

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Molekulare Effekte von Nitrit auf  
*Listeria monocytogenes* und  
die temperaturabhängige Regulation des  
Stickstoffmetabolismus in *Listeria monocytogenes*

DANIELA KASPAR

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. D. Haller

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer

2. Univ.-Prof. Dr. W. Liebl

Die Dissertation wurde am 06.03.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08.07.2014 angenommen.

*für Andi und meine kleine Schwester Sabi*

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>I. Summary</b>	<b>3</b>
<b>II. Einleitung</b>	<b>5</b>
1. Das fakultativ intrazelluläre Lebensmittelpathogen <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2. Die Rolle von Nitrat, Nitrit und Nitrit-Derivaten in der Fleischindustrie	7
2.1 Die Verwendung von Nitrat und Nitrit zur Konservierung von Fleisch- und Wurstwaren	7
2.2 Die Rolle des Nitrit-Derivats Stickstoffmonoxid während der Wurstfermentation	8
2.3 Die bakteriellen Angriffspunkte der Nitrit-Derivate	10
2.4 Bakterielle Abwehrmechanismen gegen Nitrit und dessen Derivate	11
2.5 Kontroverse Diskussion im Hinblick auf den Gebrauch von Nitrit als Pökelsatz	12
3. Der Stickstoffmetabolismus in <i>L. monocytogenes</i>	13
4. Zielsetzung der Arbeit	15
<b>III. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
1. Material	16
1.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	16
1.2 Medien und Medienzusätze	18
2. Methoden	19
2.1 Kultivierung der verwendeten Bakterien	19
2.2 Wachstumsanalysen	20
2.3 DNA-Methoden	21
2.3.1 Isolierung bakterieller DNA	21
2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	23
2.3.4 Aufreinigung bakterieller DNA	24
2.3.5 Restriktionsverdau von DNA	24
2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten	25
2.4 Transformation und genetische Veränderungen von Bakterien	25
2.4.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen	25
2.4.2 Transformation kompetenter Bakterienzellen	26
2.4.3 Herstellung von <i>L. monocytogenes</i> Deletionsmutanten	27
2.5 RNA-Methoden	31
2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>L. monocytogenes</i>	31
2.5.2 Transkriptomanalysen	33
2.5.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	39
<b>IV. Ergebnisse</b>	<b>43</b>
1. Molekulare Effekte von Nitrat bzw. Nitrit auf <i>L. monocytogenes</i>	43

1.1	Wachstumsverhalten von <i>L. monocytogenes</i> in Anwesenheit von Nitrat	43
1.2	Transkriptomanalysen von <i>L. monocytogenes</i> in An- und Abwesenheit von Nitrat	44
1.3	Wachstumsverhalten von <i>L. monocytogenes</i> in Anwesenheit von Nitrit	44
1.4	Identifizierung des Nitrit-abhängigen Transkriptoms von <i>L. monocytogenes</i>	45
1.5	Einfluss von Nitrit auf das Wachstumsverhalten von <i>B. cereus</i> und <i>S. epidermidis</i>	49
1.6	Nitrit-abhängige <i>pyrAB</i> -Transkription in <i>B. cereus</i> und <i>S. epidermidis</i>	50
1.7	Nitrit-abhängige <i>hmp</i> -Transkription in <i>B. cereus</i> und <i>S. epidermidis</i>	51
1.8	Vermindertes Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> in Anwesenheit des NO-Donors SNP	52
1.9	Untersuchung der SNP-abhängigen Transkription von <i>pyrAB</i> in <i>L. monocytogenes</i>	52
1.10	Medienabhängige Inhibierung der <i>pyrAB</i> -Transkription in Anwesenheit von Nitrit und SNP	53
1.11	Identifizierung weiterer Nitritangriffspunkte mit Hilfe einer <i>L. monocytogenes</i> EGD Insertionsmutantenbank	57
2.	Temperaturabhängige Regulation des Stickstoffmetabolismus in <i>L. monocytogenes</i>	59
2.1	Identifizierung des temperaturabhängigen Transkriptoms in <i>L. monocytogenes</i>	59
2.2	Temperaturabhängiges Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> mit Glutamin als Stickstoffquelle	63
2.3	Identifizierung des GlnR-Regulons in <i>L. monocytogenes</i> bei 24 °C und 37 °C	65
<b>V.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>72</b>
1.	Der Pökelsatz Natriumnitrit als antimikrobielles Agens gegen <i>L. monocytogenes</i>	72
1.1	Das Nitrit-abhängige Wachstum und Transkriptom von <i>L. monocytogenes</i>	72
1.2	Auswirkungen von Nitrit auf das Wachstum und die <i>pyrAB</i> -Transkription anderer Gram-positiver Bakterien	74
1.3	Der Einfluss des NO-Donors SNP auf das Wachstum und die <i>pyrAB</i> -Transkription von <i>L. monocytogenes</i>	76
1.4	Die medienabhängige Inhibierung der <i>pyrAB</i> -Transkription in <i>L. monocytogenes</i> in Anwesenheit von Nitrit bzw. SNP	77
1.5	Die Identifizierung möglicher weiterer bei der Nitrit-Antwort von <i>L. monocytogenes</i> wichtiger Gene	78
1.6	Das Fehlen von NO-detoxifizierenden Systemen als möglicher Grund für die Nitrit-Sensitivität von <i>L. monocytogenes</i> während des Pökelprozesses	79
2.	Temperaturabhängige Regulation des Stickstoffmetabolismus in <i>L. monocytogenes</i>	80
2.1	Das temperaturabhängige Transkriptom von <i>L. monocytogenes</i>	80
2.2	Die temperaturabhängige Transkription der Stickstoffgene <i>glnRA</i> , <i>amtB-glnK</i> und <i>gdh</i> in <i>L. monocytogenes</i>	81
2.3	Die Rolle des Transkriptionsregulators GlnR bei der temperaturabhängigen Transkription der Gene <i>glnRA</i> , <i>amtB-glnK</i> und <i>gdh</i> in <i>L. monocytogenes</i>	83

<b>VI. Literaturverzeichnis</b>	<b>86</b>
<b>VII. Anhang</b>	<b>99</b>
Abkürzungsverzeichnis	99
Abbildungsverzeichnis	103
Tabellenverzeichnis	104
Eigene Publikationen und Konferenzbeiträge	105
Danksagung	106

## I. Zusammenfassung

Nitrat oder Nitrit werden in der Fleischindustrie während des Pökelprozesses zur Konservierung von Fleischprodukten verwendet. Wachstumsanalysen im Rahmen dieser Dissertation konnten zeigen, dass Nitrat *per se* keinen Einfluss auf das Wachstum des Lebensmittelpathogens *Listeria monocytogenes* ausübt. Auch auf Transkriptomebene lassen sich in Gegenwart von Nitrat keinerlei Effekte feststellen. Nitrit hingegen, das entweder ausgehend von Nitrat während des Pökelprozesses gebildet oder direkt dem Wurstprodukt zugegeben wird, wirkt inhibierend auf das Wachstum von *L. monocytogenes*. Zusätzlich konnten mittels Microarray-Analysen 34 Gene, deren Transkription durch Nitrit induziert wird, und 16 Gene, deren Transkription durch Nitrit reprimiert wird, identifiziert werden. Unter den durch Nitrit induzierten Genen befinden sich 27, die dem SigB-Regulon angehören. Unter den durch Nitrit inhibierten Genen befinden sich alle zehn Gene des *pyr*-Operons, dessen Genprodukte an der *de novo* Synthese von Pyrimidinen beteiligt sind und deren Transkription durch Nitrit um das 20fache reprimiert wird. Diese Nitrit-abhängige Transkriptionsverminderung konnte in keinem der weiteren untersuchten Organismen – weder in *Bacillus cereus* noch in *Staphylococcus epidermidis* – beobachtet werden. Auch das Wachstum dieser beiden Organismen wurde durch Nitrit weniger stark beeinträchtigt als das von *L. monocytogenes*. *B. cereus* und *S. epidermidis* besitzen im Gegensatz zu *L. monocytogenes* das Gen *hmp*, das für ein NO-detoxifizierendes Flavohemoglobin kodiert. Mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR)-Analysen konnte gezeigt werden, dass die *hmp*-Transkription in *B. cereus* durch Nitrit induziert wird, während sie in *S. epidermidis* nicht beeinflusst wird.

Da vermutet wird, dass beim Pökeln nicht Nitrit selbst, sondern dessen Derivate wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid (NO) antimikrobiell wirken, wurden des Weiteren das Wachstum und die *pyrAB*-Transkription in *L. monocytogenes* in An- und Abwesenheit des NO-Donors SNP (Natrium-Nitroprussid) untersucht. Es zeigte sich, dass die Zugabe von 20 bzw. 25  $\mu$ M SNP eine ähnliche wachstumshemmende Wirkung bei *L. monocytogenes* hervorruft wie 200 mg/l Natriumnitrit ( $\text{NaNO}_2$ ). Auch eine Hemmung der *pyrAB*-Transkription in Gegenwart dieser SNP-Konzentrationen konnte mit Hilfe von qRT-PCR-Messungen nachgewiesen werden. Bei Verwendung einer weiteren BHI-Charge (Charge II) konnte die Nitrit- und SNP-abhängige Inhibierung der *pyrAB*-Transkription allerdings nicht mehr nachgewiesen werden. Erst die Deletion der Uracil-Permease *PyrP* durch die Konstruktion der Mutante

*L. monocytogenes*  $\Delta$ *pyrP* resultierte in einer Nitrit- und SNP-induzierten Transkriptionseinhibierung des Gens *pyrAB* in Charge II.

Durch Wachstumsanalysen einer *L. monocytogenes* Insertionsmutantenbank konnten zudem 16 Mutanten identifiziert werden, durch deren Insertion das Wachstum in Gegenwart von Nitrit stärker beeinträchtigt wurde als dies beim Wildtyp der Fall war. Darunter befanden sich vier Mutanten, in denen Gene inseriert waren, deren Produkte an der DNA-Synthese bzw. -Reparatur beteiligt sind.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Dissertation bildete die Identifizierung des temperaturabhängigen Transkriptom von *L. monocytogenes* unter Verwendung eines chemisch definierten Minimalmediums, das Glutamin als Stickstoff- und Glukose als Kohlenstoffquelle enthielt. Mit Hilfe von Microarray-Experimenten, die das Transkriptom von *L. monocytogenes* Zellen verglichen, die einerseits bei 24 °C und andererseits bei 37 °C angezogen wurden, konnte eine temperaturabhängige Transkription der Stickstoffgene *glnRA*, *amtB-glnK* und *gdh* beobachtet werden. Während die Gene *glnRA* und *amtB-glnK*, die für den Glutamin-Synthetase-Repressor GlnR, die Glutamin-Synthetase GlnA, den Ammonium-Transporter AmtB und das PII Regulatorprotein GlnK kodieren, bei 24 °C stärker transkribiert werden, findet bei 37 °C eine stärkere Transkription des Gens *gdh* statt, das für die NADP-abhängige Glutamat-Dehydrogenase GDH kodiert. Zur näheren Analyse wurden die Transkriptome des *L. monocytogenes* Wildtyps und der Mutante *L. monocytogenes*  $\Delta$ *glnR* mittels Next Generation Sequenzierung (NGS) bei 24 °C bzw. 37 °C gegenüber gestellt. Dabei zeigte sich, dass bei der temperaturabhängigen Regulation der Stickstoffgene *glnRA*, *amtB-glnK* und *gdh* der Transkriptionsregulator GlnR beteiligt ist.

## I. Summary

In the meat industry nitrate and nitrite are commonly used as curing agents for preservation of meat products. Growth studies performed in this study showed no effect of nitrate *per se* on the growth of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. Furthermore, the transcriptome of *L. monocytogenes* is not affected in the presence of nitrate. However, nitrite, which is generated during the curing process from nitrate or which is directly added to the meat product, inhibits the growth of *L. monocytogenes*. In addition, microarray studies identified 34 genes whose transcription was activated and 16 genes whose transcription was inhibited in the presence of nitrite. 27 of the nitrite induced genes are members of the SigB regulon. Interestingly, all genes of the *pyr* operon, whose products are involved in the *de novo* synthesis of pyrimidines, were inhibited through the addition of nitrite. This nitrite dependent inhibition of the transcription could be observed in none of the further analyzed organisms, neither in *B. cereus* nor in *S. epidermidis*. Furthermore, the growth of both organisms was less affected in the presence of nitrite compared to *L. monocytogenes*.

In contrast to *L. monocytogenes*, *B. cereus* and *S. epidermidis* possess the gene *hmp* which encodes for a NO-detoxifying flavohemoglobine. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) studies identified a nitrite induced transcription of the *hmp* gene in *B. cereus*, whereas the transcription of the *hmp* gene in *S. epidermidis* was not influenced by nitrite.

It is reported that not nitrite itself, but nitrite-derivates like nitric oxide (NO) are responsible for the antimicrobial effects during sausage fermentation. Therefore, growth analyses of *L. monocytogenes* and transcription studies of *pyrAB* in *L. monocytogenes* in the presence and absence of the NO donor SNP (sodium nitroprusside) were performed. The results showed a similar growth retardation in the presence of 20 and 25  $\mu$ M SNP like in the presence of 200 mg/l sodium nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) and a SNP-induced transcriptional inhibition of *pyrAB*. However, the nitrite and SNP dependent transcriptional inhibition of *pyrAB* could not be detected by using a second batch of BHI medium (Batch II). Only the deletion of the uracil permease *PyrP* by construction of *L. monocytogenes*  $\Delta$ *pyrP* resulted in a nitrite and SNP dependent inhibition of the *pyrAB* transcription in batch II.

Growth studies of a *L. monocytogenes* insertion mutant database identified 16 mutants which showed a stronger growth retardation in the presence of nitrite compared to the wild type. In 4 of the 16 mutants genes were inserted encoding for products of DNA synthesis and repair.

