsmutante eine verminderte Überlebensrate. Olsen (2005) und Mohamed (2006) zeigten, dass dieses Protein ein Target für die humorale Immunantwort darstellt und die Deletionsmutante einen Defekt während der intrazellulären Replikation hat.

Eine andere 2-D Elektrophorese Studie (Bayles, 2002) zur Kälteadaptation von *L. monocytogenes* ergab nur 16 Proteine, die nach dem Kälteschock induziert werden. Bemerkenswert ist, dass zwei Stämme geringe Unterschiede im Expressionsprofil hatten. Während der Stamm SLC53 drei Spots (23.7, 22.0, 21.4 kDa) hatte, die im Proteinextrakt von 10430S nicht vorhanden sind, fehlten ihm zwei Peptide (19.4 und 15.5 kDa), die bei 10430S induziert wurden. Die meisten Studien zu Kälteschockproteinen sind auf die Familie der kleinen Proteine mit ähnlicher Struktur konzentriert. Als Csps werden die kleinen Proteine bezeichnet, die die „cold shock domain“ von dem eukariotischen Y-Box Protein tragen. Diese Proteine sind unter den Mikroorganismen weit verbreitet und werden nicht nur unter Kälte expremiert.

L. monocytogenes trägt auch die Proteine der Csp-Familie. Bei dem Stamm LO28 wurden 4 Peptide nachgewiesen, die mit dem anti-Csp Antikörper von *B. subtilis* reagieren. Sie alle werden auch bei dem Wachstum bei 37°C expremiert, aber Kältestress von 37°C auf 10°C verstärkt deutlich die Expression der Peptide Csp1 und Csp3 (Wemekamp-Kamphius 2002 AEM). Die maximale Expression dieser Peptide wurde in kälteadaptierten Zellen nach 20 Stunden beobachtet. Interessant ist auch, dass auch wie bei *E. coli* das CspA Protein, der hydrostatische Druck-Stress die Induktion dieser Proteine auslöste. Die Induktion der Csp-Proteine durch Druck-Stress wurde auch im Stamm *L. monocytogenes* EGD-e bestätigt (Wemekamp-Kamphius 2004 AEM). Zusätzlich hat die Vorbehandlung mit Kälteschock die Bakterienzellen vor Gefrier-Stress und hydrostatischem Druck-Stress teilweise geschützt. Der sequenzierte Stamm *L. monocytogenes* EGD-e trägt drei Homologe des *B. subtilis* CspB Pro-

teins: CspL (*lmo1364*), CspB (*lmo2016*), CspD (*lmo1879*) (Genbank). Die genaue Funktion der Csp-Proteine in *L. monocytogenes* bleibt unbekannt.

Auch wenn bei *B. subtilis* und *E. coli* für Ribosomen schon seit langem eine Termosensor-Funktion vermutet wurde und die Auswirkung des Kälteschocks auf die Proteinsynthese untersucht wurde, gibt es nur eine Arbeit, wo die Veränderung der Ribosomen nach dem Kälteschock bei *L. monocytogenes* beschrieben wurde (Bayles et al, 2000AEM). Mit Hilfe der differentiellen skanierenden Kalorimetrie wurde gezeigt, dass bei den Kälte-geschockten Ribosomen die maximale Denaturierungstemperatur und damit auch die Thermostabilität sinken.

Die Beteiligung von den globalen Regulatoren an der Kälteschockantwort wurde bei *L. monocytogenes* nicht besonders umfangreich untersucht. Moorhead et al (2004) haben gezeigt, dass die $\Delta sigB$ Mutante eine schlechtere Überlebensrate im Puffer und auf Rindfleisch bei 4°C als der Wildtyp hat, und haben daraus den Schluss gezogen, dass *sigB* bei *L. monocytogenes* zur Kälteadaptation beiträgt. Ein anderes indirektes Indiz darauf ist die *sigB*-abhängige Regulation der Osmolytenaufnahme durch *opuC* und damit auch die Rolle in der Kälteadaptation (Becker, 2000) Für *betL*, den Na⁺-getriebenen Glycin-Betain Transporter, wurden auch σ^B und σ^A -abhängige Promotoren vermutet.

Die in der Literatur vorhandenen Ergebnisse über die Kälteadaptation von *L. monocytogenes* stammen überwiegend aus 2D-Protein-Elektrophorese oder SCOTT-Analyse oder Transkriptionsanalyse einzelner Gene und geben durch die technischen Einschränkungen einzelner Methoden keinen Überblick über die Antwort des gesamten Genoms auf die Temperatursenkung. Microarray Studien über Kälteschock oder Kälteadaptation bei *L. monocytogenes* wurden noch nicht durchgeführt.

1.4 Ziel der Arbeit

Um den genaueren Überblick über Prozesse, die nach dem Kälteschock bei *L. monocytogenes* in Gang gesetzt werden, zu verschaffen, werden in der vorliegenden Arbeit folgende Ziele gesetzt:

1. Die Kälteschockantwort anhand von Transkriptomanalysen mit Hilfe der DNA Microarray-Analyse bei *L. monocytogenes* zu identifizieren. Hoch- und runterregulierte Gene mit dem signifikanten Faktor sollen identifiziert werden und ihr Expressionsprofil im Zeitverlauf nach dem Kälteschock festgestellt werden.

2. Die Deletionsmutanten von einigen durch Kälteschock induzierten Genen herzustellen und zu charakterisieren. Durch Wachstumsversuche und phänotypische Tests wird untersucht, ob diese Gene wirklich bei der Kälteanpassung eine Rolle spielen.

Induzierte und reprimierte Gene von *L. monocytogenes* werden in der komparativen Analyse mit den bekannten Untersuchungen von gram-positiven und gram-negativen Bakterien verglichen und die Kälteschockantwort bei *L. monocytogenes* wird modelliert.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 1. Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, <i>recA1</i> , <i>Invitrogen</i> <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA</i> , <i>relA1</i>	
INV α F'	F' <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁺ , m _K ⁺), <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> <i>Invitrogen</i> <i>gyrA</i> , <i>relA1</i> , ϕ 80, <i>lacZ</i> α Δ M15 Δ (<i>lacZYA</i> -argF), <i>deo R</i> ::	
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>Invitrogen</i> <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i>	
<i>Listeria monocytogenes</i>		
EGD-e	Serotyp 1/2a	Glaser, 2001
EGD-e Δ <i>cspLA</i>	Serotyp 1/2a	E. Busch
EGD-e Δ <i>flaR</i>	Serotyp 1/2a	E. Busch

Tabelle 2. Rekombinante Stämme von *Listeria monocytogenes* EGD-e 1/2a, die in dieser Arbeit hergestellt wurden.

Genotyp	Genname	Plasmid
Δ <i>lmo0866</i>	<i>rhlA</i>	
Δ <i>lmo1246</i>	<i>rhlB</i>	
Δ <i>lmo1450</i>	<i>rhlC</i>	
Δ <i>lmo1722</i>	<i>rhlD</i>	
Δ <i>lmo1067</i>	<i>bipA</i>	
Δ <i>lmo0443</i>		
Δ <i>lmo1298</i>	<i>glnR</i>	
Δ <i>lmo1327</i>	<i>rbfA</i>	
Δ <i>lmo1416</i>		

MATERIAL UND METHODEN

<i>Δlmo1516</i>	<i>nrgA</i>	
<i>Δlmo1518</i>		
<i>Δlmo2522</i>		
<i>ΔcspLA</i>		pSOG30222+ <i>cspLA</i> -Promoter
<i>EGD-e WT</i>		pSOG30222+ <i>cspLA</i> -Promoter
<i>Δlmo0866</i>		pSOG3022
<i>Δlmo1450</i>		pSOG3022
<i>Δlmo1722</i>		pSOG3022
<i>Δlmo0866</i>		pSOG3022+ <i>lmo866</i>
<i>Δlmo1450</i>		pSOG3022+ <i>lmo1450</i>
<i>Δlmo1722</i>		pSOG3022+ <i>lmo866</i>
<i>Δlmo0866Δlmo1722</i>		
<i>Δlmo1246Δlmo1722</i>		
<i>Δlmo1246Δlmo1450</i>		

Tabelle 3. Vektoren

Plasmid	Eigenschaften	Antibiotika-Resistenz	Herkunft/ Referenz
pAUL-A	<i>lacZa</i> , MCS, <i>ermC</i> , pMB9-Origin, ori ^{ts} aus pE194ts	Em ^r	Chakraborty et al., 1992
pSOG3022	Shuttle-Vektor <i>E. coli</i> - <i>L. monocytogenes</i>	Em ^r	S. Otten
pSOG30222	<i>bgaB/cat</i> - im pSOG3022	Em ^r	S. Otten
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	<i>lacZa</i> , M13- und T7-Primer-Bindungsstellen, MCS, Co-IE1-Origin	Am ^r , Km ^r	Invitrogen
pCR [®] -Blunt	<i>ccdB</i> M13- und T7-Primer-Bindungsstellen, MCS, Co-IE1-Origin	Km ^r , Zeozin [™] Resistenz	Invitrogen

Tabelle 4. Rekombinante Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Antibiotika-Resistenz	Herkunft/Referenz
pAULA+Δ0866	Integrationsvektor mit den flankierenden Bereichen von <i>lmo0866</i>	Em ^r	Diese Arbeit
pAULA+Δ1246	Integrationsvektor mit den flankierenden Bereichen von <i>lmo1246</i>	Em ^r	Diese Arbeit
pAULA+Δ1450	Integrationsvektor mit den flankierenden Bereichen von <i>lmo1450</i>	Em ^r	Diese Arbeit
pAULA+Δ1722	Integrationsvektor mit den flankierenden Bereichen von <i>lmo1722</i>	Em ^r	Diese Arbeit
pAULA+Δ1067	Integrationsvektor mit den flankierenden Bereichen von <i>lmo1067</i>	Em ^r	Diese Arbeit
pAULA+Δ0443	Integrationsvektor mit den flankierenden Bereichen von <i>lmo0443</i>	Em ^r	Diese Arbeit
pAULA+Δ1416	Integrationsvektor mit den flankierenden Bereichen von <i>lmo1416</i>	Em ^r	Diese Arbeit
pAULA+Δ2522	Integrationsvektor mit den flankierenden Bereichen von <i>lmo2522</i>	Em ^r	Diese Arbeit
pAULA+Δ1516	Integrationsvektor mit den flankierenden Bereichen von <i>lmo1516</i>	Em ^r	Diese Arbeit
pAULA+Δ1518	Integrationsvektor mit den flankierenden Bereichen von <i>lmo1518</i>	Em ^r	Diese Arbeit
pAULA+Δ1327	Integrationsvektor mit den flankierenden Bereichen von <i>lmo1327</i>	Em ^r	Diese Arbeit
pSOG3022+ <i>lmo866</i> -K	Shuttle-Vector mit Promotor und kodierender Sequenz von <i>lmo0866</i>	Em ^r	Diese Arbeit
pSOG3022+ <i>lmo1450</i> -K	Shuttle-Vector mit Promotor und kodierender Sequenz von <i>lmo1450</i>	Em ^r	Diese Arbeit
pSOG3022+ <i>lmo1067</i> -K	Shuttle-Vector mit Promotor und kodierender Sequenz von <i>lmo1067</i>	Em ^r	Diese Arbeit
pSOG3022+ <i>cspLA</i> -Promoter	<i>bgaB/cat</i> in pSOG3022 unter <i>cspLA</i> -Promoter	Em ^r	Diese Arbeit

Tabelle 5. Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
<i>2.1.1.1.1 Herstellung der Deletionsmutanten</i>	
M100	GTAAAACGACGGCCAGT
M101	CAGGAAACAGCTATGACC
0866-1-for(SalI)	ATA <u>gtcgac</u> ATTAGTGTGTTATGATGATAG
0866-2 rev	ATAATCTTATGTCATTTCTCCTTTACCTG
0866-3-for	GAAATGACATAAGATTATTAGACAAATAG
0866-4-rev(BamHI)	ATA <u>ggatcc</u> GTTAATGTAAATGACTTATTGCAC
1246-1for	ATA <u>gtcgac</u> TAACTCATTTGCAGTATCTTGC
1246-2rev	TTAAATTAGTCAGTCCTCATTTCTCAT
1246-3for	GGACTGACTAATTTAAAGAAAAGAAGGTCCAAAC
1246-4rev	ATA <u>ggatcc</u> GACGGATGCTGCCAGGTGAGA
1298-1(SacI)-for	AgagctcCATTTATACAAGGTGCGAGTTTG
1298-2-rev	CTTTTATAGACAATTCCCCCTCAA
1298-3-for	ATTGTCTAAAAAGACAAGAAGAGGTATTTAC
1298-4(PstI)-rev	ATA <u>ctgcag</u> AACCCAAGTATCTAAGTCTGG
1327-1for	ATA <u>gtcgac</u> AGACGATGTCATTGAAGCTTACG
1327-2rev	TTTATTAGTGTATTCACCTCTTTTTATAACTTC
1327-3for	GAATACACTAATAAATAAAAGTTTAAGGCAGTC
1327-4rev	ATA <u>ggatcc</u> GGAATCTGGGTAATCTTACCTG
1450-1for	ATA <u>gtcgac</u> CTTCTCGATTAGCGCCATCTAC
1450-2rev	CTCACTTAAAAATATTTCCACTCCGTTCTATAC
1450-3for	ATATTTTTAAGTGAGGAATGAATTATGCTAAG
1450-4-rev	ATA <u>ggatcc</u> AGGGTGAAGTACGATTTGCTTGG
1516(SalI)-1for	ATA <u>gtcgac</u> TGGAAAGTATGGAAGATGAAGAAGC
1516-2rev	CTCCTTTAACTCAACTCTCCTTTTTGTTAGA
1516-3for	AGTTGAGTTAAAGGAGGCAACAATATGT
1516(BamHI)-4rev	ATA <u>ggatcc</u> GGTAAACGCCATTTCTCATTGATTT
1722-1for	ATA <u>gtcgac</u> GGAGATGTCTTTTTTCAGTAGGAC
1722-2rev	CATCTTAAACCCGACTCCTTTATTAGTTC
1722-3for	CGGGTTTAAGATGCGTCGAATGTTTTTCTCTC
1722-4rev	ATA <u>ggatcc</u> ATCTTCCAAAAGCAGACTCTTGC
1067-1-for (SalI)	ATA <u>gtcgac</u> GACGTTGCTACTGGACGAG
1067-2-rev	TCGTTAATTATCTTGTTTCCTCCTAAATTA
1067-3-for	AACAAGATAATTAACGAACAAAAGACC

MATERIAL UND METHODEN

1067-4-rev(BamHI)	ATAggatccAGTGGTAGCTGCTTTATCATTGG
Del-0443 1for	5'-AATGCAAGGACCTGGTGGAG-3'
Del-0443 2rev	5'-GCTTTAATTTACACCTCTTTCATTG-3'
Del-0443 3for	5'-GTGTGAAATTAAAGCAGAACACG-3'
Del-0443 4rev	5'-TCACGACTGCAACTGGTAGAT-3'
Del-1416 1for (SalI)	5'-ATgagctcATTAAGTAGATCATTCTTCG-3
Del-1416 2rev	5'-TAAATCAGCTACCTGGCGTCCTCC-3'
Del-1416 3for	5'-CAGGTAGCTGATTTAGCCTAGTC-3'
Del-1416 4rev (PstI)	5'-ATctgcagTTCCTTGTTAGACAATCAAC-3'
Del-2522 1for (SacI)	5'-ATgagctcTTCCAATTTTCAGTTACTTTGC-3'
Del-2522 2rev	5'-GAACGAATTAGTAATTATTTTCC-3'
Del-2522 3for	5'-ATAATTACTAATTCGTTCCATATG-3'
Del-2522 4rev (XbaI)	5'-ATtctagaCGAACTCCTTATCCGTGCGAG-3'
cspL-Pr-for	5'-ATagatctTCATAATTATCTAGTAATTTTC-3'
cspL-Pr-rev	5'-ATctgcagGTTTCATGTTTCCTCCTCGTGTG-3'

Herstellung der Komplementanten

1067-1KforBamHI	AAggatccAAAAATCGTGCCAAATCGGCTC
1067-4KrevXhoI	AActcgagGCGCTTCATATTACAATAGTG
1450-K-BamHI-for	ATAggatccTTCTCGATTAGCGCCATC
1450-K-XhoI-rev	ATActcgagCTTAGCATAATTCATTCCCTCAC
1722-K-BamHI-for	ATAggatccGTGTTCAATTTAATTTTATCCAG
1722-K-XhoI-rev	ATActcgagATGGCATCCTCGCAACG
866-K-BamHI-for	ATAggatccAACGCGTATTAGCTGTATGG
866-K-XhoI-rev	ATActcgagTCATAACTAGCACCACTC

Sequenzierung der Komplementanten

866-K-seq1-for	TTCGGAGTTCGGACTGGAC
866-K-seq2-for	ATAGCCCAGAACTTATTCGTA
866-K-seq-rev	TGCAAATGCTTCGTCCCATG
1722-K-seq-for	GAAATTCAAAGCGCAATGTACC
1722-K-seq-rev	CTTTTACTTTATCGTAATGCAG

RACE

1067-SP1	TTCATGATACGTTCTACTTCTCC
1067-SP2	GTGTATCCATGATGTTTACACG
1067-SP3	CGCGGAATGTGCCTGACTG
1246-SP1	TACATTCTGTCTTGACTTGC
1246-SP2	GGAATAGCAAATGCTGCTG
1246-SP3	GTGTTGCTTCTGTATATCCT
1450-SP1	TTTGAGTAGCAAGCTCACGAC

1450-SP2	CGTAATAACCGCTTGTACTGC
1450-SP3	ATTAGCTTCTGTTGTACTTCTG
1722-SP1N	CATTACTAATTCATGTGATGGCG
1722-SP2N	GTGATACTGCAAGTACATCTGC
1722-SP3N	TTCTGTTGGCGTTTCGTAACC
866-SP1	GCAAGTTCACGTGTTGGAGC
866-SP2	AAGCTTGTACGTTGTTACTC
866-SP3	TTTACCTTCTAATCCTAGTGG
cspL-SP1	AAGTTACTGCTTGACCTTCGTC
cspL-SP2	GGATAGCGCTGAAATGTACG
cspL-SP3	CTGCGTTAAACCATTTTACTGTAC

RT-PCR und Sonden für Northern Blot

LM00000272_3 (lmo0866)	GTGGGTTTTTCTTAAGTGAACG
LM00000272_5 (lmo0866)	ATTATTGCTCCAACACGTGAAC
LM00001295_3-neu (lmo1246)	ATATGGTCAAGTAGGCGAC
LM00001295_5-neu(lmo1246)	TTCCAACACGAGAACTTGC
LM00000402_3(lmo1450)	TAGCAAGCTCACGACTTG
LM00000402_5(lmo1450)	AAAGGTGAAAGTATCATTGGCC
LM00001562_3(lmo1722)	GGTCACATTTCATCCAAAGTA
LM00001562_5(lmo1722)	AGGAGCCAATGTCAAACGT
LM00000318_3(lmo1067)	CCTGCTAATGCTACTAAATCAC
LM00000318_5(lmo1067)	ACAATGCACGTGGGACAAA
LM00002844_3(<i>cspLA</i>)	CTTTTTGAACGTTAGCTGCTTG
LM00002844_5(<i>cspLA</i>)	CGAAAACGGTGACGATGTATT

2.2 Chemikalien

Es wurden handelsübliche Chemikalien der Firmen GE Healthcare, Roche, Merck, New England Biolabs, Roth, Fermentas, Qiagen, Serva und Sigma-Aldrich eingesetzt.

Oligonukleotid-Synthesen wurden bei den Firmen Operon, Metabion und Sigma-Aldrich in Auftrag gegeben.

Die Restriktionsendonukleasen wurden von New England Biolabs und Fermentas, *Taq*-Polymerase von Invitrogen und Alkalische Phosphatase von Roche (Mannheim) bezogen.

Kits und Reagenzien für RNA-Arbeiten sind von Amersham, Roche Molecular Diagnostics und Ambion.

2.3 Nährmedien, Medienzusätze, Puffer und Lösungen

E. coli-Stämme wurden in der Regel mit Luria-Bertani (LB)-Medium angezogen.

1% [w/v]	Trypton	10
0,5% [w/v]	Hefeextrakt	5 g
0,5% [w/v]	NaCl	5 g
	H ₂ O	ad 1000 ml

Das für die Anzucht von *L. monocytogenes* verwendete Brain Heart Infusion (BHI)-Medium enthielt 37 g Brain Heart Infusion Broth (Difco, Augsburg) in 1 l H₂O.

Bei Herstellung fester Nährmedien wurden dem LB- und BHI-Medium außerdem 2% [w/v] Agar (Sigma-Aldrich) hinzugefügt.

Für die Herstellung der chemisch kompetenten *E. coli* Zellen (nach Inoue *et al.*, 1990) wurde die Kultur im SOB-Medium angezogen:

2% [w/v]	Trypton	5,0 g
0,5% [w/v]	Hefeextrakt	1,25 g
10 mM	NaCl	0,145 g
2,5 mM	KCl	0,045 g
10 mM	MgCl ₂ ·6 H ₂ O	0,5 g
10 mM	MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,615 g
H ₂ O		ad 250 ml

Das SOC-Medium, in welchem die *E. coli*-Zellen nach der Transformation zur anschließenden Expression der Antibiotikaresistenz resuspendiert wurden, enthielt zusätzlich zu den Komponenten des SOB-Mediums noch 20 mM Glukose.

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen nach der von Chung *et al.* (1989) beschriebener Methode wurde TSS-Medium verwendet:

10% [w/v]	PEG 6000	10,0 g
5% [v/v]	DMSO	5,0 ml
50 mM	MgSO ₄	2,5 ml (einer 2 M Stammlsg.)
	LB-Medium	ad 100 ml

2.3.1 Standardpuffer

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

MATERIAL UND METHODEN

10 x TBE: 108 g Tris; 55 g Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 ad 1 l ddH₂O
10 x TBS: 0,2 M Tris; 1,37 M NaCl, pH 7,6
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

CCMB 80: 80mM CaCl₂·2H₂O
20mM MnCl₂·4H₂O
10mM MgCl₂·6H₂O
10mM K- Acetat
10%[v/v] Glycerol
pH 6,4 mit 0,1 M HCl

<u>10 x PCR-Puffer A:</u>		<u>Endkonz.:</u>
1 M Tris·HCl (pH 8,3)	200 µl	200 mM
1 M MgCl ₂	20 µl	20 mM
1 M KCl	250 µl	250 mM
10% [v/v] Tween 20	50 µl	0,5% [v/v]
10 mg/ml Gelatine	100 µl	1 mg/ml
H ₂ O ad 1000 µl		

5 x Auftragungspuffer (Agarose-Gelelektrophorese):

25% [w/v] Ficoll Typ 400
0,25% [w/v] Bromphenolblau
in TE 10.1-Puffer

TE –Puffer : 10 mM Tris·HCl (pH 8,0)
1 mM EDTA

50 x TAE-Puffer:

242,3 g Tris
57,1 ml Eisessig (96% [v/v] Essigsäure)
100 ml 0,5 M EDTA [pH 8,0] H₂O ad 1000 ml

MATERIAL UND METHODEN

10 x PBS:

80 g NaCl
2 g KCl
6,1 g Na₂HPO₄
2 g KH₂PO₄
H₂O ad 1000 ml
pH 7,4 mit NaOH

8 x Probenpuffer (Laemli):

100% [v/v] Glycerin	4,0 ml
10% [w/v] SDS	2,0 ml
β– Mercaptoethanol	800 µl
0,5 M Tris·HCl (pH 6,8)	145 µl
Bromphenolblau	350 µl
(2mg/ml in 0,1 M Tris·HCl [pH 7,5])	
H ₂ O	3,4 ml

10 x SDS-Laufpuffer:

30,3 g Tris
144 g Glycin
10 g SDS
H₂O ad 1000 ml

Polyacrylamid-Trenngel (12,5 %):

5 ml 1,5 M Tris·HCl (pH 8,8)
8,4 ml Rotiphorese® Gel 30
0,2 ml 10% [w/v] SDS
10 µl TEMED
150 µl 10% [w/v] APS
6,25 ml H₂O

Sammelgel (5,7 %):

2,5 ml 0,5 M Tris·HCl (pH 6,8)
1,9 ml Rotiphorese® Gel 30
0,1 ml 10% [w/v] SDS
3,5 µl TEMED
100 µl 10% [w/v] APS
5,4 ml H₂O

Coomassie-Färbelösung:

4 Tabl. Coomassieblue
10% [v/v] Eisessig (96% [v/v] Essigsäure)
50% [v/v] Methanol
H₂O ad 250 ml

Blitzentfärber:

10% [v/v] Eisessig (96% [v/v] Essigsäure)
40% [v/v] Methanol
H₂O ad 1000 ml

10 x Blotpuffer (ohne Methanol):

58 g Tris
29 g Glycin
3,7 g SDS
H₂O ad 1000 ml

1 x Blotpuffer (mit Methanol):

50 ml 10 x Blotpuffer
150 ml Methanol
H₂O ad 500 ml

Ponceau-S-Rot- Färberlösung:

2 g Ponceau-S- Rot
30 g TCA
30 g S- Sulfoxsallylsäure· 2 H₂O

1 x TBS mit Tween:

10 mM Tris- HCl, pH 8,0
150 mM NaCl
0,05% Tween 20

MATERIAL UND METHODEN

H₂O ad 1000 ml

1 x TBS ohne Tween:

10 mM Tris- HCl, pH 8,0

150 mM NaCl

H₂O ad 500 ml

Western Blot - Blockierlösung:

5 % Magermilchpulver in 1 x TBS ohne Tween

Antibiotikastammlösungen

Ampicillin	100 mg Ampicillin-Natriumsalz (Sigma), 1 ml MQ-H ₂ O, sterilfiltrieren, bei –20°C lagern
Erythromycin für <i>E. coli</i>	50 mg Erythromycin (Sigma), 1 ml 96% EtOH, bei –20°C lagern
Erythromycin für <i>L. monocytogenes</i>	5 mg Erythromycin (Sigma), 1 ml 96% EtOH, bei –20°C lagern
Kanamycin	10 mg Kanamycin (Sigma), 1 ml MQ-H ₂ O, sterilfiltrieren, bei 4°C lagern

Größenstandard

1 Kb Plus DNA-Ladder (Invitrogen): 12 Banden im 1000 bp Abstand von 12 Kb bis 2 Kb, 1650, 1000, 850, 650, 500, 400, 300, 200, 100 bp.

0.24-9.5 Kb RNA-Ladder (Invitrogen): 9.49, 7.46, 4.4, 2.37, 1.35, 0.24 Kb.

Protein-Größenstandard: Prestained See Blue™ (Anamed): 250, 98, 64, 50, 32, 25, 16, 6, 4 kDa (Molekulargewicht der Markerproteine variiert je nach Charge)

2.4 Verwendete Geräte

Gerät	Herkunft
Autoklav	Getinge
Blotkammer	
Brutschrank für Bakterienkultur	Heraeus
Dispenser	Brand, Dispensette

MATERIAL UND METHODEN

Eismaschine	Icematic F90 Compact Electronic
Elektrophoresekammer für Proteingele	Eigenbau der Institutswerkstatt
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Eigenbau der Institutswerkstatt
Feinwaage	Mettler H54
Gefriertruhen	Heraeus; Bosch
Gel-Dokumentationssysteme	Cybertech CS1, Cybertech
Inkubations- Wasserbäder	GFL 1083; HT
Digitalkamera	Canon
Kühlzentrifuge	Heraeus, Megafuge 1,0 R
Laborzentrifuge	Heraeus, Biofuge 15
Leuchttisch	Ewem- Janus
Magnetrührer	Ikamag, RCT
Mikroskop	Zeiss, Standard 25
Mikrowellenofen	Moulinex
Multipipette	Matrix, Independent 6-Kanal
pH- Meter	Knick
Photometer	Pharmacia, Ultrospec 3000
Pipetten	Eppendorf
Plattiergerät	BioSys, Autoplate 3000
Reinstwassersystem	Seral
Schüttler	Infors, Aquatron-Wasserbad; GFL-3017
Spannungsgeräte	Pharmacia MultiDrive XL, Consort E455 und E865
Speedvac- Konzentrator	Bachofer
Sterilbank	Heraeus, HERA safe
Thermocycler	Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400
Thermomixer	Eppendorf, Comfort
Thermoblock	Eigenbau der Institutswerkstatt
Tischzentrifuge	Eppendorf
Vortex	Janke & Kunkel, Ika Vibrofix VF1
Waagen	Kern, EG

Wasserbäder

Lauda

Computerprogramme

Clon Manager, DNA- Star, MS Office, R, BLAST

2.5 Arbeit mit den Bakterienstämmen

2.5.1 Anzucht und Lagerung der Kulturen

E. coli Stämme wurden in der Regel im LB-Medium bei 37°C und 180 rpm angezogen. Bei Anzucht rekombinanter Stämme wurden die entsprechenden Antibiotika dazugegeben. Für *L. monocytogenes* wurde BHI-Medium verwendet.

Die Kulturen wurden in Form von Glyzerolkonserven gelagert. Dafür 1.5 ml Übernachtskultur wurden mit 1.5 ml BHI+60% Glyzerol vermischt, kurz gevortext, auf Eis abgekühlt und dann mit dem flüssigen Stickstoff schockgefroren. Über längere Zeit wurden die Kulturen bei –20°C oder –80°C gelagert.

2.6 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.6.1 Isolierung chromosomaler DNA aus *Listeria*

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.

Chromosomale DNA aus dem Stamm *L. monocytogenes* EGD wurde nach der von Pitcher *et al.* (1989) beschriebenen Methode gewonnen, die wie folgt modifiziert wurde. Die Bakterien aus 1,5 ml einer *L. monocytogenes* EGD-e -Übernachtskultur wurden in einem 1,8 ml-Reaktionsgefäß durch 4-minütige Zentrifugation bei 15000 g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet mit 0,5 ml einer 0,85% [w/v]-igen NaCl-Lösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 15.000 g wurde das Pellet in 100 µl TE mit 50 mg/ml Lysozym resuspendiert und die Suspension im Anschluss für 30 min bei 37°C und

1200 rpm auf dem Thermomixer Comfort (Fa. Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µl DNase-freier RNase (500 µg/µl; Roche Molecular Diagnostics) erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur, bevor die Mischung mit 500 µl GES-Reagenz versetzt wurde. Gemischt wurde durch vorsichtiges 5-maliges Invertieren des Reaktionsgefäßes. Nach 5 min bei Raumtemperatur und weiteren 2 min auf Eis fand eine Proteinfällung mit 250 µl eiskaltem 7,5 M Ammoniumacetat statt. Eine 10-minütige Inkubation in Eiswasser folgte dem erneuten 5-maligen Invertieren. Mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde die DNA extrahiert, indem das Reaktionsgefäß 15 min lang stetig und nicht zu vorsichtig invertiert wurde. Daraufhin wurde für 15 min bei 18.000 g und 4°C zentrifugiert und die wässrige Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der chromosomalen DNA geschah mit Hilfe von 0,5 Volumenteilen 2-Propanol. Durch zunächst vorsichtiges Drehen des horizontal gehaltenen

Reaktionsgefäßes, späteres vorsichtiges Invertieren und schließlich kräftiges Schütteln konnte die chromosomale DNA zu einem gut sichtbaren Knäuel aufgewickelt werden. Das erhaltene DNA Knäuel wurde durch 5-minütige Zentrifugation bei 18.000 g und 4°C pelletiert, im Anschluss daran fünfmal mit je 1 ml 70% [v/v] Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert. Nach dem letzten Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde die DNA für 5 min in einem Vakuumkonzentrator getrocknet und über Nacht bei Raumtemperatur in 100 µl TE Puffer gelöst. Die Lagerung der chromosomalen DNA erfolgte bei 4°C.

Mit Hilfe der beschriebenen Methode konnten aus 1,5 ml einer stationär gewachsenen Bakterienkultur etwa 10 µg chromosomaler *L. monocytogenes* - DNA gewonnen werden. Wurden größere Mengen an DNA benötigt, wurden mehrere (bis zu 10) Ansätze parallel durchgeführt. Dabei musste jedoch ab der 2-Propanol-Zugabe die entsprechende Weiterbehandlung für jedes Reaktionsgefäß einzeln erfolgen.

2.6.2 Isolierung der Plasmide

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* in analytischem Maßstab wurde mit dem GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (GE Healthcare) oder mit „QIAspin Miniprep“ (Qiagen) nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Dabei wurden 3 ml Übernachtskultur durch jeweils 1-minütiges Zentrifugieren bei 13000 g in einem 1,8 ml-Reaktionsgefäß geerntet und nach dem Herstellerprotokoll für 2-3 ml Bakterienkultur aufbereitet. DNA aus der Säule wurde in

der Regel mit 50 µl H₂O eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Plasmid-DNA bei -20°C gelagert.

Größere Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurden mit dem „JETstar 2.0 Plasmid MIDI“ Kit (Genomed) aus *E. coli* isoliert. 50 ml der Übernachtskultur wurden 10 Minuten bei 6200 g zentrifugiert, um das Pellet zu ernten. Plasmid-DNA wurde nach Angaben des Herstellers gewonnen und in 100-200 µl ddH₂O gelöst.

2.6.3 Isolierung der RNA

SET-Puffer		SET-Puffer mit 10 % SDS	
5 M NaCl	0.5 ml	5 M NaCl	0.5 ml
1M Tris pH 7.0	1.515 ml	1M Tris pH 7.0	1.515 ml
0.5 M EDTA	0.5 ml	0.5 M EDTA	0.5 ml
RNAse freies Wasser	47.5 ml	RNAse freies Wasser	22.5 ml
		20% SDS	25 ml

50 mM Tris pH 6.5 Puffer für Lysozym

RNA aus *L. monocytogenes* Kulturen wurde mit Hilfe „RNeasy“ Kit von Qiagen isoliert. Je 0.5 ml der Kultur wurde mit 1 ml des vorgelegten RNA-Protect Reagenz (Qiagen) sofort nach der Abnahme vermischt, 5 sec gevortext und nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 10 min bei 6000 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet weiter verarbeitet. Für eine Isolierung wurden je 6 Eppendorf-Tubes mit RNA-Protect proben verwendet.

Für Zellwandlyse wurden die Bakterien nach einem Waschschrift mit 200 µl SDS-haltigem SET-Puffer je 2 Proben in einem Reaktionsgefäß gesammelt und in 83 µl 50 mM Tris-Puffer pH 6.5 mit 50 mg/ml Lysozym resuspendiert. Nach der Zugabe 5 µl Mutanolysin, 10 µl Proteinase K und 2 µl Suprase (Ambion) musste das Pellet sehr sorgfältig resuspendiert werden und inkubiert bei 37°C 30 min. Weiter wurde es nach der Anleitung des Herstellers gearbeitet. 3 Proben wurden auf 2 Säulchen aufgetragen.

Für die Northern Blot Analyse wurde DNase Verdau direkt auf den Säulchen mit dem „DNAfree Kit“ von Qiagen nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

Für Microarray Proben wurde RNA nach dem Protokoll isoliert, dann 30 min bei 37°C mit RNAse free DNase von Ambion (2 µl) im mitgelieferten Puffer behandelt und danach 15 min

bei 70°C mit 10 µl 50 mM EDTA zur Inaktivierung der DNase inkubiert. Anschließend wurde die RNA noch mal mit dem RNAeasy Kit aufgereinigt.

Die Qualität der isolierten RNA wurde mit Hilfe von Agilent Bioanalyser Chip nach Herstellersanleitung bestimmt.

2.6.4 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Konzentration der Nukleinsäuren wurde am Nanodrop-Gerät gemessen. Ratio 260/280 (soll über 1.8 für DNA und über 2.0 für RNA sein) zeigte auf die Reinheit der Isolierung. Als Leerwert diente Wasser oder TE-Puffer. Die Qualität der Plasmidisolierung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.7 Nukleinsäure Analytik

2.7.1 PCR

PCR (polymerase chain reaction) – Polymerase-Ketten-Reaktion dient der Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Fragments durch die hitzestabile DNA-Polymerase. Dazu werden zwei Primer (homologe gegenläufige Oligonukleotide) benötigt, die während der Annealing-Phase der Reaktion (bei 50-60° C) nach der Denaturierung (92-95°C) an die einzelsträngige (DNA) hybridisieren. Die DNA-Polymerase bindet an diesem doppelsträngigen Fragment und synthetisiert komplementären DNA-Strang in 5'→3' Richtung. Die mehrfache Wiederholung des Zyklus führt zu einer exponentiellen Vermehrung des DNA-Fragments.

Für PCR-Analyse wurde die Taq DNA-Polymerase von Firma „Invitrogen“ mit dem mitgelieferten Puffer verwendet.

Reaktion wird folgt zusammen pipettiert:

Puffer (x 10)	3.5 µl
dNTP-Mix (1,25 mM/dNTP)	1.5 µl
Matrize	chromosomale DNA 200 ng, Plasmid- 50 ng
Primer forward (20 pmol)	0.35 µl
Primer reverse (20 pmol)	0.35 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0.1 µl
H ₂ O	auf 35 µl

Reaktionsbedingungen:

- 1) 2 min 95°C (primäre Denaturierung)
- 2) 20 sec 94°C (Denaturierung)
- 3) 30 sec 50-60°C (Primer-Hybridisierung, die Temperatur vom Primer abhängig)
- 4) 90 sec 72°C (Kettenverlängerung, 1 min pro tausend Basenpaare)
- 5) 3 min 72°C (abschließende Kettenverlängerung)
- 6) 10°C ∞

Schritte 2 bis 4 wurden 25-30 Mal wiederholt. Entstandene Fragmente wurden nach der Auftrennung im Agarosegel unter dem UV-Licht visualisiert.

2.7.2 High Fidelity PCR

Für die Klonierung wurden die Fragmente mit den speziellen Polymerasen hergestellt, die geringere Fehlerrate haben. Die handelsüblichen Produkte sind die Mischungen aus Taq-Polymerase und einer Proof-Reading Polymerase mit der erhöhten 3'→5' korrigierenden Aktivität.

Folgende Polymerasen wurden verwendet:

High Fidelity PCR-System (Roche)

Accuzyme und Accusure (Bioline)

Pfx (Invitrogen)

Als Matrize diente die isolierte chromosomale DNA. Die Reaktion wurde nach der Anleitung des Herstellers angesetzt und unter den empfohlenen Bedingungen durchgeführt.

2.7.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA Molekülen in einem Größenbereich von 0,2 kb und 20 kb erfolgt im elektrischen Feld in Agarose- Gelen mit unterschiedlichen Konzentrationen.

Am häufigsten wurde ein 1 % Standardgel verwendet, bei dem 1 g Agarose (Sigma) in 100 ml 1 x TAE- Puffer durch Aufkochen in einem Mikrowellengerät gelöst wurde, und nach kurzem Abkühlen mit 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Roth) versetzt wurde. Die aufzutragenden DNA- Proben wurden mit mindestens 0,5 Volumenteilen an 5 x Auftragungspuffer (25% Fi-

coll im Wasser + 0.01% Bromphenolblau) vermischt. Als DNA-Längenstandard wurde die 1 kb DNA LADDER™ (Invitrogen) verwendet.

Die Elektrophorese wurde in der Regel in 1 x TAE-Puffer bei 150 V, 250 mA für 50 min durchgeführt. Der Nachweis der DNA-Banden erfolgte unter UV-Licht (254 nm) und die Bilder konnten mithilfe des Gel-Dokumentationssystems und Video Copy Processors gemacht werden.

2.7.4 Restriktion von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Für die enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA oder von PCR-Produkten wurden DNA-Mengen zwischen 100 ng und 2 µg in einem Volumen von 20-50 µl für 3-4 h mit den jeweiligen Restriktionsendonukleasen (ca. 7 Units pro 20 µl Ansatz) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde im jeweils dem entsprechenden vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer durchgeführt. Die eingesetzten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs und MBI Fermentas bezogen. Falls die Fragmente später für die Ligation eingesetzt werden sollten, erfolgte Inaktivierung der Enzyme innerhalb 20 min bei 70°C.

2.7.5 Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit Alkalischer Phosphatase

Im Falle einer verringerten Effizienz eines der beiden verwendeten Restriktionsenzyme bei einem Doppelverdau wurde die Alkalische Phosphatase eingesetzt. Damit sollten die am 5'-Ende der linearen Vektor-DNA befindlichen freien Phosphatgruppen abgespalten werden, und somit die Religation des linearisierten Plasmids verhindert werden. Geschnittene Vektor-DNA in einer Konzentration von 0,2 bis 2 µg wurde in einem Volumen 20 µl mit 1 U Alkalischer Phosphatase (Calf Intestine Phosphatase, 1 U/µl; Roche) und 2 µl enzymespezifischem Reaktionspuffer gemischt und für 1 h bei 37°C im Thermoblock inkubiert. Die anschließende Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 200 mM EGTA und Inkubation für 10 min bei 65°C. Das Plasmid wurde dann mit dem „QIAquick PCR Purification“ Kit (Qiagen) aufgereinigt, und konnte für die Ligation eingesetzt werden.

2.7.6 Aufreinigung von PCR und Restriktionsansätzen

Durch die Verwendung des „QIAquick PCR Purification“ Kits von Qiagen wurden DNA-Fragmente aus einer PCR-Reaktion oder aus enzymatischen Reaktionen schnell und einfach aufgereinigt. Das Prinzip der Aufreinigungsmethode basiert sich darauf, dass die DNA durch ein chaotropes Salz gefällt und an eine feste Silica-Matrix gebunden wird. Proteine, kurze Oligonukleotide und Salze werden schließlich durch einen Waschvorgang beseitigt und die DNA wird aus der Säule mit H₂O oder Elutionspuffer eluiert. Alternativ wurde der Kit „Spin PCRapid“ der Firma „Immunotools“ verwendet, der sich auf demselben Prinzip basiert. Die Durchführung der Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.7.7 DNA-Elution aus dem Agarosegel

Anhand des „Gel-Extraktions Kits“ von Qiagen können geschnittene Plasmide sauber von unverdaulichem Vektor und von kurzen DNA-Fragmenten getrennt werden.

Das Prinzip des Kits ähnelt dem des PCR Purification Kits. Hier wird die DNA jedoch gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschte Bande aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Nach Auflösen des Gels kann die DNA wieder an die Silica-Matrix gebunden und wie oben beschrieben von Agarose und Salzen befreit werden. Alternativ wurde das Kit „Qiaex II“ Die Elution der DNA erfolgte auch hier in H₂O oder in 1 x TE-Puffer. Bei der Durchführung wurde auch hier dem Protokoll des Herstellers gefolgt.

2.7.8 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA

Die Ligase dient zur Verbindung von zwei getrennten DNA-Strängen, die vorher mit Restriktionsenzymen behandelt wurden, durch Verknüpfung der OH-Gruppe am 3'-Strangende mit einer Phosphat-Gruppe am 5'-Strangende. Ligationsansätze, bei denen DNA-Fragmente mit überhängenden komplementären Enden („sticky ends“) verbunden wurden, enthielten das Insert in mindestens dreifach molarem Überschuss zur Plasmidmenge. Dieses Verhältnis zwischen den beteiligten Fragmenten sollte dazu dienen, die Religation vom Vektor zu minimieren und die Bildung von Concatameren zu vermeiden.

Bei einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 1 µl (1U/ µl) der T4-Ligase (Invitrogen) und 4 µl des mitgelieferten 5 x Ligationspuffers für 80 ng bis 300 µg zu ligierende DNA eingesetzt.

Der Ansatz wurde über Nacht bei 14°C im Wasserbad oder 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und danach zur Transformation verwendet.

2.7.9 Klonierung von DNA-Fragmenten mit dem pCR-Blunt-Cloning Kit und pCR 2.1-Topo Cloning Kit von Invitrogen

Mit dem pCR-Blunt-Cloning Kit können PCR-Produkte (oder andere DNA-Fragmente) mit glatten Enden direkt in den linearisierten und glatte Ende tragenden pCR-Blunt Vektor kloniert werden. Das Prinzip für die Selektion positiver Transformanten beruht auf dem letalen *E. coli* Gen *ccdB* (controlled cell death). Dieses Gen ist C-terminal an das LacZ α fusioniert. Die Ligation eines PCR-Produktes in den Vektor zerstört das Leseraster des fusionierten Genes und ermöglicht das Überleben der Transformanten. Wird das Leseraster des Genes jedoch nicht zerstört, wird der Transformant durch das Genprodukt abgetötet.

