

Die extrazelluläre RNA-Welt von *Listeria monocytogenes*
und deren Potential zur Typ-I-IFN Induktion
Proteomanalyse der von *Listeria monocytogenes*
produzierten *Membrane Vesicles*

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

Vorgelegt von Frantz, Renate
aus Siebenbürgen (Rumänien)

Gießen 2018

Aus dem Zentrum für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
unter der Leitung von Prof. Dr. Trinad Chakraborty
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Trinad Chakraborty
2. Gutachter: Prof. Dr. Günther Lochnit

Tag der Disputation: 19.11.2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	1
1.2. Immunantwort gegen <i>L. monocytogenes</i>	3
1.3. Induktion von Typ-I-Interferon (Typ-I-IFN).....	5
1.3.1. Induktion von Typ-I-IFN während einer Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	8
1.4. Produktion von Vesikeln (OMVs bzw. MVs) durch Bakterien.....	11
1.5. Sekretion von RNA durch Bakterien.....	14
1.6. Zielsetzung dieser Arbeit.....	17
2. Material und Methoden	18
2.1. Bakterienstämme und Virusstamm.....	18
2.2. Zelllinien.....	18
2.3. Antibiotika-Stammlösungen.....	18
2.4. Antikörper.....	19
2.5. Molekulargewichtsmarker.....	19
2.6. Vektoren.....	20
2.6.1. Plasmidkarte des pCR2.1-TOPO-Vektors.....	20
2.6.2. Multiple Cloning Site (MCS) des pCR2.1-TOPO-Vektors.....	21
2.6.3. Plasmidkarte des pERL3-Vektors.....	22
2.7. Oligonukleotide (Primer).....	22
2.7.1. Primer für die Real-Time PCR (RT-PCR).....	22
2.7.2. Primer für die Herstellung der 25 RNA-Kandidaten.....	23
2.7.3. Primer für die Herstellung der rli32-Motive.....	25
2.7.4. Primer für die Herstellung von <i>Lm</i> -pERL3-rli32.....	25
2.7.5. Primer für die Herstellung von <i>Lm</i> -pERL3-ssrS.....	26
2.8. Chemikalien.....	26
2.9. Kits, Enzyme, gebrauchsfertige Lösungen und Chemikalien.....	27
2.10. Medien, Puffer und Enzyme für die Zellkultur.....	28
2.11. Medien für die Anzucht von Bakterien.....	28
2.12. Gele und Puffer.....	31
2.13. Verbrauchsmaterialien.....	37
2.14. Geräte.....	37
2.15. Arbeiten mit DNA.....	39
2.15.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	39
2.15.2. Agarosegel-Elektrophorese von DNA-Fragmenten.....	40
2.15.3. Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	41
2.15.4. Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel.....	41
2.15.5. Isolierung von Plasmid-DNA.....	42
2.15.6. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	42
2.15.7. Klonierung.....	43
2.15.7.1. Konierung durch TA Cloning.....	43

Inhaltsverzeichnis

2.15.7.2. Klonierung durch Restriktionsverdau und Ligation	44
2.16. Bakteriologische Arbeiten	46
2.16.1. Kultivierung von Bakterien	46
2.16.2. Messung des Bakterienwachstums	46
2.16.3. Kompetenz und Transformation	46
2.16.3.1. Herstellung von elektro-kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	47
2.16.3.2. Herstellung von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	47
2.16.3.3. Herstellung von elektro-kompetenten <i>L. monocytogenes</i> -Zellen	48
2.16.3.4. Transformation von elektro-kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	48
2.16.3.5. Transformation von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	49
2.16.3.6. Transformation von elektro-kompetenten <i>L. monocytogenes</i> -Zellen	49
2.17. Arbeiten mit RNA	49
2.17.1. Transfektion von RNA in eukaryotischen Zellen	49
2.17.2. <i>In vivo</i> Transfektion von RNA	50
2.17.3. Isolierung der zellulären RNA aus eukaryotischen Zellen	51
2.17.4. Isolierung der zellulären RNA aus Bakterien	52
2.17.5. Isolierung von RNA aus Mausorganen	53
2.17.6. Qualitätskontrolle der RNA und RNA-Profilanalyse	54
2.17.7. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	54
2.17.8. Real-Time PCR (RT-PCR)	55
2.17.9. Isolierung von MVs-RNA	56
2.17.10. Isolierung von sec-RNA	57
2.17.11. Sequenzierung	58
2.17.12. Herstellung von RNA durch <i>in vitro</i> Transkription (IVT)	58
2.17.13. Verdau des DNA-templates	59
2.17.14. Dephosphorylierung von RNA	59
2.17.15. Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese	60
2.17.16. Extraktion von RNA aus dem Polyacrylamidgel	60
2.17.17. Phenol/Chloroform-Fällung von RNA	60
2.18. Proteinanalytische Methoden	61
2.18.1. Isolierung von <i>Membrane Vesicles</i> (MVs), die von <i>L. monocytogenes</i> produziert werden ..	61
2.18.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode	61
2.18.3. Bestimmung der Proteinkonzentration mit der BCA-Methode	62
2.18.4. Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie (EM)	63
2.18.5. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	63
2.18.6. Western blot-Analyse von MVs	64
2.18.7. Untersuchung der Internalisierung von MVs in PtK-Zellen	65
2.18.8. Hämolyse-Assay	65
2.19. Zellkultur-Methoden	66
2.19.1. Kultivierung von Zelllinien	66
2.19.2. Gewinnung von primären Knochenmark-Makrophagen aus der Maus	67
2.19.2.1. Gewinnung von M-CSF	68
2.19.3. Infektion von HEK293-Zellen mit A/PR/8/34 (H1N1)	68
2.19.3.1. Virusquantifizierung durch <i>Focus Forming Assay</i> (FFA)	68
2.20. Statistische Analyse	69
3. Ergebnisse	70
3.1. Isolierung und Identifizierung der von <i>L. monocytogenes</i> sekretierten RNA	70
3.1.1. Co-Isolierung von sec-RNA und MVs-RNA	70

3.1.2. Profilanalyse von sec-RNA und MVs-RNA.....	71
3.1.3. Untersuchung der Fähigkeit von sec-RNA und MVs-RNA IFN- β zu induzieren	72
3.1.4. Analyse der Zusammensetzung von sec-RNA und MVs-RNA.....	73
3.1.5. Herstellung einzelner sRNAs durch <i>in vitro</i> Transkription	74
3.1.6. Untersuchung der Fähigkeit einzelner sRNAs IFN- β zu induzieren	78
3.1.6.1. Untersuchung der Abhängigkeit der IFN- β Induktion von dem Rezeptor RIG-I.....	80
3.1.6.2. Untersuchung der Abhängigkeit der IFN- β Induktion von dem Rezeptor MDA5.....	81
3.1.6.3. Untersuchung der rli32-Motive hinsichtlich der Fähigkeit IFN- β zu induzieren.....	82
3.1.7. Untersuchung der Inhibition der viralen Replikation durch rli32 und rli47	83
3.1.7.1. Untersuchung der Abhängigkeit der viralen Inhibition von den Rezeptoren RIG-I und MDA5	85
3.1.7.2. Untersuchung der Abhängigkeit der viralen Inhibition von der RNA-Konzentration	86
3.1.7.3. Untersuchung der Inhibition der viralen Replikation durch weitere sRNAs.....	87
3.1.8. Untersuchung der Fähigkeit von rli32 Typ-I-IFN in der Maus zu induzieren	88
3.1.9. Überexpression von rli32 und ssrS in <i>L. monocytogenes</i>	90
3.1.9.1. Untersuchung der IFN- β Induktion durch sec-RNA und MVs-RNA in BMDMs	91
3.1.9.2. Untersuchung der IFN- β Induktion durch sec-RNA und MVs-RNA in HEK293-Zellen	92
3.1.9.3. Untersuchung der Abhängigkeit der IFN- β Induktion durch sec-RNA und MVs-RNA von dem Rezeptor RIG-I.....	93
3.1.9.4. Untersuchung der Fähigkeit von MVs IFN- β zu induzieren.....	94
3.2. Charakterisierung der von <i>L. monocytogenes</i> produzierten MVs.....	95
3.2.1. Elektronenmikroskopische Visualisierung von <i>L. monocytogenes</i> und isolierten MVs	95
3.2.2. Bestimmung der Größe, Anzahl und Proteinkonzentration von isolierten MVs	96
3.2.3. Proteomanalyse (Massenspektrometrie) von MVs	98
3.2.3.1. Klassifizierung der MVs-Proteine nach Funktion.....	98
3.2.3.2. Klassifizierung der MVs-Proteine nach Lokalisation	105
3.2.3.3. Die 20 häufigsten Proteine in den MVs	107
3.2.3.4. Virulenzfaktoren in den MVs	109
3.2.4. SDS-PAGE- und Western blot-Analyse von MVs	111
3.2.5. Untersuchung der hämolytischen Aktivität von MVs.....	112
3.2.6. Untersuchung der Fähigkeit von MVs zur Internalisierung in PtK-Zellen.....	113
4. Diskussion	115
4.1. Die von <i>L. monocytogenes</i> sekretierte RNA ist in den Fraktionen sec-RNA und MVs-RNA gegenwärtig	115
4.2. Unterschiedliche Zusammensetzung von sec-RNA, MVs-RNA und zellulärer RNA	116
4.3. Anreicherung von kleinen nicht-kodierenden RNAs in MVs-RNA.....	117
4.4. Unterschiedliche IFN- β Induktion durch sRNAs, die in sec-RNA und MVs-RNA identifiziert worden sind	118
4.4.1. RIG-I-Abhängigkeit der IFN- β Induktion durch die sRNAs	119
4.4.2. Protektion von HEK293-Zellen gegen das Influenza A Virus durch die sRNAs	120
4.5. Das Motiv 2 ist für die hohe IFN- β Induktion durch rli32 verantwortlich	121
4.6. Hohe Typ-I-IFN Induktion durch rli32 in der Maus	122
4.7. Erhöhte IFN- β Induktion durch die sekretierten RNA-Fraktionen und MVs nach Überexpression von rli32 in <i>L. monocytogenes</i>	122
4.8. Produktion von MVs durch <i>L. monocytogenes</i>	124
4.9. MVs enthalten Enzyme, die möglicherweise an deren Biogenese beteiligt sind.....	125

Inhaltsverzeichnis

4.10. MVs enthalten Proteine aus allen subzellulären Fraktionen: Cytoplasma, Cytoplasmamembran, Zellwand und Extrazellulär	126
4.11. MVs enthalten zum Teil vollständige Stoffwechselwege zur Energiegewinnung	127
4.12. MVs enthalten Virulenzfaktoren, die während der Infektion eine Rolle spielen.....	129
5. Zusammenfassung.....	131
5.1. Summary	132
6. Abkürzungsverzeichnis.....	134
7. Literaturverzeichnis.....	135
8. Anhang.....	152
8.1. Veröffentlichungen.....	152
8.2. Kongressteilnahme	153
8.3. Danksagung	154
8.4. Eidesstattliche Erklärung.....	155
8.5. Tab. 1: Einteilung der COGs in 25 funktionelle Kategorien	156
8.6. Tab. 2: Berechnung des Anteils an MVs-Proteine in den funktionellen Kategorien und Gruppen anhand des NSAF-Wertes in %	157
8.7. Tab. 3: Funktionelle Klassifizierung der 516 MVs-Proteine (EggNOG 4.5.1)	158

1. Einleitung

1.1. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes (*Lm*) ist ein stäbchenförmiges, gram-positives und fakultativ intrazelluläres Bakterium, das sowohl für den Menschen als auch für das Tier pathogen ist. Es gehört zur Gattung *Listeria* mit insgesamt 17 Arten, darunter ein weiteres Pathogen, *L. ivanovii*, das vorwiegend Tiere infiziert (Orsi und Wiedmann, 2016).

L. monocytogenes ist weit verbreitet und kommt in zahlreichen Tierarten und in der Umwelt vor, wie beispielsweise im Boden, Wasser und Abwasser (Weis und Seeliger, 1975; Nightingale et al, 2005). Dieses Bakterium ist äußerst resistent gegenüber extremen Umweltbedingungen. Es toleriert einen weiten Temperatur- (0-45°C) und pH-Bereich (4,5-9,0) sowie hohe Salzkonzentrationen (10%) (Koutsoumanis et al, 2003; Johnson et al, 1988). Aufgrund dieser Eigenschaften und wegen der ubiquitären Verbreitung erfolgt die Infektion mit *L. monocytogenes* in der Regel durch den Verzehr von verunreinigten Lebensmitteln in Form von rohen Milch- und Fleischprodukten sowie ungewaschenem Obst und Gemüse (Bille et al, 2006; McLauchlin et al, 1990).

Nach der oralen Aufnahme gelangt *L. monocytogenes* zunächst in den Magen-Darm-Trakt. Der weitere Verlauf der Infektion hängt von der immunologischen Fitness des Wirtes ab. Das Krankheitsbild der Listeriose reicht dabei von Durchfall und grippeähnlichen Symptomen bis hin zu Entzündungen der Hirnhäute (Meningitis) und des Gehirns (Enzephalitis) (Roberts et al, 2003; Todd und Notermans, 2011). Bei immun-kompetenten Menschen tritt eine nicht-invasive Listeriose auf, die sich in einer fiebrigen Gastroenteritis äußert. Immunsupprimierte Menschen, darunter ältere Menschen, Schwangere und Neugeborene, sind besonders für eine invasive Listeriose anfällig. Die Mortalität bei einer Erkrankung an invasive Listeriose beträgt 20-30% (Farber und Peterkin, 1991; Mead et al, 1999). Bei der invasiven Listeriose durchbricht *L. monocytogenes* die intestinale Barriere und breitet sich über Blut und Lymphe in eine Vielzahl von Organen aus. *L. monocytogenes* ist in der Lage weitere Barrieren im menschlichen Körper zu durchbrechen. Zum einen die Blut-Hirn-Schranke, woraus die Infektion der Hirnhäute und des Gehirns resultiert, und zum anderen die Placenta-Barriere, die zu einer Infektion des Fötus mit Fehl- und Totgeburt führen kann (Lecuit et al, 2004; Lecuit, 2005).

Die Abb. 1.1 zeigt den intrazellulären Infektionszyklus von *L. monocytogenes*. Während die Infektion von Makrophagen durch Phagozytose erfolgt, wird die Internalisierung von *L. monocytogenes* in nicht-phagozytierende Zellen durch rezeptorvermittelte Endocytose nach dem Zipper-Mechanismus über Internalin A (InlA) und Internalin B (InlB) induziert (Mengaud et al, 1996; Veiga und Cossart, 2005). Der Rezeptor für InlA ist das auf Epithelzellen vorkommende E-Cadherin, während der von verschiedenen Zelltypen exprimierte Rezeptor für HGF (*hepatocyte growth factor*), die sogenannte Tyrosin-Kinase Met, die Internalisierung in Hepatozyten über InlB vermittelt (Mengaud et al, 1996; Shen et al, 2000).

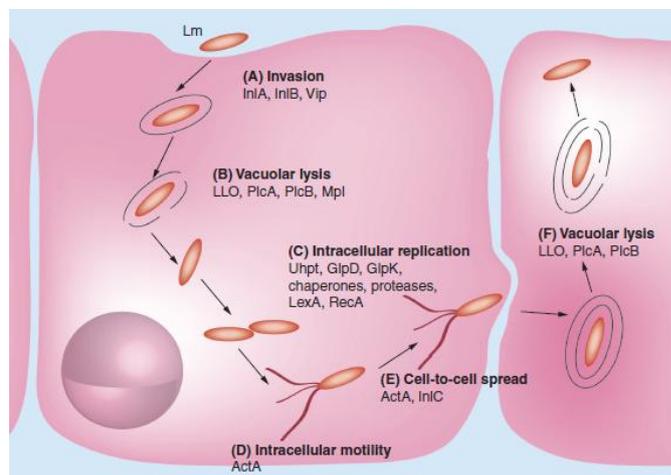


Abb. 1.1: Intrazellulärer Infektionszyklus von *L. monocytogenes*. Invasion von *Lm* in eine nicht-phagozytierende Zelle über die Internaline A und B (InlA und InlB). Lyse der Vakuole durch die koordinierte Aktivität von Listeriolysin O (LLO), den beiden Phospholipase C-Enzymen, PlcA und PlcB, sowie der Zink-Metalloprotease (Mpl). Intrazelluläre Fortbewegung mit Hilfe des Aktinfilament-akkumulierenden Faktors A (ActA). Invasion in die Nachbarzelle und Beginn eines neuen Infektionszyklus. (Pillich et al, 2015)

Nach dem Eintritt in Wirtszellen befreit sich *L. monocytogenes* mit Hilfe der koordinierten Aktivität von Listeriolysin O (LLO) und den beiden Phosphatidylinositol- und Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C-Enzymen (PlcA und PlcB) aus der primären Vakuole ins Cytosol. Letzteres wird als Proenzym synthetisiert und durch die Zink-Metalloprotease (Mpl) im sauren Milieu der Vakuole aktiviert (Portnoy et al, 1988; Mengaud et al, 1991; Geoffroy et al, 1991; Domann et al, 1991). Im Cytosol ist *L. monocytogenes* in der Lage sich mit einer Verdopplungszeit von ca. 1 Stunde zu vermehren, wobei es Glukose-1-Phosphat, das frei im Cytosol zugänglich ist, als Energiequelle nutzt. Die Aufnahme dieses Zuckers wird durch den Hexose-Phosphat-Transporter (UhpT) vermittelt (Gaillard et al, 1987; Chico-Calero et al, 2002). Der

Aktinfilament-akkumulierende Faktor A (ActA), der die polarisierte Polymerisation von Aktin der Wirtszelle induziert, vermittelt sowohl die intra- als auch die interzelluläre Bewegung von *L. monocytogenes*, wobei es zur Infektion von Nachbarzellen kommt (Kocks et al, 1992; Domann et al, 1992). Nach der Invasion in Nachbarzellen befreit sich das Pathogen erneut durch Lyse der sekundären Vakuole und kann einen neuen Infektionszyklus beginnen. Mit dieser Strategie kann sich *L. monocytogenes* von Zelle zu Zelle ausbreiten, wodurch es der humoralen Immunantwort des Wirtes entkommt.

Das Genom von *L. monocytogenes* EGD-e (Serotyp 1/2a), der Stamm der in dieser Arbeit verwendet wurde, ist im Jahr 2001 vollständig sequenziert worden. Dieser besitzt ein zirkuläres Chromosom, das ein GC-Gehalt von 39% aufweist und aus 2944528 Bp besteht. Die Anzahl der proteinkodierenden Gene beträgt 2853 (Glaser et al, 2001).

Die für den Infektionszyklus essentiellen Virulenzgene *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB* sind in dem 9 Kb langen Virulenzgencluster LIPI-1 organisiert (*Listeria pathogenicity island 1*) (Chakraborty et al, 2000). Dieser wird von dem positiven Regulationsfaktor A (PrfA), der selbst Teil des Clusters ist, positiv reguliert. Die PrfA-abhängige Transkription unterliegt einer Thermoregulation und wird erst bei 37°C induziert (Chakraborty et al, 1992; Renzoni et al, 1999; Johansson et al, 2002). Das *inlAB*-Operon ist an einer anderen Stelle des Genoms lokalisiert und wird nur teilweise von PrfA reguliert (Lingnau et al, 1995). Dies gilt auch für Internalin C (InlC), ein Homolog der beiden Internaline A und B, dem aufgrund der stark induzierten Transkription während der Vermehrung von *L. monocytogenes* im Cytosol eine Rolle in der späten Phase des Infektionszyklus zugeschrieben wird (Engelbrecht et al, 1996).

1.2. Immunantwort gegen *L. monocytogenes*

In der frühen Phase einer Infektion mit *L. monocytogenes* wirkt das angeborene Immunsystem unspezifisch und wirksam zur raschen Eindämmung der Infektion. Hierbei spielen die Aktivierung und Rekrutierung einer Reihe von Immunzellen eine entscheidende Rolle. In Milz und Leber, die primären Zielorgane von *L. monocytogenes* nach einer systemischen Infektion, wird die Mehrheit der Bakterien von gewebsständigen Makrophagen phagozytiert (Mackaness, 1962; Conlan und North, 1992). Diese produzieren daraufhin die pro-inflammatorischen Cytokine TNF- α und IL-12. Dadurch werden Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) zur Produktion von IFN- γ stimuliert (Havell, 1989; Wherry et al, 1991; Tripp et al, 1993). IFN- γ ist eines der

wichtigsten Cytokine in der frühen Phase einer Infektion mit *L. monocytogenes*. Es führt zur Aktivierung von Makrophagen, indem es deren Effektorfunktionen, wie beispielsweise die Produktion reaktiver Sauerstoff- (ROS) und Stickstoffspezies (RNS), sowie die Sekretion von pro-inflammatorischen Cytokinen steigert (Buchmeier und Schreiber, 1985; Huang et al, 1993; Beckerman et al, 1993). In der frühen Phase einer Infektion mit *L. monocytogenes* sind NK-Zellen die Hauptproduzenten von IFN- γ . Jedoch stellen T-Zellen des adaptiven Immunsystems eine alternative Quelle an anfänglichen IFN- γ dar, wodurch diese die angeborene Immunabwehr unterstützen. CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen werden in Anwesenheit von IL-12 und IFN- γ selbst zur Produktion von IFN- γ angeregt. Dieser Prozess findet in der frühen Phase der Infektion ohne Antigenstimulation über MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*) statt und wird ausschließlich von Cytokinen ausgelöst (Andersson et al, 1998; Berg et al, 2002; Lertmemongkolchai et al, 2001).

Bei der Bekämpfung von *L. monocytogenes* in der frühen Phase der Infektion sind neben Makrophagen weitere unspezifische Immunzellen beteiligt. Neutrophile Granulozyten werden durch Chemokine, die beispielsweise von infizierten Hepatozyten sekretiert werden, an die Infektionsorte gelockt (Rogers et al, 1996). Ähnlich wie Makrophagen verfügen diese über antimikrobielle Mechanismen, indem sie u.a. phagozytierte Bakterien durch die Bildung von ROS und RNS töten (Bortolussi et al, 1987; Conlan und North, 1991; Rogers und Unanue, 1993). Ly6C⁺ Monocyten sind weitere Effektorzellen, die durch das Chemokin CCL2 (*CC-chemokine ligand 2*), das von infizierten Makrophagen sekretiert wird, rekrutiert werden. Diese wandern aus dem Knochenmark in die infizierten Organe ein und differenzieren zu TipDCs (*TNF and inducible nitric oxide synthase (iNOS) producing dendritic cells*). Deren hohe Produktion an TNF und iNOS ist für die Begrenzung der Infektion unentbehrlich (Serbina et al, 2003; Serbina und Pamer, 2006).

Aufgrund der intrazellulären Lebensweise dieses Pathogens spielt die humorale Immunantwort keine wesentliche Rolle. Für die Überwindung einer Infektion mit *L. monocytogenes* ist die Aktivität von T-Zellen des adaptiven Immunsystems notwendig. Sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen sind darin involviert, jedoch ist die Aktivität von antigenspezifischen cytotoxischen CD8⁺-T-Zellen für die vollständige Eliminierung des Pathogens essentiell (Ladel et al, 1994). Während CD4⁺-T-Zellen als T_{H1}-Helferzellen die Funktion von Makrophagen antigenspezifisch über den T-Zell-

Rezeptor regulieren, töten cytotoxische CD8⁺-T-Zellen infizierte Zellen. Diese werden durch die Aktivität von DCs, den wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems (APCs), aktiviert. Im Gegensatz zu Makrophagen sind DCs in der Lage Antigene über MHC-Klasse-I-Moleküle an naive CD8⁺-T-Zellen zu präsentieren (Jung et al, 2002). Unreife DCs, die im peripheren Gewebe patrouillieren, nehmen Antigene auf und reifen daraufhin zu APCs. Diese wandern aus den infizierten Organen in die Lymphknoten ein und präsentieren Antigene an naive CD8⁺-T-Zellen. Diese differenzieren daraufhin zu antigenspezifischen cytotoxischen CD8⁺-T-Zellen und lysieren infizierte Körperzellen. Dies führt zur Freisetzung der intrazellulären Listerien und zur deren Tötung durch aktivierte Makrophagen. Weil DCs kein bedeutendes Reservoir für Listerien darstellen, findet das *Priming* von CD8⁺-T-Zellen über Kreuzpräsentation exogener Antigene statt (Albert et al, 1998).

Voraussetzung für die Bildung listerienspezifischer CD8⁺-T-Zellen ist die Invasion von *L. monocytogenes* ins Cytosol der infizierten Zellen. LLO-defiziente Listerien, die nicht ins Cytosol der Wirtszellen eindringen können, führen nicht zur Bildung von listerien-spezifischen CD8⁺-T-Zellen (Berche et al, 1987; Brunt et al, 1990). Ausschließlich im Cytosol erhalten Listerien-Antigene, die während der Vermehrung des Pathogens sekretiert werden, Zugang zu dem MHC-Klasse-I-Antigen-Präsentationsweg. Dabei agiert das Hämolysin LLO als eines der wirksamsten Listerien-Antigene (Berche et al, 1987; Safley et al, 1991). Ein weiteres Antigen, das eine ebenso effektive CD8⁺-T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen *L. monocytogenes* auslöst, ist das Autolysin P60 (Sijts et al, 1997). Die antigenspezifischen cytotoxischen CD8⁺-T-Zellen sind sowohl bei einer primären als auch bei einer sekundären Infektion mit *L. monocytogenes* essentiell. Die Ausbildung einer protektiven Immunität gegen *L. monocytogenes* erfolgt nur bei einer Immunisierung mit lebenden Bakterien, nicht mit HKLM (*heat-killed Lm*) oder LLO-defizienten Stämmen (von Koenig und Finger, 1982).

1.3. Induktion von Typ-I-Interferon (Typ-I-IFN)

Typ-I-IFN umfasst eine Vielzahl von Interferonen, darunter IFN- β und verschiedene IFN- α Subtypen. Die vielfältigen antiviralen Mechanismen, die nach deren Bindung an den *interferon alpha and beta receptor* (IFNAR) ausgelöst werden, zählen zu der am besten charakterisierten Immunantwort gegen virale Infektionen (Isaacs und Lindemann, 1957; Müller et al, 1994; Sadler und Williams, 2008). Neben der

antiviralen Aktivität wirken Interferone auch antiproliferativ auf Tumorzellen, immunmodulatorisch und als Signalüberträger zwischen Immunzellen (Trinchieri, 2010).

Typ-I-IFN wird von verschiedenen Zelltypen als Antwort auf virale und bakterielle Infektionen produziert. Die Produktion von Typ-I-IFN wird nach Detektion von sogenannten PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) durch PRRs (*pattern recognition receptors*) des angeborenen Immunsystems über intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst (Abb. 1.2). Hierbei sind sowohl membrangebundene TLRs (*Toll-like receptors*) als auch cytosolische PRRs involviert (Meylan und Tschopp, 2006; Kato et al, 2011).

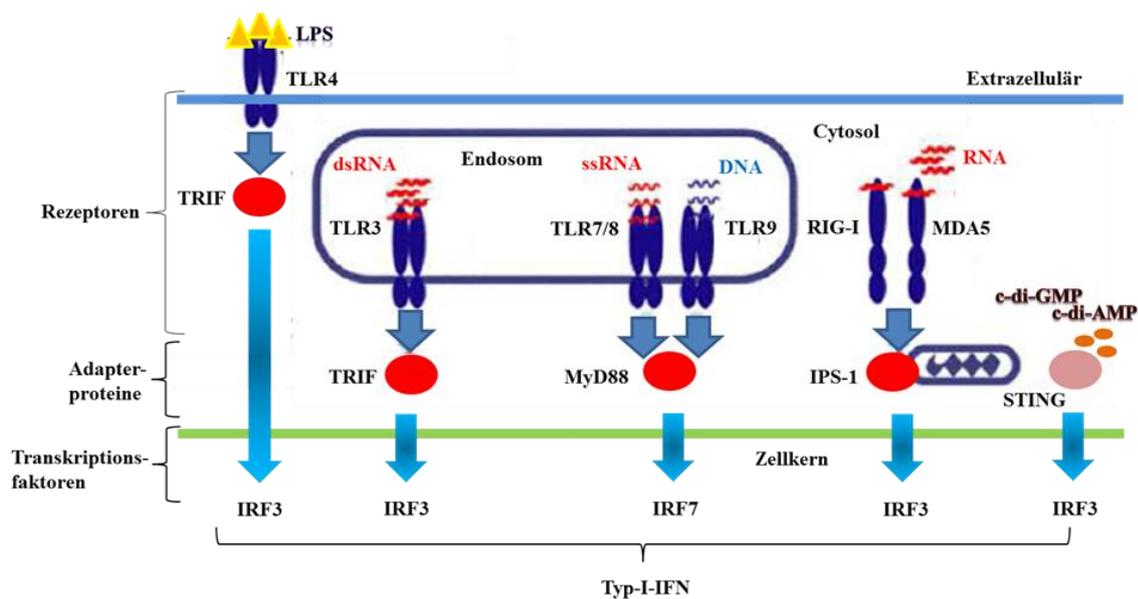


Abb.1.2: Induktion von Typ-I-IFN nach Detektion bakterieller und viraler Strukturen durch verschiedene Immunrezeptoren. Die Erkennung von LPS erfolgt durch TLR4 an der Zelloberfläche. Die Detektion von dsRNA, ssRNA und DNA erfolgt durch TLR3, TLR7/8 und TLR9 im Endosom. TLR4 und TLR3 nutzen TRIF als Adapterprotein für die Signalübermittlung, TLR7/8 und TLR9 hingegen MyD88. RIG-I und MDA5 erkennen RNA im Cytosol und nutzen IPS-1 als Adapterprotein. STING ist der Rezeptor für cyclische Dinukleotide und dient gleichzeitig als Adapterprotein. Die Signalkaskaden münden in die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7, die zur Produktion von Typ-I-IFN führen. (Abbildung angepasst nach Kawai und Akira, 2008)

TLR4, der Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien erkennt, ist in der Cytoplasmamembran lokalisiert. Die in der Membran von Endosomen verankerten TLR3, TLR7/8 und TLR9 detektieren die von außen aufgenommenen Nukleinsäuren. Während TLR3 beispielsweise vom Reovirus abgeleitete dsRNA erkennt, erkennt TLR7/8 ssRNA des Human Immunodeficiency Virus (HIV). TLR9 hingegen detektiert unmethylierte CpG-DNA-Motive von Bakterien

und Viren (Perry et al, 2005; Takeuchi, 2009). Für die Signalübermittlung nutzen TLR4 und TLR3 das Adapterprotein TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β*). Die von plasmazytoiden DCs (pDCs) besonders stark exprimierte TLR7/8 und TLR9 hingegen nutzen das Adapterprotein MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*) (Kawai und Akira, 2010).

Zu den cytosolischen Immunrezeptoren, die nach Detektion viraler RNA die Produktion von Typ-I-IFN auslösen, zählen die Rezeptoren der RLR-Familie (*RIG-I-like receptors*), RIG-I (*retinoic acid-inducible gene-1*) und MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) (Kato et al, 2006; Kato et al, 2011). Im Gegensatz zu den TLRs, die nur von bestimmten Zellen des Immunsystems, wie beispielsweise DCs und Makrophagen, exprimiert werden, kommen diese Rezeptoren im Cytosol der meisten kernhaltigen Zellen vor (Kato et al, 2006). Diese unterscheiden sich in ihrem RNA-Erkennungsmuster und detektieren infolgedessen verschiedene RNA-Viren. RIG-I erkennt 5'-Triphosphat-ssRNA mit einer sogenannten *panhandle structure*, wie sie beispielsweise von dem Influenza A Virus (IAV), dem Newcastle Disease Virus (NDV) und dem Sendaivirus (SeV) generiert wird. MDA5 hingegen erkennt lange dsRNA, die von Picornaviren, wie beispielsweise dem Encephalomyocarditis Virus (EMCV), erzeugt wird (Kato et al, 2011; Yoneyama et al, 2015).

RIG-I und MDA5 bestehen aus zwei N-terminalen CARD-Domänen (*caspase activation and recruitment domain*), einer zentralen DExD/H box Helikase-Domäne und einer C-terminalen Domäne (CTD) (Yoneyama et al, 2015). Zwei Studien an RIG-I haben durch Kristallstrukturanalyse und NMR-Spektroskopie gezeigt, dass nach Bindung des Liganden durch die CTD die ATPase-Aktivität der Helikase aktiviert wird. Durch die daraufhin ausgelöste Konformationsänderung werden die ansonsten „maskierten“ CARD-Domänen, die für die Dimerisierung und Signalübermittlung verantwortlich sind, exponiert. Nach Dimerisierung von RIG-I Molekülen erfolgt die Interaktion mit dem an der Mitochondrienmembran lokalisierten Adapterprotein IPS-1 (*IFN- β -promoter stimulator 1*) (Cui et al, 2008; Takahashi et al, 2008).

Sowohl der TRIF- als auch der IPS-1-abhängige Signalweg führt zur Aktivierung der Serin/Threonin-Proteinkinase TBK1 (*TANK-binding kinase 1*). STING (*stimulator of inteferon genes*), ein weiterer cytosolischer Immunrezeptor, der nach Bindung von zyklischen Dinukleotiden die Produktion von Typ-I-IFN auslöst, nutzt ebenfalls TBK1 für die Signalweitergabe. Die Aktivierung von TBK1 führt zur Phosphorylierung und

Dimerisierung des Transkriptionsfaktors IRF3 (*interferon regulatory factor 3*), der nach Translokation in den Zellkern die Initiation der Transkription von Typ-I-IFN induziert. Der MyD88-abhängige Signalweg in pDCs führt über IRF7 zur Produktion von Typ-I-IFN. Darüber hinaus erfolgt über Aktivierung des MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*) und NF- κ B-Signalwegs (*nuclear factor-kappa B*) die Produktion von pro-inflammatorischen Cytokinen (Honda und Taniguchi, 2006; Kawai und Akira, 2010; Burdette et al, 2011).

1.3.1. Induktion von Typ-I-IFN während einer Infektion mit *L. monocytogenes*

L. monocytogenes befällt nach einer systemischen Infektion zunächst Milz und Leber des Wirtes. Hier werden die Bakterien von gewebständigen Phagozyten aufgenommen. Es kommt zu einer effizienten Eliminierung des Pathogens durch IFN- γ -aktivierte Makrophagen. Einige Bakterien sind dennoch in der Lage aus dem Phagosom zu entkommen und sich im Cytosol der infizierten Zellen zu vermehren. Die Invasion von *L. monocytogenes* ins Cytosol führt, neben der Produktion von pro-inflammatorischen Cytokinen, zur Produktion von IFN- β (Abb. 1.3). Nach einer Infektion der Maus mit *L. monocytogenes* sind Makrophagen die wichtigsten Produzenten von IFN- β (Stockinger et al, 2009). Dabei ist die von *L. monocytogenes* ausgelöste IFN- β Antwort von cytosolischen Immunrezeptoren abhängig. LLO-defiziente Listerien, die nicht ins Cytosol der Wirtszellen eindringen können, führen nicht zur Produktion von IFN- β (O`Riordan et al, 2002; McCaffrey et al, 2004; Leber et al, 2008). Infolgedessen spielen membrangebundene TLRs in der IFN- β Induktion im Kontext einer Infektion mit *L. monocytogenes* keine wesentliche Rolle. In peritoneale Makrophagen allerdings trägt TLR2, der durch Bestandteile der Zellwand im Phagosom aktiviert wird, maßgeblich zur Produktion von IFN- β bei (Aubry et al, 2012).

Die sogenannte späte Antwort (*late response*), die von cytosolischen Listerien ausgelöst wird, wird hauptsächlich von IFN- β und die daraufhin aktivierten IRGs (*IFN response genes*) dominiert (McCaffrey et al, 2004). Die cytosolische Immunüberwachung dient der Detektion von virulenten Bakterien, die aus dem Phagosom ins Cytosol der Wirtszelle entkommen sind. Hierfür ist eine Reihe von verschiedenen Immunrezeptoren von Bedeutung. Diese erkennen diverse bakterielle Produkte, die von *L. monocytogenes* während der Vermehrung im Cytosol sekretiert werden.

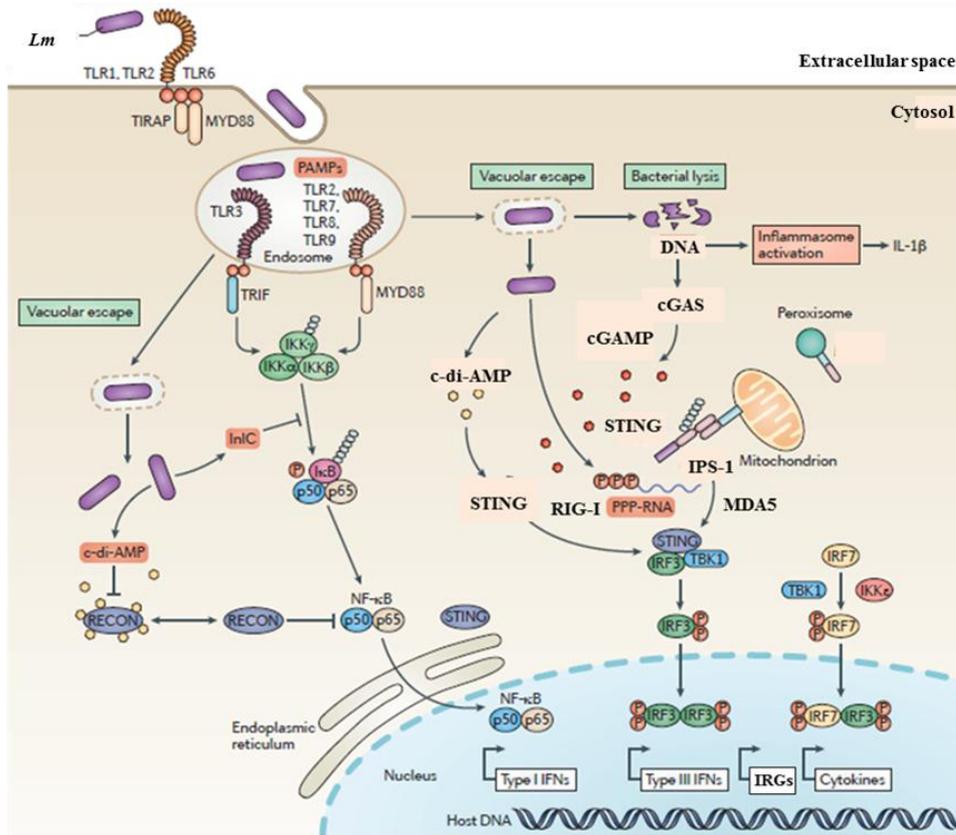


Abb. 1.3: Detektion einer Infektion mit *L. monocytogenes* durch verschiedene Immunrezeptoren. Nach einer Infektion wird *Lm* zunächst an der Zelloberfläche und im Phagosom durch TLRs erkannt. Dies führt zu einer MyD88- und NF-κB-abhängigen frühen Antwort (*early response*). Die Invasion ins Cytosol löst nach Detektion von *Lm* durch cytosolische Immunrezeptoren die späte Antwort (*late response*) aus. Diese wird von IFN-β und die daraufhin aktivierten IRGs dominiert. (Abbildung angepasst nach Radoshevich und Cossart, 2018)

Eines der wichtigsten Immunrezeptoren für die Detektion von cytosolischen Listerien ist das am endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisierte Protein STING, das als direkter Sensor für cyclische Dinukleotide und gleichzeitig als Adapterprotein in der Signalübermittlung dient. Die von *L. monocytogenes* über MDRs (*multi-drug efflux pumps*) ins Cytosol sekretierten sekundären Botenstoffe, c-di-AMP und c-di-GMP, führen über die Aktivierung von STING zur Produktion von IFN-β (Crimmins et al, 2008; Woodward et al, 2010; Burdette et al, 2011). Die durch Listerien-DNA im Cytosol der infizierten Zellen ausgelöste IFN-β Antwort ist ebenfalls von dem Immunrezeptor STING abhängig (Stetson et al, 2006; Leber et al, 2008; Hansen et al, 2014). Der eigentliche DNA-Rezeptor cGAS (*cGAMP synthase*) synthetisiert nach Bindung von DNA den sekundären Botenstoff cyclisches GMP-AMP (cGAMP), der letztendlich zur Aktivierung von STING führt (Sun et al, 2013; Wu et al, 2013).

Weitere Immunrezeptoren, die eine essentielle Rolle in der Detektion von virulenten Listerien im Cytosol spielen, sind RIG-I und MDA5. Diese detektieren die von *L. monocytogenes* sekretierte RNA und führen daraufhin zur Produktion von IFN- β (Abdullah et al, 2012). Vor allem in Nicht-Immunzellen, wie beispielsweise Epithelzellen, die keine funktionsfähige STING-Signalübermittlung besitzen, spielt RIG-I eine wesentliche Rolle in der IFN- β Produktion während einer Infektion mit *L. monocytogenes* (Hagmann et al, 2013). Die Einbeziehung verschiedener Liganden und deren individuelle Erkennung durch die entsprechenden Immunrezeptoren stellt ein Mechanismus dar, der die Identifizierung von virulenten Listerien im Cytosol sicherstellt.

In der Signalübermittlung, die nach Detektion von cytosolischen Listerien zur Produktion von IFN- β führt, sind die Serin/Threonin-Proteinkinase TBK1 und der Transkriptionsfaktor IRF3 involviert. Die Aktivierung von TBK1 durch die Adapterproteine STING und IPS-1 führt über IRF3 zur Produktion von IFN- β (O`Connell et al, 2004; O`Connell et al, 2005; Leber et al, 2008; McWhirter et al, 2009).

Anders als bei viralen Infektionen hat die IFN- β Antwort, die durch bakterielle Infektionen ausgelöst wird, unterschiedliche Auswirkungen auf den Wirt. Diese erhöht die Anfälligkeit des Wirtes bei einer Infektion mit *L. monocytogenes* und fördert dessen Vermehrung, wobei verschiedene Mechanismen eine Rolle spielen. IFN- β induziert nach Bindung an den entsprechenden Rezeptor (IFNAR) die Expression einer Vielzahl von Genen mit antiviraler und antiproliferativer Wirkung, darunter auch die Proteinkinase R (PKR). Diese spielt bei der IFN- β -vermittelten Hemmung der Proteinsynthese eine entscheidende Rolle (Williams, 2001). Im Zuge der Translationshemmung kommt es zu einer Cap-unabhängigen Translation des pro-apoptotischen Transkriptionsfaktors ATF4 (*activating transcription factor 4*). Die daraufhin ausgelöste integrierte Stressantwort, ISR (*integrated stress response*), führt zur Apoptose der betroffenen Zellen (Valderrama et al, 2017). So haben beispielsweise ältere Studien eine massive Apoptose von Makrophagen und Lymphozyten in den mit Listerien infizierten Mäusen gezeigt (Carrero et al, 2004; Stockinger et al, 2002). Infolgedessen sind IFNAR-defiziente Mäuse deutlich resistenter gegenüber einer Listerien-Infektion als Wildtypiere. Diese weisen in den primären Zielorganen, Milz und Leber, eine deutlich reduzierte Bakterienlast auf (Carrero et al, 2004; O`Connell et al, 2004; Auerbuch et al, 2004). Darüber hinaus wird die Immunantwort des Wirtes durch das

anti-inflammatorische Cytokin IL-10, das von Makrophagen nach Phagozytose der apoptotischen Immunzellen produziert wird, gedrosselt (Carrero et al, 2006). Zudem unterdrückt die von *L. monocytogenes* ausgelöste IFN- β Antwort die Aktivierung von Phagozyten durch eine reduzierte Expression von IFN- γ , eines der wichtigsten Cytokine in der frühen Phase einer Infektion mit diesem Pathogen (Rayamajhi et al, 2010).

1.4. Produktion von Vesikeln (OMVs bzw. MVs) durch Bakterien

Die Produktion von Vesikeln ist in allen bislang auf diesen Prozess hin untersuchten Organismen nachgewiesen worden. Dies ist daher ein universeller Prozess, der in Prokaryoten, Eukaryoten und Archaeen während des Wachstums stattfindet. Die Produktion von Vesikeln durch Bakterien ist, bezüglich deren Anzahl und Inhalt, von äußeren Faktoren, wie beispielsweise Temperatur, Antibiotikaeinwirkung und Wachstumsmedium, abhängig (McBroom und Kuehn, 2007; Kadurugamuwa und Beveridge, 1995; Sidhu et al, 2008).

In gram-negative Bakterien entstehen Vesikel durch Knospung der äußeren Membran und werden daher als OMVs (*outer membrane vesicles*) bezeichnet (Abb. 1.4A und 1.4C). Diese enthalten verschiedene Proteine und Lipide der äußeren Membran und des Periplasmas (Kadurugamuwa und Beveridge, 1995; Kulp und Kuehn, 2010; Schwechheimer und Kuehn, 2015; Lappann et al, 2013; Roier et al, 2016). Darüber hinaus wird für eine OMVs-Subpopulation ein weiterer Biogenese-Mechanismus vermutet, in dem auch die Cytoplasmamembran involviert ist (Abb. 1.4B). Entscheidend für deren Freisetzung sind kontrollierte Brüche in der Peptidoglykanschicht durch die gezielte Einwirkung von Autolysinen (Kadurugamuwa und Beveridge, 1995). Dieses vorgeschlagene Modell wurde Jahre später durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) von *Shewanella vesiculosa* bestätigt (Abb. 1.4D). Infolgedessen sind diese OMVs von einer doppelten Membran umgeben und enthalten darüber hinaus cytosolische Proteine, RNA und DNA (Pérez-Cruz et al, 2013).

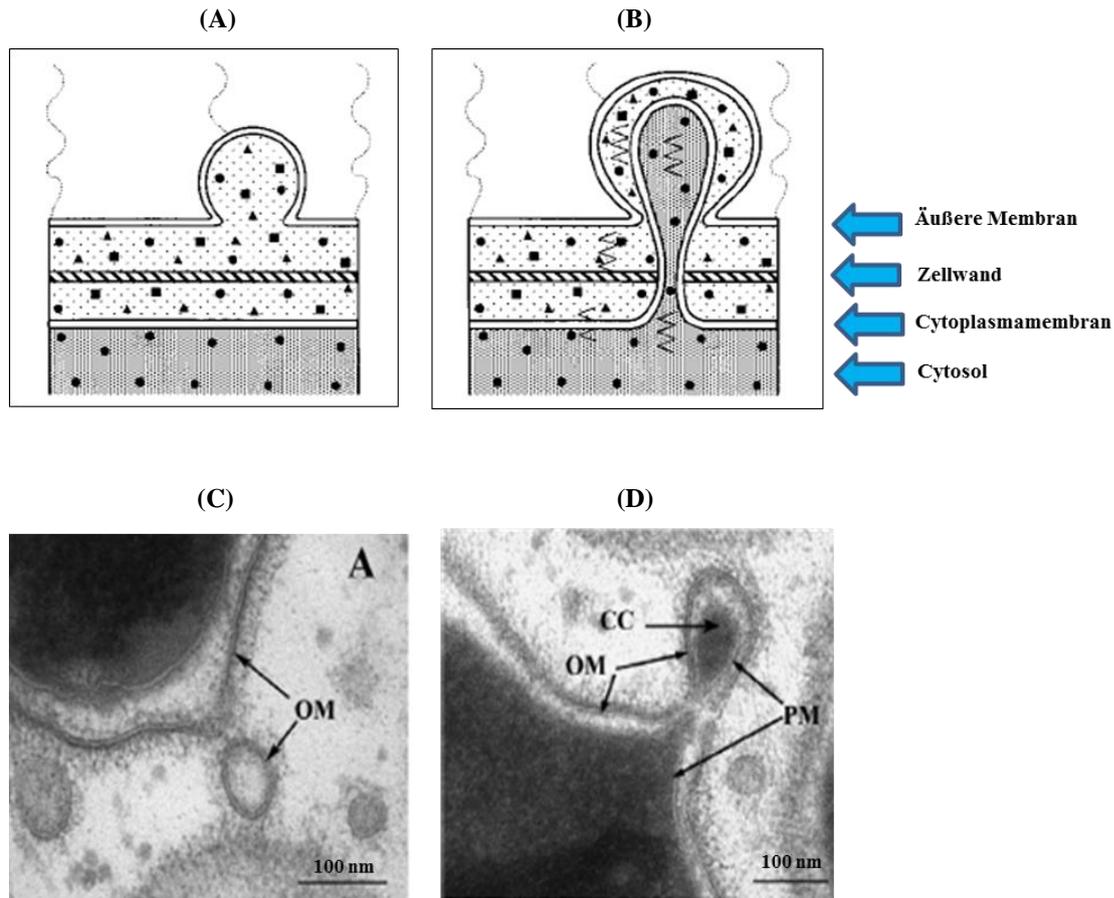


Abb. 1.4: Produktion von OMVs durch gram-negative Bakterien. A und B: Vorgeschlagener Mechanismus für die OMVs-Biogenese von Kadurugamuwa und Beveridge, 1995. Demnach entstehen OMVs durch Knospung der äußeren Membran, wodurch *one-bilayer* OMVs produziert werden (A). Durch temporäre und gezielte Brüche in der Zellwand entstehen durch Knospung der darunter liegenden Cytoplasmamembran *double-bilayer* OMVs (B). C und D: TEM-Aufnahmen von *S. vesiculosa* zeigen die Produktion dieser 2 unterschiedlichen OMVs. (Pérez-Cruz et al, 2013)

Der genaue Biogenese-Mechanismus von Vesikeln, die von gram-positiven Bakterien produziert und als MVs (*membrane vesicles*) bezeichnet werden, ist bislang nicht bekannt. Lange Zeit hat man angenommen, dass gram-positive Bakterien aufgrund der dicken Peptidoglykanschicht, die eine physikalische Barriere für deren Freisetzung darstellt, keine MVs produzieren. Inzwischen belegen zahlreiche Studien die Produktion von MVs durch gram-positive Bakterien, wie beispielsweise *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae* und *Mycobacterium tuberculosis* (Lee et al, 2009; Rivera et al, 2010; Olaya-Abril et al, 2014; Lee et al, 2015).

Von besonderem Interesse sind Vesikel, die von pathogenen Bakterien produziert werden. Zahlreiche Studien belegen die Anwesenheit von Virulenzfaktoren in den Vesikeln und deren Mitwirkung in der Pathogenese während einer Infektion. Die Vesikel verursachen, ähnlich wie bakterielle Infektionen, Entzündungen und schwere

pathologische Veränderungen von Gewebe, wie beispielsweise Lungenschäden bis hin zum Zelltod (Fiocca et al, 1999; Lee et al, 2012; Gurung et al, 2011; Thay et al, 2013).

Die Sekretion von Virulenzfaktoren über die Produktion von Vesikeln stellt einen zusätzlichen Sekretionsmechanismus dar, der von pathogenen Bakterien genutzt wird. *Helicobacter pylori* beispielsweise sekretiert ein Teil (25%) des Exotoxins VacA über OMVs (Ricci et al, 2005). Die Aminopeptidase PaAP, eines der Hauptproteine in den OMVs, die von *Pseudomonas aeruginosa* (cystische Fibrose-Isolate) produziert werden, fördert zudem deren Assoziation und Aufnahme durch Lungenepithelzellen (Bauman und Kuehn, 2006; Bauman und Kuehn, 2009). Ähnlich vermittelt das hitzelabile Enterotoxin LT, das von ETEC (*Enterotoxigenic Escherichia coli*) hauptsächlich über OMVs sekretiert wird (mehr als 95%), die Anheftung der OMVs an Wirtszellen (Kesty et al, 2004). Vesikel fungieren daher als Transportvehikel, die speziell gerichtet die Aufnahme von Virulenzfaktoren durch Wirtszellen vermitteln. Darüber hinaus bietet die Sekretion von Virulenzfaktoren über Vesikel weitere Vorteile. Hierdurch können Virulenzfaktoren gleichzeitig und über lange Strecken hinweg transportiert werden. Des Weiteren sind diese vor Abbau durch Proteasen im extrazellulären Milieu geschützt.

Vesikel nutzen verschiedene Mechanismen für deren Internalisierung in Wirtszellen. Hierzu zählt die Fusion von OMVs, die von *P. aeruginosa* produziert werden, mit der Plasmamembran von Wirtszellen (Bomberger et al, 2009). Für *Shigella flexneri*-OMVs wurde gezeigt, dass diese durch Phagozytose in Wirtszellen gelangen (Kadurugamuwa und Beveridge, 1998). OMVs, die von *Porphyromonas gingivalis* und *H. pylori* produziert werden, gelangen über Endozytose in Wirtszellen (Furuta et al, 2009; Parker et al, 2010).

Aufgrund der komplexen Zusammensetzung aus verschiedenen biologisch aktiven Biomolekülen stellen Vesikel eine Quelle für Antigene dar. Eines der Hauptbestandteile von OMVs, die von gram-negativen Bakterien produziert werden, ist LPS der äußeren Membran. Durch die Internalisierung von OMVs gelangt LPS in die Wirtszellen und löst die Produktion von IL-1 β und IL-18 durch Aktivierung von Caspase-11 aus (Vanaja et al, 2016). Durch die Produktion von Vesikeln können selbst nicht-intrazelluläre Pathogene die Aktivierung des Inflammasoms und weiterer cytosolischer Immunrezeptoren auslösen. Peptidoglykan beispielsweise wird über Vesikel in Wirtszellen transportiert und löst NOD-abhängig (*nucleotide-binding and oligomerization domain*) die Produktion von IL-8 aus (Kaparakis et al, 2010). Weitere pro-inflammatorische

Cytokine, wie beispielsweise TNF- α and IL-12, werden von Makrophagen und DCs nach deren Aktivierung durch OMVs, die von *Salmonella typhimurium* produziert werden, sekretiert. Darüber hinaus werden diese Immunzellen zu einer gesteigerten Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen stimuliert (Alaniz et al, 2007). Als APCs sind diese mit den adaptiven T- und B-Lymphozyten verlinkt, woraus protektive Immunantworten resultieren. Zahlreiche Studien haben im Mausmodell gezeigt, dass eine Immunisierung mit Vesikeln, die von verschiedenen pathogenen Bakterien produziert werden, vor der anschließenden Infektion schützt (Schild et al, 2008; Avila-Calderón et al, 2012; Olaya-Abril et al, 2014; Alaniz et al, 2007). Aufgrund der immunogenen Eigenschaften werden Vesikel zur Formulierung von Vakzinen eingesetzt. Ein auf OMVs-basierendes Vakzin gegen *Neisseria meningitidis* der Gruppe B wird beispielsweise derzeit erfolgreich eingesetzt (Uli et al, 2006; Holst et al, 2009; Masforrol et al, 2017). Die Nutzung von Vesikeln für die Antigen-Präsentation bietet den Vorteil, dass oberflächenassoziierte Antigene, wie beispielsweise das immun-dominante Antigen Porin PorA in den von *N. meningitidis* produzierten OMVs, deren native Struktur behalten. Daraufhin wird eine robuste Antikörperproduktion ausgelöst, die vor invasiven Meningokokken-Erkrankungen schützt.

Ein weiterer bedeutsamer Aspekt der Produktion von Vesikeln durch Bakterien ist der Transfer von Antibiotikaresistenzen. Beta-Laktamase positive *Moraxella catarrhalis*-Stämme beispielsweise vermitteln Amoxicillin-Resistenz durch den Transfer von OMVs auf andere Bakterienspezies mit denen diese häufig in Mischinfektionen auftreten (Schaar et al, 2011). Der Transfer von Resistenzgenen über OMVs wurde anhand eines Carbapenemase-Resistenzgens innerhalb verschiedener *Acinetobacter baumannii*-Stämmen gezeigt (Rumbo et al, 2011). Weitere Studien belegen den horizontalen Transfer von DNA über Vesikel zwischen Bakterien (Yaron et al, 2000; Renelli et al, 2004; Klieve et al, 2005; Fulsundar et al, 2014).

1.5. Sekretion von RNA durch Bakterien

Die Sekretion von RNA durch Bakterien wurde erstmal 1989 im Zusammenhang mit OMVs, die von *Neisseria gonorrhoeae* produziert werden, gezeigt (Dorward et al, 1989). Erst Jahre nach dieser Entdeckung rückte die von Bakterien sekretierte RNA in den Fokus wissenschaftlichen Interesses. In jüngster Zeit beschreiben zahlreiche Studien die Anwesenheit von RNA in den Vesikeln, die von verschiedenen Bakterien-

spezies produziert werden (Biller et al, 2014; Sjöström et al, 2015; Ghosal et al, 2015; Resch et al, 2016; Koeppen et al, 2016; Blenkiron et al, 2016). Deren umfassende Untersuchung über RNA-Sequenzierung hat gezeigt, dass es sich hierbei um eine komplexe Zusammensetzung aus RNAs verschiedener Größe und zellulärer Funktion handelt. Die von UPEC (*UroPathogenic E. coli*) über OMVs sekretierte RNA beispielsweise beinhaltet sämtliche zelluläre RNA-Spezies, rRNA, tRNA, mRNA und sRNA. Diese Reihenfolge entspricht der Häufigkeit der identifizierten RNA-Spezies in den OMVs (Blenkiron et al, 2016). Eine ähnliche Zusammensetzung ergab die Untersuchung der RNA in den MVs, die von *Streptococcus pyogenes* produziert werden (Resch et al, 2016).

Von entscheidender Bedeutung ist die Feststellung, dass sich die über Vesikel sekretierte RNA im Auftreten und in der Häufigkeit bestimmter RNA-Spezies von dem intrazellulären RNA-Profil unterscheidet. Daher wird ein selektiver Export von RNA durch Bakterien vermutet. Ähnliche Beobachtungen wurden über die extrazelluläre RNA, die von eukaryotischen Zellen zum Teil über Exosomen sekretiert wird, berichtet (Valadi et al, 2007; Nolte-'t Hoen et al, 2012; Li et al, 2013). Der Mechanismus hinter der Verpackung von RNA in den Vesikeln ist bislang nicht bekannt. Deren Funktion wird in der interzellulären Kommunikation vermutet, in der die RNA Spezies- und *kingdom*-übergreifend eine regulatorische Rolle einnimmt. Dies wird durch Studien begründet, die den Transport und die Lieferung von RNA über Vesikel in Wirtszellen gezeigt haben (Blenkiron et al, 2016). Darüber hinaus hat eine weitere Studie gezeigt, dass *P. aeruginosa* die Immunantwort des Wirtes herunterreguliert, indem es kleine nicht-kodierende RNAs über OMVs in Wirtszellen transportiert (Koeppen et al, 2016). Hierfür verantwortlich wurde ein tRNA-Fragment identifiziert, das durch Inhibition der Expression von MAPK-Kinasen zu einer Reduktion der IL-8 Produktion führt.

Zahlreiche Hinweise deuten auf eine Einflussnahme pathogener Bakterien auf ihre Wirtszellen über sekretierte RNA hin. So wurden beispielsweise zahlreiche RNA-Moleküle mit Charakteristika von miRNA-Vorläufermolekülen in den Genomen von Krankheitserregern durch computerbasierende Vorhersagen identifiziert. Als mögliche *targets* der daraus resultierenden miRNAs wurden Genprodukte, die in verschiedenen Erkrankungen involviert sind, ausgemacht (Shmaryahu et al, 2014). Ein weiterer Hinweis auf einen wahrscheinlichen RNAi-Mechanismus (*RNA interference*) durch bakterielle RNAs kam von einer Studie aus dem gleichen Jahr. Nach Infektion von

humanen Zelllinien mit verschiedenen pathogenen Bakterien wurden zahlreiche bakterielle RNAs, die mit dem RISC-Komplex (*RNA-induced silencing complex*) assoziiert waren, identifiziert (Furuse et al, 2014). Eine Manipulation der Genexpression durch bakterielle RNA während einer Infektion setzt voraus, dass diese unbeschadet in die Wirtszellen gelangt. Vesikel als Transportvehikel für RNA zu nutzen, bietet Schutz vor Abbau durch allgegenwärtige RNasen und ermöglicht zudem deren Transport über lange Distanzen (Bomberger et al, 2009).