The second part of this thesis focused on the analysis of the temperature dependent transcriptome of *L. monocytogenes* in a chemical defined minimal medium, which contained glucose as carbon and glutamine as nitrogen source. Microarray experiments which compared the transcriptome of *L. monocytogenes* cells incubated on the one hand at 24 °C and on the other hand at 37 °C identified the temperature dependent transcription of the nitrogen genes *glnRA*, *amtB-glnK* and *gdh*. The transcription of *glnRA* and *amtB-glnK* – encoding for the glutamine synthetase repressor GlnR, the glutamine synthetase GlnA, the ammonium transporter AmtB and the PII regulatory protein GlnK – was stronger at 24 °C. The transcription of *gdh* encoding for the NADP dependent glutamate dehydrogenase was stronger at 37 °C. To further analyze the temperature dependent transcription of the nitrogen genes, transcriptomes of *L. monocytogenes* wild type and *L. monocytogenes*  $\Delta$ *glnR* were compared at 24 °C and 37 °C by using the next generation sequencing (NGS) method. NGS data showed that the transcription regulator GlnR plays a crucial role in the temperature dependent regulation of the nitrogen genes *glnRA*, *amtB-glnK* and *gdh*.

## II. Einleitung

### 1. Das fakultativ intrazelluläre Lebensmittelpathogen *Listeria monocytogenes*

Bei dem Organismus *Listeria monocytogenes* handelt es sich um ein Gram-positives, stäbchenförmiges, fakultativ anaerobes, nicht sporulierendes Bakterium mit einem geringen GC-Gehalt in seiner DNA (GLASER et al., 2001). *L. monocytogenes* ist ubiquitär in der Natur verbreitet wie zum Beispiel im Boden, auf verrottetem Pflanzenmaterial, im Wasser, aber auch im Gastrointestinaltrakt von Menschen, Säugetieren und Vögeln (FARBER and PETERKIN, 1991; WATKINS and SLEATH, 1981). Ein optimales Wachstum erfolgt bei Temperaturen von 30 bis 37 °C unter neutralen pH-Bedingungen (PETRAN and ZOTTOLA, 1989). Allerdings ist *L. monocytogenes* auch in der Lage, Temperaturen von 0 bis 45 °C, pH-Werte von 4,0 bis 9,6 und Natriumchlorid-Konzentrationen von mehr als 10 % zu überleben (HUDSON, 1992; LADO and YOUSEF, 2007; PETRAN and ZOTTOLA, 1989; SHABALA et al., 2008). Aufgrund dieser Eigenschaften stellt *L. monocytogenes* ein hohes Risiko in der Lebensmittelbranche dar, da die konventionellen Methoden der Lebensmittelkonservierung unter Umständen nicht ausreichen, um ein Wachstum des Bakteriums in Rohprodukten wie zum Beispiel in Rohmilch, -käse und -würsten zu verhindern (FARBER and PETERKIN, 1991; GANDHI and CHIKINDAS, 2007; KATHARIOU, 2002; SCHUCHAT et al., 1991).

Eine Aufnahme von *L. monocytogenes* über kontaminierte Speisen kann bei gesunden, immunkompetenten Menschen zu Durchfall, Fieber und Erbrechen führen. Diese Symptome sind meistens selbstlimitierend und bedürfen bei normalem Verlauf keiner weiteren Behandlung (HOF, 2004; VAZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Bei ungeborenen und kleinen Kindern sowie älteren und immunsupprimierten Personen kann dagegen eine Infektion mit *L. monocytogenes* zum Ausbruch der humanen Listeriose führen (GOULET et al., 2012; SCHLECH and ACHESON, 2000). Trotz Antibiotikabehandlung beträgt die Mortalitätsrate bei dieser Erkrankung 20 bis 40 % (GOULET et al., 2012; SCHLECH and ACHESON, 2000; SCHUCHAT et al., 1991). Aufgrund der Fähigkeit des Bakteriums, die Blut-Hirn-Schranke und die Blut-Plazenta-Schranke zu überqueren, kann es zu Wechselwirkungen mit dem zentralen Nervensystem, zu Meningitis, zu Meningoenzephalitis oder auch zu Schwangerschaftsabbrüchen und Todgeburten bei schwangeren Frauen kommen (BAKARDJIEV et al., 2006; BENSUSHAN et al., 2002; BORTOLUSSI, 2008; DREVETS and BRONZE, 2008; JIAO et al., 2011). Weitere Symptome können Gastroenteritis, Sepsis, anhaltendes Fieber und Durchfall sein.

Der Infektionszyklus von *L. monocytogenes* beginnt im menschlichen Körper entweder durch die passive Aufnahme in phagozytierende Zellen (ALVAREZ-DOMINGUEZ et al., 1993; PAMER,

2004) oder durch die aktive Aufnahme in nicht-phagozytierende Zellen wie zum Beispiel Epithelzellen (GAILLARD and FINLAY, 1996; MENGAUD et al., 1996), Fibroblasten (KIRCHNER and HIGGINS, 2008; KUHN et al., 1988), Hepatozyten (DRAMSI et al., 1995; GREGORY et al., 1996; WOOD et al., 1993), Endothelzellen (DREVETS et al., 1995; PARIDA et al., 1998) oder Nervenzellen (DRAMSI et al., 1998). Die Invasion von *L. monocytogenes* in nicht-phagozytierende Zellen wird hauptsächlich durch die listeriellen Oberflächenproteine Internalin A und B (codiert durch *inlA* und *inlB*) induziert (COSSART et al., 2003). Dabei dient als spezifischer Internalin A-Rezeptor das auf der Epithelzell-Oberfläche befindliche E-Cadherin (MENGAUD et al., 1996; SCHUBERT et al., 2002). Internalin B hingegen besitzt drei Typen von Interaktionspartnern: die auf der eukaryontischen Zelloberfläche lokalisierten Glykosaminoglykane (JONQUIERES et al., 2001), das Membranprotein gC1q-R (BRAUN et al., 2000) und den Rezeptor des Hepatozytenwachstumsfaktors (Met), das sich wie gC1q-R auf Zelltypen epithelialen Ursprungs befindet (NIEMANN et al., 2007; SHEN et al., 2000). Während Internalin B bei der *L. monocytogenes* Aufnahme der meisten nicht-phagozytierenden Zellen eine Rolle spielt, scheint Internalin A spezifisch für die *L. monocytogenes* Invasion des Darmepithels und der Plazenta von Bedeutung zu sein (LECUIT et al., 2004; LECUIT et al., 2001). Nach der Invasion ist *L. monocytogenes* in der Wirtszell-Vakuole lokalisiert, aus der es mit Hilfe von Listeriolysin O (*hly*) und zwei Phospholipasen (*plcA*, *plcB*) in das Cytosol gelangen kann (ALVAREZ-DOMINGUEZ et al., 1997; MARQUIS et al., 1995; SMITH et al., 1995). PlcB wird als Proenzym durch *L. monocytogenes* sekretiert und erst an der Zelloberfläche durch die Metalloprotease Mpl (*mpl*) in seinen aktiven Zustand überführt (DOMANN et al., 1991; MENGAUD et al., 1991; POYART et al., 1993). Die bakterielle Fortbewegung im eukaryontischen Cytosol findet durch die Polymerisierung des Wirtsaktins statt. Diese Polymerisierung wird durch das listerielle Protein ActA (*actA*) induziert (DOMANN et al., 1992; KOCKS et al., 1992). Somit kann sich *L. monocytogenes* von Wirtszelle zu Wirtszelle bewegen und sich im menschlichen Körper ausbreiten (TILNEY and PORTNOY, 1989). Die Transkription der Virulenzgene *inlA*, *inlB*, *hly*, *plcA*, *plcB*, *mpl* und *actA* wird durch den temperaturabhängig exprimierten Hauptvirulenzfaktor PrfA reguliert (JOHANSSON et al., 2002; LEIMEISTER-WÄCHTER et al., 1992; SCORTTI et al., 2007).

## 2. Die Rolle von Nitrat, Nitrit und Nitrit-Derivaten in der Fleischindustrie

### 2.1 Die Verwendung von Nitrat und Nitrit zur Konservierung von Fleisch- und Wurstwaren

Neben Rohmilch, -käse und Fertigprodukten sind es Fleisch- und Wurstprodukte, die sich für den Konsumenten aufgrund von *L. monocytogenes* Kontaminationen zu einer ernsten Gefahr entwickeln können. Zum Beispiel waren kontaminierte Fleischprodukte die Ursache für die 2008 in Kanada ausgebrochene Listeriose-Epidemie, in deren Folge 22 Menschen verstarben (GILMOUR et al., 2010). Auch eine in Deutschland verfasste Studie identifizierte Fertigbrühwürste als die Ursache für diverse Listeriose-Infektionen zwischen den Jahren 2006 und 2008 in einem Krankenhaus in Baden-Württemberg (WINTER et al., 2009). Des Weiteren wurden 2011 mit *L. monocytogenes* kontaminierte Salamiprodukte von Aldi-Süd zurückgerufen, um mögliche Listeriose-Erkrankungen zu verhindern (HANDELSBLATT, 2011). Auch letztes Jahr mussten in den USA Wurstprodukte vom Markt genommen werden, die möglicherweise mit *L. monocytogenes* infiziert waren (FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE, 2013).

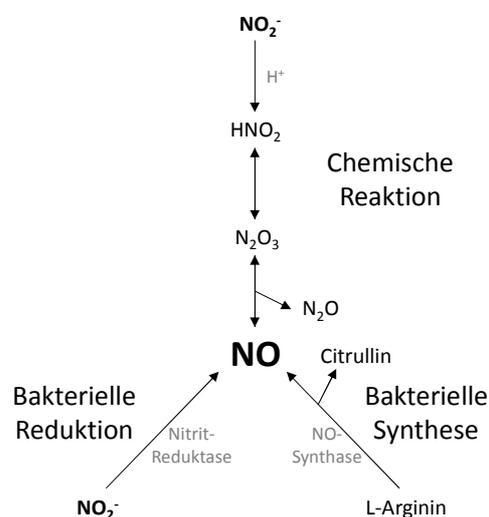
Um solche Kontaminationen weitestgehend zu vermeiden und eine mikrobielle Sicherheit der Produkte zu gewährleisten, wird bei der Rohwurst- und Fleischherstellung unter anderem auf Nitrat- oder Nitritpökelsalz zurückgegriffen, dessen Einsatz das Wachstum von unerwünschten Pathogenen im Produkt inhibieren soll. Zugegebenes Nitrat wird im Laufe der Wurstfermentation zu Nitrit reduziert, das dann seine potentiell antimikrobielle Wirkung entfalten kann. Weitere positive Aspekte, die durch Nitrit während der Wurstfermentation gewährleistet werden, sind die Ausbildung und Stabilisierung der typischen roten Pökelfarbe sowie des typischen Pökelgeschmacks (JIRA, 2004; KILLDAY et al., 1988). Des Weiteren wirkt Nitrit aufgrund seiner antioxidativen Wirkung einer schnellen Ranzigkeit des Lebensmittels entgegen. Ob Nitrit selbst alle diese positiven Effekte bewirkt, ist jedoch nicht belegt. Es wird vermutet, dass nicht das Nitrit selbst, sondern vielmehr eines oder mehrere seiner Derivate, die während des Rohwurstreifungsprozesses entstehen, für die mikrobiellen, konservierenden und antioxidativen Wirkungen verantwortlich sind (CAMMACK et al., 1999; FANG, 1997).

Dass das Wachstum des Bakteriums *L. monocytogenes* in Gegenwart von Natriumnitrit ( $\text{NaNO}_2$ ) in der Rohwurst und in Fleischwaren verhindert wird, konnte bereits experimentell bestätigt werden (KABISCH et al., 2012; SCHRADER, 2010; XI et al., 2011). Offen ist jedoch noch, ob Nitrit selbst oder eines/mehrere seiner Derivate für die Wachstumshemmung

verantwortlich sind und welche molekularen Prozesse vonstattengehen, wenn *L. monocytogenes* Nitrit bzw. dessen Derivaten ausgesetzt wird.

## 2.2 Die Rolle des Nitrit-Derivats Stickstoffmonoxid während der Wurstfermentation

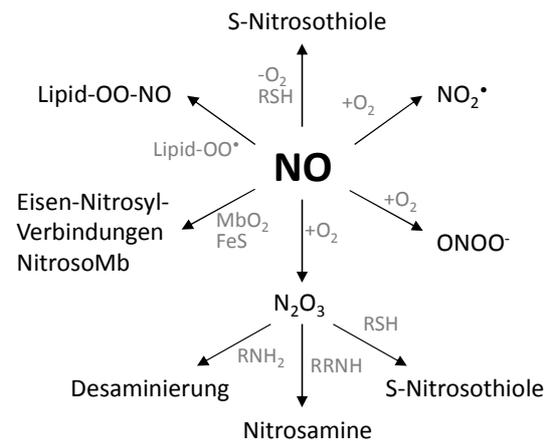
Im Zuge des Reifungsprozesses der Wurst kommt es ausgehend von Nitrit zur Bildung von reaktiven Stickstoff-Intermediaten (*reactive nitrogen species*; RNS). Eines der Nitrit-Hauptderivate, die während der Wurstfermentation entstehen können, ist Stickstoffmonoxid (NO) (HONIKEL, 2008; JIRA, 2004). Die Bildung von NO kann entweder auf chemischem oder auf mikrobiellem Weg erfolgen (RÖSZER, 2012) (Abb. 1).



**Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Generierung von NO während der Wurstfermentation.** NO<sub>2</sub>: Nitrit; HNO<sub>2</sub>: Salpetrige Säure; N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: Distickstofftrioxid; NO: Stickstoffmonoxid. Die dazugehörige Beschreibung ist dem Text zu entnehmen.

Bei der chemischen Generierung von NO reagiert Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) aufgrund des vorherrschenden sauren pHs im Produkt zu Salpetriger Säure (HNO<sub>2</sub>) bzw. Distickstofftrioxid (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) und anschließend zu NO (HONIKEL, 2008; RÖSZER, 2012). NO kann aber auch gebildet werden, indem einige Bakterien, die sich im Fleischprodukt befinden, Nitrit mit Hilfe der Nitritreduktase zu NO reduzieren oder L-Arginin mit Hilfe der NO-Synthase zu Citrullin umwandeln (FILIPPOVICH, 2010; GØTTERUP et al., 2007).

NO ist ein hochreaktives Gas, welches, je nach Oxidationsstufe, als Radikal (NO<sup>•</sup>), Nitrosonium-Kation (NO<sup>+</sup>) oder Nitrosyl-Anion (NO<sup>-</sup>) vorliegen kann (HUGHES, 1999). Die chemischen Reaktionen, in die NO involviert ist, sind vielfältig, da NO sowohl oxidierende als auch reduzierende Eigenschaften besitzt (FUKUTO et al., 2000) (Abb. 2).