Mit dem pCR 2.1-Topo Cloning Kit können PCR-Produkte mit 3'-A-Überhängen innerhalb von 5 min bei RT direkt in den 5'-T-Überhänge tragenden pCR 2.1 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. LacZ Gen ermöglicht die Auswahl von positiven Klonen durch die blau-weiße Selektion.

Die PCR-Produkte, die im PCR mit Accuzym oder *Pfx*-Polymerasen entstehen glatten Enden und solche Produkte wurden in pCR-ZERO Blunt Vektor kloniert. Die Produkte der Taq-Polymerase tragen klebrige Enden dank der Fähigkeit der Taq-DNA-Polymerase, ein Adenosintriphosphat an das 3'-Ende der PCR-Produkte anzuhängen. Solche Produkte wurden in pCR-TOPO Vektor kloniert. Die Klonierung wurde nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt.

2.7.10 DNA- Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA- Abschnitten erfolgte durch Cycle- Sequencing mit Hilfe des BigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kits (AB Biosystems) nach den Vorgaben des Herstellers.

MATERIAL UND METHODEN

In jeder Reaktion wurden 0.5 µl des BigDye-Reagenz, 1 µl Puffer, 1 µl H₂O mit 6.5 des zu untersuchenden Plasmids und 1 µl des entsprechenden Primers in einem Endvolumen von 10 µl zusammenpipettiert. Die Reaktion des Cycle Sequencing fand im Thermocycler unter folgenden Bedingungen statt:

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	96°C	10 sek	} 25 x
Primeranlagerung	55°C	10 sek	
Primerverlängerung	60°C	4 min	
Abkühlung	4°C	∞	

PCR-Produkte wurden im folgenden Ansatz sequenziert

5 µl PCR-Produkt, 0.5 µl BigDye, 2 µl 5*Puffer, 1 µl Primer, 10 µl H₂O

Das Programm für Thermocycler sah folgendermaßen aus:

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	95°C	10 sek	} 25 x
Primeranlagerung	55°C	4 sek	
Primerverlängerung	60°C	4 min	
Abkühlung	4°C	∞	

Die Aufreinigung der DNA erfolgte schließlich durch das Sephadex G-50 Superfine- Medium (GE Healthcare) in Multiscreen Filtrationssystem- Platten (0,45 µm Hydrophile Durapore[®] Membran, Millipore). Die automatische Sequenzierung wurde am Megabace Sequenser (GE-Healthcare) durchgeführt und mit dem DNASTar Softwarepaket analysiert.

2.7.11 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*- Zellen nach Hanahan (1991)

In einem 250 ml Erlenmeyer-Kolben wurde eine ÜN- Kultur von INV α F' die in SOB- Medium bei 30°C geschüttelt worden war, 1:50 mit SOB-Medium (50 ml) verdünnt. Nach dem Erreichen einer OD₅₅₀ von etwa 0,3 nach 2-3 h Inkubation bei 30°C bei 200 rpm wurde die Kultur in ein steriles Greiner-Röhrchen überführt, und für 10 min auf Eis gestellt wurde. Die Zellen wurden für 15 min bei 4000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand sorgfältig entfernt. Das Pellet wurde durch Auf- und Abziehen der Pipette in 17 ml CCMB80 resuspendiert bis die Mischung homogen war. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 4,3 ml CCMB80 vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde je 200 μ l vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss verteilt und die Zellen wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.7.12 Chemische Transformation in *E. coli*

Die Aliquots mit den kompetenten *E. coli* - Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz oder reinem Plasmid (0,1 – 1 μ l) gemischt. Der Transformationsansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und dann 90 sec einer Temperatur von 42°C im Wasserbad ausgesetzt. Schließlich wurden die Zellen für weitere 2 min auf Eis gestellt und unmittelbar danach mit 800 μ l SOC- Medium vermischt. Nach der Überführung des Ansatzes in ein 12 ml Reaktionsgefäß folgte die Regeneration der Bakterien bei 30°C oder 37°C für 1-3 h. Die Inkubationszeit bei Verwendung von Plasmiden mit Kanamycin-, Ampicillin- oder Chloramphenicol-Resistenz war 1 h, die bei Vektoren mit Erythromycinresistenz 3h. Anschließend wurden die Kulturen in Volumina zwischen 50 und 200 μ l auf geeigneten Selektionsplatten ausplattiert, und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.7.13 Elektroporation der *E. coli* - Zellen

Im Fall der nicht ausreichenden Transformationseffizienz wurde die von Fa. Invitrogen bezogenen elektrokompetenten *E. coli*-Zellen "One shot TOP10 Cells" verwendet. 2 μ l des Ligationsansatzes wurden hierzu mit 22,5 μ l der auf Eis aufgetauten elektrokompetenten Bakterien-

zellen vermischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,1 cm Schichtdicke; Invitrogen) überführt. Die Elektroporation der Zellen erfolgte mit 1,8 kV, 200 Ohm und 25 μ F. Sofort wurde 800 μ l SOC-Medium zum Ansatz gegeben, dieser in ein 12 ml Reaktionsgefäß pipettiert und für 1-3 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Der Elektroporationsansatz wurde dann auf geeignetem Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.7.14 Herstellung elektrokompenter *L. monocytogenes*-Zellen

Die elektrokompente Zellen der *Listeria* wurden nach Park und Steward (1990) hergestellt. Ein 1 l- Erlenmeyerkolben wurde mit 2 ml einer Übernachtskultur in 200 ml BHI- Medium plus 0,5 M Saccharose beimpft und bei 37°C und 200 rpm für 3-4 h inkubiert. Nach Erreichen der OD₆₀₀ von ungefähr 0,2 wurde 0,2 ml einer 10 mg/ml Stammlösung Penicillin in 70% [v/v] Ethanol zugegeben, und die Kultur für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte die Überführung in vier sterile 50 ml Greiner – Röhrchen und die Ernte der Bakterien durch Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm und 4°C. Die Überstände wurden auf Eis abgesaugt und die Zellen in je 5 ml 1 mM HEPES- Puffer (pH 7,0) plus 0,5 M Saccharose resuspendiert. Die Suspension wurde nun in ein steriles 50 ml Greiner- Röhrchen gegeben und für 10 min bei 5000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Nach insgesamt drei Waschschritten mit HEPES-Puffer erfolgte die Resuspension der Zellen in 0,5 ml HEPES- Puffer plus 10% [v/v] Glycerin und die Verteilung der Suspension in 50 μ l- Aliquots auf 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss. Im flüssigen Stickstoff wurden die Aliquots schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.7.15 Elektroporation elektrokompenter *L. monocytogenes*

Die Aliquots mit den elektrokompenten *Listerien* wurden bei Bedarf auf Eis aufgetaut und mit 400-1000 ng des gewünschten Plasmides gemischt und der Ansatz in eine gut vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,1 cm Schichtdicke, Invitrogen) gegeben. Die Elektroporation wurde bei 1,0 kV, 400 Ohm und 25 μ F durchgeführt, und unmittelbar danach wurden 800 μ l BHI-Medium + 0,5 M Saccharose zur Mischung pipettiert. Die Suspension wurde anschließend in ein 12 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 bis 3 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Wegen des temperatursensitiven Replikationsursprungs von pAUL-A wurden mit diesem Plasmid

transformierte Bakterien nur bei 30°C bebrütet. Danach erfolgte die Ausplattierung der Kultur in 100 bis 250 µl-Portionen auf BHI- Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum. In der Regel wurden die Kolonien der transformierten *L. monocytogenes* Stämme nach etwa 36 h auf den Selektionsplatten sichtbar.

2.8 Herstellung der Deletionsmutanten von *L. monocytogenes*

Die Herstellung von chromosomalen Deletionsmutante von *L. monocytogenes* wurde, wie im Folgenden beschrieben, durchgeführt. Die 250-400 bp großen flankierenden Bereiche des zu inaktivierenden Genes wurden zunächst mit einer „proof-reading“ Polymerase in der PCR amplifiziert. Danach wurde 2. PCR durchgeführt, mit Primern 1-for und 4-rev und den PCR-Produkten aus der ersten PCR. Durch die chimären Primer 2-rev und 3-for haben sich die „upstream“ und „downstream“ Produkte überlagert und das Template für 2. PCR gebildet. Das Gesamtfragment wurde nun in den temperatursensitiven Vektor pAUL-A kloniert, in *E. coli* transformiert und auf Erythromycin-Selektionsplatten ausplattiert. Durch PCR-Analyse wurden die positiven Klone ausgewählt und die Plasmid- DNA durch eine Mini- Präparation isoliert. Nach einer Restriktionsanalyse wurde das Fragment in pAUL-A sequenziert und der Vektor mit der korrekten Sequenz in *L. monocytogenes* EGD-e elektroporiert. Die Inkubation erfolgte bei 30°C, da der Replikationsstart für Listerien in pAUL-A temperatursensitiv ist, und bei höheren Temperaturen inaktiv wird. Nun wurde erneut mittels PCR mit Primern zum pAUL-A Vektor nach positiven Klonen gesucht und die Präsenz der klonierten Deletion bestätigt. Um das Plasmid in das Chromosom von *L. monocytogenes* zu integrieren, wurden ausgewählte Klone bei 42°C täglich auf frische BHI+5EM Platten überstrichen. Nach mehreren Tagen wurde anhand einer PCR-Analyse mit Primer für pAUL-A überprüft, ob die Integration ins Chromosom über homologe Rekombination stattgefunden hatte. Wenn mit den plasmidspezifischen Primern keine Bande mehr detektiert werden konnte, war die Integration vollzogen. Nun sollte das Plasmid wieder aus dem Chromosom entfernt werden, um die Expression plasmidspezifischer Gene zu vermeiden. Dafür wurde eine Übernachtskultur eines positiven Klons ohne Selektionsdruck (ohne Antibiotikum) bei 30°C und 200rpm herangewachsen und am nächsten Tag 1:100 in BHI-Medium verdünnt. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0,3- 0,5 wurde die Kultur verdünnt, aber diesmal 1: 20 in BHI- Medium plus 10 µg/ml Erythromycin (Em). Die Kultur wurde erneut für 2h in 30°C geschüttelt und nach Zu-

gabe von 200 µg/ml Ampicillin über Nacht weiter inkubiert. In diesem Schritt werden die Plasmid-tragenden Erythromycin-resistenten, und somit wachsenden Bakterien durch das Ampicillin abgetötet. Em-sensitive Bakterien werden jedoch angereichert, da sie sich nicht im aktiv wachsenden Stadium befinden. Am nächsten Morgen wurde die Kultur in verschiedenen Verdünnungsstufen (10^{-1} bis 10^{-5}) auf BHI- Platten ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Durch paralleles Überstreichen auf Em- Selektionsplatten und BHI konnten die Em – sensitiven Bakterien und damit die Deletionsmutanten ermittelt werden. Die Deletion wurde durch PCR mit Primern 1-for und 4-rev bestätigt werden. Die Klone, die kleinere Bande trugen, die der Deletion entspricht, wurden erneut auf BHI+5Em ausgestrichen, um Em-Sensitivität und damit chromosomale Herkunft der Deletionsbande zu bestätigen.

2.9 Proteinextraktion aus *L. monocytogenes*

2.9.1 Überstand

Eine 25 ml Kultur des entsprechenden Stammes wurde bei entsprechender OD₆₀₀ geerntet und für 15 min bei 6000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Kulturüberstand wurde vom Zellpellet getrennt und mit 10% TCA versetzt, um in den Überstand sezernierte Proteine zu präzipitieren. Am nächsten Tag wurden die Proteine während einer 15-minütigen Zentrifugation bei 6.200 g und 4°C pelletiert, die Überstände möglichst quantitativ entfernt und die Pellets dann direkt in 100 µl 1 M Tris-HCl (pH 8,8) gelöst. Die Lagerung der so gewonnenen Überstandsproteine erfolgte bei -20°C.

2.9.2 Zellwand

Für die Extraktion von Proteinen aus der Zellwand wurde das Pellet von 25 ml Kultur mit 1.8 ml 1% SDS in PBS versetzt und für 45 min bei 180 rpm und 37°C geschüttelt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 15 min bei 18.000 g und 4°C wurde Überstand sauber abgenommen und die löslichen Proteine wurden durch Zugabe von 10% TCA gefällt. Am nächsten Tag wurden sie in 200 µl 1 M Tris-HCl (pH 8,8) gelöst. Die Protein-Lösung wurde bei -20°C gelagert.

2.9.3 Cytoplasmatischer Extrakt

2x SMM- Medium: 1M Saccharose, 20 mM Tris, 10mM MgCl₂ 6xH₂O, 40 mM Maleinsäure. pH 6,8 mit 10N NaOH einstellen, 12 min bei 115°C autoklavieren

Modifiziertes 1x SMMP- Medium: 27,5 ml 2x SMM- Medium + 20 ml BPB

25 ml der Kultur wurde durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 6000 rpm pelletiert und vom Überstand abgetrennt (evt. noch mal abzentrifugiert). Danach wurde das Pellet auf Eis mit 10 ml sterilem deionisiertem Wasser gewaschen und bei 4°C 15 min bei 6000 rpm abzentrifugiert. Nach dem vollständigen Entfernen des Überstands, wurde das Pellet in 2,5 ml 1 x SMMP resuspendiert und 250 µl Lysozym (250 µg/ml in 2 x SMM, sterilfiltriert) wurde zugesetzt. Nach der 12-16-stündiger Inkubation bei 37°C ohne Schütteln wurden die Protoplasten mikroskopisch kontrolliert. Die Protoplasten wurde 15 min bei 6000 rpm und 4°C abzentrifugiert, Überstand verworfen und Pellet noch 2 mal mit 10 ml 1 x SMMP gewaschen, um Lysozym zu entfernen. Pellet wurde trocken zentrifugiert und anschließend auf Eis in 100 µl lysiert. Um DNA zu scheren, wurde das Lysat mehrmals mit der Pipettenspitze auf- und auspipetiert. Nach dem Zentrifugieren in 1,8 ml Reaktionsgefäß 20 min bei 15000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein frisches 1,8 ml Reaktionsgefäß abgenommen und bei -20°C gefroren.

2.9.4 SDS- PAGE

Bei der SDS-PAGE werden Proteine unter reduzierenden Bedingungen durch Erhitzen denaturiert und mit dem Detergenz SDS gebunden, das dem Polypeptid eine negative Ladung verleiht. Dadurch werden Proteine linearisiert und die elektrophoretische Auftrennung erfolgt daher nach ihrer unterschiedlichen Molekulargröße.

Die Proteinextrakte wurden auf Eis aufgetaut und für ein Coomassie-Gel in einem Volumen von 8-10 µl mit 4 µl 8x Probenpuffer (Laemli) gemischt. Bei Weiterverwendung des Gels für Western Blot und Entwicklung mit ECL wurde etwa die Hälfte der Proteinmenge verwendet. Die Proben wurden für 3 min bei 95°C denaturiert, 3 min auf Eis inkubiert, für 3 min bei 10000 rpm abzentrifugiert und schließlich auf ein 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Gewöhnlich fand die Elektrophorese in 1x Laufpuffer bei 100 V und 500 mA statt.

2.9.5 Coomassie-Färbung

Für die Detektion verschiedener Proteine in Zellextrakt oder Kulturüberstand wurden die Gele nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine mit Coomassie- Färbelösung über Nacht behandelt. Die Entfärbung erfolgte mit Blitzentfärber innerhalb von 1-2 Stunden. Die Proteingele wurden anschließend in Wasser bei 4°C gelagert und dann eingescannt.

2.9.6 Immuno-Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung im 12,5 % SDS- Polyacrylamidgel wurden die Proteine anhand eines Biometra-Gerätes auf eine Blotmembran (Millipore, 0,45 µm) übertragen. Dabei wurden drei Lagen Whatmanpapier im 1 x Blotpuffer (mit Methanol) getränkt und auf die untere Graphitplatte der Apparatur gelegt. Die Membran wurde für 5 Sekunden in Methanol aktiviert und anschließend für 2 Minuten in dH₂O gewaschen. Nach einer einminütigen Inkubation im 1 x Blotpuffer wurde die Membran auf das Whatmanpapier gegeben und mit dem Polyacrylamidgel bedeckt. Darüber wurden drei weitere Lagen im Blotpuffer getränktes Whatmanpapier gelegt, und nach sorgfältiger Entlüftung aller Schichten wurde die obere Graphitplatte angebracht. Der Blot erfolgte 10-30 min bei 250 mA.

Die Detektion der gewünschten Proteine erfolgte mit dem ECL-System von GE Healthcare und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Um den Erfolg des Blotschrittes nachzuweisen, wurde die Membran nach dem Fastblotting in dH₂O gewaschen und mit Ponceaurotlösung in einer 1:10- Verdünnung mit dH₂O angefärbt.

Nach dreimaligem Waschen in 1 x TBS mit 0,05 % Tween-20 wurde die Membran in Blockierlösung, die 5 % Magermilchpulver enthält, über Nacht leicht geschwenkt. Am nächsten Tag wurde der erste Antikörper in geeigneter Verdünnung in 5 ml 1 x TBS mit 0,05 % Tween 20 und 5 % Magermilchpulver für 1- 1,5 Stunden bei RT inkubiert. Es folgten 3 Waschschritte mit 1 x TBS mit 0,05 % Tween 20 und dann die Inkubation mit einem Horse- Radish- Peroxidase konjugierten zweiten Antikörper (anti-Maus, 1:1000) in 1 x TBS mit 0,05 % Tween 20 für 1 Stunde bei RT. Nach weiterem gründlichem Waschen in 1 x TBS mit 0,05 % Tween 20 und dann in 1 x TBS wurde die Membran für 1 min mit 3 ml ECL – Lösung 1 und 2 (1:1) behandelt. Dadurch wurde die Reaktion der Peroxidase in Gang gesetzt, und durch anschlie-

ßendes Auflegen eines HyperfilmTM ECL – Films konnte die Luminiszenz der Proteinbanden sichtbar gemacht werden.

2.10 Microarray Analyse

Für die Microarray-Analyse wurde RNA zu DNA umgeschrieben, mit dem fluoreszierenden Farbstoff markiert und in gleichen Mengen von jeder Probe auf dem Chip hybridisiert. Jedes Experiment wurde in zwei „dye-swap“-Varianten durchgeführt. Das heißt, Test und Referenz Proben wurden mit beiden Farbstoffen markiert und in beiden Kombinationen hybridisiert und verglichen, um Artefakt durch unterschiedlich effizienten Einbaus der Farbstoffen zu vermeiden. Jedes Experiment wurde drei Mal unabhängig wiederholt. Die verwendeten Micro-Array Chips wurden früher beschrieben (Chatterjee 2006). Sie enthalten als Sonde die 300-600 bp großen Gen-spezifischen PCR-Produkte, die von der Mitte des kodierenden Bereiches flankierend ausgewählt wurden. Die Hybridisierung und anschließenden Waschschrte fanden in der automatischen Hybridisierungsmaschine ASP (GE Healthcare) statt.

Die cDNA wurde mit CyScribe Postlabelling Kit (GE Healthcare) von 3 µg isolierten gesamt RNA nach Herstellersanleitung generiert. Danach wurde die cDNA mit PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt, mit Cy3- und Cy5-Farbstoffen aus dem Kit markiert und erneut aufgereinigt. Effizienz der Markierung wurde bei Wellenlängen 550 and 650 nm am NanoDrop bestimmt.

Gleiche Menge (enthaltend 10 pmol vom eingebauten Farbstoff) beider zu vergleichenden Proben, wurden mit 100 µl deionisierten Formamid und 50 µl Hybridisierungspuffer (5 min bei 70°C vorgewärmt) gemischt, mit aufgereinigtem Wasser auf 200 µl aufgefüllt, 5 min bei 70°C denaturiert und bis zur Ladung in die Hybridisierungsmaschine bei 42°C gestellt. Die Proben wurden bei 42°C 12 h hybridisiert und danach automatisch gewaschen.

Fertige Slides wurden mit dem Gene III System Scanner gescannt. Bildbearbeitung und statistische Analyse sind bei Chatterjee et al, 2006 beschrieben.

2.11 Northern Blot Analyse

10XMOPS Puffer: 20,9 g MOPS, 10 ml 0,5 M EDTA, 12,5 ml 2 M NaAc, 10,75 ml 5 M NaOH, pH 7,0, ad 500 ml DEPC-behandeltes Wasser, sterilfiltrieren.

Premix: 100 µl 10xMOPS, 175 µl 37 % Fromaldehyd, 500 µl deionisiertes Formamid

Probenpuffer: 50 % Glyzerin, autoklavieren, 0,01 % Bromphenolblau zusetzen

Für Northern Blot Analyse wurden 5-10 µg RNA auf dem denaturierenden Agarose-Gel aufgetrennt. Dafür wurden 1,3 g Agarose in 70 ml DEPC-behandelten Wasser durch Aufkochen gelöst und nach dem Abkühlen auf ca. 70-60°C wurden unter dem Abzug 10 ml 10 x MOPS Puffer und 20 ml Formaldehyd dazugegeben und in die mit RNase Zap (Ambion) behandelte Gelform gegossen.

RNA wurde mit 19 µl Premix und 1 µl Etidiumbromid (1 mg/ml) gemischt, 10 min bei 70°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und nach Zusatz von 4 µl Probepuffer auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte über 3-3,5 h bei 100 V im 1xMOPS Puffer.

Vor dem Transfer auf die Membran wurde das Gel fotografiert und danach zwei Mal je 10 min mit 5 x SSC+10 mM NaOH gewaschen. Mit der gleichen Lösung wurde die RNA auf eine mit DEPC-behandeltem Wasser angefeuchtete Hybond N+ (GE Healthcare) Membran über Nacht geblottet. Nach der Übertragung auf die Membran wurde die RNA durch „cross-link“ auf der Membran fixiert. Dafür wurde sie je 90 sec von jeder Seite auf dem Transilluminator mit UV bestrahlt.

2.11.1 Sonden für Northern Blot

Als Sonden zur Identifizierung der Transkripten dienten die PCR-Produkte, hergestellt mit dem Primern (Qiagen), die auch in Real Time PCR Experimenten benutzt wurden. Produktengrößen sind in der Tabelle 6 dargestellt. PCR wurde mit der Taq-Polymerase nach Standardprogramm durchgeführt mit einem 30 sec Verlängerungsschritt bei 72°C. Um spätere Entwicklung mit den anti-DIG Antikörpern zu ermöglichen, wurde statt der normalen Nukleotiden die DIG PCR Mix (Roche Molecular Diagnostics) verwendet, das Digoxigenin-gekoppelten dUTP enthält. Diese werden bei dem Verlängerungsschritt der PCR zugleich mit dem normalen Nukleotiden eingebaut. PCR wurde im 50 µl Volumen durchgeführt und danach mit PCR Purification Kit aufgereinigt.

2.11.2 Hybridisierung und Entwicklung

SSC: 3 M NaCl, 0.3 M Na-Citrat, pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren

Church Puffer: 50 mM Na₂HPO₄, pH 7,0, 50 % formamide, 2% Blocking Reagent (Roche)

MATERIAL UND METHODEN

Molekular Diagnostics), 5 x SSC, 0.1 % (v/v) N-Lauroylsarcosin, 7 % SDS

Maleinpuffer: 100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,5, autoklavieren

Blockierlösung: Maleinpuffer mit 1 % Blocking Reagent

DIG-Waschlösung: 0.3% (v/v) Tween 20 in Maleinsäurepuffer

DIG-Detektionslösung: 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl

Die Membran mit der gebundenen RNA wurde in den Hybridisierungsröhren mit 5 ml Church Puffer vorhybridisiert. Anschließend wurde der Church Puffer durch 7 ml des frischen ausgetauscht und für 10 min bei 90°C denaturiert und auf Eis schnell abgekühlte PCR-Sonde dazugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C.

Um optimale Signalstärke zu erreichen und Hintergrund minimieren, wurden die Waschschrte für jedes Transkript einzeln optimiert, wurden aber alle bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Durchschnitt wurde 2 mal je 5 min mit 5 x SSC mit 0,1 % SDS gewaschen und danach einmal kurz mit 2 x SSC mit 0.1 % SDS. Danach wurde die Membran kurz im Maleinpuffer äquilibriert und für 30 min bei RT in Blockierlösung inkubiert.

Um die spezifisch gebundene Sonde nachzuweisen, wurde die Membran mit dem 1:10000 im Maleinpuffer verdünnten anti-DIG Antikörper (Roche Molekular Diagnostics) 1 h inkubiert. Danach folgten 3 Waschschrte je 10 min mit der Waschlösung.

Das Chemilumineszenz-Signal wurde in Reaktion mit CSPD (Roche Molekular Diagnostics) sichtbar gemacht. Dafür wurde die Membran kurz in Detektionslösung äquilibriert und auf der trockenen Unterlage mit 1 ml 1 % CDSP Lösung in Detektionslösung benetzt und 5 min bei RT im Dunklen inkubiert. Danach wurden Reste der Substratlösung auf Wattmanpapier abgetropft, die Membran in Frischhaltefolie luftdicht eingewickelt und auf Röntgenfilm (Kodak) in die Kassette gelegt. Signal entwickelte sich auf dem Film innerhalb 30-60 min bei 37°C. Danach wurde der Film nach Herstellersanleitung entwickelt.

2.11.3 RACE

5'-RACE Methode dient der Identifizierung des 5'-Endes eines RNA-Moleküls ohne Verwendung der Radioaktivität. Dabei wird auf der RNA als Matrize cDNA mit dem spezifischen aus dem Gen lesenden Primer SP1 synthetisiert und dann mit Hilfe der terminalen Nukleotidtransferase mit PolyA am 5'-Ende versehen. Dieses Substrat wird in der 1. PCR mit polyT und „nested Primer“ SP2, der weiter stromaufwärts vom SP1 im Gen liegt, amplifiziert.

2. PCR mit dem PCR-Primer aus dem Kit und SP3 („nested“ Primer zu SP2) erhöht die Menge und Spezifität des Produkts. Das Produkt wird dann in einen Vektor kloniert und die Sequenz des Inserts durch automatische DNA-Sequenzierung (ABI-Prism) bestimmt.

Die RACE Experimente wurden mit 3'/5' RACE Kit (Roche Molekular Diagnostics) nach Herstellersanleitung durchgeführt. Verwendete RNA wurde vorher auf DNA-Freiheit in PCR mit Primer zu *prfA* Gen kontrolliert. cDNA wurde von 1000 ng (200 ng für *lmo1246*) gesamt-RNA synthetisiert. Erhaltene PCR-Produkte wurden je nach in letzter PCR verwendeter Polymerase in pCR 2.1 TOPO oder pCR Zero Vektoren (Invitrogen) kloniert. Mindestens 5 Klone wurden zum Sequenzieren gegeben und die längste Sequenz des klonierten Inserts als möglicher 5'-Bereich des Genes angenommen.

2.11.4RT-PCR

Die quantitative Real-Time PCR-Analyse wurde an dem Abi Prism 7000 Gerät durchgeführt. Totale RNA wurde wie für die Microarray-Analyse beschrieben isoliert, mit DNase behandelt und zur Synthese von cDNA eingesetzt. Quantitative Reaktion wurde in 40 Zyklen durchgeführt, mit 2,5 µl cDNA, 12,5 µl SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 10 pM von forward und reverse Primer im Endvolumen von 25 µl. Die Standardkurve wurde für jede Primerpaar mit verschiedenen Verdünnungen von der genomischen DNA generiert. Für jede Primerpaar wurden die Negativkontrollen gemacht, die Wasser statt cDNA beinhalten.

3 ERGEBNISSE

3.1 Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e bei 37°C und nach dem Kälteschock auf 15°C

Um das Wachstumsverhalten von *L. monocytogenes* EGD-e auf schnelle Veränderung der Umgebungstemperatur festzustellen, wurde die Wachstumskurve im BHI Medium gemessen. Eine Kultur wuchs konstant bei 37°C und 180 rpm und die andere wurde nach dem Erreichen OD₆₀₀ schnell im Eiswasser auf 15°C runtergekühlt und weiter bei 15°C und 180 rpm inkubiert. Aus dem Vergleich der beiden Kurven wird deutlich, dass direkt nach der Senkung der Temperatur das Wachstum praktisch aufhörte und nach der ungefähr zweistündiger Adaptationszeit wurde mit der niedrigeren Wachstumsrate wieder aufgenommen.

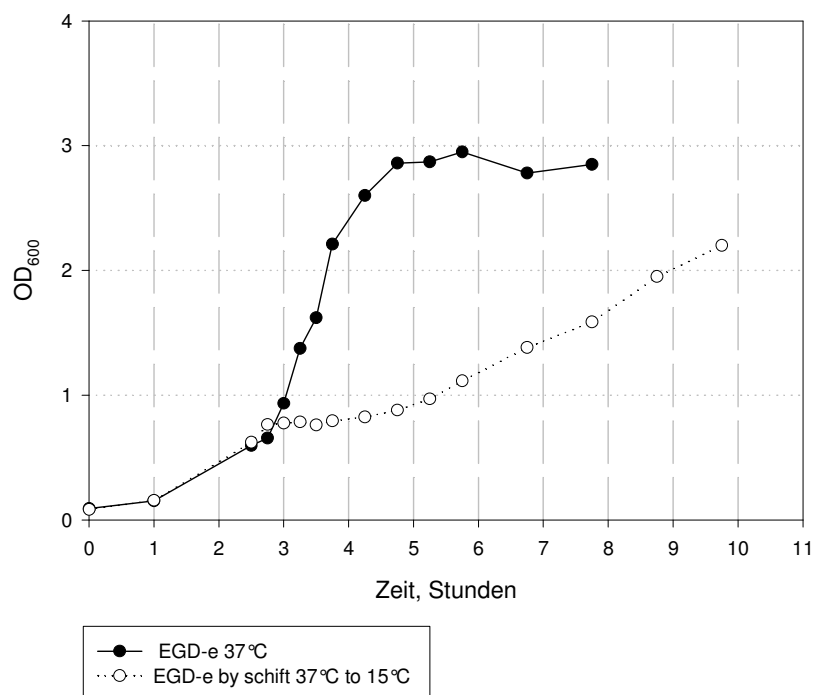


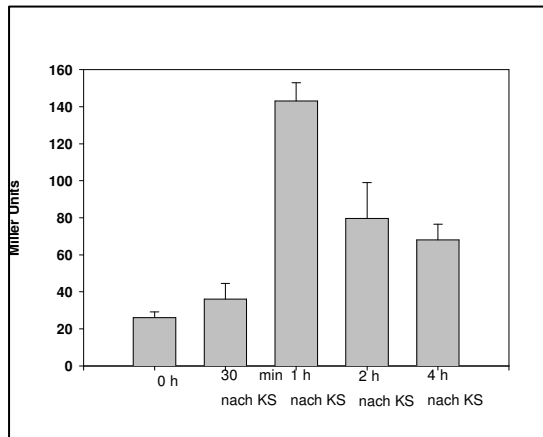
Abb. 1. Wachstum der Kultur *Listeria monocytogenes* bei der Senkung der Temperatur von 37° auf 15°C.

3.2 Expression des *cspLA* Promotors

Um zu prüfen, wann nach dem KS die Expression von „major cold shock protein“ *cspLA* ansetzt, wurde *cspLA* Promotor mittels PCR amplifiziert und in Vektor pSOG30222 vor dem Gen der thermostabilen β -Galaktosidase kloniert. Der Konstrukt wurde in elektrokompente

ERGEBNISSE

EGD-e Zellen transformiert und β -Galaktosidase-Assay durchgeführt. Dank dem 60°C-Schritt wurden endogene β -Galaktosidasen von *L. monocytogenes* inaktiviert und spezifische Expression von thermostabilen β -Galaktosidase vom *cspLA*-Promotor nachgewiesen. Proben wurden nach 30 min, 1 h, 2 h und 4 h nach dem KS entnommen.



Die Expression von *cspLA*-Promotor weist nach einer Stunde das Maximum auf und klang danach ab.

Abb. 2. β -Galaktose-Aktivität nach dem Kälteschock

3.3 Proteinexpressionprofile nach dem KS

Um abzuschätzen, wie sich die Proteinsynthese nach dem KS verändert, wurden die Proteinprofile von verschiedenen Zellfraktionen untersucht. Dafür wurden die Zellwand, Zytoplasma und Überstandproteinextrakte aus 50 ml Kultur bei 37°C und nach 1 h, 2 h und 4 h nach dem KS hergestellt, elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Blue Färbelösung angefärbt. Eingesannte Gele sind in der Abb. 3 dargestellt.

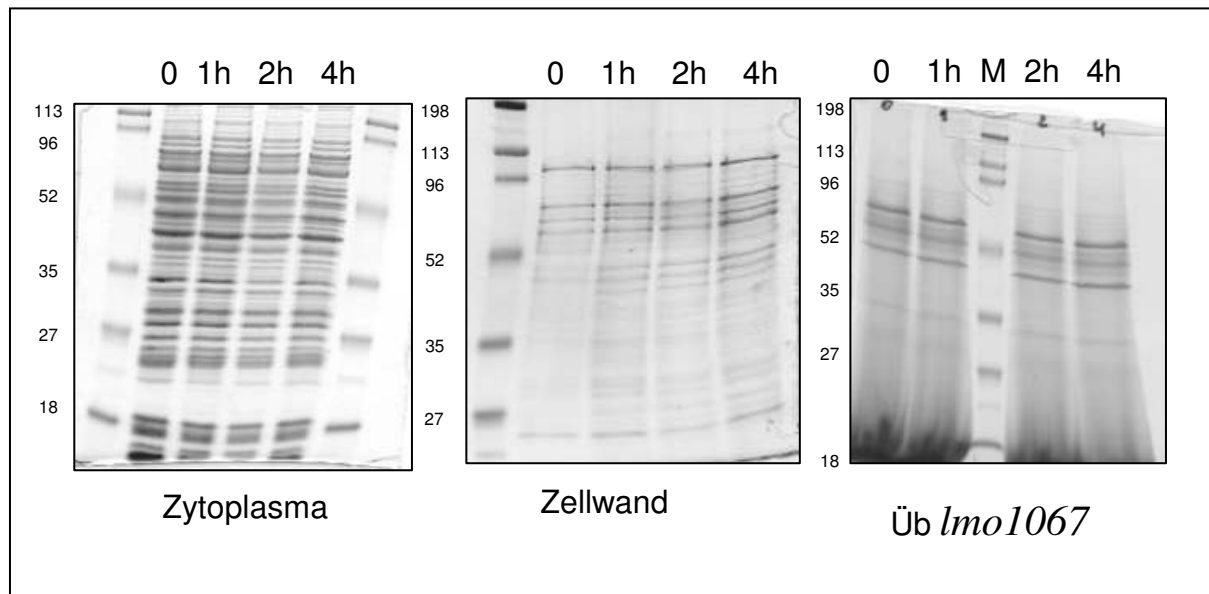


Abb. 3. Proteinextrakte nach dem KS. PAGE Gel, mit Coomassie Blue Lösung angefärbt. 8 µl Extrakt pro Spur aufgetragen.

Auf den Coomassie Blue angefärbten SDS-PAGE Gelen waren keine Unterschiede in Proteinprofilen sichtbar.

3.4 Microarray-Analyse der Kälteschockantwort

Die Microarray-Analyse sollte den Aufschluss über die Antwort des gesamten Genoms *L. monocytogenes* auf Senkung der Umgebungstemperatur bringen. Die Zeitpunkte für Probenentnahme wurden ausgehend von der Wachstumskurve festgelegt. Als Referenz diente die Kultur, die bei $OD_{600} = 0.6$ bei 37°C entnommen wurde. Weitere Zeitpunkte lagen bei 1, 2 (entspricht der Platophase auf der Kurve) und 4 Stunden (Wachstum wieder aufgenommen) nach dem Kälteschock. Die Transkriptionsprofile nach dem KS wurden mittels DNA Microarray Analyse erhalten und dann mit dem bei 37°C verglichen. Der resultierende Datensatz präsentiert Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei „dye swap“ Varianten von Replikaten. Die Gene mit dem Expressionsverhältnis über zwei und „false discovery rate“ unter 1 % wurden als signifikant bezeichnet und für weitere Analyse verwendet. Insgesamt wurden 434 Gene nach dem KS unterschiedlich reguliert, davon wurde 214 hochreguliert und 220 runterreguliert. Das bedeutet, dass ca. 15 % des Genoms an der KS-Antwort beteiligt ist. Die Gene sind in der Tabelle I im Anhang aufgelistet. Die maximale Anzahl an

ERGEBNISSE

hochregulierten Genen wurde nach 1 Stunde beobachtet, was die akute Antwort auf Veränderung der Umweltbedingungen bedeutet. 143 Gene sind für diesen Zeitpunkt spezifisch und verschwinden an späteren Zeitpunkten. Auch die Anzahl an runterregulierten Genen ist nach 1 Stunde am größten und sie haben den größten Faktor (Tabelle II). Das deutet auf Wiederherstellung der normalen Funktionen nach einer Anpassungsphase nach dem KS hin.

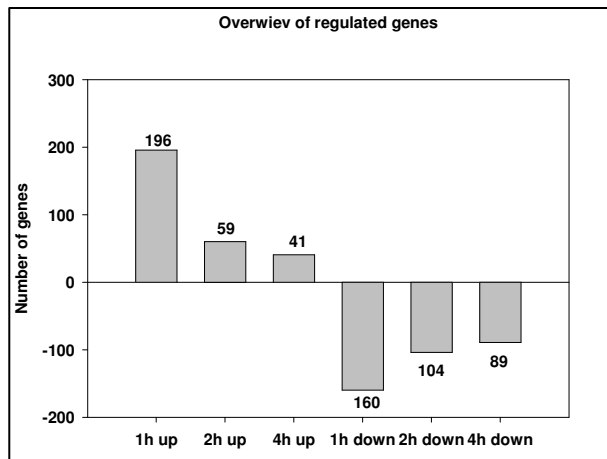


Abb. 4. Übersicht der regulierten Gene nach KS („fold change“ > 2, „fdr“ < 1%)

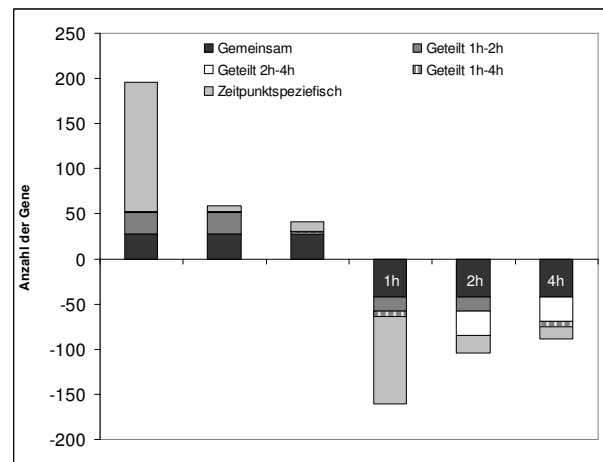


Abb. 5. Gruppen der regulierten Gene nach dem Regulationsmuster

Um die Gene zu identifizieren, die für *L. monocytogenes* KS-Antwort spezifisch sind, wurden alle regulierten Gene auf Vorhandensein der Orthologen in nah verwandten *B. subtilis* und Modellobjekt der Kälteadaptation der mesophilen Bakterien *E. coli* überprüft. 45 % von hoch- und 47 % runterregulierten Genen hatten die Orthologen in *B. subtilis*. Für *E. coli* ergab dieser Vergleich entsprechend 7 und 11 %. Ca. 50 % der Gene waren *Listeria*-spezifisch nach dem Vergleich mit anderen Bakterienspezies, für die Microarray-Analyse der Kälteadaptation durchgeführt wurde (*B. subtilis*, *E. coli*, *Colwellia* sp., *Lactobacillus*, *S. aureus*)

Die größte Gruppe der an KS-Antwort beteiligten *L. monocytogenes*-Gene wurde als “unbekannt” oder “mit nur vorhersagten Funktion” annotiert. Verschiedene Prozesse, die bei KS-Antwort reguliert werden, werden im Kapitel „Diskussion“ beschrieben.

3.5 Microarray-Untersuchung zur Kälteadaptation beim dauerhaften Wachstum bei 15°C

Andere Reihe der Experimente wurde durchgeführt, um die Gene zu identifizieren, die an dem dauerhaften Wachstum bei niedrigen Temperaturen beteiligt sind. Dafür wurde die Übernachtskultur bei 37°C angezogen, im auf 15°C vortemperierten Medium verdünnt und bis zum OD₆₀₀ 0.6 angezogen. Als Referenz diente die RNA auf 37°C Kultur. Die RNA wurde isoliert und Microarray-Analyse wurde wie für Kälteschock-Experiment beschrieben, durchgeführt und statistisch analysiert.

Insgesamt wurden 81 Gene bei dem dauerhaften Wachstum bei 15°C unterschiedlich reguliert, davon wurden im Vergleich zu 37°C 56 Gene hochreguliert und 25 runterreguliert. Das beträgt ca. 3 % des Genoms. Die unterschiedlich regulierte Gene sind in den Tabellen III und IV im Anhang dargestellt. 5 aktivierten KS-Antwort Genen wurden auch bei der Kälteadaptation hochreguliert, 21 Gene blieben reprimiert. Einige Kälteschock-Gene wurden bei der dauerhaften Kälteadaptation durch niedrigeren Regulationsfaktor und höheren “false discovery rate” charakterisiert und sind somit nach unseren statistischen Kriterien nicht in die resultierende Liste rein gekommen.

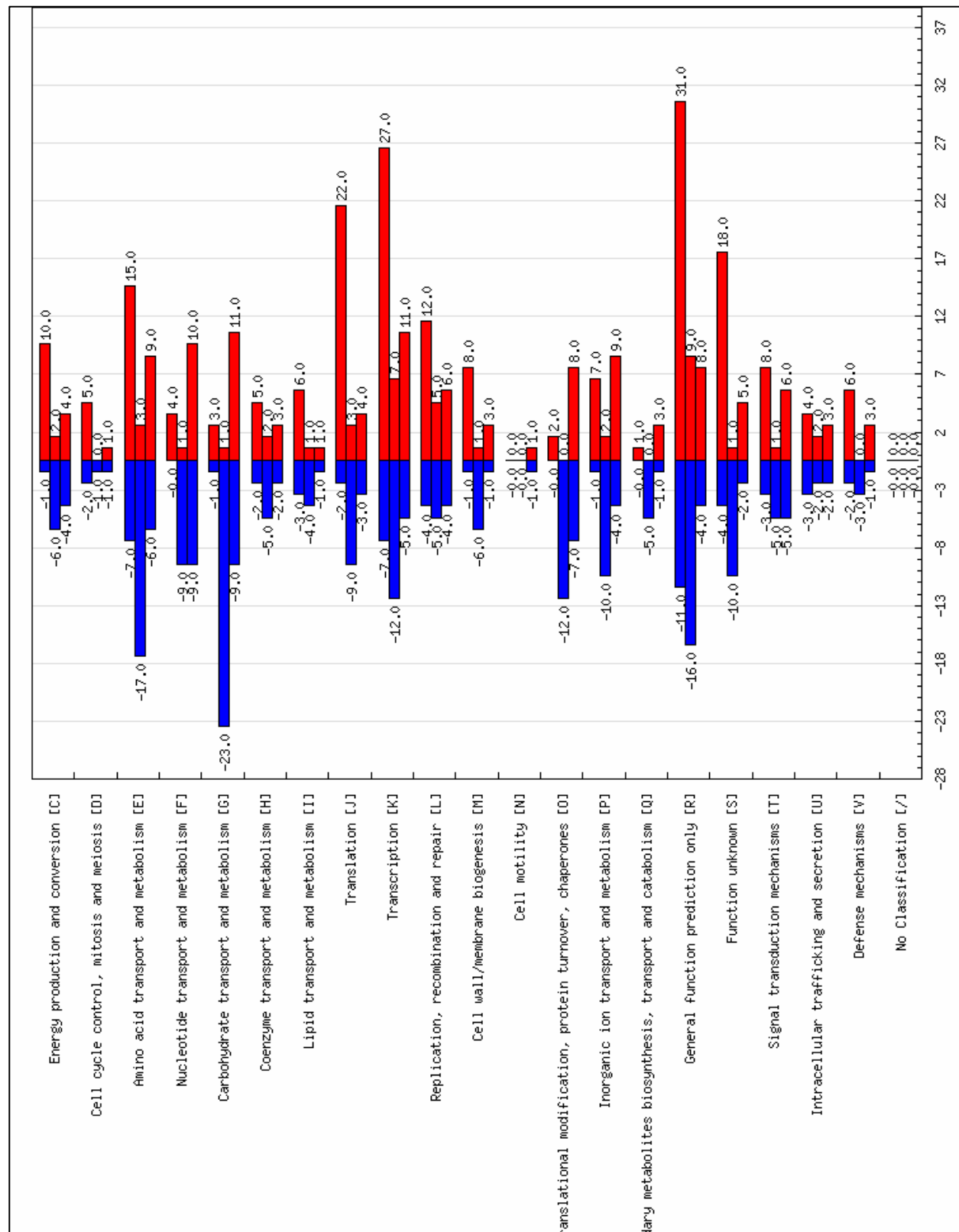


Abb. 6. Gruppen der regulierten Gene nach dem Kälteschock nach COG Klassifizierung.

