

Charakterisierung

von sRNA in

Listeria monocytogenes

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades

eines Doktors der Zahnheilkunde

des Fachbereichs der Medizin der

Justus Liebig Universität Gießen

vorgelegt von

Christian Krawitz

aus Bremen

Gießen 2012

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie der Universitätsklinikum Gießen und
Marburg GmbH, Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. T. Chakraborty

Gutachter: Prof. Dr. T. Chakraborty

Prof. Dr. Dr. V. Alt

Tag der Disputation: 10. September 2012

Erklärung:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Publikationsliste:

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

Mobarak Abu Mraheil, André Billion, Walid Mohamed, Krishnendu Mukkerjee, Carsten Kuenne, Jordan Pischmarov, **Christian Krawitz**, Julia Retez, Thomas Hartsch, Trinad Chakraborty and Torsten Hain,

2011, The intracellular sRNA transcriptome of *Listeria monocytogenes* during growth in macrophages, Nucleic Acids Res.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Listeria monocytogenes.....	1
1.2	Pathogenitätsfaktoren und Invasionskonzepte.....	2
1.3	Virulenzfaktoren.....	3
	Organisation der Virulenzgene und Zelleintritt.....	4
	Adhäsion und Internalisation.....	5
	Expansion aus der Vakuole ins Zellzytoplasma.....	6
	Intrazelluläre Beweglichkeit.....	7
	Interzelluläre Beweglichkeit.....	7
1.4	Listeriose.....	8
1.5	small non-coding RNA.....	10
1.6	Bakterielle nicht kodierende sRNA.....	10
	Cis- und Trans-agierende sRNA.....	12
	Riboswitches.....	13
	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats.....	14
1.7	Aufgabenstellung.....	15
2.	Material.....	16
2.1	Eukaryontische Ziellinien.....	16
2.2	Bakterienstämme.....	16
2.3	Plasmide.....	16

Topo –Vektor	16
pAUL-a Vektor	17
2.4 Verwendete Primer	18
2.5 Anzuchtmedien	19
2.6 Antibiotika	21
Ampicillin	22
Erythromycin	22
Gentamicin	22
2.7 Restriktionsenzyme	23
2.8 Geräte.....	23
2.9 Kits.....	24
2.10 Software.....	24
3. Methoden	25
3.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	25
3.2 Amplifizieren der DNA Produkte mittels PCR	25
3.3 Gelelektrophorese von DNA Fragmenten auf Agarose.....	26
3.4 Reinigung der DNA Fragmente.....	27
3.5 Sequenzierung der DNA.....	27
3.6 Verdau und Ligation.....	28
3.7 Transformation mittels Hitzeschock oder Elektroschock.....	29
Hitzeschock-Transformation.....	29
Elektroschock-Transformation in EGD-e	30
3.8 Herstellung kompetenter E. coli Zellen.....	30

Herstellung elektrisch kompetenter <i>E. coli</i>	30
Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> nach Hanahan.....	30
3.9 Deletionmutanten.....	31
3.10 Glycerinkulturen	33
3.11 RNA Isolation.....	33
3.12 Umschreiben der RNA in cDNA.....	34
3.13 Realtime PCR und Aktivitätsnachweis.....	35
Temperaturprogramm der RT-PCR	35
3.14 Proteinisolierung.....	35
Ausfällung von Kulturüberstandsproteinen mit TCA.....	35
Isolierung zytoplasmatischer Proteine	36
Extraktion zellwandassoziiertes Proteine.....	36
3.15 Proteinanalyse mittels SDS – PAGE.....	37
Trenngel (12%)	37
Sammelgel.....	37
3.16 Wachstumsanalysen.....	38
3.17 Wachstum in P388 D1 Makrophagen.....	39
3.18 Infektionsversuche in Larven der <i>Galleria Mellonella</i>	40
3.19 Infektionsversuche im Mausmodell.....	41
3.20 Immunfluoreszenzfärbung.....	41
3.21 Fluoreszenzmikroskopie	42
3.22 Statistik	43
4. Ergebnisse	44

4.1	Suchkriterien der sRNA und putative Funktionen	44
4.2	Herstellung und Charakterisierung der Deletionsmutanten.....	45
4.3	Analyse des Wachstumsverhalten	46
4.4	Prüfung der Invasionsfähigkeit in Makrophagen	54
4.5	Resultate der Infektion in <i>Galleria Mellonella</i> Larven	55
4.6	Infektionssessay im Mausversuch.....	58
4.7	Immunfluoreszenzfärbung von Listerien in Makrophagen	60
4.8	Immunfluoreszenzfärbung von Listerien in PTK2 Zellen.....	63
4.9	Proteinexprimierung	66
	Zellwandproteine	66
	Überstandsproteine	67
	Cytoplasmatische Proteine.....	68
4.10	RNA Expressionsmuster der Mutanten $\Delta rli31$ und $\Delta lmo0559$	69
5.	Diskussion.....	72
5.1	Eigenschaften der generierten sRNA Kandidaten	72
5.2	Wachstumsversuche	75
5.3	Infektionsversuche.....	77
5.4	Proteinanalyse.....	80
5.5	Putative Ziele der analysierten sRNA-Kandidaten.....	81
5.6	Riboswitchanalyse von $\Delta lmo0558$	83
6.	Fazit.....	86
6.1	Ausblick.....	87
7.	Summary.....	89

7.1	Perspective.....	90
8.	Anhang.....	91
8.1	rli31.....	91
8.2	rli33-1	91
8.3	rli33-2	92
8.4	rli53.....	93
8.5	rli50*.....	93
9.	Literaturverzeichnis	95
10.	Danksagung.....	103

1. Einleitung

1.1 *Listeria monocytogenes*

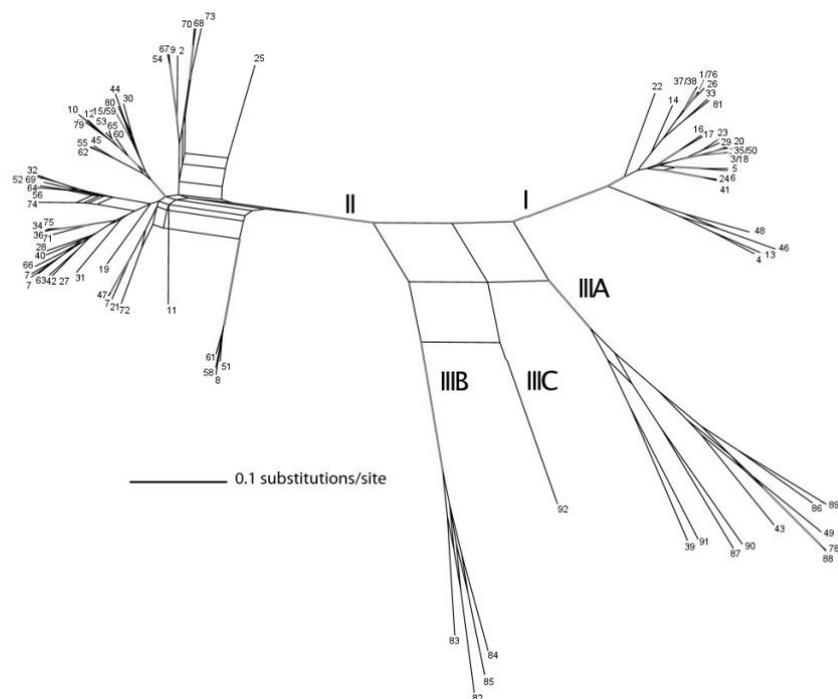
Listeria monocytogenes ist ein grampositives, fakultativ anaerobes, stäbchenförmiges Bakterium. Es ist der Erreger der Krankheit Listeriose. Bei vollständiger Ausprägung kann Listeriose zur Manifestation einer Meningitis oder Enzephalitis führen. Sie bildet vor allem bei immunsupprimierten Patienten und Neugeborenen ein letales Risiko.

Als einziges Bakterium seiner Familie ist *L. monocytogenes* in der Lage sowohl im menschlichen Organismus, als auch in Tieren unter bestimmten Bedingungen zu überleben.

Neben *L. monocytogenes* gehören zur Gruppe der Listerien noch der tierpathogene *L. ivanovii* sowie die nicht-pathogenen *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae* und *L. welshimeri* [1].

Der Keim *L. monocytogenes* wird in mehrere serologische Untergruppen differenziert. Sie haben alle das gleiche genetische Grundkonstrukt, unterscheiden sich jedoch in ihrer Häufigkeit bezüglich ihrer Verbreitung in unterschiedlichen ökologischen Nischen [2]. So werden die Serotypen der Gruppen I und II am häufigsten in klinischen Isolaten und in Nahrung gefunden.

Abbildung 1.1 Stammbaum der Serotypen von *Listeria monocytogenes*, Quelle: BMC Evol Biol. 2008 October 8. Doi: 10. 1186/1471-2148-8-277, den Bakker et al



Das Bakterium *Listeria monocytogenes* wurde nach J. Lister benannt. Bereits im Jahre 1926 fand die erste Isolation durch Everitt George Dunne Murray, dessen Initialen heute noch Stämme markieren [3]. Es erhielt seinen heutigen Namen 1940 und war vorher als *Bacterium monocytogenes* bekannt. Die Pathogenität des Erregers erkannte man aber erst 1952, als festgestellt wurde, dass es zur Ausbildung einer frühkindlichen Sepsis und Meningitis führen kann [4].

Listeria monocytogenes ist nicht in der Lage Sporen zu bilden. Es ist gegenüber äußeren Umwelteinflüssen extrem resistent: Kälte, Trockenheit, hohe Salzkonzentrationen und ein breites pH-Spektrum (pH 4,4 – 9,8) führen nicht zu einem Absterben. Sein optimales Wachstumspotential erreicht es bei Temperaturen zwischen 30 und 37°C, aber auch bei Kühlschranktemperaturen von 4°C ist ein Wachstum nachweisbar [5]. Es zeigt auf Blutagar β -Hämolyse, ist peritrich begeißelt und hat bei humaner Körpertemperatur eine herabgesetzte Synthese von Flagellin [6].

Durch seine Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen ist es ubiquitär in Flora und Fauna vorhanden. In Ausscheidungen von Tier und Mensch, sogar in Kuhmilch wurde *L. monocytogenes* nachgewiesen [7]. Positive Tests zeigen sich sogar auf Matratzen von Bewohnern landwirtschaftlicher Betriebe. Die Konfrontation des Immunsystems mit *L. monocytogenes* über lange Zeiträume, führt heutzutage zu der Annahme einer verminderten Allergieausbildung bei Menschen bestimmter Altersgruppen und Konstitution [8].

Von besonderem Interesse ist jedoch der Infektionsvorgang der Listerien. Die intrazelluläre Vermehrung und die Möglichkeit der Überwindung von Barrieren, wie der Blut-Hirn-Schranke oder der Plazenta bieten ein hohes Potential für kommende Therapieansätze. Sollte es gelingen diese Vorgänge in ihrer genetischen Abfolge zu erfassen und zu entschlüsseln so bieten sich neuartige Möglichkeiten für die Erkennung bakterieller Pathomechanismen.

1.2 Pathogenitätsfaktoren und Invasionskonzepte

Pathogene Faktoren lassen sich unterschiedlichen Funktionen zuordnen, die je nach Aufgabe als Adhäsine, Toxine, Impedine oder Moduline bezeichnet werden. Alle zielen im Zusammenspiel darauf ab, die Infektion eines potentiellen Wirtes zu ermöglichen und folglich das Überleben des Organismus und seine Vermehrung zu fördern.

Adhäsine fördern die Anheftung des Bakteriums an Zielgewebe. Dies kann über Proteine, Pilli oder Fimbrien geschehen. Invasine dienen der Aufnahme in den Wirt. Sie induzieren die Internalisation durch phagozytierende und nicht-phagozytierende Zellen.

Bei *L. monocytogenes* ist das erste Hindernis der Durchtritt der Darmbarriere nach oraler Aufnahme. Sie wird durch den „Zipper-Mechanismus“ gelöst. Durch Rezeptor vermittelte Endozytose wird die Membranstruktur betroffener Epithelzellen verändert: Das Bakterium inseriert in einem Phagosom in die Zelle. Der „Zipper“-Vorgang benötigt dazu nur einen notwendigen Liganden als Initiator.

Im Gegensatz dazu steht der umfangreiche „Trigger-Mechanismus“, wie er zum Beispiel von Shigellen angewendet wird. Hier werden 30 verschiedenen Proteine benötigt, die umfangreiche Veränderungen im Zytoskelett bewirken. Am Ende dieser Umstrukturierungen wird die Zellmembran um das Bakterium wieder geschlossen und der Erreger befindet sich im Zytosol [9].

Impedine verhindern eine effektive Immunantwort des Wirts. Sie sorgen für die Etablierung des Erregers innerhalb eines nährstoffreichen Raumes. *L. monocytogenes* wird vor der Auflösung im sauren Milieu des Phagosoms geschützt und die Lyse der Phagosom-Struktur betrieben. Impedine sind die Initiatoren eines erneuten Infektionszyklus, wenn Abkömmlinge der Spezies die Invasion eines neuen Wirtes vollzogen haben.

Die Agressine und Moduline ermöglichen die gezielte Ausbreitung im Körper. Der Erreger wird unerkannt durch die Blut-Hirn-Schranke oder die Plazenta geschleust. Innerhalb der Zelle wird durch die Rekrutierung von Aktin die gezielte Fortbewegung durch das Zytosol vollzogen [10].

1.3 Virulenzfaktoren

Pathogene Bakterien besitzen die Fähigkeit in individuell unterschiedlich ausgeprägten, günstigen Nischen zu überleben. Dafür sind vor allem Eigenschaften verantwortlich, die sie für bestimmte Lebensbedingungen besonders begünstigen. So ist der Wechsel von einer Umgebung mit niedrigen Temperaturen in einen humanen Wirtsorganismus der Impuls zur Modifikation des Stoffwechsels und in Konsequenz der Pathogenität. Temperaturen um 37°C begünstigen die Expression der Virulenzgene und erhöhen folglich auch die Syntheserate von Proteinen, die pathogene Fähigkeiten zum Ausdruck bringen.

Die Mehrheit der eingedrungenen Listerien wird vom Immunsystem als Antigen erkannt und phagozytiert. Die Bakterien, die der Immunantwort entgehen, verbergen sich aufgrund der Listerien eigenen Mechanismen im Zellverband des Wirtes und sind so primär für das Immunsystem nicht auffindbar. Der Schutz vor Phagozytose, durch die Immunantwort des Wirtes wird durch das Protein ActA betrieben. Durch Protein-Camouflage bleiben die Erreger unerkannt und können im Wirtsorganismus persistieren [11].

Organisation der Virulenzgene und Zelleintritt

Die für pathogene Eigenschaften verantwortlichen Gene verteilen sich auf drei verschiedene Abschnitte des Erbguts. Innerhalb des Genoms liegen die Gene *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB* auf dem sogenannten Virulenzgencluster [12]. Dieses wird auch als LIPI-1 (Listeria pathogenicity island 1) bezeichnet [13]. Die *L. ivanovii* – spezifische LIPI-2 beinhaltet den Virulenzfaktor SmcL (Sphingomyelinase), sowie die Gene für zehn Internaline [14].

Die entscheidende Rolle für die Expression von LIPI-1 trägt *prfA* (positive regulatory factor A). Es ist die Transkriptionsvorlage für das Protein PrfA. Dieses 27kDa große Protein ist ein Homodimer mit zwei identischen Untereinheiten des enterobakteriellen Regulators Crp (cAMP receptor protein). Es hat unmittelbaren Einfluss auf zehn verschiedene Gene, die in sieben Transkriptionseinheiten zusammengefasst sind [16].

Die Ausschüttung von PrfA ist stark temperatursensibel und erreicht ihr Optimum bei 37°C. Niedrige Umgebungstemperaturen hemmen die PrfA Transkription durch Konformationsänderung im Bereich der ribosomalen Bindungsstelle [15]. Der Einfluss von PrfA wird über seine Aktivität, die Konzentration und die Expression PrfA-abhängiger Promotoren geregelt.

Eine dem PrfA homologe Sequenz mit einer Länge von 14bp liegt strangaufwärts der Promotorensequenz, die für PrfA-regulierte Gene verantwortlich ist. Sie wird als PrfA-Box bezeichnet. Durch Bindung an diese PrfA-Box kommt es zur positiven Autoregulation der *prfA*-Expression.

Die verringerte Ausschüttung des Proteins PrfA bei Erreichen einer stationären Wachstumsphase lässt darüber hinaus auf eine negative Rückregulation des Gens schließen.

Die Steigerung der PrfA Transkription und die daran gekoppelte Expressierung an den Promotoren der Gene *actA*, *hly*, *plcA* und *mpl* sorgt für eine Steigerung ihrer Transkriptionsrate. Für die Expression von *plcA*, *plcB*, *mpl* und *actA* ist ein vorhandenes *prfA* sogar obligat [16].

Als einziges Gen besitzt *hly* zusätzlich einen schwachen Promotor, der ohne Einfluss von *prfA* für die Expressierung sorgt. Dies sichert das Überleben innerhalb der Wirtszelle, indem die

Lyse des Phagosoms ermöglicht wird. Eine weitere Ausbreitung im Gewebe bleibt jedoch unterbunden.

Bei einer Deletion von *prfA* ist auch der Pegel korrelierender Gene erniedrigt [24]. Es wird vermutet, dass die Expression von PrfA mit der Phosphorylierung der intrazellulären PTS-Permease zusammenhängt und durch induzierte Signale aus dem Zytosol geregelt wird [17].

Weitere Genomabschnitte von Bedeutung beinhalten die Gene *inlA*, *inlB* sowie *inlC*. *inlA* und *inlB* liegen direkt hintereinander in der Strangabfolge. Vor *inlA* befinden sich vier Promotoren. Von denen einer PrfA-abhängig ist. Kommt es zur Bindung an diesen Promotor, so werden die Gene von *inlA* und *inlB* transkribiert. Die Terminatoren zwischen beiden Genen haben dabei keine Stopfunktion. Wird jedoch einer der PrfA-unabhängigen Promotoren angesprochen so endet das Transkript beim Erreichen des korrelierenden Stopcodons, welches sich hinter dem Gen *inlA* und vor *inlB* befindet. Die Expression von *inlB* findet selten singular, aber oft in Kombination mit *inlA* statt.

Auch *inlC* wird öfter durch den PrfA-abhängigen Promotor, als durch sein unabhängiges Gegenstück transkribiert.

Die Promotoren lassen sich in verschiedene Stufen bezüglich ihrer PrfA-Abhängigkeit einteilen, die sich aus der Übereinstimmung zwischen PrfA und seinen Promotor-Boxen ergibt. So ist die Bindung zur PrfA-Box von *hly* und *plcA* größer, als die zu *inlA* und *irpA*. Entsprechend sind Promotoren mit einer hohen (benötigen wenig PrfA), einer niedrigen (benötigen viel PrfA) und keiner Affinität zu PrfA zu unterscheiden.

Adhäsion und Internalisation

Bei der Ausbreitung innerhalb des Organismus bedient sich *L. monocytogenes* seiner charakteristischen Oberflächenproteine um die Barrieren des Intestinaltraktes, der Bluthirnschranke und der Plazenta zu überwinden. Das Bakterium kann durch phagozytierende Zellarten des Immunsystems aufgenommen werden. Es ist aber auch selbständig in der Lage den Eintritt in Epithelgewebe zu fördern, deren Zellen keine aktive Aufnahme des Keimes betreiben. Verborgenen unter diesem physiologischen Deckmantel, erfolgt die Ausbreitung in Gewebsverbände, die auf rein hämatogenem Wege nicht erreichbar sind.

Zur Aufnahme dienen die Proteine Internalin A und B (InIA und InIB). Innerhalb von *L. monocytogenes* sind 25 verschiedene Internaline bekannt von denen aber nur die beiden erstgenannten eine entscheidende Rolle für die Invasion von Körperzellen spielen [18].

InIA bindet an E-Cadherin, ein Kalzium abhängiges Transmembranprotein. Dieses sitzt als Verbindungsprotein in der Zellwand von Epithelzellen. Es ist vor allem im Magen-Darm-Trakt zu finden. Die Anlagerung von InIA verursacht eine Neuausrichtung des zellulären Zytoskeletts. Dieses wird über eine aktivierte Signalkaskade der Proteine β -Katenin, α -Katenin, ARHGAP10, Arf6 und Vezatin ausgelöst, die die Myosinfilamentstruktur verändern [19]. So ist sowohl ein Durchdringen der Intestinal-, als auch der Plazentaschranke möglich.

Die orale Infektion von Mäusen ist nicht möglich, da diese andere E-Cadherin Rezeptoren besitzen, als der Mensch. Eine Aufnahme über das Epithel des Intestinaltraktes ist folglich nicht möglich. Die Infektion kann nur auf parenteralem Wege per Injektion in den Blutkreislauf erfolgen [20].

InIB ermöglicht den Eintritt in ein großes Spektrum an Zellen: Epithel-, Endothelzellen, Hepatozyten und Fibroblasten. Das Protein bedient sich dabei Met und gC1qR als Eindringrezeptoren. Auch dieser Vorgang wird über eine gestaffelte Signalkette reguliert. Die Bindung an das Met-Protein führt zur Phosphorylierung und zur Anlagerung von Cbl und Gab1, welche wiederum die Aktivierung der p85/p110 PI-3-Kinase in PIP3 fördern. Die Interaktionen führen zu einer Umstrukturierung des Aktinskeletts, an dessen Ende das Listerium ins Zelllumen inseriert wird [21]. Bei diesem Vorgang wird auch vom „Zipper-Mechanismus“ (Reißverschluss) gesprochen, da er durch eine progressive Interaktion der Oberflächenliganden herbeigeführt wird.

Expansion aus der Vakuole ins Zellzytoplasma

In die Zelle integriert, wird das Listerium in einer Vakuole vom intrazellulären Milieu abgegrenzt. Der Aufenthalt im Phagosom ist nur von kurzer Dauer: Das *hly* Gen exprimiert das Protein Listeriolysin O (LLO) innerhalb Phagosoms bei sinkendem pH-Wert. LLO gehört zu den durch Sulfhydryl-aktivierten Toxinen, wie Pneumolysin und besitzt zytolytische Aktivität, durch die das Phagosom zerfällt und *L. monocytogenes* ins Zytosol gelangt [22]. LLO bindet im sauren Milieu der Vakuole an Cholesterin. Synergistisch wirkt PlcA, die Phosphatidyl-Inositol-Phospholipase C, die den Effekt von LLO verstärkt [22].

Durch die Fähigkeit sich mittels LLO, PlcA und PlcB aus der Vakuole zu befreien [23], treffen die inserierten Keime im Zytosol auf Bedingungen, die einem nährstoffreichen Milieu entsprechen und ideale Voraussetzungen für eine erneute Replikation bieten.

Eine zentrale Rolle kommt dabei dem PrfA Protein zu. Es induziert die Expression der Gene, die für den Zelleintritt (*inlA* und *inlB*), Phagosomflucht (*hly* und *plcA*) und Überleben im Zytosol (*hpt*) mittels Glucoseaufnahme verantwortlich sind [24], [25]. Die initiale Steuerung geschieht durch die temperaturabhängige Sensitivität von *prfA* als Regulator der Virulenzaktivität [16].

Intrazelluläre Beweglichkeit

Die Rekrutierung von Aktinfilamenten sorgt für die Beweglichkeit innerhalb der Zelle. Das Protein ActA ist für die gezielte Steuerung des Aktins verantwortlich. Es ist 639 Aminosäuren lang und 90kDa schwer. Es ist das einzige Protein innerhalb des Genoms von *L. monocytogenes*, welches sich die umfangreiche Aktinvernetzung innerhalb des Zytosols zunutze machen kann. Bei Teilung der Bakterien entstehen Ansammlungen von Aktin am Pol des Organismus. Dieses Konglomerat wird durch die Proteine verknüpft und es bildet sich eine Schweifstruktur, die stabilisiert durch das Zytoskelett der Zelle und die fortschreitende Polymerisation von Aktin am Bakterium eine Fortbewegung durch die Zelle erlaubt. Hierbei wirken zusätzlich zu ActA das Vasodilatator-Protein (VASP) und Prolifin, die zusammen für eine Verbindung zwischen Bakterienprotein und Aktin-Zellgerüst sorgen [26].

Durch die fortwährende Anlagerung der Filamente ist eine gezielte Fortbewegung im Zellraum möglich. Dies geschieht mit einer Geschwindigkeit von bis zu 1µm/sec. Findet ein Bakterium erneuten Kontakt zur Zellwand, so beginnt es diese einzudrücken, um in Nachbarzellen einzudringen und den Prozess erneut zu beginnen.

Interzelluläre Beweglichkeit

Durch intrazelluläre Mobilität, ist *L. monocytogenes* in der Lage sich der Zellmembran zu nähern. Bei Kontakt wird die Zellwand durch das Bakterium nach außen gestülpt. Bei diesem Vorgang wird die Kontur der Nachbarzell-Membran verändert und das Bakterium dringt in den Nachbarorganismus ein. Dabei kapselt es sich mit Teilen der Zellmembran aus Herkunfts- als auch aus Zielzelle ab. Es befindet sich letztendlich in einer Doppelschicht aus zwei Zellmembranen im Zytoplasma der neu infizierten Zelle. Die Membranen werden durch LLO und Phospholipase C (PlcB) lysiert, um den Invasionsprozess erneut aufzunehmen [22].

1.4 Listeriose

L. monocytogenes ist der Überträger der Infektionskrankheit Listeriose und verbreitet sich vor allem durch kontaminierte Lebensmittel. Dabei sind besonders Artikel mit tierischen Fetten, wie Fleisch- und Milchprodukte, sowie Weichkäse betroffen. Diese werden oft als sekundär infiziert bezeichnet, da die Infektion im Zuge des Produktionsablaufes stattfindet. Primär infizierte Naturalien sind vor allem pflanzliche Nahrungsmittel, wie Kopfsalat oder Pilze, die durch die ubiquitäre Verbreitung des Erregers im Boden besiedelt werden [27].

Erst 1981 erkannte man die Rolle von Listerien beim Übertragen von Krankheiten durch Lebensmittel, als es in Halifax (Kanada) zum Ausbruch einer Epidemie mit 18 Todesfällen und 41 Erkrankten kam. Die Ursache wurde in durch Listerien kontaminierten Lebensmitteln gefunden. Seit diesem Vorfall gelten Listerien als Risikofaktor im Bereich der Lebensmittelindustrie [28].

Die Inkubationszeit bis zum Auftreten einer Erkrankung liegt zwischen einigen Tagen und mehreren Wochen. Listeriose ist eine opportunistische Erkrankung. Sie manifestiert sich nur, wenn die Abwehrlage des Wirtes geschwächt oder noch nicht ausgeprägt ist. De facto ist dies vor allem bei sehr jungen oder sehr alten Menschen der Fall.

Bei Schwangeren ist das Risiko der Erkrankung circa um ein 12-faches höher, als bei der übrigen Bevölkerung. Die Übertragung auf das Kind kann als „early-onset“ vor der Geburt, oder als „late-onset“ im Verlauf von 2-4 Wochen postnatal erfolgen. Bei geeigneter Therapie ist bei der späten Verlaufsform die Überlebensrate deutlich höher (26% bei late-onset zu 36% bei early-onset Mortalitätsrate) [27]. Rund 5 – 10% der Bevölkerung sind natürlicher Träger des Keimes, ohne dass dieser seine pathologische Wirkung entfaltet [29].

Eine Impfung gegen Listerien ist nicht möglich. Das Erscheinungsbild der Listeriose ist oft nicht eindeutig erkennbar. Die häufigsten Symptome die zur Erkennung führen sind Meningitis (32%) und Sepsis (26%). Die Eigenschaft der hämatogenen Streuung bewirkt entsprechende Fokalinfectionen, vorrangig in Leber und Milz. Aber auch Endokarditiden sind als Entzündungsherde möglich. Die Letalität bei Meningitis durch Listerien liegt bei 30%. In den USA sind Listerien die Ursache für 28% aller durch Lebensmittel verursachten Todesfälle [30]. Dabei wurden aus Lebensmittelproben öfter Serotypen 1/2a isoliert, aus klinischen Proben jedoch der Typus 4b. Folglich sind nicht alle Serotypen entsprechend an das Milieu des humanen Organismus, beziehungsweise die Besiedlung von Lebensmitteln angepasst [27].

Die Falldefinition der Listeriose wurde zum 1.1.2004 neu festgelegt. Seit diesem Zeitpunkt gilt in Deutschland die Mutter eines Neugeborenen, welches an Listeriose erkrankt ist, ebenfalls als infiziert. Diese Tatsache hat ab 2005 zu einem rapiden Anstieg der Fallzahlen geführt. Von 2001 bis 2004 stiegen die gemeldeten Zahlen für Erkrankungen durch Listeriose jährlich um 7-16% an.

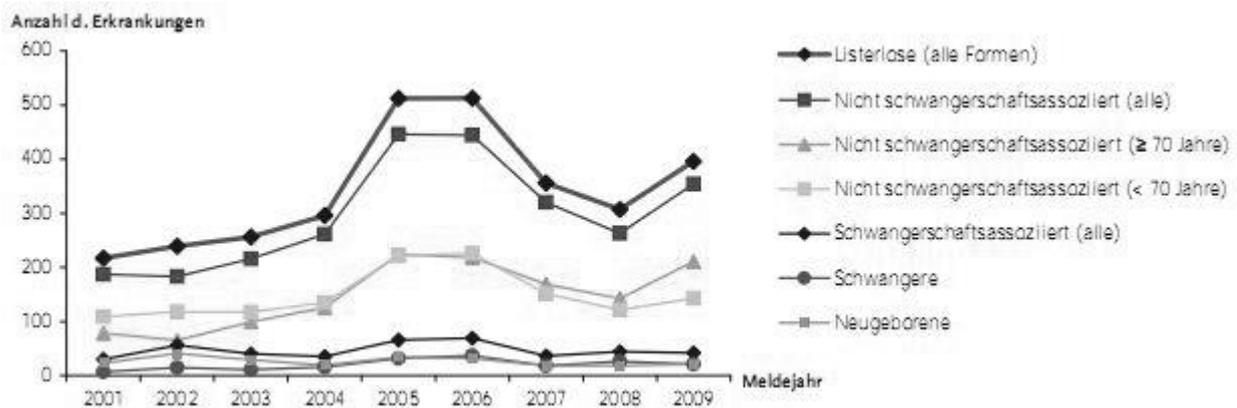


Abbildung 1.2(Quelle: Epidemiologisches Bulletin des Robert Koch Instituts, Stand: 08/2010) Gemeldete Krankheitsfälle von Listeriose innerhalb der letzten zehn Jahre. Deutlich zu sehen ist der Sprung aufgrund der veränderten Falldefinition zwischen 2004 und 2005

Ein saisonaler Trend ist dabei nicht zu erkennen. Die höchste Rate ist bei männlichen Neugeborenen auf (30-40 Fälle/Jahr) zu verzeichnen. Tritt Listeriose im Alter von 20 bis 50 Lebensjahren auf, so sind statistisch gesehen öfter Frauen als Männer von einer akuten Infektion betroffen. Ab dem 60. Lebensjahr erhöht sich aufgrund des schwächer werdenden Immunsystems die Gefahr der Erkrankung erneut. Hier sind vorrangig Männer betroffen [30].

Die Therapie der Listeriose gestaltet sich aufgrund der pathologischen Eigenschaften des Bakteriums, als schwierig. Es wird vermutet, dass dies der intrazellulären Fortpflanzung geschuldet ist. *L. monocytogenes* ist schwer für chemotherapeutische Anwendungen zu erreichen, die ihre Wirkung vormalig auf hämatogenem Wege entfalten. Als zusätzliche Barriere erweist sich die Bluthirnschranke, die für Antibiotika ein Hindernis darstellt, für *L. monocytogenes* jedoch passierbar ist.

Bei bakteriellen Meningitiden werden in erster Linie Cephalosporine verwendet. Als optimal wird eine Kombinationstherapie aus β – Laktam- und Aminoglykosidantibiotika erachtet. Dabei wird von einer täglichen Dosis von 8 - 12g bzw. 180-240mg (bei Verwendung von Ampicillin in Kombination mit Gentamicin) ausgegangen [31].

1.5 small non-coding RNA

Die Aufgaben der RNA liegen in der Regulierung genetischer Transkriptions- und Translationsvorgänge, Steuerung und Aufbau von Proteinen sowie der Kontrolle von katalytischen Fähigkeiten, ähnlich der von Enzymen.

ncRNA oder non-coding RNA sind Transkriptionsprodukte, die ausschließlich regulativen Aufgaben dienen. Ihre Transkription erfüllt keinerlei kodierende Prozesse, wie es bei mRNA der Falls ist. Non-coding RNAs sind eine Gruppe, zu der zum Beispiel tRNA (transfer-) oder rRNA (ribosomal-) gehören. Der Begriff sRNA (short-) wird dabei kleinen, nicht kodierender RNA bakteriellen Ursprungs vorbehalten. All diesen Ribonukleinsäuren ist gemein, dass sie in Interaktion mit anderen Zellkomponenten treten können.

Bei Eukaryonten erfolgt eine weitere Unterteilung in si(small interfering-) und mi(micro-) RNA. Beide haben eine Länge von 20 – 25nt und sind doppelsträngig. siRNA leiten den Abbau synthetisierter mRNA ein, sie werden aus ihrer Doppelstrang-Struktur entwunden. Verschiedene Stränge lagern sich zu RISCs (RNA induced silencing complexes) zusammen. Diese binden abzubauen Sequenzen an sich. Dabei muss eine absolute Übereinstimmung zwischen siRNA und Ziel-mRNA herrschen.

miRNA hingegen verfolgen keinen aktiven Abbau, sondern erreichen durch Bindung eine Hemmung der mRNA Funktion. Sie werden vor Beginn ihrer Funktion durch miRNA prozessiert und tolerieren eine oder mehrere Fehlpaarungen in der Zielsequenz. Dies ermöglicht der miRNA ein größeres Wirkspektrum als der siRNA [33],[32].

1.6 Bakterielle nicht kodierende sRNA

Bei prokaryontischer small non coding RNA ist die Funktionsweise eine andere, als bei eukaryontischen si- und miRNA. Bei der Synthese erfolgt aufgrund des fehlenden Zellkerns keine Auftrennung von Transkription und anschließend erfolgender Entfaltung der Aktivität. Innerhalb von Bakterien finden diese Prozesse simultan statt [33].

Nicht kodierende kleine RNA sind wichtige Regulatoren im Zellmetabolismus. In Bakterien kommt ihnen die Aufgabe der Steuerung der Genexpression zu. Dies wird sowohl auf Transkriptions- als auch auf Proteinebene (posttranskriptorisch) reguliert. Sie koordinieren die Anpassung der Bakterien an veränderte Umwelteinflüsse. Zudem sind sie Kontrollfaktoren, die

die Genexpressionen stark beeinflussen können. sRNA sind im Gegensatz zu si- und miRNA schon seit knapp 30 Jahren bekannt [34].

Das Maß an aktiven sRNA resultiert aus dem Gleichgewicht der synthetisierten und degradierenden sRNA-Stränge. Eine im Zellorganismus befindliche sRNA wird durch ihre Degradation inaktiviert. Daraus ergibt sich die Halbwertszeit als kritischer Parameter für den Einfluss der einzelnen sRNA. Sie können nicht wie Proteine deaktiviert werden. Ihre Lebenszeit unterscheidet dabei stark (von wenigen Minuten, bis zu einer halben Stunde) und erfolgt aus den kontinuierlichen Anpassungen an externe, differierende Einflüsse. Die Halbwertszeit ist aber auch von der Interaktion der sRNA mit ihrem Ziel abhängig. Hat die Ziel-RNA eine deutlich kürzere Lebenszeit als sein Regulator, wird die steuernde sRNA oft mit abgebaut [35].

Die meisten sRNAs wurden per Zufall entdeckt, bei der Analyse benachbarter, proteinkodierender Gene. Erst seit 2001 wird systematisch nach kleinen nichtkodierenden RNAs gesucht. Nachdem erkannt wurde, wie reichhaltig verschiedene sRNAs in unterschiedlichen Spezies zu finden sind, wurde das Thema von immer mehr Forschungsgruppen aufgegriffen. Charakteristika, die sich bei der Suche nach weiteren sRNAs als nützlich erwiesen haben sind:

- (1) Nicht kodierende RNAs werden oft zwischen verschiedenen Spezies konserviert. Dabei wird mittels Computeranalyse auf mögliche Sekundärstrukturen analysiert, die in beiden Stämmen vorkommen.
- (2) Häufig findet man sRNA in der intergenomischen Region (UTR, Untranslated Region) zwischen zwei kodierenden Genen positioniert. Lässt sich die gleiche Konstellation mit den Nachbargenen in anderen Spezies wiederfinden, so ist dies ein Anzeichen für eine autonome Transkriptionseinheit [36].
- (3) small RNAs enden häufig in rho-unabhängigen Terminatoren. Ein solches, „verwaistest“ Stopcodon (engl. orphan transcription terminator [37]) ist oftmals mit einer hohen Konservierungsrate verbunden.
- (4) Die Bindung an die Protein-Chaperone Hfq, ist zusätzlich ein möglicher Hinweis auf eine vorliegende sRNA.
- (5) Es sollte beachtet werden, dass sRNA, wie ihre Bezeichnung es wiedergibt klein sind. Ihre Klonierung setzt Produkte von einer Größe um ca. 100nt voraus [38].