**Abb. 2: Vereinfachte Darstellung einiger von NO ausgehenden chemischen Reaktionen, die im Wurstmilieu während der Fermentation stattfinden können.**  $+O_2$ : in Anwesenheit von Sauerstoff;  $-O_2$ : in Abwesenheit von Sauerstoff;  $N_2O_3$ : Distickstofftrioxid; NO: Stickstoffmonoxid;  $ONOO^-$ : Peroxynitrit;  $NO_2^*$ : Stickstoffdioxid;  $Lipid-OO^*$ : Lipidperoxyradikal;  $Lipid-OO-NO$ : Lipidperoxynitrit;  $MbO_2$ : Oxy-Myoglobin; NitrosoMb: Nitroso-Myoglobin;  $FeS$ : Eisen(II)-Sulfid;  $RNH_2$ : primäres Amin;  $RRNH$ : sekundäres Amin;  $RSH$ : Thiol. Die Beschreibung der jeweiligen Reaktionen sind dem Text zu entnehmen.

Im Wurstmilieu kann NO mit dem vorhandenen Restsauerstoff reagieren und zu Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) als auch Stickstoffdioxid ( $NO_2^*$ ) oxidiert werden (FUKUTO et al., 2000). Bei beiden handelt es sich um starke Oxidationsmittel, die die in der Wurst anwesenden Makromoleküle oxidieren können. Eine weitere unter aeroben Bedingungen stattfindende Reaktion ist die Bildung von  $N_2O_3$ , das durch die Oxidation von NO entstehen kann (FUKUTO et al., 2000).  $N_2O_3$  ist die anhydrierte Form von  $HNO_2$  und kann mit Thiolen und Aminen interagieren, was zur Ausbildung von S-Nitrosothiolen und Nitrosaminen sowie Desaminierungen von Aminogruppen führen kann (FUKUTO et al., 2000). S-Nitrosothiole können auch direkt durch NO generiert werden, indem das  $NO^*$ -Radikal unter anaeroben Bedingungen mit Thiolresten reagiert (FUKUTO et al., 2000). Weitere beliebte Interaktionspartner von NO stellen Metalle dar (FUKUTO et al., 2000). Durch die Interaktion von Eisen-Schwefel-Cluster (Fe-S-Cluster) können Eisen-Nitrosyl-Verbindungen entstehen. Die Bindung von NO an das Eisenzentrum des Häm des im Fleisch vorhandenen Myoglobins führt zum Beispiel zur Bildung des Nitroso-Myoglobins, des stabilen roten Farbstoffs des gepökelten Fleisches (GØTTERUP et al., 2007; MØLLER et al., 2003). Zudem schützt die durch NO hervorgerufene Verminderung von Lipid-Oxidationen das Produkt vor zu schneller Ranzigkeit und einer damit gestörten Sensorik des Fleisches bzw. der Wurst. Die Reduzierung der Lipid-Oxidation erfolgt, indem NO als lipophiles Radikal an das Lipidperoxyradikal ( $Lipid-OO^*$ ) bindet und somit durch die Entstehung von Lipidperoxynitrit ( $Lipid-OO-NO$ ) die Kettenreaktion der Peroxidation terminiert wird (FUKUTO et al., 2000).

### 2.3 Die bakteriellen Angriffspunkte der Nitrit-Derivate

Die im Wurstprodukt gebildeten RNS können mit einigen bakteriellen Zellbestandteilen interagieren, die für die Funktionalität der Zelle wichtig sind, und geno- und zytotoxisch auf die Bakterien wirken. Die bakterielle DNA stellt dabei eines der am besten untersuchten RNS-Targets dar (BURNEY et al., 1999). ONOO<sup>-</sup> kann die DNA oxidativ schädigen, indem es entweder direkt mit dem Zucker-Phosphat-Gerüst interagiert oder mit Guanin reagiert, was in der Bildung von 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin resultiert (BURNEY et al., 1999; KENNEDY et al., 1997). Dadurch können DNA-Einzelstrangbrüche bzw. G:C → A:T Transitionen entstehen. Weitere RNS, die die DNA direkt schädigen, sind HNO<sub>2</sub> (unter sauren Bedingungen) bzw. N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (unter neutralen Bedingungen).

Die direkte Interaktion dieser RNS mit der DNA kann zur Desaminierung der Nukleotide führen (BURNEY et al., 1999). Hierbei entstehen aus Guanin Xanthin bzw. Oxanin, aus Cytosin Uracil und aus Adenin Hypoxanthin (CAULFIELD et al., 1998; SUZUKI et al., 1996). Während die Bildung von Uracil durch die in der Zelle vorhandene Uracil-Glykosylase kompensiert werden kann (BURNEY et al., 1999), induziert die Anwesenheit von Xanthin bzw. Oxanin und Hypoxanthin eine höhere Mutationsrate der DNA-Sequenz. Ausgehend von Xanthin bzw. Oxanin können G:C → A:T Transitionen bzw. G:C → T:A Transversionen entstehen. Hypoxanthin, die desaminierte Form von Adenin, kann A:T → G:C Transitionen hervorrufen (BURNEY et al., 1999).

Zusätzlich konnte experimentell gezeigt werden, dass Hypoxanthin enthaltende DNA-Sequenzen von den Endonukleasen *Bgl*II und *Eco*RI schneller fragmentiert werden als solche Sequenzen, die Adenin besitzen (DOI et al., 2009). Neben der höher frequentierten DNA-Fragmentierung können sich desaminierte Nukleotide aber auch negativ auf die Aktivität von Enzymen auswirken, die an der DNA-Prozessierung beteiligt sind. So beeinflussen die Anwesenheit von Oxanin und Xanthin die durch die *Escherichia coli* Polymerase I durchgeführte DNA-Replikation, indem sie die Geschwindigkeit und Effizienz der Polymerase herabsetzen (NAKANO et al., 2005a).

Eine Veränderung der DNA-Replikation kann auch durch direkte RNS-Protein-Interaktionen hervorgerufen werden. Zum Beispiel kann die Reaktion von RNS mit den Tyrosinresten der Ribonukleotid-Reduktase deren Aktivität herabsetzen und somit die Reduktion der Nukleotide in Desoxynukleotide vermindern (LEPOIVRE et al., 1991; LEPOIVRE et al., 1994).

Des Weiteren wird das Pausieren der DNA-Replikation in *Salmonella* Typhimurium unter nitrosativem Stress damit begründet, dass diverse RNS mit zinkhaltigen Metalloproteasen interagieren können, die an der DNA-Replikation bzw. -Synthese beteiligt sind (SCHAPIRO et

al., 2003). Die Eigenschaft der RNS, mit Metallen und insbesondere mit Fe-S-Cluster zu reagieren, wirkt sich dahingehend nachteilig auf die Bakterien aus, dass einige Enzyme Fe-S-Cluster besitzen, die an der Reparatur von DNA-Modifikationen beteiligt sind. So konnte in Anwesenheit von NO in *E. coli* eine Inaktivierung der Endonuklease III durch die Interaktion von NO mit dem in dem Enzym anwesenden [4Fe-4S]-Cluster nachgewiesen werden (ROGERS et al., 2003). Durch diese Inaktivierung kann es zu keiner Exzision von oxidierten DNA-Basen mehr kommen, wodurch die Mutationsrate erhöht wird.

Weitere in der Bakterienzelle vorhandene RNS-Targets sind Proteine, die an der Atmung oder am Metabolismus der Bakterien beteiligt sind. So kann zum Beispiel die bakterielle Atmung durch die Bindung von NO an die terminale Cytochrom-bd-Oxidase inhibiert werden (BORISOV et al., 2004), womit die Redox-Balance innerhalb der Zelle nicht aufrechterhalten und wenig Energie in Form von ATP gebildet werden kann. Auch viele Proteine, die am Metabolismus beteiligt sind, können durch die RNS modifiziert werden. In *S. Typhimurium* und *E. coli* konnten bereits einige Enzyme identifiziert werden, die am Citratzyklus beteiligt sind und deren Funktion durch NO beeinträchtigt wurden (DUAN et al., 2009; GARDNER et al., 1997; RICHARDSON et al., 2011). Das Eingreifen der RNS in wichtige Stoffwechselvorgänge der Zelle beeinflusst deren Funktionalität und Vitalität, worin unter anderem die antimikrobielle Wirkungsweise der RNS begründet liegt.

#### **2.4 Bakterielle Abwehrmechanismen gegen Nitrit und dessen Derivate**

Viele Bakterien sind RNS, insbesondere NO, auch außerhalb des Pökelprozesses ausgesetzt. So kann das freie Radikal NO intrazellulär als Nebenprodukt bei der bakteriellen Nitrit- und Nitratatmung unter anaeroben Bedingungen entstehen (CORKER and POOLE, 2003; GILBERTHORPE and POOLE, 2008). Auch in der Wirtszelle spielt NO während der Immunantwort eine wichtige Rolle. Es wird bei einer Infektion durch die induzierbare NO-Synthase in der Wirtszelle produziert, um die invasiven Bakterien zu schädigen und zu töten (CHAKRAVORTTY and HENSEL, 2003). Zum Schutz vor diesem nitrosativen Stress besitzen Prokaryonten zahlreiche RNS-Abwehrmechanismen, die je nach Bakterium variieren können. Gene, die an der RNS-Abwehr in Gram-negativen Bakterien beteiligt sind, sind zum Beispiel *norV* und *nrfA*. *NorV* kodiert für die sauerstoffsensitive NO-Reduktase Flavorubredoxin und reduziert NO unter anaeroben Bedingungen zu N<sub>2</sub>O (GOMES et al., 2002; GOMES et al., 2000). *NrfA* kodiert für die periplasmatische Cytochrom-c-Nitritreduktase NrfA und katalysiert neben der Reduktion von NO<sub>2</sub><sup>-</sup> zu NH<sub>4</sub><sup>+</sup> auch die Reduktion von NO zu NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, wodurch die NO-Menge in der Zelle minimiert wird (SIMON, 2002; VAN WONDEREN et al., 2008).

Ein weiteres Protein, das bei der Abwehr von RNS in den Bakterienzellen eine Rolle spielt, ist das Flavohämoglobin Hmp. Hmp ist nicht nur für die Detoxifizierung von RNS in Gram-negativen Bakterien (CRAWFORD and GOLDBERG, 1998; GARDNER et al., 1998; HAUSLADEN et al., 1998), sondern auch in Gram-positiven Bakterien wie *Bacillus subtilis* und *Staphylococcus aureus* verantwortlich (RICHARDSON et al., 2006; ROGSTAM et al., 2007). In *B. subtilis* wird die *hmp*-Transkription durch das Zwei-Komponenten-System ResDE und den NO-sensitiven Repressor NsrR reguliert (MARINO et al., 2000; NAKANO, 2002; NAKANO et al., 2006). In *S. aureus* wird die Expression von *hmp* durch das ResDE-Ortholog SrrAB reguliert (RICHARDSON et al., 2006). Hmp scheint allerdings das Bakterium *S. aureus* nur unter microaerophilen Bedingungen gut gegen nitrosativen Stress schützen zu können (GONCALVES et al., 2006).

Durch Proteomstudien konnte festgestellt werden, dass unter aeroben Bedingungen nicht nur die Hmp-Expression in *B. subtilis* und *S. aureus* unter NO-Stress erhöht wird, sondern auch andere Schutzmechanismen vorhanden sind (HOCHGRÄFE et al., 2008). *B. subtilis* reagiert auf NO-Stress durch erhöhte Expression von Proteinen, die an der generellen Stressantwort beteiligt sind und zum SigB-Regulon gehören (HOCHGRÄFE et al., 2008). In *S. aureus* wird die Expression von Proteinen induziert, die für die anaerobe Atmung wichtig sind (HOCHGRÄFE et al., 2008). Besonders das Enzym Lactat-Dehydrogenase scheint dabei eine bedeutende Rolle zu spielen (RICHARDSON et al., 2008).

## **2.5 Kontroverse Diskussion im Hinblick auf den Gebrauch von Nitrit als Pökelsatz**

Trotz der Möglichkeit von Bakterien, sich gegen RNS zu schützen, konnte experimentell gezeigt werden, dass sich das Wachstum von Gram-positiven Lebensmittelpathogenen wie zum Beispiel *Clostridium perfringens* oder *L. monocytogenes* in einer mit Nitrit behandelten Rohwurst in den ersten Reifungstagen verhindern lässt (KABISCH et al., 2012). Dennoch ist der Einsatz von Nitrit bzw. Nitrat als Pökelsatz in der Literatur umstritten und wird auch außerhalb der Fachwelt diskutiert.

Viele Forscher sehen gesundheitliche Nachteile beim Gebrauch von Nitrit bzw. Nitrat, welches im Produkt zu Nitrit reduziert wird. Dabei wird vor allem die Entstehung von Methämoglobinämie (insbesondere bei Säuglingen) sowie Darm- und Magenkarzinomen durch den Verzehr von nitrit- bzw. nitrathaltigen Speisen angeführt (CHAO et al., 2005; JAKSZYN and GONZÁLEZ, 2006; LARSSON et al., 2006; MAJUMDAR, 2003). Unter Methämoglobinämie versteht man die erhöhte Konzentration von Methämoglobin (MetHb) im Blut (CAMP, 2007). MetHb ist im Gegensatz zu Hämoglobin (Hb) nicht in der Lage, Sauerstoff zu transportieren, wodurch die Sauerstoffversorgung im Körper vermindert wird.

MetHb entsteht durch die Oxidierung des Eisenzentrums von Hb durch zum Beispiel Nitrit- bzw. Nitrat-Derivate (CAMP, 2007; TITOV and PETRENKO, 2005), welche durch die Aufnahme von gepökelter Nahrung in den menschlichen Körper gelangen. Zur Risikogruppe der Methämoglobinämie gehören vor allem Säuglinge, da fetales Hb leichter oxidiert werden kann als adultes (WRIGHT et al., 1999). Zudem besitzen Kleinkinder eine NADH-abhängige MetHb-Reduktase mit geringerer Aktivität als Erwachsene, wodurch das gebildete MetHb weniger effizient zu Hb reduziert werden kann (HJELT et al., 1995).