Grau – hochreguliert, schwarz - runterreguliert.

3.6 Northern Blot

Die aus Microarray-Analyse bekannte Induktion von Genen von Helikasen und *lmo1067* wurde in Northern Blot Experimenten untersucht. Dafür wurde die Gesamt-RNA aus den Kulturen bei 37°C und nach 1, 2 und 4 Stunden nach dem Kälteschock isoliert und gleiche Menge davon auf dem denaturierenden 1.3 % Agarosegel aufgetrennt. Die Transkription wurde nach der Übertragung auf die Hybond N+ Membran durch DNA-RNA Hybridisierung mit DIG-markierten Sonden analysiert. Die spezifischen Sonden wurden in PCR mit DIG-PCR-Mix (ROCHE) mit den Primern für RT-PCR hergestellt. Größen sind in der Tabelle 6 dargestellt.

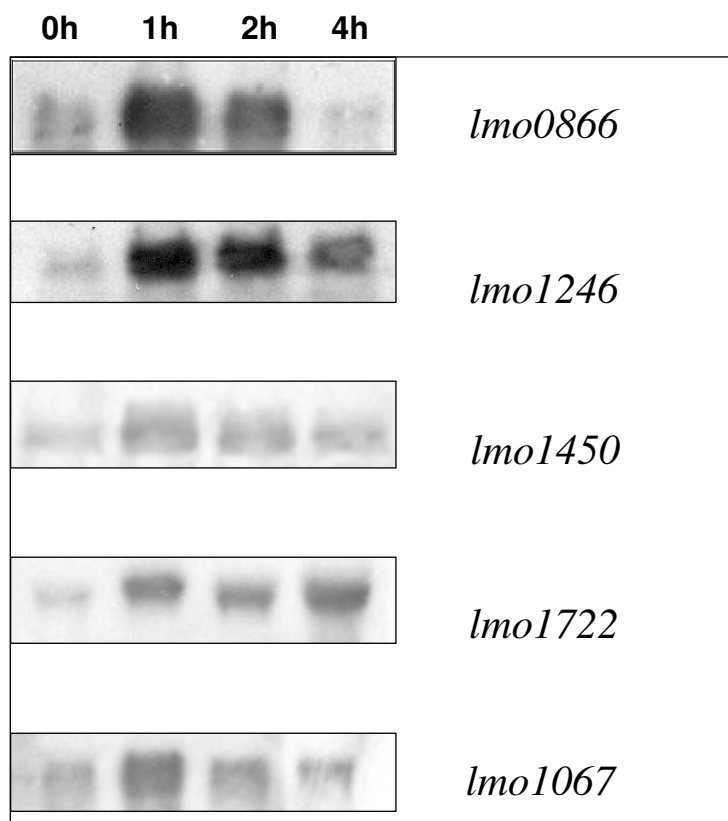


Tabelle 6. Größen der Sonden

Gen	Länge der Sonde, bp
<i>lmo0866</i>	141
<i>lmo1246</i>	174
<i>lmo1450</i>	138
<i>lmo1722</i>	126
<i>lmo1067</i>	116
<i>cspLA</i>	136

Abb. 7. Northern Blots mit den Genen der Helikasen nach dem KS.

Für alle untersuchten Gene konnte das Hybridisierungssignal in Form einzelner Bande nachgewiesen werden (Abb.7). Das bedeutet, dass die Transkription der zu untersuchten Gene als ein Transkript sowohl bei 37°C als auch nach dem Kälteschock identisch ist. Allerdings waren für alle untersuchten Gene die Banden nach Kälteschock deutlich stärker, als bei 37°C.

ERGEBNISSE

Die Transkriptgrößen entsprachen den angenommenen Größen eines monocistronischen Transkripte für *lmo0866*, *lmo1722*, *lmo1067* und der polycistronischen mit zwei „down-stream“ liegenden Genen für *lmo1450* und mit dem down-stream liegenden *lmo1247* für *lmo1246*. Das aus der Mikroarray-Analyse bekannte Profil mit Maximum der Transkription nach einer Stunde nach Kälteschock wurde durch Northern Blot Analyse bestätigt. Intensivste Bande nach 1 Stunde ist auf den Blots mit allen Genen zu erkennen. Einzige Diskrepanz ergab sich im Fall des Gens *lmo1722*, dessen Induktion in Mikroarray-Analyse mit der Zeit abklingt, aber nach Northern-Blot-Ergebnissen nach 4 Stunden noch ein Maximum aufzeigt.

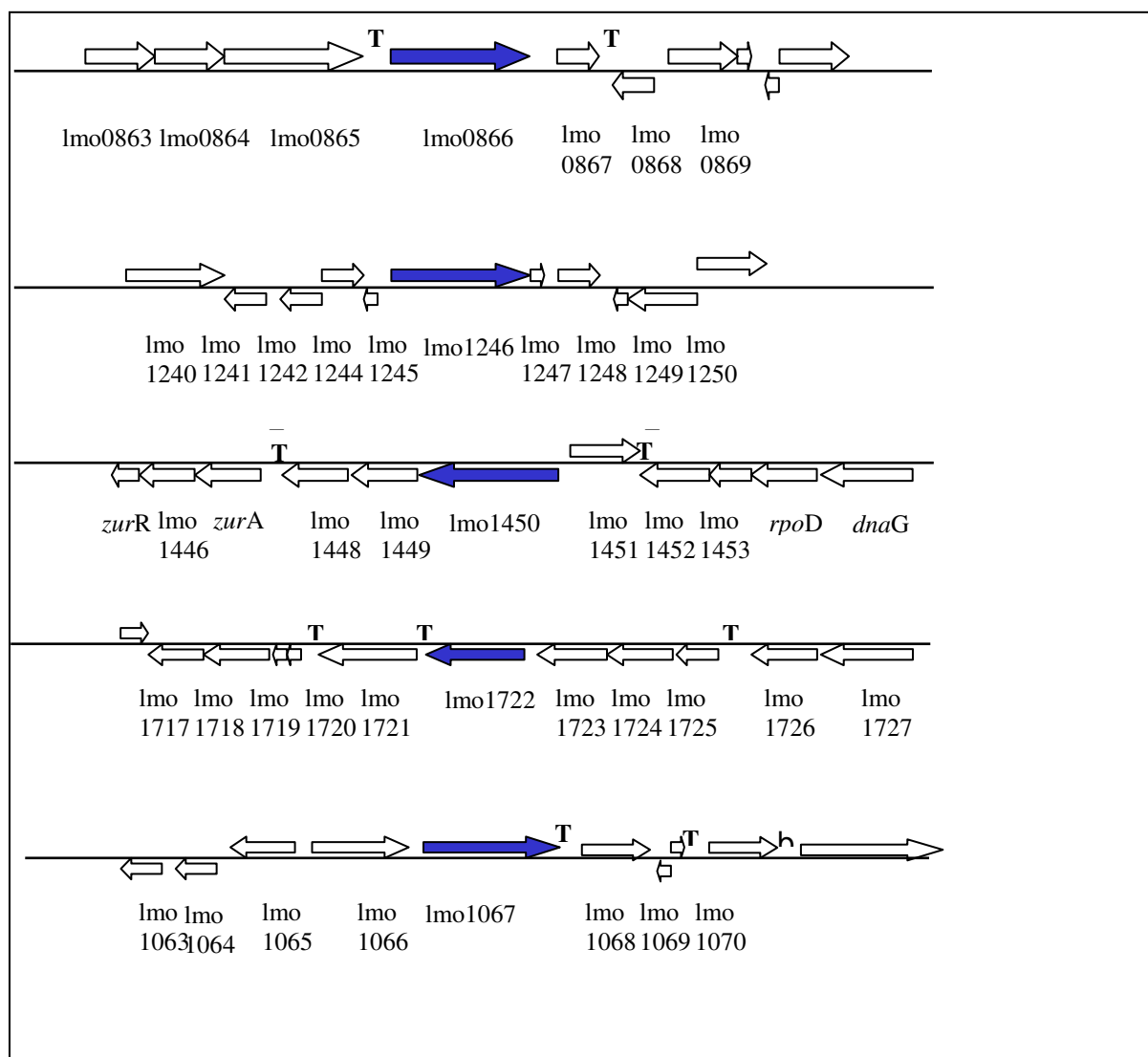


Abb. 8. Aufbau von den anliegenden Bereichen zu Helikasen. T = Terminator.

3.7 RT-PCR

„Real Time PCR“ mit der cDNA aus der reversen Transkription Reaktion sollte die Ergebnisse der Mikroarray Analyse bestätigen. Dafür wurde die gesamt-RNA nach dem KS isoliert, in cDNA umgeschrieben und in die RT-PCR Reaktion eingesetzt. Die Primer für RT-PCR sind von Firma Qiagen entwickelt und ergeben ein spezifisches Signal in Form ca. 150 bp großen PCR-Produkts. Für Ergebnisse der RT-PCR sieh Abb. 9.

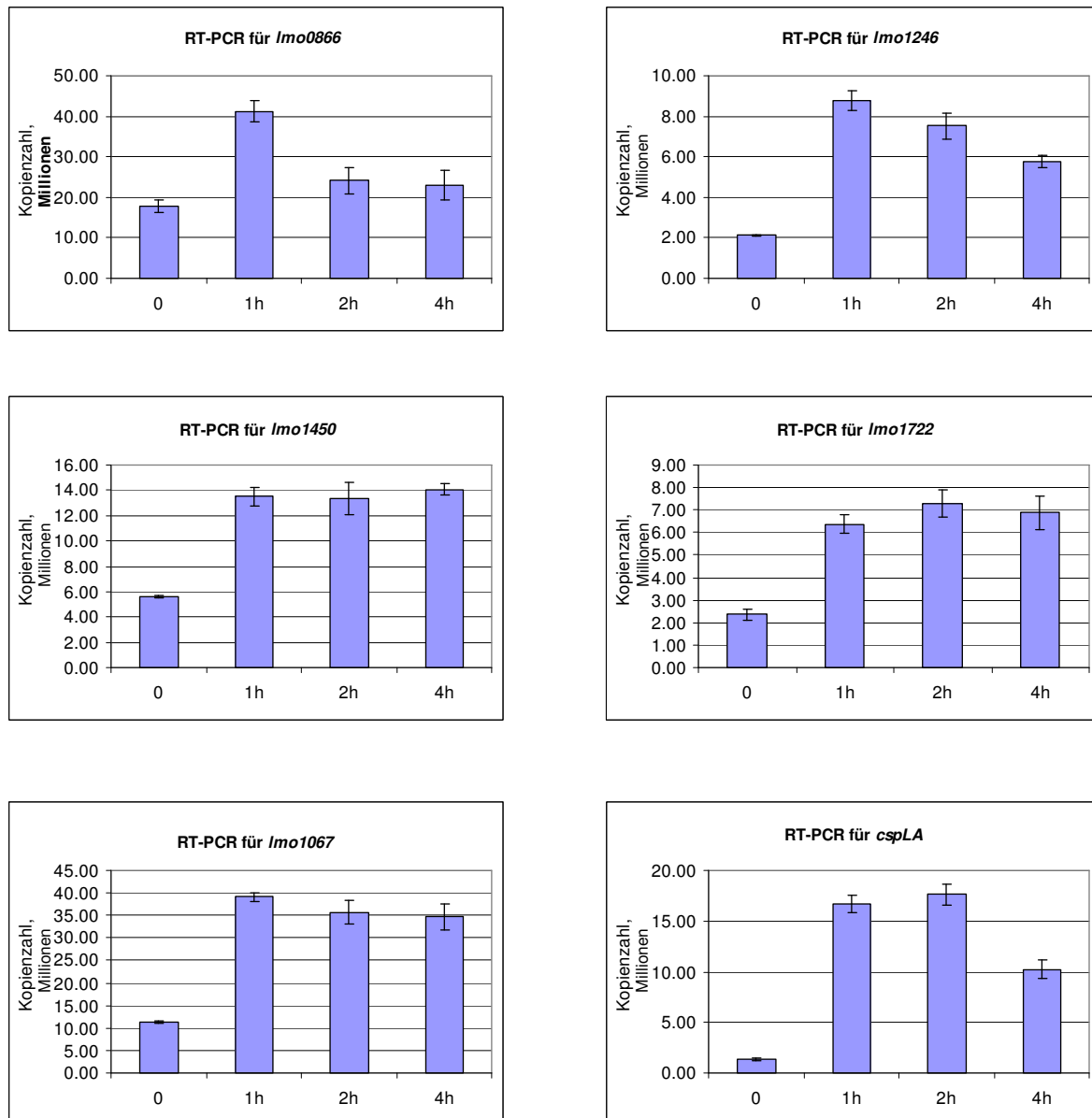


Abb. 9. Kopienzahl der Transkripten nach dem KS anhand des Ergebnisses von RT-PCR (absolute Quantifizierung).

ERGEBNISSE

Für alle untersuchten Gene wurde die Induktion nach dem KS demonstriert. Maximale Induktion wurde nach 1 h beobachtet. Hauptkälteschockprotein *cspLA* diente als Kontrolle und wies den höchsten Induktionsfaktor auf. Expression von *lmo0866*, *lmo1246*, *lmo1067* und *cspLA* klang an den späteren Zeitpunkten ab. Signal von *lmo1450* und *lmo1722* blieb auf dem erhöhten Niveau. Mit ca. 40 Mio. Kopien nach dem KS hatten die Helikasen *lmo0866* und *lmo1067* höchste Kopienzahl unter den untersuchten Genen.

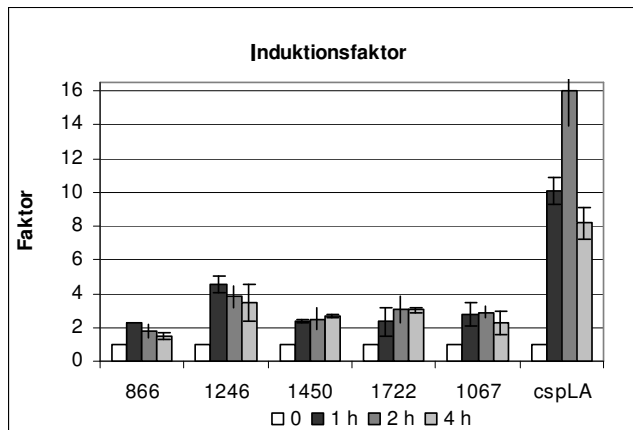


Abb. 10 Induktionsfaktor nach Kälteschock
in RT-PCR

3.8 RACE

Die Bestimmung des Transkriptionsstartpunkts sollte Aufschluss über mögliche Bindungsmotive für die Regulatoren im 5'-nichttranslatierten Bereich der untersuchten Gene bringen. Der Transkriptionsstartpunkt wurde anhand der RNA aus der Kultur nach 1 Stunde Kälteschock durch die RACE-Methode („rapid amplification of cDNA-ends“) identifiziert. Die verwendete Primer sind in der Tabelle 5 dargestellt. Für Gene *lmo1246*, *lmo1450* und *lmo1722* wurden kurze 5'-nichttranslatierte Bereiche von jeweils 17, 27 und 24 bp identifiziert. *Lmo0866* und *lmo1067* besitzen dagegen längere 5'-Bereiche von 277 und 110 bp. In allen Fällen konnten -10 und -35 (außer *lmo1722*) Sequenzbereiche identifiziert werden (Tabelle 7).

Konsensussequenzen :

-10: T₈₀A₉₅T₄₅A₆₀A₅₀T₄₈ -35: T₈₂T₈₄G₇₈A₆₅C₅₄A₄₅

Tabelle 7. 5'-Bereiche der Gene von RNA-Helikasen

Genname	Transkriptionsstart	-10 Sequenz	-35 Sequenz	RBS	Intragenisch
<i>lmo0866</i>	-277	TATGAT	TTGAAA	AGGAGA	ja
<i>lmo1246</i>	-17	TATGAT	TTCCAT	TGAGGA	ja
<i>lmo1450</i>	-27	TATAAT	TTAACA	GAGTGG, GGAGT	ja
<i>lmo1722</i>	-24	TATGAT		GGAGTC	nein
<i>lmo1067</i> (<i>bipA</i>)	-110	TATAAT	GTGCCA	AGGAGG	ja
<i>cspLA</i>	-110	TATACT		AGGAGG	ja

<i>lmo0866</i>	ACGTTG⁻³⁵AAAAGAAATAATTAGTGTGTT⁻¹⁰TATGATGATAGATGGAAGTTT⁺¹ ATTAGGTTTATAT -240bp- TAAAGG^{RBS}AGAAATGACATTG
<i>lmo1246</i>	TCGTTCCATCATTGTGAAAAAATATGGTATGATGATATGAGGAA-⁺¹ RBS TGAGGACTGACATG
<i>lmo1450</i>	GTCTTA⁻³⁵CACGCGCACGAATGTCCAATTATGTGCT⁻¹⁰TATAATGGCTA⁺¹ CTAGGTATAGAACGGAGT^{RBS}GGAAATATTTTATG
<i>lmo1067</i>	ATCGTGCCAAATCGGCTCAGCTATGCTATAATAGGTAATGTGATT⁺¹ AAACGAGACGAT-70bp-ATTTAGG^{RBS}AGGAAACAAGATTG
<i>lmo1722</i>	ACTAAATAAAAGTGCAGACTTGCAGTAAGCGTGGTATGATACAGAGA⁺¹ AGAACTAATAAAGGAGTCGGGTTATG Stop-Kodon <i>lmo1723</i>

Abb. 11. Sequenzen der 5'-nichttranslatierten Bereiche der untersuchten Gene erstellt mit RACE Methode.

3.9 Herstellung der Deletionsmutanten

3.9.1 Klonierung der Fragmenten für die Herstellung von den Deletionsmutanten

Für die Funktionsanalysen verschiedener in der Microarray-Analyse hochregulierten Genen wurden chromosomale Deletionsmutanten hergestellt. Dazu wurden die kompletten kodierenden Sequenzen „in frame“ (ohne Verschiebung des Leserasters) deletiert. Das Stop-Kodon des ausgeschalteten Genes blieb auf dem Chromosom erhalten. Die „up-stream“ und „down-stream“ flankierenden Bereiche wurden mittels PCR mit chromosomaler DNA als Matrize amplifiziert. Die verwendete Primer sind in der Tabelle 5 und resultierende Fragmentengrößen in der Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8. Klonierte Fragmente für die Herstellung der Mutanten.

Mutante	Upstream Bereich, Primer 1-for und 2-rev, bp	Downstream Bereich, Primer 3-for und 4-rev, bp	Produkt der Fusions- PCR mit Primern 1-for und 4-rev, bp	Produkt im WT, Primer 1-for und 4-rev, bp
<i>Δ0866</i>	314	375	673	227
<i>Δ1450</i>	348	356	690	1995
<i>Δ1327</i>	342	448	786	1122
<i>Δ1246</i>	349	382	716	2126
<i>Δ1722</i>	406	385	779	2102
<i>Δ1516</i>	409	460	854	1054
<i>Δ1518</i>	309	404	642	1069
<i>Δ1067</i>	404	386	751	2415
<i>Δ1298</i>	337	308	646	1012
<i>Δ0443</i>	282	399	665	1591
<i>Δ1416</i>	310	344	640	1416
<i>Δ2522</i>	291	298	572	2522

Die Primer 2-for und 3-rev enthalten zu einander komplementäre Überhänge (6-8 Basen lang), so dass die PCR-Produkte nach der Aufreinigung als Matrize für Fusion-PCR verwendet werden konnten. Das erhaltene PCR-Produkt wurde erneut aufgereinigt und in entweder erst in pCR-TOPO Vektor kloniert oder direkt mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und mit dem geschnittenen pAULA-Vektor ligiert. Die verwendeten Restriktionsendonukleasen sind in der Tabelle 5 angegeben. Nach der Ligation wurde Ligationsansatz in chemisch-kompetente *E. coli* DH10 β Zellen transformiert und auf LB-Platten mit Em und X-Gal ausplattiert. Die weißen Bakterienkolonien wurden mittels PCR mit Gen-spezifischen und Vektor-spezifischen Primern getestet und die Bakterienklone wurden ausgesucht, die Insert der richtigen Größe trugen. Aus diesen Bakterienklonen wurde Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

Das Plasmid mit der richtigen Sequenz (ohne Punktmutationen) wurde in elektrokompetente *L. monocytogenes* Zellen elektroporiert und über 2 Tage bei 30°C inkubiert. Die aus der Transformation resultierenden Klone wurden in PCR mit den Primern M100 und M101 überprüft. Die Integration des rekombinanten pAUL-A Vektors erfolgte durch 5-7-maliges Überstreichen einer Einzelkolonie auf den BHI+5Em Platten und Inkubation bei 42°C. Der Erfolg der Integration wurde mit den Primern M100 und M101 überprüft: konnte kein PCR-Produkt mehr amplifiziert werden, bedeutete das, dass kein freies Plasmid mehr Vorhanden ist und dass der pAUL-A-Vektor mit dem Insert ins Chromosom komplett integriert wurde. Die einzelnen Schritte der Klonierungsstrategie sind in der nachfolgenden Abbildung 12 dargestellt.

Die Exzision wurde wie im Methoden Kapitel beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen Em-sensitiven Klone wurden in PCR mit Primern 1-for und 4-rev getestet. Als Kontrolle diente die chromosomale DNA des WT.

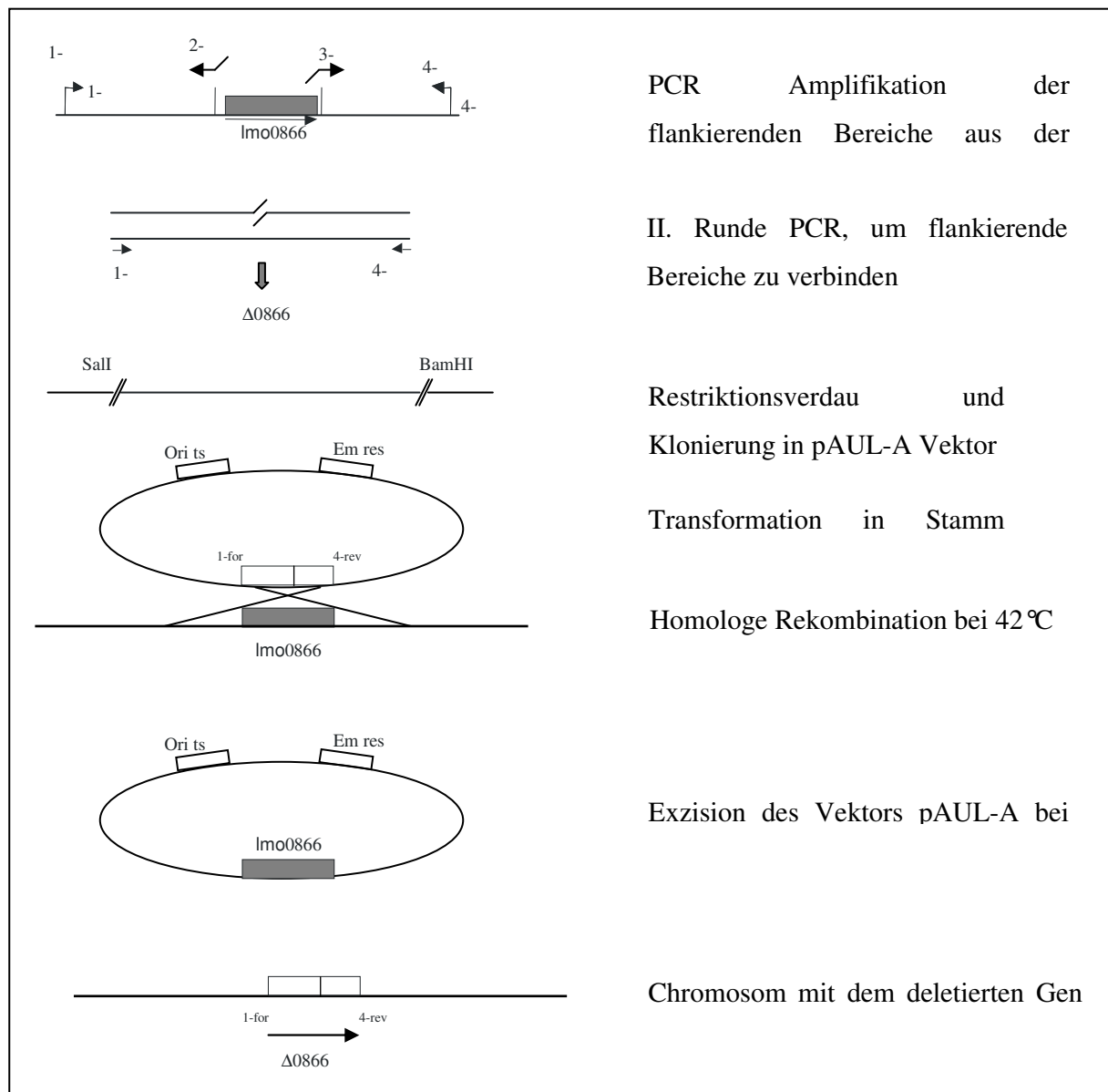


Abb. 12. Schema für Herstellung der Deletionsmutanten

3.9.2 Wachstum der Mutanten

Alle hergestellten Mutanten wurden auf ihr Wachstum in BHI Medium bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Die Wachstumskurven wurden wie im Material und Methoden Teil beschrieben gemessen und erstellt (Abb. 13). Bei 37°C zeigten die Mutanten *Δlmo0443*, *Δlmo1416*, *Δlmo2522*, *Δlmo1327*, *Δlmo1298*, *Δlmo1516*, *Δlmo1518*, *Δlmo1722*, *Δlmo1067* kein Unterschied in Wachstum zum Wildtyp. *Δ0866* und *Δ1450* waren aber leicht im Wachstum verlangsamt. Dagegen beim Wachstum bei 15°C und 20°C blieben Deletionsmutanten *Δ0866*, *Δ1450*, *Δ1722* und *Δ1067* unterschiedlich stark, aber deutlich zurück. Bei

den Mutanten $\Delta 0866$ und $\Delta 1450$ war der Wachstumsdefekt bei niedrigen Temperaturen noch deutlicher, als bei 37°C.

Bei der weiteren Arbeit haben wir uns auf kältesensitiven Deletionsmutanten konzentriert. $\Delta 1246$ wurde trotz ihres kälteresistenten Phänotyps als eine im Mikroarray-Analyse hochregulierte Helikase-Mutante mituntersucht, um das Bild über RNA-Helikasen der *L. monocytogenes* zu vervollständigen.

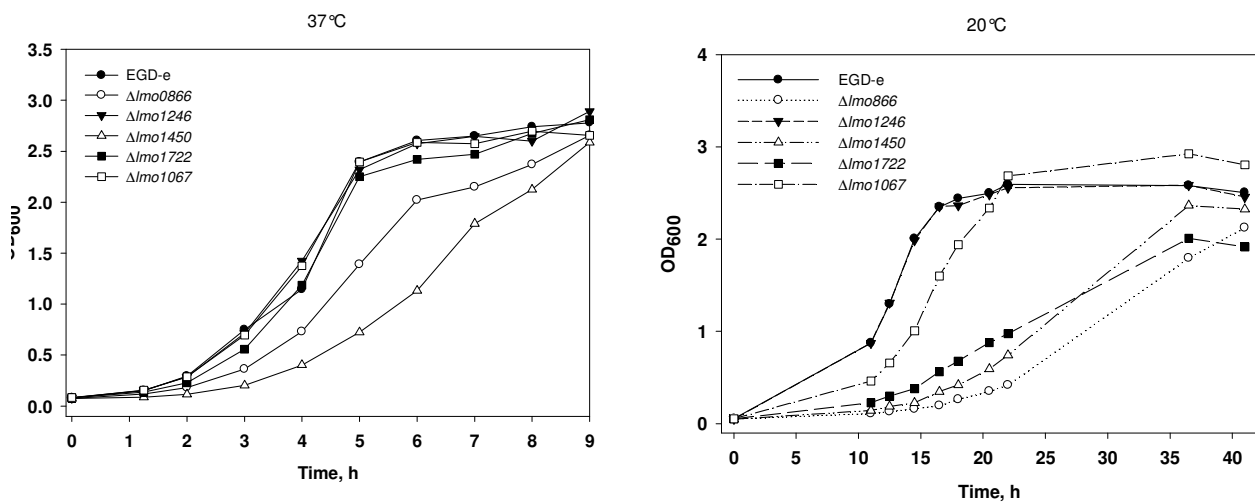


Abb. 13. Wachstumskurven der Deletionsmutanten bei verschiedenen Temperaturen.

3.9.3 Vergleich der exprimierten Proteine des Wildtyp EGD-e und der Deletionsmutanten

Um die Proteinmuster des Wildtyps mit dem der Deletionsmutanten zu vergleichen wurden Kulturen des Wildtyps und der Mutanten bei 37°C und 20°C angezüchtet und Proteinextrakte wurden aus verschiedenen Fraktionen isoliert. Die Proteinextrakte wurden elektrophoretisch im 15% SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blue Färbelösung angefärbt (Abb.14).

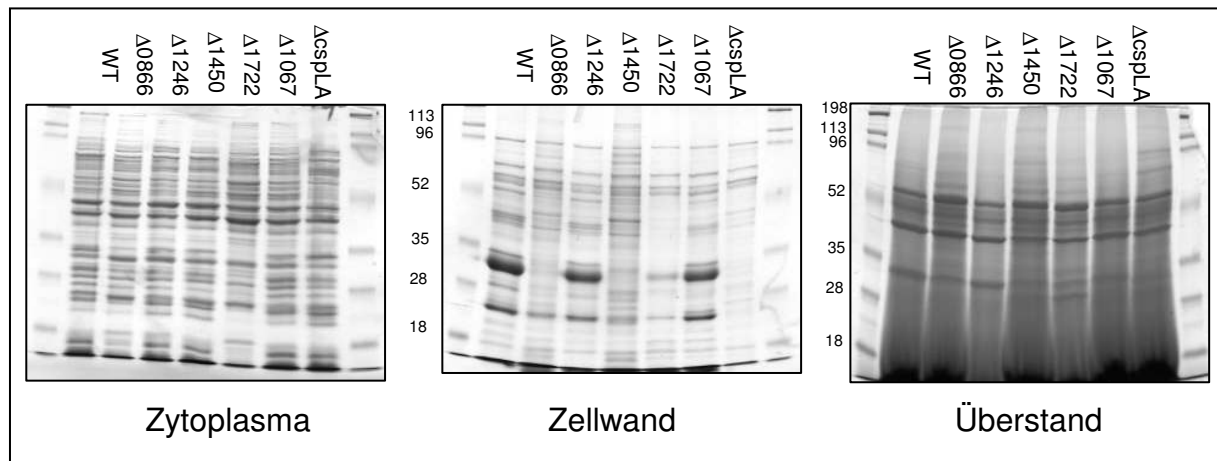


Abb. 14. Proteine, synthetisierte im Wildtyp und Deletionsmutanten bei 20°C im BHI.

In dem Überstandproteinextrakt der Mutanten und Wildtyps waren keine deutlichen Unterschiede erkennbar.

Im Zytoplasmaproteinextrakt fehlte in $\Delta lmo1722$ die Bande bei 35 kDa, die auch in $\Delta lmo0866$ schwächer als im Wildtyp war. Weitere Unterschiede waren im Bereich kleinerer Proteine zu sehen, z.B. Banden bei ca. 22 kDa und 12 kDa waren abwesend, dafür die Bande bei 18 kDa stärker expremiert.

Der Zellwandextrakt wies die meisten Unterschiede auf. Besonders auffallend war eine ca. 30 kDa große Bande, die in den Deletionsmutanten $\Delta lmo0866$, $\Delta lmo1450$ und $\Delta cspLA$ abwesend war und in $\Delta lmo1722$ in der Intensität stark vermindert. Die Größe und Abwesenheit in $\Delta cspLA$ lassen vermuten, dass es sich um FlaA Protein handelt. In diesen Mutanten wichen auch einige Banden im Bereich 45- 52 kDa in der Intensität von dem Wildtyp ab.

3.9.4 Motilitätstest

Um festzustellen, ob die eingeführten Mutationen die Beweglichkeit der *L. monocytogenes* beeinträchtigen, wurden die Motilitätstests im Weichagar wie im Material und Methoden Kapitel beschrieben durchgeführt (Abb.15). Die Beweglichkeit der Kulturen wurde nach der Verbreitung im Weichagar beurteilt. Die Helicasen-Deletionsmutanten $\Delta lmo0866$, $\Delta lmo1450$, $\Delta lmo1722$ wiesen bei 15°C unbeweglichen Phänotyp auf und $\Delta lmo1067$ zeigte verminderte Beweglichkeit im Vergleich zu Wildtyp. Bei 37°C waren sowohl alle getesteten Mutanten als auch Wildtyp unbeweglich.

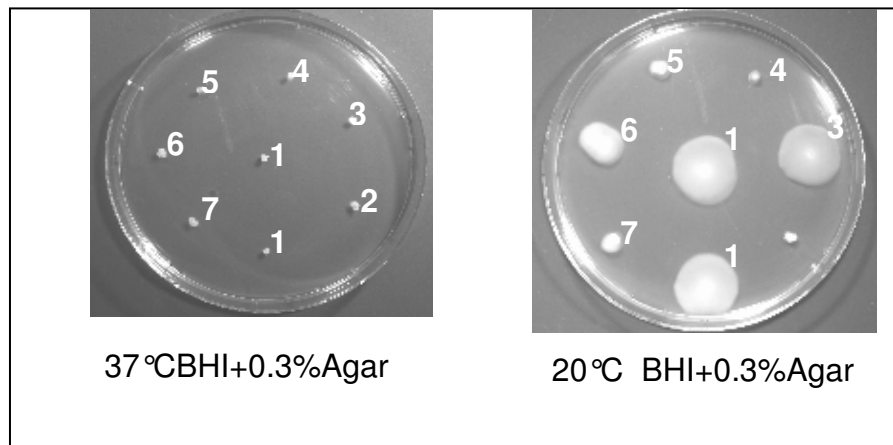


Abb. 15. Motilitätstest mit dem Wildtyp und den Deletionsmutanten.

1 - WT, 2 - *Δlmo0866*, 3 - *Δlmo1246*, 4 - *Δlmo1450*, 5 - *Δlmo1722*, 6- *Δlmo1067*, 7 - *ΔcspLA*

3.9.5 Western Blot mit anti-FlaA Antikörper

Untersuchung der Expression des Geißelstrukturproteins FlaA sollte Aufschluss über fehlende Beweglichkeit in den Deletionsmutanten der Helikasen geben. Dafür wurden die Zellwandproteinextrakte aus den bei 20°C angezogenen Kulturen auf SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran mit Hilfe des Semidryblots übertragen und mit dem polyklonalen anti-FlaA Antikörper (1:5000) hybridisiert und mit ECL-Methode (GE Healthcare) visualisiert (Abb.16). Das FlaA-Signal erscheint als eine Bande mit dem Molekulargewicht ca. 30 kDa.

In den Extrakten der *Δlmo0866* und *Δlmo1450* als auch in der negativen Kontrolle *ΔcspLA* ließ sich keine FlaA-Synthese nachweisen. In Extrakten aus *Δlmo1722* und *Δlmo1067* war die Expression von FlaA vermindert mit der stärkeren Verminderung bei *Δlmo1722*. Die Deletion des Gens *lmo1246* hatte keinen Einfluss auf die FlaA Proteinexpression.

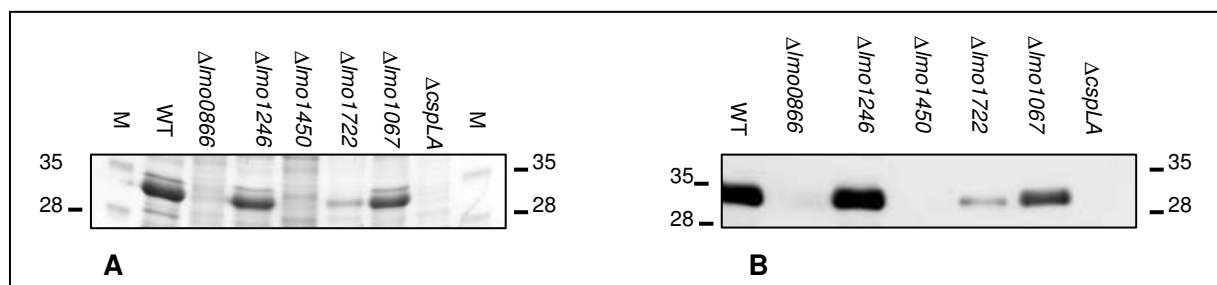


Abb. 16. Expression des FlaA-Proteins im Wildtyp und in den Deletionsmutanten.

A. Coomassie-Gel mit den Zellwandproteinextrakten

B. Western Blot mit anti-FlaA Antikörper.

3.9.6 Bildung der Biofilme

Die Fähigkeit der Mutanten zur Adhäsion auf der Kunststoff-Oberfläche wurde im Biofilmasay untersucht. Hierfür wurde die Kultur der zu untersuchenden Stämmen in 96-Well Platte bei 37°C und bei 20°C angezogen, frei schwimmende Bakterien abgesaugt und nach dem Waschen am Boden und Wänden haftenden Bakterien angefärbt. In diesem Test konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden (Abb.17).

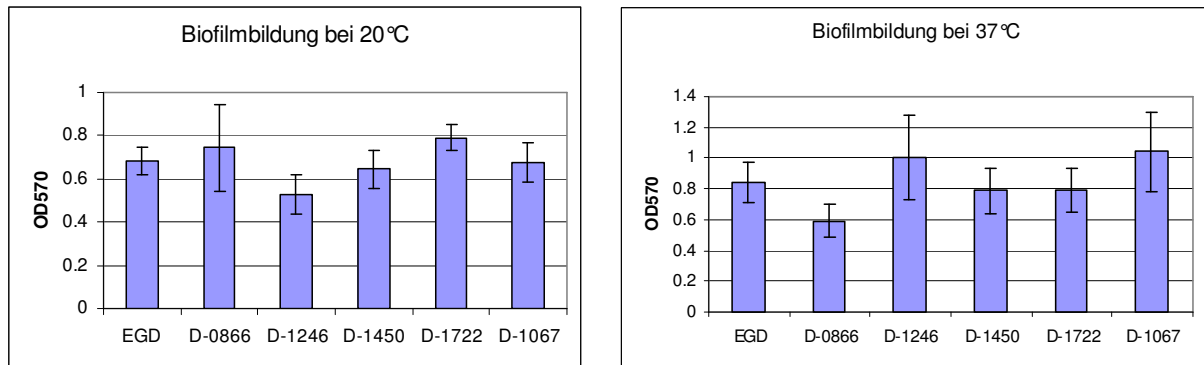


Abb.17. Biofilmbildung auf den 96-Well Polystyrenplatten.

3.9.7 Herstellung der Komplementanten

Um den Phänotyp der Deletionsmutanten zu bestätigen, wurden die zuvor deletierten Gene durch Klonierung in Em-resistentes Plasmid pSOG3022 und Transformation in Deletionsstamm zurückgebracht. Alle komplementierende Gene wurden unter deren eigenem Promotor kloniert. Verwendete Primer sind in der Tabelle 5 und die resultierenden Fragmentengrößen sind in der Tabelle 9 dargestellt.

Nach der Überprüfung der korrekten Sequenz durch automatische Sequenzierung wurden rekombinante Plasmide in kompetente Zellen der Deletionsmutanten durch Elektroporation transformiert und mittels PCR nachgewiesen.

Tabelle 9. Klonierte Fragmente für die Herstellung der Komplementanten

Gen	Länge des klonierten Fragments, bp	5'-Region	Kodierende Sequenz	3'-Region	Terminator
<i>lmo0866</i>	2173	477	1563	122	+
<i>lmo1450</i>	1670	340	1287	22	-

ERGEBNISSE

<i>lmo1722</i>	1562	152	1325	83	+
<i>lmo1067</i>	2119	152	1835	43	+

Hergestellten Komplementanten wurden auf ihr Wachstum auf BHI bei verschiedenen Temperaturen untersucht (Abb. 18, 19). Hierfür wurden je eine Bakterienkolonie von dem Wildtyp, Deletionsmutante und Komplementante von der frischen Agar-Platte auf eine neue Platte überstrichen und 1 Tag bei 37°C bzw. 3 Tage bei 15°C inkubiert.

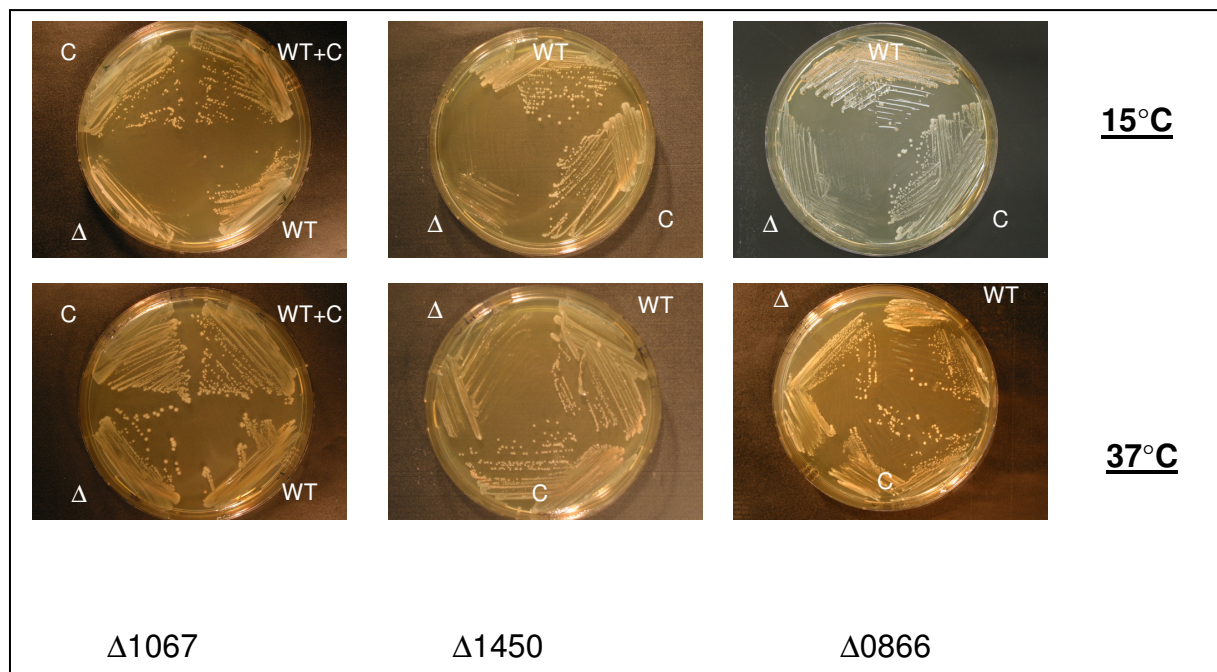
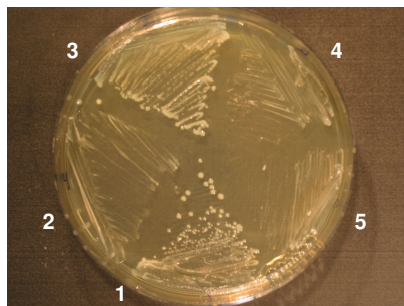


Abb. 18. Wachstum der Hergestellten Komplementanten auf BHI Medium.

