

Molekular- und zellbiologische Analyse des Invasionsmechanismus von
Listeria monocytogenes in eukaryontische Zellkulturen

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

vorgelegt von
aus

Philippos B. Pashalidis
Freiburg im Breisgau

Gießen 2000

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

Leiter: Prof. Dr. T. Chakraborty

des Klinikums der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. T. Chakraborty

Gutachter: Prof. Dr. R. Geyer

Tag der Disputation: 5. Juli 2001

Diese Arbeit ist
meinen Eltern
gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Infektionskrankheiten als aktuelles und weltweites Problem	1
1.2	<i>L. monocytogenes</i> – Mikrobiologie und Taxonomie	2
1.3	Listeriose	3
1.4	Die Immunantwort auf eine Listerieninfektion im Mausmodell	5
1.5	Aufklärung von Pathogenitätsmechanismen durch Zellkulturversuche und genetische Veränderung von Listerien	7
1.6	Virulenzfaktoren und Infektionszyklus von <i>L. monocytogenes</i>	8
1.6.1	Organisation und Regulation der Virulenzgene	8
1.6.2	Infektionszyklus und die daran beteiligten Virulenzgene	9
1.6.2.1	Adhäsion und Aufnahme in eukaryontische Zellen	9
1.6.2.2	Austritt aus Vakuolen in das Zytoplasma	12
1.6.2.3	Intrazelluläre Mobilität	12
1.6.2.4	Interzelluläre Mobilität	13
1.7	Pathogenitätsfaktoren und Invasionsstrategien von Bakterien	14
1.8	Zielsetzung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Eukaryontische Zelllinien	17
2.1.2	Materialien der Zellkultur	17
2.1.3	Bakterienstämme	18
2.1.4	Plasmide	18
2.1.5	Oligonukleotide	19
2.1.6	Chemikalien, Enzyme und Antikörper	20
2.1.7	DNA-Größenstandard	21
2.1.8	Protein-Größenstandard	21
2.1.9	Anzuchtmedien	21
2.1.10	Lösungen und Puffer	22
2.1.11	Geräte	23
2.1.12	Computerprogramme	24
2.2	Methoden	24
2.2.1	Bestimmung von Nukleinsäuren	24
2.2.2	Sequenzierung von DNA	24
2.2.2.1	Automatische Sequenzierung mit dem ALFexpress von Pharmacia	24
2.2.2.2	Sequenziergel und Laufparameter	24
2.2.2.3	Sequenzierung von Plasmiden mit unmarkierten Primern	24
2.2.2.4	Sequenzierung von Plasmiden und DNA-Fragmenten mit markierten Primern	25

2.2.3	Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Expand TM High Fidelity PCR-System von Boehringer Mannheim	25
2.2.4	Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	25
2.2.5	Reinigung von DNA-Fragmenten mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen	26
2.2.6	Schneiden, Phenolextraktion und Ligation von DNA-Fragmenten	26
2.2.7	Transformation von <i>E. coli</i>	27
2.2.7.1	Herstellung von ultra-kompetenten <i>E. coli</i> nach Inoue (1990)	27
2.2.7.2	Hitzeschocktransformation von ultra-kompetenten <i>E. coli</i> nach Hanahan (1991)	28
2.2.8	Identifizierung positiver Transformanten durch PCR	28
2.2.9	Isolierung von Plasmid-DNA mit dem GFX TM Micro Plasmid Prep Kit von Pharmacia	29
2.2.10	Isolierung von Plasmid-DNA mit dem JETstar 2.0 Plasmid MIDI Kit von Genomed	29
2.2.11	Protoplasten-Transformation von Listerien nach Wuenscher <i>et al.</i> (1991)	30
2.2.12	Anlegen von Glycerinkulturen	31
2.2.13	Transformation von Listerien mit in Expressionsvektoren klonierten Internalinen	31
2.2.14	Klonierung in die Expressionsvektoren pERL-3 und pLigal64	31
2.2.15	Extraktion von Proteinen	32
2.2.15.1	TCA-Fällung von Proteinen im Kulturüberstand	32
2.2.15.2	SDS-Extraktion von mit der Zellwand assoziierten Proteinen	32
2.2.16	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	32
2.2.17	Protein-Nachweis im Immunblot	34
2.2.17.1	Immunblot	34
2.2.17.2	Immunblot-Detektion mit alkalische Phosphatase-konjugierten Antikörpern	34
2.2.18	N-terminale Ansequenzierung von Proteinen	35
2.2.19	Reassoziationsassay	35
2.2.20	Zellkultur	36
2.2.20.1	Kulturbedingungen von eukaryontischen Zellen	36
2.2.20.2	Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen	36
2.2.21	Infektionsassay für eukaryontische Zelllinien	37
2.2.21.1	Infektion von eukaryontischen Zelllinien mit Listerien	37
2.2.21.2	Infektion von eukaryontischen Zelllinien mit Listerien nach Reassoziationsassay	38
2.2.22	Mikroskopieren	38
2.2.22.1	Immunfluoreszenzfärbung von Listerien in infizierten eukaryontischen Zellen	38
2.2.22.2	Konfokale Laserscanmikroskopie	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Die Sequenz von ORFA und dem <i>inlAB</i> -Operon	40
3.1.1	Sequenzierung von ORFA und <i>inlAB</i> -Operon	40
3.1.2	Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von InternalinA, InternalinB und ORFA der Stämme <i>L. monocytogenes</i> EGD 1/2a und <i>L. monocytogenes</i> EGD-SmR	41

3.2	Molekular- und zellbiologische Arbeiten mit der $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante	45
3.2.1	Komplementationen der $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante mit dem Vektor pERL-3 und dessen rekombinanten Plasmiden	45
3.2.2	Klonierung von Internalingenen in den Expressionsvektor pERL-3	45
3.2.3	Nachweis der Expression der Genprodukte von $\Delta inLAB2$ -Komplementanten im Immunblot	46
3.2.4	Überprüfung der Invasionsfähigkeit der $\Delta inLAB2$ -Komplementanten im Infektionsassay	48
3.2.5	Immunfluoreszenzfärbung von Listerien ($\Delta inLAB2$ -Komplementanten) in infizierten Caco-2- und HeLa-Zellen	53
3.3	Molekular- und zellbiologische Arbeiten mit <i>L. innocua</i> und pERL-3	57
3.3.1	Komplementationen von <i>L. innocua</i> mit dem Vektor pERL-3 und dessen rekombinanten Plasmiden	57
3.3.2	Klonierung von Internalingenen in den Expressionsvektor pERL-3	57
3.3.3	Nachweis der Expression der Genprodukte von <i>L. innocua</i> -Komplementanten (pERL-3) im Immunblot	57
3.3.4	Überprüfung der Invasionsfähigkeit der <i>L. innocua</i> -Komplementanten (pERL-3) im Infektionsassay	59
3.4	Molekular- und zellbiologische Arbeiten mit der $\Delta vgc2$ -Deletionsmutante	64
3.4.1	Komplementationen der $\Delta vgc2$ -Deletionsmutante mit dem Vektor pLiga164 und dessen rekombinanten Plasmiden	64
3.4.2	Klonierung von Internalingenen zur Überexpression in den Vektor pLiga164	65
3.4.3	Nachweis der Expression der Genprodukte von $\Delta vgc2$ -Komplementanten im Immunblot	66
3.4.4	Identifizierung der 28 kDa-Abbaubande der mit <i>inLAB</i> komplementierten $\Delta vgc2$ Deletionsmutante	67
3.4.5	Überprüfung der Invasionsfähigkeit der $\Delta vgc2$ -Komplementanten im Infektionsassay	68
3.5	Molekular- und zellbiologische Arbeiten mit <i>L. innocua</i> und dem Vektor pLiga164	69
3.5.1	Komplementationen von <i>L. innocua</i> mit dem Vektor pLiga164 und dessen rekombinanten Plasmiden	69
3.5.2	Klonierung von Internalingenen in den Vektor pLiga164	70
3.5.3	Nachweis der Expression der Genprodukte von <i>L. innocua</i> -Komplementanten (pLiga164) im Immunblot	70
3.5.4	Überprüfung der Invasionsfähigkeit der <i>L. innocua</i> -Komplementanten (pLiga164) im Infektionsassay	72
3.6	Demonstration der biologischen Aktivität von gereinigtem InIB	73
3.6.1	Reassoziati on des InIB von Listerien	73
3.6.2	Infektion von eukaryontischen Zelllinien mit Listerien nach Reassoziati on des InIB	73

4	Diskussion	76
4.1	Die Nukleotidsequenzen von ORFA und <i>inLAB</i> -Operon der Stämme <i>L. monocytogenes</i> EGD-SmR und <i>L. monocytogenes</i> EGD 1/2a sind identisch	76
4.2	Die Invasion komplementierter $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutanten in Zellkulturen zeigt unterschiedliche Abhängigkeiten von InlA und InlB	79
4.3	Rekombinante Plasmide des Vektors pERL-3 verleihen <i>L. innocua</i> Invasivität in Zellkulturen	83
4.4	Für die Invasion der $\Delta vgc2$ -Deletionsmutanten in Zellkulturen sind PrfA und Internaline ausreichend	85
4.5	Die bekannten Virulenzgene tragen nicht alleine zum Invasionsmechanismus bei	89
4.6	Gereinigtes InlB bindet an Listerien und induziert die Internalisation von nicht-invasiven Bakterien	91
5	Zusammenfassung und Ausblick	93
5.1	Zusammenfassung	93
5.2	Ausblick	94
6	Literaturverzeichnis	95
7	Anhang	106
7.1	Zeichen und Abkürzungen	106
7.2	Nukleotidsequenz <i>inLAB</i> von <i>L. monocytogenes</i> EGD 1/2a	111
7.3	Plasmidkarten	118
7.4	Lebenslauf	125
7.5	Danksagung	127

1 Einleitung

1.1 Infektionskrankheiten als aktuelles und weltweites Problem

Die Aufklärung der Pathogenitätsmechanismen von Erregern infektiöser Krankheiten ist weltweit von großer Wichtigkeit. Die Weltgesundheitsorganisation WHO stellt in einem Bericht des Jahres 1997 fest, daß von den insgesamt 52 Millionen verstorbenen Personen des Vorjahres ca. 33 % durch Infektionskrankheiten umgekommen sind. Damit rangieren Infektionskrankheiten noch vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen als Todesursache. Erreger sind eukaryontische Protozoen und Pilze, subzelluläre Objekte wie Prione, Viroide und Viren, metazoische Tiere wie Helminthen und Arthropoden und prokaryontische Bakterien.

Die Entdeckung und Entwicklung von Chemotherapeutika und Impfstoffen hat einerseits zu Erfolgen in der Bekämpfung von Infektionskrankheiten geführt. Wirksame Medikamente führten in den 50er und 60er Jahren zu einer leider voreiligen Euphorie, die Infektionskrankheiten könnten schnell und völlig ausgerottet werden.

Andererseits werden Erfolge in der Bekämpfung der Infektionskrankheiten durch verschiedene Ursachen geschmälert.

Ein zentrales Problem stellt die zu häufige oder falsche Anwendung von Antibiotika dar, wodurch resistente Bakterienstämme entstehen können, die eine Therapie erschweren oder unmöglich machen. Die häufige Einnahme von Antibiotika in Ungarn hat z.B. zu 58 % Penicillin-resistenten Pneumokokken-Isolaten geführt. In manchen Fällen setzten Patienten Antibiotika bei subjektiver Besserung selbst zu früh ab, was ebenso wie die zu häufige Einnahme zu Resistenzentwicklungen führen kann. Eine breite Anwendung von Antibiotika findet auch in der Lebensmittelindustrie statt. Das Glykopeptidantibiotikum Avoparcin wird dem Futter von Masttieren beigemischt, um ein schnelleres Wachstum der Tiere zu erreichen. Eine Studie des Robert-Koch-Institutes zeigte, daß in jeder zehnten untersuchten, gesunden Versuchsperson Vancomycin-resistente Enterokokken im Darm nachzuweisen waren und die Erreger aus Tierställen stammten, in denen Avoparcin gefüttert wird. Vancomycin gehört wie Avoparcin zu den Glykopeptidantibiotika, die Resistenz der Enterokokken richtet sich gegen beide Antibiotika. Infektionen durch v.a. in Krankenhäusern auftretende MRSA-Stämme (Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*) können nur noch durch die Reserveantibiotika Vancomycin und Teicoplanin behandelt werden. Im Labor wurde bereits gezeigt, daß Enterokokken ihre Vancomycin-Resistenz auf Staphylokokken übertragen können, so daß die Befürchtung eines in der Natur vorkommenden Vancomycin-resistenten Staphylokokken-Stammes nicht unbegründet ist. Die Pharmaindustrie kann nicht so schnell neue Wirkstoffe entwickeln, wie Resistenzen entstehen.

Impfstoffe und deren Möglichkeiten werden nicht genügend genutzt. Ein von Institutionen wie dem Robert-Koch-Institut in Berlin beklagter Rückgang der Impfbereitschaft in Industrieländern resultiert in einer Nicht-Ausrottung von infektiösen Agentien. Ausbrüche von Poliomyelitis in den Niederlanden (1992/93) werden fehlendem Impfschutz zugeordnet und zeigen die Wichtigkeit der Auffrischung von Impfungen.

Armut, Kriege und Naturkatastrophen unterstützen die Verbreitung von Infektionskrankheiten. Durch den reduzierten psychischen und physischen Zustand von

ganzen Volksgruppen und das enge Zusammenleben unter unzureichenden hygienischen Bedingungen breiten sich Infektionskrankheiten leichter aus. Den betroffenen Menschen fehlt es zudem an Medikamenten oder Impfstoffen, bzw. an den Möglichkeiten zur sachgemäßen Lagerung.

Die zunehmenden Reisen zwischen allen Teilen der Erde aus privaten oder beruflichen Gründen scheinen ein weiteres Risiko für die Ausbreitung von Infektionskrankheiten zu sein. Junge Ärzte sind zudem mit so „eingeschleppten“ Krankheitsbildern, die sie bestenfalls nur aus Lehrbüchern, nicht aber aus dem klinischen Alltag kennen, überfordert.

Das Auftreten von neuen Erregern (*E. coli* O157:H7) oder die Entdeckung von Erregern als Ursache von bekannten Krankheiten (*H. pylori* als Ursache einer chronischen Gastritis) unterstreichen ebenso die aktuelle Bedeutung von Infektionskrankheiten (Domann, 1997a).

Durch Großproduktion in der Lebensmittelindustrie und der weltweiten Auslieferung führen kontaminierte Lebensmittel nicht mehr nur zu lokalen Ereignissen, sondern stellen auch ein globales Problem dar. *L. monocytogenes* gehört wie *E. coli* O157:H7 oder *Vibrio vulnificus* zu Krankheitserregern, die in den letzten Jahren v.a. durch Infektionen aufgrund von kontaminierten Lebensmitteln aufgetreten sind. Erkrankungen nach dem Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln fordern in den USA z.B. jährlich mehrere tausend Tote (Tauxe, 1997). *L. monocytogenes* ist aufgrund seiner Widerstandsfähigkeit (siehe Kapitel 1.2) in der Lage, unter extremen Bedingungen in Lebensmitteln zu überleben. Ferner ist eine Kontamination durch diesen Erreger für den Verbraucher kaum zu erkennen, da die Nahrung äußerlich unverändert ist. Lebensmittelbedingte Infektionen durch *L. monocytogenes* nehmen nach Daten aus dem Ausland zu (McLauchlin, 1990). In den USA konnten jedoch durch Anstrengungen der Lebensmittelindustrie Listerienkontaminationen eingedämmt und rückläufige Erkrankungszahlen beobachtet werden (Tappero *et al.*, 1995).

Damit sich neue Ansätze für Prophylaxe und Therapie ergeben können, sollten Pathogenitätsmechanismen besser erforscht und verstanden werden, zumal die Konzentration auf die Entwicklung neuer Antibiotika im Fall von bakteriellen Infektionskrankheiten nicht ausreicht, wie die schnell zunehmende Resistenzentwicklung zeigt. Grundlagenforschung hilft u.a. bei der Suche nach Impfstoffen z.B. durch die Identifizierung der entscheidenden Antigene eines Erregers. Die Entwicklung von einfachen und daher billigen Maßnahmen der Prophylaxe und Therapie ist wünschenswert, um die medizinische Versorgung auch in armen Regionen zu verbessern.

1.2 *L. monocytogenes* – Mikrobiologie und Taxonomie

Das human- und tierpathogene Bakterium *L. monocytogenes* gehört zu den gram-positiven, nicht-sporenbildenden, regelmäßig geformten Stäbchen. Es wächst bei Temperaturen von – 0,4 bis 50 °C und ist fakultativ anaerob (Junttila *et al.*, 1989; Walker & Stringer, 1987). *L. monocytogenes* vermehrt sich bei extremen pH-Werten und NaCl-Konzentrationen (Parish & Higgins, 1989; Buchanan & Phillips, 1990) und zeigt auf Blutagarplatten β -Hämolyse. Das Katalase-positive und Oxidase-negative Bakterium ist peritrich begeißelt, weist jedoch eine herabgesetzte Produktion von Flagellin bei 37 °C auf (Peel *et al.*, 1988). *L. monocytogenes* wurde in 13 Serovaren unterteilt (Seeliger, 1958; Donker-Voet, 1972) und ist ubiquitär auf

Pflanzen, im Erdboden und in Wasserproben verbreitet (Weis & Seeliger, 1975). Es wurde in Kuhmilch, tierischer und menschlicher Fäzes nachgewiesen (McCarthy, 1990). Zu der Gattung *Listeria* gehören außer *L. monocytogenes* die ebenfalls human- und tierpathogene Spezies *L. ivanovii* und die apathogenen Spezies *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* und *L. murrayi* (Jones & Seeliger, 1987).

1.3 Listeriose

Die Inzidenz der Listeriose liegt in der Bundesrepublik Deutschland bei ca. 6/10⁶/Jahr (Farber & Peterkin, 1991). Erfasst werden in Deutschland allerdings nur konnatale Listeriosen und die meningitische Verlaufsform. Die Serovare 1/2a, 1/2b und 4b von *L. monocytogenes* verursachen am häufigsten diese Infektionskrankheit (Rocourt, 1991). Infektionsquellen sind (außer für Feten) v.a. kontaminierte Milchprodukte wie Weichkäse (Bille, 1990) oder rohes Gemüse (Schlech *et al.*, 1983). Die Inkubationszeit variiert zwischen wenigen Tagen und mehreren Wochen (Schuchat *et al.*, 1991). 5 – 10 % der Normalbevölkerung sind gesunde Träger, bei denen der Erreger im Stuhl nachgewiesen werden kann (Farber & Peterkin, 1991). Eine Infektion mit dem intrazellulären Bakterium verläuft dem Zustand des Immunsystems entsprechend unterschiedlich. Die Möglichkeit einer Impfung ist nicht gegeben.

Die Mehrheit der Infektionen von immunkompetenten Personen verläuft inapparent. Neben den Zellen des Immunsystems bietet das saure Milieu des Magens Schutz, das im Tierversuch das zur Erkrankung notwendige Inokulum steigert (Schlech, 1990). Auch bei Personen, die diese intakten Mechanismen aufweisen und als gesund gelten, werden sporadische und epidemische Infektionen durch kontaminierte Nahrungsmittel beobachtet (Schlech *et al.*, 1983; Azadian *et al.*, 1989).

Die Listeriose manifestiert sich in vielfältigen Fokalinfectionen wie Endophthalmitis, Peritonitis, Osteomyelitis, Leberabszess, Pneumonie, Pleuritis und Cholezystitis.

Listerien können über hämatogene Streuung bei Personen mit vorgeschädigten oder künstlichen Herzklappen eine Endokarditis verursachen.

Bei einer ZNS-Beteiligung sind v.a. die Meningen betroffen. Enzephalitiden und Abszesse treten ebenfalls auf. Die Symptome der ZNS-Infektion umfassen Fieber, Ataxien, Veränderungen der Persönlichkeit und des Bewußtseinszustandes.

Aus einer Fokalinfection mit Listerien kann sich wie bei anderen pathogenen Keimen eine Sepsis entwickeln (Schuchat *et al.*, 1991; Farber & Peterkin, 1991).

Eine Infektion während der Schwangerschaft kann in jedem Trimenon vorkommen und wird durch die in der Schwangerschaft reduzierte zellvermittelte Immunität unterstützt (Weinberg, 1984). 2/3 der schwangeren und mit Listerien infizierten Frauen präsentieren einen milden Krankheitsverlauf mit unspezifischen Symptomen wie Fieber, Myalgien und Rückenschmerzen (McLauchlin, 1990; Boucher & Yonekura, 1984). Abdominalschmerzen, Diarrhö, Übelkeit und Erbrechen können weitere Symptome sein. Das Vollbild der Listeriose manifestiert sich bei der Schwangeren selten (Farber & Peterkin, 1991).

Die perinatale Listeriose – eine Infektion des Kindes bei Erkrankung der Mutter kann, muß jedoch nicht erfolgen (Cruikshank & Warenski, 1989; Smith *et al.*, 1983) – wird nach dem zeitlichen Auftreten der Symptome unterteilt. Unter einem frühen Auftreten („early onset“)

wird das Krankheitsbild verstanden, bei dem Symptome am ersten und zweiten Lebenstag, spätestens innerhalb der ersten Woche nach der Geburt auftreten. Die Infektion des Feten geschieht diaplazentär bei Bakteriämie der Schwangeren oder durch ascendierende Erreger aus der Vagina und wird evtl. durch die lokale plazentäre Suppression der zellvermittelten Immunität begünstigt. Die Aspiration von infektiösem Fruchtwasser trägt möglicherweise zur Pathogenese bei (Schuchat *et al.*, 1991; Redline & Lu, 1987). Diese Form der neonatalen Listeriose kann Hautläsionen, Pneumonie evtl. mit Atemnotsyndrom, Sepsis und das Syndrom Granulomatosis infantiseptica beinhalten. Das Syndrom Granulomatosis infantiseptica ist durch disseminierte Abszesse in verschiedenen Organen wie Leber, Milz, Lunge und Plazenta charakterisiert (Farber & Peterkin, 1991). Das frühe Auftreten der Krankheit ist häufig mit Komplikationen wie Amnioninfektionssyndrom, Früh- und Totgeburt verbunden. Das späte Auftreten („late-onset“) der Krankheit wird nach der ersten Lebenswoche beobachtet (Schuchat *et al.*, 1991). Die Pathogenese ist nicht klar. Der Fetus wird möglicherweise beim Durchtritt durch den Geburtskanal oder nosokomial infiziert (McLauchlin, 1990). Bei dieser Form ist eine Meningitis das häufigste Krankheitsbild. Die Schwangerschaft und Geburt verläuft anders als im frühen Auftreten der Listeriose oft unkompliziert und termingerecht. Die Letalität ist in der Frühform mit 15 bis 50 % größer als beim späten Auftreten der neonatalen Listeriose (10 bis 20 %) (Farber & Peterkin, 1991).

Bis auf die bereits erwähnten seltenen Erkrankungen von immunkompetenten Personen tritt eine nicht mit einer Schwangerschaft assoziierte Listeriose gehäuft bei älteren Menschen oder Personen mit Immunsuppression auf. Die chronische Einnahme von Glukokortikoiden bei Autoimmunerkrankungen oder anderen Immunsuppressiva durch Transplantatempfänger, maligne Erkrankungen, Diabetes mellitus, Alkoholismus, Herz-, Leber- und Nierenerkrankungen sind prädisponierende Faktoren (Nieman & Lorber, 1980; Schwartz *et al.*, 1988). Obwohl Listerien kein typischer opportunistischer Erreger bei AIDS-Patienten sind, kommt Listeriose bei diesen Patienten häufiger vor als in der Gesamtbevölkerung (Gellin *et al.*, 1991).

Eine sichere Diagnose ist der bakteriologische Nachweis von *L. monocytogenes* durch Kultivierung aus physiologisch sterilen Proben wie Blut oder Liquor. Eine Isolierung aus Plazenta und Fruchtwasser bei bestehenden klinischen Symptomen deutet auf eine Erkrankung hin. Der Nachweis im Stuhl ist nicht von großem Nutzen, da gesunde Träger vorkommen. Die humorale Immunantwort richtet sich bei an Listeriose Erkrankten gegen eine Reihe von Antigenen (LLO, IrpA, InlB und ActA). Bei gesunden Personen mit Kontakt zu *L. monocytogenes* lassen sich nur Antikörper gegen LLO und IrpA detektieren, während gesunde Personen ohne bekannten Kontakt keine Antikörper gegen die genannten Proteine aufweisen. Dies kann diagnostisch genutzt werden (Grenningloh *et al.*, 1997).

Als Therapie der Wahl wird die Kombination eines β -Laktam-Antibiotikums (Ampicillin) und eines Aminoglykosids (Gentamicin) mit synergistischem Effekt angesehen (Boisivon *et al.*, 1990). Die Dauer der Therapie beträgt je nach Krankheitsbild 2 bis 6 Wochen (Gellin & Broome, 1989).

Als Prophylaxe sollten besonders gefährdete Personen nur pasteurisierte Milch trinken, nur vollständig gegartes Fleisch essen und Gemüse vor dem Verzehr sorgfältig putzen (Schuchat *et al.*, 1991; Buchdahl *et al.*, 1990).

Listeriose ist eine ernsthafte Erkrankung, da die Infektion v.a. über industriell gefertigte Nahrungsmittel erfolgt und relativ unspezifisch, also schwer erkennbar abläuft. Die Letalität von bis zu 30 % (Hof *et al.*, 1997) und das Risiko für Immunsupprimierte – ein Patientengut, das z.B. durch Transplantationen noch größer werden wird – machen auf den Erreger *L. monocytogenes* aufmerksam. Dieser ist - wie das klinische Bild zeigt - in der Lage, die Darmbarriere, die Blut-Hirn- und die Plazentaschranke zu überwinden. Die Aufklärung dieser Pathogenitätsmechanismen, die Adhäsion an das Wirtsgewebe und die folgende Invasion, erscheint daher notwendig und interessant.

1.4 Die Immunantwort auf eine Listerieninfektion im Mausmodell

Die Listeriose ist das bevorzugte System für die Analyse der zellvermittelten Immunität. Sie hat die Dominanz der Tuberkulose als Infektionsmodell übernommen, weil die Listeriose der Maus ein Tiermodell bietet, das relativ einfach durchführbar und reproduzierbar ist, eine granulomatöse Entzündungsreaktion hervorruft und unter Sicherheitsstandards kaum Gefahr für den im Labor arbeitenden Menschen birgt.

Immunität gegen Listerien wird durch verschiedene Zellen und Zytokine erreicht, die in unterschiedlichen Phasen der Infektion aktiviert werden.

Tab. 1.1: Immunantwort in verschiedenen Phasen der Listerieninfektion (nach Unanue, 1997).

Phase	Vorgänge					
exponentielle Wachstumsphase	1) steady-state Produktion von IFN- γ induziert Makrophagen-Aktivierung: aktivierte Kupffer-Sternzellen vermindern Wachstum von Listerien in der Leber					
24 – 48 h	1) Rekrutierung von Makrophagen und PMNs an Infektionsfoki	2) Prostaglandine, IL-1 und TNF werden an Infektionsfoki ausgeschüttet	3) Mikroabszesse in der Leber – Kontrolle durch PMNs	4) Apoptose von Lymphozyten in durch Makrophagen und PMNs infiltrierte lymphatischen Organen		
72 h und später	1) aktivierte Makrophagen vorherrschend	2) Sekretion von IL-12, TNF α , IL-1 und IL-6 durch Makrophagen	3) IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen schränkt Listerienwachstum ein	4) Rekrutierung, Aktivierung von T-Zellen	5) Granulomentstehung mit weiterer Einschränkung des Listerienwachstums	6) Elimination der Listerien durch T-Zellen

Innerhalb der ersten 24 h p.i. limitieren v.a. Kupffer-Sternzellen das exponentielle Wachstum der hämatogen in die Leber gestreuten Listerien. Durch lokale und/oder systemische Stimulierung von unbekanntem Faktoren vor der Listerieninfektion wird IFN- γ produziert, das zu einer Grundaktivierung der Makrophagen führt (Merrick *et al.*, 1997). Aktivierte Makrophagen sind durch eine erhöhte Expression von MHC II-Molekülen und einer dadurch gesteigerten Antigen-Präsentation charakterisiert.

Nach 24 bis 48 h p.i. werden Makrophagen und Neutrophile an Infektionsfoki rekrutiert. Als Zytokine sind in dieser Phase der Infektion IL-1, TNF und Prostaglandine beteiligt. IL-1 wirkt nicht direkt chemotaktisch für Neutrophile, regt jedoch Endothelzellen zur Produktion von E-Selektinen an, die als Mediatoren für die Adhäsion der Neutrophilen an Endothelzellen wirken (Bevilacqua *et al.*, 1985). Es aktiviert Neutrophile (Sullivan *et al.*, 1989) und ist an der Mobilisierung aus dem Knochenmark beteiligt (Dinarello, 1992). Ferner könnte es positiv auf die Expression von MHC II-Molekülen auf Makrophagen wirken (Rogers *et al.*, 1994). TNF spielt möglicherweise eine Rolle bei den zytotoxischen Effekten der Makrophagen und durch Aktivierung der Gefäße in der lokalen Entzündungsreaktion (Old, 1985). Prostaglandine scheinen über die Regulation des Gefäßtonus und der -permeabilität die Streuung der Listerien zu vermindern (Tripp *et al.*, 1987). Die v.a. in der Leber liegenden Infektionsfoki sind histologisch durch Mikroabszesse aus einer zentralen und einer peripheren Zone gekennzeichnet. Die zentrale Zone besteht aus toten Neutrophilen und Listerien, in der Peripherie befinden sich Neutrophile und infizierte apoptotische Hepatozyten. Zu diesem Zeitpunkt hat also ein Übertritt der Listerien aus Kupffer-Sternzellen in Hepatozyten stattgefunden. Der bakterizide Effekt der Neutrophilen gegenüber Listerien ist zwar in Zellkulturversuchen beschrieben (Czuprynski *et al.*, 1984; Alford *et al.*, 1990), aber nicht in seinem Mechanismus komplett aufgeklärt. Die Apoptose der Hepatozyten steht in engem zeitlichen Zusammenhang mit der Infiltration der Neutrophilen. Eine intensive Apoptose zeigen auch Lymphozyten. In Lymphknoten und der Milz werden Läsionen mit Makrophagen- und Neutrophilen-Infiltration und anderen toten Zellen, v.a. Lymphozyten, gefunden. Ursache für die multiplen Läsionen ist wahrscheinlich der Virulenzfaktor LLO (Merrick *et al.*, 1997; Guzman *et al.*, 1996; Rogers *et al.*, 1996).

Nach 72 h und mehr p.i. produzieren aktivierte Makrophagen, wenn sie Listerien und IFN- γ ausgesetzt wurden, NO-, das entweder allein oder mit einem anderen Faktor zusammen einen zytotoxischen Effekt hat (Beckermann *et al.*, 1993). Außerdem wird von den Makrophagen in diesem Stadium IL-12, TNF, IL-1 und IL-6 produziert. IL-6 ist ein wichtiges Zytokin in der Immunantwort (Liu *et al.*, 1994; Dalrymple *et al.*, 1995), sein Mechanismus jedoch nicht aufgeklärt. *In vitro* induzieren Listerien die Produktion von IL-12 und TNF durch Makrophagen. Beide Zytokine zusammen induzieren wiederum die Produktion von IFN- γ durch NK (Tripp *et al.*, 1993). Diese Rolle von IL-12 konnte auch *in vivo* für SCID-Mäuse (severe combined immunodeficiency; Mäuse, deren Lymphozyten der Antigen-Rezeptor fehlt) nachgewiesen werden (Tripp *et al.*, 1994). Welche Funktion die Kommunikation von Makrophagen und NK durch IL-12 und TNF und die daraus resultierende Produktion von IFN- γ in normalen/non-SCID Mäusen einnimmt, ist nicht klar, da eine Behandlung der NK mit einem Antikörper nicht zu einer verminderten Resistenz gegenüber Listerien führt (Teixeira & Kaufmann, 1994; Takada *et al.*, 1994). IL-12 hat neben dem Effekt auf NK auch Auswirkungen auf die Differenzierung von CD4⁺-Zellen. Es bewirkt eine Th 1-Anwort der CD4⁺-Zellen mit Produktion von IFN- γ und IL-2 (Hsieh *et al.*, 1993) und nimmt daher sowohl Einfluß auf die T-Zell-abhängige wie -unabhängige Immunantwort (Tripp & Unanue, 1995). Die Aktivierung der Makrophagen durch IFN- γ - entweder von NK oder T-Zellen produziert - dient auch der verbesserten Antigen-Präsentation für T-Zellen. CD4⁺-Zellen werden eher

durch Listerien, die sich in einer Vakuole befinden, aktiviert. Für die Aktivierung von CD8⁺-Zellen ist dagegen LLO und der Übertritt in das Zytosol der Wirtszelle notwendig (Ladel *et al.*, 1994; Brunt *et al.*, 1990). Auch andere T-Zellen sind in der Immunantwort identifiziert worden (Pamer *et al.*, 1993; Skeen & Ziegler, 1993). Für die vollständige Elimination einer Listerieninfektion sind T-Zellen verantwortlich, da SCID-Mäuse im Gegensatz zu normalen Mäusen auch nach Monaten noch einen Trägerstatus haben (Bancroft *et al.*, 1986). CD8⁺-Zellen lysieren infizierte Zellen, die über MHC I ein Antigen präsentieren, mit dem Protein Perforin und töten so intrazelluläre Listerien (Kagi *et al.*, 1994). Ob es sich dabei um einen Zytokin-unabhängigen oder –abhängigen Mechanismus oder um verschiedene Wege handelt, ist nicht geklärt. CD8⁺-Zellen scheinen wichtiger als CD4⁺-Zellen zu sein, da Mäuse, denen CD8⁺-Zellen fehlen, empfindlicher auf sublethale Dosen reagieren als Mäuse, denen CD4⁺-Zellen fehlen (Ladel *et al.*, 1994).

An der Immunantwort bei einer Listerieninfektion sind in verschiedenen Phasen zahlreiche Zellen und Zytokine beteiligt. Makrophagen, NK und Neutrophile dominieren die frühe Phase. Neutrophile sind v.a. für die Abwehr in der Leber wichtig. Über IL-12 und TNF interagieren Makrophagen als Produzenten dieser Zytokine und NK, die dadurch zur Produktion von IFN- γ stimuliert werden. IFN- γ wiederum aktiviert Makrophagen. T-Zellen sind für die vollständige Elimination von Listerien verantwortlich. Makrophagen nehmen über Antigen-Präsentation und Th 1-Differenzierung auch Einfluß auf die T-Zell-Antwort. Somit sind T-Zell-abhängige und –unabhängige Mechanismen der Immunantwort miteinander verbunden.

1.5 Aufklärung von Pathogenitätsmechanismen durch Zellkulturversuche und genetische Veränderung von Listerien

Außer dem Tiermodell der Listerieninfektion mit Mäusen stehen inzwischen zusätzliche Techniken zur Verfügung, um die Grundlagen der Pathogenitätsmechanismen von Listerien aufklären zu können. Das Infektionsmodell mit Zellkulturen und die genetische Veränderung von Listerien hat zur Identifizierung und Charakterisierung von verschiedenen Virulenzfaktoren beigetragen. Zu den genetischen Werkzeugen gehören der Gebrauch von Transposon-Mutanten (Gaillard *et al.*, 1987), die Transformation von Plasmid-DNA (Park & Stewart, 1990), die Komplementation mit Vektoren (Leimeister-Wächter *et al.*, 1990), die Herstellung von Insertionsmutanten und in frame-Deletionsmutanten (Wuenscher *et al.*, 1991) und die Expression von einzelnen oder mehreren Virulenzgenen durch nicht-pathogene *L. innocua* (Gaillard *et al.*, 1991). Zellkulturversuche wie Plaque- und Invasionsassays (Gaillard *et al.*, 1991; Sun *et al.*, 1990) sind von großem Nutzen, um nach Mutanten zu suchen, während das Beobachten des intrazellulären Zyklus von *L. monocytogenes* Informationen über die Interaktion zwischen Bakterium und Wirt gibt (Theriot *et al.*, 1994). Die weiterentwickelte biochemische Reinigung von Proteinen und ihre immunologische Identifizierung tragen zu genauerem Wissen über die Funktion von Virulenzgenen und ihre Interaktionen bei (Chakraborty & Wehland, 1997).

1.6 Virulenzfaktoren und Infektionszyklus von *L. monocytogenes*

1.6.1 Organisation und Regulation der Virulenzgene

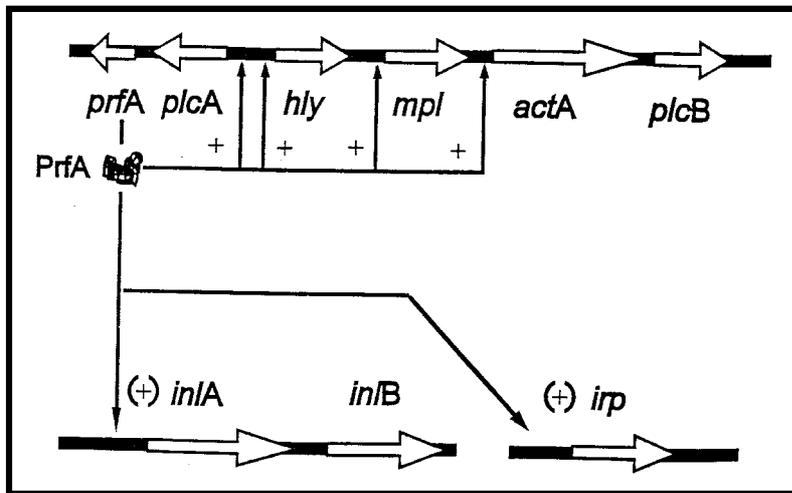


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Organisation der Virulenzgene und der Regulation durch PrfA. (+) und + symbolisieren die starke bzw. sehr starke positive Regulation durch PrfA (nach Chakraborty & Wehland, 1997).

Die bekannten Virulenzgene von *L. monocytogenes* liegen auf 3 Abschnitten des Genoms. Die Gene *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB* liegen zusammen auf dem sogenannten Virulenzgencluster, *inlA* und *inlB* sind in einem unabhängigen Operon organisiert und *irpA* ist ein einzelnes chromosomales Virulenzgen (Abb. 1.1).

Als wesentlicher Regulator der Virulenzgenexpression wurde *prfA* identifiziert (Leimeister-Wächter *et al.*, 1990). *prfA* kodiert für ein 27 kDa schweres Protein, PrfA, das an konservierte 14 bp-Palindromsequenzen bindet, sogenannte PrfA-Boxen, die in der -35 Region stromaufwärts der Promotoren der durch PrfA regulierten Gene liegen. Durch die Bindung an die PrfA-Boxen und die direkte Interaktion mit RNA-Polymerase aktiviert PrfA Genexpression (Freitag *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 1995). *prfA* unterliegt einer Autoregulation. Es unterstützt seine eigene Expression, da es den Promotor von *plcA* aktiviert und mit ihm zusammen bicistronisch transkribiert wird (*prfA* wird auch monocistronisch durch eine PrfA-unabhängige Promotorregion abgelesen). Da das Protein in der stationären Wachstumsphase vermindert produziert wird, übernimmt es wahrscheinlich auch eine Funktion in seiner Negativregulation (Freitag *et al.*, 1993; Mengaud *et al.*, 1991a).

PrfA aktiviert die Transkription der *hly*-, *plcA*-, *actA*- und *mpl*-Promotoren und ist für die Expression von *plcA*, *mpl*, *actA* und *plcB* essentiell, da Mutanten, in denen *prfA* deletiert ist, die genannten Gene nicht exprimieren können (Mengaud *et al.*, 1991a; Chakraborty *et al.*, 1992). Das Gen *hly* besitzt als einziges Gen des Virulenzgenclusters einen zusätzlichen schwachen PrfA-unabhängigen Promotor (Domann *et al.*, 1993). Zusätzliche Kopien des *prfA*-Gens steigern die Expression aller Gene auf dem Virulenzgencluster. Die Expression der Virulenzgene wird zusätzlich durch die Temperatur mit einem Optimum bei 37 °C reguliert (Leimeister-Wächter *et al.*, 1992).

PrfA hat ebenso auf die Expression von *inlA*, *inlB* und *irpA* einen deutlichen Effekt, da Komplementanten mit höherer Kopienzahl von *prfA* eine höhere Expression der Gene aufweisen. Die Gene werden schwächer exprimiert, wenn *prfA* deletiert ist. Vor *inlA* befinden sich 4 Promotoren, von denen einer PrfA-abhängig ist und die Transkription des gesamten Operons startet. Die Transkription durch die PrfA-unabhängigen Promotoren wird durch die Region zwischen *inlA* und *inlB* terminiert, während bei der bicistronischen mRNA-Produktion durch Antitermination des Transkripts das gesamte Operon abgelesen wird. Die Expression von *inlB* findet v.a. zusammen mit *inlA*, weniger durch den eigenen PrfA-unabhängigen Promotor statt. Analoges gilt für *irpA*, das v.a. durch seinen stärkeren PrfA-abhängigen und weniger durch den schwächeren PrfA-unabhängigen Promotor transkribiert wird. Expression von *inlA*, *inlB* und *irpA* ist bei Temperaturen von 20 oder 25 °C schwächer als bei 37 °C (Lingnau *et al.*, 1995; Lingnau *et al.*, 1996; Dramsi *et al.*, 1993).

Die Affinität von PrfA zu den PrfA-abhängigen Promotoren ist unterschiedlich. Bei einem Sequenzvergleich zeigen die Palindrome von *actA* und *mpl* einen Basenunterschied, die von *inlA* und *irpA* zwei Basenunterschiede im Vergleich zu den Palindromen von *hly* und *plcA* (Dramsi *et al.*, 1993; Domann *et al.*, 1997b). Die Affinität von PrfA zu den Boxen von *hly* und *plcA* ist größer als die zu den Boxen von *actA*, *mpl* und *inlA* (Freitag & Portnoy, 1994; Sheehan *et al.*, 1995; Lingnau *et al.*, 1995). *L. monocytogenes* verfügt über mindestens drei Arten von Promotoren: 1) Promotoren, die kein PrfA zur Transkription benötigen. 2) Promotoren, an die PrfA mit geringerer Affinität bindet und daher eine größere Menge PrfA benötigen, um aktiviert zu werden. 3) Promotoren, an die PrfA mit einer höheren Affinität bindet. Diese Hierarchie der PrfA-regulierten und nicht PrfA-regulierten Genexpression könnte eine größere Flexibilität in der Expression der Virulenzgene bedeuten (Freitag *et al.*, 1992; Lingnau *et al.*, 1995). PrfA hat Homologien mit anderen Transkriptionsregulatoren wie z.B. Fnr und Crp von *E. coli* (Lampidis *et al.*, 1994).

1.6.2 Infektionszyklus und die daran beteiligten Virulenzgene

1.6.2.1 Adhäsion und Aufnahme in eukaryontische Zellen

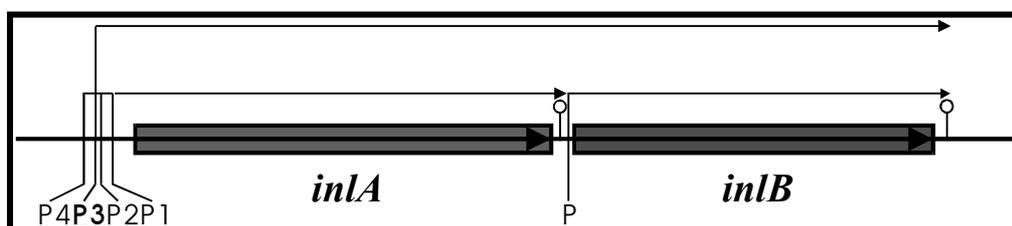


Abb. 1.2: Die Organisation des *inlAB*-Operons mit Promotoren (P) und Terminatoren (Symbol) (nach Lingnau *et al.*, 1995).

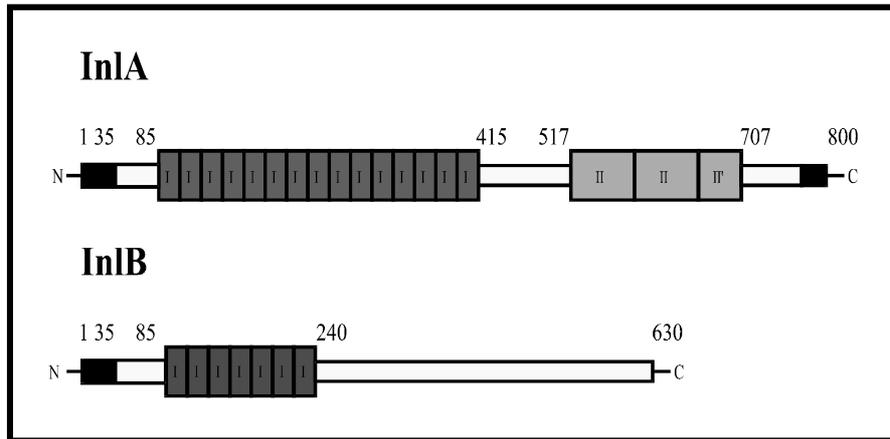


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Proteine InlA und InlB. Die Zahlen kennzeichnen Positionen in der Aminosäuresequenz.

Für die Bindung an und die Aufnahme in nicht-phagozytierende Wirtszellen sind die Produkte des *inlAB*-Operons verantwortlich (Abb. 1.2 und 1.3). Durch Transposon-Mutagenese hergestellte Mutanten von *L. monocytogenes*, bei denen Insertionen stromaufwärts des *inlAB*-Operons eingefügt wurden, waren nicht in der Lage, die Enterozyten-ähnliche Zelllinie Caco-2 zu invadieren. Je nach Zelllinie sind beide Genprodukte für die Adhäsion und induzierte Aufnahme unterschiedlich ausgeprägt wirksam, wie durch isogene Deletionsmutanten gezeigt werden konnte (Gaillard *et al.*, 1991; Lingnau *et al.*, 1995; Dramsi *et al.*, 1995).

Vor dem Gen *inlA* liegen stromaufwärts 4 Promotoren, von denen einer PrfA-abhängig ist und für die Transkription des ganzen *inlAB*-Operons verantwortlich ist. Die Transkription durch den PrfA-abhängigen Promotor wird demnach nicht durch den stromabwärts von *inlA* liegenden Terminator gestoppt (s.o.). *inlA* kodiert für ein 800 Aminosäuren langes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 88 kDa. Es besteht vom N-Terminus ausgehend aus einem Signalpeptid-Abschnitt, der für den Transport des Proteins an die Bakterienoberfläche wichtig ist und aus 35 Aminosäuren besteht. Es folgen 15 hintereinander liegende, aus je 22 Aminosäuren bestehende Leucin-reiche Motive oder Repeats (LRR), die von der Aminosäureposition 85 bis 415 reichen. Anschließend erscheint eine in InlA, InlB und IrpA konservierte Region aus 72 Aminosäuren. Eine zweite Region mit Wiederholungsmotiven bildet eine Zellwanddomäne und reicht von Position 517 bis 707. Diese besteht aus zwei Motiven mit je 70, und einem mit 49 Aminosäuren. C-terminal bilden ein Membran-Anker mit dem Motiv LPTTGD, ein hydrophober Abschnitt mit 20 Aminosäuren und einem positiv geladenen Endstück aus 7 Aminosäuren den Abschluß (Gaillard *et al.*, 1991; Lingnau *et al.*, 1995). Als Rezeptor für InlA auf Epithelzellen ist das Glykoprotein E-Cadherin identifiziert worden. Die InlA-E-Cadherin-Interaktion ist Ca^{2+} -abhängig und findet zwischen der Domäne der Leucin-reichen Repeats und dem Rezeptor statt (Mengaud *et al.*, 1996a; Mengaud *et al.*, 1996b; Lecuit *et al.*, 1997). E-Cadherin wird auf Epithelgewebe v.a. in der Haut, der Leber und im Gastrointestinaltrakt exprimiert. InlA ist, wie bereits erwähnt, für die Invasion in die Epithelzelllinie Caco-2 notwendig. Das gereinigte Protein alleine kann die Aufnahme von Latexkugeln und nicht invasiven Bakterien in eukaryontische Zellen induzieren (Gaillard *et al.*, 1991; Lecuit *et al.*, 1997; Dissertation Lingnau). Die genauen Zielzellen von *L.*

monocytogenes im Gastrointestinaltrakt und die Rolle der Internaline *in vivo* sind nicht bekannt. In differenzierten Enterozyten wird das Glykoprotein an der basolateralen Oberfläche exprimiert (Hermiston & Gordon, 1995). Tierversuche haben eine Penetration des Erregers in den Peyer-Plaques gezeigt, so daß M-Zellen evtl. als Eintrittspforte genutzt werden (MacDonald & Carter, 1980; Marco *et al.*, 1992). Enterozyten werden demnach basolateral sekundär invadiert. Andere Untersuchungen zeigten keine besondere Affinität von *L. monocytogenes* zu Peyer-Plaques gegenüber Enterozyten, keine Abhängigkeit der Translokation über die Epithelbarriere von bekannten Virulenzfaktoren, aber eine höhere Replikationsrate in den Plaques aufgrund von nicht genauer definierten mononukleären Zellen (Pron *et al.*, 1998). Für die Adhäsion an und Aufnahme in Makrophagen sind die Komplementfaktoren C1q und C3b und deren Rezeptoren auf den phagozytierenden Zellen verantwortlich (Alvarez-Dominguez *et al.*, 1993). Beteiligt sind auch Makrophagen-Rezeptoren, die Lipoteichonsäuren auf der Bakterienoberfläche erkennen (Dunne *et al.*, 1994).