Ist eine sRNA erkannt, so kann über den Promotor und seine Expressionsbedingungen die Bedingung definiert werden, unter der die sRNA transkribiert wird. In Folge dessen kann auch nach dem möglichen Ziel einer erkannten Sequenz geforscht werden.

Die Länge von small RNA differiert zwischen 20 und 500nt. sRNA werden nicht in Proteine überscriben. Es wird zwischen drei Klassen unterschieden:

- (1) sRNA in direkter Interaktion mit anderen RNA oder Proteinen
- (2) Riboswitches (genetische Strukturen zur Veränderung der Transkriptionsleistung)
- (3) CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats).

Die meisten sRNA interagieren mit mRNA. Es wird unterteilt in RNA mit hohem Bindungspotential zum Reaktionspartner und solchen mit niedriger Kongruenz. Zusätzlich muss zwischen cis- und trans-RNA unterschieden werden. Dies bezeichnet den Strang, von dem die Abschrift der RNA erfolgt, oder die Interaktion stattfindet.

Cis- und Trans-agierende sRNA

Die cis kodierte RNA wird komplementär vom Gegenstrang abgeschrieben und hat somit die gleiche Basenabfolge, wie die Ziel-RNA. Die meisten cis-RNA werden durch Bakteriophagen, Plasmide und Transposons synthetisiert. Im Allgemeinen ist die Rolle der cis-RNA innerhalb von Bakterien noch nicht vollständig erfasst [34].

Abbildung 1.3(Quelle: Waters LS, Storz G, 2009) Möglichkeiten der Interaktion zwischen Ziel-RNA (blau) und der agierenden Cis-sRNA (auch Antisense-sRNA, Rot). Die Anlagerung der sRNA verhindert die Ribosombindung der mRNA und führt zur Degradation der RNA (links). Die Anlagerung kann zur Ausbildung von Lücken innerhalb der Translation, zur verfrühten Termination und verkürzten Transkriptionsprodukten führen (Mitte, Rechts)

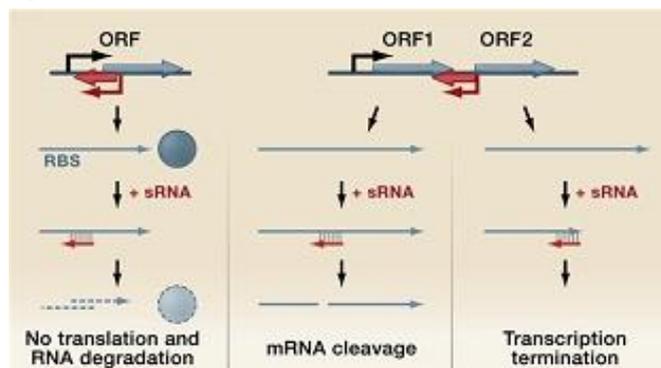
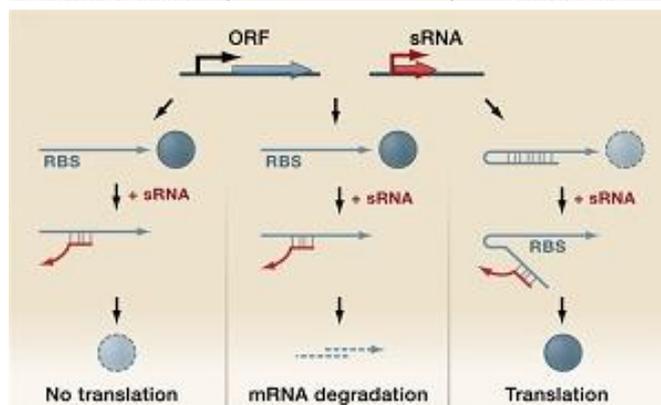


Abbildung 1.4(Quelle: Waters LS, Storz G, 2009) Die Trans-sRNA (Rot) hat eine geringere Übereinstimmung mit der Ziel-RNA (Blau) als Cis-kodierte sRNA. Sie kann die Ribosombindungsstelle besetzen (Links), für eine Degradation der Ziel RNA sorgen (Mitte) oder die Ausbildung von inhibierenden Schleifenstrukturen unterbinden und so die Translation fördern (Rechts)



Trans-sRNA habe eine geringere Deckungsgleichheit in der

Nukleotidabfolge, als die cis-RNA. Daraus ergibt sich auch eine größere Vielfalt von Bindungsmöglichkeiten an Ziel-RNA. Trans-sRNA regulieren die Translation und Stabilität von mRNA und sind das prokaryontische Analogon zu miRNA. So ist ihre Wirkung überwiegend hemmend (Silencer). Für RNA-RNA Interaktionen sind trans-RNA in vielen Fällen auf die Chaperone Hfq angewiesen [34].

Riboswitches

Die fortwährende Expression von Regulationsproteinen ist ein sehr verschwendungsintensiver Prozess. Dabei werden zudem konstant Ressourcen des Zellmetabolismus gebunden, der Vorgang erlaubt der Zelle jedoch, schnell auf physiologische Veränderungen zu reagieren. Alternative, einfache Regulationsmechanismen sind Riboswitches [39]. Sie sind in der Lage verschiedene Konformationen anzunehmen und dadurch befähigt durch Signale verschiedene metabolische Kaskaden zu regulieren. Riboswitches bestehen aus zwei Anteilen:

Das Aptamer ist die Bindungsstelle des Liganden. Es befindet sich meistens in der 5'-UTR (untranslated region) strangaufwärts des entsprechenden Gens, welches durch den Riboswitch kontrolliert wird.

Findet eine Anlagerung statt, so kommt es zu Konformationsänderung der Expressionsplattform. Diese ist für die Regulation von Transkription oder Translation entscheidend. Häufiger ist dabei die Hemmung des kontrollierenden Vorganges. So können durch gleiche Aptamere Expressionen in unterschiedlichen Kontexten durchgeführt werden

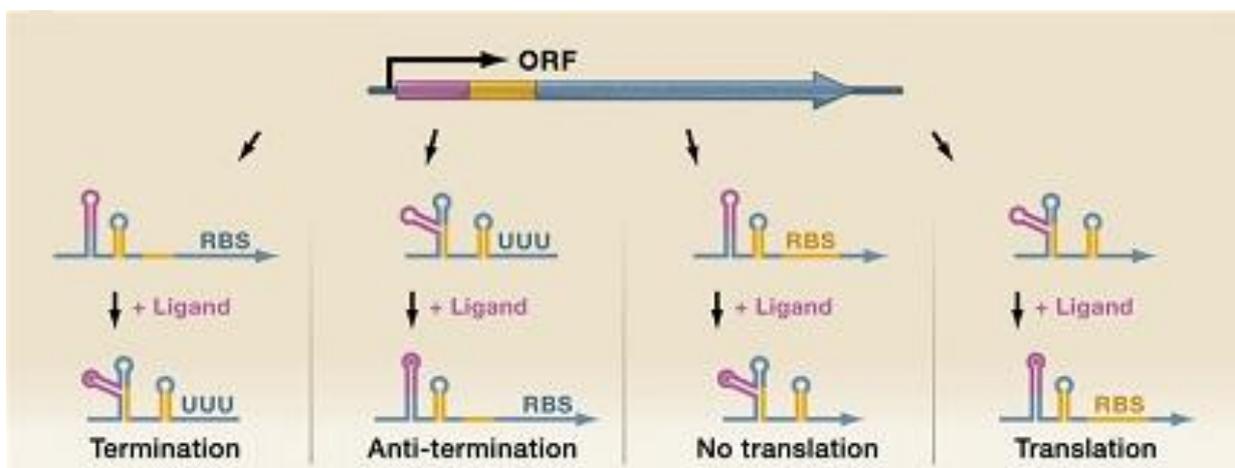


Abbildung 1.5 (Quelle: Waters LS, Storz G, 2009), Darstellung der Funktionsweise eines Riboswitch. Die Riboswitches, bestehend aus Aptamer (Pink) und Expressionsplattform (Gelb). Links: Die Ligandenbindung sorgt für eine Konformationsänderung, resultierend wird die ribosomale Bindungsstelle (RBS) in einen transkriptionellen Terminator umgebaut. Mitte Links: Die initiale Haarnadelstruktur wird durch die Ligandenbindung entfernt und die RBS freigesetzt. Mitte Rechts: Die RBS ist zugänglich, wird aber per Riboswitch in eine inhibitorische Schleife verwandelt. Rechts: Kontakt zur Aptamerregion öffnet den Zugang zur RBS

[34].

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

Bei CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) handelt es sich um repetierende Sequenzen mit einer Länge von 24-47bp. Diese werden durch sogenannte Spacer unterbrochen (26-76bp) und wiederholen sich 2-249mal. Eingeleitet werden sie durch eine sogenannte Leadsequenz (ca. 550bp), an die sich die reproduzierten Abschnitte anschließen. Sie teilen gewisse Eigenschaften mit den eukaryontischen siRNA. Ihnen wird die bakterieninterne Resistenz gegen Phagen und Plasmid Konjugationen zugeschrieben [40]. So korrelieren neue Spacer mit Phageninfektionen und vermitteln dem Bakterium eine Immunität gegenüber erneuten Angriffen und dienen entsprechend als immunologisches Gedächtnis [34].

Als Ansatz zur experimentellen Analyse von sRNA eignen sich isogene Mutanten. Die Nukleotidabfolge der betreffenden sRNA wird dabei aus dem Bakteriengenom entfernt. Zeigt der Ablegermutant einen Unterschied zu seinem Stammvater bezüglich seines phänotypischen Verhaltens, so ist dies auf die fehlende Regulation durch die entsprechende, deletierte Basensequenzen zurückzuführen. Dabei hat sich aufgrund zahlreicher Analysen die Zahl der entdeckten sRNA innerhalb der letzten fünf Jahre stark erhöht. Sie werden als das fehlende Bindeglied in der Kette der Bakterienregulation angesehen, und sind trotzdem noch weitestgehend unbekannt, was ihre Interaktions- und Steuerungsmöglichkeiten angeht.

1.7 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel die sRNA aus fünf verschiedenen intergenomischen Bereichen zu analysieren. Zu diesem Zweck werden aus dem Genom von *Listeria monocytogenes* EGD-e die betroffenen Sequenzabschnitte entfernt und die benachbarten Bereiche miteinander verknüpft. Durch diesen Vorgang entstehen Deletionsmutanten, denen bis auf die bezeichnete Sequenz das gesamte Repertoire der genetischen Möglichkeiten des Bakteriums *Listeria monocytogenes* zur Verfügung steht.

Die fünf zu generierenden Deletionsmutanten wurden gemäß *in-silico* Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Dr. T. Hain und den in Abschnitt 1.6 genannten Kriterien ausgewählt. Dazu kommt ferner die starke Differenz von extra- zu intrazellulärer Transkriptionsrate innerhalb des Genoms.

Außerdem wird eine Proteindeletion durchgeführt. Diese hat zum Ziel den Einfluss des Gens *Imo0559* zu untersuchen, welches in enger Korrelation mit einer der zu erstellenden Mutanten steht. Hier wird vermutet, dass die benachbarte sRNA $\Delta rli31$ einen Riboswitch für das folgende Gen (*Imo0559*) beinhaltet.

Die Mutanten werden nach ihrer Fertigstellung auf Wachstumseigenschaften unter extrazellulären Bedingungen getestet. Dabei wird auch das veränderte Verhalten bei Verwendung verschiedener Zusätze analysiert. Es finden Infektionssassays in Makrophagen, in Larven der Schmetterlingsmotte *Galleria Mellonella* und in Mäusen statt.

Diese Experimente sollen das intrazelluläre Erscheinungsbild der Deletionsmutanten im direkten Vergleich zum Wildtyp EGD-e untersuchen. Durch Steigerung der Komplexität des Versuchsmodells, von einfachen Zellverbänden hin zu Organismen mit eigenem Immunsystem wird Aufschluss über die regulativen Einflüsse der untersuchten sRNA erwartet.

Weiterhin wird die Proteinexpression in der Phase des exponentiellen Wachstums untersucht und eine RNA-Analyse der Proteindeletion von *Imo0559* im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt. Alle Mutanten werden im Fluoreszenzmikroskop bezüglich phänotypischer Auffälligkeiten untersucht.

Aus diesen Experimenten ergibt sich ein Gesamtbild. Dieses soll nähren Aufschluss darüber geben, welchen Einfluss die fünf sRNAs auf den *in-vivo* Stoffwechsel des Bakterium *L. monocytogenes* haben.

2. Material

2.1 Eukaryontische Ziellinien

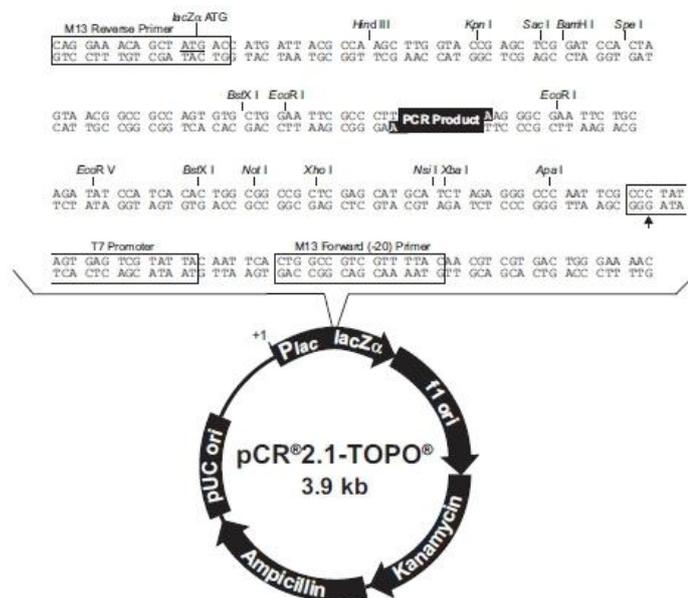
Die kultivierten Zellen sind P388D1 Makrophagen. Sie entstammen dem Immunsystem der Maus und werden in RPMI Medium mit 10% FKS (Fötales Kälber Serum) kultiviert. Diese Mischung ist speziell auf Leukozyten abgestimmt und fördert eine Zellwachstumsrate, die eine Verdoppelung der Zellzahl innerhalb von 3-4 Tagen ermöglicht.

Die Zellen werden auf handelsüblichen Brutplatten bei 37°C im CO₂-Brutschrank gelagert. Das Medium wird alle zwei Tage gewechselt. Bei Erreichen ausreichender Zelldichte werden die Platten geteilt, so dass je die Hälfte der vorhandenen Zellen auf einen neuen Boden versetzt werden. Die Kontrolle des Wachstums erfolgt mittels Lichtmikroskop bei einer 30- bis 60-fachen Vergrößerung.

2.2 Bakterienstämme

Escherichia coli DH 10β

Listeria monocytogenes EGD-e
(1/2a)



2.3 Plasmide

Topo -Vektor

Topo TA Cloning Kit mit chemisch kompetenten TOP10 Zellen, Invitrogen GmBbH, Karlsruhe

Abbildung 2.1 Topo-Vektor Plasmidkarte, Schnittstelle innerhalb des lacZ Gens, so dass eine Farbunterscheidung der gewachsenen Kolonien möglich ist. Nur Plasmide mit einem erfolgreichen Insert bleiben ohne Blaufärbung (Quelle: www.invitrogen.com)

pAUL-a Vektor

Temperatursensitives Plasmid mit integriertem lacZ Gen, Em-Resistenz ori^{ts} und Schnittstellen für Verdauungsenzyme Bam HI und Sal I

Deletionsmutanten

$\Delta rli31$

$\Delta lmo0559$

$\Delta rli33-1$

$\Delta rli33-2$

$\Delta rli53$

$\Delta rli50^*$

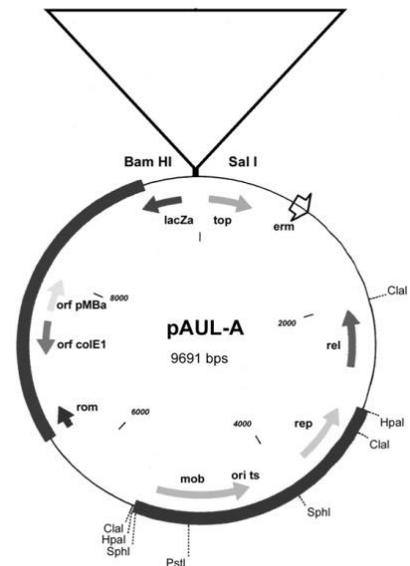


Abbildung 2.2 pAUL-a Vektor, der Pfeil oberhalb des Plasmids markiert die Stelle des Inserts, flankiert von den Schnittstellen für die Verdauungsenzyme. Hier ist keine Farbeunterscheidung möglich.

Die genaue Positionierung im Genom von *Listeria monocytogenes* befindet sich in der Genkartierung im Anhang.

Die Deletionsmutanten wurden ausgehend von chromosomaler DNA vom Wildtyp EGD-e (1/2a) erstellt.

2.4 Verwendete Primer

Als Grundlage der Primersynthese dient DNA von EGD-e des Serotyps 1/2a. Entsprechende PCR Produkte werden mit unten gelisteten Primern erstellt (siehe auch Abschnitt: 3.9, Deletionsmutanten)

Mutante / Primer	Sequenz(5'->3')	Länge P1-P2 bzw. P3-P4	Größe der Deletion
<i>Δrli31</i> sRNA-5-P1 sRNA-5-P2 sRNA-5-P3 sRNA-5-P4 sRNA-5-P7 sRNA-5-P8 sRNA-5-P7 sRNA-5-P8	gatagataccttgctctcg ctctatttctaagtatatcttacttactt agatatacttagaataagagatgctctgaa cgtattcaaagtgagcacgt gcaactccacctttatcgcc cgtgtaatatattgattgctcattg gcaactccacctttatcgcc cgtgtaatatattgattgctcattg	252nt 228nt	146nt
<i>Δlmo0559</i> lmo0559-P1 lmo0559-P2 lmo0559-P3 lmo0559-P4 P5-lmo0559-del P6-lmo0559-del	gtattgactaagacataaaaag ttttgtattttattcctcctactttcct gatgaataaaaataacaaa*aaagcccttctt gccttctacccttgatgcag ccgatataagcagttgcttg ctgcagaatattacgcaggc	252nt 343nt	906nt
<i>Δrli33-1</i> sRNA-6-P1 sRNA-6-P2 sRNA-6-P3 sRNA-6-P4 sRNA-6-P7 sRNA-6-P8	ctattatatcccgacagcgg aaatattggtgttatataatacccgtctca attataaacaccaatattataaatgccca ccatccgttgatgattgcga gaaaatgaaggttacgatgcc gcgcctattttcacaggcct	251nt 434nt	184nt
<i>Δrli33-2</i> sRNA-7-P1 sRNA-7-P2 sRNA-7-P3 sRNA-7-P4 sRNA-7-P7 sRNA-7-P8	gtgggtgtctttacttacc gattcataaaatgattatactacattaca tataaatcattttatgaatctttattgtaa gccagaatcatgtaagcgtc ggaaatcgaccgagagga tatccccatcaccatattgg	266nt 384nt	426nt
<i>Δrli53</i> sRNA-9-P1 sRNA-9-P2 sRNA-9-P3 sRNA-9-P4 sRNA-9-P7 sRNA-9P8	caccctcgctgccatcagca ataacctctgttatattatagcgcaattt ataatataacaggaggttatttttatgctc cgacatcaagattgcttgtt ccgtccgttattgctataacc gcgcggctcatgcgagataat	248nt 349nt	193nt
<i>Δrli50*</i> sRNA-17-18-P1 sRNA-17-18-P2 sRNA-17-18-P3 sRNA-17-18-P4 sRNA-17-18-P7 sRNA-17-18-P8	cagtcaaacgcgatatgccg aatttagtagtcaggagtcattgtagcgc gactccctgactactaaattattatagca gacaattctacaaggatacgc gcgtaacattacacagtttt ttgattgactacagcgtggc	252nt 354nt	265nt

2.5 Anzuchtmedien

BHI	Brain Heart Infusion, nährstoffreiches Brutmedium für das Wachstum von Bakterien, vor allem für <i>L. monocytogenes</i> geeignet 37g Brain Heart Infusion, ad 1l H ₂ O
CCMB80	11,8g CaCl ₂ x 2H ₂ O (80mM), 4,0g MnCl ₂ x 4H ₂ O (20mM), 2,0g MgCl ₂ x 6H ₂ O (10mM), 10ml 1M Kaliumacetat (pH 7,0) (10mM), 100ml Glycerol (10%) ad 1L Aqua dest.; pH mit HCl auf 6,4 eingestellt, steril filtriert und bei 4°C gelagert
FKS	100% Fötale Kälberserum
LB	Luria Bertani Broth oder Lysogeny Broth, gilt als Standard bei der Kultivierung von <i>E. coli</i> 10g (10%) Trypton, 5g (5%) Yeast Extract, 5g (5%) NaCl, ad 1l H ₂ O
PBS	Phosphated Buffered Saline von Dulbecco
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SOB	2% Bacto Trypton (GibcoBRL), 0,5% Bacto-Hefe-Extrakt (Gibco BRL), 10mM NaCl, 2,5 mM KCl
SOC	Super Optimal Broth Medium mit Zusatz von 20mM Glucose. Wurde für die Erhöhung der Effizienz von Transformationen von Plasmiden entwickelt [41]
SDS	Sodium Dodecylsulfat (C ₁₂ H ₂₅ SO ₄ Na)
MM	Minimal Medium, abgestimmt auf die Mindestwachstumsanforderungen, die Listerien zur Zellteilung benötigen, Wachstum findet sehr langsam statt

Für 50ml Minimal Medium:

Salzkonzentration A	5,0 ml
Salzkonzentration B	0,5 ml
Glucose 20%	2,5 ml
Aminosäuren	0,5 ml
Cystein	1,0 ml
Glutamin	1,0 ml
Fe-Citrat	1,0 ml
Riboflavin	25 µl
Biotin	25 µl
Thiamin	50 µl
Thiolicacid	2,5 µl
Aqua dest.	38,5 ml

Salzkomponente A	82,1 g Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) 32,8 g KH ₂ PO ₄ (wasserfrei) ad 500ml H ₂ O, autoklaviert, Lagerung bei RT
Salzkomponente B	4,1 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Heptahydrat) ad 100ml H ₂ O, autoklaviert, Lagerung bei RT
Glukoselösung	20,0 g D-Glucose (wasserfrei) ad 100ml H ₂ O, steril filtrieren (0,22µm Filter), Lagerung bei RT lichtgeschützt bei 4°C
Aminosäuren	1,0 g L-Leucin (Fluka) 1,0 g L-Isoleucin (Fluka) 1,0 g L-Arginin (Merck) 1,0 g L-Methionin (Fluka) 1,0 g L-Valin (Fluka) ad 100ml H ₂ O, steril filtrieren (0,22µm Filter), Lagerung lichtgeschützt bei 4°C
Cystein	0,5 g L-Cystein (Fluka) ad 100ml H ₂ O, steril filtrieren (0,22µm Filter)

Glutamin	3,0 g L-Glutamin (Fluka) ad 100ml H ₂ O, steril filtrieren (0,22µm Filter)
Eisencitrat	0,44 g Eisen (III)-Citrat, granuliert (Merck) Über Nacht auf Heizrührer (ca. 60°C) in 100ml heißem Wasser lösen, steril filtriert
Riboflavin	0,1 g Riboflavin (Vitamin B2; Sigma) Ad 100ml 1M Ameisensäure (3,8,ml Ameisensäure + 96,2ml H ₂ O), steril filtrieren (0,22µm Filter), Lagerung lichtgeschützt bei -20°C
Biotin	0,1 g (+)-Biotin (Fluka) Ad 100ml 0,1M NaOH, steril filtrieren (0,22µm Filter), Lagerung lichtgeschützt bei -20°C
Thiamin	0,1 g Thiamin (Vitamin B1; Hydrochlorid, Sigma) Ad 100ml H ₂ O, steril filtrieren (0,22µm Filter), Lagerung bei -20°C
Thiolicacid	0,01 g DL-6,8-Thioctic Acid (Sigma) In 100ml 70% EtOH lösen, Lagerung bei -20°C

2.6 Antibiotika

Zur Kontrolle der eingebrachten Plasmide (siehe Abschnitt 2.3), haben diese ein integriertes Resistenzgen gegen bestimmte Antibiotika-Strukturen. Die jeweilige Eigenschaft ist im inserierenden Vektor vorhanden und geht bei erfolgreicher Transformation in das Erbgut des erzeugten Organismus über. Werden die Mikroorganismen anschließend auf Agarplatten mit dem betreffenden Antibiotikum konfrontiert, so überleben aufgrund der genetischen Konstitution nur die, welche über die Möglichkeit verfügen, das Antibiotikum in seiner Struktur zu zerstören.

Folglich lässt sich nach Transformation und Bebrütung eine Anzahl an Kolonien finden, die durch die implizierte Resistenzinformation überleben. Bei diesen Organismen kann von einer erfolgreichen Transformation des Plasmids ausgegangen werden.

Im Zuge der Herstellungsmethoden für Deletionsmutanten wurden folgende Antibiotika verwendet:

Ampicillin

Aminopenicillin ist ein Breitbandantibiotikum mit einem Wirkungsbereich im gramnegativen Spektrum. Effekte erfolgen vor allem bei den Zellen, die sich im Wachstum und in Teilungsphasen befinden. Der bakterizide Wirkungsmechanismus wird vor allem durch eine Verhinderung der Zellwandsynthese erreicht. Neu strukturierte Abgrenzungen werden nur fehlerhaft ausgeführt. Dies geschieht durch die Reaktion des Antibiotikums mit den Penicillinbindenden-Proteinen, wie D-Alanin-Transpeptidase, die durch die Bindung nicht mehr in den Syntheseprozess einbezogen werden können.

Mittlerweile hat sich der Resistenzgrad bei Keimen durch Penicillinase-Fähigkeit erhöht. Die Verwendung von Ampicillin erfolgte als Zusatz in gegossenen Agarplatten mit einer Konzentration von 100 µg/ml.

Erythromycin

Als gut gewebeängigiges Schmalspektrum-Antibiotikum wird es vor allem in der Pädiatrie und bei Atemwegsinfektionen verwendet, hier insbesondere bei nachgewiesenen Infekten mit anaeroben Keimen.

Es gehört zur Gruppe der Makrolide und ist chemisch gesehen ein Glykosid. Seine Wirkung ist bakteriostatischer Natur. Durch die Hemmung der Proteinsynthese wird der Keim nicht abgetötet, jedoch seine Teilung und Fortpflanzung verhindert.

Da Erythromycin nicht säurestabil ist, wird im klinischen Alltag eine parenterale Gabe bevorzugt.

Auf *E. coli* hat es keinerlei Wirkung und wird innerhalb der Versuchsreihen nur in Verbindungen mit *L. monocytogenes* verwendet. Dabei wurden in gegossenen Agarplatten Konzentrationen von 300 und 5 µg/ml verwendet.

Gentamicin

Ein Mitglied der Aminoglykosid-Familie mit guter Wirksamkeit gegen Bakterien. Es wirkt bakterizid auf proliferierende und ruhende Bakterien. Durch Bindung an die 30S-Untereinheit der Ribosomen wird die Proteinbiosynthese gestört und die Zellwandsynthese behindert. Die Gabe erfolgt aufgrund schlechter Resorption parenteral, was auch der Grund für eine mögliche Anreicherung in den Lymphgängen des Innenohres und der Nierentubuli ist. Dieser Um-

stand kann zu oto- und nephrotoxischen Konzentrationen führen. Die Anwendung wird auf schwere bakterielle Infekte beschränkt. So findet der Gebrauch vor allem bei nosokomialen Infekten statt.

In den Versuchsbedingungen der Infektionsversuche wird ein Antibiotikum benötigt, welches zuverlässig alle außerhalb der Zellen vorhandenen Bakterien zugrunde richtet. Gentamicin ist ein Therapeutikum, welches die geforderten Bedingungen mit großer Effizienz erfüllt [42]. Die verwendeten Konzentrationen 20ng/ml wurde während der Infektionssays in Makrophagen in RPMI-Medium verwendet.

2.7 Restriktionsenzyme

Folgende Restriktionsenzyme wurden verwendet, um die Transformation vom Topo-Vektor in das pAUL-a Plasmid zu ermöglichen:

BamHI	Fast Digest Restriction Enzymes, Fermentas GmbH
Sall	Fast Digest Restriction Enzymes, Fermentas GmbH
XhoI	Fast Digest Restriction Enzymes, Fermentas GmbH
NcoI	Fast Digest Restriction Enzymes, Fermentas GmbH

2.8 Geräte

Gerät	Hersteller
7900HT Fast Real Time PCR System	Applied Biosystems
2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems
Biofuge 15R	Heraeus, Laborzentrifuge
Biofuge 15	Heraeus, Tischzentrifuge
Capitance Extender	Bio-Rad
Elektrophoresekammer	Eigenbau, Institut
Gene Pulser	Bio-Rad
Infinite 200 Pro NanoQuant	Tecan
Inkubator 3250	Forma Scientific
Keyence BZ 9000	Biozero, elektronisches LM

Molecular Imager Gel Doc XR System	Bio-Rad
Mettler H54	Feinwaage
Nanodrop	Thermo Scientific
Pulse Controller	Bio-Rad
Thermomixer	k/A
Ultrospec 3000 UV/Visible Photometer	Pharmacia Biotech
Vortex	Janke & Kunkel
Wasserbäder	GFL, Infors

2.9 Kits

Aufreinigung:	Wizard SV Gel and PRC Clean Up System, Promega Coop USA QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN
Plasmidisolierung:	QIAprep Spin Mini Prep Kit, QIAGEN
RNA Isolierung:	RNeasy Mini Kit, QIAGEN RNase Free DNase Set; QIAGEN
Transformation:	Topo TA Cloning Kit, Invitrogen
Realtime PCR	Qiagen OneStep RT-PCR Kit
Zellfixierung	Prolong Gold Antifade, Invitrogen

2.10 Software

Seq Man Pro Vers. 8.0.2	Lasergene DNA Star
SeqBuilder Vers. 8.0.2	Lasergene DNA Star
BZ Analyzer	Keyence, Bildverarbeitung
Microsoft Word 2007	Microsoft
Microsoft Excel 2007	Microsoft

3. Methoden

3.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Um die quantitativen Anteile von Nukleinsäuren zu bestimmen, wurde die spektrophotometrische Messmethode angewendet. Gemessen wurde mit dem Nanodrop bei einer Wellenlänge von 260nm für DNA und 280nm für RNA. Dies ermöglicht bei aufgereinigten Proben einen Rückschluss auf den Nukleinsäuregehalt. RNA Proben wurden bei 260 und 280nm gemessen. Das Verhältnis der gemessenen Werte zueinander gibt Aufschluss über den Reinheitsgrad der RNA und sollte bei 1,8 – 2,0 liegen.

3.2 Amplifizieren der DNA Produkte mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion dient der Vermehrung von DNA Produkten. Sie beruht auf einem zyklischen Prozedere, bei dem verschiedene Temperaturstufen in einem definierten Rhythmus durchlaufen werden. Im Idealfall verdoppelt sich innerhalb jedes Zyklus der Anteil an vorhandener DNA durch die Wirkung der vorhandenen Polymerasen.

Durch Erhitzen trennen sich die DNA Stränge voneinander. Anschließendes Abkühlen ermöglicht die spezifische Anlagerung der Primer. Eine hitzestabile Polymerase sorgt für die Verlängerung der gebundenen Primer, wenn die benötigten Basen (dNTPs) im Puffer in ausreichender Menge vorhanden sind.

Ansatz 50µl

5µl	5xPuffer
2µl	dNTPs
1µl	Primer A
1µl	Primer B
1µl	Template DNA
0,2µl	Taq Polymerase (Fermentas)

Temperaturprogramm

94°C 2 Min

94°C 20 Sec

50°C 30 Sec

72°C 60 Sec Zyklus 30x

72°C 15 Min

4°C ∞

3.3 Gelelektrophorese von DNA Fragmenten auf Agarose

Agarose Gele dienen der Auftrennung von Proteinen, DNA- oder RNA-Produkten.

Das TBE - Gel (Tris-Borat-Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA) besteht aus Agarose, TBE-Puffer, Wasser und Zusätzen von Ethidiumbromid für die Sichtbarkeit der Banden unter UV-Licht.

Die Gitterstruktur, die durch Aushärtung der Agarose entsteht erlaubt, je nach Größe der Produkte, eine unterschiedlich große Wanderungsgeschwindigkeit innerhalb des Gels beim Anlegen einer Spannung.

Die Größe der PCR-Produkte ist, durch die vorher *in-silico* gesetzten Primer bekannt. So gibt die Kontrolle per Agarose Gel zwar keinen präzisen qualitativen, aber immerhin einen quantitativen Nachweis über das erstellte Produkt und seine Größe.

Zusätzlich ist es möglich die eindeutige Funktion der Primer zu kontrollieren. Das Entstehen von Doppelbanden ist ein Anhaltspunkt für mehrfache Bindungsstellen der Primer im Genom. Diese Mehrfachbindungen erfordern eine erneute Primerdefinition, um eine reine Einfachbindung im Genom zu erreichen.

Verantwortlich für die Gelstruktur ist Agarose, eine Verkettung von D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose. Der Anteil im Gesamtvolumen liegt bei 1% für herkömmliche DNA Fragmente und bei 2% für RNA Produkte.

Aufgrund der gesetzten Primer sind keine Produkte zu erwarten, die größer als 1kB sind. Als parallel laufender Marker wurde ein handelsüblicher 1kB+ Ladder verwendet, der eine Aufteilungskontrolle im Bandenbereich zwischen 100 und 1000nt bietet.

Durch Erhitzen der TBE Lösung mit Agarose Zusatz, lösen sich die Pulverbestandteile im Puffer und lassen sich in einen vorbereiteten Gelrahmen gießen. Dieser ist mit Kämmen ausgestattet, die als Platzhalter für die späteren Proben dienen. Die Lagerung des ausgekühlten Gels erfolgt in vorbereiteten Kammern mit 1xTBE Puffer bei Raumtemperatur.

Als Spannungs- und Stromwerte werden 250V bei 150mA verwendet. Das Gel wird für eine Stunde an Spannung gelegt und anschließend ausgeschnitten. Die Auswertung erfolgt im Biorad Photometer unter UV-Licht.

3.4 Reinigung der DNA Fragmente

Die Aufreinigung erfolgt gemäß Gebrauchsanweisung mittels QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN. Im späteren Verlauf der Versuche werden zudem das Wizard SV Gel and PRC Clean Up verwendet, da dieses bei niedrigen Ausgangskonzentrationen effizientere Ergebnisse liefert.

Beide Systeme sind Säulenaufreinigungskits bei denen durch Fällung der DNA mittels Bindung durch chaotrope Salzsäulen die Trennung von PCR Restprodukten stattfindet. Durch Waschen mit Puffern und Zentrifugieren werden Proteine, Primer, Nukleotide und Salze voneinander getrennt.

3.5 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung wird in 14µl Ansätzen zu je 500ng aufgereinigter DNA und einem Zusatz von 20pmol spezifischer Primer durchgeführt. Je Probe werden zwei Primer-Läufe kontrolliert (5'-3' und 3'-5' Richtung). Die Ansätze sind zur Firma LGC Genomics (ehem. AGOWA genomics, Berlin) versandt und dort sequenziert worden. Die analysierten Nukleotidsequenzen wurden anschließend via Internet zurückgeschickt. Die Kontrolle erfolgt *in-silico* mithilfe der Programme Seqman Pro und SeqBuilder.

3.6 Verdau und Ligation

Für den Verdau der DNA werden Restriktionsendonukleasen benötigt. Die Enzyme trennen DNA Stränge an definierten Stellen. Sie ermöglichen die Klonierung in Vektoren, die eine kongruente Schnittstelle zum synthetisierten Produkt haben. Der Vektor dient als Shuttle für die Integration ins Genom einer Zell- oder Bakterienlinie.

Für die Digestion eines DNA-Ansatzes werden 1µg DNA mit 10 U Restriktionsenzymen und 2µl 10x Fastdigest Puffer in einem Gesamtvolumen von 20µl für eine Stunde bei 37°C gelagert und anschließend mittels Säulenextraktion aufgereinigt. Der Verdau des pAUL-a Plasmids geschieht mit den Enzymen BamHI und Sal-I von Fermentas, die Vorbereitung der Topo Plasmide mit BamHI, XhoI und NcoI (Fermentas). Da es sich bei den Endonukleasen um Enzyme für den Schnellverdau handelt, reicht eine Stunde aus, um eine ausreichende Menge an Plasmid zu schneiden.

Verdau des Topo Vektors:

1µl	Bam H1	
1µl	Xho 1	
1µl	Nco 1	
2µl	Fastdigest Buffer	
1µg	DNA	abhängig DNA Konzentration
X µl	H ₂ O	ergibt sich aus DNA Volumen

20 µl Gesamtvolumen

Verdau des pAUL-a Vektors

1µl	Bam H1	
1µl	Sal 1	
2µl	Fastdigest Buffer	
1µg	DNA	abhängig DNA Konzentration
X µl	H ₂ O	ergibt sich aus DNA Volumen

20µl Gesamtvolumen

In der Ligation werden die vorbereiteten Reaktionspartner miteinander verknüpft; dies sind der verdaute Vektor (Topo oder pAUL-a) und das DNA Fragment (welches sich wiederum in einem Vektor befindet). Bei einem Gesamtvolumen von 20µl werden 2µl 10xLigationspuffer und 1µl T₄-Ligase hinzugegeben. Die Anteile Vektor und Insert sind im Verhältnis von 1:3 gemischt, was gleiche Konzentrationen vorausgesetzt, Volumina von 5 und 12µl entspricht. Die Ligation erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wird die Ligase bei 65°C für zehn Minuten deaktiviert.