Zahlreiche Studien aus der Eukaryoten-Forschung haben bereits Jahre zuvor gezeigt, dass der Großteil der extrazellulären RNA (bis zu 90%) in einer freien, nicht Exosomen-assoziierten Form sekretiert wird (Wang et al, 2010; Turchinovich et al, 2011; Arroyo et al, 2011). Analog zu den Eukaryoten wird RNA auch von den Bakterien in einer freien, nicht Vesikel-assoziierten Form sekretiert. Im Jahr 2015 wurde diese RNA-Fraktion, die von *E. coli* sekretiert wird, erstmals umfassend untersucht (Ghosal et al, 2015). Diese Untersuchung hat gezeigt, dass die freie, nicht Vesikel-assoziierte RNA eine vergleichbare, komplexe Mischung verschiedener RNA-Spezies besitzt wie die Vesikel-assoziierte RNA. Der funktionelle Unterschied zwischen den beiden sekretierten RNA-Fraktionen ist nicht bekannt. Dies gilt auch für den Sekretionsmechanismus der freien, nicht Vesikel-assoziierten RNA. Für *L. monocytogenes* wurde gezeigt, dass die SecA2-ATPase der Sec-Translokase, die einen generellen Sekretionsweg für Proteine darstellt, teilweise an der RNA-Sekretion beteiligt ist. Die Deletion dieses Proteins resultiert in einer reduzierten Sekretion von RNA ins extrazelluläre Milieu (Desvaux und Hébraud, 2006; Abdullah et al, 2012).

Die Sekretion von RNA durch Bakterien hat einen essentiellen immunologischen Aspekt während einer Infektion. Die Detektion von bakterieller RNA signalisiert dem Immunsystem die Lebendigkeit und damit das Ausmaß der infektiösen Gefahr. Die RNA gehört zur Klasse der vita-PAMPs (*viability-associated PAMPs*) und dient als Kriterium für das Immunsystem, um lebende von toten Bakterien unterscheiden zu können (Sander et al, 2011). Die sekretierte RNA spielt beispielsweise eine essentielle Rolle in der Detektion virulenter Listerien, die ins Cytosol der infizierten Zellen gelangen (Abdullah et al, 2012). Die Translokation von RNA ins Cytosol der Wirtszellen während einer Infektion mit *L. monocytogenes* wurde anhand einer Fluoreszenzmarkierung gezeigt. Daraufhin führt die Detektion der RNA durch den Immunrezeptor RIG-I zur Produktion von Typ-I-IFN (Hagmann et al, 2013). Die

während einer Infektionen mit *S. pyogenes* durch RNA ausgelöste Typ-I-IFN Antwort trägt maßgeblich zur Ausbildung einer protektiven Immunantwort gegen dieses Pathogen bei (Gratz et al, 2011). Darüber hinaus löst die bakterielle RNA die Produktion von pro-inflammatorischen Cytokinen, wie beispielsweise IL-12, aus (Koski et al, 2004). Hierzu zählen des Weiteren IL-1 β und IL-18, die nach Aktivierung des Inflammasoms durch RNA produziert werden (Kanneganti et al, 2006; Sha et al, 2014). Die bakterielle RNA spielt eine essentielle Rolle in der Bekämpfung von Pathogenen durch Aktivierung des Immunsystems über Typ-I-IFN und pro-inflammatorische Cytokine.

1.6. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es die von *L. monocytogenes* sekretierte RNA aus den Überständen von Bakterienkulturen zu isolieren und deren Zusammensetzung über Sequenzierung zu identifizieren. Anschließend sollte das Potential einzelner sekretierter RNAs eine IFN- β Antwort in Wirtszellen auszulösen, untersucht werden. Dies sollte durch Transfektion der hergestellten RNAs in Epithelzellen und BMDMs (*bone marrow-derived macrophages*) durchgeführt werden. Hierbei war es von besonderem Interesse herauszufinden, ob Unterschiede in der IFN- β Induktion durch die einzelnen RNAs festzustellen sind. Darüber hinaus sollte untersucht werden welcher cytosolischer Rezeptor der RLR-Familie für die Detektion der einzelnen RNAs und der daraufhin ausgelösten IFN- β Antwort verantwortlich ist. Dies sollte in Zelllinien, die eine Defizienz des jeweiligen Rezeptors aufweisen, untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es die von *L. monocytogenes* produzierten MVs aus den Überständen von Bakterienkulturen zu isolieren und zu charakterisieren, bezüglich Größe, Proteinkonzentration und Anzahl. Darüber hinaus sollte über Massenspektrometrie der Proteininhalt der MVs identifiziert werden. Es galt herauszufinden welche zelluläre Funktion und Lokalisation die Proteine in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, haben. Des Weiteren sollten die MVs auf die Anwesenheit von RNA untersucht werden. Es galt herauszufinden welche RNA-Spezies über die Produktion von MVs exportiert werden. Anschließend sollte deren IFN- β Induktionspotential durch Transfektion in verschiedenen Zelllinien untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Bakterienstämme und Virusstamm

Bakterienstämme	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> DH10β	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> TOP10	Invitrogen
<i>Listeria monocytogens</i> EGD-e (<i>Lm</i>)	Glaser et al, 2001
<i>Lm</i> -pERL3-rli32	Diese Arbeit
<i>Lm</i> -pERL3-ssrS	Diese Arbeit

Virusstamm	Ursprung	Wirt	Herkunft
Influenza A Virus (H1N1)	Puerto Rico (1934)	Mensch	Medizinische Virologie (JLU Gießen)

2.2. Zelllinien

Zelllinie	Name	Spezies	Herkunft
HEK293	human embryonic kidney cell	Mensch	Niere
MDCK-II	Madin Darby canine kidney cells	Hund	Niere
PtK	rat-kangaroo epithelial kidney cells	Rattenkänguru	Niere
BMDMs	bone marrow-derived macrophages	Maus	Knochenmark
L929	mouse fibroblast L929 cells	Maus	Fibroblasten

2.3. Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin: Stock-Konzentration: 100 mg/ml. Gelöst in 70% EtOH.

Erythromycin: Stock-Konzentration: 30 mg/ml. Gelöst in 50% EtOH.

Penicillin: Stock-Konzentration: 10 mg/ml. Gelöst in H₂O. Anschließend steril-filtriert.

Die Stocklösungen wurden bei -20°C gelagert.

2.4. Antikörper

Primäre Antikörper

Name	Spezies	Hersteller
anti-LLO	Maus	Eigene Herstellung
anti-InlB	Maus	Eigene Herstellung
anti-P60	Maus	Eigene Herstellung
anti- β -Aktin	Hase	Cell signaling
anti-IAV-Nukleoprotein	Maus	S. Ludwig, Münster

Sekundäre Antikörper

anti-mouse IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz B
anti-rabbit IgG-HRP	Ziege	Santa Cruz B

2.5. Molekulargewichtsmarker

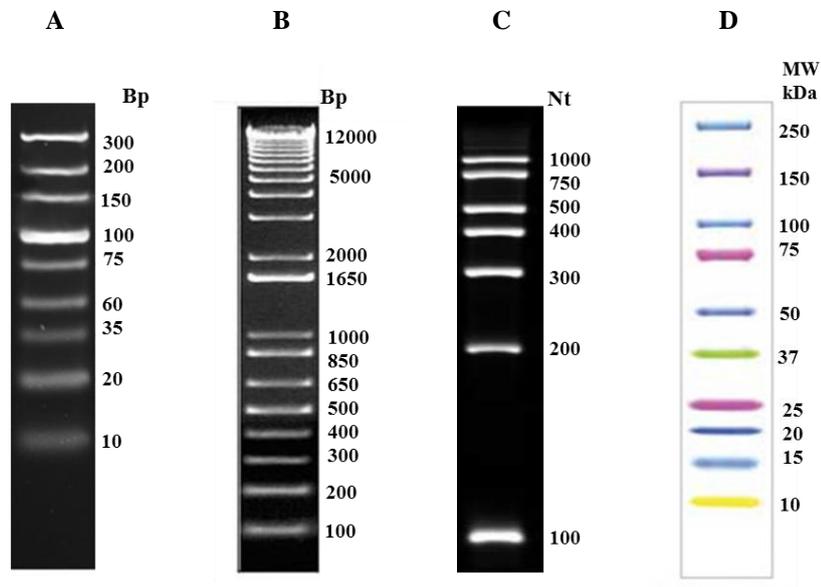


Abb. 2.1: DNA-, RNA- und Protein-Größenstandards. A: GeneRuler Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Scientific). B: 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). C: RNA Century Marker-Plus (ThermoFisher Scientific). D: Precision Plus Protein Standard (Bio-Rad).

2.6. Vektoren

2.6.1. Plasmidkarte des pCR2.1-TOPO-Vektors

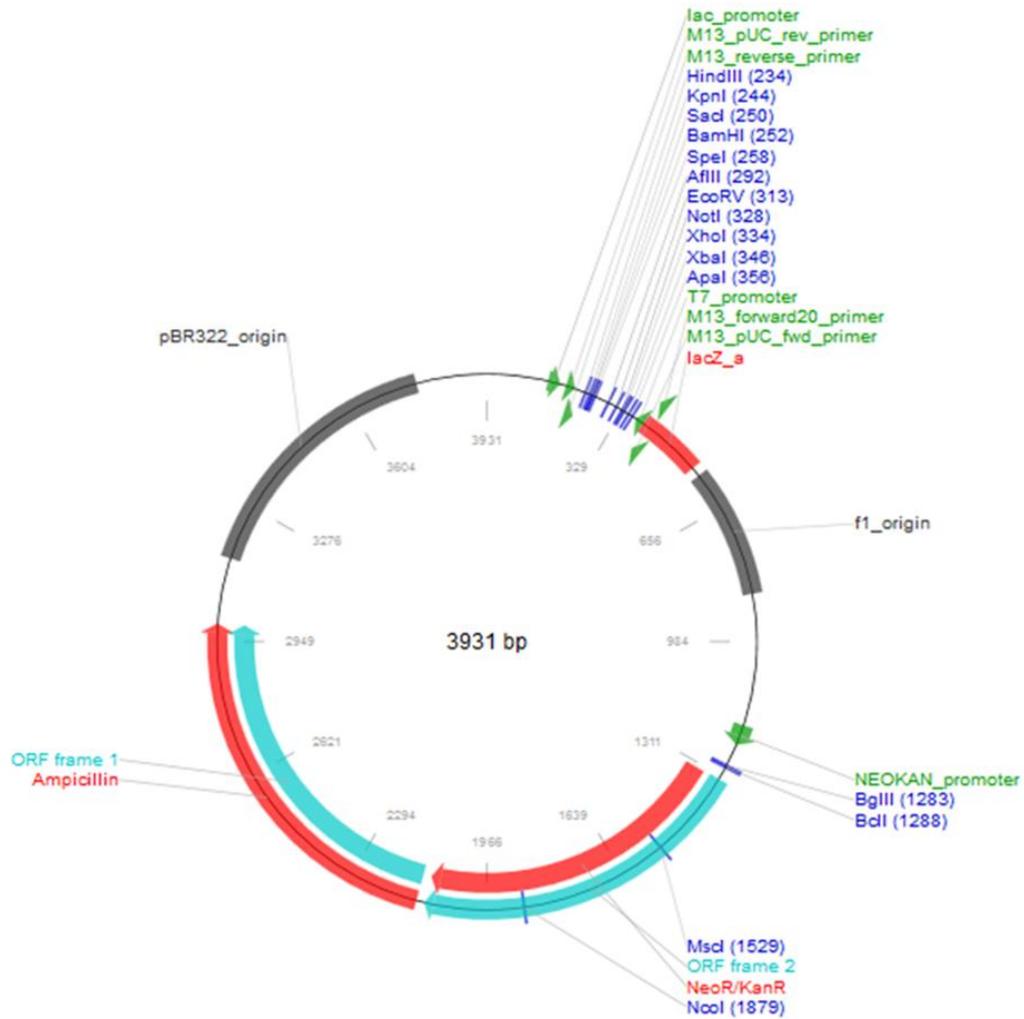
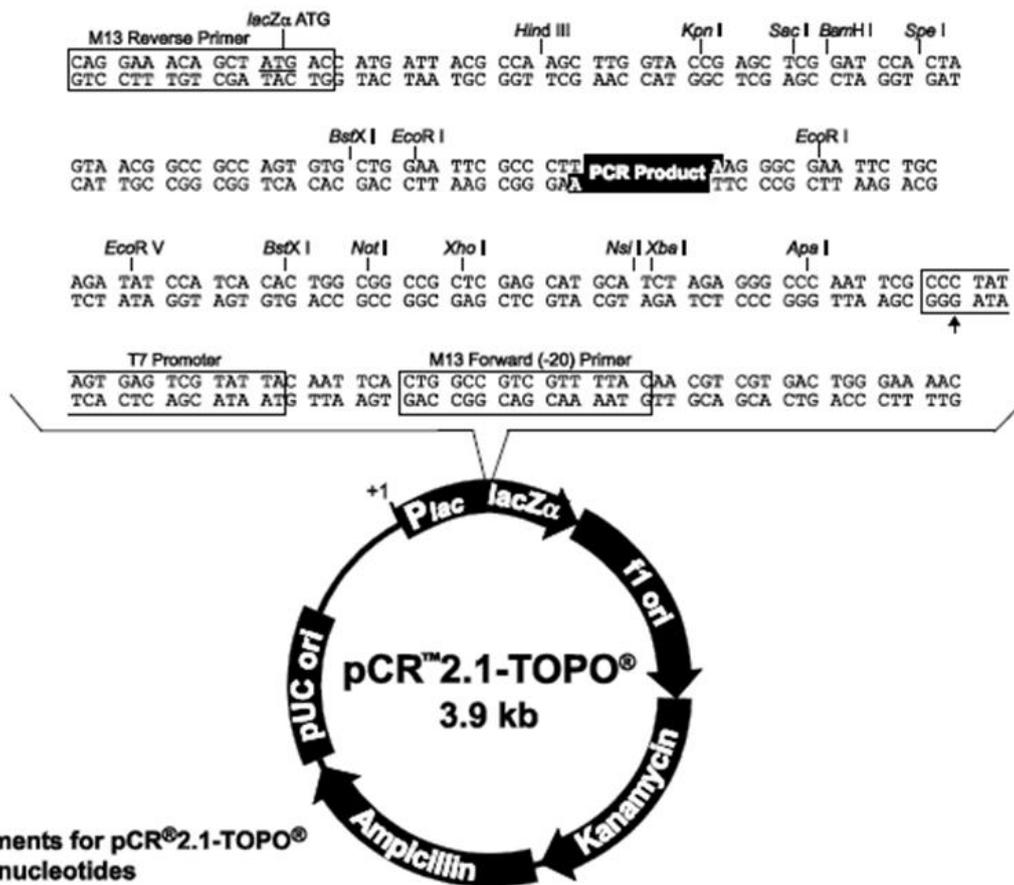


Abb. 2.2: Plasmidkarte des pCR2.1-TOPO-Vektors (Addgene Vector Database)

2.6.2. Multiple Cloning Site (MCS) des pCR2.1-TOPO-Vektors



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547
M13 reverse priming site: bases 205-221
Multiple cloning site: bases 234-357
T7 promoter/priming site: bases 364-383
M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
f1 origin: bases 548-985
Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
pUC origin: bases 3136-3809

Abb. 2.3: Multiple Cloning Site (MCS) des pCR2.1-TOPO-Vektors (Invitrogen)

2.6.3. Plasmidkarte des pERL3-Vektors

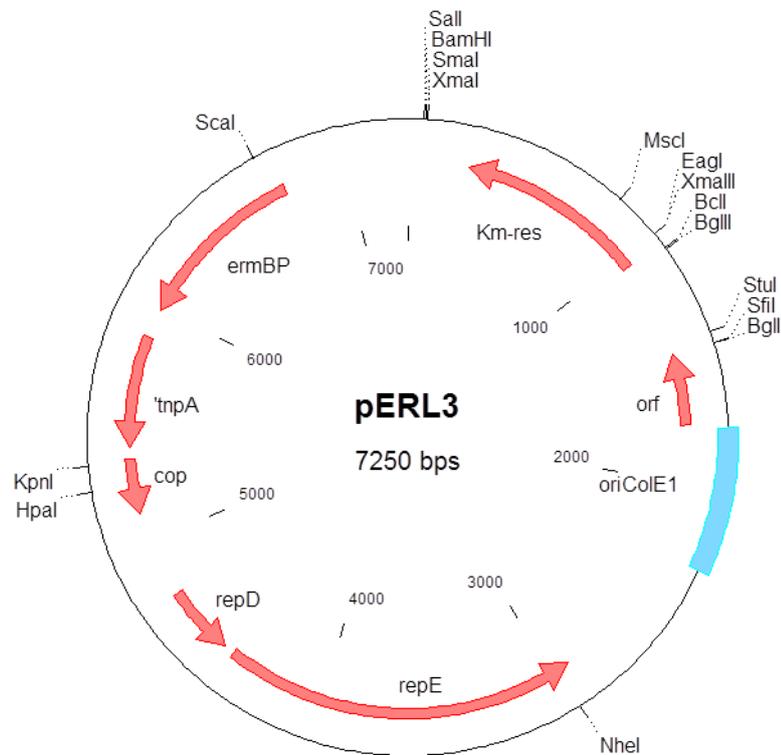


Abb. 2.4: Plasmidkarte des pERL3-Vektors

2.7. Oligonukleotide (Primer)

Die Primer für die RT-PCR wurden bei Qiagen bestellt. Die Primer für die PCR wurden selbst entworfen und bei Eurofins Genomics bestellt.

2.7.1. Primer für die Real-Time PCR (RT-PCR)

Gen	Name	Spezies
IFN-β	Ifnb1_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00249662)	Maus
IFN-α4	Ifna4_2_SG QuantiTect Primer Assay (QT01774353)	Maus
Rplp	Rplp0_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00249375)	Maus
IFN-β	IFNB1_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00203763)	Mensch
PPIA	PPIA_1_SG QuantiTect Primer Assay (QT00052311)	Mensch

2.7.2. Primer für die Herstellung der 25 RNA-Kandidaten

Die Sequenz des Promotors der T7-RNA-Polymerase ist unterstrichen.

Primer	Sequenz (5`-3`)
rli32_for	<u>TAATACGACTCACTATAGGT</u> GTGGAGAGCTTTCATTTTT
rli32_rev	AAAAAAATAACCGCACCAGG
rli47_for	<u>TAATACGACTCACTATAGGT</u> GCGAATGAAACAACTTGG
rli47_rev	CTCAAGATATTCTAACTTAC
rli48_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> AAAGGCATGTTATAATTTAT
rli48_rev	CACTCTTGCAGTAGCGCTGA
rli50_for	<u>TAATACGACTCACTATAGGT</u> TTCTTATGCTATAATAAATTT
rli50_rev	ACATGACTCCCTGAGCAGTAG
rli51_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> ATATCCCAAAGTTTAAGCCAC
rli51_rev	AAACTAAGTTTAAGCCACCT
rli56_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GAGCACAAAGACGTGTGGAA
rli56_rev	ATAGAAAGAGCCCCTTAAAA
rli60_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> ATTTTTTTTCAAAAATGTGCGAC
rli60_rev	TTTTCGATGCTTGAAAACCTCG
rli62_for	<u>TAATACGACTCACTATAGGT</u> GTGATTGGTTATGATAATT
rli62_rev	ACGGAGCATAATAAAAATAAGG
rli87_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> AAACACTATAATAATTGAGG
rli87_rev	TCTAGACCATTTATCGGAAAG
rli90_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> AGTAAAAAGAGAGACAATTG
rli90_rev	TTATTGTATAGAAAAGCACG
rli98_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GGAAGGATGTTTTAGAGGAAA
rli98_rev	GTGAAAGGCATGTTATAATT
rli99_for	<u>TAATACGACTCACTATAGGT</u> TTCGGATTTAAGGTATAATT
rli99_rev	ATTTAGAGGAATTAGAGCGT

2. Material und Methoden

rli100_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> AAAAATCAGAATTCATAGTAC
rli100_rev	GCTGGTGGCTAATAAGGGACT
rli105_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> CAAGACTGTTAGAATAGGGA
rli105_rev	TTTCAAGACTATTAAACTAGC
rli108_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GCTATCATTAGTAGTATTTT
rli108_rev	TTAAAAGTAAGGGAGCGCTG
rli111_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GCTCATTTCTAAGGATGACT
rli111_rev	TGGGCTGTATGAAAAAACATC
rli114_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> CATATGGTGGTACTATATCC
rli114_rev	ATATCAGCCAAAAAACTAATA
rliG_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GATGACGACACTTCTGTTCA
rliG_rev	CAACAGATGGAAAGGGCTAT
LhrA_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GAACAATAGTAAAATAAGTT
LhrA_rev	CATTTCCAGCGTTGCCATCA
rnpB_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> TTCGGCAGAAATGCTCGGA
rnpB_rev	AAAAAGCTGTTTTAAGAGGG
SRP_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> TTTATTTGGCATTTAATTAT
SRP_rev	AGCAAAATAGTCTTTTATAT
ssrA_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> TTTTTCTGTATAATAACTA
ssrA_rev	GTTTTCTTGACTCCATCGTT
ssrS_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GAGAAAAGAAACCCTAATGTA
ssrS_rev	CAAAAAAGAAACCCCAATCG
Imot11_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> GGACAGACTCGAAATCTGTT
Imot11_rev	TCTACGGAGAAACGGGGATT
Imot67_for	<u>TAATACGACTCACTATAGG</u> AGTATCACCTTGACATGGT
Imot67_rev	AAAGGGATGCTTTTTTGATAAATG

2.7.3. Primer für die Herstellung der rli32-Motive

Die Sequenz des Promotors der T7-RNA-Polymerase ist unterstrichen.

Primer	Sequenz (5`-3`)
Motiv 2_for	<u>TAATACGACTCACTATAGGA</u> AATAATGTTAGAGCAATAA
Motiv 2_rev	AATAATATTAAAGCGAGCCA

Die Einzelstränge der DNA-*templates* für die Motive 1 und 3 wurden bei Eurofins Genomics bestellt. In einem weiteren Schritt erfolgte das *annealing* der ssDNA zur dsDNA. Die Sequenz des Promotors der T7-RNA-Polymerase ist unterstrichen.

ssDNA	Sequenz (5`-3`)
Motiv 1_for	<u>TAATACGACTCACTATAGGGCTTTCATTTTTCCCAAGAGAA</u> AGC
Motiv 1_rev	GCTTTCTCTTGGGAAAAATGAAAGCC <u>CTATAGTGAGTCGT</u> <u>ATTA</u>
Motiv 3_for	<u>TAATACGACTCACTATAGGCCTAATACTCCCTTAACCGCAT</u> CCCCCTGGTGCGGTTATTTTTT
Motiv 3_rev	AAAAAAATAACCGCACCAGGGGGATGCGGTTAAGGGAGT <u>ATTAGGCCTATAGTGAGTCGTATTA</u>

2.7.4. Primer für die Herstellung von *Lm-pERL3-rli32*

Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme und die überstehenden Sequenzen für die Fusion von *hly*-Promotor und *hly*-Terminator an *rli32* sind unterstrichen.

Primer	Sequenz (5`-3`)	Restriktionsenzym
<i>hly</i> -p_for	GCGCG <u>T</u> CGACGTGACTTTTATGTTGAGGCA	<i>Sal I</i>
<i>hly</i> -p_rev	<u>GCTCTCCACAGCTT</u> GCTTTATAGCTTTAT	
<i>rli32</i> _for	<u>TAAAGCAAGCT</u> GTGGAGAGCTTTCATTTTT	
<i>rli32</i> _rev	<u>ACTTTTACAAAA</u> AAAAATAACCGCACCAGG	
<i>hly</i> -t_for	<u>TTATTTTTTTTT</u> TGTAAGTAATAAAAAATT	
<i>hly</i> -t_rev	GCGC <u>CCCCGGG</u> GCTTATATTATATGGATAAA	<i>Xma I</i>

2.7.5. Primer für die Herstellung von *Lm-pERL3-ssrS*

Die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme und die überstehenden Sequenzen für die Fusion von *hly*-Promotor und *hly*-Terminator an *ssrS* sind unterstrichen.

Primer	Sequenz (5`-3`)	Restriktionsenzym
<i>hly-p_for</i>	GCGCGT <u>TCGACGTGACTTTTATGTTGAGGCA</u>	<i>Sal I</i>
<i>hly-p_rev</i>	<u>TTTCTTTTCTGCTTGCTTTATAGCTTTAT</u>	
<i>ssrS_for</i>	<u>TAAAGCAAGCAGAAAAGAAACCCCTAATGTA</u>	
<i>ssrS_rev</i>	<u>ACTTTTACAACAAAAAAGAAACCCCAATCG</u>	
<i>hly-t_for</i>	<u>TTCTTTTTTGTGTA</u> AAAAGTAATAAAAAATT	
<i>hly-t_rev</i>	GCGCGGAT <u>CCGCTTATATTATATGGATAAA</u>	<i>BamH I</i>

2.8. Chemikalien

Roth: NaCl, Agarose, Borsäure, Harnstoff, Tris, Glycin, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), Roti-Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, pH = 4,5-5,0), Roti-Aqua-Phenol, Roti-Chloroform, Ficoll 400, Ampicillin, KH₂PO₄, CaCl₂ × 2 H₂O, Xylencyanol, Deionisiertes Formamid, Saccharose, Ethidiumbromid, DTT (Dithiothreitol)

SIGMA ALDRICH: Ethanol, 2-Propanol, β-Mercaptoethanol, Penicillin, Erythromycin, MgSO₄ × 7 H₂O, Riboflavin, Thiamin, L-Arginin, L-Leucin, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Valin, L-Cystein, L-Glutamin, BSA (Bovine Serum Albumin), PMSF (Phenylmethylsulfonyl Fluoride), Mutanolysin, Na-Deoxycholat

Merck: DMSO (Dimethylsulfoxid), Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ × H₂O, NaOAc, Glukose, Essigsäure, MgCl₂ × 6 H₂O, MnCl₂ × 4 H₂O, KAc, Glycerin, APS (Ammoniumpersulfat), Eisencitrat

SERVA: Tween 20, Triton X-100, HEPES (Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure), EDTA (Ethylendiamintetraacetat), Bromphenolblau

GERBU: Coomassie Brilliant Blue R

VWR: Lysozym, Methanol

BD: BHI (Brain Heart Infusion), Trypton, Hefeextrakt, Agar

2.9. Kits, Enzyme, gebrauchsfertige Lösungen und Chemikalien

Name	Hersteller
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase Kit	Invitrogen
dNTP-Set (100 mM)	ThermoFisher Scientific
<i>high fidelity</i> DNA-Polymerase	ThermoFisher Scientific
M-MLV Reverse Transcriptase	ThermoFisher Scientific
RNA 5'-Polyphosphatase	Epicenter
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
FastDigest <i>Sal</i> I, <i>Xma</i> I und <i>Bam</i> H I	ThermoFisher Scientific
T4 DNA Ligation Kit	ThermoFisher Scientific
Lipofectamine 2000	Invitrogen
miRNeasy Mini Kit	Qiagen
RNase-free DNase-Kit	Qiagen
RNAprotect Bacteria Reagent	Qiagen
Agencourt AMPure XP Kit	Beckman Coulter Genomics
SUPERase In, RNase Inhibitor	ThermoFisher Scientific
MiSeq Reagent Kit V2	Illumina
Proteinase K Solution	ThermoFisher Scientific
<i>in vivo</i> -jetPEI	Polyplus transfection
Qubit RNA BR Assay Kit (20-1000 ng)	Invitrogen
Qubit RNA HS Assay Kit (5-100 ng)	Invitrogen
Qubit dsDNA HS Assay Kit (0,2-100 ng)	Invitrogen
SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Biotechnologies
Agilent Small RNA Kit	Agilent Biotechnologies

High sensitivity DNA Kit	Agilent Biotechnologies
RNaseOut	Invitrogen
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen
RNase, DNase-free	Roche
T7-RNA-Polymerase	NEB
rNTP-Set (100 mM)	GE Healthcare
DNase I, RNase-free	ThermoFisher Scientific
Alkaline Phosphatase, Calf intestinal (CIAP)	NEB
ECL Plus Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
AEC Staining Kit	SIGMA ALDRICH
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad
Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit	SIGMA ALDRICH
Rotiphorese Gel 30	Roth
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SERVA
RNase-Away Reagent	ThermoFisher Scientific
0,5 M EDTA, pH = 8,0	ThermoFisher Scientific
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	ThermoFisher Scientific

2.10. Medien, Puffer und Enzyme für die Zellkultur

ThermoFisher Scientific: Opti-MEM Reduced Serum Medium, RPMI 1640 Medium (ATCC modification), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), MEM (Minimum Essential Medium)

Merck: FKS (Fötale Kälberserum), PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), NEA (Nicht-essenzielle Aminosäuren), Trypsin

2.11. Medien für die Anzucht von Bakterien

Herstellung von Brain Heart Infusion-Medium (BHI-Medium)

Für die Herstellung von BHI-Medium wurden 37 g BHI in 1 L H₂O gelöst. Anschließend wurde das Medium autoklaviert. Für die Herstellung von BHI-Agarplatten wurden dem Medium 15 g Agar/L zugesetzt.

Herstellung von Luria Bertani-Medium (LB-Medium)

Zusammensetzung LB-Medium:

Reagenz	Konzentration
Trypton	1% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	0,5% (w/v)

Die Reagenzien wurden zunächst in H₂O gelöst und anschließend autoklaviert. Für die Herstellung von LB-Agarplatten wurden dem Medium 15 g Agar/L zugesetzt.

Herstellung von SOC-Medium

Das SOC-Medium in dem die *E. coli*-Zellen nach der Transformation zur Expression der Antibiotika-Resistenzgene aufgenommen wurden, bestand aus SOB-Medium, das 20 mM Glukose enthielt.

Zusammensetzung SOB-Medium (Super Optimal Broth):

Reagenz	Konzentration
Trypton	2% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	10 mM
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	10 mM

Die Reagenzien wurden zunächst in H₂O gelöst und anschließend autoklaviert.

Herstellung von Minimalmedium

Zusammensetzung Minimalmedium:

Reagenz	Volumen
Salzkomponente A	100 ml
Salzkomponente B	10 ml
Eisencitrat (0,44 g in 100 ml H ₂ O)	20 ml
Glukose (20%)	50 ml
Aminosäure-Lösung (1 mg/ml)	10 ml
L-Cystein (5 mg/ml)	20 ml
L-Glutamin (30 mg/ml)	20 ml
Riboflavin (1 mg/ml in 1 M Ameisensäure)	0,5 ml
Thiamin (1 mg/ml)	1 ml
(+)-Biotin (1 mg/ml in 0,1 M NaOH)	0,5 ml
DL-6,8-Thioctansäure (0,1 mg/ml in 70% EtOH)	50 µl
H ₂ O	768 ml

Salzkomponente A:

Reagenz	Menge/Volumen
KH ₂ PO ₄	32,8 g
Na ₂ HPO ₄	82,1 g
H ₂ O	x ml
Gesamtvolumen	500 ml

Salzkomponente B:

Reagenz	Menge/Volumen
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	4,09 g
H ₂ O	x ml
Gesamtvolumen	100 ml

Aminosäure-Lösung:

Reagenz	Menge/Volumen
L-Arginin	1 g
L-Isoleucin	1 g
L-Leucin	1 g
L-Methionin	1 g
L-Valin	1 g
H ₂ O	x ml
Gesamtvolumen	100 ml

Das Wasser, Salzkomponente A und B wurden vor dem Ansetzen des Minimalmediums autoklaviert. Die anderen Bestandteile wurden steril filtriert. Das Eisencitrat wurde auf einem Heizrührer bei ca. 60°C im Dunkeln über Nacht gelöst. Die Aminosäure-Lösung wurde bei 4°C gelagert. Die Aminosäuren Cystein und Glutamin sind nur wenige Tage stabil und wurden deshalb vor Herstellung des Minimalmediums frisch angesetzt. Die Vitamin-Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

2.12. Gele und Puffer

Puffer für die Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen

Zusammensetzung CCMB80-Puffer:

Reagenz	Konzentration
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	80 mM
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	20 mM
MgCl ₂ × 6 H ₂ O	10 mM
KAc	10 mM
Glycerin	10% (v/v)

Die Reagenzien wurden zunächst in H₂O gelöst. Danach wurde der pH-Wert der Lösung auf 6,4 eingestellt. Anschließend wurde der Puffer steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Puffer für die Herstellung von elektro-kompetenten *L. monocytogenes*-Zellen

Zusammensetzung HEPES-Saccharose-Puffer:

Reagenz	Konzentration
HEPES (10 mM, pH = 7,0)	1 mM
Saccharose (1 M)	0,5 M

Zusammensetzung HEPES-Saccharose-Glycerin-Puffer:

Reagenz	Konzentration
HEPES (10 mM, pH = 7,0)	1 mM
Saccharose (1 M)	0,5 M
Glycerin	10% (v/v)

Die Reagenzien für die Herstellung des HEPES-Saccharose- und HEPES-Saccharose-Glycerin-Puffers wurden zunächst in H₂O gelöst. Anschließend wurden die Puffer steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Gele und Puffer für die SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zusammensetzung SDS-Sammelgel (4%) für 2 Gele:

Reagenz	Volumen
H ₂ O	2,9 ml
Tris (0,5 M, pH = 6,8)	1,25 ml
30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	850 µl
SDS (10%)	50 µl
TEMED	10 µl
APS (25%)	10 µl

2. Material und Methoden

Zusammensetzung SDS-Trenngel (12%) für 2 Gele:

Reagenz	Volumen
H ₂ O	5,1 ml
Tris (1,5 M, pH = 8,8)	3,8 ml
30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	6,0 ml
SDS (10%)	150 µl
TEMED	20 µl
APS (25%)	20 µl

Zusammensetzung 10× Lauf-Puffer:

Reagenz	Konzentration
Tris	0,25 M
Glycin	1,92 M
SDS	1% (w/v)

ad H₂O

Zusammensetzung 2× Lade-Puffer:

Reagenz	Volumen
Glycerin	2 ml
SDS (10%)	1 ml
β-Mercaptoethanol	200 µl
Tris (0,5 M, pH = 6,8)	290 µl
Bromphenolblau (2 mg/ml in 0,1 M Tris, pH = 7,5)	160 µl
H ₂ O	6,9 ml

Zusammensetzung Bitzentfärber:

Reagenz	Konzentration
Methanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)

ad H₂O

2. Material und Methoden

Zusammensetzung Coomassie-Färbelösung:

Reagenz	Konzentration
Methanol	40% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R	8 Tabletten

ad H₂O

Puffer für Western blot

Zusammensetzung 10× Blot-Puffer:

Reagenz	Konzentration
Tris	0,25 M
Glycin	1,92 M

ad H₂O

Zusammensetzung 1× Blot-Puffer:

Reagenz	Konzentration
10× Blot-Puffer	10% (v/v)
Methanol	10% (v/v)
SDS (10%)	0,5% (v/v)

ad H₂O

Zusammensetzung 10× TBS-Puffer:

Reagenz	Konzentration
Tris	0,1 M
NaCl	1,5 M

ad H₂O

Zusammensetzung 1× TBS-Tween 20-Puffer:

Reagenz	Konzentration
10× TBS-Puffer	10% (v/v)
Tween 20	0,1% (v/v)

ad H₂O

Zusammensetzung RIPA-Puffer:

Reagenz	Konzentration
Tris (1 M, pH = 7,4)	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Triton X-100	1% (v/v)
Na-Deoxycholat	1% (w/v)
SDS	0,1% (w/v)

ad H₂O

Puffer für die Agarosegel-Elektrophorese

Zusammensetzung Lade-Puffer:

Reagenz	Konzentration
Ficoll 400	25% (w/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)

Die Reagenzien wurden in TE-Puffer (pH = 8,0) gelöst.

Zusammensetzung TE-Puffer:

Reagenz	Konzentration
Tris	10 mM
EDTA	1 mM

Die Reagenzien wurden zunächst in H₂O gelöst. Danach wurde der pH-Wert der Lösung auf 8,0 eingestellt.

Gele und Puffer für die denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zusammensetzung denaturierendes Polyacrylamidgel (10%) für 1 Gel:

Reagenz	Menge/Volumen
Harnstoff	18,9 g
10× TBE-Puffer	4,5 ml
30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid	15 ml
TEMED	60 µl
APS (20%)	300 µl
H ₂ O	x ml
Gesamtvolumen	45 ml

Zusammensetzung 10× TBE-Puffer:

Reagenz	Menge/Volumen
Tris	109 g
Borsäure	55 g
EDTA (0,5 M, pH = 8,0)	40 ml
H ₂ O	x ml
Gesamtvolumen	1 L

Zusammensetzung Lade-Puffer:

Reagenz	Konzentration
Harnstoff	6 M
Deionisiertes Formamid	80% (v/v)
Bromphenolblau	0,1% (w/v)
Xylencyanol	0,1% (w/v)
10× TBE-Puffer	10% (v/v)

ad H₂O

2.13. Verbrauchsmaterialien

ThermoFisher Scientific: MicroAmp Optical Adhesive Film, MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate (0,1 ml), RNase-freie Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml), 12er-Well Platten für die Zellkultur, große Zellkulturflaschen, 10 cm Zellkultur-schalen, Petrischalen, Kryoröhrchen

Merck: Express PLUS 0,22 µm Filtereinheit, Millex-GV 0,22 µm Filtereinheit

SARSTEDT: Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)

VWR: Poly-D-Lysin 12er-Well Platten für die Zellkultur, Zellsieb, Zellschaber

Roche: PVDF-Membran

Beranek: 500 ml Becher, Ultrazentrifugenröhrchen

Braun: Feindosierungsspritzen

TERUMO NEOLUS: Einmalkanülen

Spectrum Laboratories: Hollow Filter Module (>30 kDa-Membran)

Bio-Rad: Elektroporationsküvetten

Bertin Technologies: Precellys Lysing Kit (Soft tissue homogenizing CK14-Röhrchen)

Greiner Bio-One: Greiner-Röhrchen (15 ml und 50 ml), 96er-Well Platten mit F- und U-Boden

2.14. Geräte

Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Biotechnologies)

MiSeq Next Generation Sequencer (Illumina)

Ultrafiltrationsgerät: KrosFlo Research II TFF Systems (Spectrum Laboratories)

Thermomixer: Eppendorf Thermomixer comfort

Thermocycler: Applied Biosystems 2720 Thermal Cycle

Heizblock (Eigenbau der Institutswerkstatt)

Tischzentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5424

Kühlzentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5424 R

Zentrifuge für Greiner-Röhrchen: Heraeus Megafuge 1.0R

Zentrifuge für 500 ml Becher: Sorvall Superspeed RC2-B

Ultrazentrifuge: L8 60M ultracentrifuge (Beckman Coulter)

SW41 Ti-Rotor: Sorvall TH-641

F10 Rotor: Piramoon Technologies F10-6x500y Fiberlite

pH-Messgerät: SevenEasy (Mettler Toledo)

Magnetrührer: IKAMAG RED

Elektrophorese-Kammer für Protein-, DNA-, und RNA-Gele (Eigenbau der Institutswerkstatt)

Spannungsgerät: Electrophoresis Power Supply EPS 601 (Amersham Biosciences)

Gel-Dokumentationssystem (Bio-Rad)

Elektroporationsgerät (Bio-Rad electroporation system)

Taumelnder Plattformschüttler: Heidolph Polymax 1040 (Heraeus)

Schüttler für Bakterienkulturen: INFORS HAT (Ecotron)

Brutschrank für Bakterienkulturen (Heraeus)

Brutschrank für Zellkulturen (Thermo Scientific Forma Steri-Cycle CO₂ Incubators)

Wasserbad für Bakterienkulturen (Eigenbau der Institutswerkstatt)

Wasserbad für Zellkulturen (Grant Instruments)

-20°C Gefrierschrank (Bosch) und -80°C Gefrierschrank (Thermo Scientific)

Kühlschrank (Liebherr)

365 nm UV-Tisch (Vilber)

Plattenphotometer: Infinite M200 PRO NonoQuant (Tecan)

Photometer für Messung des Bakterienwachstums: Ultrospec 10 (Amersham Biosciences)

Vortexer: Vortex Genie 2 (Scientific Industries)

Bachofer Speed Vacuum Concentrator

Mikrowelle (Moulinex)

Pipetten (Eppendorf)

Sterilbank: HERAsafe Sicherheitswerkbänke (Thermo Scientific)

Sterilbank: NuAire Biological Safety Cabinets (Thermo Scientific)

StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Mikroskop: Wilovert S (Hund Wetzlar)

Digitalkamera (Canon)

NanoDrop Technologies (ThermoFisher Scientific)

Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies)

Waage und Feinwaage (KERN)

Precellys 24-Homogenisator (Bertin Technologies)

NanoSight Gerät (Malvern Instruments)

Kritische-Punkt-Trocknungseinrichtung: CPD 030 (Balzers, Liechtenstein)

Sputtercoater: SCD 500 (Balzers, Liechtenstein)

Elektronenmikroskop (Carl Zeiss)

2.15. Arbeiten mit DNA

2.15.1. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur Amplifikation von DNA-Sequenzen. Die Reaktion findet in einem Thermocycler statt und benötigt: DNA-*template*, Vorwärts- und Rückwärtsprimer, dNTPs und eine hitzestabile DNA-Polymerase, wie beispielsweise die *Taq*-DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Die PCR läuft in 3 sich wiederholenden Reaktionsschritten ab. Im ersten Reaktionsschritt wird das DNA-*template* durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Im zweiten Reaktionsschritt wird die Temperatur soweit abgesenkt, dass sich die komplementären Primer an die DNA-Einzelstränge anlagern. Im dritten Reaktionsschritt findet die DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase statt, wobei die Primer als Startersequenzen dienen. Dadurch entstehen neue DNA-Doppelstränge, die im nächsten PCR-Zyklus ebenfalls als *template* dienen. Infolgedessen steigt die synthetisierte DNA-Menge pro Zyklus exponentiell an.

Die PCR-Reaktionen wurden mit dem *Taq*-DNA-Polymerase Kit (Invitrogen) durchgeführt.

Pipettierschema pro Reaktionsansatz:

Reagenz	Menge/Volumen
DNA- <i>template</i>	50-100 ng
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/μl)	0,15 μl
10× <i>Taq</i> -DNA-Polymerase-Puffer ohne MgCl ₂	5 μl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 μl
dNTP-Mix (1,25 mM)	3 μl
Vorwärtsprimer (10 μM)	1 μl
Rückwärtsprimer (10 μM)	1 μl
H ₂ O	x μl
Gesamtvolumen	50 μl

PCR-Programm:

Schritte	Temperatur [°C]	Zeit
1	95	5 Minuten
2	95	20 Sekunden
3	55	30 Sekunden
4	72	30 Sekunden
5	4	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden 30mal wiederholt.

2.15.2. Agarosegel-Elektrophorese von DNA-Fragmenten

In der Agarosegel-Elektrophorese findet die Auftrennung von DNA nach Größe statt, wobei eine Agarosegel-Matrix als Trägermaterial dient. Aufgrund des Zucker-Phosphat-Rückgrats sind DNA-Moleküle negativ geladen und wandern infolgedessen in einem elektrischen Feld zum positiven Pol.

Agarose löst sich beim Erhitzen in 1× TBE-Puffer und bildet beim Abkühlen ein dreidimensionales Netzwerk, das je nach Agarose-Konzentration unterschiedlich große Poren aufweist. Mit steigender Agarose-Konzentration steigt der Vernetzungsgrad der Agarose. Die Konzentration der eingesetzten Agarose hängt von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente ab. Die in dieser Arbeit verwendeten Gele bestanden aus 1% und 2% Agarose. Hierfür wurde die Agarose zunächst abgewogen und danach in 1× TBE-Puffer in einem Erlenmeyer-Kolben durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Nach kurzem Abkühlen der Agarose wurde Ethidiumbromid zur Färbung der DNA hinzugefügt. Anschließend wurde die gelöste Agarose in den dafür vorbereiteten Gelträger gegossen. Nach Auspolymerisierung der Agarose wurde das Gel in eine horizontale Kammer reingelegt. Die Kammer wurde zuvor mit 1× TBE-Puffer befüllt.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die DNA-Proben mit Ladepuffer versetzt. Die Elektrophorese wurde für 1 Stunden bei 150 V, 150 mA und 100 W durchgeführt. Um die Größe der DNA-Fragmente bestimmen zu können, wurde ein DNA-Größenstandard verwendet (Abb. 2.1). Nach der Elektrophorese wurden die DNA-Fragmente visualisiert und fotografiert.

2.15.3. Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von PCR- und Verdau-Produkten sowie cDNA wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieser Kit eignet sich für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 100 Bp bis 10 Kb.

Zunächst wurden 5 μ l PB-Puffer zu den DNA-Proben pipettiert. Danach wurden die Proben gevortext und auf dafür vorgesehenen Säulen gegeben. Die Säulen wurden für 1 Minute bei 13200 rpm und RT zentrifugiert. An die Säulen gebundene DNA wurde mit 750 μ l PE-Puffer gewaschen. Dabei wurden die Säulen erneut für 1 Minute bei 13200 rpm und RT zentrifugiert. Es folgte eine Zentrifugation von 3 Minuten bei 13200 rpm und RT. Nach dem die Säulen auf neue Eppis draufgesetzt wurden, wurde die DNA mit 50 μ l H₂O von den Säulen eluiert. Dabei wurden die Säulen für 1 Minute bei 13200 rpm und RT zentrifugiert. Die Konzentration der DNA wurde mit dem NanoDrop gemessen.

2.15.4. Extraktion von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel

Durch unspezifische Bindung der Primer an das DNA-*template* können Nebenprodukte während der PCR entstehen. In diesem Fall wird das entsprechende DNA-Fragment aus dem Agarosegel extrahiert. Die Extraktion der DNA-Fragmente aus dem Agarosegel wurde mit dem GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieser Kit eignet sich für die Extraktion von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 25 Bp bis 20 Kb.

Nach Auftrennung der PCR-Produkte durch Agarosegel-Elektrophorese wurden die entsprechenden DNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in Eppis überführt. Zur Bestimmung der DNA-Größe wurde ein DNA-Größenstandard verwendet (Abb. 2.1). Dabei wurde die DNA auf einem UV-Tisch (365 nm) visualisiert. Um die DNA aus dem Agarosegel zu extrahieren, wurden die Gelstücke zunächst mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und danach mit 100 μ l Binding-Puffer/100 mg Gel versetzt. Anschließend wurden die Proben solange auf dem Heizblock bei 50-60°C inkubiert bis sich das Gel aufgelöst hatte. Zur schnelleren Auflösung des Gels wurden die Proben in dieser Zeit öfters kräftig gevortext. Anschließend wurden die Proben auf dafür vorgesehenen Säulen gegeben. Diese wurden für 1 Minute bei 6000 rpm und RT zentrifugiert. An die Säulen gebundene DNA wurde mit 700 μ l Wash-

Puffer gewaschen. Dabei wurden die Säulen erneut für 1 Minute bei 6000 rpm und RT zentrifugiert. Es folgte eine Zentrifugation von 1 Minute bei 13200 rpm und RT.

Nach dem die Säulen auf neue Eppis draufgesetzt wurden, wurde die DNA mit 50 µl H₂O von den Säulen eluiert. Hierfür wurden die Säulen für 1 Minute bei 13200 rpm und RT zentrifugiert. Die DNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop gemessen.

2.15.5. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierfür wurden Übernachtkulturen von plasmidhaltigen *E. coli*-Zellen verwendet. Diese wurden zunächst in Eppis überführt und für 3 Minuten bei 13200 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 250 µl P1-Puffer resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 250 µl P2-Puffer. Die Eppis wurden mehrmals invertiert und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Hierdurch erfolgte die Lyse der Bakterienzellen unter alkalischen Bedingungen. Zur Neutralisation und Renaturierung der Plasmid-DNA wurden 350 µl N3-Puffer hinzugefügt. Die Eppis wurden erneut mehrmals invertiert. Anschließend wurden die Eppis für 10 Minuten bei 13200 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand mit der darin gelösten Plasmid-DNA wurde auf dafür vorgesehenen Säulen gegeben. Die Säulen wurden für 1 Minute bei 6000 rpm und RT zentrifugiert. An die Säulen gebundene Plasmid-DNA wurde mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Dabei wurden die Säulen erneut für 1 Minute bei 6000 rpm und RT zentrifugiert. Es folgte eine Zentrifugation von 3 Minuten bei 13200 rpm und RT. Nach dem die Säulen auf neue Eppis draufgesetzt wurden, wurde die DNA mit 50 µl H₂O von den Säulen eluiert. Dabei wurden die Säulen für 1 Minute bei 13200 rpm und RT zentrifugiert. Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wurde mit dem NanoDrop gemessen.

2.15.6. Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Nach Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen und Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und Bakterienzellen sowie nach Aufreinigung von cDNA, PCR- und Verdau-Produkten wurde die Nukleinsäure-Konzentration mit dem NanoDrop gemessen. Nukleinsäuren haben, aufgrund der Absorption durch die quasi-aromatischen Purine und Pyrimidine, ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Eine Absorption von 1

entspricht einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml dsDNA, 33 µg/ml ssDNA und 40 µg/ml ssRNA.

Der Quotient aus A_{260}/A_{280} gibt die Reinheit einer DNA- bzw. RNA-Lösung an. Proteine haben, aufgrund der Absorption durch die aromatischen Aminosäuren, ein Absorptionsmaximum bei 280 nm. Ein A_{260}/A_{280} -Quotient von $>1,8$ spricht für eine reine DNA-Isolierung, ein Verhältnis von $>2,0$ für eine reine RNA-Isolierung. Ist die Nukleinsäure-Lösung mit Proteinen oder Phenol kontaminiert, so beträgt der A_{260}/A_{280} -Quotient $<1,5$.

2.15.7. Klonierung

Bei der Klonierung wird ein bestimmtes DNA-Fragment in einen Vektor, der als Transportvehikel zur Übertragung der gewünschten DNA-Sequenz in eine Wirtszelle dient, integriert. Durch Selektionsdruck mittels Antibiotikum im Wachstumsmedium wird erreicht, dass sich nur die vektorhaltigen Zellen vermehren. Zu diesem Zweck enthalten Vektoren Antibiotika-Resistenzgene und weitere Elemente, die beispielweise für deren Vervielfältigung in den Wirtszellen essentiell sind.

2.15.7.1. Klonierung durch TA Cloning

Durch TA Cloning können PCR-Produkte mit glatten Enden (*blunt ends*) in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert werden (Abb. 2.2). Hierfür macht man sich zunutze, dass die *Taq*-DNA-Polymerase am 3'-Ende der synthetisierten DNA-Produkte nicht *template*-abhängig ein A-Nukleotid hinzufügt. Infolgedessen besitzen diese PCR-Produkte an den 3'-Enden jeweils ein überstehendes A-Nukleotid. Der linearisierte pCR2.1-TOPO-Vektor besitzt komplementär dazu an den 3'-Enden jeweils ein überstehendes T-Nukleotid. Daraufhin integrieren die PCR-Produkte über TA-Basenpaarung in den pCR2.1-TOPO-Vektor (Abb. 2.3).

Für die Herstellung von *Lm*-pERL3-rli32 und *Lm*-pERL3-ssrS wurden die entsprechenden PCR-Produkte zunächst über TA-Basenpaarung in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert. Dabei wurde der TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Pipettierschema pro Reaktionsansatz:

Reagenz	Menge/Volumen
pCR2.1-TOPO-Vektor	1 μ l
Salt Solution	1 μ l
PCR-Produkt	4 μ l (150-200 ng)
Gesamtvolumen	6 μ l

Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte die Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen. Für die Transformation von elektrokompetenten *E. coli*-Zellen wurde die Salt Solution 1:4 in H₂O verdünnt.

2.15.7.2. Klonierung durch Restriktionsverdau und Ligation

Eine weitere Methode, um gewünschte DNA-Fragmente in einen Vektor zu klonieren, wird mittels Restriktionsenzymen durchgeführt. Hierfür werden im ersten Schritt Vektor und DNA-Fragment, das in den Vektor kloniert werden soll, mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Vorzugsweise verwendet man Restriktionsenzyme die versetzt schneiden, so dass überstehende Enden (*sticky ends*) entstehen. Durch Hybridisierung der komplementären Enden wird das gewünschte DNA-Fragment in den Vektor kloniert. Im zweiten Schritt wird durch Ligation mittels DNA-Ligase das Phosphodiester-Band kovalent geschlossen.

Für die Herstellung von *Lm*-pERL3-rli32 und *Lm*-pERL3-ssrS wurden die entsprechenden DNA-Fragmente zunächst durch Restriktionsverdau aus dem pCR2.1-TOPO-Vektor herausgeschnitten. Diese wurden anschließend durch Ligation in den pERL3-Vektor kloniert (Abb. 2.4).

Restriktionsverdau

Zunächst wurde ein Restriktionsverdau beider Vektoren, pCR2.1-TOPO und pERL3, mit FastDigest Restriktionsenzymen (ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Hierfür wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus dem pCR2.1-TOPO-Vektor mit *Sal* I und *Xma* I (für rli32) bzw. *Sal* I und *BamH* I (für ssrS) herausgeschnitten. In einem parallelen Ansatz wurde der pERL3-Vektor mit *Sal* I und *Xma* I (für rli32) bzw. *Sal* I und *BamH* I (für ssrS) linearisiert.

Pipettierschema pro Reaktionsansatz:

Reagenz	Menge/Volumen
<i>Sal</i> I	1 µl
<i>Xma</i> I bzw. <i>Bam</i> H I	1 µl
10× Restriktionsenzym-Puffer	2 µl
pCR2.1-TOPO- bzw. pERL3-Vektor	1 µg
H ₂ O	x µl
Gesamtvolumen	20 µl

Anschließend wurden die Proben für 2 Stunden bei 37°C auf dem Heizblock inkubiert. In einem weiteren Schritt wurden die Verdau-Produkte elektrophoretisch in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, visualisiert und fotografiert.

Ligation

Die Ligation wurde mit dem T4 DNA Ligation Kit (ThermoFisher Scientific) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Pipettierschema pro Reaktionsansatz:

Reagenz	Menge/Volumen
T4-DNA-Ligase (1 U/µl)	1,5 µl
10× T4-DNA-Ligase-Puffer	2 µl
Verdautes pCR2.1-TOPO-Vektor	4 µl (150-300 ng)
Verdautes pERL3-Vektor	1,5 µl (50-100 ng)
H ₂ O	x µl
Gesamtvolumen	20 µl

Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert. Am nächsten Tag wurde die T4-DNA-Ligase zunächst durch Hitze inaktiviert. Hierfür wurden die Proben für 20 Minuten bei 65°C auf dem Heizblock inkubiert. Es folgte die Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen.

2.16. Bakteriologische Arbeiten

2.16.1. Kultivierung von Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli*-Zellen erfolgte in LB-Medium oder auf LB-Agarplatten. Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden am Vortag Übernachtskulturen von plasmidhaltigen *E. coli*-Zellen in 10 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum in 100 ml Erlenmeyer-Kolben angesetzt. Hierfür wurden die Bakterien mit einer Öse von der Platte eingepflegt. Zuvor wurde das Antibiotikum ins Medium pipettiert, 100 µg/ml Ampicillin für die Anzucht von pCR2.1-TOPO-haltigen *E. coli*-Zellen und 300 µg/ml Erythromycin für die Anzucht von pERL3-haltigen *E. coli*-Zellen. Die Übernachtskulturen für die Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen wurden in LB-Medium ohne Antibiotikum angesetzt.

L. monocytogenes wurde in BHI-Medium oder auf BHI-Agarplatten sowie in Minimalmedium kultiviert. Die Übernachtskulturen für die Isolierung von MVs (MV_s-RNA), sec-RNA und zellulärer RNA der Stämme *Lm*-pERL3-rli32 und *Lm*-pERL3-ssrS wurden in BHI-Medium mit 5 µg/ml Erythromycin angesetzt. Diese wurden 1:50 in Minimalmedium eingepflegt. Zuvor wurden 5 µg/ml Erythromycin ins Medium pipettiert. *Lm* wurde ohne Zugabe von Antibiotikum im Wachstumsmedium angezogen. Die Bakterienkulturen wurden bei 37°C und 180 rpm auf einen Schüttler angezogen.

2.16.2. Messung des Bakterienwachstums

Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte überprüft. Diese wurde mit einem Spektralphotometer in Einmal-Mikroküvetten bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Bei OD_{600nm}-Werten über 1 wurden die Bakterienkulturen verdünnt. Infolgedessen wurde bei der Bestimmung der optischen Dichte der Verdünnungsfaktor berücksichtigt.

2.16.3. Kompetenz und Transformation

Die Transformation ist ein Prozess, bei dem Bakterien frei in der Umgebung vorliegende Fremd-DNA aufnehmen. Voraussetzung für die Transformation ist die Kompetenz, die Fähigkeit von Bakterienzellen DNA aufzunehmen. Nur wenige Bakterienarten, wie beispielsweise *Bacillus subtilis*, zeigen eine natürliche Kompetenz. Deshalb müssen Bakterienzellen zunächst für die Aufnahme von DNA kompetent gemacht werden. Danach erfolgt die Aufnahme von DNA durch Poren, die

vorübergehend durch Elektroporation oder Hitzeschock in der Zellmembran erzeugt werden.

2.16.3.1. Herstellung von elektro-kompetenten *E. coli*-Zellen

Eine *E. coli*-Übernachtskultur wurde 1:50 in 50 ml LB-Medium in einem 300 ml Erlenmeyer-Kolben eingimpft und bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,5 bis 0,6 bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und für 8 Minuten bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Röhrchen wurde auf Eis gestellt und der Überstand wurde mit der Pipette abgesaugt. Das Bakterienpellet wurde insgesamt 3mal mit jeweils 30 ml kaltem 10%igem Glycerin gewaschen. Dabei wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugationen von jeweils 8 Minuten bei 5000 rpm und 4°C pelletiert. Nach jeder Zentrifugation wurde das Röhrchen auf Eis gestellt und der Überstand wurde mit der Pipette abgesaugt. Im letzten Schritt wurde das Bakterienpellet in 500 µl kaltem 10%igem Glycerin resuspendiert und als 50 µl Aliquot in Kryoröhrchen überführt. Die Bakterienzellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur deren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.16.3.2. Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen

Eine *E. coli*-Übernachtskultur wurde 1:50 in 50 ml LB-Medium in einem 300 ml Erlenmeyer-Kolben eingimpft und bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0,3 bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Die Bakterienzellen wurden durch eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 4000 rpm und 4°C pelletiert. Das Röhrchen wurde auf Eis gestellt und der Überstand wurde mit der Pipette abgesaugt. Das Bakterienpellet wurde zunächst in 1/3 V (17 ml) CCMB80-Puffer resuspendiert und danach für weitere 10 Minuten auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterienzellen erneut durch eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 4000 rpm und 4°C pelletiert. Das Röhrchen wurde auf Eis gestellt und der Überstand wurde mit der Pipette abgesaugt. Im letzten Schritt wurde das Bakterienpellet in 1/12 V (4,2 ml) CCMB80-Puffer resuspendiert und als 200 µl Aliquot in Kryoröhrchen überführt. Die Bakterienzellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur deren

Verwendung bei -80°C gelagert. Der CCMB80-Puffer wurde vor dessen Verwendung in den Kühlschrank gestellt.