Dem Gen *inlB* geht ein schwacher eigener Promotor voraus, der die Transkription des einzelnen Gens startet. Der PrfA-abhängige Promotor vor *inlA* (s.o.) bewirkt eine quantitativ höhere Expression von InlB (dann zusammen mit InlA). Das Polypeptid InlB besteht aus 630 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 65 kDa. Die Aminosäuresequenz des Proteins besteht vom N-Terminus ausgehend wie bei InlA aus einem Signalpeptid und Leucin-reichen Repeats bestehend aus je 22 Aminosäuren. Bei InlB sind es jedoch sieben Repeats, die die Aminosäuren 85 bis 240 umfaßt. Die erwähnte konservierte Region folgt auf die Region der Wiederholungsmotive. Zudem besitzt InlB C-terminal eine Membran-Anker-Sequenz aus 232 Aminosäuren, in der 2 Repeats aus 67 und 72 Aminosäuren liegen. Die wiederholten Sequenzen beginnen mit den Aminosäuren GW. Über diese Membran-Anker-Sequenz kann das gereinigte Protein an andere gram-positive Bakterien binden und die Aufnahme in eukaryontische Zellen induzieren (Gaillard *et al.*, 1991; Braun *et al.*, 1997; Müller *et al.*, 1998). InlB wird im Gegensatz zu InlA stärker in den Kulturüberstand abgegeben (Lingnau *et al.*, 1995). InlB ist *in vitro* notwendig für die Invasion in Hepatozyten (Dramsi *et al.*, 1995) und für einige Epithelzelllinien (Ireton *et al.*, 1996). Für die *in vivo*-Invasion in Hepatozyten werden sowohl *inlAB*-abhängige als auch –unabhängige Mechanismen diskutiert (Gregory *et al.*, 1996; Gaillard *et al.*, 1996).

irpA kodiert für ein Protein, das Sequenzhomologien zu InlA und InlB hat. Die *in vitro*-Invasion in Zellkulturen ist in der isogenen Deletionsmutante unverändert, die Virulenz *in vivo* ist attenuiert (Domann *et al.*, 1997b). Die Genprodukte von 4 weiteren Genen – *inlC2*, *inlD*, *inlE* und *inlF* – zeigen ebenfalls Homologien zu InlA und InlB. Daher wird die Gruppe der Internalin-Gene als Multigenfamilie bezeichnet. Auf die Invasion in Zellkulturen haben diese Gene keinen Einfluß (Dramsi *et al.*, 1997).

Die Internaline gehören zu einer Gruppe von über 60 bekannten Proteinen mit Leucin-reichen Repeats. Gemeinsam ist den Proteinen eine konservierte Sequenz innerhalb der LRR, die meist 20 bis 29 Aminosäuren umfaßt und paarweise bis zu 30mal wiederholt wird, und eine spezifische Funktion bei Protein-Protein-Interaktionen besitzt. Unter Prokaryonten besitzen nur pathogene Bakterien wie *Shigella flexneri* (Genprodukt von *ipaH*), *Y. pestis* (YopM-Protein), *Bordetella pertussis* (filamentous haemagglutinin protein) und *Trepomema pallidum*

(TpLRR-Protein) Proteine mit LRR (Kobe & Deisenhofer, 1994; Makhov *et al.*, 1994; Shevchenko *et al.*, 1997).

1.6.2.2 Austritt aus Vakuolen in das Zytoplasma

L. monocytogenes verfügt über einen Mechanismus, nach der *inlAB*-abhängigen oder – unabhängigen Aufnahme in die Wirtszelle aus der Vakuole heraus in das Zytoplasma zu gelangen. Für diesen Mechanismus sind wahrscheinlich 2 Gene verantwortlich. Das Gen *hly* auf dem Virulenzgencluster kodiert für das aus 529 Aminosäuren bestehende und 58 kDa schwere Protein Hämolysin oder Listeriolysin O (LLO) (Gaillard *et al.*, 1986). Listeriolysin O gehört zu den Sulfhydryl-aktivierten Toxinen mit zytolytischer Aktivität bei einem pH-Optimum von 5,6 und bindet an Cholesterin (Geoffroy *et al.*, 1987). Das Protein ist also in einer Vakuole mit saurem pH aktiv. Streptolysin ist ein weiterer Vertreter dieser Porenbildenden Zytolysine (Smyth & Duncan, 1978). Mutanten, die das Protein nicht exprimieren können, verlassen nicht die Vakuole der Wirtszelle, zeigen kein Wachstum und sind *in vivo* avirulent (Tilney & Portnoy, 1989; Gaillard *et al.*, 1987; Kuhn *et al.*, 1988). Das nicht pathogene Bakterium *Bacillus subtilis* kann in Phagozyten überleben und wachsen, wenn es mit Hilfe eines rekombinanten Plasmids Listeriolysin O produziert (Bielecki *et al.*, 1990). Listeriolysin O hat darüber hinaus Funktionen in der Signaltransduktion in der Endothelzelllinie HUVEC (Sibelius *et al.*, 1996), bei der Induktion von Apoptose (Guzman *et al.*, 1996; Rogers *et al.*, 1996) und der Aktivierung von CD8⁺-Zellen (Darji *et al.*, 1995). Stromaufwärts von *hly* liegt das Gen *plcA*, dessen Produkt PlcA eine Phosphatidyl-Inositol-Phospholipase C (PI-PLC, PlcA) ist. Diese Phospholipase wirkt synergistisch mit LLO beim Austritt aus der Vakuole durch Lyse der Membran (Goldfine *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1995).

1.6.2.3 Intrazelluläre Mobilität

L. monocytogenes bewegt sich nach Verlassen der Vakuole durch das Zytoplasma der Wirtszelle, um andere Zellen zu invadieren. *actA* ist für diesen Fortbewegungsmechanismus essentiell. *actA* kodiert für ein 639 Aminosäuren langes und 90 kDa schweres oberflächenassoziiertes Polypeptid. Es besitzt eine N-terminale Signalsequenz, eine zentrale Region mit 4 sich wiederholenden Prolin-reichen Motiven und eine hydrophobe Domäne am C-terminalen Ende. ActA nutzt als einziges Protein von *L. monocytogenes* das zu großen Anteilen aus Aktin bestehende Zytoskelett der Wirtszelle zur Fortbewegung des Bakteriums (Domann *et al.*, 1992; Kocks *et al.*, 1992; Vazquez-Boland *et al.*, 1992). Nach Austritt aus der Vakuole entstehen Aktinfilamentwolken, die symmetrisch um das Bakterium verteilt sind. Die bakterielle Zellteilung führt dann zu einer schweif-ähnlichen Formierung des Aktins an einem Pol des Bakteriums (Tilney & Tilney, 1993; Tilney & Portnoy, 1989). Im Aktinschweif kommen gleichmäßig verteilt Proteine vor, die durch Bindung an Aktinfilamente den Schweif im Zytoskelett stabilisieren (α -Aktinin, Filamin, Fimbrin, Villin und Ezrin/Radixin) (Dabiri *et al.*, 1990; Dold *et al.*, 1994; Kocks & Cossart, 1993; Temm-Grove *et al.*, 1994). Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) ist ein Zytoskelettprotein, das sowohl an die Region der Prolin-reichen Motive von ActA als auch an das Aktinmonomer-bindende

Protein Profilin bindet und so eine Verbindung zwischen Bakterium und Zytoskelett der Wirtszelle schafft (Chakraborty *et al.*, 1995; Reinhard *et al.*, 1995). Profilin erhöht die Polymerisationsfähigkeit von Aktin durch die Umwandlung von ADP-Aktin in ATP-Aktin (Pollard, 1995). Die erhöhte Effektivität der Aktinpolymerisation durch VASP aufgrund der Bindung von Profilin ergänzt die Rekrutierung von Aktinfilamenten durch einen N-terminalen Abschnitt von ActA (Lasa *et al.*, 1995). Durch die Polymerisation von Aktinmonomeren an einem Pol des Bakteriums zwischen Schweif und *L. monocytogenes* wird es durch die Wirtszelle mit einer Geschwindigkeit von bis zu 1 $\mu\text{m/s}$ geschoben (Chakraborty & Wehland, 1997).

1.6.2.4 Interzelluläre Mobilität

Durch den geschilderten Mechanismus der Aktinpolymerisation und schweifartigen Anordnung bewegt sich *L. monocytogenes* auf die Zellmembran zu. Ungeklärt ist, wodurch es dann zu Ausstülpungen der Wirtszellmembran und der Aufnahme des Bakteriums in dieser Ausstülpung durch eine andere Zelle kommt. Das Bakterium invadiert auf diese Weise eine andere Wirtszelle, ohne den Extrazellulärraum durchqueren zu müssen, und befindet sich in einer Vakuole, die von zwei Membranschichten umgeben ist. An der Lyse dieser Doppelmembran ist außer LLO noch eine Phospholipase C (PlcB) beteiligt, da Mutanten mit inaktiver PlcB die Vakuole mit Doppelmembran nicht verlassen können. Für diese Phospholipase kodiert das Gen *plcB*. Das 289 Aminosäuren lange und 33 kDa schwere Polypeptid besitzt eine Signalsequenz und ein 26 Aminosäuren langes Propeptid (Vazquez-Boland *et al.*, 1992). Für die Proteolyse von PlcB in die 29 kDa schwere und aktive Form ist wahrscheinlich das Genprodukt von *mpl*, die Metalloprotease Mpl von 57 kDa verantwortlich (Mengaud *et al.*, 1991b; Domann *et al.*, 1991; Poyart *et al.*, 1993).

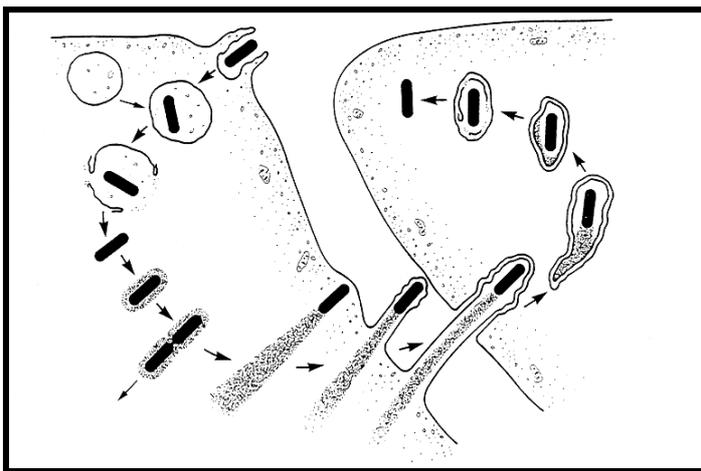


Abb. 1.4: Infektions- und Lebenszyklus von *L. monocytogenes* in der eukaryontischen Zelle (nach Tilney & Portnoy, 1989).

1.7 Pathogenitätsfaktoren und Invasionsstrategien von Bakterien

Bakterien besitzen in verschiedene Gruppen eingeteilte Pathogenitätsfaktoren, die ihnen die Infektion eines Wirtes ermöglichen. Adhäsine ermöglichen über die Bindung an Wirtszellrezeptoren die Adhärenz des Bakteriums, die für intrazelluläre Erreger vor der Invasion essentiell ist. Beispiele für Adhäsine sind Tcp-Fimbrien von *Vibrio cholerae* oder Lipoteichonsäuren von *Streptococcus pyogenes*.

Über Invasine induzieren manche Bakterien wie auch *L. monocytogenes* ihre Aufnahme in Phagozyten oder nicht-phagozytierende Zellen, um so Schutzbarrieren wie die des Darms zu überwinden.

Aggressine sind Toxine, die in das umgebende Medium sezerniert werden und Zellen oder Gewebe schädigen. In der großen Reihe von Beispielen finden sich u.a. das Diphtherie-Toxin und Hämolysin von *E. coli*.

Impedine versetzen Bakterien in die Lage, Mechanismen der Immunantwort zu umgehen oder zu verhindern. So ist *Neisseria gonorrhoeae* durch Antigenvariation, einer Veränderung von Pili und äußeren Membranproteinen, in der Lage, länger im Wirt zu persistieren.

Moduline induzieren die Synthese von Zytokinen und bewirken so eine pathologische Veränderung von eukaryontischen Zellen. Das Lipopolysaccharid gram-negativer Bakterien hat über die induzierte Synthese verschiedener Zytokine indirekt Auswirkungen auf die Körpertemperatur, Gerinnung und Blutdruck.

Ein weiterer Pathogenitätsfaktor besteht in der Eigenschaft, Eisen-Ionen, die im Wirt an Transferrin oder Laktoferrin gebunden sind, über sezernierte Siderophore mit höherer Affinität zum Eisen zu binden. Durch die Expression von Transferrin- bzw. Laktoferrin-Bindungsproteinen auf der Bakterienoberfläche werden Eisen-Ionen reduziert und in das Zytoplasma transportiert (Domann, 1998).

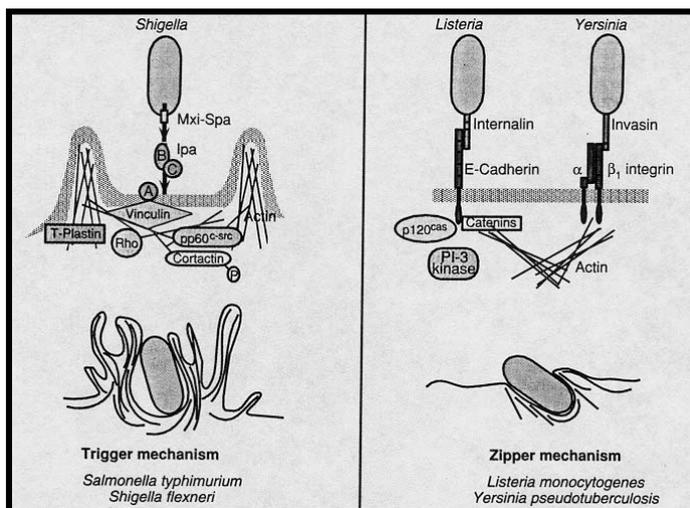


Abb. 1.5 : Mechanismen bakterieller Invasion in eukaryontische Zellen (nach Finlay & Cossart, 1997).

Um ihre Aufnahme in Wirtszellen zu induzieren, haben Bakterien v.a. zwei bekannte Mechanismen entwickelt (Abb. 1.5). *Shigella flexneri* ist ein Beispiel für den sogenannten

„Trigger-Mechanismus“. Es handelt sich hierbei um einen komplexen Eintrittsmechanismus, bei dem auf bakterieller Seite mehr als 30 Gene und auf eukaryontischer Seite große Zytoskelettveränderungen beteiligt sind. Die für die Induktion der Aufnahme notwendigen Gene liegen auf einem 31 kb-Fragment eines 220 kb großen Plasmids. Das Genprodukt von *ipgC* wirkt als Chaperon für die Proteine IpaB und IpaC, die so in einer stabilen und löslichen Form im Zytoplasma vorliegen und schnell in aktiver Form sezerniert werden können. Die Sekretion erfolgt über die Genprodukte des *mxi-spa* Locus. Das Mxi-Spa-Sekretionssystem gehört zu den sogenannten TypIII-Sekretionssystemen, durch die Proteine über verschiedene Kanalproteine und unter Verbrauch von ATP in das äußere Milieu geschleust werden. Die sezernierten Proteine eines solchen Systems besitzen keine Signalsequenzen, werden während des Transportes nicht verändert und nehmen keine Zwischenform im periplasmatischen Raum ein. Die Sekretion der für die Aufnahme wichtigen Ipa-Proteine wird durch Kontakt mit Epithelzellen stimuliert. Desweiteren stimulieren auch ein löslicher Faktor in fötalem Kälberserum und Glykoproteine der Zellmatrix die Sekretion. Die sezernierten Proteine IpaB, IpaC und IpaD (und evtl. andere Faktoren) bewirken eine massive Veränderung des Zytoskeletts. An den Stellen des Bakterieneintritts kommt es zur Aktinpolymerisation und zum Kräuseln der Wirtszellmembran („membrane ruffling“). Parallel liegende und durch Plastin querverbundene Aktinfilamente bilden um das Bakterium aufsteigende Zellausläufer. Die Vereinigung der Zellausläufer über dem Erreger führt zur Aufnahme des Bakteriums. An der Signaltransduktion innerhalb der Wirtszelle für den Umbau des Zytoskeletts sind wahrscheinlich die GTPase Rho und die Protein-Tyrosin-Kinase pp60^{c-src} beteiligt. Ungeklärt ist der genaue Mechanismus der Ipa-Proteine, der die Aufnahme in die Wirtszellen ermöglicht. Außerdem ist nicht bekannt, wie das Bakterium direkten Kontakt zur Wirtszelle bekommt. *Salmonella typhimurium* ist ein weiterer Vertreter dieser Invasionsstrategie, bei der es durch sezernierte Proteine zu einem massiven Umbau des Zytoskeletts der Wirtszelle kommt. In der Regel werden mehrere Bakterien in eine eukaryontische Zelle aufgenommen (Menard *et al.*, 1996).

Der schon beschriebene Invasionsmechanismus von *L. monocytogenes* wird hingegen „Zipper-Mechanismus“ genannt, zu dem auch der von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* gezählt wird. Ähnlich wie bei der Bindung von InlA und E-Cadherin im Fall von *L. monocytogenes* verfügen auch *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* mit Invasin über ein Oberflächenassoziertes Protein, das durch die Bindung an einen Rezeptor (β 1-Integrin-Untereinheit) die Aufnahme des Erregers in nicht-phagozytierende Zellen induziert. Im Unterschied zum „Trigger-Mechanismus“ ist ein einzelner bakterieller Ligand, der mit einem Wirtszellrezeptor agiert, in der Lage, die Wirtszellmembran reißverschlussartig um das Bakterium herum zu öffnen. Dabei kommt es jedoch nicht zu dramatischen Umbauvorgängen des Zytoskeletts. Außerdem wird meist nur ein Bakterium aufgenommen. Signaltransduktionsvorgänge der Wirtszelle sind wie beim „Trigger-Mechanismus“ von Bedeutung, da Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, die die Signaltransduktion der Wirtszelle blockieren, die Aufnahme des Bakteriums verhindern, aber die Adhärenz zulassen (Finlay & Falkow, 1997).

1.8 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit sollte die weitere Aufklärung der Funktion von InlA und InlB bezüglich der Adhärenz und Invasion in nicht-phagozytierende Zellen sein. Hierzu wurden sowohl molekularbiologische als auch zellbiologische Methoden genutzt.

Es war zunächst die Absicht, das *inlAB*-Operon des Stammes *L. monocytogenes* 1/2a zu sequenzieren. Die Sequenz des *inlAB*-Operons sollte mit einer bereits bekannten Sequenz eines anderen Stammes verglichen werden, um so Charakteristika auf genetischer Ebene bestätigen oder in Frage stellen zu können. Die Sequenz sollte Aufschluß über die molekulare Struktur des Genproduktes geben.

Anhand von Mutanten und Komplementanten, die über ein Plasmid verschiedene Abschnitte des *inlAB*-Operons exprimieren, sollte dann der Frage nach einem Zelltropismus, also einer Spezifität der Internaline für verschiedene Zelllinien nachgegangen werden. Überprüft werden sollte in diesem Zusammenhang auch, ob sich apathogene Listerien, die mit den gleichen Plasmiden komplementiert wurden, überhaupt pathogen, ähnlich spezifisch und virulent verhalten.

Die Rolle des positiven Regulationsfaktors PrfA bei der Expression von InlA und InlB wurde durch Klonierungen von *inlA* und *inlB* in einen mit *prfA* versehenen Vektor und die Komplementation von Listerien-Stämmen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund untersucht.

Darüber hinaus sollte die Bindungsfähigkeit des gereinigten Proteins InlB an die Bakterienoberfläche und die Auswirkung auf die Pathogenität verschiedener Listerien-Stämme getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Eukaryontische Zelllinien

Tab. 2.1: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Zelltyp	Organ	Herkunft	Katalognummer
Caco-2	Epithel	Dickdarm	Mensch	DSM ACC 169
HeLa	Epithel	Gebärmutter	Mensch	DSM ACC 57
Henle407	Epithel	Dünndarm	Mensch	ATCC CCL 6
L-929	Fibroblast	Unterhaut	Maus	DSM ACC 2
VERO	Epithel	Niere	Meerkatze	DSM ACC 33
PtK2	Epithel	Niere	Känguruhratte	ATCC CCL 56
A549	Epithel	Lunge	Mensch	DSM ACC 107
Hep-G2	Epithel	Leber	Mensch	DSM ACC 180

2.1.2 Materialien der Zellkultur

Lösungen

MEM:	Minimum Essential Medium with Earle's Salts, with L-Glutamine (Gibco BRL)
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium with Sodium Pyruvate, 1000 mg/l Glucose, Pyridoxin (Gibco BRL)
RPMI 1640:	with 20 mM HEPES, without L-Glutamine (Gibco BRL)
FKS:	100 % Foetal Bovine Serum (Sigma)
L-Glutamine:	100 x; 29,3 mg/ml in Normal Saline, 200 mM (PAA Laboratories)
NEA:	100 x Non-Essential Amino Acids (Seromed)
Hanks' Salt Solution:	1 x; w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Phenol Red (Seromed)
Trypsin/EDTA:	1 x; 0,5 g Trypsin (1:250)/l; 0,2 g EDTA/l in 1 x PBS (PAA Laboratories)
Einfriermedium:	4 ml DMSO; 78,13 g/mol (Merck) auf 50 ml FKS

Plastikgefäße

Gewebekulturschalen:	Nunclon™ Δ (100 x 20 mm, Nunc)
24-Well-Platten:	Multischalen mit 24 freistehenden Vertiefungen, Nunclon™ Δ (132 x 88 mm, Nunc)
Einfriergefäße:	Cryogenic Vials (Nalgene)
Einfrierbehälter:	Cryo 1°C Freezing Container (Nalgene)

2.1.3 Bakterienstämme

Escherichia coli

DH10 β (Gibco BRL)

Genotyp: F', *mcrA* Δ -(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*dlacZ* Δ M15, Δ *lacX174*, *deoR*, *recA1*, ϕ *araD139* Δ (*ara*, *leu*)7697, *galU*, *galK*, λ^- , *rpsL*, *endA1*, *nupG*

Listeria spp.

Listeria monocytogenes EGD 1/2a

und

Listeria innocua 6a NCTC 11288

Listeria monocytogenes-Deletionsmutanten

Tab. 2.2: In dieser Arbeit verwendete Deletionsmutanten.

Bezeichnung	Herkunft
Δ <i>inlA2</i>	M. Hudel
Δ <i>inlB2</i>	M. Hudel
Δ <i>inlAB2</i>	M. Hudel
Δ <i>vgc2</i>	S. Zechel und E. Domann

2.1.4 Plasmide

Vektoren

Tab. 2.3: In dieser Arbeit verwendete Vektoren.

Vektor	Herkunft
pCRII	Invitrogen
pERL-3	M. Hartl
pLigal64	B. Gerstel

Rekombinante Plasmide

Tab. 2.4: In dieser Arbeit verwendete rekombinante Plasmide.

Rekombinantes Plasmid	Vektor	Insert (kb)	Herkunft	Applikation
pPP1	pLigal64	4,14	diese Arbeit	Komplementation
pPP2	pLigal64	2,84	diese Arbeit	Komplementation

Rekombinantes Plasmid	Vektor	Insert (kb)	Herkunft	Applikation
pPP3	pLiga164	3,92	diese Arbeit	Komplementation
pPP4	pLiga164	5,97	diese Arbeit	Komplementation
pMH1	pCRII	3,42	M. Hudel	Klonierung
pMH2	pCRII	2,77	M. Hudel	Klonierung
pMH3	pCRII	3,87	M. Hudel	Klonierung
pMH4	pCRII	5,89	M. Hudel	Klonierung
pMH5	pERL-3	3,50	M. Hudel	Komplementation
pMH6	pERL-3	2,85	M. Hudel	Komplementation
pMH7	pERL-3	3,97	M. Hudel	Komplementation
pMH8	pERL-3	5,97	M. Hudel	Komplementation
MZM6	-	-	M. Hudel	Klonierung

2.1.5 Oligonukleotide

Tab. 2.5: In dieser Arbeit verwendete Primer. Mit „Position“ sind die Nukleotide innerhalb der *inLAB*-Operon-Sequenz benannt, an die der Primer bindet.

Name	5'→3'-Sequenz	Position	Bemerkung
1328	GCTACAATTACAGAAGATAC	1638-1657	Cy5
4142	TATAGGCGATTCCATACA	6591-6608	
TH64SalI	ACAAGGAATGACGTCGACATACAAACAATAT GGTA	714-748	SalI
TH65NcoI	AACCAATTAGTCCCATGGTATAGGCGATTCCA TACA	6627-6592	NcoI
1317	GGAATGACGAGCTCATACAAACAATATGG	718-746	SacI
2505	GGTTGTATTAGCGTATCACGAG		pLiga164 (6230-6251)
2031	CGTGTGTGTTAAGCGG		pLiga164 (6352-6332)
pLiga5'	GAAGATAACTAACTGCTAATCCA		pLiga164 (6151-6173), Cy5
pLiga3'	GCCTGTTTCTACATTCTTCAC		pLiga164 (6412-6392), Cy5
1320	GGCGATAGCGATAATGAGCTCTACC	3843-3867	SacI
2032	GATTAACAAATGTTAGAG		pLiga164 (6064-6081)

Name	5'→3'-Sequenz	Position	Bemerkung
Oligo164- 5'NcoI	TCGGATCCACTAGTACCATGGGCCAGTGTGCT GGAATTC		pCRII (multiple cloning site), <i>NcoI</i>
Oligo164- 3'SalI	GAGCGGCCGCCAGTCGACTGGATATCTGCAG AATTC		pCRII (multiple cloning site), <i>SalI</i>
TH20	GACAAATGCTGGATCCGCTACAATTACACAA GAT	1622-1655	<i>BamHI</i>
4141	CACGGTGATAGTCTCCGCTTGTA	4139-4117	
1314	GTCATTTGCTATCTCTCCTTATTCCTC	110-64	
TH55	CAACGATATTATCAGGTGTAA		5' von ORFA
4616	ACTTCATCTGCTGCAGGCTTAAAAGCA	520-546	<i>PstI</i>
M100	GTAAAACGACGGCCAGT		pCRII, Universal
1323	CCCTAATCTATCCGCCTGAAGCGTTG	1793-1768	
TH5	GCTAGAACTATCTAGTAACACG	2035-2057	
TH6	ATTCCCAGCTTCCACTTCTTTG	3083-3062	
1334	GTAAGAGCCATTGCAGTTCCTACTGC	3910-3885	
1318	TTTTTTTGGATCCTTGAGCGAACTTAGGTC	4448-4419	<i>BamHI</i>
4144	TTCTGGAGTCACTAACGA	4829-4812	
TH11-A	TCAACAGTTAGAGCTTTACAG	5332-5312	
1321	TTATTTCTGAGCTCTTAAATTAGCTGCTTTCGT CC	5912-5878	<i>SacI</i>
3057	GCCTCGCACCGCTGTAAAGCTC	5301-5322	
TH3	CAAGCATGGACAAATGCACCAGT	2775-2797	

2.1.6 Chemikalien, Enzyme und Antikörper

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

Tab. 2.6: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

Antikörper	Herkunft
Anti-InlA L244 (Maus, monoklonal)	S. Müller
Anti-InlB IF32F8 (Maus, monoklonal)	S. Müller
Alkalische Phosphatase-konjugiertes Anti-Maus-IgG	Dianova
M108 B11 (Maus, <i>L. monocytogenes</i> , monoklonal)	K. Niebuhr-Ebel
Cy3-Anti-Maus IgG	Dianova
FITC-Phalloidin	Dianova

Tab. 2.7: In dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen.

Restriktionsendonuklease
<i>SalI</i>
<i>NcoI</i>
<i>BamHI</i>
<i>BglII</i>
<i>XhoI</i>

2.1.7 DNA-Größenstandard

1kb-Leiter (Gibco BRL): 12,2; 11,2; 10,2; 9,2; 8,1; 7,1; 6,1; 5,1; 4,1; 3,1; 2,0; 1,6; 1,0; 0,5; 0,4; 0,34; 0,3; 0,22; 0,2; 0,16; 0,13; 0,08 kb

2.1.8 Protein-Größenstandard

Prestained SeeBlue™ (Anamed): 250, 98, 64, 50, 32, 25, 16, 6, 4 kDa

2.1.9 Anzuchtmedien

Listeria spp.

BHI (Gibco BRL): 38 g BHI, ddH₂O ad 1 l für die Anzucht auf Agarplatten

BHI (Difco): 37 g BHI, ddH₂O ad 1 l zur Kultivierung in Flüssigmedium

E. coli

LB: 10 g Tryptone, 5 g Yeast-Extract,
10 g NaCl, ddH₂O ad 1 l

Für die Anfertigung von festen Nährstoffböden wurde 1,5 % Agar in 1 l des entsprechenden Mediums eingewogen und autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50 °C wurden Antibiotikastammlösungen zugegeben und die Platten gegossen.

2.1.10 Lösungen und Puffer**Antibiotikastammlösungen**

Ampicillin: 100 mg/ml Ampicillin-Natriumsalz (Sigma), in MQ-H₂O, sterilfiltriert,
bei -20 °C gelagert, Endkonzentration 100 µg/ml

Erythromycin: 50 mg/ml Erythromycin (Sigma), in 96% EtOH sterilfiltriert,
bei -20 °C gelagert, Endkonzentration bei Transformation von *E. coli* mit
pERL-3 oder pLiga164 300 µg/ml, von Listerien 5 µg/ml

Gentamicin: 50 mg/ml Gentamicin (Gibco BRL),
bei RT gelagert, Endkonzentration 50 µg/ml

Kanamycin: 10 mg Kanamycin (Sigma), 1 ml MQ-H₂O, sterilfiltriert,
bei 4 °C gelagert, Endkonzentration 25 µg/ml

Standardpuffer

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

10 x TBE: 108 g Tris; 55 g Borsäure; 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0; ddH₂O ad 1 l

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; ddH₂O ad 1 l,
pH 7,4 mit NaOH

Die Verdünnung von 10 x Puffern wurde mit ddH₂O durchgeführt.

2.1.11 Geräte

Tab. 2.8: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

Gerät	Herkunft
ALFexpress	Pharmacia
Autoklav	Wolf
Bildverarbeitung (Agarosegel)	Mitsubishi, Cybertec CS1
Blotkammer	Eigenbau der Institutswerkstatt
Brutschrank	Forma Scientific, Inkubator 3250
Dreh-Schüttelapparat	Rettberg
Eismaschine	Icematic F90 Compact Electronic
Elektrophoresekammer für Proteingele	Biometra, Phase
Elektrophoresekammer für Agarosegele	Eigenbau der Institutswerkstatt
Feinwaage	Mettler H54
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Axiophot
Gefriertruhen	Heraeus
GeneQuant	Pharmacia
Inkubationswasserbad	Digitherm
Konfokales-Laserscanmikroskop	Leica, DM IBRE
Kühlzentrifuge	Heraeus, Biofuge 15R
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	Gilson
Plattiergerät	BioSys, Autoplate 3000
Reinstwassersystem	Seral
Sorvall-Zentrifuge	Du-Pont de Nemours, Superspeed RC2-B
Spannungsgeräte	Pharmacia MultiDrive XL, Consort E455 und E865
Speedvac-Konzentrator	Bachofer
Sterilbank	Karl Bleymehl
Stereoskop	Zeiss, 1003
Thermocycler	Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400
Thermomixer	Eppendorf, Comfort
Tischinkubator/Thermoblock	Eigenbau der Institutswerkstatt
Tischzentrifuge/Picofuge	Tomy Kogyo
UV-Lampe	Camac
UV-Transilluminator	Micro Bio Tec Brand
Vortex	Janke & Kunkel, Ika Vibrofix VF1
Waagen	Mettler
Wasserbäder	GFL, Infors
Zentrifuge	Heraeus, Megafuge1.0R

2.1.12 Computerprogramme

Die Programme Leica TCS NT, MAP 98, CASBA IV, ALFwin, DNASTar, SigmaPlot 2.0, CorelDRAW, MS Office, Reference Manager wurden verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Qualität von isolierten Nukleinsäuren wurde durch die spektrophotometrische Messung mit dem Gene Quant bei 260 und 280 nm bestimmt. Der gemessene Wert bei 260 nm erlaubt das Quantifizieren der Nukleinsäure in der Probe. Eine OD von 1 entspricht ungefähr 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis des gemessenen Wertes OD_{260}/OD_{280} läßt Rückschlüsse auf die Reinheit der Nukleinsäure zu. Der optimale Wert für die DNA-Reinheit ist ein Verhältnis von 1,8. Die Nukleinsäure wurde unverdünnt bzw. 1:10 verdünnt und mit dem Lösungsmittel als Referenz gemessen.

2.2.2 Sequenzierung von DNA

2.2.2.1 Automatische Sequenzierung mit dem ALFexpress von Pharmacia

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

2.2.2.2 Sequenziergel und Laufparameter

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

2.2.2.3 Sequenzierung von Plasmiden mit unmarkierten Primern

Für die Sequenzierung von Plasmiden mit unmarkierten Primern wurde der Cy5TM AutoReadTM Sequencing Kit in Kombination mit dem dATP Labelling Mix von Pharmacia verwendet. Bei der isothermen Reaktion bei 37 °C wird der Sequenzierprimer am 3'-Ende durch Cy5-dATP markiert und das Plasmid mit T7 DNA-Polymerase nach der Kettenabbruch-Methode sequenziert. Bei der Sequenzreaktion wurden 40-100 pmol Primer und durchschnittlich 5 µg DNA eingesetzt.

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

2.2.2.4 Sequenzierung von Plasmiden und DNA-Fragmenten mit markierten Primern

Die Sequenzierung von Plasmiden und DNA-Fragmenten mit markierten Primern wurde mit dem Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP von Amersham durchgeführt. Diese zyklische Sequenziermethode hat den Vorteil, daß mit einer hitzestabilen DNA-Polymerase eine lineare Vermehrung der Ziel-DNA stattfindet. Dazu sind als Vorteile der Methode der Einsatz von geringen Mengen an Plasmid, Cosmid oder PCR-Produkten durch Amplifikation der Ziel-DNA und die gute Auflösung von GC-reichen- und AT-reichen-Kompressionen durch die zyklische Denaturierung, Anlagerung und Vermehrung bei hohen Temperaturen zu nennen.

Reaktionsbedingungen:

- 1) 5 min 95 °C (Denaturierung)
- 2) 30 s 98 °C (Denaturierung)
- 3) 40 s 60 °C (Hybridisierung)
- 4) 5 min 60 °C (Polymerisation)

Die Schritte 2 und 3 wurden insgesamt 25 x wiederholt.

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

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

2.2.3 Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels Expand™ High Fidelity PCR-System von Boehringer Mannheim

Die Polymerasekettenreaktion ist ein zyklisches Verfahren, bei dem sich in jeder neuen Runde die Anzahl der DNA-Kopien verdoppelt. Man trennt die Stränge der Ziel-DNA durch Erhitzen und kühlt die Reaktion anschließend ab, damit sich die Primer spezifisch an die Zielregion anlagern können. Eine hitzestabile DNA-Polymerase verlängert die Primer (Oligonukleotide), wenn alle vier dNTPs, im entsprechenden Reaktionspuffer vorliegend, vorhanden sind. Es entstehen ab dem vierten Zyklus exponentiell Kopien der Zielregion.

Das Expand™ PCR-System zeichnet sich durch seine hohe Kopiergenauigkeit bei der DNA-Amplifikation von PCR-Produkten bis zu 10 kb aus. Dafür ist ein Enzymmix aus *Taq*-Polymerase (hohe Amplifikationsrate) und *Pwo*-Polymerase (hohe Kopiergenauigkeit) verantwortlich. Die DNA-Amplifikation wurde wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben durchgeführt.

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Auftragspuffer: 0,25 % Bromphenolblau
 25 % Ficoll (Typ 400, Pharmacia)
 in ddH₂O gelöst, bei RT gelagert

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

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

2.2.5 Reinigung von DNA-Fragmenten mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen

Der QIAquick PCR Purification Kit diente zur schnellen Reinigung von DNA-Fragmenten aus einer PCR-Reaktion.

Das Prinzip des QIAquick PCR Purification Kit beruht auf der Bindung der durch ein chaotropes Salz gefällten PCR-Produkte an eine feste Silica-Matrix. Die gebundenen PCR-Produkte werden durch Wasch- und Zentrifugationsschritte von Proteinen, Primern, Nukleotiden und Salzen getrennt und mit MQ-H₂O oder 1 x TE-Puffer von der Silica-Matrix eluiert.

Die Aufreinigung wurde wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben durchgeführt.

2.2.6 Schneiden, Phenolextraktion und Ligation von DNA-Fragmenten

10 x TAC-Restriktionspuffer: 330 mM Tris-Acetat, pH 7,9
 660 mM KAc, pH 7,5
 100 mM MgAc
 5 mM DTT
 1 mg/ml BSA

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

Für einen Standard-Restriktionsansatz wurden 200-300 ng DNA, 5-10 U Restriktionsendonuklease und 2 µl 10 x TAC-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl pipettiert. Der Ansatz wurde 2 h bei der für das Restriktionsenzym geeigneten Temperatur inkubiert.

Ein Teil des Restriktionsansatzes wurde anschließend im Agarosegel analysiert.

DNA-Fragmente sind nach der Anwendung von Restriktionsendonukleasen für weitere molekularbiologische Anwendungen von Restriktionsenzymen und Salzen zu reinigen. Dazu wurde eine Phenolextraktion durchgeführt. Der Ansatz wurde 1:1 mit einer Suspension aus Roti-Phenol (Roth) und Isoamylalkohol/Chloroform (25:24:1) gemischt und bei 15680 g für 3 min bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 2,5 Volumenteil 100 % EtOH und 0,1 Volumenteil 3 M

NaAc, pH 4,5 für 30 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ präzipitiert. Nach einer Zentrifugation bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 18186 g, 15 min und einmaligem Waschen mit 70 % EtOH wurde das unter Vakuum getrocknete DNA-Pellet in einem beliebigen Volumen MQ- H_2O aufgenommen.

Ein Teil des gereinigten Restriktionsansatzes wurde anschließend im Agarosegel analysiert.

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

Für eine Ligrationsreaktion wurden die beteiligten Partner (vorbereiteter Vektor und DNA-Fragment) im Verhältnis 1:5 gemischt. Für ein Gesamtvolumen von 20 μl wurden 4 μl 5 x Ligationspuffer (Gibco BRL) und 1 μl (1U/ μl) T4 DNA Ligase (Gibco BRL) zum Reaktionsansatz gegeben. Die Ligation erfolgte bei $14\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht im Wasserbad und wurde anschließend zur Transformation eingesetzt.

2.2.7 Transformation von *E. coli*

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

TB-Puffer: 10 mM Pipes
 55 mM MnCl_2
 15 mM CaCl_2
 250 mM KCl
 pH 6,7

SOB-Medium: 2 % Bacto Tryptone
 0,5 % Bacto Yeast Extract
 10 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl_2
 10 mM MgSO_4
 pH 6,7-7,0

Zunächst wurde die benötigte Menge für 10 mM Pipes in 800 ml MQ- H_2O gelöst. Der pH-Wert von 6,95 wurde mit 15-20 ml 1 M KOH eingestellt. Jedes Salz wurde einzeln hinzugegeben und gelöst und mit MQ- H_2O auf 1 l aufgefüllt. Der Puffer wurde sterilfiltriert und bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

10 ml SOB-Medium in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben wurden mit dem gewünschten Stamm (10 μl aus Glycerinkultur) beimpft und 14 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese ÜN-Kultur 1:50 in SOB-Medium (250 ml) verdünnt und im 1000-ml-Erlenmeyerkolben bei $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad inkubiert, bis eine OD_{600} von 0,6 erreicht war. Die Kultur wurde in sterile GS3-Zentrifugenbecher überführt und 10 min auf Eis abgekühlt. Nach einer Zentrifugation (2500 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min) wurde das Pellet in 80 ml eiskaltem TB

vorsichtig resuspendiert und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden wiederum durch Zentrifugation bei 2500 g, 4 °C, 10 min pelletiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Zellen wurden in 20 ml eiskaltem TB aufgenommen. 1,4 ml DMSO (Endkonzentration 7 %) wurden zupipettiert und der Ansatz wieder 10 min auf Eis stehengelassen. Die kompetenten Zellen wurden zu 500 µl aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.7.2 Hitzeschocktransformation von ultra-kompetenten *E. coli* nach Hanahan (1991)

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

100 µl kompetente *E. coli* (DH10β) wurden mit dem Ligationsansatz oder reinem Plasmid (maximal 50-1000 ng DNA) gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden nun für 90 s einer Temperatur von 42 °C im Thermoblock ausgesetzt und anschließend weitere 2 min auf Eis stehengelassen, bevor 400 µl SOC-Medium hinzupipettiert wurden. Je nach zu transformierendem Plasmid erfolgte die Expression der Antibiotikaresistenz bei 30 °C oder 37 °C für 1-3 h. Danach wurde der Transformationsansatz auf Antibiotika-haltigen festen Nährböden ausplattiert, die der Antibiotikaresistenz des transformierten Plasmids entsprachen.

2.2.8 Identifizierung positiver Transformanten durch PCR

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

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

Template: Als Template dienen Einzelkolonien (von Agarplatten mit sterilen Zahnstochern abgenommen), chromosomale DNA (isoliert durch Mitarbeiter des Instituts), Plasmid-DNA oder gereinigte PCR-Produkte.

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

Für einen Reaktionsansatz wurden neben dem Template und Primern 4 µl des dNTP-Mixes, 10 µl des 10 x PCR-Puffer A, 0,5 µl *Taq*-DNA-Polymerase (entsprechen 2,5 U Enzym von Gibco BRL) pipettiert und mit MQ-H₂O auf 100 µl aufgefüllt.

Reaktionsbedingungen:

- 1) 2 min 94 °C (Denaturierung)
- 2) 20 s 94 °C (Denaturierung)
- 3) 30 s 50 °C (Hybridisierung)
- 4) 1,5 min 72 °C (Polymerisation)
- 5) 3 min 72 °C (Polymerisation)

Die Schritte 2 bis 4 wurden insgesamt 25 x wiederholt.

Im Anschluß an die Polymerasekettenreaktion wurden 5 µl des einzelnen Ansatzes mit 5µl Ficoll-Auftragspuffer gemischt und auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem GFXTM Micro Plasmid Prep Kit von Pharmacia

Der GFXTM Micro Plasmid Prep Kit dient zur schnellen Isolierung und Aufreinigung von hochgradig sauberer Plasmid-DNA (bis zu 15 µg) aus 1-3 ml *E. coli*-ÜN-Kultur. Die gereinigte Plasmid-DNA ist in ihrer Qualität vergleichbar mit der aus einem CsCl-Gradienten gereinigten DNA und ist für jede molekularbiologische Anwendung nutzbar.

Das Prinzip des Plasmidisolierkits beruht auf einer modifizierten alkalischen Lyse der Bakterien, Fällung der im Lyseansatz befindlichen bakteriellen Proteine und selektive Bindung der freien Plasmid-DNA an eine feste Silica-Matrix. Die gebundene Plasmid-DNA wird durch Waschschriffe von Kontaminationen und Salzen gereinigt und mit MQ-H₂O oder 1 x TE-Puffer von der Silica-Matrix eluiert.

Die Plasmidisolierung wurde wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben durchgeführt.

2.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem JETstar 2.0 Plasmid MIDI Kit von Genomed

Der JETstar 2.0 Plasmid MIDI Kit dient zur schnellen Isolierung und Aufreinigung von höchstgradig sauberer Plasmid-DNA (bis zu 100 µg) aus 25-100 ml *E. coli*-ÜN-Kultur. Die Qualität der aufgereinigten Plasmid-DNA entspricht der aus einem 2 x CsCl-Gradienten gereinigten Plasmid-DNA. Das Prinzip der Aufreinigung gleicht der in Kapitel 2.2.9 beschriebenen Methode. Der generelle Unterschied ist in der Säulenmatrix gegeben, an der die Plasmid-DNA gebunden wird. Hierbei handelt es sich um eine Anionenaustauschermatrix.

Die Plasmidisolierung wurde wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben durchgeführt.

2.2.11 Protoplasten-Transformation von Listerien nach Wuenscher *et al.* (1991)

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

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

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

5 % BSA:	5 g BSA (Gerbu Fraktion V)
	ddH ₂ O ad 100 ml
	pH 7,5 mit NaOH
	sterilfiltriert

Eine ÜN-Kultur (BHI mit 0,2% Glycin) von Listerien wurde 1:100 in 30 ml BHI-Medium verdünnt und bei 200 rpm im Schüttelwasserbad bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 inkubiert.

25 ml der Kultur wurden in ein steriles 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt und bei 4332 g für 10 min zentrifugiert. Die Bakterien wurden mit 25 ml sterilem MQ-H₂O einmal gewaschen, anschließend in 2,5 ml SMMP (frisch!) resuspendiert und in ein steriles 50-ml-Greiner-Röhrchen überführt. Von einer frisch angesetzten Lysozymlösung in 2 x SMM (100 mg/ml) wurden 250 µl hinzupipettiert. Die Bakterien wurden ohne Schütteln für 12 bis 22 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Protoplasten unter dem Mikroskop überprüft und bei 4332 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 10 ml frischem SMMP gewaschen und nach der Zentrifugation in 2,5 ml SMMP resuspendiert. Die Protoplasten wurden in sterilen 1,5 ml Schraubgefäßen zu jeweils 300 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

DM3 Regenerationsplatten:

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

Fusogen:

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

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

300 µl Protoplasten wurden in ein 15 ml Greiner-Röhrchen überführt und mit 0,5-1,0 µg des zu transformierenden Plasmids (Isolierung aus *E. coli*) vorsichtig gemischt. Vorsichtig wurden 2 ml Fusogen hinzupipettiert und der Ansatz wird für genau 1 min schnell hin und her geschwenkt. Nach einer weiteren Minute stehender Inkubation wurden 7 ml frisches SMMP zugegeben, der Ansatz wurde 5 x vorsichtig invertiert und bei 4332 g für 20 min bei RT zentrifugiert. Wegen des sehr kleinen Pellets wurde der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Die Zellen wurden in 1 ml SMMP resuspendiert und für 3 h bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Jeweils 333 µl der Protoplasten wurden auf einer DM3-Platte (vorgetrocknet) vorsichtig ausplattiert. Die Platten wurden für 4-8 Tage im Brutschrank bei 30 °C inkubiert.

2.2.12 Anlegen von Glycerinkulturen

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

2.2.13 Transformation von Listerien mit in Expressionsvektoren klonierten Internalinen

Durch Transformation (Kapitel 2.2.11) wurde versucht, die Expression von Genen, die in einen Expressionsvektor kloniert worden waren, in Deletionsmutanten (Komplementation) oder apathogenen Listerien-Stämmen herzustellen.

2.2.14 Klonierung in die Expressionsvektoren pERL-3 und pLiga164

Für die Expression von Genen in *E. coli* und Listerien können die Vektoren pERL-3 und pLiga164 verwendet werden. Beide verfügen über einen Replikationsstart für *E. coli*.

Auf dem Vektor pERL-3 ist ein für ein breites Spektrum gram-positiver Bakterien spezifischer Replikationsstart vorhanden. Der Terminator sollte mit dem zu komplementierenden Gen mitkloniert werden.

Der Expressionsvektor pLiga164 besitzt außer einem spezifischen Replikationsstart zusätzlich einen PrfA-abhängigen *actA*-Promotor, eine Terminatorsequenz (LisA) und zur Überexpression des klonierten Gens das *prfA*-Gen.

2.2.15 Extraktion von Proteinen

2.2.15.1 TCA-Fällung von Proteinen im Kulturüberstand

Eine 50 ml Kultur ($OD_{600} = 0,8-1,0$) des entsprechenden Stammes wurde für 15 min bei 6238 g, 4 °C zentrifugiert, der Kulturüberstand in ein steriles 50 ml Greiner Röhrchen überführt und mit TCA versetzt (Endkonzentration 10 %). Die Präzipitation erfolgte für mindestens 12 bis 24 h bei 4 °C. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation bei 4 °C, 6238 g, 15 min pelletiert, der Überstand wurde entfernt und das Pellet zweimal mit 25 ml Aceton gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das restliche Aceton vollständig entfernt, das Pellet an der Luft getrocknet und in 240 µl 1 M Tris/HCl, pH 8,8 gelöst. Die Proteinlösung wurde mit 80 µl 4 x Roti-Load und 3,2 µl 100 mM Pefabloc SC versetzt und bei -20 °C gelagert. Für eine SDS-Page (Kapitel 2.2.16) wurden je 10 µl SeeBlue™ Marker als Protein-Größenstandard und 20 µl der Proteinlösung des jeweiligen Stammes aufgetragen.

2.2.15.2 SDS-Extraktion von mit der Zellwand assoziierten Proteinen

Eine 50 ml Kultur ($OD_{600} = 0,8-1,0$) wurde in ein steriles 50 ml Greiner-Röhrchen gefüllt und bei 4 °C, 15 min, 6238 g pelletiert. Der Überstand wurde vollständig dekantiert und das Pellet in 1,8 ml 1 % SDS (in 1 x PBS) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 45 min bei 37 °C im Schüttelwasserbad bei 200 rpm wurde die Suspension in 2-ml-Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (18186 g, 15 min, 4 °C) und der klare Überstand zur Präzipitation der Proteine mit TCA versetzt (Endkonzentration 10 %). Die Präzipitation erfolgte für mindestens 12 bis 24 h bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurden die Proben zentrifugiert (18186 g, 15 min, 4 °C), der Überstand verworfen und das Pellet in 240 µl 1 M Tris/HCl, pH 8,8 aufgenommen. Die Proteinlösung wurde mit 80 µl 4 x Roti-Load und 3,2 µl 100 mM Pefabloc SC versetzt und bei -20 °C gelagert. Für eine SDS-Page (Kapitel 2.2.16) wurden je 10 µl SeeBlue™ Marker als Protein-Größenstandard und 20 µl der Proteinlösung des jeweiligen Stammes aufgetragen.