Ligation in pAUL-a und Transformation in. EGD-e

2µl	10x Ligationspuffer	
1µl	T4 Ligase	
5µl	pAUL-a Verdau	
12µl	Topo Verdau	Verhältnis Insert zu Vektor, 1:3
<hr/>		
20µl	Gesamtvolumen	

3.7 Transformation mittels Hitzeschock oder Elektroschock

Hitzeschock-Transformation

Die in -80°C gelagerten Zellen werden auf Eis aufgetaut und mit 5µl Ligationsansatz (s.o.) gemischt. Der Ansatz wird für 30 Minuten auf Eis inkubiert und danach für 90 Sekunden ins 42°C Wasserbad transferiert, um anschließend weitere zwei Minuten auf Eis gelagert zu werden.

Nach der Temperaturbehandlung wird ein 1ml SOC-Medium hinzugegeben und das Reaktionsgemisch für drei Stunden bei 37°C und 180rpm im Schüttler belassen.

Anschließend wird der Ansatz auf festen Nährböden mit Antibiotika Zusatz ausplattiert., Die Resistenz des eingebrachten Plasmids dient als Kontrollinstanz, da nur Bakterien mit erfolgreich inseriertem Plasmid wachsen.

Elektroschock-Transformation in EGD-e

Die gelagerten Zellen werden auf Eis aus dem -80°C Schrank geholt und mit $3\mu\text{l}$ Ligationsansatz gemischt. Das Gemisch wird in eine vorgekühlte Küvette gegeben und nach sorgfältiger Trocknung der Kontakte in die Schockvorrichtung des Gene Pulser gesetzt. Dieser bildet zusammen mit dem Pulse Controller und dem Capacitance Extender eine Einheit und dient der genauen Einstellung des Elektroschocks, sowie der Zeitnahme für die Überbrückung des Widerstandes, der durch Flüssigkeit und Zellen gebildet wird.

Vor Einsetzen der Küvette wird der Widerstand auf 400Ω und die Spannung auf 1kV gesetzt, der Capacitance Extender auf $125\mu\text{F}$ und der Gene Pulser auf $25\mu\text{F}$. Nach der Auslösung des elektrischen Impulses muss innerhalb kürzester Zeit ein Milliliter $0,5\text{M}$ Saccharose-BHI Gemisch auf die Zellen gegeben werden. Diese werden folgend für drei Stunden bei 30°C und 180rpm regeneriert. Es erfolgt das Ausplattieren auf festen Nährböden mit Antibiotika Versatz, der Resistenz des eingebrachten Plasmids entsprechend.

3.8 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Herstellung elektrisch kompetenter *E. coli*

Eine bis zur gewünschten optischen Dichte ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,5-0,7$) gewachsene Kultur der Zellen in 100ml LB-Medium wird für 15 Minuten bei 4°C und 4000g zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in 100ml kaltem Glycerol (10%) resuspendiert.

Der Ansatz wird erneut bei oben genannten Werten zentrifugiert und mit der Hälfte des ursprünglichen Volumens gelöst. Der Vorgang wird abermals mit 25ml wiederholt. Das verbleibende Pellet wird in $400\mu\text{l}$ Glycerol (10%) gelöst und gleichmäßig in Ansätzen zu je $50\mu\text{l}$ aliquotiert. Die Gefäße werden bei -80°C gelagert.

Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* nach Hanahan

Eine bis zur $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,3$ gewachsene Kultur kompetenter Zellen in 500ml SOB Medium, bei 30°C und 200rpm wird in sterile Greiner Rörchen (50ml) umgefüllt und für 15 Minuten bei 4°C auf Eis gelagert. Die Ansätze werden für 15 Minuten bei 4°C und 3000rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in einem Drittel des ursprünglichen Vo-

lumens in CCMB80 resuspendiert und für 20 Minuten bei 4°C gelagert. Es folgt eine erneute Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 3000rpm. Wieder wird der Überstand entfernt und das Pellet in einem Zwölftel des Anfangsvolumens mit CCMP80 gelöst. Die Zellen können sofort verwendet oder bei -80°C eingefroren werden.

3.9 Deletionmutanten

Deletionsmutanten oder isogene Mutanten bezeichnen Organismen, denen gegenüber ihrem Urvater eine genetische Sequenz fehlt. So ist es möglich im direkten Vergleich zum Wildtyp Veränderungen unter Versuchsbedingungen festzustellen.

Für ermittelte sRNAs wurden im Vorfeld zwei Primerpaare erstellt, die sich vor- beziehungsweise hinter der zu deletierenden Region befinden. Die Primer vor der sRNA sind mit P1 und P2, die in Strangfolge in 3'-Richtung liegenden mit P3 und P4 bezeichnet (siehe auch Abb. 3.1). Mittels PCR werden die flankierenden Bereiche aus dem Ursprungsgenom von *L. monocytogenes*, EGD-e vervielfältigt. Anschließend wird durch Kombination der jeweils äußeren Primer aus den flankierenden Paaren eine Fusion der vorherigen Reaktionsprodukte geschaffen. Das Resultat ist eine Kopie der ursprünglichen Sequenz, der jedoch die Region der deletierten sRNA fehlt. Diese wird entsprechend der Primersetzung P2 und P3 in der Reaktionsabfolge ausgeklammert.

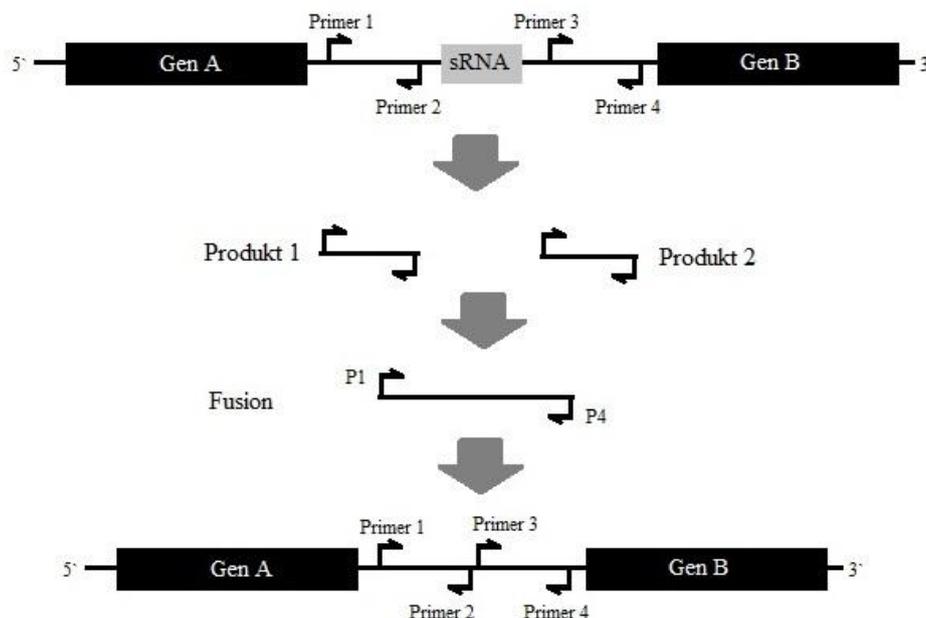


Abbildung 3.1 Die flankierenden Primerpaare beinhalten je einen Primer für den 5'-3' als auch für den 3'-5'-Strang. Die Fusion klammert die Region der sRNA aus. In der Fusion werden die beiden flankierenden Teile miteinander verknüpft und anschließend über Vektoren ins Genom integriert.

Die erstellte Sequenz wird mit dem Topo TA Cloning Kit, ligiert und in *E. coli* transformiert. Aufgrund der Ampicillinresistenz des Topo Vektors, kann durch Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit Ampicillin-Zusatz (100ng/ml) selektiert werden.

Gewachsene Kolonien werden nach 24 Stunden vom Agar gepickt und auf neue Platten übertragen und auf diesen anschließend übersichtlich nummeriert. Dieses Prozedere bietet den Vorteil, dass anschließende Kontrollen auf Einzelkolonien zurück verfolgbar sind, und reproduzierbar bleiben.

Durch PCR mit den flankierenden Primern (P1 und P4) und anschließendes Auftragen auf TBE - Gel kann erneut geprüft werden, ob das entsprechende Insert im Klon enthalten ist und ob es anhand der Bandenwanderung, der vorher errechneten Größe entspricht.

Aus positiven Klonen wird das Plasmid isoliert. Die Sequenzierung erfolgt bei LGC Genomics. Die eingeschickten Proben werden sequenziert und via Internet zurückgesandt. Die ermittelten Basenabfolgen werden mit der Referenz im SeqBuilder verglichen und auf vollständig korrekte Abfolge geprüft. Nach positiver Kontrolle der Sequenzierung wird der Vektor mittels Restriktionsenzymen geöffnet und mit pAUL-a als neuem Vektor ligiert. Die Transformation findet erneut in *E. coli* statt. Anschließend erfolgt eine weitere Transformation ins Genom von EGD-e. Die ausplattierten Zellen werden auf nummerierte Platten überimpft und anschließend als Template verwendet. Die PCR wird durch Gelelektrophorese kontrolliert und entsprechende Klone ermittelt.

Um eine dauerhafte Integration der eingebrachten Sequenz ins Listeriengenom zu gewährleisten werden die positiven Klone sechs Tage in Folge auf neue BHI Agar Platten überstrichen.

Anschließend erfolgt der Exzisionsprozess. Durch Antibiotika-Stress (Kombination von Ampicillin und Erythromycin) wird der pAUL-a Vektor wieder aus dem Genom entfernt. Dabei wird durch die Stressbedingungen entweder die ursprüngliche oder die zuvor eingebrachte Sequenz aus dem Genom eliminiert. Es besteht für jeden Klon eine 50%-Chance die Deletionssequenz zu erhalten. Im Versuch wird diesem Sachverhalt Rechnung getragen, indem möglichst viele Klone getestet werden. Der doppelte Ausstrich auf BHI Platten mit und ohne Erythromycin-Zusatz, ergibt ein Vorscreening, das Aufschluss über eine erfolgreiche Exzision des Vektors gibt. Bei noch vorhandener Antibiotika Resistenz ist keine erfolgreiche Vektor Exzision erfolgt. Mittels PCR und anschließendem TBE Gel-Lauf werden die Mutan-

ten mit erfolgreich integriertem Deletionsinsert ermittelt. Diese werden nochmals sequenziert (LGC Genomics), um zu gewährleisten, dass im Verlauf der Prozesse keine Fehler aufgetreten sind.

Die fertigen Deletionsmutanten werden in Glycerinkultur (-80°C) und auf BHI Platten (4°C) gelagert. Die 4°C-Kulturen werden alle vier Wochen neu überstrichen, um die Frische der Platten zu garantieren.

3.10 Glycerinkulturen

750µl einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur werden in ein steriles 2ml Gefäß mit Stehrand gegeben. Nach Hinzufügen von 750µl 60%igem Glycerin werden die Ansätze gemischt und mit Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

3.11 RNA Isolation

Die RNA Isolation erfolgt aus Minimalmedium (MM) Versuchen in 100ml Glaskolben, innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase zwischen den OD₆₀₀ Werten von 0,6 -1,2. Es werden Probenvolumina zu je 500µl entnommen.

Die Proben werden in 950µl RNA Protect (QIAGEN) gelöst, gevortext und für zehn Minuten bei 8000g zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand entfernt und das Pellet mit Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die gefrorenen Pellets werden auf Eis aufgetaut und bei Raumtemperatur mit 200µl SET, versetzt mit 10% SDS gelöst. Das Pellet wird gevortext, bis es komplett gelöst ist. Anschließend erfolgt die Zentrifugation bei 13.200rpm für drei Minuten. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert, verworfen und 83µl 50mM Tris mit Lysozym (50mg/ml) hinzugegeben. Nach Zugabe von 2µl SUPERase, 5µl Mutanlysin (5U/µl) und 10µl Proteinkinase K erfolgt ein weiteres Mischen.

Im Anschluss wird der Ansatz für 45 Minuten bei 37°C und 350rpm geschüttelt. Die zugegebenen Enzyme katalysieren die Lyse der Bakterienwände. Nach Eröffnung der Membranen wird mit QIAzol lysis Reagenz (miRNeasy Kit) und Chloroform die Ausfällung der einzelnen Bestandteile betrieben. Die beiden Reagenzien stehen im Verhältnis 60:14. Beide werden gut gemischt, für fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und abschließend für 30 Mi-

nuten bei 4°C und 12000rpm zentrifugiert. Das Reagenz teilt sich während der halben Stunde in drei Phasen auf, von denen die oberste die RNA enthält. Sie wird vorsichtig abpipettiert und im 1,5fachen ihres Volumen in 100% Alkohol gelöst.

Die Probe wird mittels miRNeasy Kit durch Säulenuelution vom Alkohol und etwaigen Resten getrennt. Durch Zentrifugieren bei 8000g für 15 Sekunden erfolgt die Entfernung eines Großteils des Alkohols.

Abschließend geschieht die Aufreinigung nach dem Prinzip der Säulenuelution. Nacheinander werden 350µl RWT Puffer und ein Inkubationsmix aus 70µl RDD Puffer und 10µlDNase Stocklösung auf die Säule gegeben. Nach Applikation der DNase erfolgt eine Inkubationszeit von 25 Minuten. Anschließend wird erneut RWT und zum Schluss RPE Puffer auf die Säule gegeben und jeweils für 15 Sekunden bei 8000g zentrifugiert.

Die restliche Flüssigkeit wird bei maximaler Umdrehungszahl der Zentrifuge aus der Säule entfernt und die zurückbleibende RNA mit RNase freiem Wasser eluiert.

3.12 Umschreiben der RNA in cDNA

Dieser Vorgang wird auch als reverse Transkription bezeichnet, da er den physiologischen Prozess der Umschreibung von DNA in RNA ins Gegenteil verkehrt.

Es wird ein Mindestansatz von 3µg RNA benötigt um am Reaktionsende eine ausreichende Konzentration von cDNA zu erhalten. Dieser wird gemischt mit jeweils einem Mikroliter Hexa- und Nonamerprimer (Konzentration 10 pmol/µl). Fehlendes Restvolumen für den 12µl Ansatz wird mit RNase freiem Wasser aufgefüllt.

Der Ansatz wird für fünf Minuten bei 70°C in den Thermoblock gestellt. Anschließend belässt man das Reagenz für zehn Minuten bei Raumtemperatur. Der Ansatz wird kurz an zentrifugiert um Niederschläge der Temperaturbehandlung in den Ansatz zurück zu holen.

Durch Zugabe von RT-Puffer, dNTPs, und dem Enzym Reverse-Transkriptase wird das vorher synthetisierte Produkt in cDNA umgeschrieben. Der Ansatz wird für 90 Minuten bei 42°C belassen. Der Zusatz von Dithiothreitol (DTT) sorgt für eine entsprechende Stabilität der Produkte nach Synthese durch die Transkriptase. Abschließend erfolgt die Aufreinigung mit QIAquick Purification Kit.

3.13 Realtime PCR und Aktivitätsnachweis

Das Verfahren beruht auf dem Prinzip der klassischen Polymerasekettenreaktion. Es dient neben dem Nachweis der DNA Produkte, die im Laufe der Reaktionen gewonnen werden, auch der Quantifizierung mithilfe von Fluoreszenzmessungen. Die Fluoreszenz nimmt proportional zur Menge der synthetisierten DNA zu. Dieser Vorgang ist nur dann präzise, wenn sich die PCR in ihrer exponentiellen Phase befindet. Also genug Templates, als auch genug freie Nukleotide vorhanden sind, um in jedem Zyklus eine optimale Syntheseleistung zu erbringen. Diese quantitative qRT-PCR unterscheidet sich von der kompetitiven Methode, bei der unter Zuhilfenahme der Gelelektrophorese eine Auftrennung und vergleichende Messung möglich ist.

Der verwendete Farbstoff SYBR Green I wird aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften verwendet. Er wird in Kombination mit Puffer und Polymerase als Mastermix(12µl) zu cDNA(100ng), Primern (je 1µl) und Wasser hinzugegeben. Das Gesamtvolumen beträgt 25µl.

Das Reaktionsgemisch wird im Taqman auf Platten im 96 Well Format angesetzt.

Temperaturprogramm der RT-PCR

50°C 30 Sec

95°C 15 Sec

94°C 30 Sec

50°C 30 Sec

72°C 60 Sec Zyklus 25x

72°C 10 Min

4°C ∞

3.14 Proteinisolierung

Aus Übernachtskulturen erfolgt eine 1:50 Verdünnung in 60ml frischem BHI. Diese Kulturen werden bei 37°C und 180rpm geschüttelt bis $OD_{600nm} = 1,0$ erreicht ist.

Ausfällung von Kulturüberstandspoteinen mit TCA

Eine 60ml Kultur ($OD_{600nm} = 1,0$) wird für 15Minuten bei 4°C und 6000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und auf neue Greiner (50ml) verteilt. Es werden 10% TCA

(6ml) hinzugegeben, gemischt und für mindestens 12 Stunden auf Eis gelagert. Anschließend erfolgt eine erneute Zentrifugation für 20 Minuten bei 4°C und 6000rpm. Der TCA Überstand wird entfernt und das Pellet in 200µl Tris-HCl pH 8,8 bei 4°C resuspendiert. Anschließend wird das Pellet zur weiteren Verwendung der Proteinanalyse bei -20°C eingefroren.

Isolierung zytoplasmatischer Proteine

Eine 60ml Kultur ($OD_{600nm} = 1,0$) wird für 15 Minuten bei 4°C und 6000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in sterilem MQ-Wasser resuspendiert. Es folgt eine erneute Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 6000rpm. Der Überstand wird erneut abgenommen und etwaige Reste vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Anschließend wird das Pellet in 2,5ml modifiziertem 1x SMMP resuspendiert und 250µl einer 100mg/ml Lysozym Stocklösung hinzugefügt. Der Ansatz wird für mindestens 12 Stunden bei 37°C inkubiert.

Der Überstand wird verworfen und das zurückbleibende Pellet in 5ml modifiziertem 1x SMMP vorsichtig gewaschen und erneut bei 4°C und 6000rpm für 15 Minuten zentrifugiert, um die Lysozymreste zu entfernen. Der Überstand wird erneut verworfen und es wird nochmals zentrifugiert. Nach abermaligem Entfernen des Überstandes wird das Pellet in 100µl sterilem MQ Wasser gelöst. Das Gemisch wird in ein 1,5ml Eppendorf Gefäß gegeben und bei 1500rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben. Er beinhaltet die Überstandsproteine der cytoplasmatischen Fraktion. Sie werden bei -20°C gelagert.

Extraktion zellwandassoziierter Proteine

Eine 60ml Kultur ($OD_{600nm} = 1,0$) wird für 15 Minuten bei 4°C und 6000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert, das Pellet in 1,6ml 1xPBS pH 7,4 resuspendiert und mit 200µl 10% SDS versetzt. Der Ansatz wird für 45 Minuten bei 37°C schüttelnd bei 180rpm inkubiert. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in ein 2,2ml Eppendorf Gefäß überführt und für 15 Minuten bei 4°C und 15000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird entnommen und in ein frisches Eppendorf Gefäß gegeben. Es werden 0,1 Volumenanteile TCA (200µl) hinzugegeben und für mindestens 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Folgend wird der Ansatz abermals für 15 Minuten bei 4°C und 15000rpm zentrifugiert. Das TCA wird entfernt und entsorgt. Das Pellet wird in 200µl 1M Tris-HCl pH8,8 gelöst und bei -20°C eingefroren.

3.15 Proteinanalyse mittels SDS – PAGE

Trenngel (12%)

6,85ml	H ₂ O
5,5ml	Tris pH 8,8; 1,5M
0,22ml	SDS 10%
11µl	Temed
0,15ml	APS 10%
9,24ml	Polyacrylamid

Sammelgel

11,88ml	H ₂ O
5,28ml	Tris pH 6,8
0,22ml	SDS 10%
7,6µl	Temed
0,22ml	APS 10%
4,18ml	Polyacrylamid

Die Lösungen für das Trenngel, und nach dessen Aushärtung auch die für das Sammelgel, werden in zwei durch eine Gummilippe voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Um eine gleichmäßige Polymerisation zu gewährleisten, wird für die Zeit der Aushärtung Alkohol als Deckschicht auf das Gel gegeben. Das Ethanol beseitigt beim Abfüllen entstandene Luftblasen an der Oberfläche des Gels. Gleichzeitig mit der Sammelgellösung wird ein Kamm appliziert, der Platzhalter für die Proben ist. Aufgrund der starken Polymerisationsschrumpfung ist ein Nachfüllen im Bereich der Kammtaschen bis zur vollständigen Aushärtung des Sammelgels notwendig.

Die Proben werden mit 8x Probenpuffer gemischt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Auf Eis erfolgt die Abkühlung. Jede Probe wird kurz anzentrifugiert und anschließend in eine der Geltaschen appliziert.

Die Elektrophorese erfolgt mit 1x SDS Puffer bei 120V und 25mA. Nach erfolgter Elektrophorese wird das Gel vorsichtig den beiden Glasplatten entnommen und mit Coomassie für mindestens 12 Stunden im Schwenkbad gefärbt. Das Gel wird in eine Plastikschiene mit Deckel gegeben und vollständig mit Coomassie bedeckt. Nach erfolgreicher Färbung wird das Gel wieder entfärbt. Zurück bleiben die Proteinbanden, in denen das Färbemittel besser per-

sistiert als im restlichen Gel. Bei schwachen Banden hat sich das Wiederholen dieses Prozesses als praktikabel erwiesen um die Banden nachhaltig stärker sichtbar zu machen.

3.16 Wachstumsanalysen

Der Vergleich des Wachstums zwischen dem EGD-e Wildtyp und generierten Deletionsmutanten, gibt Aufschlüsse über mögliche metabolisch-regulative Funktionen der entfernten Abschnitte.

Die zu testenden Stämme wurden als Übernachtskultur in 100ml Glaskolben in einem Volumen von 10ml BHI angeimpft. Es erfolgte eine erneute Verdünnung der Kulturen am Folgetag auf 1:20. Bei einer gemessenen OD_{600nm} von 0,6 - 1,0 erfolgte die Entnahme der Probe aus dem Schüttler.

Nach Angleichen der Volumina auf $OD_{600nm} = 1,0$ Wert durch entsprechendes Anpassen der Vergleichsvolumina zum Referenzwert mit 1,0 erfolgt die Zentrifugation bei 8000g für drei Minuten.

Der Überstand wird verworfen und das Pellet in einem Milliliter des Mediums gelöst, welches für die Versuchsreihe vorgesehen ist (BHI, MM). Nach Lösen des Pellets im neuen Medium durch vortexen, wird die Kultur als Verdünnung auf vorbereitete Gefäße verteilt, die bereits mit Medium und Zusätzen entsprechend den Versuchsbedingungen ausgestattet sind.

Bei Versuchsreihen im Messautomaten (Infinite m200, Tecan), erfolgt die Verdünnung der Kulturen im Verhältnis 1:20 auf einen Milliliter Gesamtvolumen. Diese werden gemischt und als Probensatz mit mindestens drei Wells à 150 μ l auf eine 96-Well Platte übertragen.

Bei Versuchen im Glaskolben erfolgt eine erneute Verdünnung 1:50 auf zehn Milliliter Gesamtvolumen.

Im Messautomaten geschieht die Auswertung bei Versuchen in BHI nach 24 Stunden. Bei Läufen in MM nach frühestens 48, spätestens 72 Stunden. Die Messung erfolgt alle 20 Minuten automatisiert bei OD_{600} als Viererbestimmung pro Well.

Bei Kolbenversuchen mit MM erfolgt die erste Messung nach 12 Stunden und anschließend im Drei-Stunden-Takt. Durch stark verzögertes Anfangswachstum waren innerhalb des ersten halben Tages nur minimale Wachstumsunterschiede festzustellen. In der zweiten Tageshälfte hingegen ergaben sich höhere Wachstumsraten.

Als Zusätze werden verwendet:

- EtOH (in Konzentrationen zwischen 2 – 10%),
- H₂O₂ (Konzentrationen zwischen 0,1 – 1%)
- und im MM durch Verringerung des Mg²⁺ Gehaltes mithilfe von Verdünnung der Salzkonzentration B auf 100, 50, 10 und 5%.

3.17 Wachstum in P388 D1 Makrophagen

Am Vortag der Versuche werden Zellen in neues RPMI + 10% FKS Medium überführt und in Volumina zu je 1ml auf 24- Well-Platten aufgeteilt. Nach ca. 2 Stunden erfolgt die Kontrolle per Lichtmikroskop auf gleichmäßige Verteilung der Zellen. Die Deletionsmutanten und EGD-e als Referenz werden in Übernachtskultur in BHI befüllten 100ml Kolben angesetzt.

Vor Beginn des Versuches wird eine Zellzählung aus einem der Wells der 24er Platte durchgeführt, um das Infektionsverhältnis (MOI₁₀, Multiplicity of Infection) von Bakterien und Zellen zu bestimmen. Das errechnete Verhältnis wird mittels Konstante für den Wert OD_{600nm} = 1,0 der Bakterienkulturen (entspricht einer Bakterienzahl von 1,5 x 10⁹) umgerechnet auf das benötigte Volumen der Bakterienkulturen pro Well.

Die Übernachtskulturen in BHI Flüssigmedium werden 1:50 verdünnt und bis OD_{600nm} = 1,0 bei 37°C, 180rpm belassen. Anschließend erfolgt die Infektion der Makrophagen für 45 Minuten mit dem vorher errechneten Volumen an Bakterien, die in einem Milliliter RPMI + FKS gelöst werden. Das Volumen wird gleichzeitig auf BHI Platten als Inokulationskontrolle ausplattiert, um nach Abschluss des Versuches eine Referenz für die Gesamtzahl der zugegebenen Bakterien zu erhalten.

Nach Ablauf des Integrationsvorganges wird das Medium erneut gewechselt und mit Antibiotika Zusatz versehen (Gentamicin 20µg/ml). Anschließend belässt man die Zellen für vier Stunden im Brutschrank bei 37°C. Alle Bakterien, die sich zu diesem Zeitpunkt nicht im Lumen einer Zelle befinden, gehen unter der Einwirkung des Gentamicins zugrunde.

Nach Ablauf der Infektionszeit (4 Stunden) werden die Antibiotika-Zusätze durch Waschen der Zellen (PBS) entfernt und die Zellinhalte freigesetzt (H₂O mit 0,2% Triton-Zusatz). Die im Triton gelösten Bakterien werden aus den Wells in 1.5ml Eppendorf Gefäße umgefüllt. Anschließend erfolgen Verdünnungsreihen in PBS. Nach anfangs ermittelter Zelldichte ist eine Verdünnung zwischen 10² und 10⁴ notwendig um ein zählbares Ergebnis zu liefern. Die verdünnten Ansätze werden auf BHI – Agarplatten zu je 100µl ausgestrichen und für 16 Stunden im Brutschrank bei 37°C belassen.

Innerhalb dieser Zeit wachsen die Kolonien auf eine Größe von ca. 1mm Durchmesser heran. Die Auszählung der Platten erfolgt per Hand. Jede Mutante wird aus drei unterschiedlichen Wells ausplattiert, so dass am Ende jedes Versuches eine Dreierbestimmung der gewachsenen Bakterienkultur vorliegt. Die Versuche werden für jede Deletionsmutante aus Gründen exakter, aussagefähiger Ergebnisse dreimal wiederholt.

3.18 Infektionsversuche in Larven der *Galleria Mellonella*

Die große Wachsmotte (*Galleria mellonella*) wird bei künstlicher Ernährung (22% Maismehl, 22% Weizenkeime, 11% Hefe, 17,5% Bienenwachs, 11% Honig und 11% Glycerin) bei 30°C und Dunkelheit gehalten. Die verwendeten Gallerien befinden sich alle im Larvenstadium und wiegen zwischen 250 und 350 mg.

Die Bakterienkulturen der Deletionsmutanten werden bei 37°C und 180rpm bis zu einer Dichte von 10⁹CFU/ml in der logarithmischen Phase gezüchtet (entspricht einer OD_{600nm} = 1,0). Die entnommen Proben zentrifugiert, zweimal mit NaCl gewaschen und auf CFU 10⁸ verdünnt (1:10 Verdünnung).

Die Infektion der Wachsmotten geschieht von dorsokaudal zwischen dem letzten und vorletzten Extremitätenpaar mit 0,2mm Nadeln und einem Mikroapplikator. Das applizierte Volumen beträgt jeweils 10µl mit 10⁶CFU, so dass pro infizierte Larve eine Menge von ca. 10⁶ Bakterien injiziert wird.

Post infectionem erfolgt die Aufbewahrung bei Dunkelheit und 37°C für eine Woche. Über 7 Tage wird täglich die Sterberate einer vorher definierten Population an Versuchstieren gemessen. Pro Versuchsreihe werden zehn Larven verwendet. Ein Organismus wird für tot erklärt, wenn er keinerlei Reaktion auf Berührungen durch Pinzetten zeigte. Jede Versuchsreihe wird pro getesteter Mutante dreimal wiederholt. Jeweils zehn Tiere werden dabei verwendet, um

eine Versuchsgruppe zu bilden. Zum Vergleich werden mit NaCl infizierte Larven über den gleichen Zeitraum aufbewahrt.

3.19 Infektionsversuche im Mausmodell

Das Mausmodell bietet die Möglichkeit der Invasion eines Säugetier-Organismus mit intrazellulär-pathogenen Keimen wie *Listeria monocytogenes*. Es ist möglich pathologische Eigenschaften *in-vivo* beurteilen zu können und den Wildtyp mit generierten Mutanten zu vergleichen. Es werden 8-9 Wochen alte, weibliche BALB/c Mäuse infiziert. Aufgrund des einleitend erwähnten E-Cadherin Rezeptors ist eine Interaktion zwischen InlA und den Zellen des Magendarmtraktes der Maus nicht möglich. Die Injektion erfolgt daher intravenös in die Schwanzvene nach Erwärmung des kaudalen Körperteils mit einer Rotlichtlampe und nicht über den Digestivtrakt. Es werden zweimal $CFU 10^3$ von *Listeria monocytogenes* oder einer Deletionsmutante in einem Volumen von 100µl gelöst in NaCl injiziert.

Nach 3 Tagen *post infectionem* werden die Mäuse getötet, die Organe aseptisch isoliert und in PBS auf 0,2% homogenisiert und auf BHI-Agar als Verdünnung ausplattiert. Gemessen wird die Akkumulation von Bakterien in Leber und Milz. Nach 24 Stunden Wachstum bei 37°C werden die Kolonien gezählt und in Relation zu EGD-e gesetzt.

3.20 Immunfluoreszenzfärbung

Um eine visuelle Kontrolle der Vorgänge der Infektionsversuche zu bekommen, wird eine Reihe von Zellen auf Deckgläschen infiziert. Sie durchlaufen exakt den gleichen Versuchsaufbau, wie die Zellen der oben beschriebenen Infektionsreihen in P388D1-Makrophagen, mit dem Unterschied, dass die Zellen nach Ablauf der 4 Stunden Infektionszeit nicht aus den Wells gelöst, sondern mitsamt einem vorher inserierten Deckgläschen entnommen werden.

Die Immunfluoreszenz ermöglicht eine visuelle Beurteilung der Zellen, des Invasionsverhaltens und der Adhärenz der Bakterien zum Zeitpunkt der Invasion durch Listerien.

Am Ende der Infektionsversuche wird das mit Zellen bewachsene Deckgläschen mit 1,0ml 3,5% Formaldehyd für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend erfolgte eine zweimalige Waschung in PBS (jeweils Volumen von 1ml) und die Eröffnung der Zellmembran durch das Aufbringen von 1ml H₂O + 0,2% Triton für eine Minute.

Das Deckgläschen wird in eine feuchte, dunkle Kammer transferiert und es werden 15µl des Primärantikörpers (N81, 1:1 verdünnt mit PBS) aufgetragen. Dieser bindet an Listerien, die durch die Behandlung mit Triton für die Antikörperlösung erreichbar sind. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten wird die primäre Antikörperlösung in drei Schritten mit 1x PBS abgewaschen. Anschließend erfolgt die Zugabe des sekundären Antikörpers. Der Cy3-AntiMaus IgG enthält sowohl den zweiten Antikörper zur Bindung an N81, als auch den Fluoreszenz Farbstoff Cy3 zur Sichtbarkeit der Listerien unter dem Mikroskop. Zusätzlich enthält die zweite Lösung FITC Phalloidin (1:50 verdünnt in PBS), einen grün färbenden Stoff, der an das Aktin des Zellskelettes der Eukaryonten bindet. Dieser färbt vormalig die Aktinakkumulationen an, welche durch die Schweifbildung der Listerien entstehen.

Nach weiteren 45 Minuten Inkubation erfolgt eine weitere 3-Schritt Waschung in 1x PBS. Die folgende Fixierung des Deckgläschens auf dem Objektträger erfolgt mit 4µl Prolong Gold Antifade für 24 Stunden. Zum Abschluss wird das Präparat versiegelt, hierfür wird ein handelsüblicher Nagelklarlack verwendet, um das Deckgläschen luftdicht zu versiegeln.

Die verwendeten Objektträger können im Kühlschrank lichtgeschützt bei 4°C für 4 Wochen gelagert werden.

3.21 Fluoreszenzmikroskopie

Diese Form der Zellbetrachtung ist ein Ableger der konventionellen Lichtmikroskopie. Um entsprechende Bilder zu sehen ist eine Vorbehandlung der Präparate mit entsprechenden Farbstoffen notwendig (s.o.). Durch Fluorochrome, die Licht bestimmter Wellenlängen emittieren, wird ein Filter angeregt, der das Bild innerhalb des Mikroskops definiert.

Die Grundanordnung entspricht der eines klassischen Auflichtmikroskops mit Objektisch, Träger und Präparat.

Bei einer Wellenlänge von 550 bis 570nm erreicht die Fluoreszenz des Cy3 kombinierten Antikörpers sein Maximum, der N81 hingegen bei 410nm.

Per *in-silico* Überlagerung der Bilder, die bei beiden Wellenlängenmaxima aufgenommen wurden, lässt sich die Beziehung der Zellstruktur und der inserierten Bakterien analysieren.

3.22 Statistik

Die experimentell bestimmten Daten und Meßergebnisse wurden durch dreifache Wiederholung der Versuche mit paralleler, dreifacher Durchführung erzeugt.

Die Auswertung der gewonnen Resultate erfolgte mittels Microsoft Excel 2007; der Anwendung der Mittelwertberechnung, des studentschen T-Test und der graphischen Darstellung.

4. Ergebnisse

Die große Zahl vollständig sequenzierter Bakteriengenome und die Optimierung von *in-silico* Analyseverfahren, hat zu einer steigenden Anzahl von identifizierten small non-coding RNAs (sRNAs) geführt [43]. Die Mehrzahl dieser identifizierten sRNA wird im Funktionsbereich der Genregulation vermutet. Interaktionen mit Ziel-mRNA [44] können zu Modulation der Stabilität und der Translationsaktivität führen [38]. Modifikation von Transkriptions- und Proteinaktivitäten gehören ebenso zum Aufgabenfeld, wie zum Beispiel die Ausbildung funktionaler Komplexe, wie Sekundärstrukturen [45].

Die Charakterisierung der untersuchten Sequenzabschnitte im Genom von *Listeria monocytogenes* wird durch phänotypische Tests erreicht. Anhand der *in-silico* Vorauswahl werden potentielle sRNA Abschnitte erkannt und als Deletionsmutanten generiert.

4.1 Suchkriterien der sRNA und putative Funktionen

Die durchgeführten Experimente haben zum Ziel, veränderte Einflüsse durch das Fehlen der deletierten, mutmaßlichen sRNA aufzuzeigen. Aufgrund der feinregulativen Funktion der entnommenen Sequenzen gibt das Maß der Unterschiede zum EGD-e Wildtyp auch einen Aufschluss über die Rolle der sRNA innerhalb des Bakterienmetabolismus. Folglich können bei starken Veränderungen gegenüber dem Verhalten zu EGD-e, Rückschlüsse auf Veränderungen im Metabolismus der Organismen gezogen werden.

Dabei wird als Auswahlkriterium besonders der Unterschied zwischen extra- und intrazellulärer Transkriptionsrate der sRNA berücksichtigt. Vor allem sRNA mit einer hohen intrazellulären Transkriptionsrate sind ins Blickfeld gerückt. Diese Sequenzen finden sich hauptsächlich in den Untranslated Regions (UTRs), Bereichen zwischen zwei Genen. Ihre Länge nimmt einen Bereich von ca. 100nt ein [38] und kann eine strategisch entscheidende Funktion bezüglich des Transkriptionsstarts folgender Gene haben. Sie können ihre Wirkung aber auch völlig unabhängig von ihrem Lokalisationsort auf dem Genom entfalten, wenn es um die Regulation von Proteintätigkeiten oder Translationsleistungen geht.