2.16.3.3. Herstellung von elektro-kompetenten *L. monocytogenes*-Zellen

Eine *L. monocytogenes*-Übernachtskultur wurde zunächst 1:100 in 200 ml $1\times$ BHI-Medium + 0,5 M Saccharose in einem 1 L Erlenmeyer-Kolben eingimpft und danach bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Nach Erreichen einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,2 wurden 200 μg Penicillin hinzugefügt. Danach wurde die Bakterienkultur für weitere 2 Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Bakterienkultur in $4\times$ 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und für 10 Minuten bei 5000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Röhrchen wurden auf Eis gestellt und der Überstand wurde mit der Pipette abgesaugt. Die Bakterienpellets wurden in jeweils 10 ml kaltem HEPES-Saccharose-Puffer resuspendiert und in ein 50 ml Greiner-Röhrchen zusammengeführt. Danach wurden die Bakterienzellen erneut für 10 Minuten bei 5000 rpm und 4°C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde insgesamt 3mal mit jeweils 10 ml kaltem HEPES-Saccharose-Puffer gewaschen. Dabei wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugationen von jeweils 15 Minuten bei 6000 rpm und 4°C pelletiert. Nach jeder Zentrifugation wurde das Röhrchen auf Eis gestellt und der Überstand wurde mit der Pipette abgesaugt. Im letzten Schritt wurde das Bakterienpellet in 500 μl kaltem HEPES-Saccharose-Glycerin-Puffer resuspendiert und als 50 μl Aliquot in Kryoröhrchen überführt. Die Bakterienzellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.16.3.4. Transformation von elektro-kompetenten *E. coli*-Zellen

Die bei -80°C gelagerten elektro-kompetenten *E. coli*-Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Danach wurden 2 μl aus den Klonierungsansätzen (TA-Cloning bzw. Ligation) hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen in dafür vorgesehenen Küvetten überführt und auf Eis gestellt. Es folgte die Elektroporation durch einen kurzen Stromstoß (200 Ω , 1,8 V und 125 μF) mittels Elektroporationsgerät. Nach der Elektroporation wurden die Zellen in 500 μl SOC-Medium aufgenommen und für 1 Stunde (pCR2.1-TOPO-Vektor) bzw. für 3 Stunden (pERL3-Vektor) bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten

mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.16.3.5. Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen

Die bei -80°C gelagerten chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen wurden zunächst auf Eis aufgetaut und danach mit 5 µl aus den Klonierungsansätzen (TA-Cloning bzw. Ligation) versetzt. Die Zellen wurden für weitere 10 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen einem kurzen Hitzeschock von 90 Sekunden bei 42°C im Wasserbad ausgesetzt. Es folgte eine erneute Inkubation von 10 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl SOC-Medium überführt und für 1 Stunde (pCR2.1-TOPO-Vektor) bzw. für 3 Stunden (pERL3-Vektor) bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.16.3.6. Transformation von elektro-kompetenten *L. monocytogenes*-Zellen

Für die Herstellung von *Lm*-pERL3-rli32 und *Lm*-pERL3-ssrS wurden elektro-kompetente *Lm*-Zellen mit den entsprechenden pERL3-Vektoren transformiert. Hierfür wurden die bei -80°C gelagerten Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Danach wurden 50-100 ng entsprechender pERL3-Vektor hinzugefügt. Für die anschließende Elektroporation wurden die Zellen in dafür vorgesehenen Küvetten überführt und auf Eis gestellt. Die Zellen wurden zunächst einem kurzen Stromstoß (400 Ω, 1 V und 125 µF) mittels Elektroporationsgerät ausgesetzt. Danach wurden die Zellen in 500 µl 1× BHI-Medium + 0,5 M Saccharose aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 3 Stunden bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden auf BHI-Platten mit 5 µg/ml Erythromycin ausplattiert und für 2 Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

2.17. Arbeiten mit RNA

2.17.1. Transfektion von RNA in eukaryotischen Zellen

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen von Nukleinsäuren (DNA bzw. RNA) in eukaryotische Zellen. Für die Transfektion von RNA in HEK293-Zellen und BMDMs wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers

verwendet. Lipofectamine 2000 besteht aus kationischen Lipide, die an das negativ geladene Zucker-Phosphat-Rückgrat von Nukleinsäuren binden und diese in Liposomen einschließen. Die positive Ladung der Liposomen vermittelt die Wechselwirkung mit der negativ geladenen Zellmembran. Über Endocytose gelangt die Nukleinsäure in die Zellen.

HEK293-Zellen wurden am Vortag in DMEM + 10% FKS in 12er-Well Platten ausgesät. Zum Zeitpunkt der Transfektion lag die Konfluenz der Zellen bei 60-70%, deren Zahl betrug ca. 7×10^5 Zellen/Well.

BMDMs wurden aus flüssigem Stickstoff aufgetaut, in BMDM-Medium + 30% M-CSF aufgenommen, gezählt und in 12er-Well Platten ausgesät. Am nächsten Tag (24 Stunden später) wurde das Medium der Zellen gewechselt. Zum Zeitpunkt der Transfektion (48 Stunden später) lag die Konfluenz der Zellen bei 80-90%, deren Zahl betrug ca. 1×10^6 Zellen/Well. Das BMDM-Medium setzte sich wie folgt zusammen: RPMI-Medium + 10% FKS + 50 μ M β -Mercaptoethanol.

Vor der Transfektion der RNA in die Zellen wurden die RNA-Lipofectamine 2000-Komplexe hergestellt. Hierfür wurden 50 bzw. 100 ng RNA in jeweils 50 μ l Opti-MEM Reduced Serum Medium pipettiert. In einem parallelen Ansatz wurden 0,25 μ g Transfektionsreagenz ebenfalls in jeweils 50 μ l Opti-MEM Reduced Serum Medium pipettiert. Anschließend wurde die RNA zu dem Transfektionsreagenz pipettiert, mit der Pipette vorsichtig vermischt und für 20 Minuten bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde das Medium der Zellen gewechselt. Zuvor wurden 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin zu dem Medium hinzugefügt. Im letzten Schritt wurden die RNA-Lipofectamine 2000-Komplexe ins Medium zu den Zellen pipettiert. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dabei wurden die HEK293-Zellen für 24 Stunden inkubiert. Die BMDMs wurden für 6 Stunden inkubiert. In beiden Fällen folgte die Untersuchung der Typ-I-IFN Antwort über RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und RT-PCR.

2.17.2. *In vivo* Transfektion von RNA

Die von rli32 und ssrS ausgelöste Typ-I-IFN Antwort *in vivo* wurde in Milz und Leber der Maus untersucht. Als Transfektionsreagenz wurde *in vivo*-jetPEI (Polyplus transfection) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dieses Reagenz enthält eine von dem kationischen Polymer Polyethylenimin (PEI) abgeleitete Substanz als Transport-

molekül für Nukleinsäuren. Nach einer intravenösen Injektion wird die Nukleinsäure von *in vivo*-jetPEI u.a. in Leber und Milz der Maus geliefert.

Für diesen Versuch wurden insgesamt 20 Mäuse, die in 4 Gruppen eingeteilt wurden, verwendet. Eine Gruppe aus 5 Mäusen diente als Kontrolle. Diese Tiere wurden nur mit dem Transfektionsreagenz intravenös injiziert. Die Tiere in den restlichen 3 Gruppen (5 Tiere/Gruppe) wurden mit jeweils 40 µg RNA (rli32, ssrS bzw. eukaryotische RNA) intravenös injiziert. Vor der *in vivo* Transfektion der RNA wurden die RNA-*in vivo*-jetPEI-Komplexe hergestellt. Hierfür wurde die RNA (jeweils 40 µg) in jeweils 50 µl einer 10%igen Glukose-Lösung aufgenommen und auf 100 µl mit H₂O aufgefüllt. In einem parallelen Ansatz wurde das Transfektionsreagenz (jeweils 6,4 µl) ebenfalls in jeweils 50 µl einer 10%igen Glukose-Lösung aufgenommen und auf 100 µl mit H₂O aufgefüllt. Anschließend wurden die Ansätze miteinander vermischt, gevortext und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Es folgte die intravenöse Injektion der Mäuse mit den RNA-*in vivo*-jetPEI-Komplexen.

2.17.3. Isolierung der zellulären RNA aus eukaryotischen Zellen

Die Isolierung der zellulären RNA aus eukaryotischen Zellen wurde mit dem miRNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurde das Medium der Zellen in den 12er-Well Platten abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 700 µl QIAzol/Well lysiert. Das Zelllysate wurde in Eppis überführt. Nach Zugabe von 0,2 V (140 µl) Chloroform wurden die Eppis kräftig geschüttelt und für 3 Minuten bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Eppis für 15 Minuten bei 13200 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in neue Eppis überführt und mit 1,5 V 100% EtOH versetzt. Nach kräftigem Mischen mit der Pipette wurden die Proben auf miRNeasy Mini Säulen gegeben. Danach wurden die Säulen für 30 Sekunden bei 10000 rpm und RT zentrifugiert. An die Säulen gebundene RNA wurde mit 350 µl RWT-Puffer gewaschen, wobei die Säulen erneut für 30 Sekunden bei 10000 rpm und RT zentrifugiert wurden.

Es folgte ein DNase-Verdau mit dem RNase-free DNase-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Hierfür wurden 80 µl (10 µl DNase I + 70 µl RDD-Puffer)/Säule eingesetzt. Der DNase-Verdau wurde für 30 Minuten bei 30°C auf dem Thermomixer durchgeführt. An die Säulen gebundene RNA wurde anschließend erneut mit 350 µl RWT-Puffer gewaschen. Hierfür wurden die Säulen für 30 Sekunden bei 10000 rpm

und RT zentrifugiert. Es folgten 2 weitere Waschschr tte mit jeweils 500 µl RPE-Puffer, wobei im letzten Waschschr tt die Säulen für 2 Minuten bei 10000 rpm und RT zentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Säulen für 1 Minute bei 13200 rpm und RT zentrifugiert. Nach dem die Säulen auf neue Eppis draufgesetzt wurden, wurde die RNA mit 40 µl H₂O von den Säulen eluiert. Dabei wurden die Säulen für 1 Minute bei 13200 rpm und RT zentrifugiert.

Die RNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop gemessen. Die Qualität der isolierten RNA wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer untersucht.

2.17.4. Isolierung der zellulären RNA aus Bakterien

Für die Isolierung der zellulären RNA wurden *Lm-*, *Lm-pERL3-rli32-* und *Lm-pERL3-ssrS-*  bernachtulturen zunächst 1:50 in 10 ml Minimalmedium eingimpft und danach bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Zuvor wurden 5 µg/ml Erythromycin ins Medium der beiden überexprimierenden Stämme gegeben. Nach Erreichen einer OD_{600nm} von 1 wurden 0,5 ml aus den Bakterienkulturen entnommen, mit 1 ml RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen) versetzt, gevortext und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Bakterienzellen für 5 Minuten bei 13200 rpm und RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Bakterienpellets wurden bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert.

Für die Isolierung der zellulären RNA wurden die Bakterienzellen zunächst lysiert. Hierfür wurde das Bakterienpellet in 200 µl SET-Puffer [50 mM NaCl, 5 mM EDTA und 30 mM Tris-HCl (pH = 7,0)] + 10% SDS (v/v) resuspendiert. Danach wurden die Bakterienzellen durch eine Zentrifugation von 3 Minuten bei 13200 rpm und RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit der Pipette abgezogen. Anschließend wurde das Bakterienpellet in 83 µl 50 mM Tris-HCl (pH = 6,5) + 50 mg/ml Lysozym resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 2 µl SUPERase In, RNase Inhibitor (20 U/µl), 5 µl Mutanolysin (5 U/µl) und 10 µl Proteinase K (20 mg/ml). Die Proben wurden gevortext und für 45 Minuten bei 37°C und 350 rpm auf dem Thermomixer inkubiert.

Nach Lyse der Bakterienzellen wurden zunächst 600 µl QIAzol dazugegeben. Danach wurden die Eppis gevortext und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 V (140 µl) Chloroform wurden die Eppis kräftig geschüttelt und für weitere 3 Minuten bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Eppis für 15 Minuten bei 13200 rpm

und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in Eppis überführt und mit 1,5 V 100% EtOH versetzt. Nach kräftigem Mischen mit der Pipette wurden die Proben auf miRNeasy Mini Säulen (Qiagen) gegeben. Die weiteren Schritte wurden, wie bereits im Abschnitt 2.17.3 beschrieben, durchgeführt.

Im letzten Schritt wurde die RNA mit 40 µl H₂O von den Säulen eluiert, wobei die Säulen für 1 Minute bei 13200 rpm und RT zentrifugiert wurden. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem NanoDrop gemessen. Die RNA-Qualität wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer untersucht.

2.17.5. Isolierung von RNA aus Mausorganen

5 Stunden nach der intravenösen Injektion von Mäusen mit RNA wurden Milz und Leber entnommen, mit einer Präzisionswaage gewogen, in Eppis überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Für die RNA-Isolierung wurden Teile von Milz und Leber (in tiefgefrorenem Zustand) in 700 µl QIAzol in 2 ml Soft tissue homogenizing CK14-Röhrchen (Bertin Technologies) überführt und auf Eis gestellt. Die Röhrchen enthalten 1,4 mm *ceramic beads* und eignen sich für die Homogenisierung von 20-200 mg Gewebe. Die Homogenisierung der Organe wurde mit einem Precellys 24-Homogenisator durchgeführt, wobei die Proben zwischendurch auf Eis gestellt wurden. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 V (140 µl) Chloroform wurden die Proben kräftig geschüttelt und für weitere 3 Minuten bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben für 15 Minuten bei 13200 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in Eppis überführt und mit 1,5 V 100% EtOH versetzt. Nach kräftigem Mischen mit der Pipette wurden die Proben auf miRNeasy Mini Säulen (Qiagen) gegeben. Die weiteren Schritte wurden, wie bereits im Abschnitt 2.17.3 beschrieben, durchgeführt.

Im letzten Schritt wurde die RNA mit 40 µl H₂O und eine Zentrifugation von 1 Minute bei 13200 rpm und RT von den Säulen eluiert. Die Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem NanoDrop gemessen. Die Qualität der RNA wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer untersucht.

2.17.6. Qualitätskontrolle der RNA und RNA-Profilanalyse

Der Agilent 2100 Bioanalyser wird zur Qualitätsüberprüfung von isolierter RNA verwendet. Ähnlich herkömmlicher Standardverfahren zur RNA-Analyse wird die RNA in eine Gelmatrix, die als Trägermaterial dient, elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt. Dabei wird die RNA durch eingelagerten Fluoreszenzfarbstoff detektiert. Die Analyse von RNA-Proben mit dem Agilent 2100 Bioanalyser liefert sogenannte Elektropherogramme (Peaks), wobei die y-Achse die RNA-Menge in FU (*fluorescence units*) und die x-Achse die RNA-Länge in Nukleotiden angibt. Diese liefert darüber hinaus gelartige Bilder (Banden) von RNA-Proben. Diese bildlichen Darstellungen decken selbst kleine Degradierungseffekte in den Proben auf. Zusätzlich wird die RNA-Qualität als RIN-Wert (RNA-Integritätsnummer) angegeben.

Diese Technologie wurde zur Qualitätsüberprüfung von RNA, die aus eukaryotischen Zellen, Bakterienzellen und Organe der Maus isoliert wurde, verwendet. Diese wurde des Weiteren zur Profilanalyse der von *L. monocytogenes* sekretierten RNA-Fractionen, sec-RNA und MVs-RNA, verwendet.

2.17.7. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die Untersuchung der Typ-I-IFN Antwort nach der *in vitro* und *in vivo* Transfektion von RNA erfolgte über RT-PCR. Hierfür wurde die isolierte RNA zunächst in cDNA durch Reverse Transkription mit der SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) umgeschrieben. Zum Umschreiben der RNA in cDNA wurden ein Oligo (dT) 21-Primer, der an den Poly(A)-Schwanz von mRNAs bindet, und ein Random-Primer (N9) verwendet.

Pipettierschema pro Reaktionsansatz:

Reagenz	Menge/Volumen
RNA	500 ng
Oligo (dT) 21-Primer (20 µM)	1 µl
N9 (100 µM)	2 µl
H ₂ O	x µl
Gesamtvolumen	11 µl

Die Proben wurden zunächst für 5 Minuten bei 70°C auf dem Thermomixer inkubiert und danach auf Eis gestellt. Es folgte die Zugabe von Reverse Transkriptase, Reverse Transkriptase-Puffer, DTT, RNaseOut und dNTP-Mix, wodurch ein Gesamtvolumen von 20 µl/Probe erreicht wurde.

Pipettierschema pro Reaktionsansatz:

Reagenz	Volumen
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
5× Reverse Transkriptase-Puffer	4 µl
DTT (100 mM)	2 µl
RNaseOut (40 U/µl)	1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl

Anschließend wurden die Proben für 1 Stunde bei 42°C und 300 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. Zur Deaktivierung der Reversen Transkriptase wurden die Proben für 15 Minuten bei 70°C auf dem Thermomixer inkubiert.

2.17.8. Real-Time PCR (RT-PCR)

Nach Umschreiben der RNA in cDNA wurde eine RT-PCR angesetzt. Diese beruht auf dem im Abschnitt 2.15.1 beschriebenen Prinzip. Allerdings lässt sich durch die Anwesenheit des Farbstoffes SYBR Green die Amplifizierung der DNA-Fragmente unter Echtzeitbedingungen messen. Der Farbstoff lagert sich während der DNA-Synthese unspezifisch in die neu synthetisierten DNA-Doppelstränge ein und wird durch Fluoreszenzmessung detektiert. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional mit der DNA-Menge zu, wodurch eine Quantifizierung der untersuchten cDNA und damit der ursprünglich vorhandenen RNA in einer Probe möglich ist.

Zur Auswertung wurde der Ct-Wert (*Cycle threshold*) verwendet. Dieser beschreibt den PCR-Zyklus an dem die Amplifikation der DNA exponentiell ansteigt. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte über das effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell (Pfaffl, 2001). Zur Normalisierung der Expressionsergebnisse wurde sowohl die Expression des Zielgens (IFN-β/IFN-α4) als auch die Expression eines nicht regulierten Haushaltgens in der gleichen Probe untersucht. Für die Untersuchung der

Typ-I-IFN Antwort in HEK293-Zellen wurde das Haushaltsgen PPIA (*peptidylprolyl isomerase A*) verwendet. In BMDMs und in den Mausorganen wurde Rplp (*ribosomal protein, large, P0*) verwendet.

Die RT-PCR wurde mit dem QuantiTect Primer Assay (Qiagen) und dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) durchgeführt.

Pipettierschema pro Reaktionsansatz:

Reagenz	Menge/Volumen
cDNA	100 ng
QuantiTect Primer Assay	7,5 µl
H ₂ O	x µl
Gesamtvolumen	12,5 µl

Anschließend wurden 12,5 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix dazugegeben. Die Proben wurden in 96er-Well Platten pipettiert. Für jede Probe wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die RT-PCR wurde mit dem StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt.

PCR-Programm:

Schritte	Temperatur [°C]	Zeit
1	95	15 Minuten
2	95	20 Sekunden
3	55	30 Sekunden
4	72	30 Sekunden
5	4	∞

Die Schritte 2 bis 4 wurden 40mal wiederholt.

2.17.9. Isolierung von MVs-RNA

Vor der Isolierung von MVs-RNA wurde ein RNase-Verdau durchgeführt, um die an der äußeren Oberfläche von MVs assoziierte RNA zu verdauen. Zu 50 µg MVs-Probe wurden 2,5 µg RNase, DNase-free (Roche) pipettiert. Die Proben wurden für 30

Minuten bei 37°C auf dem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden die MVs-Proben auf 500 µl mit PBS aufgefüllt. Nach Zugabe von 1,5 V (750 µl) Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, pH = 4,5-5,0) wurden die Proben gevortext und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurden die Proben für 15 Minuten bei 13200 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde die obere wässrige Phase in Eppis überführt und mit 0,1 V 3 M NaOAc (pH = 4,8-5,2) und 2 V 100% EtOH versetzt. Die Proben wurden zunächst für mindestens 1 Stunde bei -80°C inkubiert. Danach wurden die Proben für 15 Minuten bei 13200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde über Nacht getrocknet.

Im letzten Schritt wurde das RNA-Pellet in 50 µl H₂O resuspendiert. Die Konzentration der isolierten MVs-RNA wurde mit dem Qubit gemessen. Die RNA-Profilanalyse wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyser durchgeführt.

2.17.10. Isolierung von sec-RNA

Nach dem die MVs in dem eingeeengten Überstand (ca. 30 ml) von *L. monocytogenes*-Kulturen durch Ultrazentrifugation pelletiert worden sind, wurde der MVs-freie Überstand für die Isolierung von sec-RNA verwendet. Dieser wurde in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt, in einem Verhältnis von 1:1 mit 100% EtOH versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Röhrchen für 30 Minuten bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet über Nacht getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 3 ml H₂O resuspendiert und in Eppis (500 µl/Eppi) überführt. Nach Zugabe von 1,5 V (750 µl) QIAzol wurden die Proben gevortext und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 0,2 V (250 µl) Chloroform dazugegeben und die Proben kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubation von 3 Minuten bei RT wurden die Proben zur Phasentrennung für 15 Minuten bei 13200 rpm und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in Eppis überführt und mit 1,5 V 100% EtOH versetzt. Nach kräftigem Mischen mit der Pipette wurden die Proben auf miRNeasy Mini Säulen (Qiagen) gegeben. Die weiteren Schritte wurden, wie bereits im Abschnitt 2.17.3 beschrieben, durchgeführt.

Im letzten Schritt wurde die RNA mit 50 µl H₂O von den Säulen eluiert. Dabei wurden die Säulen für 1 Minute bei 13200 rpm und RT zentrifugiert. Die Konzentration der

isolierten sec-RNA wurde mit dem Qubit gemessen. Die RNA-Profilanalyse wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer durchgeführt.

2.17.11. Sequenzierung

Zunächst wurde die RNA mit einer RNA 5'-Polyphosphatase (Epicenter) behandelt. Anschließend wurden Oligonukleotid-Adapter an den 5`- und 3`- Enden der RNA ligiert. Die *first-strand* cDNA-Synthese wurde mit der M-MLV Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific) durchgeführt, wobei der 3`-Adapter als Primer diente. Die resultierende cDNA wurde mit einer *high fidelity* DNA-Polymerase (ThermoFisher Scientific) über PCR amplifiziert. Anschließend wurde die cDNA mit dem Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter Genomics) aufgereinigt. Die Menge und Größenverteilung der cDNA wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer analysiert. Anschließend wurden die cDNA *libraries* verdünnt und mit dem MiSeq Next Generation Sequencer mittels MiSeq Reagent Kit V2 (Illumina) sequenziert und analysiert. Die Adapter-Sequenzen wurden mittels Sequence Quality Trimming mit cutadapt 1 entfernt (Martin, 2011). Die *reads* wurden gegen das Referenzgenom von *L. monocytogenes* mittels CLC Genomics Workbench (Qiagen) gemappt (Glaser et al, 2001).

2.17.12. Herstellung von RNA durch *in vitro* Transkription (IVT)

Die 25 ausgesuchten RNA-Kandidaten, die in den sekretierten RNA-Fractionen von *L. monocytogenes* identifiziert worden sind, wurden enzymatisch durch *in vitro* Transkription mittels T7-RNA-Polymerase (NEB) hergestellt. Zunächst wurde das DNA-*template* durch PCR hergestellt. Dabei enthielt der Vorwärtsprimer am 5`-Ende die Sequenz des Promotors der T7-RNA-Polymerase (5`-taatacgaactcactatagg-3`). Anschließend wurden die PCR-Produkte in 1%ige und 2%ige Agarosegele aufgetrennt, visualisiert und fotografiert. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurde die DNA-Konzentration mit dem NanoDrop gemessen. Es folgte die *in vitro* Transkription der DNA in RNA.

Pipettierschema pro Reaktionsansatz:

Reagenz	Menge/Volumen
DNA	1 µg
T7-RNA-Polymerase (50 U/µl)	2 µl
10× T7-RNA-Polymerase-Puffer	5 µl
DTT (100 mM)	5 µl
rNTP-Mix (25 mM)	4 µl
RNaseOut (40 U/µl)	2 µl
H ₂ O	x µl
Gesamtvolumen	50 µl

Anschließend wurden die Proben für 3 Stunden bei 37°C auf dem Thermomixer inkubiert.

2.17.13. Verdau des DNA-templates

Nach der *in vitro* Transkription wurde das DNA-*template* in den Proben durch DNase-Verdau mit der DNase I, RNase-free (ThermoFisher Scientific) entfernt. Hierfür wurden 5 µl DNase I (2 U/µl) und 5 µl 10× DNase I-Puffer zu den Proben hinzugefügt. Das Gesamtvolumen der Proben betrug 50 µl. Danach wurden die Proben für 1 Stunde bei 37°C auf dem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde die DNase I durch Zugabe von 5 µl EDTA (50 mM) und eine Inkubation von 10 Minuten bei 75°C auf dem Thermomixer deaktiviert.

2.17.14. Dephosphorylierung von RNA

Um die 5`-Triphosphat-Gruppe der RNAs, die durch *in vitro* Transkription hergestellt worden sind, sowie der RNAs in sec-RNA und MVs-RNA zu entfernen, wurde eine Dephosphorylierung mit der Alkaline Phosphatase, Calf intestinal (NEB) durchgeführt. Hierfür wurden 1 µl Alkalische Phosphatase (10 U/µl) und 5 µl 10× Alkalische Phosphatase-Puffer zu 1 µg RNA hinzugefügt. Das Gesamtvolumen der Proben betrug 50 µl. Die Proben wurden für 1 Stunde bei 37°C auf dem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch Phenol/Chloroform-Fällung aufgereinigt.

2.17.15. Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Nach Herstellung der 25 ausgesuchten RNA-Kandidaten durch *in vitro* Transkription wurden diese unter denaturierenden Bedingungen (7 M Harnstoff) in 10%ige und 12%ige Polyacrylamidgele elektrophoretisch aufgetrennt. Die Zugabe von Harnstoff verhindert die Bildung von Sekundärstrukturen, wodurch eine Auftrennung der RNA nach Länge erfolgt. Hierfür wurden jeweils 10 µl aus den *in vitro* Transkriptionsansätzen auf das Gel aufgetragen. Vor dem Auftragen wurden die RNA-Proben mit Ladepuffer in einem Verhältnis von 1:1 vermischt und für 10 Minuten bei 65°C auf dem Thermomixer inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt.

Die Auftrennung der RNA erfolgte in 20 cm × 20 cm große Glasplatten, die in vertikale Kammern reingelegt wurden. Die Kammern wurden zuvor mit 1× TBE-Puffer befüllt. Die Elektrophorese wurde für 2 Stunden bei 400 V, 150 mA und 150 W durchgeführt. Zur Färbung der RNA wurden die Gele in ethidiumbromidhaltiges 1× TBE-Puffer für 10 Minuten reingelegt. Anschließend wurde die RNA auf einem UV-Tisch (365 nm) visualisiert und fotografiert. Um die Größe der RNA bestimmen zu können, wurde ein RNA-Größenstandard verwendet (Abb. 2.1). Die entsprechenden RNA-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten, in Eppis überführt und bei -80°C gelagert.

2.17.16. Extraktion von RNA aus dem Polyacrylamidgel

Um die RNA aus dem Polyacrylamidgel zu extrahieren, wurden die Gelstücke zunächst mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und danach mit 500 µl Elutionspuffer [0,5 M NaOAc (pH = 5,0), 1 mM EDTA (pH = 8,0) und 2,5% Phenol (v/v)] versetzt. Anschließend wurde die RNA durch wiederholtes Einfrieren in flüssigem Stickstoff, Auftauen und Vortexen sowie einer Inkubation über Nacht bei 1500 rpm auf dem Thermomixer aus dem Gel extrahiert. Es folgte die Aufreinigung der RNA durch Phenol/Chloroform-Fällung.

2.17.17. Phenol/Chloroform-Fällung von RNA

Nach Dephosphorylierung der RNA und Extraktion der RNA aus dem Polyacrylamidgel wurde die RNA durch Phenol/Chloroform-Fällung aufgereinigt. Hierfür wurden die RNA-Proben mit 1,5 V (750 µl) Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, pH = 4,5-5,0) versetzt und gevortext. Das Gesamtvolumen der Proben betrug 500 µl. Nach einer

Inkubation von 5 Minuten bei RT folgte die Phasentrennung durch eine Zentrifugation von 15 Minuten bei 13200 rpm und 4°C. Die obere wässrige Phase wurde in Eppis überführt und mit 0,1 V 3 M NaOAc (pH = 4,8-5,2) und 2 V 100% EtOH versetzt. Anschließend wurden die Proben für mindestens 1 Stunde bei -80°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Proben für 15 Minuten bei 13200 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet wurde über Nacht getrocknet. Im letzten Schritt wurde das RNA-Pellet in 50 µl H₂O resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde mit dem Qubit gemessen.

2.18. Proteinanalytische Methoden

2.18.1. Isolierung von *Membrane Vesicles* (MVs), die von *L. monocytogenes* produziert werden

Für die Isolierung von MVs, die von *Lm*, *Lm-pERL3-rli32* und *Lm-pERL3-ssrS* produziert werden, wurden Übernachtskulturen in BHI-Medium angezogen. Das Minimalmedium (2 L) wurde nach Fertigstellung auf 6× 1 L Erlenmeyer-Kolben aufgeteilt (ca. 300 ml Medium/Kolben). Anschließend wurden die Übernachtskulturen 1:50 in Minimalmedium eingimpft und die Kolben bei 37°C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Zuvor wurden 5 µg/ml Erythromycin ins Medium der beiden überexprimierenden Stämme pipettiert. Nach Erreichen einer OD_{600nm} von 1 wurden die Bakterienkulturen in 6× 500 ml Zentrifugenbecher überführt und für 15 Minuten bei 9000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Express PLUS 0,22 µm Filtereinheit steril filtriert. Anschließend wurde der Überstand durch Ultrafiltration mit einer Membran mit einem *Cut Off* von 30 kDa auf ca. 30 ml eingengt. Der eingengte Überstand (das Ultrafiltrat) wurde zunächst mit einer Millex-GV 0,22 µm Filtereinheit steril filtriert. Danach wurde das Ultrafiltrat in 3 Röhrchen für den SW41 Ti-Rotor der Ultrazentrifuge überführt und für 3 Stunden bei 30000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Hierdurch wurden die während des Wachstums produzierten und ins Medium abgegebenen MVs pelletiert. Das MVs-Pellet wurde zunächst getrocknet, danach in 300 µl PBS resuspendiert und bei -80°C gelagert.

2.18.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode

Die Messung der Proteinkonzentration von isolierten MVs wurde mit der Bradford-Methode durchgeführt. Diese Methode beruht auf der Anlagerung des Farbstoffs

Coomassie an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten von Proteinen. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 450 zu 595 nm. Da die Zunahme der Absorption bei 595 nm direkt proportional zur Proteinkonzentration in der Lösung ist, lässt sich unter Verwendung einer Eichkurve die Proteinkonzentration bestimmen.

Für die Messung wurden jeweils 10 µl MVs-Probe (1:3 in PBS verdünnt) zu 200 µl Bradford-Reagenz (1:5 in H₂O verdünnt) in einer 96er-Well Platte pipettiert und vermischt. In einem parallelen Ansatz wurde zur Herstellung einer Eichkurve eine BSA-Verdünnungsreihe in PBS angesetzt. Anschließend wurden jeweils 10 µl aus der BSA-Verdünnungsreihe zu 200 µl Bradford-Reagenz pipettiert und vermischt. Sowohl für die MVs-Proben als auch für die Eichkurve wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Platte wurde für 5 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der Proben bei 595 nm mit einem Photometer gemessen. Zur Auswertung wurde eine Eichkurve hergestellt, wobei die Absorption (x-Achse) gegen die Proteinkonzentration (y-Achse) des BSA-Standards aufgetragen wurde. Für die Berechnung der Proteinkonzentration wurde die Gleichung verwendet, die man nach dem Erstellen der Regressionsgerade erhält.

2.18.3. Bestimmung der Proteinkonzentration mit der BCA-Methode

Die Fähigkeit von MVs in PtK-Zellen zu internalisieren, wurde durch Detektion des Autolysins P60 im Zelllysats über Western blot untersucht. Hierfür wurde zunächst die Proteinkonzentration des Zelllysats der PtK-Zellen mit der BCA-Methode bestimmt.

Grundlage für die BCA-Methode ist die Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ durch Peptidbindungen unter alkalischen Bedingungen. Das entstandene Cu⁺ bildet mit Bicinchoninsäure (BCA) einen Farbkomplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm.

Für die Messung der Proteinkonzentration des Zelllysats wurden jeweils 6,25 µl Probe (1:5 in RIPA-Puffer verdünnt) zu 50 µl BCA-Reagenz in einer 96er-Well Platte pipettiert und vermischt. In einem parallelen Ansatz wurde zur Herstellung einer Eichkurve eine BSA-Verdünnungsreihe in RIPA-Puffer angesetzt. Anschließend wurden jeweils 6,25 µl aus der BSA-Verdünnungsreihe zu 50 µl BCA-Reagenz pipettiert und vermischt. Sowohl für die Proben als auch für die Eichkurve wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Platte wurde für 30 Minuten bei 37°C

inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der Proben bei 562 nm mit einem Photometer gemessen. Die Auswertung erfolgte ähnlich wie bei der Bradford-Methode.

2.18.4. Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie (EM)

Für die Transmissionselektronenmikroskopie wurde zunächst ein Tropfen aus den MVs-Proben auf ein Trägermaterial (Grid) pipettiert. Anschließend wurde zur Kontrastierung ein Tropfen aus einer 3%igen Uranylacetat-Lösung auf die Proben pipettiert und vermischt. Nach einer Inkubation von wenigen Minuten bei RT wurde die Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgezogen. Anschließend wurden die Proben analysiert.

Für die Rasterelektronenmikroskopie wurden die *Lm*-Proben zunächst mit 5% Formaldehyd und 1% Glutaraldehyd chemisch fixiert. Anschließend wurden die Proben durch eine aufsteigende Aceton-Reihe (10-100%) dehydriert und durch Kritische-Punkt-Trocknung (KPT) mit CO₂ in der KPT-Anlage getrocknet. Um eine Aufladung der Proben zu vermeiden, wurden elektrisch leitende Schichten aus Gold-Palladium auf die Oberfläche der Proben durch Sputtern aufgebracht. Anschließend wurden die Proben analysiert.

2.18.5. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese werden Proteine in einem Netzwerk aus Acrylamid/Bisacrylamid elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt. Durch Zugabe des Detergenz SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) werden nicht-kovalente Bindungen in den Proteinen gelöst. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wird β -Mercaptoethanol im Ladepuffer hinzugefügt. Darüber hinaus wurden die Proben vor dem Auftragen auf das Gel für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht. Zuvor wurden die Proben mit 2× Ladepuffer vermischt. Durch die Einwirkung von SDS, Reduktionsmittel und Hitze werden die Proteine vollständig denaturiert. Durch die Bindung von SDS-Anionen an die Hauptkette erhalten die Proteine eine konstant negative Ladungsverteilung. Daraufhin wandern die Proteine in einem elektrischen Feld zum positiven Pol.

Die in dieser Arbeit verwendeten Gele bestanden aus einem Sammelgel (4%) und einem Trenngel (12%). Das Sammelgel dient zum Bündeln der aufgetragenen Proben und ermöglicht für alle Proteine den gleichen Startpunkt für die Trennung im Trenngel.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 10 cm × 10 cm große Glasplatten, die in vertikale Kammern reingelegt wurden. Die Kammern wurden zuvor mit 1×

Elektrophorese-Puffer befüllt. Die Elektrophorese wurde für 90 Minuten bei 125 V und 25 mA/Gel durchgeführt. Die Gele wurden über Nacht in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend mittels Bitzentfärber teilentfärbt.

2.18.6. Western blot-Analyse von MVs

Die Anwesenheit des Autolysins P60 und der beiden Virulenzfaktoren, InlB und LLO, in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs wurde über Western blot untersucht. Dies ist ein Verfahren zur Detektion von bestimmten Proteinen in einem Proteingemisch über spezifische Antikörperbindung.

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine in den MVs-Proben wurden zunächst elektrophoretisch aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Diese wurde zuvor für 1 Minute in 100% Methanol inkubiert, anschließend in H₂O geschwenkt und für eine weitere Minute in 1× Blot-Puffer inkubiert. Anschließend wurde das Gel in einem Stapel aus Whatman-Filterpapieren, die zuvor für 1 Minute in 1× Blot-Puffer inkubiert wurden, auf die PVDF-Membran in der Blotting-Apparatur gelegt. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte für 90 Minuten bei 50 V und 54 mA/Gel.

Um freie Bindungsstellen auf der PVDF-Membran zu blockieren, wurde diese für 1 Stunde bei RT in 1× TBS-Tween 20-Puffer* geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper (mouse anti-P60, mouse anti-InlB bzw. mouse anti-LLO) über Nacht bei 4°C geschwenkt. Die Antikörper wurden wie folgt in 1× TBS-Tween 20-Puffer* verdünnt: mouse anti-P60 (1:50), mouse anti-InlB (1:10) und mouse anti-LLO (1:10). Am nächsten Tag wurde die PVDF-Membran 3mal für jeweils 5 Minuten in 1× TBS-Tween 20-Puffer bei RT geschwenkt. Es folgte die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper für 1 Stunde bei RT. Hierfür wurde ein goat anti-mouse IgG-HRP, der 1:2000 in 1× TBS-Tween 20-Puffer* verdünnt wurde, verwendet. Anschließend wurde die Membran erneut 3mal für jeweils 5 Minuten in 1× TBS-Tween 20-Puffer bei RT geschwenkt. Der 1× TBS-Tween 20-Puffer* enthielt 5% Milch (w/v).

Die Detektion der Proteine erfolgte durch Chemilumineszenz mit dem ECL-System (GE Healthcare). Hierfür wurde die Membran zunächst für 1 Minute in ECL-Lösung 1 und 2 (1:1) inkubiert. Dadurch wurde die von der Meerrettich-Peroxidase (HRP) kataly-

sierte Reaktion gestartet. Durch anschließendes Auflegen eines Röntgenfilms wurden die Proteinbanden sichtbar gemacht.

2.18.7. Untersuchung der Internalisierung von MVs in PtK-Zellen

Am Vortag wurden PtK-Zellen in MEM + 10% FKS + 1% NEA in einer 24er-Well-Platte ausgesät. Vor der Zugabe von MVs wurde das Medium der Zellen gewechselt. Anschließend wurden 5 bzw. 10 µg MVs ins Medium zu den Zellen pipettiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nicht mit MVs inkubiert wurden. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden 3mal mit jeweils 500 µl PBS/Well gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl PBS/Well abgedeckt, mit einem Zellschaber abgeschabt und in Eppis überführt. Die Zellen wurden für 5 Minuten bei 13200 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden mit 10 µl RIPA-Puffer + Protease-Inhibitoren lysiert. Hierfür wurden die Proben für 30 Minuten bei 4°C und 300 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 13200 rpm und 4°C wurde der Überstand (das Zelllysate) in Eppis überführt.

Zunächst wurde die Proteinkonzentration des Zelllysates mit der BCA-Methode bestimmt. Danach wurden die Proteine im Zelllysate durch SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt, wobei 15 µg Protein/Ansatz aufgetragen wurden. Anschließend wurden die Proteine durch Western blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Es folgte die Detektion des Autolysins P60 im Zelllysate über spezifische Antikörperbindung. Hierfür wurden mouse anti-P60 (1:50) und goat anti-mouse IgG-HRP (1:2000) verwendet. Beide Antikörper wurden in 1× TBS-Tween 20-Puffer* verdünnt. Um sicherzustellen, dass von jedem Ansatz die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde, wurde das Haushaltsgen β-Aktin als Ladekontrolle verwendet. Für die Detektion von β-Aktin wurden rabbit anti-β-Aktin (1:2000 in 1× TBS-Tween 20-Puffer** verdünnt) und goat anti-rabbit IgG-HRP (1:2000 in 1× TBS-Tween 20-Puffer* verdünnt) verwendet. Der 1× TBS-Tween 20-Puffer* enthielt 5% Milch (w/v). Der 1× TBS-Tween 20-Puffer** enthielt 5% BSA (w/v).

2.18.8. Hämolyse-Assay

Die hämolytische Aktivität von MVs wurde anhand der Lyse von Schafserythrozyten untersucht. Zunächst wurde das Schafsblut in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und solange mit PBS gewaschen bis der Überstand klar war. Hierfür wurde das Röhrchen

mehrmals invertiert und für 5 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde eine 1%ige Erythrozyten-Lösung mit Hämolyse-Puffer hergestellt. Für die Herstellung des Hämolyse Puffers wurden 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und 150 mM NaCl abgewogen und in H_2O gelöst. Nach dem der pH-Wert auf 6,6 eingestellt wurde, wurden 0,1% BSA (w/v) und 5 mM DTT hinzugefügt.

In einer 96er-Well Platte wurden zunächst 50 μl /Well Hämolyse-Puffer vorgelegt. Anschließend wurden 10 μg MVs in einem Volumen von 50 μl im ersten Well pipettiert, vermischt und in das nächste Well der Reihe überführt. Hierdurch wurde die MVs-Probe 1:2 verdünnt. Diese Verdünnungsreihe wurde mit allen nachfolgenden Wells der Reihe durchgeführt. Aus dem letzten Well der Reihe wurden 50 μl verworfen. In der 2ten Reihe wurde eine weitere Verdünnungsreihe mit PBS, das als Negativkontrolle diente, angesetzt. In einem weiteren Well wurden 50 μl H_2O zu den 50 μl Hämolyse-Puffer pipettiert. Der durch H_2O erzielte hämolytische Effekt entspricht der maximalen Hämolyse (100%-Wert). Nach der Zugabe von 50 μl 1%ige Erythrozyten-Lösung/Well und Mischen wurde die Platte für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte zentrifugiert und die Überstände in eine 96er-Well Platte überführt. Die optische Dichte der Überstände wurde bei 405 nm mit einem Photometer gemessen.

2.19. Zellkultur-Methoden

2.19.1. Kultivierung von Zelllinien

Die Epithelzelllinien HEK293 und MDCK-II wurden in 10 ml DMEM + 10% FKS in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Für die Epithelzelllinie PtK wurde MEM + 10% FKS + 1% NEA verwendet. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80-90% wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 1mal mit PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/Schale abgelöst. Die Zellen wurden für die weitere Kultivierung 1:3 in frischem Medium verdünnt und in Schalen überführt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Vor jedem Versuch wurde die Zahl der Epithelzellen mikroskopisch durch Auszählen der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden die Epithelzellen 1mal mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst, abzentrifugiert und in ein bestimmtes Volumen an Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl in einem 10 μl Aliquot gezählt und diese pro Milliliter berechnet.

Die BMDMs wurden 48 Stunden vor der Transfektion aus flüssigem Stickstoff aufgetaut, in BMDM-Medium + 30% M-CSF aufgenommen, gezählt und in 12er-Well

Platten ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium der Zellen gewechselt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das BMDM-Medium setzte sich wie folgt zusammen: RPMI-Medium + 10% FKS + 50 µM β-Mercaptoethanol.

2.19.2. Gewinnung von primären Knochenmark-Makrophagen aus der Maus

Die von den einzelnen sRNAs, den sekretierten RNA-Fractionen und MVs ausgelöste Typ-I-IFN Antwort wurde in Knochenmark-Makrophagen (BMDMs = *bone marrow-derived macrophages*) untersucht. Hierfür wurden BMDMs aus C57BL/6-Mäusen isoliert.

Zunächst wurden Femur (Oberschenkel-Knochen) und Tibia (Schienbein) vom Fleisch befreit und in 70% EtOH reingelegt. Anschließend wurden die Knochen in PBS reingelegt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Röhrenknochen an den Enden geöffnet und die Markhöhle mit kaltem BMDM*-Medium mit Hilfe einer Kanüle durchgespült. Die Knochenmarkzellen wurden zunächst durch ein Zellsieb passiert und danach durch eine Zentrifugation von 5 Minuten bei 1500 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in BMDM*-Medium + 30% M-CSF resuspendiert und in 10 cm unbeschichteten Petrischalen ausgesät. Die Schalen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Ausdifferenzierung der Zellen zu BMDMs erfolgte in einem Zeitraum von 6 Tagen, wobei am 4ten Tag ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Am 6ten Tag wurden die Zellen durch Kryokonservierung eingefroren. Hierfür wurde zunächst das Medium abgesaugt. Danach wurden die Zellen mit 5 ml BMDM*-Medium abgedeckt, mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation von 5 Minuten bei 1500 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in FKS + 10% DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen überführt und in einem speziellen Einfrierbehälter, der mit 2-Propanol gefüllt war, zunächst bei -80°C gelagert. Diese Vorgehensweise gewährleistet ein schrittweises Abkühlen von 1°C/Minute. Danach wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff überführt.

Das BMDM*-Medium setzte sich wie folgt zusammen: RPMI-Medium + 10% FKS + 50 µM β-Mercaptoethanol + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin.

2.19.2.1. Gewinnung von M-CSF

Der Makrophagen-Differenzierungsfaktor M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*) wird von *mouse fibroblast L929 cells* produziert. Dieser unterstützt die Reifung und das Wachstum von Makrophagen, die aus dem Knochenmark von Mäusen isoliert werden (Ladner et al, 1988).

Für die Gewinnung von L929-Zellüberstand wurden die Zellen zunächst aus flüssigem Stickstoff aufgetaut und danach bis zur Konfluenz in DMEM + 10% FKS in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen 1mal mit PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin/Schale abgelöst. Die Zellen wurden in DMEM + 5% FKS aufgenommen und auf große Zellkulturflaschen umgesetzt. Die Zellen wurden 5 bis 6 Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde der Zellüberstand in 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und für 5 Minuten bei 3000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in 50 ml Greiner-Röhrchen überführt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.19.3. Infektion von HEK293-Zellen mit A/PR/8/34 (H1N1)

24 Stunden nach der Transfektion von HEK293-Zellen mit den einzelnen sRNAs wurden die Zellen zunächst mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit A/PR/8/34 (H1N1) für 1 Stunde bei RT infiziert. Dabei wurde eine MOI von 0,1 in PBS⁺⁺/BSA/P/S eingesetzt. Nach dem das Virusinokulum abgesaugt wurde, wurden die Zellen mit DMEM/FKS/P/S + 2 µg/ml Trypsin für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.19.3.1. Virusquantifizierung durch *Focus Forming Assay* (FFA)

Der FFA verwendet zur Detektion von infektiösen Viruspartikeln die Anfärbung von virusspezifischen Antigenen mittels Antikörpern (Ma et al, 2010).

In einer 96er-Well Platte ausgesäte MDCK-II-Zellen wurden zunächst mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend mit 50 µl/Well einer 1:3 in PBS⁺⁺/BSA/P/S angesetzten Verdünnungsreihe des virushaltigen Überstandes für 1 Stunde bei RT infiziert. Nach dem das Virusinokulum abgesaugt wurde, wurden die Zellen mit Avicel-Medium (DMEM/FKS + 1,25% Avicel + 2 µg/ml Trypsin) für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Überschichtung der Zellen mit einem halbfesten Overlay-Medium verhindert die Ausbreitung von infektiösen Viruspartikeln, wodurch lokalisierte Infektionsherde entstehen. Um diese zu detektieren wurden die Zellen zunächst mit 4%

Paraformaldehyd + 1% Triton X-100 in PBS⁺⁺ für 1 Stunde bei 4°C fixiert und permeabilisiert. Danach wurden die Zellen 3mal mit PBS⁺⁺ + 0,05% Tween 20 gewaschen. Die Zellen wurden mit 50 µl/Well des primären Antikörpers (mouse anti-IAV-Nukleoprotein) für 1 Stunde bei RT inkubiert. Dieser wurde zuvor 1:100 in PBS⁺⁺ + 3% BSA verdünnt. Anschließend wurden die Zellen erneut 3mal mit PBS⁺⁺ + 0,05% Tween 20 gewaschen. Es folgte die Zugabe von 50 µl/Well des sekundären Antikörpers (goat anti-mouse IgG-HRP). Dieser wurde zuvor 1:1000 in PBS⁺⁺ + 3% BSA verdünnt. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei RT wurden die Zellen 3mal mit PBS⁺⁺ + 0,05% Tween 20 gewaschen und mit 40 µl/Well AEC staining solution inkubiert. Anschließend wurden die Platten gescannt und mit dem Photoshop software package analysiert. Das PBS⁺⁺ setzte sich wie folgt zusammen: PBS + 1 mM MgCl₂ + 0,9 mM CaCl₂. Das PBS⁺⁺ /BSA/P/S setzte sich wie folgt zusammen: PBS⁺⁺ + 0,2% BSA + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin.

2.20. Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit dem zweiseitigen ungepaarten t-Test durchgeführt. Alle Daten sind mit Mittelwert ± Standardabweichung (MW ± SA) dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1. Isolierung und Identifizierung der von *L. monocytogenes* sekretierten RNA

3.1.1. Co-Isolierung von sec-RNA und MVs-RNA

Um die von *L. monocytogenes* sekretierte RNA zu isolieren, wurde ein Protokoll entwickelt, das zunächst die Trennung beider RNA-Fractionen und anschließend die Isolierung der RNA beinhaltet (Abb. 3.1). Um eine Freisetzung von zellulärer RNA durch Lyse der Bakterienzellen zu vermeiden, wurden die sekretierten RNA-Fractionen aus dem Überstand von Bakterienkulturen isoliert, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Des Weiteren wurde ein chemisch definiertes Medium verwendet, um eine Kontamination durch RNA, die in einem komplexen Medium wie BHI-Medium vorhanden ist, auszuschließen (Premaratne et al, 1991).

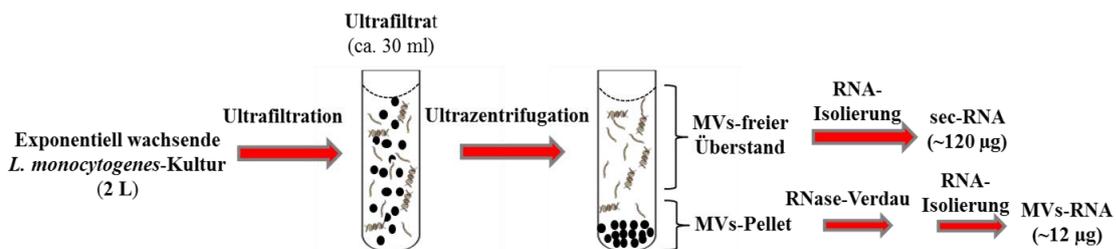


Abb. 3.1: Co-Isolierung von sec-RNA und MVs-RNA. *Lm* wurde in 2 L Minimalmedium bis OD_{600nm} von 1 kultiviert und anschließend abzentrifugiert. Der steril filtrierte Überstand wurde durch Ultrafiltration auf ca. 30 ml eingengt. Anschließend wurden die MVs durch Ultrazentrifugation pelletiert. Das MVs-Pellet diente für die Isolierung von MVs-RNA. Der MVs-freie Überstand wurde für die Isolierung von sec-RNA verwendet.

Nach Abzentrifugation der Bakterienzellen wurde der Überstand steril filtriert und durch Ultrafiltration mit einer Membran mit einem *Cut Off* von 30 kDa von 2 L auf ca. 30 ml eingengt. Dies ist ein Verfahren um bestimmte Moleküle, abhängig von der Porengröße der dabei verwendeten Membran, zu konzentrieren. Dabei wird die Flüssigkeit aus der Lösung entfernt. Durch anschließende Ultrazentrifugation wurden die MVs in dem eingengten Überstand von *L. monocytogenes*-Kulturen pelletiert. Das MVs-Pellet wurde in PBS aufgenommen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode erfolgte die Isolierung der MVs-RNA. Zuvor wurde ein RNase-Verdau durchgeführt, um die an der äußeren Oberfläche von MVs assoziierte RNA zu entfernen. Aus dem eingengten MVs-freien Überstand von *L. monocytogenes*-Kulturen wurde die sec-RNA isoliert.

Aus 2 L *L. monocytogenes*-Kulturen wurden anhand dieses Protokolls 150-200 µg MVs isoliert. Daraus wurden in einem weiteren Schritt ca. 12 µg MVs-RNA isoliert. Die Konzentration an sec-RNA, die aus 2 L *L. monocytogenes*-Kulturen isoliert wurde, beträgt ca. 120 µg.

3.1.2. Profilanalyse von sec-RNA und MVs-RNA

Nach Isolierung und Quantifizierung von sec-RNA und MVs-RNA wurde eine Profilanalyse der beiden sekretierten RNA-Fractionen mittels Agilent 2100 Bioanalyzer durchgeführt (Abb. 3.2). Diese Technologie liefert eine visuelle Darstellung der Größenverteilung von RNAs, die in einer RNA-Population vorhandenen sind. Die RNA wird, ähnlich herkömmlicher Standardverfahren zur RNA-Analyse, elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt, wobei eine Gelmatrix als Trägermaterial dient. Dabei wird auf der y-Achse die RNA-Menge in FU (*fluorescence units*) angegeben, während die x-Achse die RNA-Länge in Nukleotiden (Nt) angibt.

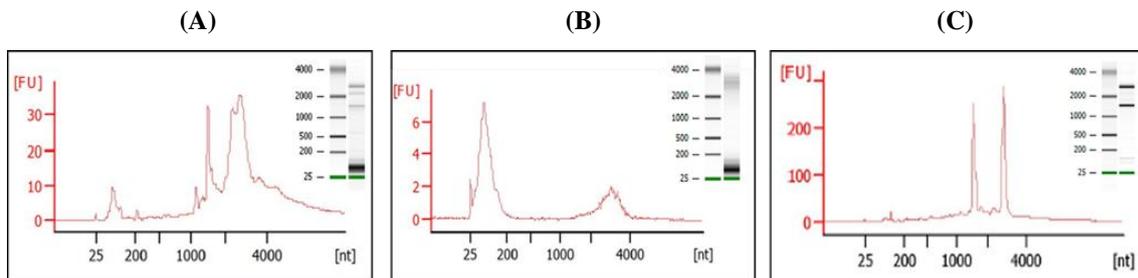


Abb. 3.2: Profilanalyse von sec-RNA, MVs-RNA und zelluläre RNA. Die Profilanalyse der 3 RNA-Fractionen von *Lm* wurde mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer durchgeführt. Hierdurch wurde die Menge (FU) und die Länge (Nt) der RNAs in den beiden sekretierten RNA-Fractionen von *Lm* erstmals visualisiert. Der Peak zwischen 25-200 Nt zeigt die Anwesenheit von kleinen nicht-kodierenden RNAs in sec-RNA (A) und MVs-RNA (B). Die beiden Peaks in der zellulären RNA zeigen die ribosomalen RNAs, 16S- und 23S-rRNA (C).

Das typische Bild einer zellulären RNA-Präparation zeigt die beiden ribosomalen RNAs, die 16S- und die 23S-rRNA (Abb. 3.2C). Die beiden sekretierten RNA-Fractionen, sec-RNA und MVs-RNA, hingegen weisen ein völlig anderes RNA-Profil auf (Abb. 3.2A und 3.2B). In beide RNA-Fractionen sind kleine nicht-kodierende RNAs mit einer Größe, die weniger als 200 Nt beträgt, zu sehen. Diese überwiegen in MVs-RNA, während in sec-RNA auch längere RNAs, darunter ribosomale RNAs, zu sehen sind.

Um eine höhere Auflösung der kleinen nicht-kodierenden RNA-Population in sec-RNA und MVs-RNA zu erreichen, wurde ein Small RNA Chip verwendet. Dadurch können RNAs mit einer Länge von 6-150 Nt analysiert werden. Die Abb. 3.3 zeigt die Größenverteilung der kleinen nicht-kodierenden RNAs in sec-RNA (Abb. 3.3A) und MVs-RNA (Abb. 3.3B). In sec-RNA besteht diese RNA-Population überwiegend aus 60 Nt langen RNAs, während in MVs-RNA die 20 Nt langen RNAs überwiegen.

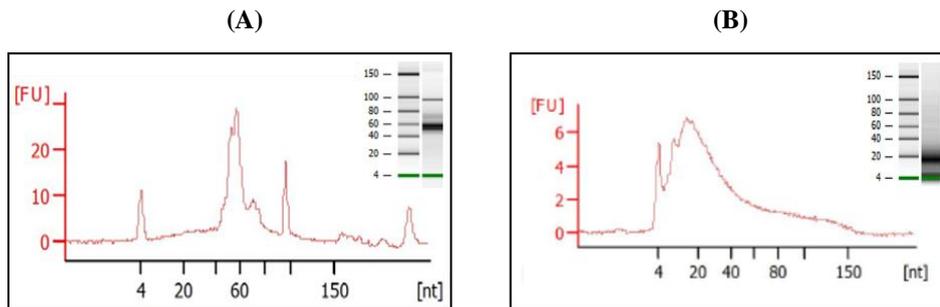


Abb. 3.3: Profilanalyse von sec-RNA und MVs-RNA. Um eine höhere Auflösung der kleinen nicht-kodierenden RNA-Population in den sekretierten RNA-Fractionen von *Lm* zu erzielen, wurde ein Small RNA Chip verwendet. Diese Analyse zeigt, dass die Zusammensetzung dieser RNA-Population in sec-RNA (A) und MVs-RNA (B) unterschiedlich ist. In sec-RNA haben diese RNAs eine Länge von überwiegend 60 Nt. In MVs-RNA hingegen überwiegen die 20 Nt langen RNAs.

3.1.3. Untersuchung der Fähigkeit von sec-RNA und MVs-RNA IFN- β zu induzieren

Die von *L. monocytogenes* sekretierten RNA-Fractionen, sec-RNA und MVs-RNA, wurden auf deren Fähigkeit IFN- β zu induzieren, untersucht. Hierfür wurden jeweils 100 ng sec-RNA, MVs-RNA und zelluläre RNA in BMDMs transfiziert. Die zelluläre RNA diente als Vergleich zu den beiden sekretierten RNA-Fractionen. In einem weiteren Ansatz wurden die 3 RNA-Fractionen vor deren Transfektion in BMDMs mit der Alkalischen Phosphatase (CIAP) dephosphoryliert. Nach einer Inkubation von 6 Stunden wurde die IFN- β Induktion über RT-PCR untersucht (Abb. 3.4). Zuvor wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Berechnung der relativen Expression erfolgte über das effizienz-korrigierte relative Quantifizierungsmodell (Pfaffl, 2001). Zur Normalisierung der Expressionsergebnisse wurde die Expression des Zielgens (IFN- β) auf ein nicht-reguliertes Haushaltsgen (Rplp) in der gleichen Probe bezogen.