2.2.16 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Polyacrylamidgele

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

4 x Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
10 x SDS-Laufpuffer:	30,3 g Tris 144 g Glycin 20 g SDS ddH ₂ O ad 1 l
2 x Probenpuffer:	0,5 M Tris/HCl, pH 6,5 10 % SDS 22 % Glycerin 10 % β-Mercaptoethanol 8 M Harnstoff 0,25 % Bromphenolblau
Coomassie R250:	0,2 % Coomassie R250 45 % Methanol 10 % Eisessig filtriert
Blitzentfärber:	400 ml Methanol 100 ml Eisessig ddH ₂ O ad 1 l
ÜN-Entfärber:	50 ml Methanol 75 ml Eisessig ddH ₂ O ad 1 l

Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels:

Trenngel (10 %):

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

Sammelgel (5 %):

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

Die Lösung für das Trenngel wurde in zwei durch Spacer getrennte Glasplatten (BioRad oder Phase) bis ca. 1,5 cm unterhalb des oberen Randes gegossen und vorsichtig mit Wasser überschichtet. Nach Auspolymerisation des Trenngels wurde das Wasser entfernt, der Kamm zwischen den Glasplatten plaziert und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Die Proteinproben wurden mit 2 x Probenpuffer oder 4 x Roti-Load gemischt (1:1 bzw. 1:4) und

für 5 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt, kurz zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit 1 x SDS-Laufpuffer (10 x SDS-Puffer mit ddH₂O verdünnt) bei 150 V, 500 mA. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel entweder für einen Immunblot (Kapitel 2.2.17) auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) übertragen oder mit Coomassie R250 angefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit Blitzentfärbemittel innerhalb von 1-2 Stunden oder über Nacht mit ÜN-Entfärbemittel. Das Gel kann in 2 % Essigsäure mehrere Wochen bis Monate gelagert werden.

2.2.17 Protein-Nachweis im Immunblot

2.2.17.1 Immunblot

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

Proteine, die im Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt worden sind, können im Anschluß an die Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen werden (Immunblot).

Der Blot erfolgte semi-dry mit Hilfe einer von der Institutswerkstatt gebauten Graphit-Blotkammer. Dazu wurden 2 Lagen Whatmanpapier 3MM 5 min in 1 x Blotpuffer getränkt und auf die untere Graphitplatte der Apparatur aufgelegt. Auf das Whatmanpapier wurde eine für 5 min mit Methanol vorbehandelte Immobilonmembran luftblasenfrei aufgelegt und mit dem Polyacrylamidgel bedeckt. 2 Lagen für 5 min in 1 x Blotpuffer getränktes Whatmanpapier 3MM wurden aufgelegt und die obere Graphitplatte angebracht. Der Blot erfolgte für 2 Stunden bei 30 V und 200 mA.

2.2.17.2 Immunblot-Detektion mit Alkalische Phosphatase-konjugierten Antikörpern

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

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

Die Membran, auf die das Proteinmuster des Polyacrylamidgels übertragen worden war, wurde für die Durchführung eines Immunblots mit 1 x Roti-Block in ddH₂O gesättigt (mindestens 30 min bis 1 Stunde bei RT oder ÜN bei 4°C). Anschließend wurde sie dreimal für 10 min mit 25 ml TBST gewaschen, bevor der erste Antikörper in TBST (1:2000 verdünnt) zugegeben wurde. Die Inkubation erfolgte für mindestens 2 Stunden auf dem Taumler bei RT.

Im Anschluß wurde die Membran dreimal für 10 min mit 25 ml TBST gewaschen und der zweite Antikörper (z.B.: Alkalische Phosphatase gekoppelter Anti-Maus-IgG, 1:1000 in TBST verdünnt) zugegeben. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei RT auf dem Taumler wurde die Membran erneut dreimal für 10 min mit 25 ml TBST gewaschen und in Glycinpuffer äquilibriert.

Die Detektion erfolgte durch Zugabe von 1 mg/ml BCIP. Die Positionen auf der Membran, die von den ersten und zweiten Antikörpern erkannt worden waren, wurden durch die Umsetzung des Substrates BCIP durch die Alkalische Phosphatase als blaue Banden (Niederschlag von Indigo) sichtbar. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Spülen mit Wasser gestoppt. Die Membran wurde getrocknet und lichtdicht zwischen Whatmanpapier und Aluminiumfolie aufbewahrt.

2.2.18 N-terminale Ansequenzierung von Proteinen

10 x Blotpuffer: 50 mM Tris	Amidoschwarzlösung: 0,5 g Amidoschwarz (Merck)
50 mM Borsäure	225 ml Methanol
	35 ml Essigsäure
	240 ml ddH ₂ O

Zwei SDS-Gele (Kapitel 2.2.16) wurden vorbereitet. Eine ausreichende Menge an Proteinen wurde aufgetragen und das Proteingemisch elektrophoretisch aufgetrennt.

Das als Kontrolle dienende Gel wurde zunächst mit Coomassie gefärbt, anschließend entfärbt. Das Proteinmuster des anderen Gels wurde mittels Naßblot auf eine MiniPro Blot-Membran (Applied Biosystems) übertragen. Dabei wurde die Membran in Methanol 1 min äquilibriert, mit ddH₂O gespült und für 2 h zusammen mit dem SDS-Gel und Whatmanpapier in der Blotkammer mit 1 x Blotpuffer bei 150 mA und 250 V geblottet.

Die Membran wurde dann kurz in Wasser geschwenkt und danach für 5 min mit Amidoschwarz gefärbt. Die Entfärbung erfolgte mit Wasser. Das Proteinmuster der Amidoschwarz-gefärbten Membran wurde mit dem Coomassie-gefärbten Gel verglichen und die gesuchte Bande aus der Membran herausgeschnitten und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Membran wurde bei RT getrocknet, die Proteinansequenzierung von der Abteilung für Zellbiologie der GBF in Braunschweig mit dem Applied Biosystems Phase Sequencer (Model A 470) und Online Phenylethiohydantoin (PTH) Aminosäure-Analyzer durchgeführt.

2.2.19 Reassoziationsassay

Eine ÜN-Kultur von Listerien wurde 1:50 in 10 ml BHI verdünnt und bei 37 °C und 200 rpm im Wasserbad bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 inkubiert. Bei Stämmen, die über eine Erythromycinresistenz verfügten, wurde dem BHI Erythromycin in einer Konzentration von 5 µg/ml hinzugefügt. 1 ml der Kultur wurde in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß für 2 min bei RT, 5938 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 1 x PBS gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift (Zentrifugation, Verwerfen des Überstandes, Zugabe von

1 ml 1 x PBS und Vortexen) wurde erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu dem Pellet wurde 1 ml eines in 1 x PBS verdünnten und langsam auf Raumtemperatur erwärmten Proteins pipettiert. Durch Vortexen wurde das Pellet gelöst. Es folgte eine Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur auf einem Inkubationsrad. Dann wurde fünfmal mit je 1 ml 1 x PBS gewaschen, um das nicht an die Listerien reassozierte Protein zu entfernen.

2.2.20 Zellkultur

2.2.20.1 Kulturbedingungen von eukaryontischen Zellen

Die Zellen wurden in Gewebekultur-Petrischalen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank mit 15 ml der entsprechenden Medien kultiviert. Bei den Medien MEM, DMEM und RPMI wurden jeweils 25 ml 100 % FKS (Endkonzentration 5 %) und 5 ml 100 x Glutaminlösung hinzugefügt. Dem MEM-Medium wurde zudem noch 5 ml 100 x nicht-essentielle Aminosäuren (NEA) beigegeben.

Tab. 2.9: Die für die Zelllinien verwendeten Medien.

Zelllinie	Medium
Caco-2	MEM
HeLa	MEM
Henle407	DMEM
L-929	RPMI
VERO	DMEM*
PtK2	MEM
A549	DMEM
Hep-G2	RPMI

* mit nicht-essentiellen Aminosäuren

Die adhärennten Zellen wurden mit Erreichen eines konfluenten Zellrasens mit 3 ml Hanks' Salt Solution gewaschen, durch 1ml Trypsin/EDTA von der Petrischale abgelöst und auf neue Schalen 1:2 verteilt.

2.2.20.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen

Einfriermedium: 8 % DMSO in FKS
sterilfiltriert, bei -20 °C gelagert

Zum Einfrieren von eukaryontischen Zellen wurden diese zunächst mit Hanks' Salt Solution gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und in ein 15 ml Greiner-Röhrchen pipettiert. Pro 1 ml des Zell-Trypsin-Gemisches werden 3 ml des entsprechenden Mediums beigegeben und bei Raumtemperatur für 5 Minuten und 292 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 1,5 ml Einfriermedium hinzupipettiert und die Zellen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 0,5-ml-Aliquots in 2-ml-Einfriergefäßen (Cryogenic Vials, Nalgene)

in einem mit 250 ml Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter (Nalgene) bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht eingefroren. Am folgenden Tag wurden die 2-ml-Einfriergefäße zur Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurde ein Aliquot für 5 min im Inkubationsschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt und in eine Petrischale mit frischem Medium überführt. Sobald die Zellen adhärent waren, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um Reste des Einfriermediums zu entfernen.

2.2.21 Infektionsassay für eukaryontische Zelllinien

2.2.21.1 Infektion von eukaryontischen Zelllinien mit Listerien

Eine ÜN-Kultur von Listerien wurde 1:50 in 10 ml BHI verdünnt und bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 200 rpm im Wasserbad bis zu einer OD_{600} von 0,8 bis 1,0 inkubiert. Bei Stämmen, die über eine Erythromycinresistenz verfügten, wurde dem BHI Erythromycin in einer Endkonzentration von $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ hinzugefügt. 1 ml der Kultur wurde für 2 min bei RT, 5938 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml des der eukaryontischen Zelllinie entsprechenden Mediums gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (2 Minuten, RT, 5938 g) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml Medium aufgenommen und durch 10maliges Mischen mit einer Pipette resuspendiert. Je $8\text{ }\mu\text{l}$ der gut durchmischten Kultur wurden in Wells einer vorbereiteten 24-Well-Platte pipettiert (multiplicity of infection 100:1). In den Wells befanden sich jeweils ein konfluenter Zellrasen und 1 ml Medium, in den für die Fluoreszenzmikroskopie vorgesehenen Wells zusätzlich ein Deckgläschen. Der Inhalt der Wells wurde vorsichtig einmal durchmischt und die Platte 1 min bei 863 g zentrifugiert. Nach einer Inkubation von einer Stunde im Brutschrank ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2), in der die Bakterien die Möglichkeit zur Invasion hatten, wurde das Medium abgesaugt und die Wells zweimal mit je 1 ml 1 x PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 1 ml frischem Medium und Gentamicin (Endkonzentration $50\text{ }\mu\text{g/ml}$) wurden extrazelluläre Listerien während einer weiteren einstündigen Inkubation im Brutschrank abgetötet, so daß nur intrazelluläre Bakterien in eukaryontischen Zellen überlebten, sich vermehrten und ausbreiteten. Nach der Inkubation wurde erneut das Medium abgesaugt und dreimal mit je 1 ml 1 x PBS gewaschen.

Um die Infektion der Zellen zu quantifizieren, wurden diese für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 1 ml einer 0,2 % Triton X-100 Lösung in ddH₂O inkubiert. Nach dieser Permeabilisierung der Wirtszellmembran wurde die Suspension aus Bakterien und eukaryontischen Zellen zehnmal mit einer Pipette durchmischt und je nach Stamm in 1 x PBS verdünnt. Sowohl Bakterienkultur (Inokulum) als auch die Suspension (invadierte Listerien) wurden in adäquaten Verdünnungen auf BHI-Platten mit dem Autoplate 3000 ausplattiert und über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Anzahl der erhaltenen Kolonien konnten entweder entsprechend der Herstelleranleitung manuell oder mit der Software des CASBA IV ausgewertet werden. Dabei wurde für die Errechnung der relativen Invasion der Referenzstamm mit 100 % angegeben. Die Standardabweichung ergab sich aus drei oder mehr Versuchen.

Um die Infektion der Zellen mikroskopisch zu beurteilen, wurden die Wells mit Deckgläschen für 5 Minuten mit 3,7 % Formaldehyd inkubiert. Nach dieser Fixierung durch

Formaldehyd wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mit Hilfe der Immunfluoreszenz (Kapitel 2.2.22.1) betrachtet.

2.2.21.2 Infektion von eukaryontischen Zelllinien mit Listerien nach Reassoziationsassay

Listerien wurden zunächst nach dem Reassoziationsassay (Kapitel 2.2.19) behandelt und dann für die Infektion von eukaryontischen Zellen nach dem Infektionsassay (Kapitel 2.2.21.1) verwendet.

2.2.22 Mikroskopieren

2.2.22.1 Immunfluoreszenzfärbung von Listerien in infizierten eukaryontischen Zellen

Moviol mit Ausbleichschutz: 1 Teil N-Propyl-Gallat (P3130, Sigma)
3 Teile Moviol (Hoechst)

Moviol: 2,4 g Moviol
4,76 ml Glycerin
6 ml ddH₂O, 2 h bei RT
12 ml 0,2 M Tris/HCl, pH 8,5, 10 min, 50 °C
Zentrifugation 5000 g, 15 min, untere Phase verworfen
bei 4 °C gelagert

N-Propyl-Gallat: 2,5 % in Glycerin/PBS (1:1), bei 4 °C gelagert

Parallel zum Infektionsassay wurde ein mit eukaryontischen Zellen beschichtetes Deckgläschen infiziert. Die Immunfluoreszenz ermöglichte die Kontrolle der eukaryontischen Zellen, die Kontrolle der Invasionseffizienz und des Adhärenzverhaltens der Bakterien beim Infektionsassay.

Am Ende des Infektionsassays (Kapitel 2.2.21.1) wurde das mit Zellen beschichtete Deckgläschen mit 500 µl 3,7 % Formaldehyd (in 1 x PBS verdünnt) 5 min bei RT fixiert. Anschließend wurde das Deckgläschen mit 1 ml 1 x PBS gewaschen und zum Permeabilisieren der Zellmembran der eukaryontischen Zellen 2 min mit 500 µl 0,2 % Triton X-100 (in 1 x PBS verdünnt) behandelt. Es folgte ein Waschschriff mit 1 ml 1 x PBS. Das Deckgläschen wurde in eine feuchte Kammer gelegt und 15 µl des primären Antikörpers (M108 B11, unverdünnt) wurden auf das Deckgläschen pipettiert. Dieser Antikörper bindet an extrazellulär liegende Listerien. Anschließend wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Antikörperlösung wurde danach dreimal kurz mit 1 x PBS abgewaschen, bevor 15 µl des sekundären Antikörpers Cy3-Anti-Maus IgG (1:100 verdünnt in 1 x PBS) dazupipettiert wurden. Die sekundäre Antikörperlösung enthielt zusätzlich FITC-Phalloidin (1:50 verdünnt in 1 x PBS). Cy3-Anti-Maus IgG bindet an den primären Antikörper und erscheint in der Fluoreszenz durch den Cy3-Farbstoff rot. Phalloidin bindet an Aktin des Zytoskeletts der

eukaryontischen Zelle und daher besonders an die Aktinakkumulation, die durch *L. monocytogenes* induziert wird. Durch FITC erscheint Phalloidin und damit indirekt das Aktin in der Fluoreszenz grün. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 37 °C wurde das Deckgläschen erneut 3 x kurz mit 1 x PBS abgespült und dann in Moviol eingebettet.

Dazu wurden 4 µl Moviol mit Ausbleichschutz auf einen Objektträger pipettiert und das Deckgläschen luftblasenfrei auf den Objektträger aufgelegt. Nach 15 min bei 37 °C im Brutschrank wurde das Deckgläschen mit farblosem Nagellack versiegelt. Die Immunfluoreszenz wurde im Fluoreszenzmikroskop oder im konfokalen Laserscanmikroskop ausgewertet. Der Objektträger kann kühl und dunkel 2-4 Wochen gelagert werden.

2.2.22.2 Konfokale Laserscanmikroskopie

Die konfokale Laserscanmikroskopie diente zur Darstellung, Bewertung und Archivierung der Immunfluoreszenzfärbungen von Bakterien und eukaryontischen Zellen aus dem Infektionsassay (Kapitel 2.2.21.1). Dabei konnten zwei- und dreidimensionale Bilder mit horizontaler und vertikaler Schnittebene digital mit dem konfokalen Laserscanmikroskop DM IBRE von Leica aufgenommen werden.

3 Ergebnisse

3.1 Die Sequenz von ORFA und dem *inLAB*-Operon

3.1.1 Sequenzierung von ORFA und *inLAB*-Operon

ORFA, ein offenes Leseraster stromaufwärts vom *inLAB*-Operon mit ungeklärter Funktion, und das *inLAB*-Operon wurden sequenziert (Kap. 2.2.2 und 7.2), um diesen Sequenzbereich von 5912 bp des Stammes *L. monocytogenes* EGD 1/2a (Abb. 3.1) mit dem von *L. monocytogenes* EGD-SmR (Gaillard *et al.*, 1991) vergleichen zu können. Der Vergleich sollte Aufschluß über die Charakteristika auf genetischer Ebene und eventuelle Unterschiede in der Struktur des Genproduktes geben.

Dazu wurde zunächst das rekombinante Plasmid pMH4 verwendet, das aus dem Vektor pCRII und dem Insert *inLAB* besteht. Zur Überprüfung der Sequenz aus pMH4 wurde das gesamte Operon auf dem von M. Hudel hergestellten Plasmid MZM6 nochmals sequenziert.

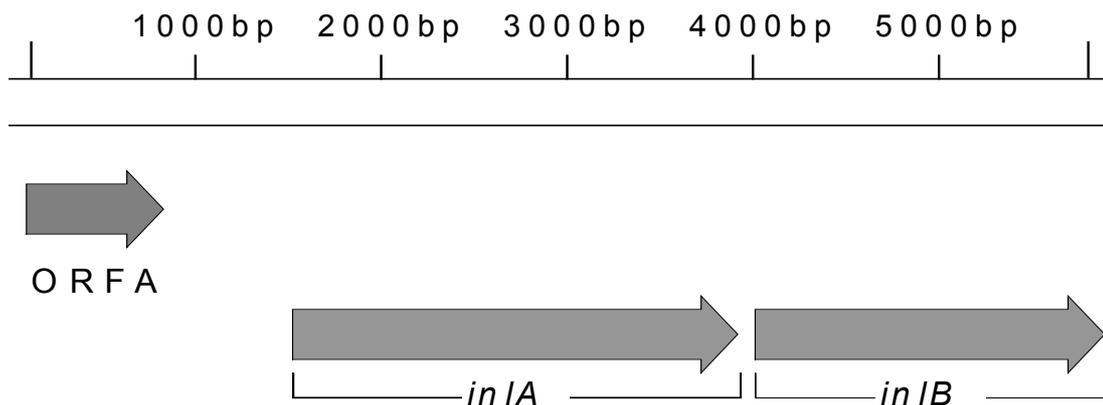


Abb. 3.1: Leserichtung und Lage von ORFA und des *inLAB*-Operons im Bereich der sequenzierten 5912 Nukleotide.

Tab. 3.1: Verwendete Primer und deren Bindungsstelle für die Sequenzierung des *inLAB*-Operons.

Primer	Bindungsstelle	sequenzierter Genabschnitt
1314	0110-0064	0001-0032
TH55	5' von ORFA	0033-0600
4616	0520-0546	0601-0735
M100	Universal	0736-1320
1323	1793-1768	1321-1733
1328	1638-1657	1734-2246
TH5	2035-2057	2247-2550
TH6	3083-3062	2551-2989
TH3	2775-2797	2990-3473

Primer	Bindungsstelle	sequenzierter Genabschnitt
1334	3910-3885	3474-3799
1318	4448-4419	3800-4212
4144	4829-4812	4213-4766
TH11-A	5332-5312	4767-5224
1321	5912-5878	5225-5850
3057	5301-5322	5851-5912

3.1.2. Vergleich der Nukleotid- und Aminosäuresequenz von InternalinA, InternalinB und ORFA der Stämme *L. monocytogenes* EGD 1/2a und *L. monocytogenes* EGD-SmR

Die Sequenzierung des Stammes *L. monocytogenes* EGD 1/2a und der Vergleich mit der Nukleotidsequenz des Stammes *L. monocytogenes* EGD-SmR ergaben 47 Unterschiede in der Nukleotidsequenz (Tab. 3.2). Von den Nukleotidunterschieden, die nicht in einem offenen Leseraster lagen, betraf kein Unterschied Positionen innerhalb von Promotoren, Terminatoren oder Shine-Dalgarno-Sequenzen. Start- oder Stopcodons waren ebenfalls nicht betroffen.

Die ORFA- und *inLAB*-Operon-Sequenz des Stammes *L. monocytogenes* EGD 1/2a ist im Kapitel 7.2 dargestellt. Die Angaben zu den genetischen Elementen der Sequenz mit Ausnahme der Promotoren für die Gene *inlA* und *inlB* wurden von Gaillard *et al.* (1991), die Promotor- und LRR-Angaben für *inlA* und *inlB* von Lingnau *et al.* (1995) und Domann *et al.* (1997b) übernommen.

Tab. 3.2: Unterschiede der Nukleotidsequenz des *inLAB*-Operons der Stämme *L. monocytogenes* EGD 1/2a und *L. monocytogenes* EGD-SmR und deren Position. **Fette Kursivschrift** kennzeichnet die Nukleotidunterschiede, die auch in der Aminosäuresequenz zu Unterschieden führen.

Leseraster	Position in der Nukleotid- sequenz	Nukleotid von <i>L. monocytogenes</i> EGD-SmR	Nukleotid von <i>L. monocytogenes</i> EGD 1/2a
-	0059	A	C
ORFA	0248	T	C
	0258	A	G
	0317	A	G
	0650	C	T
-	0920	A	T
	0925	A	G
	1056	C	A
	1420	T	C
	1421	A	G

Leseraster	Position in der Nukleotidsequenz	Nukleotid von <i>L. monocytogenes</i> EGD-SmR	Nukleotid von <i>L. monocytogenes</i> EGD 1/2a
<i>inlA</i>	1595	T	C
	1616	C	T
	1682	C	T
	1683	G	A
	1745	G	A
	1812	T	G
	1868	T	C
	1884	G	A
	1997	A	G
	2048	T	C
	2092	A	G
	2192	A	G
	2567	G	T
	2681	C	A
	2855	G	A
	2864	T	A
	2892	G	A
	2897	A	G
	2900	G	T
	3031	C	T
	3251	G	T
	3311	A	G
	3312	C	G
3338	C	T	
<i>inlB</i>	4140	T	C
	4164	C	T
	4361	A	G
	4368	A	G
	4413	A	G
	4418	A	G
	4440	C	T
	4781	C	T
	5072	C	T
	5205	A	G
	5585	G	A
	5675	T	C
	5684	A	G

Aus den 41 in einem offenen Leseraster liegenden Unterschieden der Nukleotidsequenz resultierten insgesamt 16 Unterschiede in der Aminosäuresequenz (Tab. 3.3). Durch die Degeneration des genetischen Codes wirkten sich 25 Nukleotidunterschiede nicht in der Aminosäuresequenz aus. Wie bereits erwähnt, hatten die übrigen Nukleotidunterschiede keinen Einfluß auf Promotoren, Terminatoren oder Shine-Dalgarno-Sequenzen.

Tab. 3.3: Unterschiede der Aminosäuresequenz von ORFA, InIA und InIB der Stämme *L. monocytogenes* EGD 1/2a und *L. monocytogenes* EGD-SmR und deren Position.

Leseraster	Position in der Aminosäuresequenz	Aminosäure von <i>L. monocytogenes</i> EGD-SmR	Aminosäure von <i>L. monocytogenes</i> EGD 1/2a
ORFA	048	Ile	Thr
	071	Lys	Arg
	182	Ala	Val
InIA	051	Ala	Thr
	094	Leu	Val
	118	Asp	Asn
	187	Asn	Ser
	454	Ala	Thr
	500	Ala	Val
	573	Glu	Asp
594	Pro	Ala	
InIB	041	Ser	Pro
	049	Pro	Ser
	117	Thr	Ala
	132	Ile	Val
	396	Thr	Ala

Im InIA unterschieden sich in Position 118 die Aminosäuren in ihrer Ladung: Asparaginsäure ist bei neutralem pH ionisiert, also negativ geladen, Asparagin ist nicht ionisiert. Die übrigen Aminosäuren des InIA und des InIB zeigten keinen Unterschied in ihrer Ladung in wäßriger Lösung. Es bestanden jedoch mehrere Unterschiede bezüglich der hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften, da in einigen Positionen polare durch hydrophobe Aminosäuren und umgekehrt ersetzt waren.

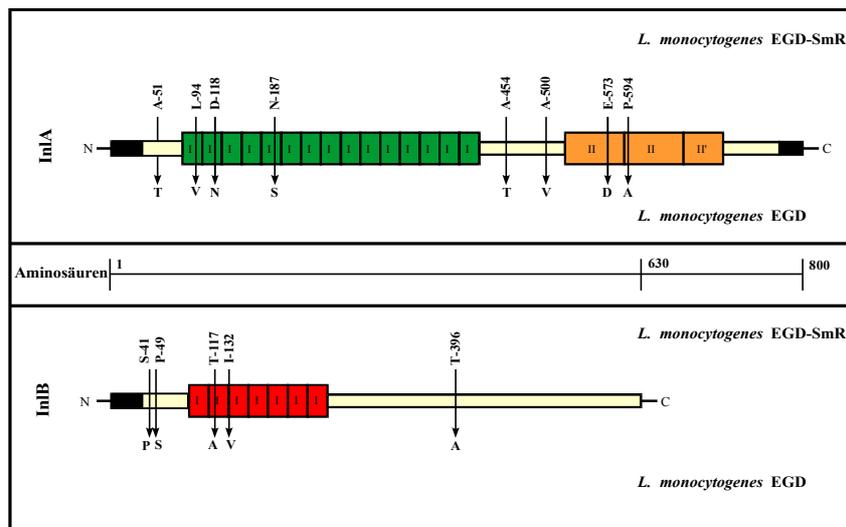


Abb. 3.2: Unterschiede der Aminosäuresequenz des *inlAB*-Genprodukts der Stämme *L. monocytogenes* EGD 1/2a und *L. monocytogenes* EGD-SmR und deren Position in den einzelnen Abschnitten von InlA und InlB (Farberklärung: grün = LRR-Domäne von InlA, orange = Zellwanddomäne von InlA, rot = LRR-Domäne von InlB, schwarz = N-terminal Signalpeptid oder C-terminal Membrananker).

Um die Nukleotid- und Aminosäuresequenz der Stämme *L. monocytogenes* EGD 1/2 a und *L. monocytogenes* EGD-SmR zu vergleichen, wurden mit dem BESTFIT-Programm (HUSAR-GCG, DKFZ, Heidelberg) Homologiestudien durchgeführt. Mit Ähnlichkeiten von 99,2 % für das Genprodukt des ORFA, 99,5 % für InlA, 99,4 % für InlB und 99,2 % für die Gesamtnukleotidsequenz des *inlAB*-Operons waren beide Stämme diesbezüglich somit als nahezu identisch anzusehen.

Mit dem Internalin-ähnlichen Protein IrpA und den von Dramsi *et al.* (1997) gefundenen „neuen Internalinen InlC2, InlE und InlF“ wurden InlA und InlB zusätzlich verglichen. (Clustal-Methode, Lasergene von DNASTar). Dabei stellte sich heraus, daß nur das InlC2 stärkere Ähnlichkeiten mit InlD (61,1 %), InlE (60,5 %) und InlA (49,8 %) zeigte. Die restlichen Ähnlichkeitswerte des Vergleichs waren mit 27,6 % und 42,5 % für die Internalin-Proteine geringer (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Vergleich der Ähnlichkeiten (in %) aller bekannten Internalin-Proteine (***) = identisch).

InlA	InlB	IrpA	InlC2	InlD	InlE	InlF	
***	31.7	39.1	49.8	42.5	42.3	40.0	InlA
	***	38.7	32.3	29.5	33.5	27.6	InlB
		***	35.0	34.7	33.7	32.0	IrpA
			***	61.1	60.5	37.2	InlC2
				***	45.5	33.0	InlD
					***	36.1	InlE
						***	InlF

3.2 Molekular- und zellbiologische Arbeiten mit der $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante

3.2.1 Komplementationen der $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante mit dem Vektor pERL-3 und dessen rekombinanten Plasmiden

Tab. 3.5: Übersicht über die Komplementation von $\Delta inLAB2$ mit dem Vektor pERL-3 und verschiedenen Abschnitten des *inLAB*-Operons.

Stamm	Komplementation		Rekombinantes Plasmid
	Vektor	Gen	
$\Delta inLAB2$	pERL-3	-	-
$\Delta inLAB2$	pERL-3	<i>inIA</i>	pMH5
$\Delta inLAB2$	pERL-3	<i>inIB</i>	pMH6
$\Delta inLAB2$	pERL-3	<i>inIB</i> _[P_{inIA}]	pMH7
$\Delta inLAB2$	pERL-3	<i>inIAB</i>	pMH8

In der $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante sind die Gene *inIA* und *inIB* deletiert. Die Mutante wurde mit dem Expressionsvektor pERL-3 komplementiert (Kapitel 2.2.13), in den zuvor verschiedene Genabschnitte der Internaline kloniert wurden (Tab. 3.5). Diese Komplementation und die vorherige Klonierung diente der Herstellung von Komplementanten, an denen die Rolle der einzelnen Abschnitte des *inLAB*-Operons beim Invasionsprozeß in die jeweiligen eukaryontische Zelllinien untersucht werden sollte.

3.2.2 Klonierung von Internalingenen in den Expressionsvektor pERL-3

Für die Klonierung von Internalingenen in den Expressionsvektor pERL-3 wurden von Martina Hudel hergestellte rekombinante Plasmide (pCRII und Insert) verwendet, aus denen die entsprechenden Gene herausgeschnitten wurden.

inIA wurde mit den Primern 1317 und 4141 aus chromosomaler DNA von *L. monocytogenes* EGD amplifiziert. Das 3421 bp große Fragment wurde mit Hilfe des TA-Cloning Kits von Invitrogen in pCRII kloniert. Das rekombinante Plasmid wurde pMH1 (pCRII + 3,42 kb-Insert) genannt.

inIB wurde in gleicher Weise kloniert, wobei das Primerpaar 1320 und 4142 zur Amplifizierung eines DNA-Fragments von 2768 bp genutzt und das Plasmid pMH2 (pCRII + 2,77 kb-Insert) genannt wurde.

inIB mit dem stromaufwärts liegenden PrfA-abhängigen Promotor des Internalinoperons (*inIB*_[P_{inIA}]) wurde mit den Primern 1317 und 4142 aus chromosomaler DNA der Deletionsmutante $\Delta inIAB2$ amplifiziert und in pCRII kloniert. Das rekombinante Plasmid bestehend aus pCRII und dem 3866 bp großen Insert wurde pMH3 genannt.

inIAB wurde mit dem Primern 1317 und 4142 aus chromosomaler DNA von *L. monocytogenes* EGD amplifiziert. Das resultierende PCR-Produkt zeigte eine Länge von 5892

bp und wurde ebenfalls in pCRII kloniert. Das rekombinante Plasmid wurde pMH4 (pCRII + 5,89 kb-Insert) genannt.

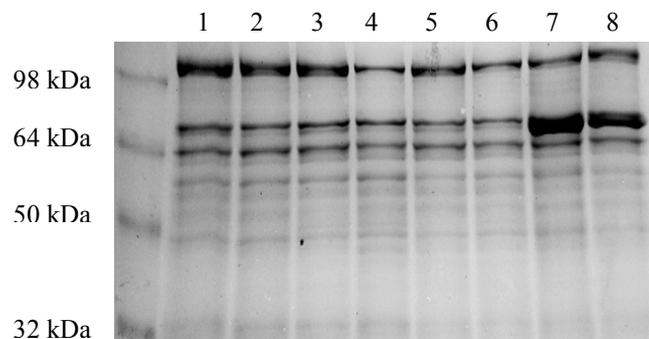
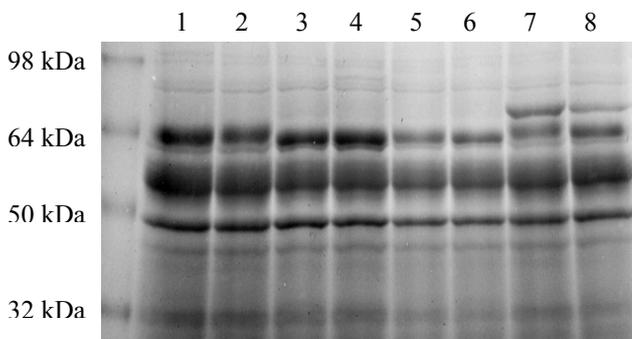
Diese rekombinanten Plasmide wurden im weiteren von M. Hudel für die Klonierung der Internalingene in den Expressionsvektor pERL-3 verwendet. Aus pMH1, pMH2 und pMH4 wurden mit den Restriktionsendonukleasen *XhoI* und *BamHI* Fragmente geschnitten, die die entsprechenden Internalingene trugen. Diese Fragmente wurden in den mit *SalI* und *BglII* geschnittenen Vektor pERL-3 kloniert (Kapitel 2.2.6). Das *inlB*_[*P*_{*inlA*}] tragende Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *NsiI* aus pMH3 herausgeschnitten und in die kompatiblen *XhoI*- und *PstI*-Schnittstellen des linearisierten Vektors pERL-3 kloniert. Die rekombinanten pERL-3 Plasmide wurden pMH5 (3,50 kb-*inlA*-Insert), pMH6 (2,85 kb-*inlB*-Insert), pMH7 (3,97 kb-*inlB*_[*P*_{*inlA*}]-Insert) und pMH8 (5,97 kb-*inlAB*-Insert) genannt und mit den entsprechenden Primerpaaren, die ursprünglich für die Amplifizierung der Fragmente bei der Klonierung in pCRII verwendet worden waren, auf die richtige Größe des jeweiligen Inserts überprüft (Kapitel 2.2.3, 2.2.4). Protoplasten der Δ *inlAB2*-Deletionsmutanten wurden mit dem Vektor pERL-3 und den rekombinanten Plasmiden pMH5, pMH6, pMH7 und pMH8 transformiert (Kapitel 2.2.13).

3.2.3 Nachweis der Expression der Genprodukte von Δ *inlAB2*-Komplementanten im Immunblot

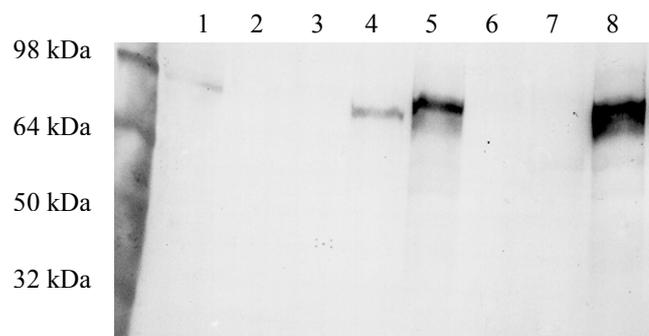
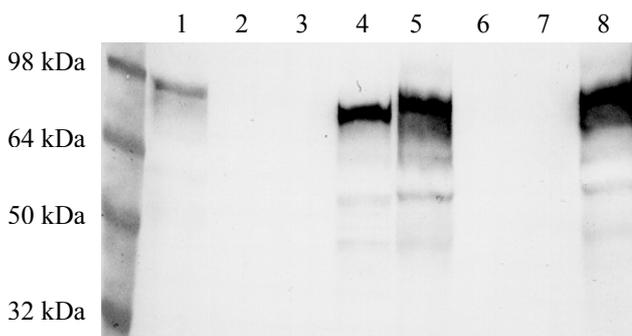
Kulturüberstandsproteine

Zellwandproteine

A



B



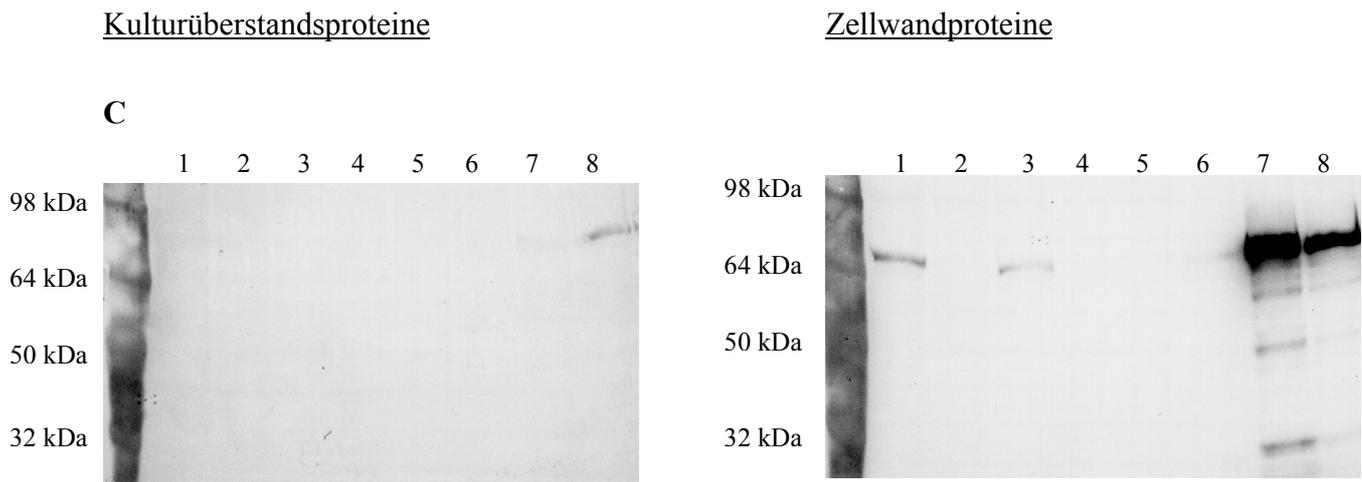


Abb. 3.3: Vergleich der Kulturüberstands- und Zellwandproteine des Wildtyps EGD mit den komplementierten $\Delta inlAB2$ -Deletionsmutanten im Coomassie gefärbten SDS-Gel (A) und im Immunblot (B: mAk α -InlA L244, C: mAk α -InlB IF32F8).

Linker Rand SeeBlueTM-Marker; Spur 1: EGD; Spur 2: $\Delta inlAB2$; Spur 3: $\Delta inlA2$; Spur 4: $\Delta inlB2$; Spur 5: $\Delta inlAB2$ +pERL-3+*inlA*; Spur 6: $\Delta inlAB2$ +pERL-3+*inlB*; Spur 7: $\Delta inlAB2$ +pERL-3+*inlB*_[*pinlA*]; Spur 8: $\Delta inlAB2$ +pERL-3+*inlAB*.

Im Immunblot wurden die Proteine InlA (82,6 kDa) und InlB (67,2 kDa) mit den monoklonalen Antikörpern L244 gegen InlA und IF32F8 gegen InlB detektiert (Kap. 2.2.15-17). Das Molekulargewicht bezieht sich auf errechnete Werte (DNASar) ohne Signalpeptid.

Im Coomassie-Gel (Abb. 3.3A) des Kulturüberstandes zeigten sich keine Unterschiede in den Bandenmustern der komplementierten Deletionsmutanten bis auf eine zusätzliche Bande in der mit *inlB*_[*pinlA*] komplementierten Deletionsmutante $\Delta inlAB2$ von ca. 67 kDa und eine schwächere Bande derselben Größe in der mit *inlAB* komplementierten Deletionsmutanten. Diese Bande entsprach der Größe des InlB. Im Coomassie-Gel der Zellwandproteine war ebenfalls die zusätzliche Bande im Falle dieser beiden Komplementanten und auch in demselben Mengenverhältnis zu sehen.

Der Immunblot für das InlA-Protein zeigte, daß sich mehr InlA im Kulturüberstand befand als im Zellwandextrakt (Abb. 3.3B). Das Protein wurde wie erwartet in den Kulturüberstandsproteinen des Wildtyps, stärker jedoch in der $\Delta inlB2$ -Deletionsmutante und in der mit *inlA* und *inlAB* komplementierten $\Delta inlAB2$ -Deletionsmutante nachgewiesen, wobei das Protein stark abgebaut war. Nach der SDS-Zellwandextraktion fiel die im Vergleich zu den anderen Deletionsmutanten geringere Menge an InlA in der $\Delta inlB2$ -Deletionsmutante auf. Ein Abbau des Proteins war im Gegensatz zu den anderen Deletionsmutanten kaum zu sehen. Beide Immunblots für das InlA-Protein zeigten, daß die Proteinbande des InlA aus der $\Delta inlB2$ -Deletionsmutante tiefer lief als das native InlA.

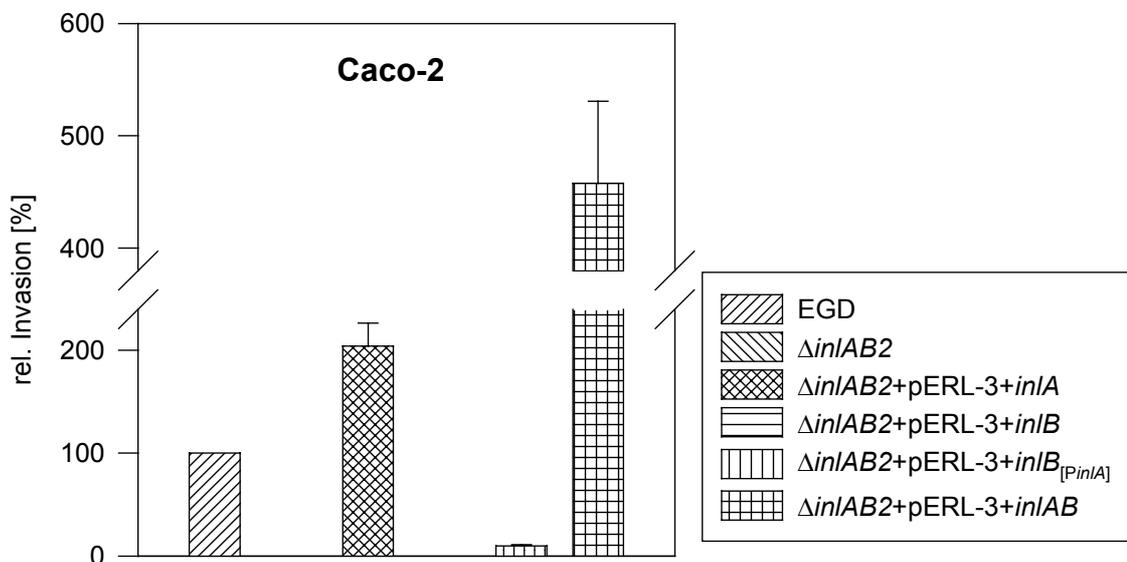
Der Immunblot für das InlB-Protein präsentierte mehr InlB im Zellwandextrakt als im Kulturüberstand (Abb. 3.3C). Unter den gefällten Überstandsproteinen konnte InlB in der mit

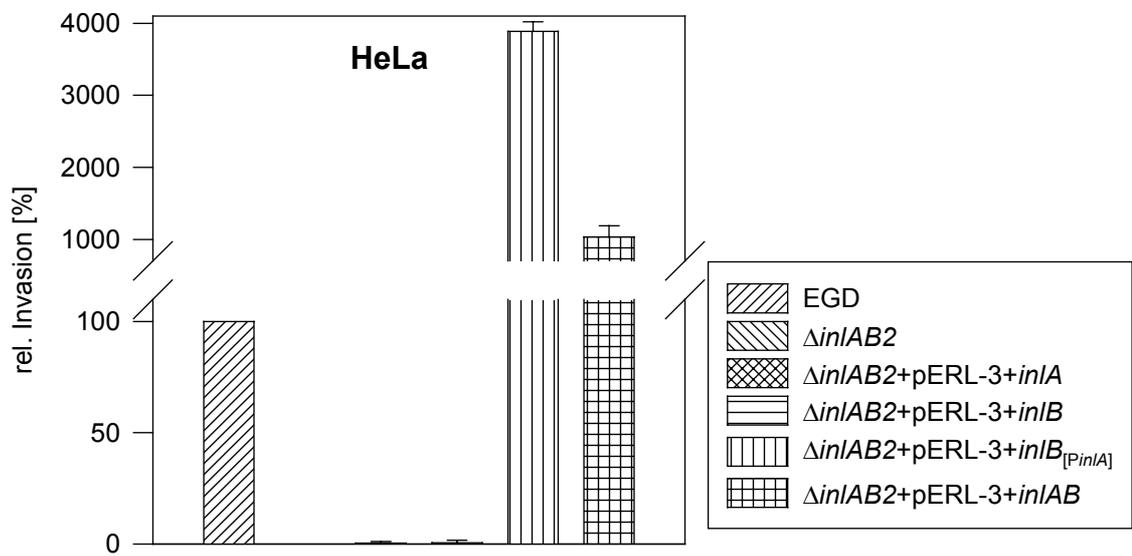
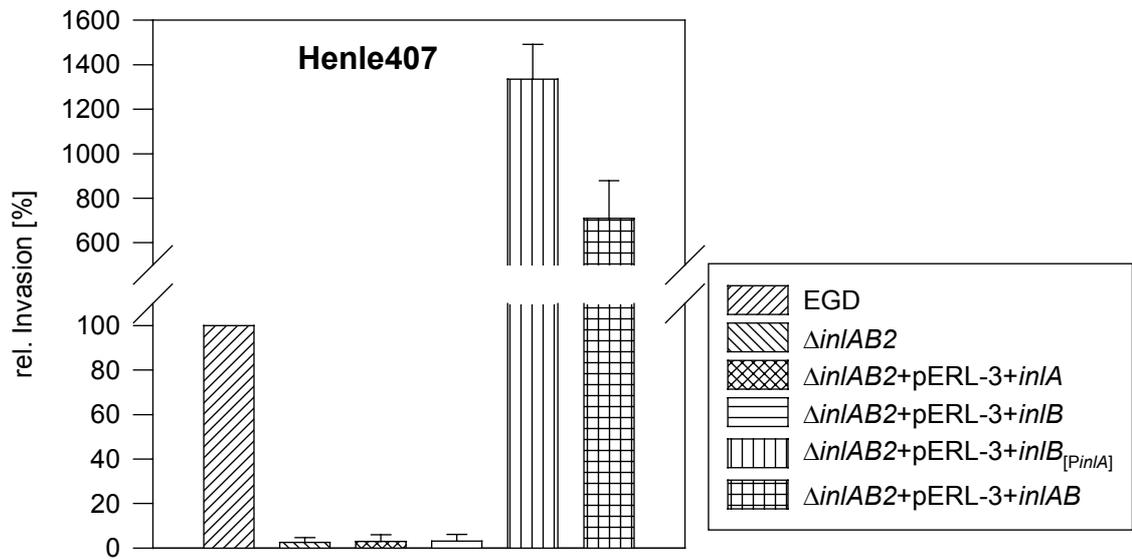
inlAB und äußerst schwach in der mit *inlB*_[*pinlA*] komplementierten Δ *inlAB2*-Deletionsmutante nachgewiesen werden. Unter den SDS-extrahierten Zellwandproteinen war das Protein im Wildtyp und schwächer in der Δ *inlA2*-Deletionsmutante nachzuweisen. Sehr schwach wurde das Protein in der Komplementation mit *inlB*, sehr stark in der Komplementation mit *inlAB* und vor allem in der mit *inlB*_[*pinlA*] detektiert. Die beiden letztgenannten zeigten Abbau des Proteins.