4.2 Herstellung und Charakterisierung der Deletionsmutanten

Die generierten Deletionsmutanten wurden durch Polymerasekettenreaktionen erstellt. Produkte, die auf dem entsprechenden DNA-Strang vor- beziehungsweise hinter der zu deletierten Sequenz liegen und an diese unmittelbar angrenzen, wurden fusioniert und durch Transformation in verschiedene Vektoren zuerst in *Escherichia coli* und folgend in *Listeria monocytogenes* eingebracht.

Nach ihrer Fertigstellung wurden die erstellten Deletionsmutanten durch neu erstellte Primerkombinationen kontrolliert (siehe auch Abschnitt 2.5 entsprechende Primerkombinationen wurden mit Nummern P7 und P8 benannt). Diese wurden in 5'- vor, und in 3'-Richtung hinter dem Deletionsbereich gesetzt (siehe auch Übersichtstabelle Kapitel 2.5 verwendete Primer).

Sie decken den gesamten durch PCR und Fusion veränderten Bereich ab und dienen der letztmaligen Kontrolle, dass die Mutationsveränderung korrekt durchgeführt wurde. Als Template wurden die fertigen Deletionsmutanten verwendet. Das PCR- Produkt wurde letztmalig zu LGC Genomics versandt und auf die korrekte Basenabfolge in der SeqBuilder Software kontrolliert.

ID	voriges ORF	folgendes ORF	intrazell Start	intrazell Stop	intra Länge	intra rc	extrazell Start	extrazell Stop	extra Länge	extra rc	Promotor Name
$\Delta rli31$	<i>lmo0558</i>	<i>lmo0559</i>	597806	597949	144	623	597806	597949	144	16	sigmaA
$\Delta lmo0559$	<i>lmo0558</i>	<i>lmo0560</i>	598020	598926	906		598020	598926	906		
$\Delta rli33-1$	<i>lmo0671</i>	<i>lmo0672</i>	708309	708494	186	1093	708309	708494	186	19	sigmaB
$\Delta rli33-2$	<i>lmo0671</i>	<i>lmo0672</i>	708618	708891	274	21	708618	708891	274	23	-
$\Delta rli53$	<i>lmo0918</i>	<i>lmo0919</i>	955824	956029	206	512	955824	956029	206	127	sigmaB
$\Delta rli50^*$	<i>lmo2709</i>	<i>lmo2710</i>	2782995	2783259	265		2782995	2783259	265		

Tabelle 4-1 Übersicht der generierten Deletionsmutanten und ihrer Position im Genom. Bei $\Delta lmo0559$ handelt es sich nicht um eine sRNA, sondern um die Ausschaltung eines vermuteten Proteins, daher erfolgte auch keine rli Bezeichnung (rli = RNA Listeria) sondern die lmo Nummer des deletierten Gens. Die Abkürzung rc steht für read account und gibt die Anzahl der intra- bzw. extrazellulär produzierten Replikate innerhalb der Analyse an.

4.3 Analyse des Wachstumsverhalten

Das Messen der Wachstumskurven gibt Aufschluss über die Entwicklung von *Listeria monocytogenes* im extrazellulären Milieu. Unter Bedingungen, die ein optimales Angebot an Nährstoffen enthalten, wird ein ungehemmtes Wachstum gefördert. Als zusätzlicher Stressfaktor sind bei weiteren Experimenten Alkohol und Wasserstoffperoxid als Zusätze verwendet worden. Diese Modifikationen geben Hinweise über mögliche Ausfallerscheinungen unter Stressbedingungen, die durch die fehlenden Sequenzbereiche forciert werden.

Einflüsse, wie Ethanol oder H_2O_2 bilden Stressfaktoren für wachsende Bakterien. Gerade im Verlauf des exponentiellen Wachstums wirken sich diese als zusätzlicher Selektionsdruck negativ auf die Reproduktion der Bakterien aus. Ethanol wirkt durch Veränderung der osmotischen Umgebungsverhältnisse und durch zusätzliche Reize auf die Ionenkanäle. H_2O_2 verändert durch Bindung der Eisenionen das lokale Milieu und kann einen Nährstoffmangel bedingen. Bei *L. monocytogenes* ist bekannt, dass unter verschiedenen Stressbedingungen Adaptationsprozesse stattfinden, die zu einer erhöhten Resistenz gegenüber äußeren Einflüssen führen [46]. Inwieweit sich diese Fähigkeiten aus den regulativen Eigenschaften der sRNA rekrutieren, lässt sich anhand des Versuchsaufbaus jedoch nur quantitativ erfassen. So ist es im Verlauf der Wachstumsessays nicht möglich Aussagen über das qualitative Transkriptionsbild von RNA und sRNA zu treffen.

Das Wachstum von Bakterienkulturen im infitite200 (Tecan, Schweiz) ermöglicht das Bebrüten von Kulturen bei konstanten Bedingungen und exakten, kontinuierlichen Messintervallen.

Bei 37°C, einer Schüttelfrequenz von 180rpm und 4 Messpunkten pro Well wird das Wachstumsverhalten in BHI unter dem Einfluss von Ethanol und H_2O_2 gemessen. Dabei können die Bedingungen über den gesamten Versuchszeitraum konstant gehalten werden, was bei Kolbenversuchen aufgrund der regelmäßigen Entnahmen zur Messung nicht zu gewährleisten ist.

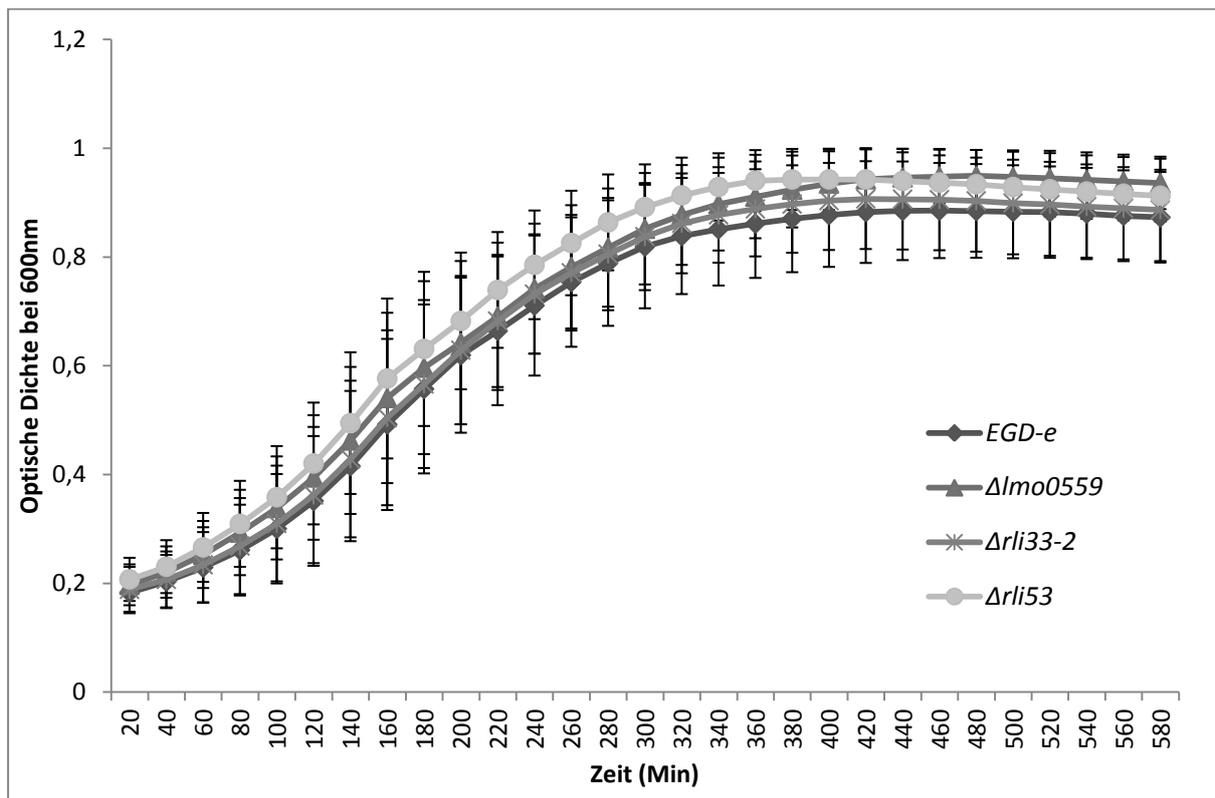


Abbildung 4.1 Wachstumsverläufe über einen Zeitraum von 600 Minuten. Kultiviert wurde in reinem BHI Medium ohne Zusätze

Die initiale Wachstumsphase bis zum Beginn des exponentiellen Wachstums ist durch das Maß der Verdünnung (1/20) bei allen Mutanten gleich. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung, ist bei den Organismen $\Delta rli33-2$, $\Delta lmo0559$ und $\Delta rli53$ kein signifikanter Unterschied im Wachstumsvergleich zu EGD-e festzustellen. Der Verlauf bis zum Erreichen der stationären Phase, genauso wie die exponentielle Entwicklung, haben einen kongruenten Verlauf.

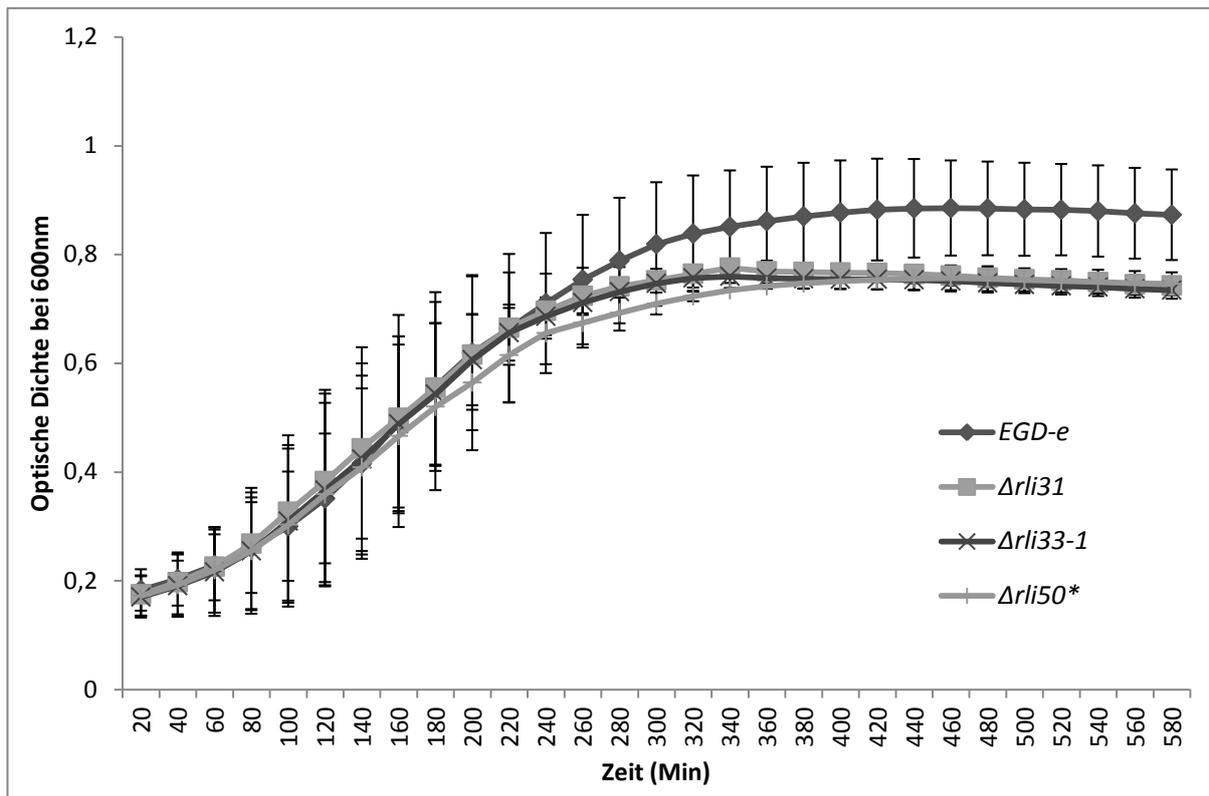


Abbildung 4.2 Wachstum von EGD-e, $\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$ über einen Zeitraum von 600 Minuten in reinem BHI-Medium

Unterschiede werden bei den Mutanten $\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$ sichtbar. Genannte sRNA-Kandidaten erreichen das Ende ihres exponentiellen Wachstums deutlich früher als EGD-e. Schwächt sich das Wachstum von EGD-e bei einem OD_{600nm} Wert von 0,87 ab, so trifft dies auf $\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$ bereits bei einem Wert von 0,76 zu; eine Stunde vor der Sättigung des Wildtyps. Die drei Deletionsmutanten sind nicht in der Lage eine entsprechend hohe Bakteriendichte im Medium zu erreichen wie EGD-e. Das Wachstum in der Anfangsphase und der beginnende exponentielle Verlauf sind jedoch deckungsgleich.

Der Einfluss von Alkohol in BHI wurde über 24 Stunden gemessen. Innerhalb von neun Stunden wurde unter getesteten Wachstumsbedingungen die stationäre Phase erreicht. Der Verlauf (siehe Abb 4.3 und 4.4) zeigt das Erreichen der stationären Phase, ebenso wie die vorangehende ungehemmte Wachstumsphase der untersuchten Bakterien.

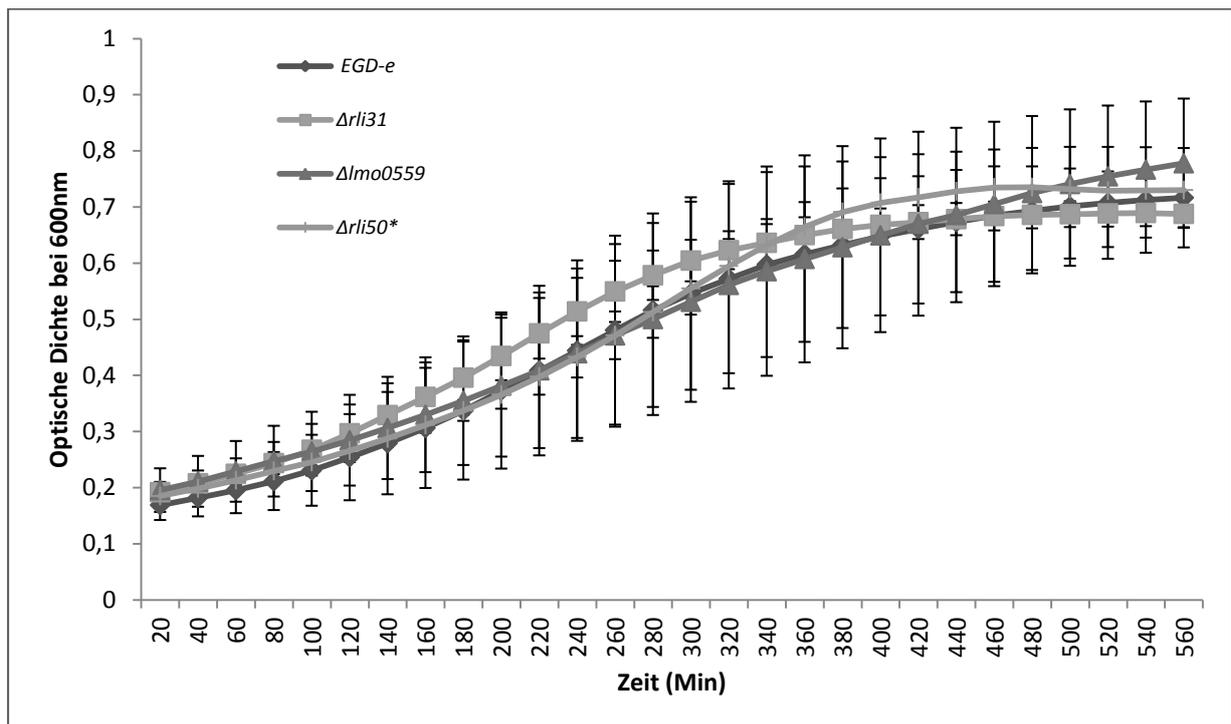


Abbildung 4.3 Wachstum der Deletionsmutanten in BHI Medium versetzt mit 5% Ethanol. Zu sehen sind hier EGD-e und die Mutanten $\Delta rli50^*$, $\Delta lmo0559$ und $\Delta rli31$. Gezeigte Organismen zeigen keinen Unterschied in ihrem Wachstumsverhalten verglichen mit dem Wildtyp.

Bedingt durch den Einfluss von Alkohol wird das Wachstum im Nährmedium verlangsamt. Es wurde mit Konzentrationen zwischen 3 und 10% experimentiert (hier nicht gezeigt), bei denen sich das Erreichen der stationären Phase mit steigender Alkoholkonzentration deutlich hinauszögerte. Bei einem Gehalt von 5% Ethanol in BHI sind auftretende Effekte optimal zu erkennen ohne das Wachstum übermäßig zu hemmen.

Um mögliche Effekte zu beurteilen, ist der Wildtyp EGD-e auch hier als Referenz zu betrachten. Unter Alkoholeinfluss zeigen sich nur marginale Wachstumsunterschiede. Massgebend ist die Entwicklung am Ende der exponentiellen Wachstumsphase und der Eintritt in den stationären Abschnitt.

Bezieht man versuchsbedingte Schwankungen der Kultivierung mit ein, so sind bezüglich EGD-e bei folgenden Deletionsmutanten keine signifikanten Unterschiede festzustellen: $\Delta rli31$, $\Delta lmo0559$, $\Delta rli50^*$ und $\Delta rli33-2$ (Abb 4.3 und 4.4).

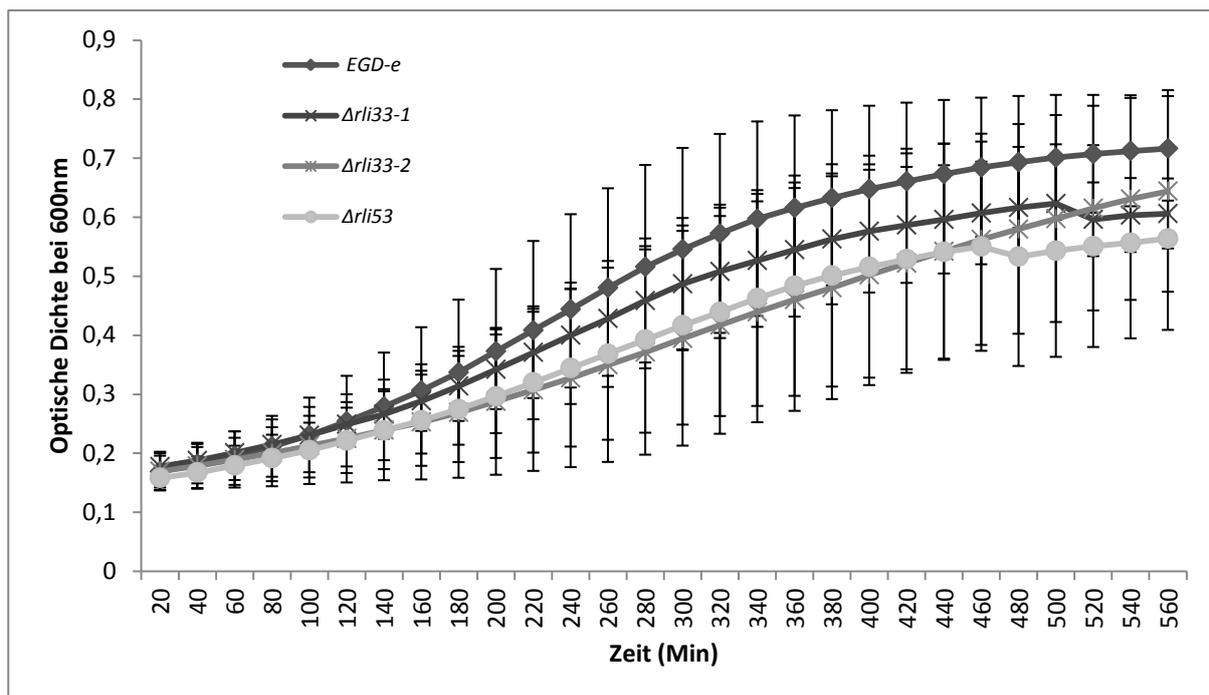


Abbildung 4.4 Wachstum der Deletionsmutanten $\Delta rli33-1$, $\Delta rli33-2$ und $\Delta rli53$ zusammen mit EGD-e in BHI mit 5% Ethanol-Zusatz. Genannte Mutanten zeigen bis auf $\Delta rli33-2$ eine Hemmung bei Wachstum unter Alkoholeinfluss und erreichen mit beendetem Wachstum nicht das stationäre Niveau des Wildtyps

Unterschiede zeigen sich hingegen bei $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli53$ (Abb 4.4). Diese sind in ihrem Wachstum durch Ethanol stärker gehemmt als der Wildtyp.

$\Delta rli53$ zeigt beim Erreichen der stationären Phase nach 420 bis 460 Minuten nur eine optische Dichte die 80% (OD_{600nm} Wert von 0,541) von EGD-e (OD_{600nm} = 0,673) entspricht. Ein ähnlicher Effekt ist bei $\Delta rli33-1$ mit 88% (OD_{600nm} = 0,596) zu beobachten. Folglich ist davon auszugehen, dass die deletierten Genomabschnitte den Bakterienstoffwechsel in Verbindung mit Ethanol beeinflussen. Die Mutante $\Delta rli33-2$ zeigt zwar einen abgeschwächtes Wachstum, jedoch ist aufgrund der gemessenen Schwankungen dieser Unterschied im nicht-signifikanten Bereich.

Die Einwirkung von H₂O₂ auf Listerien ist deutlich stärker ausgeprägt als die von Ethanol. So können nur Konzentrationen verwendet werden, die um ein Hundertfaches geringer sind als getestete Ethanolkonzentrationen, um ein vergleichbares Wachstum zu erzeugen.

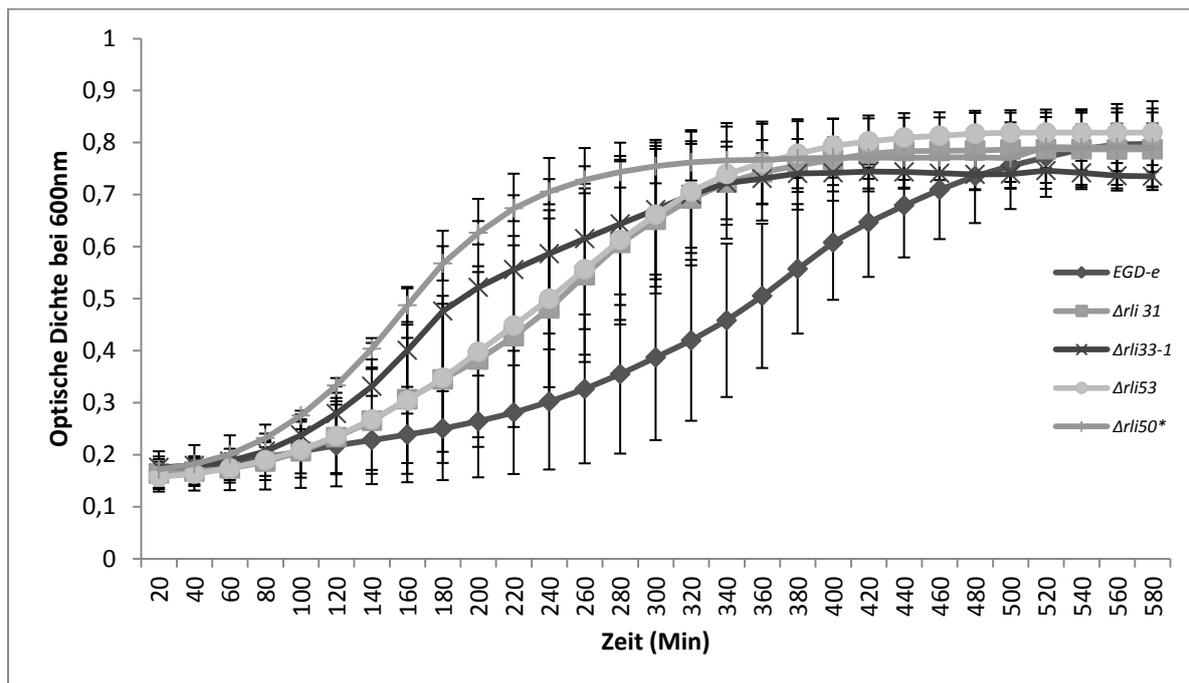


Abbildung 4.5 Das Wachstum in BHI bei einem Zusatz von 0,03% H₂O₂. Zu sehen ist der Verlauf der Mutanten $\Delta rli50^*$, $\Delta rli33-1$, $\Delta rli53$ und $\Delta rli31$. Alle angegebenen Deletionsmutanten zeigen primär ein geringeres ausgeprägtes Hemmverhalten gegenüber dem Einfluss von H₂O₂ als der Wildtyp. Das Wachstum ist anfangs stärker ausgeprägt und die exponentiellen Phase deutlicher sichtbar, woraus ein früheres Erreichen des Sättigungspunktes resultiert.

Bei Analyse des Gesamtwachstums in BHI mit 0,03% H₂O₂, ist beim Erreichen der Sättigungsphase kein signifikanter Unterschied zwischen EGD-e und generierten Deletionsmutanten festzustellen.

Ein ungehemmtes Wachstum zeigen initial $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$, beide treten früh in die exponentielle Wachstumsphase ein und erreichen zeitig ihren Sättigungsgrad. Ähnliche Tendenzen, zeigen $\Delta rli33-2$ und $\Delta rli53$, die ebenfalls früher als EGD-e in die stationäre Phase eintreten, dabei aber nicht die Signifikanz von $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$ aufweisen. Die Endkonzentration an Bakterien, die im Medium erreicht wird, unterscheidet sich bei keiner Mutanten verglichen mit dem Wildtyp.

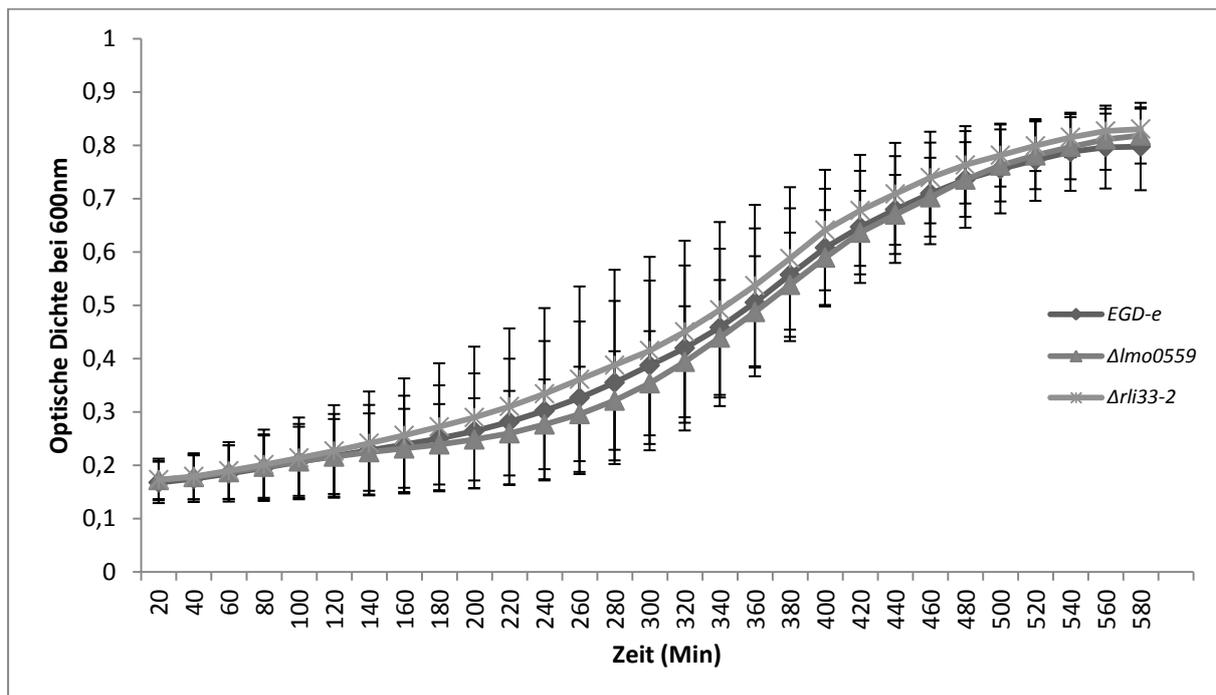


Abbildung 4.6 Das Wachstum in BHI mit 0,03% H_2O_2 bei den Mutanten $\Delta lmo0559$ und $\Delta rli33-2$. Das Wachstum zeigt keinerlei signifikante Unterschiede zum Verlauf von EGD-e.

Es zeigen sich bei Kultivierung mit H_2O_2 zwei verschiedene Wachstumsmuster. EGD-e wird durch H_2O_2 initial gehemmt, das Wachstum findet verlangsamt aber kontinuierlich statt. Einen ähnlichen Verlauf nehmen $\Delta lmo0559$ und $\Delta rli33-2$, deren Wachstum parallel zu EGD-e verläuft. Anders die restlichen getesteten Mutanten, die keine signifikant messbare Hemmung durch 0,03% H_2O_2 erfahren (siehe auch Abb 4.5).

Das Wachstum in BHI mit den Zusätzen Ethanol und H_2O_2 zeigt Veränderungen im Replikationsverhalten. Als einzige Deletionsmutante weist $\Delta lmo0559$ keine Unterschiede in der Wachstumstendenz zu EGD-e auf. Dies betrifft sowohl den Metabolismus in Ethanol als auch in H_2O_2 .

Die Zugabe von 5% Ethanol erzielt bei allen Mutanten mit Unterschieden zu EGD-e eine Wachstumshemmung. Besonders $\Delta rli53$ und $\Delta rli33-2$ werden in ihrer Reproduktion eingeschränkt, obwohl sie beim Wachstum in BHI keine Differenzen zu EGD-e aufweisen.

H_2O_2 kann das Wachstum nicht langfristig verzögern. Es zeigt sich eine verstärkte Resistenz gegen den Wasserstoffperoxid Einfluss. Dieser ist besonders bei $\Delta rli50^*$ und $\Delta rli33-1$ stark ausgeprägt.

Plattenversuche auf BHI-Agar bezüglich des Wachstumsverhaltens bei unterschiedlichen Temperaturen wurden bei 40°C, 37°C, 20°C und 4°C durchgeführt. Bis auf die Negativkontrolle zeigten alle getesteten Mutanten: $\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$, $\Delta rli33-2$, $\Delta rli53$, $\Delta rli50^*$ und $\Delta lmo0559$ das gleiche Wachstumsmuster wie EGD-e. Folglich kann von keiner speziellen Sensibilität der Deletionsmutanten gegenüber Temperaturschwankungen ausgegangen werden.

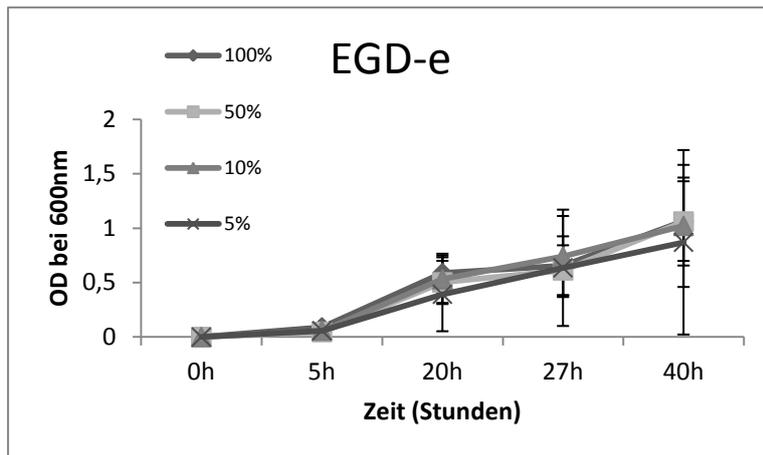


Abbildung 4.7 Wachstum in MM von EGD-e über einen Zeitraum von 40 Stunden

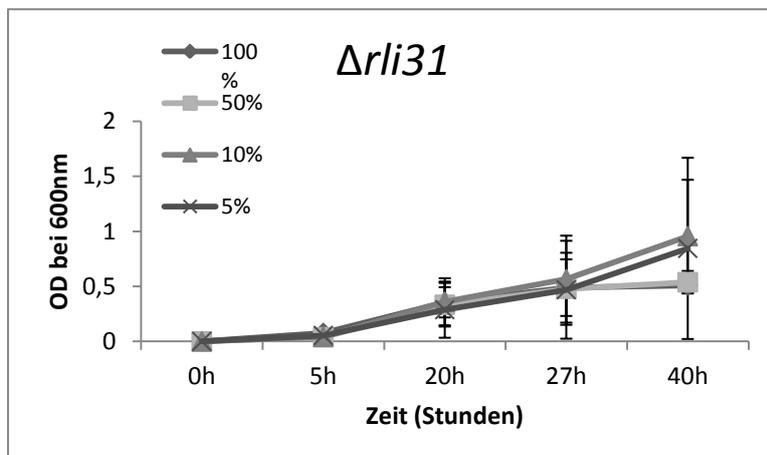


Abbildung 4.8 Wachstum der Deletionsmutante $\Delta rli31$ in MM. Wie bei EGD-e sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

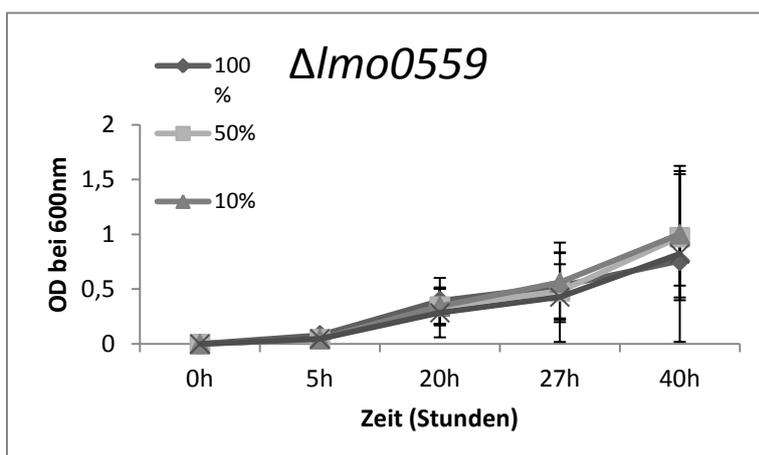


Abbildung 4.7 Proteindeletion $\Delta lmo0559$ in MM, aufgrund der hohen Streuung der Werte und stark ähnelnden Verläufen ist auch hier kein signifikanter Unterschied zu erkennen

Für die Analyse der RNA wurden EGD-e, $\Delta lmo0559$ und $\Delta rli31$ in MM angezüchtet. Der Expressionszustand wurde dabei während des exponentiellen Wachstums im extrazellulären Milieu bestimmt. Durch Variation des Mediums wurden Mg^{2+} -Werte zwischen 1,7mM und 0,035mM im Medium erreicht. Dabei wurde der Wert von 1,7mM als 100% gesetzt. Entsprechend sind 50, 10 und 5% als Konzentrationen von 0,35mM, 0,17mM und 0,035mM zu bewerten. Bei allen getesteten Organismen zeigt sich hierbei kein signifikanter Unterschied bezüglich des Wachstums. Einzige Versuche ohne Magnesium im Medium verliefen ohne Wachstum der Kulturen. Aufgrund des Wachstums in Kolben sind keine kürzeren Messintervalle möglich.

4.4 Prüfung der Invasionsfähigkeit in Makrophagen

Um die Fähigkeit der intrazellulären Replikation zu untersuchen sind Infektionssays mit P388D1-Makrophagen durchgeführt worden. Im Gegensatz zu Wachstumskurven im Brutmedium werden zwei Faktoren überprüft: Die Fähigkeit des Eintritts in eukaryontische Zellen und die Eigenschaft der intrazellulären Vermehrung. Diese wird über die Dauer der Infektionszeit von vier Stunden definiert.

Als Kontrolle wurde bei Durchführung der Experimente immer der *Listeria* EGD-e Wildtyp unter exakt gleichen Versuchsbedingungen mit untersucht. So konnte bei Auszählung der ausplattierten Bakterienkolonien immer eine relative Beziehung zu unveränderten Organismen ermittelt werden. Aufgrund der aktiven Aufnahmefähigkeit der Makrophagen-Zellen P388D1 ist die Möglichkeit zur Analyse der intrazellulären Vermehrung besonders gut gegeben.