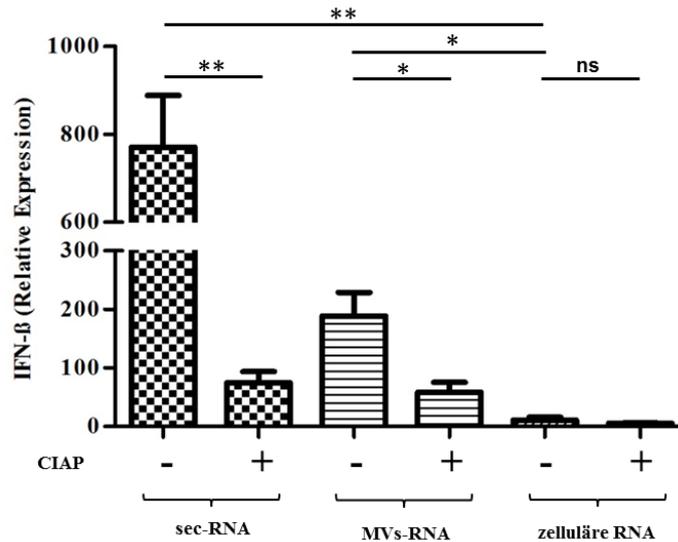


Abb. 3.4: IFN- β Induktion in BMDMs durch sec-RNA und MV_s-RNA. Jeweils 100 ng aus den 3 RNA-Fractionen, sec-RNA, MV_s-RNA und zelluläre RNA, von *Lm* wurden in BMDMs transfiziert. 6 Stunden später wurde die IFN- β Induktion über RT-PCR untersucht. Sec-RNA und MV_s-RNA haben zu einem signifikanten Anstieg der IFN- β Induktion im Vergleich zu der zellulären RNA geführt. Die Dephosphorylierung der sekretierten RNA-Fractionen vor deren Transfektion in BMDMs hat zu einer signifikanten Reduktion der IFN- β Induktion geführt. (*P < 0,05; **P < 0,01; ns = nicht signifikant)

Die Abb. 3.4 zeigt, dass nach Transfektion der 3 RNA-Fractionen in BMDMs sec-RNA die höchste IFN- β Antwort ausgelöst hat, gefolgt von MV_s-RNA. Beide sekretierte RNA-Fractionen haben zu einem signifikanten Anstieg der IFN- β Induktion im Vergleich zu der zellulären RNA geführt. Diese zeigen ein Vielfach höheres IFN- β Induktionspotential als die zelluläre RNA. Die in BMDMs ausgelöste IFN- β Antwort ist durch sec-RNA ca. 70fach und durch MV_s-RNA ca. 20fach höher im Vergleich zu der zellulären RNA. Die Dephosphorylierung von sec-RNA und MV_s-RNA mit der Alkalischen Phosphatase (CIAP) vor deren Transfektion in BMDMs hat zu einer signifikanten Reduktion der IFN- β Induktion geführt.

3.1.4. Analyse der Zusammensetzung von sec-RNA und MV_s-RNA

Um die Zusammensetzung der sekretierten RNA-Fractionen von *L. monocytogenes* zu identifizieren, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Die zelluläre RNA, die als Vergleich diente, wurde ebenfalls sequenziert. Für die Sequenzierung wurden von jeder RNA-Fraktion 3 biologische Replikate verwendet. Die Abb. 3.5 zeigt die Anzahl der *total reads*, die an das Referenzgenom von *L. monocytogenes* gemappt haben (Glaser et al, 2001). Diese weisen eine hohe Reproduzierbarkeit auf.

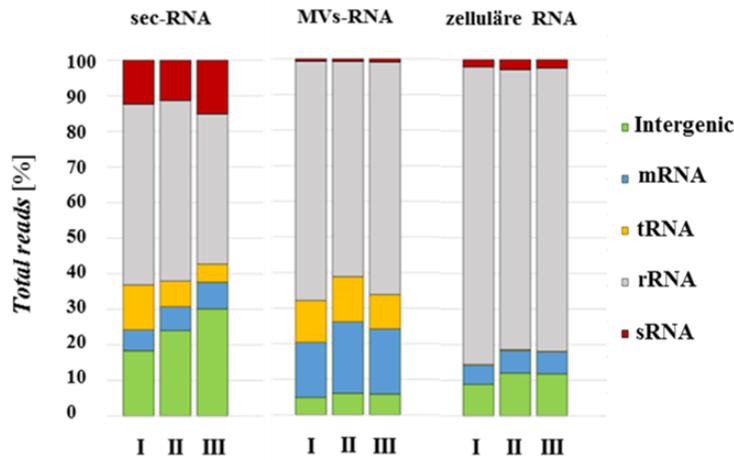


Abb. 3.5: Anzahl der *total reads* in % in den 3 RNA-Fraktionen von *L. monocytogenes*. Durch Sequenzierung wurden die RNA-Spezies in den beiden sekretierten RNA-Fraktionen von *Lm* erstmals identifiziert. Auffallend ist der höhere Anteil an kleinen nicht-kodierenden RNAs (sRNAs) in sec-RNA im Vergleich zu der zellulären RNA. In MVs-RNA hingegen ist der Anteil an mRNAs höher als in der zellulären RNA. Beide sekretierte RNA-Fraktionen enthalten mehr tRNAs als die zelluläre RNA.

Die häufigste RNA-Spezies in sec-RNA und MVs-RNA ist rRNA (47,9% und 64,4%), wobei in MVs-RNA der Anteil höher ist. In der zellulären RNA macht die rRNA 80,6% aus.

Zu der zweithäufigsten RNA-Spezies in MVs-RNA zählen mRNA-Fragmente mit 18%. Deren Anteil in MVs-RNA ist deutlich höher als in sec-RNA (6,7%) und zellulärer RNA (6%). In sec-RNA hingegen gehören sRNAs mit 12,9% zu der zweithäufigsten RNA-Spezies. Diese sind in sec-RNA im Vergleich zu der zellulären RNA (2,4%) deutlich angereichert. Der Anteil an sRNAs in MVs-RNA beträgt 0,7%.

Der Anteil an tRNAs in den beiden sekretierten RNA-Fraktionen, sec-RNA (8,3%) und MVs-RNA (11,3%), ist deutlich höher als in der zellulären RNA (0,2%). Besonders 2 tRNAs, Imot28 (tRNA-Met) und Imot67 (tRNA-Val), weisen in MVs-RNA eine viel höhere Anzahl an *reads* auf als in der zellulären RNA.

Des Weiteren ist die Region zwischen Imo2271 und Imo2332, die den Prophagen A118 kodiert, in sec-RNA deutlich angereichert (Rabinovich et al, 2012). Diese weist eine geringere Anzahl an *reads* in MVs-RNA auf und ist in der zellulären RNA nahezu abwesend.

3.1.5. Herstellung einzelner sRNAs durch *in vitro* Transkription

Im Vorfeld wurde gezeigt, dass die von *L. monocytogenes* sekretierten RNA-Fraktionen, sec-RNA und MVs-RNA, eine hohe IFN- β Antwort in BMDMs auslösen. In einem weiteren Schritt wurde die Zusammensetzung der beiden sekretierten RNA-

Fraktionen identifiziert. Als nächstes wurde untersucht welchen Beitrag einzelne in sec-RNA und MVs-RNA identifizierte RNAs an der IFN- β Antwort haben. Hierfür wurden insgesamt 25 RNA-Kandidaten, 23 sRNAs und 2 tRNAs, ausgesucht und auf deren Fähigkeit IFN- β zu induzieren, untersucht. Hierbei handelt es sich um sRNAs, die in sec-RNA eine höhere Anzahl an *reads* aufweisen als in der zellulären RNA (rli48, rli62, rliG, SRP, ssaA und ssaS). Diese zählen in MVs-RNA zu den sRNAs mit der höchsten Anzahl an *reads*. Darüber hinaus wurden auch solche sRNAs ausgesucht, die in beiden sekretierten RNA-Fraktionen eine geringe Anzahl an *reads* aufweisen (rli100, rli105 und rli114). Ein weiteres Kriterium für die Auswahl der sRNAs war deren Transkriptionslevel während des intra- bzw. extrazellulären Wachstums von *L. monocytogenes*. So zählen rli32, rli47, rli48, rli51, rli98, rli105 und rliG zu den sRNAs deren Transkriptionslevel während des intrazellulären Wachstums höher ist. Andere hingegen, wie rli62, rli87, rli90, rli99, rli108, rli114, rnpB, ssaA und ssaS, weisen während des extrazellulären Wachstums einen höheren Transkriptionslevel auf (Mraheil et al, 2011). Des Weiteren wurden 2 tRNAs ausgesucht, die in den sekretierten RNA-Fraktionen häufiger vertreten sind als in der zellulären RNA, zum einen lmot11 (tRNA-Serin) in sec-RNA und zum anderen lmot67 (tRNA-Val) in MVs-RNA.

Der erste Schritt bestand darin die 25 ausgesuchten RNA-Kandidaten herzustellen. Die Abb. 3.6 zeigt die einzelnen Schritte, die für die Herstellung der RNAs durchgeführt worden sind. Die RNAs wurden enzymatisch durch *in vitro* Transkription mit der T7-RNA-Polymerase hergestellt. Diese katalysiert die Synthese von ssRNA in 5'-3'-Richtung von einem DNA-*template* aus, das stromabwärts vom T7-spezifischen Promotor (5'-taatacgaactactataGg-3') liegt. Die T7-RNA-Polymerase bevorzugt an der Position +1 ein G (in der Sequenz groß geschrieben), daher beginnen die RNA-Transkripte mit 5'-GG. Darüber hinaus besitzen die so hergestellten RNAs am 5'-Ende eine Triphosphat-Gruppe.

3. Ergebnisse

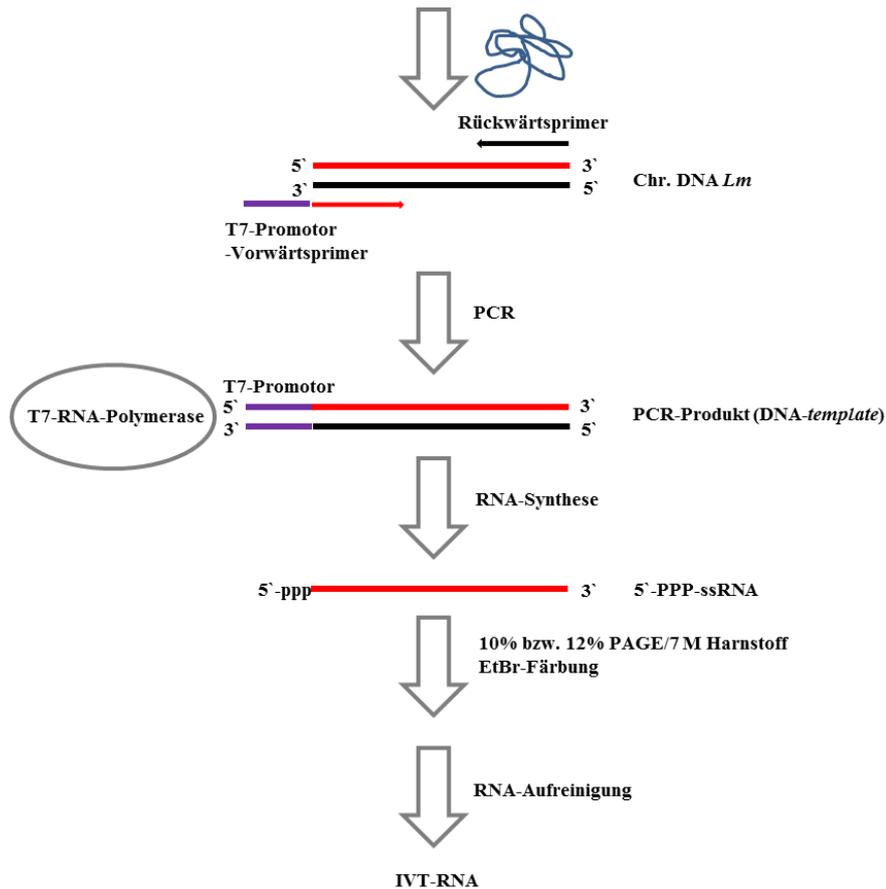


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte für die Herstellung der 25 RNA-Kandidaten. Im ersten Schritt wurde das DNA-*template* durch PCR hergestellt. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurde die *in vitro* Transkription (IVT) mit der T7-RNA-Polymerase durchgeführt. Anschließend wurden die RNAs in denaturierende Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Im letzten Schritt wurden die RNAs aus dem Gel herausgeschnitten und aufgereinigt.

Die DNA-*templates* für die Herstellung der einzelnen RNAs durch *in vitro* Transkription wurden durch PCR hergestellt. Dabei enthielt der Vorwärtsprimer am 5'-Ende die Sequenz des Promotors der T7-RNA-Polymerase. Die PCR-Produkte wurden zunächst in 1%ige und 2%ige Agarosegele aufgetrennt und danach visualisiert und fotografiert (Abb. 3.7). Nach Aufreinigung der PCR-Produkte folgte die *in vitro* Transkription der DNA in RNA. Die hergestellten RNAs wurden unter denaturierenden Bedingungen (7 M Harnstoff) in 10%ige und 12%ige Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Abb. 3.8). Durch die Zugabe von Harnstoff wurde die Bildung von Sekundärstrukturen verhindert, so dass die RNAs nach Länge aufgetrennt wurden.

3. Ergebnisse

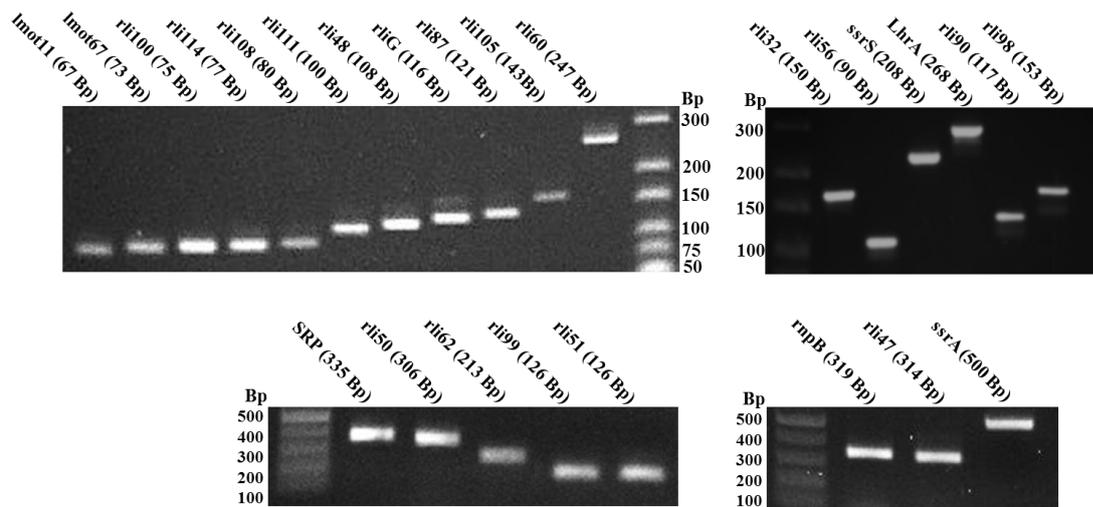


Abb. 3.7: DNA-templates für die Herstellung der 25 RNA-Kandidaten durch *in vitro* Transkription. Nach Herstellung der DNA-templates für die *in vitro* Transkription durch PCR wurden die PCR-Produkte in 1%ige und 2%ige Agarosegele aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte wurde ein DNA-Größenstandard (Abb. 2.1) verwendet.

Die T7-RNA-Polymerase kann zusätzlich als RNA-abhängige RNA-Polymerase funktionieren, wenn die synthetisierte RNA am 3`-Ende eine gewisse Selbstkomplementarität aufweist, wodurch es zur Bildung einer Haarnadelschleife kommt. In diesem Fall verwendet die T7-RNA-Polymerase den RNA-Strang als *template* und verlängert diesen am 3`-Ende (Schlee et al, 2009; Schmidt et al, 2009). Dieser *copy-back*-Mechanismus wurde für virale Polymerasen während der Virusreplikation beschrieben (Behrens et al, 1996).

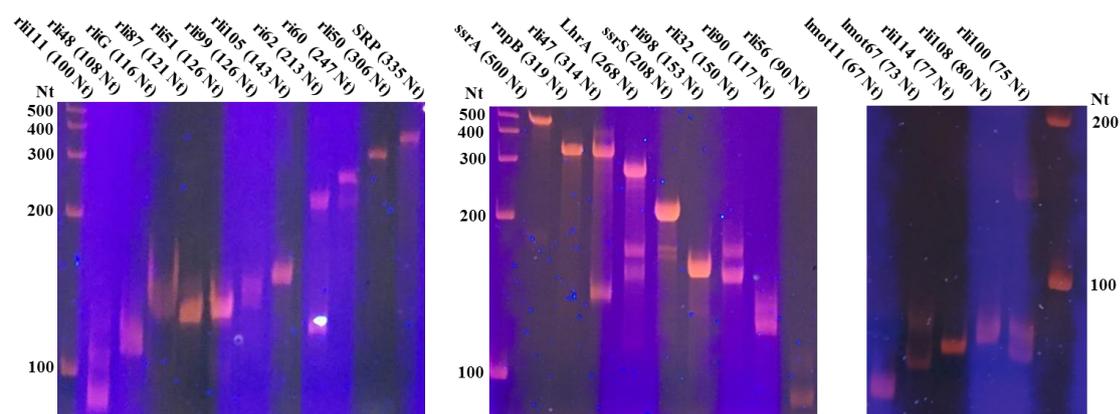


Abb. 3.8: Visualisierung der durch *in vitro* Transkription hergestellten 25 RNA-Kandidaten. Die durch *in vitro* Transkription hergestellten RNAs wurden unter denaturierenden Bedingungen in 10%ige und 12%ige Polyacrylamidgele aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der RNAs wurde ein RNA-Größenstandard (Abb. 2.1) verwendet.

In der Abb. 3.8 sind die Produkte der *in vitro* Transkription dargestellt. In den einzelnen *in vitro* Transkriptionsansätzen sind, außer den RNAs mit der entsprechenden Länge, sowohl kürzere als auch längere Nebenprodukte zu sehen. Zur Bestimmung der RNA-Länge wurde ein RNA-Größenstandard (Abb. 2.1) verwendet. Die entsprechenden RNAs wurden aus dem Gel herausgeschnitten, extrahiert und über Phenol/Chloroform-Fällung aufgereinigt.

3.1.6. Untersuchung der Fähigkeit einzelner sRNAs IFN- β zu induzieren

Nach dem die 25 RNA-Kandidaten enzymatisch hergestellt worden sind, wurde deren IFN- β Induktionspotential in HEK293-Zellen untersucht. Hierfür wurden jeweils 50 ng RNA in die Zellen transfiziert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde die von den einzelnen RNAs ausgelöste IFN- β Antwort über RT-PCR untersucht (Abb. 3.9).

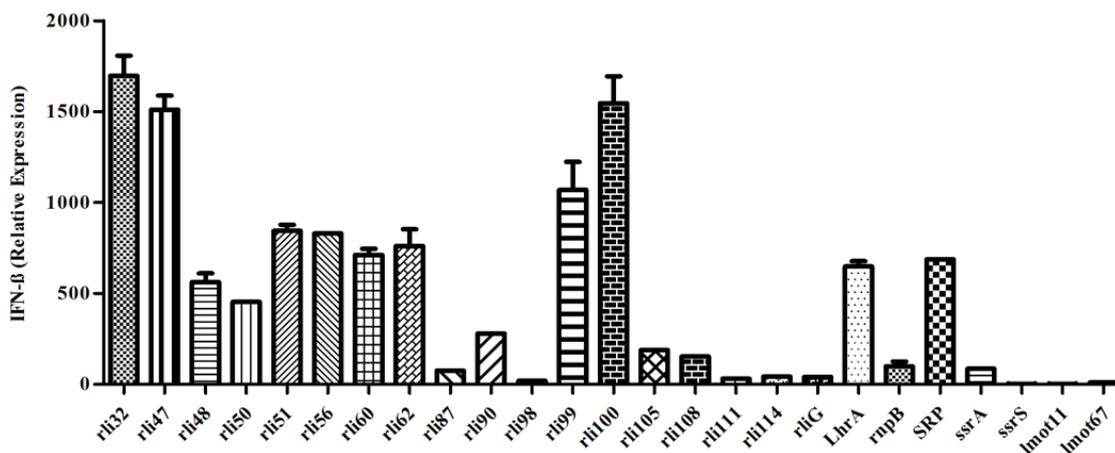


Abb. 3.9: Unterschiedliche IFN- β Induktion in HEK293-Zellen durch sRNAs, die in sec-RNA und MVs-RNA identifiziert worden sind. Die 25 RNA-Kandidaten wurden nach deren Herstellung durch *in vitro* Transkription in HEK293-Zellen transfiziert. Darunter zeigen rli32, rli47, rli99 und rli100 die höchste IFN- β Induktion. SsrS hingegen und die beiden tRNAs, Imot11 und Imot67, zeigen eine sehr schwache IFN- β Induktion. Die restlichen sRNAs zeigen eine mehr oder weniger starke Induktion von IFN- β .

Die Transfektion der 25 RNA-Kandidaten in HEK293-Zellen zeigt, dass diese ein unterschiedliches Potential besitzen IFN- β zu induzieren. Von den untersuchten sRNAs haben rli32, rli47, rli99 und rli100 die höchste IFN- β Antwort ausgelöst. Andere sRNAs hingegen, wie beispielsweise rli98, rli111, rli114, rliG und ssrS, haben eine sehr schwache IFN- β Antwort ausgelöst. Dies gilt auch für die beiden tRNAs, Imot11 und Imot67. Die restlichen untersuchten sRNAs zeigen ein moderates Potential die IFN- β Antwort auszulösen.

In einem weiteren Versuch wurden 8 der 23 ausgesuchten sRNAs in BMDMs transfiziert. Für diesen Versuch wurden, wie zuvor in HEK293-Zellen, jeweils 50 ng RNA in die Zellen transfiziert. Nach einer Inkubation von 6 Stunden wurde die IFN- β Antwort über RT-PCR untersucht (Abb. 3.10). Hier, ähnlich wie in HEK293-Zellen, gehören rli32, rli99 und rli100 zu den sRNAs mit der höchsten IFN- β Induktion, während ssrS eine sehr schwache IFN- β Antwort ausgelöst hat. Die Transfektion der 8 sRNAs in BMDMs bestätigt das zuvor in HEK293-Zellen erzielte Ergebnis (Abb. 3.9). Die einzelnen sRNAs, die in den sekretierten RNA-Fractionen von *L. monocytogenes* identifiziert worden sind, besitzen ein unterschiedliches Potential IFN- β zu induzieren.

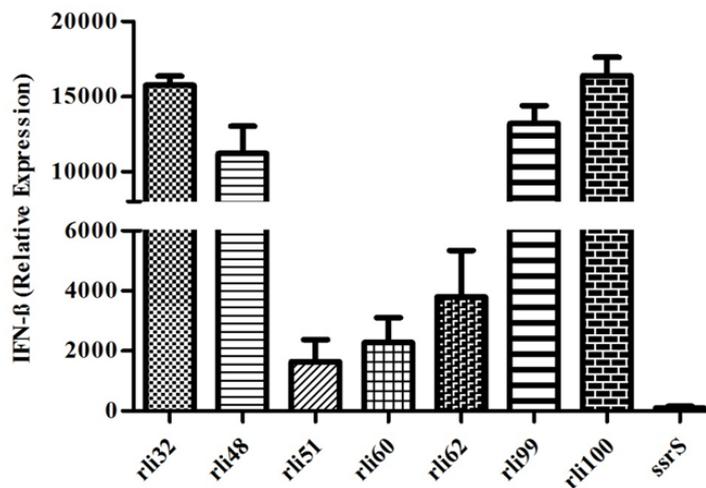


Abb. 3.10: Unterschiedliche IFN- β Induktion in BMDMs durch sRNAs, die in sec-RNA und MVs-RNA identifiziert worden sind. Von den 25 RNA-Kandidaten wurden einige sRNAs, die zuvor in HEK293-Zellen ein unterschiedliches IFN- β Induktionspotential gezeigt hatten, in BMDMs transfiziert. In BMDMs, wie zuvor in HEK293-Zellen, zeigen rli32, rli99 und rli100 die höchste IFN- β Induktion. SsrS hingegen zeigt auch in BMDMs eine sehr schwache Induktion von IFN- β .

Von den 23 ausgesuchten sRNAs, die in sec-RNA und MVs-RNA identifiziert worden sind, hat rli32 sowohl in HEK293-Zellen (Abb. 3.11A) als auch in BMDMs (Abb. 3.11B) die höchste IFN- β Antwort ausgelöst. Anders hingegen ssrS, das eine sehr schwache IFN- β Antwort ausgelöst hat (Abb. 3.11A und 3.11B).

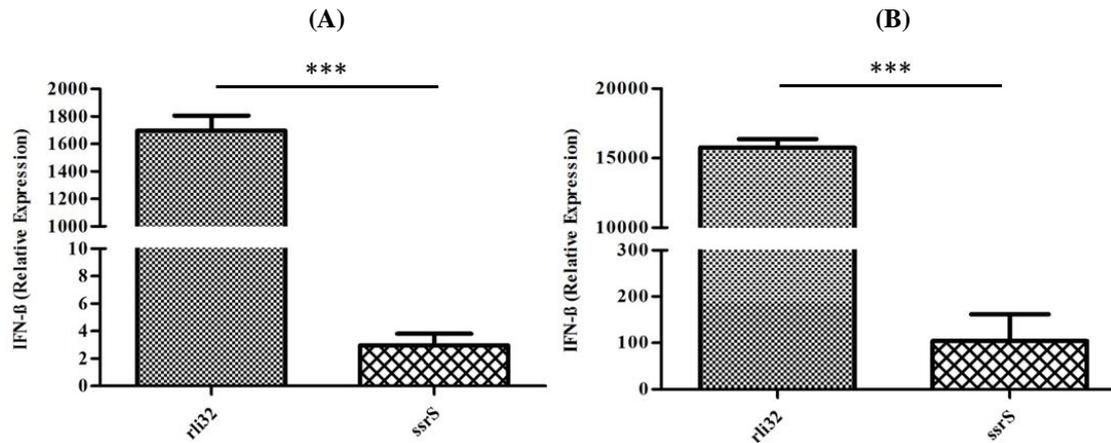


Abb. 3.11: Rli32 und ssrS, 2 sRNAs mit sehr unterschiedlichem IFN- β Induktionspotential. Von den 25 RNA-Kandidaten, die in sec-RNA und MVs-RNA identifiziert worden sind, zeigt rli32 die höchste und ssrS die niedrigste IFN- β Induktion sowohl in HEK293-Zellen (A) als auch in BMDMs (B). (***) $P < 0,001$

3.1.6.1. Untersuchung der Abhängigkeit der IFN- β Induktion von dem Rezeptor RIG-I

Die cytosolischen Immunrezeptoren der RLR-Familie, RIG-I und MDA5, sind dafür bekannt, dass sie nach Detektion viraler RNA im Cytosol die Produktion von Typ-I-IFN auslösen (Kato et al, 2006; Kato et al, 2011). In einem ersten Versuch wurde die Abhängigkeit der IFN- β Antwort, die von den sRNAs in HEK293-Zellen ausgelöst wurde, von dem Rezeptor RIG-I untersucht. Hierfür wurden 11 der 23 ausgesuchten sRNAs in RIG-I-defiziente HEK293-Zellen transfiziert. Darunter waren sRNAs, die zuvor in Wildtypzellen eine starke (rli32, rli47, rli99 und rli110) sowie eine sehr schwache bis moderate (rli48, rli51, rli60, rli62, rli105, SRP und ssrS) IFN- β Antwort ausgelöst hatten (Abb. 3.9). Wie in dem zuvor durchgeführten Transfektionsversuch wurden jeweils 50 ng RNA in die Zellen transfiziert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde die IFN- β Antwort über RT-PCR untersucht. Die Abb. 3.12 zeigt, dass in RIG-I-defiziente Zellen die IFN- β Antwort, die von den sRNAs in Wildtypzellen ausgelöst wurde, nahezu ausgeblieben ist. In dieser Zelllinie zeigen die sRNAs, unabhängig von deren IFN- β Induktionspotential, eine sehr schwache IFN- β Antwort.

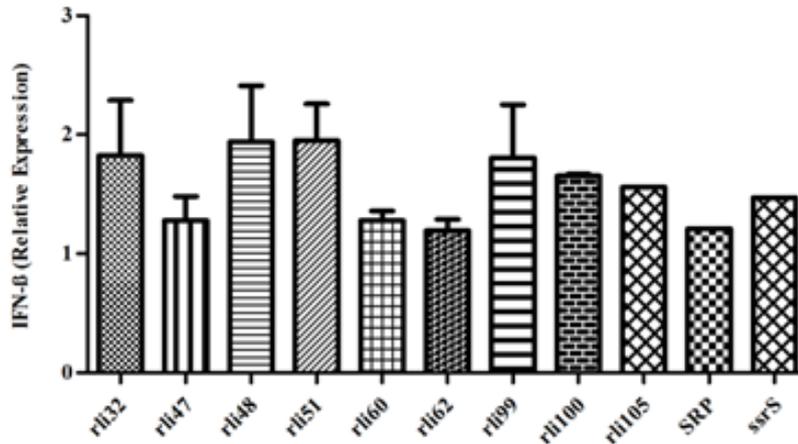


Abb. 3.12: RIG-I-Abhängigkeit der IFN- β Antwort in HEK293-Zellen durch sRNAs, die in sec-RNA und MVs-RNA identifiziert worden sind. Von den 25 RNA-Kandidaten wurden einige sRNAs, die in den Transfektionsversuchen zuvor eine sehr schwache bis starke IFN- β Induktion gezeigt hatten, in HEK293 RIG-I^{-/-}-Zellen transfiziert. In dieser Zelllinie ist die von den sRNAs in Wildtypzellen ausgelöste IFN- β Antwort nahezu ausgeblieben.

3.1.6.2. Untersuchung der Abhängigkeit der IFN- β Induktion von dem Rezeptor MDA5

In einem weiteren Versuch wurde auch die Beteiligung des Rezeptors MDA5 an der IFN- β Antwort, die von den sRNAs in HEK293-Zellen ausgelöst wurde, untersucht. Hierfür wurde rli32 in HEK293-Zellen mit einer Defizienz in eines der beiden Rezeptoren, RIG-I oder MDA5, transfiziert. In einem parallelen Ansatz wurde rli32 in HEK293-Wildtypzellen (WT) transfiziert. In einem weiteren Ansatz wurde rli32 vor der Transfektion in Wildtypzellen mit der Alkalischen Phosphatase (CIAP) dephosphoryliert. Diese sRNA hat in den Transfektionsversuchen zuvor die höchste IFN- β Antwort sowohl in HEK293-Zellen als auch in BMDMs ausgelöst (Abb. 3.9 und 3.10). Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in der Abb. 3.13 dargestellt. Die Transfektion von rli32 in Wildtypzellen zeigt eine ähnlich hohe IFN- β Induktion wie in dem zuvor durchgeführten Transfektionsversuch (Abb. 3.9). Anders hingegen die Transfektion von rli32 in RIG-defiziente Zellen, die eine signifikante Reduktion der IFN- β Induktion im Vergleich zu den Wildtypzellen zeigt. Die Transfektion von rli32 nach Dephosphorylierung mit der Alkalischen Phosphatase (CIAP) in Wildtypzellen zeigt ebenfalls eine signifikante Reduktion der IFN- β Induktion. Die IFN- β Induktion durch rli32 in MDA5-defiziente Zellen hingegen zeigt keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Wildtypzellen.

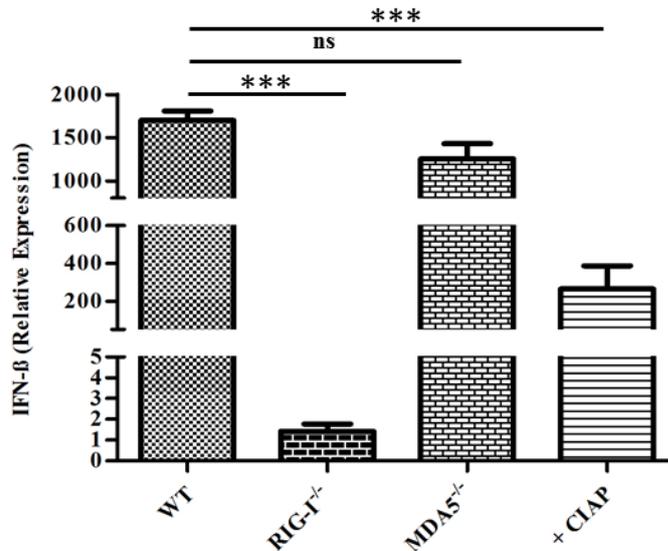


Abb. 3.13: RIG-I-Abhängigkeit der IFN- β Antwort in HEK293-Zellen durch rli32. Rli32 wurde in Wildtyp-, RIG-I- und MDA5-defiziente HEK293-Zellen transfiziert. RIG-I-defiziente Zellen zeigen eine signifikante Reduktion der IFN- β Induktion im Vergleich zu den Wildtypzellen. Die Transfektion von rli32 nach Dephosphorylierung mit der Alkalischen Phosphatase (CIAP) in Wildtypzellen zeigt ebenfalls eine signifikante Reduktion der IFN- β Induktion. MDA5-defiziente Zellen hingegen zeigen keine signifikante Reduktion der IFN- β Induktion. (***) $P < 0,001$; ns = nicht signifikant)

3.1.6.3. Untersuchung der rli32-Motive hinsichtlich der Fähigkeit IFN- β zu induzieren

Anders als DNA ist RNA einzelsträngig allerdings nicht linear. Die komplementären Basen C-G und A-U bilden stabile Basenpaare über Wasserstoffbrückenbindungen (Watson-Crick-Basenpaare). Aufgrund der Komplementarität der Basen kommt es zur Faltung der RNA-Sequenz, die als Sekundärstruktur (2D-Faltung) bezeichnet wird. Hierbei definieren die Basenpaare, die zwischen den verschiedenen Teilen eines RNA-Moleküls gebildet werden, dessen Sekundärstruktur.

In einem weiteren Versuch wurde die Abhängigkeit des hohen IFN- β Induktionspotentials von rli32 von dessen strukturellen Beschaffenheit näher untersucht. Hierfür wurde eine *in silico* Vorhersage der Sekundärstruktur von rli32 mit dem RNAfold WebServer durchgeführt (Gruber et al, 2008). Die in der Abb. 3.14A dargestellte Nukleotidsequenz von rli32 bildet eine Sekundärstruktur, die aus 3 Motiven besteht (Abb. 3.14B). Diese weisen verschiedene *stem-loop* Strukturen auf. Um herauszufinden welches Motiv für das hohe IFN- β Induktionspotential von rli32 verantwortlich ist, wurden diese zunächst einzeln durch *in vitro* Transkription hergestellt. Anschließend wurden die einzelnen rli32-Motive in BMDMs transfiziert.

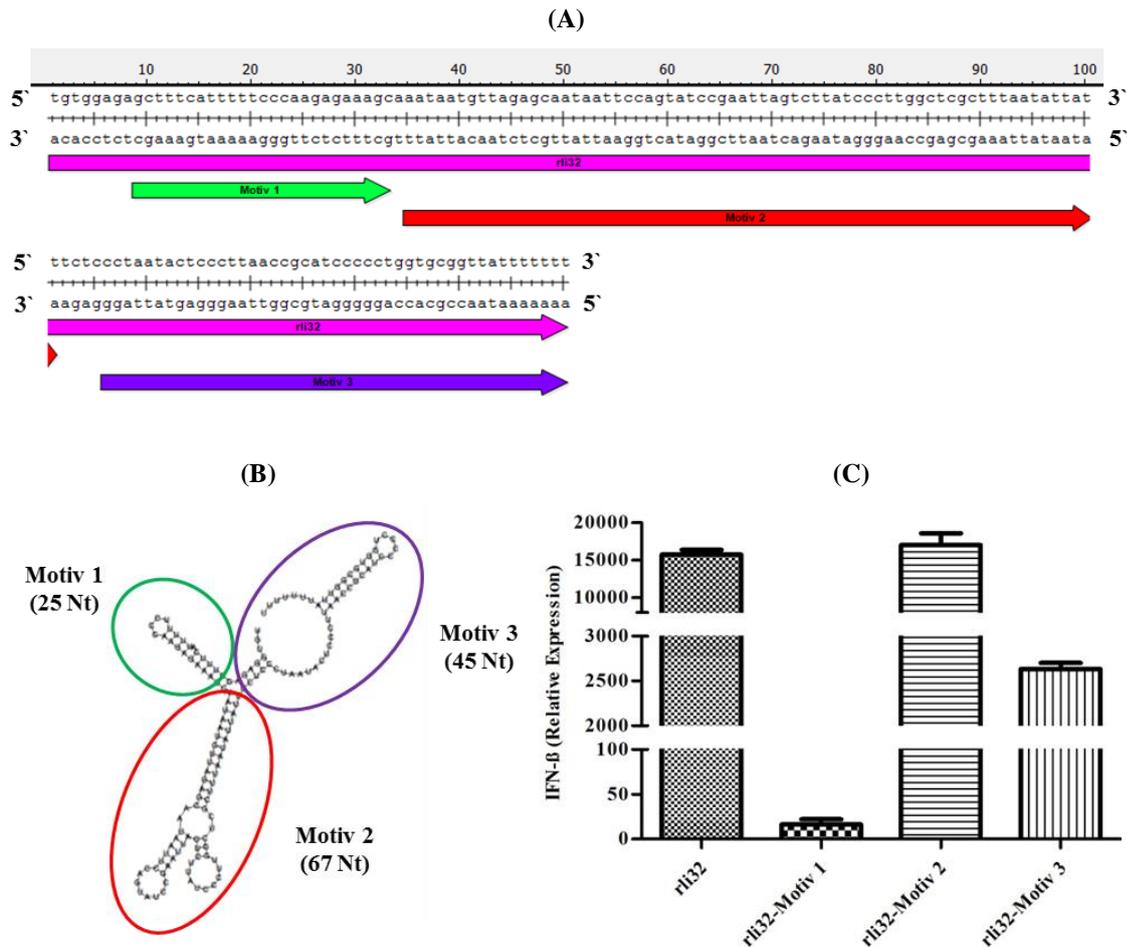


Abb. 3.14: Nukleotidsequenz, Sekundärstruktur und IFN- β Induktion durch die rli32-Motive. A: Nukleotidsequenz von rli32. Rli32 besteht aus 150 Nt, wobei die Pfeile die Sequenzen zeigen, die über Basenpaarung zur Ausbildung der 3 Motive führen. B: Sekundärstruktur von rli32. Die *in silico* Vorhersage der Sekundärstruktur von rli32 wurde mit dem RNAfold WebServer durchgeführt. Rli32 bildet 3 Motive, die aus unterschiedlichen *stem-loop* Strukturen bestehen. C: IFN- β Induktion durch die rli32-Motive in BMDMs. Die 3 rli32-Motive wurden einzeln durch *in vitro* Transkription hergestellt und in BMDMs transfiziert. Das Motiv 2 zeigt eine gleich hohe IFN- β Induktion wie rli32 selbst. Während das Motiv 3 eine schwächere IFN- β Induktion zeigt, zeigt das Motiv 1 eine sehr schwache Induktion von IFN- β .

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass Motiv 2 für das hohe IFN- β Induktionspotential von rli32 verantwortlich ist (Abb. 3.14C). Die von diesem Motiv ausgelöste IFN- β Antwort ist so hoch wie die von rli32 selbst. Während das Motiv 3 eine viel schwächere IFN- β Antwort ausgelöst hat, zeigt das Motiv 1 eine sehr schwache Induktion von IFN- β .

3.1.7. Untersuchung der Inhibition der viralen Replikation durch rli32 und rli47

Die Transfektionsversuche mit den einzelnen sRNAs haben gezeigt, dass diese das Potential besitzen IFN- β zu induzieren, wenn auch im unterschiedlichem Maße. Die von Isaacs und Lindemann im Jahr 1957 beobachtete „Interferenz“ mit der Virusreplikation

fürte zur Namensgebung der Interferone (Isaacs und Lindemann, 1957). Diese, darunter IFN- β , inhibieren über verschiedene Mechanismen, die nach deren Bindung an den entsprechenden Rezeptor (IFNAR) ausgelöst werden, die virale Replikation und damit die Vermehrung der Viren in den infizierten Zellen (Müller et al, 1994; Sadler und Williams, 2008).

Als nächstes wurde untersucht, ob die von den sRNAs ausgelöste IFN- β Antwort zu einer Inhibition der viralen Replikation in den infizierten Zellen führt. Hierfür wurden 3 sRNAs ausgesucht, die im Vorfeld eine starke (rli32 und rli47) und eine sehr schwache (ssrS) IFN- β Antwort in HEK293-Zellen ausgelöst hatten (Abb. 3.9). Wie in den Transfektionsversuchen zuvor wurden jeweils 50 ng RNA in HEK293-Zellen transfiziert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden die Zellen mit dem Influenza A Virus (A/PR/8/34/(H1N1)) infiziert, wobei eine MOI von 0,1 eingesetzt wurde. Die Zellen wurden für weitere 24 Stunden inkubiert. Der Virustiter in den Überständen der infizierten Zellen wurde in MDCK-II-Zellen mittels FFA (*focus forming assay*) bestimmt (Abb. 3.15). Die Infektionen von HEK293-Zellen mit dem Influenza A Virus (A/PR/8/34/(H1N1)) wurden in Kooperation mit Christin Müller und Prof. Dr. Stephan Pleschka (Institut für Medizinische Virologie, Justus-Liebig-Universität Gießen) durchgeführt.

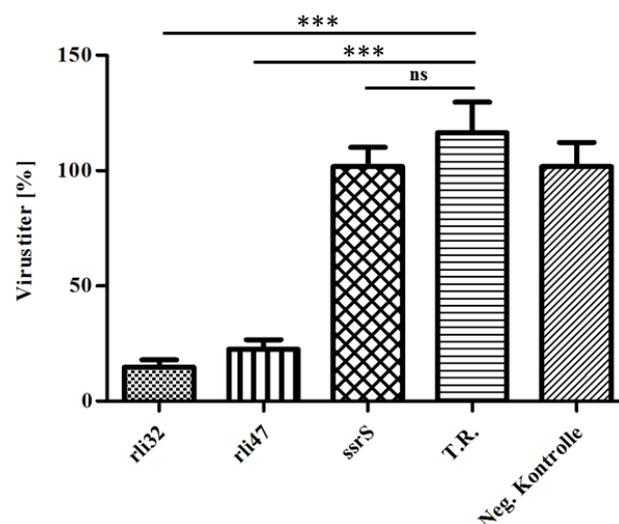


Abb. 3.15: Antivirale Aktivität von rli32 und rli47 in HEK293-Zellen. 24 Stunden vor der Infektion mit A/PR/8/34/(H1N1) wurden HEK293-Zellen mit rli32, rli47 und ssrS transfiziert. Der Virustiter in den Überständen der infizierten Zellen wurde mittels FFA in MDCK-II-Zellen bestimmt. Die Vorbehandlung der Zellen mit rli32 und rli47 hat zu einer signifikanten Reduktion des Virustiters geführt. Anders hingegen die Vorbehandlung der Zellen mit ssrS, die nicht zu einer Inhibition der viralen Replikation geführt hat. (***) $P < 0,001$; ns = nicht signifikant)

Das in der Abb. 3.15 dargestellte Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass die Vorbehandlung der HEK293-Zellen mit rli32 und rli47 zu einer signifikanten Inhibition der viralen Replikation im Vergleich zu dem Transfektionsreagenz (T.R.) geführt hat. Der Virustiter in den Überständen dieser Zellen zeigt eine Reduktion von 85% durch rli32 und von 80% durch rli47. Anders hingegen der Ansatz, in dem die Zellen vor der viralen Infektion mit srsS behandelt worden sind. Die Vorbehandlung der Zellen mit srsS, das im Vorfeld eine sehr schwache IFN- β Antwort ausgelöst hatte, hat nicht zu einer Inhibition der viralen Replikation geführt. Dieser Ansatz zeigt einen ähnlich hohen Virustiter wie das Transfektionsreagenz.

3.1.7.1. Untersuchung der Abhängigkeit der viralen Inhibition von den Rezeptoren RIG-I und MDA5

In einem weiteren Versuch wurde die Beteiligung der beiden Rezeptoren RIG-I und MDA5 an der antiviralen Antwort, die von rli32 und rli47 ausgelöst wurde, untersucht. Hierfür wurden RIG-I- und MDA5-defiziente HEK293-Zellen, ähnlich wie die Wildtypzellen zuvor, mit den 3 sRNAs transfiziert und anschließend mit dem Virus infiziert (Abb. 3.16).

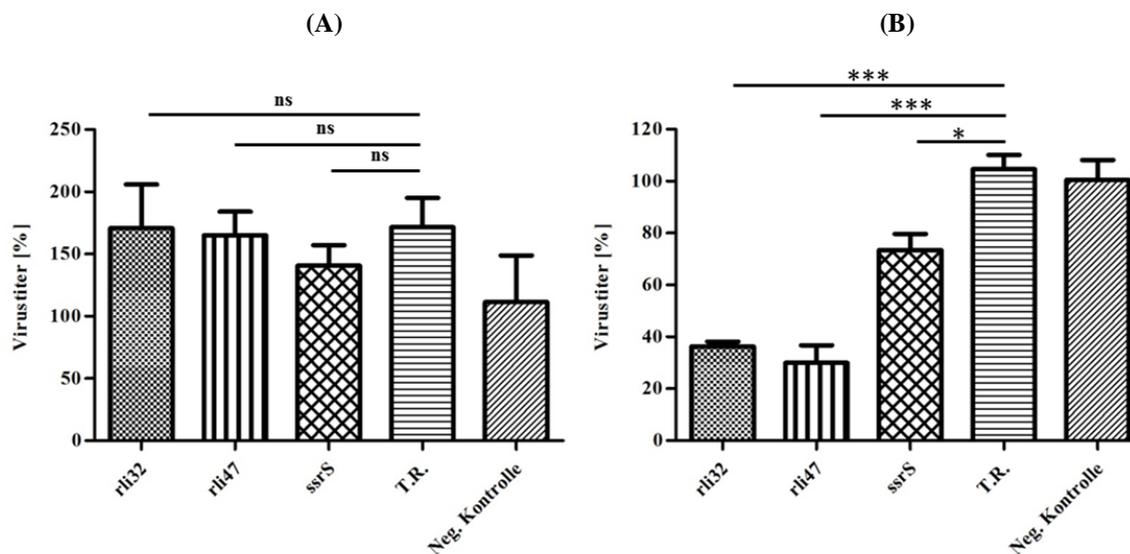


Abb. 3.16. Untersuchung der antiviralen Aktivität von rli32, rli47 und srsS in HEK293 RIG-I^{-/-}- und HEK293 MDA5^{-/-}-Zellen. RIG-I- und MDA5-defiziente Zellen wurden 24 Stunden vor der Infektion mit A/PR/8/34/(H1N1) mit rli32, rli47 und srsS transfiziert. A: Keine Inhibition der viralen Replikation in HEK293 RIG-I^{-/-}-Zellen durch rli32 und rli47. Die Vorbehandlung der RIG-I-defizienten Zellen mit rli32 und rli47 hat nicht zu einer Inhibition der viralen Replikation geführt. Unabhängig von der transfizierten sRNA zeigen RIG-I-defiziente Zellen einen gleich hohen Virustiter in allen Ansätzen. B: Inhibition der viralen Replikation in HEK293 MDA5^{-/-}-Zellen durch rli32 und rli47. Die Vorbehandlung der MDA5-defizienten Zellen mit rli32 und rli47 hat zu einer signifikanten Reduktion des Virustiters geführt. (*P < 0,05; ***P < 0,001; ns = nicht signifikant)

Anders als in Wildtypzellen zuvor hat die Vorbehandlung der RIG-I-defizienten Zellen mit rli32 und rli47 nicht zu einer Inhibition der viralen Replikation geführt (Abb. 3.16A). Alle Ansätze zeigen einen ähnlich hohen Virustiter. Anders hingegen die Vorbehandlung der MDA5-defizienten Zellen mit rli32 und rli47, die zu einer signifikanten Inhibition der viralen Replikation im Vergleich zu dem Transfektionsreagenz (T.R.) geführt hat (Abb. 3.16B). In diesen Ansätzen zeigt der Virustiter eine Reduktion von 65% durch rli32 und von 70% durch rli47.

3.1.7.2. Untersuchung der Abhängigkeit der viralen Inhibition von der RNA-Konzentration

Als nächstes wurde die Abhängigkeit der viralen Inhibition von der eingesetzten rli32-Konzentration untersucht. Dabei wurde ssrS, das in den Versuchen zuvor keine antivirale Aktivität gezeigt hatte, ebenfalls untersucht. Hierfür wurden HEK293-Zellen zunächst mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen an rli32 und ssrS transfiziert und anschließend mit dem Virus infiziert (Abb. 3.17).

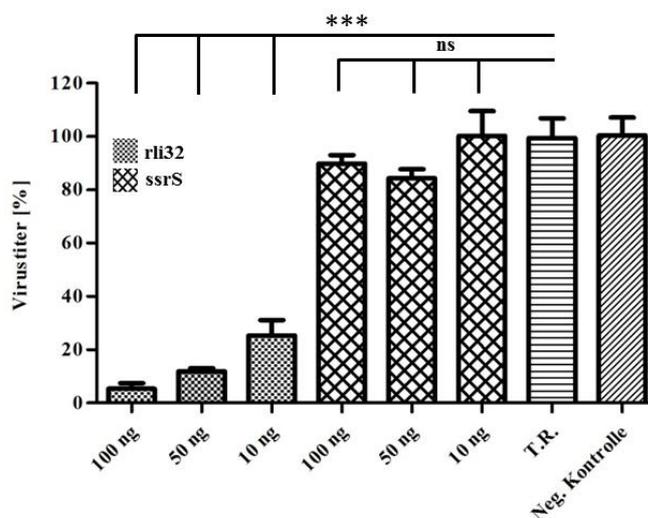


Abb. 3.17: Konzentrationsabhängige Inhibition der viralen Replikation durch rli32 in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden 24 Stunden vor der Infektion mit A/PR/8/34/(H1N1) mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen an rli32 und ssrS transfiziert. Die anschließende Bestimmung des Virustiters in den Überständen der infizierten Zellen zeigt eine konzentrationsabhängige Inhibition der viralen Replikation durch rli32. (***) $P < 0,001$; ns = nicht signifikant)

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt eine signifikante Inhibition der viralen Replikation durch rli32 im Vergleich zu dem Transfektionsreagenz (T.R.). Mit steigender rli32-Konzentration zeigt der Virustiter in den Überständen der infizierten Zellen eine zunehmende Reduktion, von 75% durch 10 ng, von 90% durch 50 ng und

von 95% durch 100 ng. Anders hingegen die Ansätze mit *ssrS*, die einen ähnlich hohen Virustiter zeigen wie das Transfektionsreagenz. Unabhängig von der eingesetzten Konzentration zeigt diese sRNA keine antivirale Aktivität. Selbst die Vorbehandlung der Zellen mit 100 ng *ssrS* hat nicht zu einer Inhibition der viralen Replikation geführt.

3.1.7.3. Untersuchung der Inhibition der viralen Replikation durch weitere sRNAs

In einem abschließenden Versuch wurde die antivirale Aktivität weiterer sRNAs, die in *sec*-RNA und MVs-RNA identifiziert worden sind, untersucht (Abb. 3.18). Hierfür wurden sRNAs ausgesucht, die im Vorfeld eine moderate (*rli48*, *rli51*, *rli60* und *rli62*) bis starke (*rli99* und *rli100*) IFN- β Antwort in HEK293-Zellen ausgelöst hatten (Abb. 3.9). Als eine der schwach IFN- β induzierenden sRNAs wurde *ssrS* eingesetzt.

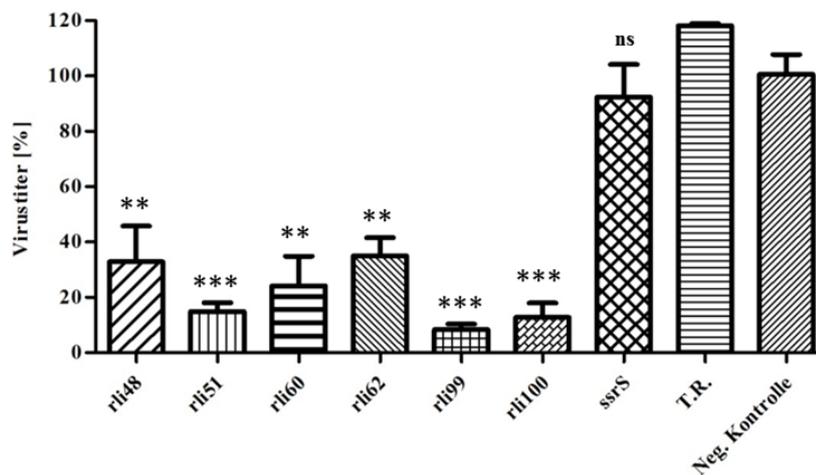


Abb. 3.18: Unterschiedliche antivirale Aktivität von sRNAs, die in *sec*-RNA und MVs-RNA identifiziert worden sind. 24 Stunden vor der Infektion mit A/PR/8/34/(H1N1) wurden HEK293-Zellen mit 7 sRNAs, die in *sec*-RNA und MVs-RNA identifiziert worden sind, transfiziert. Bis auf *ssrS*, das keine antivirale Aktivität zeigt, zeigen die anderen sRNAs eine unterschiedlich starke Inhibition der viralen Replikation. (**P < 0,01; ***P < 0,001; ns = nicht signifikant)

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass die Vorbehandlung der HEK293-Zellen mit *rli99* und *rli100* zu einer signifikanten Inhibition der viralen Replikation im Vergleich zu dem Transfektionsreagenz (T.R.) geführt hat. In diesen Ansätzen zeigt der Virustiter eine Reduktion von 92% durch *rli99* und von 87% durch *rli100*. Anders hingegen die Vorbehandlung der Zellen mit *ssrS*, die nicht zu einer Inhibition der viralen Replikation geführt hat. Die Bestimmung des Virustiters in den Überständen der Zellen, die mit den anderen sRNAs vorbehandelt worden sind, zeigt eine mehr oder weniger signifikante Inhibition der viralen Replikation.

3.1.8. Untersuchung der Fähigkeit von rli32 Typ-I-IFN in der Maus zu induzieren

Die im Vorfeld durchgeführten *in vitro* Transfektionsversuche haben gezeigt, dass von den untersuchten sRNAs rli32 das höchste IFN- β Induktionspotential besitzt. Als nächstes wurde die von rli32 ausgelöste Typ-I-IFN Antwort (IFN- β und IFN- $\alpha 4$) *in vivo* im Mausversuch untersucht. Dabei wurde auch srsS, das im Vorfeld ein sehr schwaches Potential zur IFN- β Induktion gezeigt hatte, untersucht. Des Weiteren wurde zelluläre RNA von HEK293-Zellen (eukaryotische RNA), die als Vergleich zu den bakteriellen sRNAs diente, eingesetzt. Für diesen Versuch wurden insgesamt 20 Mäuse verwendet. Davon wurden 15 Mäuse mit jeweils 40 μg rli32, srsS und eukaryotische RNA (5 Tiere/Gruppe) und 5 Mäuse nur mit dem Transfektionsreagenz intravenös injiziert. Die Mausversuche wurden in Kooperation mit Jessica Wingerath und Dr. Thomas Wirth (Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt.

Als Transfektionsreagenz wurde *in vivo*-jetPEI verwendet, das jede Art von Nukleinsäure in eine Reihe von Organen effizient liefert. Hierbei bestimmt die Injektionsart der Nukleinsäure-*in vivo*-jetPEI-Komplexe weitgehend die *target*-Organe. Nach einer intravenösen Injektion wird die Nukleinsäure von *in vivo*-jetPEI u.a. in Leber und Milz geliefert. Diese Organe wurden 5 Stunden nach Injektion der RNA und des Transfektionsreagenz entnommen. Die dort ausgelöste Typ-I-IFN Antwort wurde nach Isolierung der RNA und Umschreibung dieser in cDNA über RT-PCR untersucht (Abb. 3.19 und 3.20). In der Gruppe srsS ist eine Maus gestorben. Eine weitere Maus in dieser Gruppe hat keine Typ-I-IFN Antwort gezeigt. Diese wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass rli32 in beide Organe der Maus eine hohe IFN- β Antwort ausgelöst hat. In der Leber wurde eine ca. 10000fache (Abb. 3.19A) und in der Milz eine ca. 14000fache (Abb. 3.19B) IFN- β Induktion festgestellt. Insgesamt ist die IFN- β Antwort in der Milz höher ausgefallen als in der Leber. Anders als in den *in vitro* Transfektionsversuchen hat srsS in der Maus eine hohe IFN- β Antwort ausgelöst. In der Milz hat srsS eine höhere IFN- β Antwort ausgelöst (ca. 20000fache) als rli32 (Abb. 3.19B). Die eukaryotische RNA hat, anders als die beiden sRNAs, eine schwache IFN- β Antwort ausgelöst. Im Vergleich zu der eukaryotischen RNA zeigen beide sRNAs eine signifikant höhere IFN- β Induktion in beide Organe der Maus.

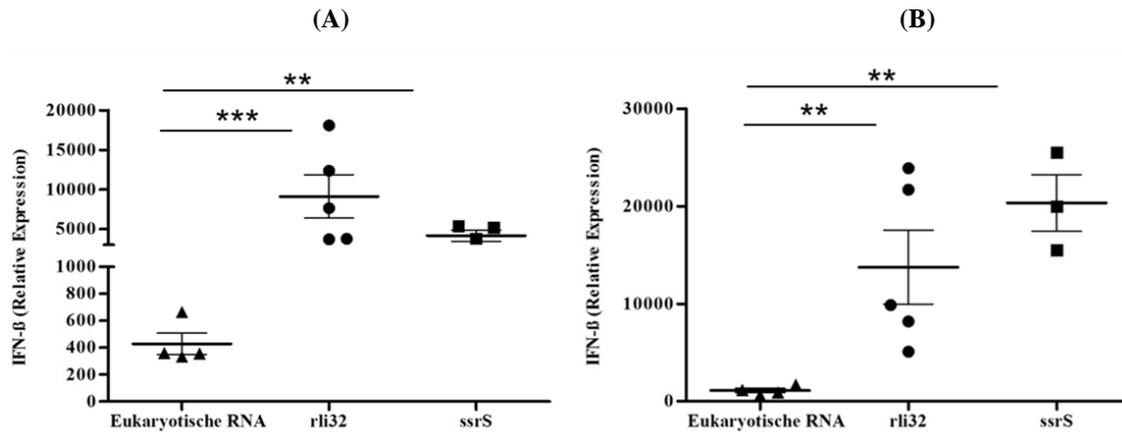


Abb. 3.19: Untersuchung der IFN- β Induktion durch rli32 und ssrS in Leber und Milz der Maus. Jeweils 40 μ g RNA (eukaryotische RNA, rli32 und ssrS) wurden intravenös in die Mäuse injiziert. 5 Stunden später wurde die IFN- β Induktion in Leber und Milz über RT-PCR untersucht. A: Hohe IFN- β Induktion durch rli32 und ssrS in der Leber. Rli32 hat zu einer ca. 10000fachen Induktion von IFN- β in der Leber geführt. SsrS hat mit einer ca. 5000fachen Induktion eine halb so hohe IFN- β Antwort ausgelöst. B: Höhere IFN- β Induktion durch ssrS als durch rli32 in der Milz. SsrS hat mit einer ca. 20000fachen Induktion eine höhere IFN- β Antwort in der Milz ausgelöst als rli32 (ca. 14000fache). (**P < 0,01; ***P < 0,001)

Die IFN- α 4 Antwort ist in beide Organe der Maus insgesamt schwächer ausgefallen als die IFN- β Antwort (Abb. 3.20). Diese zeigt allerdings ein ähnliches Induktionsmuster wie die zuvor beschriebene IFN- β Antwort. In der Milz ist die IFN- α 4 Antwort höher ausgefallen als in der Leber. Des Weiteren zeigt ssrS mit einer ca. 15000fachen Induktion eine höhere IFN- α 4 Antwort in der Milz als rli32 (ca. 10000fache) (Abb. 3.20B).