Es konnte festgestellt werden, dass die Klonierung von den Genen der drei zu untersuchten Helikasen unter der Kontrolle des eigenen Promotors Wachstumsdefekt bei niedriger Temperatur kompensiert. Für $\Delta 01450$ und $\Delta 0866$ wurde auch Defekt bei 37°C kompensiert.



Die Komplementation des $\Delta 1722$ hat nicht gelungen, die Komplementante blieb im Wachstum bei 20°C genau so wie Wildtyp zurück.

Abb. 19. Wachstum der *lmo1722* Komplementante bei 15°C. 1 – WT, 2 – $\Delta lmo1722$, 3–WT+Komplementante, 4 und 5– $\Delta lmo1722$ +Komplementante.

4 DISKUSSION

4.1 Transkriptomantwort von *L. monocytogenes* auf Kälteschock

Die besondere Fähigkeit der Kälteadaptation von *L. monocytogenes* stellt bei der Lagerung von Lebensmitteln ein ernsthaftes Problem für die Lebensmittelindustrie dar. Bisherige wissenschaftliche Arbeiten untersuchten vor allem die Bedeutung einzelner Gene für die Kälteanpassung der Listerien. Auch vorhandene Daten aus 2D-Proteinelektrophorese-Studien geben wegen technischer Beschränkungen auch keinen kompletten Überblick über die Mechanismen, die bei *L. monocytogenes* nach der Temperatursenkung aktiviert werden. In dieser Arbeit wird zum ersten Mal die Transkriptomantwort von *L. monocytogenes* auf den Kälteschock präsentiert, die mit Hilfe der Microarray-Analyse auf dem DNA-Chip ermittelt wurde.

In dieser Arbeit wurden die Transkriptionsprofile nach dem Kälteschock der Kultur von *L. monocytogenes* durch Microarray-Analyse untersucht und dann mit denen bei 37°C verglichen. Der resultierende Datensatz wurde aus drei unabhängigen Experimenten gewonnen. Varianten von Replikaten. Die Gene mit einem Expressionsverhältnis über zwei und einer „false discovery rate“ unter 1 % wurden als signifikant gewertet und weiter analysiert.

Insgesamt wurden 434 Gene nach dem Kälteschock unterschiedlich reguliert, davon wurde 214 hochreguliert und 220 runterreguliert. Daraus folgt, dass ca. 15 % des Genoms an der Kälteschock-Antwort beteiligt ist. Die Gene sind in der Tabelle I im Anhang aufgelistet.

L. monocytogenes reagiert auf akute Temperatursenkung mit einer ca. 2-stündigen Lag-Phase. Auch wenn direkt nach der Temperatursenkung Wachstum der Kultur aufhört, verändert sich die Physiologie der Zelle an diesem Zeitpunkt am stärksten, was durch die höchste Anzahl an hochregulierten Genen nach einer Stunde bestätigt wird. 143 Gene sind für diesen Zeitpunkt spezifisch und konnten an späteren Zeitpunkten nicht mehr identifiziert werden. Sowohl die Anzahl an runterregulierten Genen ist nach einer Stunde am größten (96 Gene) als auch der Faktor der Repression. Diese Beobachtung deutet auf eine Normalisierung des Zellstoffwechsels nach einer Anpassungsphase an neue Umweltbedingungen hin.

Die größte Gruppe der an Kälteschock-Antwort beteiligten *L. monocytogenes* - Gene wurde als „unbekannt“ oder „mit nur vorhersagten Funktion“ eingestuft. Verschiedene im Kälteschock regulierte Stoffwechselprozesse werden weiter unten beschrieben.

4.1.1 Osmolyten-Aufnahme nach Kälteschock

Die Aufnahme von Osmolyten ist als einer der Anpassungsmechanismen bei niedrigen Temperaturen bei *L. monocytogenes* bekannt und wurde bei der dauerhaften Kälteadaptation schon gezeigt (Wemekampf-Kamphius, 2004). In dieser Arbeit wurde die unterschiedliche Regulation der drei von den vier bekannten Osmolyten-Aufnahme-Systemen demonstriert.

Besondere Bedeutung in der Phase der sofortigen Antwort kommt dem ATP-abhängige *gbuABC* System zu, dessen Gene nach einer Stunde 5,8-7,1-fach hochreguliert wurden. Dieses System transportiert bevorzugt Betain, und es passt zu früheren Arbeiten, die ein Bevorzugen des Betains über dem Carnitin bei der Kälteadaptation von *L. monocytogenes* aufzeigten (Wemekampf-Kamphius, 2002). *opuC* (*lmo1425* - *lmo1426*, ein anderes ABC-Transporter-System, und der Na⁺-angetriebene Transporter *betL* (*lmo2092*) waren nach einer Stunde stark runterreguliert und wurden auch an späteren Zeitpunkten nicht über dem Grenzwert detektiert. Weitere Microarray-Analysen zeigten, dass das Transporter-System *opuC* allerdings beim dauerhaften Wachstum bei 15°C 2,5-fach (q=1,66%) induziert wurde.

OpuC besitzt eine Konsensussequenz von der *sigB* - Bindungsstelle im Promotorbereich und wird von dem alternativen Sigma-Faktor σ^B reguliert (Fraser, 2003). Die Runterregulation von *opuC* korreliert mit der Tatsache, dass *sigB* (*lmo0895*) selbst nach einer Stunde 2,4-fach runterreguliert ist und nach zwei und vier Stunden und beim dauerhaften Wachstum bei 15°C nicht über dem Grenzwert detektiert wurde. In den anderen Studien, die die Beteiligung von *opuC* (Angelidis, 2003), *betL* und *sigB* an der Kälteadaptation zeigen, wurden auch an späteren Zeitpunkten Proben genommen. Möglicherweise ist das Muster der identifizierten Osmolytenaufnahmeregulation für die sofortige Kälteschock-Antwort spezifisch. Zum Beispiel wurde die Runterregulation von *opu-CACBCCCD* nach 30 bis 90 Minuten nach dem Kälteschock für *B. subtilis* von Kaan mit Kollegen gezeigt (2002).

Es ist bekannt, dass unter Kältestressbedingungen von Bakterien Oligopeptide aufgenommen werden, was für das Überleben der Zelle wichtig sind (Borezee, 2000). *L. monocytogenes* hat vier Oligopeptidaufnahmesysteme. Die Gene *lmo0555* (Wouters, 2005), *lmo2569*, *lmo0136-0137* wurden runterreguliert. Die Repression des ABC-Transporters, der von dem *lmo0136-0137*-Operon kodiert ist, kann durch das Runterregulieren von *sigL* (*rpoN*, *lmo2461*) erklärt werden, die Expression von *lmo0136-0137* wurde bereits mit *sigL* in Verbindung gebracht (Arous, 2004).

Das erste Gen des ATP-getriebenen Oligopeptidtransporters *oppA* (*lmo2196*) war nach einer Stunde 3.8-fach runterreguliert und zu späteren Zeitpunkten schwach induziert. Die Notwendigkeit des *oppA* Gens für das Wachstum bei niedriger Temperatur wurde schon einmal beschrieben (Borezee, 2000) was es wahrscheinlich macht, dass es bei späteren Stadien der Kälteadaptation eine Rolle spielt. In adaptierten Zellen können die aufgenommenen Oligopeptide gespalten werden und bei der verlangsamten Biosynthese als Aminosäurequelle dienen.

4.1.2 Transport und Metabolismus der Aminosäuren

Die Proteinbiosynthese ist nach dem Kälteschock vermindert und dementsprechend ist der Bedarf an Aminosäuren gesenkt (Marahiel, 2002). Für *B. subtilis* wurde gefunden, dass die Synthese von vielen Aminosäuren nach dem Kälteschock inhibiert ist (Kaan, 2002). Auch in unseren Experimenten zeigte sich eine Verminderung der Aminosäuresynthese, was sich in der Repression der Gene wie *lmo2006* (*aslS*, Leucin, Valin und Isoleucin Biosynthese), *cysK* (Cysteinsynthase), *lmo1011-lmo1012* (Lysine Biosynthese), *lmo1681* (*metL*, Methioninsynthase) in der Adaptationsphase nach dem Kälteschock zeigt. Auch das Glutamintransportsystem *lmo0848-0849* wurde nach dem Kälteschock zunehmend runterreguliert.

Andererseits war ein anderes den Glutamintransport kodierendes Operon *lmo1738-lmo1739-lmo1740*, nach einer Stunde nach dem Kälteschock hochreguliert. Daher ist zu vermuten, dass zwei verschiedene Regulationsmuster der Glutaminaufnahme existieren. Während der verminderten Synthese kann der Transport von außerhalb der Zelle beim Wachstum in reichem Medium (BHI in unserem Fall) bedeutsam sein. Keiner von den beiden für den Glutamintransport wichtiger Operons ist von *sigL* (Sigma Faktor 54) abhängig, welches für die Expression von Stickstoff-regulierten Genen zuständig ist (Arous, 2004).

4.1.3 Protein Transport nach dem Kälteschock

Nach dem Kälteschock wurden alle drei Typ I Signalpeptidasen, die bei *L. monocytogenes* beschrieben sind, aktiviert und blieben an allen untersuchten Zeitpunkten um Faktor zwei bis drei hochreguliert. Zwei SPasen Typ I werden als ein Transkript von dem *lmo1269* Promoter abgelesen (Raynaud et Charbit, 2005). Diese Peptidasen haben ein breites Substratspektrum, und nach der Spaltung durch diese Peptidasen können die Proteine entweder an der Zellmembran verankert oder ins extrazelluläre Medium ausgeschieden werden. Die verstärkte Expression von Typ I SPasen

kann mit den Veränderungen der Proteinzusammensetzung an der Zelloberfläche in Verbindung stehen. *lmo2591* (ein hochreguliertes Oberflächenprotein mit GW-Repeat) kann zum Beispiel ein mögliches Substrat für die SPase I sein. Typ II Spasen, die spezifisch Lipoproteine spalten, wurden in unseren Untersuchungen dagegen nicht detektiert. Die kälteinduzierte Expression der SPase *lmo1269* und *lmo1270* stimmt mit früheren Daten überein, die mit Hilfe der RT-PCR und der Promotorfusion die Induktion von diesen Genen nach 30 Minuten bei 4°C nachgewiesen haben (Raynaud et Charbit, 2005).

Das andere vorausberechnete Proteintransporter-Gen *tatC* (Dilks, 2003) war direkt nach dem Kälteschock um Faktor 4 reprimiert. Sein Target, *lmo2201*, eine 3-oxoacyl-acyl-carrier Proteinsynthase war an allen Zeitpunkten auch schwach runterreguliert. Das kann durch einen veränderten Lipidenmetabolismus erklärt werden.

Auch andere Transportsysteme wurden von der Temperatursenkung beeinflusst. Zwei Gene, *lmo1300* für Arsen und *lmo2062* für Kupfer, welche Proteine in Exportsystemen für diese toxischen Metalle kodieren, wurden schwach aktiviert. Dies kann auf eine Entgiftungsfunktion unter Stressbedingungen hinweisen.

4.1.4 Einfluss des Kälteschocks auf die Zellwand

Die Zellwand ist in den meisten Fällen die Außenbarriere zwischen der Bakterienzelle und der Umwelt und ist damit den Umweltveränderungen besonders ausgesetzt. Nach dem Kälteschock wurden 13 zellwandassoziierte Gene aktiviert und 12 reprimiert. Sechs der unterschiedlich regulierten Gene (*lmo0130*, *lmo0136*, *lmo0186*, *lmo0433*, *lmo0725*, *lmo0799*) besitzen ein LPXTG-Motiv, welches für die Verankerung von diesen Proteinen auf der Zelloberfläche wichtig ist. Die meisten Veränderungen in der Expression von den zellwandassoziierten Genen weisen auf die Verlangsamung der Zellteilung unmittelbar nach dem Kälteschock hin.

Das Runterregulieren von *lmo0956* (N-acetylglucosamin-6P-Phosphat-Deacetylase) und *lmo0957* (Glucosamin-Phosphat-Isomerase), beide an der Biosynthese von N-Acetylglucosamin beteiligt, korreliert zum Beispiel mit der Plateau-Phase der Wachstumskurve der Flüssigkultur in den ersten zwei Stunden nach Kälteschock. Aktivierung des *ezrA* Genes, das für die negative Septationsring-Bildung zuständig ist, wurde nach einer und zwei Stunden nach Kälteschock festgestellt. Nach vier Stunden ist die Expression von *ezrA* nicht mehr festzustellen. Dies weist auf eine Rückkehr zur normalen Zellteilung hin.

Der Operon *lmo1544-lmo1548 (minDCmreDCB)* wird sofort nach dem Kälteschock 2,5-3,0-fach induziert. Er enthält die Gene, die bei stäbchenförmigen Bakterien ihre Form definieren und bei der Zellteilung die korrekte Chromosomsegregation ermöglichen. *MreBCD* Operon wurde bei *E. coli* (Wachi, 1989) und später bei gram-positiven Bakterien (Levin, 1992, van der Ent, 2006) identifiziert.

Sowohl MreB als auch MreC bilden Helix-förmige Strukturen in der Zellmembran. Van der Ent mit Kollegen (2006) haben gezeigt, dass MreC mit Penicillin-Bindenden Proteinen interagiert und als Gerüst für räumliche Anordnung von den Mureinsynthetasen während Zellwachstum dienen kann. MinC lokalisiert die Position des Septums bei der Zellteilung, indem dass die FtsZ Filamente auf den Zellpolen destabilisiert werden, bevor sie sich zu einem reifen Z-Ring polymerisiert haben. Die Induktion von dem Operon (*minDCmreDCB*) nach dem Kälteschock kann eine Funktion für den Schutz der Zellen vor der Lysis haben, indem durch Proteine MinBCD Zellwand gefestigt wird und so die korrekte Stäbchenform erhalten bleibt.

Lipoprotein-Diacylglyceriltransferase *lgt (lmo2482)* verbindet kovalent den Diacylglyceril-Rest an den Cystein im Lipobox der Lipoproteine. Diese Modifikation ist die für Lokalisierung der Lipoproteine in der Membran notwendig. und spielt wichtige Rolle für die Verankerung der Lipoproteine an der Zellmembran. Baumgärtner et al., (2007) haben demonstriert, dass in der Δlgt Deletionsmutante 26 Lipoproteine ins Medium sekretiert werden, die im Medium der Wildtypkultur nicht nachgewiesen werden können. Interessant ist, dass unter anderem drei nach dem Kälteschock reprimierte Gene (oligopeptide binding protein *lmo0135*, dipeptide binding protein ABS transporter *lmo2569*, T-cells stimulating antigen *lmo1388*) und zwei induzierte Gene (amino acid binding protein *lmo1738*, peptide binding protein *oppA lmo2190*) Substrate für Lgt sind.

Der Lipidrest von einem Lipoprotein ist für die Verankerung an der richtigen Position in der Zellmembran und das Erfüllen der vorgegebenen Funktion entscheidend. Das könnte auf die Rolle der kurzzeitigen Induktion des *lgt* Gens (2,8-fach nach 1 Stunde) für den adaptiven Umbau der Zelloberfläche und z.B. Anpassung des Transportapparats schon am frühen Zeitpunkt hinweisen. In der Arbeit von Borezee (2000) wurde gezeigt, dass die Oligopeptidaufnahme durch Oligopeptidtransporter *oppA* für Kälteresistenz notwendig ist. Das kann ein Beispiel für die Verbindung zwischen *lgt* und Kältestressantwort sein.

Die Lipoproteine vermitteln verschiedene Funktionen für die Anpassung an diverse Umwelteinflüsse, für Nährstoffaufnahme und für Virulenzprozess von pathogenen Mikroorganismen. In der Stammsammlung unseres Instituts vorhandene Deletionsmutante $\Delta lmo2482$ (Baumgärtner, 2007)

wurde auf ihr Wachstum bei niedriger Temperatur getestet und wies bei 15°C kältesensitiven Phänotyp auf. Diese Ergebnisse bestätigen die Notwendigkeit des Lgt Proteins für die Anpassung an niedrige Temperatur. Weiterhin war die Motilität der Δlgt Deletionsmutante im Schwärmttest um ca. 40 % verringert. Möglicherweise ist der Aufbau der funktionsfähigen Flagellen in Abwesenheit der Lgt nicht möglich.

Die Teichonsäuren sind ein wichtiger Bestandteil der Zellwand bei gram-positiven Bakterien. Die Störung der Biosynthese der Teichonsäuren führt zu einer unregelmäßiger Form und einer verminderten Lebensfähigkeit der Zellen, wie es bei *B. subtilis* demonstriert wurde (Bhavsar, 2004). Die Gene *lmo1089* (*tagD*) und *lmo2521* nehmen an der Synthese von Teichonsäuren teil. *TagD* katalysiert bei *B. subtilis* den ersten Schritt der Teichonsäurensynthese, indem es N-Acetylmannosamine (ManNAc) an das C4 Hydroxyl von dem membran-gebundenen N-Acetylglucosaminyl Diphospholipid (Lipid I) überträgt und so das ManNAc-beta-(1,4)-GlcNAc-pp-Undecaprenyl Lipid II bildet (Zhanq, 2006). *lmo2521* wird von NCBI auch als Homolog des *tagD* annotiert.

Die mittelstarke Aktivierung dieser Gene deutet auf eine Umorganisation der Teichonsäurenkomponenten der Zellmembran bei der Kälteadaptation hin. Der Transporter für den Export von Polysacchariden und Teichonsäuren, *lmo1624*, wurde ebenso eine Stunde nach Kälteschock mit dem maximalen Faktor 8 indiziert und klang danach ab. Möglicherweise, schützt die verstärkte Synthese von Teichonsäuren die Zelle von der Zellyse. Chassaing (2007) hat mit Hilfe der Transposonmutagenese bei *L. monocytogenes* demonstriert, dass die Zerstörung des Gens *lmo1078* zu einem Kälte- und Salzstresssensitiven Phänotyp führt. *lmo1078* kodiert eine UDP-Glukose-Phosphorylase, die die Bildung von UDP-Glukose katalysiert, einem Vorläufer für die Synthese der Membranglycolipiden und Teichonsäuren bei gram-positiven Bakterien. Das ist ein Hinweis auf die Bedeutung der Zellwand bei der Adaptation an die Stressbedingungen.

4.1.5 Flagellinproduktion nach dem Kälteschock

Niedrige Temperatur bedeutet für ein pathogenes Bakterium, dass es sich außerhalb des Wirtes befindet und sich an den freien Lebensstil anzupassen hat. Die Bildung von Geißeln ermöglicht die Beweglichkeit, zum Beispiel zur Suche nach Nahrungsquellen.

Die Expression des Hauptstrukturproteins der Geißel, des Flagellins, findet bei vielen Bakterien, auch bei *L. monocytogenes*, nur bei niedriger Temperatur statt (Way, 2004). Die Expression von

Flagellin unterliegt der strengen Regulation, da die Erkennung von Flagellin als ein „pattern recognition molecule“ durch Toll-like Rezeptoren zur Aktivierung der angeborenen Immunantwort führt (Hayashi, 2001). Die nicht Temperatur-regulierte Überexpression von FlaA führte zu verminderter Virulenz im Maus-Model. Der Repressor MogR wurde bis jetzt als ein Hauptregulator der Flagellabiosynthese beschrieben (Grundling, 2004); er reprimiert die Expression von Motilitätsgenen bei 37°C. Nach dem Kälteschock konnte jedoch in den ersten vier Stunden keine Transkription von *flaA* nachgewiesen werden, obwohl das Gen für den negativen Regulator von *FlaA*, MogR, runterreguliert war. Anscheinend unterliegt *flaA* zusätzlichen Mechanismen der Regulation und wird erst in späteren Phasen der Kälteadaptation exprimiert.

Die Zelloberfläche spielt aufgrund ihrer sowohl hydrophil-hydrophoben Eigenschaften und aufgrund der Zellladung eine wichtige Rolle bei der Anhaftung der Bakterien am Substrat. Die Fähigkeit der Bakterien, u. a. von *L. monocytogenes*, durch Biofilmbildung Oberflächen zu kolonisieren, verursacht die Probleme für die Anlagenreinigung in der Lebensmittelindustrie. Chavant mit Kollegen (2002) haben festgestellt, dass die Biofilmbildung im Temperaturbereich 8°C-37°C möglich ist, es werden aber bei 37°C auf hydrophilen Oberflächen besonders ausgeprägten 3-D Strukturen gebildet. Hydrophile Eigenschaften der Zelloberfläche korrelierten negativ mit der Temperatur. Die von uns angewendete Methode (Biofilmmessung anhand der Bindung von Cristal Violet) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Werten bei 37°C und 15°C. Die Mikroelektrophorese oder Lösungsmittelaффinitäтанalyse könnten helfen, genau festzustellen, wie sich die Zelloberfläche bezüglich hydrophile/hydrophobe Eigenschaften nach dem Kälteschock ändert.

Lemon et al. (2007) haben in den Experimenten mit Wildtyp und Flagellin-minus Mutanten demonstriert, dass die Geißelbildung auch für die Anhaftung auf den abiotischen Oberflächen und für spätere Phasen der Biofilmbildung notwendig ist. Die Biofilmbildung bereitet ernsthafte Probleme bei der Sterilisation in der Biotechnologie, weil die Bakterien im Biofilm im Vergleich zu den frei schwimmenden resistenter gegenüber den Desinfektionsmitteln und Detergensen sind (Costerton, 1999, Fux, 2005). So kann die Expression von Flagellin einen zusätzlichen Vorteil für *L. monocytogenes* als ein Lebensmittelinfekt bei der Anpassung an niedrige Temperaturen in den Kühlanlagen bieten.

4.1.6 Veränderungen des Lipidenmetabolismus nach dem Kälteschock

Die Studien, die an *B. subtilis* und *E. coli* durchgeführt wurden, zeigen, dass der Lipidenmetabolismus und die Lipidzusammensetzung der Zellmembran eine wichtige Rolle bei der Adaptation an die Temperaturänderung in der Umwelt spielen. Die Adaptation an niedrige Temperatur geht bei Bakterien in der Regel mit der Anreicherung von Lipiden mit kürzeren anteiso-verzweigten Fettsäuren oder der Desaturierung der vorhandenen Fettsäuren einher.

In unseren Experimenten war *fabH* (*lmo2202*) eines der nach Kälteschock am stärksten induzierten Gene. Es kodiert das Oxoacyl-acyl-carrier Protein, das die erste Kondensationsreaktion von der Fettsäuresynthese durch Hinzufügung von zwei Kohlenstoffatomen von Malonyl-ACP zu dem Acyl-Akzeptor durchführt. Damit kann *fabH* (*lmo2202*) eine steuernde Rolle für die gesamte Fettsäureproduktion spielen. Die Induktion dieses Gens weist auf den intensiven Umbau der Lipidfraktion speziell in der frühen Phase der Kälteschock-Antwort hin. Zu späteren Zeitpunkten wurde die Expression des *fabH* nicht mehr detektiert.

Interessant ist die Induktion des Operons *lmo1371-1374* nach einer Stunde. Es kodiert die Enzyme des Degradationsstoffwechselweges von hydrophoben Aminosäuren zu verzweigten Fettsäuren. Diese Fettsäuren tragen bei *B. subtilis* zur Erhaltung des Fließvermögens der Zellmembran bei niedrigen Temperaturen bei (Kaan, 2002). Es scheint auch bei *L. monocytogenes* ein Mechanismus der Anpassung von der Lipidmembran sein.

Um die Erstarren der Zellmembran zu vermeiden, besitzt das zu *Listerien* nah verwandte Bakterium *B. subtilis* einen Mechanismus der Desaturierung der Fettsäuren durch die *desA* Desaturase, die durch *desKR* Zwei-Komponenten-System kontrolliert wird (Beckerling, 2002). In unseren Experimenten wurde das Homolog von *desA* an keinem Zeitpunkt induziert. Dies lässt darauf schließen, dass bei *L. monocytogenes* die *de novo* Synthese der Fettsäuren ein entscheidender Mechanismus der Adaptation der Lipidfraktion der Zellmembran nach dem Kälteschock ist.

4.1.7 Regulation der Gene durch Antitermination der Transkription

Das Phänomen der Antitermination bei Kälte, das das Durchlesen von downstream liegenden Genen durch Inaktivierung der Terminatorstruktur und damit die Transkription von adaptiven Genen erlaubt, ist aus den Studien bei *B. subtilis* und *E. coli* bekannt (Xia, 2001, Bae, 2000). Zum Beispiel wird *nusA* bei niedriger Temperatur stärker expremiert. Nach dem Kälteschock wurde die Aktivierung von *nus* Genen nur nach einer Stunde detektiert. Daher scheinen diese Gene zur frü-

hen Kälteschockantwort zu gehören. Eine ähnliche Induktion der *nus* Gene durch Kälte wurde bei *Y. pestis* festgestellt (Han, 2005). Der Komplex von Nus-Proteinen bindet normalerweise an der *boxA* Sequenz upstream von den Genen der rRNA und bildet einen Komplex mit der RNA-Polymerase, was zur Transkription der Gene der rRNA mit höherer Rate führt. Dies könnte bedeuten, dass die Fehlfunktion der Ribosomen bei Kälte durch die *de novo* Synthese von Ribosomen kompensiert wird.

Noch weitere Transkriptionsantiterminatoren wurden nach dem Kälteschock runterreguliert: Zum Beispiel ist das 2,5 und 2,8 -fach reprimierte Gen *lmo2788* (*bvrA*) als Repressor der Virulenzfaktoren *plcA* und *hly* bekannt (Brehm, 1999). Bei *L. monocytogenes* signalisiert dieser Repressor über die Erkennung und Interaktion mit der β -Glycoside Zellobiose die Lokalisation im Bodenumfeld (außerhalb des warmblutigen Wirtes). Wahrscheinlich, wird Kälte als eines der Signale der Lokalisation außerhalb des Wirtes registriert und *bvrA* mit *prfA* tragen gemeinsam zur Repression der Virulenzgene bei.

Lmo1840, ein PyrR Regulator mit Antiterminator-Aktivität, reguliert die Synthese der Pyrimidin-Nukleotide. Er wurde in unseren Experimenten genau so wie die anderen Gene des *pyr* Operons *pyrE*, *pyrD*, *pyrF*, *pyrE* runterreguliert. Ein ähnlicher Effekt wurde nach dem Kälteschock bei *E. coli* (Phadtare, 2004) und *B. subtilis* (Beckering, 2002) nachgewiesen; in diesen Organismen wurde die Synthese von Purin- und Pyrimidin-Nukleotiden nach Temperatursenkung reprimiert. Die Transkription und die Replikation der DNA korrelieren mit dem verlangsamtem Wachstum und Zellteilung nach dem Kälteschock, was zum Überfluss an Nukleotiden führt. Unter diesen Bedingungen kann die Repression der Biosynthese von Purin und Pyrimidin-Nukleotiden der Zelle die Energie sparen.

4.1.8 Anpassung der ribosomalen Prozesse an die Kälte

Die meisten regulierten Gene, die mit ribosomalen Prozessen assoziiert werden, wurden in unseren Experimenten nach einer Stunde nach Kälteschock detektiert. Bei *E. coli* wurde gezeigt, dass nach dem Kälteschock ein Großteil der Proteinsynthese sofort stoppt. Damit kann die Runterregulation der Gene *pth* (*lmo0213*) und *def* (*lmo1051*) erklärt werden. Die Produkte der beiden Gene sind an der Reifung der Proteine nach der Translation beteiligt. *pth* spaltet die tRNA von der Peptidyl-tRNA nach der Lösung von dem Ribosom und *def* spaltet Formylmethionin von den fertigen Proteinen. Beide Gene haben das gleiche Regulationsprofil mit maximaler Repression nach einer

Stunde nach Kälteschock. Zwei tRNA-Synthetasen (*lmo2198 trpS* und *lmo2747 serS*), die während der Proteinsynthese die entsprechende Aminosäure mit tRNA binden, wurden nach einer Stunde ebenso leicht runterreguliert. Die Zunahme der Expression von diesen Genen an späteren Zeitpunkten spiegelt die Rückkehr zum normalen Metabolismus und zur effektiven Proteinsynthese in der Zelle wieder.

Das Gen für das allgemeine Stressprotein *ctc* (*lmo0211*) wurde nach einer Stunde 13-fach runterreguliert. Über seine Homologe in *B. subtilis* (Korepanov, 2004) und *E. coli* (Stoldt, 1998) ist bekannt, dass *ctc* an der 5S rRNA bindet und bei verschiedenen Stressarten, vor allem bei Hitzestress induziert wird. Vermutlich ist es für die Genauigkeit der Translationselongation zuständig oder für die Wiederverwertung von Ribosomen von Bedeutung. Der Kälteschock ist eine konträre Situation zum Hitzeschock und das kann erklären, dass die anderen Veränderungen vom Ribosom als bei Hitzestress bei der Anpassung auftreten.

Das Operon *lmo2614-2620*, das die Gene der ribosomalen Proteine der kleinen und großen Untereinheiten des Ribosoms kodiert (*lmo2614* - L30, *lmo2615* - S5, *lmo2616* - L18, *lmo2617* - L6, *lmo2618* - S8, *lmo2620* - L5), wurde direkt nach dem Kälteschock induziert. Es kann ein Anzeichen dafür sein, dass die Ribosomen *de novo* synthetisiert oder reorganisiert werden, um die Fehlfunktion der durch die Kälte beschädigten Fraktion zu kompensieren.

Ein zusätzlicher Hinweis auf die Reorganisation der Ribosomen nach dem Kälteschock ist die 4-fache Induktion des *rbfA* Genes unmittelbar nach dem Kälteschock. Sein Produkt steht in Verbindung mit dem Processierung von der 16S RNA und der Reifung der kleinen Untereinheit bei *E. coli* (Xia, 2003). *RbfA* wird auch bei *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica* und *B. subtilis* als Teil der Kälteantwort hochreguliert (Han, 2005, Beckering, 2002).

Drei Gene für verschiedene Pseudouridin-Synthasen, die Urazil zu Pseudouridin umwandeln, wurden nach Kälteschock induziert. TruB (*lmo1328*) ist zur Position 55 der tRNA spezifisch und seine Deletionsmutante bei *E. coli* weist eine erhöhte Empfindlichkeit der rRNA gegenüber hoher Temperatur auf (Kinghorn, 2002). Möglicherweise, katalysieren *lmo2244* und *lmo1949* diese Reaktion an spezifischen Positionen der rRNA bei den kleinen und großen Ribosomuntereinheiten bei *L. monocytogenes*. Es wurde vermutet, dass Pseudouridin (psi) in tRNA- und rRNA-Molekülen nicht essentiell ist, aber deren Struktur bei nichtoptimalen Temperaturen stabilisiert (Dalluge, 1997) Diese Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass die psi Modifikation bei der niedrigen Temperatur in den psychrophilen Mikroorganismen der Erhaltung der Flexibilität der rRNA dient.

Die Induktion dieser Gene ist ein Hinweis darauf, dass auch bei *L. monocytogenes* die Strukturhaltung der rRNA einer der Adaptationsmechanismen an Kälte ist.

4.1.9 GTPasen

Die GTPase sind unter den Bakterien weit verbreitet und haben verschiedenen Funktionen in den grundlegenden zellulären Prozessen. Die Gemeinsamkeit ist allen konservierten GTPasen, dass sie ihre Funktion durch die Interaktion mit RNA oder Ribosomen ausführen und entweder für die Funktion der Ribosomen oder für die Übertragung der Information an die down-stream Prozesse notwendig sind (Caldon, 2001). In unseren Experimenten zeichnete sich die Genexpression nach dem Kälteschock durch eine Vielzahl der induzierten Proteine mit GTP-bindenden Eigenschaften aus (*era lmo1462, lepA lmo1499, lmo1537, engB lmo1558, lmo2779, bipA lmo1067, lmo1227*), was die Anpassung des Translationsapparatus charakterisieren kann.

Ein weiteres Zeichen für die Optimierung der Biosynthese des Ribosoms ist die Induktion von der *era* GTPase (*lmo1462*) um Faktor zwei in der frühen Phase der Kälteschockantwort. Es wurde gezeigt, dass das Homolog der *era* GTPase in *E. coli* den Wachstumsdefekt der *rbfA* Deletionsmutante unterdrückt und eine Rolle bei der Biogenese der kleinen Untereinheit des Ribosoms spielt (Inoue, 2006). Auch von der GTPase *engA* von *E. coli*, die nach dem Kälteschock induziert wurde, wird die Assoziation mit dem Ribosom vermutet (Caldon, 2003), aber ihre genaue Funktion bleibt unklar.

Das Gen *lmo1499* für das in Bakterien und Mitochondrien konservierte Protein LepA wurde nach 1 Stunde nach dem Kälteschock 2,4-fach induziert. Qin mit Kollegen haben demonstriert, dass dieses Protein bei *E. coli* eine unikale Funktion des vierten Elongationsfaktors hat, der bei der falschen Translokation des Ribosoms ihn zurück bringt und erneute korrekte Translokation ermöglicht (Qin, 2006). March (1992) weisen auch auf die membranassoziierte Funktion der GTPasen (z.B. LepA, FtsY) hin, was sie zu den möglichen Sensoren für die Umweltsignale macht.

Für das Homolog von *lmo1272* in *B. subtilis*, *ylqF* wurde erst vor kurzem eine Rolle in der Ribosombildung entdeckt (Matsuo, 2007). Es wird nun mit den unreifen 50S Untereinheiten assoziiert und für den Einbau von L16 und L27 ribosomalen Proteinen durch die GTP-getriebene Konformationsveränderungen der 23S rRNA von Bedeutung zu sein.

lmo1067 ist ein weiteres interessantes Gen mit GTPase Aktivität, das nach dem Kälteschock induziert wurde. Die Homologen von BipA sind unter den Bakterien und Pflanzen weit verbreitet und tragen unterschiedliche Funktionen. Sein Homolog wurde in *B. subtilis* als kälteinduziert, aber für

das Wachstum bei Kälte nicht essentiell eingestuft (Beckering, 2002) Es besitzt die Domäne, die für die Elongationsfaktoren G und Tu typisch ist, ebenso wie die GTPase Aktivität. In *E. coli* koordiniert sein Homolog BipA die Expression der Pathogenitätsinsel (Grant, 2003), und die Deletion des *bipA* Gens führt zu einem kältesensitiven Phänotyp (Pfennig, 2001). Reva et al. (2006) haben mit Hilfe einer Transposon-induzierten Mutantenbibliothek essentielle Funktion von BipA für das Überleben bei Kälte von *Pseudomonas putida* demonstriert. Bei *Sinorhizobium meliloti* ist TypA sowohl für das Überleben des Kälte- und SDS-Stresses, als auch für die Interaktion mit der Wirtspflanze *Medicago truncatula* notwendig (Kiss, 2004)

Owens (2004) konnte in Gel-Filtration Experimenten zeigen, dass BipA bei *E. coli* an den Ribosomen bindet und den Bindungsstelle mit dem EF-G Elongationsfaktor teilt. Die GTPase Aktivität von BipA wird durch mit mRNA und aa-tRNA beladenen 70S Ribosomen, aber nicht durch 30S und 50S Untereinheiten fünffach induziert und durch hohes Ratio GDT:GTP inhibiert. Die Analyse mit den Translationsinhibitoren ergab, dass trotz großer Ähnlichkeit von BipA und EF-G, wurde zum Beispiel, die GTPase Aktivität von BipA durch die Fusidinsäure nicht blockiert und im Kontrast zu EF-G durch GDP inhibiert. Die Autoren erklären den pleiotropen Phänotyp von *bipA* Deletionsmutanten durch BipA-abhängige Regulation eines globalen Regulators Fis, der bei der Erhöhung des Nährstoffgehaltes die Translation zu den neuen Bedingungen anpasst und damit schnelles Wachstum erlaubt. Die Regulation findet statt, indem BipA Konformationsveränderungen an der Ribosom herforruft und die ungewöhnlich starke Bindung von 5'-UTR der *fis* mRNA zu dem 3'-Stem-Loop in 16S rRNA auflockert und damit die Translation der anderen Transkripten ermöglicht. Die Erfassung des intrazellulären GTP:GDP Status und damit verbundene GTPase Aktivität erlauben die Translation von *fis* nur bei dem hohen GTP Gehalt in der Zelle. Obwohl das Protein Fis nur bei Enterobakterien identifiziert wurde und solche BipA-Fis Interaktion *E. coli* spezifisch ist, bei den anderen Bakterien kann BipA seine Funktion auch durch Regulation eines globalen Regulators ausüben.

Rowe et al. (2000) zeigten, dass BipA eine ähnliche Funktion in der Regulation der Temperaturenhängigen Expression von Kapsel-Antigenen wie Nukleoid-assoziiertes Protein H-NS in *E. coli* hat. Bei 37°C ist es notwendig zum Erreichen der maximalen Expressionsrate notwendig, und bei 20°C reprimiert es die Expression von Cluster 2 Kapsel-Genen.

Über die Regulation der Expression des *bipA* Gens ist nicht viel bekannt. In *E. coli* gehen dem *bipA* Gen drei Promotoren voraus, welche Wachstumsphasen-abhängig reguliert werden (Owens, 2004) In *Bordetella bronchiseptica* ist die Expression des *bipA* Gens von der Bindung des globa-

len Regulators BvgA abhängig, der den Wechsel zwischen mindestens drei phänotypischen Zuständen mit verschiedenen Expressionsprofilen abhängig von den Umweltbedingungen reguliert (Mishra, Deora, 2005).

Bei *L. monocytogenes* wurde *lmo1067* über den ganzen untersuchten Zeitraum aktiviert und spielt anscheinend eine Rolle in der Optimierung der Translation. Die Bedeutung des *lmo1067* für die Kälteadaptation ist dadurch bestätigt, dass die in dieser Arbeit hergestellte Deletionsmutante dieses Gens einen kältesensitiven Phänotyp aufwies.

Den restlichen induzierten GTP-bindenden Proteinen (*lmo1537*, *lmo1937*, *lmo2779*) konnte im Moment keine bestimmte Funktion zugeordnet werden. *lmo1537* wäre von besonderem Interesse, weil es nach einer Stunde nach Kälteschock besonders stark (8,4-fach) induziert wurde und auch nach zwei Stunden identifiziert werden konnte. Möglicherweise sind diese zusätzlichen neuartigen Elongationsfaktoren, die an der Anpassung des Ribosoms an die Proteinsynthese bei niedriger Temperatur beteiligt sind.

4.1.10 RNA-Helikasen nach dem Kälteschock

In der Gruppe der mit der Translation assoziierten Gene sind die RNA-Helikasen von besonderem Interesse. Die RNA-Helikasen sind an fast allen RNA-gebundenen Prozessen beteiligt. Sie entwinden die Sekundärstruktur der RNA-Moleküle und machen sie damit für spezifische Enzyme zugänglich, z.B. für die Translation oder den RNA-Abbau.

L. monocytogenes hat insgesamt vier Gene für RNA-Helikasen im Genom. Alle vier RNA-Helikasen von *L. monocytogenes* wurden nach Kälteschock induziert. Das Maximum der Expression von den Helikasen wurde nach einer Stunde nach Kälteschock beobachtet, zu späteren Zeitpunkten klang die Induktion ab. Die Bedeutung von solchem Expressionsmuster der RNA-Helikasen kann die Anpassung des Translationsapparats direkt nach Temperatursenkung an veränderte Umweltbedingungen sein. *lmo0866* wurde nur nach einer Stunde nach Kälteschock aktiviert und später nicht mehr detektiert. *lmo1450* war das einzige Gen für RNA-Helikase, das auch bei dem dauerhaften Wachstum bei 15°C leicht hochreguliert war (1,8-fach). *lmo1722* konnte unter diesen Bedingungen nur mit einem hohen "false discovery rate" Wert von 5,8 als kälteinduziertes Gen identifiziert werden.

Die RNA-Helikasen sind außer mit der Translationsinitiation auch mit den Degradosomen assoziiert. Brandi mit Kollegen (1999) haben gezeigt, dass in den *E. coli* Zellen, in denen die RNA-Helikase CsdA am Plasmid überexprimiert wurde, die Konzentration von Transkript des *cspA*

Gens für Kälteschockprotein höher war, als in den Wildtypzellen. Dieser Effekt ist möglicherweise durch Schutz des *cspA*-Transkripts von den RNAsen zu erklären.

4.1.11 Kälteschockproteine

Durch die Sequenz-Analyse mit dem BLAST Programm wurden im Genom von *L. monocytogenes* EGD-e drei Gene für Proteine der Csp-Familie identifiziert. Sie alle wurden nach dem Kälteschock reguliert. Das Gen des Hauptkälteschockproteins von *L. monocytogenes*, CspLA, hat die höchste Homologie zu den Hauptkälteschockproteinen CspA von *E. coli* und CspB von *B. subtilis*. Mit einem maximalen Faktor von 14 zwei Stunden nach dem Kälteschock war es eins der am stärksten induzierten Gene.

Die Proteine der Csp-Familie besitzen eine Nukleinsäuren-bindende Domäne und können sowohl an Einzelstrang-DNA als auch an RNA binden. Mit dieser Bindung partizipieren sie möglicherweise nach dem Kälteschock an Transkription und Translation. Für *B. subtilis* wurde demonstriert, dass das Homolog des CspLA Proteins, CspB, bevorzugt an der ssDNA an den Sequenzen mit der Kernsequenz ATTGG oder an dem komplementären Y-Box CCAAT bindet (Schröder, 1995). Vermutlich unterstützt CspB die Bildung oder die Stabilisierung des offenen Komplexes der RNA-Polymerase (Graumann, 1996). Für mindestens zwei Gene: das für H-NS Protein *hns* (La Teana, 1991) und das für α -Untereinheit der DNA-Gyrase *gyrA* (Jones, 1995), wurde die Transkriptionsaktivatorfunktion von CspB nachgewiesen. 94 Gene von *L. monocytogenes* EGD-e, die in unseren Experimenten hoch oder runterreguliert wurden, tragen innerhalb von 250 Basen Bereich vor dem Startkodon die ATTGG Sequenz. Etwa die Hälfte dieser Gene wurde induziert, der Rest reprimiert. Ob diese Gene die Targets für CspLA sind, bedarf experimentelle Untersuchungen.

In *E. coli* demonstrierten Bae mit Kollegen (2000) die Csp-abhängige Expression des *yhbC-nusA-infB-rbfA-rpsO-pnp* Operons durch Antitermination der Transkription. In vitro schwächt die Zugabe der Proteinen CspE, CspC und CspA in physiologischer Konzentration die Termination an verschiedenen Terminatoren. In vivo induzierte die Überexpression von klonierten Csps die Expression von dem Operon downstream zu einem multiplen Terminator. Die Produkte der Gene dieses Operons sind die kälteinduzierten Proteine in *E. coli*, *B. subtilis* und zum Teil in *L. monocytogenes*. Sie ermöglichen die effektive Transkription bei niedriger Temperatur. Bei *L. monocytogenes* sind die Gene *nusA-infB-rbfA-truB* in einem Operon organisiert, und CspLA kann über die

oben beschriebene Funktionalität die Transkription dieses Operons bei einer allgemeinen Verlangsamung der Proteinsynthese begünstigen.

In der Arbeit von Hofweber et al., (2005) wurde anhand der Daten aus den Experimenten im zellfreien *E. coli* Modell vermutet, dass Csp Protein auf den Großteil der Proteinsynthese nicht als Chaperon wirkt, sondern umgekehrt die Transkription und Translation inhibiert. Die Inhibition der Proteinsynthese konnte durch Zugabe von Hepta-2'-desoxy-Thymidylate, welches Csp komplett bindet, aufgehoben werden. Allerdings handelt es sich bei der Arbeit von Hofweber um einen Einzelbericht. Es existieren dagegen mehrere Beweise für die Funktion von Csp-Proteinen bei *E. coli* als RNA-Chaperone (Bae, 2000, Jiang, 1997).

El-Sharoud (2007) hat postuliert, dass Csp Proteine die Rolle in der Ankopplung zwischen Transkription und Translation bei Bakterien spielen und im Komplex mit RNA-Helikasen agieren. Die Csp Proteine sind in den Transfer der linearen mRNA vom Syntheseort im Nukleoid zu den Ribosomen involviert, was für eine effektive Initiation der Translation wichtig ist. Die Helikasen entwinden die Sekundärstrukturen, während die Csps Bildung der neuen verhindern, indem sie mRNA in linearer Form fixieren. Das stimmt mit den Ergebnissen verschiedener Forschungsgruppen über die Interaktion zwischen Csps und Helikasen überein. Zusätzlich, tragen zum Beispiel bei *E. coli* die *cspA*, *cspB* und die Helikase *csdA* in ihrem 5'-nichttranslatierten Bereich eine „cold-box“ Sequenz UGACGUACAGA mit nur einem Basenaustausch, die eine gleichzeitige Aktivierung der Expression dieser Gene hervorruft. Bei *L. monocytogenes* konnte diese Sequenz mit bis zu zwei Mismatches nicht nachgewiesen werden.