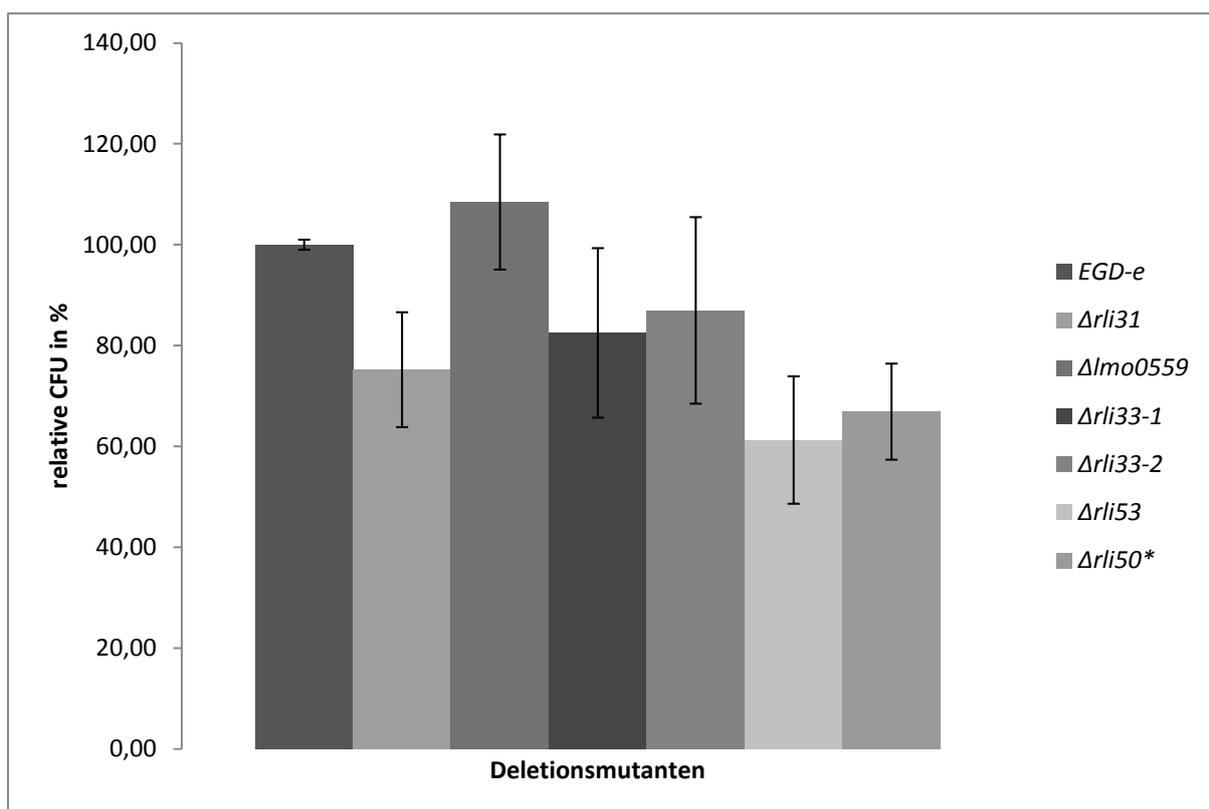


Abbildung 4.8 Relatives Invasionsverhältnis von EGD-e und Deletionsmutanten nach 4 Stunden intrazellulärer Infektionszeit in P388D1 Makrophagen. Gemessene Mutanten: $\Delta rli31$ und $\Delta rli53$ zeigen einen P-Wert von $\leq 0,05$, $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$ sogar einen P-Wert von $\leq 0,005$, $\Delta lmo0559$ und $\Delta rli33-2$ liegen bei $P \geq 0,05$

Im Infektionsversuch der P388D1-Makrophagen stellt EGD-e den Bezugswert für alle getesteten Deletionsmutanten dar. Deutlich weniger intrazelluläre Reproduktion zeigen im Vergleich die Organismen $\Delta rli53$ und $\Delta rli50^*$. Sie liegen bei 70,20 beziehungsweise 66,89% des von EGD-e erreichten Vermögens der intrazellulären Vermehrungsrate.

Eine geschwächtes intrazelluläres Wachstum zeigen auch $\Delta rli31$ und $\Delta rli33-1$, die mit 75,21% beziehungsweise 82,51% drei Viertel bis vier Fünftel des möglichen Potentials von EGD-e erreichen. Weniger deutlich fiel der Unterschied zu EGD-e bei $\Delta rli33-2$ mit 86,97% aus.

Eine erhöhte Invasionsrate zeigt hingegen die Mutante $\Delta lmo0559$ die mit 108,46% im Mittel eine stärkere Replikation als EGD-e aufweist. Die drei zuletzt genannten Mutanten sind jedoch aufgrund der hohen Standardabweichung in so enger Verbindung zu EGD-e zu sehen, dass die Unterschiede als nicht signifikant betrachtet werden können (P-Wert $\geq 0,05$).

4.5 Resultate der Infektion in *Galleria Mellonella* Larven

Das Gallerien Versuchsmodell bietet die Chance der Infektion im Insektenmodell. Aufgrund der simplen Lagerung, der einfachen Aufzuchtbedingungen und der Disponibilität im Fachhandel eignet sich dieser Organismus besonders gut für Infektionsversuche unter *in-vivo* Bedingungen. Darüber hinaus ist *Galleria mellonella* bereits als Listerien-Modell etabliert [47] und liefert über einen längeren Zeitraum als Zell- oder Mausmodell Analyseansätze für die Erforschung der sRNA.

Im Vergleich mit dem Säugetierversuch des Mausexperimentes sind einige Unterschiede herauszustellen:

- Aufgrund der Größe der Organismen, ist eine Isolierung von Organen nicht möglich.
- Durch die kurze Lebensdauer werden metabolische Eingriffe schneller umgesetzt
- und im Gegensatz zu Maus und Mensch verfügt die *G. Mellonella* Larve nur über ein angeborenes Immunsystem und keinen zweiten Anteil, der für die kompetitive Optimierung und Anpassung auf neue Erreger reagiert.

Die im Gallerien Modell getesteten Stämme sind alle bisherigen untersuchten Deletionsmutanten: $\Delta rli31$, $\Delta lmo0559$, $\Delta rli33-1$, $\Delta rli33-2$, $\Delta rli53$ und $\Delta rli50^*$, sowie EDG-e

als Referenz und *Listeria innocua* als apathogene Negativkontrolle. Zusätzlich wurde eine Versuchsreihe der Larven mit Kochsalz, als weitere Negativkontrolle infiziert. Die Organismen dieser Experimentreihe zeigten innerhalb des gemessenen Zeitraums keinen Sterbefall.

In folgenden Grafiken ist der zeitliche Verlauf über die gesamten sieben Tage der Versuchsfolge zu sehen. In Relation zur Startpopulation einer jeden Mutante wird die Verlustrate dokumentiert und diese zum Ausgangswert in Relation gesetzt.

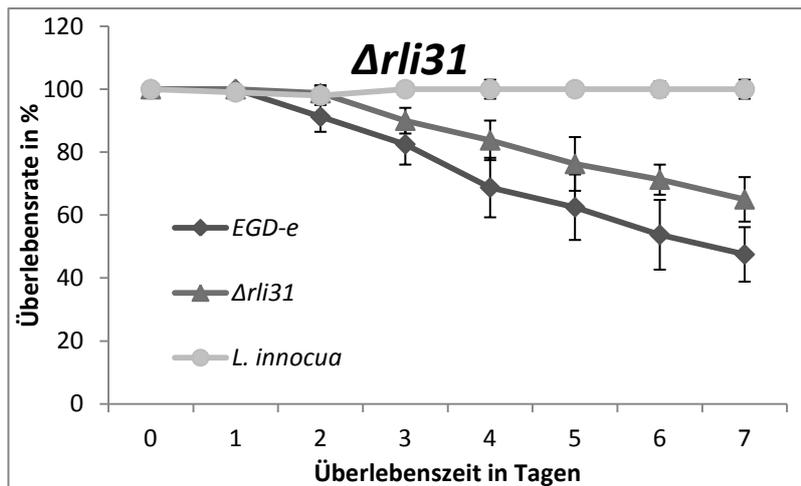


Abbildung 4.9 Der Verlauf von EGD-e und $\Delta rli31$ ist annähernd parallel, die Mortalität ist anfangs bei EGD-e höher, entwickelt jedoch ab dem dritten Tag konstante Sterberaten, die nur auf eine minimale Verminderung des pathogenen Potentials schließen lassen.

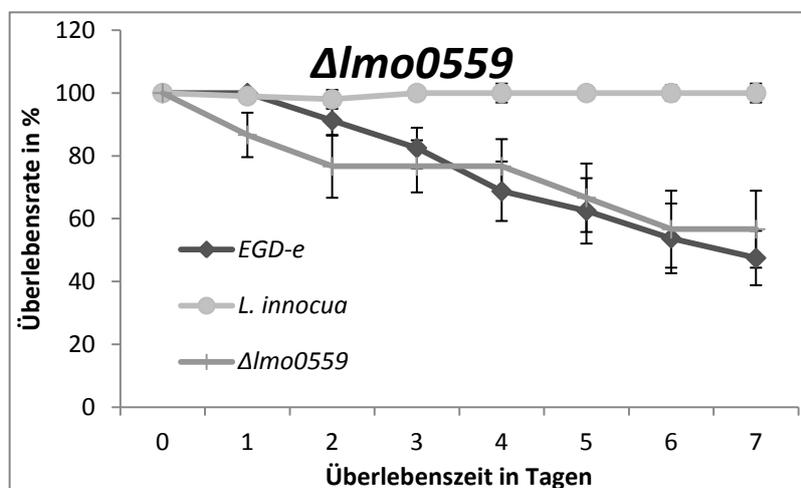


Abbildung 4.10 Die Genomdeletion *lmo0559* zeigt einen kongruenten Verlauf zu EGD-e. Berücksichtigt man die Standardabweichung ist der Unterschied als nicht signifikant zu beurteilen.

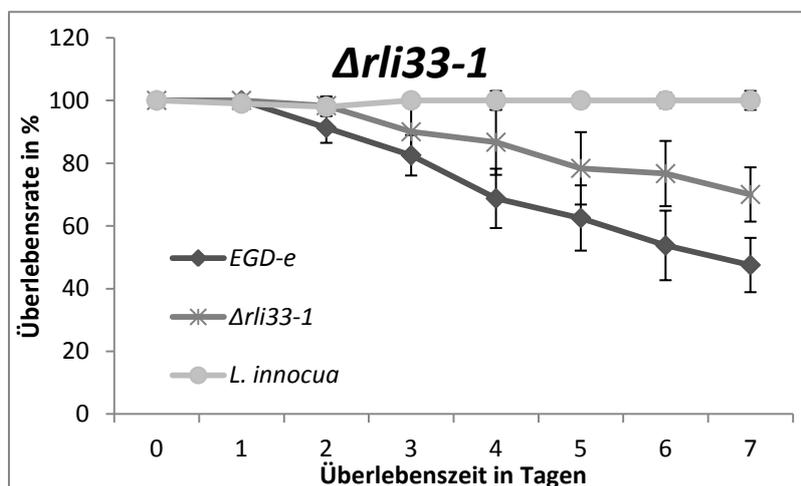


Abbildung 4.11 $\Delta rli33-1$ zeigt eine weniger stringente Parallelität zu EGD, als $\Delta rli31$. So flacht der Verlauf ab dem fünften Tag ab, was Rückschlüsse auf eine geringere Sterblichkeit der Gallerien bei Infektion mit $\Delta rli33-1$ zulässt.

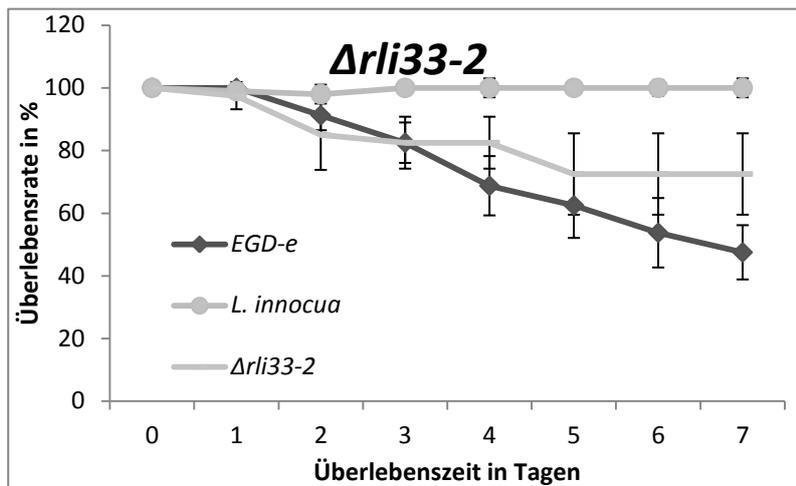


Abbildung 4.12 Die $\Delta rli33-2$ Mutante zeigt eine eingeschränkte Mortalitätsrate. Ihr pathogenes Potential erreicht nicht das Maß des Wildtyps.

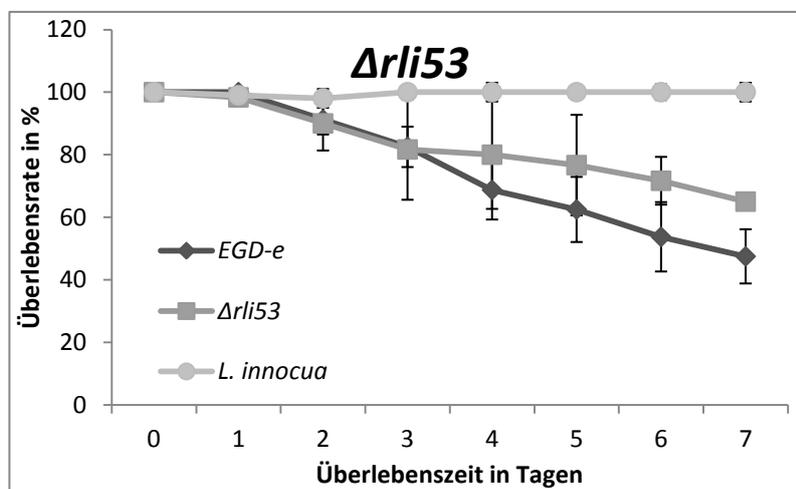


Abbildung 4.13 Initial zeigt $\Delta rli53$ die gleichen Eigenschaften, wie der Wildtyp. Dies hält jedoch nur über einen Zeitraum von drei Tagen an. Zusätzlich steigt nach dieser Zeit die Varianz stark an, was sich im Balken der Standardabweichung deutlich beurteilen läßt.

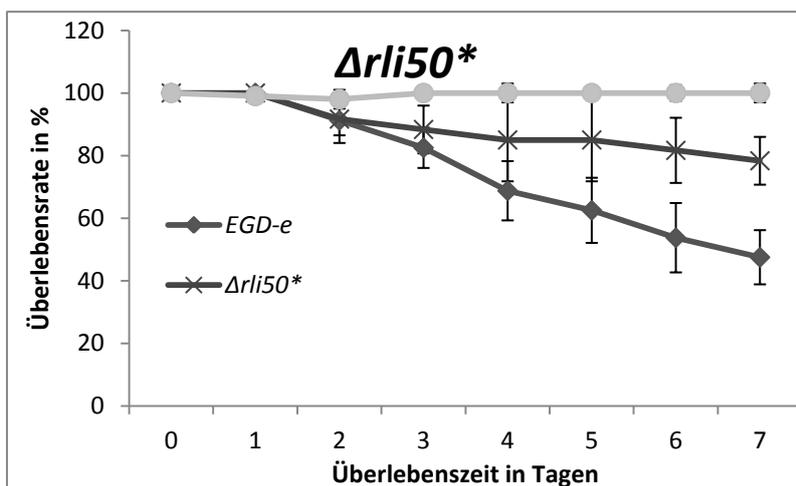


Abbildung 4.14 $\Delta rli50^*$ weist von allen getesteten Deletionsmutanten die geringste Mortalität bei Gallerien auf. Nach einer Woche sind, respektive geringer Abweichungen noch 80% der Anfangspopulation vorhanden. Hier läßt sich vermuten, dass die deletierten Sequenzen wenig Einfluss auf die Pathogenität innerhalb des Genoms haben.

Das Resümee der Versuche in *G. Mellonella* Larven ist: die Deletion der spezifischen Sequenzen geht immer mit einer Verringerung der Mortalität einher. Das ist gleichbedeutend mit einem Rückgang der *in-vivo* Pathogenität. Die gezeigten Unterschiede sind besonders bei den Mutanten $\Delta rli 33-2$ und $\Delta rli50^*$ zu erkennen. Beide weisen eine starke Signifikanz im

Unterschied zu EGD-e auf ($P\text{-Wert} \leq 0,005$). Auch $\Delta rli31$ und $\Delta rli33-1$ zeigen Abweichungen vom Wildtyp, sind aber nicht so prägnant ($P\text{-Wert} \leq 0,05$), wie die beiden bereits erwähnten Deletionsmutanten. Einzige Ausnahme ist die Genomdeletion $\Delta lmo0559$ die keinen signifikanten Unterschied zu EGD-e zeigt. Die Deletionsmutante $\Delta rli53$ zeigt Abweichungen, die jedoch im nicht-signifikanten im Bereich liegen.

4.6 Infektionssessay im Mausversuch

Da absolute Zahlen ausplattierter Kolonien in einem Modell, wie der Mausinfektion nicht miteinander vergleichbar sind, wird hier, entsprechend den *G. Melonella* und Makrophagen Experimenten auf das relative Verhältnis der Invasionsrate zurückgegriffen.

Bei Tötung der Mäuse werden die Leber und Milz, als gut durchblutete Organe und Filterstationen von Fremdkörpern im Blutkreislauf separiert. Aufgrund der hohen Erregerdichte findet eine Verdünnung mit Kochsalz statt. Die Anzahl der vorhandenen Bakterien wird als Maß für die intrazelluläre Überlebensrate gesetzt.

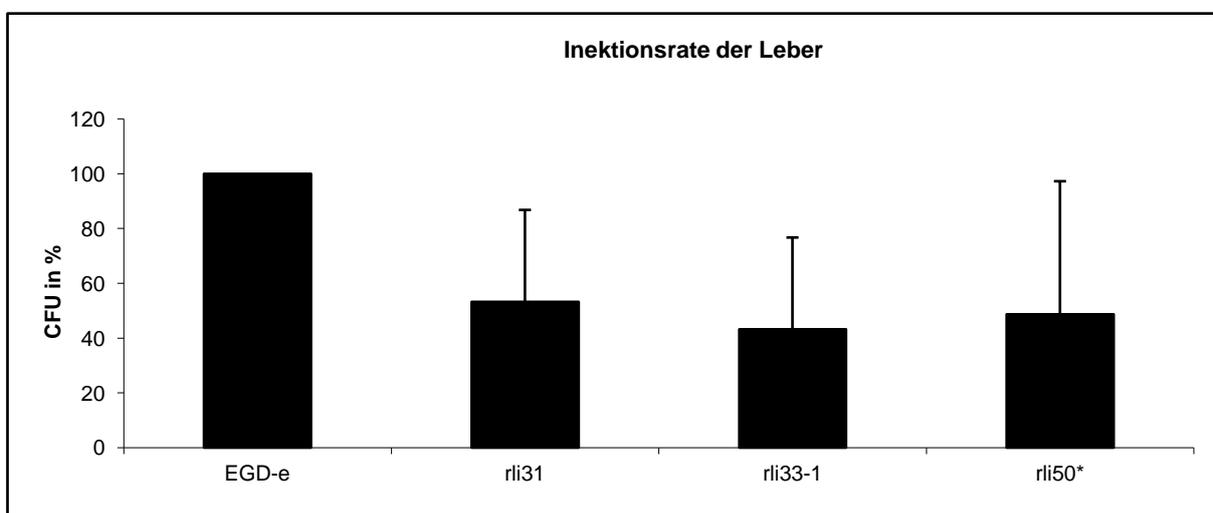


Abbildung 4.15 Infektionsverhältnis nach Ausplattierung der infizierten Leber nach drei Tagen. $\Delta rli31$ und $\Delta rli33-1$ mit signifikanten Unterschieden ($P\text{-Wert} \leq 0,05$), $\Delta rli50^*$ zeigt keine signifikante Unterschiede zu EGD-e ($P\text{-Wert} \geq 0,05$).

Die Relation der isolierten Kolonien aus der Leber zeigt signifikante Unterschiede in der Invasionsrate. Alle getesteten Deletionsmutanten haben eine verringerte Wachstumsraten im Mausmodell und liegen im Mittel bei weniger als 60% des Niveaus, welches durch EGD-e erreicht wird.

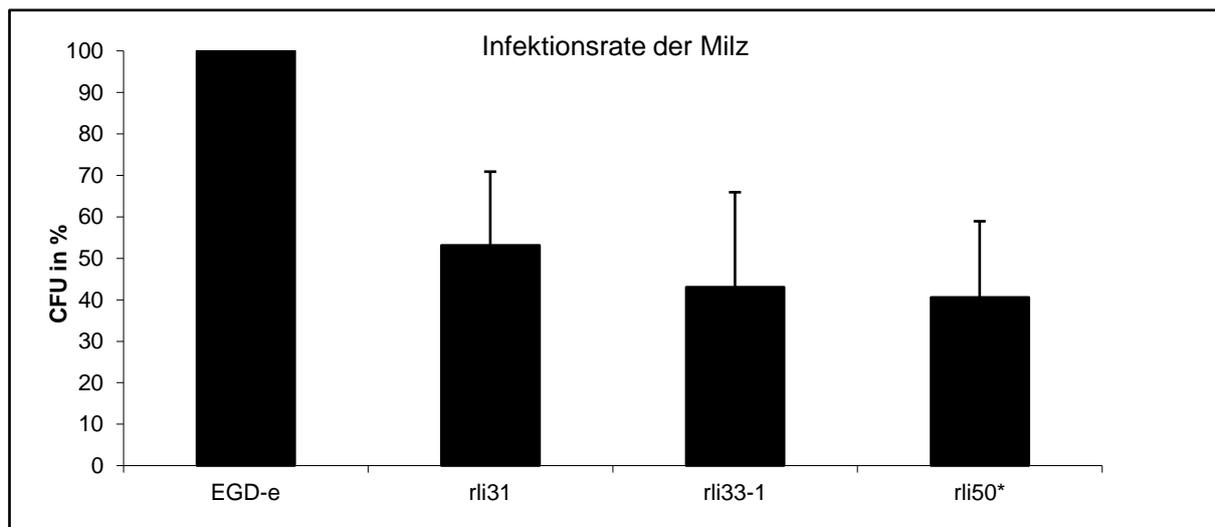


Abbildung 4.16 Infektionsverhältnis nach Ausplattierung der isolierten Milzorgane nach drei Tagen. $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$ zeigen stark-signifikante Unterschiede (P-Wert $\leq 0,005$), $\Delta rli31$ zeigt signifikante Differenzen zu EGD-e (P-Wert $\leq 0,05$)

Die Werte der aus Milzorganen isolierten Kolonien sind der Tendenz der Leberwerte entsprechend. Hier zeigt sich noch deutlicher die Verringerung der Pathogenität der Deletionsmutanten, $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$ liegen mit ihren Invasionsraten unter 50% des von EGD-e erreichten Wertes. Daraus ist zu schließen, dass die deletierten sRNA-Bereiche Einfluß auf die Infektionsfähigkeit und Überlebensrate im Säugetierorganismus ausüben.

4.7 Immunfluoreszenzfärbung von Listerien in Makrophagen

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigt die Doppelfärbung der eukaryontischen Makrophagen (grün) und der Listerien (rot). Für die Sichtbarkeit der Strukturen werden N81-Antikörper und Cy3/ Antimouse IgG Antikörper in Kombination mit Oregon Green verwendet.

Zellwände und pseudopodiale Ausläufer der Makrophagen sind aufgrund ihrer Aktinanteile grün gefärbt. Listerien sind durch ihre Rotfärbung erkennbar. Diese ergibt sich durch die Abstimmung des Antikörpers auf die ActA-Proteine der Bakterienoberfläche. Intrazelluläre Listerien sind an Aktinschweiften augenfällig sichtbar (grüne Appendizes der Bakterien). Anhand der Schweifausrichtung sind die letzten Bewegungsmuster der Erreger nachziehvollbar. Diese sind nur innerhalb der Zelle anzutreffen, da sich *L. monocytogenes* der intrazellulären Ressourcen bedient um das Gerüst zur Fortbewegung zu synthetisieren. Anhand der Länge der gebildeten Schweife kann theoretisch eine grobe Relation zur Verweildauer der Bakterien im Zelllumen hergestellt werden.

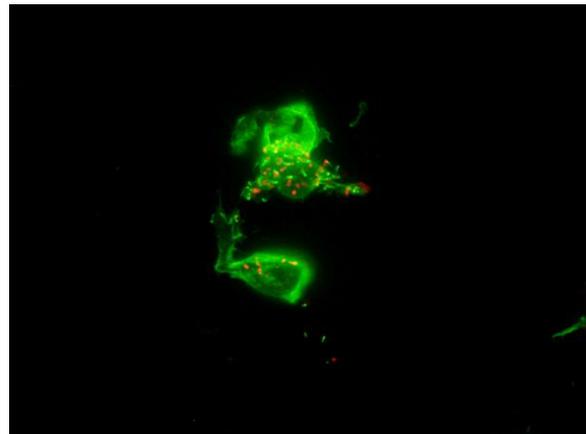
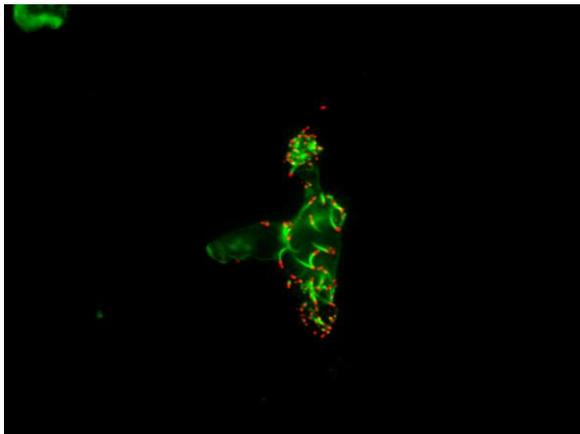


Abbildung 4.17 Wildtyp EGD-e intrazellulär nach einer Infektionszeit von 4 Stunden. Deutlich sind Aktinschweife unterschiedlicher Länge zu erkennen.

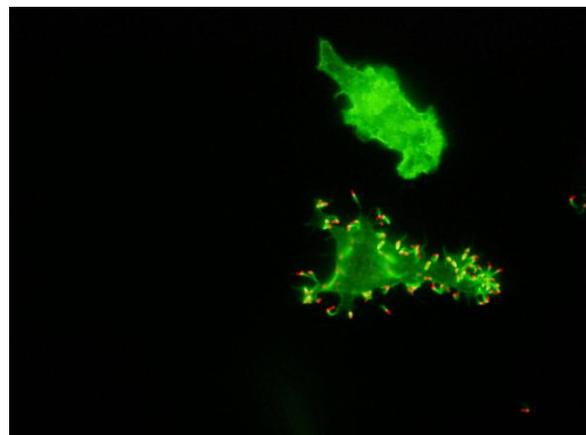
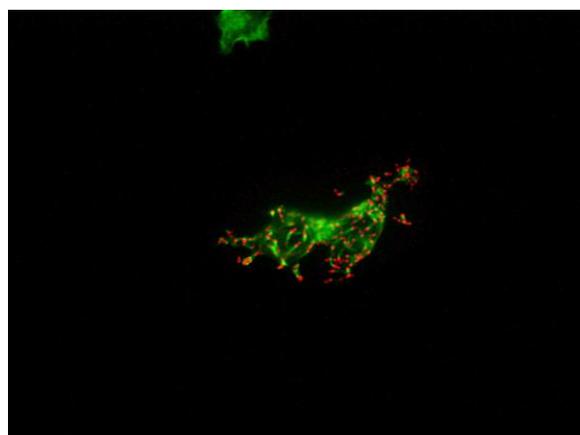


Abbildung 4.18 Deletionsmutante $\Delta rli31$ nach Infektionssassay. Rechts: Durch Eröffnung der Zellen mit Triton treten vormalig inserierte Bakterien in den interzellulären Raum aus und werden durch die Färbung dort sichtbar.

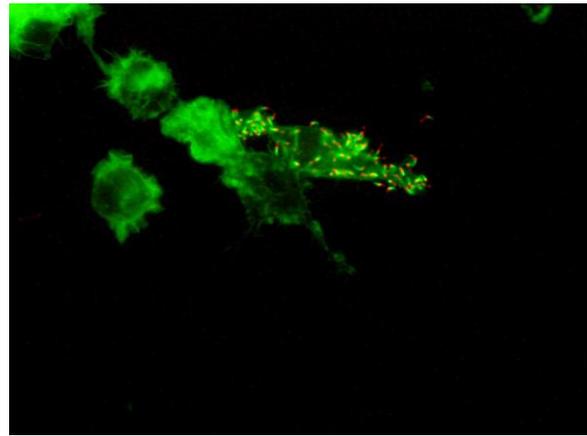
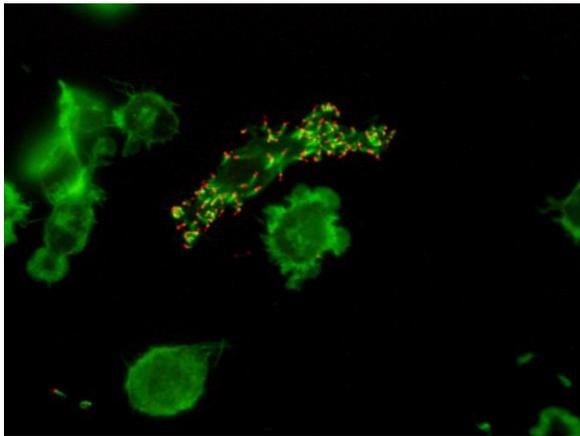


Abbildung 4.19 $\Delta Lmo0559$ intrazellulär. Ohne Kontakt zum restlichen Gewebe findet keine Verbreitung im Zellverband statt. Alle Nachbarzellen sind frei von Bakterien.

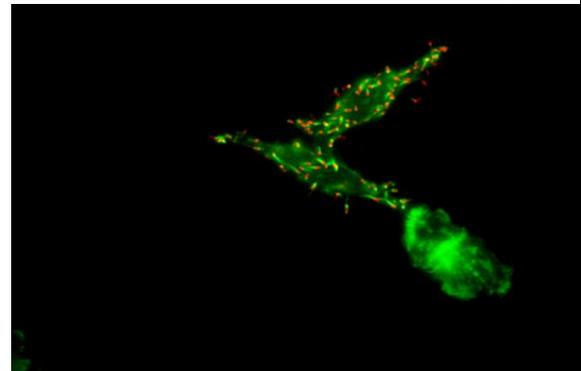
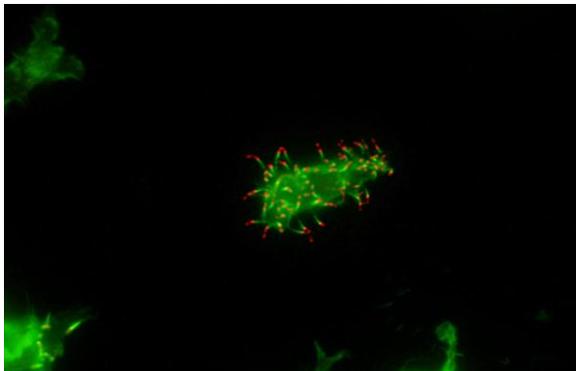


Abbildung 4.20 Zwei Zellen mit Bakterien der Deletionsmutante $\Delta rli33-1$. Rechts: Der Kontakt beider Zellen reicht aus um eine Infektion des anliegenden Organismus zu erreichen.

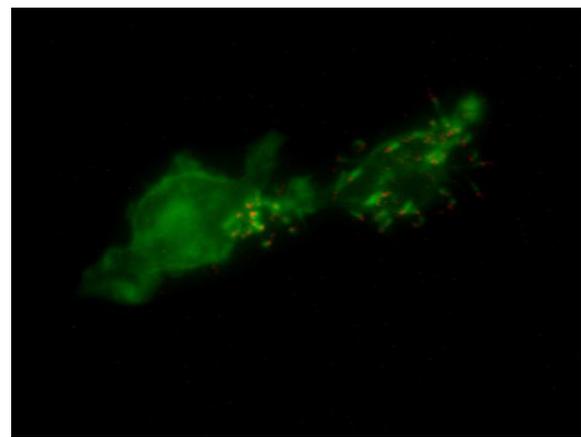
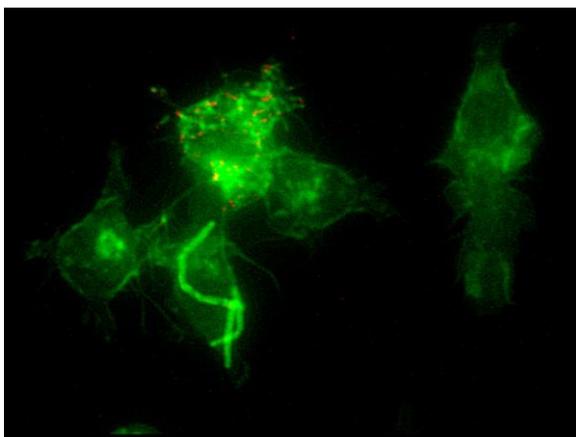


Abbildung 4.21 $\Delta rli33-2$ nach Infektion. Links: die Nachbarzelle ist nicht infiziert, Aktinansammlungen sind jedoch am unteren Bereich zu erkennen, die auf eine gerichtete Bewegung von Listerien auf die Nachbarzellen zu vermuten lassen. Rechts: zwei Zellen im Stadium der erfolgten Invasion. Die Ausbreitung durch das Zelllumen ist erst partiell vollzogen.

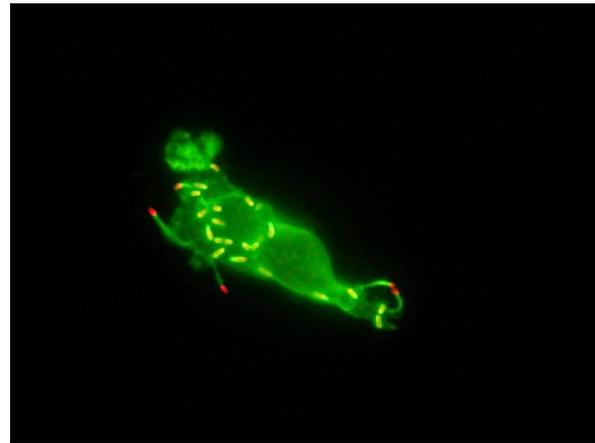
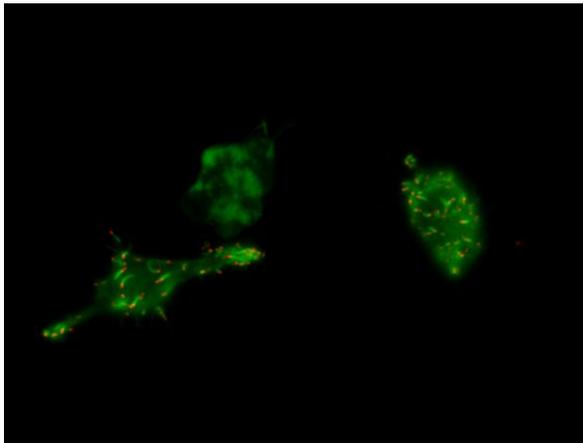


Abbildung 4.22 Infektion durch $\Delta rli53$. Links: Innerhalb der Zelle beginnt die Rekrutierung von Aktin zirkulär um das Bakterium, erkennbar am dünnen Film, der sich über die Oberfläche der Erreger gelegt hat

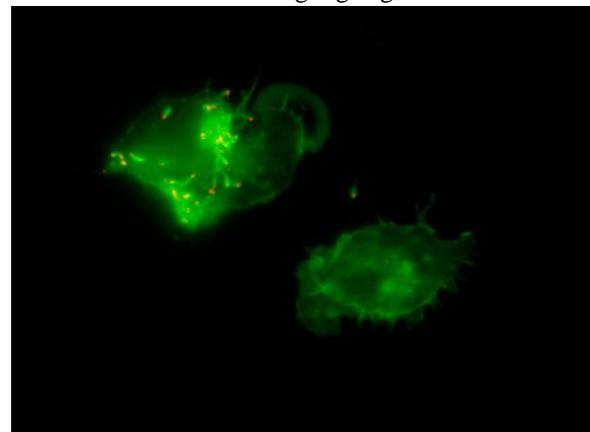
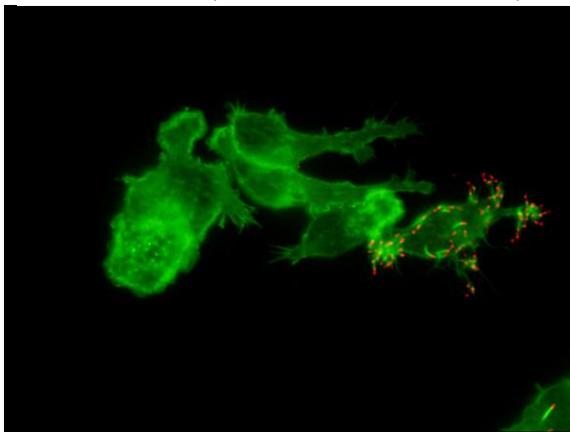


Abbildung 4.23 $\Delta rli50^*$ in Makrophagen. Auffällig hier die traubenförmigen Ansammlungen an den Pseudopodien der Zelle. Auch hier erfolgte noch keine Invasion der Nachbarzelle.

Der Vergleich der Immunfluoreszenzaufnahmen zeigt bei allen untersuchten Deletionsmutanten die Fähigkeit zur Replikation innerhalb von humanen Immunzellen. Die intrazelluläre Überlebensfähigkeit ist gegeben und mittels gezeigter Bilder auch die Ausbildung der zur Fortbewegung notwendigen Aktinschwefel. Die gezeigten Bilder lassen keinerlei Rückschlüsse auf veränderte Pathomechanismen zu. Innerhalb aller Präparate sind Zellen in jedem Stadium der Infektion anzutreffen. Die Infektion benachbarten Gewebes ist bei allen Deletionsmutanten ausgeprägt.