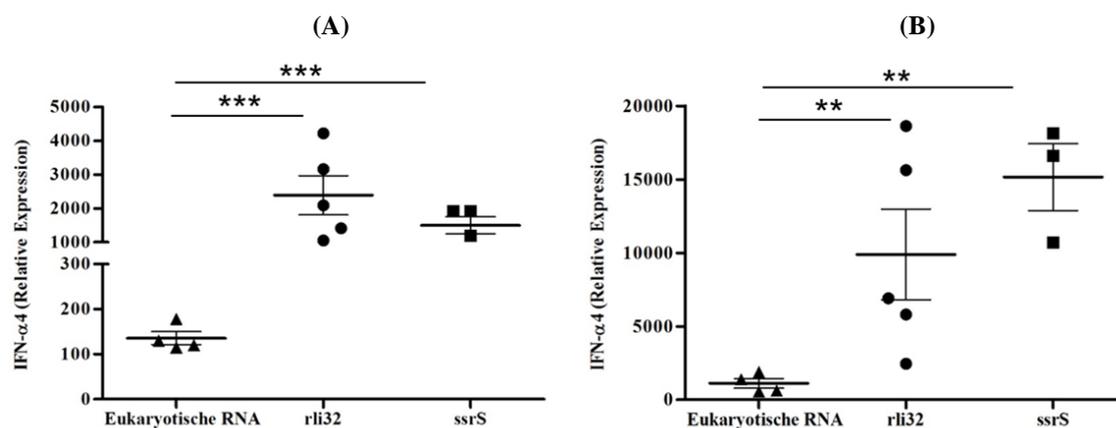


Abb. 3.20: Untersuchung der IFN- α 4 Induktion durch rli32 und ssrS in Leber und Milz der Maus. 5 Stunden nach der intravenösen Injektion von Mäusen mit jeweils 40 μ g eukaryotische RNA, rli32 und ssrS wurde die IFN- α 4 Induktion in Leber und Milz über RT-PCR untersucht. A: Hohe IFN- α 4 Induktion durch rli32 und ssrS in der Leber. Rli32 hat zu einer ca. 2500fachen und ssrS zu einer ca. 1500fachen Induktion von IFN- α 4 in der Leber geführt. B: Höhere IFN- α 4 Induktion durch ssrS als durch rli32 in der Milz. SsrS hat in der Milz zu einer höheren IFN- α 4 Induktion (ca. 15000fache) geführt als rli32 (ca. 10000fache). (**P < 0,01; ***P < 0,001)

3.1.9. Überexpression von rli32 und ssrS in *L. monocytogenes*

Die *in vitro* Transfektionsversuche haben gezeigt, dass einzelne in sec-RNA und MVs-RNA identifizierte sRNAs ein unterschiedliches IFN- β Induktionspotential besitzen. Unter den 23 ausgesuchten sRNAs hat sich rli32 als die sRNA mit dem höchsten IFN- β Induktionspotential herausgestellt. Im Laufe dieser Arbeit kam die Frage auf, ob eine Überexpression von rli32 in *L. monocytogenes* eine höhere IFN- β Antwort durch die sekretierten RNA-Fractionen und MVs in Wirtszellen auslöst. Um dies zu überprüfen, wurde rli32 in *L. monocytogenes* überexprimiert. In einem parallelen Ansatz wurde ssrS ebenfalls in *L. monocytogenes* überexprimiert. Hierfür wurde die Nukleotidsequenz der beiden sRNAs von chromosomaler DNA aus über PCR amplifiziert und mit dem *hly*-Promotor stromaufwärts und dem *hly*-Terminator stromabwärts von der kodierenden Sequenz ausgestattet. Anschließend wurden diese Transkriptionseinheiten in den pERL3-Vektor über Restriktionsverdau und Ligation kloniert. Durch Transformation von *L. monocytogenes* mit den pERL3-Vektoren mit entsprechender sRNA-Kassette wurden 2 Stämme konstruiert, die als *Lm*-pERL3-rli32 und *Lm*-pERL3-ssrS bezeichnet wurden. Es folgte die Isolierung von sec-RNA, MVs-RNA und zellulärer RNA der Stämme *Lm* (WT), *Lm*-pERL3-rli32 und *Lm*-pERL3-ssrS. Die RNA, die vom Wildtyp isoliert wurde, diente als Vergleich zu den beiden überexprimierenden Stämmen.

In einem weiteren Schritt wurde die Überexpression der beiden sRNAs in *L. monocytogenes* über RT-PCR überprüft. Zuvor wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in der Abb. 3.21 dargestellt. Der sogenannte Ct-Wert (*Cycle threshold*) auf der y-Achse ist ein Maß für die Quantität der untersuchten cDNA und damit der ursprünglich vorhandenen RNA in einer Probe. Je niedriger der Ct-Wert desto mehr DNA und infolgedessen desto mehr RNA ist in der untersuchten Probe vorhanden. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass die Überexpression von rli32 und ssrS in *L. monocytogenes* zu einem Anstieg der entsprechenden sRNA-Transkripte in allen 3 RNA-Fractionen der beiden Stämme geführt hat.

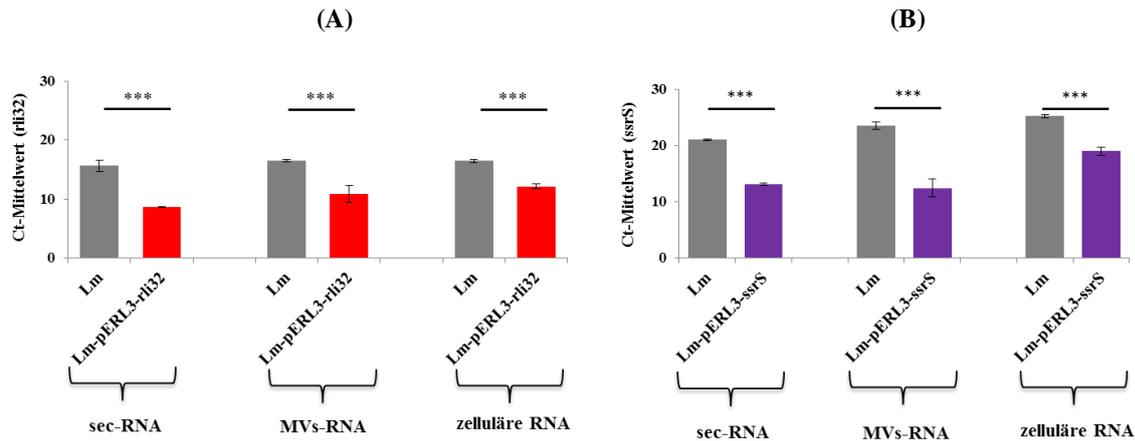


Abb. 3.21: Untersuchung der Überexpression von rli32 und ssrS in *L. monocytogenes*. Nach Überexpression der beiden sRNAs in *Lm* wurden die 3 RNA-Fractionen von *Lm*, *Lm*-pERL3-rli32 und *Lm*-pERL3-ssrS isoliert, in cDNA umgeschrieben und über RT-PCR untersucht. A: Anstieg der rli32-Transkripte in den RNA-Fractionen von *Lm*-pERL3-rli32. Die Überexpression von rli32 in *Lm* hat zu einem Anstieg der rli32-Transkripte in allen 3 RNA-Fractionen geführt. B: Anstieg der ssrS-Transkripte in den RNA-Fractionen von *Lm*-pERL3-ssrS. Die von *Lm*-pERL3-ssrS isolierte RNA zeigt einen Anstieg an ssrS in allen 3 Fractionen. (***) $P < 0,001$

3.1.9.1. Untersuchung der IFN- β Induktion durch sec-RNA und MVs-RNA in BMDMs

Nach dem rli32 und ssrS in *L. monocytogenes* erfolgreich überexprimiert worden sind, wurde das IFN- β Induktionspotential der isolierten RNA-Fractionen in BMDMs untersucht. Hierfür wurden jeweils 100 ng aus den 3 RNA-Fractionen der Stämme *Lm* (WT), *Lm*-pERL3-rli32 und *Lm*-pERL3-ssrS in die Zellen transfiziert. Nach einer Inkubation von 6 Stunden wurde die IFN- β Antwort über RT-PCR untersucht (Abb. 3.22). Von den 3 untersuchten Stämmen hat die von *Lm*-pERL3-rli32 isolierte RNA die höchste IFN- β Antwort ausgelöst. Sowohl die sekretierten RNA-Fractionen als auch die zelluläre RNA zeigen einen signifikanten Anstieg der IFN- β Induktion im Vergleich zu der RNA, die vom Wildtyp isoliert wurde. Dabei hat sec-RNA die höchste IFN- β Antwort ausgelöst, gefolgt von MVs-RNA und zelluläre RNA. Anders hingegen die Überexpression von ssrS in *L. monocytogenes*, die nicht zu einem Anstieg der IFN- β Induktion durch die sekretierten RNA-Fractionen geführt hat. Die sec-RNA, die von diesem Stamm isoliert wurde, zeigt eine signifikante Reduktion der IFN- β Induktion im Vergleich zu der RNA, die vom Wildtyp isoliert wurde.

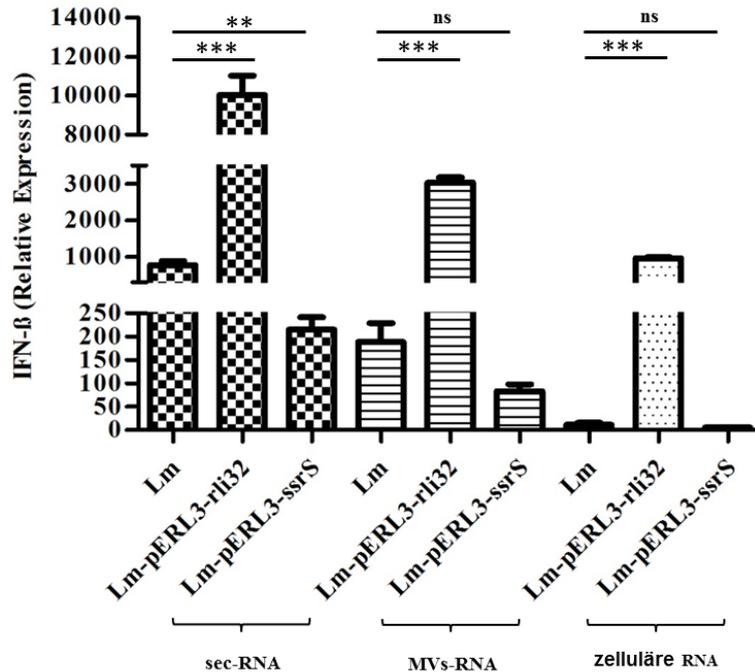


Abb. 3.22: Erhöhte IFN- β Induktion in BMDMs durch sec-RNA, MVs-RNA und zelluläre RNA nach Überexpression von rli32 in *L. monocytogenes*. Nach Überexpression von rli32 und ssrS in *Lm* wurden die 3 RNA-Fractionen von *Lm*, *Lm*-pERL3-rli32 und *Lm*-pERL3-ssrS isoliert und in BMDMs transfiziert. 6 Stunden später wurde die IFN- β Induktion über RT-PCR untersucht. Die von *Lm*-pERL3-rli32 isolierten RNA-Fractionen haben zu einem signifikanten Anstieg der IFN- β Induktion geführt. Die sec-RNA, die von *Lm*-pERL3-ssrS isoliert wurde, zeigt im Vergleich zu *Lm* eine signifikante Abnahme der IFN- β Induktion. (**P < 0,01; ***P < 0,001; ns = nicht signifikant)

3.1.9.2. Untersuchung der IFN- β Induktion durch sec-RNA und MVs-RNA in HEK293-Zellen

In einem weiteren Versuch wurde das IFN- β Induktionspotential der RNA, die aus den 3 Fraktionen der Stämme *Lm* (WT), *Lm*-pERL3-rli32 und *Lm*-pERL3-ssrS isoliert wurde, in HEK293-Zellen untersucht. Hierfür wurden, wie zuvor in BMDMs, jeweils 100 ng RNA in die Zellen transfiziert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde die IFN- β Antwort über RT-PCR untersucht (Abb. 3.23). Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass die von *Lm*-pERL3-rli32 isolierten RNA-Fractionen einen signifikanten Anstieg der IFN- β Antwort im Vergleich zu der RNA, die vom Wildtyp isoliert wurde, ausgelöst hatten. Anders als in BMDMs hat MVs-RNA eine höhere IFN- β Antwort ausgelöst als sec-RNA. Des Weiteren hat auch die Überexpression von ssrS in *L. monocytogenes* zu einem signifikanten Anstieg der IFN- β Induktion durch die sekretierten RNA-Fractionen geführt.

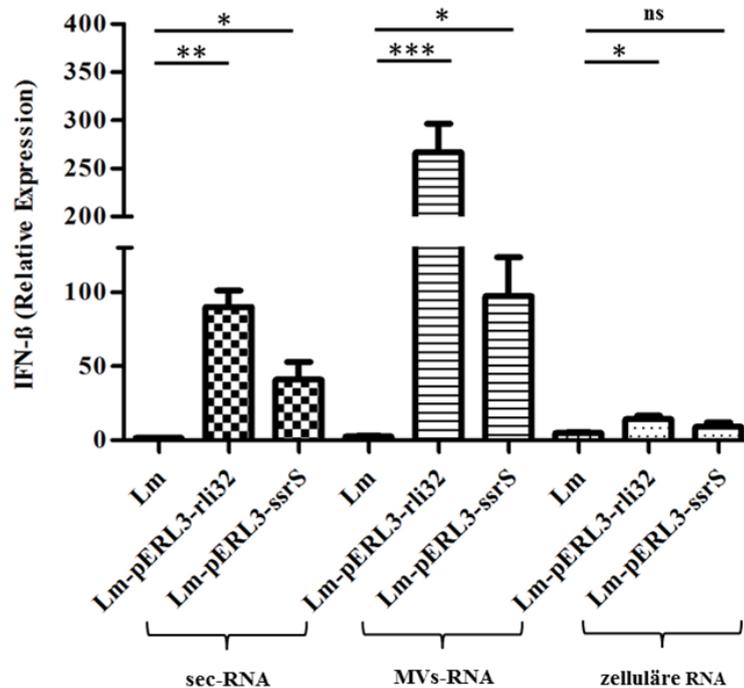


Abb. 3.23: Erhöhte IFN- β Induktion in HEK293-Zellen durch die sekretierten RNA-Fraktionen nach Überexpression von rli32 und ssrS in *L. monocytogenes*. Nach Überexpression von rli32 und ssrS in *Lm* wurden die 3 RNA-Fraktionen von *Lm*, *Lm*-pERL3-rli32 und *Lm*-pERL3-ssrS isoliert und in HEK293-Zellen transfiziert. 24 Stunden später wurde die IFN- β Antwort über RT-PCR untersucht. Die Überexpression von rli32 in *Lm* hat zu einem signifikanten Anstieg der IFN- β Induktion durch die sekretierten RNA-Fraktionen geführt. Die sekretierten RNA-Fraktionen von *Lm*-pERL3-ssrS haben ebenfalls einen signifikanten Anstieg der IFN- β Antwort ausgelöst. (*P <0,05; **P <0,01; ***P <0,001; ns = nicht signifikant)

3.1.9.3. Untersuchung der Abhängigkeit der IFN- β Induktion durch sec-RNA und MVs-RNA von dem Rezeptor RIG-I

Als nächstes wurde die Abhängigkeit der IFN- β Antwort, die von den sekretierten RNA-Fraktionen der beiden überexprimierenden Stämme in HEK293-Zellen ausgelöst wurde, von dem Rezeptor RIG-I untersucht. Hierfür wurden jeweils 100 ng aus den 3 RNA-Fraktionen der Stämme *Lm* (WT), *Lm*-pERL3-rli32 und *Lm*-pERL3-ssrS in RIG-I-defiziente HEK293-Zellen transfiziert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde die IFN- β Antwort über RT-PCR untersucht. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist in der Abb. 3.24 dargestellt. Es zeigt, dass in RIG-I-defiziente Zellen die IFN- β Antwort, die von den sekretierten RNA-Fraktionen der beiden überexprimierenden Stämme in Wildtypzellen ausgelöst wurde, nahezu ausgeblieben ist.

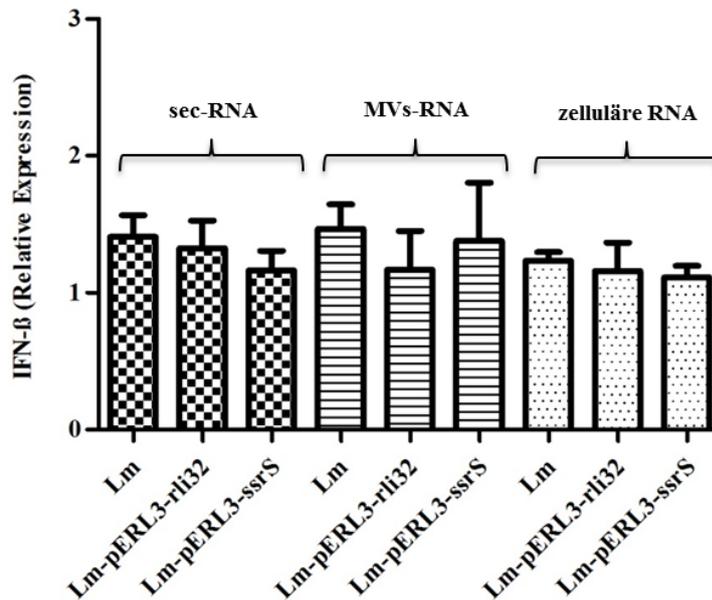


Abb. 3.24: RIG-I-Abhängigkeit der IFN- β Antwort in HEK293-Zellen durch die sekretierten RNA-Fraktionen von *Lm-pERL3-rli32* und *Lm-pERL3-ssrS*. Die von *Lm*, *Lm-pERL3-rli32* und *Lm-pERL3-ssrS* isolierten RNA-Fraktionen, sec-RNA, MVs-RNA und zelluläre RNA, wurden in HEK293 RIG-I^{-/-}-Zellen transfiziert. Die über RT-PCR untersuchte IFN- β Induktion 24 Stunden nach der Transfektion zeigt, dass diese in RIG-I-defiziente Zellen nahezu ausgeblieben ist.

3.1.9.4. Untersuchung der Fähigkeit von MVs IFN- β zu induzieren

Die Überexpression von *rli32* in *L. monocytogenes* hat zu einem Anstieg der IFN- β Induktion durch die RNA, die aus den MVs isoliert wurde (MVs-RNA), geführt (Abb. 3.22 und 3.23). In einem weiteren Versuch wurde untersucht, ob der Anstieg an *rli32*-Transkripte das immunstimulatorische Potential der MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, erhöht. Hierfür wurden BMDMs mit jeweils 10 μ g MVs, die von *Lm* (WT), *Lm-pERL3-rli32* und *Lm-pERL3-ssrS* isoliert wurden, für 6 Stunden inkubiert. Anschließend wurde nach Lyse der Zellen die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die von den MVs ausgelöste IFN- β Antwort wurde über RT-PCR untersucht (Abb. 3.25). Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt, dass die Überexpression von *rli32* das IFN- β Induktionspotential der MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, erhöht hat. Die von *Lm-pERL3-rli32* isolierten MVs zeigen eine ca. 7,5fach höhere IFN- β Induktion als die MVs, die vom Wildtyp isoliert wurden. Die MVs hingegen, die von *Lm-pERL3-ssrS* isoliert wurden, zeigen ein schwächeres Potential IFN- β zu induzieren als die MVs vom Wildtyp.

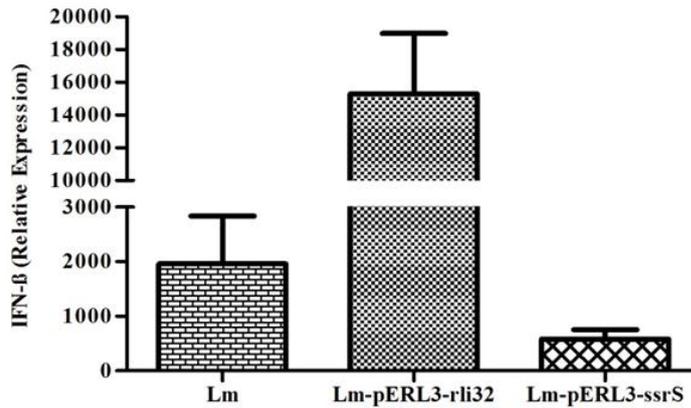


Abb. 3.25: Erhöhte IFN- β Induktion in BMDMs durch MVs nach Überexpression von rli32 in *L. monocytogenes*. BMDMs wurden mit jeweils 10 μ g MVs, die von *Lm*, *Lm-pERL3-rli32* und *Lm-pERL3-ssrS* isoliert wurden, inkubiert. 6 Stunden später wurde die IFN- β Antwort über RT-PCR untersucht. Die Überexpression von rli32 in *Lm* hat zu einem Anstieg der IFN- β Induktion durch die MVs geführt. Die von *Lm-pERL3-ssrS* isolierten MVs zeigen eine reduziertere IFN- β Antwort als die MVs, die vom Wildtyp isoliert wurden.

3.2. Charakterisierung der von *L. monocytogenes* produzierten MVs

3.2.1. Elektronenmikroskopische Visualisierung von *L. monocytogenes* und isolierten MVs

Eine erste Charakterisierung der MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, wurde durch Elektronenmikroskopie (EM) durchgeführt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Manfred Rohde (Zentrale Einheit für Mikroskopie, Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig) durchgeführt. Die durch Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) erzielten Bilder zeigen, dass die von *L. monocytogenes* produzierten MVs eine sphärisch geformte Struktur haben (Abb. 3.26A und 3.26B). Diese scheint von einer doppelschichtigen Membranhülle begrenzt zu sein. Des Weiteren enthüllt die Visualisierung der isolierten MVs durch TEM, dass diese nicht einheitlich sind, bezüglich ihrer Größe. Eine MVs-Isolierung enthält sowohl kleinere als auch größere MVs. Dies wird durch Rasterelektronenmikroskopie (REM) von *L. monocytogenes* bestätigt (Abb. 3.26C und 3.26D). Die hierdurch erzielten Bilder zeigen unterschiedlich große MVs, die über die gesamte Oberfläche der Bakterien verteilt sind.

Für die EM müssen biologische Proben zur Erzeugung des notwendigen Bildkontrasts durch Anlagerung von Schwermetallen gefärbt (kontrastiert) werden. Dies führt allerdings zum Schrumpfen der Proben und häufig zur Bildung von Eindellungen, weshalb sich die EM nicht zur Größenbestimmung eignet. Für die Größenbestimmung der MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, wurde eine relativ neue

Technologie, die NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*), verwendet. Die NTA wurde erstmals im Jahr 2011 von unabhängigen Gruppen für die Charakterisierung von eukaryotischen Exosomen genutzt und beschrieben. Seitdem wird diese Technologie für die Größenbestimmung von Vesikeln allgemein verwendet (Sokolova et al, 2011; Dragovic et al, 2011).

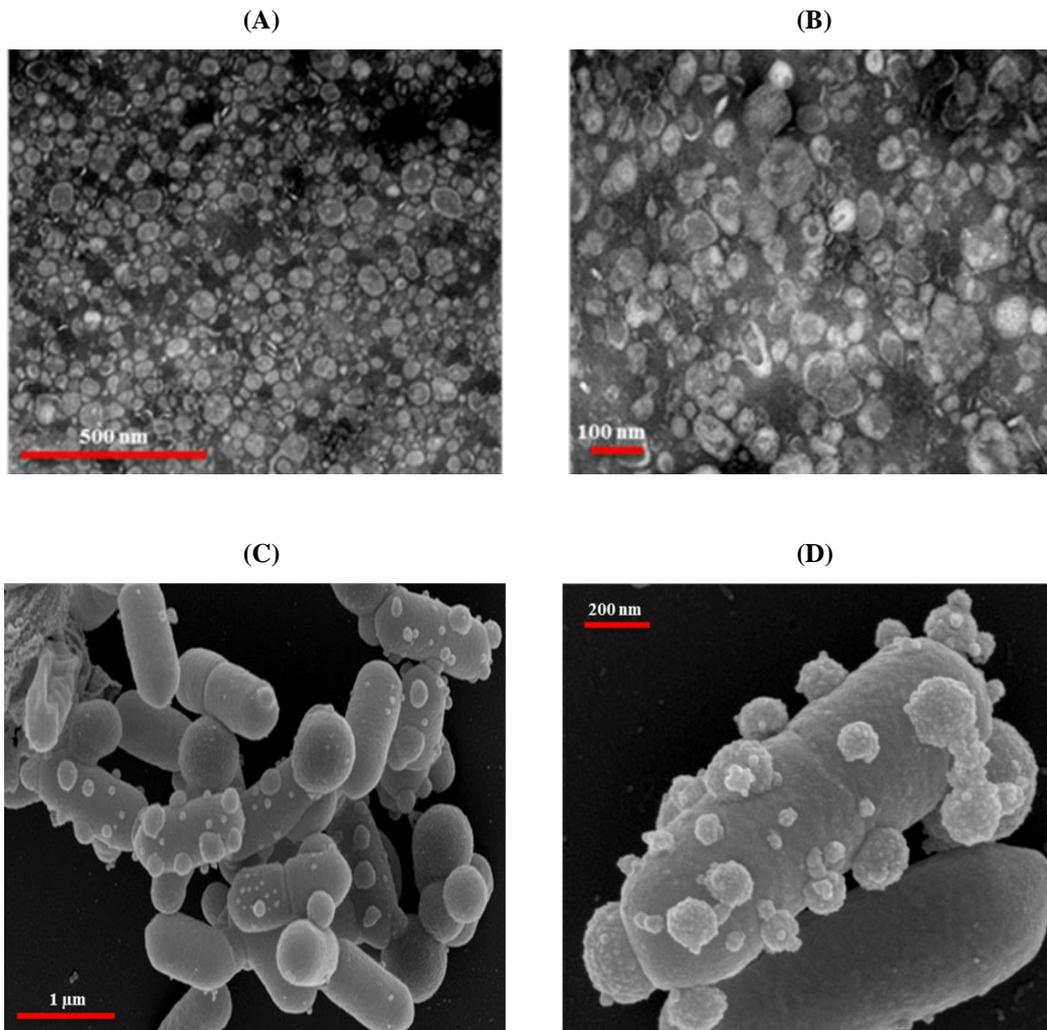


Abb. 3.26: Visualisierung von MVs und *L. monocytogenes* durch Elektronenmikroskopie. A und B: TEM-Aufnahmen von *Lm*-MVs. Die MVs wurden von *Lm*-Kulturen isoliert, die in Minimalmedium bis OD_{600nm} von 1 gezüchtet wurden. Eine MVs-Isolierung enthält unterschiedlich große MVs mit einer sphärisch geformten Struktur. C und D: SEM-Aufnahmen von *Lm*. Sphärisch geformte MVs sind über die gesamte Oberfläche der Bakterien verteilt.

3.2.2. Bestimmung der Größe, Anzahl und Proteinkonzentration von isolierten MVs

Die Größe der von *L. monocytogenes* produzierten MVs wurde durch NTA mittels NanoSight-Gerät bestimmt. Diese Technologie ermöglicht die Detektion und Verfol-

gung (*tracking*) einzelner Nanopartikel, die sich aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung stets in Bewegung befinden. Die Partikel werden mit einem Laser angestrahlt, wobei das gestreute Licht von einem Mikroskop erfasst und von einer Videokamera aufgezeichnet wird. Die Software berechnet mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung den hydrodynamischen Durchmesser der einzelnen Partikel.

Die NTA-Analyse hat ergeben, dass die von *L. monocytogenes* produzierten MVs eine durchschnittliche Größe von $130,7 \pm 1,0$ nm haben (Abb. 3.27A). Da mit dieser Technologie einzelne Partikel sichtbar gemacht werden können, kann eine direkte Bestimmung der Anzahl von Nanopartikeln in einer Probe erfolgen (Abb. 3.27A). Die Anzahl der MVs, die aus 2 L *L. monocytogenes*-Kulturen isoliert wurden, beträgt laut NTA-Analyse ca. 70×10^9 . Des Weiteren liefert die NTA einen unmittelbaren visuellen Eindruck der Proben und lässt somit Rückschlüsse auf deren Beschaffenheit zu (Abb. 3.27B).

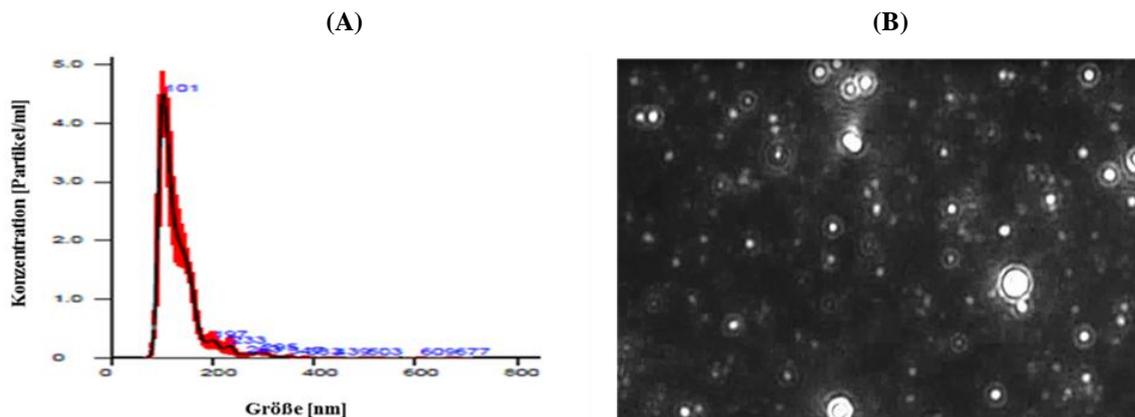


Abb. 3.27: Größenbestimmung, Zählung und Visualisierung von MVs durch Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). A: Größenbestimmung und Zählung von *Lm*-MVs mittels NTA. Die von *Lm* produzierten MVs haben eine durchschnittliche Größe von $130,7 \pm 1,0$ nm. Die Anzahl der MVs, die aus 2 L *Lm*-Kulturen isoliert wurden, beträgt ca. 70×10^9 . B: Repräsentatives Bild der NTA. Videostandbild von MVs, die sich aufgrund der Brown'schen Molekularbewegung unregelmäßig und ruckartig in Lösung bewegen.

Darüber hinaus wurde die Proteinkonzentration der MVs mit der Bradford-Methode, die zur quantitativen Bestimmung von bakteriellen Vesikeln verwendet wird, bestimmt (Kaparakis et al, 2010; Lee et al, 2012; Olaya-Abril et al, 2014). Demnach beträgt die Proteinkonzentration der MVs, die aus 2 L *L. monocytogenes*-Kulturen isoliert wurden, 150-200 μg .

3.2.3. Proteomanalyse (Massenspektrometrie) von MVs

Die Identifizierung der Proteine in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, erfolgte über Massenspektrometrie (MS). Gleichzeitig wurde eine markierungsfreie relative Proteinquantifizierung durchgeführt. Diese basierte auf den Vergleich der identifizierten MS/MS-Spektren eines Proteins zwischen LC-MS/MS-Läufen (*spectral counting*) und den zur Normalisierung herangezogenen NSAF-Wert (*normalized spectral abundance factor*) (Zybailov et al, 2005; Zybailov et al, 2006; Zhu et al, 2010). Die MS-Analyse wurde von Dr. Andreas Otto und Prof. Dr. Dörte Becher (Institut für Mikrobiologie, Abteilung für Mikrobielle Proteomics und Massenspektrometrie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald) durchgeführt.

Die MS-Analyse führte zur Identifizierung von insgesamt 612 Proteinen in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs. Für weitere Analysen wurden ausschließlich Proteine verwendet, die in mindestens 2 von 3 biologischen Replikaten identifiziert worden sind. Nach Abzug der Proteine, die nur in eine MVs-Isolierung identifiziert worden sind, wurden die restlichen 516 Proteine näher analysiert (Tab. 3). Anhand des NSAF-Wertes wurde der Anteil jedes Proteins an der Gesamtmasse der Proteine in den MVs in % berechnet.

3.2.3.1. Klassifizierung der MVs-Proteine nach Funktion

Um herauszufinden welche zelluläre Funktion die in den MVs identifizierten Proteine haben, wurde eine funktionelle Klassifizierung durchgeführt. Hierfür wurde die EggNOG 4.5.1-Datenbank (*evolutionary genealogy of genes: Non-supervised Orthologous Groups*), die auf der COG-Ontologie basiert, verwendet (Jensen et al, 2008; Huerta-Cepas et al, 2016). Jedes COG (*Cluster of Orthologous Groups*) enthält orthologe Proteine aus mindestens 3 unterschiedlichen Spezies. Sämtliche COGs werden dabei in 25 funktionelle Kategorien, die eine Vielzahl von biologischen Prozessen in der Zelle beschreiben, eingeteilt (Tab. 1). Diese werden den folgenden funktionellen Gruppen zugeordnet: Metabolismus, Zelluläre Prozesse und Signale sowie Informationsspeicherung und -prozessierung. In der Gruppe Wenig charakterisiert werden Proteine eingeteilt, die nur eine allgemeine Funktion beschrieben haben oder deren Funktion unbekannt ist. Die Proteine für die es in der EggNOG 4.5.1-Datenbank kein Treffer gibt, werden der Gruppe Kein Ortholog gefunden zugeordnet. Für jede

funktionelle Kategorie und Gruppe, die in den MVs vertreten ist, wurde anhand des NSAF-Wertes der Anteil an Proteine in % berechnet (Tab. 2).

Die Abb. 3.28 zeigt, dass mehr als ein Drittel (37,37%) der Proteine in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs eine Funktion im Metabolismus beschrieben haben. Die zweithäufigsten Proteine in den MVs mit 26,44% gehören der Gruppe Wenig charakterisiert an. In der Gruppe Zelluläre Prozesse und Signale sind knapp 15% der Proteine in den MVs eingeteilt worden. Es folgen die Proteine, die eine Funktion in der Gruppe Informationsspeicherung und -prozessierung beschrieben haben, mit 10,55%. Für 11% der Proteine in den MVs hat die EggNOG 4.5.1-Datenbank kein Ortholog gefunden.

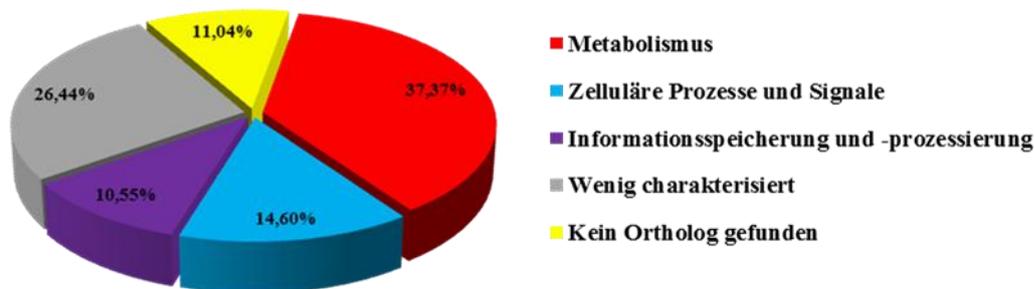


Abb. 3.28: Funktionelle Klassifizierung der MVs-Proteine unter Verwendung der EggNOG 4.5.1-Datenbank. Die über MS-Analyse identifizierte Proteine in den MVs, die von *Lm* produziert werden, wurden in 3 funktionelle Gruppen eingeteilt. Des Weiteren sind 26,44% der MVs-Proteine nur wenig charakterisiert. Für 11% der Proteine in den MVs hat die EggNOG 4.5.1-Datenbank kein Ortholog gefunden.

MVs-Proteine, die im Metabolismus involviert sind

Die meisten über MS-Analyse in den MVs identifizierte Proteine (37,37%) haben eine Funktion im Metabolismus beschrieben (Abb. 3.28). Diese Gruppe umfasst 8 funktionelle Kategorien (Tab. 1). Hierzu werden Proteine, die in den Transport und im Stoffwechsel von verschiedenen Biomolekülen, Coenzymen, anorganische Ionen und Sekundärmetaboliten involviert sind, eingeteilt. Die Abb. 3.29 zeigt den Anteil der Proteine, die in den verschiedenen funktionellen Kategorien dieser Gruppe eingeteilt worden sind.

Die Proteine, die in den Transport von anorganischen Ionen und deren Metabolismus (funktionelle Kategorie P) involviert sind, machen mit 11,21% den höchsten Anteil einer beschriebenen Funktion in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs aus. Allerdings gehört das häufigste Protein in den MVs, die von *L. monocytogenes* während

des Wachstums in Minimalmedium unter aeroben Bedingungen produziert werden, mit einem Anteil von 8% dieser funktionellen Kategorie an. Es handelt sich hierbei um das Dps-Protein (*DNA protection during starvation protein*) auf das später in dieser Arbeit näher eingegangen wird (Abschnitt 3.2.3.3). Weitere Proteine, die in der funktionellen Kategorie P eingeteilt worden sind, sind beispielsweise die Katalase (*kat*, Imo2785) und die Superoxid-Dismutase (*sodA*, Imo1439), die ähnlich wie das Dps-Protein Schutz vor oxidativem Schaden vermitteln (Tab. 3) (Vasconcelos und Deneer, 1994; Myers und Martin, 1994).

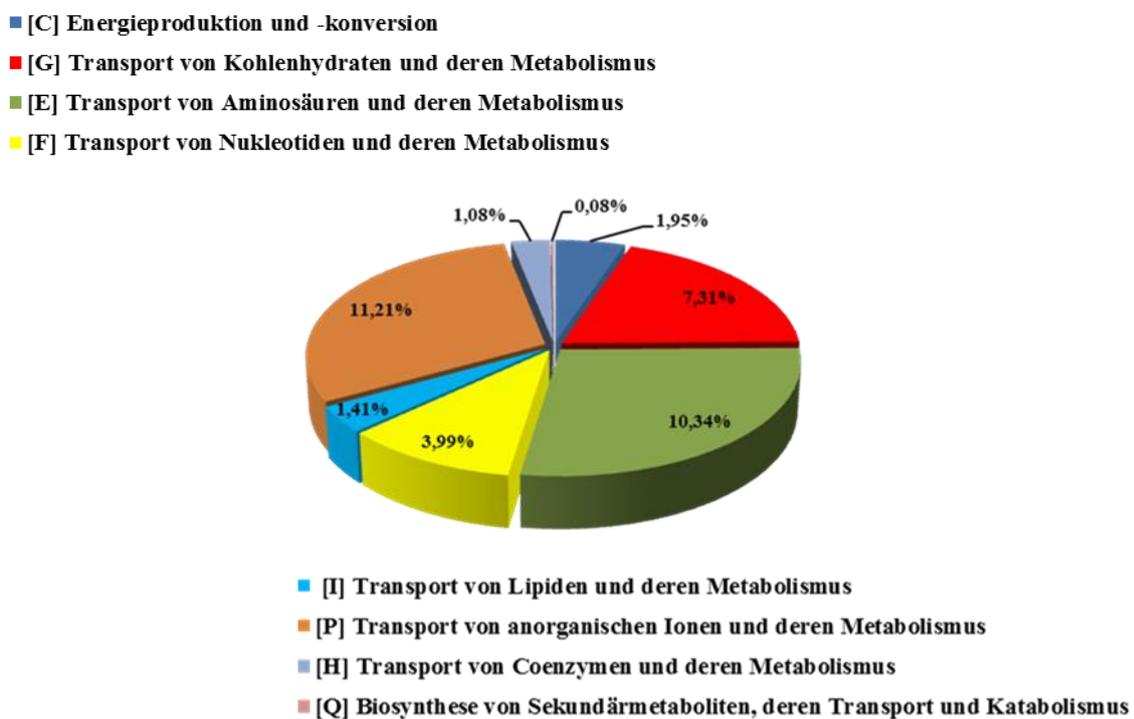


Abb. 3.29: Einteilung der MVs-Proteine in funktionelle Kategorien der Gruppe Metabolismus. Basierend auf der EggNOG 4.5.1-Klassifizierung sind die häufigsten beschriebenen Funktionen in den MVs, die von *Lm* produziert werden, der Transport und Metabolismus von anorganischen Ionen (11,21%), Aminosäuren (10,34%) und Kohlenhydraten (knapp 10%).

Die zweithäufigste beschriebene Funktion in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, ist der Transport von Aminosäuren und deren Metabolismus (funktionelle Kategorie E). Insgesamt 10,34% der Proteine in den MVs sind in diese funktionelle Kategorie eingeteilt worden. Hierzu zählt OppA, eines der häufigsten Proteine in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs, mit einem Anteil von 1,22% (Abschnitt 3.2.3.3). Darüber hinaus sind weitere ABC-Transporter über MS-Analyse in den MVs identifiziert worden (Tab. 3). Hierzu zählen verschiedene Bestandteile zweier in *L. monocytogenes* osmotisch regulierten Transportsysteme für osmoprotektive

Substanzen, der Glycin-Betain Transporter Gbu und der Carnitin-Transporter OpuC (Ko und Smith, 1999; Fraser et al, 2000). Zu dieser funktionellen Kategorie zählen des Weiteren 2 Enzyme, die über α -Ketoglutarat den Kohlenhydratstoffwechsel mit der Fixierung von Ammonium verbinden, Glutamat-Dehydrogenase (Imo0560) und Glutamin-Synthetase (*glnA*, Imo1299) (Tab. 3).

Die Proteine in den funktionellen Kategorien C (Energieproduktion und -konversion) und G (Transport von Kohlenhydraten und deren Metabolismus) ergeben gemeinsam knapp 10% und stellen damit die dritthäufigste beschriebene Funktion in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs dar. In diese funktionellen Kategorien eingeteilte Proteine sind in den Transport und im Stoffwechsel von Kohlenhydraten zur Energiegewinnung involviert. Diese Arbeit hat MVs untersucht, die von *L. monocytogenes* während des Wachstums in Minimalmedium mit Glukose als Energiequelle unter aeroben Bedingungen produziert werden. Unter diesen Bedingungen wird Glukose über die Glykolyse und den Pentosephosphat-Weg zur Energiegewinnung und Bereitstellung von Vorstufen für Biosynthesen abgebaut (Müller-Herbst et al, 2014). Sämtliche Enzyme beider Stoffwechselwege sind über MS-Analyse in den MVs identifiziert worden (Tab. 3). Das aus der Glykolyse resultierende Pyruvat wird unter aeroben Bedingungen zum Teil durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex (*pdhABCD*), der ebenfalls in den MVs identifiziert worden ist, zu Acetyl-CoA oxidiert und in den Citrat-Zyklus eingeschleust (Kim et al, 2006). Verschiedene Enzyme, sowohl des oxidativen als auch des reduktiven Zweigs des Citrat-Zyklus, sind in den MVs identifiziert worden (Tab. 3). Darüber hinaus sind verschiedene Bestandteile der Atmungskette, die in *L. monocytogenes* relativ einfach aufgebaut ist, über MS-Analyse in den MVs identifiziert worden (Tab. 3) (Glaser et al, 2001; Patchett et al, 1991). Hierzu zählen 2 NADH-Dehydrogenasen, Imo2389 und Imo2638, die durch Oxidation Reduktionsäquivalente regenerieren und gleichzeitig Elektronen in die Atmungskette einschleusen. Verschiedene Bestandteile der beiden terminalen Oxidasen, *cytochrome aa3* (*qoxABCD*) und *cytochrome bd* (*cydABCD*), die diese Elektronen auf Sauerstoff übertragen, zählen ebenfalls dazu (Müller-Herbst et al, 2014).

Des Weiteren sind Enzyme der Substratkettenphosphorylierung, die von *L. monocytogenes* auch unter aeroben Bedingungen genutzt wird, in den MVs identifiziert worden (Tab. 3). Hierzu zählen Fumarat-Reduktase (Imo0355) und Laktat-Dehydrogenasen

(*ldh1*, Imo0210 und *ldh2*, Imo1534), deren Aktivität zur Oxidation von Reduktionsäquivalenten und Bildung von Säuren führt (Romick et al, 1996).

Verschiedene Transporter für Kohlenhydrate, die über MS-Analyse in den MVs identifiziert worden sind, sind ebenfalls in den funktionellen Kategorien C und G eingeteilt worden (Tab. 3). Hierzu zählen beispielsweise verschiedene Bestandteile zweier Phosphotransferase-Systeme (PTS), PTS^{Man}-2/Mpt (*mptACD*, Imo0096-0098) und PTS^{Man}-3/Mpo (*mpoABCD*, Imo0781-0784). Diese Transporter befördern zusätzlich zur Mannose auch Glukose (Stoll und Goebel, 2010). Ein weiterer in den MVs identifizierter Transporter für Glukose ist der PrfA-regulierte Hexose-Phosphat-Transporter UhpT (*uhpT*, Imo0838), der während des Wachstums von *L. monocytogenes* im Cytosol der Wirtszellen eine essentielle Rolle spielt (Chico-Calero et al, 2002).

MVs-Proteine, die in Zelluläre Prozesse und Signale involviert sind

Knapp 15% der Proteine in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, haben eine Funktion in der Gruppe Zelluläre Prozesse und Signale beschrieben (Abb. 3.28). Diese Gruppe umfasst 10 funktionelle Kategorien (Tab. 1). Die funktionellen Kategorien Nukleäre Struktur [Y], Zytoskelett [Z] und Extrazelluläre Strukturen [W] sind in den MVs nicht vertreten. Die restlichen funktionellen Kategorien umfassen Proteine, die in verschiedene zelluläre Prozesse, darunter Biogenese der Zellwand und Cytoplasmamembran, Proteinsekretion, Signaltransduktion und Verteidigung, involviert sind. In der Abb. 3.30 sind die verschiedenen funktionellen Kategorien und der jeweilige Anteil an Proteine in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs dargestellt. Die Proteine, die in der funktionellen Kategorie M (Biogenese der Zellwand/Membran/Hülle) eingeteilt worden sind, gehören mit 7,10% zu der vierthäufigsten beschriebenen Funktion in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs. Hierbei handelt es sich um Proteine, die überwiegend in der Umgestaltung (*remodeling*) der Zelloberfläche, ein für Zellwachstum und Zellteilung essentieller Prozess, involviert sind (Tab. 3). Dieser Prozess beinhaltet u.a. ein koordiniertes Zusammenspiel von Abbau und Biosynthese der Zellwand durch die entsprechenden Enzyme. In den von *L. monocytogenes* produzierten MVs sind Enzyme, die an beide Vorgänge beteiligt sind, über MS-Analyse identifiziert worden. So zählen beispielsweise MurA (Imo2691), Ami (*ami*, Imo2558), P60 (*iap*, Imo0582) und P45

(*spl*, Imo2505) zu den Autolysinen, die als Zellwandhydrolasen die Spaltung von kovalenten Bindungen katalysieren (Carvalho et al, 2014). Die Penicillin-bindende Proteine (PBP), PBPA1 (*pbpA*, Imo1892), PBPA2 (Imo2229), PBPB1 (Imo1438) und PBPB2 (*pbpB*, Imo2039), hingegen zählen zu den Enzymen, die in der Zellwandsynthese involviert sind (Bierne und Cossart, 2007). Das DltD-Protein (*dltD*, Imo0971), das als Teil des *dlt*-Operons in der Modifikation von Lipoteichonsäuren der Zellwand involviert ist, ist ebenfalls in diese funktionelle Kategorie eingeteilt worden (Abachin et al, 2002).

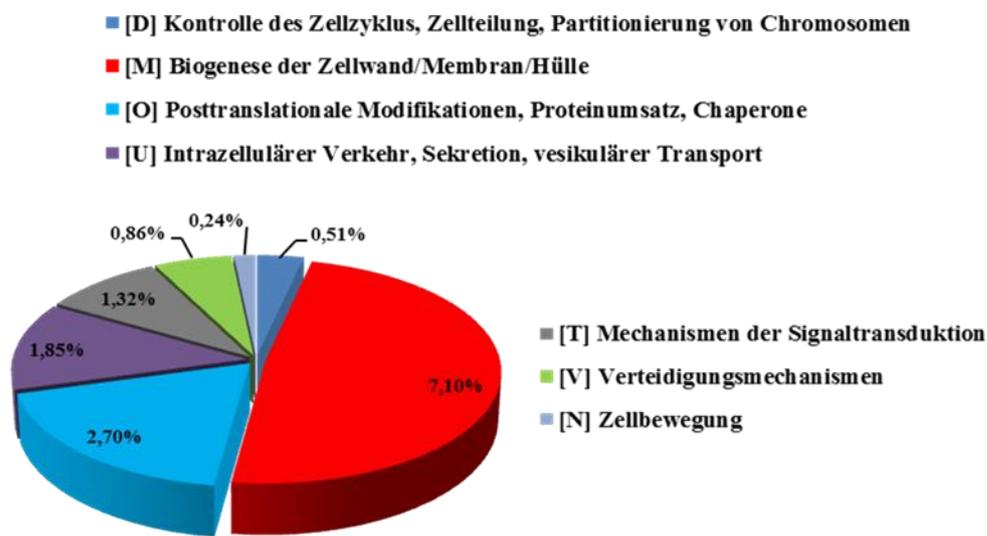


Abb. 3.30: Einteilung der MVs-Proteine in funktionelle Kategorien der Gruppe Zelluläre Prozesse und Signale. Basierend auf der EggNOG 4.5.1-Klassifizierung sind 7,10% der Proteine in den MVs, die von *Lm* produziert werden, in der Biogenese der Zellwand und der Cytoplasmamembran [M] involviert. Die funktionellen Kategorien Zellteilung [D], Verteidigung [V] und Zellbewegung [N] sind in den MVs unterrepräsentiert.

In der funktionellen Kategorie U (Intrazellulärer Verkehr, Sekretion, vesikulärer Transport) sind Bestandteile des generellen Sekretionswegs, der Sec-Translokase, die über MS-Analyse in den MVs identifiziert worden sind, eingeteilt worden (Tab. 3). Hierzu zählen die Komponenten SecY (Imo2612), SecDF (Imo1527), YajC (Imo1529), YidC1 (Imo1379) und YidC2 (Imo2854), die den Proteinkanal der Sec-Translokase in der Cytoplasmamembran bilden. Eine zentrale Komponente der Translokase, die SecA-ATPase (Imo2510), ist ebenfalls in den MVs identifiziert worden. Diese katalysiert durch ATP-Hydrolyse die Translokation von sekretorischen Proteinen nach Bindung an deren N-terminalen Signalsequenz. Die Signalpeptidasen des Typ I, SipX (Imo1269), SipY (Imo1270) und SipZ (Imo1271), die während oder kurz nach der Translokation der

Proteine das Signalpeptid abspalten, sind ebenfalls in den MVs identifiziert worden (Desvaux und Hébraud, 2006). Weitere in diesem Prozess involvierte Proteine, die über MS-Analyse in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs identifiziert worden sind, sind Chaperone, die das *targeting* von sekretorischen Proteinen zur Sec-Translokase vermitteln (Tab. 3). Hierzu zählen PrsA2 (*prsA2*, Imo2219), DnaK (*dnaK*, Imo1473), GroEL (*groEL*, Imo2068) und GroES (*groES*, Imo2069) (Desvaux und Hébraud, 2006; Beha et al, 2003). PrsA2 gehört mit einem Anteil von 1,34% zu den häufigsten Proteinen in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden (Abschnitt 3.2.3.3). Diese Chaperone sind in der funktionellen Kategorie O (Posttranslationale Modifikationen, Proteinumsatz, Chaperone) eingeteilt worden.

Zu den Proteinen, die eine Funktion in der Signaltransduktion (funktionelle Kategorie T) beschreiben haben, gehört beispielsweise das RNA-bindende Protein Hfq (Imo1295) mit einem Anteil von 0,66% (Tab. 3). Dieses RNA-Chaperon hat eine Schlüsselfunktion in der post-transkriptionellen Genregulation, indem es die Stabilität und Bindung von sRNAs an deren mRNA-*targets* vermittelt (Møller et al, 2002; Geissmann und Touati, 2004).

Die funktionelle Kategorie V (Verteidigungsmechanismen) umfasst 17 Proteine, die mit einem Anteil von 0,86% zu den unterrepräsentierten Proteinen in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, gehören (Tab. 3). Hierzu zählen überwiegend ABC-Transporter, darunter die Strukturproteine BceA (Imo2114) und BceB (Imo2115) des BceAB-Transporters, der Resistenz gegen das Antibiotikum Bacitracin vermittelt (Bernard et al, 2007; Rietkötter et al, 2008).

MVs-Proteine, die in der Speicherung, Weitergabe und Umsetzung der genetischen Information involviert sind

In der funktionellen Gruppe Informationsspeicherung und -prozessierung sind 10,55% der MVs-Proteine, die über MS-Analyse identifiziert worden sind, eingeteilt worden (Abb. 3.28). Diese Gruppe umfasst 5 funktionelle Kategorien (Tab. 1). Die funktionellen Kategorien RNA-Prozessierung und -Modifikation [A] sowie Chromatinstruktur und deren Dynamik [B] sind in den MVs nicht vertreten. Die restlichen funktionellen Kategorien umfassen Proteine, die in der Replikation, Rekombination, Reparatur und Transkription der DNA sowie Ribosomen-Aufbau und Proteinsynthese involviert sind (Abb. 3.31).

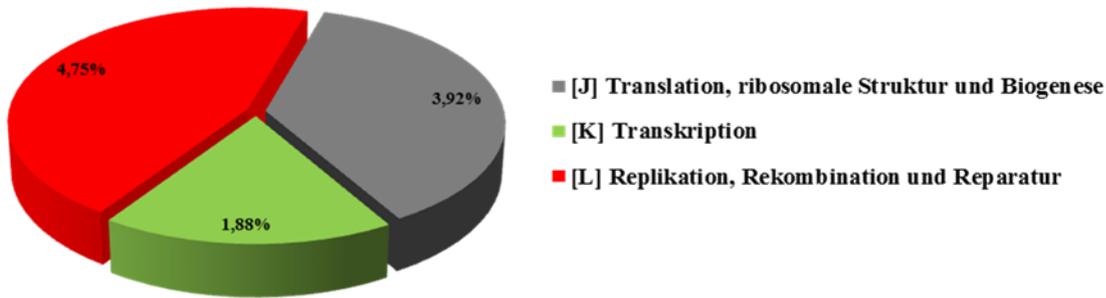


Abb. 3.31: Einteilung der MVs-Proteine in funktionelle Kategorien der Gruppe Informationsspeicherung und -prozessierung. Laut EggNOG 4.5.1-Datenbank sind 10,55% der Proteine in den MVs, die von *Lm* produziert werden, an der Speicherung und Weitergabe der genetischen Information [L und K] sowie Ribosomen-Aufbau und Proteinsynthese [J] beteiligt.

In der funktionellen Kategorie L (Replikation, Rekombination und Reparatur) ist eines der häufigsten Proteine, das in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs identifiziert worden ist, eingeteilt worden. Es handelt sich hierbei um das SSB2-Protein (*Single-stranded DNA-binding protein 2*) mit einem Anteil von 3,58% (Abschnitt 3.2.3.3). Die Mehrheit der restlichen Proteine, die in dieser funktionellen Kategorie eingeteilt worden ist, ist ebenfalls an der Replikation, Rekombination und Reparatur der DNA beteiligt (Tab. 3). Hierzu zählen beispielsweise die DNA-Gyrase (*gyrA*, Imo0007), die DNA-Polymerase (*polA*, Imo1565), das RecA-Protein (*recA*, Imo1398) und DNA-Helikasen (*addA*, Imo2267 und *addB*, Imo2268). Das Histon-ähnliche Protein Hup (*hup*, Imo1934), das durch unspezifische Bindung an die DNA zu deren Kondensation beiträgt, zählt ebenfalls dazu (Bonnefoy und Rouvière-Yaniv, 1992).

In der funktionellen Kategorie J (Translation, ribosomale Struktur und Biogenese) sind 32 Proteine, die über MS-Analyse in den MVs identifiziert worden sind, eingeteilt worden (Tab. 3). Diese machen knapp 4% der Proteine in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs aus. Der überwiegende Teil dieser Proteine sind ribosomale Proteine und Aminoacyl-tRNA-Synthetasen. Die Elongationsfaktoren EF-Tu (*tuf*, Imo2653), EF-G (*fus*, Imo2654) und EF-Ts (*tsf*, Imo1657) zählen ebenfalls dazu.

3.2.3.2. Klassifizierung der MVs-Proteine nach Lokalisation

Um herauszufinden aus welchen subzellulären Kompartimenten der Zelle die Proteine in den MVs stammen, wurden diese unter Verwendung der NCBI-Datenbank nach Lokalisation klassifiziert. Die Abb. 3.32 zeigt, dass die Proteine in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, aus allen 4 subzellulären Kompartimenten der Zelle stammen, allerdings mit unterschiedlicher Häufigkeit.

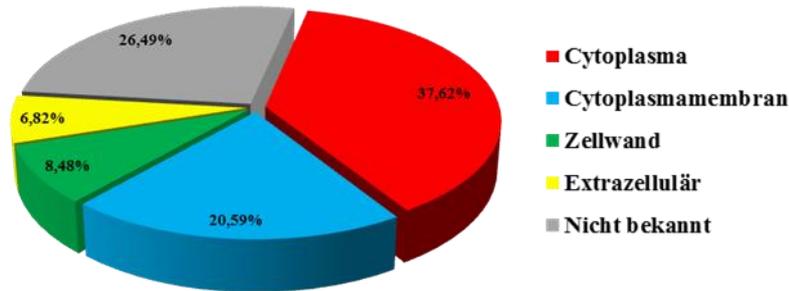


Abb. 3.32: Klassifizierung der MVs-Proteine nach der subzellulären Lokalisation unter Verwendung der NCBI-Datenbank. Laut NCBI-Datenbank enthalten die MVs, die von *Lm* produziert werden, Proteine aus allen 4 subzellulären Kompartimenten. Die meisten MVs-Proteine (37,62%) sind als cytosolische Proteine beschrieben. Für 26,49% der Proteine in den MVs ist laut NCBI-Datenbank keine Lokalisation beschrieben.

Mehr als ein Drittel (37,62%) der Proteine in den MVs sind als cytosolische Proteine beschrieben. Hierzu zählen Proteine, die eine Funktion im Metabolismus von Kohlenhydraten, Aminosäuren, Lipide und Nukleotide beschrieben haben. Die Proteine, die eine Funktion in der Gruppe Informationsspeicherung und -prozessierung beschrieben haben, werden ebenfalls dazugezählt. Hierzu gehören Proteine, die in der Replikation, Rekombination und Transkription der DNA sowie Ribosomen-Aufbau und Proteinsynthese involviert sind.

Integrale und Membran-assoziierte Proteine stellen 20,59% der Proteine in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs dar. Hierzu zählen die Membranproteine verschiedener ABC-Transporter, die über MS-Analyse in den MVs identifiziert worden sind. Verschiedene Bestandteile der Sec-Translokase und der Atmungskette, die über MS-Analyse in den MVs identifiziert worden sind, wurden ebenfalls in diesem subzellulären Kompartiment eingeteilt.

Die Proteine, die eine Lokalisation in der Zellwand beschrieben haben, sind mit einem Anteil von 8,48% deutlich weniger in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs vorhanden. Hierzu zählen beispielsweise Internalin A (*inlA*, lmo0433) und Internalin H (*inlH*, lmo0263), die über das LPXTG-Motiv kovalent an die Zellwand gebunden sind. Internalin B (*inlB*, lmo0434), das über ein GW-Modul nicht-kovalent mit der Zellwand assoziiert ist, zählt ebenfalls dazu (Trost et al, 2005; Bierne und Cossart, 2007).

Die extrazellulär beschriebenen Proteine stellen mit 6,82% die kleinste Gruppe in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs dar. Hierzu gehört beispielsweise das Autolysin P60 (*iap*, lmo0582), das mit 2,28% zu den häufigsten Proteinen in den MVs zählt (Abschnitt 3.2.3.3). Die sekretierten Virulenzfaktoren Listeriolysin O (*hly*, lmo0202), Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (*plcA*, lmo0201) und Zink-Metallo-

protease (*mpl*, lmo0203) werden ebenfalls dazu gezählt (Trost et al, 2005). Auf diese Virulenzfaktoren wird im Abschnitt 3.2.3.4 näher eingegangen.