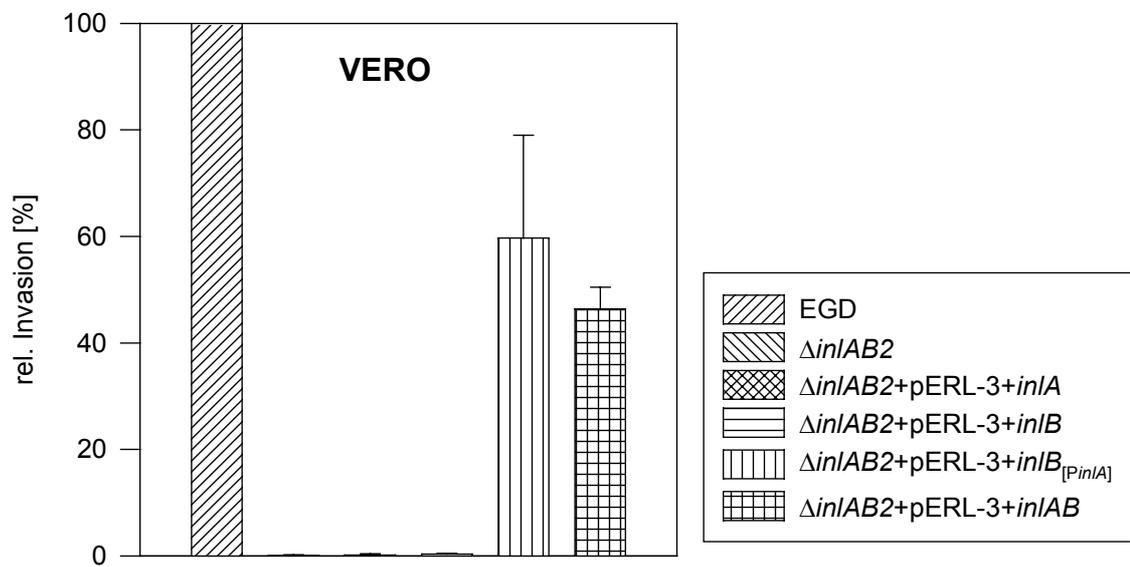
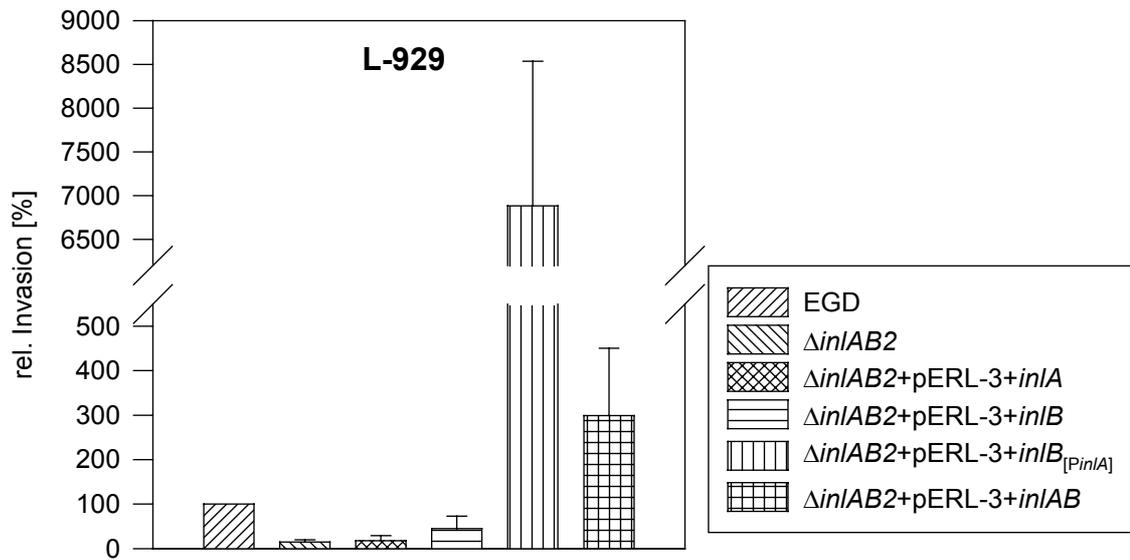
3.2.4 Überprüfung der Invasionsfähigkeit der Δ *inlAB2*-Komplementanten im Infektionsassay

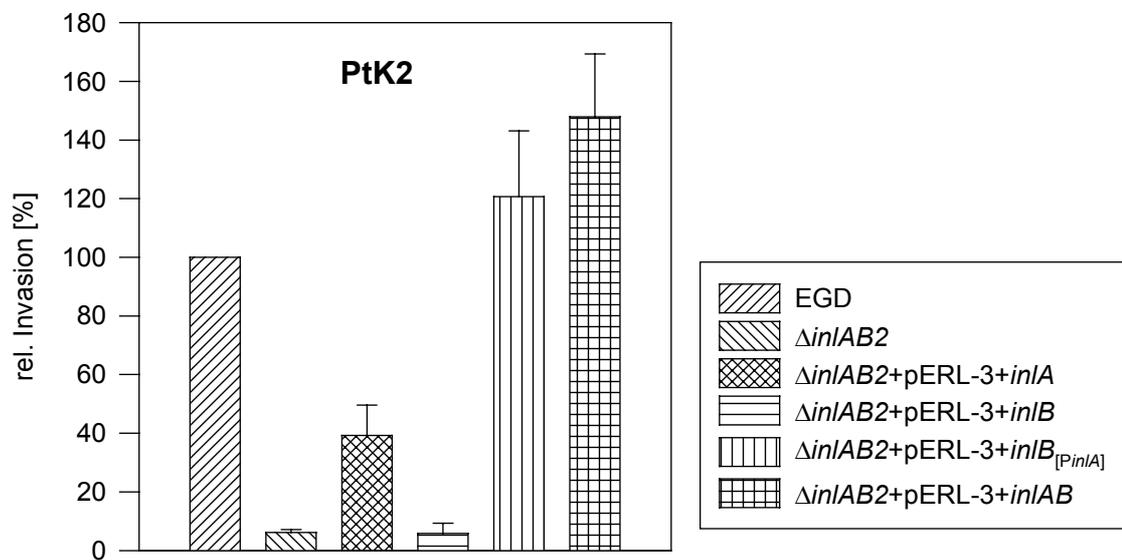
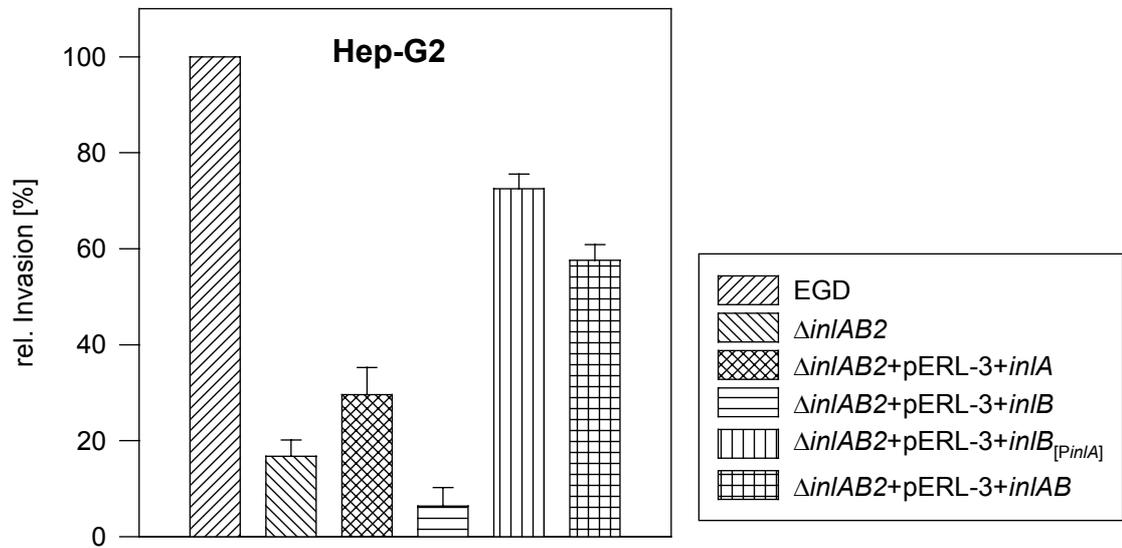
Um die Invasivität der Δ *inlAB2*-Komplementanten zu bestimmen, wurden Infektionsassays durchgeführt (Kap. 2.2.21.1).

Die Invasionsfähigkeit der einzelnen Komplementanten wurde hierzu im Vergleich zum Wildtyp *L. monocytogenes* EGD mit verschiedenen Zelllinien festgestellt. Als Negativkontrolle wurde die Δ *inlAB2*-Deletionsmutante verwendet.









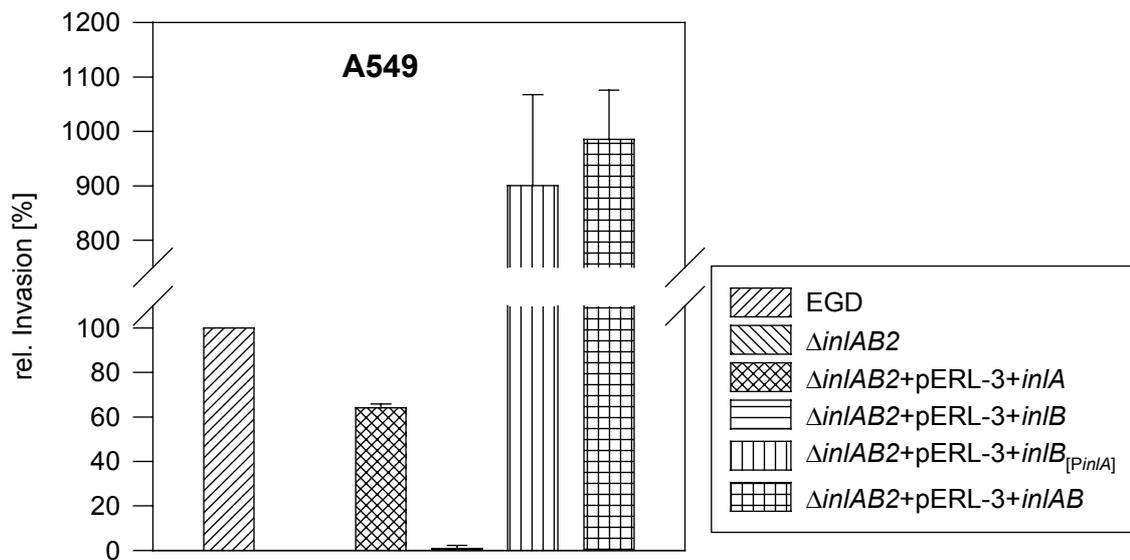


Abb. 3.4: Invasionsverhalten der $\Delta inLAB2$ -Komplementanten in verschiedenen eukaryontischen Zelllinien.

Bei der Infektion der Zelllinie Caco-2 übertrafen die *inIA*- und *inIAB*-Komplementanten die Invasion des Wildtyps mit 204,1 und 457,7 %. Unter den übrigen Komplementanten zeigte lediglich noch die *inIB_[PinIA]*-Komplementante mit 9,6 % Invasionsfähigkeit.

In der Zelllinie Henle407 übertrafen die *inIB_[PinIA]*- und *inIAB*-Komplementante die Invasion des Wildtyps mit einer relativen Invasion von 1335,4 und 709,8 %. Die anderen Komplementanten, bzw. die $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante kamen auf Invasionswerte von um die 3 %.

Auch in der Zelllinie HeLa zeigten die *inIB_[PinIA]*- und *inIAB*-Komplementanten die stärkste Invasion mit Werten von 3885,9 und 1033,4 %. Die übrigen Komplementanten, bzw. die $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante erreichten Werte unter 1 %.

Der Infektionsassay mit der Zelllinie L-929 ergab eine Invasion der $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante von 14,8 %, der *inIA*-Komplementante von 17,5 % und der *inIB*-Komplementante von 44,5 %. Stärker war die Invasion der *inIAB*-Komplementante mit 298,7 % und der *inIB_[PinIA]*-Komplementante mit 6884,7 %.

Die Infektion von VERO-Zellen zeigte eine Invasion der *inIB_[PinIA]*-Komplementante von 59,7 % und der *inIAB*-Komplementante von 46,4 %. Im übrigen lagen die Invasionsraten unter 1 %.

Die Zelllinie Hep-G2 wurde am stärksten von den *inIB_[PinIA]*- und *inIAB*-Komplementanten invadiert – zu 72,5 und 57,6 %. Die $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante als Negativkontrolle kam auf 16,8 %, während die *inIA*-Komplementante auf 29,6 und die *inIB*-Komplementante auf 6,3 % kamen.

Die Infektion von PtK2-Zellen ergab eine Invasion der *inlB*_[*P*_{*inlA*}]- und *inlAB*-Komplementante mit Werten von 120,7 und 147,9 %. Die *inlA*-Komplementante kam auf 39,3 % Invasion, während Δ *inlAB2*-Deletionsmutante und *inlB*-Komplementante bei Werten um die 6 % lagen. Die Infektion von A549-Zellen ergab schließlich eine recht unterschiedliche Invasion der verschiedenen Konstrukte. Bei der Δ *inlAB2*-Deletionsmutante ließ sich keine Invasion nachweisen, bei der *inlB*-Komplementante mit unter 1 % praktisch keine. Die *inlA*-Komplementante invadierte mit 64,1 %. Wesentlich stärker war die Invasion von der *inlB*_[*P*_{*inlA*}]- und *inlAB*-Komplementanten mit 900,1 und 985,3 % (Abb. 3.4).

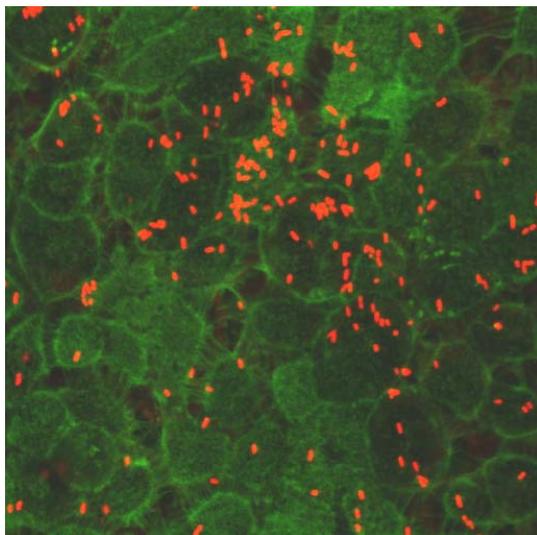
Tab. 3.6: Einfluß von InlA und InlB in den komplementierten Δ *inlAB2*-Deletionsmutanten auf das Invasionsverhalten in eukaryontische Zelllinien. + symbolisiert einen positiven Effekt auf die Invasion, - keine gesteigerte Invasion durch das jeweilige Protein.

Zelllinie	InlA	InlB	InlA+InlB
Caco-2	+	-	+
Henle407	-	+	+
HeLa	-	+	+
L-929	-	+	+
VERO	-	+	+
Hep-G2	+	+	+
PtK2	+	+	+
A549	+	+	+

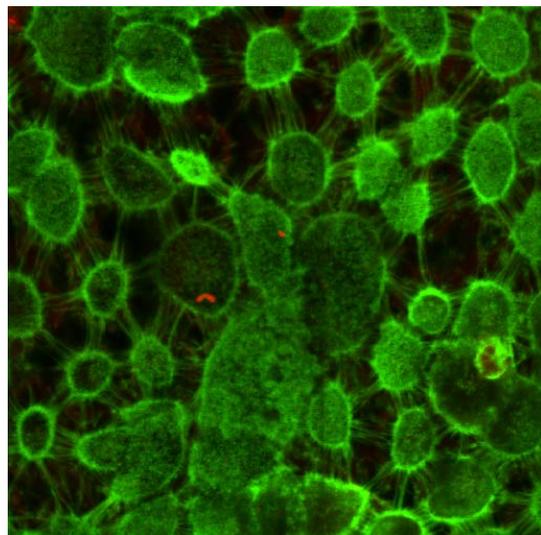
3.2.5 Immunfluoreszenzfärbung von Listerien (Δ *inlAB2*-Komplementanten) in infizierten Caco-2- und HeLa-Zellen

Caco-2

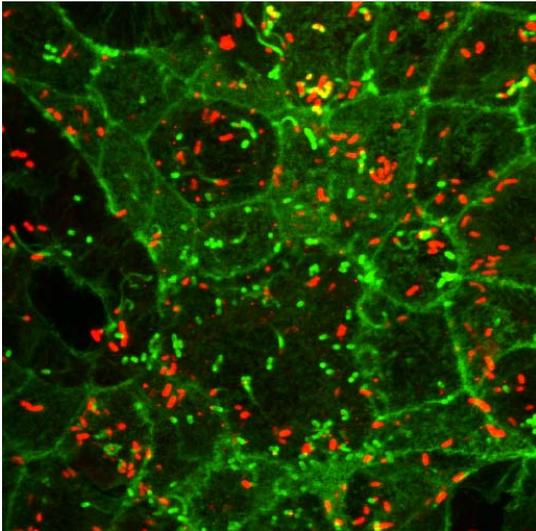
1



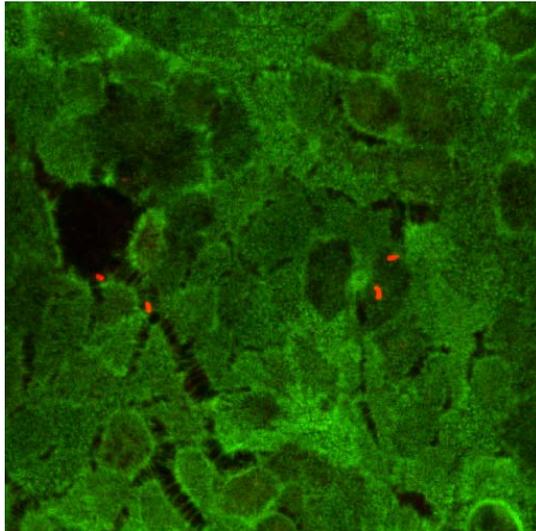
2



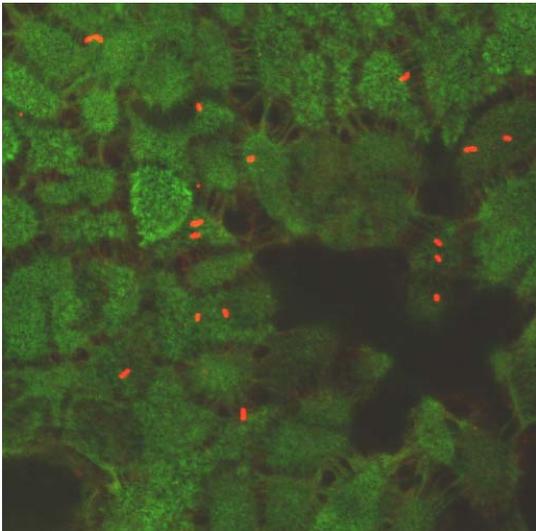
3



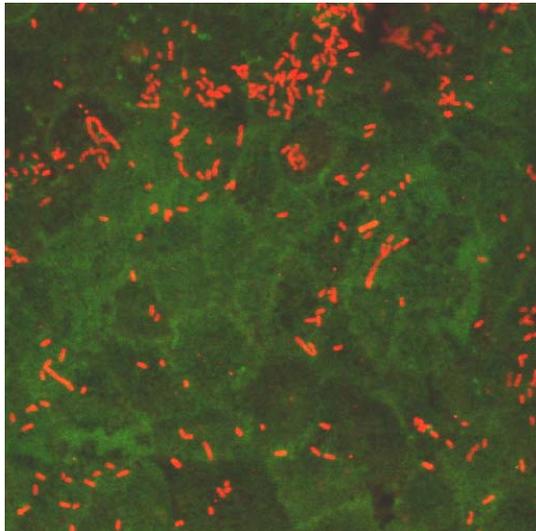
4



5

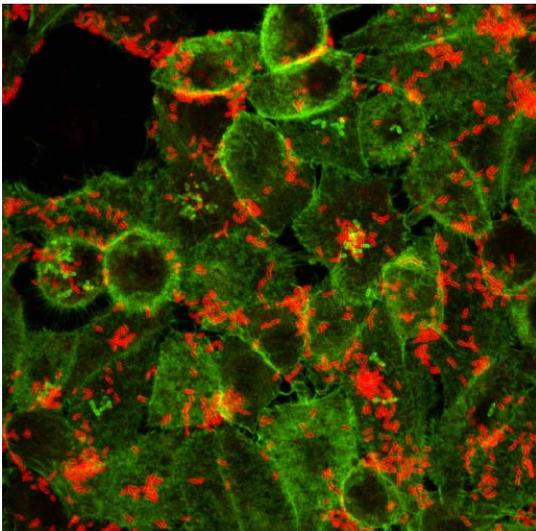


6

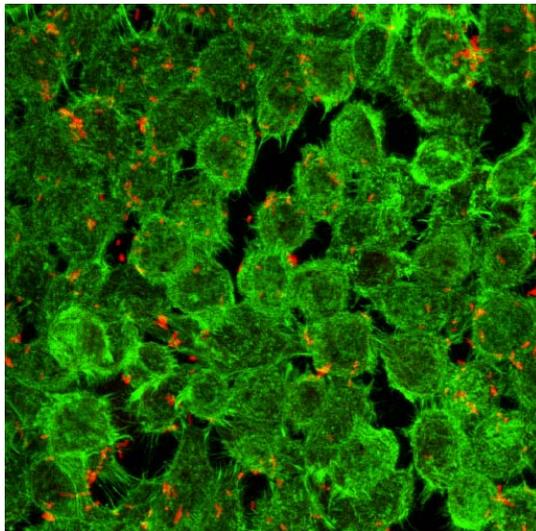


HeLa

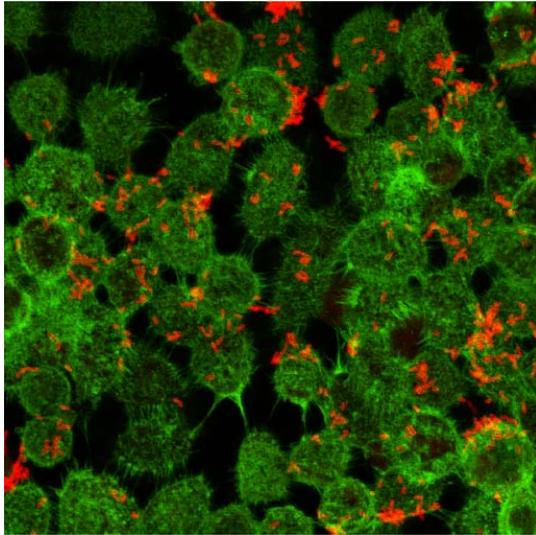
1



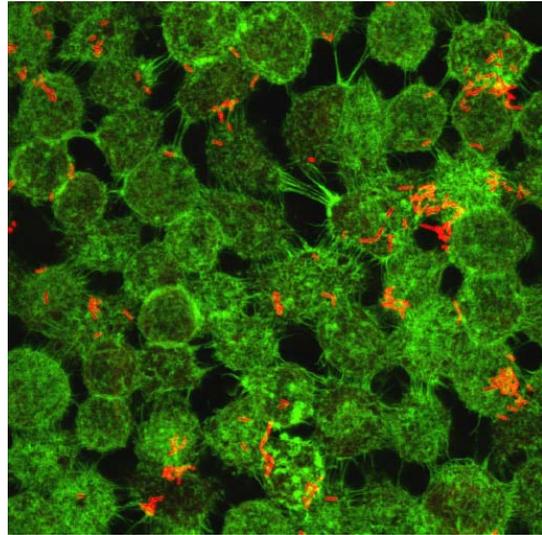
2



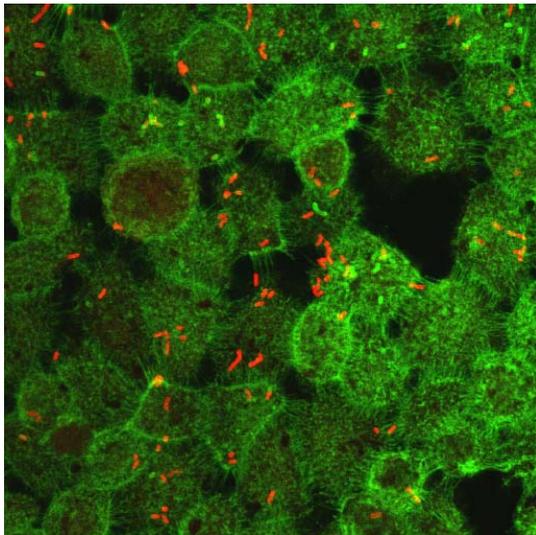
3



4



5



6

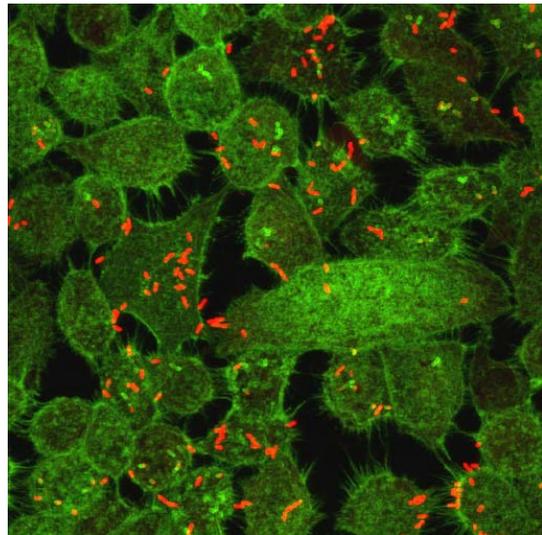


Abb. 3.5: Immunfluoreszenzfärbung von Listerien ($\Delta inLAB2$ -Komplementanten) in infizierten Caco-2- und HeLa-Zellen.

Bild 1: EGD; Bild 2: $\Delta inLAB2$; Bild 3: $\Delta inLAB2+pERL-3+inIA$; Bild 4: $\Delta inLAB2+pERL-3+inIB$; Bild 5: $\Delta inLAB2+pERL-3+inIB_{[pinIA]}$; Bild 6: $\Delta inLAB2+pERL-3+inLAB$.

Die Immunfluoreszenzfärbungen (Kap. 2.2.22.1) zeigten neben den grünen eukaryontischen Zellen (groß) sich rot und grün darstellende Listerien (klein). Bei den rot fluoreszierenden handelte es sich um extrazelluläre, an die Oberfläche der eukaryontischen Zelle adhärierende Listerien. Die grün fluoreszierenden Listerien befanden sich bezogen auf die Wirtszelle intrazellulär (wenige mit Aktinschweif).

Bei Caco-2-Zellen unterschied sich die Anzahl von adhärennten und invadierten Listerien zwischen den einzelnen Komplementanten. Generell war eine im Vergleich zur Invasion stärkere Adhäsion zu erkennen. Der Wildtyp *L. monocytogenes* EGD fiel durch eine starke Adhäsion über den ganzen Ausschnitt des Präparates auf. Intrazelluläre Bakterien konnten sowohl im linken oberen Bildausschnitt als auch rechts mittig beobachtet werden. Der Wildtyp und sein Adhärenz- bzw. Invasionsverhalten sollte als Referenz für die $\Delta inLAB2$ -Komplementanten dienen. Die nicht komplementierte $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante zeigte kaum Adhäsion und keine Invasion. Die *inLA*-Komplementante übertraf sowohl das Adhäsions- als auch das Invasionsverhalten der Referenz. Bei der *inLB*- und *inLB*_[*P**inLA*]-Komplementante konnten in den Bildausschnitten 4 bzw. 15 adhärennde Bakterien gesehen werden. Invadierte Bakterien stellten sich bei diesen Konstrukten nicht dar. Die *inLAB*-Komplementante zeigte ein Adhäsionsverhalten, das in seiner Stärke mit dem der *inLA*-Komplementante vergleichbar war. Die Invasion war dagegen geringer. Einige intrazelluläre Bakterien konnten in der Mitte und im linken oberen Bereich detektiert werden.

Bei den HeLa-Zellen zeigten sich ebenfalls Unterschiede im Adhäsions- und Invasionsverhalten der verschiedenen Komplementanten. Als Referenzen galten wiederum die detektierten extrazellulären und intrazellulären Bakterien des Stammes *L. monocytogenes* EGD. Die nicht komplementierte $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante adhärennte an HeLa-Zellen deutlicher als an Caco-2-Zellen, aber wiederum viel schwächer als der Wildtyp. In der Mitte des linken Bildrandes ist schwach ein intrazelluläres Bakterium zu erkennen. Während die Adhäsion deutlicher ausfiel, war die Invasion dieser Deletionsmutante im Vergleich zu Caco-2-Zellen nicht gesteigert. Bakterien mit dem *inLA*-Konstrukt adhärennten etwas stärker als die $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante. Eine schwache Invasion war am rechten oberen Bildausschnitt zu erkennen. Die *inLB*-Komplementante adhärennte etwas schwächer als das *inLA*-Konstrukt, invadierte jedoch stärker, wie rechts oben im Bild zu erkennen ist. Die *inLB*_[*P**inLA*]- und die *inLAB*-Komplementante zeichneten sich durch eine starke Invasion aus, die die der anderen Stämme deutlich übertraf, jedoch unter der des Wildtyps blieb. Die Adhäsion der *inLB*_[*P**inLA*]-Komplementante entsprach ungefähr der *inLB*-Komplementante. Die Adhäsion der *inLAB*-Komplementante lag auf dem Niveau der Adhäsion von dem *inLA*-Konstrukt. Bei den kettenförmig angeordneten Bakterien in den Abbildungen mit der *inLB*- und *inLB*_[*P**inLA*]-Komplementation, bzw. der Abbildung für die *inLAB*-Komplementation bei Caco-2 handelte es sich wahrscheinlich um p60-Mutanten. Das Protein p60 soll eine Funktion bei der Zellteilung und evtl. beim Invasionsprozeß haben (Wuenscher *et al.*, 1993; Hess *et al.*, 1995). Dementsprechend lagerten sich hier Bakterienketten aufgrund der fehlerhaften Teilung an der Wirtszelle an.

3.3 Molekular- und zellbiologische Arbeiten mit *L. innocua* und pERL-3

3.3.1 Komplementationen von *L. innocua* mit dem Vektor pERL-3 und dessen rekombinanten Plasmiden

Tab. 3.7: Übersicht über die Komplementation von *L. innocua* mit dem Vektor pERL-3 und verschiedenen Abschnitten des *inlAB*-Operons.

Stamm	Komplementation		Rekombinantes Plasmid
	Vektor	Gen	
<i>L. innocua</i>	pERL-3	-	-
<i>L. innocua</i>	pERL-3	<i>inlA</i>	pMH5
<i>L. innocua</i>	pERL-3	<i>inlB</i>	pMH6
<i>L. innocua</i>	pERL-3	<i>inlB</i> _[<i>PinlA</i>]	pMH7
<i>L. innocua</i>	pERL-3	<i>inlAB</i>	pMH8

Protoplasten von *L. innocua* wurden mit dem Vektor pERL-3 und den rekombinanten Plasmiden pMH5, pMH6, pMH7 und pMH8 transformiert (Kapitel 2.2.13). Diese Komplementation und die vorherige Klonierung diente der Herstellung von Komplementanten, mit denen untersucht werden sollte, ob die Expression von Internalinen dem apathogenen und nicht-invasivem Stamm *L. innocua* die Fähigkeit zur Invasion der jeweiligen eukaryontischen Zellkulturen mit gleicher Spezifität wie bei den $\Delta inlAB2$ -Komplementanten verleihen kann.

3.3.2 Klonierung von Internalingenen in den Expressionsvektor pERL-3

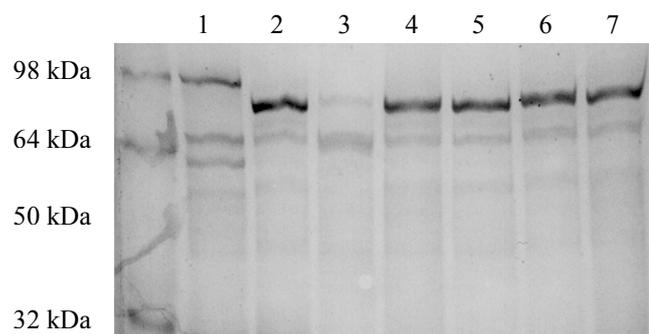
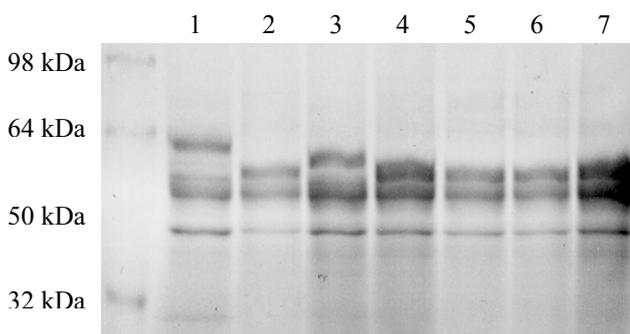
Die Klonierung von Internalingenen in den Expressionsvektor pERL-3 wurde in Kapitel 3.2.2 beschrieben.

3.3.3 Nachweis der Expression der Genprodukte von *L. innocua*-Komplementanten (pERL-3) im Immunblot

Kulturüberstandsproteine

Zellwandproteine

A



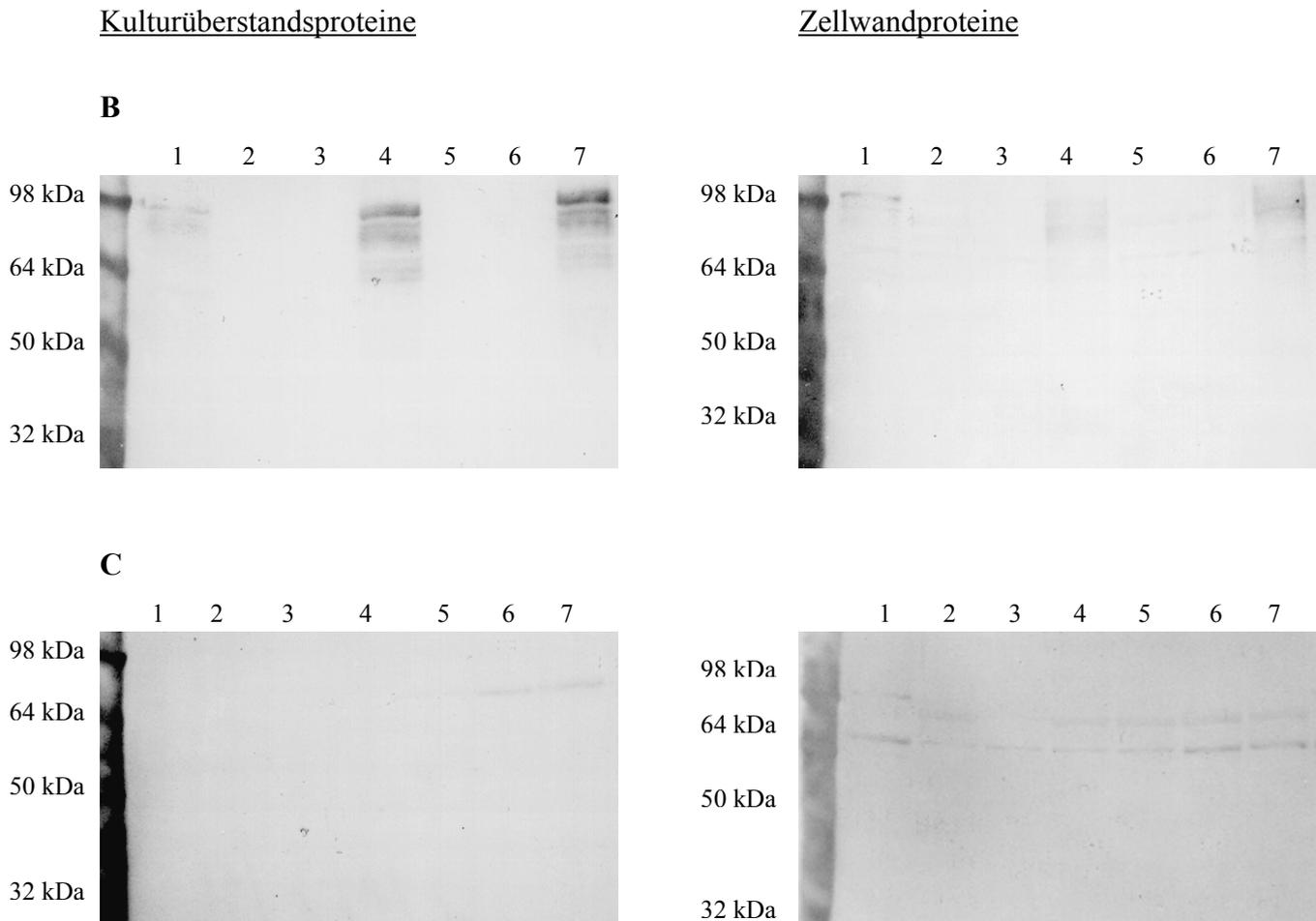


Abb. 3.6: Vergleich der Kulturüberstands- und Zellwandproteine des Wildtyps EGD mit den *L. innocua*-Komplementanten im Coomassie gefärbten SDS-Gel (A) und im Immunblot (B: mAk α -InA L244, C: mAk α -InB IF32F8).

Linker Rand SeeBlue™-Marker; Spur 1: EGD; Spur 2: *L. innocua*; Spur 3: *L. innocua*+pERL-3; Spur 4: *L. innocua*+pERL-3+*inlA*; Spur 5: *L. innocua*+pERL-3+*inlB*; Spur 6: *L. innocua*+pERL-3+*inlB*_[*pInlA*]; Spur 7: *L. innocua*+pERL-3+*inlAB*.

Im Immunblot wurden die Proteine InA (82,6 kDa) und InB (67,2 kDa) mit den monoklonalen Antikörpern L244 gegen InA und IF32F8 gegen InB detektiert (Kap. 2.2.15-17).

Das Coomassie-Gel (Abb. 3.6A) des Kulturüberstandes zeigte die unterschiedlichen Bandenmuster von *L. monocytogenes* EGD und den *L. innocua*-Komplementanten. Die *L. innocua*-Komplementanten wiesen bis auf den mit dem reinen Vektor pERL-3 komplementierten *L. innocua*-Stamm untereinander dasselbe Bandenmuster auf. Die pERL-3-Komplementante zeigte eine gegenüber den anderen Komplementanten zusätzliche Bande von ca. 60 kDa. Auch im Coomassie-Gel der SDS-Extrakte zeigte sich der erwartete Unterschied zwischen *L. monocytogenes* EGD Wildtyp und *L. innocua*-Komplementanten. Wiederum war der mit dem reinen Vektor pERL-3 komplementierte *L. innocua*-Stamm der

einzig, der sich von den anderen *L. innocua*-Komplementanten unterschied. In diesem Fall fehlte der Komplementante eine Bande der Größe um 90 kDa.

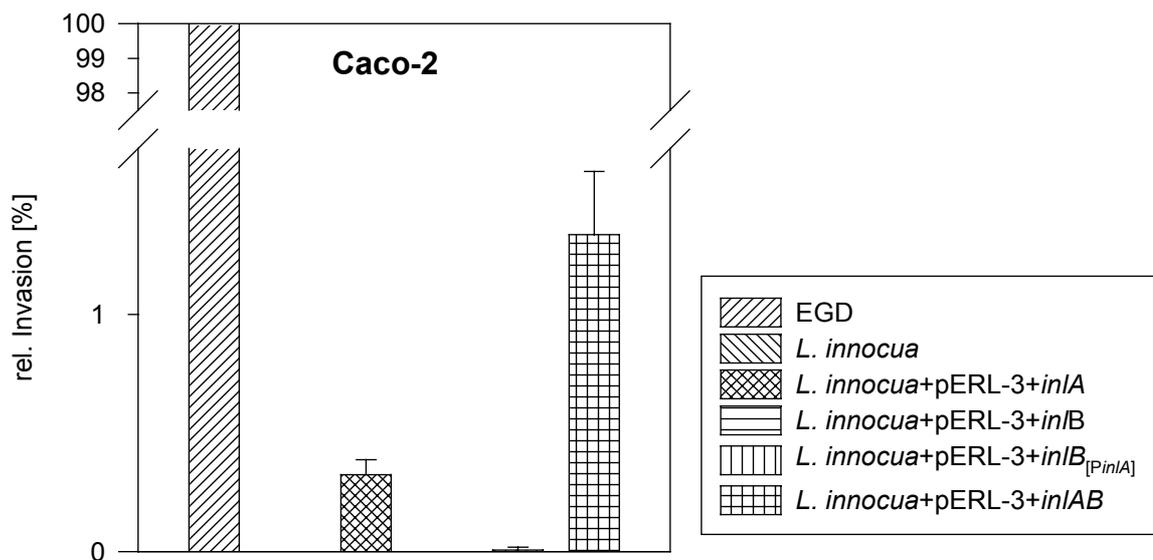
Der Immunblot für das InIA-Protein (Abb. 3.6B) zeigte mehr InIA im Überstand als im Zellwandextrakt. Im Überstand konnte InIA am stärksten in der Komplementation mit *inLAB* und etwas schwächer in der mit *inIA* nachgewiesen werden. Bei beiden Komplementanten zeigten sich Abbaubanden. Im Wildtyp von *L. monocytogenes* konnte das Protein nur schwach detektiert werden. Der Immunblot des SDS-Zellwandextraktes stellte sich ähnlich, jedoch insgesamt schwächer dar.

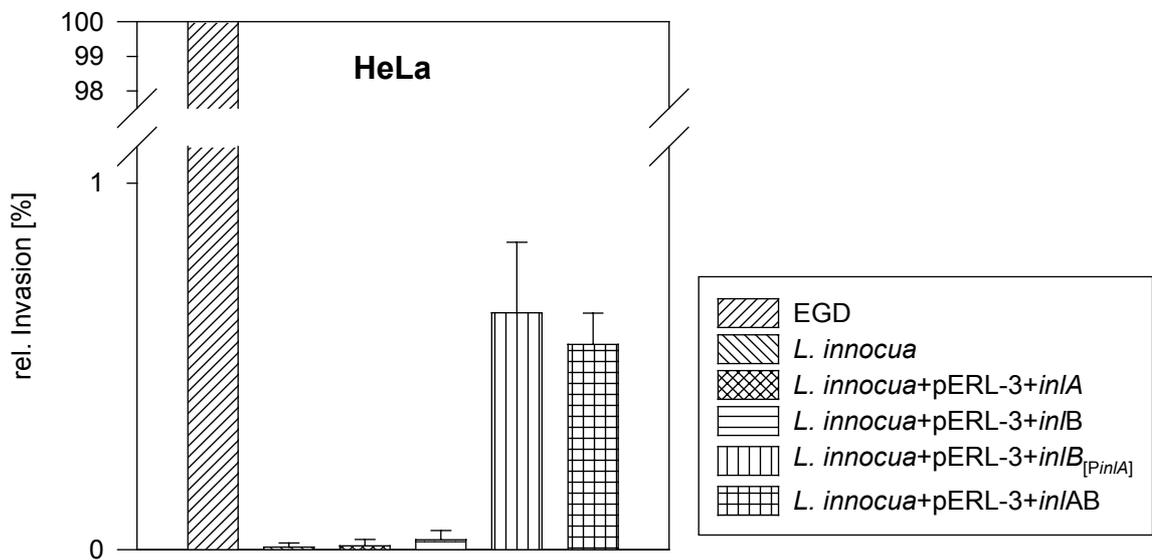
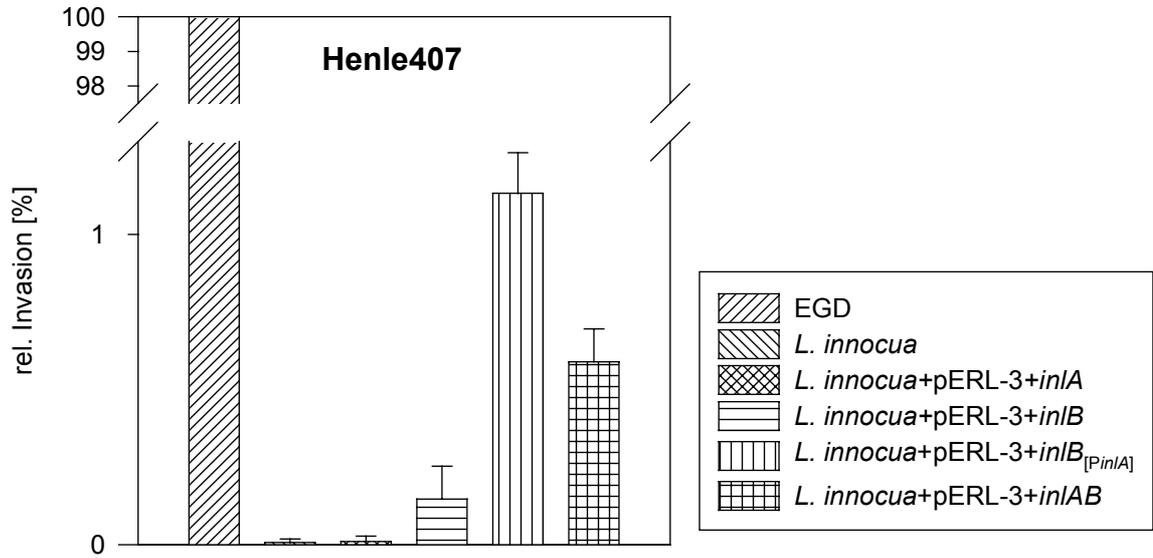
Der Immunblot für das InIB-Protein (Abb. 3.6C) ließ mehr Protein im SDS-Zellwandextrakt als in den TCA-gefällten Kulturüberstandproteinen erkennen. Im Blot der Überstände war InIB schwach in der *inIB*_[*P**inIA*]-, bzw. *inLAB*-Komplementation nachzuweisen. Im Blot der SDS-Extraktion war InIB zusätzlich im Wildtyp zu detektieren.

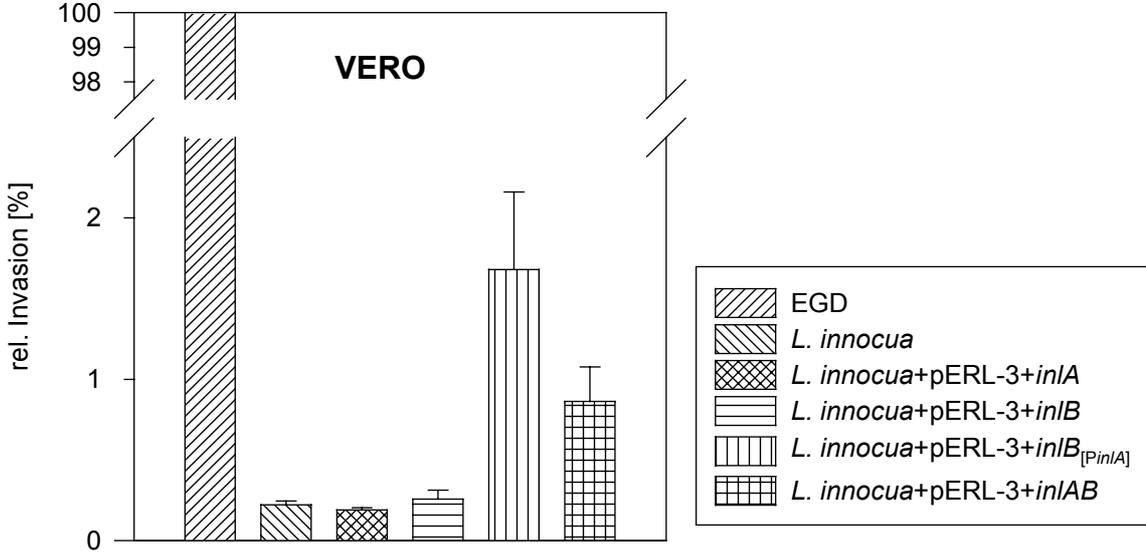
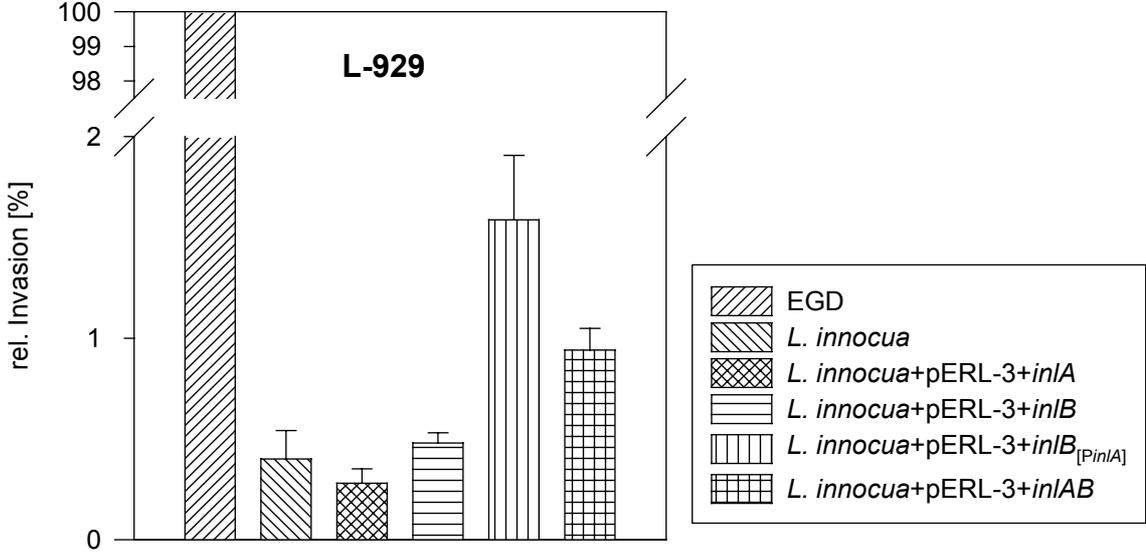
3.3.4 Überprüfung der Invasionsfähigkeit der *L. innocua*-Komplementanten (pERL-3) im Infektionsassay

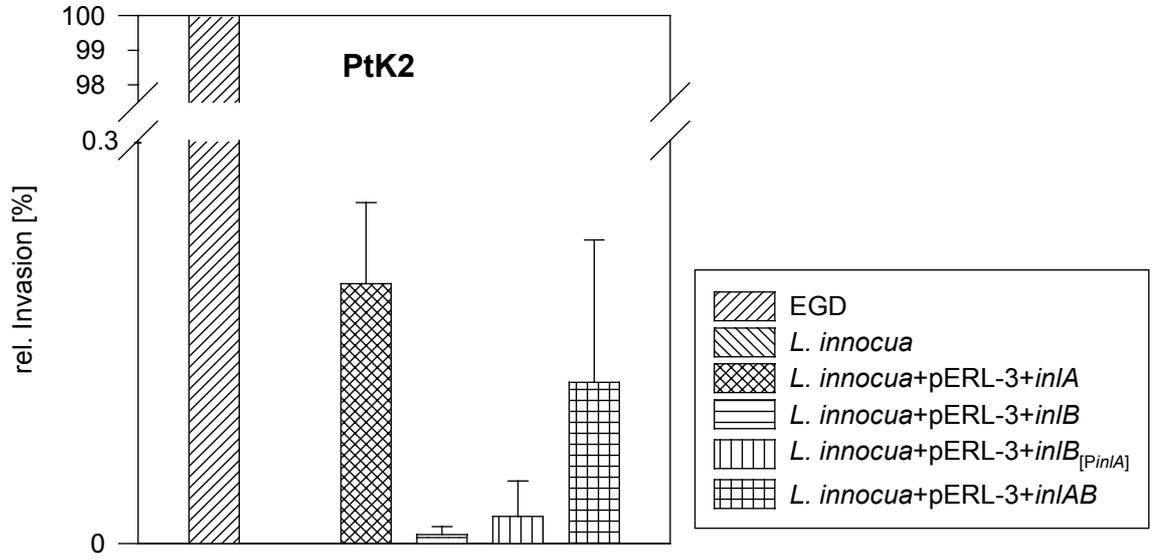
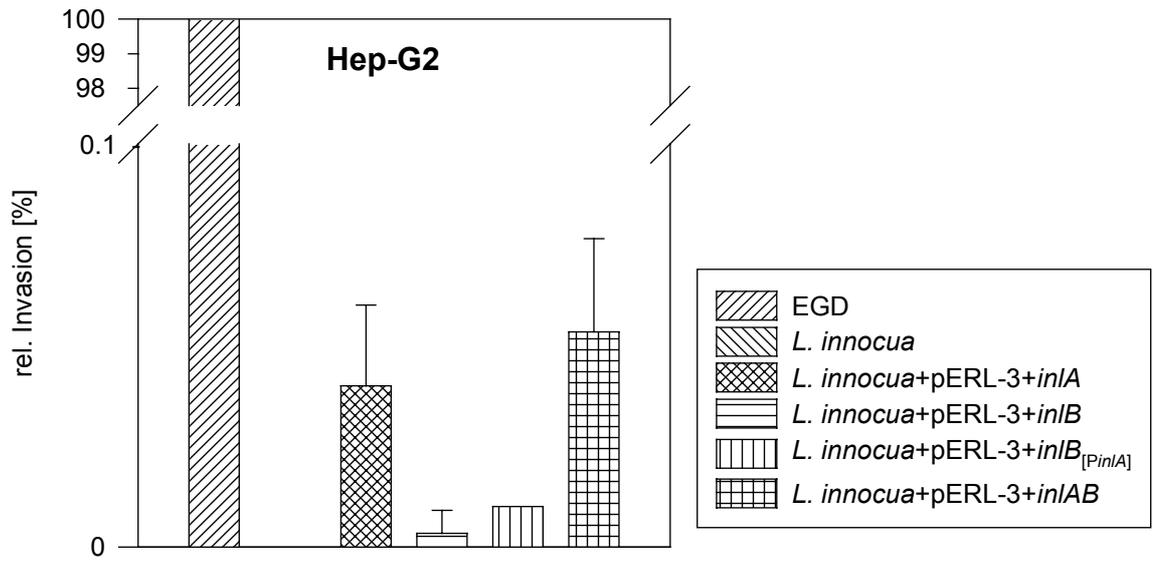
Um die Fähigkeit der *L. innocua*-Komplementanten zur Invasion zu bestimmen, wurden Infektionsassays durchgeführt (Kap. 2.2.21.1).