Weitere postulierte Nitrat- bzw. Nitrit-induzierte menschliche Erkrankungen sind Magen- und Darmkarzinome (CHAO et al., 2005; JAKSZYN and GONZÁLEZ, 2006; LARSSON et al., 2006). Die Entstehung dieser Karzinome kann durch N-Nitrosamine hervorgerufen werden (CROSS and SINHA, 2004; PEGG and SHAHIDI, 2008). Die Bildung von N-Nitrosaminen erfolgt dabei entweder im Körper durch die Reaktion des durch die Nahrung aufgenommenen und im sauren Milieu des Magens angesäuerten Nitrits mit sekundären Aminen (VERMEER et al., 1998) oder außerhalb des Körpers durch die starke Erhitzung von gepökeltem Fleisch (DRABIK-MARKIEWICZ et al., 2009).

Im Gegensatz dazu konnten andere Forscher keinen Zusammenhang zwischen der Entstehung von Magen- bzw. Darmkrebs und dem Verzehr von nitrat- bzw. nitrithaltiger Nahrung feststellen (CROSS et al., 2011; DELLAVALLE et al., 2013).

Arbeiten der letzten Jahre belegen sogar, dass das Nitrit-Hauptderivat NO eines der wichtigsten Moleküle für zelluläre Signaltransduktionen darstellt (HILL et al., 2010). Somit wird aufgrund der profunden biologischen Aktivität von NO in der menschlichen Physiologie das durch gepökelte Ware aufgenommene Nitrit bzw. NO als nicht schädlich, sondern sogar als gesundheitsfördernd angesehen (ARCHER, 2002; HORD et al., 2009). Die momentane Höchstgrenze der zur Herstellung von Rohwürsten zugelassenen Menge an  $\text{NaNO}_2$  beläuft sich in der Europäischen Union auf 150 mg/kg Brät (European Directive 2006/52/EC, European Parliament, 2006).

### 3. Der Stickstoffmetabolismus in *L. monocytogenes*

Viele Gram-positiven Organismen wie zum Beispiel *B. subtilis* oder *S. aureus* sind in der Lage, Nitrat und Nitrit zu reduzieren. Im Zuge dieser Reduzierungsreaktionen entstehen NO-Moleküle als Nebenprodukte (LUNDBERG et al., 2004). Um sich vor toxischem NO zu schützen, besitzen diese Bakterien NO-detoxifizierende Systeme (RICHARDSON et al., 2006; ROGSTAM et al., 2007). Solche Systeme sind in *L. monocytogenes* bisher nicht bekannt. Auch ist *L. monocytogenes* nicht in der Lage, Nitrit bzw. Nitrat zu reduzieren, da dem Bakterium die

Gene für eine Nitrit- bzw. Nitratreduktase fehlen (GLASER et al., 2001). Somit ist *L. monocytogenes* auf reduzierte Stickstoffquellen wie zum Beispiel Ammonium oder Aminosäuren angewiesen. Es wird vermutet, dass *L. monocytogenes* unterschiedliche Stickstoffquellen verwendet, je nachdem, ob es sich innerhalb oder außerhalb seiner Wirtszelle befindet. Es konnte jedoch noch nicht festgestellt werden, welche Verbindung das Bakterium als Stickstoffquelle bevorzugt, wenn es sich in der menschlichen Wirtszelle befindet. Glutamin wird eine wichtige Rolle für die Virulenz und das Überleben von pathogenen Bakterien im Wirt zugesprochen (KLOSE and MEKALANOS, 1997). Allerdings wird postuliert, dass sich eine mögliche Verwendung von Glutamin als Stickstoffquelle durch *L. monocytogenes* negativ auf die Wirtszelle auswirken könnte, da der Wirt Glutamin zur Aufrechterhaltung seiner Zellfunktion benötigen würde (JOSEPH and GOEBEL, 2007). Als alternative intrazelluläre Stickstoffquelle könnte Ammonium fungieren, um die Funktionen der menschlichen Zelle aufrechtzuerhalten und einen optimalen Lebensraum für das Bakterium zu bieten. Ammonium könnte hierbei aus dem in der Wirtszelle befindlichen Arginin gewonnen werden (JOSEPH and GOEBEL, 2007). Dieses kann über den Arginin-ABC-Transporter ArpJ in die *L. monocytogenes* Zelle aufgenommen und anschließend über die listerielle Arginin-Deiminase zu Ammoniak und Citrullin verstoffwechselt werden (JOSEPH and GOEBEL, 2007; KLARSFELD et al., 1994). Citrullin könnte dann zu einem weiteren Ammoniakmolekül sowie CO<sub>2</sub> und ATP abgebaut werden. Als Katalysatoren dieser Reaktion würden die Enzyme Ornithin-Carbamoyltransferase (OCT) und Carbamoyl-Carboxykinase (CCK) dienen (JOSEPH and GOEBEL, 2007).

Eine bereits bekannte alternative Stickstoffquelle einiger pathogener Bakterien innerhalb des Wirts ist Ethanolamin (GARSIN, 2010). Ethanolamin könnte somit auch für *L. monocytogenes* als alternative Stickstoffquelle dienen (JOSEPH and GOEBEL, 2007). Ethanolamin entsteht durch den Abbau von Phosphatidylethanolamin (PEA) über die listerielle Phospholipase C (PlcB). Anschließend wird Ethanolamin durch die Vitamin B12-abhängige Ethanolamin-Ammoniak-Lyase zu Ammoniak und Acetaldehyd hydrolysiert.

Bis *dato* sind der Stickstoffmetabolismus und dessen Regulation in *L. monocytogenes* allerdings weitgehend unerforscht.

#### 4. Zielsetzung der Arbeit

Ein negativer Effekt des Pökelsatzes  $\text{NaNO}_2$  auf das Wachstum von *L. monocytogenes* während der Rohwurstherstellung konnte bereits nachgewiesen werden (KABISCH et al., 2012). Um den Einsatz von  $\text{NaNO}_2$  aus mikrobiologischer Sicht zu rechtfertigen, ist es Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von Nitrit auf das *L. monocytogenes* Wachstum *in vitro* näher zu untersuchen und mögliche Transkriptionsveränderungen in *L. monocytogenes* in Gegenwart von Nitrit zu identifizieren. Anschließend sollen die daraus gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf einen möglichen Nitrit-Stress in *L. monocytogenes* auf andere Gram-positive Organismen übertragen werden.

Es ist bereits bekannt, dass die Virulenz und die Motilität von *L. monocytogenes* unter anderem von der Außentemperatur reguliert werden (DONS et al., 1994; DONS et al., 1992; JOHANSSON et al., 2002; LEIMEISTER-WÄCHTER et al., 1992; MICHEL et al., 1998). Einige Forscher haben bereits Studien zu temperaturabhängigen Transkriptomanalysen in *L. monocytogenes* in komplexen Medien durchgeführt (GARMYN et al., 2012; TOLEDO-ARANA et al., 2009; WILLIAMS et al., 2005). Allerdings waren die Ergebnisse dieser Studien nicht kongruent, sondern unterschieden sich in einigen Genen. Zur weiteren Identifizierung temperaturabhängig transkribierter Gene in *L. monocytogenes* soll in dieser Arbeit das temperaturabhängige Transkriptom von *L. monocytogenes* in einem chemisch definierten Minimalmedium untersucht werden. Anhand der gewonnenen Daten sollen anschließend Rückschlüsse auf eine mögliche temperaturabhängige Anpassung des Metabolismus in *L. monocytogenes* gezogen werden.

### III. Material und Methoden

#### 1. Material

##### 1.1 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

**Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme**

Bakterienstamm	relevante Eigenschaften	Herkunft/Referenz
<i>L. monocytogenes</i> EGDe	Serovar 1/2a, EGD-Derivat	Stammsammlung ZIEL Weihenstephan (GLASER et al., 2001)
<i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta$ <i>pyrP</i>	In-frame Deletion des Gens <i>pyrP</i>	Diese Arbeit
<i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta$ <i>glnR</i>	In-frame Deletion des Gens <i>glnR</i>	Stammsammlung AG Dr. Müller-Herbst (AUER, 2012)
<i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta$ <i>glnR::glnR</i>	<i>In cis</i> Komplementation von <i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta$ <i>glnR</i> ; Reintegration von <i>glnR</i> in den deletierten <i>glnR</i> -Locus	Stammsammlung AG Dr. Müller-Herbst (OSPINA, 2012)
<i>L. monocytogenes</i> EGD Integrationsmutanten	Zufällige chromosomale Integration des Plasmids pLSV101, welches homologe <i>L. monocytogenes</i> EGD DNA-Regionen enthält	Prof. Dr. Thilo Fuchs (ZIEL, Weihenstephan) (JOSEPH et al., 2006; SCHAUER et al., 2010)
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> ( <i>rk<sup>-</sup> mk<sup>+</sup></i> ), <i>relA1</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )- <i>U169</i> , $\Phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> , <i>supE44</i> , $\lambda$ <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> (Nal <sup>R</sup> )	Stammsammlung ZIEL Weihenstephan (HANAHAN, 1983)
<i>B. cereus</i> F4810/72 (AH187)	Emetischer Referenzstamm; enthält das Plasmid pCER270 für die Produktion von Cereulid	Stammsammlung ZIEL Weihenstephan (TURNBULL et al., 1979)
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	Keine Biofilmbildung	Stammsammlung ZIEL Weihenstephan (ZHANG et al., 2003)

**Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide**

Plasmid	relevante Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pLSV101	Verkürzte Version von pLSV1 (WUENSCHER et al., 1991); Temperaturabhängiger Shuttle Vektor; Em <sup>R</sup>	(JOSEPH et al., 2006)
pLSV101- $\Delta$ <i>pyrP</i>	Plasmid für die <i>pyrP</i> -Deletion; Em <sup>R</sup>	Diese Arbeit

**Tab. 3: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.** Die Oligonukleotide wurden kommerziell erworben (Invitrogen oder Eurofins MWG Operon), mit dH<sub>2</sub>O bzw. DEPC-dH<sub>2</sub>O (qRT-PCR) auf eine Stockkonzentration von 100 pmol/ $\mu$ l eingestellt und bei -20 °C gelagert. Eingeführte Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt.

Oligonukleotid	Sequenz 5' $\rightarrow$ 3'
	Konstruktion von <i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta$ <i>pyrP</i>
pyrP_A	AGT GCA AAG GGG CTA CGC TTG
pyrP_B	TGG TTT <u>AGA TCT</u> TGT TTC TGT CGT TTC TGT CAT

pyrP_C	GTT GGG <u>AGA TCT</u> TTA AAC TTA GTA TTA CCA GCC
pyrP_D	TCC ATT TTT TAA TAC GTA CAT
pyrP_nestAB	CAC AAA <u>GGA TCC</u> GCT TGT CGG TAT TAA GAC GCG
pyrP_nestCD	GAG AAA <u>GAA TTC</u> GCG CCA AGT CTT TTT AAC ACT
qRT-PCR ( <i>L. monocytogenes</i> )	
rpoB_qRT_F	ACA CGT ATC TGC GAA AGA CT
rpoB_qRT_R	TTA CTT CTT TGC CAT CCA CT
16S_qRT_F	AGA CAC GGC CCA GAC TCC T
16S_qRT_R	GAT CCG AAA ACC TTC TTC ATA CA
agrC_qRT_F	TCC ATG TGA TAT CGC ACT AC
agrC_qRT_R	AAA TAT CCA CTG CAT CAA GG
lmo0133_qRT_F	GCA TTC GGG TAA TTG TGT AA
lmo0133_qRT_R	CTT GGG CAA GTA TGA ATC AC
inlB_qRT_F	AAA CAC TGA TGG GTC GTT AG
inlB_qRT_R	GCT TTT CCA ATA GTG ACT GG
gdh_qRT_F	TCC ATG TGA TAT CGC ACT AC
gdh_qRT_R	AAA TAT CCA CTG CAT CAA GG
lmo0641_qRT_F	GGA ACT TTG ACA AAT GGA AC
lmo0641_qRT_R	TCC GGT TCT AAG TCT TGT GT
lmo0995_qRT_F	CCG TTT TTC TTA GTT GGC TA
lmo0995_qRT_R	TTT GCA TAA GGC TTA GAA CC
glnR_qRT_F	CGC TAC TAT GAA GAC CAA GG
glnR_qRT_R	TTT TCT TAA TTC CCG CAA TA
glnA_qRT_F	ATC CTG ACA TGA CTC CAT TC
glnA_qRT_R	ATA GGA AGA ACT CTG GCT CA
lmo1425_qRT_F	ATG GAA GTT ATG TCA TGG AA
lmo1425_qRT_R	GGA TGA TAT TAG CGA TTT GG
amtB_qRT_F	GCA ACT GGA CTT TTT GCT AC
amtB_qRT_R	TAC ATA TGC CAC TGT TGA GC
purH_qRT_F	AAG AAC ACG GTG CAA CTA CT
purH_qRT_R	GTT TCT CCA GTG ATG TTC GT
pyrAB_qRT_F	TGG AAA ATA TTG ACC CAG TC
pyrAB_qRT_R	CCA CCT TCA ATT TCT AGT GC
lmo2183_qRT_F	GCG CTT GTT TCT AGT CAA TC
lmo2183_qRT_R	ACC TAA CAC ATT GCA CCA TT
qRT-PCR ( <i>B. cereus</i> )	
rpoB_qRT_F	ATT CCG TAT CGG TCT TTC TC
rpoB_qRT_R	AGA TGC AAT AAC AGG ACG AA
pyrAB_qRT_F	TCG AGC CAG CAT TAG ACT AT
pyrAB_qRT_R	CAT AAC CTC ACC AGT TGC TT
hmp_qRT_F	GTA TGG TGT CAT TGC TGA TG
hmp_qRT_R	AAT AAC ATC GCT TTC CTT CA
qRT-PCR ( <i>S. epidermidis</i> )	
rpoB_qRT_F	ATG GGA CGG TTA CAA CTA TG
rpoB_qRT_R	TGC ACT TTC AGA TAC GTT TG
hmp_qRT_F	GTT TAT TGG TTC TGG CGT AG
hmp_qRT_R	ATG GTC GTT CAT CTT CTG TC
pyrAB_qRT_F	GGC TAT CCA GTT GTA GTT CG
pyrAB_qRT_R	TAG CGG TCT ACC AAT ACA GG
pLSV101-spezifische Oligonukleotide	
LSV3	AGT ACC ATT ACT TAT GAG
LSV_4380rev	AGG GTT TTC CCA GTC ACG

## 1.2 Medien und Medienzusätze

<u>Luria Bertani (LB) Medium:</u>	10 g/l Trypton (Oxoid Thermo Scientific) 5 g/l Hefeextrakt (Oxoid Thermo Scientific) 5 g/l NaCl (Roth)
<u>Brain Heart Infusion (BHI)-Medium:</u>	37 g/l BHI (Merck Millipore)
<u>BHI-Medium (pH 7):</u>	37 g/l BHI (Merck Millipore) 5,5 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O (Roth) 7,12 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (Fluka Sigma-Aldrich®) mit 1 M HCl (Merck Millipore) auf pH 7 eingestellt
<u>SOC-Medium:</u>	20 g/l Pepton (Oxoid Thermo Scientific) 5 g/l Hefeextrakt (Oxoid Thermo Scientific) 3,9 g/l D(+)-Glukose-Monohydrat (Fluka Sigma-Aldrich®) 0,6 g/l NaCl (Roth) 0,1 g/l KCl (Roth) 1,25 g/l MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (Merck Millipore) 1,05 g/l MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O (Roth)

Die jeweiligen Komponenten wurden in dH<sub>2</sub>O gelöst und für 17 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Für die Herstellung von Agarplatten wurde den Medien jeweils 15 g/l Agar (GibcoBRL) vor dem Autoklavieren zugegeben. Falls gewünscht wurde der autoklavierte Agar nach Abkühlen unter 50 °C mit Antibiotika versetzt. Zu Flüssigmedien wurden die Antibiotika direkt vor Beimpfung zugegeben.