Es ist auch möglich, dass die Anreicherung der *cspA* mRNA nach dem Kälteschock nicht nur durch die Induktion des Gens, sondern auch durch erhöhte Stabilität der mRNA unter diesen Bedingungen zu Stande kommt. Einige Arbeitsgruppen demonstrieren, dass die interne Strukturen im 5'-5'-nichttranslatierten Bereich der *cspA* mRNA von der Hydrolyse durch RNAsen schützen (Brandi 1999, Xia, 2002).

Wemekamp-Kamphius mit Kollegen (2002) fanden vier Loci (*csp1-4*), die in der Southern-Hybridisierung mit der *cspB* Probe von *B. subtilis* beim Stamm *L. monocytogenes* LO28 ein Signal lieferten. Zwei von ihnen (*csp1* und 2) wurden beim Kältestress und hohem Druck induziert, und die anderen zwei wurden unter diesen Bedingungen nicht identifiziert. Dies deutet auf weitere Funktionen der Csp-Proteine bei *L. monocytogenes* neben der Anpassung an niedrige Temperaturen hin.

cspD (*lmo1879*), das homologe Gen zum Gen für Hauptkälteschockprotein *cspLA*, wurde nach zwei Stunden nach dem Kälteschock 4,2-fach runterreguliert und an anderen Zeitpunkten nicht mehr beobachtet. *cspB* (*lmo2016*) wurde nach dem Kälteschock nicht beobachtet, wurde aber beim dauerhaften Wachstum bei 15°C 11,5-fach runterreguliert. Das kann bedeuten, dass diese Proteine trotz ihrer Homologie zu dem Hauptkälteschockprotein CspLA andere Funktionen bei *L. monocytogenes* tragen und einer anderen Regulation unterliegen.

Bei *E. coli* sind von neun Proteinen der Kälteschockproteinfamilie nur vier kälteinduziert: CspA, CspB, CspG, CspI, cspC und CspE werden bei 37°C konstitutiv expremiert und CspD wird mit der frühen stationären Phase in Verbindung gebracht (Yamanaka, 1998). Etchegaray mit Kollegen (1996) haben bei *E. coli* die Funktion von zwei kälteinduzierten Csp Proteinen CspA und CspB als Thermomostaten für verschiedenen Temperaturbereich vorgeschlagen, da diese Proteine ihr Induktionspeak bei unterschiedlichen Temperaturen haben. Es könnte auch sein, dass bei *Listeria* ein Temeratureschift von 37°C auf 15°C für die Induktion von CspLB und CspLC nicht ausreicht. Bei *B. subtilis* werden die CspB und CspC Proteine auch ohne Kältestress beim Übergang in die stationäre Phase expremiert (Graumann, 1999) und angeblich durch die Inaktivierung der Ribosomen, die unter beiden Bedingungen auftritt, induziert.

4.1.12 Transkriptionsregulatoren nach dem Kälteschock

Die sofortige Antwort auf die Temperatursenkung wird durch eine Vielzahl von verändert expremierten Regulatoren charakterisiert. In unseren Experimenten wurden 17 Proteine mit regulatorischer Funktion induziert und 13 reprimiert (siehe Tabellen I und II im Anhang). Dieses Maximum in der Anzahl der Regulatoren nach einer Stunde deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt die intensivsten Veränderungen stattfinden. Zu späteren Zeitpunkten nimmt die Anzahl an Regulatoren ab. Beim dauerhaften Wachstum bei 15°C wurden keine Regulatoren über dem Grenzwert (Regulierung um den Faktor 2) gefunden.

Die maximale Induktion nach dem Kälteschock wurde bei *glnR* (*lmo1298*) beobachtet (15-fach nach einer Stunde). GlnR ist ein Repressor der Glutamin-Synthetase *glnA*, des Schlüsselproteins der Stickstoffassimilation bei gram-positiven Bakterien (Schreier, 1989). Die Repression von der Glutamin-Synthetase durch den Repressor GlnR sofort nach dem Kälteschock deutet auf eine Inhibition der Stickstoffaufnahme in den Zellmetabolismus hin. Das korreliert gut mit der verminderten Aminosäurensynthese. Das kann ein Mechanismus sein, über den *L. monocytogenes* den Aminosäurenmetabolismus bei der Temperaturveränderung steuert.

DISKUSSION

Die stärkste Induktion nach *glnR* fand sich für ein Protein mit einer vermutlichen Regulatorfunktion *lmo2021*. Es verfügt über ein helix-turn-helix Motiv und eine potenzielle Bindungsdomäne für kleine Moleküle. Das Induktionsmaximum fand sich nach einer Stunde, danach klang die Induktion ab. Dieses Regulationsmuster spricht für die Bedeutung des *lmo2021* für die sofortige Kälteschockantwort.

Die Induktion von dem Gen *lmo2460* ist nach dem Kälteschock von Bedeutung. Sein Homolog in *B. subtilis*, CggR, ist ein Repressor des *gap* Operons und ist somit der Hauptregulator der Glykolyse (Ludwig, 2001). Die Induktion dieses Gens kann die Repression von den glykolytischen Genen nach Kälteschock bei *L. monocytogenes* erklären.

Zwei Regulatorproteine der MarR Familie („multiple antibiotic resistance regulator“) der prokaryotischen Regulatoren, *lmo0266* und *lmo0989*, wurden nach dem Kälteschock mäßig induziert. Die Proteine dieser Familie sind an der Produktion von Virulenzfaktoren beteiligt, welche mit der Reaktion auf Antibiotika und auf oxidativen Stress assoziiert sind (Wilkinson, 2006).

lmo0443 und *lmo1026*, die Vertreter der LytR Familie, wurden nach dem Kälteschock reprimiert. Die Proteine dieser Familie beeinflussen vermutlich über eine Regulation der Autolysine die Stabilisierung der Zellwandstruktur. Brunskill und Baleys (1996) stellten bei einer Mutante von *S. aureus* mit Deletionen im *lytRS* Zweikomponentensystem erhebliche Schäden in der Zelloberfläche fest. Chatfield et al. (2005) demonstrierten für *S. mutans*, dass der LytR Regulator die autolytische Aktivität in den Zellwänden schwächt, möglicherweise durch die Repression der Autolysin-Gene. Möglicherweise führt bei *L. monocytogenes* das Repremieren der autolytischen Aktivität durch Proteine *lmo0443* und *lmo1026* nach Kälteschock zu einer Repression der Zellteilung in den ersten Stunden.

Die 3,5-fache Induktion des *recX* (*lmo1693*) Gens kann auf die Initiierung der DNA-Reparatur-Prozesse nach dem Kälteschock hinweisen. RecX ist ein Regulator der *recA* Aktivität (Pages, 2003) der DNA-Rekombinase, die an der SOS-Response und der rekombinanten DNA-Reparatur beteiligt ist.

Die induzierten Regulatoren mit bis jetzt unbekannter Funktion und ihren unbekannten Targets, wie *lmo0522*, *lmo2128*, *lmo2165* und *lmo2408*, könnten auch eine Rolle in der Optimierung der Stoffwechselwege nach dem Kälteschock spielen.

Einige Regulatoren wurden nach dem Kälteschock runterreguliert. Zum Beispiel *lmo2485* wurde nach einer Stunde runterreguliert und später nicht mehr zu detektieren. Für sein Homolog, das PspC Protein in *E. coli*, *Y. enterocolitica* und *S. enterica*, wird eine positive regulatorische Funkti-

on des *pcp* Operons („phage shock proteins“) vermutet. Das *pcp* Operon ist mit der Pathogenität der Keime assoziiert; seine Expression ist in *E. coli* vom sigma-32 (Hitzestress-Sigmafaktor) abhängig und wird unter Hitze-, Salz- und Phagenstress induziert (Weiner, 1991). Diesen Beobachtungen, einerseits die Runterregulation von *lmo2485* nach Kälteschock und andererseits die Induktion seines Homologs im Hitze-, Salz- und Phagenstress, lässt sich eine Gegensätzlichkeit des Kältestress zu Hitzestress und Invasionsprozessen ableiten. Deshalb werden dieser Regulator und die ihm unterordneten Gene ausgeschaltet, weil sie nach dem Kälteschock nicht gebraucht werden.

Zwei Gene für Regulatoren der GntR-Familie (*lmo0948* und *lmo0958*), die fast immer als negative Regulatoren beschrieben werden, wurden nach Kälteschock ebenso runterreguliert: *lmo0948* liegt entgegengesetzt zu einem Gen mit unbekannter Funktion, *lmo0949*, das nach dem Kälteschock 5-fach induziert wurde. Eine solche Orientierung und ein solches Regulationsmuster lassen vermuten, dass *lmo0949* ein Target für Produkt des Gens *lmo0948* sein könnte.

lmo0958 liegt am Ende einer möglichen Transkriptionseinheit, die zwei Gene für den Aminosukkermetabolismus kodiert: N-Acetylglucosamine-6-Phosphate Deacetylase *lmo0956* und Glukosamine-6- Phosphate Isomerase *lmo0957*. Beide sind an der Synthese des Glykosamins für die Zellwandbiosynthese assoziiert. Damit ist die Beteiligung von *lmo0958* an der Regulation dieses Prozesses möglich.

lmo2795 ist ein Homolog des Gens *rpiR*, des negativen Regulators des *rpiB* Gens der Ribose-Phosphat-Isomerase für den Ribosekatabolismus-Stoffwechselweg (Sorensen, 1996). Es wurde nach einer und zwei Stunden nach dem Kälteschock reprimiert. Zu der RpiR Familie gehört auch der an allen Zeitpunkten runterregulierte Transkriptionsregulator *lmo2731*.

Das Regulatorgen *lmo1996* (3-fach runterreguliert) bildet eine mögliche Transkriptionseinheit mit *lmo1995*, *lmo1994* und *lmo1993*, die nach einer Stunde Kälteschock ebenso ca. 3-fach runterreguliert wurden. Dieses Operon ist ein Homolog zu dem *dra-nupC-pdp* Operon von *B. subtilis* (Saxild, 1996), das die Gene für die Aufnahme und den Metabolismus von Nukleosiden kodiert. Seine Expression unterliegt der katabolischen Repression durch Glukose und wird durch den DeoR Repressor reguliert (Zheng, 1999). Vermutlich erfüllt *lmo1996* bei *L. monocytogenes* dieselbe Funktion und spielt nach dem Kälteschock eine Rolle in der Runterregulation des Nukleotidenmetabolismus. Wenn das Wachstum der Kultur nach dem Kälteschock vorübergehend anhält, entsteht der Überfluss an Metaboliten, unter anderem auch Glukose, was zur Repression von einigen Prozessen führt.

Ein Regulatorgen der MerR-Familie, *lmo2329*, wurde nach dem Kälteschock im Zeitverlauf mit abnehmendem Faktor runterreguliert. Die MerR Familie vereint die Metall-sensing Regulatoren, die den Export der Metalle aus der Zelle regulieren und damit der Entgiftung der Zelle dienen (Hobman, 2007). Unter Kältestress erfüllen sie möglicherweise auch bei *L. monocytogenes* diese Funktion. Diese Hypothese wird durch die Induktion von *lmo1300* (Gen für Arsen Export-Pumpe) und *lmo2062* (Gen für Kupferresistenzprotein) gestützt.

4.1.13 Zwei-komponenten Systeme

Die Zwei-Komponenten-Systeme sind bei den Untersuchungen der Stressantwort jeder Art sehr interessant, weil sie als Sensoren für die Signalaufnahme dienen können. Ein allgemeiner Sensor für Temperatursenkungen wurde in Bakterien bis jetzt nicht gefunden. In unseren Untersuchungen wurde eine Reihe der Gene für Zwei-Komponenten-Systeme schwach reguliert (Tabelle II im Anhang). Das leicht induzierte Operon *lmo1507-lmo1508* stellt ein Zwei-Komponenten-System dar. *lmo1507* wurde nach einer Stunde nach Kälteschock 3,8-fach hochreguliert, zu den späteren Zeitpunkten jedoch nur unter dem Signifikanzgrenzwert detektiert. Es ist homolog zu dem *yclJ* Gen von *B. subtilis*, für das eine Induktion unter Sauerstofflimitierung festgestellt wurde (Hartig, 2004). Die Induktion war allerdings nicht ohne Bindung eines anderen Response-Regulators möglich. *lmo1508* ist ein Homolog von *phoR*, des Gens für Sensorprotein des Phosphat-Regulons, und wurde nach vier Stunden nach Kälteschock 2,2-fach induziert. Die Bedeutung dieses Systems in der Kälteschockantwort blieb in der vorliegenden Arbeit unklar.

Die Gene *agrA* (*lmo0050*) und *agrC* (*lmo0051*), welche ebenfalls ein Zwei-Komponentensystems bilden, wurden zwei und vier Stunden nach Kälteschock 3-4-fach runterreguliert. In *S. aureus* reguliert dieses Zwei-Komponenten-System die Expression von einigen Virulenzfaktoren und anderen Exoproteinen über eine Regulation der Expression des RNAIII-Moleküls (Novick, 1995). In *L. monocytogenes* wurde *agr* Locus ebenso in Verbindung mit Virulenz gebracht, weil die Δ *agrA* Mutante eine verminderte Virulenz im Maus-Model aufwies und eine veränderte Expression von einigen sekretierten Proteinen zeigte (Autret, 2003). Wahrscheinlich, wird dieses Zwei-Komponenten-System nach dem Kälteschock nicht benötigt und deshalb runterreguliert.

Weiterhin wurden unter den hochregulierten Genen zwei Histidinkinasen mit vermutlich sensorischer Funktion identifiziert: *lmo0799* (anhand der ERGO-Klassifizierung eine sensorische Transduktionsproteinkinase EC 2.7.3.-) und *lmo1741* (Zwei-Komponenten Sensor-Histidinekinase EC

2.7.-.-). Benachbarte Gene zum *lmo1741*, *lmo1740*, (putativer Transporter für Aminosäuren) und *lmo1742* (*adeC*, wurde in *B. subtilis* als Adenindeaminase beschrieben) weisen andere Regulationsmuster auf und sind anhand der Homologie keine regulatorischen Proteine. Wahrscheinlich werden die Targets für diese Histidinkinase von anderen Genen kodiert. Für *lmo0799* ist die Rolle für die Regulation des Sigma-Faktors nicht auszuschließen (siehe unten).

Das nach Kälteschock induzierte Gen *lmo1022* wurde anhand der Sequenzhomologie als Regulator der Zwei-Komponenten Systems annotiert. Das Zwei-Komponenten-System *lmo1022-lmo1021* (Homolog zu *liaRS* bei *B. subtilis*) ist ein Teil des Operons *liaIHGFSR*. Das System wurde als Sensor für den Zellwandstress beschrieben, der durch Antibiotika Vancomycin, Bacitracin, Ramoplanin verursacht wird (Jordan, 2006, Masher, 2003) Alle diese genannten Antibiotika interagieren mit dem Lipid II Zyklus in der Zellmembran, der einen Engpass in der Biosynthese des Zellwandpolymers darstellt.

Die Induktion von *lmo1022-lmo1021* wurde als Teil der Zellantwort auf subletale Konzentrationen von Bacitracin identifiziert. Die entsprechende Proteinkinase *lmo1021* (Homolog zu *liaS* in *B. subtilis*) wurde nur schwach (1.6-1.8-fach) induziert. Zusammen mit den anderen Zellwandstresskinasen BceS, YvcQ und LiaS bildet sie eine besondere Gruppe der Kinasen mit einem besonders kurzen N-terminalen Sensing-Domain, das komplett in der Zellmembran versunken ist und sein Signal direkt in der Membran wahrnimmt. Die Kinase *lmo1021* wurde bei allen grampositiven Bakterien mit Ausnahme von Clostridien gefunden und wird oft mit den Transportern in Verbindung gebracht. Bei *B. subtilis* wurde die minimale Bindungssequenz für LiaR identifiziert (Jordan, 2006)

Im Genom von *L. monocytogenes* gibt es zwei mögliche Bindungsstellen für LiaR: einmal vor dem Homolog für *B. subtilis* Gen *liaF* (*lmo1020* in *B. subtilis*) und zum anderen vor dem hypothetischen Protein *lmo0954*. Diese Gene stellen daher mögliche Targets für die Regulation durch LiaR dar. Für LiaF, einen potentiellen negativen Regulator der LiaR abhängigen Gene, ist die LiaR-abhängige Expression bei *B. subtilis* nachgewiesen (Jordan, 2006). Obwohl in unseren Experimenten *lmo0954* nicht induziert und *lmo1020* nur unsignifikant induziert wurden, kann es weitere Targetgene für LiaR geben, wenn die Bindungssequenz bei *Listeria* sich von der bei *B. subtilis* unterscheidet. Die Induktion dieses Zwei-Komponenten Systems könnte bedeuten, dass die *L. monocytogenes* nach dem Kälteschock die Anzeichen des Zellwandstress aufweist, mit Reaktionen auf zellwandgerichtete Antibiotika identisch sind. Möglicherweise, detektiert LiaRS die Störungen in

der Teichonsäurebiosynthese als Signal der Kälte. Damit könnte die *LiaR* eine Rolle in der Anpassung der Zellwandbiosynthese bei niedrigen Temperaturen spielen.

4.1.14 Beteiligung der Sigma Faktoren an der Anpassung nach dem Kälteschock

Die Kältestressantwort ist eine sehr umfangreiche Reaktion des Bakteriums, die sich aus vielen Aspekten und den Veränderungen mehrerer Stoffwechselwege zusammensetzt. Deshalb stellt sich die Frage nach dem globalen Regulator, der die einzelnen Reaktionen koordiniert. Ein übergeordneter Regulator für die Expression von kälteassoziierten Genen konnte bis jetzt nicht identifiziert werden. Für die Antwort auf Hitzeschock wurde bei vielen Bakterien wie *E. coli*, *Sterptomyces coelicolor*, *Sinorhizobium meliloti*, ein spezifischer Sigma-Faktor identifiziert (Kormanek, 2000, Aramaki, 1999, Erickson, 1989). Ein entsprechender Sigma-Faktor für den Kälteschock ist bis jetzt nicht bekannt.

Der universelle Stress-Sigma-Faktor B (σ^B , *lmo0895*) ist bei *L. monocytogenes* an der Antwort auf pH, Salz, stationäres Wachstum, Hitze, Invasionstress beteiligt (Sue, 2004, Sleator, 2003, Ferreira, 2004). Vermutlich spielt er auch bei der Kälteanpassung eine Rolle. (Becker, 2000, Moorhead, 2004). In unseren Untersuchungen wurde σ^B nur leicht (2,4-fach) nach einer Stunde reprimiert und war zu späteren Zeitpunkten sowie beim dauerhaften Wachstum bei 15°C nicht mehr nachzuweisen. Dies könnte die Repression von 14 σ^B -abhängigen Genen nach einer Stunde nach Kälteschock erklären. Darunter befinden sich Gene, die für den Osmolyten-Transporter OpuC, den Mannose-Transporter und für das allgemeine Stress-Antwort Protein Ctc kodieren. Auch für diese Gene konnte zu späteren Zeitpunkten keine Repression mehr nachgewiesen werden.

Becker et. al zeigten mit ihren Experimenten eine wachstumsphase-abhängige Rolle von σ^B in der Kälteanpassung, die hauptsächlich durch σ^B -abhängige Osmolytenaufnahme vermittelt wurde. Für die Kultur in der stationären Wachstumsphase war die σ^B -abhängige Adaptation eher von Bedeutung, als für die logarithmisch wachsende. Die meisten Untersuchungen zur Rolle von σ^B in der Kälteadaptation wurden bei stärkerem Kältestress durchgeführt (37°C auf 8° bei Becker, 4°C bei Moorhead). Möglicherweise war die Temperatursenkung von 37°C auf 15°C bei der logarithmisch wachsenden Kultur von *Listeria* in dieser Arbeit für die Induktion von σ^B nicht ausreichend. Dies spricht dafür, dass bei Kälteschock eher die anderen Regulatoren eine Rolle spielen.

Die Regulation der σ^B Expression durch Rsb-Proteine ist bei dem Umwelt- und Energie-Mangel-Stress relativ gut untersucht. Diese Regulation wird auch durch die Inaktivierung des σ^B durch die Verbindung mit dem Anti-Sigma-Faktor RsbW beeinflusst. RsbW wird wiederum durch den Anti-Anti-Sigma-Faktor RsbV reguliert, welcher durch Phosphorelierung und Dephosphorylierung aktiviert, bzw. inaktiviert wird. Für einige Stressarten sind die Phosphatasen bekannt (RsbP, RsbU), die den RsbV dephosphorelieren (Voelker, 1995). Die Antwort auf Kältestress scheint dabei RsbV-unabhängig zu sein und kann eher durch die Unterschiede in der Synthese und Stabilität von RsbW und σ^B Proteinen funktionieren (Brigulla, 2003).

Die Expression der σ^B -regulatoren der Rsb-Familie konnte in unseren Experimenten nicht nachgewiesen werden. Das Gen *lmo0799* (Homolog zu *ytaA* von *B. subtilis*) wurde jedoch nach einer Stunde nach dem Kälteschock leicht induziert. Nach der Klassifizierung von NCBI wird *lmo0799* in die COG-Klasse SPOIIAA Anti-Anti-Sigmafaktoren für die Regulation durch Signaltransduktionsmechanismus eingeordnet. Für dieses Gen wurde vor kurzem die Rezeptorfunktion für blaues Licht (Gaidenko, 2006) entdeckt. YtvA gehört zu der RsbR Protein-Familie und hat in *B. subtilis* 5 Paraloge: RsbRA, RsbRB, RsbRC, RsbRD und RsbD (Kang, 1998). In YtvA ist jedoch das Threonin in der C-terminalen Sulphat-Transporter-Anti-Sigma (STAS) - Domäne gegen ein geladenes Glutamat ausgetauscht.

Auf dem N-Terminus befindet sich ein light-oxygen-voltage (LOV) Domain, ähnlich den Domänen von pflanzlichen Phototropinen, gekoppelt mit einem C-terminalen Kinase-Domain. Pflanzlicher LOV-Domain bindet einen Flavin-Mononukleotid Chromophor (FMN). Bestrahlt mit blauem Licht bindet das Chromophor an den konservierten Cystein-Rest innerhalb des LOV Domains. Die daraus resultierende Strukturveränderung wird an die benachbarten Serine/Threonin-Kinase Domain und Helix-Turn-Helix Domain weitergeleitet (Losi, 2004). YtvA Protein trägt ein LPXTG-Motif, das der Verankerung an der Zelloberfläche dient. YtvA Protein kann damit in *L. monocytogenes* eventuell das Weiterleiten von Umweltstresssignal an den Stress-Regulator σ^B ermöglichen. Für YtvA in *B. subtilis* wurde vor kurzem eine positive regulatorische Funktion für die σ^B -abhängige Stressinduzierte Gene nachgewiesen (Suzuki, 2007). Es wurde demonstriert, dass bei der normalen Expression von YtvA Licht keine Expression von σ^B induziert, die Verstärkung der Salz-induzierten σ^B -Aktivität ist jedoch nur in Anwesenheit von YtvA möglich ist. Das könnte bedeuten, dass YtvA die Wirkung von zwei verschiedenen Umweltreizen verbündelt und zu einem Signal konvertiert. Blaues Licht ist ein normaler Bestandteil des Sonnenlichts und könnte

so als ein Signal für einen Oberflächenaufenthalt des Bakteriums dienen. Damit könnte das YtvA Protein ein neuartiger Sensor für Kälte sein.

4.2 Reprimierte Gene nach dem Kälteschock

Wenn die Proteinsynthese stockt, kann durch das Runterregulieren bestimmter Gene die Synthesekapazität für die Anpassung des Stoffwechsels an die veränderten Umweltbedingungen gesteigert werden. Nach dem Kälteschock wurden 220 Gene signifikant runterreguliert (Tabelle II im Anhang). Außer einer großen Gruppe von Genen mit unbekannten Funktionen konnten die Gene identifiziert werden, die folgende wichtige Prozesse kodieren: Hitzeschockantwort, allgemeine Stressantwort, Virulenzfaktoren, Transport von Zucker und Aminosäuren, Aminosäurebiosynthese, Synthese der sekundären Metaboliten, Zellwandbiosynthese, Regulatoren. Die Mehrzahl der runterregulierten Gene wurde entweder nach einer Stunde Kälteschock identifiziert oder zeigte nach einer Stunde die stärkste Repression. Das Abklingen der Repression zu späteren Zeitpunkten spricht für die Wiederaufnahme der Funktionen, die ein normales Wachstum begleiten.

4.2.1 Hitzeschock Gene

Die Gene für Chaperone *dnaJ* (*lmo1472*), *dnaK* (*lmo1473*), *groEL* (*lmo2068*), *groES* (*lmo2069*), zugehörig zum *hrcA* Regulon (Hitzeschock-Gene der Klasse I), wurden in unseren Experimenten sofort nach dem Kälteschock stark reprimiert. Das Regulatorgen vom *dnaK* Operon, *hrcA* (*lmo1475*) (Hanawa, 2000), war zu allen Zeitpunkten 17- bis 34-fach runterreguliert. Auch beim dauerhaften Wachstum bei 15°C wurden diese Gene reprimiert, allerdings nicht so stark. Mögliche Erklärung für die Repression von den Hitzeschockgenen wäre, dass nach dem Kälteschock kein Bedarf an Chaperonen besteht, weil bei der verminderten Proteinsynthese kein Substrat (misgefalteten Proteinen) vorhanden ist. Die von Liu et al. (2002) demonstrierte Induktion von *groEL* bei *L. monocytogenes* bei Kälte konnte in unseren Experimenten nicht bestätigt werden. Die Repression von den Hitzeschockgenen stimmt mit den Beobachtungen bei *B. subtilis* und *E. coli* (Beckering, 2002, Phadtare, 2004) überein, auch in diesen Bakterien wurden die Gene für die Antwort auf Hitze- und Kälteschockstress entgegengesetzt reguliert.

Die Gene für hitzeinduzierte Proteasen (Hitzeschock Gene der Klasse II) *clpB* (*lmo2206*), *clpP* (*lmo2468*), *clpY* (*lmo1279*) wurden ebenso reprimiert. Die Gene für Proteasen ClpP und ClpY wurden nur nach einer Stunde detektiert. Dagegen wurde *clpB* auch beim dauerhaften Wachstum bei Kälte reprimiert. *clpB* ist in dem dem nah verwandtem *B. subtilis* nicht vorhanden. ClpB

könnte also ein für *L. monocytogenes* spezifischer Virulenzfaktor sein. Chastanet (2004) fand, dass *clpB* Gen Domäne für die Proteinase und ATPase-Aktivität trägt und damit an dem Virulenzprozess beteiligt ist. ClpB erhöht die induzierte Termotoleranz von *L. monocytogenes*, aber nicht in die Antwort auf Hitze, Kälte, Salz und Detergenzstress einbezogen ist. Starke dauerhafte Repression nach dem Kälteschock kann mit dem Signal „außerhalb des Wirts“ verbunden sein.

ctsR, ein Repressor der Hitzeschock-Gene der Klasse III (Nair, 2000, Krueger, 1998), wurde in unseren Experimenten auf der Transkriptionsebene nicht identifiziert. Der CtsR-Regulator ist in den gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C Gehalt weit verbreitet. Er reprimiert das *clp*-Operon, indem er bei Temperaturen unter 37°C in seiner Dimer-Form im Operator-Bereich der regulierten Gene bindet, und zwar an der direkt wiederholten heptanukleotiden Sequenz, und damit die Expression der Gene verhindert. Bei Temperaturen über 42°C wird die Bindung an die Operator-Sequenz gelöst (Derre, 2000). Vermutlich wird die Funktion von CtsR nicht über dessen Expression, sondern über seine temperaturabhängige Affinität zur Ziel-Operator-Sequenz reguliert.

clpB und *clpP* wurden in der Arbeit von Liu et al. (2002) bei Kälte induziert. Die Bedeutung dieser Proteasen für die Kälteanpassung kann auch im Abbau von Proteinen liegen, welche von kältegeschädigten Ribosomen fehlerhaft synthetisiert wurden.

lmo0211, das Gen für das allgemeine Stressprotein Ctc, wurde nach einer Stunde nach dem Kälteschock 13-fach runterreguliert. Über seine Homologe in *B. subtilis* (Korepanov, 2004, Smalisch, 2002) und *E. coli* (Stoldt, 1998) ist bekannt, dass Ctc an der 5S rRNA bindet und bei verschiedenen Stressarten, vor allem bei Hitzestress induziert wird. Vermutlich ist Ctc für die Genauigkeit der Translationselongation von Bedeutung. Es mag auch an der Wiederverwertung von Ribosomen beteiligt sein. Der Kälteschock ist eine entgegengesetzte Situation zum Hitzeschock und deshalb läuft die Anpassung vom Ribosom in eine andere Richtung.

4.2.2 Reprimierte Transporter nach Kälteschock

Nach Kälteschock wurden 27 Gene mit Transporter-Funktion reprimiert. Unter diesen fanden sich viele Zucker-Transporter (*mptABC*, Mannose-Transporter *lmo0781-0782*, nicht identifizierte Zucker-Transporter *lmo2650*, *lmo1389-1391*, *lmo2415*, *lmo2760* und Trehalose-spezifisches Protein *lmo1255*). *lmo2760* blieb auch weiter bei 15°C 2-fach reprimiert (q=1,9%). Die Repression der Transporter schützt die Zelle vor dem Überfluss an Substraten Beim verlangsamten Stoffwechsel nach dem Kälteschock. Die Aminosäuren-Transporter (Glutamintransporter *glnP* (*lmo0847-lmo0848*, *lmo2469*) und Oligopeptide-Transporter *lmo0555*, *lmo2569*) wurden zu allen Zeitpunkten

stark reprimiert. *lmo2196* (*oppA*) wurde nach der initialen Repression nach einer Stunde nach Kälteschock bereits nach vier Stunden wieder aktiviert. Die Osmolytentransporter *opuB*, *opuC*, *betL* wurden nach einer Stunde stark reprimiert, aber zu späteren Zeitpunkten nicht mehr detektiert. Die Repression von *opuC* und *opuB* wurde bereits bei *B. subtilis* nach dem Kälteschock beobachtet (Kaan, 2002).

Auch die Gene für die Aufnahme von Eisen und Siderophoren wurden runterreguliert (*fhuB* *lmo1958*, *fhuC* *lmo1960*, Metaleisen-Bindungsprotein *lmo2105*). Auch das Gen für das Nicht-Häm-Eisen-Bindungsprotein *flp* (*lmo0943*) wurde nach einer Stunde 4-fach reprimiert. Beim dauerhaften Wachstum bei Kälte blieb es auch gegenüber 37°C 2,5-fach runterreguliert (q=2.9). Es ist möglich, dass die Eisenaufnahmesysteme, die während der Infektion im Wirt besonders intensiv induziert werden, bei Kälteschock runter gefahren werden, weil der Kälteschock als ein Signal „außerhalb vom Wirt“ wahrgenommen wird.

4.2.3 Repression der Atmungskette und Kohlenwasserstoff-Metabolismus

Die Expression vom Operon *lmo2715-lmo2718*, welches die Gene für die Cytochromubiquinonoxidase und für die Cytochrom-bd-Transporters enthält, wurden direkt nach dem Kälteschock runterreguliert. Das führt zu einer Hemmung der oxidativen Phosphorylierung und damit zu einer Verminderung der Zellatmung.

Einige Gene der Glykolyse, z.B. Pyruvatkinase *pykA* (*lmo1570*, 2,3-fach), Phosphoglyceratmutase *gmpA* (*lmo2205*, 9-fach), Glukose-6-Phosphatisomerase *pgi* (*lmo2367*, 3,2-fach), Laktatdehydrogenase *ldh* (*lmo1534*, 4 bis 5-fach) wurden ebenfalls runterreguliert. Der dadurch ausgelöste Energiemangel kann die Wachstumsverzögerung direkt nach Kälteschock erklären. Die Runterregulation der anderen Gene des Zuckermetabolismus wie *lmo1078* (UDP-Glukose-Pyrophosphorylase), *lmo0271* (Phosphobetaglucosidase) und *lmo1254* (α -Phosphotrehalase), welche verschiedene Zucker zu den Zwischenprodukten metabolisieren, die dann in die Glykolyse eingehen, führt zu einer Senkung der Energieproduktion in Form von ATP durch die Glykolyse. Die Mannose-Phosphat-Isomerase wurde reprimiert, was mit dem eingeschränkten Transport der Mannose in die Zelle durch die Repression des *mpt* (*lmo0096-lmo0097-lmo0098*) Transporter-Systems im Einklang steht. Dieses Transportsystem ist eines der am stärksten runterregulierten. Es ist vier Stunden nach Kälteschock bis zu 17-fach reprimiert. Vor dem ersten Gen dieses Operons liegt eine perfekte Konsensus-Sequenz für *sigL* (*rpoN*, *lmo02461*). Es wurde gezeigt, dass *mptA*, wie auch viele

andere Zuckermethabolismus-Gene, durch *sigL* reguliert ist (Arous, 2004). Die Runterregulation des *mpt*-Systems stimmt mit der Repression von *sigL* nach dem Kälteschock überein. Die Repression vom *sigL*-abhängigen Aktivator (Xue, 2005) des *mpt* Operons *manR* (*lmo0785*) trägt dazu bei. Das andere, nicht *sigL*-abhängige Mannose-Transportersystem (*lmo0781-lmo0782*) wurde nur nach einer Stunde nach dem Kälteschock schwach runterreguliert. Auch andere Transporter mit unklarer Spezifität (*lmo1389*, *lmo1391*, *lmo1746*, *lmo2760*) wurden runterreguliert. Dies kann mit der allgemeinen Verlangsamung des Metabolismus bei niedriger Temperatur begründet sein und damit ein Ersparnis von Energie in Form von ATP ermöglichen.

4.2.4 Repression der Virulenz-assoziierten Gene

L. monocytogenes ist ein pathogenes Bakterium, das auch in der Umwelt außerhalb des Wirtes überleben und sich vermehren kann und deshalb ein feines Regulationssystem der Expression der Virulenzgene benötigt. Die Regulation des Virulenzgenclusters wird über den positiven Regulationsfaktor PrfA ausgeführt, für den wiederum die temperaturabhängige Regulation durch Bildung der alternativen RNA Sekundärstrukturen demonstriert wurde (Johansson, 2002). In unseren Experimenten wurde eine starke Repression von *prfA* und PrfA-regulierten Genen des Virulenzgenclusters und *inlA* demonstriert. Sie trat sofort nach dem Kälteschock auf und wurde auch zu späteren Zeitpunkten und bei dauerhaftem Wachstum bei 15°C behalten. Eine Temperatur von 37°C ist ein Zeichen für das Aufenthalt des Bakteriums im warmblütigen Wirt, während die Senkung der Temperatur kann Hinausgehen in die Umwelt bedeuten. Anscheinend ist die Regulation über den PrfA Regulator der Hauptregulationsmechanismus zur Repression der Virulenzgene nach dem Kälteschock. Damit wird die Expression der außerhalb vom Wirt unnötigen Virulenzfaktoren sofort nach dem Kälteschock abgestellt.

4.3 Kälteadaptation beim dauerhaften Wachstum bei 15°C

Ebenso wie die durch Kälteschock induzierte Genexpression der kälteadaptierten Kultur von *L. monocytogenes* ist die Genexpression während des stationären Wachstums unter hypothermen Bedingungen von Bedeutung. Die kälteadaptierte Kultur wurde in unseren Experimenten auch in Microarray-Analyse untersucht. Die Genexpression beim dauerhaften Wachstum bei niedriger Temperatur zeichnet sich im Vergleich zur kälteschockinduzierten Expression durch die geringere Anzahl der regulierten Gene aus.

Die Gene des Virulenzgencluster (*lmo0200-0206*) blieben in unseren Experimenten runterreguliert, wie auch die Hitzeschock Gene der Klasse I (*dnaJ*, *dnaK*, *grpE*, *hrcA*, *groEL*, *groES*) und der Klasse II (*lmo2206 clpB* und *lmo1138*). Bei niedrigen Temperaturen birgt die Expression dieser Gene keinen Überlebensvorteil für die bakterielle Zelle. Ebenfalls gleich bleibend runterreguliert blieben die Gene, die mit der allgemeinen Stressantwort assoziiert sind, zum Beispiel Alkylhydroperoxid-Reduktase (*lmo1604*) und der Homolog des Kälteschockproteins CspLB (*lmo2016*). Anscheinend, werden sie unter anderen Stressarten induziert und *lmo2016* hat trotz seiner Homologie zu CspLA eine andere Funktion, als Kälteanpassung.

Die Repression von den Genen *lmo1254* und *lmo1255*, assoziiert mit Trehaloseaufnahme und Metabolismus, und die Repression der Laktatdehydrogenase kodierendes *lmo1534* spricht für eine Modifikation des Kohlehydratmetabolismus bei niedriger Temperatur. Die Synthese der sekundären Metaboliten erreicht anscheinend auch beim dauerhaften Wachstum bei der Kälte nicht die Syntheserate während der optimalen Temperatur. Zum Beispiel, blieb die Inosine-5-monophosphate Dehydrogenase *guaB* (*lmo2058*) runterreguliert.

Auffällig ist die Induktion des kompletten Flagella-Operon (*lmo0676-lmo0724*) während des kälteadaptierten Wachstums. Am stärksten wurde das *flaA* Gen, welches ein Strukturprotein der Geißel kodiert, induziert, und zwar um den Faktor 28. Die Geißeln ermöglichen den Listerien freie Bewegung außerhalb des Wirts. Das Auftreten des beweglichen Phänotyps wurde auch im Motilitätstest bei 15°C bestätigt.

Auch die Gene für RNA-Helikasen, welche vermutlich für die Expression von *flaA* essentiell sind, wurden zum Teil während des dauerhaften Wachstums bei Kälte verstärkt expremiert: *lmo1450* war 1,8-fach gesteigert (q % = 0) und *lmo1722* – 1,6-fach (q % = 5.8). Auch *bipA* (*lmo1067*), dessen Deletionsmutante auch verminderte Expression von *flaA* aufwies, wurde bei niedriger Temperatur deutlich induziert.

Die um den Faktor 6,8 gesteigerte Induktion des Gens des Kälteschockproteins CspLA verweist auf die Funktion des Proteins bezüglich des Wachstums bei niedrigen Temperaturen. Das stimmt mit den Daten aus den anderen Experimenten für *Listeria*, *E. coli* und *B. subtilis* überein (Wemkamp-Kamphius, 2002, Xia 2001, Graumann, 1997).

Beim dauerhaften Wachstum bei niedriger Temperatur normalisierte sich die Expression der meisten Gene, die mit ribosomalen Prozessen assoziiert sind. Das weist darauf hin, dass die Anpassung der Ribosomen in den frühen Stadien des Kälteschocks stattfinden. Diese Hypothese kann durch den Vergleich der Genexpressionsraten während des Kälteschocks nach einer, zwei und vier

Stunden gestützt werden. Im Gegensatz dazu wird das konstante Wachstum bei der Kälte vor eher durch die gleichmäßig gesteigerte Synthese von BipA und CspLA charakterisiert.

Die Zelloberfläche wird durch die Induktion einiger Proteine charakterisiert (zum Beispiel Antigen A *lmo0117*, Antigen B *lmo0118*, *lmo0128*, *lmo0193*, Lyncomyzinresistenz Protein *lmo0519*, Transporter *lmo1039*, integrales Membranprotein *lmo2484*). Die Gene des *lma* Operons *lmo0117* und *lmo0118* wurden 1997 von Schäferkordt und Chakraborty als *Listeria*-spezifische Gene mit der immuninduzierenden Wirkung beschrieben. Bei 20°C konnte ein zusätzliches kurzes Transkript des *lma*-Operons neben dem bei allen Temperaturen auftretenden langen Transkript nachgewiesen werden. Die genaue Funktion dieses Operons in der Kälteanpassung ist jedoch nicht bekannt.

4.4 Komparative Analyse

Ein Teil der in dieser Arbeit aus Microarray-Analyse generierten Daten wurden durch die Experimente anderer Arbeitsgruppen bestätigt. Oft jedoch ist der direkte Vergleich der Microarray Ergebnisse mit den anderen Studien schwierig. Bei Studien zu Kälteanpassung bei *L. monocytogenes* wurden meistens die 2-D Gelelektrophorese-Analyse angewendet. Bei den Microarray-Analysen von den anderen Bakterien unterscheiden sich die Bedingungen deutlich zu denen im Umgang mit *L. monocytogenes*.

Die Arbeitsgruppe um Wilkinson beobachtete die ca. 2-stündige Lag-Phase nach Kälteschock, der durch ein Abkühlen der Umgebung von 37°C auf 10°C ausgelöst wurde (Bayles, 1996).

Allerdings wurden ihre 2-D Gelelektrophorese-Experimente nach dem Schock auf 5°C durchgeführt und die Anzahl an unterschiedlich regulierten Proteinen war in den Experimenten dieser Gruppe viel niedriger als die Anzahl der regulierten Gene, die in unserer Arbeit mit Hilfe der Microarray-Technologie gefunden wurde. Bayles et al. konnten 12 Spots als Kälteschockproteine einordnen, 4 von diesen waren auch beim kontinuierlichen Wachstum bei 5°C verstärkt induziert und wurden daher als Kälteadaptationsproteine bezeichnet. Die Proteinprofile für die Stämme SLCC53 und 10403S waren sich bis auf vier Proteine sehr ähnlich.

Die andere 2-D Elektrophorese Studie (Phan-Than and Gormon, 1995) fand 38 induzierte Proteine und 63-65 über 2-fach reprimierte Proteine, nachdem die Kultur von *L. monocytogenes* 2-3 Stunden auf 4°C gekühlt worden war. Die Differenz kann durch technische Unterschiede in der Methodik und durch die verschiedenen verwendeten Stämme erklärt werden.

In den Experimenten von Hebraud und Guzzo (2000) zeigte sich das Ferritin-ähnliche Protein Flp (Lmo0943) als am deutlichsten verstärkt exprimiertes Protein nach dem Kälteschock. Flp ist mit der Resistenz gegen verschiedene Arten von Stress assoziiert. In den Experimenten der hier vorliegenden Arbeit zeigte sich eine Runterregulation des Gens *lmo0943* um den Faktor 4 eine Stunde nach Kälteschock. Dies weist auf eine Regulation des bakteriellen Stoffwechsels nach dem Kälteschock auch auf der Ebene der Translation hin.

Um die Gene zu identifizieren, die für Kälteschock-Antwort von *L. monocytogenes* spezifisch sind, wurden alle regulierten Gene auf das Vorhandensein der Orthologen in dem zu *L. monocytogenes* nah verwandten *B. subtilis* und andererseits *E. coli*, dem Modellobjekt der Kälteadaptation der mesophilen Bakterien, überprüft. Als Kriterium wurden 75 % Überdeckung und 50 % Identität zwischen den Sequenzen genommen. 45 % von hoch- und 47 % runterregulierten Genen hatten Orthologen in *B. subtilis*. Für *E. coli* fanden sich Orthologen zu 7 % der hoch- und 11 % der runterregulierten Gene. Verglichen mit den Genen anderer Bakterienspezies (*B. subtilis*, *E. coli*, *Collwellia* sp., *Lactobacillus*, *S. aureus*), deren Kälteadaptation mit Microarray-Analysen untersucht wurde, waren 50% der Gene spezifisch für *L. monocytogenes*.

Beim Vergleich der regulierten Gene von *L. monocytogenes* EGD-e mit den anderen sequenzierten Stämmen von *L. monocytogenes* und mit den apathogenen Spezies *L. innocua* und *L. welschheimeri* wurde festgestellt, dass die Kälteschockantwort zum Großteil für *Listeria* Genus-spezifisch ist. Nur ca. 3 % der Gene hatten, nach den oben genannten Kriterien, keine Homologe in den Stämmen *L. monocytogenes* 4b CLIP80459 und 4b F2365. Ca. 4 % der hochregulierten Gene hatten keine Homologe in apatogenen Spezies. Bei den meisten Genen ohne Homologen handelt es sich um Gene mit nicht identifizierter Funktion. Für die runterregulierten Gene war die Zahl der Gene ohne Homologe aufgrund der nur bei *L. monocytogenes* vorhandenen Virulenzgene etwas höher.