Die Invasionsfähigkeit der einzelnen *L. innocua*-Komplementanten wurde hierzu im Vergleich zum Wildtyp *L. monocytogenes* EGD mit verschiedenen Zelllinien festgestellt. *L. innocua* wurde als Negativkontrolle verwendet. Dabei zeigte sich generell eine sehr geringe Invasion durch die Komplementanten.









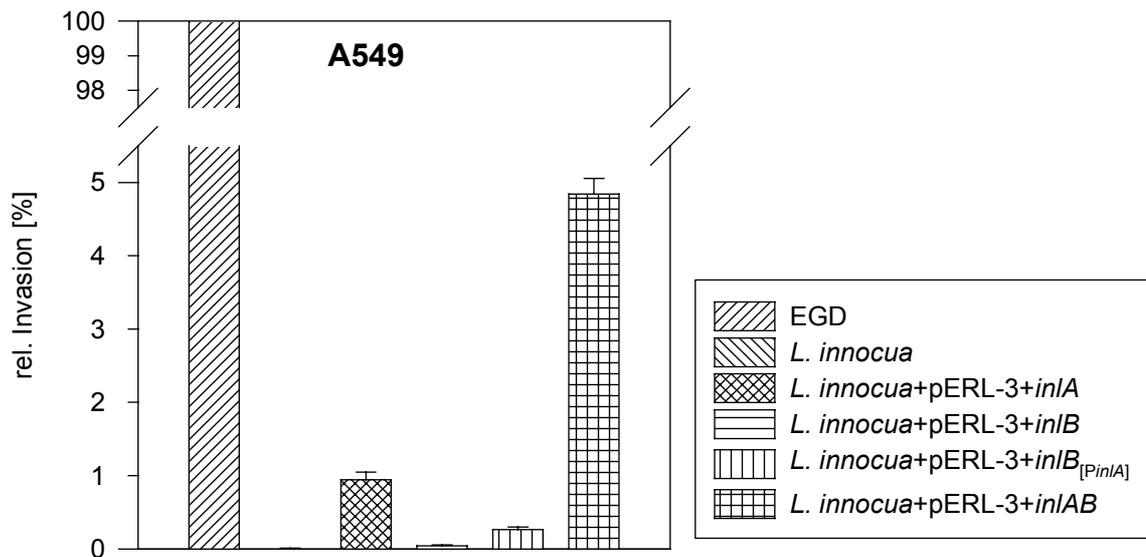


Abb. 3.7: Invasionsverhalten der *L. innocua*-Komplementanten in verschiedenen eukaryontischen Zelllinien.

In der Zelllinie Caco-2 war die *inIA*-Komplementante in der Lage, mit 0,3 % zu invadieren, während die *inIAB*-Komplementante auf 1,3 % kam. Im übrigen fand gar keine, bzw. eine viel geringere Invasion statt.

Die Infektion von Henle407-Zellen ergab die stärkste Invasion durch die *inIB*_[*inIA*]-Komplementante mit 1,1 %. Die *inIAB*-Komplementante erreichte mit 0,6 % ungefähr die Hälfte, während die *inIB*-Komplementante mit weniger als 0,2 % deutlich schwächer invadierte.

Die Zelllinie HeLa wurden von der *inIB*_[*inIA*]- und *inIAB*-Komplementanten mit 0,7 % und 0,6 % ungefähr gleich stark invadiert, während im übrigen die Invasion viel geringer war.

Die Invasion der Negativkontrolle wurde in der Zelllinie L-929 von der *inIB*_[*inIA*]- und *inIAB*-Komplementante mit 1,6 und 0,9 % relativer Invasion deutlicher als durch die *inIB*-Komplementante (0,5 %) übertroffen.

Eine stärkere Invasion als die Negativkontrolle in VERO-Zellen zeigten die *inIB*_[*inIA*]- und die *inIAB*-Komplementanten mit 1,7 und 0,9 %.

Die Zelllinie Hep-G2 konnte von der *inIA*-Komplementante mit 0,04 %, von der *inIAB*-Komplementante mit 0,05 % invadiert werden, wobei die Invasion der übrigen Konstrukte geringer war.

Die Invasion von PtK2-Zellen war durch die *inIA*-Komplementante mit 0,2 % am stärksten. Die *inIAB*-Komplementante kam auf 0,1%, während ansonsten eine schwächere Invasion zu verzeichnen war.

Die weitaus stärkste Invasion der Zelllinie A549 zeigte mit 4,8 % die *inIAB*-Komplementante. Fast 1 % erreichte die *inIA*-Komplementante, während die Invasion sonst deutlich geringer ausfiel (Abb. 3.7).

Tab. 3.8: Einfluß von InlA und InlB in komplementierten *L. innocua* auf das Invasionsverhalten in eukaryontischen Zelllinien. + symbolisiert einen positiven Effekt auf die Invasion, (+) einen leicht positiven Effekt, - keine gesteigerte Invasion durch das jeweilige Protein.

Zelllinie	InlA	InlB	InlA+InlB
Caco-2	+	-	+
Henle407	-	+	+
HeLa	-	+	+
L-929	-	+	+
VERO	-	+	+
Hep-G2	+	(+)	+
PtK2	+	(+)	+
A549	+	(+)	+

3.4 Molekular- und zellbiologische Arbeiten mit der $\Delta vgc2$ -Deletionsmutante

3.4.1 Komplementationen der $\Delta vgc2$ -Deletionsmutante mit dem Vektor pLiga164 und dessen rekombinanten Plasmiden

Tab. 3.9: Übersicht über die Komplementation von $\Delta vgc2$ mit dem Vektor pLiga164 und verschiedenen Abschnitten des *inlAB*-Operons.

Stamm	Komplementation		Rekombinantes Plasmid
	Vektor	Gen	
$\Delta vgc2$	pLiga164	-	-
$\Delta vgc2$	pLiga164	<i>inlA</i>	pPP1
$\Delta vgc2$	pLiga164	<i>inlB</i>	pPP2
$\Delta vgc2$	pLiga164	<i>inlB</i> _[P<i>inlA</i>]	pPP3
$\Delta vgc2$	pLiga164	<i>inlAB</i>	pPP4

In der $\Delta vgc2$ -Deletionsmutante sind sowohl das Virulenzgencluster mit den Genen *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*, als auch die Gene *inlA*, *inlB* und *irpA* deletiert. Die $\Delta vgc2$ -Deletionsmutante wurde mit dem Vektor pLiga164 komplementiert (Kap. 2.2.13), in den zuvor verschiedene Genabschnitte der Internaline kloniert wurden (Tab. 3.9, Kap. 3.4.2). Diese Komplementation und die vorherige Klonierung diente der Herstellung von Komplementanten, an denen die Rolle der Internaline am Invasionsprozeß in eukaryontische Zellkulturen bei gleichzeitigem Fehlen der oben genannten Gene untersucht werden sollte. Das Gen *prfA* befand sich auf dem Vektor pLiga164.

3.4.2 Klonierung von Internalingenen zur Überexpression in den Vektor pLiga164

Um *inlA* in den Vektor pLiga164 zu klonieren, wurde zunächst mit den Primern TH64SalI und TH65NcoI aus der Deletionsmutante $\Delta inlB2$ ein DNA-Fragment von 4167 bp amplifiziert (Kap. 2.2.3). Als Template diente eine von einer Agarplatte gepickte Kolonie. Das aufgereinigte PCR-Produkt (Kap. 2.2.5) wurde mit den Restriktionsendonukleasen *SalI* und *NcoI* geschnitten und in den mit *SalI* und *NcoI* geschnittenen Vektor pLiga164 kloniert, d.h. Amplifikat und Vektor wurden ligiert (Kap. 2.2.6) und kompetente Zellen mit dem rekombinanten Plasmid transformiert (Kap. 2.2.7). Die Transformanten wurden mit den Primern 1317 und 4142 bzw. 2505 und 2031 auf die erwarteten PCR-Produkte der Größe 4136 bp bzw. 4219 bp hin überprüft (Kap. 2.2.8). Das rekombinante Plasmid wurde pPP1 (pLiga164 + 4,14 kb-Insert) genannt.

inlB wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BamHI* und *XhoI* aus dem Plasmid pMH2 geschnitten. Das DNA-Fragment von 2847 bp wurde in den mit den Enzymen *BglII* und *SalI* geschnittenen Vektor pLiga164 kloniert. Der positive Transformant pPP2 (pLiga164 + 2,84 kb-Insert) wurde mit den Primern 1320 und 4142 bzw. 2031 und 2032 mittels PCR auf die erwarteten PCR-Fragmente von 2768 bp und 3130 bp hin überprüft.

Zusätzlich zu *inlB* ohne den PrfA-abhängigen Promotor des Internalinoperons wurde *inlB* mit dem stromaufwärts liegenden Promotor (*inlB*_{[P_{inlA}]) in den Vektor kloniert. Hierzu wurde zunächst mit den Primern Oligo164-5'NcoI und Oligo164-3'SalI aus pMH3 ein DNA-Fragment der Größe 3950 bp amplifiziert. Dieses wurde mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *SalI* geschnitten und in den ebenfalls mit *NcoI* und *SalI* geschnittenen Vektor pLiga164 kloniert. Das rekombinante Plasmid pPP3 (pLiga164 + 3,92 kb-Insert) wurde mit dem Primerpaar 1317 und 4142 auf ein DNA-Fragment von 3866 bp, mit dem Primerpaar 2031 und 2505 auf ein Fragment von 3999 bp hin überprüft.}

inlAB wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BamHI* und *XhoI* aus dem Vektor pMH4 geschnitten. Das DNA-Fragment von 5971 bp wurde in den mit den Enzymen *BglII* und *SalI* linearisierten Vektor pLiga164 wie in der *inlB*-Komplementation kloniert. Das rekombinante Plasmid pPP4 (pLiga164 + 5,97 kb-Insert) wies in der PCR mit den Primern TH20 und 4142 bzw. 2031 und 2032 die erwarteten Fragmente von 4988 bp und 6254 bp auf.

Mit den Cy5-markierten Primern pLiga5' und pLiga3' wurden die Plasmide über die Insertionsstellen sequenziert (Kap. 2.2.2.4). Es zeigte sich die Orientierung des Inserts im Vektor entgegen der Leserichtung des *actA*-Promotors bei pPP1, pPP3 und pPP4 und in Leserichtung bei pPP2.

Protoplasten der $\Delta vgc2$ -Deletionsmutante wurden mit dem Vektor pLiga164 und den Plasmiden pPP1, pPP2, pPP3 und pPP4 transformiert (Kap. 2.2.11).

3.4.3 Nachweis der Expression der Genprodukte von $\Delta vgc2$ -Komplementanten im Immunblot

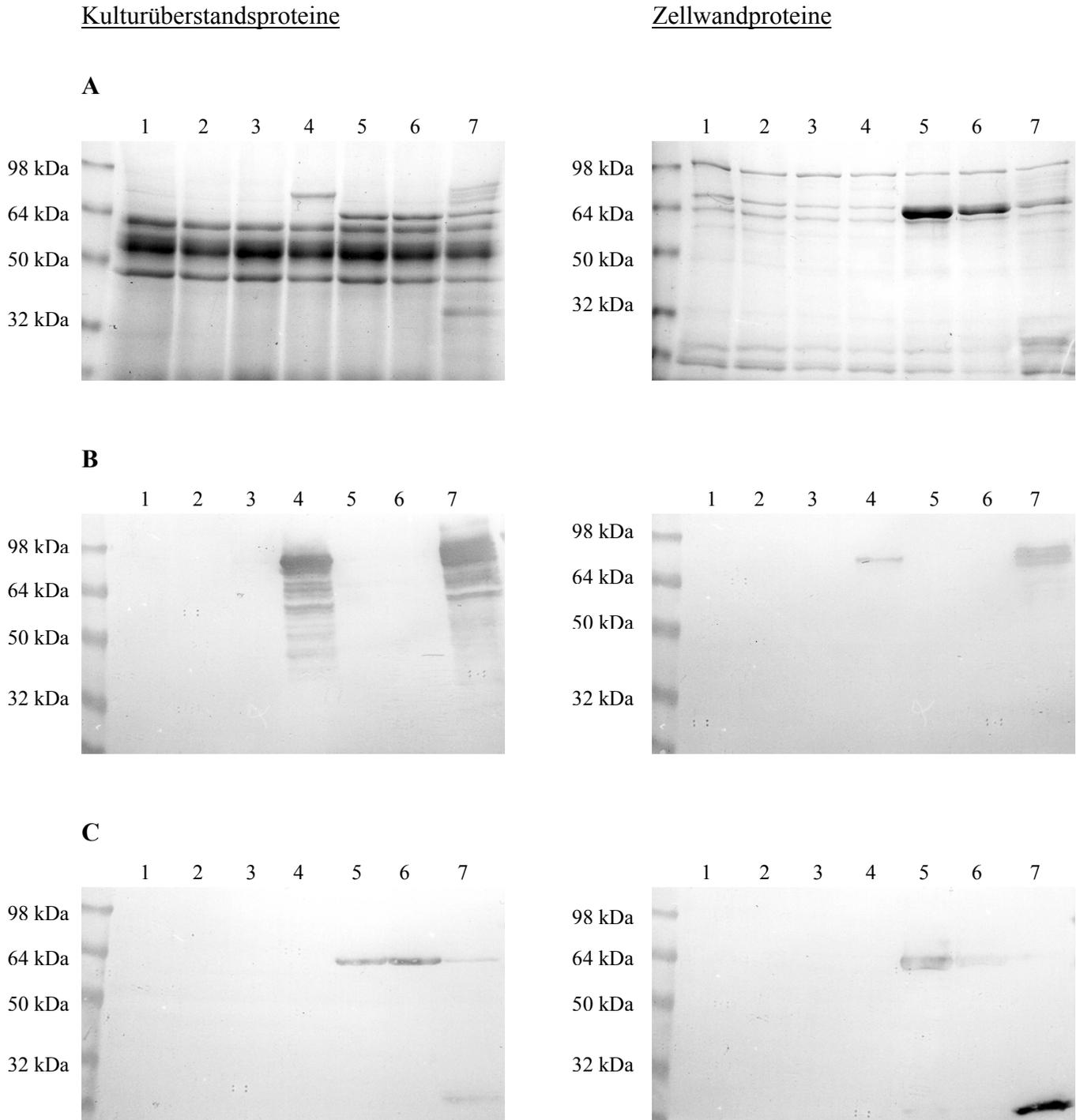


Abb. 3.8: Vergleich der Kulturüberstands- und Zellwandproteine des Wildtyps EGD mit den komplementierten $\Delta vgc2$ -Deletionsmutanten im Coomassie gefärbten SDS-Gel (A) und im Immunblot (B: mAk α -InlA L244, C: mAk α -InlB IF32F8).

Linker Rand SeeBlueTM-Marker; Spur 1: EGD; Spur 2: $\Delta vgc2$; Spur 3: $\Delta vgc2$ +pLiga164; Spur 4: $\Delta vgc2$ +pLiga164+*inlA*; Spur 5: $\Delta vgc2$ +pLiga164+*inlB*; Spur 6: $\Delta vgc2$ +pLiga164+*inlB*_[*pinlA*]; Spur 7: $\Delta vgc2$ +pLiga164+*inlAB*.

Im Immunblot wurden die Proteine InIA (82,6 kDa) und InIB (67,2 kDa) mit den monoklonalen Antikörpern L244 für InIA und IF32F8 für InIB detektiert (Kap. 2.2.15-17).

Im Coomassie-Gel (Abb. 3.8A) der Kulturüberstandsproteine zeigten sich verschiedene Bandenmuster. Die mit *inIA* komplementierte Δ *vgc2*-Deletionsmutante wies eine zusätzliche Bande in der Größe des InIA auf. Die mit *inIB*, *inIB*_[*P*_{*inIA*}] und *inIAB* komplementierten Deletionsmutanten zeigten eine Bande in der Größe des InIB. Die *inIAB*-Komplementation ließ zumindest noch drei weitere übereinanderliegende Banden erkennen, die wiederum in der Größenordnung des InIA lagen. Diese Komplementation wies eine weitere Bande von ca. 40 kDa auf, die sonst nicht vorkam. Das Coomassie-gefärbte Gel des SDS-Extraktes ließ einen deutlichen Unterschied der mit *inIB*, *inIB*_[*P*_{*inIA*}] und *inIAB* komplementierten Deletionsmutante erkennen, da diese jeweils eine zusätzliche Bande derselben Größe von ca. 67 kDa zeigten. Diese Bande war am stärksten in der *inIB*-, schwächer in der *inIB*_[*P*_{*inIA*}]- und am schwächsten in der *inIAB*-Komplementante ausgeprägt.

Der Immunblot für das InIA-Protein (Abb. 3.8B) zeigte mehr Protein im Kulturüberstand als im Zellwandextrakt. InIA konnte in der TCA-Fällung des Kulturüberstandes der *inIA*- und *inIAB*-Komplementante etwa gleich stark, jedoch partiell degradiert nachgewiesen werden. In der SDS-Zellwandextraktion fand sich kein Abbau des Proteins in der *inIA*-Komplementante, aber die schon im Coomassie-Gel beobachteten direkt übereinander liegenden Banden der *inIAB*-Komplementante. Die Bande der *inIA*-Komplementante lag unterhalb der höchsten der drei Banden der *inIAB*-Komplementante.

Eine deutliche, spezifische Abbaubande des InIB in den Immunblots (Abb. 3.8C) deutete auf eine größere Menge des Proteins im Zellwandextrakt als im Kulturüberstand hin. In der TCA-Fällung des Kulturüberstandes zeigten sich gleich starke Banden in der *inIB*- und *inIB*_[*P*_{*inIA*}]-Komplementante, eine schwächere in der *inIAB*-Komplementante, die zudem die spezifische Abbaubande von 28 kDa aufwies. In der SDS-Zellwandextraktion war der Nachweis in der *inIB*-Komplementante am stärksten, in der *inIB*_[*P*_{*inIA*}]- schwächer und in der *inIAB*-Komplementante kaum zu erbringen. Es zeigte sich hier die 28 kDa-Abbaubande sehr deutlich.

3.4.4 Identifizierung der 28 kDa-Abbaubande der mit *inIAB* komplementierten Δ *vgc2* Deletionsmutante

Durch die N-terminale Ansequenzierung (Kap. 2.2.18) wurden die ersten zwanzig Aminosäurereste zweier 28 kDa-Abbaubanden bestimmt. Es stellte sich bei der SDS-Gelelektrophorese des Zellwandextraktes mit einem 12,5 % PAA-Gel heraus, daß die 28 kDa-Abbaubande tatsächlich aus zwei Banden mit geringen Unterschieden im Molekulargewicht bestand. Diese beiden aufgetrennten Proteinbanden wurden sequenziert und als C-terminale Fragmente von InIB identifiziert.

Bande 1: InlB 375-DYMSGNDFTLYAVFKAETTE-394

Bande 2: InlB 388-FKAETTEKAVNLTRYVKYIR-407

3.4.5 Überprüfung der Invasionsfähigkeit der $\Delta vgc2$ -Komplementanten im Infektionsassay

Um die Effektivität der $\Delta vgc2$ -Komplementanten bei der Invasion zu bestimmen, wurden Infektionsassays durchgeführt (Kap. 2.2.21.1).

Die Invasionsfähigkeit der einzelnen Komplementanten wurde hierzu im Vergleich zum Wildtyp *L. monocytogenes* EGD mit den Zelllinien Caco-2 und HeLa festgestellt. Als Negativkontrolle wurde die Invasion der mit pLiga164 komplementierten Deletionsmutante bestimmt.

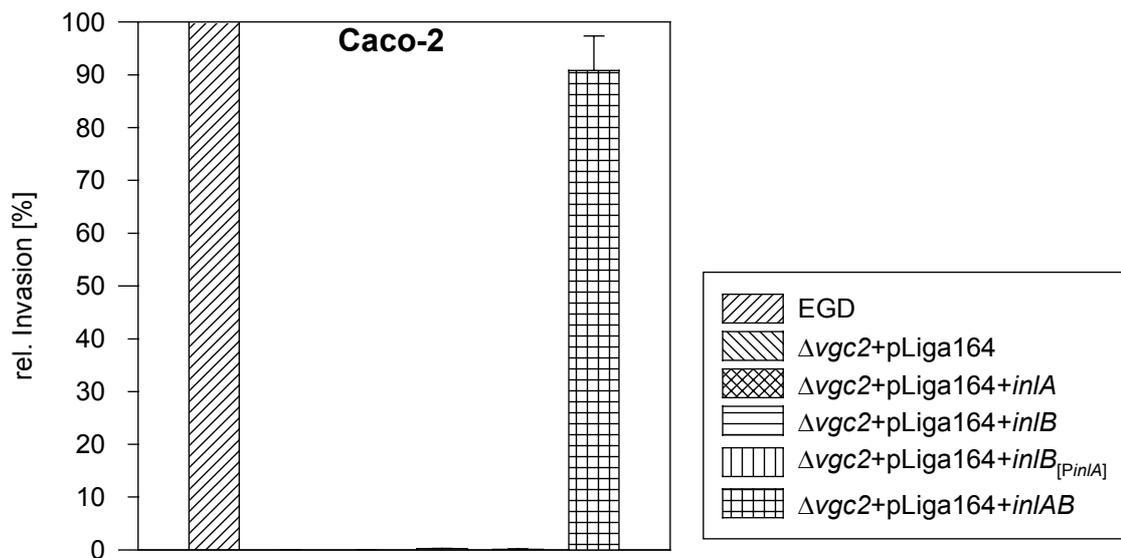


Abb. 3.9: Invasionsverhalten der $\Delta vgc2$ -Komplementanten in Caco-2-Zellen.

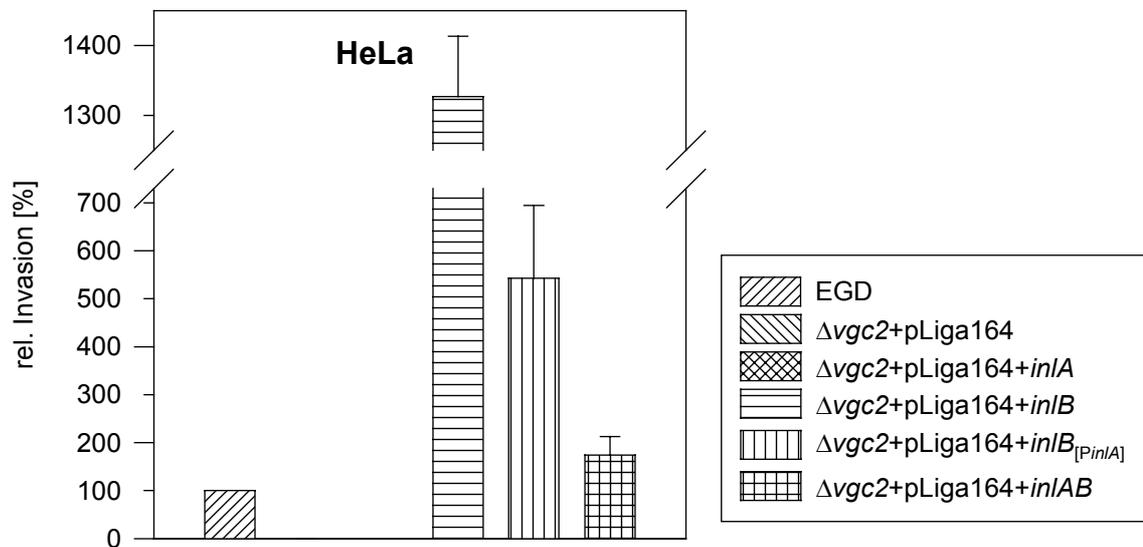


Abb. 3.10: Invasionsverhalten der $\Delta vgc2$ -Komplementanten in HeLa-Zellen.

Die Zelllinie Caco-2 (Abb. 3.9) konnte durch die *inLAB*-Komplementante zu 90,8 % invadiert werden, während die Invasion der übrigen Komplementanten unter 1 % lag.

HeLa-Zellen (Abb. 3.10) konnten z.T. wesentlich stärker invadiert werden. Die *inLAB*-Komplementante kam auf eine Invasionsrate von 173,8 %. Größere Invasionsraten zeigten die *inIB*_[PinIA]- und *inIB*-Komplementanten mit 542,4 und 1326,8 %. Die *inIA*-Komplementante zeigte keine Invasion.

3.5 Molekular- und zellbiologische Arbeiten mit *L. innocua* und dem Vektor pLiga164

3.5.1 Komplementationen von *L. innocua* mit dem Vektor pLiga164 und dessen rekombinanten Plasmiden

Tab. 3.10: Übersicht über die Komplementation von *L. innocua* mit dem Vektor pLiga164 und verschiedenen Abschnitten des *inLAB*-Operons.

Stamm	Komplementation		Rekombinantes Plasmid
	Vektor	Gen	
<i>L. innocua</i>	pLiga164	-	-
<i>L. innocua</i>	pLiga164	<i>inIA</i>	pPP1
<i>L. innocua</i>	pLiga164	<i>inIB</i>	pPP2
<i>L. innocua</i>	pLiga164	<i>inIB</i> _[PinIA]	pPP3
<i>L. innocua</i>	pLiga164	<i>inLAB</i>	pPP4

L. innocua wurde mit dem Vektor pLiga164 und den rekombinanten Plasmiden pPP1, pPP2, pPP3 und pPP4 komplementiert (Kap. 2.2.13). Diese Komplementation und die vorherige Klonierung diente der Herstellung von Komplementanten, mit denen die Expressionsfähigkeit von Internalinen und die Invasionsfähigkeit im Vergleich zur $\Delta vgc2$ -Komplementation, sowie die mögliche Beteiligung weiterer Faktoren oder Gene für den Invasionsprozeß untersucht werden sollte.

3.5.2 Klonierung von Internalingenen in den Vektor pLiga164

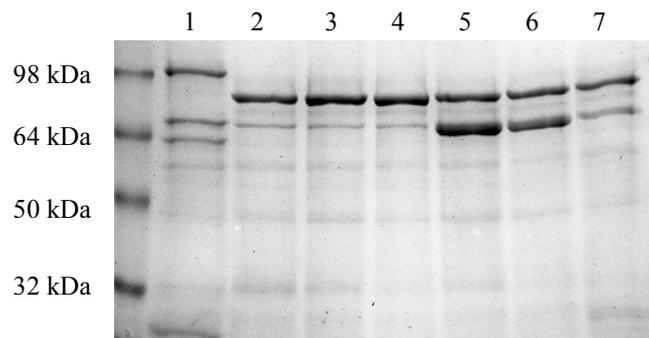
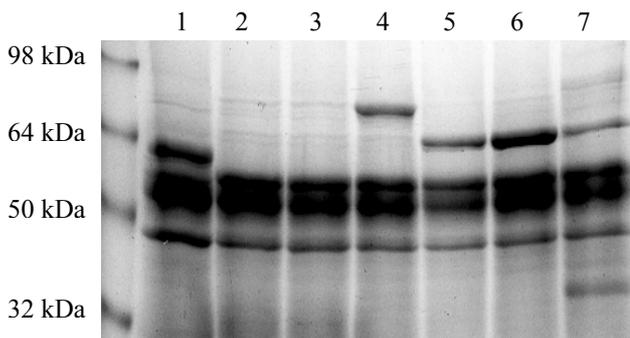
Die Klonierung von Internalingenen in den Vektor pLiga164 wurde in Kapitel 3.4.2 beschrieben.

3.5.3 Nachweis der Expression der Genprodukte von *L. innocua*-Komplementanten (pLiga164) im Immunblot

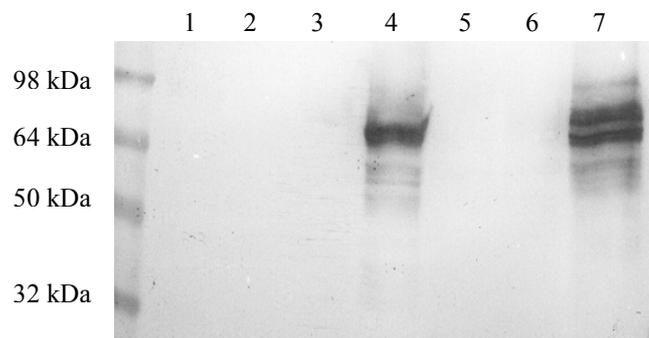
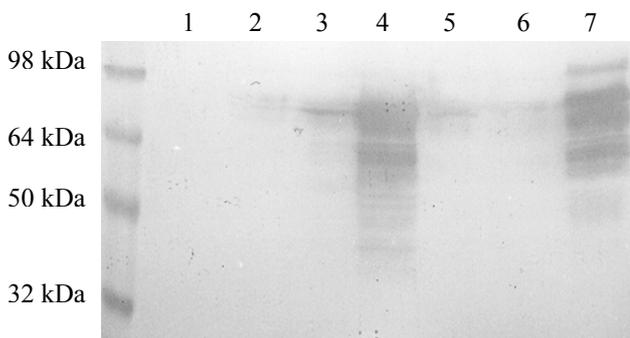
Kulturüberstandsproteine

Zellwandproteine

A



B



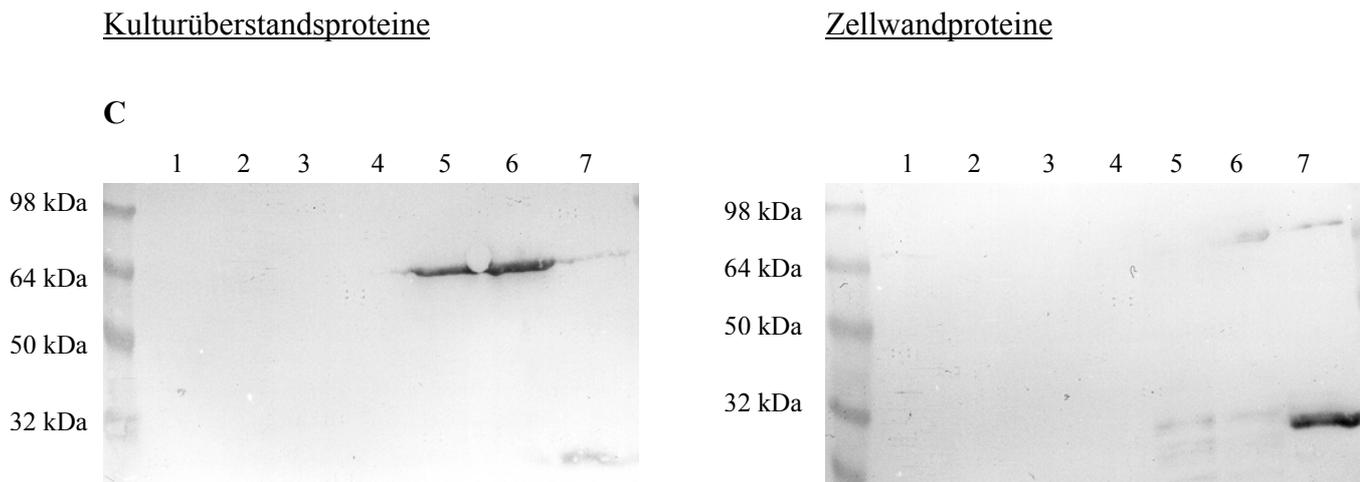


Abb. 3.11: Vergleich der Kulturüberstands- und Zellwandproteine des Wildtyps EGD mit den *L. innocua*-Komplementanten im Coomassie gefärbten SDS-Gel (A) und im Immunblot (B: mAk α -InlA L244, C: mAk α -InlB IF32F8).

Linker Rand SeeBlueTM-Marker; Spur 1: EGD; Spur 2: *L. innocua*; Spur 3: *L. innocua*+pLiga164; Spur 4: *L. innocua*+pLiga164+*inlA*; Spur 5: *L. innocua*+pLiga164+*inlB*; Spur 6: *L. innocua*+pLiga164+*inlB*_[*pinlA*]; Spur 7: *L. innocua*+pLiga164+*inlAB*.

Im Immunblot wurden die Proteine InlA (82,6 kDa) und InlB (67,2 kDa) mit den monoklonalen Antikörpern L244 für InlA und IF32F8 für InlB detektiert (Kap. 2.2.15-17).

Im Coomassie-Gel (Abb. 3.11A) der TCA-Fällung der Überstandsproteine zeigten sich unterschiedliche Bandenmuster zwischen *L. monocytogenes* EGD und *L. innocua*-Komplementanten. Der mit *inlA* komplementierte Stamm wies gegenüber dem Wildtyp eine zusätzliche Bande in der Größenordnung des InlA auf. Die mit *inlB*, *inlB*_[*pinlA*] und *inlAB* komplementierten *L. innocua* zeigten eine Bande in der Größe des InlB. Die *inlAB*-Komplementation ließ einige übereinander liegende Banden erkennen, die wiederum in der Größe des InlA lagen. Diese Komplementation wies eine weitere Bande von ca. 40 kDa auf, die sonst nicht vorkam. Das Coomassie-Gel des SDS-Zellwandextraktes ließ einen deutlichen Unterschied des mit *inlB*, *inlB*_[*pinlA*] und *inlAB* komplementierten Stammes erkennen, da diese je eine zusätzliche Bande von 67 kDa zeigten. Diese Bande war am stärksten in der *inlB*-, schwächer in der *inlB*_[*pinlA*]- und am schwächsten in der *inlAB*-Komplementante ausgeprägt.

InlA (Abb. 3.11B) konnte in der TCA-Fällung des Überstandes der *inlA*- und *inlAB*-Komplementante etwa gleich stark und mit Abbau des Proteins nachgewiesen werden, was auch für die SDS-Extraktion der Zellwandproteine zutraf. Die InlA-Bande der *inlA*-Komplementation lief tiefer als bei der *inlAB*-Komplementation. Bei beiden Extrakten war das Protein nicht im Wildtyp nachweisbar.

Eine deutliche spezifische Abbaubande des InlB in den Immunblots (Abb. 3.11C) sprach für eine größere Menge des Proteins im Zellwandextrakt als im Kulturüberstand. In der TCA-Fällung des Kulturüberstandes zeigten sich gleich starke Banden in der *inlB*- und *inlB*_[*pinlA*]-Komplementante, eine schwächere in der *inlAB*-Komplementante, die zudem die spezifische

Abbaubande aufwies. In der SDS-Extraktion der Zellwandproteine war der Nachweis schwach, die Abbaubande der *inlAB*-Komplementante deutlich nachgewiesen.

3.5.4 Überprüfung der Invasionsfähigkeit der *L. innocua*-Komplementanten (pLiga164) im Infektionsassay

Um die Invasionsfähigkeit der *L. innocua*-Komplementanten zu bestimmen, wurden Infektionsassays durchgeführt (Kap. 2.2.21.1).

Die Invasionsfähigkeit der einzelnen *L. innocua*-Komplementanten wurde hierzu im Vergleich zum Wildtyp *L. monocytogenes* EGD mit verschiedenen Zelllinien festgestellt. Als Negativkontrolle wurde die Komplementation von *L. innocua* mit pLiga164 verwendet.

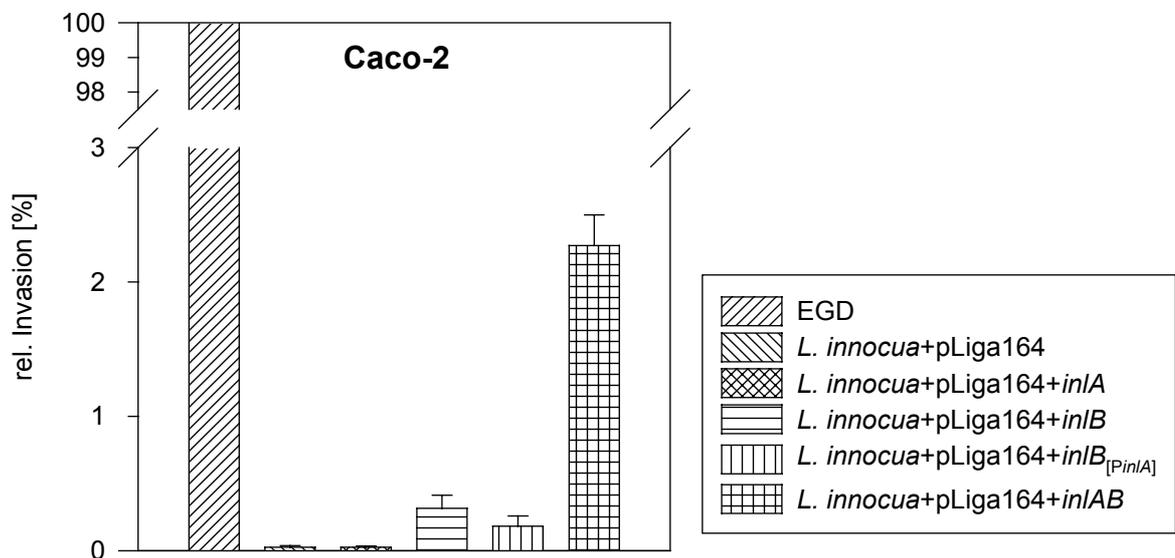


Abb. 3.12: Invasionsverhalten der *L. innocua*-Komplementanten in Caco-2-Zellen.

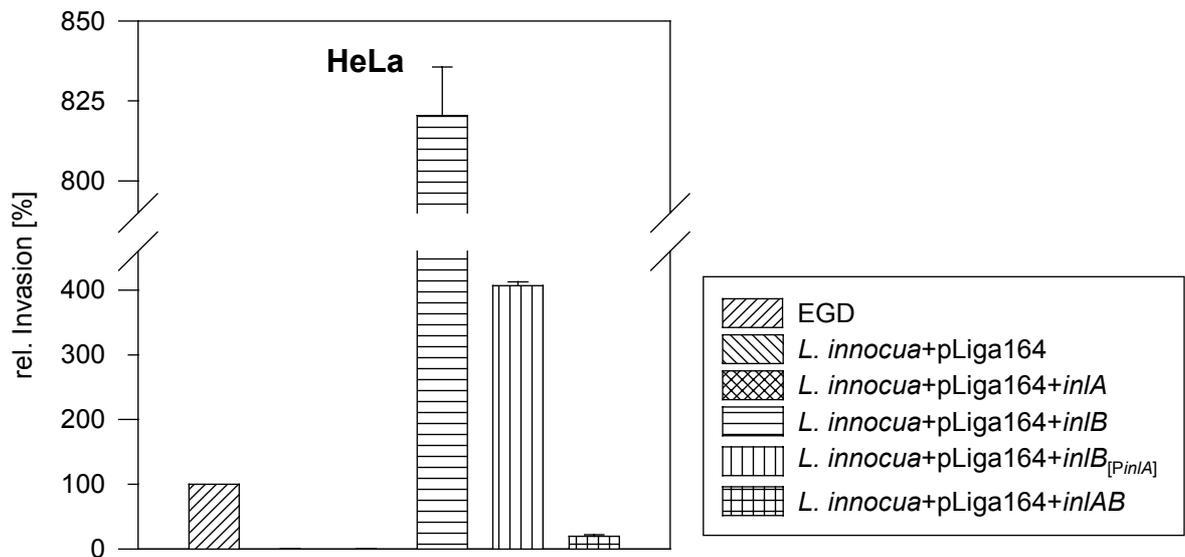


Abb. 3.13: Invasionsverhalten der *L. innocua*-Komplementanten in HeLa-Zellen.

Die relativ stärkste Invasion in Caco-2-Zellen (Abb. 3.12) erreichte die *inIAB*-Komplementante mit 2,3 %, während die anderen Konstrukte unter den 0,3 % der *inIB*-Komplementante lagen.

Bei der Zelllinie HeLa (Abb. 3.13) wurden höhere Invasionsraten erreicht. Das *inIAB*-Konstrukt kam auf 19,7 %, die *inIB*_[PinIA]-Komplementante lag bei 406,6 %, die *inIB*-Komplementante bei 820,4 %.

3.6 Demonstration der biologischen Aktivität von gereinigtem InIB

3.6.1 Reassoziierung des InIB von Listerien

Die Listerien-Arten *L. monocytogenes* und *L. innocua* und die Deletionsmutante $\Delta inIB2$ wurden nach dem Reassoziationsassay (Kap. 2.2.19) mit dem Protein InIB behandelt, um zu untersuchen, ob InIB an Listerien bindet und nicht-invasive Listerien dadurch Invasionfähigkeit erlangen. Das von S. Müller an der GBF in Braunschweig gereinigte Protein wurde in verschiedenen Konzentrationen zur Inkubation mit den Listerien verwendet.

3.6.2 Infektion von eukaryontischen Zelllinien mit Listerien nach Reassoziierung des InIB

Die nach dem Reassoziationsassay mit dem Protein InIB behandelten Listerien wurden für die Infektion der eukaryontischen Zelllinien (Kap. 2.2.21.2) HeLa und VERO verwendet. Die relative Invasion von behandelten und unbehandelten Listerien wurde im Vergleich zum Wildtyp *L. monocytogenes* EGD festgestellt. Die angegebenen Daten beziehen sich auf eine Konzentration von 4,17 µg/ml des Proteins InIB.

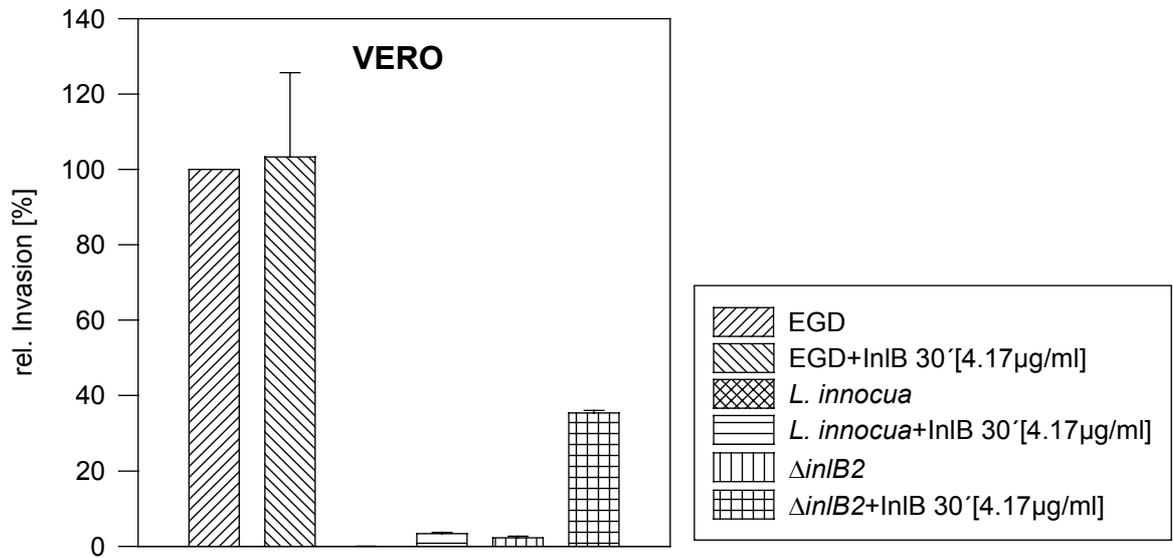


Abb. 3.14: Invasionsverhalten von Listerien nach Reassoziationsassay in VERO-Zellen.

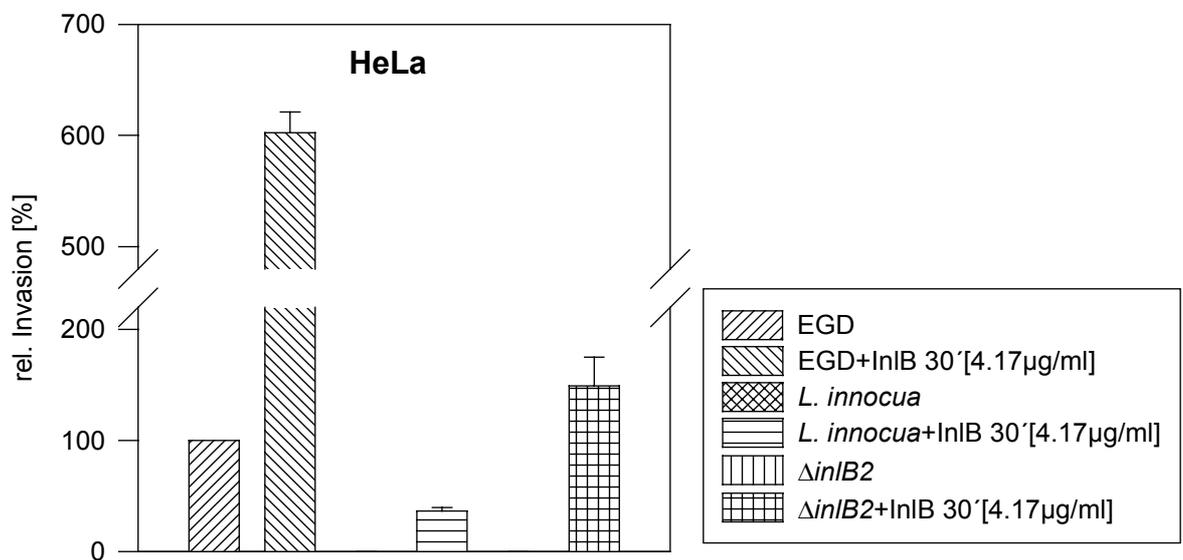


Abb. 3.15: Invasionsverhalten von Listerien nach Reassoziationsassay in HeLa-Zellen.

Bei VERO-Zellen (Abb. 3.14) zeigte der mit InIB inkubierte Wildtyp EGD mit 103,3 % eine gering höhere Invasion als der unbehandelte Stamm. *L. innocua* konnte unbehandelt kaum

nachweisbar invadieren, während der im Reassoziationsassay behandelte Stamm eine relative Invasion von 3,4 % erreichte. Die Deletionsmutante $\Delta inlB2$ zeigte eine relative Invasion von 2,3 %. Die präinkubierten Bakterien derselben Mutante kamen auf die höhere Invasionsrate von 35,4 % verglichen zum Wildtyp.

In der Zelllinie HeLa (Abb. 3.15) konnte der präinkubierte Wildtyp EGD ca. 6mal stärker invadieren als die Kontrolle. Während *L. innocua* und die Deletionsmutante $\Delta inlB2$ mit Invasionsraten von unter 0,1 % keine Invasion zeigten, kamen die entsprechenden mit InlB präinkubierten Bakterien auf 36,7 und 149,1 % Invasion.

4 Diskussion

4.1 Die Nukleotidsequenzen von ORFA und *inLAB*-Operon der Stämme

L. monocytogenes EGD-SmR und *L. monocytogenes* EGD 1/2a sind identisch

Durch die Sequenzierung der offenen Leseraster ORFA und *inLAB*-Operon im Stamm *L. monocytogenes* EGD 1/2a und den dadurch ermöglichten Vergleich mit der bekannten Sequenz von *L. monocytogenes* EGD-SmR (Gaillard *et al.*, 1991) können die Nukleotidsequenzen aufgrund der hohen Homologie als identisch angesehen werden (Kap. 3.1, 7.2). Die Genprodukte der drei offenen Leseraster zeigten analog sehr hohe Homologien zu ihrem jeweiligen Gegenstück. Diese Ergebnisse bedeuten, daß die Charakteristika der Nukleotidsequenz von *L. monocytogenes* EGD-SmR auch im Stamm *L. monocytogenes* EGD 1/2a vorhanden sind, und eine sehr ähnliche Struktur der Genprodukte angenommen werden kann.

Die Sequenzierung der Gesamtnukleotidsequenz (ORFA und *inLAB*-Operon) umfaßte eine Länge von 5912 bp. Da die Sequenzierung und der Vergleich mit der Sequenz von *L. monocytogenes* EGD-SmR Nukleotidunterschiede in nur 47 Positionen ergab, betrug die errechnete Homologie der Gesamtsequenz 99,2 %. Die genetischen Voraussetzungen bezüglich des *inLAB*-Operons und des davon abhängigen Invasionsprozesses in nicht-phagozytierende Zelllinien scheinen daher für beide Stämme nahezu identisch zu sein. Die Funktion von ORFA ist zwar nicht geklärt. Aufgrund der Homologie ist es jedoch wahrscheinlich, daß ORFA in den beiden Stämmen die gleiche Bedeutung hat.

Die errechneten Homologien der 3 Genprodukte von ORFA, *inlA* und *inlB* zwischen beiden Stämmen lag jeweils bei über 99 %. Für das Genprodukt von ORFA wurden Ähnlichkeitswerte von 99,2 %, für *InlA* 99,5 % und für *InlB* 99,4 % festgestellt. Der Homologie in der Nukleotidsequenz entsprechend wiesen auch die Proteine kaum Unterschiede in ihrer Aminosäuresequenz auf (Aminosäuresequenzen nicht komplett dargestellt, siehe Kap. 3.1).