Die Flüssigmedien wurden bei Raumtemperatur (RT) und die Agarplatten bei 4 °C aufbewahrt.

<u>Minimalmedium</u> modifiziert nach (PREMARATNE et al., 1991)	16,4 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O (Fluka) 6,56 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Roth) 0,6 g/l L-Glutamin (Roth) <sup>*)</sup> 0,41 g/l MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O (Merck Millipore) 0,1 g/l L-Leucin (Serva Electrophoresis) 0,1 g/l L-Isoleucin (Merck Millipore) 0,1 g/l L-Valin (Merck Millipore) 0,1 g/l L-Methionin (Sigma-Aldrich®) 0,1 g/l L-Arginin (Sigma-Aldrich®) 0,1 g/l L-Histidin (Roth) 0,1 g/l L-Cystein (Merck Millipore) 100 mg/l Eisen(III)-Citrat (Merck Millipore) 1 mg/l Thiamin (Fluka) 0,5 mg/l Riboflavin (Sigma-Aldrich®) 0,5 mg/l Biotin (Sigma-Aldrich®) 0,0015 mg/l DL-6,8-Thioctsäure (Sigma-Aldrich®)
<sup>*)</sup> Bei Versuchen mit Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl) als einziger Stickstoffquelle wurde kein Glutamin zugegeben.	

Nach Zusammenfügen der oben aufgezählten Komponenten wurde das Medium mit dH<sub>2</sub>O auf 950 ml aufgefüllt und mit Hilfe eines Sterilfilters (MILLEX® GP (Merck Millipore), Ø 0,22 µm) steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C für maximal vier Wochen. Glukose als Kohlenstoffquelle wurde erst unmittelbar vor Beimpfung des jeweiligen Mediums zugegeben. Dafür wurden bei Versuchen mit Glutamin als einziger Stickstoffquelle zu 26,5 ml glutaminhaltigem Minimalmedium 1,5 ml einer steril filtrierten 20 % Glukose-Lösung gegeben. Das Endvolumen des Mediums vor Zugabe der Bakterienkulturen betrug somit 28 ml. Bei Versuchen mit Ammonium als einziger Stickstoffquelle wurden zu den 28 ml Medium (26,5 ml glutaminfreies Medium + 1,5 ml Glukose) 23,3 µl einer 250 mg/ml steril filtrierten NH<sub>4</sub>Cl-Lösung pipettiert.

**Tab. 4: In dieser Arbeit verwendete Medienzusätze**

Zusätze	Lösungsmittel	Stock	Endkonzentration
Erythromycin (Sigma-Aldrich®)	100 % EtOH	100 mg/l ( <i>E. coli</i> ) 10 mg/l ( <i>L. monocytogenes</i> )	100 µg/l ( <i>E. coli</i> ) 10 µg/l ( <i>L. monocytogenes</i> )
NaNO <sub>3</sub> (Roth)	dH <sub>2</sub> O	50 mg/ml	200 mg/l oder 246 mg/l
NaNO <sub>2</sub> (Sigma-Aldrich®)	dH <sub>2</sub> O	50 mg/ml	200 mg/l oder 1000 mg/l
SNP (Calbiochem Merk Millipore)	dH <sub>2</sub> O	10 mM	20 µM, 25 µM oder 100 µM

## 2. Methoden

### 2.1 Kultivierung der verwendeten Bakterien

Im Allgemeinen wurden *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* und *Staphylococcus epidermidis* Zellen in BHI-Medium und *E. coli* Zellen in LB-Medium angezogen. Bei Bedarf wurden die entsprechenden Antibiotika hinzugefügt. Für eine Übernachtskultur (ÜNK) wurden die Medien mit jeweils einer Kolonie beimpft und dann bei 37 °C unter kontinuierlichem Schütteln (150 rpm) aerob inkubiert. Eine Ausnahme bildeten hierbei die *L. monocytogenes* Zellen, welche den temperatursensitiven Shuttle Vektor pLSV101 enthielten oder diesen chromosomal integriert hatten. Diese wurden bei 30 °C (bei extrachromosomalem pLSV101) bzw. 42 °C (bei chromosomaler Integration von pLSV101) angezogen.

Die Inkubation der Bakterien auf festen Nährböden erfolgte auf den entsprechenden Agarplatten. Dafür wurden die Bakterien ausgestrichen und bei der gewünschten Temperatur ein bis zwei Tage (Platten mit Erythromycin) inkubiert.

Für die langfristige Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden ÜNK mit Glycerin (20 %) versetzt und bei -80 °C gelagert.

## 2.2 Wachstumsanalysen

### Wachstumsanalysen im BHI-Medium

Zunächst wurde eine Bakterienkolonie in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt, welcher 50 ml BHI-Medium enthielt. Der Kolben wurde bei 37 °C über Nacht aerob inkubiert. Am nächsten Tag wurden 50 ml BHI (pH 7), welches sich ebenfalls in 250 ml Erlenmeyerkolben befand und bei Bedarf entsprechende Zusätze enthielt, mit 500 µl dieser ÜNK beimpft und bei 24 °C geschüttelt. Anschließend wurden stündlich 1 ml Aliquots der Kulturen entnommen (ab  $OD_{600} = 1,00$  100 µl, welche anschließend in der Küvette mit 900 µl Medium verdünnt wurden), um die optische Dichte der Bakteriensuspensionen bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) im Spectrophotometer (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech) zu bestimmen. Für die Auswertung der Kurven wurden die  $OD_{600}$ -Werte gegen die Inkubationszeit aufgetragen.

### Wachstumsanalysen im Minimalmedium

Für die Generierung von Wachstumskurven im Minimalmedium wurden 30 ml einer in BHI angezogenen ÜNK in Minimalmedium gewaschen, wobei das Minimalmedium auf 37 °C vorgewärmt war und keinerlei Kohlenstoff- und Stickstoffquellen enthielt. Hierfür wurden die Zellen zunächst geerntet (4000 g, 8 min, RT), in 1 ml Minimalmedium resuspendiert, auf 10 ml aufgefüllt und erneut abzentrifugiert (4000 g, 8 min, RT). Das dabei entstandene Pellet wurde wiederum in 1 ml Minimalmedium resuspendiert und auf 20 ml aufgefüllt. Mit 2,5 ml der gewaschenen Zellen wurden die jeweiligen 250 ml Erlenmeyerkolben beimpft, welche das bereits mit Glukose und gewünschter Stickstoffquelle (Glutamin oder  $NH_4Cl$ ) versetzte Minimalmedium enthielten. Das Endvolumen der Kolben betrug 30,5 ml (28 ml Medium + 2,5 ml Bakteriensuspension). Anschließend wurden die Kolben bei 37 °C bzw. 24 °C aerob geschüttelt. Die Messung des ersten  $OD_{600}$ -Wertes erfolgte bei 37 °C nach vier und bei 24 °C nach sechs Stunden. Weitere Messpunkte wurden in Abständen von zwei Stunden genommen.

### Wachstumsanalysen mit Hilfe des Bioscreen C Readers

Die Wachstumsanalysen der *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank im kleinen Volumen wurden mit Hilfe des Bioscreen C Readers (Oy Growth curves Ab Ltd, Helsinki)

durchgeführt. Dafür wurden ÜNKn des Wildtyps und der Mutante 1:100 und 1:500 in einem Endvolumen von 200 µl eines gepufferten BHI-Mediums (pH 7) verdünnt. Das BHI-Medium enthielt entweder 10 µg/ml Erythromycin (Insertionsmutanten) oder die entsprechende Menge an Ethanol (Wildtyp) und war mit oder ohne 200 mg/l NaNO<sub>2</sub> versetzt. Die Inkubation erfolgte unter kontinuierlichem Schütteln (*shaking step* 60) bei 41 °C. Anschließend wurde die OD<sub>600</sub> der Zellen alle 30 Minuten über einen Zeitraum von 24 Stunden automatisch vermessen. Die Wachstumskurven wurden mit Hilfe einer Microsoft Excel basierten Software (Transcaltactic Ltd, Helsinki) protokolliert.

## 2.3 DNA-Methoden

### 2.3.1 Isolierung bakterieller DNA

#### Isolierung chromosomaler DNA aus *L. monocytogenes*

<u>AKI-Lösung:</u>	6,7 % (w/v) Saccharose (Roth)
	50 mM Tris-HCl (pH 8) (Roth)
	1 mM Na <sub>2</sub> -EDTA (Roth)

3 ml einer *L. monocytogenes* EGDe ÜNK wurden abzentrifugiert (16000 g, 2 min, RT) und in 500 µl AKI-Lösung zusammen mit 10 mg/ml Lysozym (Sigma-Aldrich®) sowie 100 µg/ml RNase A (Sigma-Aldrich®) resuspendiert. Anschließend wurde die Probe bei 37 °C für 90 Minuten inkubiert. Während dieses Schrittes wurde die Suspension gelegentlich invertiert, um möglichst viele Zellen zu zerstören und eine optimale DNA-Ausbeute zu erlangen. Durch die anschließende Zugabe von 12,5 µl einer 20 mg/ml Proteinase K-Lösung (AppliChem), kurzes Mischen und Inkubation bei 50 °C für 20 Minuten wurden die nun freiliegenden Proteine inaktiviert und abgebaut. Dieser Vorgang wurde durch die Zugabe von 100 µl 10 % SDS (Roth) und einer weiteren Inkubation bei 70 °C für 10 Minuten unterstützt. Nach Abkühlung des Gemisches wurden 200 µl einer neutralen Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkoholmischung (Roth) zugegeben und die Phenol-Chloroform-Extraktion durch Zentrifugation (16000 g, 20 min, RT) herbeigeführt. Die obere wässrige Phase, welche die chromosomale DNA enthielt, wurde in ein neues Mikrozentrifugenröhrchen überführt und der Phenol-Chloroform-Schritt wiederholt. Die daraus resultierende obere Phase wurde sowohl mit 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 8; Roth) als auch mit 1 Volumen einer Isopropanol-Lösung (Roth) vermischt und bei 16000 g für 30 Minuten bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal

mit 500 µl 70 % EtOH (J. T. Baker) gewaschen, luftgetrocknet und zuletzt in 100 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen wurden 9 ml (QiAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit, Qiagen) bzw. 100 ml (PureLink<sup>™</sup> HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit, Invitrogen) einer ÜNK verwendet. Die Durchführung der Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben. Eluiert wurden die aufgereinigten Plasmide in 50 µl (Miniprep) bzw. 100 µl (Midiprep) dH<sub>2</sub>O. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des ND-1000 Spectrometers (NanoDrop<sup>®</sup>). Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

**2.3.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

DNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Der Ansatz einer Standard-PCR-Reaktion setzte sich folgendermaßen zusammen:

1 µl	Template DNA
2 µl	10 pmol/µl <i>forward</i> Primer
2 µl	10 pmol/µl <i>reverse</i> Primer
1 µl	5 mM dNTP-Mix (Fermentas)
5 µl	10 x <i>Pfu</i> -Puffer (+ MgSO <sub>4</sub> ) (Fermentas)
0,5 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase (Fermentas)
38,5 µl	dH <sub>2</sub> O
<hr/>	
Σ 50 µl	

Für die Durchführung einer Kolonie-PCR oder um auf Anwesenheit von genomischer DNA (bei der Isolierung von RNA) zu testen, wurde auf die *Taq*- anstelle der *Pfu*-Polymerase zurückgegriffen und das Endvolumen des Ansatzes auf 25 µl reduziert. Die Ansätze wurden folgendermaßen pipettiert:

1 µl	Zellsuspension* bzw. aufgereinigte RNA-Probe
1 µl	10 pmol/µl <i>forward</i> Primer
1 µl	10 pmol/µl <i>reverse</i> Primer
0,5 µl	5 mM dNTP-Mix (Fermentas)
2,5 µl	10 x <i>Taq</i> -Puffer (Fermentas)
2,5 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)
0,1 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (AG Dr. Müller-Herbst; aus <i>E. coli</i> isoliert)
16,4 µl	dH <sub>2</sub> O
<hr/>	
Σ 25 µl	*Eine Kolonie in 100 µl dH <sub>2</sub> O resuspendiert.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermo Cycler (Primus 96 advanced, Primus 25 advanced (PeqLab); MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad)) mit dem entsprechenden Programm durchgeführt. Hierbei wurde die Elongationszeit auf die jeweilige Amplikongröße angepasst.