4.5 Rolle der RNA-Helikasen an der Kälteadaptation

Die Induktion der RNA-Helikasen und des *lmo1067* in Microarray-Analysen wurde mit Hilfe der RT-PCR und Northern Blot bestätigt. Die Induktionsfaktoren stimmen zwar nicht überein, aber die Tendenz konnte verifiziert werden. Für alle untersuchten Gene war eine deutliche Induktion nach dem Kälteschock mit einem Maximum nach einer Stunde zu sehen.

Um die Rolle der RNA-Helikasen und des *lmo1067* an der Kälteanpassung näher zu untersuchen, wurden die Deletionsmutanten der entsprechenden Gene hergestellt und auf ihr Wachstum bei 37°C und 15°C untersucht. Für Δ *lmo0866*, *lmo1450*, *lmo1722* und *lmo1067* wurde kälteempfindli-

cher Phänotyp demonstriert, was ihre Bedeutung für die Adaptation an die niedrige Temperatur bestätigt. *Lmo1246* zeigte keine erhöhte Kältesensitivität gegenüber dem Wildtyp. *Lmo1246* kann mit der Reifung des Ribosoms in Verbindung gestellt werden, da es zu DbpA von *E. coli* stark homolog ist. Über DbpA und sein Homolog in *B. subtilis*, YxiN, ist bekannt, dass es von der Stem-loop-Struktur der 23S RNA aktiviert wird und eher die Rolle an der Ribosombiogenese als an der Translation spielt (Kossen, 1999, Diges, 2001). Möglicherweise können sich die Helikasen in ihren Funktion gegenseitig ersetzen. So können Fehlfunktion, wie zum Beispiel das Ribosomprosessing, in den Mutanten kompensiert werden.

Almo0866 und *lmo1450* zeigten zusätzlich gegenüber dem Wildtyp leicht vermindertes Wachstum bei 37°C. *Lmo0866* hat die höchste Homologie zu DeaD/CsdA von *E. coli*. Für DeaD wurden mehrere Funktionen vermutet: zum einen die Unterstützung der Translationsinitiation (Lu, 1999), zum anderen der Aufbau der 50S Ribosomuntereinheit (Charollais, 2004), sowie Bildung des Degradosoms im Komplex mit der RNase E (Prud'homme-Genereux, 2004). Die Deletion dieses Gens führt somit zu multiplen Defekten des Translationsapparats. Diese Defekte können sich auch unter normalen Bedingungen auswirken. Der Homolog von *Lmo0866* in *B. subtilis*, YdbR, wurde auch als Protein mit der RNA-Bindungsaktivität und ATP-Hydrolyseaktivität charakterisiert. Die Deletion dieses Proteins führte zu einem Wachstumsdefekt bei 37°C, das sich bei 22°C noch verstärkte (Ando, 2006).

Die Deletionsmutante des Gens *lmo1450* wies ein noch etwas stärker vermindertes Wachstum bei 37°C auf, und bei 15°C schweren Wachstumsdefekt. *Lmo1450* ist stark homolog zu CshB (YqfR) von *B. subtilis* und zu RhIE von *E. coli*. Für CshB Protein wurde ein Modell für die Interaktion mit dem Hauptkälteschockprotein von *B. subtilis*, CspB, entwickelt. Dieser Komplex soll die Translationsinitiation unterstützen (Hunger, 2006) und damit den Engpass bei der Translation überwinden. Auf der anderen Seite, RhIE wird mit den Degradosomen assoziiert und kann in den kälteadaptierten Degradosomen die Helikase RhlB ersetzen (Khemici 2004) Bei den psychrotrophen *Pseudomonas syringae* ist RhIE auch nach der kälteadaptiven Reorganisation Teil der Degradosomem (Purushart 2005). Für die Austauschbarkeit der RNA-Helikasen untereinander bei den verschiedenen Funktionen spricht auch die Feststellung, dass sich RhlB, RhIE und CsdA *in vitro* in den Degradationsassays ersetzen können (Khemici, 2004)

Die Komplementation von Deletierten Genen *in trans* hat für *lmo866*, *lmo1450* und *lmo1067* gelungen, der kälteresistente Phänotyp konnte wiederhergestellt werden. Damit konnte der spezifische Effekt von deletierten Genen für die Kältesensitivität bestätigt werden.

4.5.1 Rolle von RNA-Helikasen für die Expression von FlaA

Die Expression von Flagellin, des Hauptstrukturproteins der Geißel, erfolgt, wie bei vielen Bakterien, auch bei *L. monocytogenes* nur bei niedrigen Temperaturen, weil es während der Infektion als ein “pattern recognition molecule” eine Immunreaktion hervorrufen kann und daher der strengen Regulation unterliegt (Way, 2004).

Die Expression des FlaA Proteins wurde zusätzlich mit Hilfe der immunochemischen Western Blot Analyse untersucht. Das Signal des FlaA Proteins wurde genau so wie der *flaA*-Transkript in der Microarray-Analyse nur in den dauerhaft bei 15°C angezogenen Kulturen von *L. monocytogenes*, aber nicht in den Kulturen nach einer, zwei oder vier Stunden nach dem Kälteschock detektiert.

Es war von Interesse zu prüfen, ob die kälteabhängige Regulation von der Expression von FlaA mit der Expression von Helikasen zusammenhängt. Dazu wurden die Deletionsmutanten von Helikasegenen auf ihre Motilität und FlaA Expression untersucht. Wie die Ergebnisse der Western Blot Analyse zeigen, wird in den Deletionsmutanten von den Genen der Helikasen und $\Delta I067$ die Synthese von dem FlaA Protein vermindert oder unterlassen. Das führt zu dem unbeweglichen Phänotyp. Der unbewegliche Phänotyp wurde der mit dem Motilitätstest bestätigt. Der gleiche Phänotyp tritt auch in der $\Delta cspLA$ Mutante auf. Vermutlich, sind die beiden Komponenten für die Expression von dem Gen *flaA* notwendig und agieren im Komplex. Für FlaA wurde früher gezeigt, dass es bei Temperaturen unter 30°C expremiert wird (Grundling, 2004) und unterliegt der Temperatur-abhängigen Regulation.

Hunger et al. (2006) haben anhand der Co-Lokalisation in der Zelle und der FISH Experimente demonstriert, dass in *B. subtilis* CspB (das Homolog von CspLA) und die Helikase CshB (das Homolog von *Lmo1450*) im Komplex funktionieren, und so bei niedrigen Temperaturen die Translation von Kälte-induzierten Genen ermöglichen. Zunächst bindet die Helikase an der RNA und entwindet die unerwünschten sekundären Strukturen, und danach bindet das CspB an der Einzelstrang-RNA und stabilisiert sie. In unserem Fall kann die mRNA von FlaA eines der Substrate für diesen Helikasen-CspL Komplex sein.

4.6 Übersicht der Prozesse bei der Kälteschockantwort von *L. monocytogenes*

Aus den Daten der Microarray-Analyse und der durchgeführten phänotypischen Experimenten lassen sich folgende Mechanismen der Adaptation nach Kälteschock feststellen:

- Nachdem das Signal der Temperatursenkung über einen bislang ungeklärten Mechanismus wahrgenommen worden ist, stoppen die Zellteilung und ein Großteil der Proteinsynthese.
- Der allgemeine Metabolismus und einige der Transportersysteme werden sofort nach dem Kälteschock angehalten und erst nach der Adaptationsphase wiederaufgenommen.
- Ein komplexes Netzwerk von den Transkriptionsregulatoren wird in Gang gesetzt (*glnR*, *cggR*, die Regulatoren der *LytR*, *GntR*, *MarR* Familien)
- Darauf folgen Veränderungen im Zellmetabolismus, die vor allem die Proteinsynthese, die Zellwand und die Osmolytenaufnahme betreffen. Die niedrige Temperatur dient als ein Signal, dass *L. monocytogenes* sich außerhalb vom Wirt befindet.
- Die Virulenzfaktoren werden runterreguliert. Unter den neuen Bedingungen sind nicht nötig.
- Osmolyten werden aufgenommen, vor allem das Betain durch Aktivierung des *gbuABC* Transporter-Systems.
- Die Lipidzusammensetzung von der Membran wird durch *de novo* Synthese angepasst oder durch die Synthese von verzweigten Fettsäuren aus hydrophoben Aminosäuren.
- Das Kälteschockprotein wird sofort nach dem Kälteschock stark induziert und bleibt auch während des dauerhaften Wachstums bei 15°C nachweisbar.
- Die Ribosomen werden modifiziert bzw. neu synthetisiert. Dafür spricht die Induktion vieler Proteine, die an der Reifung der Ribosomen beteiligt sind. Die Translation wird den veränderten Bedingungen angepasst.
- Die RNA-Helikasen *lmo0866*, *lmo1246*, *lmo1450* werden induziert und ermöglichen die Translation durch Entwinden der unerwünschten Sekundärstrukturen der mRNAs. Zum Beispiel, die Expression von Flagellin scheint von den Helikasen abhängig zu sein.
- Nach der Adaptationsphase von ca. zwei Stunden wird das Wachstum wiederaufgenommen.
- An späten Phasen der Kälteadaptation wird das Flagella-Operon induziert, die Flagellen werden synthetisiert und die *Listeria*-Zellen werden beweglich. Das ermöglicht den Listerien freie Bewegung zum Beispiel für die Suche nach optimalen Nährstoffen bei dem freien Lebensstil außerhalb vom Wirt.

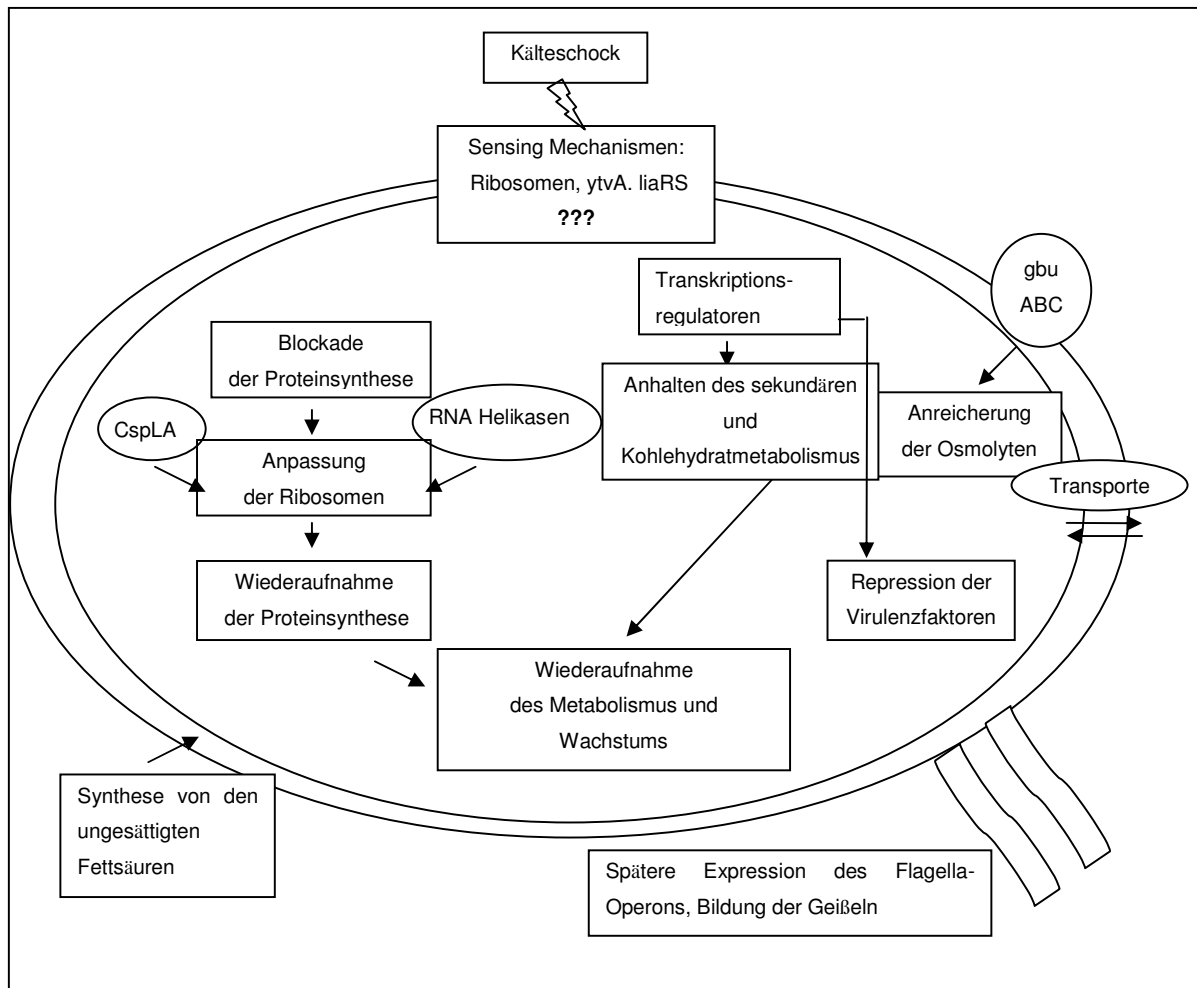


Abb. 20. Übersicht der Kälteschockantwort bei *L. monocytogenes*.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Kälteschock-Antwort von *L. monocytogenes*. Mit Hilfe von Microarray-Analyse wurden die Transkriptionsprofile bei 37°C sowie jeweils nach einer, zwei und vier Stunden nach der Temperatursenkung auf 15°C ermittelt und verglichen. Die Analyse ergab, dass ca. 15 % des Genoms nach dem Kälteschock verändert exprimiert wurde. Die deutlichsten Unterschiede in den Expressionsprofilen fanden sich nach einer Stunde nach dem Kälteschock. Die beobachtete Anzahl an unterschiedlich exprimierten Regulatoren deutet auf die Anpassung mehrerer Stoffwechselwege hin. Kohlenstoffmetabolismus und Energieproduktion in Form von ATP, sowie Sekundärmetabolismus und Transportsysteme für Zucker und Aminosäuren verlangsamten sich. Die Expression von Virulenz- und Hitzeschock-relevanten Genen wurde runterreguliert. Damit werden Ressourcen für die Biosynthese der kälteinduzierten Proteine frei.

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der am stärksten veränderte Prozess nach dem Kälteschock die Proteinbiosynthese ist. Es wurde kein spezieller Sigma-Faktor gefunden, der an der Expression der kälteinduzierten Gene beteiligt ist. Daher scheint die Anpassung der Proteinbiosynthese eher durch die Veränderungen am Ribosom zu erfolgen. Zum Beispiel ist *bipA* (*lmo1067*) ein möglicher Translationsfaktor, der speziell bei der niedrigen Temperatur verstärkt exprimiert wird und eine Rolle bei der Translation spielt.

Die Bedeutung der RNA-Helikasen nach dem Kälteschock konnte noch einmal bestätigt werden. Die Gene der RNA-Helikasen wurden bei *L. monocytogenes* EGD-e deletiert und zeigten alle bis auf $\Delta lmo1246$, einen kältesensitiven Phänotyp. Um die Kälteschockantwort bei *L. monocytogenes* genauer zu charakterisieren, wäre es interessant, die Target-Gene, auf deren Transkripten die RNA-Helikasen binden und die Translation nach dem Kälteschock begünstigen, zu identifizieren. Ihre Identifizierung könnte das Verständnis der nach Kälteschock veränderten Zellphysiologie vertiefen.

Um die Regulation der Expression von RNA-Helikasen bei den niedrigen Temperaturen zu untersuchen, gilt es nun, diejenigen Faktoren zu finden, die an Promotor-Bereich der Helikase-Gene binden und so deren Expression regulieren. Auch die Interaktion zwischen den RNA-Helikasen und dem *cspLA* Gen ist noch nicht abschließend untersucht. Die Microarray-Analyse der Kälteschockantwort in der $\Delta cspLA$ Mutante im Vergleich zu dem Wildtyp könnte die Gene aufschließen, deren Transkription bei der Kälte durch *cspLA* beeinflusst wird.

Die Expression des *flaA* Gens bedarf einer näheren Untersuchung. Bekannt ist, dass die Expression des *flaA* Gens in der $\Delta cspLA$ Mutante auf Transkriptionsebene verhindert wird (Busch, 1998). Ob ein Fehlen der entsprechenden Helikase die Synthese des FlaA-Proteins auf Transkriptions- oder Translationsebene hemmt, bedarf ebenfalls weiterer Experimente. Mit Hilfe einer *flaA* Sonde wäre ein Transkript des *flaA* Gens in den Δ -Helikasen-Mutanten nachzuweisen, bzw. auszuschließen.

Die Frage nach einem globalen Sensor für die Kälte in *L. monocytogenes* blieb in vorliegender Arbeit offen. Zum Überprüfen dieser Hypothese bieten sich die Deletion des als potenzieller Sensor identifizierten Gens *lmo0799* und eine anschließende Charakterisierung unter verschiedenen Temperaturen und Lichtbedingungen an.

6 LITERATUR

1. **Agafonov, D. E., V. A. Kolb, I. V. Nazimov, and A. S. Spirin.** 1999. A protein residing at the subunit interface of the bacterial ribosome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**:12345-12349.
2. **Aguilar, P. S., P. Lopez, and D. de Mendoza.** 1999. Transcriptional control of the low-temperature-inducible *des* gene, encoding the delta5 desaturase of *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **181**:7028-7033.
3. **Angelidis, A. S., L. T. Smith, L. M. Hoffman, and G. M. Smith.** 2002. Identification of *opuC* as a chill-activated and osmotically activated carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**:2644-2650.
4. **Angelidis, A. S. and G. M. Smith.** 2003. Role of the glycine betaine and carnitine transporters in adaptation of *Listeria monocytogenes*. *Appl.Environ.Microbiol.* **69**:7492-7498.
5. **Annous, B. A., L. A. Becker, D. O. Bayles, D. P. Labeda, and B. J. Wilkinson.** 1997. Critical role of anteiso-C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl.Environ.Microbiol.* **63**:3887-3894.
6. **Aramaki, H., Y. Sagara, and M. Fujita.** 1999. Cloning and sequencing of *rpoH* and identification of *ftsE-ftsX* in *Pseudomonas putida* PpG1. *DNA Res.* **6**:241-245.
7. **Arous, S., C. Buchrieser, P. Folio, P. Glaser, A. Namane, M. Hebraud, and Y. Hechard.** 2004. Global analysis of gene expression in an *rpoN* mutant of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology.* **150**:1581-1590.
8. **Autret, N., C. Raynaud, I. Dubail, P. Berche, and A. Charbit.** 2003. Identification of the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. *Infect.Immun.* **71**:4463-4471.
9. **Bae, W., B. Xia, M. Inouye, and K. Severinov.** 2000. *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **97**:7784-7789.
10. **Bayles, D. O., M. H. Tunick, T. A. Foglia, and A. J. Miller.** 2000. Cold shock and its effect on ribosomes and thermal tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl.Environ.Microbiol.* **66**:4351-4355.
11. **Bayles, D. O. and B. J. Wilkinson.** 2000. Osmoprotectants and cryoprotectants for *Listeria monocytogenes*. *Lett.Appl.Microbiol.* **30**:23-27.
12. **Becker, L. A., S. N. Evans, R. W. Hutkins, and A. K. Benson.** 2000. Role of sigma(B) in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. *J.Bacteriol.* **182**:7083-7087.

LITERATUR

13. **Beckering, C. L., L. Steil, M. H. Weber, U. Volker, and M. A. Marahiel.** 2002. Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **184**:6395-6402.
14. **Bhavsar, A. P., L. K. Erdman, J. W. Schertzer, and E. D. Brown.** 2004. Teichoic acid is an essential polymer in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **186**:7865-7873.
15. **Borezee E, Pellegrini E, and P. Berche.** 2000. *OppA* of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infect.Immun.* **68**:7069-7077.
16. **Bozzi, M., G. Mignogna, Stefanini S, D. Barra, C. Longhi, P. Valenti, and Chiancone E.** 1997. A novel non-heme iron-binding ferritin related to the DNA-binding proteins of the Dps family in *Listeria innocua*. *J.Biol.Chem.* **272**:3259-3265.
17. **Brandi, A., R. Spurio, C. O. Gualerzi, and C. L. Pon.** 1999. Massive presence of the *Escherichia coli* major cold-shock protein CspA under non-stress conditions. *EMBO J.* **18**:1653-1659.
18. **Brehm, K., M. T. Ripio, J. Kreft, and J. A. Vazquez-Boland.** 1999. The *bvr* locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression. *J.Bacteriol.* **181**:5024-5032.
19. **Brigulla, M., T. Hoffmann, A. Krisp, A. Volker, E. Bremer, and U. Volker.** 2003. Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J.Bacteriol.* **185**:4305-4314.
20. **Broeze, R. J., C. J. Solomon, and D. H. Pope.** 1978. Effects of low temperature on in vivo and in vitro protein synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *J.Bacteriol.* **134**:861-874.
21. **Brunskill, E. W. and K. W. Bayles.** 1996. Identification of *LytSR*-regulated genes from *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* **178**:5810-5812.
22. **Caldon, C. E. and P. E. March.** 2003. Function of the universally conserved bacterial GTPases. *Curr.Opin.Microbiol.* **6**:135-139.
23. **Carty, S. M., K. R. Sreekumar, and C. R. Raetz.** 1999. Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*. Induction at 12 degrees C of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. *J.Biol.Chem.* **274**:9677-9685.
24. **Chamot, D. and G. W. Owttrim.** 2000. Regulation of cold shock-induced RNA helicase gene expression in the *Cyanobacterium anabaena* sp. strain PCC 7120. *J.Bacteriol.* **182**:1251-1256.
25. **Charollais, J., M. Dreyfus, and I. Iost.** 2004. *CsdA*, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **32**:2751-2759.

LITERATUR

26. **Chassaing, D. and F. Auvray.** 2007. The *lmo1078* gene encoding a putative UDP-glucose pyrophosphorylase is involved in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperature. *FEMS Microbiol.Lett.* **275**:31-37.
27. **Chastanet, A., I. Derre, S. Nair, and T. Msadek.** 2004. *clpB*, a novel member of the *Listeria monocytogenes* CtsR regulon, is involved in virulence but not in general stress tolerance. *J.Bacteriol.* **186**:1165-1174.
28. **Chatfield, C. H., H. Koo, and R. G. Quivey, Jr.** 2005. The putative autolysin regulator LytR in *Streptococcus mutans* plays a role in cell division and is growth-phase regulated. *Microbiology.* **151**:625-631.
29. **Chatterjee, S. S., H. Hossain, Otten S, C. Kuenne, K. Kuchmina, Machata S, Domann E, T. Chakraborty, and T. Hain.** 2006. Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect.Immun.* **74**:1323-1338.
30. **Chattopadhyay, M. K.** 2006. Mechanism of bacterial adaptation to low temperature. *J.Biosci.* **31**:157-165.
31. **Chavant, P., B. Martinie, T. Meylheuc, M. N. Bellon-Fontaine, and M. Hebraud.** 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**:728-737.
32. **Collins, M. D., Wallbanks S, D. J. Lane, J. Shah, R. Nietupski, J. Smida, M. Dorsch, and Stackebrandt E.** 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **41**:240-246.
33. **Czuprynski, C. J.** 2005. *Listeria monocytogenes*: silage, sandwiches and science. *Anim Health Res.Rev.* **6**:211-217.
34. **Dalluge, J. J., T. Hamamoto, K. Horikoshi, R. Y. Morita, K. O. Stetter, and J. A. McCloskey.** 1997. Posttranscriptional modification of tRNA in psychrophilic bacteria. *J.Bacteriol.* **179**:1918-1923.
35. **Dammel, C. S. and H. F. Noller .** 1995. Suppression of a cold-sensitive mutation in 16S rRNA by overexpression of a novel ribosome-binding factor, RbfA. *Genes Dev.* **9**:626-637.
36. **Derre, I., G. Rapoport, and T. Msadek.** 2000. The CtsR regulator of stress response is active as a dimer and specifically degraded in vivo at 37 degrees C. *Mol.Microbiol.* **38**:335-347.
37. **Dilks, K., R. W. Rose, E. Hartmann, and M. Pohlschroder.** 2003. Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey. *J.Bacteriol.* **185**:1478-1483.
38. **Dominguez-Bernal, G., Muller-Altrock S, B. Gonzalez-Zorn, M. Scortti, P. Herrmann, H. J. Monzo, L. Lacharme, J. Kreft, and J. A. Vazquez-Boland.** 2006. A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins. *Mol.Microbiol.* **59**:415-432.

LITERATUR

39. **Dons, L., Rasmussen OF, and J. E. Olsen.** 1992. Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *Listeria monocytogenes*. *Mol.Microbiol.* **6**:2919-2929.
40. **Duffy, L. L., P. B. Vanderlinde, and F. H. Grau.** 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packed cooked meats: effects of pH, aw, nitrite and ascorbate. *Int.J.Food Microbiol.* **23**:377-390.
41. **Dussurget, O., Dumas E, C. Archambaud, I. Chafsey, C. Chambon, M. Hebraud, and P. Cossart.** 2005. *Listeria monocytogenes* ferritin protects against multiple stresses and is required for virulence. *FEMS Microbiol.Lett.* **250**:253-261.
42. **Dykes, G. A. and S. M. Moorhead.** 2001. The role of L-carnitine and glycine betaine in the survival and sub-lethal injury of non-growing *Listeria monocytogenes* cells during chilled storage. *Lett.Appl.Microbiol.* **32**:282-286.
43. **El Sharoud, W. M. and P. L. Graumann.** 2007. Cold shock proteins aid coupling of transcription and translation in bacteria. *Sci.Prog.* **90**:15-27.
44. **Erickson, J. W. and C. A. Gross.** 1989. Identification of the sigma E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression. *Genes Dev.* **3**:1462-1471.
45. **Etchegaray, J. P., P. G. Jones, and M. Inouye.** 1996. Differential thermoregulation of two highly homologous cold-shock genes, *cspA* and *cspB*, of *Escherichia coli*. *Genes Cells.* **1**:171-178.
46. **Etchegaray, J. P. and M. Inouye.** 1999. A sequence downstream of the initiation codon is essential for cold shock induction of *cspB* of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **181**:5852-5854.
47. **Ferreira, A., M. Gray, M. Wiedmann, and K. J. Boor.** 2004. Comparative genomic analysis of the *sigB* operon in *Listeria monocytogenes* and in other Gram-positive bacteria. *Curr.Microbiol.* **48**:39-46.
48. **Fraser, K. R., D. Sue, M. Wiedmann, K. Boor, and C. P. O'Byrne.** 2003. Role of sigmaB in regulating the compatible solute uptake systems of *Listeria monocytogenes*: osmotic induction of *opuC* is sigmaB dependent. *Appl.Environ.Microbiol.* **69**:2015-2022.
49. **Gaidenko, T. A., T. J. Kim, A. L. Weigel, M. S. Brody, and C. W. Price.** 2006. The blue-light receptor YtvA acts in the environmental stress signaling pathway of *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **188**:6387-6395.
50. **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.
51. **Gellin, B. G. and C. V. Broome .** 1989. Listeriosis. *JAMA.* **261**:1313-1320.

52. **Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, Couve E, A. de Daruvar, P. Dehoux, Domann E, G. Dominguez-Bernal, Duchaud E, L. Durant, O. Dussurget, K. D. Entian, H. Fsihi, F. Garcia-del 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, Madueno E, A. Maitournam, J. M. Vicente, Ng E, H. Nedjari, G. Nordsiek, Novella S, B. de Pablos, J. C. Perez-Diaz, R. Purcell, B. Remmel, 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.
53. **Gouin E, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1994. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infect.Immun.* **62**:3550-3553.
54. **Grant, A. J., M. Farris, P. Alefounder, P. H. Williams, M. J. Woodward, and C. D. O'Connor.** 2003. Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in in enteropathogenic *Escherichia coli* (E-PEC). *Mol.Microbiol.* **48**:507-521.
55. **Graumann, P. and M. A. Marahiel.** 1994. The major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB binds with high affinity to the ATTGG- and CCAAT sequences in single stranded oligonucleotides. *FEBS Lett.* **338**:157-160.
56. **Graumann, P. and M. A. Marahiel.** 1996. Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Arch.Microbiol.* **166**:293-300.
57. **Graumann, P., K. Schroder, R. Schmid, and M. A. Marahiel.** 1996. Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **178**:4611-4619.
58. **Graumann, P. and M. A. Marahiel.** 1996. A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules. *Bioessays.* **18**:309-315.
59. **Graumann, P., T. M. Wendrich, M. H. Weber, K. Schroder, and M. A. Marahiel.** 1997. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol.Microbiol.* **25**:741-756.
60. **Graumann, P. L. and M. A. Marahiel.** 1999. Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *Arch.Microbiol.* **171**:135-138.
61. **Grundling, A., L. S. Burrack, H. G. Bouwer, and D. E. Higgins.** 2004. *Listeria monocytogenes* regulates flagellar motility gene expression through MogR, a transcriptional repressor required for virulence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **101**:12318-12323.

62. **Gualerzi, C. O., A. M. Giuliodori, and C. L. Pon.** 2003. Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. *J.Mol.Biol.* **331** :527-539.
63. **Haas, A., M. Dumbsky, and J. Kreft.** 1992. Listeriolysin genes: complete sequence of *ilo* from *Listeria ivanovii* and of *Iso* from *Listeria seeligeri*. *Biochim.Biophys.Acta.* **1130**:81-84.
64. **Hain, T., C. Steinweg, C. T. Kuenne, A. Billion, R. Ghai, S. S. Chatterjee, Domann E, U. Karst, A. Goesmann, T. Bekel, D. Bartels, O. Kaiser, F. Meyer, A. Puhler, B. Weisshaar, J. Wehland, C. Liang, T. Dandekar, R. Lampidis, J. Kreft, W. Goebel, and T. Chakraborty.** 2006. Whole-genome sequence of *Listeria welshimeri* reveals common steps in genome reduction with *Listeria innocua* as compared to *Listeria monocytogenes*. *J.Bacteriol.* **188**:7405-7415.
65. **Han, Y., D. Zhou, X. Pang, Y. Song, L. Zhang, J. Bao, Z. Tong, J. Wang, Z. Guo, J. Zhai, Z. Du, X. Wang, X. Zhang, J. Wang, P. Huang, and R. Yang.** 2004. Microarray analysis of temperature-induced transcriptome of *Yersinia pestis*. *Microbiol.Immunol.* **48**:791-805.
66. **Han, Y., D. Zhou, X. Pang, L. Zhang, Y. Song, Z. Tong, J. Bao, E. Dai, J. Wang, Z. Guo, J. Zhai, Z. Du, X. Wang, J. Wang, P. Huang, and R. Yang.** 2005. DNA microarray analysis of the heat- and cold-shock stimulons in *Yersinia pestis*. *Microbes.Infect.* **7**:335-348.
67. **Hanawa, T., M. Kai, S. Kamiya, and T. Yamamoto.** 2000. Cloning, sequencing, and transcriptional analysis of the *dnaK* heat shock genes. *Cell Stress.Chaperones.* **5**:21-29.
68. **Hartig E, H. Geng, A. Hartmann, A. Hubacek, R. Munch, R. W. Ye, D. Jahn, and M. M. Nakano.** 2004. *Bacillus subtilis* ResD induces expression of the potential regulatory genes *yclJK* upon oxygen limitation. *J.Bacteriol.* **186**:6477-6484.
69. **Hayashi, F., K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem.** 2001. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptors. *Nature.* **410**:1099-1103.
70. **Hebraud, M. and P. Potier.** 1999. Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **1**:211-219.
71. **Hebraud, M. and J. Guzzo.** 2000. The main cold shock protein of *Listeria monocytogenes* belongs to the family of ferritin-like proteins. *FEMS Microbiol.Lett.* **190**:29-34.
72. **Hillier, B. J., H. M. Rodriguez, and L. M. Gregoret.** 1998. Coupling protein stability and protein function in *Escherichia coli* CspA. *Fold.Des.* **3**:87-93.
73. **Hobman, J. L.** 2007. MerR family transcription activators: similar designs, different specificities. *Mol.Microbiol.* **63**:1275-1278.

74. **Hofweber, R., G. Horn, T. Langmann, J. Balbach, W. Kremer, G. Schmitz, and H. R. Kalbitzer.** 2005. The influence of cold shock proteins on transcription and translation studied in cell-free model systems. *FEBS J.* **272**:4691-4702.
75. **Hunger, K., C. L. Beckering, F. Wiegeshoff, P. L. Graumann, and M. A. Marahiel.** 2006. Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *J.Bacteriol.* **188**:240-248.
76. **Inaba, M., I. Suzuki, B. Szalontai, Y. Kanesaki, D. A. Los, H. Hayashi, and N. Murata.** 2003. Gene-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *synechocystis*. *J.Biol.Chem.* **278**:12191-12198.
77. **Inoue, K., J. Chen, Q. Tan, and M. Inouye.** 2006. Era and RbfA have overlapping function in ribosome biogenesis in *Escherichia coli*. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **11**:41-52.
78. **Iost, I. and M. Dreyfus.** 1994. mRNAs can be stabilized by DEAD-box proteins. *Nature.* **372**:193-196.
79. **Jensen, V. B., J. T. Harty, and B. D. Jones.** 1998. Interactions of the invasive pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* with M cells and murine Peyer's patches. *Infect.Immun.* **66**:3758-3766.
80. **Jiang, W., Y. Hou, and M. Inouye.** 1997. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J.Biol.Chem.* **272**:196-202.
81. **Johansson, J., P. Mandin, A. Renzoni, C. Chiaruttini, M. Springer, and P. Cossart.** 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell.* **110**:551-561.
82. **Jones, P. G. and M. Inouye.** 1994. The cold-shock response - a hot topic. *Mol.Microbiol.* **11**:811-818.
83. **Jordan, S., A. Junker, J. D. Helmann, and T. Mascher.** 2006. Regulation of LiaRS-dependent gene expression in *Bacillus subtilis*: identification of inhibitor proteins, regulator binding sites, and target genes of a conserved cell envelope stress-sensing two-component system. *J.Bacteriol.* **188**:5153-5166.
84. **Jordan, S., E. Rietkotter, M. A. Strauch, F. Kalamorz, B. G. Butcher, J. D. Helmann, and T. Mascher.** 2007. LiaRS-dependent gene expression is embedded in transition state regulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* **153**:2530-2540.
85. **Kaan, T., G. Homuth, U. Mader, J. Bandow, and T. Schweder.** 2002. Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response. *Microbiology.* **148**:3441-3455.
86. **Kampelmacher, E. H. and van Noorle Jansen LM.** 1969. Isolation of *Listeria monocytogenes* from faeces of clinically healthy humans and animals. *Zentralbl.Bakteriol.[Orig.]*. **211**:353-359.

87. **Kandror, O., A. DeLeon, and A. L. Goldberg.** 2002. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **99**:9727-9732.
88. **Kaneda, T.** 1966. Biosynthesis of branched-chain fatty acids. IV. Factors affecting relative abundance of fatty acids produced by *Bacillus subtilis*. *Can.J.Microbiol.* **12**:501-514.
89. **Kang, C. M., M. S. Brody, S. Akbar, X. Yang, and C. W. Price.** 1996. Homologous pairs of regulatory proteins control activity of *Bacillus subtilis* transcription factor sigma(b) in response to environmental stress. *J.Bacteriol.* **178**:3846-3853.
90. **Karunasagar, I., B. Senghaas, G. Krohne, and W. Goebel.** 1994. Ultrastructural study of *Listeria monocytogenes* entry into cultured human colonic epithelial cells. *Infect.Immun.* **62**:3554-3558.
91. **Karunasagar, I., R. Lampidis, W. Goebel, and J. Kreft.** 1997. Complementation of *Listeria seeligeri* with the *plcA-prfA* genes from *L. monocytogenes* activates transcription of seeligerolysin and leads to bacterial escape from the phagosome of infected mammalian cells. *FEMS Microbiol.Lett.* **146**:303-310.
92. **Kinghorn, S. M., C. P. O'Byrne, I. R. Booth, and I. Stansfield.** 2002. Physiological analysis of the role of *truB* in *Escherichia coli*: a role for tRNA modification in extreme temperature resistance. *Microbiology.* **148**:3511-3520.
93. **Klein, W., M. H. Weber, and M. A. Marahiel.** 1999. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J.Bacteriol.* **181**:5341-5349.
94. **Kloks, C. P., C. A. Spronk, Lasonder E, A. Hoffmann, G. W. Vuister, Grzesiek S, and C. W. Hilbers.** 2002. The solution structure and DNA-binding properties of the cold-shock domain of the human Y-box protein YB-1. *J.Mol.Biol.* **316**:317-326.
95. **Ko, R., L. T. Smith, and G. M. Smith.** 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J.Bacteriol.* **176**:426-431.
96. **Korepanov, A. P., G. M. Gongadze, and M. B. Garber.** 2004. General stress protein Ctc from *Bacillus subtilis* specifically binds to ribosomal 5S RNA. *Biochemistry (Mosc.).* **69**:607-611.
97. **Kormanec, J., B. Sevcikova, N. Halgasova, R. Knirschova, and B. Rezuchova.** 2000. Identification and transcriptional characterization of the gene encoding the stress-response sigma factor sigma(H) in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol.Lett.* **189**:31-38.
98. **Kremer, W., B. Schuler, Harrieder S, M. Geyer, W. Gronwald, C. Welker, R. Jaenicke, and H. R. Kalbitzer.** 2001. Solution NMR structure of the cold-shock protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Eur.J.Biochem.* **268**:2527-2539.

LITERATUR

99. **Kruger, E. and M. Hecker.** 1998. The first gene of the *Bacillus subtilis* *clpC* operon, *ctsR*, encodes a negative regulator of its own operon and other class III heat shock genes. *J.Bacteriol.* **180**:6681-6688.
100. **La Teana, A., A. Brandi, M. Falconi, R. Spurio, C. L. Pon, and C. O. Gualerzi.** 1991. Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein *H-NS*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**:10907-10911.
101. **La Teana, A., C. O. Gualerzi, and R. Brimacombe.** 1995. From stand-by to decoding site. Adjustment of the mRNA on the 30S ribosomal subunit under the influence of the initiation factors. *RNA.* **1**:772-782.
102. **Lecuit, M., H. Ohayon, L. Braun, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1997. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect.Immun.* **65**:5309-5319.
103. **Leimeister-Wachter, M. and T. Chakraborty.** 1989. Detection of listeriolysin, the thiol-dependent hemolysin in *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri*. *Infect.Immun.* **57**:2350-2357.
104. **Leimeister-Wachter, M., C. Haffner, Domann E, W. Goebel, and T. Chakraborty.** 1990. Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**:8336-8340.
105. **Lepay, D. A., R. M. Steinman, C. F. Nathan, H. W. Murray, and Z. A. Cohn.** 1985. Liver macrophages in murine listeriosis. Cell-mediated immunity is correlated with an influx of macrophages capable of generating reactive oxygen intermediates. *J.Exp.Med.* **161**:1503-1512.
106. **Lingnau, A., Domann E, M. Hudel, M. Bock, T. Nichterlein, J. Wehland, and T. Chakraborty.** 1995. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *inlA* and *inlB* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect.Immun.* **63**:3896-3903.
107. **Liu S, J. E. Graham, L. Bigelow, P. D. Morse, and B. J. Wilkinson.** 2002. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**:1697-1705.
108. **Los, D. A. and N. Murata.** 1998. Structure and expression of fatty acid desaturases. *Biochim.Biophys.Acta.* **1394**:3-15.
109. **Los, D. A. and N. Murata.** 1999. Responses to cold shock in cyanobacteria. *J.Mol.Microbiol.Biotechnol.* **1**:221-230.
110. **Losi, A., E. Ternelli, and W. Gartner.** 2004. Tryptophan fluorescence in the *Bacillus subtilis* phototropin-related protein YtvA as a marker of interdomain interaction. *Photochem.Photobiol.* **80**:150-3.:150-153.

LITERATUR

111. **Ludwig, H., G. Homuth, M. Schmalisch, F. M. Dyka, M. Hecker, and J. Stulke.** 2001. Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: evidence for the presence of multiple levels of control of the *gapA* operon. *Mol.Microbiol.* **41**:409-422.
112. **Lundrigan, M. D. and C. F. Earhart.** 1984. Gene *envY* of *Escherichia coli* K-12 affects thermoregulation of major porin expression. *J.Bacteriol.* **157**:262-268.
113. **Mackow, E. R. and F. N. Chang .** 1983. Correlation between RNA synthesis and ppGpp content in *Escherichia coli* during temperature shifts. *Mol.Gen.Genet.* **192**:5-9.
114. **Makhatadze, G. I. and M. A. Marahiel.** 1994. Effect of pH and phosphate ions on self-association properties of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. *Protein Sci.* **3**:2144-2147.
115. **Malinovskii, N. N., N. P. Agafonov, E. A. Reshetnikov, and V. P. Bashilov.** 2000. [Treatment of acute destructive alimentary pancreatitis]. *Khirurgiia (Mosk).* 4-7.
116. **Marr, A. G. and J. L. Ingraham.** 1962. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **84**:1260-1267.
117. **Marrakchi, H., W. E. Dewolf, Jr., C. Quinn, J. West, B. J. Polizzi, C. Y. So, D. J. Holmes, S. L. Reed, R. J. Heath, D. J. Payne, C. O. Rock, and N. G. Wallis.** 2003. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* enoyl-(acyl-carrier protein) reductase (FabK). *Biochem.J.* **370**:1055-1062.
118. **Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee, C. Shapiro, P. M. Griffin, and R. V. Tauxe.** 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg.Infect.Dis.* **5**:607-625.
119. **Mendum, M. L. and L. T. Smith .** 2002. Characterization of glycine betaine porter I from *Listeria monocytogenes* and its roles in salt and chill tolerance. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**:813-819.
120. **Mengaud, J., H. Ohayon, P. Gounon, R.-M. Mege, and P. Cossart.** 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell.* **84**:923-932.
121. **Milohanic E, P. Glaser, J. Y. Coppee, L. Frangeul, Y. Vega, J. A. Vazquez-Boland, F. Kunst, P. Cossart, and C. Buchrieser.** 2003. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol.Microbiol.* **47**:1613-1625.
122. **Mishra, M. and R. Deora.** 2005. Mode of action of the *Bordetella* BvgA protein: transcriptional activation and repression of the *Bordetella bronchiseptica* *bipA* promoter. *J.Bacteriol.* **187**:6290-6299.
123. **Mishra, M., G. Parise, K. D. Jackson, D. J. Wozniak, and R. Deora.** 2005. The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J.Bacteriol.* **187**:1474-1484.

LITERATUR

124. **Mohamed, W., A. Darji, Domann E, Chiancone E, and T. hakraborty.** 2006. The ferritin-like protein Frm is a target for the humoral immune response to *Listeria monocytogenes* and is required for efficient bacterial survival. *Mol.Genet.Genomics.* **275**:344-353.
125. **Moll, I., Grill S, A. Grundling, and U. Blasi.** 2002. Effects of ribosomal proteins S1, S2 and the DeaD/CsdA DEAD-box helicase on translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **44**:1387-1396.
126. **Moorhead, S. M. and G. A. Dykes.** 2004. Influence of the *sigB* gene on the cold stress survival and subsequent recovery of two *Listeria monocytogenes* serotypes. *Int.J.Food Microbiol.* **91**:63-72.
127. **Movahedi S and W. Waites.** 2002. Cold shock response in sporulating *Bacillus subtilis* and its effect on spore heat resistance. *J.Bacteriol.* **184**:5275-5281.
128. **Nair, S., I. Derre, T. Msadek, O. Gaillot, and P. Berche.** 2000. CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol.Microbiol.* **35**:800-811.
129. **Nelson, K. E., D. E. Fouts, E. F. Mongodin, J. Ravel, R. T. DeBoy, J. F. Kolonay, D. A. Rasko, S. V. Angiuoli, S. R. Gill, I. T. Paulsen, J. Peterson, O. White, W. C. Nelson, W. Nierman, M. J. Beanan, L. M. Brinkac, S. C. Daugherty, R. J. Dodson, A. S. Durkin, R. Madupu, D. H. Haft, J. Selengut, Van Aken S, H. Khouri, N. Fedorova, H. Forberger, B. Tran, Kathariou S, L. D. Wonderling, G. A. Uhlich, D. O. Bayles, J. B. Luchansky, and C. M. Fraser.** 2004. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res.* **32** :2386-2395.
130. **Novick, R. P., S. J. Projan, J. Kornblum, H. F. Ross, G. Ji, B. Kreiswirth, F. Vandenesh, and Moghazeh S.** 1995. The *agr* P2 operon: an autocatalytic sensory transduction system in *Staphylococcus aureus*. *Mol.Gen.Genet.* **248**:446-458.
131. **O'Connell, K. P., A. M. Gustafson, M. D. Lehmann, and M. F. Thomashow.** 2000. Identification of cold shock gene loci in *Sinorhizobium meliloti* by using a *luxAB* reporter transposon. *Appl.Environ.Microbiol.* **66**:401-405.
132. **Oke, V., B. G. Rushing, E. J. Fisher, M. Moghadam-Tabrizi, and S. R. Long.** 2001. Identification of the heat-shock sigma factor RpoH and a second RpoH-like protein in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology.* **147**:2399-2408.
133. **Olsen, K. N., M. H. Larsen, C. G. Gahan, B. Kallipolitis, X. A. Wolf, R. Rea, C. Hill, and H. Ingmer.** 2005. The Dps-like protein Fri of *Listeria monocytogenes* promotes stress tolerance and intracellular multiplication in macrophage-like cells. *Microbiology.* **151**:925-933.