Für die restlichen Proteine (26,49%), die über MS-Analyse in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs identifiziert worden sind, hat die NCBI-Datenbank keine Lokalisation beschrieben. Die Mehrheit dieser Proteine ist weitgehend nicht charakterisiert.

3.2.3.3. Die 20 häufigsten Proteine in den MVs

In der Abb. 3.33 sind die 20 häufigsten Proteine in den MVs, die von *L. monocytogenes* während des Wachstums in Minimalmedium unter aeroben Bedingungen produziert werden, dargestellt. Deren Anteil an der Gesamtmasse der Proteine in den MVs liegt bei jeweils über 1%. Diese 20 Proteine machen knapp die Hälfte der Masse (47,18%) aller Proteine in den MVs aus. Die restlichen 496 Proteine, deren Anteil bei jeweils unter 1% liegt, machen knapp 53% aus. Dieser Abschnitt beschreibt einige der häufigsten Proteine in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs.

Das häufigste Protein in den MVs ist das *DNA protection during starvation protein* (*dps*, lmo0943) mit einem Anteil von 8,06%. Dieses Protein wurde ursprünglich in *E. coli* identifiziert als eines der Hauptproteine, die in der stationären Wachstumsphase induziert werden (Altuvia et al, 1994). Das Dps-Protein ist ein Ferritin-ähnliches Protein, das die Bildung toxischer Hydroxyl-Radikale über die Fenton-Reaktion verhindert, indem es frei in der Zelle vorliegendes Eisen bindet. Es reduziert darüber hinaus vorhandenes H₂O₂ zu H₂O, wobei das gebundene Eisen als Reduktionsmittel dient (Zhao et al, 2002). Dadurch werden die beiden reaktiven Komponenten aus der Fenton-Reaktion entfernt. Das Dps-Protein bietet zusätzlichen Schutz vor oxidativem Schaden, indem es unspezifisch an DNA bindet (Martinez und Kolter, 1997). Aufgrund dieser Eigenschaften spielt das Dps-Protein eine essentielle Rolle in der intrazellulären Vermehrung und damit in der Virulenz von *L. monocytogenes* (Olsen et al, 2005).

Ein weiteres häufiges Protein in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs ist das *Single-stranded DNA-binding protein 2* (*ssb2*, lmo2308) mit einem Anteil von 3,58%.

Durch die Bindung an DNA vermittelt das SSB2-Protein u.a. Schutz vor Abbau durch Exo- und Endonukleasen unter Stressbedingungen (Meyer und Laine, 1990).

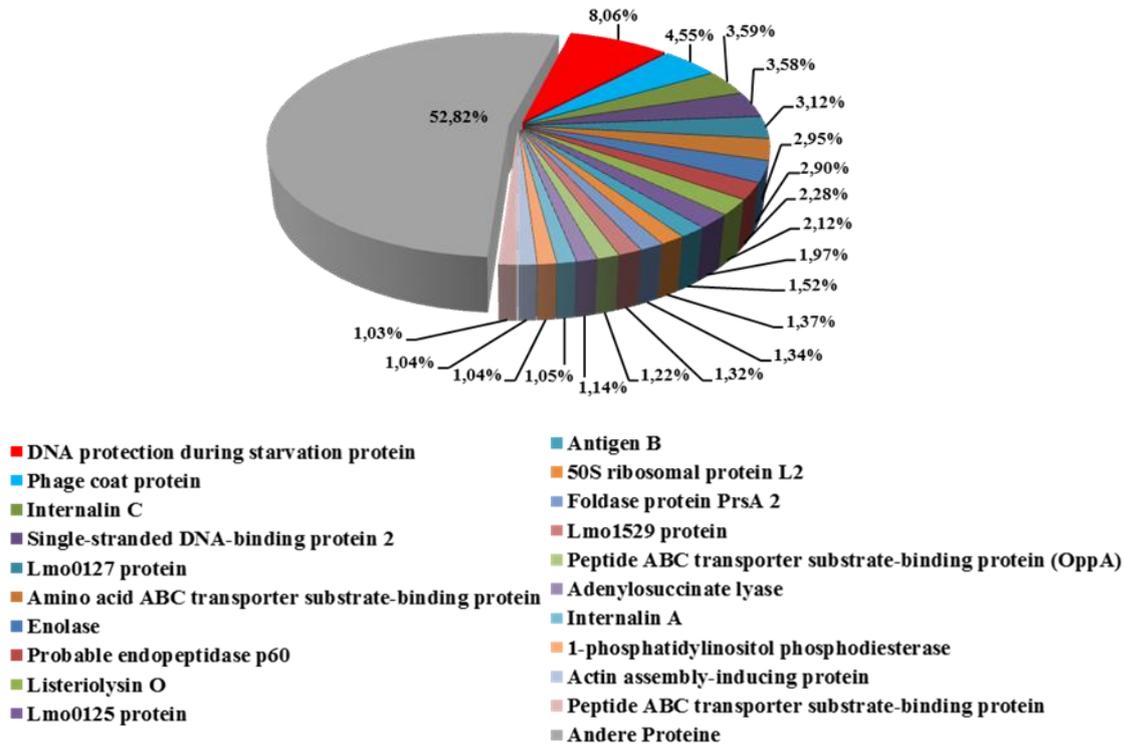


Abb. 3.33: Die 20 häufigsten Proteine in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden. Die 20 häufigsten Proteine machen knapp die Hälfte (47,18%) der Gesamtmasse der Proteine in den MVs, die von *Lm* produziert werden, aus. Deren Anteil liegt bei jeweils über 1%. Der Anteil der restlichen 496 Proteine liegt bei jeweils unter 1%.

Die Enolase (*eno*, lmo2455) gehört mit 2,90% ebenfalls zu den 20 häufigsten Proteinen in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden. Der Enolase, die ein glykolytisches Enzym ist, werden zusätzliche *moonlighting* Funktionen außerhalb der Zelle, wie beispielsweise die Bindung von humanem Plasminogen, zugeschrieben. Die Enolase wird trotz fehlender Signalsequenz durch die SecA2-ATPase der Sec-Translokase sekretiert und ist sowohl in der Zellwand als auch im Überstand von *L. monocytogenes*-Kulturen identifiziert worden (Lenz et al, 2003; Schaumburg et al 2004).

Ein weiteres häufiges Protein in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs ist das Autolysin *Probable endopeptidase p60* (*iap*, lmo0582) mit einem Anteil von 2,28%. P60 wird, ähnlich wie die Enolase, durch die SecA2-ATPase der Sec-Translokase sekretiert. Es trägt als Autolysin zur Trennung der Tochterzellen in der Zellteilung bei. Darüber hinaus wurde für P60 eine Beteiligung an der Invasion von *L. monocytogenes* in nicht-phagozytierenden Zellen gezeigt, weshalb es auch als *Invasion-associated secreted endopeptidase* bezeichnet wird (Kuhn und Goebel, 1989; Pilgrim et al, 2003; Lenz et al, 2003; Machata et al, 2005).

Foldase protein PrsA2 (*prsA2*, lmo2219) zählt mit 1,34% ebenfalls zu den häufigsten Proteinen in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden. Es unterstützt als Chaperon die korrekte Faltung von sekretierten Proteinen im Anschluss an die Translokation (Alonzo und Freitag, 2010). PrsA2 trägt zur Virulenz von *L. monocytogenes* bei, indem es die Faltung und Stabilität und dadurch die Aktivität der Virulenzfaktoren LLO und PlcB kontrolliert. Die PrsA2-Deletionsmutante zeigt eine verringerte Hämolyse- und Phospholipase-Aktivität und infolgedessen eine abgeschwächte Virulenz im Mausinfektionsmodell (Alonzo et al, 2009). Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung von PrsA2 in der Virulenz von *L. monocytogenes* ist dessen Hochregulation während des intrazellulären Wachstums in Makrophagen aufgrund der PrfA-abhängigen Regulation (Chatterjee et al, 2006; Port und Freitag, 2007).

Ein weiteres häufiges Protein in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs ist das Oligopeptid-bindende Protein OppA (lmo2196) mit einem Anteil von 1,22%. Dieses Protein ist Teil des Oligopeptidpermease-Operons (Opp), das den Transport von Peptiden in die Zelle vermittelt (Borezee et al, 2000). Während des intrazellulären Wachstums von *L. monocytogenes* vermittelt OppA die Aufnahme von Peptiden, die als Quelle für Aminosäuren genutzt werden. Infolgedessen spielt OppA eine essentielle Rolle in der Virulenz dieses Pathogens (Borezee et al, 2000; Marquis et al, 1993). Darüber hinaus wird diesem Protein eine Rolle in der Kälteadaptation von *L. monocytogenes* zugeschrieben (Borezee et al, 2000).

3.2.3.4. Virulenzfaktoren in den MVs

In den von *L. monocytogenes* produzierten MVs ist eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, die für den intrazellulären Infektionszyklus dieses Pathogens essentiell sind, über MS-Analyse identifiziert worden. Diese machen 10% der Proteine in den MVs aus (Abb. 3.34).

Mit einem Anteil von 3,59% ist Internalin C (*inlC*, lmo1786) der häufigste Virulenzfaktor in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden. Es handelt sich hierbei um ein sekretiertes Protein, das homolog zu den beiden Internaline A und B ist (Engelbrecht et al, 1996). Aufgrund der induzierten Expression während der Vermehrung von *L. monocytogenes* im Cytosol von Wirtszellen wird diesem Internalin eine Rolle in der späten Phase des Infektionszyklus zugeschrieben (Engelbrecht et al, 1996). Darüber hinaus wurde für Internalin C eine unterstützende Rolle in der InlA-

induzierten Internalisierung in nicht-phagozytierenden Zellen gezeigt (Bergmann et al, 2002). Die reduzierte Virulenz der InlC-Deletionsmutante im Mausinfektionsmodell bestätigt dessen Rolle als Virulenzfaktor von *L. monocytogenes* (Engelbrecht et al, 1996).

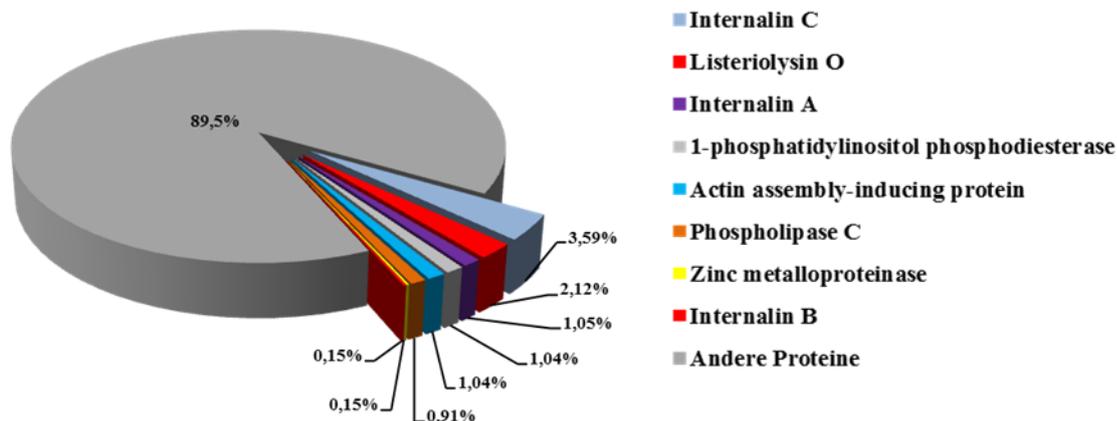


Abb. 3.34: Virulenzfaktoren in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs. Die MS-Analyse hat zur Identifizierung von Virulenzfaktoren, die in den intrazellulären Infektionszyklus von *Lm* involviert sind, in den MVs geführt. Diese machen 10% der Proteine in den MVs aus, wobei Internalin C mit einem Anteil von knapp 4% der häufigste Virulenzfaktor ist.

In den von *L. monocytogenes* produzierten MVs sind weitere Internaline, Internalin A (*inlA*, Imo0433) und Internalin B (*inlB*, Imo0434), identifiziert worden. Diese vermitteln die Internalisierung von *L. monocytogenes* in nicht-phagozytierenden Zellen (Abb. 1.1) (Mengaud et al, 1996; Shen et al, 2000).

Die für die Befreiung von *L. monocytogenes* aus dem Phagosom der Wirtszellen essentiellen Virulenzfaktoren Listeriolysin O (*hly*, Imo0202), die beiden Phosphatidylinositol- und Phosphatidylcholin-spezifischen Phospholipase C-Enzyme (*plcA*, Imo0201 und *plcB*, Imo0205) sowie die Zink-Metalloprotease (*mpl*, Imo0203) sind ebenfalls in den MVs identifiziert worden (Gedde et al, 2000; Leimeister-Wächter et al, 1991; Geoffroy et al, 1991; Domann et al, 1991). Dies gilt auch für den Aktinfilament-akkumulierenden Faktor A (*actA*, Imo0204), der die intra- und interzelluläre Bewegung von *L. monocytogenes* über die Akkumulation von Aktin der Wirtszelle vermittelt (Abb. 1.1) (Kocks et al, 1992; Domann et al, 1992).

Nach InlC ist LLO mit 2,12% der zweithäufigste Virulenzfaktor in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden. Es folgen InlA, PlcA, ActA und PlcB mit jeweils 1%. Mpl und InlB machen jeweils 0,15% der Proteine in den MVs aus (Abb. 3.34).

3.2.4. SDS-PAGE- und Western blot-Analyse von MVs

Das Proteinprofil der MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, wurde durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung visualisiert. Hierfür wurden MVs aus 3 biologischen Replikaten verwendet, wobei jeweils 5 µg MVs in einem 12%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden (Abb. 3.35A).

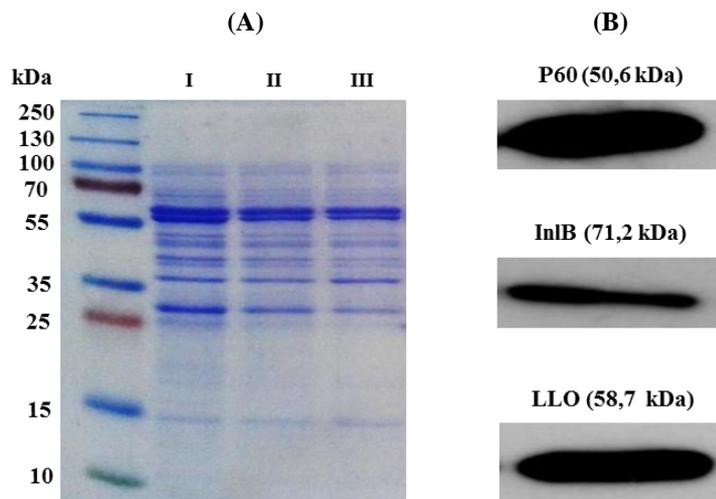


Abb. 3.35: Proteinprofil- und Western blot-Analyse von MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden. A: Proteinprofil-Analyse von *Lm*-MVs mittels SDS-PAGE. Jeweils 5 µg MVs aus 3 biologischen Replikaten wurden in einem 12%igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Diese Untersuchung enthüllt eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine in den MVs, wobei alle 3 MVs-Isolierungen das gleiche Proteinprofil zeigen. B: Western blot-Analyse von *Lm*-MVs. Nach Auftrennung der MVs-Proteine durch SDS-PAGE wurden diese elektrophoretisch auf eine Trägermembran übertragen und mit P60-, InlB- und LLO-Antikörper behandelt. Diese Untersuchung enthüllt die Anwesenheit des Autolysins P60 und der beiden Virulenzfaktoren, InlB und LLO, in den *Lm*-MVs.

Das durch SDS-PAGE erzielte Proteinprofil bestätigt das in den Abschnitten zuvor beschriebene Ergebnis der MS-Analyse. Es zeigt, dass die von *L. monocytogenes* produzierten MVs eine Vielzahl von verschiedenen Proteinen mit jeweils unterschiedlicher Häufigkeit enthalten. Des Weiteren zeigen die MVs aus den 3 verschiedenen Isolierungen das gleiche Proteinprofil.

In einem weiteren Schritt wurde die Anwesenheit des Autolysins P60 und der beiden Virulenzfaktoren, Internalin B (InlB) und Listeriolysin O (LLO), in den MVs über Western blot untersucht. Hierfür wurden Antikörper, die gegen P60, InlB und LLO gerichtet sind, verwendet. Die Abb. 3.35B zeigt die Detektion dieser Proteine über spezifische Antikörperbindung in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs und bestätigt das Ergebnis der MS-Analyse (Abb. 3.33 und 3.34).

3.2.5. Untersuchung der hämolytischen Aktivität von MVs

Die Anwesenheit von Listeriolysin O (LLO) in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, wurde über MS- und Western blot-Analyse identifiziert (Abb. 3.34 und 3.35B). Die hämolytische Aktivität dieses Virulenzfaktors vermittelt u.a. die Befreiung von *L. monocytogenes* aus dem Phagosom der Wirtszellen (Abb. 1.1). In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob das in den MVs identifizierte LLO hämolytisch aktiv ist. Hierfür wurde ein Hämolyse-Assay durchgeführt. In einer 96er-Well Platte wurden 5 µg MVs heruntertitriert und mit einer 1%igen Schafserythrozyten-Lösung für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte abzentrifugiert und die Überstände wurden in eine neue Platte überführt (Abb. 3.36).

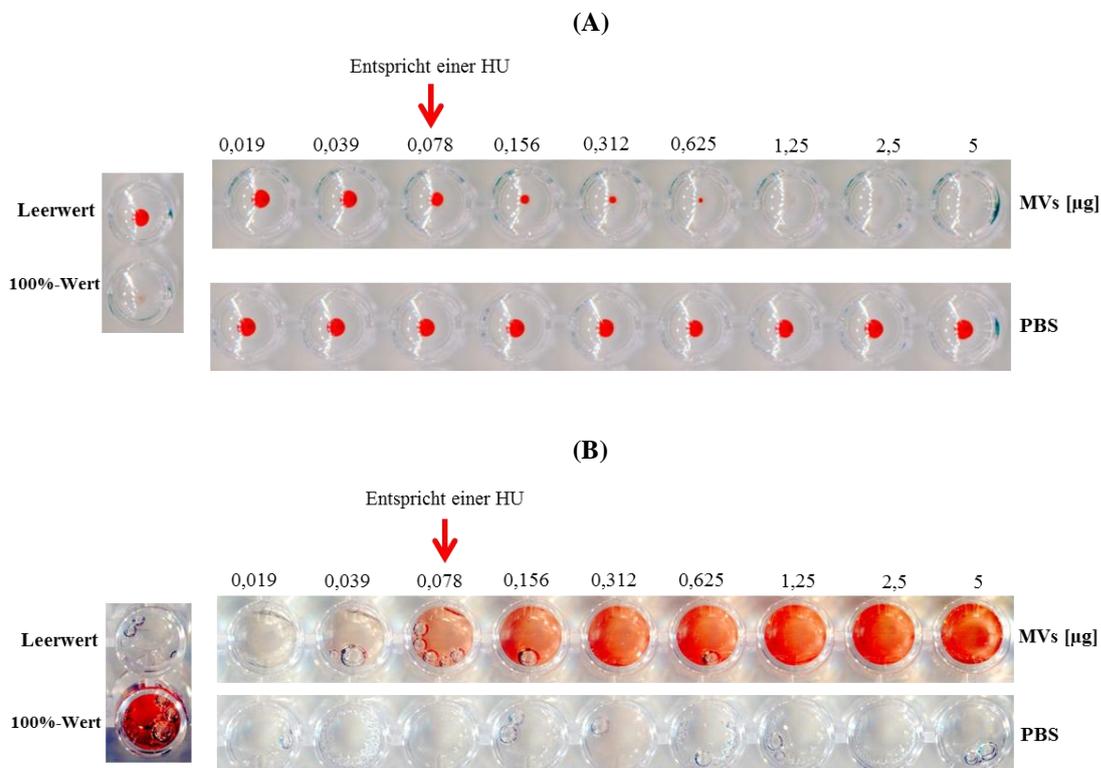


Abb. 3.36: Konzentrationsabhängige Lyse von Schafserythrozyten durch MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden. 5 µg *Lm*-MVs wurden heruntertitriert und mit einer 1%igen Schafserythrozyten-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Platte abzentrifugiert und die Überstände wurden in eine neue Platte überführt. Die Verfärbung der Überstände in den einzelnen Wells zeigt den Grad der Hämolyse an (B). Dabei ist eine konzentrationsabhängige Lyse von Schafserythrozyten durch die MVs zu sehen.

Das Ausmaß der Lyse von Erythrozyten lässt sich anhand der Verfärbung, die durch Freisetzung von Hämoglobin verursacht wird, in den einzelnen Wells optisch feststellen und photometrisch messen. Der durch H₂O erzielte hämolytische Effekt entspricht der maximalen Hämolyse (100%-Wert). Als Negativkontrolle diente PBS. Die Abb. 3.36

zeigt, dass LLO in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs hämolytisch aktiv ist. Es zeigt des Weiteren eine konzentrationsabhängige Lyse von Schafserythrozyten durch die MVs. Die Messung der optischen Dichte bei 405 nm ergab, dass 0,078 µg MVs einer hämolytischen Einheit (HU) und damit 50% der durch H₂O verursachten Hämolyse entsprechen.

3.2.6. Untersuchung der Fähigkeit von MVs zur Internalisierung in PtK-Zellen

Um herauszufinden, ob die von *L. monocytogenes* produzierten MVs die Fähigkeit zur Internalisierung in Wirtszellen haben, wurden PtK-Zellen mit 2 verschiedenen MVs-Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gründlich gewaschen und lysiert. Die Anwesenheit des Autolysins P60 im Zelllysate der PtK-Zellen wurde über Western blot untersucht (Abb. 3.37). Hierfür wurde ein Antikörper, der gegen P60 gerichtet ist, verwendet. P60 wurde zuvor über MS- und Western blot-Analyse in den MVs identifiziert (Abb. 3.33 und 3.35B). Es gehört zu den häufigsten Proteinen in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden.

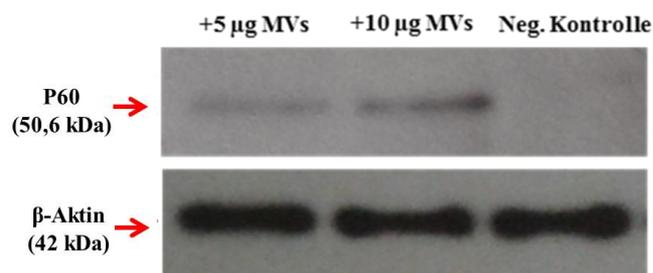


Abb. 3.37: Internalisierung von MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, in PtK-Zellen. Nach Inkubation von PtK-Zellen mit 5 und 10 µg MVs wurde die Anwesenheit des Autolysins P60 im Zelllysate über Western blot untersucht. Während die unbehandelten Zellen (Neg. Kontrolle) kein Signal zeigen, ist eine zunehmende Signalintensität in den behandelten Ansätzen zu sehen. Die Ladekontrolle (β-Aktin) zeigt in allen 3 Ansätzen die gleiche Intensitätsstärke.

Die Abb. 3.37 zeigt die Detektion des Autolysins P60 im Zelllysate der PtK-Zellen, die mit den MVs inkubiert wurden. Die Signalintensität ist in dem Ansatz, der mit einer höheren MVs-Konzentration (10 µg) inkubiert wurde, stärker. Dies spricht für eine dosenabhängige Internalisierung von MVs in PtK-Zellen. Im Zelllysate der Zellen, die nicht mit MVs inkubiert wurden und als Negativkontrolle dienten, ist kein Signal zu sehen. Dies zeigt, dass der verwendete P60 Antikörper nicht unspezifisch an Zellstrukturen von PtK-Zellen bindet. Des Weiteren zeigt die Ladekontrolle (β-Aktin) in allen Ansätzen die gleiche Signalintensität. Das Ergebnis dieser Untersuchung zeigt,

dass die von *L. monocytogenes* produzierten MVs die Fähigkeit zur Internalisierung in Wirtszellen haben.

4. Diskussion

4.1. Die von *L. monocytogenes* sekretierte RNA ist in den Fraktionen sec-RNA und MVs-RNA gegenwärtig

Diese Arbeit hat gezeigt, dass die von *L. monocytogenes* sekretierte RNA in zwei Fraktionen vorkommt, in den MVs und in einer freien, nicht MVs-assoziierten Fraktion. Daraufhin wurden die Begriffe MVs-RNA und sec-RNA eingeführt, um eine Unterscheidung dieser beiden sekretierten RNA-Fraktionen machen zu können. Diese Unterscheidung wurde von früheren Studien, die sich mit der von *L. monocytogenes* sekretierten RNA beschäftigt haben, nicht gemacht (Abdullah et al, 2012; Hagmann et al, 2013). Die Erkenntnis, dass die von *L. monocytogenes* sekretierte RNA in zwei Fraktionen vorkommt, wurde erst im Laufe dieser Arbeit gewonnen. Dabei wurde ein Protokoll etabliert, das zunächst die Trennung beider RNA-Fraktionen und anschließend die Isolierung der RNA beinhaltet (Abb. 3.1). Sowohl MVs als auch sec-RNA werden von *L. monocytogenes* während des Wachstums ins Medium freigesetzt, daher war der Rohstoff für die Isolierung beider RNA-Fraktionen der bakterienfreie Überstand. Nach dem dieser durch Ultrafiltration eingengt wurde, wurden die MVs pelletiert. Daraus erfolgte in einem weiteren Schritt die Isolierung von MVs-RNA.

Der resultierende MVs-freie Überstand diente als Grundlage für die Isolierung von sec-RNA. Anhand dieses Protokolls wurden aus 2 L *L. monocytogenes*-Kulturen ca. 12 µg MVs-RNA und ca. 120 µg sec-RNA isoliert. Infolgedessen sekretiert *L. monocytogenes* 10mal mehr RNA in einer freien, nicht MVs-assoziierten Form. Bislang gibt es keine Studie, die eine Quantifizierung der RNA, die von den Bakterien sekretiert wird, durchgeführt hat. Daher ist an dieser Stelle ein Vergleich mit anderen Bakterienspezies nicht möglich. Dies ist allerdings analog zu eukaryotischen Zellen, die den Großteil der extrazellulären RNA in einer freien, nicht Exosomen-assoziierten Form sekretieren (Wang et al, 2010; Arroyo et al, 2011; Turchinovich et al, 2011).

Dass Bakterien die Produktion von Vesikeln u.a. für den Export von RNA nutzen, wurde von weiteren Studien gezeigt, wenngleich der Mechanismus für die selektive Sortierung von RNA in die Vesikel weitgehend unbekannt ist (Ho et al, 2015; Sjöström et al, 2015; Resch et al, 2016). Aufgrund der Tatsache, dass *L. monocytogenes* 10mal mehr RNA in einer freien, nicht MVs-assoziierten Form sekretiert, muss es für deren Export weitere Sekretionswege geben. Eine Studie aus dem Jahr 2012 hat gezeigt, dass

die SecA2-ATPase der Sec-Translokase, die einen generellen Sekretionsweg für Proteine darstellt, teilweise an der Sekretion von RNA durch *L. monocytogenes* beteiligt ist. Die SecA2-Deletionsmutante zeigt eine reduzierte Sekretion von RNA ins extrazelluläre Milieu (Desvaux und Hébraud, 2006; Abdullah et al, 2012). Die SecA2-ATPase vermittelt u.a. die Sekretion von sogenannten *moonlighting* Proteinen, wie beispielsweise DnaK, GroEL, EF-Tu, Enolase, RNA-Polymerase und ribosomale Proteine, die für deren RNA-Bindung bekannt sind (Lenz et al, 2003; Georgellis et al, 1995; Py et al, 1994; Miczak et al, 1996; Vanzo et al, 1998). Es wäre daher denkbar, dass *L. monocytogenes* RNA über Proteinsekretionswege in Verbindung mit RNA-bindenden Proteinen sekretiert. Eine Sekretion von RNA über RNA-bindende Proteine, wie beispielsweise *Argonaute 2* (AGO2), *Nucleophosmin* (NPM1) und *High Density Lipoprotein* (HDL), wird auch bei Eukaryoten vermutet (Wang et al, 2010; Turchinovich et al, 2011; Vickers et al, 2011). Dies würde die Stabilität der freien, nicht MVs-assoziierten RNA im extrazellulären Milieu erklären. Darüber hinaus könnte diese Transportform deren Aufnahme durch *target*-Zellen vermitteln, wie das bereits für HDL-assoziierte miRNAs gezeigt wurde (Vickers et al, 2011).

4.2. Unterschiedliche Zusammensetzung von sec-RNA, MVs-RNA und zellulärer RNA

Diese Arbeit hat erstmals die Zusammensetzung der RNA, die von *L. monocytogenes* sekretiert wird, identifiziert. Durch die Sequenzierung von sec-RNA und MVs-RNA wurde gezeigt, dass die von *L. monocytogenes* sekretierte RNA alle bekannten RNA-Spezies enthält, rRNA, tRNA, mRNA und sRNA (Abb. 3.5). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die beiden sekretierten RNA-Fraktionen sich sowohl untereinander als auch von der zellulären RNA unterscheiden, bezüglich Vorkommen und Häufigkeit bestimmter RNA-Spezies. Diese Feststellung und die hohe Reproduzierbarkeit der erzielten Sequenzierungsdaten aus drei biologischen Replikaten weisen auf einen selektiven Export von RNA durch *L. monocytogenes* hin. Ähnliche Beobachtungen wurden von weiteren Studien, die sich mit der von verschiedenen Bakterienspezies sekretierten RNA beschäftigt haben, berichtet (Ghosal et al, 2015; Koeppen et al, 2016; Blenkiron et al, 2016). Daher wird für die sekretierte RNA eine Funktion in der interzellulären Kommunikation, in der pathogene Bakterien die Genexpression ihrer Wirtszellen manipulieren, vermutet. Dies wird zum einen durch Studien begründet, die

den Transfer von RNA über Vesikel in Wirtszellen gezeigt haben (Koeppen et al, 2016; Blenkiron et al, 2016). Zum anderen wurde eine veränderte Expression von bestimmten Proteinen, die von Vesikel-assoziierten RNAs in Wirtszellen ausgelöst wurde, gezeigt (Koeppen et al, 2016). Weitere Analysen wären notwendig, um eine genaue Aussage darüber machen zu können, ob die von *L. monocytogenes* sekretierte RNA eine Funktion in der interzellulären Kommunikation erfüllt.

Diese Arbeit hat allerdings gezeigt, dass die von *L. monocytogenes* sekretierten RNA-Fraktionen, sec-RNA und MVs-RNA, eine hohe IFN- β Antwort nach Transfektion in Wirtszellen auslösen (Abb. 3.4). Hierdurch wurde gezeigt, dass die in BMDMs ausgelöste IFN- β Antwort durch sec-RNA ca. 70fach und durch MVs-RNA ca. 20fach höher ist im Vergleich zu der zellulären RNA. Wie bereits eingangs erwähnt, erhöht die von *L. monocytogenes* während einer Infektion ausgelöste IFN- β Antwort die Anfälligkeit des Wirtes gegenüber diesem Pathogen und fördert dessen Vermehrung (Carrero et al, 2004; O'Connell et al, 2004). So wurde beispielsweise diesbezüglich gezeigt, dass die von *L. monocytogenes* ausgelöste Typ-I-IFN Antwort die polarisierte Polymerisation von Aktin der Wirtszelle durch den Virulenzfaktor ActA fördert, wodurch dessen intrazelluläre Bewegung und Infektion von Nachbarzellen unterstützt wird (Osborne et al, 2017). Die Induktion von IFN- β über die Sekretion von RNA ist daher als eine Form von Einflussnahme durch *L. monocytogenes* auf die Wirtszellen anzusehen.

4.3. Anreicherung von kleinen nicht-kodierenden RNAs in MVs-RNA

Ein erster Eindruck über die Zusammensetzung von sec-RNA und MVs-RNA wurde durch Profilanalyse mittels Agilent 2100 Bioanalyser erzielt. Hierdurch wurde die Anwesenheit von kleinen nicht-kodierenden RNAs in beide sekretierten Fraktionen gezeigt (Abb. 3.2). Die höhere Auflösung dieser RNA-Population hat gezeigt, dass in MVs-RNA der überwiegende Teil aus 20 Nt langen RNAs besteht (Abb. 3.3B). Diese Länge entspricht der von eukaryotischen miRNAs, die als kleine nicht-kodierende RNAs eine Schlüsselfunktion in der post-transkriptionellen Genregulation haben. RNAs mit dieser Länge wurden in verschiedenen Bakterienspezies, darunter *E. coli* und *Streptococcus mutans*, identifiziert und werden als msRNAs (*microRNA-size, small RNAs*) bezeichnet (Kang et al, 2013; Lee und Hong, 2011). Deren Funktion ist weitgehend unbekannt, allerdings wird aufgrund der Häufigkeit und der Diversität ihres Vorkommens in den Bakterienzellen eine regulatorische Funktion angenommen.

Eine weitere Studie hat die Anwesenheit von msRNAs in den MVs, die von *Streptococcus sanguinis* produziert werden, gezeigt (Choi et al, 2016). Eine mögliche Funktion dieser RNA-Spezies in den von Bakterien produzierten MVs wird in der interzellulären Kommunikation vermutet. Diese Vermutung wird von zahlreichen Studien aus der Eukaryoten-Forschung, die den Export von miRNAs über Exosomen gezeigt haben, begründet (Chevillet et al, 2014; Baldwin et al, 2017). Darüber hinaus wurde eine Einflussnahme auf die Genregulation von Empfängerzellen nach Transfer von miRNAs über Exosomen gezeigt (Kogure et al, 2011).

4.4. Unterschiedliche IFN- β Induktion durch sRNAs, die in sec-RNA und MVs-RNA identifiziert worden sind

Aufgrund der höheren IFN- β Induktion durch die sekretierten RNA-Fractionen im Vergleich zu der zellulären RNA wurde untersucht welchen Beitrag einzelne RNAs, die in sec-RNA und MVs-RNA identifiziert worden sind, an der IFN- β Antwort haben. Die Transfektion der einzelnen sRNAs, die durch *in vitro* Transkription hergestellt worden sind, in HEK293-Zellen hat gezeigt, dass diese ein unterschiedliches Potential besitzen IFN- β zu induzieren (Abb. 3.9). So haben rli32, rli47, rli99 und rli100 die höchste IFN- β Antwort ausgelöst. Andere hingegen, wie rli98, rli111, rli114, rliG, ssaA und ssaS, haben eine sehr schwache IFN- β Antwort ausgelöst. Weitere sRNAs, wie rli50, rli51, rli56, rli60, rli62, LhrA und SRP, haben ein moderates IFN- β Induktionspotential gezeigt. In einem weiteren Versuch, in dem einige dieser sRNAs in BMDMs transfiziert worden sind, wurde das unterschiedliche Potential einzelner sRNAs IFN- β zu induzieren, bestätigt (Abb. 3.10).

Die Fähigkeit einer gegebenen sRNA IFN- β zu induzieren, korreliert nicht mit der Häufigkeit ihres Vorkommens in den beiden sekretierten RNA-Fractionen. So zählen beispielsweise ssaA und ssaS zu den häufigsten sRNAs in sec-RNA und MVs-RNA, dennoch haben diese sRNAs eine sehr schwache IFN- β Antwort ausgelöst. SRP, die häufigste sRNA in den beiden sekretierten RNA-Fractionen, hat eine moderate IFN- β Antwort nach Transfektion in HEK293-Zellen ausgelöst. Anders hingegen rli100, das im Vergleich dazu eine viel geringere Anzahl an *reads* in sec-RNA und MVs-RNA aufweist und dennoch zu den sRNAs mit der höchsten IFN- β Induktion zählt.

Einige in den sekretierten RNA-Fractionen von *L. monocytogenes* identifizierten sRNAs sind von früheren Studien beschrieben worden. Für rli32 beispielsweise wird,

aufgrund der höheren Transkription während des intrazellulären Wachstums von *L. monocytogenes* und dessen möglichen mRNA-*targets*, eine Rolle in der Virulenz vermutet (Mraheil et al, 2011; Toledo-Arana et al, 2009). Ähnliches wird für rli47 angenommen, dessen Transkription von dem alternativen Sigma Faktor B, der die generelle Stressantwort in der stationären Wachstumsphase und während der Infektion kontrolliert, abhängt (Hain et al, 2008; Mraheil et al, 2011; Oliver et al, 2009). Des Weiteren wurde über Transkriptom-Analyse gezeigt, dass LhrA in der stationären Wachstumsphase die Expression von ca. 300 Genen reguliert. Experimentell wurde die *chiA*-mRNA, die für eine der beiden Chitinasen von *L. monocytogenes* kodiert, als *target* nachgewiesen (Christiansen et al, 2006; Nielsen et al, 2011). Für rli60 wurde eine Rolle in der Anpassung von *L. monocytogenes* an verschiedenen Stressbedingungen und in der Biofilmbildung gezeigt. Für rli50 hingegen wird, aufgrund der reduzierten Virulenz der rli50-Deletionsmutante im Mausinfektionsmodell, eine Rolle in der intrazellulären Vermehrung von *L. monocytogenes* vermutet (Peng et al, 2016; Mraheil et al, 2011).

4.4.1. RIG-I-Abhängigkeit der IFN- β Induktion durch die sRNAs

Diese Arbeit hat gezeigt, dass die von *L. monocytogenes* sekretierten sRNAs ein unterschiedliches Potential besitzen IFN- β zu induzieren. In einem weiteren Schritt wurde die Abhängigkeit der IFN- β Antwort, die von den einzelnen sRNAs in HEK293-Zellen ausgelöst wurde, von den Rezeptoren RIG-I und MDA5 untersucht. Hierfür wurden einige der 23 ausgesuchten sRNAs in RIG-I-defiziente Zellen transfiziert. Darunter waren sRNAs, die in Wildtypzellen eine starke (rli32, rli47, rli99 und rli110) sowie eine sehr schwache bis moderate (rli48, rli51, rli60, rli62, rli105, SRP und sssS) IFN- β Antwort ausgelöst hatten (Abb. 3.9). In RIG-I-defiziente Zellen haben diese sRNAs, unabhängig von deren in Wildtypzellen gezeigten IFN- β Induktionspotential, eine sehr schwache IFN- β Antwort ausgelöst (Abb. 3.12). Hierdurch wurde gezeigt, dass die von den sRNAs in HEK293-Zellen ausgelöste IFN- β Antwort von dem Rezeptor RIG-I abhängig ist. Dies wurde durch Transfektion von rli32, das unter den ausgesuchten sRNAs das höchste IFN- β Induktionspotential gezeigt hatte, in HEK293-Zellen mit einer Defizienz in eines der beiden Rezeptoren, RIG-I oder MDA5, bestätigt (Abb. 3.13). RIG-I-defiziente Zellen zeigen eine signifikante Reduktion der IFN- β Antwort im Vergleich zu den Wildtypzellen. Anders hingegen MDA5-defiziente Zellen,

die keinen signifikanten Unterschied in der IFN- β Antwort im Vergleich zu den Wildtypzellen zeigen. Die signifikante Reduktion der IFN- β Induktion durch rli32 nach Entfernung der 5'-Triphosphat-Gruppe durch Dephosphorylierung weist ebenfalls auf eine RIG-I-Abhängigkeit der IFN- β Antwort durch die sRNAs in HEK293-Zellen hin.

Die erforderliche molekulare Struktur von RNAs für die Bindung und Aktivierung des Rezeptors RIG-I wurde von zwei Studien identifiziert. Diese haben gezeigt, dass RNAs, die am 5'-Ende eine basengepaarte Struktur mit einer Triphosphat-Gruppe besitzen, der optimale Ligand für diesen Rezeptor darstellen. Dabei ist die Anwesenheit einer Triphosphat-Gruppe am 5'-Ende von RNAs eine Grundvoraussetzung für deren Bindung durch RIG-I (Schlee et al, 2009; Schmidt et al, 2009). Nach Entfernung der 5'-Triphosphat-Gruppe durch Dephosphorylierung verliert rli32 die Fähigkeit einer effektiven Bindung durch RIG-I und infolgedessen das hohe immunstimulatorische Potential.

4.4.2. Protektion von HEK293-Zellen gegen das Influenza A Virus durch die sRNAs

Zahlreiche Studien haben die Bedeutung des Rezeptors RIG-I in der antiviralen Immunantwort gezeigt. Nach Detektion viraler RNA im Cytosol der infizierten Zellen löst RIG-I über die Produktion von Typ-I-IFN antivirale Mechanismen aus, die zur Inhibition der viralen Vermehrung führen (Pichlmair et al, 2006; Kato et al, 2006; Kato et al, 2011). In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob die von den sRNAs ausgelöste IFN- β Antwort die virale Replikation nach Infektion von HEK293-Zellen mit dem Influenza A Virus (A/PR/8/34/(H1N1)) inhibiert. Diese Untersuchung hat gezeigt, dass die Vorbehandlung von HEK293-Zellen mit rli32 und rli47, die im Vorfeld eine starke IFN- β Antwort ausgelöst hatten, zu einer signifikanten Reduktion des Virustiters in den Überständen der infizierten Zellen geführt hat (Abb. 3.15). Infolgedessen hat die von den sRNAs ausgelöste IFN- β Antwort zu einer Inhibition der viralen Replikation in den infizierten Zellen geführt. Anders hingegen srsS, das nicht zu einer Inhibition der viralen Replikation geführt hat. Diese sRNA hat im Vorfeld eine sehr schwache IFN- β Antwort in HEK293-Zellen ausgelöst. Aufgrund des sehr schwachen Potentials von srsS eine IFN- β Antwort auszulösen, blieb die Inhibition der viralen Replikation in den infizierten Zellen aus. Hierdurch wurde gezeigt, dass das unterschiedliche IFN- β Induktionspotential einzelner sRNAs zu einer entsprechend mehr oder weniger starken Inhibition der viralen Replikation geführt hat.

Des Weiteren wurde eine konzentrationsabhängige Inhibition der viralen Replikation durch rli32 gezeigt. Die Vorbehandlung von HEK293-Zellen mit zunehmenden rli32 Konzentrationen hat zu einer zunehmenden Reduktion des Virustiters in den Überständen der infizierten Zellen geführt (Abb. 3.17). Infolgedessen hat der Einsatz einer höheren rli32 Konzentration zu einer höheren IFN- β Antwort mit entsprechend höherer antiviraler Aktivität in den Zellen geführt.

In einem weiteren Versuch wurde die direkte Beteiligung von RIG-I an der antiviralen Antwort, die von den sRNAs ausgelöst wurde, gezeigt. Die Vorbehandlung von RIG-I-defizienten Zellen mit rli32 und rli47 hat nicht zu einer Inhibition der viralen Replikation geführt (Abb. 3.16A). In MDA5-defiziente Zellen hingegen wurde eine signifikante Reduktion des Virustiters festgestellt (Abb. 3.16B). Hierdurch hat diese Arbeit erstmals die RIG-I-abhängige antivirale Aktivität von individuellen bakteriellen sRNAs gezeigt. Verschiedene Studien haben die antivirale Aktivität von RIG-I-aktivierenden RNA-Oligonukleotiden gezeigt. So wurde beispielsweise gezeigt, dass diese synthetischen RIG-I-Liganden humane Lungeneithelzelllinien vor der Infektion mit den von 1918 und 2009 pandemischen Influenza A Viren schützen (Ranjan et al, 2010). Eine weitere Studie hat gezeigt, dass die intravenöse Injektion von Mäusen mit einem solchen RNA-Oligonukleotid Schutz gegen eine letale Infektion mit dem Influenza A Virus bietet (Coch et al, 2017).

4.5. Das Motiv 2 ist für die hohe IFN- β Induktion durch rli32 verantwortlich

Rli32 hat sich unter den 23 ausgesuchten sRNAs, die in sec-RNA und MVs-RNA identifiziert worden sind, als die sRNA mit dem höchsten IFN- β Induktionspotential herausgestellt. Eine *in silico* Vorhersage der Sekundärstruktur von rli32 mit dem RNAfold WebServer hat gezeigt, dass diese sRNA aus 3 Motiven besteht, die verschiedene *stem-loop* Strukturen aufweisen (Gruber et al, 2008). Um herauszufinden welche strukturelle Beschaffenheit für die hohe immunstimulatorische Aktivität von rli32 verantwortlich ist, wurden die einzelnen Motive nach deren Herstellung in BMDMs transfiziert. Diese Untersuchung hat Unterschiede, bezüglich der Fähigkeit einzelner Motive IFN- β zu induzieren, gezeigt (Abb. 3.14). Während die Motive 1 und 3 eine sehr schwache bis moderate IFN- β Antwort ausgelöst hatten, hat das Motiv 2 eine ähnlich hohe IFN- β Antwort ausgelöst wie rli32 selbst. Basierend auf dieses Ergebnis ist Motiv 2 für das hohe IFN- β Induktionspotential von rli32 verantwortlich.

Darüber hinaus hat diese Untersuchung gezeigt, dass Unterschiede in der strukturellen Beschaffenheit von RNAs für die unterschiedliche IFN- β Antwort verantwortlich sind. Zusätzlich zu der 5'-Triphosphat-Gruppe bestimmt die Struktur einer gegebenen RNA die Bindung und Aktivierung des Rezeptors RIG-I. Dies ist möglicherweise der Grund für die unterschiedliche IFN- β Induktion durch die von *L. monocytogenes* sekretierten sRNAs.

4.6. Hohe Typ-I-IFN Induktion durch rli32 in der Maus

Die Untersuchung des immunstimulatorischen Potentials von rli32 *in vivo* hat gezeigt, dass diese sRNA in beide Organe der Maus, Leber und Milz, eine hohe Typ-I-IFN Antwort ausgelöst hat (Abb. 3.19 und 3.20). SsrS, das sich in den *in vitro* Transfektionsversuchen als eine sRNA mit einem sehr schwachen IFN- β Induktionspotential herausgestellt hatte, hat ebenfalls eine hohe Typ-I-IFN Antwort ausgelöst. Darüber hinaus hat ssrS in der Milz eine höhere Typ-I-IFN Antwort ausgelöst als rli32. Die Typ-I-IFN Antwort ist insgesamt in der Milz höher ausgefallen als in der Leber. Es wurde gezeigt, dass die DCs-Subpopulationen in der Leber schwache Aktivatoren des Immunsystems sind. Diese sind weniger reif, erfassen weniger Antigene und induzieren eine schwächere T-Zelle Stimulation als die DCs in der Milz (Pillarisetty et al, 2004). Dies erklärt die schwächere Typ-I-IFN Antwort in der Leber gegenüber der Milz.

Die von ssrS ausgelöste hohe Typ-I-IFN Antwort in der Maus ist möglicherweise auf dessen Detektion durch pDCs, die das TLR-System und das Adapterprotein MyD88 für die Produktion von Typ-I-IFN nutzen, zurückzuführen (Kawai und Akira, 2010). Diese DCs-Subpopulation ist für die hohe Typ-I-IFN Antwort nach Detektion viraler RNA bekannt (Cella et al, 1999; Colonna et al, 2002; Diebold et al, 2003). So lösen beispielsweise pDCs einen antiviralen Status nach Detektion des Hepatitis C Virus (HCV) über TLR7 aus (Takahashi et al, 2010). Die Erkennung von ssrS durch die aktiveren pDCs in der Milz ist möglicherweise der Grund dafür, dass ssrS eine höhere Typ-I-IFN Antwort in der Milz ausgelöst hat als rli32.

4.7. Erhöhte IFN- β Induktion durch die sekretierten RNA-Fraktionen und MVs nach Überexpression von rli32 in *L. monocytogenes*

Die Überexpression von rli32 in *L. monocytogenes* hat zu einem signifikanten Anstieg der IFN- β Induktion durch alle RNA-Fraktionen, die von diesem Stamm isoliert und in

BMDMs transfiziert wurden, geführt (Abb. 3.22). Dabei hat sec-RNA die höchste IFN- β Antwort ausgelöst, gefolgt von MVs-RNA und zellulärer RNA. Dadurch wurde das IFN- β Induktionspotential der sec-RNA von *L. monocytogenes* um ein 10faches erhöht, von ca. 1000fach auf ca. 10000fach. Darüber hinaus hat diese Untersuchung gezeigt, dass nicht nur durch *in vitro* Transkription hergestelltes rli32 die Fähigkeit besitzt eine hohe IFN- β Antwort auszulösen. Das von den Bakterienzellen selbst transkribierte rli32 besitzt das Potential IFN- β zu induzieren. Die von dem ssrS-überexprimierenden Stamm isolierte RNA hingegen hat nicht zu einem Anstieg der IFN- β Antwort nach Transfektion in BMDMs geführt. Dieses Ergebnis bestätigt die im Vorfeld durchgeführten *in vitro* Transfektionsversuche und verdeutlicht, dass einzelne in den sekretierten RNA-Fractionen vorhandene sRNAs ein unterschiedliches Potential besitzen IFN- β zu induzieren. Infolgedessen bestimmt die Zusammensetzung der sekretierten RNA-Fractionen aus verschiedenen RNAs mit unterschiedlichem immunstimulatorischem Potential letztendlich die Höhe der IFN- β Antwort.

In HEK293-Zellen zeigen die sekretierten RNA-Fractionen von *Lm*-pERL3-rli32, ähnlich wie in BMDMs, eine höhere IFN- β Antwort als die zelluläre RNA (Abb. 3.23). Anders als in BMDMs hat MVs-RNA eine höhere IFN- β Antwort ausgelöst als sec-RNA. Ein weiterer Unterschied ist die höhere IFN- β Induktion durch die sekretierten RNA-Fractionen von *Lm*-pERL3-ssrS im Vergleich zu den RNA-Fractionen, die vom Wildtyp isoliert wurden. In einem weiteren Versuch wurde allerdings gezeigt, dass die von den sekretierten RNA-Fractionen der Stämme *Lm*-pERL3-rli32 und *Lm*-pERL3-ssrS ausgelöste IFN- β Antwort in HEK293-Zellen von dem Rezeptor RIG-I abhängig ist (Abb. 3.24). In BMDMs wurde eine signifikante Reduktion der IFN- β Antwort nach Dephosphorylierung und Transfektion von sec-RNA und MVs-RNA festgestellt (Abb. 3.4). Dies spricht dafür, dass auch in BMDMs der Rezeptor RIG-I in der Detektion der RNA, die von *L. monocytogenes* sekretiert wird, involviert ist. Allerdings könnten hier auch andere Rezeptoren, wie beispielsweise TLRs, eine Rolle spielen. Weitere Analysen wären notwendig, um eine genaue Aussage darüber machen zu können.

Des Weiteren hat die Überexpression von rli32 in *L. monocytogenes* das immunstimulatorische Potential der MVs erhöht (Abb. 3.25). Die von *Lm*-pERL3-rli32 isolierten MVs haben eine höhere IFN- β Antwort in BMDMs ausgelöst als die MVs, die vom Wildtyp isoliert wurden. Das IFN- β Induktionspotential der MVs hingegen, die von *Lm*-pERL3-ssrS isoliert wurden, liegt unter dem Niveau der MVs vom Wildtyp.

Infolgedessen hat das unterschiedliche IFN- β Induktionspotential der beiden sRNAs zu der unterschiedlichen IFN- β Antwort durch die MVs der beiden Stämme geführt.

4.8. Produktion von MVs durch *L. monocytogenes*

Diese Arbeit hat die Produktion von MVs durch *L. monocytogenes* in der exponentiellen Phase während des Wachstums in Minimalmedium unter aeroben Bedingungen gezeigt. Die Charakterisierung der von *L. monocytogenes* produzierten MVs unter diesen Bedingungen beinhaltete u.a. die Visualisierung und Bestimmung der Größe, Anzahl und Proteinkonzentration. Die optische Darstellung der MVs wurde durch Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie durchgeführt (Abb. 3.26). Diese Visualisierung zeigt, dass *L. monocytogenes* sphärisch geformte MVs, die mehr oder weniger einheitlich sind in ihrer Größe, produziert. Die Größenbestimmung der MVs durch NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*) ergab, dass die von *L. monocytogenes* produzierten MVs eine durchschnittliche Größe von $130,7 \pm 1,0$ nm haben (Abb. 3.27). Eine Studie, die im Jahr 2013 erstmals die Produktion von MVs durch *L. monocytogenes* gezeigt hatte, hat dabei eine Größe von 20-100 nm festgestellt (Lee et al, 2013). Allerdings hat diese Studie MVs untersucht, die von *L. monocytogenes* in der stationären Phase während des Wachstums in BHI-Medium unter aeroben Bedingungen produziert werden. Die Anzahl der MVs, die aus 2 L *L. monocytogenes*-Kulturen isoliert wurden, beträgt laut NTA-Analyse ca. 70×10^9 . Die Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bradford-Methode ergab 150-200 $\mu\text{g}/2$ L Bakterienkultur. Die im Jahr 2013 durchgeführte Studie hat eine Proteinkonzentration von $121 \pm 6,2$ $\mu\text{g}/1$ L *L. monocytogenes*-Kultur angegeben. Diese Unterschiede zwischen der vorliegenden Arbeit und der Studie von Lee et al (2013) zeigen, dass die Produktion von MVs durch *L. monocytogenes* von äußeren Faktoren, wie beispielsweise das Wachstumsmedium, beeinflusst wird. Dass die Produktion von Vesikeln durch Bakterien von äußeren Bedingungen beeinflusst wird, wurde auch von anderen Studien gezeigt. Eine davon beispielsweise beschreibt den Einfluss des Wachstumsmediums auf die MVs-Produktion durch das Pflanzen-Pathogen *Xanthomonas campestris* (McBroom und Kuehn, 2007; Kadurugamuwa und Beveridge, 1995; Sidhu et al, 2008).

4.9. MVs enthalten Enzyme, die möglicherweise an deren Biogenese beteiligt sind

Die durch Rasterelektronenmikroskopie (REM) erzielten Bilder zeigen die Produktion von MVs durch *L. monocytogenes* (Abb. 3.26C und 3.26D). Darauf kann man erkennen, dass die Produktion von MVs über die gesamte Oberfläche von *L. monocytogenes* erfolgt. Der genaue Biogenese-Mechanismus für die Produktion von MVs durch gram-positive Bakterien ist weitgehend unbekannt. Ein Modell, das für die Produktion von OMVs durch gram-negative Bakterien von zwei Studien vorgeschlagen wurde, beschreibt die MVs-Produktion durch *L. monocytogenes* am plausibelsten (Kadurugamuwa und Beveridge, 1995; Pérez-Cruz et al, 2013). Basierend auf dieses Modell und aufgrund der Bilder, die durch REM erzielt wurden, kann man davon ausgehen, dass die von *L. monocytogenes* produzierten MVs von der Cytoplasmamembran abgeschnürt und ins extrazelluläre Milieu freigesetzt werden. Vor dem Abschnüren werden die MVs mit diversem zellulärem Material von der Mutterzelle befüllt. Dies würde die Anwesenheit von RNA und zahlreicher cytosolischer Proteine, die mit 37,62% die häufigsten Proteine in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs darstellen, erklären (Abb. 3.32). Der Unterschied in der Größe spiegelt wahrscheinlich den Beladungszustand der MVs wieder.

Wegen der Zellwand, die eine physikalische Barriere für deren Freisetzung darstellt, findet die Produktion von MVs sehr wahrscheinlich während des Wachstums und der Zellteilung von *L. monocytogenes* statt. Diese Prozesse beinhalten die Umgestaltung (*remodeling*) der Zelloberfläche durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen, darunter Enzyme, die den Abbau und die Biosynthese der Zellwand vermitteln. Die funktionelle Klassifizierung der über MS-Analyse identifizierten Proteine unter Verwendung der EggNOG 4.5.1-Datenbank zeigt, dass 7,10% der Proteine in den MVs in der Biogenese der Zellwand/Membran/Hülle involviert sind (Abb. 3.30). Diese funktionelle Kategorie ist die vierthäufigste beschriebene Funktion in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs. Hierzu gehören die Autolysine MurA, Ami, P60 und P45, die als Zellwandhydrolasen die Spaltung von kovalenten Bindungen katalysieren (Carvalho et al, 2014). Eine Vielzahl von verschiedenen Penicillin-bindenden Proteinen (PBP), die in der Zellwandsynthese involviert sind, zählt ebenfalls dazu (Bierne und Cossart, 2007). Die Anwesenheit weiterer Proteine, die in der Biogenese der Zellhülle involviert sind, spricht ebenfalls dafür, dass die Produktion von MVs durch *L. monocytogenes* an Stellen erfolgt wo ein aktives *remodeling* der Zelloberfläche stattfindet.

Der hohe Anteil an Proteine, die laut NCBI-Datenbank eine Lokalisation in der Cytoplasmamembran (20,59%) und in der Zellwand (8,48%) beschrieben haben, ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Zellhülle in der Biogenese der MVs involviert ist (Abb. 3.32).

4.10. MVs enthalten Proteine aus allen subzellulären Fraktionen: Cytoplasma, Cytoplasmamembran, Zellwand und Extrazellulär

Die über MS-Analyse identifizierten Proteine in den MVs wurden unter Verwendung der NCBI-Datenbank nach Lokalisation eingeteilt. Dies ergab, dass die MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, Proteine aus allen subzellulären Fraktionen enthalten (Abb. 3.32). Allerdings sind die Proteine aus den subzellulären Fraktionen Cytoplasma, Cytoplasmamembran, Zellwand und Extrazellulär mit jeweils unterschiedlichem Anteil in den MVs vertreten. Die meisten Proteine in den MVs mit 37,62% sind als cytosolische Proteine beschrieben. Der Grund hierfür ist der hohe Anteil an Proteine, die eine Funktion im Metabolismus beschrieben haben (Abb. 3.28). Diese stellen mit 37,37% die häufigsten Proteine in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs dar. Ein ähnlich hoher Anteil an cytosolischen Proteinen wurde auch in den Vesikeln, die beispielsweise von *Acinetobacter radioresistens* (gram-negativ) und *Mycobacterium tuberculosis* (gram-positiv) produziert werden, identifiziert (Fulsundar et al, 2015; Lee et al, 2015). Aufgrund des hohen Anteils an cytosolischen Proteinen kann man davon ausgehen, dass *L. monocytogenes* die Produktion von MVs u.a. für die Sekretion von cytosolischen Proteinen nutzt. Dies würde zum Teil die Sekretion von Proteinen, die keine Signalsequenz besitzen und für die es keinen beschriebenen Sekretionsweg gibt, erklären. Des Weiteren wäre eine Sekretion von bestimmten Proteinen sowohl über Proteinsekretionswege als auch über MVs denkbar. So wurde beispielsweise für die sogenannten *moonlighting* Proteinen, wie DnaK, GroEL, EF-Tu, Enolase, RNA-Polymerase und ribosomale Proteine, eine Sekretion über die SecA2-ATPase der Sec-Translokase gezeigt (Lenz et al, 2003). Diese Proteine sind auch in den MVs über MS-Analyse identifiziert worden. Das glykolytische Enzym Enolase beispielsweise zählt mit 2,90% zu den häufigsten Proteinen in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden (Abb. 3.33). Ein weiteres Protein für das eine Sekretion über die SecA2-ATPase gezeigt wurde, ist das Autolysin P60, das zur Trennung der Tochterzellen in der Zellteilung beiträgt (Pilgrim et al, 2003; Machata et al, 2005; Lenz et al,

2003). Ähnlich wie die Enolase zählt P60 mit 2,28% zu den häufigsten Proteinen in den MVs. Dies zeigt, dass *L. monocytogenes* für die Sekretion von bestimmten Proteinen ins extrazelluläre Milieu sowohl Proteinsekretionswege als auch die Produktion von MVs nutzt. Dass Bakterien beide Formen der Sekretion für den Export von bestimmten Proteinen nutzen, wurde auch von anderen Studien gezeigt. So wurde beispielsweise das Shiga-Toxin (Stx), das von *E. coli* O₁₀₄:H₄ produziert wird, teils in den OMVs (30%) und teils in den OMVs-freien Überstand (70%) identifiziert (Kunsmann et al, 2015). Weitere Analysen wären notwendig, um eine genaue Aussage darüber machen zu können welche Proteine von *L. monocytogenes* ausschließlich über MVs sekretiert werden.