Initiale Denaturierung	95 °C	3 min bzw. 10 min (Kolonie-PCR)	
Denaturierung	95 °C	3 min	} 30 Zyklen
Annealing	50 °C	30 s	
Elongation	72 °C	2 min/kb ( <i>Pfu</i> ) bzw. 1 min/kb ( <i>Taq</i> )	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Abkühlen	15 °C	∞	

### 2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

10 x TAE-Puffer (pH 8,3): 2 M Tris Base (Roth)  
5,71 % (v/v) Eisessig (Sigma-Aldrich®)  
50 mM Na<sub>2</sub>-EDTA (pH 8) (Roth)

Agarosegele: 1-2 % (w/v) Agarose (Biozym, Bioline) in  
1 x TAE-Puffer aufgekocht

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde benutzt, um die Länge von DNA-Fragmenten zu bestimmen. Je nach Fragmentgröße wurden 1 bis 2 %ige Agarosegele eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 6 x DNA-Auftragepuffer (Fermentas) vermischt und in die entsprechenden Geltaschen gefüllt. Für die Größenbestimmung der DNA-Banden wurden je nach erwarteter Länge der GeneRuler 1 kb oder der GeneRuler 100 bp (Fermentas) als DNA-Marker zusätzlich zu den Proben verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung fand bei 100 V für circa 45 Minuten in einer Elektrophoresekammer (peqLab) statt, welche mit 1 x TAE Puffer gefüllt war. Anschließend wurden die Gele in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Roth) bzw. GelRed™ (5 µl in 100 ml 0,1 M NaCl-Lösung; Biotium Inc.) für 30 Minuten gefärbt. Die Detektion der Banden erfolgte mit Hilfe einer UV-Lichtkamera (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) (Wellenlänge = 254 nm).

### 2.3.4 Aufreinigung bakterieller DNA

Des Weiteren wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt, um zum Beispiel geschnittene DNA- oder PCR-Produkte zu reinigen, die Nebenprodukte enthielten. Hierfür wurde ein Agarosegel mit den entsprechenden Proben präpariert und unter den bereits in Kap. III.2.3.3 beschriebenen Bedingungen laufen gelassen. Die Detektion der Banden erfolgte unter Bestrahlung des Gels im UV-Licht mit einer Wellenlänge von 360 nm. Die gewünschten Gelstücke wurden mittels eines sauberen Skalpells ausgeschnitten, die DNA mit Hilfe des E.Z.N.A. Gel Extraction Kits (Omega Bio-Tek) nach Angaben des Herstellers isoliert und in dH<sub>2</sub>O eluiert.

Zum Umpuffern von Restriktions- oder Ligationsansätzen als auch zur Aufreinigung von PCR-Produkten ohne Nebenprodukte wurde das E.Z.N.A. Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek) verwendet und die Proben in dH<sub>2</sub>O eluiert.

Die aufgereinigten DNA-Fragmente wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.3.5 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsspaltung von DNA wurde mit Hilfe des entsprechenden Enzyms und Puffers (Fermentas) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden 20 bis 30 µg Vektor DNA bzw. die gesamte Menge eines PCR-Produkts für die Reaktion eingesetzt. Bei einem Doppelverdau wurde die Restriktion nacheinander durchgeführt. Die Puffersysteme wurden hierbei durch Verwendung des E.Z.N.A. Cycle Pure Kits (Omega Bio-Tek; Kap. III.2.3.4) gewechselt. Ein typischer Restriktionsansatz ist im Folgenden dargestellt:

86 µl	PCR-Produkt (in dH <sub>2</sub> O eluiert)
10 µl	10 x Puffer (Fermentas)
4 µl	Restriktionsenzym (Fermentas)
<hr/>	
Σ 100 µl	

#### Dephosphorylierung

Mit Restriktionsenzymen geschnittene Vektoren wurden nach dem Verdau mit Hilfe der Shrimp Alkalischen Phosphatase (SAP) dephosphoryliert, um eine mögliche Religation, vor allem bei Verwendung nur eines Restriktionsenzym, zu vermeiden. Die Proben setzten sich aus

88 µl	geschnittenem Vektor
10 µl	10 x SAP-Puffer (Fermentas)
2 µl	SAP (Fermentas)
<hr/>	
Σ 100 µl	

zusammen. Die Ansätze wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und mit Hilfe des E.Z.N.A. Cycle Pure Kits (Omega Bio-Tek; Kap. III.2.3.4) gereinigt.

### 2.3.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Verdaute DNA-Fragmente wurden unter Verwendung der T4-DNA-Ligase nach Herstellerangaben miteinander ligiert. Dafür wurden zunächst die Konzentrationen der zu ligierenden Fragmente im ND-1000 Spectrometer (NanoDrop®) bestimmt. Vektor- zu Insert-DNA wurde in einem molaren Verhältnis von 1:3 und Fragmente mit gleicher Länge in einem molaren Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Es wurden

1 µl bzw. 2 µl	Vektor bzw. linearisierte DNA
3 µl bzw. 2 µl	Insert bzw. linearisierte DNA
1 µl	10 x Ligase-Puffer (Fermentas)
1 µl	5 U/µl T4-DNA-Ligase (Fermentas)
4 µl	dH <sub>2</sub> O
<hr/>	
Σ 10 µl	

vermischt und über Nacht bei 15 °C inkubiert.

## 2.4 Transformation und genetische Veränderungen von Bakterien

### 2.4.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

#### Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Präparation von CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer *E. coli* ÜNK beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von circa 0,30 bis 0,60 angezogen. Nach Erreichen dieser OD<sub>600</sub> wurden die Zellen abgeerntet (1860 g, 10 min, 4 °C) und in 20 ml einer gekühlten 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert und anschließend erneut pelletiert (1860 g, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 10 ml einer gekühlten 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen, welche 20 % Glycerin als Frostschutzmittel enthielt. 100 bis 300 µl Aliquots wurden unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Herstellung elektrokompetenter *L. monocytogenes* Zellen

<u>SMHEM-Medium:</u>	16,3 g Saccharose (Roth)
	0,036 g MgCl x 6 H <sub>2</sub> O (Roth)
	0,085 g HEPES (Roth)
	Auf 50 ml mit dH <sub>2</sub> O aufgefüllt und steril filtriert
	Lagerung bei -4 °C

100 ml BHI-Medium, welches 0,2 g Glyzin (Merck Millipore) enthielt, wurde mit 1 ml einer *L. monocytogenes* ÜNK beimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,50 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur mit 5 µg/ml Penicillin G (Biochrom AG) behandelt und bei 37 °C weiter inkubiert. Als eine OD<sub>600</sub> von 0,65 erreicht war, wurden die Zellen auf zwei 50 ml Falcons aufgeteilt, abzentrifugiert (1200 g, 10 min, 4 °C), in jeweils 5 ml gekühltem SMHEM-Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert (1200 g, 10 min, 4 °C). Die gewaschenen Zellen wurden anschließend in jeweils 500 µl gekühltem SMHEM-Medium aufgenommen. 100 µl Aliquots dieser Zellsuspension wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

**2.4.2 Transformation kompetenter Bakterienzellen**Transformation von CaCl<sub>2</sub>-kompetenten *E. coli* Zellen

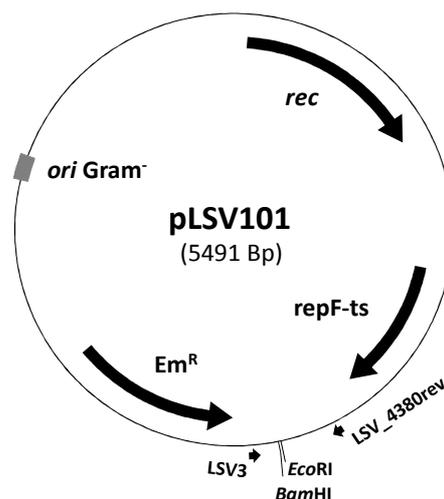
CaCl<sub>2</sub>-kompetente *E. coli* Zellen (Kap. III.2.4.1) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Das Zell-DNA-Gemisch wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock ausgesetzt, bei welchem die Zellen für 90 Sekunden auf 42 °C (Thermoblock, Biometra) und anschließend sofort für weitere zwei Minuten auf Eis gegeben wurden. Danach wurde zu der Suspension 1 ml SOC-Medium pipettiert und dieses bei 37 °C für sechs Stunden unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. 100 µl der Kultur wurden auf einer Platte ausgestrichen, welche das entsprechende Antibiotikum enthielt. Der Rest der Kultur wurde abzentrifugiert (2300 g, 3 min, RT), der Überstand verworfen, das Pellet im Rücklauf resuspendiert und auf eine weitere Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C für 24 bis 48 Stunden inkubiert.

### Transformation von elektrokompetenten *L. monocytogenes* Zellen

Zu 100  $\mu$ l auf Eis aufgetauten elektrokompetenten *L. monocytogenes* Zellen (Kap. III.2.4.1) wurden 1 bis 4  $\mu$ g Plasmid-DNA gegeben. Die Zellen wurden für eine Minute auf Eis gehalten, anschließend einem elektrischen Puls (12,5 kV/cm, 25  $\mu$ F, 200  $\Omega$ ) im GenePulser® Electroporation System (BioRad) ausgesetzt und sofort mit 1 ml BHI-Medium versetzt. Die Kultur wurde bei 30 °C für sechs Stunden unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu$ l der Suspension auf eine BHI-Platte aufgetragen, welche 10  $\mu$ g/ml Erythromycin enthielt. Der Rest der Zellen wurde abzentrifugiert (2300 g, 3 min, RT), der Überstand verworfen, das Pellet im Rücklauf resuspendiert und auf eine weitere Platte ausplattiert, welche ebenfalls mit 10  $\mu$ g/ml Erythromycin versetzt war. Die Inkubation erfolgte zwei Tage bei 30 °C.

#### 2.4.3 Herstellung von *L. monocytogenes* Deletionsmutanten

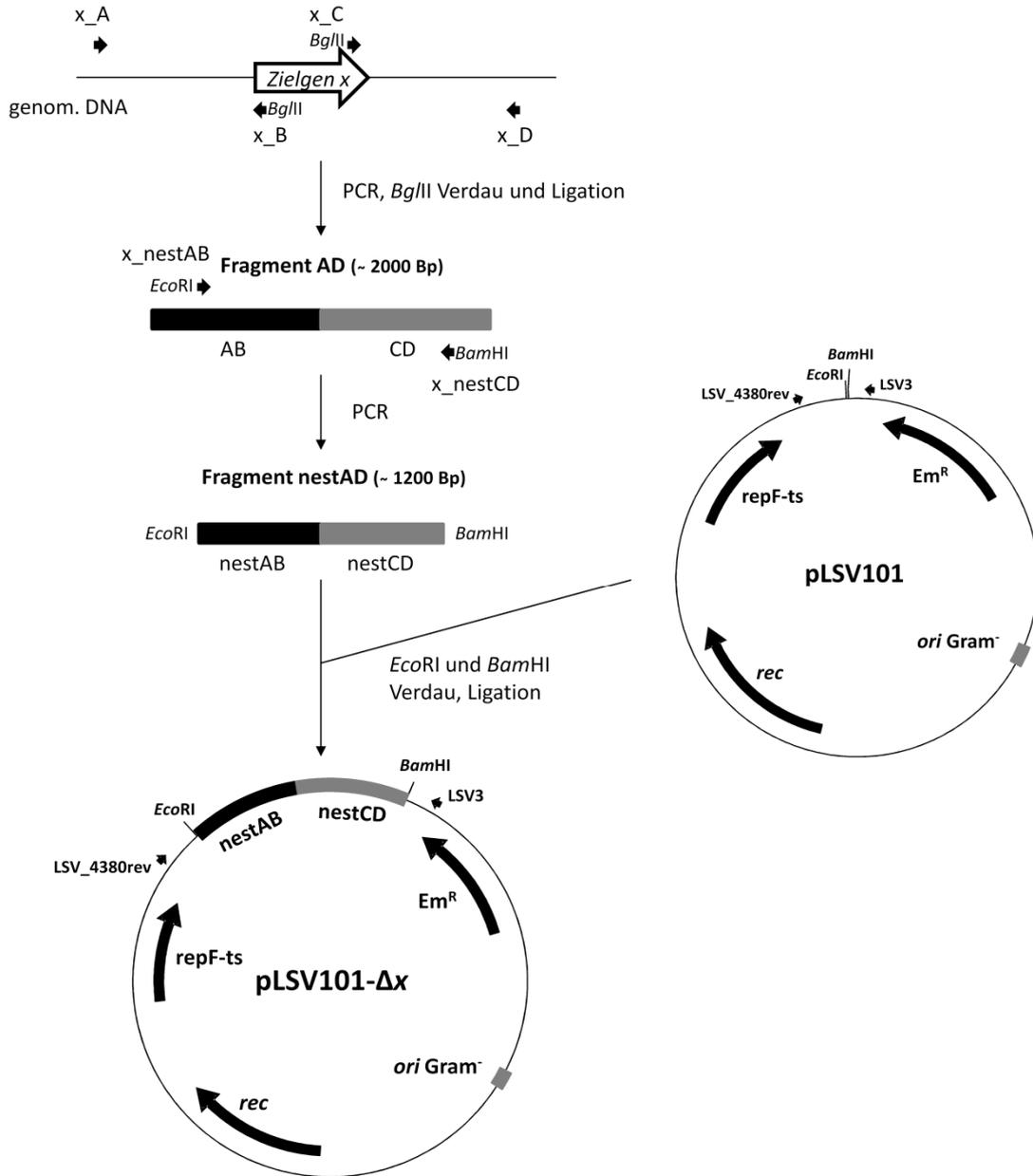
Die *L. monocytogenes* in-frame Deletionsmutanten wurden mit Hilfe des Prinzips der homologen Rekombination konstruiert. Hierbei wurde der Vektor pLSV101 (Abb. 3) (JOSEPH et al., 2006) verwendet, welcher einen temperatursensitiven *Origin of Replication (ori)* für Gram-positive Bakterien besitzt. Aufgrund dieser Eigenschaft ist eine Replikation des Vektors bei höheren Temperaturen als 37 °C nicht mehr möglich.