Für das Protein *InlA* konnte abgeleitet aus der DNA-Sequenz N-terminal der Signalpeptid-Abschnitt aus 35 Aminosäuren bestätigt werden, der für den Transport des Proteins aus dem Inneren des Bakteriums an die Oberfläche zuständig ist. Ferner hat die Sequenz 15 aufeinanderfolgende Leucin-reiche Motive, aus je 22 Aminosäuren bestehend, aufzuweisen. Nach den Leucin-reichen Motiven, die von Position 85 bis 415 reichen, zeigte sich die zweite Region mit sich wiederholenden Abschnitten, wobei die ersten beiden eine Länge von 70, die dritte eine Länge von 49 Aminosäuren hat. Hierbei handelt es sich um eine Zellwanddomäne von *InlA*, die in der Aminosäuresequenz von Position 517 bis 707 reicht. C-terminal wurde ebenfalls die Zellwandankerstruktur bestätigt: das Aminosäure-Motiv LPTTGD, gefolgt von einer hydrophoben Region aus 20 Aminosäuren und weiteren 7 vorwiegend positiv geladenen Aminosäuren. Für das Protein *InlB* wurde das charakteristische Signalpeptid, die von Position 85 bis 240 reichenden 7 Leucin-reichen Wiederholungsmotive und die C-terminale Ankersequenz mit zwei je 80 Aminosäuren langen Wiederholungsmotiven – jeweils mit GW beginnend - der Sequenz von *L. monocytogenes* EGD-SmR entsprechend nachgewiesen.

Herauszuheben sind jedoch die wenigen Unterschiede, die zur Veränderung der räumlichen

Struktur der Proteine führen könnten.

Im InlA befindet sich an Position 118 beim Stamm *L. monocytogenes* EGD-SmR die in wäßriger Lösung ionisierte und damit negativ geladene Aminosäure Asparaginsäure, während das gleiche Protein des Stammes *L. monocytogenes* EGD 1/2a an dieser Stelle die ungeladene Aminosäure Asparagin besitzt. Diese gehört jedoch zu den polaren Aminosäuren, die in wäßriger Lösung neutral sind, aber über umschriebene Regionen verfügen, in denen positive oder negative Ladungen überwiegen. Beide Aminosäuren haben daher hydrophile Eigenschaften und sind wahrscheinlich an der Oberfläche des Proteins zu finden.

In InlA befindet sich beim Stamm *L. monocytogenes* EGD-SmR an den Positionen 51 und 454 die hydrophobe Aminosäure Alanin, die häufig in der α -Helix von Proteinen vorkommt. Demgegenüber steht an den genannten Positionen im Stamm *L. monocytogenes* EGD 1/2a die polare Aminosäure Threonin. An diesen Stellen des Proteins liegt also ein Unterschied vor, was die Orientierung der jeweiligen Aminosäure an die Oberfläche oder ins Innere des Proteins angeht, da hydrophobe Aminosäuren wie Alanin im Gegensatz zum polaren Threonin eher im Inneren des Proteins zu finden sind. An Position 594 liegt im Stamm *L. monocytogenes* EGD-SmR die Aminosäure Prolin. Es handelt sich dabei um die einzige Aminosäure, die keine α -Helix bilden kann, da sie nur über eine sekundäre Amino-Gruppe (NH) verfügt, das Wasserstoffatom bei der Peptidbindung verlorengelht und so keine Wasserstoff-Brückenbindungen eingehen kann. *L. monocytogenes* EGD 1/2a verfügt an dieser Position über die oft in α -Helices vorkommende Aminosäure Alanin.

Wichtig zu beachten erscheint bei den hier vorgestellten Unterschieden für InlA, daß Position 118 und 454 innerhalb der für die Interaktion mit E-Cadherin wichtigen Region der Leucinreichen Repeats bzw. innerhalb der für die korrekte Faltung der LRR wichtigen C-terminal angrenzenden Region liegen (Lecuit *et al.*, 1997).

Im Protein InlB des Stammes *L. monocytogenes* EGD-SmR findet sich an Position 41 die polare Aminosäure Serin. An entsprechender Position des Proteins von *L. monocytogenes* EGD 1/2a befindet sich Prolin. Prolin kommt zwar nicht als α -Helix-Bildner in Frage, Serin findet sich jedoch ebenfalls selten in α -Helices, wodurch ein unterschiedlicher Effekt auf die räumliche Struktur ausbleiben könnte. An Position 49 tritt der gleiche Austausch zwischen den Sequenzen der Stämme umgekehrt auf. An den Positionen 117 und 396, erstere innerhalb der LRR, liegt jeweils die polare Aminosäure Threonin einerseits (*L. monocytogenes* EGD-SmR) und die hydrophobe Aminosäure Alanin andererseits (*L. monocytogenes* EGD 1/2a). Das heißt, an diesen Stellen befindet sich die bevorzugt an der Oberfläche von Proteinen liegende Aminosäure Threonin in *L. monocytogenes* EGD-SmR und die bevorzugt im Inneren liegende Aminosäure Alanin in *L. monocytogenes* EGD 1/2a.

Ob diese wenigen Unterschiede in den Wechselwirkungen der Aminosäuren auf die Struktur des Proteins signifikanten Einfluß nehmen, kann nicht ohne weiteres beurteilt werden. T. Hain hat jedoch festgestellt, daß die Veränderung von wenigen Aminosäuren im Bereich der Leucinreichen Motive zu wesentlichen Unterschieden in der Invasionsfähigkeit führen kann (Dissertation, 1999). Mit Hilfe von Röntgen-Strukturanalyse oder NMR-Methode (nuclear magnetic resonance) ist es möglich, die dreidimensionale Struktur von Proteinen aufzuklären. Ein solcher Vergleich zwischen den Proteinen beider Stämme könnte Aufschluß geben. Über

die Aktivität der Proteine kann festgehalten werden, daß sie sich wahrscheinlich ähnlich verhalten. Invasionsassays mit beiden Stämmen kommen zu vergleichbaren Ergebnissen. Für Caco-2-Zellen wurden Invasionswerte von 2,0 %, 2,25 %, bzw. 2,8 % der eingesetzten Bakterien publiziert. Auch für die Hepatozyten-Zelllinie HEP-2 liegen mit je ca. 0,5 % ähnliche wie in dieser Arbeit beschriebene Ergebnisse vor (Gaillard *et al.*, 1991; Dramsi *et al.*, 1993; Lingnau *et al.*, 1995). Die Unterschiede in Nukleotid- und Aminosäuresequenz sind im Infektionsversuch mit Zellkulturen zumindest nicht offensichtlich.

Die Internaline gehören zu einer Gruppe von über 60 bekannten Proteinen mit Leucin-reichen Repeats. Diese Proteine kommen sowohl in Pro- als auch Eukaryonten vor und sind an sehr unterschiedlichen Mechanismen wie Signaltransduktion, Zelladhäsion und Transkription beteiligt. Gemeinsam ist den Proteinen eine konservierte Sequenz innerhalb der LRR, die meist 20 bis 29 Aminosäuren umfaßt und paarweise bis zu 30mal wiederholt wird, und eine spezifische Funktion bei Protein-Protein-Interaktionen besitzt. Die Spezifität der Proteine wird vermutlich durch die nicht konservierten Anteile und die flankierenden Bereiche der Repeat-Region bewirkt. In Prokaryonten wurden Proteine mit LRR bis jetzt nur in pathogenen Bakterien wie z.B. im YopM-Protein von *Y. pseudotuberculosis*, in Genprodukten der *ipaH*-Genfamilie von *Shigella flexneri*, FHA von *Bordetella pertussis* und TpLRR von *Treponema pallidum* entdeckt (Kobe & Deisenhofer, 1994; 1995).

Gene von *L. monocytogenes* EGD kodieren außer für InlA und InlB noch für weitere Proteine mit LRR: Aufgrund der Entdeckung von IrpA (Domann *et al.*, 1997), InlC2, InlD, InlE und InlF (Dramsi *et al.*, 1997) wird von einer Internalin-Multigenfamilie gesprochen. Der Verwandtschaftsgrad von InlA und InlB zu IrpA, InlC2, InlD, InlE und InlF ist mit Homologien zwischen 27,6 % und 49,8 % nach der Clustal-Methode jedoch nicht sehr hoch. Nur InlC2 zeigt stärkere Ähnlichkeiten mit InlD (61,1 %), InlE (60,5 %) und InlA (49,8 %). Die Funktion dieser Proteine ist nicht geklärt. Auf die Invasion des Bakteriums in Zellkulturversuchen hat die Deletion einzelner oder aller für die Proteine kodierender Gene keinen Einfluß, so daß nicht von Internalinen im Sinne von InlA und InlB gesprochen werden kann. Allerdings soll das entdeckte *inlGHE*-Cluster in *L. monocytogenes* EGD für die Virulenz in Mäusen mitverantwortlich sein (Raffelsbauer *et al.*, 1998). Auch in *L. ivanovii* finden sich Internalin-Genabschnitte, deren Produkte an der Virulenz des Bakteriums beteiligt sind. Hierbei handelt es sich um Gene, die in *L. monocytogenes* EGD nicht vorkommen (Engelbrecht *et al.*, 1998).

Sequenzanalysen von ORFA haben Ähnlichkeiten mit der Enzymfamilie der Oxidoreduktasen ergeben. ORFA ist zu 34 % identisch mit der Clavulanat-9-Aldehydreduktase von *Streptomyces clavuligerus*, ebenfalls zu 34 % identisch mit der 3-Ketoacyl-Reduktase von *Bacillus subtilis*, zu 33 % identisch mit einer Alkoholdehydrogenase von *H. pylori* und zu 32 % identisch mit der Ribitol-2-Dehydrogenase von *Klebsiella pneumoniae*.

Weitere Sequenzierungen über einen Bereich von 933 bp und die Suche nach weiteren offenen Leserastern haben stromaufwärts von ORFA zwei weitere offene Leseraster ergeben. Das direkt an ORFA liegende Leseraster hat Ähnlichkeiten mit der Enzymgruppe der Acetyltransferasen wie die von *Rhizobium meliloti* (36 %) oder Galaktosid-O-Acetyltransferase von *E. coli* (31 %). Das zweite stromaufwärts liegende offene Leseraster hat Homologie zu Genen, die die Transkription beeinflussen. Zum Transkriptionsregulator der

Lys-Familie von *Bacillus subtilis* besteht eine 27 %ige Homologie, zum oxidativen Stresstranskriptionsregulator von *Erwinia carotovora* eine 26 %ige Homologie. Die genaue Funktion und Bedeutung dieser beiden offenen Leseraster ist nicht geklärt.

Stromabwärts des *inLAB*-Operons wurde ein Bereich von 1277 bp sequenziert, für den keine eindeutigen Homologien durch Datenbankanalysen festgestellt werden konnten. Auffällig war eine nur 50 %ige Homologie zwischen einer bekannten Terminatorsequenz von *inlB* des Stammes *L. monocytogenes* EGD-SmR (Dramsi *et al.*, 1993) und des Stammes *L. monocytogenes* EGD. Die sonst sehr großen Homologien von ORFA und *inLAB*-Operon zwischen den beiden Stämmen wurden für diesen Abschnitt nicht bestätigt. Ein technischer Fehler bei der Sequenzierung scheidet als Erklärung aus, zumal dieser Bereich einmal als aus chromosomaler DNA amplifiziertes PCR-Produkt und einmal als kloniertes DNA-Fragment im Plasmid MZM6 sequenziert wurde. Mögliche stammspezifische Unterschiede scheinen bei den sonst sehr hohen Homologien ebenfalls keine befriedigende Erklärung zu sein, so daß diese Differenz hier unbeantwortet bleiben muß.

4.2 Die Invasion komplementierter $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutanten in Zellkulturen zeigt unterschiedliche Abhängigkeiten von InlA und InlB

Um den Invasionsmechanismus in eukaryontische Zellkulturen und die dafür verantwortlichen Genprodukte des *inLAB*-Operons zu untersuchen, wurde die mit verschiedenen rekombinanten Plasmiden komplementierte $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante verwendet, in der das gesamte *inLAB*-Operon „in-frame“ deletiert ist (Gaillard *et al.*, 1991; Parida *et al.*, 1998). Durch die Deletion des für die Invasion verantwortlichen chromosomalen Genbereiches und die Komplementationen mit Plasmiden, die unterschiedliche Bereiche des *inLAB*-Operons tragen, bestand die Möglichkeit, die Effekte der einzelnen, aber auch beider Genprodukte zusammen nachzuvollziehen. Da für die Klonierung und die Komplementation der Vektor pERL-3 verwendet wurde (Kap. 3.2.1, 3.2.2), der ein „high copy plasmid“, also ein Plasmid mit hoher Kopienzahl ist, konnten natürlicherweise schwache Effekte verstärkt und eindeutiger durch die stärkere Expression der Internaline im Invasionsversuch untersucht werden.

Da im Immunblot (Kap. 3.2.3) das InlA-Protein sowohl im Kulturüberstand als auch im Zellwandextrakt in der *inlA*- und *inLAB*-Komplementanten stärker als jeweils im Wildtyp *L. monocytogenes* EGD nachgewiesen wurde, ist die erwünschte höhere Expression durch diese Komplementanten offensichtlich. Die größere Menge an InlA im Kulturüberstand insgesamt geht konform mit früheren Beobachtungen und ermöglicht theoretisch eine Rolle des Proteins bei der Invasion sowohl in Zellwand-assoziiertes als auch in löslicher Form (Lingnau *et al.*, 1995; Dramsi *et al.*, 1993). Die beobachteten Abbaubanden von InlA in der *inlA*- und *inLAB*-Komplementante sind vergleichbar mit Blots einer früheren Untersuchung, in der mehrere Banden mit einem Molekulargewicht von 95 bis 80 kDa nachgewiesen wurden (Gaillard *et al.*, 1991). Als Erklärungsansatz diente dort das Phänomen, daß einige Proteine ein verzögertes Wandern in SDS-PAA-Gelen zeigen. Ob dies zutrifft oder die Vermutung, daß das Protein degradiert wird – v.a. wenn es überproduziert im Kulturüberstand vorkommt – kann hier letztlich nicht beantwortet werden.

Das Protein InlB wurde wesentlich stärker im Zellwandextrakt in der *inlB*_{[*p*_{*inlA*}]- und – wenn auch wiederum schwächer als in der *inlB*_{[*p*_{*inlA*}]-Komplementante – in der *inlAB*-Komplementante als im Wildtyp exprimiert, während die Expression der *inlB*-Komplementante deutlich abfiel. Dies bedeutet eine höhere Expression von InlB aufgrund des rekombinanten Plasmides mit der Einschränkung, daß dazu der PrfA-abhängige Promotor vor *inlA* notwendig ist. Denn dieser Promotor ist in der *inlB*-Komplementante nicht vorhanden. Die Beobachtung der höheren Expression in Anwesenheit des PrfA-abhängigen Promotors deckt sich mit früheren Transkriptionsanalysen des Wildtyps *L. monocytogenes* EGD, in dem die InlB-Expression ebenfalls in großem Maße durch den PrfA-abhängigen Promotor gesteuert wird (Lingnau *et al.*, 1995). In der *inlB*_{[*p*_{*inlA*}]- und in der *inlAB*-Komplementante trat ein nicht geklärter Abbau des Proteins auf. Der Kulturüberstand bot einen Nachweis des Proteins in der *inlAB*- und schwach in der *inlB*_{[*p*_{*inlA*}]-Komplementante, während ansonsten das Protein nicht detektiert werden konnte. Der stärkere Nachweis von InlB im Zellwandextrakt gegenüber dem Kulturüberstand bestätigt frühere Ergebnisse (Lingnau *et al.*, 1995).}}}}

Die Ergebnisse der Invasionsversuche (Kap. 3.2.4) mit verschiedenen Zellkulturen zeigen unterschiedliche Abhängigkeiten von InlA und/oder InlB für die Invasion der komplementierten Δ *inlAB2*-Deletionsmutanten in die Zelllinien. Die Invasionsversuche liefern Daten, die als Trend schwächere oder stärkere Abhängigkeiten von den Genprodukten des *inlAB*-Operons erkennen lassen.

Nicht-invasive Transposon-Mutanten, die ihre Invasionsfähigkeit gegenüber dem Wildtyp verloren hatten, konnten durch die Komplementation mit rekombinanten Plasmiden, die *inlA* oder *inlA* mit ORFA und Teilen von *inlB* besaßen, wieder für die Enterozyten-ähnliche Zelllinie Caco-2 invasiv gemacht werden (Gaillard *et al.*, 1991). Auch die alleinige Deletion von *inlA* auf chromosomaler Ebene zeigte die Abhängigkeit der Invasion in Caco-2 von dem Genprodukt InlA, da die Invasion der Deletionsmutante nur noch einen Bruchteil der des Wildtyps betrug. Die Deletion von *inlB* führte dagegen nur zu einem leichten Absinken der Invasion in Caco-2. Die Komplementation einer Δ *inlAB2*-Deletionsmutanten mit *inlA*- oder *inlB*-tragenden Plasmiden durch Dramsi führte nur bei der *inlA*-Komplementation zu einem Wiederherstellen der Invasivität (Dramsi *et al.*, 1995). Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen ebenfalls die Abhängigkeit der Invasion in Caco-2 Zellen von InlA, da die *inlA*-Komplementante einen relativen Invasionswert von ca. 200 % erreichte. Darüber hinaus wird die Invasion verstärkt, wenn InlA und InlB zusammen produziert werden, wie die relative Invasion der *inlAB*-Komplementante von fast 460 % zeigte. Der Grund hierfür liegt nicht in einer unterschiedlichen Produktion von InlA durch die beiden Konstrukte, da die Immunblots sowohl für die *inlA*-Komplementante als auch für die *inlAB*-Komplementante die gleiche Proteinmenge zeigten. Da das *inlB*-Konstrukt keine, das *inlB*_{[*p*_{*inlA*}]-Konstrukt eine Invasion von lediglich 9,6 % aufwies, hat InlB alleine – die Anwesenheit des im Operon vor *inlA* liegenden PrfA-abhängigen Promotors hatte einen relativ kleinen Effekt – eine sehr geringe Wirkung auf die Invasion. Es kann daher sowohl von einer InlA-abhängigen Invasion als auch von einem synergistischen Effekt zusammen mit InlB für Caco-2-Zellen gesprochen werden. Auf welche Weise InlB die Invasion fördern könnte, ist noch nicht bekannt. Denkbar ist, daß InlB in Wechselwirkung mit InlA tritt und so die Invasion erhöht. Es könnte aber auch auf Caco-2-Zellen ein Rezeptor vorhanden sein, mit dem InlB in Wechselwirkung tritt und über}

Signaltransduktionsvorgänge die Invasion durch InlA unterstützt. Gegen diese beiden Überlegungen spricht jedoch die – wenn auch nur schwach vorhandene – Invasion durch die *inlB*_[*P**inlA*]-Komplementante. Diese eigenständige Invasion stellt ein Argument für einen InlA-unabhängigen Eintritt dar, der nach Vorbild der E-Cadherin-InlA-Interaktion als weiteres Beispiel für einen Zipper-Mechanismus zwischen InlB und dem noch unbekanntem Rezeptor auf der Wirtszelle ablaufen könnte. Aber auch dieses Denkmodell erklärt nicht hinreichend eine Verdopplung der Invasion durch beide Proteine gegenüber InlA alleine, da wie bereits erwähnt die Invasion durch InlB alleine sehr gering ist.

Die zum Infektionsversuch parallel durchgeführte mikroskopische Analyse mit Immunfluoreszenzaufnahmen (Kap. 3.2.5) bestätigt die Invasionsdaten dahingehend, daß nur die *inlA*- und die *inlAB*-Komplementante neben dem Wildtyp Invasion in Caco-2 zeigten. Die genaue Relation der Invasion unter den einzelnen Komplementanten wurde zwar nicht widerspiegelt – in der Immunfluoreszenz zeigte die *inlA*-Komplementante die meisten intrazellulären Bakterien – dies ist jedoch durch die weitere notwendige Behandlung der Deckgläschen zu erklären. Bei dieser Behandlung ist ein Verlust von eukaryontischen Zellen und Bakterien unvermeidlich, so daß Relationen nicht exakt wiedergegeben sein können. Wichtig für die Interpretation erscheint der grundsätzliche Nachweis der Invasionsfähigkeit der beiden genannten Komplementanten. Das Adhärenzverhalten war generell stärker ausgeprägt als das Invasionsverhalten, spiegelte jedoch den Trend der Invasionsergebnisse wider und gibt damit einen indirekten Hinweis auf die für die Invasion notwendige Bindung der Bakterien an die Oberfläche der Wirtszelle.

Die Invasionsdaten für die Zelllinie Henle407, eine Dünndarm-Zelllinie, mit den Wildtyp deutlich übertreffenden Invasionszahlen für die *inlB*_[*P**inlA*]- und die *inlAB*-Komplementante indizieren eine InlB-abhängige Invasion, da auch InlA alleine keinen invasiven Effekt hat und zusammen mit InlB eher die Invasion vermindert, wie die praktisch fehlende Invasion der *inlA*-Komplementante und die gegenüber der *inlB*_[*P**inlA*]-Komplementante geringeren Invasionszahlen der *inlAB*-Komplementante zeigten. Diese Ergebnisse decken sich jedoch nicht unbedingt mit den Invasionsdaten einer Deletionsmutante, in der *inlA* deletiert ist und die eine verminderte Invasion in Henle407-Zellen und damit eine InlA-abhängige Invasion aufweist (Lingnau *et al.*, 1995).

Die Abhängigkeit der Invasion in die Zelllinie HeLa von InlA und InlB, die ursprünglich aus einem Uterus isoliert wurde, verhalten sich nach den vorgestellten Daten in derselben Weise wie bei Henle407-Zellen. Ein hier postulierter InlB-abhängiger Eintritt in HeLa-Zellen wird leider in der Literatur nur angedeutet und kann daher nicht ausführlicher in die Diskussion eingebracht werden (Ireton *et al.*, 1996).

Die Abhängigkeit der Invasion in die Zelllinie HeLa von InlA und InlB wurden wie schon bei Caco-2-Zellen zusätzlich mit Immunfluoreszenzaufnahmen überprüft, um die Invasionsfähigkeit der Komplementanten zu bestimmen. Außer dem Wildtyp zeigten die *inlB*_[*P**inlA*]- und die *inlAB*-Komplementante die stärkste Invasion in diese Zelllinie. Der InlB-abhängige Eintritt wird also auch hier angedeutet, auch wenn diese Methode aufgrund der etwa gleich starken Invasion von *inlB*_[*P**inlA*]- und *inlAB*-Konstrukt nicht die gleichen Relationen aufweist wie der Infektionsversuch. Entsprechend der Feststellungen bei Caco-2-Zellen waren auch bei HeLa-Zellen die Adhäsionszahlen bei allen Stämmen größer als die

Invasionsdaten. Da die $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante relativ stark adhÄrierte, obwohl dieser Mutante beide Internaline fehlen, kann ein Bindungsmechanismus vermutet werden, der unabhÄngig von den beiden Proteinen funktioniert. Diese Bindung resultierte jedoch nicht in eine Invasion und scheint daher keine pathogenetische Bedeutung fÄr das Modell der Zellkultur zu haben. Bindung von *L. monocytogenes* an und darÄber hinaus Eintritt in eukaryontische Zellen (MÄusemakrophagen IC-21, Epithelzellen CHO) soll auch durch Heparansulfat-haltige MolekÄle und das OberflÄchenprotein ActA des Bakteriums vermittelt werden (Alvarez-Dominguez *et al.*, 1997). Ob dieser Mechanismus in den hier vorgestellten Beobachtungen eine Rolle spielt, bedarf zwar spezieller Untersuchungen, erscheint aber zumindest mÄglich.

Auch fÄr die Fibroblasten-Zelllinie L-929 und fÄr die Nierenepithelzellen VERO bedeuten die vorgestellten Invasionsdaten mit den HÄchstwerten fÄr die $inLB_{[PinLA]}$ -Komplementante einen InLB-abhÄngigen Effekt, der bei gleichzeitiger Produktion von InLA und InLB geschwÄcht wird. FÄr VERO-Zellen findet sich die bereits erwÄhnte Literaturstelle, in der ein InLB-abhÄngiger Eintritt in VERO-Zellen genannt wird (Ireton *et al.*, 1996). WÄhrend bei den Zelllinien Henle407, HeLa und L-929 sowohl die $inLB_{[PinLA]}$ -Komplementante als auch die $inLAB$ -Komplementante Invasionsraten erreichen, die Äber denen des Wildtyps liegen, ist das bei VERO-Zellen nicht der Fall. Ein mÄglicher Grund kÄnnte eine geringere Zahl von InLB-Rezeptoren auf VERO-Zellen sein. Daß die Invasion durch die $inLB_{[PinLA]}$ -Komplementante durchweg am stÄrksten ist, lÄßt sich durch die Produktion von InLB erklÄren. Diese Komplementante zeigte im Immunblot die stÄrkste Expression von InLB. Die InLB-Produktion der $inLAB$ -Komplementanten war etwas schwÄcher und damit auch die Invasion. Die schwache Produktion im Falle der $inLB$ -Komplementante resultierte in einer praktisch nicht vorhandenen Invasion, was die ErklÄrung von Invasionsraten in AbhÄngigkeit von Proteinmengen unterstÄtzt.

Die vorliegenden Ergebnisse fÄr die humane Hepatozyten-Zelllinie Hep-G2 sind weniger eindeutig und daher schwieriger zu interpretieren als die der Äbrigen Zelllinien. InLB fÄr sich und beide Internaline zusammen sind in der Lage, die InvasivitÄt der Deletionsmutante auf mehr als die HÄlfte der InvasivitÄt des Wildtyps zu steigern, wie durch die $inLB_{[PinLA]}$ -, bzw. die $inLAB$ -Komplementante gezeigt wurde. FÄr InLA ist zwar ein positiver Effekt auf die Invasion zu sehen, da die $inLA$ -Komplementante fast ein Drittel der Invasion des Wildtyps erreicht. Dieser Effekt wird jedoch durch einen hohen Hintergrund der Negativkontrolle geschmÄlert. Die InLA-AbhÄngigkeit betreffend weicht dieses Ergebnis von frÄher publizierten Daten ab. Dramsi *et al.* haben einen gleich starken Effekt von InLA und InLB in entsprechend komplementierten $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutanten festgestellt, machten jedoch keine Aussage zu dem Effekt bei gleichzeitiger Produktion beider Proteine. Allerdings stehen die Konstrukte dieser Arbeitsgruppe unter der Kontrolle des Proteasegenpromotors von *Streptococcus cremoris* und damit nicht unter der physiologischen Kontrolle des PrfA-abhÄngigen Promotors, wodurch die Vergleichbarkeit eingeschrÄnkt wird. Interessanterweise fand diese Arbeitsgruppe fÄr die murine Hepatozyten-Zelllinie ATCC TIB73 nur eine InLB-AbhÄngigkeit (Dramsi *et al.*, 1995). Die hier vorgestellten Daten der Hep-G2-Zellen unterscheiden sich - soweit vergleichbar - von denen von Dramsi *et al.*, weisen aber eine Parallele bezÄglich der genannten murinen Hepatozyten-Zellen auf, da bei diesen nur ein InLB-Effekt aber kein InLA-

Effekt beobachtet wurde (auch für die murinen Hepatozyten gibt es keine Angaben über einen gemeinsamen Effekt der Internaline).

Die Invasionsdaten der Zelllinien PtK2 (Niere) und A549 (Lunge) zeigten die gleiche Tendenz. Die Invasion in beide Zelllinien durch das *inlA*-Konstrukt war schwächer als die des Wildtyps. Ein InlA-abhängiger Eintritt ist jedoch eindeutig. InlB verhilft in beiden Zelllinien, wenn es durch das *inlB*_[P_{inlA}]-Konstrukt produziert wird, zu einem stärkeren Eintritt als beim Wildtyp. Dieser Effekt wird durch die gleichzeitige Produktion der Proteine InlA und InlB ein wenig übertroffen, da die *inlAB*-Komplementante stärker als die *inlB*_[P_{inlA}]-Komplementante invadierte. Es besteht daher evtl. ein schwacher synergistischer Effekt. Frühere Untersuchungen der Internalin-Abhängigkeit der Invasion in beide Zelllinien mit einer chromosomalen Deletionsmutanten für das *inlA* haben eine InlA-abhängige Invasion ergeben, die die hier vorgestellte InlA-Abhängigkeit unterstützt (Lingnau *et al.*, 1995).

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß es unterschiedliche Abhängigkeiten von den Proteinen InlA und InlB für die Invasion je nach Zellkultur gibt. Der propagierte Begriff „cell tropism“ (Dramsi *et al.*, 1995), der diese unterschiedlichen Abhängigkeiten beschreiben soll, kann anhand der vorgestellten Daten aufgegriffen und gestützt werden. Durch die Untersuchung verschiedener Zelllinien wird die Rolle der Proteine InlA und InlB am Invasionsprozeß weiter aufgefächert. Es gibt sowohl synergistische als auch sich gegenseitig störende Effekte der beiden Proteine. Diese Variabilität könnte es dem Bakterium *L. monocytogenes* ermöglichen, sich in verschiedenen Nischen des menschlichen Körpers zu etablieren und dabei nicht nur von einem Wirtszelltyp oder einem Rezeptor abhängig zu sein.

4.3 Rekombinante Plasmide des Vektors pERL-3 verleihen *L. innocua* Invasivität in Zellkulturen

Dem apathogenen Bakterium *L. innocua*, das laut 16sRNA-Studien am nächsten verwandt mit *L. monocytogenes* ist, fehlen gegenüber *L. monocytogenes* alle bekannten Virulenzfaktoren inklusive der Gene für die Invasionsproteine InlA und InlB. Es eignet sich daher zur Überprüfung, ob die Expression von InlA und/oder InlB ausreicht, um ihm Pathogenität zu verleihen oder ob noch weitere Faktoren notwendig sind. Außerdem kann durch Invasionsassays überprüft werden, ob sich die Spezifität der Internaline für verschiedene Zellkulturen in gleicher Weise wie bei den komplementierten $\Delta inlAB2$ -Deletionsmutanten verhält.

Durch die Komplementation des apathogenen und nicht-invasiven Stammes *L. innocua* mit rekombinanten Plasmiden, die verschiedene Abschnitte des *inlAB*-Operons tragen, kann grundsätzlich Invasivität verliehen werden (Kap. 3.3.1-4). Diese beträgt jedoch höchstens 5 %, meistens weniger als 1 % der Invasivität des Wildtyps *L. monocytogenes* EGD und damit nur einen Bruchteil der Invasivität der komplementierten $\Delta inlAB2$ -Deletionsmutanten. Aufgrund dieser reduzierten Invasion muß davon ausgegangen werden, daß *L. monocytogenes* gegenüber *L. innocua* einen oder mehrere Faktoren außer den Genprodukten des *inlAB*-Operons besitzt, der oder die für die Invasion in Zellkulturen essentiell ist oder sind. Die Spezifität der Internaline für die Invasion in verschiedene Zelllinien verhält sich nicht in allen Fällen wie bei den $\Delta inlAB2$ -Komplementanten.

Die Immunblots der *L. innocua*-Komplementanten (Kap. 3.3.3) spiegeln prinzipiell die Ergebnisse der Blots der $\Delta inLAB2$ -Komplementanten wider. Das ist insoweit erwartungsgemäß, da es sich um den gleichen Vektor bzw. um die gleichen rekombinanten Plasmide handelt. Die Immunblots für InlA zeigten, daß das Protein stärker im Kulturüberstand als im Zellwandextrakt nachzuweisen war. Die stärkere Detektion des Proteins in der *inLA*- und *inLAB*-Komplementante verglichen mit dem Wildtyp spricht für die erwünschte stärkere Expression des Proteins in den Komplementanten. Auch die bei den komplementierten $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutanten beobachteten und diskutierten vermeintlichen Abbaubanden traten erneut auf. Die Immunblots für InlB zeigten mehr Protein im Zellwandextrakt als im Kulturüberstand. Während das Protein in der TCA-Fällung des Kulturüberstandes in der *inlB*_{[*P*_{*inLA*}]- und die *inLAB*-Komplementante detektiert wurde, konnte es im Zellwandextrakt darüber hinaus im Wildtyp *L. monocytogenes* EGD nachgewiesen werden.}

Die hier gezeigten Ergebnisse der Invasionsassays (Kap. 3.3.4) für die Zelllinie Caco-2 stimmen von der Tendenz mit den Ergebnissen der komplementierten $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutante überein, da auch bei den *L. innocua*-Komplementanten das *inLA*- und das *inLAB*-Konstrukt die eindeutigsten Effekte zeigten. InlA alleine und InlA zusammen mit InlB bewirken eine Invasion, wobei auch hier ein synergistischer oder stärkerer Effekt vorhanden ist, wenn beide Proteine produziert werden. Diese Ergebnisse gehen konform mit früher publizierten, was die InlA-Abhängigkeit von *L. innocua* für die Invasion in Caco-2 angeht (Gaillard *et al.*, 1991; Dramsi *et al.*, 1995). Über den gemeinsamen Effekt beider Proteine wird leider keine Aussage gemacht. Allerdings – und das steht im Gegensatz zu dieser Arbeit – werden bei den genannten Autoren sehr viel höhere Invasionswerte mit bis zu ca. 75 % des Wildtyps *L. monocytogenes* EGD für die mit *inLA* und Vektor komplementierten *L. innocua* erreicht. Eine Erklärung für diese Unterschiede kann die Verschiedenheit der reinen, also nicht komplementierten *L. innocua*-Stämme nur bedingt sein, da beide Stämme an sich nicht invasiv sind. Die rekombinanten Plasmide der genannten Autoren Gaillard, Dramsi *et al.* verfügen über einen Protease-Promotor und unterscheiden sich daher erheblich von den in dieser Arbeit verwendeten Plasmiden. Letztere besitzen den PrfA-abhängigen und die PrfA-unabhängigen Promotoren des *inLAB*-Operons. Da PrfA in *L. innocua* nicht gebildet wird, stehen den Konstrukten nur schwache Promotoren zur Verfügung. Dieser Unterschied mag eher zu den erheblichen Unterschieden in der Invasivität der Konstrukte beitragen.

Die Invasion der *L. innocua*-Komplementanten in Henle407 hatte bei der *inlB*_{[*P*_{*inLA*}]- und der *inLAB*-Komplementante die stärksten Effekte, einen schwächeren bei der *inlB*-Komplementante. Es findet sich daher analog zu den komplementierten $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutanten ein InlB-abhängiger Eintritt in diese Zelllinie, der ebenfalls durch InlA nicht gefördert, sondern eher gehemmt wird. Für die Zelllinien HeLa, L929 und VERO können die gleichen Aussagen wie bei Henle407 getroffen werden: Die Invasion in diese Zelllinien ist InlB-abhängig, und es gibt keinen synergistischen Effekt zusammen mit InlA. Für die genannten Zelllinien verhalten sich *L. innocua*-Komplementanten, was die Spezifität der Internaline angeht, wie die komplementierten $\Delta inLAB2$ -Deletionsmutanten.}

Komplizierter sind dagegen die Ergebnisse für die Zelllinien Hep-G2, PtK2 und A549.

Für die Invasion in die Hepatozyten-Zellen Hep-G2 ist nach den vorgestellten Ergebnissen InlA verantwortlich. Die Produktion von InlA und InlB zusammen verstärkt kaum die Invasion gegenüber InlA allein. Bei den $\Delta inlAB2$ -Deletionsmutanten erreichte das $inlB_{[PinlA]}$ -Konstrukt die größte Invasion, während bei *L. innocua* dieser Effekt praktisch fehlt. Sowohl diese Diskrepanz als auch die viel geringere Invasion durch diese *L. innocua*-Komplementante insgesamt signalisieren, daß der Invasionsprozeß nicht nur durch die beiden Proteine InlA und InlB gekennzeichnet ist, sondern auch andere Faktoren eine Rolle übernehmen. Für Hep-G2 konnte bislang keine Invasion durch komplementierte *L. innocua* gezeigt werden. Interessant ist dabei, daß der in Caco-2 stark invasive Stamm *L. innocua* mit *inlA* bei Hepatozyten sozusagen erfolglos blieb (Dramsi *et al.*, 1995). Das kann eventuell als Hinweis darauf gewertet werden, daß gerade Hep-G2 eine für diese Untersuchungen problematische Zelllinie darstellt.

Bei den PtK2-Zellen liegt ein InlA-abhängiger Eintritt vor, der durch InlB eher gehemmt als gefördert wird, wie die Invasionsdaten der *inlA*- und *inlAB*-Komplementation von *L. innocua* zeigten. Hier fehlt wie auch bei Hep-G2 der bei den komplementierten $\Delta inlAB2$ -Deletionsmutanten beobachtete Effekt durch das $inlB_{[PinlA]}$ -Konstrukt und der leichte Synergismus der beiden Proteine.

Die *inlA*-Komplementante zeigte in A549-Zellen eine relative Invasion von ca. 1 %. Dieser InlA-abhängige Eintritt stieg jedoch auf das 5fache, wenn beide Proteine durch das *inlAB*-Konstrukt produziert wurden. Ein synergistischer Effekt wird deutlich. InlB für sich hat einen viel schwächeren Effekt als InlA, wie die geringere Invasion durch die $inlB_{[PinlA]}$ -Komplementante erkennbar machte. Abermals fehlt hier eine Auswirkung von InlB als singulärem Genprodukt auf die Invasion, die bei den komplementierten $\Delta inlAB2$ -Deletionsmutanten durch die $inlB_{[PinlA]}$ -Komplementante beobachtet werden konnte.

Auf der einen Seite konnte für eine Reihe der Zellkulturen die Spezifität der Internaline („cell tropism“) für die Invasion in diese bestätigt werden. Dies gilt für Caco-2, Henle407, HeLa, L929 und VERO. Auf der anderen Seite fehlt bei Hep-G2, PtK2 und A549 der Effekt von InlB. Dem Bakterium *L. innocua* könnte also ein oder mehrere Faktoren fehlen, der/die für den InlB-abhängigen Eintritt in gerade diese Zellen wichtig ist/sind. Möglich ist, daß sich der Transport von InlB an die Bakterienoberfläche in *L. innocua* von dem Transport in *L. monocytogenes* unterscheidet und daher bei bestimmten Zelllinien unterschiedliche Effekte auftreten. Auch die räumliche Anordnung der Oberflächenproteine InlA und InlB und anderer Moleküle auf *L. innocua* und *L. monocytogenes* könnte sich unterscheiden, so daß bei manchen Zellen mit einem möglichen Rezeptor für InlB eine bessere oder schlechtere Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand möglich wäre. Diese Hypothesen bedürfen einer weitergehenden Untersuchung.

4.4 Für die Invasion der $\Delta vgc2$ -Deletionsmutanten in Zellkulturen sind PrfA und Internaline ausreichend

Mit der $\Delta vgc2$ -Deletionsmutanten steht eine Mutante zur Verfügung, in der die bekannten Virulenzgene *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*, *inlA*, *inlB* und *irpA* deletiert sind, und die daher

geeignet ist, um bekannte und unbekannte an dem Invasionsprozeß beteiligte Faktoren zu untersuchen. Durch das Ausschalten der bekannten Virulenzfaktoren können einzelne Effekte von verschiedenen Abschnitten des *inlAB*-Operons auf die Invasionsfähigkeit noch genauer überprüft werden, wenn die Deletionsmutante mit rekombinanten Plasmiden des Vektors pLigal64 komplementiert wird. Die $\Delta vgc2$ -Deletionsmutante verfügt zwar im Vergleich zur $\Delta inlAB2$ -Deletionsmutanten über keine bekannten Virulenzfaktoren. Beide Deletionsmutanten haben aber ansonsten den gleichen genetischen Hintergrund des Wildtyps *L. monocytogenes* EGD und müßten daher in der Lage sein, die Invasion – falls dafür andere Faktoren außerhalb der Virulenzgene eine Rolle spielen – zu unterstützen. Der Vektor pLigal64 trägt den wesentlichen Regulator der Virulenzgenexpression, das Gen *prfA* (Leimeister-Wächter *et al.*, 1990). Die Komplementation mit diesem Vektor und den daraus klonierten rekombinanten Plasmiden (Kap. 3.4.1) ermöglicht daher eine Aussage über die Wirkung von PrfA auf die Expression von *inlA* und *inlB* (auf dem Plasmid liegend) und eine anschließende Prüfung der Invasivität der Komplementanten unter dem Einfluß des Regulationsproteins PrfA. Der Vektor pLigal64 besitzt ferner einen Promotor für das Gen *actA* (nicht das Gen *actA* selbst). PrfA aktiviert sowohl den PrfA-abhängigen Promotor vor *inlA* als auch den *actA*-Promotor (Mengaud *et al.*, 1991a; Chakraborty *et al.*, 1992; Dramsi *et al.*, 1993; Lingnau *et al.*, 1995). Aus diesem Grund ist anzunehmen, daß PrfA an beide Promotoren bindet und daher auch ein positiver Regulationseffekt auf den PrfA-abhängigen Promotor des *inlAB*-Operons zu beobachten ist.

Die Immunblots (Kap. 3.4.3) für das InlA zeigten früheren Publikationen entsprechend mehr detektiertes Protein im Kulturüberstand als im Zellwandextrakt (Lingnau *et al.*, 1995; Dramsi *et al.*, 1993). Nachgewiesen wurde das Protein in der *inlA*- und in der *inlAB*-Komplementante deutlich, während es zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung nicht im Wildtyp *L. monocytogenes* EGD nachzuweisen war. Dies spricht für eine stärkere Expression der Komplementanten gegenüber dem Wildtyp. Die tiefer laufende Bande der *inlA*-Komplementante – sie war durch den hohen unspezifischen Hintergrund des Blots für den Kulturüberstand nur im Blot für den Zellwandextrakt gut zu zuordnen – signalisiert, daß das Protein in verkürzter Form vorliegt.

Das verkürzte Protein der *inlA*-Komplementante gab Anlaß, dieses Konstrukt durch eine Sequenzierung mit markierten Primern zu überprüfen. Die Sequenzierung ergab eine Punktmutation in der Nukleotidsequenz an Position 3767 in *inlA*, die zu einem „frame shift“ führte. Die Verschiebung des offenen Leserasters führte zu dem Auftreten des Stopcodons TGA an Position 3793 bis 3795. Dementsprechend kann nur noch eine um 47 Aminosäuren verkürzte Form des Proteins gebildet werden, der die für die Verankerung in der Membran des Bakteriums notwendige Sequenz am C-Terminus fehlt.

Die übereinander liegenden Banden im Immunblot entsprechen wahrscheinlich den bereits vorher diskutierten vermeintlichen Abbaubanden (Kap. 4.2).

Im Immunblot für InlB wurde, wenn man die sehr starke Abbaubanden von ca. 28 kDa zugrundelegt, mehr Protein im Zellwandextrakt als im Kulturüberstand nachgewiesen. Der stärkere Nachweis von InlB im Zellwandextrakt gegenüber dem Kulturüberstand bestätigt frühere Ergebnisse (Lingnau *et al.*, 1995). InlB konnte im Wildtyp nicht detektiert werden. Überraschenderweise zeigten sich jedoch im Blot des Kulturüberstandes gleich starke Banden

in der *inlB*- und *inlB*_[*P*_{*inlA*}]-Komplementante. Die publizierte stärkere Transkription von *inlB* durch den PrfA-abhängigen Promotor des *inlAB*-Operons und die daraus angenommene stärkere Translation ist demnach in dem hier vorgestellten Konstrukt nicht relevant (Lingnau *et al.*, 1995). Die InlB-Bande der *inlAB*-Komplementante war schwächer, es gab aber analog zum Zellwandextrakt die erwähnten zusätzlichen 28 kDa-Banden. Daß die InlB-Bande in der SDS-Zellwandextraktion der *inlB*-Komplementante deutlicher zu detektieren war als in der *inlB*_[*P*_{*inlA*}]-Komplementante, spricht wiederum nicht für die erwartete stärkere Expression durch den PrfA-abhängigen Promotor des *inlAB*-Operons. In der *inlAB*-Komplementante des Zellwandextraktes war das Protein nur schwach zu detektieren, dafür aber sehr deutlich in der bereits erwähnten degradierten Form. Die Blots für InlB signalisieren eine sehr starke Produktion des Proteins durch die *inlB*-, *inlB*_[*P*_{*inlA*}]- und die *inlAB*-Komplementante, die unabhängig vom PrfA-abhängigen Promotor des *inlAB*-Operons funktioniert. Zudem tritt eine spezifische Degradation des Proteins bei der *inlAB*-Komplementanten auf.

Durch SDS-Gelelektrophorese des Zellwandextraktes mit einem 12,5 % PAA-Gel konnten nicht wie zunächst angenommen nur eine, sondern zwei Abbaubanden mit ähnlichem Molekulargewicht identifiziert werden. N-terminale Ansequenzierungen zeigten, daß es sich um C-terminale Fragmente von InlB handelt (Kap. 3.4.4). Der Grund für diesen Abbau ist nicht geklärt. Die Spaltung durch eine Protease im entsprechenden Bereich des Proteins (Position 390-394; AETT) wird in der Arbeitsgruppe Wehland an der GBF in Braunschweig schon länger diskutiert, ist aber noch nicht befriedigend zu beantworten.

In den Δ *vgc2*-Komplementanten werden die klonierten Genabschnitte des *inlAB*-Operons stärker exprimiert als im Wildtyp *L. monocytogenes* EGD. Die stärkere Expression ist zum einen dadurch bedingt, daß der komplementierte Vektor pLiga164 ein „high copy plasmid“ ist, ein Plasmid mit hoher Kopienzahl. Zum anderen kann sich der Effekt des positiven Regulationsfaktors PrfA in dieser Form bemerkbar machen. Die signifikante Produktion von InlB unabhängig vom PrfA-abhängigen Promotor des *inlAB*-Operons läßt darauf schließen, daß sich der auf dem Vektor befindende und ebenfalls unter positiver Kontrolle durch PrfA stehende *actA*-Promotor (Mengaud *et al.*, 1991a; Chakraborty *et al.*, 1992) auch als starker Promotor für *inlB* wirkt. Das *inlB*-Konstrukt liegt als einziges in Leserichtung des *actA*-Promotors (vergleiche Kap. 7.3). Es liegt hier unter Berücksichtigung der Immunblots möglicherweise eine stärkere, positive Kontrolle von *inlB* durch den *actA*-Promotor als durch den PrfA-abhängigen Promotor des *inlAB*-Operons vor, da das *inlB*-Konstrukt mehr Protein zu bilden scheint als das *inlB*_[*P*_{*inlA*}]-Konstrukt. Möglich ist aber auch, daß die Promotorenhierarchie von *L. monocytogenes* innerhalb des letztgenannten Konstruktes zum Tragen kommt: PrfA aktiviert den *actA*-Promotor stärker als den PrfA-abhängigen Promotor des *inlAB*-Operons aufgrund von geringen Abweichungen in den Palindromsequenzen, an die PrfA bindet (Sheehan *et al.*, 1995). Daher ist es wahrscheinlich, daß PrfA in der *inlB*_[*P*_{*inlA*}]-Komplementante stärker an den *actA*-Promotor bindet als an den des *inlAB*-Operons und auf diese Weise der transkriptionssteigernde Effekt des Promotors vor dem *inlAB*-Operon gemindert wird.

Um die Invasion der Komplementanten zu testen, wurden die Zelllinien Caco-2 und HeLa verwendet, da für erstere ein InlA-abhängiger Eintritt der Listerien publiziert und dieser neben einem synergistischen Effekt für InlA und InlB in dieser Arbeit vorgestellt worden war.

Außerdem wurde für HeLa-Zellen ein InlB-abhängiger Eintritt beobachtet, der durch die gleichzeitige Produktion beider Proteine aus der Internalin-Familie nicht verstärkt, sondern eher vermindert wurde. Mit der Verwendung dieser zwei Zelllinien sind verschiedene Spezifitäten der Internaline exemplarisch vertreten.

In Caco-2-Zellen erreichte das *inlAB*-Konstrukt eine Invasion, die fast der des Wildtyps entsprach. Das bedeutet, daß die Anwesenheit von PrfA und der Internaline in dieser Deletionsmutante nicht ausreicht, um die Invasivität deutlich über die des Wildtyps zu steigern. Das *inlA*-Konstrukt zeigte keine Invasion, was durch die oben beschriebene Punktmutation erklärbar ist. Denn diese bewirkt die Produktion eines verkürzten Proteins, dem der Membran-Anker fehlt und welches so nicht mehr oberflächenassoziiert ist. Die Wechselwirkung zwischen dem Rezeptor E-Cadherin und dem Internalin auf der Bakterienoberfläche kann nach Stand der Forschung nicht mehr stattfinden. Sogenannte „nonsense mutations“ wie in dem Stamm *L. monocytogenes* LO28 führen zu herabgesetzter Invasion in Zellkulturen, da das Protein vollständig in den Kulturüberstand abgegeben wird und nicht mehr mit dem Rezeptor interagiert (Jonquieres *et al.*, 1998). Die InlA-abhängige Invasion in Caco-2 sollte durch dieses Ergebnis daher nicht angezweifelt werden. Ein synergistischer Effekt durch InlA und InlB kann weiterhin angenommen werden.