LITERATUR

134. **Ozcan, N., R. Kramer, and Morbach S.** 2005. Chill activation of compatible solute transporters in *Corynebacterium glutamicum* at the level of transport activity. *J.Bacteriol.* **187**:4752-4759.
135. **Pages, V., N. Koffel-Schwartz, and R. P. Fuchs.** 2003. *recX*, a new SOS gene that is co-transcribed with the *recA* gene in *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst).* **2**:273-284.
136. **Pfennig, P. L. and A. M. Flower.** 2001. BipA is required for growth of *Escherichia coli* K12 at low temperature. *Mol.Genet.Genomics.* **266**:313-317.
137. **Phadtare, S. and M. Inouye.** 2004. Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-csp-deletion strains of *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **186**:7007-7014.
138. **Phan-Thanh, L. and T. Gormon.** 1995. Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis.* **16**:444-450.
139. **Pizarro-Cerda, J., Sousa S, and P. Cossart.** 2004. Exploitation of host cell cytoskeleton and signalling during *Listeria monocytogenes* entry into mammalian cells. *C.R.Biol.* **327**:523-531.
140. **Polidoro, M., D. De Biase, B. Montagnini, L. Guarrera, Cavallo S, P. Valenti, Stefanini S, and Chiancone E.** 2002. The expression of the dodecameric ferritin in *Listeria spp.* is induced by iron limitation and stationary growth phase. *Gene.* **296**:121-128.
141. **Pron, B., C. Boumaila, F. Jaubert, Sarnacki S, J. P. Monnet, P. Berche, and J. L. Gaillard.** 1998. Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infect.Immun.* **66**:747-755.
142. **Puttmann, M., N. Ade, and H. Hof.** 1993. Dependence of fatty acid composition of *Listeria spp.* on growth temperature. *Res.Microbiol.* **144**:279-283.
143. **Raynaud S, R. Perrin, M. Coccagn-Bousquet, and P. Loubiere.** 2005. Metabolic and transcriptomic adaptation of *Lactococcus lactis subsp. lactis* Biovar *diacetylactis* in response to autoacidification and temperature downshift in skim milk. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**:8016-8023.
144. **Raynaud, C. and A. Charbit.** 2005. Regulation of expression of type I signal peptidases in *Listeria monocytogenes*. *Microbiology.* **151**:3769-3776.
145. **Reay, D. S., D. B. Nedwell, J. Priddle, and J. C. Ellis-Evans.** 1999. Temperature dependence of inorganic nitrogen uptake: reduced affinity for nitrate at suboptimal temperatures in both algae and bacteria. *Appl.Environ.Microbiol.* **65**:2577-2584.
146. **Rocourt, J. and H. P. Seeliger.** 1985. Distribution of species of the genus *Listeria*. *Zentralbl.Bakteriol.Mikrobiol.Hyg.[A]*. **259**:317-330.

LITERATUR

147. **Rogers, H. W. and E. R. Unanue.** 1993. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect.Immun.* **61**:5090-5096.
148. **Saxild, H. H., L. N. Andersen, and K. Hammer.** 1996. *Dra-nupC-pdp* operon of *Bacillus subtilis*: nucleotide sequence, induction by deoxyribonucleosides, and transcriptional regulation by the *deoR*-encoded DeoR repressor protein. *J.Bacteriol.* **178**:424-434.
149. **Schindelin, H., M. A. Marahiel, and U. Heinemann.** 1993. Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature.* **364** :164-168.
150. **Schindelin, H., W. Jiang, M. Inouye, and U. Heinemann.** 1994. Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**:5119-5123.
151. **Schindler, T., P. L. Graumann, D. Perl, Ma S, F. X. Schmid, and M. A. Marahiel.** 1999. The family of cold shock proteins of *Bacillus subtilis*. Stability and dynamics in vitro and in vivo. *J.Biol.Chem.* **274**:3407-3413.
152. **Schreier, H. J., S. W. Brown, K. D. Hirschi, J. F. Nomellini, and A. L. Sonenshein.** 1989. Regulation of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase gene expression by the product of the *glnR* gene. *J.Mol.Biol.* **210**:51-63.
153. **Schroder, K., P. Graumann, A. Schnuchel, T. A. Holak, and M. A. Marahiel.** 1995. Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. *Mol.Microbiol.* **16**:699-708.
154. **Schuchat, A., B. Swaminathan, and C. V. Broome.** 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin.Microbiol.Rev.* **4**:169-183.
155. **Seeliger, H. P. and P. Emmerling.** 1970. Epidemiology, clinical aspects and therapy of listeriosis. *Med.Klin.* **65**:279-283.
156. **Sleator, R. D., J. M. Wood, and C. Hill.** 2003. Transcriptional regulation and posttranslational activity of the betaine transporter BetL in *Listeria monocytogenes* are controlled by environmental salinity. *J.Bacteriol.* **185**:7140-7144.
157. **Smith, J. P., D. P. Daifas, W. El Khoury, J. Koukoutsis, and A. El Khoury.** 2004. Shelf life and safety concerns of bakery products-a review. *Crit Rev.Food Sci.Nutr.* **44**:19-55.
158. **Smith, L. T.** 1996. Role of osmolytes in adaptation of osmotically stressed and chill-stressed *Listeria monocytogenes* grown in liquid media and on processed meat surfaces. *Appl.Environ.Microbiol.* **62**:3088-3093.

LITERATUR

159. **Sola-Penna, M., A. Ferreira-Pereira, A. P. Lemos, and J. R. Meyer-Fernandes.** 1997. Carbohydrate protection of enzyme structure and function against guanidinium chloride treatment depends on the nature of carbohydrate and enzyme. *Eur.J.Biochem.* **248**:24-29.
160. **Sorensen, K. I. and B. Hove-Jensen.** 1996. Ribose catabolism of *Escherichia coli*: characterization of the *rpiB* gene encoding ribose phosphate isomerase B and of the *rpiR* gene, which is involved in regulation of *rpiB* expression. *J.Bacteriol.* **178**:1003-1011.
161. **Stoldt, M., J. Wohnert, O. Ohlenschlager, M. Gorlach, and L. R. Brown.** 1999. The NMR structure of the 5S rRNA E-domain-protein L25 complex shows preformed and induced recognition. *EMBO J.* **18**:6508-6521.
162. **Sue, D., D. Fink, M. Wiedmann, and K. J. Boor.** 2004. sigmaB-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. *Microbiology.* **150**:3843-3855.
163. **Suutari, M. and Laakso S.** 1994. Microbial fatty acids and thermal adaptation. *Crit Rev.Microbiol.* **20**:285-328.
164. **Suzuki, I., D. A. Los, Y. Kanesaki, K. Mikami, and N. Murata.** 2000. The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *EMBO J.* **19**:1327-1334.
165. **Suzuki, N., N. Takaya, T. Hoshino, and A. Nakamura.** 2007. Enhancement of a sigma(B)-dependent stress response in *Bacillus subtilis* by light via YtvA photoreceptor. *J.Gen.Appl.Microbiol.* **53**:81-88.
166. **Tasaka, Y., Z. Gombos, Y. Nishiyama, P. Mohanty, T. Ohba, K. Ohki, and N. Murata.** 1996. Targeted mutagenesis of acyl-lipid desaturases in *Synechocystis*: evidence for the important roles of polyunsaturated membrane lipids in growth, respiration and photosynthesis. *EMBO J.* **15**:6416-6425.
167. **Tasara, T. and R. Stephan.** 2006. Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: A review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications. *J.Food Prot.* **69**:1473-1484.
168. **Thevenot, D., A. Dernburg, and C. Vernozy-Rozand.** 2006. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *J.Appl.Microbiol.* **101**:7-17.
169. **Toone, W. M., K. E. Rudd, and J. D. Friesen.** 1991. *deaD*, a new *Escherichia coli* gene encoding a presumed ATP-dependent RNA helicase, can suppress a mutation in *rpsB*, the gene encoding ribosomal protein S2. *J.Bacteriol.* **173**:3291-3302.
170. **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.

LITERATUR

171. **Vazquez-Boland, J. A., G. Dominguez-Bernal, B. Gonzalez-Zorn, J. Kreft, and W. Goebel.** 2001. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes.Infect.* **3**:571-584.
172. **Voelker, U., A. Voelker, B. Maul, M. Hecker, A. Dufour, and W. G. Haldenwang.** 1995. Separate mechanisms activate sigma B of *Bacillus subtilis* in response to environmental and metabolic stresses. *J.Bacteriol.* **177**:3771-3780.
173. **Vorachek-Warren, M. K., Ramirez S, R. J. Cotter, and C. R. Raetz.** 2002. A triple mutant of *Escherichia coli* lacking secondary acyl chains on lipid A. *J.Biol.Chem.* **19**;277:14194-14205.
174. **Way, S. S., L. J. Thompson, J. E. Lopes, A. M. Hajjar, T. R. Kollmann, N. E. Freitag, and C. B. Wilson.** 2004. Characterization of flagellin expression and its role in *Listeria monocytogenes* infection and immunity. *Cell Microbiol.* **6**:235-242.
175. **Weber, M. H., C. L. Beckering, and M. A. Marahiel.** 2001. Complementation of cold shock proteins by translation initiation factor IF1 in vivo. *J.Bacteriol.* **183**:7381-7386.
176. **Weber, M. H., A. V. Volkov, I. Fricke, M. A. Marahiel, and P. L. Graumann.** 2001. Localization of cold shock proteins to cytosolic spaces surrounding nucleoids in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. *J.Bacteriol.* **183**:6435-6443.
177. **Weber, M. H., W. Klein, L. Muller, U. M. Niess, and M. A. Marahiel.** 2001. Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Mol.Microbiol.* **39**:1321-1329.
178. **Weber, M. H. and M. A. Marahiel.** 2002. Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* **357**:895-907.
179. **Weber, M. H. and M. A. Marahiel.** 2003. Bacterial cold shock responses. *Sci.Prog.* **86**:9-75.
180. **Weiner, L., J. L. Brissette, and P. Model.** 1991. Stress-induced expression of the *Escherichia coli* phage shock protein operon is dependent on sigma 54 and modulated by positive and negative feedback mechanisms. *Genes Dev.* **5**:1912-1923.
181. **Wemekamp-Kamphuis, H. H., J. A. Wouters, R. D. Sleator, C. G. Gahan, C. Hill, and T. Abee.** 2002. Multiple deletions of the osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**:4710-4716.
182. **Wemekamp-Kamphuis, H. H., A. K. Karatzas, J. A. Wouters, and T. Abee.** 2002. Enhanced levels of cold shock proteins in *Listeria monocytogenes* LO28 upon exposure to low temperature and high hydrostatic pressure. *Appl.Environ.Microbiol.* **68**:456-463.

LITERATUR

183. **Wemekamp-Kamphuis, H. H., J. A. Wouters, P. P. de Leeuw, T. Hain, T. Chakraborty, and T. Abee.** 2004. Identification of sigma factor sigma B-controlled genes and their impact on acid stress, high hydrostatic pressure, and freeze survival in *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl.Environ.Microbiol.* **70**:3457-3466.
184. **Wemekamp-Kamphuis, H. H., R. D. Sleator, J. A. Wouters, C. Hill, and T. Abee.** 2004. Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl.Environ.Microbiol.* **70**:2912-2918.
185. **Wilkinson, S. P. and A. Grove .** 2006. Ligand-responsive transcriptional regulation by members of the MarR family of winged helix proteins. *Curr.Issues Mol.Biol.* **8**:51-62.
186. **Wouters, J. A., T. Hain, A. Darji, Hufner E, H. Wemekamp-Kamphuis, T. Chakraborty, and T. Abee.** 2005. Identification and characterization of Di- and tripeptide transporter DtpT of *Listeria monocytogenes* EGD-e. *Appl.Environ.Microbiol.* **71**:5771-5778.
187. **Xia, B., H. Ke, and M. Inouye .** 2001. Acquisition of cold sensitivity by quadruple deletion of the *cspA* family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*. *Mol.Microbiol.* **40**:179-188.
188. **Xia, B., H. Ke, U. Shinde, and M. Inouye.** 2003. The role of RbfA in 16S rRNA processing and cell growth at low temperature in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* **N19;332**:575-584.
189. **Yamanaka, K., L. Fang, and M. Inouye.** 1998. The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Mol.Microbiol.* **27**:247-255.
190. **Yamanaka, K., M. Inouye, and Inouye S.** 1999. Identification and characterization of five *cspA* homologous genes from *Myxococcus xanthus*. *Biochim.Biophys.Acta.* **1447**:357-365.
191. **Yamanaka, K. and M. Inouye.** 2001. Selective mRNA degradation by polynucleotide phosphorylase in cold shock adaptation in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **183**:2808-2816.
192. **Zheng, G., L. Z. Yan, J. C. Vederas, and P. Zuber.** 1999. Genes of the *sbo-alb* locus of *Bacillus subtilis* are required for production of the antilisterial bacteriocin subtilisin. *J.Bacteriol.* **181**:7346-7355.

Danksagung

Im Folgenden möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die zum Entstehen und Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen habe. Mein Dank gilt:

...Prof. Dr. Chakraborty für die Bereitstellung des Themas, die Ermöglichung der Promotion und die fachlichen Unterstützung.

...Prof. Dr. Baniahmad für die Bereitschaft zur Hauptberichterstattung im naturwissenschaftlichen Fachbereich.

...Dr. Torsten Hain für die Betreuung dieser Arbeit sowie die Motivation, die vielen wertvollen Ideen und die anregenden Diskussionen.

...Dr. Hamid Hossain für die statistische Analyse der Microarray-Daten.

...dem Graduiertenkolleg “Biochemie der Nukleoproteinkomplexen” und dem Prof. Dr. Pingoud für die Großteil der Finanzierung meiner Stelle und die Möglichkeit, meine Arbeit in dem Graduiertenseminar vorzustellen.

...Nelli Schklarenko und Claudia Zörb für jegliche Unterstützung im Bereich der DNA- Sequenzierung, Dr. Schummer, Carsten Künne und Andrey Billion für die Hilfe mit der elektronischen Datenanalyse.

...der gesamten Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft, Unterstützung und Erfahrungsaustausch, insbesondere Silke Machata, Alexandra Amend, Christiane Steinweg, Nelli und Juri Schklarenko.

...meinen Eltern für die Unterstützung und Ermöglichung der Promotion in Deutschland.

7 ANHANG

Tabelle I. Hochregulierte Gene nach dem Kälteschock
(fdr <1 %, Faktor > 2)

Gene ID	1h	2h	4h	Gene Names	Ncbi Description	Internal Description
Stressantwort						
<i>lmo1364</i>	12.1	14.1	8.2	<i>cspL</i> ;	CspA protein; similar to cold shock protein; major cold-shock protein	
<i>lmo2191</i>	-	-	2.7	<i>spxA</i>	unknown; similar to unknown proteins	Arsenate reductase family protein
Transport						
Osmolyten-transport						
<i>lmo1014</i>	5.8	-	-	<i>gbuA</i>	highly similar to glycine betaine ABC transporter: ATP-binding protein	Transporter
<i>lmo1015</i>	7.1	-	-	<i>gbuB</i>	highly similar to glycine betaine ABC transporters: permease	Glycine betaine transport system permease protein
<i>lmo1016</i>	7.2	2.8	-	<i>gbuC</i>	highly similar to glycine betaine ABC transporters: glycine betaine-binding protein	GLYCINE BETAINES/L-PROLINE-BINDING PROTEIN PROX
Andere Transporter						
<i>lmo1624</i>	8.9	4.4	3.2		similar to putative transporters	Export protein for polysaccharides and teichoic acids
<i>lmo0593</i>	5.4	-	-		similar to transport proteins: formate?	Nitrite transporter
<i>lmo1300</i>	2.9	-	-		similar to arsenic efflux pump protein	Arsenical pump membrane protein
<i>lmo1447</i>	2.5	-	-	<i>zurA</i>	metal: zinc transport protein:ABC transporter, ATP-binding protein	High-affinity zinc uptake system ATP-binding protein znuC

Gene ID	1h	2h	4h	Gene Names	Ncbi Description	Internal Description
<i>lmo1719</i>	2.7	5.7	5.4		similar to phosphotransferase system: PTS lichenan-specific enzyme IIA component	PTS system, cellobiose-specific IIA component (EC 2.7.1.69)
<i>lmo1724</i>	3.6	-	-		similar to ABC transporter, ATP-binding protein	ABC transporter ATP-binding protein
<i>lmo1738</i>	-	6.4	-		similar to amino acid ABC transporter: binding protein	Histidine-binding protein
<i>lmo1740</i>	4.1	31.9	-		similar to amino acid: glutamine ABC transporter, permease protein	Histidine transport system permease protein hisM
<i>lmo2062</i>	2.5	-	-		similar to copper export proteins	Copper resistance protein
<i>lmo2114</i>	2.5	-	-		similar to ABC transporter: ATP-binding protein	ABC transporter ATP-binding protein
<i>lmo2196</i>	-	-	2.4	<i>oppA</i>	similar to pheromone ABC transporter: binding protein	Oligopeptide-binding protein oppA
Transkription						
<i>lmo1322</i>	2.3	-	-	<i>nusA</i>	highly similar to N utilization substance protein A; NusA protein	N utilization substance protein A
<i>lmo1359</i>	2.5	-	-	<i>nusB</i>	similar to transcription termination protein: NusB	N utilization substance protein B
<i>lmo0246</i>	2.5	-	-	<i>nusG</i>	transcription antitermination factor	Transcription antitermination protein nusG
Translation und ribosomale Prozesse						
<i>lmo1067</i>	11.1	5.4	-		similar to GTP-binding elongation factor	GTP-binding protein TypA/BipA
<i>lmo1272</i>	3.2	-	-		conserved hypothetical protein similar to B. subtilis YlqF protein	GTP-binding protein
<i>lmo1294</i>	2.8	-	-	<i>miaA</i>	similar to tRNA isopentenylpyrophosphate transferase	tRNA delta(2)-isopentenylpyrophosphate transferase (EC 2.5.1.8)
<i>lmo1324</i>	3.0	-	-		conserved hypothetical protein, similar to B. subtilis YlxQ protein	LSU ribosomal protein L7AE
<i>lmo1325</i>	3.4	-	-	<i>infB</i>	highly similar to translation initiation factor IF-2	Bacterial Protein Translation Initiation Factor 2 (IF-2)

Gene ID	1h	2h	4h	Gene Names	Ncbi Description	Internal Description
<i>lmo1327</i>	4.1	-	-	<i>rbfA</i>	highly similar to ribosome-binding factor A	Ribosome-binding factor A
<i>lmo1328</i>	5.6	-	-	<i>truB</i>	highly similar to tRNA pseudouridine synthase	tRNA pseudouridine synthase B (EC 4.2.1.70)
<i>lmo1462</i>	2.1	-	-	<i>era</i>	similar to GTP binding proteins	GTP binding protein
<i>lmo1479</i>	2.4	-	-	<i>lepA</i>	highly similar to GTP-binding protein LepA; LepA-like GTP-binding protein	GTP-binding protein lepA
<i>lmo1537</i>	8.4	3.9	-		conserved GTP binding protein	GTP-binding protein
<i>lmo1558</i>	2.8	-	-	<i>engB</i>	similar to hypothetical GTP binding protein	GTP-binding protein
<i>lmo1937</i>	3.1	-	-	<i>engA</i>	similar to unknown protein	GTP-binding protein
<i>lmo1949</i>	3.8	-	-		similar to unknown proteins	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase B (EC 4.2.1.70)
<i>lmo2076</i>	3.2	-	-		similar to ribosomal protein alanine acetyltransferase	Ribosomal-protein-alanine acetyltransferase (EC 2.3.1.128)
<i>lmo2244</i>	6.5	-	-		similar to putative ribosomal large subunit pseudouridine synthase	Ribosomal large subunit pseudouridine synthase D (EC 4.2.1.70)
<i>lmo2614</i>	3.2	-	-	<i>rpmD</i>	ribosomal protein L30	
<i>lmo2615</i>	2.5	-	-	<i>rpsE</i>	ribosomal protein S5	SSU ribosomal protein S5P
<i>lmo2616</i>	2.3	-	-	<i>rplR</i>	ribosomal protein L18	LSU ribosomal protein L18P
<i>lmo2617</i>	2.7	-	-	<i>rplF</i>	ribosomal protein L6	LSU ribosomal protein L6P
<i>lmo2618</i>	2.7	-	-	<i>rpsH</i>	ribosomal protein S8	SSU ribosomal protein S8P
<i>lmo2620</i>	2.6	-	-	<i>rplE</i>	ribosomal protein L5	LSU ribosomal protein L5P
<i>lmo2622</i>	2.2	-	-	<i>rplN</i>	ribosomal protein L14	LSU ribosomal protein L14P
<i>lmo2630</i>	2.7	-	-	<i>rplW</i>	ribosomal protein L23	LSU ribosomal protein L23P
<i>lmo2779</i>	3.9	-	-		similar to probable GTP-binding protein	GTP-binding protein

LITERATUR

Gene ID	1h	2h	4h	Gene Names	Ncbi Description	Internal Description
Regulatoren						
<i>lmo0252</i>	5.6	-	-		similar to repressor: penicillinase repressor	Transcriptional repressor
<i>lmo0266</i>	3.9	-	-		similar to transcriptional regulators	Transcriptional regulator, MarR family
<i>lmo0430</i>	4.2	-	-		similar to transcriptional regulator: LysR family	Transcriptional regulators, LysR family
<i>lmo0443</i>	3.3	-	-		similar to B. subtilis transcription regulator LytR	Transcriptional regulator, LytR family
<i>lmo0522</i>	6.6	-	-		similar to transcription regulator	
<i>lmo0799</i>	2.4	-	-		lmo0799	Sensory Transduction Protein Kinase (EC 2.7.3.-)
<i>lmo0989</i>	2.6	-	-		similar to regulatory proteins: MarR family	Transcriptional regulator, MarR family
<i>lmo1026</i>	2.8	-	-		similar to B. subtilis LytR protein	Transcriptional regulator, LytR family
<i>lmo1298</i>	15.3	-	-	<i>glnR</i>	similar to glutamine synthetase repressor	
<i>lmo1445</i>	4.9	-	-	<i>zurR</i> , <i>lin1483</i>	transcriptional regulator ZurR: ferric uptake regulation	
<i>lmo1693</i>	3.5	-	-	<i>recX</i>	similar to hypothetical proteins	Regulatory protein recX
<i>lmo1878</i>	-	-	2.1	<i>mntR</i>	similar o transcriptional regulators	MANGANESE TRANSPORT TRANSCRIPTIONAL REGULATOR
<i>lmo2021</i>	9.9	2.6	2.1		similar to unknown protein	hypothetical transcriptional regulator
<i>lmo2128</i>	3.8	-	-		similar to transcription regulator, LacI family	Transcriptional repressor
<i>lmo2165</i>	4.1	-	-		similar to transcription regulator CRP/FNR family	LapA
<i>lmo2408</i>	2.9	-	-		similar to repressor protein	TRANSCRIPTIONAL REGULATOR, PBSX FAMILY
<i>lmo2460</i>	2.7	2.6	-		similar to B. subtilis CggR hypothetical transcriptional regulator	Central glycolytic genes regulator
Zwei-Komponenten-Systeme						
<i>lmo0048</i>	2.5	-	-		similar to Staphylococcus two-component sensor histidine kinase AgrB	Accessory gene regulator protein B AGRB

Gene ID	1h	2h	4h	Gene Names	Ncbi Description	Internal Description
<i>lmo1022</i>	2.6	4.1	-		similar to two-component response regulator, in particular <i>B. subtilis</i> YvqC protein	Two-component response regulator yvqC
<i>lmo1507</i>	3.8	-	-		similar to two-component response regulators	Two-component response regulator yclJ
<i>lmo1508</i>	-	-	2.2		similar to two-component sensor histidine kinase	Phosphate regulon sensor protein phoR (EC 2.7.3.-)
<i>lmo1741</i>	3.4	-	-		similar to two-component sensor histidine kinase	Two-component sensor histidine kinase (EC 2.7.-.-)
Signalpeptidasen						
<i>lmo1269</i>	2.5	2.5	2.2		similar to type-I signal peptidase	Signal peptidase I (EC 3.4.21.89)
<i>lmo1270</i>	3.3	3.4	2.4		similar to signal peptidase I	Signal peptidase I (EC 3.4.21.89)
<i>lmo1271</i>	2.8	-	-		similar to signal peptidase I	Signal peptidase I (EC 3.4.21.89)
Zellteilung						
<i>lmo1544</i>	2.4	-	-	<i>minD</i>	highly similar to cell division inhibitor: septum placement protein MinD	Cell division inhibitor MinD
<i>lmo1545</i>	2.6	-	-	<i>minC</i>	similar to cell-division inhibition: septum placement protein MinC	Cell division inhibitor MinC
<i>lmo1546</i>	3.2	-	-	<i>mreD</i>	similar to cell-shape determining protein MreD	Rod shape-determining protein mreD
<i>lmo1547</i>	2.6	-	-	<i>mreC</i>	similar to cell-shape determining protein MreC	Rod shape-determining protein mreC
<i>lmo1548</i>	2.9	2.3	-	<i>mreB</i>	similar to cell-shape determining protein MreB	Rod shape-determining protein mreB
<i>lmo1594</i>	3.1	2.7	-	<i>ezrA</i>	similar to <i>B. subtilis</i> negative regulator of FtsZ ring formation: EzrA	Septation ring formation regulator
<i>lmo2427</i>	2.5	-	-		similar to cell division proteins RodA, FtsW	Cell division protein ftsW
<i>lmo2482</i>	2.8	-	-	<i>lgt</i>	highly similar to prolipoprotein	Prolipoprotein diacylglyceryl transferase (EC

Gene ID	1h	2h	4h	Gene Names	Nebi Description	Internal Description
<i>lmo1090</i>	2.9	-	-		diacylglyceryl transferase similar to glycosyltransferases	2.4.99.-) Glycosyltransferase involved in cell wall biogenesis (EC 2.4.-.-)
Zellwandassoziert						
<i>lmo0519</i>	4.8	-	-	<i>lmrB</i>	similar to multidrug resistance protein	Lincomycin resistance protein
<i>lmo0721</i>	2.3	-	-		putative fibronectin-binding protein	Fibronectin-binding protein
<i>lmo1653</i>	3.3	-	-		putative cell surface protein	
<i>lmo1829</i>	3.3	-	-		similar to fibronectin binding proteins	Fibronectin-binding protein / Fibrinogen-binding protein
<i>lmo0540</i>	4.9	5.6	-		similar to penicillin-binding protein	Penicillin-binding protein
<i>lmo2504</i>	4.4	-	-		similar to cell wall binding proteins	Cell wall endopeptidase, family M23/M37
<i>lmo1638</i>	2.8	-	-		similar to unknown proteins	Muramoyltetrapeptide carboxypeptidase
Kohlwasserstoffe-Metabolismus						
<i>lmo2720</i>	5.3	-	-		similar to acetate-CoA ligase	Acetyl-coenzyme A synthetase (EC 6.2.1.1)
<i>lmo2712</i>	-	-	2.6		highly similar to gluconate kinase	Gluconokinase (EC 2.7.1.12)
<i>lmo2721</i>	3.2	-	-		similar to glucosamine-6-phosphate isomerase	Glucosamine-6-phosphate isomerase (EC 3.5.99.6)
<i>lmo2481</i>	2.9	-	-	<i>ppaX</i>	similar to B. subtilis P-Ser-HPPr phosphatase	Phosphoglycolate phosphatase (EC 3.1.3.18)
Aminosäuren-Metabolismus						
<i>lmo0570</i>	2.7	-	-	<i>hisJ</i>	similar histidinol phosphate phosphatase	Histidinol-phosphatase (EC 3.1.3.15)
<i>lmo0906</i>	8.1	-	-		similar to glutathione Reductase	Glutathione reductase (EC 1.6.4.2)
<i>lmo1299</i>	5.0	4.5	-	<i>glnA</i>	highly similar to glutamine synthetases	Glutamine synthetase (EC 6.3.1.2)
<i>lmo1348</i>	2.6	-	-	<i>gcvT</i>	similar to aminomethyltransferase	Aminomethyltransferase (EC 2.1.2.10)
<i>lmo1536</i>	3.8	-	-		similar to prephenate dehydratase PheA	Prephenate dehydratase (EC 4.2.1.51)
<i>lmo1619</i>	2.6	4.8	5.2	<i>daaA; dat</i>	D-amino acid aminotransferase	D-alanine aminotransferase (EC 2.6.1.21)
<i>lmo1630</i>	2.6	-	-	<i>trpC</i>	highly similar to indol-3-glycerol phosphate synthases	Indole-3-glycerol phosphate synthase (EC 4.1.1.48)

Gene ID	1h	2h	4h	Gene Names	Nebi Description	Internal Description
<i>lmo1680</i>	3.0	-	-		similar to cystathionine gamma-synthase	Cystathionine gamma-synthase (EC 4.2.99.9)
<i>lmo1733</i>	-	9.5	-		similar to glutamate synthase: small subunit	Glutamate synthase [NADPH] small chain (EC 1.4.1.13)
<i>lmo2824</i>	2.6	2.6	2.3		similar to D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)
Nukleinsäuren assoziierte Prozesse						
<i>lmo0866</i>	7.6	-	-		similar to ATP-dependent RNA helicase	ATP-dependent RNA helicase
<i>lmo1228</i>	4.3	-	-	<i>rnhC</i>	similar to B. subtilis ribonuclease HIII	Ribonuclease HIII (EC 3.1.26.4)
<i>lmo1246</i>	9.9	8.1	3.4		similar to ATP-dependent RNA helicase: DEAD motif	ATP-dependent RNA helicase
<i>lmo1273</i>	2.8	-	-	<i>rnhB</i>	similar to ribonuclease H rnh	Ribonuclease HIII (EC 3.1.26.4)
<i>lmo1275</i>	-	-	2.3	<i>topA</i>	highly similar to DNA topoisomerase I TopA	DNA topoisomerase I (EC 5.99.1.2)
<i>lmo1449</i>	8.5	2.7	2.3	<i>nfo</i>	similar to endonuclease IV	Endonuclease IV (EC 3.1.21.2)
<i>lmo1450</i>	4.1	-	2.1		similar to ATP-dependent RNA helicase, DEAD-box family: deaD	ATP-dependent RNA helicase
<i>lmo1460</i>	2.9	-	-	<i>recO</i>	similar to B. subtilis RecO protein involved in DNA repair and homologous recombination	DNA repair protein recO
<i>lmo1722</i>	7.8	3.2	2.3		similar to ATP-dependent RNA helicases	ATP-dependent RNA helicase
<i>lmo1895</i>	3.5	-	-	<i>dnaD</i>	similar to chromosome replication initiation protein	DNA replication protein dnaD
<i>lmo2449</i>	2.5	-	-		similar to exoribonuclease RNase-R	Exoribonuclease II (EC 3.1.13.1)
Lipiden-Metabolismus						
<i>lmo0611</i>	3.6	3.1	3.1		similar to acyl-carrier protein phosphodiesterase and NAD:PH dehydrogenase	Acyl carrier protein phosphodiesterase (EC 3.1.4.14)
<i>lmo1089</i>	3.7	-	-	<i>tagD</i>	highly similar to glycerol-3-phosphate cytidylyltransferase: gct, CDP-glycerol	Glycerol-3-phosphate cytidylyltransferase (EC 2.7.7.39)

Gene ID	1h	2h	4h	Gene Names	Nebi Description	Internal Description
					pyrophosphorylase: teichoic acid biosynthesis protein D	
<i>lmo1316</i>	3.3	2.8	-	<i>cdsA</i>	similar to phosphatidate cytidylyltransferase: CDP-diglyceride synthase	Phosphatidate cytidylyltransferase (EC 2.7.7.41)
<i>lmo1371</i>	3.5	-	-		similar to branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E3 subunit	Dihydrolipoamide dehydrogenase (EC 1.8.1.4)
<i>lmo1372</i>	3.0	-	-		similar to branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 subunit: 2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit (EC 1.2.4.4)
<i>lmo1373</i>	3.5	-	-		similar to branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 subunit: 2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit	2-oxoisovalerate dehydrogenase beta subunit (EC 1.2.4.4)
<i>lmo1374</i>	3.5	-	-		similar to branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase E2 subunit: lipoamide acyltransferase	Lipoamide acyltransferase component of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex (EC 2.3.1.-)
<i>lmo1396</i>	3.2	3.0	-		similar to phosphatidylglycerophosphate synthase	CDP-diacylglycerol--glycerol-3-phosphate phosphatidyltransferase (EC 2.7.8.5)
<i>lmo2202</i>	18.0	-	-	<i>fabH</i>	similar to 3-oxoacyl- acyl-carrier protein synthase	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase III (EC 2.3.1.41)
<i>lmo2521</i>	4.0	5.3	3.4		similar to B. subtilis TagA protein involved in polyglycerol phosphate biosynthesis	N-acetylglucosaminylidiphosphoundecaprenol N-acetyl-beta-D-mannosaminyltransferase (EC 2.4.1.187)
Sekundäres Metabolismus						
<i>lmo0042</i>	3.7	-	-		similar to E. coli DedA protein	DedA protein
<i>lmo1369</i>	3.5	-	-		similar to phosphotransbutyrylase	Phosphate butyryltransferase (EC 2.3.1.19)
<i>lmo1488</i>	3.0	-	-	<i>nadD</i>	similar to unknown proteins	Nicotinate-nucleotide adenyllyltransferase (EC 2.7.7.18)
<i>lmo1673</i>	2.3	-	-	<i>menB</i>	similar to dihydroxynaphthoic acid	Naphthoate synthase (EC 4.1.3.36)

LITERATUR

Gene ID	1h	2h	4h	Gene Names	Ncbi Description	Internal Description
<i>lmo1691</i>	2.3	-	-		synthetase similar to deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolases	Deoxyuridine 5-triphosphate nucleotidohydrolase (EC 3.6.1.23)
<i>lmo1705</i>	2.5	-	-		similar to deoxyguanosine kinase/deoxyadenosine kinase:I subunit	Deoxyguanosine kinase (EC 2.7.1.113)
<i>lmo1770</i>	5.3	-	-	<i>purL</i> ; <i>purQ</i>	similar to phosphoribosylformylglycinamide synthetase II to	Phosphoribosylformylglycinamide synthase (EC 6.3.5.3)
<i>lmo2152</i>	2.6	-	-		similar to thioredoxin	THIOL-DISULFIDE ISOMERASE AND THIOREDOXINS
<i>lmo2611</i>	2.1	-	-	<i>adk</i>	highly similar to adenylate kinases	Adenylate kinase (EC 2.7.4.3)
Unbekannt						
<i>lmo0125</i>	6.2	-	-		lmo0125	
<i>lmo0166</i>	2.2	-	-		similar to B. subtilis YzxA protein	Hypothetical Cytosolic Protein
<i>lmo0189</i>	3.4	3.7	-		highly similar to B. subtilis Veg protein	VEG protein
<i>lmo0216</i>	3.8	-	-		highly similar to B. subtilis YabO protein	Heat shock protein 15
<i>lmo0267</i>	2.9	-	-		similar to other proteins	Glyoxalase family protein
<i>lmo0375</i>	-	3.3	-		lmo0375	
<i>lmo0377</i>	-	3.1	-		lmo0377	
<i>lmo0391</i>	3.2	5.2	2.5		lmo0391	
<i>lmo0395</i>	3.6	-	-		weakly similar to blasticidin S-acetyltransferase	Acetyltransferase (EC 2.3.1.-)
<i>lmo0403</i>	3.8	5.6	2.5		lmo0403	
<i>lmo0404</i>	8.2	6.1	4.0		lmo0404	
<i>lmo0449</i>	2.7	4.0	2.0		lmo0449	
<i>lmo0470</i>	4.9	-	-		weakly similar to site-specific DNA-methyltransferase	
<i>lmo0581</i>	2.6	-	-		conserved hypothetical protein	METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.-)
<i>lmo0603</i>	3.2	-	-		lmo0603	
<i>lmo0613</i>	3.4	-	-		similar to oxidoreductase	Quinone oxidoreductase (EC 1.6.5.5)

Gene ID	1h	2h	4h	Gene Names	Nebi Description	Internal Description
<i>lmo0622</i>	6.6	18.8	3.9		hypothetical	
<i>lmo0623</i>	3.0	4.3	2.4		<i>lmo0623</i>	
<i>lmo0624</i>	-	2.6	2.2		similar to unknown proteins	Acetyltransferase (EC 2.3.1.-)
<i>lmo0625</i>	-	3.2	3.2		<i>lmo0625</i>	
<i>lmo0635</i>	4.8	-	-		<i>lmo0635</i>	2-haloalkanoic acid dehalogenase (EC 3.8.1.2)
<i>lmo0664</i>	-	-	2.1		similar to acetyl transferase	Maltose O-acetyltransferase (EC 2.3.1.79)
<i>lmo0778</i>	4.4	-	-		<i>lmo0778</i>	
<i>lmo0823</i>	2.9	3.9	3.2		similar to oxydoreductases	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase (EC 1.1.1.-)
<i>lmo0836</i>	2.3	4.0	3.1	<i>psiE</i>	similar to B. subtilis YrkR protein	Hypothetical Membrane Spanning Protein
<i>lmo0857</i>	2.3	-	-		similar to carboxylesterase	Carboxylesterase (EC 3.1.1.1)
<i>lmo0867</i>	4.1	-	-		<i>lmo0867</i>	Membrane protein
<i>lmo0925</i>	8.0	12.0	-		putative membrane protein	Transporter
<i>lmo0949</i>	5.0	-	-		conserved hypothetical membrane protein	Membrane protein
<i>lmo0976</i>	2.5	7.2	4.5		similar to B. subtilis YjcfF protein	Acetyltransferase (EC 2.3.1.-)
<i>lmo0977</i>	2.3	3.5	2.9		similar to B. subtilis YjchH protein	Acetyl esterase (EC 3.1.1.-)
<i>lmo0992</i>	4.0	-	-		conserved hypothetical protein	TerC-like protein
<i>lmo1001</i>	-	7.1	-		similar to B. subtilis protein YkvS	
<i>lmo1009</i>	3.3	3.3	2.3		similar to B. subtilis YkuL protein	CBS domain containing protein
<i>lmo1027</i>	3.6	-	-		similar to conserved hypothetical proteins: in particular B. subtilis YkqC	Zn-dependent hydrolase (EC 3.-.-.-)
<i>lmo1028</i>	5.1	3.8	-		similar to B. subtilis YkzG protein	Putative transcriptional regulator
<i>lmo1056</i>	2.7	3.4	-		<i>lmo1056</i>	
<i>lmo1247</i>	6.4	4.4	2.6		<i>lmo1247</i>	
<i>lmo1282</i>	2.2	3.3	-		similar to B. subtilis YneQ protein	
<i>lmo1321</i>	3.7	-	-		conserved hypothetical protein, similar to B. subtilis YlxS protein	protein associated with nus operon
<i>lmo1323</i>	2.8	-	-		similar to B. subtilis YlxR protein	Hypothetical Cytosolic Protein
<i>lmo1326</i>	8.1	-	-		conserved hypothetical protein similar to B. subtilis YlxP protein	Hypothetical Cytosolic Protein
<i>lmo1340</i>	-	-	3.1		similar to B. subtilis YqgU protein	YqgU
<i>lmo1430</i>	2.8	-	-		similar to unknown proteins	Hypothetical Cytosolic Protein

Gene ID	1h	2h	4h	Gene Names	Nebi Description	Internal Description
<i>lmo1432</i>	-	-	2.2		lmo1432	
<i>lmo1487</i>	2.9	-	-		similar to unknown proteins	metal dependent phosphohydrolase
<i>lmo1491</i>	2.8	-	-		similar to unknown proteins	GTP-binding protein
<i>lmo1492</i>	3.9	3.8	2.7		similar to unknown proteins	Putative lipase
<i>lmo1501</i>	2.5	-	-		similar to unknown proteins	hypothetical protein
<i>lmo1518</i>	11.2	4.4	-		lmo1518	
<i>lmo1529</i>	2.9	3.8	-		similar to unknown proteins	Protein translocase subunit YajC
<i>lmo1597</i>	4.3	-	-		lmo1597	
<i>lmo1612</i>	2.6	-	-		similar to unknown proteins	
<i>lmo1616</i>	2.5	-	-		similar to unknown proteins	putative choline kinase involved in lipopolysaccharide biosynthesis
<i>lmo1639</i>	4.0	-	-		similar to dna-3-methyladenine glycosidase	DNA-3-methyladenine glycosylase (EC 3.2.2.20)
<i>lmo1648</i>	6.1	6.6	-		lmo1648	
<i>lmo1655</i>	2.3	-	-		similar to unknown proteins	Teicoplanin resistance protein vanZ
<i>lmo1662</i>	2.3	-	-		similar to conserved hypothetical protein	potential RNA adenine demethylase/ATP-dependent RNA helicase
<i>lmo1665</i>	2.8	-	-		lmo1665	
<i>lmo1692</i>	3.3	3.6	-		lmo1692	Hypothetical Cytosolic Protein
<i>lmo1706</i>	2.3	-	-		similar to transport proteins	Ribonuclease BN (EC 3.1.-.-)
<i>lmo1710</i>	3.0	-	-		similar to putative flavodoxin	Flavodoxin
<i>lmo1723</i>	2.1	-	-		lmo1723	
<i>lmo1845</i>	3.2	-	-		similar to conserved hypothetical proteins	Guanine-hypoxanthine permease
<i>lmo1886</i>	2.3	-	-		similar to probable thermostable carboxypeptidases	Thermostable carboxypeptidase 1 (EC 3.4.17.19)
<i>lmo1887</i>	2.6	2.7	-		similar to conserved hypothetical proteins	METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.-)
<i>lmo1890</i>	6.4	3.5	2.7		similar to conserved hypothetical proteins	
<i>lmo2029</i>	4.4	-	-		similar to unknown proteins	Integral membrane protein
<i>lmo2030</i>	3.8	-	-		similar to unknown proteins	Hypothetical Cytosolic Protein
<i>lmo2031</i>	2.6	-	-		similar to unknown proteins	Hypothetical Cytosolic Protein
<i>lmo2070</i>	2.3	-	-		similar to unknown proteins	CAAX amino terminal protease family
<i>lmo2080</i>	3.9	2.9	-		lmo2080	