Die Proteine, die von der NCBI-Datenbank als extrazellulär beschrieben sind, stellen mit 6,82% die kleinste Gruppe in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs dar (Abb. 3.32). Dies spricht dafür, dass *L. monocytogenes* die Produktion von MVs nicht für die Sekretion von Proteinen, die für den Export bestimmt sind, nutzt.

Proteine aus zwei weiteren subzellulären Fraktionen sind ebenfalls in den MVs identifiziert worden. Laut NCBI-Datenbank haben 20,59% und 8,48% der Proteine in den MVs eine Lokalisation in der Cytoplasmamembran und in der Zellwand beschrieben. Wie bereits erwähnt ist die Zellhülle möglicherweise in der Biogenese der MVs involviert. Dies würde die Anwesenheit zahlreicher sowohl Integraler und Membran-assoziiertes Proteine als auch Zellwand-assoziiertes Proteine erklären.

4.11. MVs enthalten zum Teil vollständige Stoffwechselwege zur Energiegewinnung

Die funktionelle Klassifizierung der Proteine unter Verwendung der EggNOG 4.5.1-Datenbank zeigt, dass die meisten in den MVs identifizierten Proteine (37,37%) im Metabolismus involviert sind (Abb. 3.28). Diese funktionelle Gruppe beinhaltet u.a. Proteine, die den Transport und den Stoffwechsel von Kohlenhydraten vermitteln. Diese machen knapp 10% der Proteine in den MVs aus und stellen damit die dritthäufigste beschriebene Funktion dar (Abb. 3.29). Eine genaue Analyse dieser Proteine ergab, dass die von *L. monocytogenes* produzierten MVs zum Teil vollständige Stoffwechselwege, die zur Energiegewinnung genutzt werden, enthalten. Die Glukose, die als einzige Energiequelle dem Minimalmedium zugefügt wurde, wird von *L. monocytogenes* unter aeroben Bedingungen über die Glykolyse und den Pentosephosphat-Weg zur

Energiegewinnung und Bereitstellung von Vorstufen für Biosynthesen abgebaut (Müller-Herbst et al, 2014; Kim et al, 2006). Sämtliche Enzyme beider Stoffwechselwege sind über MS-Analyse in den MVs identifiziert worden. Es wäre daher denkbar, dass diese Stoffwechselwege nach der Freisetzung der MVs ins extrazelluläre Milieu weiterhin aktiv sind. Dies würde bedeuten, dass in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs Energie in Form von ATP über die Glykolyse erzeugt wird. Der Pentosephosphat-Weg würde als alternativer Abbauweg für die Glukose u.a. Zwischenprodukte für die Glykolyse bereitstellen.

Die für die aerobe Atmung notwendigen Enzyme des Citrat-Zyklus und der Atmungskette sind nicht vollständig aber zum großen Teil ebenfalls in den MVs identifiziert worden. Diese dienen dem weiteren Abbau von Glukose, wodurch Vorstufen für Biosynthesen entstehen und die Regenerierung von Reduktionsäquivalenten erfolgt. Denkbar wäre es, dass manche Reaktionen dieser Stoffwechselwege in den MVs stattfinden, aufgrund der darin vorhandenen Enzyme.

Basierend auf der Anwesenheit sämtlicher Enzyme der Glykolyse und ganz entscheidend der Laktat-Dehydrogenase wäre eine Energiegewinnung durch Substratkettenphosphorylierung in Form einer Milchsäuregärung in den MVs denkbar. Die Regenerierung von Reduktionsäquivalenten würde in diesem Fall über Oxidation durch die Laktat-Dehydrogenase stattfinden und damit ein Weiterlaufen der Glykolyse sicherstellen.

Die Vermutung, dass in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs energieerzeugende Prozesse stattfinden, wird durch die Anwesenheit von Transporter für Kohlenhydrate unterstützt. So wurden über MS-Analyse Bestandteile verschiedener Phosphotransferase-Systeme (PTS), darunter PTS^{Man}-2/Mpt und PTS^{Man}-3/Mpo, in den MVs identifiziert (Stoll und Goebel, 2010). Es wäre daher denkbar, dass diese Transporter die Aufnahme von Glukose in die MVs vermitteln, woraus letztendlich ATP über die vorhin erwähnten Stoffwechselwege erzeugt wird. Die Erzeugung von ATP würde bedeuten, dass in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs biologische Prozesse stattfinden, die Energie benötigen. Um eine genaue Aussage darüber machen zu können, wären weitere Untersuchungen notwendig, wie beispielsweise die Messung der Aktivität verschiedener Enzyme und des ATP-Levels. Eine aktuelle Studie hat bereits gezeigt, dass in den von *Bacteroides fragilis* produzierten OMVs verschiedene

biochemische Reaktionen, die in dem Stoffwechsel von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Nukleotiden eine Rolle spielen, aktiv sind (Zakharzhevskaya et al, 2017).

4.12. MVs enthalten Virulenzfaktoren, die während der Infektion eine Rolle spielen

Diese Arbeit hat die Anwesenheit von Virulenzfaktoren in den MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, gezeigt. Diese wurden durch MS- und teils durch Western blot-Analyse identifiziert (Abb. 3.34 und 3.35). Hierbei handelt es sich um Virulenzfaktoren, die für den intrazellulären Infektionszyklus von *L. monocytogenes* essentiell sind (Abb. 1.1). Diese machen 10% der Proteine in den MVs aus. Die im Jahr 2013 durchgeführte Studie hat ebenfalls die Anwesenheit verschiedener Virulenzfaktoren in den MVs, die von *L. monocytogenes* während des Wachstums in BHI-Medium produziert werden, gezeigt (Lee et al, 2013). Demnach nutzt *L. monocytogenes*, selbst in unterschiedlichen Wachstumsmedien, die Produktion von MVs u.a. für die Sekretion von Virulenzfaktoren. Eine ähnliche Beobachtung wurde beispielsweise von einer Studie über das gram-negative Bakterium *Xanthomonas campestris* berichtet. Die von diesem Pflanzen-Pathogen produzierten OMVs enthalten als konstanten Bestandteil, trotz deren Produktion in unterschiedlichen Wachstumsmedien und einem entsprechend unterschiedlichem Proteinhalt, Virulenzfaktoren (Sidhu et al, 2008). Die Sekretion von Virulenzfaktoren über die Produktion von Vesikeln wurde für verschiedene pathogene Bakterienspezies gezeigt (Rivera et al, 2010; Thay et al, 2013; Kunsmann et al, 2015). ETEC (*Enterotoxigenic Escherichia coli*) beispielsweise sekretiert den überwiegenden Teil des hitzelabilen Enterotoxins LT (mehr als 95%) über OMVs (Kesty et al, 2004). Daher stellen Vesikel, neben den bekannten Sekretionswege für Proteine, einen zusätzlichen Sekretionsmechanismus für Virulenzfaktoren und weitere Proteine dar.

Diese Arbeit hat des Weiteren die Internalisierung von MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, in die Epithelzelllinie PtK gezeigt. Dies wurde durch Detektion des Autolysins P60 im Zelllysate der PtK-Zellen nach deren Inkubation mit MVs über Western blot-Analyse gezeigt (Abb. 3.37). Eine aktuelle Studie hat die Internalisierung von MVs, die von *L. monocytogenes* produziert werden, in die Epithelzelllinie HeLa gezeigt. Hierfür wurde allerdings kein Mechanismus gezeigt (Vdovikova et al, 2017).

Eine rezeptorvermittelte Endocytose über die Internaline A und B, die durch MS- und teils durch Western blot-Analyse in den MVs identifiziert worden sind, wäre für deren Internalisierung denkbar (Abb. 3.34 und 3.35B). Diese Virulenzfaktoren, die für die Internalisierung von *L. monocytogenes* in nicht-phagozytierenden Zellen essentiell sind, könnten in ähnlicher Weise die Internalisierung der MVs vermitteln (Seveau et al, 2004). Um eine genaue Aussage über die Beteiligung der Internaline an dem Internalisierungsprozess von MVs in eukaryotische Zellen machen zu können, wären weitere Untersuchungen notwendig. Dass Virulenzfaktoren in den Vesikeln, die von verschiedenen pathogenen Bakterienspezies produziert werden, deren Assoziation und Aufnahme durch eukaryotische Zellen vermitteln, wurde von weiteren Studien gezeigt (Bauman und Kuehn, 2006; Bauman und Kuehn, 2009; Kesty et al, 2004).

Die Funktionalität der Virulenzfaktoren in den von *L. monocytogenes* produzierten MVs wurde durch Hämolyse-Assay gezeigt (Abb. 3.36). Hierdurch wurde eine konzentrationsabhängige Lyse von Schafserythrozyten durch die MVs gezeigt. Dieser Effekt wurde durch Listeriolysin O (LLO), das mit 2,12% zu den häufigsten Proteinen in den MVs zählt, verursacht (Abb. 3.33). Dies wurde von einer aktuellen Studie bestätigt, die gezeigt hat, dass die von der LLO-Deletionsmutante produzierten MVs keinen hämolytischen Effekt haben (Vdovikova et al, 2017). Diese Studie hat zudem gezeigt, dass LLO in einer nicht-aktiven Form in den MVs vorhanden ist. Listeriolysin O ist ein Hämolysin, das seine maximale Aktivität bei einem leicht saurem pH-Wert, wie das beispielsweise im Lysosom der Fall ist, entfaltet (Glomski et al, 2002). Allerdings gelangen MVs nach der Internalisierung im Lysosom, woraus sie möglicherweise durch die Aktivität des MVs-assoziierten LLO entkommen (Vdovikova et al, 2017).

5. Zusammenfassung

Diese Arbeit hat erstmals die RNA, die von *L. monocytogenes* während des Wachstums sekretiert wird, umfassend untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde gezeigt, dass *L. monocytogenes* die Produktion von *Membrane vesicles* (MVs) für die Sekretion von RNA (MVs-RNA) nutzt. Darüber hinaus hat diese Arbeit gezeigt, dass der überwiegende Teil der extrazellulären RNA in einer freien, nicht MVs-assoziierten Form (sec-RNA) sekretiert wird. Die umfassende Untersuchung von sec-RNA und MVs-RNA hat die einzigartige Zusammensetzung und Vielfalt der RNA, die von *L. monocytogenes* sekretiert wird, enthüllt. Hierdurch wurde gezeigt, dass sec-RNA und MVs-RNA sich sowohl untereinander als auch von der zellulären RNA unterscheiden, bezüglich Vorkommen und Häufigkeit bestimmter RNA-Spezies. Darüber hinaus hat diese Arbeit die besondere Eigenschaft von sec-RNA und MVs-RNA eine höhere IFN- β Antwort in Wirtszellen auszulösen als die zelluläre RNA gezeigt. Hierdurch wurde gezeigt, dass die Induktion von IFN- β ein Charakteristikum der RNA, die von *L. monocytogenes* sekretiert wird, darstellt. Diese Erkenntnis weist auf eine funktionelle Abgrenzung von sec-RNA und MVs-RNA von der zellulären RNA hin. Für die unterschiedliche IFN- β Antwort wurde die diverse Zusammensetzung von sec-RNA, MVs-RNA und zelluläre RNA aus RNAs mit unterschiedlichem immunstimulatorischem Potential ausgemacht. Dies beruht auf der Erkenntnis, dass individuelle RNAs, die in sec-RNA und MVs-RNA identifiziert worden sind, ein unterschiedliches Potential besitzen eine IFN- β Antwort in Wirtszellen auszulösen. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden zwei sRNAs, rli32 mit einem sehr hohen und ssrS mit einem sehr schwachen IFN- β Induktionspotential, identifiziert. In diesem Zusammenhang hat diese Arbeit erstmals die antivirale Aktivität von individuellen bakteriellen sRNAs gezeigt. Hierdurch wurde die Wirksamkeit der RIG-I-abhängigen IFN- β Antwort, die von den sRNAs ausgelöst wird, im Kontext einer viralen Infektion gezeigt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die von *L. monocytogenes* produzierten MVs eine Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen, die in verschiedenen zellulären Prozessen involviert sind, enthalten. Im Rahmen dieser Untersuchung hat diese Arbeit erstmals die Anwesenheit zum Teil vollständiger Stoffwechselwege und Kohlenhydrattransporter, die zur Energiegewinnung genutzt werden, gezeigt. Diese Erkenntnis weist auf aktive biologische Prozesse in den MVs, die von *L.*

monocytogenes produziert werden, hin. Darüber hinaus hat diese Arbeit die Anwesenheit von Virulenzfaktoren in den MVs und damit deren potentielle Beteiligung an dem Infektionsprozess von *L. monocytogenes* gezeigt.

5.1. Summary

This work has for the first time extensively studied the RNA secreted by *L. monocytogenes* during growth. In the context of this research it was shown that *L. monocytogenes* are using the production of *membrane vesicles* (MVs) for the secretion of RNA (MVs-RNA). In addition, this work has shown that the majority of the extracellular RNA is being secreted in a free, not MVs-associated form (sec-RNA). The comprehensive study of sec-RNA and MVs-RNA has revealed the unique composition and diversity of RNA, which is secreted by *L. monocytogenes*. It was shown that sec-RNA and MVs-RNA differ in their occurrence and abundance of specific RNA species, both among each other and from the cellular RNA. Moreover, this work has revealed the special characteristic of sec-RNA and MVs-RNA to elicit a higher IFN- β response in host cells than the cellular RNA. Thru this it was shown that the induction of IFN- β is a characteristic of the RNA secreted by *L. monocytogenes*. This finding points to a functional demarcation of sec-RNA and MVs-RNA from cellular RNA. It was shown that the diverse composition of sec-RNA, MVs-RNA and cellular RNA consisting of RNAs with different immune stimulatory potential is responsible for the different IFN- β response. This is based on the finding that individual RNAs, which have been identified in sec-RNA and MVs-RNA, have a different potential to trigger an IFN- β response in host cells. Within this study, two sRNAs, rli32 with a very high and ssrS with a very weak IFN- β induction potential, were identified. In this context, this work has for the first time demonstrated the antiviral activity of individual bacterial sRNAs. This demonstrated the effectiveness of the RIG-I-dependent IFN- β response triggered by the sRNAs in the context of a viral infection.

In the second part of this work, it has been shown that the MVs produced by *L. monocytogenes* contain a large number of different proteins which are involved in different cellular processes. In the context of this study, this work has for the first time shown the presence of partially complete metabolic pathways and carbohydrate transporters used for energy production. This finding points to active biological processes in the MVs produced by *L. monocytogenes*. In addition, this work has shown

the presence of virulence factors in the MVs and with that their potential involvement in the infection process of *L. monocytogenes*.

6. Abkürzungsverzeichnis

BMDMs = bone marrow-derived macrophages
Bp = Basenpaare
BSA = Bovine Serum Albumin
CIAP = Alkaline Phosphatase, Calf intestinal
DCs = Dendritic cells
dsDNA = double-stranded DNA
dsRNA = double-stranded RNA
FKS = Fötale Kälberserum
IVT-RNA = in vitro transkribierte RNA
Lm = *Listeria monocytogenes*
MDA5 = melanoma differentiation-associated gene 5
MS = Massenspektrometrie
MVs = Membrane Vesicles
Nt = Nukleotide
NTA = Nanoparticle Tracking Analysis
OMVs = Outer Membrane Vesicles
PBS = Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PCR = Polymerase chain reaction
P/S = Penicillin/Streptomycin
REM = Rasterelektronenmikroskopie
RIG-I = retinoic acid-inducible gene I
Rli = RNA in *Listeria*
RLR = RIG-I-like receptors
RT = Raumtemperatur
RT-PCR = Real-Time PCR
ssRNA = single-stranded RNA
sRNA = small non-coding RNA
TEM = Transmissionselektronenmikroskopie
T.R. = Transfektionsreagenz
WT = Wildtyp

7. Literaturverzeichnis

- Abachin, Eric; Poyart, Claire; Pellegrini, Elisabeth; Milohanic, Eliane; Fiedler, Franz; Berche, Patrick; Trieu-Cuot, Patrick (2002): Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. In: *Molecular microbiology* 43 (1), S. 1–14.
- Abdullah, Zeinab; Schlee, Martin; Roth, Susanne; Mraheil, Mobarak Abu; Barchet, Winfried; Böttcher, Jan et al. (2012): RIG-I detects infection with live *Listeria* by sensing secreted bacterial nucleic acids. In: *The EMBO journal* 31 (21), S. 4153–4164.
- Alaniz, Robert C.; Deatherage, Brooke L.; Lara, Jimmie C.; Cookson, Brad T. (2007): Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 179 (11), S. 7692–7701.
- Albert, M. L.; Sauter, B.; Bhardwaj, N. (1998): Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. In: *Nature* 392 (6671), S. 86–89.
- Alonzo, Francis; Freitag, Nancy E. (2010): *Listeria monocytogenes* PrsA2 is required for virulence factor secretion and bacterial viability within the host cell cytosol. In: *Infection and immunity* 78 (11), S. 4944–4957.
- Alonzo, Francis; Port, Gary C.; Cao, Min; Freitag, Nancy E. (2009): The posttranslocation chaperone PrsA2 contributes to multiple facets of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. In: *Infection and immunity* 77 (7), S. 2612–2623.
- Altuvia, S.; Almirón, M.; Huisman, G.; Kolter, R.; Storz, G. (1994): The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. In: *Molecular microbiology* 13 (2), S. 265–272.
- Andersson, A.; Dai, W. J.; Di Santo, J. P.; Brombacher, F. (1998): Early IFN-gamma production and innate immunity during *Listeria monocytogenes* infection in the absence of NK cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161 (10), S. 5600–5606.
- Arroyo, Jason D.; Chevillet, John R.; Kroh, Evan M.; Ruf, Ingrid K.; Pritchard, Colin C.; Gibson, Donald F. et al. (2011): Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (12), S. 5003–5008.
- Aubry, Camille; Corr, Sinéad C.; Wienerroither, Sebastian; Goulard, Céline; Jones, Ruth; Jamieson, Amanda M. et al. (2012): Both TLR2 and TRIF contribute to interferon- β production during *Listeria* infection. In: *PloS one* 7 (3), e33299.
- Auerbuch, Victoria; Brockstedt, Dirk G.; Meyer-Morse, Nicole; O’Riordan, Mary; Portnoy, Daniel A. (2004): Mice lacking the type I interferon receptor are resistant to *Listeria monocytogenes*. In: *The Journal of experimental medicine* 200 (4), S. 527–533.
- Avila-Calderón, Eric Daniel; Lopez-Merino, Ahidé; Jain, Neeta; Peralta, Humberto; López-Villegas, Edgar Oliver; Sriranganathan, Nammalwar et al. (2012): Characterization of outer membrane vesicles from *Brucella melitensis* and protection induced in mice. In: *Clinical & developmental immunology* 2012, S. 352493.
- Baldwin, Scott; Deighan, Clayton; Bandeira, Elga; Kwak, Kwang J.; Rahman, Mohammad; Nana-Sinkam, Patrick et al. (2017): Analyzing the miRNA content of extracellular vesicles by fluorescence nanoparticle tracking. In: *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 13 (2), S. 765–770.
- Bauman, Susanne J.; Kuehn, Meta J. (2006): Purification of outer membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* and their activation of an IL-8 response. In: *Microbes and infection* 8 (9-10), S. 2400–2408.

- Bauman, Susanne J.; Kuehn, Meta J. (2009): *Pseudomonas aeruginosa* vesicles associate with and are internalized by human lung epithelial cells. In: *BMC microbiology* 9, S. 26.
- Beckerman, K. P.; Rogers, H. W.; Corbett, J. A.; Schreiber, R. D.; McDaniel, M. L.; Unanue, E. R. (1993): Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 150 (3), S. 888–895.
- Beha, Daniel; Deitermann, Sandra; Müller, Matthias; Koch, Hans-Georg (2003): Export of beta-lactamase is independent of the signal recognition particle. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (24), S. 22161–22167.
- Behrens, S. E.; Tomei, L.; Francesco, R. de (1996): Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. In: *The EMBO journal* 15 (1), S. 12–22.
- Berche, P.; Gaillard, J. L.; Sansonetti, P. J. (1987): Intracellular growth of *Listeria monocytogenes* as a prerequisite for in vivo induction of T cell-mediated immunity. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 138 (7), S. 2266–2271.
- Berche, P.; Gaillard, J. L.; Geoffroy, C.; Alouf, J. E. (1987): T cell recognition of listeriolysin O is induced during infection with *Listeria monocytogenes*. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 139 (11), S. 3813–3821.
- Berg, Rance E.; Cordes, Christoph J.; Forman, James (2002): Contribution of CD8+ T cells to innate immunity. IFN- γ secretion induced by IL-12 and IL-18. In: *Eur. J. Immunol.* 32 (10), S. 2807–2816.
- Bergmann, Birgit; Raffelsbauer, Diana; Kuhn, Michael; Goetz, Monika; Hom, Silke; Goebel, Werner (2002): InlA- but not InlB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. In: *Molecular microbiology* 43 (3), S. 557–570.
- Bernard, Remi; Guiseppi, Annick; Chippaux, Marc; Foglino, Maryline; Denizot, François (2007): Resistance to bacitracin in *Bacillus subtilis*. Unexpected requirement of the BceAB ABC transporter in the control of expression of its own structural genes. In: *Journal of bacteriology* 189 (23), S. 8636–8642.
- Bierne, Hélène; Cossart, Pascale (2007): *Listeria monocytogenes* surface proteins. From genome predictions to function. In: *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* 71 (2), S. 377–397.
- Bille, J.; Blanc, D. S.; Schmid, H.; Boubaker, K.; Baumgartner, A.; Siegrist, H. H. et al. (2006): Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. In: *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 11 (6), S. 91–93.
- Biller, Steven J.; Schubotz, Florence; Roggensack, Sara E.; Thompson, Anne W.; Summons, Roger E.; Chisholm, Sallie W. (2014): Bacterial vesicles in marine ecosystems. In: *Science (New York, N.Y.)* 343 (6167), S. 183–186.
- Blenkiron, Cherie; Simonov, Denis; Muthukaruppan, Anita; Tsai, Peter; Dauros, Priscila; Green, Sasha et al. (2016): Uropathogenic *Escherichia coli* Releases Extracellular Vesicles That Are Associated with RNA. In: *PLoS one* 11 (8), e0160440.
- Bomberger, Jennifer M.; Maceachran, Daniel P.; Coutermarsh, Bonita A.; Ye, Siying; O'Toole, George A.; Stanton, Bruce A. (2009): Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. In: *PLoS pathogens* 5 (4), e1000382.
- Bonnefoy, E.; Rouvière-Yaniv, J. (1992): HU, the major histone-like protein of *E. coli*, modulates the binding of IHF to oriC. In: *The EMBO journal* 11 (12), S. 4489–4496.

- Borezee, E.; Pellegrini, E.; Berche, P. (2000): OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. In: *Infection and immunity* 68 (12), S. 7069–7077.
- Bortolussi, R.; Vandenbroucke-Grauls, C. M.; van Asbeck, B. S.; Verhoef, J. (1987): Relationship of bacterial growth phase to killing of *Listeria monocytogenes* by oxidative agents generated by neutrophils and enzyme systems. In: *Infection and immunity* 55 (12), S. 3197–3203.
- Brunt, L. M.; Portnoy, D. A.; Unanue, E. R. (1990): Presentation of *Listeria monocytogenes* to CD8+ T cells requires secretion of hemolysin and intracellular bacterial growth. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 145 (11), S. 3540–3546.
- Buchmeier, N. A.; Schreiber, R. D. (1985): Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (21), S. 7404–7408.
- Burdette, Dara L.; Monroe, Kathryn M.; Sotelo-Troha, Katia; Iwig, Jeff S.; Eckert, Barbara; Hyodo, Mamoru et al. (2011): STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. In: *Nature* 478 (7370), S. 515–518.
- Carrero, Javier A.; Calderon, Boris; Unanue, Emil R. (2004): Type I interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to *Listeria* infection. In: *The Journal of experimental medicine* 200 (4), S. 535–540.
- Carrero, Javier A.; Calderon, Boris; Unanue, Emil R. (2006): Lymphocytes are detrimental during the early innate immune response against *Listeria monocytogenes*. In: *The Journal of experimental medicine* 203 (4), S. 933–940.
- Carvalho, Filipe; Sousa, Sandra; Cabanes, Didier (2014): How *Listeria monocytogenes* organizes its surface for virulence. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 4, S. 48.
- Cella, M.; Jarrossay, D.; Facchetti, F.; Alebardi, O.; Nakajima, H.; Lanzavecchia, A.; Colonna, M. (1999): Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. In: *Nature medicine* 5 (8), S. 919–923.
- Chakraborty, T.; Hain, T.; Domann, E. (2000): Genome organization and the evolution of the virulence gene locus in *Listeria* species. In: *International journal of medical microbiology : IJMM* 290 (2), S. 167–174.
- Chakraborty, T.; Leimeister-Wächter, M.; Domann, E.; Hartl, M.; Goebel, W.; Nichterlein, T.; Notermans, S. (1992): Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. In: *Journal of bacteriology* 174 (2), S. 568–574.
- Chatterjee, Som Subhra; Hossain, Hamid; Otten, Sonja; Kuenne, Carsten; Kuchmina, Katja; Machata, Silke et al. (2006): Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. In: *Infection and immunity* 74 (2), S. 1323–1338.
- Chevillet, John R.; Kang, Qing; Ruf, Ingrid K.; Briggs, Hilary A.; Vojtech, Lucia N.; Hughes, Sean M. et al. (2014): Quantitative and stoichiometric analysis of the microRNA content of exosomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (41), S. 14888–14893.
- Chico-Calero, Isabel; Suárez, Mónica; González-Zorn, Bruno; Scotti, Mariela; Slaghuis, Jörg; Goebel, Werner; Vázquez-Boland, José A. (2002): Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (1), S. 431–436.
- Choi, Ji-Woong; Kwon, Tae-Yub; Hong, Su-Hyung; Lee, Heon-Jin (2016): Isolation and Characterization of a microRNA-size Secretable Small RNA in *Streptococcus sanguinis*. In: *Cell biochemistry and biophysics*.

- Christiansen, Janne K.; Nielsen, Jesper S.; Ebersbach, Tine; Valentin-Hansen, Poul; Søgaaard-Andersen, Lotte; Kallipolitis, Birgitte H. (2006): Identification of small Hfq-binding RNAs in *Listeria monocytogenes*. In: *RNA (New York, N.Y.)* 12 (7), S. 1383–1396.
- Coch, Christoph; Stümpel, Jan Phillip; Lilien-Waldau, Vanessa; Wohlleber, Dirk; Kümmerer, Beate M.; Bekeredjian-Ding, Isabelle et al. (2017): RIG-I Activation Protects and Rescues from Lethal Influenza Virus Infection and Bacterial Superinfection. In: *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* 25 (9), S. 2093–2103.
- Colonna, Marco; Krug, Anne; Cella, Marina (2002): Interferon-producing cells. On the front line in immune responses against pathogens. In: *Current opinion in immunology* 14 (3), S. 373–379.
- Conlan, J. W.; North, R. J. (1991): Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. In: *The Journal of experimental medicine* 174 (3), S. 741–744.
- Conlan, J. W.; North, R. J. (1992): Roles of *Listeria monocytogenes* virulence factors in survival. Virulence factors distinct from listeriolysin are needed for the organism to survive an early neutrophil-mediated host defense mechanism. In: *Infection and immunity* 60 (3), S. 951–957.
- Crimmins, Gregory T.; Herskovits, Anat A.; Rehder, Kai; Sivick, Kelsey E.; Lauer, Peter; Dubensky, Thomas W.; Portnoy, Daniel A. (2008): *Listeria monocytogenes* multidrug resistance transporters activate a cytosolic surveillance pathway of innate immunity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (29), S. 10191–10196.
- Cui, Sheng; Eisenächer, Katharina; Kirchhofer, Axel; Brzózka, Krzysztof; Lammens, Alfred; Lammens, Katja et al. (2008): The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. In: *Molecular cell* 29 (2), S. 169–179.
- Desvaux, Mickaël; Hébraud, Michel (2006): The protein secretion systems in *Listeria*. Inside out bacterial virulence. In: *FEMS microbiology reviews* 30 (5), S. 774–805.
- Diebold, Sandra S.; Montoya, Maria; Unger, Hermann; Alexopoulou, Lena; Roy, Polly; Haswell, Linsey E. et al. (2003): Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. In: *Nature* 424 (6946), S. 324–328.
- Domann, E.; Leimeister-Wächter, M.; Goebel, W.; Chakraborty, T. (1991): Molecular cloning, sequencing, and identification of a metalloprotease gene from *Listeria monocytogenes* that is species specific and physically linked to the listeriolysin gene. In: *Infection and immunity* 59 (1), S. 65–72.
- Domann, E.; Wehland, J.; Rohde, M.; Pistor, S.; Hartl, M.; Goebel, W. et al. (1992): A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. In: *The EMBO journal* 11 (5), S. 1981–1990.
- Dorward, D. W.; Garon, C. F.; Judd, R. C. (1989): Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of *Neisseria gonorrhoeae*. In: *Journal of bacteriology* 171 (5), S. 2499–2505.
- Dragovic, Rebecca A.; Gardiner, Christopher; Brooks, Alexandra S.; Tannetta, Dionne S.; Ferguson, David J. P.; Hole, Patrick et al. (2011): Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. In: *Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine* 7 (6), S. 780–788.
- Engelbrecht, F.; Chun, S. K.; Ochs, C.; Hess, J.; Lottspeich, F.; Goebel, W.; Sokolovic, Z. (1996): A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. In: *Molecular microbiology* 21 (4), S. 823–837.

- Farber, J. M.; Peterkin, P. I. (1991): *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. In: *Microbiological reviews* 55 (3), S. 476–511.
- Fiocca, R.; Necchi, V.; Sommi, P.; Ricci, V.; Telford, J.; Cover, T. L.; Solcia, E. (1999): Release of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin by both a specific secretion pathway and budding of outer membrane vesicles. Uptake of released toxin and vesicles by gastric epithelium. In: *The Journal of pathology* 188 (2), S. 220–226.
- Fraser, K. R.; Harvie, D.; Coote, P. J.; O'Byrne, C. P. (2000): Identification and characterization of an ATP binding cassette L-carnitine transporter in *Listeria monocytogenes*. In: *Applied and environmental microbiology* 66 (11), S. 4696–4704.
- Fulsundar, Shweta; Harms, Klaus; Flaten, Gøril E.; Johnsen, Pål J.; Chopade, Balu Ananda; Nielsen, Kaare M. (2014): Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation. In: *Applied and environmental microbiology* 80 (11), S. 3469–3483.
- Fulsundar, Shweta; Kulkarni, Heramb M.; Jagannadham, Medicharla V.; Nair, Rashmi; Keerthi, Sravani; Sant, Pooja et al. (2015): Molecular characterization of outer membrane vesicles released from *Acinetobacter radioresistens* and their potential roles in pathogenesis. In: *Microbial pathogenesis* 83-84, S. 12–22.
- Furuse, Yuki; Finethy, Ryan; Saka, Hector A.; Xet-Mull, Ana M.; Sisk, Dana M.; Smith, Kristen L. Jurcic et al. (2014): Search for microRNAs expressed by intracellular bacterial pathogens in infected mammalian cells. In: *PloS one* 9 (9), e106434.
- Furuta, Nobumichi; Tsuda, Kayoko; Omori, Hiroko; Yoshimori, Tamotsu; Yoshimura, Fuminobu; Amano, Atsuo (2009): *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles enter human epithelial cells via an endocytic pathway and are sorted to lysosomal compartments. In: *Infection and immunity* 77 (10), S. 4187–4196.
- Gaillard, J. L.; Berche, P.; Mounier, J.; Richard, S.; Sansonetti, P. (1987): In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. In: *Infection and immunity* 55 (11), S. 2822–2829.
- Gedde, M. M.; Higgins, D. E.; Tilney, L. G.; Portnoy, D. A. (2000): Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. In: *Infection and immunity* 68 (2), S. 999–1003.
- Geissmann, Thomas A.; Touati, Danièle (2004): Hfq, a new chaperoning role. Binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. In: *The EMBO journal* 23 (2), S. 396–405.
- Geoffroy, C.; Raveneau, J.; Beretti, J. L.; Lecroisey, A.; Vazquez-Boland, J. A.; Alouf, J. E.; Berche, P. (1991): Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. In: *Infection and immunity* 59 (7), S. 2382–2388.
- Georgellis, D.; Sohlberg, B.; Hartl, F. U.; Gabain, A. von (1995): Identification of GroEL as a constituent of an mRNA-protection complex in *Escherichia coli*. In: *Molecular microbiology* 16 (6), S. 1259–1268.
- Ghosal, Anubrata; Upadhyaya, Bimal Babu; Fritz, Joëlle V.; Heintz-Buschart, Anna; Desai, Mahesh S.; Yusuf, Dilmurat et al. (2015): The extracellular RNA complement of *Escherichia coli*. In: *MicrobiologyOpen*.
- Glaser, P.; Frangeul, L.; Buchrieser, C.; Rusniok, C.; Amend, A.; Baquero, F. et al. (2001): Comparative genomics of *Listeria* species. In: *Science (New York, N.Y.)* 294 (5543), S. 849–852.
- Glomski, Ian J.; Gedde, Margaret M.; Tsang, Albert W.; Swanson, Joel A.; Portnoy, Daniel A. (2002): The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize

- activity and prevent damage to infected host cells. In: *The Journal of cell biology* 156 (6), S. 1029–1038.
- Gratz, Nina; Hartweger, Harald; Matt, Ulrich; Kratochvill, Franz; Janos, Marton; Sigel, Stefanie et al. (2011): Type I interferon production induced by *Streptococcus pyogenes*-derived nucleic acids is required for host protection. In: *PLoS pathogens* 7 (5), e1001345.
- Gruber, Andreas R.; Lorenz, Ronny; Bernhart, Stephan H.; Neuböck, Richard; Hofacker, Ivo L. (2008): The Vienna RNA websuite. In: *Nucleic acids research* 36 (Web Server issue), W70-4.
- Gurung, Mamata; Moon, Dong Chan; Choi, Chi Won; Lee, Jung Hwa; Bae, Yong Chul; Kim, Jungmin et al. (2011): *Staphylococcus aureus* produces membrane-derived vesicles that induce host cell death. In: *PloS one* 6 (11), e27958.
- Hagmann, Cristina Amparo; Herzner, Anna Maria; Abdullah, Zeinab; Zillinger, Thomas; Jakobs, Christopher; Schuberth, Christine et al. (2013): RIG-I detects triphosphorylated RNA of *Listeria monocytogenes* during infection in non-immune cells. In: *PloS one* 8 (4), e62872.
- Hain, Torsten; Hossain, Hamid; Chatterjee, Som S.; Machata, Silke; Volk, Ute; Wagner, Sandra et al. (2008): Temporal transcriptomic analysis of the *Listeria monocytogenes* EGD-e sigmaB regulon. In: *BMC microbiology* 8, S. 20.
- Hansen, Kathrine; Prabakaran, Thaneas; Laustsen, Anders; Jørgensen, Sofie E.; Rahbæk, Stine H.; Jensen, Søren B. et al. (2014): *Listeria monocytogenes* induces IFN β expression through an IFI16-, cGAS- and STING-dependent pathway. In: *The EMBO journal* 33 (15), S. 1654–1666.
- Havell, E. A. (1989): Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 143 (9), S. 2894–2899.
- Ho, Meng-Hsuan; Chen, Chin-Ho; Goodwin, J. Shawn; Wang, Bing-Yan; Xie, Hua (2015): Functional Advantages of *Porphyromonas gingivalis* Vesicles. In: *PloS one* 10 (4), e0123448.
- Holst, Johan; Martin, Diana; Arnold, Richard; Huergo, Concepcion Campa; Oster, Philipp; O'Hallahan, Jane; Rosenqvist, Einar (2009): Properties and clinical performance of vaccines containing outer membrane vesicles from *Neisseria meningitidis*. In: *Vaccine* 27 Suppl 2, B3-12.
- Honda, Kenya; Taniguchi, Tadatsugu (2006): IRFs. Master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. In: *Nature reviews. Immunology* 6 (9), S. 644–658.
- Huang, S.; Hendriks, W.; Althage, A.; Hemmi, S.; Bluethmann, H.; Kamijo, R. et al. (1993): Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. In: *Science (New York, N.Y.)* 259 (5102), S. 1742–1745.
- Huerta-Cepas, Jaime; Szklarczyk, Damian; Forslund, Kristoffer; Cook, Helen; Heller, Davide; Walter, Mathias C. et al. (2016): eggNOG 4.5. A hierarchical orthology framework with improved functional annotations for eukaryotic, prokaryotic and viral sequences. In: *Nucleic acids research* 44 (D1), D286-93.
- Isaacs, A.; Lindemann, J. (1957): Virus interference. I. The interferon. In: *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 147 (927), S. 258–267.
- Jensen, Lars Juhl; Julien, Philippe; Kuhn, Michael; Mering, Christian von; Muller, Jean; Doerks, Tobias; Bork, Peer (2008): eggNOG. Automated construction and annotation of orthologous groups of genes. In: *Nucleic acids research* 36 (Database issue), D250-4.
- Johansson, Jörgen; Mandin, Pierre; Renzoni, Adriana; Chiaruttini, Claude; Springer, Mathias; Cossart, Pascale (2002): An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. In: *Cell* 110 (5), S. 551–561.

- Johnson, J. L.; Doyle, M. P.; Cassens, R. G.; Schoeni, J. L. (1988): Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. In: *Applied and environmental microbiology* 54 (2), S. 497–501.
- Jung, Steffen; Unutmaz, Derya; Wong, Phillip; Sano, Gen-Ichiro; los Santos, Kenia de; Sparwasser, Tim et al. (2002): In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. In: *Immunity* 17 (2), S. 211–220.
- Kadurugamuwa, J. L.; Beveridge, T. J. (1995): Virulence factors are released from *Pseudomonas aeruginosa* in association with membrane vesicles during normal growth and exposure to gentamicin. A novel mechanism of enzyme secretion. In: *Journal of bacteriology* 177 (14), S. 3998–4008.
- Kadurugamuwa, J. L.; Beveridge, T. J. (1998): Delivery of the non-membrane-permeative antibiotic gentamicin into mammalian cells by using *Shigella flexneri* membrane vesicles. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 42 (6), S. 1476–1483.
- Kang, Sung-Min; Choi, Ji-Woong; Lee, Youngkyun; Hong, Su-Hyung; Lee, Heon-Jin (2013): Identification of microRNA-size, small RNAs in *Escherichia coli*. In: *Current microbiology* 67 (5), S. 609–613.
- Kanneganti, Thirumala-Devi; Ozören, Nesrin; Body-Malapel, Mathilde; Amer, Amal; Park, Jong-Hwan; Franchi, Luigi et al. (2006): Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3. In: *Nature* 440 (7081), S. 233–236.
- Kaparakis, Maria; Turnbull, Lynne; Carneiro, Leticia; Firth, Stephen; Coleman, Harold A.; Parkington, Helena C. et al. (2010): Bacterial membrane vesicles deliver peptidoglycan to NOD1 in epithelial cells. In: *Cellular microbiology* 12 (3), S. 372–385.
- Kato, Hiroki; Takahashi, Kiyohiro; Fujita, Takashi (2011): RIG-I-like receptors. Cytoplasmic sensors for non-self RNA. In: *Immunological reviews* 243 (1), S. 91–98.
- Kato, Hiroki; Takeuchi, Osamu; Sato, Shintaro; Yoneyama, Mitsutoshi; Yamamoto, Masahiro; Matsui, Kosuke et al. (2006): Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. In: *Nature* 441 (7089), S. 101–105.
- Kawai, Taro; Akira, Shizuo (2008): Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1143, S. 1–20.
- Kawai, Taro; Akira, Shizuo (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity. Update on Toll-like receptors. In: *Nature immunology* 11 (5), S. 373–384.
- Kesty, Nicole C.; Mason, Kevin M.; Reedy, Mary; Miller, Sara E.; Kuehn, Meta J. (2004): Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells. In: *The EMBO journal* 23 (23), S. 4538–4549.
- Kim, Hyun-Jin; Mittal, Meghna; Sonenshein, Abraham L. (2006): CcpC-dependent regulation of citB and lmo0847 in *Listeria monocytogenes*. In: *Journal of bacteriology* 188 (1), S. 179–190.
- Klieve, Athol V.; Yokoyama, Melvin T.; Forster, Robert J.; Ouwkerk, Diane; Bain, Peter A.; Mawhinney, Erin L. (2005): Naturally occurring DNA transfer system associated with membrane vesicles in cellulolytic *Ruminococcus* spp. of ruminal origin. In: *Applied and environmental microbiology* 71 (8), S. 4248–4253.
- Ko, R.; Smith, L. T. (1999): Identification of an ATP-driven, osmoregulated glycine betaine transport system in *Listeria monocytogenes*. In: *Applied and environmental microbiology* 65 (9), S. 4040–4048.
- Kocks, C.; Gouin, E.; Tabouret, M.; Berche, P.; Ohayon, H.; Cossart, P. (1992): *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. In: *Cell* 68 (3), S. 521–531.

- Koenig, Carl Heinz Wirsing von; Finger, Horst; Hof, Herbert (1982): Failure of killed *Listeria monocytogenes* vaccine to produce protective immunity. In: *Nature* 297 (5863), S. 233–234.
- Koepfen, Katja; Hampton, Thomas H.; Jarek, Michael; Scharfe, Maren; Gerber, Scott A.; Mielcarz, Daniel W. et al. (2016): A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles. In: *PLoS pathogens* 12 (6), e1005672.
- Kogure, Takayuki; Lin, Wen-Lang; Yan, Irene K.; Braconi, Chiara; Patel, Tushar (2011): Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer. A mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. In: *Hepatology (Baltimore, Md.)* 54 (4), S. 1237–1248.
- Koski, G. K.; Kariko, K.; Xu, S.; Weissman, D.; Cohen, P. A.; Czerniecki, B. J. (2004): Cutting Edge. Innate Immune System Discriminates between RNA Containing Bacterial versus Eukaryotic Structural Features That Prime for High-Level IL-12 Secretion by Dendritic Cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172 (7), S. 3989–3993.
- Koutsoumanis, K. P.; Kendall, P. A.; Sofos, J. N. (2003): Effect of Food Processing-Related Stresses on Acid Tolerance of *Listeria monocytogenes*. In: *Applied and environmental microbiology* 69 (12), S. 7514–7516.
- Kuhn, M.; Goebel, W. (1989): Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. In: *Infection and immunity* 57 (1), S. 55–61.
- Kulp, Adam; Kuehn, Meta J. (2010): Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. In: *Annual review of microbiology* 64, S. 163–184.
- Kunsmann, Lisa; Rüter, Christian; Bauwens, Andreas; Greune, Lilo; Glüder, Malte; Kemper, Björn et al. (2015): Virulence from vesicles. Novel mechanisms of host cell injury by *Escherichia coli* O104:H4 outbreak strain. In: *Scientific reports* 5, S. 13252.
- Ladel, C. H.; Flesch, I. E.; Arnoldi, J.; Kaufmann, S. H. (1994): Studies with MHC-deficient knock-out mice reveal impact of both MHC I- and MHC II-dependent T cell responses on *Listeria monocytogenes* infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 153 (7), S. 3116–3122.
- Ladner, M. B.; Martin, G. A.; Noble, J. A.; Wittman, V. P.; Warren, M. K.; McGrogan, M.; Stanley, E. R. (1988): cDNA cloning and expression of murine macrophage colony-stimulating factor from L929 cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (18), S. 6706–6710.
- Lappann, Martin; Otto, Andreas; Becher, Dörte; Vogel, Ulrich (2013): Comparative proteome analysis of spontaneous outer membrane vesicles and purified outer membranes of *Neisseria meningitidis*. In: *Journal of bacteriology* 195 (19), S. 4425–4435.
- Leber, Jess H.; Crimmins, Gregory T.; Raghavan, Sridharan; Meyer-Morse, Nicole P.; Cox, Jeffery S.; Portnoy, Daniel A. (2008): Distinct TLR- and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen. In: *PLoS pathogens* 4 (1), e6.
- Lecuit, M. (2005): Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers. In: *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 11 (6), S. 430–436.
- Lecuit, Marc; Nelson, D. Michael; Smith, Steve D.; Khun, Huot; Huerre, Michel; Vacher-Lavenu, Marie-Cécile et al. (2004): Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*. Role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (16), S. 6152–6157.
- Lee, Eun-Young; Choi, Do-Young; Kim, Dae-Kyum; Kim, Jung-Wook; Park, Jung Ok; Kim, Sungjee et al. (2009): Gram-positive bacteria produce membrane vesicles. Proteomics-based

- characterization of *Staphylococcus aureus*-derived membrane vesicles. In: *Proteomics* 9 (24), S. 5425–5436.
- Lee, Heon-Jin; Hong, Su-Hyung (2012): Analysis of microRNA-size, small RNAs in *Streptococcus mutans* by deep sequencing. In: *FEMS microbiology letters* 326 (2), S. 131–136.
- Lee, Jaewook; Kim, Si-Hyun; Choi, Dong-Sic; Lee, Jong Seok; Kim, Dae-Kyum; Go, Gyeongyun et al. (2015): Proteomic analysis of extracellular vesicles derived from *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Proteomics* 15 (19), S. 3331–3337.
- Lee, Je Chul; Lee, Eun Jeoung; Lee, Jung Hwa; Jun, So Hyun; Choi, Chi Won; Kim, Seung Il et al. (2012): *Klebsiella pneumoniae* secretes outer membrane vesicles that induce the innate immune response. In: *FEMS microbiology letters* 331 (1), S. 17–24.
- Lee, Jung Hwa; Choi, Chi-Won; Lee, Taewon; Kim, Seung Il; Lee, Je-Chul; Shin, Ji-Hyun (2013): Transcription factor σ B plays an important role in the production of extracellular membrane-derived vesicles in *Listeria monocytogenes*. In: *PloS one* 8 (8), e73196.
- Leimeister-Wächter, M.; Domann, E.; Chakraborty, T. (1991): Detection of a gene encoding a phosphatidylinositol-specific phospholipase C that is co-ordinately expressed with listeriolysin in *Listeria monocytogenes*. In: *Molecular microbiology* 5 (2), S. 361–366.
- Lenz, Laurel L.; Mohammadi, Sina; Geissler, Aimee; Portnoy, Daniel A. (2003): SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (21), S. 12432–12437.
- Lertmemongkolchai, G.; Cai, G.; Hunter, C. A.; Bancroft, G. J. (2001): Bystander activation of CD8+ T cells contributes to the rapid production of IFN-gamma in response to bacterial pathogens. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 166 (2), S. 1097–1105.
- Li, Cheryl C. Y.; Eaton, Sally A.; Young, Paul E.; Lee, Maggie; Shuttleworth, Rupert; Humphreys, David T. et al. (2013): Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and non-coding RNAs which alter gene expression in recipient cells. In: *RNA biology* 10 (8), S. 1333–1344.
- Lingnau, A.; Domann, E.; Hudel, M.; Bock, M.; Nichterlein, T.; Wehland, J.; Chakraborty, T. (1995): Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. In: *Infection and immunity* 63 (10), S. 3896–3903.
- Ma, Wenjun; Brenner, Dominique; Wang, Zhongfang; Dauber, Bianca; Ehrhardt, Christina; Högner, Katrin et al. (2010): The NS segment of an H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) is sufficient to alter replication efficiency, cell tropism, and host range of an H7N1 HPAIV. In: *Journal of virology* 84 (4), S. 2122–2133.
- Machata, Silke; Hain, Torsten; Rohde, Manfred; Chakraborty, Trinad (2005): Simultaneous deficiency of both MurA and p60 proteins generates a rough phenotype in *Listeria monocytogenes*. In: *Journal of bacteriology* 187 (24), S. 8385–8394.
- Mackness, G. B. (1962): Cellular resistance to infection. In: *The Journal of experimental medicine* 116, S. 381–406.
- Marquis, H.; Bouwer, H. G.; Hinrichs, D. J.; Portnoy, D. A. (1993): Intracytoplasmic growth and virulence of *Listeria monocytogenes* auxotrophic mutants. In: *Infection and immunity* 61 (9), S. 3756–3760.
- Martin, Marcel (2011): Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. In: *EMBnet j.* 17 (1), S. 10.
- Martinez, A.; Kolter, R. (1997): Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. In: *Journal of bacteriology* 179 (16), S. 5188–5194.

- Masforrol, Yordanka; Gil, Jeovanis; García, Darien; Noda, Jesús; Ramos, Yassel; Betancourt, Lázaro et al. (2017): A deeper mining on the protein composition of VA-MENGOC-BC®. An OMV-based vaccine against *N. meningitidis* serogroup B and C. In: *Human vaccines & immunotherapeutics* 13 (11), S. 2548–2560.
- McBroom, Amanda J.; Kuehn, Meta J. (2007): Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. In: *Molecular microbiology* 63 (2), S. 545–558.
- McCaffrey, Ramona L.; Fawcett, Paul; O’Riordan, Mary; Lee, Kyung-Dall; Havell, Edward A.; Brown, Patrick O.; Portnoy, Daniel A. (2004): A specific gene expression program triggered by Gram-positive bacteria in the cytosol. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (31), S. 11386–11391.
- McLauchlin, J.; Greenwood, M. H.; Pini, P. N. (1990): The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. In: *International journal of food microbiology* 10 (3-4), S. 255–262.
- McWhirter, Sarah M.; Barbalat, Roman; Monroe, Kathryn M.; Fontana, Mary F.; Hyodo, Mamoru; Joncker, Nathalie T. et al. (2009): A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. In: *The Journal of experimental medicine* 206 (9), S. 1899–1911.
- Mead, P. S.; Slutsker, L.; Dietz, V.; McCaig, L. F.; Bresee, J. S.; Shapiro, C. et al. (1999): Food-related illness and death in the United States. In: *Emerging infectious diseases* 5 (5), S. 607–625.
- Mengaud, J.; Braun-Breton, C.; Cossart, P. (1991): Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*. A novel type of virulence factor? In: *Molecular microbiology* 5 (2), S. 367–372.
- Mengaud, J.; Ohayon, H.; Gounon, P.; Mege, R-M; Cossart, P. (1996): E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. In: *Cell* 84 (6), S. 923–932.
- Meyer, R. R.; Laine, P. S. (1990): The single-stranded DNA-binding protein of *Escherichia coli*. In: *Microbiological reviews* 54 (4), S. 342–380.
- Meylan, Etienne; Tschopp, Jürg (2006): Toll-like receptors and RNA helicases. Two parallel ways to trigger antiviral responses. In: *Molecular cell* 22 (5), S. 561–569.
- Miczak, A.; Kaberdin, V. R.; Wei, C. L.; Lin-Chao, S. (1996): Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (9), S. 3865–3869.
- Møller, Thorleif; Franch, Thomas; Højrup, Peter; Keene, Douglas R.; Bächinger, Hans Peter; Brennan, Richard G.; Valentin-Hansen, Poul (2002): Hfq. A bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. In: *Molecular cell* 9 (1), S. 23–30.
- Mraheil, Mobarak A.; Billion, André; Mohamed, Walid; Mukherjee, Krishnendu; Kuenne, Carsten; Pischmarov, Jordan et al. (2011): The intracellular sRNA transcriptome of *Listeria monocytogenes* during growth in macrophages. In: *Nucleic acids research* 39 (10), S. 4235–4248.
- Müller, U.; Steinhoff, U.; Reis, L. F.; Hemmi, S.; Pavlovic, J.; Zinkernagel, R. M.; Aguet, M. (1994): Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. In: *Science (New York, N.Y.)* 264 (5167), S. 1918–1921.
- Müller-Herbst, Stefanie; Wüstner, Stefanie; Mühlig, Anna; Eder, Daniela; M Fuchs, Thilo; Held, Claudia et al. (2014): Identification of genes essential for anaerobic growth of *Listeria monocytogenes*. In: *Microbiology (Reading, England)* 160 (Pt 4), S. 752–765.

- Myers, Eric R.; Martin, Scott E. (1994): Virulence of *Listeria monocytogenes* Propagated in NaCl Containing Media at 4, 25 and 37°C. In: *Journal of Food Protection* 57 (6), S. 475–478.
- Nielsen, Jesper S.; Larsen, Marianne Halberg; Lillebæk, Eva Maria Sternkopf; Bergholz, Teresa M.; Christiansen, Mie H. G.; Boor, Kathryn J. et al. (2011): A small RNA controls expression of the chitinase ChiA in *Listeria monocytogenes*. In: *PLoS one* 6 (4), e19019.
- Nightingale, Kendra K.; Fortes, Esther D.; Ho, Alphina J.; Schukken, Ynte H.; Grohn, Yrjo T.; Wiedmann, Martin (2005): Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants. In: *Journal of the American Veterinary Medical Association* 227 (11), S. 1808–1814.
- Nolte-'t Hoen, Esther N. M.; Buermans, Henk P. J.; Waasdorp, Maaïke; Stoorvogel, Willem; Wauben, Marca H. M.; Hoen, Peter A. C. 't (2012): Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. In: *Nucleic acids research* 40 (18), S. 9272–9285.
- O'Connell, R. M.; Vaidya, S. A.; Perry, A. K.; Saha, S. K.; Dempsey, P. W.; Cheng, G. (2005): Immune Activation of Type I IFNs by *Listeria monocytogenes* Occurs Independently of TLR4, TLR2, and Receptor Interacting Protein 2 but Involves TANK-Binding Kinase 1. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 174 (3), S. 1602–1607.
- O'Connell, Ryan M.; Saha, Supriya K.; Vaidya, Sagar A.; Bruhn, Kevin W.; Miranda, Gustavo A.; Zarnegar, Brian et al. (2004): Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. In: *The Journal of experimental medicine* 200 (4), S. 437–445.
- Olaya-Abril, Alfonso; Prados-Rosales, Rafael; McConnell, Michael J.; Martín-Peña, Reyes; González-Reyes, José Antonio; Jiménez-Munguía, Irene et al. (2014): Characterization of protective extracellular membrane-derived vesicles produced by *Streptococcus pneumoniae*. In: *Journal of proteomics* 106, S. 46–60.
- Oliver, Haley F.; Orsi, Renato H.; Ponnala, Lalit; Keich, Uri; Wang, Wei; Sun, Qi et al. (2009): Deep RNA sequencing of *L. monocytogenes* reveals overlapping and extensive stationary phase and sigma B-dependent transcriptomes, including multiple highly transcribed noncoding RNAs. In: *BMC genomics* 10, S. 641.
- Olsen, Katja N.; Larsen, Marianne H.; Gahan, Cormac G. M.; Kallipolitis, Birgitte; Wolf, Xenia A.; Rea, Rosemary et al. (2005): The Dps-like protein Fri of *Listeria monocytogenes* promotes stress tolerance and intracellular multiplication in macrophage-like cells. In: *Microbiology (Reading, England)* 151 (Pt 3), S. 925–933.
- O'Riordan, Mary; Yi, Caroline H.; Gonzales, Ramona; Lee, Kyung-Dall; Portnoy, Daniel A. (2002): Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (21), S. 13861–13866.
- Orsi, Renato H.; Wiedmann, Martin (2016): Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. In: *Applied microbiology and biotechnology* 100 (12), S. 5273–5287.
- Osborne, Suzanne E.; Sit, Brandon; Shaker, Andrew; Currie, Elissa; Tan, Joël M. J.; van Rijn, Jorik et al. (2017): Type I interferon promotes cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. In: *Cellular microbiology* 19 (3).
- Parker, Heather; Chitcholtan, Kenny; Hampton, Mark B.; Keenan, Jacqueline I. (2010): Uptake of *Helicobacter pylori* outer membrane vesicles by gastric epithelial cells. In: *Infection and immunity* 78 (12), S. 5054–5061.
- Patchett, R. A.; Kelly, A. F.; Kroll, R. G. (1991): Respiratory activity in *Listeria monocytogenes*. In: *FEMS microbiology letters* 62 (1), S. 95–98.

- Peng, Ye-Long; Meng, Qing-Ling; Qiao, Jun; Xie, Kun; Chen, Cheng; Liu, Tian-Li et al. (2016): The Regulatory Roles of ncRNA Rli60 in Adaptability of *Listeria monocytogenes* to Environmental Stress and Biofilm Formation. In: *Current microbiology* 73 (1), S. 77–83.
- Pérez-Cruz, Carla; Carrión, Ornella; Delgado, Lidia; Martínez, Gemma; López-Iglesias, Carmen; Mercade, Elena (2013): New type of outer membrane vesicle produced by the Gram-negative bacterium *Shewanella vesiculosa* M7T. Implications for DNA content. In: *Applied and environmental microbiology* 79 (6), S. 1874–1881.
- Perry, Andrea K.; Chen, Gang; Zheng, Dahai; Tang, Hong; Cheng, Genhong (2005): The host type I interferon response to viral and bacterial infections. In: *Cell research* 15 (6), S. 407–422.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic acids research* 29 (9), e45.
- Pichlmair, Andreas; Schulz, Oliver; Tan, Choon Ping; Näslund, Tanja I.; Liljeström, Peter; Weber, Friedemann; Reis e Sousa, Caetano (2006): RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. In: *Science (New York, N.Y.)* 314 (5801), S. 997–1001.
- Pilgrim, Sabine; Kolb-Mäurer, Annette; Gentshev, Ivaylo; Goebel, Werner; Kuhn, Michael (2003): Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. In: *Infection and immunity* 71 (6), S. 3473–3484.
- Pillarisetty, Venu G.; Shah, Alaap B.; Miller, George; Bleier, Joshua I.; DeMatteo, Ronald P. (2004): Liver dendritic cells are less immunogenic than spleen dendritic cells because of differences in subtype composition. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 172 (2), S. 1009–1017.
- Pillich, Helena; Chakraborty, Trinad; Mraheil, Mobarak Abu (2015): Cell-autonomous responses in *Listeria monocytogenes* infection. In: *Future microbiology* 10 (4), S. 583–597.
- Port, Gary C.; Freitag, Nancy E. (2007): Identification of novel *Listeria monocytogenes* secreted virulence factors following mutational activation of the central virulence regulator, PrfA. In: *Infection and immunity* 75 (12), S. 5886–5897.
- Portnoy, D. A.; Jacks, P. S.; Hinrichs, D. J. (1988): Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. In: *The Journal of experimental medicine* 167 (4), S. 1459–1471.
- Premaratne, R. J.; Lin, W. J.; Johnson, E. A. (1991): Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. In: *Applied and environmental microbiology* 57 (10), S. 3046–3048.
- Py, B.; Causton, H.; Mudd, E. A.; Higgins, C. F. (1994): A protein complex mediating mRNA degradation in *Escherichia coli*. In: *Molecular microbiology* 14 (4), S. 717–729.
- Rabinovich, Lev; Sigal, Nadejda; Borovok, Ilya; Nir-Paz, Ran; Herskovits, Anat A. (2012): Prophage excision activates *Listeria* competence genes that promote phagosomal escape and virulence. In: *Cell* 150 (4), S. 792–802.
- Radoshevich, Lilliana; Cossart, Pascale (2018): *Listeria monocytogenes*. Towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. In: *Nature reviews. Microbiology* 16 (1), S. 32–46.
- Ranjan, Priya; Jayashankar, Lakshmi; Deyde, Varough; Zeng, Hui; Davis, William G.; Pearce, Melissa B. et al. (2010): 5'PPP-RNA induced RIG-I activation inhibits drug-resistant avian H5N1 as well as 1918 and 2009 pandemic influenza virus replication. In: *Virology journal* 7, S. 102.
- Rayamajhi, Manira; Humann, Jessica; Penheiter, Kristi; Andreasen, Karl; Lenz, Laurel L. (2010): Induction of IFN- α enables *Listeria monocytogenes* to suppress macrophage activation by IFN- γ . In: *The Journal of experimental medicine* 207 (2), S. 327–337.