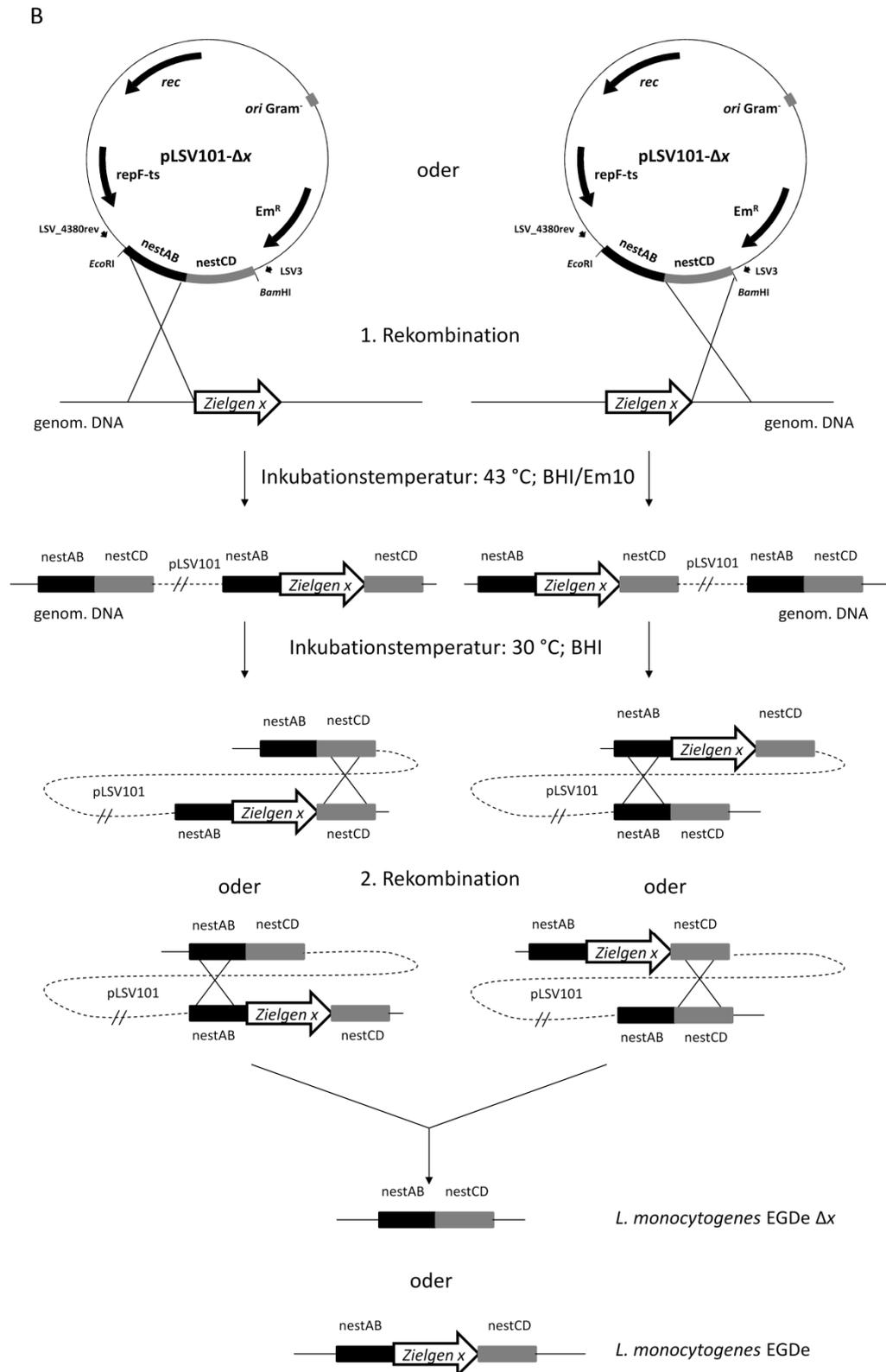


**Abb. 3: Plasmidkarte von pLSV101.** Das Plasmid pLSV101 ist ein pLSV1-Derivat (WUENSCHER et al., 1991) und besitzt neben einer Erythromycin-Resistenz einen Replikationsursprung sowohl für Gram-negative (*ori Gram*;) als auch für Gram-positive Bakterien (*repF-ts*). Letzterer ist temperatursensitiv, was zur Folge hat, dass pLSV101 in Gram-positiven Bakterien bei Temperaturen ab 37 °C nicht selbstständig replizieren kann.

Der Ablauf der Herstellung einer Deletionsmutante ist in Abb. 4 schematisch dargestellt.

A





**Abb. 4: Schematische Darstellung der Herstellung einer *L. monocytogenes* in-frame Deletionsmutante.** (A) Konstruktion des Deletionsplasmids pLSV101-Δx ( $x$  = zu deletierendes Gen) in *E. coli* DH5α. Als Template für die Generierung der beiden Fragmente AB und CD diente die listerielle chromosomale DNA. Nach Amplifizierung der Fragmente mit Hilfe der Oligonukleotidpaare  $x_A$  und  $x_B$  bzw.  $x_C$  und  $x_D$  wurden die Fragmente *Bgl*II verdaut und ligiert. Das daraus resultierende Fragment nestAD wurde unter Verwendung der Oligonukleotide  $x_{nestAB}$  und  $x_{nestCD}$  aufamplifiziert und über *Eco*RI und *Bam*HI in den Vektor pLSV101 kloniert. (B) Herstellung der *L. monocytogenes* EGDe Deletionsmutante. Das Plasmid pLSV101-Δx wurde in *L. mono-*

*cytogenes* EGDe elektroporiert. Die homologe Rekombination über die Fragmente nestAB oder nestCD in Verbindung mit der erhöhten Inkubationstemperatur von 43 °C führte zu einer Integration des Plasmids in das listerielle Chromosom. Nachfolgende Subkultivierungsschritte bei 30 °C in Abwesenheit des Antibiotikums erlaubten eine Reexcision und den anschließenden Verlust des Plasmids und führten zur Generierung von *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta x$  oder *L. monocytogenes* EGDe.

Zunächst wurden die beiden Fragmente AB und CD, welche sich ungefähr 1000 Basenpaare (Bp) *down-* und *upstream* der zu deletierenden Gensequenz befinden, mittels PCR unter Verwendung der *L. monocytogenes* Oligonukleotidpaare  $x\_A$  ( $x$  = das zu deletierende Gen) und  $x\_B$  bzw.  $x\_C$  und  $x\_D$  generiert. Als Template diente hierbei chromosomale DNA von *L. monocytogenes* EGDe. Über die eingebrachten *Bgl*II-Schnittstellen wurden diese beiden Fragmente miteinander ligiert. Eine PCR mit den Oligonukleotiden  $x\_nestAB$  und  $x\_nestCD$  lieferte das Produkt nestAD, welches über die beiden Restriktionsenzyme *Eco*RI und *Bam*HI in den Vektor pLSV101 kloniert wurde. Das daraus resultierende Deletionsplasmid pLSV101- $\Delta x$  wurde in *E. coli* repliziert, aufgereinigt und durch die Firma GATC sequenziert. Anschließend wurden *L. monocytogenes* EGDe Zellen mit dem sequenzierten Plasmid elektroporiert und auf BHI-Agarplatten, die 10  $\mu$ g/ml Erythromycin enthielten (Em10-Platten), bei 30 °C für zwei Tage inkubiert. Erythromycin-resistente Zellen, die das Plasmid pLSV101- $\Delta x$  enthielten, wurden mittels PCR unter Verwendung der beiden plasmidspezifischen Oligonukleotiden LSV3 und LSV\_4380rev identifiziert. In einem nächsten Schritt wurde von einer Einzelkolonie einer positiven Transformante eine ÜNK bei 30 °C angefertigt und aus dieser am nächsten Tag 100  $\mu$ l einer  $10^{-2}$  und  $10^{-5}$  Verdünnung auf Em10-Platten ausplattiert. Die Inkubation dieser Platten erfolgte bei 42 °C für 24 bis 48 Stunden. Zellen, die bei dieser hohen Temperatur auf Erythromycin wachsen konnten, mussten das Plasmid in das Chromosom integriert haben, da dieses sich aufgrund seines temperatursensitiven *ori* nicht mehr selbstständig replizieren konnte. Die chromosomale Integration von pLSV101- $\Delta x$  wurde mittels PCR unter Verwendung der beiden Oligonukleotidpaare LSV3 und  $x\_D$  bzw. LSV\_4380rev und  $x\_A$  nachgewiesen. Positive Klone wurden in BHI subkultiviert, indem zunächst eine Einzelkolonie in 3 ml BHI für 24 Stunden bei 30 °C inkubiert wurde. Anschließend wurden jeweils 30  $\mu$ l der vorangegangenen Subkultivierung nach 24 Stunden Inkubation bei 30 °C in weitere 3 ml BHI-Medium pipettiert. Nach jedem Subkultivierungsschritt wurden 100  $\mu$ l einer  $10^{-6}$  und  $10^{-7}$  Verdünnung der Kulturen auf Platten ohne Antibiotikum ausplattiert und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die gewachsenen Zellen wurden mit Hilfe eines Replikatorstempels auf Platten mit und ohne Antibiotikum übertragen, um eventuelle Erythromycin-sensitive Zellen zu identifizieren. Die Platten mit Erythromycin wurden zwei Tage, die Platten ohne Antibiotikum einen Tag bei 30 °C bebrütet. Zellen, die auf Em10-Platten nicht mehr

wachsen konnten, mussten das Plasmid pLSV101- $\Delta x$  durch homologe Rekombination aus dem Chromosom entfernt und durch den fehlenden Selektionsdruck verloren haben. Dies hatte entweder eine Deletion des Zielgens oder eine Herstellung des Wildtyps zur Folge, was mittels PCR und mit Hilfe der Oligonukleotide x\_A und x\_D untersucht wurde. Identifizierte *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta x$ -Mutanten wurden durch die Firma GATC sequenziert, um die Richtigkeit ihrer Sequenz zu bestätigen.

## 2.5 RNA-Methoden

### 2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus *L. monocytogenes*

Während der Arbeit mit RNA wurden besondere Sicherheitsmaßnahmen getroffen, um eine mögliche Degradierung der RNA durch RNasen zu vermeiden. Zunächst wurde eine Übertragung von RNasen der menschlichen Haut durch Verwendung von Handschuhen während des gesamten Isolierungsprozesses ausgeschlossen. Außerdem wurden Pipetten benutzt, mit denen noch keine RNasen pipettiert worden waren, sowie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße verwendet, welche nicht autoklaviert worden waren. Vor und nach der RNA-Isolierung wurde der Arbeitsplatz mit 70 % (v/v) vergälltem Ethanol gereinigt.

#### Herstellung von DEPC-dH<sub>2</sub>O

dH<sub>2</sub>O wurde mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, um darin enthaltene RNasen zu deaktivieren. Das Gemisch wurde über Nacht bei RT unter Rühren auf einem IKAMAG® RCT Magnetrührer (IKA®) inkubiert. Um das DEPC zu entfernen, wurde anschließend das Wasser zweimal autoklaviert.

#### Gewinnung von Zellmaterial aus BHI-Medium

3 ml einer *L. monocytogenes*, *S. epidermidis* oder *B. cereus* ÜNK wurden in 200 ml BHI pH 7 gepuffert übertragen. Anschließend wurde die Kultur bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,30 bis 0,35 bei 24 °C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Hierauf wurde die Suspension in 50 ml Kulturen aufgeteilt (200 ml Erlenmeyerkolben). Der Referenzkultur wurden keine Zusätze zugegeben, während die anderen Kulturen mit den entsprechenden Mengen an NaNO<sub>3</sub>, NaNO<sub>2</sub> bzw. SNP induziert und vor dem Abernten (4200 g, 8 min, RT) für weitere zwei Stunden bei 24 °C geschüttelt wurden. Die *L. monocytogenes* Referenzkultur wurde bereits nach einer Stunde und 40 Minuten abzentrifugiert (4200 g, 8 min, RT), um

die gleiche Wachstumsphase der Zellen mit und ohne Additiven zu gewährleisten. Die Zellpellets wurden unmittelbar nach der Zentrifugation in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C gelagert.

#### Gewinnung von Zellmaterial aus Minimalmedium

30 ml einer *L. monocytogenes* ÜNK wurden abzentrifugiert (4200 g, 8 min, RT) und mit auf 37 °C vorgewärmtem Minimalmedium, wie unter Kap. III.2.2 beschrieben, gewaschen. Danach wurden die Kulturen bei 24 °C bzw. 37 °C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,80 bis 0,87 aerob inkubiert. Nach Abernten der Bakterien (4200 g, 8 min, RT) wurden die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur RNA-Isolierung bei -80 °C gelagert.

#### RNA-Isolierung

Für die RNA-Isolierung wurden die entsprechenden Pellets auf Eis aufgetaut und in jeweils 1 ml TRI<sup>®</sup> Reagent (Sigma-Aldrich) resuspendiert. Das Zell-Tri<sup>®</sup> Reagent-Gemisch wurde in 2 ml Shredder Tubes (Sarstedt) überführt, welche bereits bodenbedeckt Silikakügelchen (Ø 0.1 mm; Roth) enthielten. Anschließend wurde das Gemisch fünf Minuten bei RT stehend inkubiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte unter Verwendung der FastPrep<sup>®</sup>-24 (MP Biomedicals). Dabei wurden die Zellen vier Mal bei 45 Sekunden mit einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s geschüttelt, während die Suspensionen zwischen den Schritten für eine Minute auf Eis gehalten wurden. Zu den aufgeschlossenen Zellen wurden 200 µl Chloroform gegeben, das Gemisch durch Invertieren vermischt, bei RT für drei Minuten inkubiert und abzentrifugiert (12000 g, 15 min, 4 °C). Die dabei gebildete obere klare Phase wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol versetzt. Nach Mischen durch Invertieren wurden die Proben für zehn Minuten auf RT stehen gelassen und abzentrifugiert (12000 g, 10 min, 4 °C). Die RNA-Pellets wurden mit 1 ml 70 % (v/v) Ethanol gewaschen (7500 g, 5 min, 4 °C) und vor Resuspension in 80 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O für 15 Minuten bei RT luftgetrocknet. Die noch vorhandene DNA wurde durch Zugabe von 10 µl RQ1 RNase-free DNase und 10 µl des dazugehörigen Puffers (Promega) (45 min, 37 °C) entfernt. Zur Entfernung der DNase wurden 100 µl Chloroform hinzugefügt, die Proben durch Invertieren vermischt, bei 15000 g für 15 Minuten auf 4 °C abzentrifugiert und 80 µl der oberen Phase in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert. Diese wurde dann mit DEPC-dH<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt und einem weiteren Aufreinigungsschritt und DNase-Verdau unter Verwendung des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben

unterzogen. Die isolierte RNA wurde zum Schluss in 30 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) aufgenommen und deren Konzentration im ND-1000 Spectrometer (NanoDrop®) bestimmt. Des Weiteren wurde die Intaktheit der RNA durch Agarose-Gelelektrophorese (Kap. III.2.3.3) untersucht und die Abwesenheit von DNA mittels PCR unter Verwendung von *L. monocytogenes* spezifischen Oligonukleotiden überprüft. Die isolierten RNA-Proben dienten hierbei als Template. Bei Anwesenheit von DNA in den Proben wurde eine erneute Aufreinigung und ein erneuter DNase-Verdau mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit durchgeführt. Die aufgereinigte RNA wurde auf -80 °C gelagert.