4.8 Immunfluoreszenzfärbung von Listerien in PTK2 Zellen

Die PTK2 Zellen sind Ableger des Potortoo (Riesenkänguruhatte, *Potorous tridactylis*). Sie werden zur Analyse von Mitose Studien verwendet und zeigen ein ausgedehntes, flächiges Wachstum auf Oberflächen. Aufgrund ihrer umfassenden Lumina und flachen Morphologie eignen sie sich besonders gut für Prozesse, die im Zellinneren zu analysieren und graphisch zu dokumentieren sind.

Die Analyse der Deletionsmutanten in PTK2 Zellen bietet neben der Analyse in Makrophagen die Möglichkeit einer differenzierten Betrachtung. Ihre Körper sind verglichen mit P388D1 Makrophagen deutlich größer. So wird die gleiche intrazelluläre Bakterienmenge subjektiv als weniger empfunden, aufgrund des größeren Raumes, den eine Zelle beansprucht. Zusätzlich haben diese Zellen keinen aktiven Aufnahmeprozess, wie Makophagen, daher ist die Gesamtzahl inserierter Bakterien niedriger bei gleicher Infektionszeit.

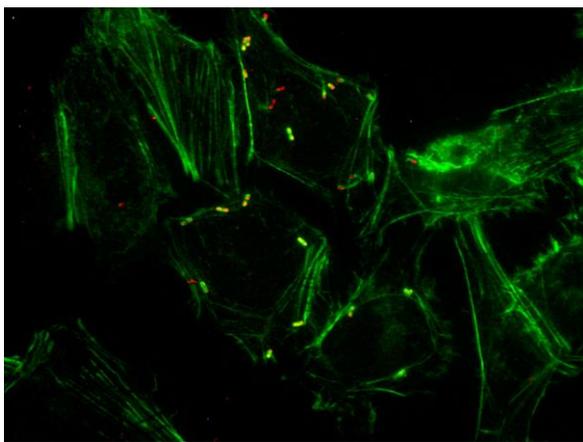


Abbildung 4.24 EGD-e nach Infektion in PTK2

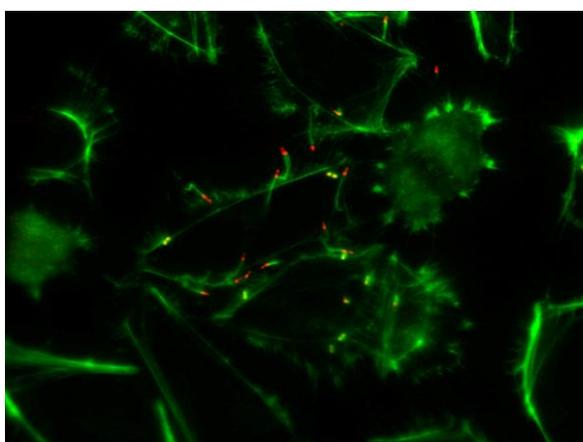
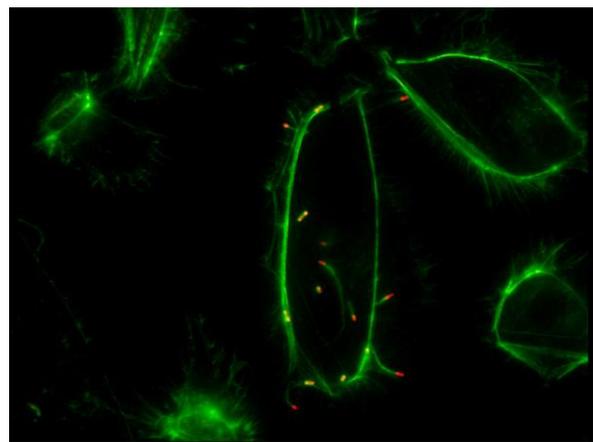
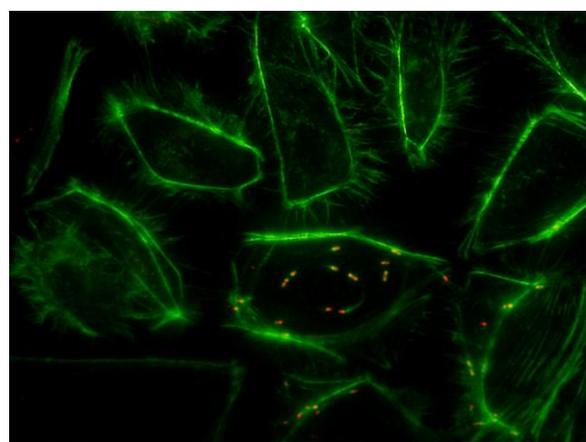


Abbildung 4.25 $\Delta rli31$ nach Infektion in PTK2



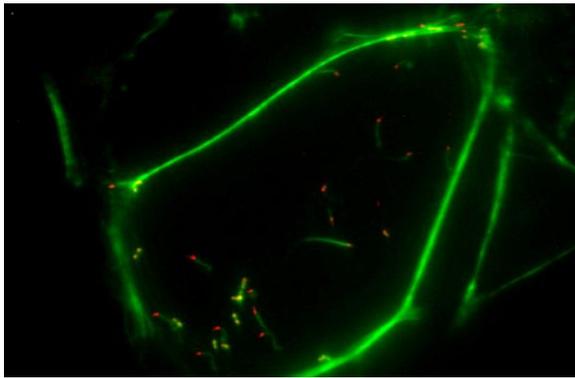


Abbildung 4.26 $\Delta lmo0559$ nach Infektion in PTK2

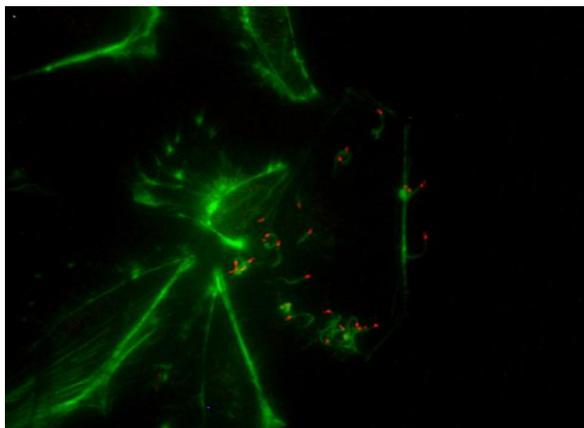
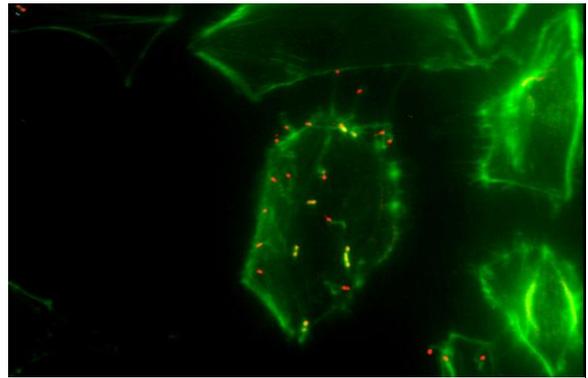


Abbildung 4.27 $\Delta rli33-1$ nach Infektion in PTK2

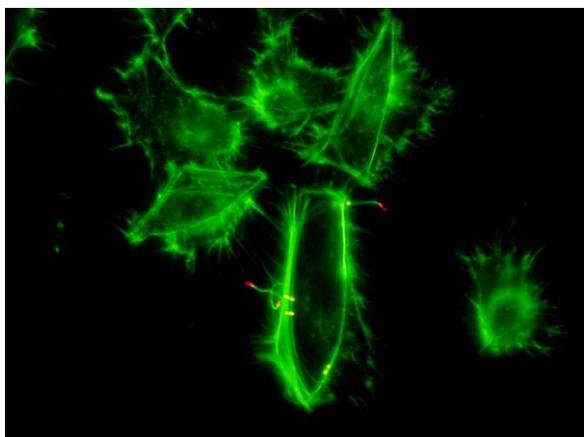
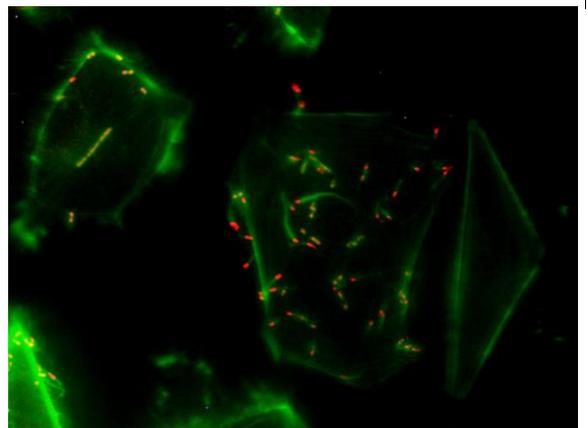
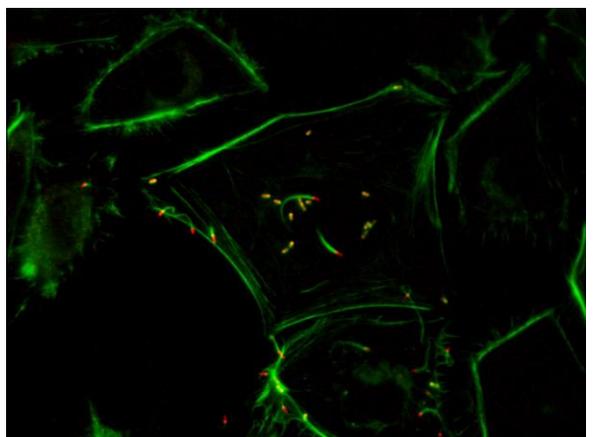
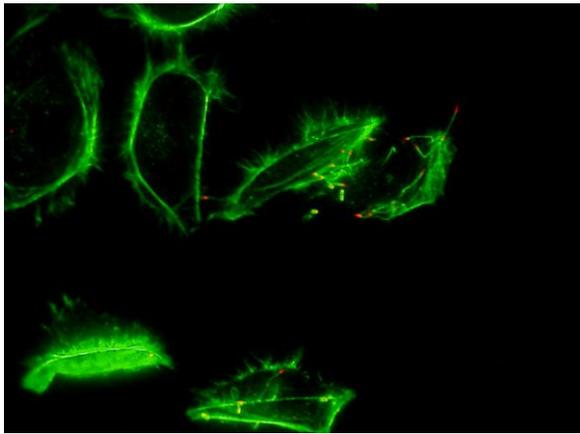
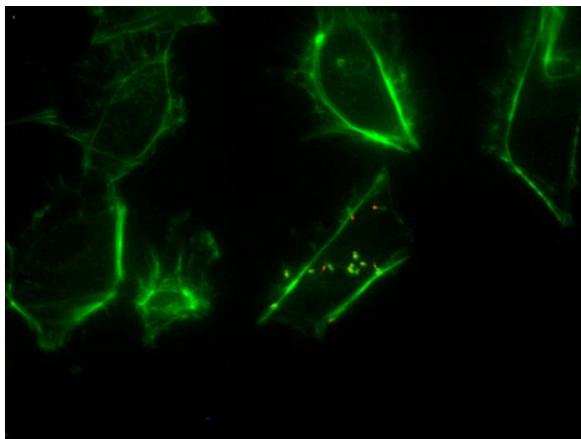
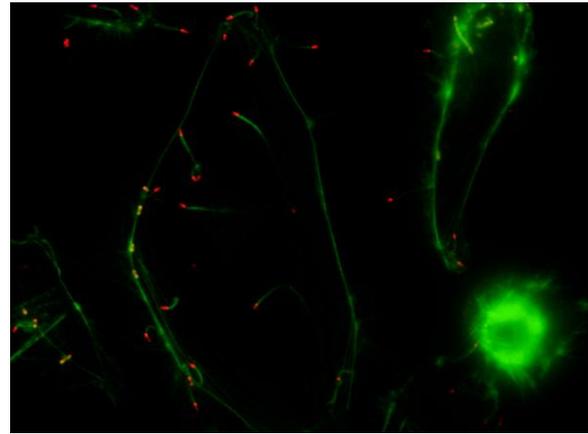
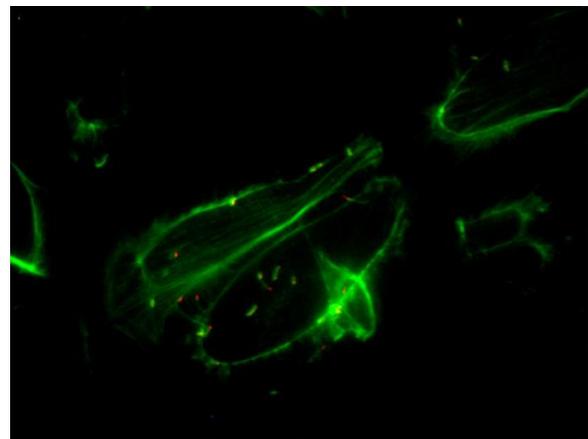


Abbildung 4.28 $\Delta rli33-2$ nach Infektion in PTK2



Abbildung 4.31 $\Delta rli53$ nach Infektion in PTK2Abbildung 4.29 $\Delta rli50^*$ nach Infektion in PTK2

In allen infizierten Zellen ist die Schweifbildung durch Aktinpolymerisation zu erkennen. Diese erfährt mit fortwährender intrazellulärer Lebensdauer der Bakterien auch eine stärkere Ausprägung. Unterschiede zwischen den einzelnen Deletionmutanten sind anhand gezeigter Bilder nicht zu erkennen. Allen Mutanten ist die Fähigkeit der Zellinvasion und des intrazellulären Überlebens gegeben. Unterschiede bezüglich der Infektionsquote und der Verbreitung in Nachbarzellen lassen sich anhand der Bilder nicht analysieren. In den gezeigten Momentaufnahmen sind in allen Mutanten die Fähigkeiten zur Invasion, Proliferation, Aktinbildung und Insertion in angrenzende Organismen zu erkennen.

4.9 Proteinexprimierung

Die Isolierung von Proteinen ermöglicht einen Einblick in die Expressionsvorgänge im Zuge des exponentiellen Wachstums. Von Interesse sind die durch Deletion bestimmter Genomabschnitte hervorgerufenen Veränderungen im Proteinmuster. Aufgrund fehlender, oder zusätzlicher Proteinbanden im SDS-PAGE können Unterschiede zum Wildtyp sichtbar werden und lassen Rückschlüsse auf die Einflüsse der deletierten sRNA Sequenzen bezüglich des Proteinhaushaltes zu.

Zellwandproteine

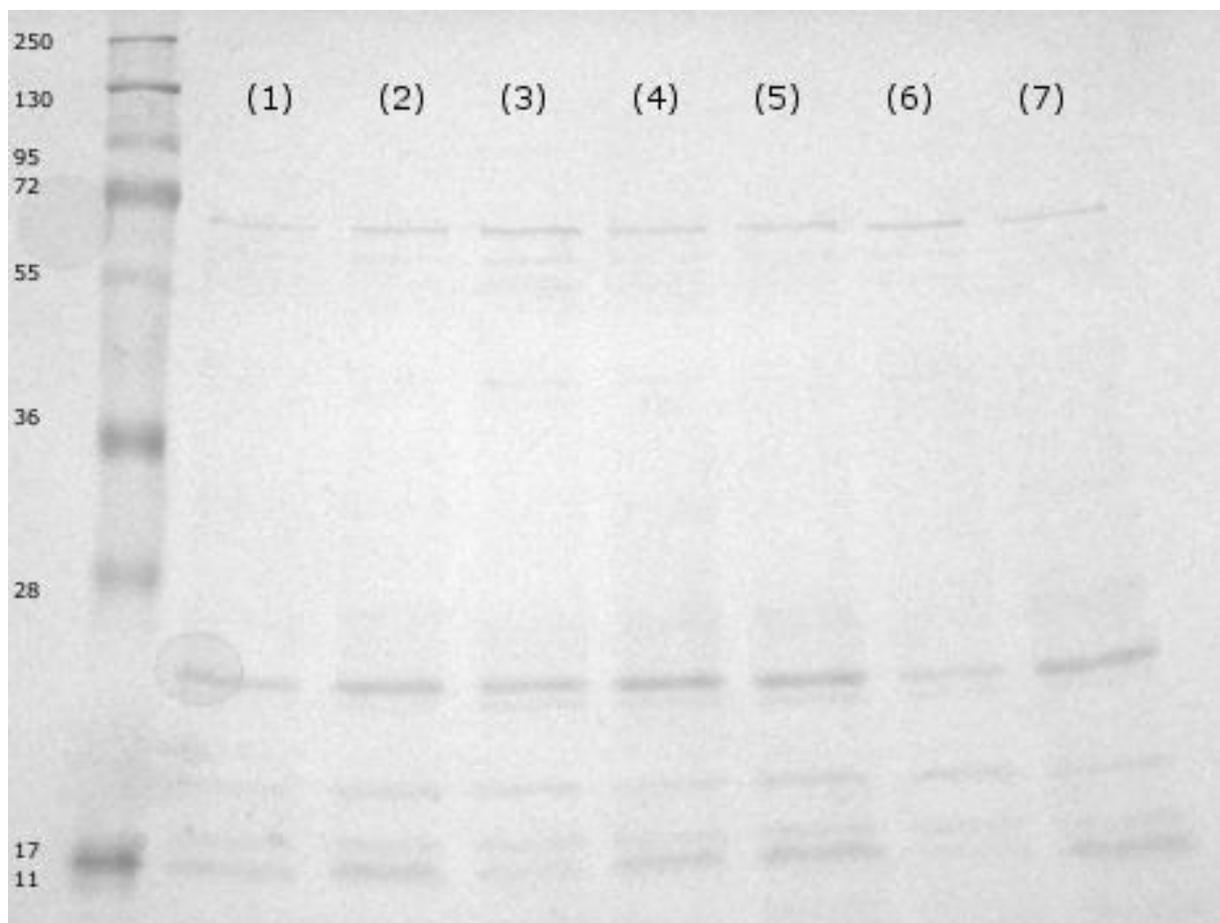


Abbildung 4.30 SDS-Gelanalyse mit Coomassie Färbung der Proteinzellwandfraktion. Rechts: Bandenmarker mit hinzugefügten Größen in kDa. (1) EGD-e Wildtyp, (2) $\Delta rli31$, (3) $\Delta lmo0559$, (4) $\Delta rli33-1$, (5) $\Delta rli33-2$, (6) $\Delta rli53$ und (7) $\Delta rli50$

Die Analyse der Zellwandproteine ergibt gleichwertige Bandenmuster aller Mutanten. Die Konzentration der Banden ist relativ schwach ausgeprägt. Deutlich sind jedoch die Banden Ansammlungen zwischen 72 und 55, sowie zwischen 28 und 11kDa zu erkennen. Alle Mutanten weisen das komplette Spektrum der Proteine des Wildtyps auf (Abb. 4.33 Bande (1) EGD-e).

Überstandsproteine

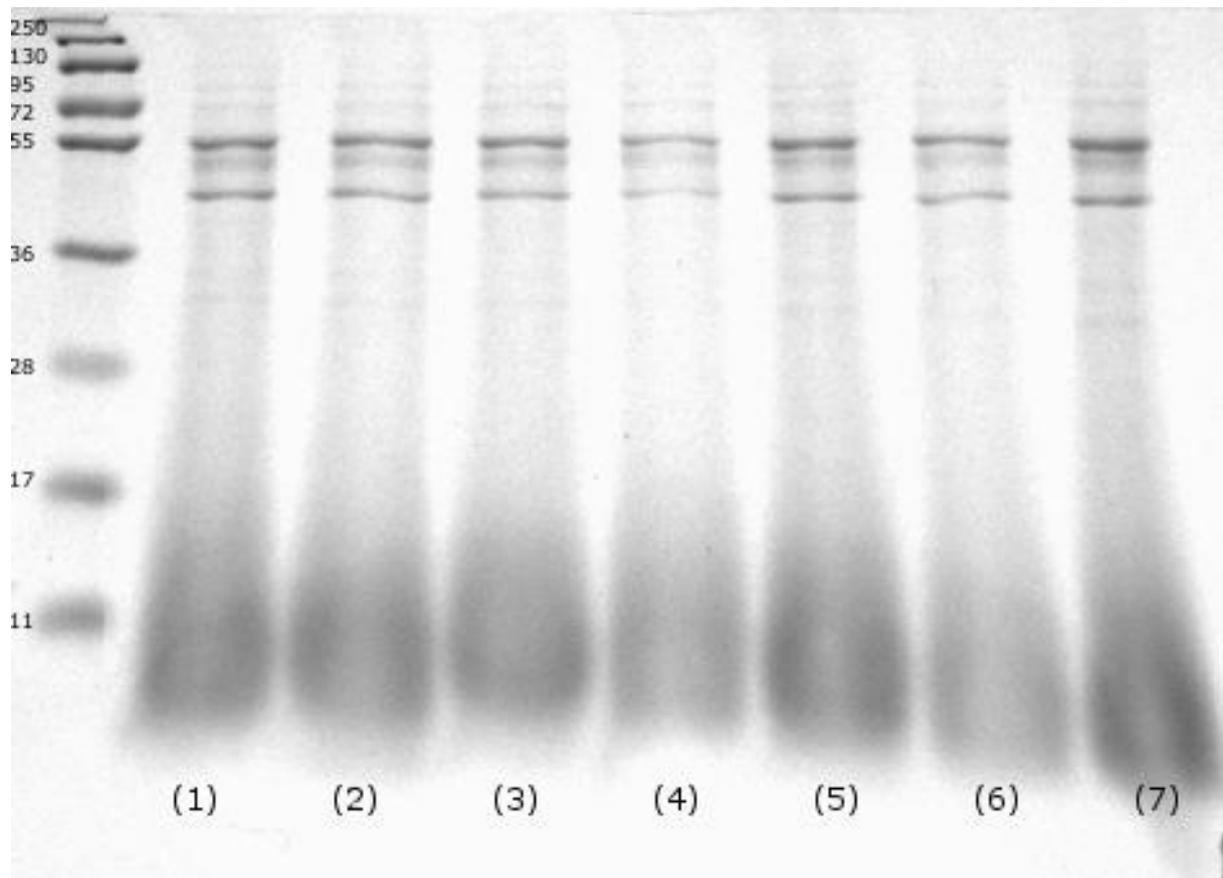


Abbildung 4.31 Coomassie gefärbtes SDS Gel der Überstandsfraktion aus isolierten Proteinen. (1) EGD-e Wildtyp, (2) $\Delta rli31$, (3) $\Delta lmo0559$, (4) $\Delta rli33-1$, (5) $\Delta rli33-2$, (6) $\Delta rli53$ und (7) $\Delta rli50^*$

In der Proteinexprimierung der Überstandsfraktion ist beim Wildtyp und den erstellten sRNA Deletionsmutanten ein hohes Maß an Proteinexprimierung im Bereich der Fraktionen von 36 bis 55kDA zu erkennen. Die Analyse des Gels ergibt keine Unterschiede hinsichtlich der exprimierten Proteinbanden. $\Delta rli33-1$ (Abb. 4.34 Bande (4)) zeigt einen schwächeren Bandenverlauf, was aber auf eine geringe Konzentration im Probenvolumen zurückzuführen ist. Das aufgetragene Volumen je Probe betrug jeweils 8 μ l.

Cytoplasmatische Proteine

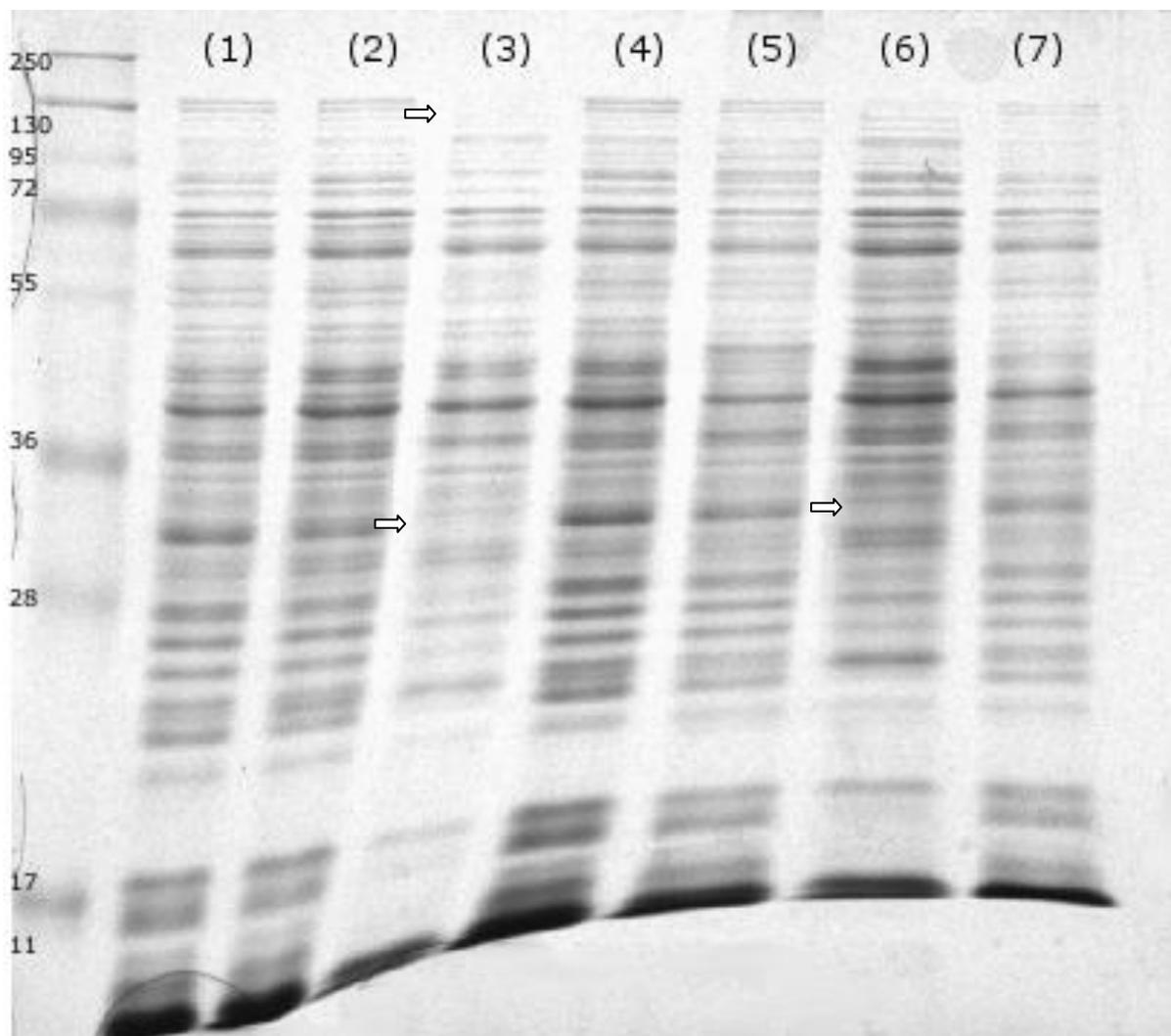


Abbildung 4.32 Cytoplasmatische Proteinfraction im SDS Gel. (1) EGD-e Wildtyp, (2) $\Delta rli31$, (3) $\Delta lmo0559$, (4) $\Delta rli33-1$, (5) $\Delta rli33-2$, (6) $\Delta rli53$ und (7) $\Delta rli50^*$

Die Expressierung der cytoplasmatischen Proteinfraction offenbart Unterschiede im Expressionsmuster. Die Mutante $\Delta lmo0559$ ist, verglichen mit dem Wildtyp durch folgende zwei Unterschiede geprägt: Die Doppelbande der 130kDa Fraktion fehlt, ebenso wie der Bereich zwischen 36 und 28kDa.

Die Proteinisolate wurden zusätzlich mittels Bradford-Analyse [48] bezüglich ihrer Konzentrationen verglichen und mit entsprechenden Mengen erneut auf ein Gel gegeben (siehe Abb. 4.35).

Neben der Proteindeletion $\Delta lmo0559$ ist $\Delta rli53$ (siehe Abb. 4.35 (6)) die einzige Probe, die eine veränderte Expressierung im cytoplasmatischen Muster aufweist: Ab einer Größe von 36kDa (markiert durch Pfeil) verschiebt sich das Bandenmuster im Vergleich zu den benachbarten Proben, die in der Expression dem Wildtyp entsprechen.

4.10 RNA Expressionsmuster der Mutanten $\Delta rli31$ und $\Delta lmo0559$

Die Deletionsmutante $\Delta lmo0559$ stellt bei den generierten Organismen die einzige Nicht-sRNA-Mutante dar. Sie ist die Deletion eines vermuteten Proteins aus dem Gesamtgenom von *L. monocytogenes*. Entscheidend für ihre Erstellung war die Vermutung eines Riboswitches in der UTR zwischen *lmo0558* und *lmo0559*. Dieser Riboswitch, so die Hypothese, wird durch Magnesium beeinflusst und dadurch die Transkription des folgenden Gens *lmo0559* ermöglicht.

Die RNA-Extraktion aus *Listeria monocytogenes* und den Deletionsmutanten innerhalb des ungehemmten Wachstums soll Aufschluss über den Transkriptionszustand innerhalb der UTR-Bereiche *lmo0558* und *lmo0559* geben. Die RNA Proben werden nach ihrer Isolierung als Reverse Transkriptase PCR mit RNA als Template in DNA umgeschrieben.

Bei der RT-PCR kann durch die Stärke der Banden in der Gelanalyse geprüft werden, wie ausgeprägt Transkriptionsprozesse zum Zeitpunkt der Isolation innerhalb des Primerdefinierten-Bereiches sind. Als Template wird für jeden PCR Ansatz die gleiche Menge an RNA verwendet. Folglich kann über einen direkten Vergleich zweier Banden, Aufschluss gewonnen werden, wie stark der Umfang der Genexpression im Bereich, der durch Primer reproduzierten Sequenz ist. Eine starke Bande ist der Indikator für eine große Menge Template-RNA und folglich auch eine starke Expression der entsprechenden Sequenz. Eine schwache Bande resultiert aus verminderter Syntheseleistung innerhalb des replizierten Bereiches und zeigt somit eine geringere RNA-Menge an.

Durch Isolierung der RNA unter verschiedenen Bedingungen (Variation des Magnesium Gehalts im Mediums) soll Aufschluss über mögliche regulative Prozesse geben werden und so eine mögliche Korrelation zwischen Magnesiumgehalt des Mediums und Syntheserate der RNA erkannt werden.

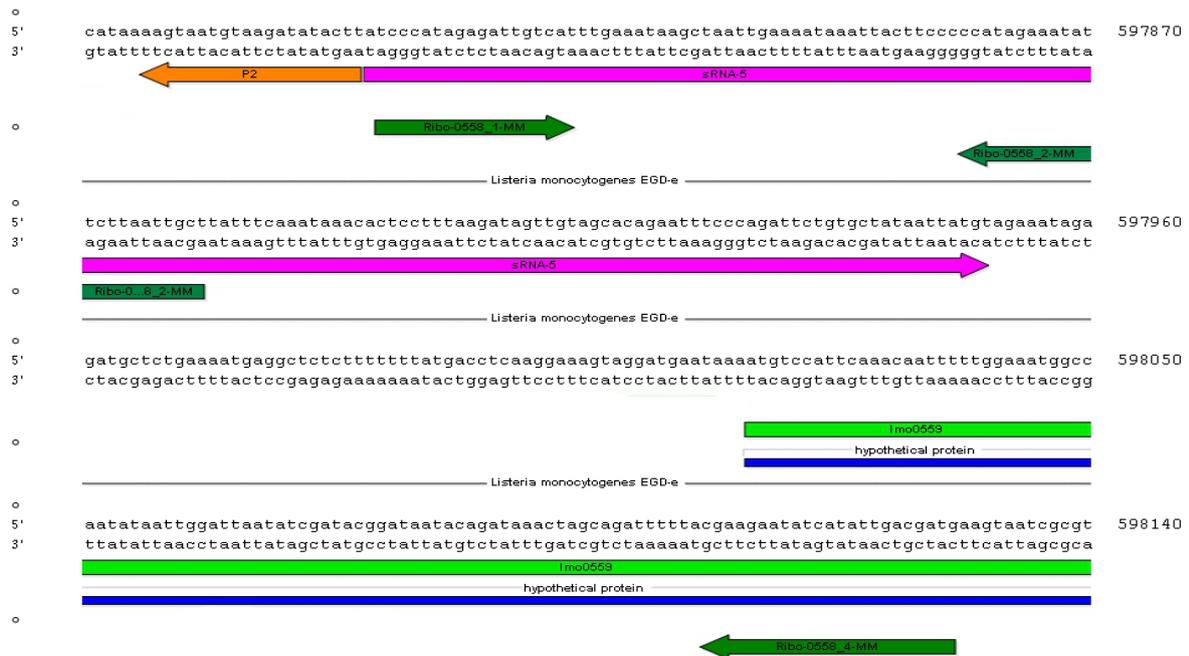


Abbildung 4.33 Ansicht des Listeriengenoms EGD-e im Abschnitt zwischen den Genen *lmo0558* und *lmo0559*. Dunkelgrün: gesetzte Primer zur Analyse der Transkriptionstätigkeit bei unterschiedlichem Mg^{2+} -Gehalt im Medium. Hellgrün: Beginn des Gens *lmo0559*, Violett: sRNA *Δrli31*

Die Primer wurden nach den Kriterien der zu erwartenden Transkriptionen gesetzt. Vermutet wurde aufgrund vorheriger *in-silico* Untersuchungen, dass der Bereich zwischen P1 und P2 sich unter Magnesium-Überschuss durch eine Konformationsänderung der Sekundärstruktur in einen Terminator umorganisieren würde, der eine Transkription des Gens *lmo0559* verhindert. Diese Strukturänderung soll theoretisch bei Mangel an Magnesium nicht vollzogen werden, um so die Transkription eines mutmaßlichen Magnesiumtransporters zu ermöglichen.

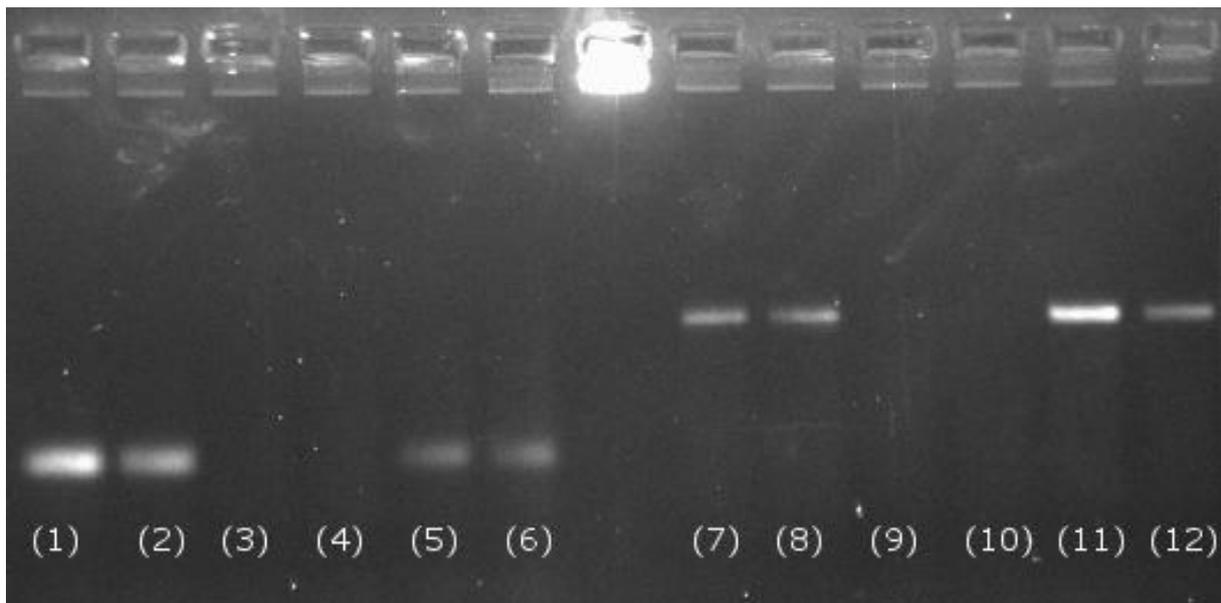


Abbildung 4.34 Gelanalyse der RT-PCR auf 2% TBE-Agarose Gel (1) EGD-e bei 100% Mg^{2+} , (2) EGD-e bei 10% Mg^{2+} , (3) $\Delta rli31$ bei 100% Mg^{2+} , (4) $\Delta rli31$ bei 10% Mg^{2+} , (5) $\Delta lmo0559$ bei 100% Mg^{2+} , (6) $\Delta lmo0559$ bei 10% Mg^{2+} , (7) EGD-e bei 100% Mg^{2+} , (8) EGD-e bei 10% Mg^{2+} , (9) $\Delta rli31$ bei 100% Mg^{2+} , (10) $\Delta rli31$ bei 10% Mg^{2+} , (11) $\Delta lmo0559$ bei 100% Mg^{2+} , (12) $\Delta lmo0559$ bei 10% Mg^{2+} , Proben 1-6 wurden mit Primerpaar P1+P2 erstellt (s.a. Abb. 3.46), Proben 7-12 wurden mit Primerpaar P1+P4 erstellt (s.a. Abb. 4.50)

Abbildung 4.37 zeigt die Transkriptionsleistungen innerhalb der untersuchten Sequenzbereiche proportional zum Magnesiumgehalt des Minimal Mediums. Ein Probendurchlauf ohne Magnesium entfiel, da Minimal Medium ohne Mg^{2+} kein Wachstum von *L. monocytogenes* und erstellter Deletionsmutanten ermöglicht. Folglich ist Magnesium unter nährstoffarmen Bedingungen eine Grundvoraussetzung für das Wachstum von *L. monocytogenes*.