- Renelli, Marika; Matias, Valério; Lo, Reggie Y.; Beveridge, Terry J. (2004): DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. In: *Microbiology (Reading, England)* 150 (Pt 7), S. 2161–2169.
- Renzoni, A.; Cossart, P.; Dramsi, S. (1999): PrfA, the transcriptional activator of virulence genes, is upregulated during interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells and in eukaryotic cell extracts. In: *Molecular microbiology* 34 (3), S. 552–561.
- Resch, Ulrike; Tsatsaronis, James Anthony; Le Rhun, Anaïs; Stübiger, Gerald; Rohde, Manfred; Kasvandik, Sergo et al. (2016): A Two-Component Regulatory System Impacts Extracellular Membrane-Derived Vesicle Production in Group A *Streptococcus*. In: *mBio* 7 (6).
- Ricci, Vittorio; Chiozzi, Valentina; Necchi, Vittorio; Oldani, Amanda; Romano, Marco; Solcia, Enrico; Ventura, Ulderico (2005): Free-soluble and outer membrane vesicle-associated VacA from *Helicobacter pylori*. Two forms of release, a different activity. In: *Biochemical and biophysical research communications* 337 (1), S. 173–178.
- Rietkötter, Eva; Hoyer, Diana; Mascher, Thorsten (2008): Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. In: *Molecular microbiology* 68 (3), S. 768–785.
- Rivera, Johanna; Cordero, Radames J. B.; Nakouzi, Antonio S.; Frases, Susana; Nicola, André; Casadevall, Arturo (2010): *Bacillus anthracis* produces membrane-derived vesicles containing biologically active toxins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (44), S. 19002–19007.
- Roberts, A. J.; Wiedmann, M. (2003): Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. In: *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 60 (5), S. 904–918.
- Rogers, H. W.; Callery, M. P.; Deck, B.; Unanue, E. R. (1996): *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 156 (2), S. 679–684.
- Rogers, H. W.; Unanue, E. R. (1993): Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. In: *Infection and immunity* 61 (12), S. 5090–5096.
- Roier, Sandro; Zingl, Franz G.; Cakar, Fatih; Schild, Stefan (2016): Bacterial outer membrane vesicle biogenesis. A new mechanism and its implications. In: *Microbial cell (Graz, Austria)* 3 (6), S. 257–259.
- Romick, T. L.; Fleming, H. P.; McFeeters, R. F. (1996): Aerobic and anaerobic metabolism of *Listeria monocytogenes* in defined glucose medium. In: *Applied and environmental microbiology* 62 (1), S. 304–307.
- Rumbo, Carlos; Fernández-Moreira, Esteban; Merino, María; Poza, Margarita; Mendez, Jose Antonio; Soares, Nelson C. et al. (2011): Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles. A new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (7), S. 3084–3090.
- Sadler, Anthony J.; Williams, Bryan R. G. (2008): Interferon-inducible antiviral effectors. In: *Nature reviews. Immunology* 8 (7), S. 559–568.
- Safley, S. A.; Cluff, C. W.; Marshall, N. E.; Ziegler, H. K. (1991): Role of listeriolysin-O (LLO) in the T lymphocyte response to infection with *Listeria monocytogenes*. Identification of T cell epitopes of LLO. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 146 (10), S. 3604–3616.
- Sander, Leif E.; Davis, Michael J.; Boekschoten, Mark V.; Amsen, Derk; Dascher, Christopher C.; Ryffel, Bernard et al. (2011): Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. In: *Nature* 474 (7351), S. 385–389.

- Schaar, Viveka; Nordström, Therése; Mörgelin, Matthias; Riesbeck, Kristian (2011): Moraxella catarrhalis outer membrane vesicles carry β -lactamase and promote survival of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae by inactivating amoxicillin. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 55 (8), S. 3845–3853.
- Schaumburg, Jessica; Diekmann, Oliver; Hagendorff, Petra; Bergmann, Simone; Rohde, Manfred; Hammerschmidt, Sven et al. (2004): The cell wall subproteome of Listeria monocytogenes. In: *Proteomics* 4 (10), S. 2991–3006.
- Schild, Stefan; Nelson, Eric J.; Camilli, Andrew (2008): Immunization with Vibrio cholerae outer membrane vesicles induces protective immunity in mice. In: *Infection and immunity* 76 (10), S. 4554–4563.
- Schlee, Martin; Roth, Andreas; Hornung, Veit; Hagmann, Cristina Amparo; Wimmenauer, Vera; Barchet, Winfried et al. (2009): Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. In: *Immunity* 31 (1), S. 25–34.
- Schmidt, Andreas; Schwerd, Tobias; Hamm, Wolfgang; Hellmuth, Johannes C.; Cui, Sheng; Wenzel, Michael et al. (2009): 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (29), S. 12067–12072.
- Schwechheimer, Carmen; Kuehn, Meta J. (2015): Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria. Biogenesis and functions. In: *Nature reviews. Microbiology* 13 (10), S. 605–619.
- Serbina, Natalya V.; Pamer, Eric G. (2006): Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. In: *Nature immunology* 7 (3), S. 311–317.
- Serbina, Natalya V.; Salazar-Mather, Thais P.; Biron, Christine A.; Kuziel, William A.; Pamer, Eric G. (2003): TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. In: *Immunity* 19 (1), S. 59–70.
- Seveau, Stéphanie; Bierne, Hélène; Giroux, Stéphanie; Prévost, Marie-Christine; Cossart, Pascale (2004): Role of lipid rafts in E-cadherin-- and HGF-R/Met--mediated entry of Listeria monocytogenes into host cells. In: *The Journal of cell biology* 166 (5), S. 743–753.
- Sha, Wenwen; Mitoma, Hiroki; Hanabuchi, Shino; Bao, Musheng; Weng, Leiyun; Sugimoto, Naoshi et al. (2014): Human NLRP3 inflammasome senses multiple types of bacterial RNAs. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (45), S. 16059–16064.
- Shen, Y.; Naujokas, M.; Park, M.; Ireton, K. (2000): InIB-dependent internalization of Listeria is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. In: *Cell* 103 (3), S. 501–510.
- Shmaryahu, Amir; Carrasco, Margarita; Valenzuela, Pablo D. T. (2014): Prediction of bacterial microRNAs and possible targets in human cell transcriptome. In: *Journal of microbiology (Seoul, Korea)* 52 (6), S. 482–489.
- Sidhu, Vishaldeep K.; Vorhölter, Frank-Jörg; Niehaus, Karsten; Watt, Steven A. (2008): Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium Xanthomonas campestris pv. campestris. In: *BMC microbiology* 8, S. 87.
- Sijts, A. J.; Pilip, I.; Pamer, E. G. (1997): The Listeria monocytogenes-secreted p60 protein is an N-end rule substrate in the cytosol of infected cells. Implications for major histocompatibility complex class I antigen processing of bacterial proteins. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (31), S. 19261–19268.
- Sjöström, Annika E.; Sandblad, Linda; Uhlin, Bernt Eric; Wai, Sun Nyunt (2015): Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. In: *Scientific reports* 5, S. 15329.

- Sokolova, Viktoriya; Ludwig, Anna-Kristin; Hornung, Sandra; Rotan, Olga; Horn, Peter A.; Epple, Matthias; Giebel, Bernd (2011): Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy. In: *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 87 (1), S. 146–150.
- Stetson, Daniel B.; Medzhitov, Ruslan (2006): Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. In: *Immunity* 24 (1), S. 93–103.
- Stockinger, Silvia; Kastner, Renate; Kernbauer, Elisabeth; Pilz, Andreas; Westermayer, Sandra; Reutterer, Benjamin et al. (2009): Characterization of the interferon-producing cell in mice infected with *Listeria monocytogenes*. In: *PLoS pathogens* 5 (3), e1000355.
- Stockinger, Silvia; Materna, Tilo; Stoiber, Dagmar; Bayr, Lourdes; Steinborn, Ralf; Kolbe, Thomas et al. (2002): Production of type I IFN sensitizes macrophages to cell death induced by *Listeria monocytogenes*. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 169 (11), S. 6522–6529.
- Stoll, Regina; Goebel, Werner (2010): The major PEP-phosphotransferase systems (PTSs) for glucose, mannose and cellobiose of *Listeria monocytogenes*, and their significance for extra- and intracellular growth. In: *Microbiology (Reading, England)* 156 (Pt 4), S. 1069–1083.
- Sun, Lijun; Wu, Jiayi; Du, Fenghe; Chen, Xiang; Chen, Zhijian J. (2013): Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121), S. 786–791.
- Takahashi, Ken; Asabe, Shinichi; Wieland, Stefan; Garaigorta, Urtzi; Gastaminza, Pablo; Isogawa, Masanori; Chisari, Francis V. (2010): Plasmacytoid dendritic cells sense hepatitis C virus-infected cells, produce interferon, and inhibit infection. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (16), S. 7431–7436.
- Takahashi, Kiyohiro; Yoneyama, Mitsutoshi; Nishihori, Tatsuya; Hirai, Reiko; Kumeta, Hiroyuki; Narita, Ryo et al. (2008): Nonspecific RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. In: *Molecular cell* 29 (4), S. 428–440.
- Takeuchi, Osamu; Akira, Shizuo (2009): Innate immunity to virus infection. In: *Immunological reviews* 227 (1), S. 75–86.
- Thay, Bernard; Wai, Sun Nyunt; Oscarsson, Jan (2013): *Staphylococcus aureus* α -toxin-dependent induction of host cell death by membrane-derived vesicles. In: *PloS one* 8 (1), e54661.
- Todd, E.C.D.; Notermans, S. (2011): Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. In: *Food Control* 22 (9), S. 1484–1490.
- Toledo-Arana, Alejandro; Dussurget, Olivier; Nikitas, Georgios; Sesto, Nina; Guet-Revillet, Hélène; Balestrino, Damien et al. (2009): The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. In: *Nature* 459 (7249), S. 950–956.
- Trinchieri, Giorgio (2010): Type I interferon. Friend or foe? In: *The Journal of experimental medicine* 207 (10), S. 2053–2063.
- Tripp, C. S.; Wolf, S. F.; Unanue, E. R. (1993): Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (8), S. 3725–3729.
- Trost, Matthias; Wehmhoner, Dirk; Käst, Uwe; Dieterich, Guido; Wehland, Jürgen; Jansch, Lothar (2005): Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. In: *Proteomics* 5 (6), S. 1544–1557.

- Turchinovich, Andrey; Weiz, Ludmila; Langhein, Anne; Burwinkel, Barbara (2011): Characterization of extracellular circulating microRNA. In: *Nucleic acids research* 39 (16), S. 7223–7233.
- Uli, Liliam; Castellanos-Serra, Lila; Betancourt, Lazaro; Domínguez, Francisco; Barberá, Ramón; Sotolongo, Franklin et al. (2006): Outer membrane vesicles of the VA-MENGOC-BC vaccine against serogroup B of *Neisseria meningitidis*. Analysis of protein components by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. In: *Proteomics* 6 (11), S. 3389–3399.
- Valadi, Hadi; Ekström, Karin; Bossios, Apostolos; Sjöstrand, Margareta; Lee, James J.; Lötval, Jan O. (2007): Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. In: *Nature cell biology* 9 (6), S. 654–659.
- Valderrama, Carolina; Clark, Amy; Urano, Fumihiko; Unanue, Emil R.; Carrero, Javier A. (2017): *Listeria monocytogenes* induces an interferon-enhanced activation of the integrated stress response that is detrimental for resolution of infection in mice. In: *European journal of immunology* 47 (5), S. 830–840.
- Vanaja, Sivapriya Kailasan; Russo, Ashley J.; Behl, Bharat; Banerjee, Ishita; Yankova, Maya; Deshmukh, Sachin D.; Rathinam, Vijay A. K. (2016): Bacterial Outer Membrane Vesicles Mediate Cytosolic Localization of LPS and Caspase-11 Activation. In: *Cell* 165 (5), S. 1106–1119.
- Vanzo, N. F.; Li, Y. S.; Py, B.; Blum, E.; Higgins, C. F.; Raynal, L. C. et al. (1998): Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. In: *Genes & development* 12 (17), S. 2770–2781.
- Vasconcelos, J. A.; Deneer, H. G. (1994): Expression of superoxide dismutase in *Listeria monocytogenes*. In: *Applied and environmental microbiology* 60 (7), S. 2360–2366.
- Vdovikova, Svitlana; Luhr, Morten; Szalai, Paula; Nygård Skalmann, Lars; Francis, Monika K.; Lundmark, Richard et al. (2017): A Novel Role of *Listeria monocytogenes* Membrane Vesicles in Inhibition of Autophagy and Cell Death. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7, S. 154.
- Veiga, Esteban; Cossart, Pascale (2005): *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. In: *Nature cell biology* 7 (9), S. 894–900.
- Vickers, Kasey C.; Palmisano, Brian T.; Shoucri, Bassem M.; Shamburek, Robert D.; Remaley, Alan T. (2011): MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. In: *Nature cell biology* 13 (4), S. 423–433.
- Wang, Kai; Zhang, Shile; Weber, Jessica; Baxter, David; Galas, David J. (2010): Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. In: *Nucleic acids research* 38 (20), S. 7248–7259.
- Weis, J.; Seeliger, H. P. (1975): Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. In: *Applied microbiology* 30 (1), S. 29–32.
- Wherry, J. C.; Schreiber, R. D.; Unanue, E. R. (1991): Regulation of gamma interferon production by natural killer cells in scid mice. Roles of tumor necrosis factor and bacterial stimuli. In: *Infection and immunity* 59 (5), S. 1709–1715.
- Williams, B. R. (2001): Signal integration via PKR. In: *Science's STKE: signal transduction knowledge environment* 2001 (89), re2.
- Woodward, Joshua J.; Iavarone, Anthony T.; Portnoy, Daniel A. (2010): c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. In: *Science (New York, N.Y.)* 328 (5986), S. 1703–1705.

- Wu, Jiayi; Sun, Lijun; Chen, Xiang; Du, Fenghe; Shi, Heping; Chen, Chuo; Chen, Zhijian J. (2013): Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121), S. 826–830.
- Yaron, S.; Kolling, G. L.; Simon, L.; Matthews, K. R. (2000): Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. In: *Applied and environmental microbiology* 66 (10), S. 4414–4420.
- Yoneyama, Mitsutoshi; Onomoto, Koji; Jogi, Michihiko; Akaboshi, Teppei; Fujita, Takashi (2015): Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. In: *Current opinion in immunology* 32, S. 48–53.
- Zakharzhevskaya, Natalya B.; Vanyushkina, Anna A.; Altukhov, Ilya A.; Shavarda, Aleksey L.; Butenko, Ivan O.; Rakitina, Daria V. et al. (2017): Outer membrane vesicles secreted by pathogenic and nonpathogenic *Bacteroides fragilis* represent different metabolic activities. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 5008.
- Zhao, Guanghua; Ceci, Pierpaolo; Ilari, Andrea; Giangiacomo, Laura; Laue, Thomas M.; Chiancone, Emilia; Chasteen, N. Dennis (2002): Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (31), S. 27689–27696.
- Zhu, Wenhong; Smith, Jeffrey W.; Huang, Chun-Ming (2010): Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, S. 840518.
- Zybailov, Boris; Coleman, Michael K.; Florens, Laurence; Washburn, Michael P. (2005): Correlation of relative abundance ratios derived from peptide ion chromatograms and spectrum counting for quantitative proteomic analysis using stable isotope labeling. In: *Analytical chemistry* 77 (19), S. 6218–6224.
- Zybailov, Boris; Mosley, Amber L.; Sardi, Mihaela E.; Coleman, Michael K.; Florens, Laurence; Washburn, Michael P. (2006): Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Journal of proteome research* 5 (9), S. 2339–2347.

8. Anhang

8.1. Veröffentlichungen

Fischer, Sabrina; Lamping, Matthias; Gold, Maike; Röttger, Yvonne; Brödje, Dörte; Dodel, Richard; Frantz, Renate; Mraheil, Mobarak Abu; Chakraborty, Trinad (2017): Synthesis of a biological active β -hairpin peptide by addition of two structural motifs. In: Bioorganic & medicinal chemistry 25 (2), S. 603–608.

Mraheil, Mobarak Abu; Frantz, Renate; Teubner, Lisa; Wendt, Heiko; Linne, Uwe; Wingerath, Jessica; Wirth, Thomas; Chakraborty, Trinad (2017): Requirement of the RNA-binding protein SmpB during intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. In: International journal of medical microbiology: IJMM 307 (3), S. 166–173.

Die in dieser Arbeit gezeigten Daten über die von *L. monocytogenes* sekretierten sRNAs und deren Potential zur Induktion von IFN- β wurden als Manuskript bei Nature Communications unter folgendem Namen submittiert: Comprehensive analysis of the secRNome of *Listeria monocytogenes* reveals small non-coding RNA as potent inducers of IFN- β response.

Folgende Autoren: Frantz, Renate; Schultze, Tilman; Teubner, Lisa; Wingerath, Jessica; Müller, Christin; Gwozdzinski, Konrad; Pillich, Helena; Hain, Torsten; Gerlach, Michaela; Mostafa, Ahmed; Weber, Friedemann; Rohde, Manfred; Pleschka, Stephan; Wirth, Thomas; Chakraborty, Trinad; Mraheil, Mobarak Abu

8.2. Kongressteilnahme

GGL (2013)

Poster: Detection of nucleic acids secreted by *L. monocytogenes*

GGL (2014)

Poster: Characterization of membrane vesicles (MVs) produced by *L. monocytogenes*

GGL Retreat (2015)

Vortrag: Secreted nucleic acids and membrane vesicles (MVs) released by *L. monocytogenes*

Proantilis, Porto (2015)

Vortrag: Mechanisms affecting secretion and shedding of bacterial components.
Production of Membrane Vesicles and NAs secretion

Vorgetragen von Dr. Abu Mraheil

Isopol, Paris (2016)

Poster: Immunogenic capacity of membrane vesicles (MVs) produced by *L. monocytogenes*

Proantilis, Paris (2017)

Vortrag: Secretion mechanisms of nucleic acids by *L. monocytogenes*

Vorgetragen von Dr. Abu Mraheil

Proantilis, Gießen (2017)

Vortrag: Analysis of the secRNome of *L. monocytogenes*

Vorgetragen von Dr. Abu Mraheil

8.3. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Chakraborty für die Bereitstellung des Projekts und die Möglichkeit diese Arbeit im Institut für Medizinische Mikrobiologie anfertigen zu können. Des Weiteren möchte ich mich bei Ihm für die Betreuung und Unterstützung der Arbeit bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Abu Mraheil für die kontinuierliche Betreuung der Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Kooperationspartner Dr. Andreas Otto, Prof. Dr. Dörte Becher, Christin Müller, Prof. Dr. Stephan Pleschka, Jessica Wingerath, Dr. Thomas Wirth und Prof. Dr. Manfred Rohde für deren Unterstützung bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt Lisa Teubner für ihre unermüdlich gute Laune, die mich in dieser Zeit aufgebaut hat. Des Weiteren möchte ich mich bei Ihr für die tatkräftige Unterstützung in allen Belangen des alltäglichen Laboraltags ganz lieb bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei den anderen Kollegen im Labor bedanken, Tilman Schultze, Nelli und Juri Schklarenko, Sylvia Krämer, Martina Hudel, Besim Berisha, Luigi La Pietra, Konrad Gwozdzinski, Helena Pillich, Christina Gerstmann und Alexandra Amend.

Ein herzlicher Dank gilt der Familie Keil, besonders Frau Keil und Jochen, für deren aufmerksame Unterstützung und Hilfsbereitschaft in jeglichen Lebenssituationen.

Im Besonderen möchte ich mich bei meinen Eltern für deren Hilfe und Beistand in dieser Zeit bedanken. Dies gilt auch für meine Zwillingsschwester und Bruder, die immer für mich da waren. Abschließend danke ich meinen Eltern für das Verständnis dafür, dass ich aufgrund dieser Arbeit nicht so viel Zeit mit Ihnen verbringen konnte.

8.4. Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

8.5. Tab. 1: Einteilung der COGs in 25 funktionelle Kategorien

Metabolismus
[C] Energieproduktion und -konversion
[G] Transport von Kohlenhydraten und deren Metabolismus
[E] Transport von Aminosäuren und deren Metabolismus
[F] Transport von Nukleotiden und deren Metabolismus
[I] Transport von Lipiden und deren Metabolismus
[P] Transport von anorganischen Ionen und deren Metabolismus
[H] Transport von Coenzymen und deren Metabolismus
[Q] Biosynthese von Sekundärmetaboliten, deren Transport und Katabolismus
Zelluläre Prozesse und Signale
[D] Kontrolle des Zellzyklus, Zellteilung, Partitionierung von Chromosomen
[M] Biogenese der Zellwand/Membran/Hülle
[O] Posttranslationale Modifikationen, Proteinumsatz, Chaperone
[U] Intrazellulärer Verkehr, Sekretion, vesikulärer Transport
[T] Mechanismen der Signaltransduktion
[V] Verteidigungsmechanismen
[N] Zellbewegung
[Y] Nukleäre Struktur
[Z] Zytoskelett
[W] Extrazelluläre Strukturen
Informationsspeicherung und -prozessierung
[A] RNA-Prozessierung und -Modifikation
[B] Chromatinstruktur und deren Dynamik
[J] Translation, ribosomale Struktur und Biogenese
[K] Transkription
[L] Replikation, Rekombination und Reparatur
Wenig charakterisiert
[R] Nur generelle Funktion vorhergesagt
[S] Funktion unbekannt
Kein Ortholog gefunden

8.6. Tab. 2: Berechnung des Anteils an MVs-Proteine in den funktionellen Kategorien und Gruppen anhand des NSAF-Wertes in %

				Anzahl		NSAF	
					%		%
Metabolismus							
[C] Energieproduktion und -konversion			28	5,43	0,018	1,95	
[G] Transport von Kohlenhydraten und deren Metabolismus			39	7,56	0,067	7,31	
[E] Transport von Aminosäuren und deren Metabolismus			56	10,85	0,095	10,34	
[F] Transport von Nucleotiden und deren Metabolismus			27	5,23	0,037	3,99	
[I] Transport von Lipiden und deren Metabolismus			11	2,13	0,013	1,41	
[P] Transport von anorganischen Ionen und deren Metabolismus			35	6,78	0,102	11,21	
[H] Transport von Coenzymen und deren Metabolismus			11	2,13	0,010	1,08	
[Q] Biosynthese von Sekundärmetaboliten, deren Transport und Katabolismus			2	0,39	0,001	0,08	
			209	40,50	0,342	37,37	
Zelluläre Prozesse und Signale							
[D] Kontrolle des Zellzyklus, Zellteilung, Partitionierung von Chromosomen			8	1,55	0,005	0,51	
[M] Biogenese der Zellwand/Membran/Hülle			39	7,56	0,065	7,10	
[O] Posttranslationale Modifikationen, Proteinumsatz, Chaperone			18	3,49	0,025	2,70	
[U] Intrazellulärer Verkehr, Sekretion, vesikulärer Transport			9	1,74	0,017	1,85	
[T] Mechanismen der Signaltransduktion			10	1,94	0,012	1,32	
[V] Verteidigungsmechanismen			17	3,29	0,008	0,86	
[N] Zellbewegung			3	0,58	0,002	0,24	
			104	20,16	0,133	14,60	
Informationspeicherung und -prozessierung							
[J] Translation, ribosomale Struktur und Biogenese			32	6,20	0,036	3,92	
[K] Transkription			13	2,52	0,017	1,88	
[L] Replikation, Rekombination und Reparatur			12	2,33	0,043	4,75	
			57	11,05	0,096	10,55	
Wenig charakterisiert							
[S] Funktion unbekannt			120	23,26	0,242	26,44	
			26	5,04	0,101	11,04	
Kein Ortholog gefunden			516	100,00	0,914	100,00	
			516	100,00	0,914	100,00	

8.7. Tab. 3: Funktionelle Klassifizierung der 516 MVs-Proteine (EggNOG 4.5.1)

Accession-Nr. (UniProt)	Protein-Name (UniProt)	Gen-Name	Protein-Name (NCBI)
Metabolismus			
[C] Energieproduktion und -konversion			
O8Y5C5_LISMO	Lmo2140 protein	lmo2140	A,BC transporter permease
A1PB2_LISMO	ATP synthase subunit beta 2	atpD2	
A1PF_LISMO	ATP synthase subunit b	atpF	
O8Y435_LISMO	Lmo2638 protein	lmo2638	NADH dehydrogenase
A1PA2_LISMO	ATP synthase subunit alpha 2	atpA2	
O8YA11_LISMO	Lmo0355 protein	lmo0355	Fumarate reductase subunit A
O8Y819_LISMO	Aldehyde dehydrogenase	lmo0913	
O8YA0_LISMO	Quinol oxidase subunit 2	qoxA	
O8Y862_LISMO	Dihydrolipoyl dehydrogenase	PdhD	
LDHL_LISMO	L-lactate dehydrogenase 1	ldh1	
O8Y864_LISMO	PdhB protein	PdhB	
O8Y4P6_LISMO	Lmo2389 protein	lmo2389	NADH dehydrogenase
NAMA_LISMO	NADPH dehydrogenase	nama	
O927C3_LISMO	CydA protein	cydA	
ACKA1_LISMO	Acetate kinase I	ackA1	
FUMC_LISMO	Fumarate hydratase class II	fumC	
O8YA09_LISMO	AA3-600 quinol oxidase subunit I	qoxB	
O8Y993_LISMO	Lmo0640 protein	lmo0640	Oxidoreductase
O8Y786_LISMO	Pyruvate formate-lyase	pflB	
O8Y865_LISMO	PdhA protein	pdhA	
O8Y6P3_LISMO	Aconitate hydratase	citB	
A1PD_LISMO	ATP synthase subunit delta	atpH	
O8Y7B5_LISMO	Dihydrolipoyl dehydrogenase	lmo1371	
O8Y846_LISMO	Pyruvate carboxylase	pycA	
O8Y863_LISMO	Dihydrolipoamide acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	pdhC	
LDH2_LISMO	L-lactate dehydrogenase 2	ldh2	
O8Y6W5_LISMO	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	citC	
PPAC_LISMO	Probable manganese-dependent inorganic pyrophosphatase	ppaC	
[G] Transport von Kohlenhydraten und deren Metabolismus			
O8Y4P4_LISMO	Lmo2391 protein	lmo2391	
ENO_LISMO	Enolase	eno	
O8Y4H1_LISMO	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	gap	
PFKA_LISMO	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	pfkA	
G6PI_LISMO	Glucose-6-phosphate isomerase	pgi	

Q8YA00_LISMO	Lmo0098 protein				Imo0098	PTS mannose transporter subunit IID
Q8Y6W1_LISMO	Pyruvate kinase	pykA			Imo1570	
Q8Y8W1_LISMO	Lmo0781 protein				Imo0781	PTS mannose transporter subunit IID
TALI_LISMO	Probable transaldolase 1	talI			Imo2743	
Q8Y7B0_LISMO	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating				Imo1376	
Q8Y7H4_LISMO	Transketolase	tkt			Imo1305	
Q8Y5S7_LISMO	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	zvf			Imo1978	
LACD_LISMO	Tagatose 1,6-diphosphate aldolase	lacD			Imo0539	
TPSI_LISMO	Triosephosphate isomerase 1	tpiA1			Imo2457	
Q8Y498_LISMO	FbaA protein	fbaA			Imo2556	
Q8Y9F4_LISMO	Lmo0574 protein				Imo0574	Beta-glucosidase
Q8YAM2_LISMO	Lmo0096 protein				Imo0096	PTS mannose transporter subunit IIAB
Q8YAE9_LISMO	Lmo0181 protein				Imo0181	Sugar ABC transporter substrate-binding protein
GPMVA_LISMO	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	gpmA			Imo2205	
PTI_LISMO	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	ptiI			Imo1003	
Q8Y681_LISMO	Ribulose-phosphate 3-epimerase				Imo1818	
Q8Y4U6_LISMO	FruA protein	fruA			Imo2335	
Q8Y404_LISMO	Lmo2674 protein				Imo2674	Ribose-5-phosphate isomerase B
Q8YAM1_LISMO	Lmo0097 protein				Imo0097	PTS mannose transporter subunit IIC
Q8Y9W8_LISMO	Lmo0401 protein				Imo0401	Alpha-mannosidase
Q8Y7L9_LISMO	Lmo1255 protein				Imo1255	PTS trehalose transporter subunit IIBC
Q8Y808_LISMO	UhpT protein	uhpT			Imo0838	
Q8Y9V5_LISMO	Lmo0415 protein				Imo0415	Endo-1,4-beta-xylanase
PGK_LISMO	Phosphoglycerate kinase	pgk			Imo2458	
Q8Y3Z4_LISMO	Permease IIC component				Imo2684	
Q8Y8I4_LISMO	Lmo0907 protein				Imo0907	Phosphoglycerate mutase
Q8Y7E4_LISMO	Lmo1339 protein				Imo1339	Glucose kinase
Q8Y990_LISMO	Transaldolase	fsa_like			Imo0643	
Q8YA88_LISMO	Lmo0271 protein				Imo0271	Phospho-beta-glucosidase
Q8Y4C8_LISMO	Lmo2475 protein				Imo2475	Phosphoglucomutase
Q929P4_LISMO	Lmo2125 protein				Imo2125	Sugar ABC transporter substrate-binding protein
Q8Y9K6_LISMO	Lmo0521 protein				Imo0521	6-phospho-beta-glucosidase
Q8Y904_LISMO	Lmo0738 protein				Imo0738	PTS beta-glucoside transporter subunit IIABC
[E] Transport von Aminosäuren und deren Metabolismus						
Q7AP53_LISMO	Lmo2193 protein				Imo2193	Peptide ABC transporter ATP-binding protein
Q8Y6E9_LISMO	Lmo1738 protein				Imo1738	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein
Q7AP52_LISMO	Lmo2196 protein				Imo2196	Peptide ABC transporter substrate-binding protein

O8YA10_LISMO	Lmo0135 protein				lmo0135	Peptide ABC transporter substrate-binding protein
O8Y6E7_LISMO	Lmo1740 protein				lmo1740	Amino acid ABC transporter permease
O8Y710_LISMO	Glutamine synthetase		glnA		lmo1299	
O8Y6E8_LISMO	Lmo1739 protein				lmo1739	Amino acid ABC transporter ATP-binding protein
O8Y9C8_LISMO	Glutamate dehydrogenase				lmo0560	
O8Y6V2_LISMO	Alanine dehydrogenase				lmo1579	
HIS7_LISMO	Imidazoleglycerol-phosphate dehydratase		hisB		lmo0566	
Q7AP65_LISMO	OpuCA protein		opuCA		lmo1428	
O8Y8C6_LISMO	Lmo0982 protein				lmo0982	Peptidase
O8Y775_LISMO	Lmo1422 protein				lmo1422	Glycine/betaine ABC transporter permease
O8Y581_LISMO	Lmo2192 protein				lmo2192	Peptide ABC transporter ATP-binding protein
PRTA_LISMO	Zinc metalloproteinase		npl		lmo0203	
O8YAC3_LISMO	Cysteine synthase		cysK		lmo0223	
Q7AP67_LISMO	OpuCC protein		opuCC		lmo1426	
DAPEL_LISMO	N-acetyldiaminopimelate deacetylase				lmo1012	
GLYA_LISMO	Serine hydroxymethyltransferase		glyA		lmo2539	
GCSPB_LISMO	Probable glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 2		gcvPB		lmo1350	
O8Y638_LISMO	Lmo1862 protein				lmo1862	
Q7AP68_LISMO	OpuCD protein		opuCD		lmo1425	
O8YAH4_LISMO	Lmo0152 protein				lmo0152	Peptide ABC transporter substrate-binding protein
O8Y486_LISMO	Lmo2569 protein				lmo2569	Peptide ABC transporter substrate-binding protein
O8Y8P9_LISMO	Lmo0847 protein				lmo0847	Glutamine ABC transporter
GCSPA_LISMO	Probable glycine dehydrogenase (decarboxylating) subunit 1		gcvPA		lmo1349	
Q7AP76_LISMO	GbuA protein		gbuA		lmo1014	
Q7AP69_LISMO	Lmo1421 protein				lmo1421	Glycine/betaine ABC transporter ATP-binding protein
O8Y730_LISMO	Lmo1493 protein				lmo1493	Oligopeptidase
O8Y583_LISMO	Lmo2188 protein				lmo2188	Oligoendopeptidase
O8Y8D0_LISMO	Branched-chain-amino-acid aminotransferase				lmo0978	
DAAA_LISMO	D-alanine aminotransferase		dat		lmo1619	
DAPB_LISMO	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase		dapB		lmo1907	
O8Y898_LISMO	GbuC protein		gbuC		lmo1016	
O8YAB2_LISMO	Serine acetyltransferase		cysE		lmo0238	
AROA_LISMO	3-phosphoshikimate 1-carboxyvinyltransferase		aroA		lmo1923	
O8Y527_LISMO	AtpJ protein		atpJ		lmo2250	
O8Y9X2_LISMO	Pyroline-5-carboxylate reductase		proC		lmo0396	
O8Y8Y7_LISMO	Lmo0755 protein				lmo0755	Aminopeptidase
O8Y6T0_LISMO	Lmo1603 protein				lmo1603	Amino acid ABC transporter ATP-binding protein
O8Y8P8_LISMO	Lmo0848 protein				lmo0848	

PURL_LISMO	Phosphoribosylformylglycinamide synthase subunit PurL		purL	lmo1769	
PYRE_LISMO	Orotate phosphoribosyltransferase		pyrE	lmo1831	
PYRB_LISMO	Aspartate carbamoyltransferase		pyrB	lmo1838	
Q8Y5B2_LISMO	Ribonucleoside-diphosphate reductase			lmo2155	
KGUA_LISMO	Guanilate kinase		gmk	lmo1827	
CARB_LISMO	Carbamoyl-phosphate synthase large chain		carB	lmo1835	
[J] Transport von Lipiden und deren Metabolismus					
PHLC_LISMO	Phospholipase C		plcB	lmo0205	
Q8Y6N7_LISMO	lmo1647 protein			lmo1647	l-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase
Q8Y5H3_LISMO	lmo2089 protein			lmo2089	Lipase
Q8Y794_LISMO	lmo1396 protein			lmo1396	Phosphatidylglycerophosphate synthase
TARL_LISMO	Ribitol-5-phosphate cytidylyltransferase		tarI	lmo1086	
Q8Y574_LISMO	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 2			lmo2201	
Q8Y689_LISMO	Malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase		fabD	lmo1808	
CLS_LISMO	Cardiolipin synthase		cls	lmo2503	
FABH_LISMO	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase 3		fabH	lmo2202	
Q8Y5P0_LISMO	lmo2017 protein			lmo2017	
Q8Y781_LISMO	lmo1415 protein			lmo1415	Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase
[P] Transport von anorganischen Ionen und deren Metabolismus					
DPS_LISMO	DNA protection during starvation protein		dps	lmo0943	
MNTA_LISMO	Manganese-binding lipoprotein MntA		mntA	lmo1847	
CATA_LISMO	Catalase		kat	lmo2785	
Q8YAH3_LISMO	lmo0153 protein			lmo0153	Zinc ABC transporter substrate-binding protein
Q8YAM0_LISMO	Lipoprotein			lmo2417	
Q8Y9I7_LISMO	lmo0541 protein			lmo0541	ABC transporter substrate-binding protein
Q8Y992_LISMO	lmo0641 protein			lmo0641	Heavy metal-transporting ATPase
MNTB_LISMO	Manganese transport system ATP-binding protein MntB		mntB	lmo1849	
Q8Y876_LISMO	lmo1041 protein			lmo1041	Molybdate ABC transporter substrate-binding protein
Q8Y580_LISMO	lmo2194 protein			lmo2194	Peptide ABC transporter permease
Q8Y7D2_LISMO	lmo1351 protein			lmo1351	
LMCA1_LISMO	Calcium-transporting ATPase lmo0841			lmo0841	
Q8Y845_LISMO	lmo1073 protein			lmo1073	Metal ABC transporter substrate-binding protein
Q8Y4K7_LISMO	lmo2431 protein			lmo2431	Ferriochrome ABC transporter substrate-binding protein
SODM_LISMO	Superoxide dismutase [Mn]		sodA	lmo1439	
Q8YAH2_LISMO	lmo0154 protein			lmo0154	Zinc ABC transporter ATP-binding protein
Q929C7_LISMO	lmo2248 protein			lmo2248	

Q8Y579_LISMO	Lmo2195 protein			lmo2195	Peptide ABC transporter permease
MEIN2_LISMO	Methionine import ATP-binding protein MeIN2		meIN2	lmo2419	
Q8YA74_LISMO	Lipoprotein			lmo0285	
Q8Y5U6_LISMO	Lmo1959 protein			lmo1959	Ferrichrome-binding protein
Q8Y4L9_LISMO	Lmo2418 protein			lmo2418	ABC transporter permease
ECFA1_LISMO	Energy-coupling factor transporter ATP-binding protein EcFA1		ecFA1	lmo2601	
Q8Y544_LISMO	Lmo2232 protein			lmo2232	
Y1967_LISMO	Uncharacterized protein Lmo1967			lmo1967	Toxic ion resistance protein
Q8Y647_LISMO	Lmo1853 protein			lmo1853	Heavy metal-transporting ATPase
Q8Y8T3_LISMO	Lmo0811 protein			lmo0811	Carbonic anhydrase
Q8Y6L3_LISMO	Lmo1671 protein			lmo1671	ABC transporter
Q8Y439_LISMO	Energy-coupling factor transporter transmembrane protein EcFT		ecFT	lmo2634	
Q8Y8S6_LISMO	Lmo0818 protein			lmo0818	Cation-transporting ATPase
Q8Y4E7_LISMO	Lmo2499 protein			lmo2499	Phosphate ABC transporter substrate-binding protein
Q92FC3_LISMO	Lmo0136 protein			lmo0136	Peptide ABC transporter permease
Q8Y9K3_LISMO	Lmo0524 protein			lmo0524	Sulfate transporter
Q8Y3Z0_LISMO	Lmo2689 protein			lmo2689	Magnesium-translocating P-type ATPase
Q8Y854_LISMO	Lmo1064 protein			lmo1064	Transporter
[H] Transport von Coenzymen und deren Metabolismus					
PDXS_LISMO	Pyridoxal 5'-phosphate synthase subunit PdxS		pdxS	lmo2101	
PANB_LISMO	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase		panB	lmo1902	
Q8Y5N3_LISMO	NadC protein		nadC	lmo2024	
GCHL_LISMO	GTP cyclohydrolase I		folE	lmo1933	
Q8Y437_LISMO	FAD-protein FMN transferase			lmo2636	
Q8Y674_LISMO	Lmo1825 protein			lmo1825	Pantothenate metabolism flavoprotein
Q8Y971_LISMO	ThiD protein		thiD	lmo0662	
Q8Y6L1_LISMO	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase		menB	lmo1673	
NADP_LISMO	NH(3)-dependent NAD(+) synthetase		nadE	lmo1093	
FOLD_LISMO	Bifunctional protein FOLD		folD	lmo1360	
Q8Y6X7_LISMO	Delta-aminolevulinic acid dehydratase		hcmB	lmo1554	
[Q] Biosynthese von Sekundärmetaboliten, deren Transport und Katabolismus					
Q8Y4U2_LISMO	Pseudouridine-5-phosphate glycosidase		psuG	lmo2340	
Q8Y5B0_LISMO	SepA protein		sepA	lmo2157	
Zelluläre Prozesse und Signale					
[D] Kontrolle des Zellzyklus, Zellteilung, Partitionierung von Chromosomen					
Q8Y4E0_LISMO	FtsE protein		ftsE	lmo2507	

Q8Y4E1_LISMO	Cell division protein FtsX		ftsX	lmo2506	
Q8Y5N7_LISMO	DivIVA protein		divIVA	lmo2020	
EZRA_LISMO	Septation ring formation regulator EzrA		ezrA	lmo1594	
Q8Y5M4_LISMO	Cell division protein FtsA		ftsA	lmo2033	
Q8Y5M5_LISMO	Cell division protein FtsZ		ftsZ	lmo2032	
Q8Y6Y7_LISMO	Site-determining protein		minD	lmo1544	
FTSK_LISMO	DNA translocase FtsK		ftsK	lmo1386	
	[M] Biogenese der Zellwand/Membran/Hülle				
TAGH_LISMO	Teichoic acids export ATP-binding protein TagH		tagH	lmo1075	
Q8Y707_LISMO	Lmo1521 protein			lmo1521	N-acetylmuramyl-L-alanine amidase
Q8Y4C8_LISMO	Lmo2522 protein			lmo2522	Cell wall-binding protein
Q8Y3Y8_LISMO	Lmo2691 protein			lmo2691	Autolysin
P60_LISMO	Probable endopeptidase p60		iap	lmo0582	
Q8Y3S7_LISMO	Lmo2754 protein			lmo2754	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
Q7AP49_LISMO	Peptidoglycan lytic protein P45		spl	lmo2505	
MSCL_LISMO	Large-conductance mechanosensitive channel		mscL	lmo2064	
Q8Y8H6_LISMO	Lmo0927 protein			lmo0927	
Q8YAJ6_LISMO	Lmo0129 protein			lmo0129	N-acetylmuramyl-L-alanine amidase
Q8Y8H5_LISMO	Lmo0929 protein			lmo0929	Sortase
Q8Y4E2_LISMO	Lmo2504 protein			lmo2504	Cell wall-binding protein
Q8Y496_LISMO	Autolysin, amidase		ami	lmo2558	
Q8Y763_LISMO	Lmo1438 protein			lmo1438	Penicillin-binding protein
Q8Y610_LISMO	PbpA protein		pbpA	lmo1892	
MREC_LISMO	Cell shape-determining protein MreC		mreC	lmo1547	
Q8YA D8_LISMO	Lmo0193 protein			lmo0193	
Q8Y8L7_LISMO	Lmo0880 protein			lmo0880	Wall associated protein precursor
SP5G2_LISMO	Putative septation protein SpoVG2		spoVG2	lmo0197	
Q7AP54_LISMO	Lmo2185 protein			lmo2185	
Q7AP78_LISMO	DltD protein for D-alanine esterification of lipoteichoic acid and wall teichoic acid		dltD	lmo0971	
Q8Y513_LISMO	Lmo2067 protein			lmo2067	Bile acid hydrolase
Q8Y5W4_LISMO	Lmo1941 protein			lmo1941	
Q8Y989_LISMO	Lmo0644 protein			lmo0644	
Q7AP48_LISMO	Lmo2550 protein			lmo2550	Glycosyl transferase
Q8Y836_LISMO	Lmo1082 protein			lmo1082	dTDP-sugar epimerase
Q8Y645_LISMO	Lmo1855 protein			lmo1855	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase
Q8Y547_LISMO	Lmo2229 protein			lmo2229	Penicillin-binding protein
Q8Y899_LISMO	Lmo1013 protein			lmo1013	

Q8Y7K7_LISMO	Signal peptidase I			lmo1270	
YIDC1_LISMO	Membrane protein insertase YidC1	yidC1		lmo1379	
SECA1_LISMO	Protein translocase subunit SecA1	secA1		lmo2510	
Q8Y448_LISMO	Protein translocase subunit SecY	secY		lmo2612	
[T] Mechanismen der Signaltransduktion					
Q9ZC58_LISMO	RNA-binding protein Hfq	hfq		lmo1295	
Q8Y6V1_LISMO	Universal stress protein			lmo1580	
Q8Y679_LISMO	Lmo1820 protein			lmo1820	Serine/threonine protein kinase
Q8Y9J6_LISMO	Lmo0531 protein			lmo0531	
Q8Y8K9_LISMO	RsbR protein	RsbR		lmo0889	
Q9ZDC5_LISMO	RsbS protein	rsbS		lmo0890	
Q8Y6E6_LISMO	Lmo1741 protein			lmo1741	Histidine kinase
RSBW_LISMO	Serine-protein kinase RsbW	rsbW		lmo0894	
Q8Y5K8_LISMO	Lmo2051 protein			lmo2051	
Q7A P63_LISMO	Lmo1467 protein			lmo1467	Phosphate starvation-induced protein PhoH
[V] Verteidigungsmechanismen					
Q8Y5F0_LISMO	Lmo2114 protein			lmo2114	A BC transporter ATP-binding protein
Q8Y4R2_LISMO	Lmo2372 protein			lmo2372	A BC transporter ATP-binding protein
Q8Y6P8_LISMO	Lmo1636 protein			lmo1636	A BC transporter ATP-binding protein
Q8Y4R3_LISMO	Lmo2371 protein			lmo2371	A BC transporter pemease
Q8Y475_LISMO	Lmo2580 protein			lmo2580	A BC transporter ATP-binding protein
Q8Y474_LISMO	Lmo2581 protein			lmo2581	
Q8Y9C5_LISMO	Lmo0607 protein			lmo0607	A BC transporter ATP-binding protein
Q8Y5U1_LISMO	Lmo1964 protein			lmo1964	A BC transporter ATP-binding protein
Q8Y9C4_LISMO	Lmo0608 protein			lmo0608	A BC transporter ATP-binding protein
Q8Y6E0_LISMO	Lmo1747 protein			lmo1747	A BC transporter ATP-binding protein
Q8Y3T0_LISMO	Lmo2751 protein			lmo2751	A BC transporter ATP-binding protein
Q8Y3W4_LISMO	CydD protein	cydD		lmo2715	
Q8Y8Y6_LISMO	Lmo0756 protein			lmo0756	A BC transporter ATP-binding protein
Q8Y3V6_LISMO	Lmo2725 protein			lmo2725	
Q8Y5E9_LISMO	Lmo2115 protein			lmo2115	A BC transporter pemease
Q8Y3W3_LISMO	CydC protein	cydC		lmo2716	
Q8Y3S9_LISMO	Lmo2752 protein			lmo2752	A BC transporter ATP-binding protein
[N] Zellbewegung					
Q8Y464_LISMO	Surface protein (CW repeat) similar to N-acetylmuuramidase			lmo2591	N-acetylmuuramoyl-L-alanine amidase
Q8Y7Q7_LISMO	Lmo1215 protein			lmo1215	N-acetylmuuramoyl-L-alanine amidase
Q8Y842_LISMO	Lmo1076 protein			lmo1076	Autolysin

Informationspeicherung und -prozessierung		
[J] Translation, ribosomale Struktur und Biogenese		
RL2_LISMO	50S ribosomal protein L2	lmo2629
RL20_LISMO	50S ribosomal protein L20	lmo1783
PNP_LISMO	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	lmo1331
RL4_LISMO	50S ribosomal protein L4	lmo2631
RS2_LISMO	30S ribosomal protein S2	lmo1658
RL1_LISMO	50S ribosomal protein L1	lmo0249
EFTU_LISMO	Elongation factor Tu	lmo2653
RL5_LISMO	50S ribosomal protein L5	lmo2620
Q8YAV4_LISMO	Lmo0009 protein	lmo0009
RS5_LISMO	30S ribosomal protein S5	lmo2615
RS3_LISMO	30S ribosomal protein S3	lmo2626
RS4_LISMO	30S ribosomal protein S4	lmo1596
SYL_LISMO	Isoleucine-tRNA ligase	lmo2019
RS11_LISMO	30S ribosomal protein S11	lmo2607
EFTS_LISMO	Elongation factor Ts	lmo1657
SYM_LISMO	Methionine-tRNA ligase	lmo0177
GATB_LISMO	Aspartylglutamylyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	lmo1754
RL16_LISMO	50S ribosomal protein L16	lmo2625
SYR_LISMO	Arginine-tRNA ligase	lmo2561
SYE_LISMO	Glutamate-tRNA ligase	lmo0237
RS7_LISMO	30S ribosomal protein S7	lmo2655
EFG_LISMO	Elongation factor G	lmo2654
RL10_LISMO	50S ribosomal protein L10	lmo0250
GATA_LISMO	Glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit A	lmo1755
SYS_LISMO	Serine-tRNA ligase	lmo2747
SYF_LISMO	Proline-tRNA ligase	lmo1319
Q8Y6S6_LISMO	PheT protein	lmo1607
RL25_LISMO	50S ribosomal protein L25	lmo0211
RNPH_LISMO	Ribonuclease PH	lmo1238
SYA_LISMO	Alanine-tRNA ligase	lmo1504
SYFB_LISMO	Phenylalanine-tRNA ligase beta subunit	lmo1222
SYV_LISMO	Valine-tRNA ligase	lmo1552
[K] Transkription		
Q8Y9T0_LISMO	Lmo0443 protein	lmo0443
Q8Y4D2_LISMO	Lmo2518 protein	lmo2518
		LytR family transcriptional regulator
		LytR family transcriptional regulator

Q8YAK2_LISMO	lmo0122-protein			lmo0122	
Q8Y4Y4_LISMO	Protein gp8 [Bacteriophage A118]			lmo2295	
Q7AP93_LISMO	Antigen A		lmaA	lmo0118	
Q7AP59_LISMO	lmo1601 protein			lmo1601	General stress protein
Q8YAK1_LISMO	lmo0123 protein			lmo0123	
Q8Y850_LISMO	lmo1068 protein			lmo1068	
Q8Y6T1_LISMO	lmo1602 protein			lmo1602	
Q8YAR7_LISMO	lmo0047 protein			lmo0047	
Q8Y6N5_LISMO	lmo1649 protein			lmo1649	
Y392_LISMO	UPF0365 protein lmo0392			lmo0392	
Q8Y7E8_LISMO	lmo1334 protein			lmo1334	
Q8Y639_LISMO	lmo1861 protein			lmo1861	
Q8Y795_LISMO	lmo1395 protein			lmo1395	
Q8Y980_LISMO	lmo0653 protein			lmo0653	
Q8Y3B_LISMO	lmo2853 protein			lmo2853	
Q8Y8V1_LISMO	lmo0791 protein			lmo0791	
Q8Y690_LISMO	FabG protein		fabG	lmo1807	
Q8Y6L8_LISMO	Peptidoglycan linked protein (LPxTG)			lmo1666	
Q8Y5Y4_LISMO	lmo1919 protein			lmo1919	
Q8Y7E9_LISMO	lmo1333 protein			lmo1333	
Q8Y6D1_LISMO	lmo1757 protein			lmo1757	
INLB_LISMO	Internalin B		inIB	lmo0434	
Q29B9_LISMO	lmo2256 protein			lmo2256	
Q8Y5M8_LISMO	lmo2029 protein			lmo2029	
Q8Y559_LISMO	lmo2217 protein			lmo2217	
Q8Y3W9_LISMO	lmo2710 protein			lmo2710	
Q8YAK3_LISMO	lmo0121 protein			lmo0121	Phage tail protein
Q8Y4W1_LISMO	lmo2318 protein			lmo2318	
Y1776_LISMO	UPF0316 protein lmo1776			lmo1776	
YHAM_LISMO	3'-5' exoribonuclease YhaM		yhaM	lmo2220	
Q8Y9E6_LISMO	lmo0584 protein			lmo0584	
Y2113_LISMO	Putative heme-dependent peroxidase lmo2113			lmo2113	
DACA_LISMO	Diadenylate cyclase		dacA	lmo2120	
Q8Y5T9_LISMO	lmo1966 protein			lmo1966	
Q8Y605_LISMO	lmo1898 protein			lmo1898	
Q8Y725_LISMO	lmo1499 protein			lmo1499	
Q8Y8F4_LISMO	lmo0950 protein			lmo0950	
Q8Y6P7_LISMO	lmo1637 protein			lmo1637	

8. Anhang

Q8Y3X4_LISMO	Lmo2705 protein				Lmo2705	
Q8Y704_LISMO	Lmo1526 protein				Lmo1526	
Q8Y4W7_LISMO	Lmo2312 protein				Lmo2312	
Q8Y762_LISMO	Lmo1440 protein				Lmo1440	
Q7AP92_LISMO	Lmo0119 protein				Lmo0119	
Y207_LISMO	Uncharacterized lipoprotein Lmo0207				Lmo0207	Uncharacterized lipoprotein Lmo0207 precursor.
Y1306_LISMO	UPF0154 protein lmo1306				Lmo1306	
Q8Y715_LISMO	Lmo1511 protein				Lmo1511	
Q8Y4Y2_LISMO	Putative scaffolding protein [Bacteriophage A118]				Lmo2297	
Q8Y4I9_LISMO	Lmo2439 protein				Lmo2439	
Q8Y983_LISMO	Lmo0650 protein				Lmo0650	
Q8Y671_LISMO	Lmo1828 protein				Lmo1828	
Q8Y6E4_LISMO	Lmo1743 protein				Lmo1743	
Q8Y8F2_LISMO	Lmo0952 protein				Lmo0952	
Q8Y4H8_LISMO	Lmo2463 protein				Lmo2463	Multidrug transporter
Q7AP87_LISMO	Interthalin H			inIH	Lmo0263	
Y2474_LISMO	Nucleotide-binding protein lmo2474				Lmo2474	
Q8Y5U2_LISMO	Lmo1963 protein				Lmo1963	
Q8Y3E5_LISMO	Lmo2119 protein				Lmo2119	
Q8YA69_LISMO	Lmo0290 protein				Lmo0290	
Q8YA18_LISMO	Lmo0126 protein				Lmo0126	
Q8Y642_LISMO	Lmo1858 protein				Lmo1858	Dehydrogenase
Q8Y728_LISMO	Lmo1495 protein				Lmo1495	
Q8YA63_LISMO	Lmo0296 protein				Lmo0296	
Q8Y3R6_LISMO	Lmo2767 protein				Lmo2767	
Y534_LISMO	UPF0210 protein lmo0534				Lmo0534	
Q8Y8L5_LISMO	Lmo0882 protein				Lmo0882	
Q8Y669_LISMO	Lmo1830 protein				Lmo1830	Short-chain dehydrogenase
Q8Y7A1_LISMO	Lmo1389 protein				Lmo1389	Sugar ABC transporter ATP-binding protein
Q8Y9F1_LISMO	Putative conserved membrane protein				Lmo0578	
PLSY_LISMO	Glycerol-3-phosphate acyltransferase			plsY	Lmo1284	
Q8Y7N3_LISMO	Lmo1241 protein				Lmo1241	
Y234_LISMO	Uncharacterized PIN and TRAM-domain containing protein Lmo0234				Lmo0234	
Q8Y4P9_LISMO	Lmo2386 protein				Lmo2386	Oxidoreductase
Q8Y5S9_LISMO	Lmo1976 protein				Lmo1976	
Q8Y4F3_LISMO	Lmo2491 protein				Lmo2491	
Y208_LISMO	UPF0145 protein lmo0208				Lmo0208	
Q8Y6I6_LISMO	Lmo1688 protein				Lmo1688	Enoyl-ACP reductase

Q8YA10_LISMO	Lmo0356 protein			lmo0356	Oxidoreductase
Q8Y8U6_LISMO	Lmo0796 protein			lmo0796	
Q8Y905_LISMO	Lmo0737 protein			lmo0737	
Q8Y917_LISMO	Lmo0530 protein			lmo0530	
Q8YA70_LISMO	Lmo0289 protein			lmo0289	
Q8Y9H5_LISMO	Lmo0553 protein			lmo0553	
Q8Y4W4_LISMO	Lmo2315 protein			lmo2315	
Q8Y490_LISMO	Lmo2565 protein			lmo2565	
Q8Y7L6_LISMO	Lmo1261 protein			lmo1261	
Y779_LISMO	UPF0266 membrane protein lmo0779			lmo0779	
Q8Y9D2_LISMO	Lmo0600 protein			lmo0600	
Q8Y8L4_LISMO	Lmo0883 protein			lmo0883	
Q8Y7P7_LISMO	Lmo1226 protein			lmo1226	Transporter
RNY_LISMO	Ribonuclease Y		my	lmo1399	
Q8Y8F3_LISMO	Lmo0951 protein			lmo0951	
Q8Y537_LISMO	Lmo2239 protein			lmo2239	
Q8Y610_LISMO	Lmo1694 protein			lmo1694	CDP-abequose synthase
Q8Y4F8_LISMO	Lmo2486 protein			lmo2486	
Q8Y3K6_LISMO	Lmo2829 protein			lmo2829	Nitroreductase
Q8Y9C2_LISMO	Lmo0610 protein			lmo0610	Internalin
Q8Y839_LISMO	Lmo1079 protein			lmo1079	
Q8Y523_LISMO	Lmo2254 protein			lmo2254	
Q8Y5C6_LISMO	Lmo2139 protein			lmo2139	ABC transporter ATP-binding protein
Q8Y5K4_LISMO	Lmo2056 protein			lmo2056	
ERA_LISMO	GTPase Era		era	lmo1462	
Q8Y9A6_LISMO	Lmo0626 protein			lmo0626	
Q8YA84_LISMO	C-terminal part similar to B. subtilis ComEC protein			lmo0275	
Q8Y619_LISMO	Phosphatidylglycerol lysyltransferase		mprF	lmo1695	
Q8Y6G8_LISMO	Lmo1718 protein			lmo1718	
Q8Y9D1_LISMO	Lmo0601 protein			lmo0601	Cell surface protein
Q8Y4Z2_LISMO	Putative tape-measure [Bacteriophage A118]			lmo2287	
Q8YA F6_LISMO	Lmo0170 protein			lmo0170	
Q8Y9E3_LISMO	Putative secreted protein			lmo0587	
Q8Y4S2_LISMO	Transmembrane protein			lmo2360	
Kein Ortholog gefunden					
Q8YA17_LISMO	Lmo0127 protein			lmo0127	
Q8YA19_LISMO	Lmo0125 protein			lmo0125	

Q7AP94_LISMO	Antigen B			lmo0117
ACTA_LISMO	Actin assembly-inducing protein		lmo0204 actA	lmo0204
Q8Y429_LISMO	Protein gp23 [Bacteriophage A 118]			lmo2280
Q8Y4U9_LISMO	Lmo2331 protein			lmo2331
Q8Y4M1_LISMO	Lmo2416 protein			lmo2416
Q8Y500_LISMO	Holin [Bacteriophage A 118]			lmo2279
Q8Y513_LISMO	Lmo2079 protein			lmo2079
Q8Y4M6_LISMO	Lmo2410 protein			lmo2410
Q8Y3W5_LISMO	Peptidoglycan anchored protein (LPXTG motif)			lmo2714
Q8YAK0_LISMO	Lmo0124 protein			lmo0124
Q8Y769_LISMO	Lmo1432 protein			lmo1432
Q8Y9P5_LISMO	Putative secreted protein			lmo0479
Q7AP60_LISMO	Lmo1518 protein			lmo1518
Q8Y4V0_LISMO	Lmo2330 protein			lmo2330
Q8Y9P7_LISMO	Putative secreted protein			lmo0477
Q8Y4Y8_LISMO	Major tail shaft protein [Bacteriophage A 118]			lmo2291
Q8Y512_LISMO	Lmo2080 protein			lmo2080
Q8Y3N0_LISMO	Lmo2805 protein			lmo2805
Q8Y8Z2_LISMO	Lmo0750 protein			lmo0750
Q8Y4W8_LISMO	Lmo2311 protein			lmo2311
Q8Y3P3_LISMO	Lmo2792 protein			lmo2792
Q8Y6D5_LISMO	Lmo1752 protein			lmo1752
Q8Y4Z6_LISMO	Protein gp20 [Bacteriophage A 118]			lmo2283
Q8Y4Z5_LISMO	Protein gp19 [Bacteriophage A 118]			lmo2284