HeLa-Zellen wurden sehr stark durch die *inlB*-Komplementante invadiert. Dabei betrug die Invasion mehr als das 13fache der Invasion des Wildtyps. Das *inlB*_{[*P*_{inlA}]-Konstrukt war schwächer invasiv, übertraf jedoch die Invasion des Wildtyps um mehr als das 5fache. Das *inlAB*-Konstrukt war zwar mit ca. 170 % deutlich invasiver als der Wildtyp, aber auch deutlich schwächer als die beiden InlB-produzierenden Komplementanten. Analog zu der hohen Expression von InlB, die in den Blots beobachtet wurde und durch einen als starker Promotor für *inlB* agierender *actA*-Promotor gedeutet werden kann, signalisieren die Invasionsdaten ein ähnliches Bild. Der *actA*-Promotor verhilft der *inlB*-Komplementante möglicherweise zu einer starken Expression und zu einer hohen Invasion in eukaryontische Zellkulturen, für die ein InlB-abhängiger Invasionsmechanismus bekannt ist. Die gleichzeitige Anwesenheit des PrfA-abhängigen Promotors des *inlAB*-Operons in der *inlB*_{[*P*_{inlA}]-Komplementante führt zu einer geringeren Invasion. Möglich erscheint, daß in dieser Komplementanten der positive Regulationsfaktor PrfA aufgrund seiner durch die Abweichungen von der Palindromsequenz begründeten höheren Affinität stärker an den *actA*-Promotor bindet, dem aber im Gegensatz zur *inlB*-Komplementante nicht der Genabschnitt in Leserichtung folgt. Wie auch vorher beobachtet, liegt bei diesem InlB-abhängigen Eintritt in eukaryontische Zellen kein synergistischer Effekt von InlA und InlB vor, da das *inlAB*-Konstrukt geringere Invasionsraten erreicht als die Komplementanten, die nur über *inlB* verfügen.}}

PrfA führt bei diesen Komplementanten nur in Verbindung mit dem InlB-abhängigen Eintritt in HeLa-Zellen zu einer Invasion, die deutlich über der des Wildtyps liegt. Insbesondere die Invasion in HeLa-Zellen läßt vermuten, daß die Deletionsmutante Δ *vgc2* mit den Genen des *inlAB*-Operons und *prfA* auch ohne die anderen Virulenzgene signifikant Zellkulturen invadieren kann. Der Vergleich mit einer Komplementation von *L. innocua* mit den rekombinanten Plasmiden des Vektors pLiga164 gibt Aufschluß darüber, daß der genetische Hintergrund von *L. monocytogenes* ohne die Virulenzgene entscheidend zum

Invasionsmechanismus beiträgt.

4.5 Die bekannten Virulenzgene tragen nicht alleine zum Invasionsmechanismus bei

Durch die Komplementation von *L. innocua* mit pLiga164 und dessen Derivaten (Kap. 3.5.1), mit denen zuvor schon die $\Delta vgc2$ -Deletionsmutante komplementiert worden war, stehen Stämme zur Verfügung, mit denen ein Vergleich der Invasivität zwischen beiden Komplementationen gezogen werden kann. Eine unterschiedliche Invasivität der beiden Komplementationen bedeutet, daß ein Faktor oder mehrere Faktoren außerhalb der bekannten Virulenzgene die Invasion von *L. monocytogenes* beeinflussen, da beiden Stämmen die bekannten Virulenzgene fehlen.

Die Immunblots (Kap. 3.5.3) für InIA zeigten zwar einen stärkeren Nachweis des Proteins im Zellwandextrakt als im Kulturüberstand und entsprechen dahingehend nicht der Erwartung, daß InIA stärker im Kulturüberstand detektiert werden kann (Lingnau *et al.*, 1995; Dramsi *et al.*, 1993). Dieser Effekt kann jedoch durch unterschiedliche Entwicklungszeiten entstehen. Die Reaktion des Blots für den Kulturüberstand wurden aufgrund des Entstehens von unspezifischem Hintergrund früher gestoppt, um die spezifischen Nachweise besser erkennen zu können. Nachgewiesen wurde das Protein sowohl im Kulturüberstand als auch im Zellwandextrakt sehr deutlich und mit bereits diskutierten vermeintlichen Abbaubanden in der *inIA*- und *inIAB*-Komplementante, während es im Wildtyp zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung noch nicht zu sehen war. Daher kann festgestellt werden, daß die Expression durch die *inIA*- und *inIAB*-Komplementante die Expression durch den Wildtyp übertrifft. Recht deutlich ist im Blot des Zellwandextraktes zu sehen, daß die Bande der *inIA*-Komplementante tiefer lief als die der *inIAB*-Komplementanten. Diese zur Komplementation der $\Delta vgc2$ -Deletionsmutanten analoge Beobachtung eines verkürzten Proteins aufgrund einer Punktmutation in der *inIA*-Komplementante wurde dort entsprechend diskutiert (Kapitel 4.4). Das Protein InIB konnte im Kulturüberstand etwa gleich stark in der *inIB*- und *inIB*_[*P**inIA*]-Komplementante nachgewiesen werden. Im Wildtyp war es nicht zu detektieren, in der *inIAB*-Komplementante nur schwach. Die schon diskutierten InIB-Abbaubanden von ca. 28 kDa wurden auch hier in der *inIAB*-Komplementante detektiert. Der Blot für den Zellwandextrakt zeigte diese sich als zunächst eine Abbaubande darstellenden Banden sehr deutlich, das native Protein aber relativ schwach in der *inIB*_[*P**inIA*]- und *inIAB*-Komplementante. Die erwartete Bande in der *inIB*-Komplementante fehlte aufgrund eines technischen Problems bei der Blotherstellung. Das Protein konnte in einem hier nicht gezeigten Blot nachgewiesen werden. Die wesentlichen Merkmale der Immunblots für InIB aus den komplementierten $\Delta vgc2$ -Deletionsmutanten finden sich auch hier: eine starke Produktion des Proteins InIB, die auch unabhängig vom PrfA-abhängigen Promotor des *inIAB*-Operons in der *inIB*-Komplementante stattfindet, und eine spezifische Degradation, die zu 28 kDa-Banden führt.

Auch in *L. innocua* sind die Komplementanten in der Lage, Genabschnitte des *inIAB*-Operons stärker zu exprimieren als der Wildtyp und erfüllen damit eine Voraussetzung für eine signifikante Invasion in Zellkulturen.

Für das Prüfen der Invasivität der Komplementanten und den Vergleich mit den komplementierten $\Delta vgc2$ -Deletionsmutanten wurden die schon vorher verwendeten Zelllinien

Caco-2 und HeLa kultiviert. Der Eintritt in Caco-2 ist InlA-abhängig und wird durch die Produktion von InlA und InlB zusammen verstärkt. In HeLa-Zellen ist der Eintritt InlB-abhängig. Ein synergistischer Effekt liegt nicht vor.

Die Ergebnisse der Infektionsversuche (Kap. 3.5.4) mit Caco-2 deuten zwar nur auf den vorher diskutierten synergistischen Effekt von InlA und InlB hin, der weit unter dem des Wildtyps bleibt. Die fehlende Invasion des *inlA*-Konstruktes ist jedoch erwartet, da der Genabschnitt *inlA* eine inzwischen bekannte und bereits diskutierte Punktmutation aufweist, die zur Expression eines verkürzten Proteins führt. An den vorher gemachten Aussagen zum Eintrittsmechanismus in Caco-2 muß daher nicht gezweifelt werden. Da das *inlAB*-Konstrukt eine im Vergleich zum Wildtyp *L. monocytogenes* EGD schwache Invasion zeigt und das gleiche Konstrukt in der $\Delta vgc2$ -Deletionsmutante Invasionswerte erreicht, die dem Wildtyp fast entsprechen, scheint dem Stamm *L. innocua* mindestens ein wesentlicher Faktor gegenüber $\Delta vgc2$ zu fehlen. Dieser Faktor ist nicht PrfA oder die beiden Internaline, da ja beide Stämme mit den entsprechenden Genen komplementiert sind. Der Faktor scheint auch nicht aus der Menge der übrigen bekannten Pathogenitätsfaktoren von *L. monocytogenes* EGD zu stammen, da diese auch der $\Delta vgc2$ -Deletionsmutante fehlen.

Auch in den HeLa-Zellen liegt derselbe Trend vor wie bei den komplementierten $\Delta vgc2$ -Deletionsmutanten: Das *inlB*-Konstrukt zeigte die stärkste Invasion und war mehr als 8mal so invasiv wie der Wildtyp *L. monocytogenes* EGD. Die *inlB*_{[*P*_{*inlA*}]-Komplementante war halb so invasiv wie die *inlB*-Komplementante, doch damit immer noch deutlich stärker als der Wildtyp. Das *inlAB*-Konstrukt reichte nicht an *L. monocytogenes* EGD heran. Die Invasionsdaten sprechen für den bei HeLa-Zellen typischen InlB-abhängigen Invasionsmechanismus. Wie bei den komplementierten $\Delta vgc2$ -Deletionsmutanten beobachtet und diskutiert, scheint auch in diesem Fall der *actA*-Promotor die Expression und die Invasion der *inlB*-Komplementante zu steigern. Im *inlB*_{[*P*_{*inlA*}]- und *inlAB*-Konstrukt mindert die Palindromsequenz-abhängige stärkere Affinität des PrfA zum *actA*-Promotor die positive Regulation durch den PrfA-abhängigen Promotor des *inlAB*-Operons und läßt die Invasion niedriger ausfallen. Die Invasionsdaten für die komplementierten *L. innocua*-Stämme liegen wie bei den Caco-2-Zellen unter denen der komplementierten $\Delta vgc2$ -Deletionsmutanten. Das wird bei den HeLa-Zellen allerdings nicht so deutlich, da die Invasionszahlen der *inlB*- und der *inlB*_{[*P*_{*inlA*}]-Komplementante immer noch sehr hoch liegen (ein vielfaches des Wildtyps) und relativ nicht so stark abfallen wie die der *inlAB*-Komplementante in Caco-2.}}}

Die Invasionsassays mit diesen *L. innocua*-Komplementanten deuten darauf hin, daß die bekannten Virulenzgene nicht der einzige für den Invasionsmechanismus wichtige Unterschied zu *L. monocytogenes* sein können. Ansonsten müßten die Invasionszahlen der beiden Komplementationen zumindest enger zusammen liegen. Es bedarf also weiterer Untersuchungen, ob *L. innocua* evtl. ein weiteres wichtiges Virulenzgen fehlt, oder ob die Präsentation der Internaline auf der Bakterienoberfläche z.B. aufgrund von störenden Oberflächenmolekülen zu der Umgebung nicht effizient genug ist.

4.6 Gereinigtes InlB bindet an Listerien und induziert die Internalisation von nicht-invasiven Bakterien

Es wurde gezeigt, daß die Inkubation einer Deletionsmutante, der *inlB* fehlt, mit dem Kulturüberstand von *L. monocytogenes*-Stämmen dieser Mutante Invasivität durch das Binden des InlB an die Bakterienoberfläche verleiht (Braun *et al.*, 1997). Darüber hinaus ist durch *E. coli* produziertes rekombinantes und gereinigtes InlB in der Lage, die Invasion der genannten Deletionsmutante und eines nicht-invasiven *L. innocua*-Stammes zu induzieren (Braun *et al.*, 1998).

In dieser Arbeit diente die Vorinkubation von verschiedenen Listerien-Stämmen mit gereinigtem InlB und anschließende Infektionsassays zur Überprüfung der biologischen Aktivität des Proteins (Kap. 3.6). Daß die Vorinkubation der Listerien zu einer Assoziation des Proteins mit der Zellwand führt, hat S. Müller anhand von Coomassie-gefärbten SDS-Extrakten der Deletionsmutante $\Delta inlB2$ mit einem spezifischen Antikörper gezeigt (Müller *et al.*, 1998). In den vorgestellten Infektionsversuchen mit vor- und nicht-vorinkubierten Bakterien ist InlB in der Lage, die Invasivität in Zelllinien, für deren Invasion Listerien InlB benötigen, zu steigern, bzw. Invasivität zu verleihen.

Die Vorinkubation von *L. monocytogenes* EGD erhöht die Invasion in VERO-Zellen nicht. Dagegen steigt die ansonsten sehr geringe Invasion von *L. innocua* um das 300fache. Bei $\Delta inlB2$ steigt die Invasion um das 15fache und erreicht mehr als ein Drittel der Invasionsstärke des Wildtyps. In HeLa-Zellen wird die Invasion stärker erhöht. Hier findet sich auch eine gesteigerte Invasion von *L. monocytogenes* EGD um das 6fache, und die Invasion der Deletionsmutante übertrifft die von *L. monocytogenes* EGD.

Die Methode der Reinigung von InlB von S. Müller ergibt ein hoch aktives Protein, wie durch die Vorinkubation von verschiedenen Listerien-Stämmen und die anschließenden Invasionsassays belegt wird. Das Binden des Proteins an die Oberfläche von nicht-invasiven Bakterien verleiht diesen Invasivität. Dabei kommt es anscheinend zu einer Interaktion des Proteins mit einem Zellwandmolekül des Bakteriums, das sowohl bei *L. monocytogenes* EGD und *L. innocua* vorhanden ist. Verglichen mit den Invasionsraten von nicht-invasiven Listerien, die mit rekombinantem InlB aus *E. coli* vorinkubiert wurden (Braun *et al.*, 1998), scheint das gereinigte Protein von *L. monocytogenes* EGD aktiver zu sein. Die Assoziation von InlB an die Bakterienoberfläche hat erwartungsgemäß keinen Effekt auf den Eintritt in Caco-2-Zellen (Daten nicht vorgestellt). Dieses Ergebnis stimmt mit der Auffassung überein, daß diese Zelllinie einen anderen Invasionsmechanismus, einen InlA-abhängigen Mechanismus repräsentiert.

Für die Assoziation von gereinigtem InlB an die Bakterienoberfläche sind die letzten 232 Aminosäuren des Proteins verantwortlich (Braun *et al.*, 1997). In dieser Sequenz finden sich Wiederholungssequenzen von 80 Aminosäuren, die mit dem Motiv GW beginnen. Eine ähnliche Assoziation eines Zellwandproteins durch die C-terminale Region an die Bakterienoberfläche wurde auch für Streptokokken nachgewiesen (Diaz *et al.*, 1989; Baba & Schneewind, 1996).

Dieser Versuchsansatz mit der Reinigung des Proteins, der Assoziation und der Überprüfung der biologischen Aktivität im Invasionsassay ermöglicht es, andere Proteine aus der

Internalin-Familie auf ihre Assoziations- und Invasionsfähigkeit zu testen. Ferner könnten auch primäre Zellkulturen in die Untersuchungen aufgenommen werden. Diese Methoden können auch nützlich sein, um den eukaryontischen Rezeptor von InlB zu finden, da dieses gereinigte Protein offensichtlich in der Lage ist, an den Rezeptor der Wirtszelle zu binden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

Der Krankheitserreger *L. monocytogenes* ist ein v.a. für Feten und immunsupprimierte Personen gefährliches Bakterium. Eine recht unspezifische Klinik und die Vermehrung des Keimes in Lebensmitteln unter anspruchslosen Bedingungen machen die durch *L. monocytogenes* ausgelöste Listeriose zu einer ernstzunehmenden Krankheit mit zahlreichen Manifestationsformen. Besonderes Interesse erlangt dieses Bakterium in zahlreichen Untersuchungen auch deswegen, weil es in der Lage ist, verschiedene Gewebe bzw. Barrieren des Körpers zu überwinden. Sowohl die Darmbarriere als auch die Blut-Hirn- und Plazentaschranke können überwunden werden, was u.a. zu den vielfältigen Manifestationsformen der Erkrankung führt. Die Erforschung der Invasionsstrategien von *L. monocytogenes* wird durch die Möglichkeiten von Infektionsmodellen (Maus, Zellkultur) und genetischen Veränderung der Bakterien (Transposon-Mutanten, Transformation mit Plasmid-DNA, Komplementation von Deletionsmutanten) unterstützt.

In dieser Arbeit wurde zunächst das offene Leseraster ORFA und das *inlAB*-Operon von *L. monocytogenes* EGD 1/2a sequenziert und mit der bekannten Sequenz von *L. monocytogenes* EGD-SmR (Gaillard *et al.*, 1991) verglichen. Die Genprodukte des *inlAB*-Operons sind entscheidend am Invasionsmechanismus in eukaryontische Zellen beteiligt. Der Vergleich ergab eine sehr hohe Homologie und damit nahezu identische Nukleotidsequenzen. Somit konnte davon ausgegangen werden, daß der in dieser Arbeit verwendete Stamm EGD sehr ähnliche Voraussetzungen für die Invasion hat wie der in der Literatur beschriebene LO28. Die Auswirkung der genetischen Unterschiede und damit der Unterschiede in der Aminosäuresequenz auf die räumliche Struktur der Proteine muß mit Verfahren wie der Röntgen-Strukturanalyse weiter abgeklärt werden.

Die Komplementation der Δ *inlAB2*-Deletionsmutanten mit verschiedenen rekombinanten Plasmiden des Vektors pERL-3 und die Überprüfung der Stämme in Invasionsassays ergab unterschiedliche Abhängigkeiten von den Proteinen InlA und InlB je nach Zelllinie. Diese Ergebnisse stützen daher den von Dramsi geprägten Begriff des „Zelltropismus“, mit dem die unterschiedlichen Abhängigkeiten beschrieben werden (Dramsi *et al.*, 1995). Das Bakterium verfügt durch die Internaline und deren unterschiedliche Effekte in verschiedenen Zelllinien über eine große Variabilität, die als Ausdruck der Variabilität *in vivo* gesehen werden kann.

Die Komplementation von *L. innocua* mit verschiedenen rekombinanten Plasmiden des Vektors pERL-3 und die durchgeführten Invasionsassays zeigten, daß der an sich nicht-invasive Stamm mit dieser Technik der genetischen Veränderung invasiv gemacht werden kann, wenn auch die Invasionsraten erheblich unter denen der Δ *inlAB2*-Komplementante lagen. Der Zelltropismus zeigte sich auch in diesen Untersuchungen, war aber nicht identisch mit den Ergebnissen der Δ *inlAB2*-Komplementanten.

Durch die Komplementation der Deletionsmutante Δ *vgc2* mit rekombinanten Plasmiden des Vektors pLiga164 konnte die Rolle des Regulationsfaktors PrfA näher beleuchtet werden. PrfA ist in der Lage, auch über die Aktivierung des *actA*-Promotors die Expression von InlB

und damit die Invasion gegenüber dem Wildtyp *L. monocytogenes* zu steigern. Da der Deletionsmutante $\Delta vgc2$ alle bekannten Virulenzgene fehlen, bedeutete die starke Invasion nach Komplementation mit dem die Gene *prfA*, *inlA* und/oder *inlB* tragenden Vektor, daß die anderen Virulenzgene für den Invasionsprozeß dieser Mutante nicht von Bedeutung sein müssen.

Die Komplementation von *L. innocua* mit den verschiedenen Derivaten des Vektors pLigal164 ergab im Invasionsassay niedrigere Invasionszahlen als die Komplementation von $\Delta vgc2$. Da auch $\Delta vgc2$ wie *L. innocua* die bekannten Virulenzgene fehlen, muß ein oder müssen mehrere noch unbekannte Faktoren in *L. monocytogenes* zur effizienteren Invasion beitragen.

In dieser Arbeit konnte ferner gezeigt werden, daß das von S. Müller gereinigte Protein InlB biologisch aktiv ist. Dazu wurden verschiedene Listerien-Stämme mit dem Protein vorinkubiert, woraufhin das Protein an die Bakterien binden und Invasivität wiederherstellen oder steigern konnte.

5.2 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, daß die Internaline A und B und die weiteren bekannten Virulenzgene von *L. monocytogenes* EGD nicht allein für den Invasionsprozeß in eukaryontische Zelllinien entscheidend sein können. Schwächere Invasionsraten von komplementierten *L. innocua*-Stämmen gegenüber komplementierten Deletionsmutanten aus *L. monocytogenes* EGD – v.a. die Unterschiede zwischen $\Delta vgc2$ -Komplementanten und *L. innocua* – werfen die Frage nach weiteren am Invasionsprozeß beteiligten, bakteriellen Faktoren auf. Diese Faktoren könnten den Transport des Proteins an die Oberfläche des Bakteriums betreffen. Für diesen Punkt spricht, daß Internalin A und B nicht natürlicherweise in *L. innocua* vorkommen und daher bei niedrigeren Invasionsraten der entsprechende Transportmechanismus oder die korrekte Regulation des Transports in dieser Spezies nur schwach arbeiten könnte. Möglich erscheint auch, daß die Proteinstrukturen auf der Oberfläche von *L. innocua* nicht der natürlichen Anordnung bei *L. monocytogenes* EGD entsprechen und so die Wechselwirkung mit dem Rezeptor der Wirtszelle beeinträchtigt ist. Die Proteinmenge scheint aufgrund der Immunblots keine Rolle für die unterschiedlichen Invasionsdaten zu spielen. Bei der Suche nach weiteren Faktoren sollten nicht nur Virulenzgene in Betracht gezogen werden, sondern auch Faktoren, die für sich allein keinen Virulenzfaktor darstellen und erst im Zusammenspiel mit den bekannten Virulenzgenen wichtig werden.

Der in dieser Arbeit untersuchte Tropismus mit unterschiedlichen Invasionsdaten für unterschiedliche Zelltypen kann in der unterschiedlichen Quantität der Rezeptoren für InlA und B auf den eukaryontischen Zellen begründet sein.

Mit der beginnenden Aufklärung von Signaltransduktionsvorgängen oder der Darstellung der räumlichen Struktur der Internaline müssen weitere Einflüsse auf den Invasionsprozeß erforscht werden, um diesen komplexen Vorgang zu verstehen. Die Suche nach dem Rezeptor von InlB steht zur Zeit im Mittelpunkt des Interesses.

6 Literaturverzeichnis

- Alford, C.E., E. Amaral, and P.A. Campbell.** 1990. Listericidal activity of human neutrophil cathepsin G. *J Gen Microbiol* 136 (Pt 6):997-100.
- Alvarez-Dominguez, C., E. Carrasco-Marin, and F. Leyva-Cobian.** 1993. Role of complement component C1q in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophage-like cell lines. *Infect Immun* 61:3664-3672.
- Alvarez-Dominguez, C., J.A. Vazquez-Boland, E. Carrasco-Marin, P. Lopez-Mato, and F. Leyva-Cobian.** 1997. Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the listerial surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. *Infect Immun* 65:78-88.
- Azadian, B.S., G.T. Finnerty, and A.D. Pearson.** 1989. Cheese-borne listeria meningitis in immunocompetent patient. *Lancet* 1:322-323.
- Baba, T. and O. Schneewind.** 1996. Target cell specificity of a bacteriocin molecule: a C-terminal signal directs lysostaphin to the cell wall of *Staphylococcus aureus*. *EMBO J* 15:4789-4797.
- Bancroft, G.J., M.J. Bosma, G.C. Bosma, and E.R. Unanue.** 1986. Regulation of macrophage Ia expression in mice with severe combined immunodeficiency: induction of Ia expression by a T cell-independent mechanism. *J Immunol* 137:4-9.
- Beckerman, K.P., H.W. Rogers, J.A. Corbett, R.D. Schreiber, M.L. McDaniel, and E.R. Unanue.** 1993. Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 150:888-895.
- Bevilacqua, M.P., J.S. Pober, M.E. Wheeler, R.S. Cotran, and M.A.J. Gimbrone.** 1985. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 76:2003-2011.
- Bielecki, J., P. Youngman, P. Connelly, and D.A. Portnoy.** 1990. *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 345:175-176.
- Bille, J.** 1990. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. In Foodborne listeriosis. Society for Industrial Microbiology. A.J. Miller, J.L. Smith, and G.A. Somkuti, editors. Elsevier Science Publishing, Inc., New York. 71-74.
- Boisivon, A., C. Guiomar, and C. Carbon.** 1990. In vitro bactericidal activity of amoxicillin, gentamicin, rifampicin, ciprofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole alone or in combination against *Listeria monocytogenes*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 9:206-209.

- Boucher, M. and M.L. Yonekura.** 1984. Listeria meningitis during pregnancy. *Am J Perinatol* 1:312-318.
- Braun, L., S. Dramsi, P. Dehoux, H. Bierne, G. Lindahl, and P. Cossart.** 1997. InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Mol Microbiol* 25:285-294.
- Braun, L., H. Ohayon, and P. Cossart.** 1998. The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. *Mol Microbiol* 27:1077-1087.
- Brunt, L.M., D.A. Portnoy, and E.R. Unanue.** 1990. Presentation of *Listeria monocytogenes* to CD8+ T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth. *J Immunol* 145:3540-3546.
- Buchanan, R.L. and J.G. Phillips.** 1990. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 53:370-376.
- Buchdahl, R., M. Hird, H. Gamsu, A. Tapp, D. Gibb, and C. Tzannatos.** 1990. Listeriosis revisited: the role of the obstetrician. *Br J Obstet Gynaecol* 97:186-189.
- Chakraborty, T., M. Leimeister-Wachter, E. Domann, M. Hartl, W. Goebel, T. Nichterlein, and S. Notermans.** 1992. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J Bacteriol* 174:568-574.
- Chakraborty, T., F. Ebel, E. Domann, K. Niebuhr, B. Gerstel, S. Pistor, C.J. Temm-Grove, B.M. Jockusch, M. Reinhard, and U. Walter.** 1995. A focal adhesion factor directly linking intracellularly motile *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* to the actin-based cytoskeleton of mammalian cells. *EMBO J* 14:1314-1321.
- Chakraborty, T. and J. Wehland.** 1997. The Host Cell Infected With *Listeria monocytogenes*. In *Host Response to Intracellular Pathogens*. S.H.E. Kaufmann, editor. R.G.Landes Company, 271-290.
- Cruikshank, D.P. and J.C. Warenski.** 1989. First-trimester maternal *Listeria monocytogenes* sepsis and chorioamnionitis with normal neonatal outcome. *Obstet Gynecol* 73:469-471.
- Czuprynski, C.J., P.M. Henson, and P.A. Campbell.** 1984. Killing of *Listeria monocytogenes* by inflammatory neutrophils and mononuclear phagocytes from immune and nonimmune mice. *J Leukoc Biol* 35:193-208.
- Dabiri, G.A., J.M. Sanger, D.A. Portnoy, and F.S. Southwick.** 1990. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6068-6072.
- Dalrymple, S.A., L.A. Lucian, R. Slattery, T. McNeil, D.M. Aud, S. Fuchino, F. Lee, and R. Murray.** 1995. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. *Infect Immun* 63:2262-2268.

- Darji, A., T. Chakraborty, J. Wehland, and S. Weiss.** 1995. Listeriolysin generates a route for the presentation of exogenous antigens by major histocompatibility complex class I. *Eur J Immunol* 25:2967-2971.
- Diaz, E., E. Garcia, C. Ascaso, E. Mendez, R. Lopez, and J.L. Garcia.** 1989. Subcellular localization of the major pneumococcal autolysin: a peculiar mechanism of secretion in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 264:1238-1244.
- Dinarello, C.A.** 1992. The biology of interleukin-1. In *Interleukins: Molecular Biology and Immunology*. T. Kishimoto, editor. Karger, Basel. 1-32.
- Dold, F.G., J.M. Sanger, and J.W. Sanger.** 1994. Intact alpha-actinin molecules are needed for both the assembly of actin into the tails and the locomotion of *Listeria monocytogenes* inside infected cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 28:97-107.
- Domann, E., M. Leimeister-Wachter, W. Goebel, and T. Chakraborty.** 1991. Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. *Infect Immun* 59:65-72.
- Domann, E., J. Wehland, M. Rohde, S. Pistor, M. Hartl, W. Goebel, M. Leimeister-Wachter, M. Wuenscher, and T. Chakraborty.** 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *EMBO J* 11:1981-1990.
- Domann, E., J. Wehland, K. Niebuhr, C. Haffner, M. Leimeister-Wachter, and T. Chakraborty.** 1993. Detection of a *prfA*-independent promoter responsible for listeriolysin gene expression in mutant *Listeria monocytogenes* strains lacking the PrfA regulator. *Infect Immun* 61:3073-3075.
- Domann, E.** 1997a. Infektionskrankheiten heute. *Deutsche Apotheker Zeitung* 40:80-84.
- Domann, E., S. Zechel, A. Lingnau, T. Hain, A. Darji, T. Nichterlein, J. Wehland, and T. Chakraborty.** 1997b. Identification and characterization of a novel PrfA-regulated gene in *Listeria monocytogenes* whose product, IrpA, is highly homologous to internalin proteins, which contain leucine-rich repeats. *Infect Immun* 65:101-109.
- Domann, E.** 1998. Pathogenitätsfaktoren bakterieller Krankheitserreger. *Dtsch Med Wochenschr* 123:229-236.
- Donker-Voet, J.** 1972. Proceedings: *Listeria monocytogenes*: some biochemical and serological aspects. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 19:287-291.
- Dramsi, S., C. Kocks, C. Forestier, and P. Cossart.** 1993. Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator *prfA*. *Mol Microbiol* 9:931-941.
- Dramsi, S., I. Biswas, E. Maguin, L. Braun, P. Mastroeni, and P. Cossart.** 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of *inIB*, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* 16:251-261.

- Dramsi, S., P. Dehoux, M. Lebrun, P.L. Goossens, and P. Cossart.** 1997. Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infect Immun* 65:1615-1625.
- Dunne, D.W., D. Resnick, J. Greenberg, M. Krieger, and K.A. Joiner.** 1994. The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1863-1867.
- Engelbrecht, F., G. Dominguez-Bernal, J. Hess, C. Dickneite, L. Greiffenberg, R. Lampidis, D. Raffelsbauer, J.J. Daniels, J. Kreft, S.H. Kaufmann, J.A. Vazquez-Boland, and W. Goebel.** 1998. A novel PrfA-regulated chromosomal locus, which is specific for *Listeria ivanovii*, encodes two small, secreted internalins and contributes to virulence in mice. *Mol Microbiol* 30:405-417.
- Farber, J.M. and P.I. Peterkin.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 55:476-511.
- Finlay, B.B. and S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:136-169.
- Finlay, B.B. and P. Cossart.** 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276:718-725.
- Freitag, N.E., P. Youngman, and D.A. Portnoy.** 1992. Transcriptional activation of the *Listeria monocytogenes* hemolysin gene in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 174:1293-1298.
- Freitag, N.E., L. Rong, and D.A. Portnoy.** 1993. Regulation of the prfA transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect Immun* 61:2537-2544.
- Freitag, N.E. and D.A. Portnoy.** 1994. Dual promoters of the *Listeria monocytogenes* prfA transcriptional activator appear essential in vitro but are redundant in vivo. *Mol Microbiol* 12:845-853.
- Gaillard, J.L., P. Berche, and P. Sansonetti.** 1986. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 52:50-55.
- Gaillard, J.L., P. Berche, J. Mounier, S. Richard, and P. Sansonetti.** 1987. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun* 55:2822-2829.
- Gaillard, J.L., P. Berche, C. Frehel, E. Gouin, and P. Cossart.** 1991. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65:1127-1141.
- Gaillard, J.L., F. Jaubert, and P. Berche.** 1996. The inlAB locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes in vivo. *J Exp Med* 183:359-369.
- Gellin, B.G. and C.V. Broome.** 1989. Listeriosis. *JAMA* 261:1313-1320.

- Gellin, B.G., C.V. Broome, W.F. Bibb, R.E. Weaver, S. Gaventa, and L. Mascola.** 1991. The epidemiology of listeriosis in the United States--1986. Listeriosis Study Group. *Am J Epidemiol* 133:392-401.
- Geoffroy, C., J.L. Gaillard, J.E. Alouf, and P. Berche.** 1987. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl- activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 55:1641-1646.
- Goldfine, H., C. Knob, D. Alford, and J. Bentz.** 1997. Membrane permeabilization by *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C is independent of phospholipid hydrolysis and cooperative with listeriolysin O. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:2772
- Gregory, S.H., A.J. Sagnimeni, and E.J. Wing.** 1996. Expression of the *inlAB* operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry into hepatic cells in vivo. *Infect Immun* 64:3983-3986.
- Grenningloh, R., A. Darji, J. Wehland, T. Chakraborty, and S. Weiss.** 1997. Listeriolysin and *IrpA* are major protein targets of the human humoral response against *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 65:3976-3980.
- Guzman, C.A., E. Domann, M. Rohde, D. Bruder, A. Darji, S. Weiss, J. Wehland, T. Chakraborty, and K.N. Timmis.** 1996. Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 20:119-126.
- Hain, T.** 1998. Zellbiologische und molekulargenetische Analyse des Internalin vermittelten Invasionsmechanismus von *Listeria monocytogenes*. Medizinische Mikrobiologie, Justus-Liebig Universität Gießen.
- Hanahan, D., J. Jessee, and F.R. Bloom.** 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 204:63-113.
- Hermiston, M.L. and J.I. Gordon.** 1995. In vivo analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 129:489-506.
- Hess, J., I. Gentshev, G. Szalay, C. Ladel, A. Bubert, W. Goebel, and S.H. Kaufmann.** 1995. *Listeria monocytogenes* p60 supports host cell invasion by and in vivo survival of attenuated *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* 63:2047-2053.
- Hof, H., T. Nichterlein, and M. Kretschmar.** 1997. Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 10:345-357.
- Hsieh, C.S., S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra, and K.M. Murphy.** 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* 260:547-549.
- Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.

- Ireton, K., B. Payraastre, H. Chap, W. Ogawa, H. Sakaue, M. Kasuga, and P. Cossart.** 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* 274:780-782.
- Jones, D. and H.P.R. Seeliger.** 1987. International Committee on Systematic Bacteriology - Subcommittee on the Taxonomy of *Listeria*, *Brochothrix*, and *Erysipelothrix*. Minutes of the meeting, September 7-8, 1986, Manchester. *Int J Syst Bacteriol* 37:176
- Jonquieres, R., H. Bierne, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1998. The *inlA* gene of *Listeria monocytogenes* LO28 harbors a nonsense mutation resulting in release of internalin. *Infect Immun* 66:3420-3422.
- Junttila, J.R., S.I. Niemela, and J. Hirn.** 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non- haemolytic *Listeria*. *J Appl Bacteriol* 65:321-327.
- Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel.** 1994. CD8+ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur J Immunol* 24:3068-3072.
- Kobe, B. and J. Deisenhofer.** 1994. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* 19:415-421.
- Kobe, B. and J. Deisenhofer.** 1995. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr Opin Struct Biol* 5:409-416.
- Kocks, C., E. Gouin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon, and P. Cossart.** 1992. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* 68:521-531.
- Kocks, C. and P. Cossart.** 1993. Directional actin assembly by *Listeria monocytogenes* at the site of polar surface expression of the *actA* gene product involving the actin-bundling protein plastin (fimbrin). *Infect Agents Dis* 2:207-209.
- Kuhn, M., S. Kathariou, and W. Goebel.** 1988. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 56:79-82.
- Ladel, C.H., I.E. Flesch, J. Arnoldi, and S.H. Kaufmann.** 1994. Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 153:3116-3122.
- Lampidis, R., R. Gross, Z. Sokolovic, W. Goebel, and J. Kreft.** 1994. The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcription regulators. *Mol Microbiol* 13:141-151.
- Lasa, I., V. David, E. Gouin, J.B. Marchand, and P. Cossart.** 1995. The amino-terminal part of ActA is critical for the actin-based motility of *Listeria monocytogenes*; the central proline-rich region acts as a stimulator. *Mol Microbiol* 18:425-436.
- 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.

- Leimeister-Wächter, M., C. Haffner, E. Domann, 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.
- Leimeister-Wächter, M., E. Domann, and T. Chakraborty.** 1992. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J Bacteriol* 174:947-952.
- Lingnau, A., E. Domann, 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.
- Lingnau, A., T. Chakraborty, K. Niebuhr, E. Domann, and J. Wehland.** 1996. Identification and purification of novel internalin-related proteins in *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii*. *Infect Immun* 64:1002-1006.
- Lingnau, A.** 1996. Identifizierung und Charakterisierung der Genprodukte des *inlAB* Operons von *Listeria monocytogenes* hinsichtlich ihrer Funktion als Invasionsfaktoren, sowie Entdeckung Internalin-ähnlicher Proteine in *L. monocytogenes* und *L. ivanovii*. Naturwissenschaftliche Fakultät, Technische Universität Carola-Wilhelmina, Braunschweig.
- Liu, Z., R.J. Simpson, and C. Cheers.** 1994. Role of IL-6 in activation of T cells for acquired cellular resistance to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 152:5375-5380.
- MacDonald, T.T. and P.B. Carter.** 1980. Cell-mediated immunity to intestinal infection. *Infect Immun* 28:516-523.
- Makhov, A.M., J.H. Hannah, M.J. Brennan, B.L. Trus, E. Kocsis, J.F. Conway, P.T. Wingfield, M.N. Simon, and A.C. Steven.** 1994. Filamentous hemagglutinin of *Bordetella pertussis*. A bacterial adhesin formed as a 50-nm monomeric rigid rod based on a 19-residue repeat motif rich in beta strands and turns. *J Mol Biol* 241:110-124.
- Marco, A.J., N. Prats, J.A. Ramos, V. Briones, M. Blanco, L. Dominguez, and M. Domingo.** 1992. A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. *J Comp Pathol* 107:1-9.
- McCarthy, S.A.** 1990. *Listeria* in the environment. In Foodborne listeriosis. Society for Industrial Microbiology. A.J. Miller, J.L. Smith, and G.A. Somkuti, editors. Elsevier Science Publishing, Inc., New York. 25-29.
- McLauchlin, J.** 1990. Human listeriosis in Britain, 1967-85, a summary of 722 cases. *Epidemiol Infect* 104:181-201.
- Menard, R., C. Dehio, and P.J. Sansonetti.** 1996. Bacterial entry into epithelial cells: the paradigm of *Shigella*. *Trends Microbiol* 4:220-226.
- Mengaud, J., S. Dramsi, E. Gouin, J.A. Vazquez-Boland, G. Milon, and P. Cossart.** 1991a. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factors by a gene that is autoregulated. *Mol Microbiol* 5:2273-2283.

- Mengaud, J., C. Geoffroy, and P. Cossart.** 1991b. Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect Immun* 59:1043-1049.
- Mengaud, J., H. Ohayon, P. Gounon, R.-M. Mege, and P. Cossart.** 1996a. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84:923-932.
- Mengaud, J., M. Lecuit, M. Lebrun, F. Nato, J.C. Mazie, and P. Cossart.** 1996b. Antibodies to the leucine-rich repeat region of internalin block entry of *Listeria monocytogenes* into cells expressing E-cadherin. *Infect Immun* 64:5430-5433.
- Merrick, J.C., B.T. Edelson, V. Bhardwaj, P.E. Swanson, and E.R. Unanue.** 1997. Lymphocyte apoptosis during early phase of *Listeria* infection in mice. *Am J Pathol* 151:785-792.
- Müller, S., T. Hain, P. Pashalidis, A. Lingnau, E. Domann, T. Chakraborty, and J. Wehland.** 1998. Purification of the *inlB* gene product of *Listeria monocytogenes* and demonstration of its biological activity. *Infect Immun* 66:3128-3133.
- Nieman, R.E. and B. Lorber.** 1980. Listeriosis in adults: a changing pattern. Report of eight cases and review of the literature, 1968-1978. *Rev Infect Dis* 2:207-227.
- Old, L.J.** 1985. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 230:630-632.
- Pamer, E.G., M.J. Bevan, and K.F. Lindahl.** 1993. Do nonclassical, class Ib MHC molecules present bacterial antigens to T cells? *Trends Microbiol* 1:35-38.
- Parida, S.K., E. Domann, M. Rohde, S. Muller, A. Darji, T. Hain, J. Wehland, and T. Chakraborty.** 1998. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol* 28:81-93.
- Parish, M.E. and D.P. Higgins.** 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *J Food Prot* 52:144-147.
- Park, S.F. and G.S. Stewart.** 1990. High-efficiency transformation of *Listeria monocytogenes* by electroporation of penicillin-treated cells. *Gene* 94:129-132.
- Peel, M., W. Donachie, and A. Shaw.** 1988. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J Gen Microbiol* 134 (Pt 8):2171-2178.
- Pollard, T.D.** 1995. Missing link for intracellular bacterial motility? *Current Biology* 5:837-840.
- Poyart, C., E. Abachin, I. Razafimanantsoa, and P. Berche.** 1993. The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* 61:1576-1580.
- Pron, B., C. Boumaila, F. Jaubert, S. Sarnacki, 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.

- Raffelsbauer, D., A. Bubert, F. Engelbrecht, J. Scheinpflug, A. Simm, J. Hess, S.H. Kaufmann, and W. Goebel.** 1998. The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol Gen Genet* 260:144-158.
- Redline, R.W. and C.Y. Lu.** 1987. Role of local immunosuppression in murine fetoplacental listeriosis. *J Clin Invest* 79:1234-1241.
- Reinhard, M., K. Giehl, K. Abel, C. Haffner, T. Jarchau, V. Hoppe, B.M. Jockusch, and U. Walter.** 1995. The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J* 14:1583-1589.
- Rocourt, J.** 1991. Human listeriosis - 1989. WHO/HPP/FOS/91.3. World Health Organization, Geneva.
- Rogers, H.W., C.S. Tripp, R.D. Schreiber, and E.R. Unanue.** 1994. Endogenous IL-1 is required for neutrophil recruitment and macrophage activation during murine listeriosis. *J Immunol* 153:2093-2101.
- Rogers, H.W., M.P. Callery, B. Deck, and E.R. Unanue.** 1996. *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. *J Immunol* 156:679-684.
- Schlech, W.F., P.M. Lavigne, R.A. Bortolussi, A.C. Allen, E.V. Haldane, A.J. Wort, A.W. Hightower, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Nicholls, and C.V. Broome.** 1983. Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. *N Engl J Med* 308:203-206.
- Schlech, W.F.** 1990. *Listeria*, animals and man: aspects of virulence. In Foodborne listeriosis. A.J. Miller, J.L. Smith, and G.A. Somkuti, editors. Elsevier, Amsterdam. 51-54.
- Schuchat, A., B. Swaminathan, and C.V. Broome.** 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 4:169-183.
- Schwartz, B., C.A. Ciesielski, C.V. Broome, S. Gaventa, G.R. Brown, B.G. Gellin, A.W. Hightower, and L. Mascola.** 1988. Association of sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. *Lancet* 2:779-782.
- Seeliger, H.P.R.** 1958. Listeriosen. Springer-Verlag KG, Berlin.
- Sheehan, B., A. Klarsfeld, T. Msadek, and P. Cossart.** 1995. Differential activation of virulence gene expression by PrfA, the *Listeria monocytogenes* virulence regulator. *J Bacteriol* 177:6469-6476.
- Shevchenko, D.V., D.R. Akins, E. Robinson, M. Li, T.G. Popova, D.L. Cox, and J.D. Radolf.** 1997. Molecular characterization and cellular localization of TpLRR, a processed leucine-rich repeat protein of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *J Bacteriol* 179:3188-3195.
- Sibeliuss, U., F. Rose, T. Chakraborty, A. Darji, J. Wehland, S. Weiss, W. Seeger, and F. Grimminger.** 1996. Listeriolysin is a potent inducer of the phosphatidylinositol response and lipid mediator generation in human endothelial cells. *Infect Immun* 64:674-676.

- Skeen, M.J. and H.K. Ziegler.** 1993. Intercellular interactions and cytokine responsiveness of peritoneal alpha/beta and gamma/delta T cells from *Listeria*-infected mice: synergistic effects of interleukin 1 and 7 on gamma/delta T cells. *J Exp Med* 178:985-996.
- Smith, A.R., B.A. Lieberman, L. Allen, and A.J. Barson.** 1983. Listeriosis and pregnancy. *Lancet* 2:1364
- Smith, G.A., H. Marquis, S. Jones, N.C. Johnston, D.A. Portnoy, and H. Goldfine.** 1995. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* 63:4231-4237.
- Smyth, C.J. and J.L. Duncan.** 1978. Thiol-activated (oxygen labile) cytolysins. In *Bacterial toxins and cell membranes*. J. Jeljaszewicz and T. Wadstrom, editors. Academic, New York. 129-183.
- Sullivan, G.W., H.T. Carper, J.A. Sullivan, T. Murata, and G.L. Mandell.** 1989. Both recombinant interleukin-1 (beta) and purified human monocyte interleukin-1 prime human neutrophils for increased oxidative activity and promote neutrophil spreading. *J Leukoc Biol* 45:389-395.
- Sun, A.N., A. Camilli, and D.A. Portnoy.** 1990. Isolation of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect Immun* 58:3770-3778.
- Takada, H., G. Matsuzaki, K. Hiromatsu, and K. Nomoto.** 1994. Analysis of the role of natural killer cells in *Listeria monocytogenes* infection: relation between natural killer cells and T-cell receptor gamma delta T cells in the host defence mechanism at the early stage of infection. *Immunology* 82:106-112.
- Tappero, J.W., A. Schuchat, K.A. Deaver, L. Mascola, and J.D. Wenger.** 1995. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? The Listeriosis Study Group. *JAMA* 273:1118-1122.
- Tauxe, R.V.** 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. *Emerg Infect Dis* 3:425-434.
- Teixeira, H.C. and S.H. Kaufmann.** 1994. Role of NK1.1+ cells in experimental listeriosis. NK1+ cells are early IFN-gamma producers but impair resistance to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 152:1873-1882.
- Temm-Grove, C.J., B.M. Jockusch, M. Rohde, K. Niebuhr, T. Chakraborty, and J. Wehland.** 1994. Exploitation of microfilament proteins by *Listeria monocytogenes*: microvillus-like composition of the comet tails and vectorial spreading in polarized epithelial sheets. *J Cell Sci* 107 (Pt 10):2951-2960.
- Theriot, J.A., J. Rosenblatt, D.A. Portnoy, P.J. Goldschmidt-Clermont, and T.J. Mitchison.** 1994. Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell* 76:505-517.
- Tilney, L.G. and D.A. Portnoy.** 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 109:1597-1608.

- Tilney, L.G. and M.S. Tilney.** 1993. The wily ways of a parasite: induction of actin assembly by *Listeria*. *Trends Microbiol* 1:25-31.
- Tripp, C.S., P. Needleman, and E.R. Unanue.** 1987. Indomethacin in vivo increases the sensitivity to *Listeria* infection in mice. A possible role for macrophage thromboxane A2 synthesis. *J Clin Invest* 79:399-403.
- Tripp, C.S., S.F. Wolf, and E.R. Unanue.** 1993. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:3725-3729.
- Tripp, C.S., M.K. Gately, J. Hakimi, P. Ling, and E.R. Unanue.** 1994. Neutralization of IL-12 decreases resistance to *Listeria* in SCID and C.B-17 mice. Reversal by IFN-gamma. *J Immunol* 152:1883-1887.
- Tripp, C.S. and E.R. Unanue.** 1995. Macrophage production of IL12 is a critical link between the innate and specific immune responses to *Listeria*. *Res Immunol* 146:515-520.
- Unanue, E.R.** 1997. Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol Rev* 158:11-25.
- Vazquez-Boland, J.A., C. Kocks, S. Dramsi, H. Ohayon, C. Geoffroy, J. Mengaud, and P. Cossart.** 1992. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. *Infect Immun* 60:219-230.
- Walker, S.J. and M.F. Stringer.** 1987. Growth of *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila* at chill temperatures. *J Appl Bacteriol* 63:R20:
- Weinberg, E.D.** 1984. Pregnancy-associated depression of cell-mediated immunity. *Rev Infect Dis* 6:814-831.
- Weis, J. and H.P.R. Seeliger.** 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl Microbiol* 30:29-32.
- Wuenschel, M.D., S. Kohler, W. Goebel, and T. Chakraborty.** 1991. Gene disruption by plasmid integration in *Listeria monocytogenes*: insertional inactivation of the listeriolysin determinant *lisA*. *Mol Gen Genet* 228:177-182.
- Wuenschel, M.D., S. Kohler, A. Bubert, U. Gerike, and W. Goebel.** 1993. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *J Bacteriol* 175:3491-3501.