Die analysierten Proben wurden bei einem Magnesiumgehalt von 1,7mmol angezüchtet. Eine Verringerung der Konzentration auf 10% des Ausgangswertes, senkt auch die Syntheseleistung. Besonders stark ist dieser Effekt beim Wildtyps im Primerbereich P1 + P2 und bei $\Delta lmo0559$ im Bereich von P1 + P4 zu beobachten (siehe Abb. 4.37 Nummer 1 und 2 bzw. 11 und 12). Die Transkription der untersuchten Sequenzabschnitte geschieht demnach in Abhängigkeit vom jeweiligen Magnesiumgehalt des Mediums. Es ist aber keine Korrelation zwischen der Konzentration und möglichen Translationsstops zu erkennen.

Die $\Delta rli31$ Mutante zeigt keine Fusionsprodukte, da die UTR vor *lmo0559* in diesem Organismus entfernt wurde.

5. Diskussion

Innerhalb der letzten Jahre wurden mithilfe der Bioinformatik und experimenteller Ansätze circa 50 small non coding RNA in *Listeria monocytogenes* entdeckt [49]. Das Hauptaugenmerk richtet sich nun auf ihre spezifischen Bedeutungen und biologischen Möglichkeiten der Entfaltung im Metabolismus des Bakteriums.

Die wichtigste Aufgabe der sRNA liegt in der Anpassung an Veränderungen der Zellumgebung. Aufgrund ihrer Größe sind sRNAs schnell verfügbar und erlauben eine zeitnahe, unverzügliche Reaktion auf Umweltveränderungen, wie Sauerstoffmangel, Magnesiumknappheit oder Temperaturschwankungen [50].

Die Computer-basierte Genomanalyse mithilfe von Northern-Blots hatte die Erkennung kurzer, stark exprimierter Transkriptionsanteile zur Folge. Eine qualitative Aussage über die Funktion der einzelnen Abschnitte ließ sich jedoch nicht treffen.

Die Generierung der Deletionsmutanten $\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$, $\Delta rli33-2$, $\Delta rli53$, $\Delta rli50^*$ und $\Delta lmo0559$ ermöglichte die Untersuchung einiger sRNA Abschnitte unter verschiedenen Bedingungen und Einflüssen:

- extrazelluläres Wachstum in Verbindung mit zusätzlichen Stressfaktoren
- Proteinanalysen
- Wachstumsversuche mit Isolierung der RNA-Expressionsmuster bei $\Delta rli31$ und $\Delta lmo0559$
- Immunfluoreszenzen
- Infektionssays im Zellversuch und Tiermodell der *Galleria Melonella* und Maus.

5.1 Eigenschaften der generierten sRNA Kandidaten

Die Auswahl der zu deletierenden Nukleotidabfolgen wurde aufgrund der RNA-Sequenzierungsanalyse und von Northern-Blot Ergebnissen getroffen [51]. Das Hauptaugenmerk wurde dabei vor allem auf Untranslated Regions (UTRs) gelegt, die im 5'-Bereich von Genen liegen und den Kriterien der sRNA entsprechen (siehe auch Abschnitt 1.6 bakterielle nicht kodierende sRNA). Zusätzlich wurde besonders auf erhöhte Transkriptionsraten im intrazellulären Zustand geachtet. Als weiteres Kriterium galt ein starker Zuwachs im Vergleich

von extra- zu intrazellulärer Transkriptionsrate. Dieser Sachverhalt ist als Zeichen für wechselnde Beanspruchung aufgrund des veränderten Milieus zu werten.

Die Auswirkungen der sRNA auf Gram negative Bakterien, wie *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, oder *Helicobacter pylori* zeigen sich im Einfluss auf Pathogenität und Virulenz. Der Ausprägungsgrad kann durch sRNA regulierte Vorgänge stark erhöht werden [52],[53]. Das Beispiel der *Chlamydia trachomatis* bietet eine gute Vergleichsmöglichkeit zu *Listeria monocytogenes*. *C. trachomatis* ist ein Gram negativer Erreger, der nur intrazellulär fortpflanzungsfähig ist. Dabei existiert das Bakterium in zwei verschiedenen Zuständen:

- Das Elementarkörperchen als extrazelluläre Überlebensform, metabolisch inaktiv
- Das Retikularkörperchen im Proliferations- und Reproduktionsstatus

Im Elementarkörperchen vorliegende Transkripte, bieten die Möglichkeit der sofortigen Reproduktion bei Eintritt in die Wirtszelle. Intrazellulär entstehen vermehrt Retikularkörperchen, die für die eigene Reproduktion von Bedeutung sind. Anhand des aktuellen Transkriptionsbildes der Bakterien innerhalb der Wirtszelle kann auch der Zeitpunkt des Infektionszyklus bestimmt werden. Vor dem Untergang der Wirtszelle entstehen wiederum vermehrt Elementarkörperchen, um die Verteilung und das Überleben der Spezies zu sichern.

Ähnlich wie *L. monocytogenes* benötigt *C. trachomatis* unterschiedliche Anteile seines Genoms um sich dem wechselnden Milieu und daraus resultierenden Anforderungen anzupassen. Das Erbgut von *C. trachomatis* ist hochoptimiert und bietet nur wenig Platz für intergenomische Sequenzbereiche, die typisch sind für sRNA. Folglich ist die vorhandene Auswahl von sRNAs einem starken Selektionsdruck ausgesetzt. Nur regulative Fähigkeiten, die im Hinblick auf das Überleben einen eindeutigen Selektionsvorteil bieten und überlebenswichtig sind, bleiben im Genom verankert.

Gleichzeitig können innerhalb des Organismus zwei Transkriptionszustände vorliegen:

- Intrazellulär mit einer starken Ausrichtung zur Reproduktion.
- Extrazellulär mit der Zielsetzung eines minimalen Grundstoffwechsels.

In Konsequenz ist die aktive Vermehrung von *C. trachomatis* von einer intrazellulären Umgebung abhängig. Hier besitzen Listerien einen entscheidenden Vorteil. Sie sind auch in unwirtlichen Situationen überlebensfähig und in der Lage sich bei harten Überlebensbedingungen, wie zum Beispiel einer Umgebungstemperatur von 4°C zu reproduzieren. Einen Beitrag

zu diesen Eigenschaften leisten sRNAs, die in der Lage sind den Stoffwechsel stark zu beeinflussen und eine optimale Assimilation an widrige Umstände zu ermöglichen. Diese Fähigkeiten sind aufgrund der Vielzahl an sRNA in fein differenzierter Abstimmung latent vorhanden. Bei *C. trachomatis* ist dies aufgrund des verkleinerten sRNA Pools nicht möglich.

Zudem besitzt *C. trachomatis* kein sRNA-Bindungsprotein, wie Hfq in *L. monocytogenes* [54]. Es wird vermutet, dass diese Rolle zum Teil von genominsertierten Plasmiden erfüllt wird.

Die Gewichtung der sRNA in *C. trachomatis* ist weniger stark ausgeprägt, als bei *L. monocytogenes*. Die Erfassung von sRNA und der dazugehörigen Transkriptionsabschnitte sowie ihrer Startcodons ist jedoch in beiden Spezies von entscheidender Bedeutung für die Entschlüsselung und Funktion des Genoms. Die Strategie der sRNA-Erkennung durch Kombination von *in-silico* und *in-vivo* Untersuchungen bietet in beiden Organismen die Grundlage zur Strukturierung der Stoffwechselkaskaden.

Das bereits erwähnte Protein Hfq hat im Metabolismus von *L. monocytogenes* die Rolle einer Chaperone. So kann durch ihren Einfluss die Halbwertszeit bestehender Transkripte und Proteine verlängert oder verkürzt werden [55]. Eine essentielle Eigenschaft liegt in der Stimulation der bi-molekularen sRNA-mRNA Interaktion. Studien haben gezeigt, dass der Austausch der *hfq*-Genomsequenz von *E. coli* mit der *hfq*-Sequenz von *L. monocytogenes* die Wachstumsrate unter oxidativen Stressbedingungen nicht verändert [56]. Daraus wird der Rückschluss gezogen, dass beide Proteine die funktionellen Aufgaben ihres Gegenparts erfüllen können. Darunter fallen Eigenschaften, wie:

- Förderung der Translation von mRNA (z.B. zur Förderung von Stressresistenzen)
- Beschleunigung der Degradation vorhandener RNA Strukturen

In Konsequenz ist Hfq ein Protein, das starken Einfluss auf die sRNA-vermittelte posttranskriptionale Riboregulation nehmen kann. Hfq ist nicht nur in der Lage die Proteintranskription zu verändern, sondern nimmt auch Einfluss auf agierende sRNA. Hierbei können Effekte entstehen, die durch die Beteiligung diverser Partner synergistisch wirken. In dieser Funktion ist Hfq als ein kritischer und essentieller Faktor in der Regulation des prätranslativen Metabolismus zu sehen [56].

Die Deletionsmutanten $\Delta rli31$ und $\Delta rli33-1$ wurden aufgrund ihrer hohen intrazellulären Transkriptionsrate bei sehr niedriger extrazellulärer Beanspruchung geschaffen.

Das Gen *lmo0559* ist ein potentieller Transporter der CorA-Familie [57]. Die These war, dass eine entsprechende Deletion Veränderungen des intrazellulären Magnesiumhaushalts bewirken und beeinflussen kann. Die erstellte Mutante $\Delta lmo0559$ ist entsprechend der eigentlichen Definition keine small non-coding RNA Deletion. Sie wurde jedoch aufgrund der engen sequentiellen Beziehung zu $\Delta rli31$ im Genom geschaffen. So ist $\Delta rli31$ die Deletion der 5'-UTR von *lmo0559*. Während $\Delta lmo0559$ die Deletion des eigentlichen Gens in diesem Sequenzabschnitt ist.

Bei $\Delta rli50^*$ handelt es sich um eine Doppelmutante der Genomabschnitte $\Delta rli50$ (-`Strang) und $\Delta rli117$ (+`Strang). Beide sRNA Abschnitte überlappen, so dass eine singuläre Entfernung nicht möglich ist, ohne den Gegenstrang partiell zu deletieren. Die *in-silico* Auswertung ergab kleinere Transkriptionsraten für den Anteil von $\Delta rli50$ und einen gesteigerten Transkriptionspegel bei $\Delta rli117$ im extrazellulären Milieu.

Umgekehrt verhält es sich bei $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli33-2$, die nach *in-silico* Überprüfung aus dem UTR-Bereich zwischen *lmo0671* und *lmo0672* aufgeteilt wurden. Bisherige Analysen haben diesen Bereich nur als eine sRNA deklariert und untersucht [58]. Die Untersuchung ergaben jedoch zwei autonome Bereiche mit unterschiedlichen Sequenzen, so dass der Bereich in geteilte Deletionsmutanten partitioniert wurde.

5.2 Wachstumsversuche

Das Wachstum im Brain Heart Infusion (BHI) bietet ein optimales Brutmilieu zur Reproduktion der untersuchten sRNA-Mutanten. Unerwartet zeigen sich hier Proliferationsunterschiede im reinen Medium, ohne Zusätze von Ethanol oder Wasserstoffperoxid bei $\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$, und $\Delta rli50^*$. Alle drei Organismen weisen einen weniger markanten Verlauf als EGD-e bezüglich der maximal erreichbaren optischen Dichte auf.

Der dauerhafte Kontakt einer Bakterienpopulation mit Wasserstoffperoxid kann in der Proliferation eine toxische Wirkung hervorrufen. Entsprechend der Konzentration wirkt es als Oxidationsmittel, das den Bakterienstoffwechsel hemmt. Dasselbe gilt auch für Ethanol, das in höheren Konzentrationen das Bakterienwachstum zum Erliegen bringt. Die Erforschung des extrazellulären Wachstums gibt Aufschluss über eine veränderte Sensibilität gegenüber dem direkten bakteriellen Umfeld.

Die Analyse in BHI-Medium mit Zusätzen von Ethanol oder H_2O_2 erbrachte für die Deletionsmutante $\Delta lmo0559$ keine Unterschiede, verglichen mit dem Wachstum des Wildtyps. Das Gen *lmo0559* wird einem potentiellen Protein zugeschrieben. Es ist anzunehmen, dass die Sequenzabfolge unter nährstoffreichen Bedingungen keine Funktion inne hat. Diese Annahme begründet sich auf der Beobachtung, dass die Mutante unter allen Wachstumsbedingungen keine signifikanten Unterschiede EGD-e aufweist.

Der Zusatz von Ethanol führt zu einem verlangsamten Wachstum. Bei den sRNA Kandidaten $\Delta rli33-1$, $\Delta rli33-2$ und $\Delta rli53$ (s. Abb. 4.3 und 4.4) ist die Reproduktion stärker ausgeprägt als bei EGD-e, $\Delta rli31$, $\Delta rli50^*$ und $\Delta lmo0559$. Das Erreichen der Sättigungsphase bei einem niedrigeren OD_{600nm} als EGD-e markiert den Unterschied. Bei den drei zuletzt genannten sRNA Kandidaten ist der Unterschied zum Wildtyp EGD-e nicht signifikant.

Vergleicht man die Wachstumsverläufe der Deletionsmutanten in BHI mit und ohne Ethanol-Zusatz, so ist erkennbar, dass die Proliferation während des exponentiellen Wachstums deutliche Hemmungen erfährt. Die Wachstumstendenz bis zum Übergang in die stationäre Phase flacht sichtbar ab. Alle getesteten Stämme sind der Hemmung durch Ethanol ausgesetzt.

Der Effekt bei Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entfaltet sich nicht einheitlich, wie die Wirkung von Ethanol. Alle sRNA-Kandidaten, die ein retardiertes Wachstum in BHI-Medium zeigen ($\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$), sind vom H_2O_2 -Einfluss nicht betroffen. EGD-e hat in BHI-Medium mit Zusatz von 0,05% H_2O_2 ein gehemmtes, Initialwachstum. Dieses ist bei $\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$ nicht nachweisbar. Ihre Proliferation bleibt im Anfangsstadium durch H_2O_2 ungehemmt. Die initiale Wachstumsphase wechselt deutlich früher in das exponentielle Wachstum, als EGD-e.

Es liegt die Vermutung nahe, dass durch die vorgenommenen Deletionen eine Hemmung der Anpassungsfähigkeit entsteht. In BHI wird diese durch ein verringertes Wachstum deutlich. Bei Proliferation in Wasserstoffperoxid versetztem Medium hingegen könnte die Deletion einen Selektionsvorteil bieten. Die erstellten sRNA Kandidaten $\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$ erweisen sich als weniger anfällig gegenüber der Hemmung durch Wasserstoffperoxid als EGD-e. Diese Beobachtung gibt Grund zur Annahme, dass die deletierten Gensequenzen der drei Kandidaten progressive Funktionen innerhalb der Aufnahmekaskaden besitzen. Durch ihre Entfernung wird der Aufnahmeprozess gehemmt. In Konsequenz wird bei Wasserstoffperoxid versetztem Medium weniger H_2O_2 in die Bakterien inkorporiert und der intrabakterielle Stoffwechsel initial weniger stark gehemmt.

5.3 Infektionsversuche

Das Infektionssessay in Makrophagen stellt einen entscheidenden Punkt in der Betrachtung der Kausalkette zur Listeriose dar. Sie sind der ausschlaggebende Zelltyp für die Beseitigung von *L. monocytogenes* während der Erstinfektion. So ist eine verringerte Proliferationsrate der Bakterien in den Makrophagen auch ein Indiz für einen fehlenden Regulationsfaktors bezüglich des intrazellulären Wachstums, ergo der Pathogenität.

Die Untersuchung der Infektion in Makrophagen zeigt, dass die drei Deletionsmutanten $\Delta rli31$, $\Delta rli53$ und $\Delta rli50^*$ eine signifikant verringerte, intrazelluläre Replikationsfähigkeit aufweisen (Vergl. Abb. 4.10). -In der Versuchskonstellation wird das Wachstum nach vierstündigem intrazellulärem Verbleib evaluiert. Hier zeigt sich bei genannten sRNA Kandidaten ein verringertes Potenzial zur intrazellulären Replikation. Es lässt sich kein direkter Vergleich zwischen extra- und intrazellulärem Wachstum ziehen, da sich das Spektrum der aktiven Gene verändert. Dennoch sind Parallelen bei extra- und intrazellulären Proliferationmustern zu erkennen. Die sRNA Kandidaten $\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$ bleiben in beiden Szenarien signifikant hinter dem Potential des Wildtyps zurück.

Es ist zu vermuten, dass die geringere Mengen an Bakterienkolonien auf die fehlende Regulation durch sRNA zurückzuführen ist. Diese Eigenschaft ist sowohl intra- als auch extrazellulär ausgeprägt, wie das Wachstum in BHI-Medium zeigt. Entsprechend muss es sich bei den deletierten Bereichen von $\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$ um Abschnitte handeln, die in beiden Zustandsformen des Bakteriums von regulativer Bedeutung sind. Anhand des vorliegenden Versuchsmodells ist jedoch nicht eindeutig, welche Regulationsmechanismen sich verändern. Eine präzise Aussage über Protein- oder mRNA Muster kann nicht gegeben werden. Sichtbar wird nur das Resultat der veränderten Regulationskaskaden.

Die Experimente in Larven der *Galleria mellonella* Wachsmotten sind das Vorstadium zum klassischen *in-vivo* Test im Säugetierorganismus. Durch ein angeborenes Immunsystem sind die Vorläufer der Schmetterlinge zu simplen Abwehrreaktionen in der Lage. Sie stellen einen zusätzlichen Ansatz beim Infektionsversuch am fortentwickelten Immunsystem eines Säugtieres dar.

Das pathogene Potential der getesteten Stämme rangiert in der Breite zwischen *L. innocua* und *L. monocytogenes*. Erstgenannte apathogene Spezies induziert bei der Injektion in *G. mellonella* keine Steigerung der Mortalität. Demgegenüber steht mit *L. monocytogenes* das

Mitglied des Genus, dem das gesamte Arsenal an pathogenen, genetischen Möglichkeiten zur Verfügung steht und folglich auch die stärkste Pathogenität entfaltet.

Alle Mutanten zeigen innerhalb dieses Fenster eine abgeschwächte Mortalität (siehe Abb. 4.11 - 16). Liegt die Überlebensrate von *L. monocytogenes* nach sieben Tagen bei knapp 47%, so ist die Quote von $\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$, und $\Delta rli53$ zwischen 65 und 70%. Einzig $\Delta rli33-2$ und $\Delta rli50^*$ zeige eine signifikant schwächere Pathogenität mit 72 beziehungsweise 79%. Die Untersuchung von $\Delta lmo0559$ zeigt keinen signifikanten Unterschied zu EGD-e.

Im *Gallerien*-Modell hat die Tendenz zur verringerten Pathogenität auch Bestand. So ist bei jeder Deletion eine Verringerung der Mortalitätsrate zu beobachten. Die einzige Ausnahme bildet $\Delta lmo0559$, allerdings ohne signifikante Unterschiede zum Wildtyp.

Es wird festgestellt, dass alle untersuchten Deletionsmutanten in ihrer Wirkung an pathogenem Potential einbüßen. Sie entfalten aber, verglichen mit *L. innocua*, eine letale Wirkung. Entsprechend ist anzunehmen, dass die entfernten Sequenzbereiche einen Teil zur Ausprägung der Pathogenität von *L. monocytogenes* beitragen. Ihre regulativen Aufgaben liegen in der Optimierung von Assimilationsprozessen. Diese münden letztendlich in der optimierten Überlebensfähigkeit des Wildtyps.

Die Deletion bestimmter Sequenzbereiche führt nicht zu einem Ausschluss pathogener Grundfunktionen, vermindert aber die Adaptionfähigkeit im Wirt und dessen Umgebung.

Die Untersuchung der aussichtsreichsten Kandidaten $\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$ im Mausmodell ist nunmehr ein weiterer Schritt, um das Verhalten der Deletionsmutanten in einem Organismus mit einem komplexeren Immunsystem zu ergründen.

Die Ergebnisse der Infektionsversuche im Mausmodell korrelieren mit den bisherigen Infektionsresultaten (siehe Abb. 4.17 und 4.18). In Milz und Leber finden die größten Ansammlungen von im Blut fluktuierenden Fremdkörpern statt. Beide Organe sind als Filterstationen Sammelstellen für die Konglomerate unphysiologischer Blutbestandteile, wie Bakterien. Sie geben den besten Anhaltspunkt über *in-vivo* Proliferation.

Die Akkumulation der *in-vivo* reproduzierten Bakterien ist bei *Listeria monocytogenes* EGD-e erwartungsgemäß am stärksten ausgeprägt. Bei relativen Vergleichen in der Leber erreichen die getesteten Deletionsmutanten nur knapp 50% der, in gleicher Zeit bei *Listeria monocytogenes* EGD-e gewachsenen Kolonien. In der Milz ist der Unterschied mit bis zu 40% bei $\Delta rli50^*$ noch stärker ausgeprägt (s. a. Abb. 4.17 und 4.18).

Es ist zu beobachten, dass die Deletion der ausgewählten sRNA Sequenzen keinen absoluten Verlust der pathogenen Eigenschaften zur Folge haben. Die regulative Rolle der sRNA hat aber auch nicht zum Ziel, Totalausfälle von Bakterienfunktionen zu erzeugen. Die Tendenz, die sich mit steigender Komplexität der Versuchsmodelle einstellt, ist die Gewichtung der Steuerungsfunktionen; Je umfangreicher die Vorgänge und Abläufe innerhalb eines Wirtsorganismus sind, desto stärker fällt die Rolle der sRNA ins Gewicht, um Listerien in einem Organismus zu etablieren und Assimilation zu ermöglichen.

Diese Tatsache wird vor allem beim Vergleich des Gallerien-Modells mit der Mauseinfektion deutlich: Die *G. mellonella* Larven sind von ihren Körperausmaßen, der Beschaffenheit und Stoffwechselprozessen weniger differenziert als Mäuse und Säugetiere mit unabhängigem Temperaturkreislauf und hochentwickeltem Organsystem. Dementsprechend sind auch die Einflussfaktoren, in ihrer Wirkung simpler und geringer. Sind bei den Makrophagenexperimenten Unterschiede von knapp 35% in der Diskrepanz zwischen EGD-e und $\Delta rli50^*$ aufgetreten, so ist dieses Verhältnis bei *Gallerien* bei 31% und im Mausversuch sogar bei einem Unterschied von 60% in den Leberwerten. Diese Tendenz ist auch bei $\Delta rli31$ mit 25, 18 und 47% Diskrepanz zu EGD-e in Makrophagen-, *Gallerien*- und Mausversuchen zu beobachten. Bei $\Delta rli33-1$ mit 18, 23 und 57% fällt der Trend zur Differenzierung mit zunehmender Komplexität der Versuchsmodelle sogar noch stärker aus (siehe dazu auch Abbildung 4.10 Makrophagen, Abbildung 4.11 – 4.16 für *G. Mellonella* und Abbildung 4.17- 4.18 für Mauseinfektion).

Anhand dieser Beobachtungen ist der Schluss zu ziehen, dass durch Deletion der untersuchten sRNA-Sequenzen eine Verringerung der Adaptationsfähigkeit erfolgt.

Diese Prozesse lassen sich im Immunfluoreszenz-Mikroskop nicht visualisieren. Unterschiede im phänotypischen Erscheinungsbild im Stadium der Makrophagen- oder PTK2-Zellen-Infektion sind nicht signifikant erkennbar. Diese Tatsache ist auch auf das bereits erwähnte Infektionsmodell der Makrophagen, beziehungsweise der PTK2 Zellen zurückzuführen (siehe dazu auch Abb. 4.19 – 4.25 für Infektion in Makrophagen, Abb. 4.26 – 4.32 für Infektion in PTK2 Zellen).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mit steigendem Umgebungsanspruch auch der Grad an erforderlichen Regulationsmöglichkeiten steigt. Ein komplexer Organismus, wie der Körper eines Säugetieres erfordert eine präzisere, feindifferenziertere Anpassung an das lokale Milieu, als die Infektion einzelner Zellen oder Gewebsverbände. Zusätzlich sind inkorporierte

Bakterien hier mehr und besser abgestimmten Abwehrmechanismen ausgesetzt, die eine Infektion verhindern.

Diesem Anspruch der Assimilation kann nur durch optimale Regulation der Eigenschaften und Fähigkeiten des Bakteriums begegnet werden. Entfallen diese Möglichkeiten der Anpassung, so resultiert dies in einer verringerten Überlebensrate und verminderten Proliferation.

5.4 Proteinanalyse

Die Proteinexprimierung bietet eine zusätzliche Möglichkeit aus sRNA-Veränderungen resultierende Abweichungen im Syntheseprozess des intrabakteriellen Metabolismus sichtbar zu machen. Veränderte Proteinbanden in der SDS-PAGE Analyse resultieren aus veränderten mRNA Transkriptions- und Regulationsleistungen. Sie werden durch sRNA beeinflusst und dienen der Anpassung an Umweltveränderungen. Die Folgen werden in unterschiedlichen Proteinbandenmustern sichtbar. Daraus können Rückschlüsse auf mögliche regulative Beteiligungen der deletierten sRNA Sequenz gezogen werden.

Die Fraktionen der Zellwand- und der Überstandsproteine zeigen keine Unterschiede zum Bandenmuster des EGD-e Wildtyps. Alle Deletionsmutanten haben in den gefertigten Coomassie-Protein-Gelanalysen (siehe Abb. 4.34 und 4.35) das gleiche Bandenmuster, wie der Wildtyp. Entsprechend ist davon auszugehen, dass Art und Umfang der Proteinexprimierung innerhalb der erstellten Deletionsmutanten, dem Muster des Wildtyps entsprechen.

In der cytoplasmatischen Fraktion offenbaren $\Delta lmo0559$ und $\Delta rli53$ Unterschiede zum Wildtyp. Die Bandenmuster der Größen zwischen 28 und 36kDa sind verändert. Im Hinblick auf die Expressierung von Proteinen lässt sich diese Aussage nicht auf eine qualitative Gruppe von Proteinen eingrenzen. Dazu ist das Verfahren der SDS-Gelanalyse zu ungenau und der verwendete Primer zu breit unterteilt. Hier bietet sich eine weitere Analyse mit besserer Auflösung des Bereiches zwischen 28-36kDa an, um ein präzises Ergebnis der genauen Veränderungen innerhalb des genannten Spektrums zu bekommen. Alternativ wäre auch an eine Extraktion der Bandenmuster aus dem Gel, Aufreinigung und Identifikation zu denken.

Zusätzlich fehlt der $\Delta lmo0559$ Mutante die Doppelbande bei 130kDa. Aufgrund der Größe der hier fehlenden Proteine lässt sich der Kreis der nicht exprimierten Proteine auf eine Gruppe von drei potentiellen Produkten beschränken. Bei bisher bekannten Proteinen handelt es sich um Abschriften der Strangsequenzen *rpoB*, *addB* und *pycA* (siehe auch Tab. 5.1).

Die *rpoB* - Sequenz codiert für die β -Untereinheit der DNA abhängigen RNA-Polymerase. Diese ist ein wichtiger Faktor bei der Unterscheidung gram-positiver und gram-negativer Bakterien sowie bei der Einordnung in die Stammbäume der einzelnen Spezies. Aufgrund seiner Größe und Funktion stellt das *RpoB*-Protein einen zentralen Bestandteil im Wirkprinzip der DNA Transkription dar [59].

Die *addB* - Sequenz ähnelt einer ATP-abhängigen β -Untereinheit einer Desoxyribonuklease. Durch Verringerung der Gewichtung der Nuklease-Untereinheiten kann das Gleichgewicht zwischen Synthese und Hydrolyse empfindlich gestört werden und die Homöostase des Bakterienhaushaltes verändert werden.

Die Pyruvat Carboxylase A wird durch die Sequenz *pycA* codiert. Sie ist Teilvorlage für die Herstellung eines Carboxylase Enzyms, welches in der Lage ist Carboxylgruppen in vorhandene Strukturen einzubauen. Allerdings scheidet die Entfernung der *pycA*-Sequenz als mögliche Folge der Deletion von *lmo0559* aus. So haben bisherige Studien zur Rolle des *pycA*- Abschnittes ergeben, dass die Deletion eine Verringerung des Wachstums in BHI zur Folge hat [60]. Dies konnte bei vorliegenden Experimenten nicht gezeigt werden (siehe Abb. 4.1). Folglich kann mit großer Sicherheit angenommen werden, dass diese Zielsequenz als Möglichkeit nicht in Betracht kommt.

Name	Start	Ende	Strang	Molekulargewicht	Beschreibung
<i>rpoB</i>	273003	276557	+	132.603,00	Produkt: RNA polymerase (Beta Untereinheit).
<i>addB</i>	2356325	2359798	-	132.601,00	ähnl. der ATP-abhängigen Desoxyribonuklease (sub. B)
<i>pycA</i>	1099266	1102706	+	128.049,00	ähnl der Pyruvat Carboxylase.

Tabelle 5-1 Potentielle Sequenzen der fehlenden 130kDa Fraktion von *lmo0559* aus der Zytoplasma Analyse des SDS-Gels

5.5 Putative Ziele der analysierten sRNA-Kandidaten

Die Betrachtung der detaillierten, wechselnden Transkriptionsleistungen, welche durch die Folgen der sRNA Deletionen zustande kommen, werden im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert. Vergleicht man die deletierten sRNAs mit putativen Ziel-Sequenzen, so ergibt sich ein differenziertes Bild mit möglichen Interaktionswegen. Auffällig ist hierbei der hohe Übereinstimmungsfaktor mit partiellen Proteinsequenzen, die im Regulationshaushalt integriert sind.

Bei der sRNA Sequenz *rli31* kommen als putative Ziele folgende Nukleotidabfolgen in Frage: Die Sequenz für das Protein FliE, das einen Basalkomplex für Flagellin hacken bildet und so-

mit zur Verankerung der Bakterien beiträgt. Die Basenabfolge für ein acetylierendes Peptidoglykan-Protein. Dieses sitzt vorwiegend in Zellwänden Gram positiver Bakterien und bildet einen Teil des Mureinnetzes zum Schutz vor osmotischen Veränderungen. Beide Nukleotidabfolgen zielen auf Strukturen, die in der Membran verankert sind und Einfluss auf Interaktionen mit dem Umgebungsmilieu nehmen können.

Die sRNA *rli33-1* hat als mögliche Ziele die Sequenzen für das ribosomale Protein S10, die Sequenz des vermuteten Antigen A und eine Inosin Monophosphat Dehydrogenase. Alle drei Ziele sind im intrabakteriellen Stoffwechsel verankert. Das S10-Protein ist am Aufbau der Ribosomen beteiligt und somit aktiv im Translationsprozess von mRNA in Proteine integriert. Das Antigen A und die Inosin Dehydrogenase sind in intrazellulären Umbauprozessen involviert. Inosin ist ein Umbauprodukt von Adenosin.

Der zweite sRNA Kandidat dieses Sequenzbereiches *rli33-2* ist möglicher Regulator des Hitzeschockprotein GroEL, welches eine Leitstruktur für die Faltungsprozesse von Bakterienproteinen ist. GroEL dient als Chaperone und verknüpft unterschiedliche Aminosäureketten zu Ihrer späteren physiologischen Struktur. Als weitere Ansatzpunkte kommen die Sequenzen für die DNA-Polymerase III und einen Aminosäure-Antiporter in Frage. Beide Proteine nehmen Einfluss auf den Metabolismus innerhalb der Bakterien, indem sie wichtige Bausteine für den Nukleotidumsatz bereitstellen.

Die deletierte Nukleotidabfolge *rli53* hat Möglichkeiten der Interaktion mit dem Gen der Carbamant Kinase B. Diese katalysiert den Umbau von ADP in ATP im Energiehaushalt der Bakterien. Alternative Ansatzpunkte sind Sequenzen, die dem YlxR Protein von *B. subtilis* ähneln, dessen Funktion jedoch noch nicht geklärt ist.

Die letzte untersuchte sRNA Sequenz, *rli50** hat als mögliches Interaktionsgen einen transkriptionellen Regulator der LacI Familie. Dieser ist für die Synthese von L-Glutamin verantwortlich. Eine weitere Interaktionsmöglichkeit ist eine Zielsequenz, die vermutlich für ein Internalin codiert. Internaline sind als Oberflächenproteine von entscheidender Bedeutung für die Wechselwirkung von *L. monocytogenes* und dem Wirtsorganismus. Eine Veränderung innerhalb dieses Stoffwechsellusters kann weitreichende Folgen für die Pathogenität der Spezies haben.

Auch wenn die hier genannten möglichen Zielsequenzen weitreichende Konsequenzen für den Metabolismus haben können, ist anhand der Versuchsmuster nicht eindeutig bestimmbar, ob die Einflüsse der sRNA tatsächlich über die beschriebenen Signalkaskaden ablaufen.

5.6 Riboswitchanalyse von *Δlmo0558*

Riboswitches stellen eine der regulativen Klassen von sRNA dar. Sie befinden sich in der 5'-untranslated region (UTR) eines Gens und sind cis-interagierende Regulationselemente. Transkriptionsprozesse werden dabei über die Bindung einzelner, mono- oder bivalenter Liganden moduliert. Die Elemente binden sich an die hochkonservierten Aptamer Region (siehe auch Abschnitt 1.6). Die resultierende Konformationsänderung bildet die strukturelle Basis für die Regulation der entsprechenden Genexpression [61]. Wird die Strukturänderung des Riboswitches durch bivalente Ionen, wie zum Beispiel Mg^{2+} herbeigeführt, so spricht man auch von einer sogenannten „M-Box“. Diese Riboswitches werden durch die Bindung mehrerer Liganden in ihrer Konformation so verändert, dass wie im Falle der potentiellen Mg^{2+} -Box eine Terminatorregion entsteht, die eine Translation des nachfolgenden Gens unterbindet.

Der beschriebene Aufbau wurde als Hypothese für die 5'-UTR des Gens *lmo0559* untersucht. Vorangehende Analysen haben für die Nukleotidabfolge von *lmo0559* eine hohe extrazelluläre Expressionsrate ergeben. Unter intrazellulären Bedingungen finden jedoch fast keine Abschriften des Folgens statt. Die RNA-Isolation geschieht bei Wachstum in Minimal Medium, um explizit den Einfluss des Magnesiumgehaltes auf die Gen-Expression zu untersuchen.

Die Analyse der RNA Expression von *Δrl31* und *Δlmo0559* resultiert in einer Transkriptionsrate, die kongruent zum Magnesiumgehalt des Anzuchtmediums ist. Nach Isolierung wurde eine Real Time-PCR Reihe mit Primern durchgeführt, die sich direkt auf den entsprechenden Sequenzabschnitt vor dem Gen *lmo0559* bezog.

Zusätzlich wurde eine Versuchsfolge mit einem Primerpaar durchgeführt, welches den Bereich über die sRNA-Region und den Startpunkt des Gens hinaus abdeckte (siehe dazu auch Abb. 4.36). Die Expression im Bereich des vermuteten Riboswitches, vor dem Gen *lmo0559*, ist bei hohem Mg^{2+} -Gehalt stärker ausgeprägt, als bei niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen. Dies ist gleichermaßen bei Sequenzierung über den Riboswitch hinaus in den Genabschnitt von *lmo0559* hinein festzustellen.

Aufgrund dieser Ergebnisse, ist die These des Magnesium-abhängigen Riboswitches, der bei einem niedrigen Mg^{2+} -Gehalt die Transkription des Gens *lmo0559* freigibt nicht aufrecht zu erhalten.

Vorweg wurde die Hypothese aufgestellt, der Riboswitch vor *lmo0559* blockiere bei hohem Mg^{2+} -Gehalt die Transkription des Gens, welches für einen Mg^{2+} -Transporter kodiert. Die Aktivierung der entsprechenden Transporter-Transkription sei bei Magnesiumüberschuss gehemmt. Aufgrund ausreichender Magnesiumkonzentration würde der Riboswitch seine Blockadefunktion wahrnehmen, um die Synthese weiterer Transporter zu verhindern.

Bei niedrigen Mg^{2+} -Konzentrationen hingegen würde eine Konformationsänderung die Terminator-Funktion aufheben, und die Transkription ungehindert in der Synthese von Mg^{2+} -Transportern resultieren. Diese wären daraufhin in der Lage den Mangel an Mg^{2+} durch erhöhte Transportleistung auszugleichen.