LITERATUR

Gene ID	1h	2h	4h	Gene Names	Nebi Description	Internal Description
<i>lmo2142</i>	3.6	-	-		lmo2142	
<i>lmo2151</i>	-	2.7	-		similar to unknown proteins	Hypothetical Cytosolic Protein
<i>lmo2177</i>	4.9	-	-		similar to unknown protein	Hypothetical Membrane Spanning Protein
<i>lmo2357</i>	7.5	-	-		similar to unknown protein	
<i>lmo2368</i>	-	-	2.3		lmo2368	
<i>lmo2420</i>	9.1	-	-		lmo2420	
<i>lmo2438</i>	5.3	-	-		lmo2438	
<i>lmo2439</i>	2.2	-	-		lmo2439	hypothetical protein
<i>lmo2450</i>	2.2	-	-		similar to carboxylesterase	Carboxylesterase (EC 3.1.1.1)
<i>lmo2483</i>	2.7	-	-	<i>hprK</i>	HPr-P:Ser kinase/phosphatase	HPR(SER) KINASE (EC 2.7.1.-) / PHOSPHATASE (EC 3.1.3.-)
<i>lmo2517</i>	3.6	-	-		lmo2517	
<i>lmo2527</i>	5.3	4.5	-		similar to B. subtilis YwzB protein	
<i>lmo2573</i>	5.5	11.1	3.0		similar to zinc-binding dehydrogenase	
<i>lmo2823</i>	2.5	-	-		similar to an hypothetical protein from Thermotoga maritima	Hypothetical Cytosolic Protein

LITERATUR

Tabelle II. Runterregulierte Gene nach dem Kälteschock
(fdr < 1%, Faktor > 2)

Gene ID	1h	2h	4h	Gen-Name	Nebi Description	Internal Description
Stress-Antwort						
Allgemeine Stress-Antwort						
<i>lmo0211</i>	13.9	-	-	<i>ctc</i>	similar to <i>B. subtilis</i> general stress protein	LSU ribosomal protein L25P
<i>lmo0895</i>	2.4	-	-	<i>sigB</i>	RNA polymerase sigma-37 factor: sigma-B	RNA polymerase sigma-B factor
<i>lmo0943</i>	4.2	-	-	<i>fri</i> ; <i>flp</i>	non-heme iron-binding ferritin; ferritin-like protein	Non-specific DNA-binding protein Dps / Iron-binding ferritin-like antioxidant protein / Ferroxidase (EC 1.16.3.1)
<i>lmo1879</i>	-	4.2	-	<i>cspD</i>	similar to cold shock protein	Cold shock protein
Class I Hitzeschockgene						
<i>lmo1472</i>	3.0	4.6	4.1	<i>dnaJ</i>	heat shock protein DnaJ	Chaperone protein dnaJ
<i>lmo1473</i>	11.7	16.9	11.0	<i>dnaK</i>	DnaK; class I heat-shock protein: molecular chaperone DnaK	Chaperone protein dnaK
<i>lmo1475</i>	17.8	34.7	19.8	<i>hrcA</i>	transcription repressor of class I heat-shock gene HrcA	Heat-inducible transcription repressor hrcA
<i>lmo2068</i>	27.0	49.7	21.3	<i>groEL</i>	class I heat-shock protein: chaperonin GroEL	60 kDa chaperonin GROEL
<i>lmo2069</i>	47.8	75.8	19.0	<i>groES</i>	GroES; class I heat-shock protein: chaperonin GroES	10 kDa chaperonin GROES
Class III Hitzeschockgene						
<i>lmo2206</i>	11.9	14.6	5.0	<i>clpB</i>	similar to endopeptidase Clp ATP-binding chain B: ClpB	ClpB protein
<i>lmo2468</i>	3.4	-	-	<i>clpP</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (EC 3.4.21.92)
<i>lmo1279</i>	2.2	-	-	<i>clpY</i> ; <i>hslU</i>	highly similar to ATP-dependent	ATP-dependent hsl protease ATP-binding subunit

Gene ID	1h	2h	4h	Gen-Name	Ncbi Description	Internal Description
					Clp protease-like proteins	hslU
Transport						
Peptide-Transport						
<i>lmo0555</i>	3.8	-	-		similar to di-tripeptide transporter	Di-/tripeptide transporter
<i>lmo2196</i>	3.8	-	-	<i>oppA</i>	similar to pheromone ABC transporter: binding protein	Oligopeptide-binding protein oppA
<i>lmo2569</i>	4.0	5.3	3.9		similar to dipeptide ABC transporter: dipeptide-binding protein	Oligopeptide-binding protein oppA
Osmolyten-Transport						
<i>lmo1425</i>	8.1	-	-	<i>opuCD</i>	similar to betaine/carnitine/choline ABC transporter: membrane p	Glycine betaine/L-proline transport system permease protein proW
<i>lmo1426</i>	7.1	-	-	<i>opuCC</i>	similar to glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter: osmoprotectant-binding protein	Glycine betaine-binding protein
<i>lmo2092</i>	3.3	-	-	<i>betL</i>	glycine betaine transporter BetL	Glycine betaine transporter
Aminosäuren-Transport						
<i>lmo0847</i>	2.4	5.4	-		similar to Glutamine ABC transporter: binding and transport protein	Glutamine transport system permease protein glnP
<i>lmo2469</i>	3.1	-	-		similar to amino acid transporter	Amino acid permease
PTS-Systeme						
<i>lmo0096</i>	5.8	15.1	17.9	<i>mptA</i>	similar to PTS system mannose-specific, factor IIAB	PTS system, mannose-specific IIAB component (EC 2.7.1.69)
<i>lmo0097</i>	5.5	15.3	11.2	<i>mptC</i>	similar to PTS system mannose-specific, factor IIC	PTS system, mannose-specific IIC component (EC 2.7.1.69)
<i>lmo0098</i>	3.7	10.1	11.5	<i>mptD</i>	similar to PTS system mannose-specific, factor IID	PTS system, mannose-specific IID component (EC 2.7.1.69)
<i>lmo0781</i>	3.2	-	-		similar to mannose-specific phosphotransferase system: PTS component IID	PTS system, mannose-specific IID component (EC 2.7.1.69)

LITERATUR

Gene ID	1h	2h	4h	Gen-Name	Ncbi Description	Internal Description
<i>lmo0782</i>	3.7	-	-		similar to mannose-specific phosphotransferase system: PTS component IIC	PTS system, mannose-specific IIC component (EC 2.7.1.69)
<i>lmo1255</i>	50.4	31.4	31.3		similar to PTS system trehalose specific enzyme IIBC	PTS system, trehalose-specific IIBC component (EC 2.7.1.69)
<i>lmo2650</i>	3.5	6.1	3.9		similar to hypothetical PTS enzyme IIB component	PTS SYSTEM, IIB COMPONENT (EC 2.7.1.69)
ABC-Transporter						
<i>lmo0136</i>	16.3	97.1	28.5		similar to oligopeptide ABC transporter, permease protein	Oligopeptide transport system permease protein oppB
<i>lmo0137</i>	8.2	30.8	6.8		similar to oligopeptide ABC transporter, permease protein	Oligopeptide transport system permease protein oppC
<i>lmo0608</i>	2.3	-	-		similar to ABC transporter, ATP-binding protein	Multidrug resistance ABC transporter ATP-binding and permease protein
<i>lmo0848</i>	2.5	4.7	5.2		similar to amino acid ABC transporter, ATP-binding protein	Glutamine transport ATP-binding protein glnQ
<i>lmo1389</i>	2.7	-	-		similar to sugar ABC transporter, ATP-binding protein	SUGAR TRANSPORT ATP-BINDING PROTEIN
<i>lmo1391</i>	2.7	-	3.1		similar to sugar ABC transporter, permease protein	SUGAR TRANSPORT SYSTEM PERMEASE PROTEIN
<i>lmo1746</i>	-	2.4	-		similar to ABC transporter: permease	ABC transporter permease protein
<i>lmo1958</i>	-	4.1	1.9	<i>fhuB</i>	similar to ferrichrome ABC transporter: permease	Ferrichrome transport system permease protein fhuB
<i>lmo1960</i>	4.1	4.9	-	<i>fhuC</i>	similar to ferrichrome ABC transporter: ATP-binding protein	Ferrichrome transport ATP-binding protein fhuC
<i>lmo2044</i>	2.9	-	-		similar to transporter binding proteins	Oligopeptide-binding protein oppA
<i>lmo2105</i>	3.2	2.6	3.8		similar to ferrous iron transport protein B	Ferrous iron transport protein B
<i>lmo2249</i>	3.4	-	2.7		similar to low-affinity inorganic phosphate transporter	Low-affinity inorganic phosphate transporter

LITERATUR

Gene ID	1h	2h	4h	Gen-Name	Ncbi Description	Internal Description
<i>lmo2415</i>	3.3	-	-		similar to ABC transporter, ATP-binding protein	ABC transporter ATP-binding protein
<i>lmo2760</i>	-	5.7	4.2		similar to ABC transporter: ATP-binding protein	ABC transporter ATP-binding protein uup
<i>lmo2826</i>	-	2.8	-		similar to efflux proteins	QUINOLONE RESISTANCE NORA PROTEIN
Transkription						
<i>lmo2461</i>	-	2.8	2.3	<i>sigL; rpoN</i>	RNA polymerase sigma-54 factor: sigma-L	RNA polymerase sigma-54 factor rpoN
<i>lmo2511</i>	9.6	-	-		similar to conserved hypothetical proteins like to B. subtilis YvyD protein	PROBABLE SIGMA(54) MODULATION PROTEIN / SSU ribosomal protein S30P
<i>lmo2652</i>	2.7	4.4	3.5		similar to transcriptional antiterminator	Transcription antiterminator, BglG family
<i>lmo2788</i>	-	2.8	2.5	<i>bvrA</i>	transcription antiterminator	Transcription antiterminator, BglG family
Translation und ribosomale Prozesse						
<i>lmo0213</i>	4.6	2.9	2.4	<i>pth</i>	similar to peptidyl-tRNA hydrolase	Peptidyl-tRNA hydrolase (EC 3.1.1.29)
<i>lmo1051</i>	4.0	2.6	2.1	<i>def</i>	similar to formylmethionine deformylase and to B. subtilis YkrB protein	Polypeptide deformylase (EC 3.5.1.31)
<i>lmo1522</i>	2.2	-	-	<i>dtd</i>	similar to unknown proteins	D-tyrosyl-tRNA(Tyr) deacylase (EC 3.1.1.-)
<i>lmo1982</i>	3.4	-	-		similar to unknown proteins	Ribosomal-protein-alanine acetyltransferase (EC 2.3.1.128)
<i>lmo2198</i>	-	-	1.8	<i>trpS</i>	tryptophanyl-tRNA synthetase	Tryptophanyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.2)
<i>lmo2342</i>	3.0	-	-		similar to 16S pseudouridylate synthase	Ribosomal small subunit pseudouridine synthase A (EC 4.2.1.70)
<i>lmo2747</i>	2.2	-	-	<i>serS</i>	seryl-trna synthetase	Seryl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.11)
Regulatoren und zwei-Komponenten-Systeme						
<i>lmo0050</i>	-	3.8	3.4		similar to sensor histidine kinase: AgrC from Staphylococcus	Sensory Transduction Protein Kinase (EC 2.7.3.-)
<i>lmo0051</i>	-	4.3	5.3		similar to 2-components response	Accessory gene regulator protein A AGRA

Gene ID	1h	2h	4h	Gen-Name	Ncbi Description	Internal Description
<i>lmo0387</i>					regulator protein: AgrA from Staphylococcus	
<i>lmo0785</i>	3.3	-	-		similar to B. subtilis YhdG protein	Transcriptional regulator
	-	3.6	-	<i>manR</i>	similar to transcriptional regulator: NifA/NtrC family	Transcriptional regulatory protein levR
<i>lmo0871</i>	12.9	3.4	-		similar to B. subtilis YtcD protein	Transcriptional regulator, MarR family
<i>lmo0948</i>	3.7	5.7	-		similar to transcription regulator	Transcriptional regulator, GntR family
<i>lmo0958</i>	4.5	-	-		similar to transcription regulator: GntR family	Transcriptional regulator, GntR family
<i>lmo1585</i>	-	2.1	-		similar to proteases	Putative signal peptide peptidase sppA (EC 3.4.21.-)
<i>lmo1911</i>	-	-	2.3		similar to unknown proteins: hypothetical sensory transduction histidine kinase	Sensory Transduction Protein Kinase (EC 2.7.3.-)
<i>lmo1996</i>	3.0	-	-		similar to transcription repressor of dra/nupC/pdp operon DeoR	Deoxyribonucleoside regulator
<i>lmo2328</i>	5.7	-	-		similar to transcription regulator	MunI regulatory protein
<i>lmo2329</i>	3.8	3.2	2.0		similar to a putative repressor protein	Transcriptional regulator, MerR family
<i>lmo2485</i>	4.0	-	-		similar to B. subtilis yvxC protein	Stress-responsive transcriptional regulator PspC
<i>lmo2731</i>	3.2	4.4	2.4		similar to transcription regulator: RpiR family	
<i>lmo2795</i>	3.6	3.1	-		similar to E. coli RpiR transcription regulator	Transcriptional regulator, RpiR family
<i>lmo2842</i>	3.1	-	-		similar to transcriptional regulator	Transcriptional regulator, LacI family
Zellwandsynthese						
<i>lmo0956</i>	6.5	-	-		similar to N-acetylglucosamine-6P-phosphate deacetylase: EC 3.5.1.25	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (EC 3.5.1.80) / N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (EC 3.5.1.25)
<i>lmo0957</i>	2.9	-	-	<i>nagB</i>	similar to glucosamine-6-Phosphate isomerase: EC 5.3.1.10	Glucosamine-6-phosphate isomerase (EC 3.5.99.6)

LITERATUR

Gene ID	1h	2h	4h	Gen-Name	Ncbi Description	Internal Description
<i>lmo1803</i>	-	2.6	2.6		similar to FtsY of E. coli and SRP receptor alpha-subunit	Cell division protein ftsY
Zellwandassoziiert						
<i>lmo0130</i>	26.3	13.8	6.1		similar to 5-nucleotidase, putative peptidoglycan bound protein: LPXTG motif	5-nucleotidase (EC 3.1.3.5)
<i>lmo0186</i>	-	2.4	-		similar to B. subtilis YabE protein	Cell wall-binding protein
<i>lmo0215</i>	-	5.9	-		conserved membrane-spanning protein	Polysaccharides export protein
<i>lmo0361</i>	4.1	-	-		similar to conserved hypothetical integral membrane protein	Sec-independent protein translocase protein tatC
<i>lmo0725</i>	3.1	-	2.4		putative peptidoglycan bound protein: LPXTG motif	
<i>lmo1013</i>	-	2.4	2.4		similar to conserved hypothetical proteins like to B. subtilis YkuT protein	MECHANOSENSITIVE ION CHANNEL
<i>lmo1388</i>	3.1	-	-	<i>tcsA</i>	CD4plus T cell-stimulating antigen, lipoprotein	CD4+ T cell-stimulating antigen
<i>lmo1483</i>	3.0	3.0	3.3	<i>comEB</i>	similar to B. subtilis ComEB protein	ComE operon protein 2
<i>lmo1712</i>	3.9	2.7	2.0		similar to multidrug resistance protein, integral membrane protein	Multidrug resistance protein B
<i>lmo2229</i>	-	4.6	-		similar to penicillin-binding protein	Multimodular transpeptidase-transglycosylase PBP 2A
<i>lmo2591</i>	-	7.9	4.7		surface protein: GW repeat similar to N-acetylmutarimidase	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (EC 3.5.1.28)
Kohlwasserstoff-Metabolismus						
<i>lmo0271</i>	2.9	2.6	-		highly similar to phospho-beta-glucosidase	Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)
<i>lmo0539</i>	4.2	-	-	<i>lacD</i>	similar to tagatose-1,6-diphosphate aldolase	Tagatose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.40)

Gene ID	1h	2h	4h	Gen-Name	Ncbi Description	Internal Description
<i>lmo0574</i>	-	-	2.7		similar to beta-glucosidase	Beta-glucosidase (EC 3.2.1.21)
<i>lmo1057</i>	-	2.4	-		similar to L-lactate dehydrogenase	L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27)
<i>lmo1078</i>	2.3	-	-		similar to putative UDP-glucose pyrophosphorylases	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase (EC 2.7.7.9)
<i>lmo1254</i>	7.7	24.0	21.0		similar to alpha,alpha-phosphotrehalase	Trehalose-6-phosphate hydrolase (EC 3.2.1.93)
<i>lmo1381</i>	3.0	-	-		<i>lmo1381</i>	Acylphosphatase (EC 3.6.1.7)
<i>lmo1534</i>	4.1	6.1	5.5	<i>ldh2</i>	similar to L-lactate dehydrogenase	L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27)
<i>lmo1570</i>	2.3	-	-	<i>pykA</i>	highly similar to pyruvate kinases	Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40)
<i>lmo1954</i>	-	-	2.4	<i>drm; deoB</i>	similar to phosphopentomutase	Phosphopentomutase (EC 5.4.2.7)
<i>lmo2110</i>	2.9	2.1	-		similar to mannose-6 phosphate isomerase	Mannose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.8)
<i>lmo2205</i>	9.7	-	-	<i>gpmA</i>	similar to phosphoglyceromutase 1	Phosphoglycerate mutase (EC 5.4.2.1)
<i>lmo2367</i>	3.2	-	-	<i>pgi</i>	glucose-6-phosphate isomerase	Glucose-6-phosphate isomerase (EC 5.3.1.9)
<i>lmo2674</i>	2.6	-	-		similar to ribose 5-phosphate epimerase	Ribose 5-phosphate isomerase (EC 5.3.1.6)
Aminosäuren-Metabolismus						
<i>lmo0223</i>	35.2	8.9	4.9	<i>cysK</i>	highly similar to cysteine synthase	Cysteine synthase (EC 4.2.99.8)
<i>lmo0560</i>	6.2	-	-		similar to NADP-specific glutamate dehydrogenase	NADP-specific glutamate dehydrogenase (EC 1.4.1.4)
<i>lmo0811</i>	3.3	3.0	-		similar to carbonic anhydrase	Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1)
<i>lmo1011</i>	2.2	-	-		similar to tetrahydrodipicolinate succinylase	Tetrahydrodipicolinate N-acetyltransferase (EC 2.3.1.89)
<i>lmo1012</i>	2.7	3.1	-		similar to N-acyl-L-amino acid amidohydrolases	Putative N-acetyldiaminopimelate deacetylase (EC 3.5.1.47)
<i>lmo1579</i>	5.7	-	-		similar to alanine dehydrogenase	Alanine dehydrogenase (EC 1.4.1.1)
<i>lmo1681</i>	2.4	-	-	<i>metE</i>	similar to cobalamin-independent methionine synthase	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase (EC 2.1.1.14)
<i>lmo1877</i>	5.1	3.0	-		similar to formyl-tetrahydrofolate synthetase N-terminal part	Formate--tetrahydrofolate ligase (EC 6.3.4.3)

LITERATUR

Gene ID	1h	2h	4h	Gen-Name	Ncbi Description	Internal Description
<i>lmo2006</i>	11.6	4.9	3.9	<i>alsS</i>	similar to alpha-acetolactate synthase protein, AlsS	Acetolactate synthase large subunit (EC 4.1.3.18)
<i>lmo2413</i>	3.3	-	-		similar to aminotransferase	Cysteine desulphydrase (EC 4.4.1.-) / Selenocysteine lyase (EC 4.4.1.16)
Zellteilung						
<i>lmo1455</i>	-	2.5	-	<i>dnaG</i>	2104269B DNA primase	DNA primase (EC 2.7.7.-)
<i>lmo2590</i>	2.5	-	-		similar to ATP binding proteins	Mrp protein
<i>lmo2759</i>	3.5	3.3	2.5		similar to unknown protein	ATPase associated with chromosome architecture/replication
Nukleinsäure-assoziierte Prozesse						
<i>lmo1097</i>	2.6	4.1	5.3		similar to integrases	DNA integration/recombination/inversion protein
<i>lmo1533</i>	-	2.3	1.7	<i>ruvA</i>	highly similar to Holliday junction DNA helicase: ruvA	Holliday junction DNA helicase ruvA
<i>lmo1804</i>	-	3.1	2.8	<i>smc</i>	similar to Smc protein essential for chromosome condensation and partition	Chromosome partition protein smc
<i>lmo1880</i>	-	-	2.4		similar to similar to RNase III	Ribonuclease HI (EC 3.1.26.4) ; Cell wall enzyme EBSB
<i>lmo1955</i>	-	-	2.6	<i>xerD</i>	similar to integrase/recombinase	DNA integration/recombination/inversion protein
<i>lmo2704</i>	-	2.2	1.7	<i>dnaX</i>	highly similar to DNA polymerase III: gamma and tau subunits	DNA polymerase III subunit gamma/tau (EC 2.7.7.7)
DNA-Reparatur						
<i>lmo1227</i>	5.6	-	2.3	<i>ung2</i>	similar to uracil-DNA glycosylase	Uracil-DNA glycosylase (EC 3.2.2.-)
<i>lmo1368</i>	2.5	-	-	<i>recN</i>	DNA repair and genetic recombination	DNA repair protein recN
<i>lmo2488</i>	-	2.8	1.9	<i>uvrA</i>	excinuclease ABC: subunit A	Excinuclease ABC subunit A
<i>lmo2676</i>	-	3.8	-		similar to UV-damage repair protein	

Gene ID	1h	2h	4h	Gen-Name	Ncbi Description	Internal Description
Lipiden-Metabolismus						
<i>lmo0170</i>	6.1	-	-		lmo0170	Phosphatidylserine decarboxylase (EC 4.1.1.65)
<i>lmo0354</i>	5.4	-	-		similar to fatty-acid--CoA ligase	Acetyl-coenzyme A synthetase (EC 6.2.1.1)
<i>lmo0786</i>	4.1	-	-		similar to acyl-carrier protein phosphodiesterase and to NAD:PH dehydrogenase	Acyl carrier protein phosphodiesterase (EC 3.1.4.14)
<i>lmo0927</i>	3.5	-	-		hypothetical transmembrane protein	Phosphoglycerol transferase
<i>lmo1647</i>	2.5	-	-		similar to 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferases	1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (EC 2.3.1.51)
<i>lmo1830</i>	3.1	-	-		similar to conserved hypothetical proteins	short chain dehydrogenase
<i>lmo2201</i>	-	2.3	2.3		similar to 3-oxoacyl-acyl-carrier protein synthase	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase (EC 2.3.1.41)
<i>lmo2696</i>	10.0	-	-		similar to hypothetical dihydroxyacetone kinase	Dihydroxyacetone kinase (EC 2.7.1.29)
Sekundärer Metabolismus						
<i>lmo1042</i>	3.6	-	-		similar to molybdopterin biosynthesis protein moeA	Molybdopterin biosynthesis MoeA protein
<i>lmo1049</i>	-	-	4.7		similar to molybdopterin biosynthesis protein MoeB	Hypothetical Protein
<i>lmo1308</i>	3.2	-	-		weakly similar to arginine N-methyltransferases	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase UBIE (EC 2.1.1.-)
<i>lmo1551</i>	-	4.7	2.0	<i>folC</i>	similar to Folyl-polyglutamate synthetase	FOLYL POLYGLUTAMATE SYNTHASE (EC 6.3.2.17) / DIHYDROFOLATE SYNTHASE (EC 6.3.2.12)
<i>lmo1581</i>	-	-	2.1	<i>ackA; akkAI</i>	highly similar to acetate kinase	Acetate kinase (EC 2.7.2.1)
<i>lmo1685</i>	2.3	-	-	<i>gsaB; hemL2</i>	glutamate-1-semialdehyde amino-transferase	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2 (EC 5.4.3.8)

Gene ID	1h	2h	4h	Gen-Name	Ncbi Description	Internal Description
<i>lmo1831</i>	-	2.7	2.3	<i>pyrE</i>	highly similar to orotate phosphoribosyltransferases	Orotate phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.10)
<i>lmo1832</i>	-	-	2.6	<i>pyrF</i>	highly similar to orotidine 5-phosphate decarboxylases	Orotidine 5-phosphate decarboxylase (EC 4.1.1.23)
<i>lmo1833</i>	-	5.3	2.9	<i>pyrD</i>	highly similar to dihydroorotase dehydrogenase	Dihydroorotate dehydrogenase (EC 1.3.3.1)
<i>lmo1839</i>	4.6	-	-	<i>pyrP</i>	highly similar to uracil permease	Uracil permease
<i>lmo1840</i>	4.2	2.4	-	<i>pyrR</i>	highly similar to pyrimidine operon regulatory protein	Uracil phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.9) / Pyrimidine operon regulatory protein pyrR
<i>lmo1885</i>	6.2	5.7	4.7		similar to xanthine phosphoribosyltransferase	Xanthine phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.-)
<i>lmo1939</i>	-	2.1	1.9	<i>cnk</i>	similar to cytidylate kinase	Cytidylate kinase (EC 2.7.4.14)
<i>lmo1953</i>	-	-	2.8	<i>pnp</i>	similar to purine-nucleoside phosphorylase	Purine nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1)
<i>lmo1993</i>	3.4	-	3.6	<i>pdp</i>	similar to pyrimidine-nucleoside phosphorylase	Pyrimidine-nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.2)
<i>lmo1995</i>	2.8	-	-	<i>dra; deoC</i>	similar to deoxyribose-phosphate aldolase	Deoxyribose-phosphate aldolase (EC 4.1.2.4)
<i>lmo2211</i>	2.4	-	-	<i>henH</i>	similar to ferrochelatase	Ferrochelatase (EC 4.99.1.1)
<i>lmo2715</i>	3.1	7.2	4.1	<i>cydD</i>	highly similar to ABC transporter: ATP-binding protein required for expression of cytochrome BD	Transport ATP-binding protein cydC
<i>lmo2716</i>	4.7	8.3	-	<i>cydC</i>	highly similar to ABC transporter required for expression of cytochrome BD	Transport ATP-binding protein cydD
<i>lmo2717</i>	3.5	4.8	3.0	<i>cydB</i>	highly similar to cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit II (EC 1.10.3.-)
<i>lmo2718</i>	3.9	4.9	2.9	<i>cydA</i>	highly similar to cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I (EC 1.10.3.-)
<i>lmo2758</i>	-	7.0	4.5	<i>guaB</i>	similar to inosine-monophosphate dehydrogenase	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.205)

LITERATUR

Gene ID	1h	2h	4h	Gen-Name	Ncbi Description	Internal Description
Invasionsprozess						
<i>lmo0200</i>	12.6	38.4	6.4	<i>prfA</i>	listeriolysin positive regulatory protein	Listeriolysin regulatory protein
<i>lmo0201</i>	27.5	125.5	10.3	<i>plcA; pic</i>	phosphatidylinositol-specific phospholipase c	1-phosphatidylinositol phosphodiesterase precursor (EC 3.1.4.10)
<i>lmo0202</i>	-	7.4	8.2	<i>hly; lisA; hlyA</i>	listeriolysin O precursor; S24231 listeriolysin precursor - Listeria monocytogenes: strain 12067	Listeriolysin O
<i>lmo0204</i>	2.6	12.4	7.4	<i>actA; prtB</i>	actin-assembly inducing protein precursor; S20887 actA protein precursor - Listeria monocytogenes	Actin-assembly inducing protein precursor
<i>lmo0205</i>	-	20.0	5.0	<i>plcB; prtC</i>	phospholipase C; S20888 phospholipase C; EC 3.1.4.3 precursor - Listeria monocytogenes: fragment	Phospholipase C (EC 3.1.4.3)
<i>lmo0433</i>	-	2.6	-	<i>inlA</i>	internalin; Internalin A	Internalin protein
Unbekannt						
<i>lmo0099</i>	-	-	4.3		lmo0099	Hypothetical Protein
<i>lmo0104</i>	-	2.6	-		lmo0104	
<i>lmo0125</i>	-	-	2.6		lmo0125	
<i>lmo0165</i>	-	3.7	-		conserved hypothetical protein	METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.-)
<i>lmo0185</i>	2.9	-	-		similar to conserved hypothetical proteins	SEC-INDEPENDENT PROTEIN TATD (EC 3.1.21.-)
<i>lmo0196</i>	2.7	-	-		similar to B. subtilis SpoVG protein	Stage V sporulation protein G
<i>lmo0197</i>	2.8	-	-		similar to B. subtilis SpoVG protein	Stage V sporulation protein G
<i>lmo0227</i>	-	2.3	2.1		conserved hypothetical protein	Nitrogen regulation protein NIFR3
<i>lmo0368</i>	3.6	-	-		similar to different proteins	DIMETHYLADENOSINE TRANSFERASE (EC 2.1.1.-) / MutT/nudix family protein
<i>lmo0369</i>	3.1	2.5	2.0		conserved hypothetical protein, highly similar to B. subtilis YeeI protein	Hypothetical Cytosolic Protein

Gene ID	1h	2h	4h	Gen-Name	Ncbi Description	Internal Description
<i>lmo0472</i>	3.0	-	-		lmo0472	
<i>lmo0670</i>	2.8	-	-		lmo0670	
<i>lmo0674</i>	7.0	3.6	2.4		lmo0674	
<i>lmo0720</i>	4.4	-	-		lmo0720	Hypothetical Cytosolic Protein
<i>lmo0752</i>	2.8	-	-		weakly similar to a putative haloacetate dehalogenase	ESTERASE/LIPASE (EC 3.1.-.-)
<i>lmo0796</i>	3.7	-	-		conserved hypothetical protein	Protein yceI
<i>lmo0900</i>	3.2	-	-		lmo0900	
<i>lmo0930</i>	2.4	-	-		conserved hypothetical protein, similar to B. subtilis YhfI protein	METAL DEPENDENT HYDROLASE (EC 3.-.-.-)
<i>lmo0940</i>	2.4	-	-		lmo0940	
<i>lmo0941</i>	2.3	-	-		lmo0941	
<i>lmo0953</i>	3.8	-	-		lmo0953	
<i>lmo0965</i>	3.7	-	-		similar to B. subtilis YjbK protein	Hypothetical Cytosolic Protein
<i>lmo0982</i>	2.5	-	-		similar to glucanase and peptidase	Deblocking aminopeptidase (EC 3.4.11.-)
<i>lmo1050</i>	4.7	-	-		similar to B. subtilis YdfE protein	Hypothetical Cytosolic Protein
<i>lmo1236</i>	2.3	-	-		similar to B. subtilis YslB protein	Hypothetical Cytosolic Protein
<i>lmo1303</i>	-	3.3	-		similar to B. subtilis YneA protein	
<i>lmo1384</i>	2.5	-	-		similar to unknown protein	Thiosulfate sulfurtransferase (EC 2.8.1.1)
<i>lmo1495</i>	2.5	-	-		similar to unknown proteins	
<i>lmo1535</i>	-	3.1	1.7		similar to unknown proteins	Hypothetical Cytosolic Protein
<i>lmo1604</i>	4.0	4.1	3.0		similar to 2-cys peroxiredoxin	Alkyl hydroperoxide reductase C22 (EC 1.6.4.-)
<i>lmo1717</i>	2.7	-	-		similar to hypothetical proteins	
<i>lmo1861</i>	-	-	1.6		similar to hypothetical proteins	Hypothetical Membrane Associated Protein
<i>lmo1876</i>	5.2	3.2	-			PseudoGen;
<i>lmo1961</i>	2.4	3.6	2.5		similar to oxidoreductases	Thioredoxin reductase (EC 1.6.4.5)
<i>lmo1966</i>	4.0	-	-		similar to unknown proteins	XpaC protein
<i>lmo1967</i>	2.8	-	-		similar to toxic ion resistance proteins	Tellurite resistance protein
<i>lmo1981</i>	2.5	-	-		similar to unknown proteins	Hypothetical Cytosolic Protein
<i>lmo2197</i>	-	4.6	-		lmo2197	
<i>lmo2230</i>	13.1	-	-		similar to arsenate reductase	Arsenate reductase (EC 1.97.1.5)

Gene ID	1h	2h	4h	Gen-Name	Ncbi Description	Internal Description
<i>lmo2247</i>	3.5	-	-		similar to oxidoreductase	2,5-diketo-D-gluconic acid reductase (EC 1.1.1.-)
<i>lmo2275</i>	-	3.7	-		Portein gp28	
<i>lmo2276</i>	-	2.8	2.4		similar to an unknown bacteriophage protein	hypothetical protein
<i>lmo2286</i>	3.0	-	-		Protein gp17	
<i>lmo2385</i>	2.3	-	1.5		similar to <i>B. subtilis</i> YuxO protein	ComA operon protein 2
<i>lmo2389</i>	2.5	-	-		similar to NADH dehydrogenase	NADH dehydrogenase (EC 1.6.99.3)
<i>lmo2411</i>	3.3	-	-		similar to conserved hypothetical proteins	ABC transporter ATP-binding protein
<i>lmo2412</i>	3.4	-	-		similar to conserved hypothetical proteins	NifU protein
<i>lmo2414</i>	3.4	-	-		similar to aminotransferase	ABC transporter ATP-binding protein
<i>lmo2426</i>	2.8	-	-		conserved hypothetical proteins	Arsenate reductase family protein
<i>lmo2540</i>	-	3.1	-		similar to phosphatases	Protein tyrosine phosphatase (EC 3.1.3.48)
<i>lmo2542</i>	-	-	1.9		similar to protoporphyrinogen oxidase	METHYLTRANSFERASE (EC 2.1.1.-)
<i>lmo2562</i>	-	2.2	2.1		lmo2562	
<i>lmo2599</i>	-	2.2	-		highly similar to <i>B. subtilis</i> YbaF protein	Cobalt transport protein cbtQ
<i>lmo2643</i>	2.5	-	-		lmo2643	
<i>lmo2646</i>	10.2	106.3	15.1		lmo2646	4-Hydroxy-2-oxoglutarate aldolase (EC 4.1.3.16) / 2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase (EC 4.1.2.14)
<i>lmo2697</i>	6.7	-	-		lmo2697	Dihydroxyacetone kinase phosphotransfer protein
<i>lmo2719</i>	5.5	2.8	-		conserved hypothetical proteins	Cytosine deaminase (EC 3.5.4.1)
<i>lmo2724</i>	2.8	-	-		similar to unknown proteins	PhnB protein
<i>lmo2727</i>	5.7	2.8	-		similar to unknown proteins	Leucine rich protein
<i>lmo2730</i>	-	3.0	2.4		similar to phosphatase	Phosphoglycolate phosphatase (EC 3.1.3.18)
<i>lmo2792</i>	4.4	-	-		lmo2792	
<i>lmo2828</i>	-	4.1	3.0		lmo2828	

LITERATUR

Tabelle III. Hochregulierte Gene bei dem dauerhaften Wachstum bei 15°C
(fdr <1%, Faktor > 2)

Gene ID	Faktor	Gene Names	Ncbi Description	Internal Description
Stressantwort				
<i>lmo1364</i>	6.4	<i>cspLA</i>	CspA,protein major cold-shock protein	Cold shock protein
Translation und ribosomale Prozesse				
<i>lmo1067</i>	2.6		similar to GTP-binding elongation factor	GTP-binding protein TypA/BipA
Zellwandassoziierte				
<i>lmo0117</i>	3.0	<i>lmaB</i>	antigen B	Antigen B
<i>lmo0118</i>	3.1	<i>lmaA</i>	antigen A	Antigen A
<i>lmo0128</i>	2.2		similar to a protein from Bacteriophage phi-105: ORF 45	holin
<i>lmo0193</i>	2.2		lmo0193	periplasmic component of efflux system
<i>lmo0519</i>	2.2	<i>lmrB</i>	similar to multidrug resistance protein	Lincomycin resistance protein
<i>lmo1039</i>	2.1		similar to ABC transporter, ATP-binding protein	Transporter
<i>lmo2484</i>	2.4		similar to B. subtilis YvID protein	Integral membrane protein

Gene ID	Faktor	Gene Names	Ncbi Description	Internal Description
Chemotaxis und Flagellen-Biosynthese				
<i>Imo0676</i>	2.8		similar to flagellar biosynthetic protein FliP	Flagellar biosynthetic protein fliP
<i>Imo0678</i>	2.6		similar to flagellar biosynthetic protein FliR	Flagellar biosynthetic protein fliR
<i>Imo0680</i>	2.1		similar to flagella-associated protein flhA	Flagellar biosynthetic protein flhA
<i>Imo0681</i>	2.1		similar to flagellar biosynthesis protein FlhF	Flagellar biosynthesis protein flhF
<i>Imo0682</i>	2.4		similar to flagellar hook-basal body protein FlgG	Flagellar basal-body rod protein flgG
<i>Imo0683</i>	2.3	<i>cheR</i>	similar to chemotactic methyltransferase CheR	Chemotaxis protein methyltransferase
<i>Imo0684</i>	2.1		Imo0684	
<i>Imo0685</i>	2.8	<i>motA</i>	similar to motility protein: flagellar motor rotation MotA	Chemotaxis motA protein
<i>Imo0686</i>	3.8	<i>motB</i>	similar to motility protein: flagellar motor rotation MotB	Chemotaxis motB protein
<i>Imo0687</i>	2.5		Imo0687	
<i>Imo0688</i>	3.7		similar to unknown protein	Glycosyltransferase
<i>Imo0689</i>	3.8		similar to CheA activity-modulating chemotaxis protein CheV	Chemotaxis protein cheW
<i>Imo0690</i>	28.9	<i>flaA</i>	flagellin protein	Flagellin
<i>Imo0691</i>	3.3	<i>cheY</i>	Chemotaxis response regulator CheY	Chemotaxis protein cheY
<i>Imo0692</i>	4.5	<i>cheA</i>	two-component sensor histidine kinase CheA	Chemotaxis protein cheA (EC 2.7.3.-)
<i>Imo0693</i>	2.3		similar to flagellar motor switch protein	Flagellar motor switch protein fliN
<i>Imo0694</i>	2.3		Imo0694	Hypothetical Cytosolic Protein
<i>Imo0695</i>	5.7		Imo0695	

LITERATUR

Gene ID	Faktor	Gene Names	Ncbi Description	Internal Description
<i>lmo0696</i>	3.9		similar to flagellar hook assembly protein	Basal-body rod modification protein flgD
<i>lmo0697</i>	3.6		similar to flagellar hook protein FlgE	Flagellar hook protein flgE
<i>lmo0698</i>	3.8		weakly similar to flagellar switch protein	Flagellar motor switch protein fliN
<i>lmo0699</i>	3.1		similar to flagellar switch protein FliM	Flagellar motor switch protein fliM
<i>lmo0700</i>	3.2		similar to flagellar motor switch protein fliY	Chemotaxis protein cheC
<i>lmo0701</i>	2.8		lmo0701	
<i>lmo0702</i>	2.2		lmo0702	
<i>lmo0703</i>	2.4		lmo0703	UDP-N-acetylglucosamine reductase
<i>lmo0704</i>	4.0		lmo0704	
<i>lmo0705</i>	4.0		similar to flagellar hook-associated protein FlgK	Flagellar hook-associated protein 1
<i>lmo0706</i>	2.6		similar to flagellar hook-associated protein 3 FlgL	Flagellar hook-associated protein 3
<i>lmo0707</i>	4.8		similar to flagellar hook-associated protein 2 FliD	Flagellar hook-associated protein 2
<i>lmo0708</i>	2.3		similar to hypothetical flagellar protein	Flagellar protein fliS
<i>lmo0709</i>	3.1		lmo0709	
<i>lmo0710</i>	3.7		similar to flagellar basal-body rod protein flgB	Flagellar basal-body rod protein flgB
<i>lmo0711</i>	3.1		similar to flagellar basal-body rod protein flgC	Flagellar basal-body rod protein flgC
<i>lmo0712</i>	4.0	<i>fliE</i>	similar to flagellar hook-basal body complex protein FliE	Flagellar hook-basal body complex protein fliE
<i>lmo0713</i>	3.0		similar to flagellar basal-body M-ring protein fliF	Flagellar M-ring protein fliF
<i>lmo0714</i>	3.2		similar to flagellar motor switch protein fliG	Flagellar motor switch protein fliG

LITERATUR

Gene ID	Faktor	Gene Names	Ncbi Description	Internal Description
<i>Imo0715</i>	4.0		Imo0715	
<i>Imo0716</i>	3.3		similar to Hplus-transporting ATP synthase alpha chain FliI, flagellar-specific, -	Flagellum-specific ATP synthase (EC 3.6.3.14)
<i>Imo0717</i>	4.6		similar to transglycosylase	Soluble lytic murein transglycosylase (EC 3.2.1.-)
<i>Imo0718</i>	3.5		Imo0718	
<i>Imo0723</i>	7.4		similar to methyl-accepting chemotaxis protein	Methyl-accepting chemotaxis protein
<i>Imo0724</i>	9.1		similar to B. subtilis YvpB protein	Hypothetical Protein
Unbekannt				
<i>Imo0149</i>	2.4		Imo0149	
<i>Imo1001</i>	2.3		similar to B. subtilis protein YkvS	
<i>Imo1245</i>	2.2		Imo1245	
<i>Imo1518</i>	2.5		Imo1518	

LITERATUR

Tabelle IV. Runterregulierte Gene bei dem dauerhaften Wachstum bei 15°C (fdr <1 %, Faktor > 2)

Gene ID	Faktor	Gene Names	NcbiDescription	Internal
Invasionsprozess				
<i>lmo0200</i>	3.4	<i>prfA</i>	listeriolysin positive regulatory protein; listeriolysin regulatory protein	Listeriolysin regulatory protein
<i>lmo0201</i>	6.7	<i>plcA</i>	phosphatidylinositol-specific phospholipase c	1-phosphatidylinositol phosphodiesterase precursor
<i>lmo0202</i>	29.6	<i>hly</i>	listeriolysin O	Listeriolysin O
<i>lmo0204</i>	4.8	<i>actA</i>	actin-assembly inducing protein precursor	Actin-assembly inducing protein precursor
<i>lmo0205</i>	4.3	<i>plcB</i>	phospholipase C	Phospholipase C (EC 3.1.4.3)
Allgemeiner Stressantwort				
<i>lmo1604</i>	2.7		similar to 2-cys peroxiredoxin	Alkyl hydroperoxide reductase C22 (EC 1.6.4.-)
<i>lmo2016</i>	11.5	<i>cspLB</i>	major cold-shock protein homolog CspB	Cold shock protein
Class I Hitzeschockgene				
<i>lmo1472</i>	2.0	<i>dnaJ</i>	heat shock protein DnaJ	Chaperone protein dnaJ
<i>lmo1473</i>	2.8	<i>dnaK</i>	DnaK; class I heat-shock protein; molecular chaperone DnaK	Chaperone protein dnaK
<i>lmo1474</i>	2.2	<i>grpE</i>	GrpE; heat shock protein GrpE	GrpE protein
<i>lmo1475</i>	2.1	<i>hrcA</i>	transcription repressor of class I heat-shock gene HrcA	Heat-inducible transcription repressor hrcA
<i>lmo2068</i>	5.1	<i>groEL</i>	class I heat-shock protein: chaperonin GroEL	60 kDa chaperonin GROEL
<i>lmo2069</i>	5.2	<i>groES</i>	GroES; class I heat-shock protein: chaperonin GroES	10 kDa chaperonin GROES
Class III Hitzeschockgene				
<i>lmo1138</i>	2.5		similar to ATP-dependent Clp protease proteolytic component	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit (EC 3.4.21.92)
<i>lmo2206</i>	4.2	<i>clpB</i>	similar to endopeptidase Clp ATP-binding chain B:	ClpB protein

LITERATUR

Gene ID	Faktor	Gene Names	NcbiDescription	Internal
			ClpB	
Zuckermetabolismus				
<i>lmo1254</i>	4.2		similar to alpha,alpha-phosphotrehalase	Trehalose-6-phosphate hydrolase (EC 3.2.1.93)
<i>lmo1255</i>	3.8		similar to PTS system trehalose specific enzyme IIBC	PTS system, trehalose-specific IIBC component (EC 2.7.1.69)
<i>lmo1534</i>	2.7	<i>ldh2</i>	similar to L-lactate dehydrogenase	L-lactate dehydrogenase (EC 1.1.1.27)
Nukleotidenmetabolismus				
<i>lmo2758</i>	2.4	<i>guaB</i>	similar to inosine-monophosphate dehydrogenase	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.205)
Zwei-Komponenten System				
<i>lmo0050</i>	3.7		similar to sensor histidine kinase: AgrC from Staphylococcus	Sensory Transduction Protein Kinase (EC 2.7.3.-)
<i>lmo0051</i>	5.7		similar to 2-components response regulator protein: AgrA from Staphylococcus	Accessory gene regulator protein A AGRA
Unbekannt				
<i>lmo0227</i>	2.3		conserved hypothetical protein	Nitrogen regulation protein NIFR3
<i>lmo0811</i>	2.4		similar to carbonic anhydrase	Carbonic anhydrase (EC 4.2.1.1)
<i>lmo1423</i>	2.3		lmo1423	