7 Anhang

7.1 Zeichen und Abkürzungen

%	Prozent
&	und
°C	Grad Celsius
Δ	(Gen-)Deletion
μ	mikro (10 ⁻⁶)
A	Adenin oder Ampere
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
ActA	Aktinnukleationsfaktor
<i>actA</i>	für ActA kodierendes Gen
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-indolylphosphat-p-toluidinsalz
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C1q	Komplementfaktor
C3b	Komplementfaktor
ca.	circa
CD (4 ⁺ /8 ⁺)	cluster of differentiation, T-Lymphozyten
Crp	cAMP receptor protein
C-Terminus/C-terminal	Carboxy-terminales Ende eines Proteins
Cy	Carbocyaninfarbstoff
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat
ddH ₂ O	destilliertes Wasser

dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	beliebige 2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphate
DSM	Katalog Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
EM	Erythromycin
E.	<i>Escherichia</i>
<i>et al.</i>	und andere
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
FHA	filamentous haemagglutinin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fnr	fumarate nitrate reductase regulator
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G	Guanin
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
<i>H.</i>	<i>Helicobacter</i>
<i>hly</i>	für LLO kodierendes Gen
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
<i>inlA</i>	für InlA kodierendes Gen
InlA	Internalin A
<i>inlB</i>	für InlB kodierendes Gen
InlB	Internalin B
<i>inlC2</i>	Gen der Internalin-Multigenfamilie
<i>inlD</i>	Gen der Internalin-Multigenfamilie
<i>inlE</i>	Gen der Internalin-Multigenfamilie
<i>inlF</i>	Gen der Internalin-Multigenfamilie
IpaB	invasion plasmid antigen B
IpaC	invasion plasmid antigen C

IpaD	invasion plasmid antigen D
<i>ipaH</i>	Gen für invasion plasmid antigen H
<i>ipgC</i>	Gen für invasion plasmid antigen C
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktosid
<i>irpA</i>	für IrpA kodierendes Gen
IrpA	Internalin related protein A
k	
k	kilo (10 ³)
KAc	Kaliumacetat
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaar
l	
l	Liter
LB	Luria Bertani
<i>L.</i>	<i>Listeria</i>
LLO	Listeriolysin O
LRR	Leucinreiche Repeats/Motive
m	
m	milli (10 ⁻³) oder Meter
M	molar = mol/l
mAK	monoklonaler Antikörper
MgAc	Magnesiumacetat
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
<i>mpl</i>	für Mpl kodierendes Gen
Mpl	Metalloprotease
MQ-H ₂ O	entmineralisiertes Wasser
<i>mxi-spa</i>	Genlocus eines Typ III Sekretionssystems
Mxi-Spa	Proteine eines Typ III Sekretionssystems
M-Zellen	Zellen des lymphatischen Gewebes, die Makromoleküle und Mikroorganismen aufnehmen und weitertransportieren
n	
n	nano (10 ⁻⁹)
NaAc	Natriumacetat
NCTC	National Collection of Type Cultures, London
NK	Natürliche Killerzellen
NO·	Radikal des Stickoxids
N-Terminus/N-terminal	Amino-terminales Ende eines Proteins
OD	
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (Open Reading Frame)
p	
p	piko (10 ⁻¹²)

p.i.	post infectionem
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphate buffered Saline, Standardpuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PlcA	Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
<i>plcA</i>	für PlcA kodierendes Gen
PlcB	(weniger spezifische) Phospholipase C
<i>plcB</i>	für PlcB kodierendes Gen
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
pp60 ^{c-src}	Tyrosinkinase
<i>prfA</i>	für PrfA kodierendes Gen
PrfA	Positiver Regulationsfaktor A
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rho	GTPase
rel.	relativ(e)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.o.	siehe oben
SCID	Severe Combined Immune Deficiency
SDS	Natrium Dodecylsulfat
<i>spp.</i>	Spezies
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris/Borat/EDTA-Standardpuffer
TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
Tcp	toxin coregulated pilus
TE	Tris-EDTA(-Puffer)
TEMED	N, N, N, N-Tetramethyldiamin
Th	T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TpLRR	Leucinreiches-Repeat-Protein von <i>Treponema pallidum</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T-Zelle	T-Lymphozyt

U	Unit
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VASP	Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein
W	Watt
WHO	World Health Organization
Y.	<i>Yersinia</i>
YopM	Yersinia outer membrane protein M
z.B.	zum Beispiel

Buchstabencode für Aminosäuren:

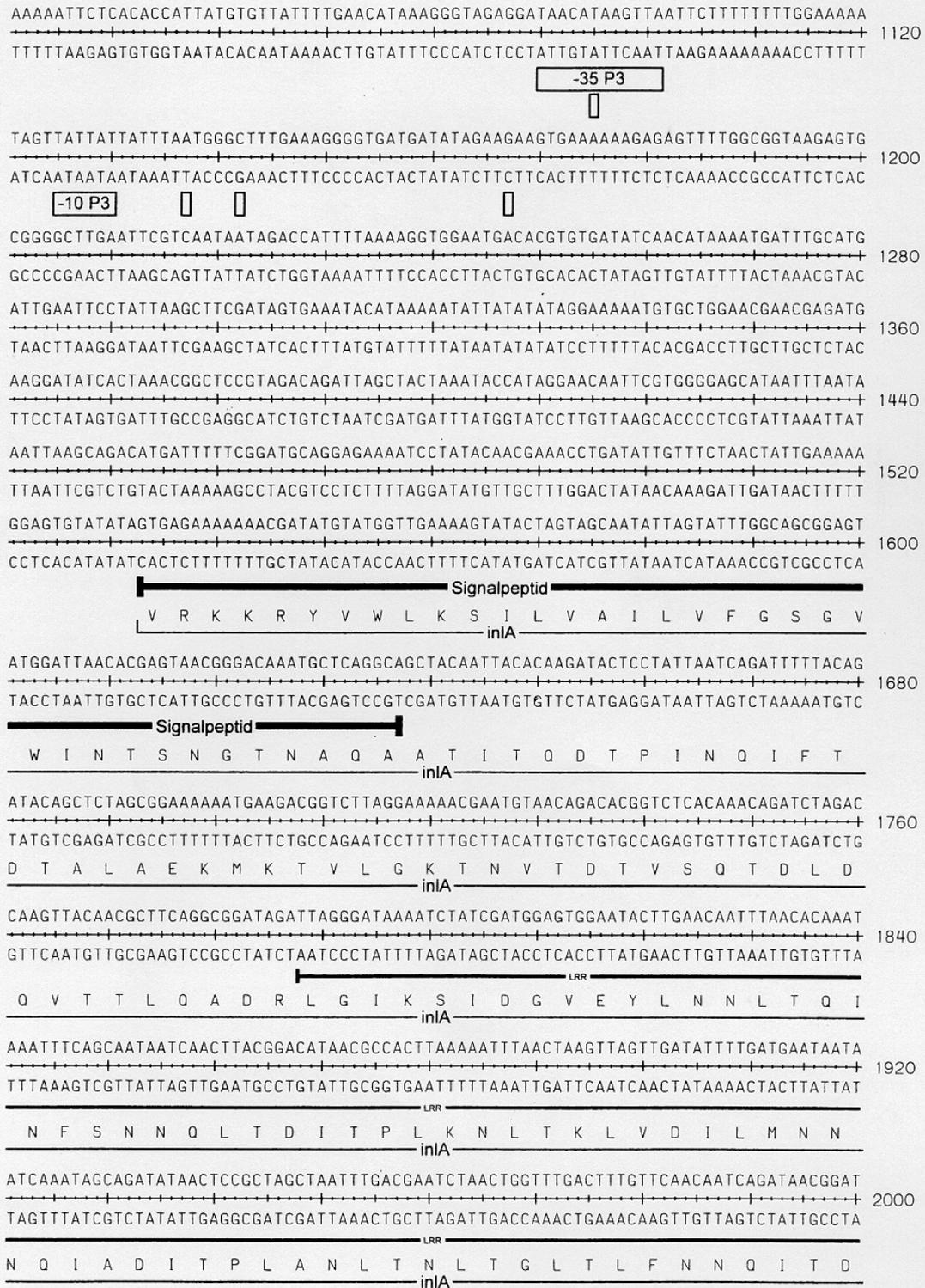
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

7.2 Nukleotidsequenz *inlAB* von *L. monocytogenes* EGD 1/2a

```

CTGCAGATGCTACCGTTACAAAAGATGTCCACCTAACGTCATCGTCGCGGAAGCCCGCCAAACAAATTCGTAAAATT 80
GACGCTACGATGGCAATGTTTTCTACAGGGTGGATTGCAGTAGCAGCGCCCTTCGGGGCGGTTTGTAAAGCATTTTAA
ATTGAGGAATAAGGAGAGATAGCAAATGACAATCAAAAATAAAGTAATTATTATAACCGGAGCATCATCTGGCATTGGTA 160
TAACTCCTTATTCCCTCTCTATCGTTTACTGTTAGTTTTATTTCAATAATAATTTGGCCTCGTAGTAGCCGTAACCAT
RBS M T I K N K V I I I T G A S S G I G
AAGCAACAGCTCTACTTTTTGGCTGAAAAAGGAGCGAAATTAGTCTTGCTGCCCGTCGCGTAGAAAAACTGGAAAAAATT 240
TTCGTTGTCGAGATGAAAACCGACTTTTTCTCGCTTAATCAAGAACGACGGGCAGCGCATCTTTTGGACCTTTTTTAA
K A T A L L L A E K G A K L V L A A R R V E K L E K I
GTTCAAACCATTAAGCGAATTCAGGTGAAGCAATTTTGC AAAACGGATGTAACGAAACGGAAGATAATAAGAGATT 320
CAAGTTTGGTAATTCGCTTAAGTCCACTTCGTTAAAAACGGTTTTGCCTACATTGCTTTGCGCTTCTATTATTCTCTAA
V Q T I K A N S G E A I F A K T D V T K R E D N K R L
AGTAGAGTTAGCCATTGAAAGATACGGAAAAGTAGATGCCATCTTTTTAAATGCGGGAATCATGCCAAATTCGCCATTAT 400
TCATCTCAATCGGTAACCTTCTATGCCTTTTCTACGTTAGAAAAATTTACGCCCTTAGTACGGTTAAGCGGTAATA
V E L A I E R Y G K V D A I F L N A G I M P N S P L
CGGCTTTAAAAGAAGATGAATGGGAGCAAATGATTGATTAATATTTAAAGGCGTACTAAATGGAATTGCGGCTGTTCTG 480
GCCGAAATTTCTTCTACTTACCCTCGTTTACTAATAATTATAATTTCCGCATGATTTACCTTAACGCCGACAAGAC
S A L K E D E W E Q M I D I N I K G V L N G I A A V L
CCTTCTTTCATCGCCAAAAATCAGGTCATATCATCGCCACTTCATCTGTTGCAGGCTTAAAAGCATATCCCGGCGGCGC 560
GGAAGAAAGTAGCGGGTTTTAGTCCAGTATAGTAGCGGTGAAGTAGACAACGTCGCAATTTTCGTATAGGGCCGCGCG
P S F I A Q K S G H I I A T S S V A G L K A Y P G G A
AGTATATGGCGGACTAAATGGGCAGTCCGCGATTTAATGGAAGTTTTACGAATGGAGTCAGCCCAAGAAGGTACCAATA 640
TCATATACCGCGCTGATTTACCCGTCAGGCGCTAAATTACCTTCAAATGCTTACCTCAGTCGGGTTCTTCCATGGTTAT
V Y G A T K W A V R D L M E V L R M E S A Q E G T N
TTCGCACAGTGACCATTTATCCAGCTGCTATCAATACGGAATTACTAGAACAATTACGGATAAAGAAACCGAACAAGGA 720
AAGCGTGTCACCTGGTAAATAGGTCGACGATAGTTATGCCTTAATGATCTTTGTTAATGCCTATTTCTTTGGCTTGTCTC
I R T V T I Y P A A I N T E L L E T I T D K E T E Q G
ATGACGAGCTTATACAAACAATATGGTATCACACCAGACCGAATCGCAAGCATCGTCGCTATGCCATTGATCAACCCGA 800
TACTGCTCGAATATGTTTGTATACCATAGTGTGGTCTGGCTTAGCGTTCGTAGCAGCGGATACGGTAACTAGTTGGGCT
M T S L Y K Q Y G I T P D R I A S I V A Y A I D Q P E
AGACGTCAACGTAAACGAATTCAGTGTGCGACCAACGAGCCAACCGTGGTAAATGGAAAAACCTTGAACGTGATAAAGA 880
TCTGCAGTTGCATTTGCTTAAGTGACAGCCTGGTTGCTCGGTTGGCACCATTACCTTTTTTGGAACTTGACTATTTTCT
D V N V N E F T V G P T S Q P W Terminator
TTGGTTCAAGGTTTTTTTATAGTGCTAAGGATTGATAAATAATTGATGTAAGATAAGTAAATGAATAATTGTATTTTAC 960
AACCAAGTTCCAAAAAATATCACGATTCTTAATTTATTAATACTACATTTCTATTCTATTACTTATTAACATATAAATG
Terminator
TAGTCTTCTCAGAAAAATAGTTTTATGGTGTTTAGAGATTATTGTAGCTGTTTCTTTGGGAGTGACATGCTTTTTAAC 1040
ATCAAGAAGAGTCTTTTTATCAAAATACCACAAAATCTCTAATAACATCGACAAAGAAACCTCACTGTACGAAAAATTG

```



ATAGACCCGCTTAAAAATCTAACAAATTTAAATCGGCTAGAAGTATCCAGTAACACGATTAGTGATATTAGTGGCCTTTC 2080
 TATCTGGGCGAATTTTTAGATTGTTAAATTTAGCCGATCTTGATAGGTCATTGTGCTAATCACTATAATCACGCGAAAG
 I D P L K N L T N L N R L E L S S N T I S D I S A L S
 AGGTTAACTAGTCTACAGCAATTATCTTTTGGTAATCAAGTGACAGATTTAAAACCATTAGCTAATTTAACAACTAG 2160
 TCCAAATTGATCAGATGTCGTTAATAGAAAACCATAGTTCAGTCTAAATTTGGTAATCGATTAATTTGTTGTGATC
 G L T S L Q Q L S F G N Q V T D L K P L A N L T T L
 AACGACTAGATATTTCAAGTAATAAGGTGTCGGATATTAGTGTCTGGCTAAATTAACCAATTTAGAAAGTCTTATCGCT 2240
 TTGCTGATCTATAAAGTTCATTATCCACAGCCTATAATCACAAGACCGATTTAATTGGTTAAATCTTTCAGAATAGCGA
 E R L D I S S N K V S D I S V L A K L T N L E S L I A
 ACTAACAAACAAATAAGTGATATAACTCCACTTGGGATTTTAAACAAATTTGGACGAATTATCCTTAAATGGTAACCAAGTT 2320
 TGATTGTTGGTTTATTCACTATATTGAGGTGAACCCATAAATTTGTTAAACCTGCTTAATAGGAATTTACCATTGGTCAA
 T N N Q I S D I T P L G I L T N L D E L S L N G N Q L
 AAAAGATATAGGCACATTGGCGAGTTTAAACAAACCTTACAGATTTAGATTTAGCAAATAACCAAAATTAGTAATCTAGCAC 2400
 TTTTCTATATCCGTGTAACCGCTCAAATTGTTTGGAAATGCTAAATCTAAATCGTTTATTGGTTAATCATTAGATCGTG
 K D I G T L A S L T N L T D L D L A N N Q I S N L A
 CACTGTCGGGTCTAACAAAATAACTGAGTTAAAACCTTGGAGCTAACCAATAAGTAACATCAGTCCCCTAGCAGGTTTA 2480
 GTGACAGCCAGATTGTTTGGATTGACTCAATTTGAACCTCGATTGGPTTATTCAATTGTAGTCAGGGGATCGTCCAAAT
 P L S G L T K L T E L K L G A N Q I S N I S P L A G L
 ACCGCACTCACTAAGTACTAGAGCTTAATGAAAAATCAGTGGGAAGATATTAGCCCAATTTCTAACCTGAAAAATCTCACATA 2560
 TGGCGTGAGTGATTGAATCTCGAATTACTTTTAGTCGACCTCTATAATCGGGTTAAAGATTGGACTTTTTAGAGTGTAT
 T A L T N L E L N E N Q L E D I S P I S N L K N L T Y
 TTTAACTTTGACTTTAATAATATAAGTGATATAAGCCAGTTTCTAGTTTAAACAAAGCTTCAAAGATTATTTTCTATA 2640
 AAATTGAAACATGAAATTATTATATTCACTATATTGCGGTCAAAGATCAAATTTGTTTGAAGTTTCTAATAAAAAGATAT
 L T L Y F N N I S D I S P V S S L T K L Q R L F F Y
 ATAACAAGGTAAGTGACGTAAGCTCACTTGCGAACTTAACAAATATTAATTGGCTTTCAGCTGGGCATAACCAAAATTAGC 2720
 TATTGTTCCATTCACTGCATTGAGTGAACGCTTGAATTGTTTATAATTAACCGAAAGTCGACCCGATTGGTTTAATCG
 N N K V S D V S S L A N L T N I N W L S A G H N Q I S
 GATCTTACACCATTGGCTAATTTAAACAAGAATCACCCAACCTAGGGTTGAATGATCAAGCATGGACAAATGCACCAGTAAA 2800
 CTAGAATGTGGTAACCGATTAAATTTGTTCTTAGTGGGTTGATCCCAACTTACTAGTTCGTACCTGTTTACGTGGTCATTT
 D L T P L A N L T R I T Q L G L N D Q A W T N A P V N

CTACAAAGCAAATGTATCCATTCCAACACGGTGAAAAATGTGACTGGCGCTTTAATTGCACCAGCTACTATTAGCGATG 2880
 GATGTTTCGTTTACATAGGTAAGGTTTGTGCCACTTTTACTACTGACCGCGAAATTAACGTGGTCGATGATAATCGCTAC
 Y K A N V S I P N T V K N V T G A L I A P A T I S D

 inIA

 GCGGTAGTTACACAGAGCCTGATATAACATGGAACCTTACCTAGTTATACAAATGAAGTAAGCTATACCTTTAGCCAACCT 2960
 CGCCATCAATGTGTCTCGGACTATATTGTACCTTGAATGGATCAATATGTTTACTTCATTTCGATATGGAAATCGGTTGGA
 G G S Y T E P D I T W N L P S Y T N E V S Y T F S Q P

 inIA

 GTCCTATTGAAAAGGAACGACAACATTTAGTGGAAACCGTGACGACGCCACTTAAGGCAATTTTTAATGTTAAGTTTCA 3040
 CAGTGATAACCTTTCCCTGCTGTTGTAATCACCTTGGCACTGCGTGGTGAATTCGGTAAAAAATTACAATTCAAAGT
 V T I G K G T T T F S G T V T Q P L K A I F N V K F H

 inIA

 TGTGGACGGCAAAGAAACAACCAAGAAGTGAAGCTGGGAATTTATTGACTGAACCAGCTAAGCCCGTAAAAAGAAGGTC 3120
 ACACCTGCCGTTTCTTTGTTGGTTTCTTACCTTCGACCCTTAAATAACTGACTTGGTCGATTCCGGCATTCTTCCAG
 V D G K E T T K E V E A G N L L T E P A K P V K E G

 inIA

 ACACATTTGTTGGTTGGTTTGTATGCCAAACAGGCGGAACATAAATGGAATTCAGTACGGATAAAAATGCCGACAAATGAC 3200
 TGTGTAACAACCAACCAACTACGGGTTTGTCCGCCTTGATTTACCTTAAAGTCATGCCTATTTTACGGCTGTTTACTG
 H T F V G W F D A Q T G G T K W N F S T D K M P T N D

 inIA

 ATCAATTTATATGCACAATTTAGTATTAACAGCTACACAGCAACCTTTGATAATGACGGTGAACAACATCTCAAACAGT 3280
 TAGTTAAATATACGTGTTAAATCATAATTGTCGATGTGTCGTTGGAAACTATTACTGCCACATTGTTGTAGAGTTTGTCA
 I N L Y A Q F S I N S Y T A T F D N D G V T T S Q T V

 inIA

 AGATTATCAAGGCTTTGTTACAAGAACCTACGGCACCAACAAAAGAAGGTTATACTTTTTAAAGGCTGGTATGACGCAAAAA 3360
 TCTAATAGTTCGAAACAATGTTCTTGGATGCCGTGGTTGTTTTCTCCAATATGAAAATTTCCGACCATACTGCGTTTTT
 D Y Q G L L Q E P T A P T K E G Y T F K G W Y D A K

 inIA

 CTGGTGGTGACAAGTGGGATTTGCAACTAGCAAAATGCCTGCTAAAAACATCACCTTATATGCCCAATATAGCGCAAT 3440
 GACCACCACTGTTACCCCTAAAGCGTTGATCGTTTTACGGACGATTTTTGTAGTGAATATACGGGTTATATCGCGGTTA
 T G G D K W D F A T S K M P A K N I T L Y A Q Y S A N

 inIA

 AGCTATACAGCAACGTTTGTATGTTGATGGAAAATCAACGACTCAAGCAGTAGACTATCAAGGACTTCTAAAAGAACCAAA 3520
 TCGATATGTCGTTGCAAACTACAACCTACCTTTTGTGCTGAGTTCGTCATCTGATAGTTCTGAAGATTTCTTGGTTT
 S Y T A T F D V D G K S T T Q A V D Y Q G L L K E P K

 inIA

 GGCACCAACGAAAGCCGGATATACTTTCAAAGGCTGGTATGACGAAAAACAGATGGGAAAAAATGGGATTTTGCACGG 3600
 CCGTGGTTGCTTTCCGCTATATGAAAGTTCCGACCATACTGCTTTTTTGTCTACCCTTTTTACCCTAAAACGCTGCC
 A P T K A G Y T F K G W Y D E K T D G K K W D F A T

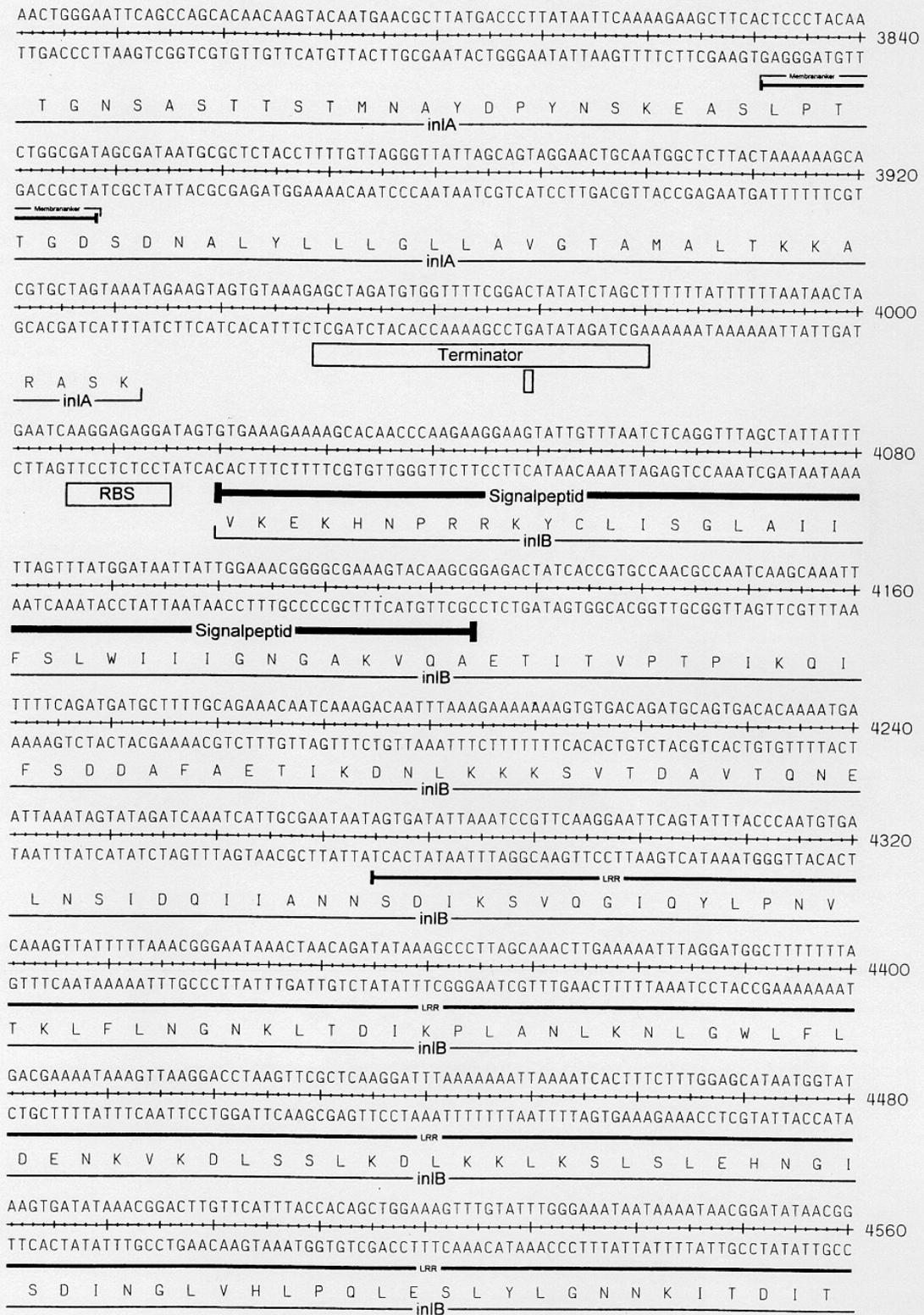
 inIA

 AAAAAATGCCAGCAATGACATTACGCTGTACGCTCAATTTACGAAAAATCCTGTGGCACCACCAACAACCTGGAGGGAAC 3680
 TATTTTACGGTCGTTTACTGTAATGCGACATGCGAGTTAAATGCTTTTTAGGACACCGTGGTGGTTGTTGACCTCCCTTG
 D K M P A N D I T L Y A Q F T K N P V A P P T T G G N

 inIA

 ACACCGCTACAACAATAACGGCGGAATACTACACCCTTCCGCAATATACCTGGAAGCGACACATCTAACACATC 3760
 TGTGGCGGATGTTGTTTATGCGCCCTTATGATGTGGTGAAGGCGTTTATATGGACCTTCGCTGTGTAGATTGTGTAG
 T P P T T N N G G N T T P P S A N I P G S D T S N T S

 inIA



TTCTTTCACGTTFAACTAAACTGGAFACCTTTGTCTCTCGAAGATAACCAAATTAGTGATATTGTGCCACTTGCAGGTTTA
 AAGAAAGTCAAATTGATTTGACCTATGAAACAGAGAGCTTCTATTGGTTTAATCACTATAACACGGTGAACGTCCAAT 4640
 LRR
 V L S R L T K L D T L S L E D N Q I S D I V P L A G L
 inIB
 ACTAAATTGCAGAACCTATATTTAAGTAAAAATCACATAAGCGATTTAAGAGCATTAGCAGGACTTAAAAATCTAGATGT
 TGATTTAACGTCTTGGATATAAATTCATTTTAGTGATTTCGCTAAATTCTCGTAATCGTCCTGAATTTTTAGATCTACA 4720
 LRR
 T K L Q N L Y L S K N H I S D L R A L A G L K N L D V
 inIB
 TTTAGAATTATTTAGCCAAGAATGTCTTAATAAGCCTATTAATCATCAATCTAATTTGGTTGTTCCGAATACAGTGAAAA
 AAATCTTAATAAATCGGTTCTTACAGAATTATTCGGATAATTAGTAGTTAGATTAACCAACAAGGCTTATGTCACCTTT 4800
 LRR
 L E L F S Q E C L N K P I N H Q S N L V V P N T V K
 inIB
 AACTGATGGGTCGTTAGTGACTCCAGAAATAATAAGTGATGATGGCGATTATGAAAAACCTAATGTTAAATGGCATTTA
 TGTGACTACCCAGCAATCACTGAGGCTTTATTATTCACTACTACCGCTAATACTTTTTGGATTACAATTTACCGTAAAT 4880
 N T D G S L V T P E I I S D D G D Y E K P N V K W H L
 inIB
 CCAGAATTTACAAATGAAGTGAGTTTTATTTCTATCAGCCAGTCACTATTGGAAAAGCAAAAGCAAGATTTTCATGGGAG
 GGTCTTAAATGTTTACTTCACTCAAATAAAAGATAGTCGGTCAGTGATAACCTTTTCGTTTTCGTTCTAAAGTACCCCTC 4960
 P E F T N E V S F I F Y Q P V T I G K A K A R F H G R
 inIB
 AGTAACCAACCCTGAAAGAGGTTTACACAGTAAGTTATGATGTTGATGGAACGGTAATAAAAACAAAAGTAGAAGCAG
 TCATTGGGTTGGTGACTTTCTCCAAATGTGTCATTCAATACTACAACCTTGCCATTATTTTTGTTTTTCATCTTCGTC 5040
 V T Q P L K E V Y T V S Y D V D ' G T V I K T K V E A
 inIB
 GGACGGGATAACTGCACCTAAACCTCCGACTAAACAAGGCTATGTTTTAAAGGATGGTATACTGAAAAAATGGTGGG
 CCTGCGCTATTGACGTGGATTGGAGGCTGATTTGTTCCGATACAAAAATTCCTACCATATGACTTTTTTACCACCC 5120
 G T R I T A P K P P T K Q G Y V F K G W Y T E K N G G
 inIB
 CATGAGTGAATTTAATACGGATTATATGTCGGAAATGATTTTACTTTGTACGCAGTATTTAAAGCGGAAACGACCGA
 GTACTCACCTTAAATATGCCTAATATACAGGCCTTTACTAAAATGAAACATGCGTCATAAATTTCCGCTTTGCTGGCT 5200
 H E W N F N T D Y M S G N D F T L Y A V F K A E T T E
 inIB
 AAAAGCAGTCAACTTAACCCGCTATGTCAAATATATTCGCGGAATGCAGGCATCTACAACTTCCACGAGAAGATAACT
 TTTTCGTCAGTTGAATGGGCGATACAGTTTATATAAGCGCCTTACGTCGGTAGATGTTGAAGGTGCTCTTCTATTGA 5280
 K A V N L T R Y V K Y I R G N A G I Y K L P R E D N
 inIB
 CGCTTAAACAAGGAACTCTAGCCTCGCACCGCTGAAAAGCTCTAACTGTTGATAGAGAAGCCGAAATGGCGGAAAAATTA
 GCGAATTTGTTCCCTTGAGATCGGAGCGTGGCGACATTTGAGATTGACAACCTATCTCTTCGGGCTTTACCCTTTTAAT 5360
 S L K Q G T L A S H R C K A L T V D R E A R N G G K L
 inIB
 TGGTACAGTTAAAAAATATTGGCTGGACTAAAGCGGAAAACCTTTCCCTTAGACCGATACGATAAAATGGAATATGACAA
 ACCATGTCCAATTTTTATAACCGACCTGATTTTCGCTTTTGGAAAAGGAATCTGGCTATGCTATTTTACCTTATACTGTT 5440
 W Y R L K N I G W T K A E N L S L D R Y D K M E Y D K
 inIB

AGGGGTTACCGCTTATGCAAGAGTGAGAAATGCGTCTGGAAATTCGGTTTGGACAAAACCTACAACACAGCCGGCGCTA
TCCCAATGGCGAATACGTTTCTCACTCTTTACGCAGACCTTTAAGCCAAACCTGTTTTGGGATGTTGTGTCGGCCCGCAT 5520
G V T A Y A R V R N A S G N S V W T K P Y N T A G A
-----inlB-----

AACACGTGAATAAGCTATCGGTCTACCAAGGTA AAAATATGCGTATCTTGC GCGAAGCCAAAACCAATTACTACATGG
TTGTGCACTTATTCGATAGCCAGATGGTTCCATTTTATACGCATAGAACGCGCTTCGGTTTTGTGGTTAATGATGTACC 5600
K H V N K L S V Y Q G K N M R I L R E A K T P I T T W
-----inlB-----

TATCAATTTAGCATTGGTGGTAAAGTAATTGGTTGGGTCGATACCCGAGCACTTAACACATTCTACAAAACAAGCATGGA
ATAGTTAAATCGTAACCACCATTTCAATTAACCAACCCAGCTATGGGCTCGTGAATTGTGTAAGATGTTTGTTCGTACCT 5680
Y Q F S I G G K V I G W V D T R A L N T F Y K Q S M E
-----inlB-----

AAAGCCAACCCGTTTAACTCGTTATGT CAGCGCAATAAAGCTGGCGAATCGTACTATAAAGTCCC GGTAGCAGATAATC
TTTCGGTTGGCAAATTGAGCAATACAGTCGCGGTTATTTGACCGCTTAGCATGATATTT CAGGGCCATCGTCTATTAG 5760
K P T R L T R Y V S A N K A G E S Y Y K V P V A D N
-----inlB-----

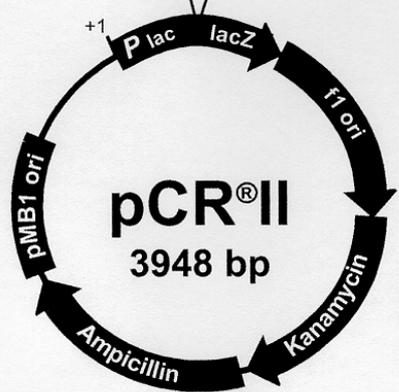
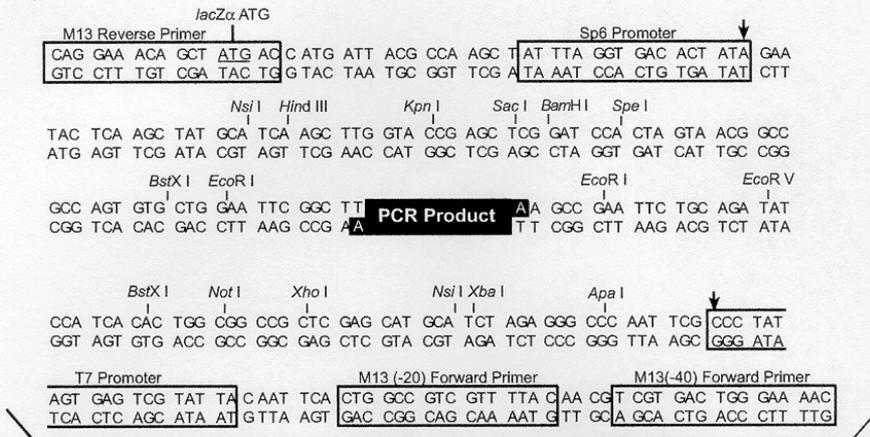
CAGTCAAAAGGGTACTTTAGCCAAGTATAAAAATCAAAGTTAATTGTTGATTGTCAAGCAACCATCGAAGGTCAACTT
GTCAGTTTTCCCATGAAATCGGTTCAATTTTTAGTTTTCAATTAACAACTAACAGTTCGTTGGTAGCTTCCAGTTGAA 5840
P V K R G T L A K Y K N Q K L I V D C Q A T I E G Q L
-----inlB-----

TGGTACCGAATAAGGACTAGTTCCTTTCATTGGTTGGACGAAAGCAGCTAATTTAAGGGCACAGAAATAA
ACCATGGCTTATTCCTGATCAAGGTGAAAGTAACCAACCTGCTTTCGTCGATTAATTTCCCGTGTCTTTATT 5912
W Y R I R T S S T F I G W T K A A N L R A Q K
-----inlB-----

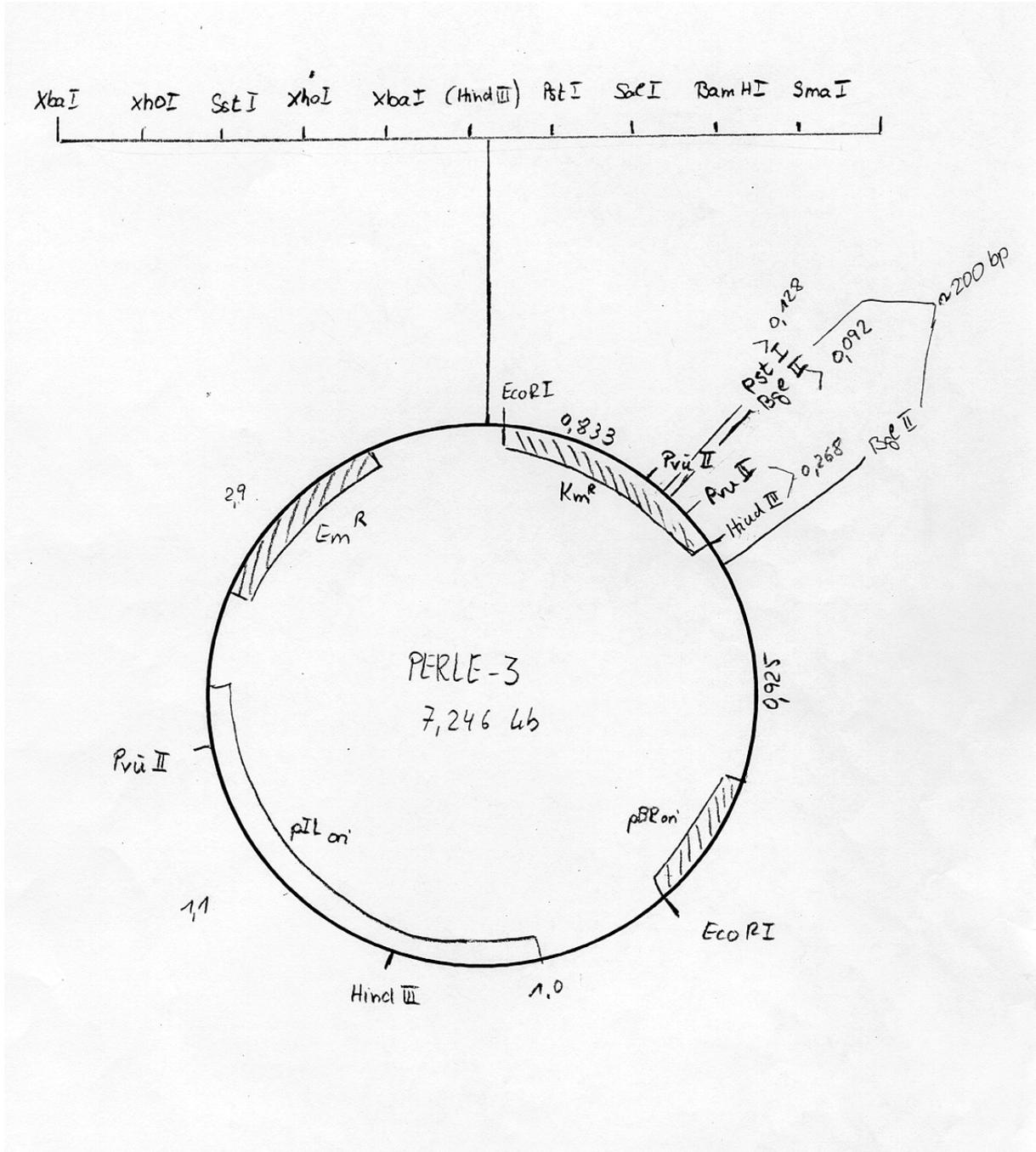
7.3 Plasmidkarten

Comments for pCR®II
3948 nucleotides

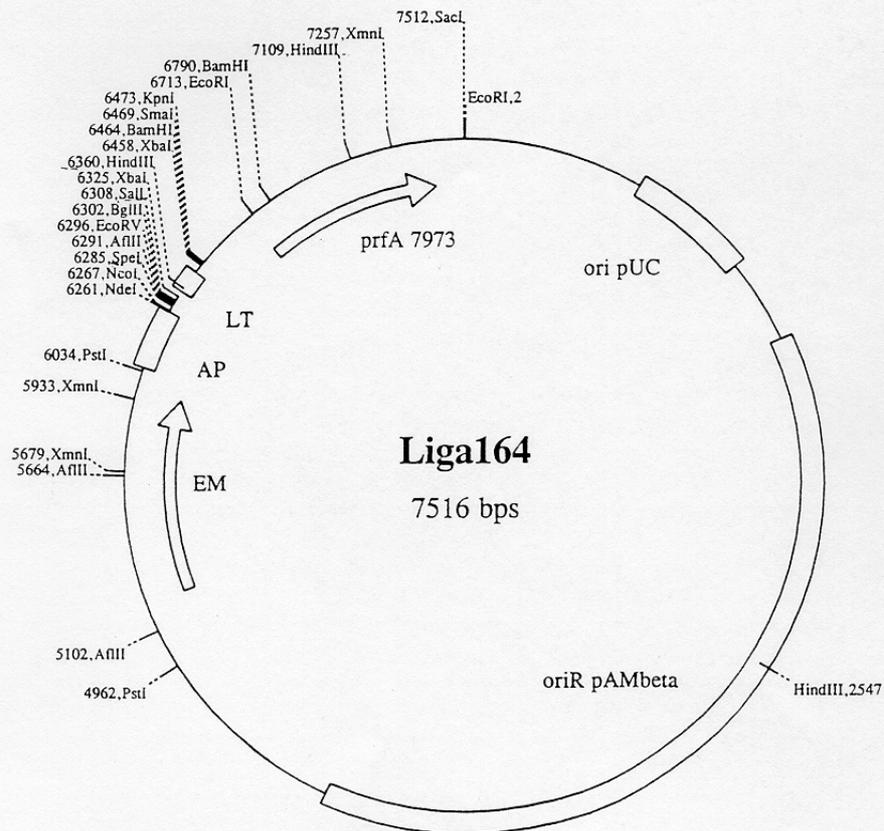
LacZ gene: bases 1-571
 Sp6 promoter: bases 239-255
 Multiple Cloning Site: bases 269-381
 TA Cloning® site: bases 335-336
 T7 promoter: bases 388-407
 F1 origin: bases 572-986
 Kanamycin resistance: bases 987-2114
 Ampicillin resistance: bases 2133-2992
 pMB1 origin (pUC-derived): bases 3182-3765

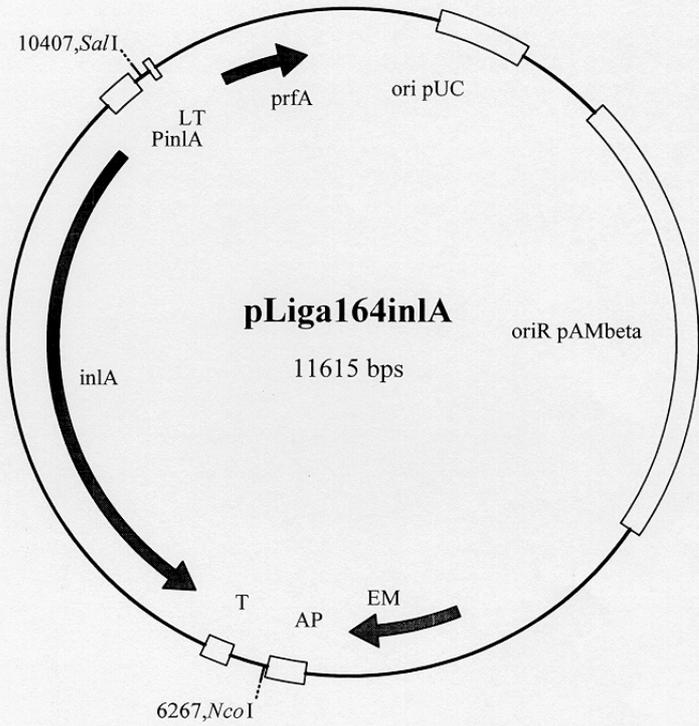


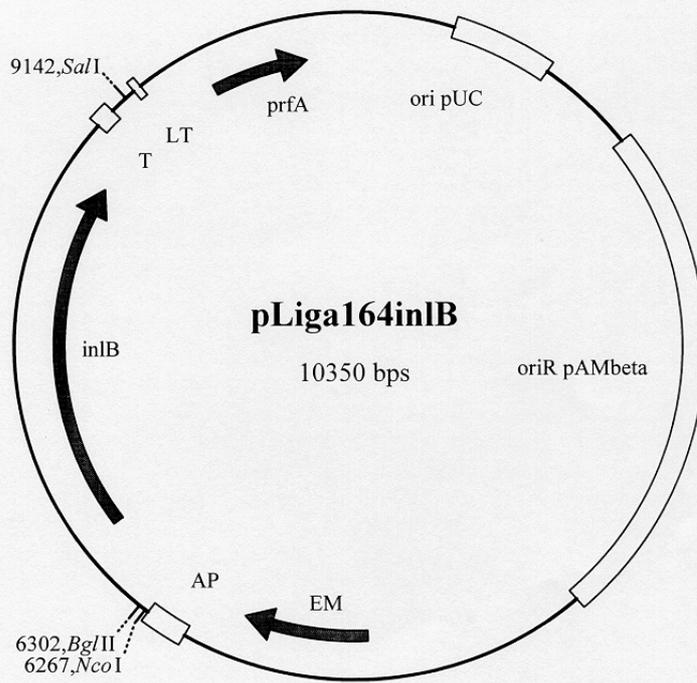
Arrows (↓) indicate the start of transcription for Sp6 and T7 RNA polymerases, respectively.

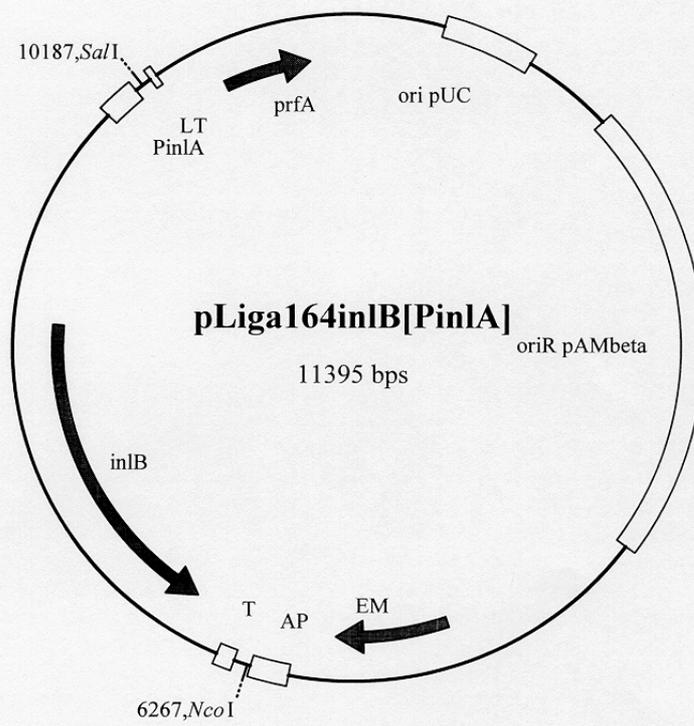


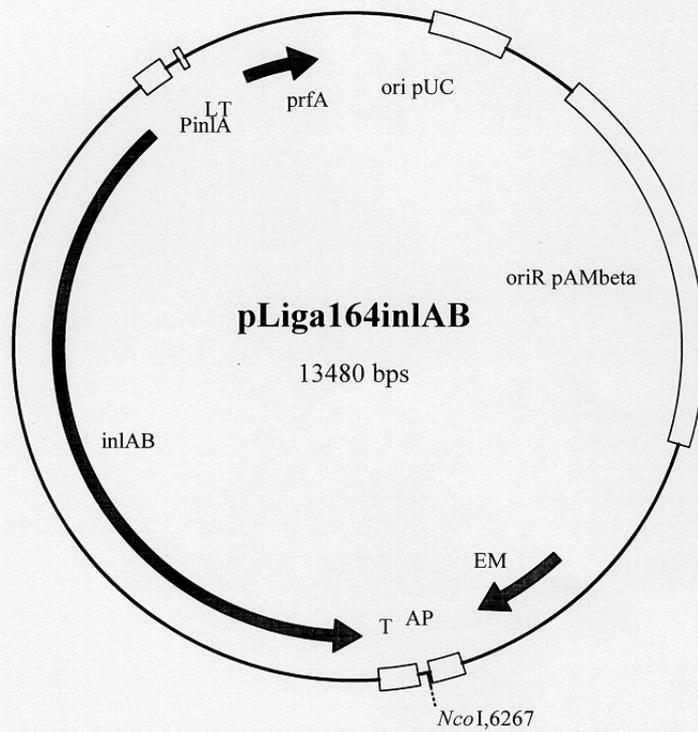
Expressionsplasmid pEP2
 ActA Promotor
 ATG von NdeI ist Startcodon
 Polylinker NdeI, NcoI, SpeI, AflIII, EcoRI, BglIII, SalI
 Stopcodone in allen Rastern
 Em Resistenz, Shuttle Vektor fuer E.coli und Listerien
 AP ActA Promotor
 LT Lisa terminator
 prfA aus NCTC7973











7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Philippos Benedikt Pashalidis
geboren am: 07.08.1972
Geburtsort: Freiburg im Breisgau
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch
Adresse: Frankfurter Str. 21, 35392 Gießen
Telefon: 0641/9718280
e-mail: Philippos.Pashalidis@mikrobio.med.uni-giessen.de

Schulbildung:

1978-1980 Grundschule Overbergschule in Recke
1980-1982 Grundschule Josefschule in Haren (Ems)
1982-1984 Gymnasium Marianum in Meppen
1984-1989 Gymnasium Haren
1989-1990 High Point High School in Beltsville, MD, USA
1990-1992 Gymnasium Haren, Abschluß: Abitur

Zivildienst:

07/1992-09/1993 Individuelle Schwerstbehindertenbetreuung, DRK Kreisverband
Münster e.V.

Studium:

09/1993-03/2000 Studiengang Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
Ärztliche Prüfung am 06.04.2000
Ärztliche Vorprüfung am 07.09.1995
Famulaturen: 02-03/1996 Neurochirurgie Krankenhaus Ludmillenstift,
Meppen
02-04/1997 Med. Mikrobiologie Klinikum Gießen
03/1998 Innere Medizin Oakwood Hospital and Medical Center,
Dearborn, MI, USA
Praktisches Jahr: 04-08/1999 Innere Medizin, Nottingham City Hospital, England
08-12/1999 Anästhesiologie, Klinikum Gießen
12/1999-03/2000 Chirurgie, Klinikum Gießen
Experimentelle
Doktorarbeit: begonnen 10/1996 im Institut für Med. Mikrobiologie, Klinikum
Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. T. Chakraborty,
Arbeitsgruppe Listerien

relevante Tätigkeiten:

1994-1995 Sitzwache Chirurgie, Klinikum Gießen
08-09/1996
und
02-03/1997 Pflegehelfer Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und
Urologie, Klinikum Gießen
05-11/1997 Hilfskraft SFB 535, Justus-Liebig-Universität Gießen
12/1997 Hilfskraft SFB 249, Justus-Liebig-Universität Gießen

Graduiertenkolleg:

seit 01/2000 „Biochemie von Nukleoproteinkomplexen“, GK 370

**Tagungsbeitrag/
Veröffentlichung:**

Hain T., P. Pashalidis, T. Chakraborty, E. Domann.
Differential entry and requirements of internalins for invasion
into cultured eukaryotic cell lines. Vortrag auf dem 49. Kongreß
der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
(DGHM), 5.-9. Oktober 1997, Jena.

Müller, S., T. Hain, P. Pashalidis, A. Lingnau, E. Domann, T.
Chakraborty, and J. Wehland. 1998. Purification of the inlB
gene product of *Listeria monocytogenes* and demonstration of its
biological activity. *Infect Immun* 66:3128-3133.

Arzt im Praktikum:

seit 05/2000 Institut für Med. Mikrobiologie, Klinikum Gießen

Gießen 2000

7.5 Danksagung

Zunächst danke ich Prof. Dr. T. Chakraborty, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem Thema in seiner Arbeitsgruppe unter hervorragenden Bedingungen zu arbeiten. Sein Interesse, seine ständige Diskussionsbereitschaft und ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung waren ein sehr starker Antrieb für das Gelingen dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei PD Dr. E. Domann für seinen fachlichen Rat. PD Dr. F. Ebel danke ich für eine ganze Reihe wertvoller Tips und Anregungen.

Simone Müller danke ich für die Reinigung und Bereitstellung des Internalin B.

Ein ganz herzliches Danke schön geht an alle Mitarbeiter des Institutes. Dabei danke ich vor allem Sonja Otten, die mir durch ihre kritische Korrektur und die Erklärung vieler für mich fachfremder Zusammenhänge sehr geholfen hat.

Torsten Hain danke ich vielmals, da er meine Einarbeitung und sozusagen die „Vorort-Betreuung“ meiner Arbeit im Labor übernommen hat. Ihm gilt ein ganz besonderer Dank, weil er mir über die gesamte Zeit mit viel Aufwand geholfen hat.

Ich danke Freunden und Verwandten für ihre Unterstützung ganz unterschiedlicher Art.

Julia Kamenik danke ich für ihre gestalterische Kritik und Hilfe und vor allem für: Liebe.

Meinem Vater danke ich für seinen stetigen Einsatz und das Ermöglichen meiner Ausbildung. Seine Gewissenhaftigkeit wird für mich immer beispielhaft sein. Meiner Mutter danke ich für ihre großartige Unterstützung in den letzten zum Teil schwierigen Jahren. Sie hat es durch ihre Stärke und ihr Verständnis geschafft, mir Mut zu machen und mir ein großer Rückhalt zu sein.