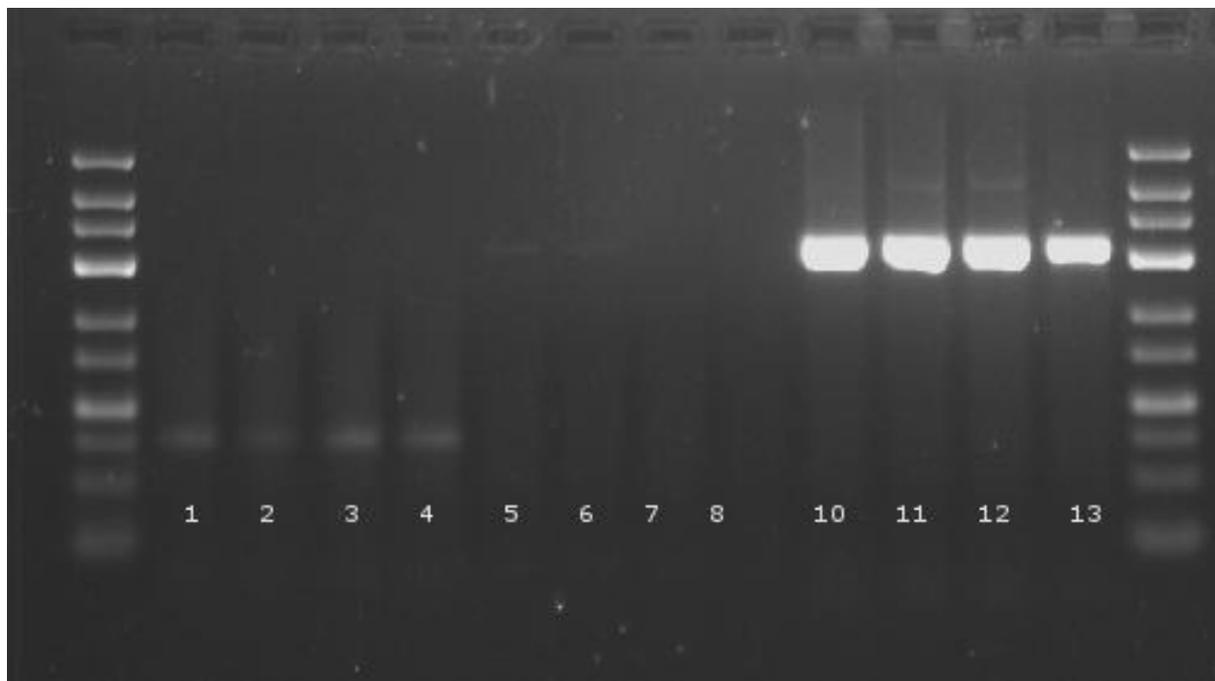


Abbildung 5.1 Gelanalyse der Elektrophorese der RNA Proben nach erfolgter RT-PCR von EGD-e und $\Delta lmo0559$: (1) EGD-e bei 100% Mg^{2+} Gehalt, (2) EGD-e bei 10% Mg^{2+} Gehalt, (3) $\Delta lmo0559$ bei 100% Mg^{2+} Gehalt, (4) $\Delta lmo0559$ bei 10% Mg^{2+} Gehalt, (5) EGD-e bei 100% Mg^{2+} Gehalt, (6) EGD-e bei 10% Mg^{2+} Gehalt, (7) $\Delta lmo0559$ bei 100% Mg^{2+} Gehalt, (8) $\Delta lmo0559$ bei 10% Mg^{2+} Gehalt, (10) housekeeping EGD-e, (11) housekeeping *lmo 0559*, (12) housekeeping EGD-e und (13) housekeeping $\Delta lmo0559$. Die RT-PCRs 1-4 wurden mit prä-*lmo0559* Primerpaar, 5-8 mit intra-*lmo0559* Primerpaar durchgeführt.

Diese These ist durch die hier gezeigten Ergebnisse nicht zu bestätigen. Das Expressionsmuster verhält sich proportional zum Magnesiumgehalt im Medium. Dies spricht gegen das vermutete antagonistische Verhältnis von Mg^{2+} -Konzentration zu Expressionsrate. Durch die simultane Überprüfung aktiver House-keeping Gene, die bei veränderten Bedingungen kon-

stant produziert werden, konnte gezeigt werden, dass andere RNA Abschnitte trotz wechselnder Mg^{2+} -Bedingungen konstant exprimiert werden.

Eine mögliche Erklärung für diesen Sachverhalt könnte der Mg^{2+} -Gehalt des verwendeten Minimalmediums sein. Gearbeitet wurde mit einer Ausgangskonzentration von 1,7mM (100% Mg^{2+}) und einer Verringerung auf 0,17mM (10% Mg^{2+}).

Ähnliche Versuche zur Untersuchung von potentiellen Riboswitches in Bakterien, verliefen in *Salmonella enterica* bei gleichen Konzentrationsverhältnissen [62] und lieferten Ergebnisse, die einen entsprechenden Antagonismus zwischen Magnesiumgehalt des Mediums und Expressionsstärke zeigen. In *S. enterica* wirkt das Protein *PhoP* als Aktivator, um den physiologischen Level an Mg^{2+} aufrechtzuerhalten. Wird in Folge MgtA-Protein synthetisiert, wirkt die Internalisation von Magnesium als Ligand für die Bindung der 5'-UTR Region von MgtA. Hier kommt es durch Konformationsänderung des Riboswitch zur Ausbildung eines Terminators und zur Hemmung der eigenen Transkription. Das Mg^{2+} -Ion hat hier also eine bifunktionale Aufgabe. Dieser Regelungsprozess gilt als ungewöhnlich, da die meisten Gene bei Steuerung über einen Riboswitch, einzig und allein von diesem geregelt werden und nicht über zwei kooperierende Mechanismen.

Darüber hinaus kann sich die Funktion der sRNA auch als eine rein intrazellulär aktive Komponente erweisen, die aber aufgrund des Versuchsaufbaus nicht überprüft werden kann.

Es bleibt also zu vermuten, dass die Ausführung der Translation von *lmo0559* über einen Riboswitch reglementiert wird, der seine Funktion proportional zur vorhandenen extrazellulären Magnesiumkonzentration erfüllen kann. Hier eröffnet sich die Fragestellung nach der Negativ-Regulation und dem Sinn eines zusätzlichen Transporters bei ausreichender Versorgung des Organismus. Zudem ist zu klären, welche Funktion eine sRNA als Riboswitch hat, der in direkter Abhängigkeit zum betreffenden Ion steht.

Dass es sich trotz dieser Ergebnisse um einen Transporter handeln mag, belegen die Ergebnisse der Infektionsversuche in Gallerien. Hier ist kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp EGD-e zu messen. Zusätzlich zeigt sich in der Proteinanalyse ein verändertes Bandenmuster, was ein Indiz für die Auswirkungen auf eine verminderte Proteinsynthese ist.

Zudem lassen sich Bedingungen und Eigenschaften nicht vorbehaltlos von Spezies zu Spezies übertragen. Die Tatsache, dass sich erfolgreiche Regulationsmechanismen auch über die Grenzen einer Art hinaus manifestieren können, zeigt die Steuerung des Eisenhaushaltes über das Protein Fur in *Escherichia coli*, *Shigella flexneri* und *Listeria monocytogenes* [63],[64]

6. Fazit

Die ubiquitäre Verbreitung von *Listeria monocytogenes* stellt in der Lebensmittelbranche ein ernsthaftes Problem dar. Der Kontakt des Erregers ist vor allem für immunsupprimierte Personen und Neugeborene mit einem hohen letalen Risiko verbunden. Dabei machen es insbesondere die niedrigen Überlebensanforderungen und die hohe Stressresistenz schwer, den Keim wirksam zu bekämpfen [65].

Bisherige Untersuchungen beschäftigen sich mit der Kälteanpassung [66], Unterschieden der intra- und extrazellulären Überlebensweise [67] und der Genexpression beim Übergang in eine Wirtszelle [68]. Die Möglichkeit das Bakterium als potentiellen Vektor für zukünftige Behandlungen zu verwenden, macht *L. monocytogenes* zu einem Organismus mit großem therapeutischen Potential und vielen Forschungsansätzen [69]. Dabei ist besonders die Fähigkeit zur Überwindung von Gewebebarrieren hervorzuheben. Innerhalb des menschlichen Körpers ist *L. monocytogenes* in der Lage das Darmepithel, die Blut-Hirn- und die Plazentaschranke zu durchdringen [70]. Dies hat zur Folge, dass sich die Listeriose in verschiedenen Formen manifestieren kann [71].

Die Erforschung des Replikationserfolges unter verschiedenen Bedingungen ist auch ein Teil dieser Arbeit. Dabei wird die Rolle der small non-coding RNA innerhalb der letzten Jahre in steigendem Maße als ein Kernbereich für Kontrolle und Adaptation von Abläufen innerhalb des bakteriellen Lebenszyklus erkannt. Ihre abstimmende und regulierende Wirkung stellt eine optimale, schnell verfügbare und flexible Anpassung an sich verändernde Bedingungen des Umgebungsmilieus dar. Die Untersuchung der Einflüsse vom sRNA Sequenzen unter verschiedenen Bedingungen und die Möglichkeit ihre Auswirkungen auf den Gesamtprozess der Proliferation zu beobachten und zu analysieren geben Aufschluss über den Stellenwert, den man der sRNA im Hinblick auf die Vernetzung innerhalb des Genoms beimessen muss.

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, *in-silico* analysierte sRNA des Genoms von *Listeria monocytogenes* EGD-e durch *in-vivo* Experimenten zu analysieren. Die generierten sRNA Kandidaten sind auf ihre Fähigkeiten bezüglich des Wachstums unter extrazellulären Bedingungen, wie dem Einfluss von Ethanol und Wasserstoffperoxid untersucht worden. Dabei zeigt sich verringertes Wachstum unter Normalbedingungen, und eine Umkehr unter dem Einfluss von H₂O₂.

Der Zusatz von Ethanol führt zu einer generellen Verlangsamung des Wachstums.

Die intrazelluläre Proliferation nach Infektion in verschiedenen Versuchsmodellen zeigt mit steigender Komplexität des Versuchsorganismus eine signifikante Diskrepanz zwischen dem Wildtyp *L. monocytogenes* EGD-e und den Deletionsmutanten. Davon ausgenommen bleibt $\Delta lmo0559$, welche keine sRNA Mutante sondern die Deletion eines vermuteten Proteins ist. Besonders die sRNA-Kandidaten $\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$ und $\Delta rli50^*$ zeigen die beschriebene Tendenz im Mausmodell. Hier ergeben sich signifikante Unterschiede, bezüglich des Vermögens der intrazellulären Replikation.

Die Proteine aus Cytoplasma, Zellwand und Überstand aller Deletionsmutanten und des Wildtyps wurden isoliert. Dabei sind in der cytoplasmatischen Fraktion verminderte Expressionsmuster der Banden von $\Delta lmo0559$ und $\Delta rli53$ sichtbar. Diese Beobachtung lässt sich mit dem veränderten regulativen Einfluss durch Entfernung des Proteingenes, respektive der sRNA begründen. Hier bieten sich weitere Möglichkeiten für Untersuchungen an, um ein präzises Bild der fehlenden Bandenmuster zu erhalten und die fehlenden Proteine zu identifizieren.

Die Analyse der 5' UTR des Gens *lmo0559* bezüglich des vermuteten Riboswitches ergab kein Bandenmuster, welches auf eine negative Rückkopplung bei steigender Magnesiumkonzentration schließen lässt. Folglich muss die Funktion der untersuchten Region eine Aufgabe erfüllen, die sich im Zusammenhang mit anderen Gensequenzen erschließt oder nur im intrazellulären Zustand messbar ist.

6.1 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit, geben Aufschluss über die Wichtigkeit der untersuchten sRNA Sequenzen. Auch wenn ihnen keine essentiellen Überlebensfunktionen zugeschrieben werden können, so sind sie doch maßgeblich am Integrationsprozess unter physiologischen Umweltbedingungen und bei Veränderung der bakteriellen Umgebung beteiligt. Schwächere CFU-Raten (Colonies of Infection) zeugen eindeutig von verringerten Adaptations- und Überlebensfähigkeiten.

Inwieweit sich die präzisen Einflüsse der jeweiligen sRNA einer bestimmten Protein-, Translations- oder Transkriptionskomponente zuordnen lassen, kann durch den hier erarbeiteten Wissensstand nicht prognostiziert werden.

Die Analyse der fehlenden Proteinbanden der Deletionen $\Delta lmo0559$ und $\Delta rli53$ bietet weiterhin einen zusätzlichen Ausgangspunkt für Analysen.

Die weiterführende Untersuchung der 5'-UTR Region des Gens *lmo0559* ist ein Ansatz, der untersucht werden sollte. Die Hypothese des Riboswitches konnte aufgrund der Ergebnisse nicht bestätigt werden. Alternative Funktionen sollten in Betracht gezogen werden, um so die Aufgabe des Sequenzabschnittes klären zu können.

7. Summary

The universal dissemination of *Listeria monocytogenes* is a serious problem in food industries. Especially old people and newborn children have a high lethal risk in contact to the pathogen. The reduction of *listeria* contamination is barely possible, respecting low survival requirements and potent stress-resistance factors [65].

Previous experiments observed temperature assimilation [66], survival in extra- and intracellular environments [67] and the genetic expression at host cell entrance [68]. *Listeria monocytogenes* shows high ambitions as a potential vector for upcoming therapeutic strategies [69]. The skills of crossing tissues like the blood-brain-, placenta- and intestinal barrier [70] are certain abilities for diversified manifestations of listeriosis [71] and therefore promising factors of coming therapeutic approaches. The exploration of *listeria* replication-success under different conditions is an integral part of this paper.

The role of small non coding RNA, as an eminent factor for controlling and adaptation in bacteria life cycles, has been recognized within the last years. The sRNA-effects of regulation and tuning are fast available, flexible and optimal supporters for adapted survival in changing environments. Analysis of sRNA sequences under changing influences is an opportunity to observe effects in proliferation progresses. Consequences can be linked to significant changes of the network of genetic factors.

The present paper analyses sRNAs screened out of *in-silico* dissections in *in-vivo* experiments. The generated sRNA candidates were tested in extracellular conditions. Reduced growing abilities in sRNA mutants were detected under standard conditions. Differences in growing characteristics were observed under influence of H₂O₂, while the use of ethanol showed no significant differences, except a general declaration in reproduction velocity.

Intracellular proliferation was tested in three different experimental lines. Notable is a rising discrepancy between wild type *L. monocytogenes* and generated mutant candidates by increasing complexity of host organisms. Exception of this trend is $\Delta lmo0559$, which is not a classic sRNA mutant, but the deletion of a suspected protein. Especially sRNA candidates $\Delta rli31$, $\Delta rli33-1$ and $\Delta rli50^*$ show the tendency described above in mice experiments. The results offer significant differences between wild type and generated mutants in intracellular reproduction abilities.

Proteins were isolated out of bacteria cytoplasm, membrane and supernatant of all tested deletion mutants and the wild type. The cytoplasms of $\Delta lmo0559$ and $\Delta rli53$ have a reduced banding expression. This observation could probably be connected to regulative influences by the deleted hypothetical protein sequence, respective the sRNA sequence. These experiments show potential for further investigations to get a precise image of missing protein bands and their identification.

The analysis of the 5'UTR region of genome *lmo0559* resulted in a band pattern, which does not lead to the conclusion of a negative feedback-link to rising magnesia concentrations. Therefore the analyzed region has to fulfill different functions, like interacting with other gene sequences or only detectable in intracellular conditions, which were not measurable in the fulfilled experimental set up.

7.1 Perspective

The results of this paper give a hind and a slight conclusion over the importance of sRNA sequences. Even though sRNAs are not necessary for the explicit surviving of organisms, they take decisive participation in the progress of an optimal integration to the surrounding environment. The statement of lower adaption and surviving skills is verified by performed experiments in weaker CFU-rates.

Precise influences and correlations between proteins and transcriptional or translational components cannot be related to certain sRNAs by the state of the knowledge of this paper.

Furthermore the genome of 5'UTR of *lmo0559* is an approach to be studied. The hypothesis of a magnesia-riboswitch could not be validated. Alternative options should be considered to answer the question of unsolved sequence function.

8. Anhang

Alle hier gezeigten möglichen sRNA-Zielsequenzen wurden mithilfe des Programms TargetRNA (<http://snowwhite.wellesley.edu/targetRNA/index.html>) identifiziert und mittels UGMI Harvester (Carsten Kuenne unpubliziert) auf beinhaltende Proteine untersucht.

8.1 rli31

Deletierte Sequenz

```
atcccatagagattgtcatttgaataagctaattgaaaataaattactccccatagaaatattcttaattgcttatttcaataaacactcctttaagatagttgtagcacagaattcccaga
ttctgtgctataattatgt
```

putative Ziel Gene

Rank	Gen	Synonym	Score	P-Wert
1	<i>lmo0712</i>	<i>lmo0712</i>	-110	2.08835e-06
2	<i>lmo1193</i>	<i>lmo1193</i>	-107	3.52221e-06
3	<i>lmo2778</i>	<i>lmo2778</i>	-97	2.01147e-05
4	<i>lmo1441</i>	<i>lmo1441</i>	-91	5.72172e-05
5	<i>lmo0625</i>	<i>lmo0625</i>	-88	9.65004e-05

Position und Funktion der Gene

1	743418	743714	+	NOTE: sim.to flag. hook-basal body complex protein FliE.
2	1219135	1219767	+	NOTE: similar to precorrin isomerase
3	2862774	2863283	-	
4	1474802	1475908	+	NOTE: sim. to putative peptidoglycan acetylation protein
5	661470	662171	-	

8.2 rli33-1

deletierten Sequenz

```
cataagcaatgacaatgccattacttttctcccttttttagtgggtgtcttacttacctaaactccttttatactctttgtggtgtgtagcaacccttggagtatttttggaaaaaatgc
taaataagaaaaactcctcaacaaggaaagttcgaggagttcggcattt
```

putative Ziel Gene

Rank	Gene	Synonym	Score	P-Wert
1	<i>lmo0132</i>	<i>lmo0132</i>	-89	0.000182849
2	<i>lmo0656</i>	<i>lmo0656</i>	-88	0.000215669
3	rpsJ	<i>lmo2633</i>	-87	0.000254378
4	lmaA	<i>lmo0118</i>	-82	0.000580651
5	dapB	<i>lmo1907</i>	-82	0.000580651

Position und Funktion der Gene

1	134782	136290	-	NOTE: similar to inosine monophosphate dehydrogenase.
2	697634	698197	-	NOTE: conserved hypothetical protein
3	2705746	2706054	-	PRODUCT: ribosomal protein S10
4	123200	123712	+	PRODUCT: antigen A
5	1980511	1981302	-	NOTE: similar to dihydrodipicolinate reductase

8.3 rli33-2*deletierten Sequenz*

acaattctgtagtacatcatatagcactgaattaccaattcctgataaataaggaaagggtggaataaaagtatctcatcaggtatattaaattacacggtagttaaggaggaacgat
aagttgagtaatttaacatcatgggatctttaatgcttatagctgttttagtttagcagtgatgtattaccaagttattaacaaatataaaaaataagtagagtttaactaaaatcaccaata
acatttggggattttatatttagtgattattctcgcaatcatcaacggatggattttatgtaaagttttatgtgatgtattcataggctatcgttttgatgtctaataaggtttaaagccctgtg
aaaaataggcgcattttattttaaaaatagaaatgtgtctat

putative Ziel Gene

Rank	Gene	Synonym	Score	Pvalue
1	groEL	<i>lmo2068</i>	-96	0.000195809
2	<i>lmo0082</i>	<i>lmo0082</i>	-79	0.00260664
3	dnaN	<i>lmo0002</i>	-77	0.0035335
4	<i>lmo2362</i>	<i>lmo2362</i>	-76	0.00411379
5	<i>lmo0950</i>	<i>lmo0950</i>	-73	0.00648953

Position und Funktion der Gene

1	2147684	2149312	-	PRODUCT: class I heat-shock protein (chaperonin) GroEL
2	85902	86228	+	
3	1867	3012	+	PRODUCT: DNA polymerase III, beta chain
4	2431688	2433211	+	NOTE: similar to amino acid antiporter (acid resistance)
5	984823	985722	-	

8.4 rli53

deletierten Sequenz

catcaaatgaaaaggagtgttatcttaagccaatgaaattctaactcgtattatatgaaaaatgaagaaagctatccacttctcgatagaaactatcttccggacgggattcgtatgtca
tttcgcatgataactcttgctatagccttttggcgtagccccgcggattcctctctgaaaatattcaggaggttatt

putative Ziel Gene

Rank	Gene	Synonym	Score	Pvalue
1	<i>lmo0039</i>	<i>lmo0039</i>	-83	0.000480283
2	<i>lmo0864</i>	<i>lmo0864</i>	-83	0.000480283
3	<i>lmo1323</i>	<i>lmo1323</i>	-73	0.0025082
4	<i>lmo1066</i>	<i>lmo1066</i>	-71	0.00348986
5	<i>lmo1810</i>	<i>lmo1810</i>	-69	0.00485481

Position und Funktion der Gene

1	44282	45223	+	NOTE: similar to carbamate kinase
2	902773	903840	+	
3	1353097	1353381	+	NOTE: similar to B. subtilis YlxR protein
4	1093000	1093773	+	NOTE: sim. to extragen suppr. protein
5	1884096	1884665	-	NOTE: similar to unknown proteins

8.5 rli50*

deletierten Sequenz

atgaaaagagagccatcgctaacatgactccctgagcagtagcaccgcgtaaaagacggcgctattaactaataattacagaaagtaaccatcgatcagctcgctaaagtggatca
gatggtatttttggttttaaagtcgagaatcatcagcagagggtggcaaataccaccgcaaacgtcagtgcttcatacacagacacggctattcctttctaggagtaaaaccttctat
aaccaagagcatcaccccgctcctggagatttagccaccatcttttcaacttacta

putative Ziel Gene

Rank	Gene	Synonym	Score	Pvalue
1	<i>lmo0930</i>	<i>lmo0930</i>	-91	0.000283478
2	<i>lmo2390</i>	<i>lmo2390</i>	-84	0.000848444
3	<i>lmo1848</i>	<i>lmo1848</i>	-81	0.00135709
4	<i>lmo2445</i>	<i>lmo2445</i>	-73	0.00474386
5	<i>lmo0031</i>	<i>lmo0031</i>	-71	0.00648361

Position und Funktion der Gene

1	967029	967760	+	NOTE: cons. hypo.l protein, simto B. subtilis YhfI protein
2	2465630	2466625	+	NOTE: similar to hypothetical thioredoxine reductase
3	1924754	1925596	-	NOTE: sim. metal cations ABC transporter
4	2514308	2515210	-	NOTE: similar to internalin
5	33397	34452	-	PRODUCT: transcriptional regulator LacI family

9. Literaturverzeichnis

- [1] Hain T, Chatterjee SS, Ghai R, Kuenne CT, Billion A, Steinweg C, Domann E, Kärst U, Jänsch L, Wehland J, Eisenreich W, Bacher A, Joseph B, Schär J, Kreft J, Klumpp J, Loessner MJ, Dorscht J, Neuhaus K, Fuchs TM, Scherer S, Doumith M, Jacquet C, Martin P, Cossart P, Rusniok C, Glaser P, Buchrieser C, Goebel W, Chakraborty T, 2007, Pathogenomics of *Listeria* spp, *Int J Med Microbiol*. Nov;297(7-8):541-57
- [2] Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M, 2010, *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology and phenotypic characteristics, *Int J Med Microbiol*
- [3] Murray EGD, Webb RE, Swann MBR, 1926, A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*, *J. Pathol. Bacteriol.* 29: 407– 439.
- [4] Potel, J. 1952. Zur Granulomatosis infantiseptica. *Zentr. Bakteriolog. I. Orig.* 158: 329-331
- [5] Chan YC, Wiedmann M, 2009, Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. *Crit Rev Food Sci Nutr*;49(3):237-53.
- [6] Gorski L, Duhé JM, Flaherty D, 2009 The use of flagella and motility for plant colonization and fitness by different strains of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*, *PLoS One* 4(4):e5142. Epub 209 Apr. 9
- [7] Vilar MJ, Pena FJ, Pérez I, Diéguez FJ, Sanjuán ML, Rodríguez-Otero JL, Yus E, 2010, Presence of *Listeria*, *Arcobacter* and *Campylobacter* spp. In dairy farms in Spain, *Berl Munch Tierärztl. Wochenschr.* Jan-Feb 123 (1-2):58-62
- [8] Korthals M, Ege M, Lick S, von Mutius E, Bauer J, 2008, Occurrence of *Listeria* spp. In mattress dust of arm children in Bavaria, *Environ Res* Jul; 107(3):299-304

[9] **Pizarro-Cerdá J, Cossart P**, 2006, Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells, *Cell* Feb 124(4): 715-27

[10] **Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J**, 2001, Listeria Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants, *Clin Microbiol* 14(3); 584-640

[11] **Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, Chakraborty T, Sasakawa C**, 2009, Listeria monocytogenes ActA is a key player in evading autophagic recognition, *Autophagy*. Nov;5(8):1220-1

[12] **Chakraborty T, Hain T, Domann E**, 2000, Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in Listeria species, *Int J Med Microbiol*, May; 290(2): 167-74

[13] **Volokhov DV, Duperrier S, Neverov AA, George J, Buchrieser C, Hitchins AD**, 2007, The presence of the internalin gene in natural atypically hemolytic Listeria innocua strains suggests descent from L. monocytogenes, *Appl Environ Microbiol*, 73(3): 1928-39

[14] **Domínguez-Bernal G, Müller-Altrock S, González-Zorn B, Scortti M, Herrmann P, Monzó HJ, Lacharme L, Kreft J, Vázquez-Boland JA**, 2006, A spontaneous genomic deletion in Listeria ivanovii identifies LIPI-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins, *Mol Microbiol*. Jan;59(2):415-32

[15] **Johansson J, Mandin P, Renzoni A, Chiaruttini C, Springer M, Cossart P**, 2002, An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, *Cell*. Sep 6;110(5):551-61.

[16] **Scortti M, Monzó HJ, Lacharme-Lora L, Lewis DA, Vázquez-Boland JA**, 2007, The PrfA virulence regulon, *Microbes and Infect.* 9:1196-1207

[17] **Stoll R, Mertins S, Joseph B, Müller-Altrock S, Goebel W**, 2008 Modulation of PrfA activity in *Listeria monocytogenes* upon growth in different culture media, *Microbiology* Dec 154(Pt 12):3856-76

[18] **Bierne H, Sabet C, Personnic N, Cossart P**, 2007, Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*, *Microbes Infect.* Aug;9(10):1156-66. Epub 2007 May 7. Review

[19] **Lecuit M, Dramsi S, Gotardi C, Fedor-Chaiken M, Gumbiner B, Cossart P**, 1999, A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*, *Embo J* 18:3956-63

[20] **Barbuddhe SB, Chakraborty T**, 2009, *Listeria* as an enteroinvasive gastrointestinal pathogen, *Curr Top Microbiol Immunol.* 337:173-95. Review

[21] **Bonazzi M, Cossart P**, 2006, Bacterial entry into cells: a role for the endocytic machinery, *FEBS Lett*, 580(12): 2962-7

[22] **Schnupf P, Portnoy DA**, 2007, Listeriolysin O: a phagosome-specific lysine, *Microbes Infect* Aug.9(10):1176-87

[23] **Bavdek A, Gekara NO, Priselac D, Gutiérrez Aguirre I, Darji A, Chakraborty T, Macek P, Lakey JH, Weiss S, Anderluh G**, 2007, Sterol and pH interdependence in the binding, oligomerization, and pore formation of Listeriolysin O, *Biochemistry.* Apr 10;46(14):4425-37

[24] **Chico-Calero I, Suárez M, González-Zorn B, Scotti M, Slaghuis J, Goebel W, Vázquez-Boland JA**, 2002, Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*, *European Listeria Genome Consortium Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 8;99(1):431-6.

[25] **Freitag NE**, 2009, *Listeria monocytogenes* – saprophyte to intracellular pathogen, *Nat Rev Microbiol* Sept, 7(9): 623

[26] **Pizarro Cerdá J, Cossart P**, 2006, Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*, *J Pathol*, Jan 208(2):215-23

- [27] **Hof H, Szabo K, Becker B**, 2007, Epidemiologie der Listeriose in Deutschland –im Wandel und dennoch nicht beachtet, Dtsch Med Wochenschr 132:1343-1348
- [28] **Schlech WF, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, Hightower AW, Johnson SE, King SH, Nicholls ES and Broome CV**, 1983, Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *New Engl. J. Med.* 308:203–206.)
- [29] **Schlech WF**, 2001, Foodborne listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 31: 770-775
- [30] **Epidemiologisches Bulletin des Robert Koch Instituts No.46; 12/2006**
- [31] **Hof H.**, 2004, An update on the medical management of listeriosis, *Expert Opin Pharmacother* 5(8): 1727-35
- [32] **Zhang X, Zeng Y.** 2010 Regulation of mammalian microRNA expression. *J Cardiovasc Transl Res.* Jun; 3(3):197-203.
- [33] **Knippers R**, *Molekulare Genetik*, 9. Aufl. , Thieme
- [34] **Waters LS, Storz G**, 2009, Regulatory RNAs in Bacteria, *Cell Biol and Met* 136: 615-628
- [35] **Viegas SC, Arraiano CM**, 2008, Regulating the regulators, *RNA Biologiy* 5:4, 230-43
- [36] **Vogel J, Sharma CM**, 2005, How to find small non-coding RNAs in bacteria, *Biol Chem Vol* 386; 1219-38
- [37] **Mandin P, Repoila F, Vergassola M, Geissmann T, Cossart P**, 2006, Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets, *Nuc Acids Res.* Vol. 35(3):962-74
- [38] **Majdalani N, Vanderpool CK, Gottesman S**, 2005, Bacterial Small RNA Regulators, *Biochemistry and Mol Biol*, 40:93-113

- [39] **Henkin TM**, 2008, Riboswitch RNAs: using RNA to sense cellular metabolism, *Genes Dev.* 22: 3383-3390
- [40] **Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Rmero DA, Horvath P**, 2007, CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, *Science* 315(5819): 1709-12
- [41] **Hannahan D**, 1983, Studies on transformation of *Escherchia coli* with plasmids, *J Mol Biol* 166(4): 557-80
- [42] **Karow, Lang**, *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 17.Aufl.,
- [43] **Storz G, Altuvia S, Waasarman KM**, 2005, An abundance of RNA rgulators, *Annu Rev Biochem* 74: 199-217
- [44] **Gottesman S**, 2005, Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria, *Trends Genet*, Jul; 21(7): 399-404
- [45] **Serganov A**, 2009, The long and the short of riboswitches, *Curr Opin Struct Biol*, Jun 19(3): 251-9
- [46] **Lou Y, Yousef AE**, 1997, Adaptation to sublethal environmental stresses protects *L. monocytogenes* against lethal preservation factors, *Appl Env Microbiol* Apr, 63(4): 1252-5
- [47] **Mukherjee K, Altincicek B, Hain T, Domann E, Vilcinskas A, Chakraborty T**, 2010, *Galleria Mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis, *Appl Environ Microbiol*, Jan, 76(1): 310-7
- [48] **Bradford MM**, 1976, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *May 7*, 72: 248-54

- [49] **Mandin P, Repoila F, Vergasola M, Geissmann T, Cossart P**, 2007, Identification of new noncoding RNAs in *Listeria monocytogenes* and prediction of mRNA targets, *Nucleic Acids Research*, 35: 962-74
- [50] **Dann CE 3rd, Wakeman CA, Sieling CL, Baker SC, Irnov I, Winkler WC**, 2007, Structure and mechanism of a metal-sensing regulatory RNA, *Cell*, Sep 7, 130(5): 878-92
- [51] **Mraheil MA, Billion A, Mohamed W, Mukkerjee K, Kuenne C, Pischmarov J, Krawitz C, Retey J, Hartsch T, Chakraborty T, Hain T**, 2010, The intracellular sRNA transcriptome of *Listeria monocytogenes* during growth in macrophages, noch nicht publiziert
- [52] **Toledo-Arana A, Repoila F, Cossart P**, 2007, Small non coding RNAs controlling pathogenesis, *Curr Opin Microbiol*, Apr; 10(2): 182-8
- [53] **Romby P, Vandenesch F, Wagner EG**, 2006, The role of RNAs in the regulation of virulence-gene expression, *Curr Opin Microbiol*, Apr 9(2): 229-36
- [54] **Albrecht M, Sharma CM, Reinhardt R, Vogel J, Rudel T**, 2010, Deep dequencing-based discovery of the *Chlamydia trachomatis* transcriptome, *Nucleic Acids Research*, Jan, 38(3): 868-77
- [55] **Christiansen JK, Larsen MH, Ingmer H, Sorgaard-Andersen L, Kallipolitis BH**, 2004, The RNA binding protein Hfq of *Listeria monocytogenes*: role in stress tolerance and virulence, *J Bacteriol* Jun 182(11): 3355-62
- [56] **Nielsen JS, Lei LK, Ebersbach T, Olsen AS, Klitgaard JK, Valentin-Hansen P, Kallipolitis BH**, 2009, Defining a role for Hfq in Gram positive bacteria: evidence for Hfq-dependent antisense regulation in *Listeria monocytogenes*, *Nucl. Acids Res.* 1-13
- [57] **Moomaw AS, Maguire ME**, 2008, The unique nature of Mg²⁺ channels, *Physiology (Bethesda)*, Oct, 23: 275-85

- [58] Toledo-Arana A, Dussurget O, Nikitas G, Sesto N, Guet-Revillet H, Balestrino D, Loh E, Gripenland J, Tiensuu T, Vaitkevicius K, Barthelemy M, Vergassola M, Nahori MA, Soubigou G, Régnault B, Coppée JY, Lecuit M, Johansson J, Cossart P, 2009, The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence, *Nature*, Jun 18, 459(7249): 950-6
- [59] Morse R, O'Hanlon K, Collins M; 2002, Phylogenetic, amino acid content and indel analysis of the β subunit of DNA-dependent RNA polymerase of Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(Pt 5):1477-84
- [60] Schär J, Stoll R, Schauer K, Loeffler DI, Eylert E, Joseph B, Eisenreich W, Fuchs TM, Goebel W, 2010, Pyruvate Carboxylase plays a crucial role in carbon metabolism of extra- and intracellularly replicating *Listeria monocytogenes*, *J Bacteriol*, 192(7): 1774-84
- [61] Buck J, Noeske J, Wöhnert J, Schwalbe H, 2010, Dissecting the influence of Mg^{2+} on 3D architecture and ligand-binding of the guanine-sensing Riboswitch aptamer domain, *Nucleic Acids Research* Vol 38(12): 4143-53
- [62] Cromie MJ, Shi Y, Latifi T, Groisman EA; 2006, An RNA sensor for intracellular Mg^{2+} ; *Cell*, Apr 7; 125(1):71-84
- [63] Wilderman PJ, Sowa NA, FitzGerald PC, Gottesman S, Ochsner UA, Vasil ML, 2004, Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis, *Proc Natl Acad Sci USA*
- [64] Gaballa A, Antelmann H, Aguilar C, Khakh SK, Song KB, Smaldone GT, Helmann JD, 2008, The *Bacillus subtilis* iron-sparing response is mediated by a Fur regulated small RNA and three small basic proteins, *Proc Natl Acad Sci*, Aug 19, 105(33), 11927-32
- [65] Walecka E, Molenda J, Bania J, 2009, The impact of environmental stress on *Listeria monocytogenes* virulence, *Pol J Vet Sci*, 12(4): 575-9

- [66] **Tasara T, Stephan R**, 2006, Cold Stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: A review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications, *J Food Prot*, 69(6): 1473-84
- [67] **Kazmierczak MJ, Wiedmann M, Boor KJ**, 2006, Contributions of *Listeria monocytogenes* σ^B and PrfA to expression of virulence and stress response genes during extra- and intracellular growth, *Microbiology*, 152(Pt 6): 1827-38
- [68] **Freitag NE**, From hot dog to host cells: how the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* regulates virulence gene expression
- [69] **Tangney M, Gahan CG**, 2010, *Listeria monocytogenes* as a vector for anti- cancer therapies, *Curr Gene Ther* 10(1): 46-55
- [70] **Bonazzi M, Leucit M, Cossart P**, 2009, *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from structure to pathogenesis, *Cell Microbiol* Feb.2
- [71] **Hof H**, 2003, History and epidemiology of listeriosis, *FMES Immunol Med Microbiol*, 35(3):199-202

10. Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Trinad Chakraborty für die Überlassung und Bereitstellung dieses Projektes. Bei Dr. Torsten Hain und Dr. Mobarak Abu Mraheil möchte ich mich besonders für die umfangreiche und intensive Betreuung bedanken. Ihr Engagement und Denkanstöße haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Alexandra Amend, Silke Silva und Nelli Schklarenko für die Unterstützung, Tipps, Geduld, nette Worte und Lebensweisheiten bedanken.

Danke auch an Martin Leustik, Maria Loose und Farhad Pazan, für kurze Diskussionen und Motivationsschübe im Laboralltag.

Vielen Dank auch an Dr. Walid Mohamed für die Kooperation und Unterstützung bei der Durchführung der Mausexperimente, die ohne ihn nicht möglich gewesen wären und einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Ein außerordentliches Dankeschön gilt Marco Retterath, Jörn Bohn und Anna Moschner, für endlose Abende und entspannte Auszeiten, die mich immer wieder in meinem Tun bestärkt haben und meine Motivation aufrecht erhielten.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, die mir in jeglicher Hinsicht den Rücken gestärkt hat, regen Anteil an meiner Arbeit nahm, immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und Zweifel hatte und immer an mich geglaubt hat.