## 2.5.2 Transkriptomanalysen

### DNA-Microarrays

Um das Transkriptom von *L. monocytogenes* EGDe unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen, wurden DNA-Microarrays verwendet, bei welchen synthetische 70mer Oligodeoxyribonukleotide (Operon Biotechnologies) auf mit Epoxid beschichtete Objektträger aus Glas gespottet wurden (BioCat GmbH). Diese Oligonukleotide beinhalteten alle offenen Leserahmen des *L. monocytogenes* Genoms und wurden jeweils zweimal auf einen Objektträger gespottet.

### *Synthese fluoreszenzmarkierter DNA*

<u>20 x SSC:</u>	3 M NaCl
	0,3 M Natriumcitrat
	Auf pH 7 eingestellt

Die isolierten und zu vergleichenden RNA-Proben (Kap. III.2.5.1) wurden auf Eis aufgetaut. Jeweils 30 µg RNA wurden mit 3 µl *random*-Nonamer-Oligonukleotide (GE Healthcare) versetzt und mit DEPC-dH<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 18 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung von RNA-Sekundärstrukturen wurden die Proben für fünf Minuten bei 70 °C inkubiert, bevor sie für zehn Minuten auf RT gestellt wurden, um eine optimale Bindung der *random*-Oligonukleotide zu ermöglichen. Anschließend wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

---

8 µl	5 x CyScript Buffer (GE Healthcare) oder 5 x First Strand Buffer (Invitrogen)
4 µl	0,1 M DTT (Sigma-Aldrich®)
1 µl	20 mM dATP (Fermentas)
1 µl	20 mM dGTP (Fermentas)
1 µl	20 mM dTTP (Fermentas)
0,8 µl	20 mM dCTP (Fermentas)
2 µl bzw.	100 U/µl CyScript Reverse Transkriptase (GE Healthcare) bzw.
1 µl	200 U/µl Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen)
Ad 20 µl	DEPC-dH <sub>2</sub> O
<hr/>	
Σ 20 µl	

Zu diesen 38 µl wurden dann jeweils 2 µl der lichtempfindlichen Fluoreszenzmarker Cy3-dCTP (Bedingung 1) bzw. Cy5-dCTP (Bedingung 2) (GE Healthcare) dazugegeben und die cDNA-Synthese bei 42 °C für zwei Stunden in einem Endvolumen von 40 µl je Ansatz durchgeführt. Anschließend wurde die RNA mittels DNase-free RNase (Roche Diagnostics; 2 µl einer > 30 U/mg Lösung) für 45 Minuten bei 37 °C verdaut. Die cDNA wurde unter Verwendung des QIAquick<sup>®</sup> PCR-Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 40 µl Elutionspuffer eluiert. Die zu vergleichenden Proben, welche mit den unterschiedlichen Fluoreszenzmarkern markiert wurden, wurden vereint und das Volumen unter Anlegen eines Vakuums im Concentrater 5301 (Eppendorf; 15 min, 45 °C) auf 30 µl eingengt. Im Anschluss daran wurden 60 µl 20 x SSC und 4 µl 1 % SDS hinzupipettiert, die Reaktionsgefäße bei 94 °C für eine Minute inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Die cDNA wurde auf die Microarray-Objektträger aufgetragen und für 16 bis 18 Stunden bei 64 °C hybridisiert.

#### *Waschen der Objektträger*

<u>Waschlösung 1:</u>	2 x SSC 0,2 % SDS
<u>Waschlösung 2:</u>	2 x SSC
<u>Waschlösung 3:</u>	0,2 x SSC

Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger zunächst in Waschlösung 1 (10 min, 60 °C), dann in Waschlösung 2 (10 min, RT) und zum Schluss zweimal in Waschlösung 3 (10 min, RT) gesäubert. Unmittelbar vor der Zentrifugation (1600 g, 3 min, RT) wurden die Objektträger kurz in 4 °C kalten Isopropanol getaucht, um einer möglichen Schlierenbildung durch den Trocknungsvorgang zuvorzukommen.

### *Scannen und Auswertung*

Die getrockneten Objektträger wurden im GenePix 4000B Scanner (MDS Analytical Technologies) gescannt und mittels des GenePix Pro Programms (Software Version 6.0; Axon Instruments) analysiert. Zur Normalisierung der Daten wurden die arithmetischen Mittel der verschiedenen Cy5/Cy3-Verhältnisse auf eins gesetzt (GenePix Pro Programm).

Generell wurden nur Spots in die finale Auswertung genommen, deren Fluoreszenzsignal höher als das Hintergrundsignal plus einer Standardabweichung war. Spots, die eine unregelmäßige Morphologie aufwiesen, wurden nicht berücksichtigt, wenn sich deren Median-, Mittel- und Regressionsquotienten um mehr als 30 % unterschieden. Um einen Ausschluss positiver Spots aufgrund der automatisierten Auswertung des Programms zu minimieren, wurden die Rohdaten der Spots näher analysiert, deren  $\log_2$  Medianquotient  $\geq 1$  oder  $\leq -1$  betrug. Wenn die Intensität ihrer Cy5- oder Cy3-Fluoreszenzen mindestens 50 % der Intensität erreichte, die für den Durchschnitt aller Spots auf diesem Objektträger berechnet wurde, wurden diese in die Auswertung miteinbezogen. Die Transkription von Genen wurde als signifikant höher oder niedriger im Vergleich zu einer anderen Bedingung angesehen, wenn (i) bei mindestens sieben (Transkription mit 200 mg/l  $\text{NaNO}_2$ /Transkription ohne  $\text{NaNO}_2$ ; vgl. Kap. IV.1.4) bzw. neun (Transkription bei 24 °C/Transkription bei 37 °C; vgl. Kap. IV.2.1) gültigen Spots der  $\log_2$  Medianquotient-Werte von  $\geq 1$  oder  $\leq -1$  betrug und wenn (ii) das arithmetische Mittel der  $\log_2$  Medianquotienten der validen Spots sich im Bereich  $\geq 1$  oder  $\leq -1$  befand. Das  $\log_2$  relative Transkriptionslevel ( $\log_2$  RTL) bezeichnet das arithmetische Mittel der  $\log_2$  Medianquotienten aller validen Spots.

### Next Generation Sequenzierung (NGS)

Neben den DNA-Microarrays ist die Next Generation Sequenzierung (NGS) eine weitere Methodik, um Transkriptomstudien durchzuführen. Dabei wird das gesamte Transkriptom in cDNA umgeschrieben, diese sequenziert und gegen das Referenzgenom gemappt, um die Countanzahl der jeweiligen DNA-Fragmente für ein Gen pro Bedingung zu bestimmen. Durch Vergleichen der jeweiligen Counts pro Gen pro Bedingung lassen sich die unterschiedlichen Genexpressionen ermitteln.

*RNA-Isolierung*

Die Isolierung von RNA für die NGS wurde bis zum Lufttrocknungsschritt wie in Kap. III.2.5 beschrieben durchgeführt. Nachdem die RNA an der Luft getrocknet war, wurde diese in 40 µl Nuklease-freiem Wasser (Ambion Life Technologies) rehydriert und deren Konzentration im ND-1000 Spectrometer (NanoDrop®) bestimmt. Anschließend wurde die RNA-Qualität mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies) unter Verwendung des Agilent RNA 6000 Pico Kits (Agilent Technologies) nach Herstellerangaben überprüft. Für die Entfernung der rRNA wurde das MicrobExpress™ Kit (Ambion Life Technologies) nach Angaben des Herstellers benutzt. Die Konzentration der rRNA-freien RNA wurde im ND-1000 Spectrometer bestimmt und eine weitere Qualitätsanalyse mittels des Agilent 2100 Bioanalyzers durchgeführt. Insgesamt konnten 55 bis 75 % der rRNA-Fragmente aus der isolierten RNA entfernt werden. Für die Entfernung der noch vorhandenen DNA wurde das Turbo DNA-free™ Kit (Ambion Life Technologies), wie im Protokoll des Herstellers beschrieben, eingesetzt. Die vorhandenen 50 µl der von DNA befreiter RNA wurden für die Fragmentierung und Herstellung der Library weiterverarbeitet.

*Generierung der Library*

Die RNA wurde im Covaris E220 (Covaris) in den dafür eigens vorgesehenen Gefäßen fragmentiert (180 s, 10 % Duty Cycle, 175 Watt, 200 Cycles/Burst, Fragmentlänge: 150 Basen). Eine erfolgreiche Fragmentierung konnte im Agilent 2100 Bioanalyzer nachgewiesen werden. Die fragmentierte RNA wurde mit Hilfe einer Ethanol-fällung aufgereinigt. Anschließend wurde ihre Konzentration im ND-1000 Spectrometer gemessen. Dephosphoryliert wurden die RNA-Fragmente unter Verwendung von folgendem Ansatz:

25 µl	250 ng fragmentierte RNA
3 µl	10 x Antarktische Phosphatase-Puffer (New England BioLabs®)
2 µl	Antarktische Phosphatase (New England BioLabs®)
<hr/>	
Σ 30 µl	

Die Proben wurden für 30 Minuten auf 37 °C inkubiert und mit Hilfe des miRNeasy Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Eluiert wurde in 30 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen). Anschließend fand die Phosphorylierungsreaktion wie folgt statt:

30 µl	Probe
2 µl	T4-Polynukleotidkinase (New England BioLabs®)
3,5 µl	10 x T4-DNA-Ligase-Puffer (Thermo Fisher Scientific)
<hr/>	
Σ 35,5 µl	

→ Inkubation eine Stunde bei 37 °C

Die Proben wurden mittels miRNeasy Mini Kit (Qiagen) aufgereinigt, in 30 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen) eluiert und deren Konzentration im ND-1000 Spectrometer bestimmt. Die verschiedenen Proben wurden in einem Volumen von 30 µl mit RNase-freiem Wasser (Qiagen) auf die gleiche Konzentration eingestellt und in der SpeedVac unter Anlegen eines Vakuums auf 5 µl eingeeengt (30 min, 30 °C). Im weiteren Verlauf wurde mit dem TruSeq® Small RNA Sample Preparation Kit (Illumina) nach Herstellerangaben weitergearbeitet. In diesem wurden die verschiedenen Adaptoren für die Sequenzierungsreaktion an die jeweiligen RNA-Fragmente ligiert, diese revers transkribiert und mittels PCR amplifiziert. Die daraus resultierende DNA wurde mit Hilfe eines 6 %igem Novex® TBE PAGE Gels (Invitrogen) aufgetrennt und Fragmente mit einer Länge von 190 bis 200 Bp ausgeschnitten. Zur Detektierung der DNA wurde SYBR® Gold (Invitrogen) (5 µl in 50 ml 1 x Novex® TBE-Puffer, Invitrogen) verwendet. Die DNA wurde aus den jeweiligen Gelstückchen mit Hilfe von Spin-X Centrifuge Tube Filter (Ø 0,22 µm; Costar) aufgereinigt und durch Ethanolfällung in 10 µl aufkonzentriert. Die Konzentration der Libraries wurde im Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen) gemessen und deren Qualität im Agilent 2100 Bioanalyzer unter Verwendung des Agilent High Sensitivity DNA Kits (Agilent Technologies) überprüft. Für die anschließende Sequenzierungsreaktion wurden die gemessenen ng/µl der verschiedenen Libraries in nM durch die Formel

$$\frac{[\text{ng}/\mu\text{l}] \times 1 \times 10^6}{(195 \text{ Bp} \times 650 \text{ Da/Bp})} \quad (195 \text{ Bp} = \text{Längendurchschnitt der ausgeschnittenen Fragmente})$$

umgerechnet (UCI Genomics High Throughput Facility; Illumina Guidelines; <http://ghtf.biochem.uci.edu/content/illumina-guidelines>). Anschließend wurden die Libraries zu gleichen Teilen zu einer Endkonzentration von 1 nM in 10 µl Endvolumen vereint. Durch die Zugabe von 9 µl Elutionspuffer (Illumina; 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 + 0,1% Tween) und 1 µl 2 M NaOH wurde der Library-Pool auf 0,5 nM verdünnt und bis zur Sequenzierungsreaktion bei -80 °C aufbewahrt.

### Sequenzierung

Die notwendigen Vorbereitungen für das Sequenzieren im MiSeq™ Sequenziergerät (Illumina) richteten sich nach dem „MiSeq® System User Guide“. Während des dreimaligen Vorwaschens des Sequencers wurde das Sample Sheet erstellt (Assay: Small RNA; 50 bp single read) und der bereits generierte und bei -80 °C aufbewahrte Library-Pool durch Zugabe einer auf 4 °C vorgekühlten HT1-Lösung (Illumina) auf eine Konzentration von 10 pM in einem Endvolumen von 1 ml eingestellt. Die Cartridge und Flow cell, welche aus dem MiSeq® Reagent Kit v2 (Illumina) entnommen wurden, wurden für den Sequenzierungsvorgang, wie im „MiSeq® System User Guide“ angegeben, vorbereitet. Anschließend wurden 600 µl des 10 pM Library-Pools in die Cartridge geladen und sequenziert.

### Auswertung

Die aus dem MiSeq Sequencer erhaltenen FASTQ-Dateien wurden mit Hilfe des FTP-Clients FileZilla auf den Galaxy Server geladen und unter Verwendung des FASTQ-Groomer in FASTQSANGER-Formate konvertiert (BLANKENBERG et al., 2010). Anschließend wurden diese auf das *L. monocytogenes* EGDe Genom mittels Bowtie für Illumina (LANGMEAD et al., 2009) gemappt (Standardeinstellungen: 28 Bp Kernlänge; höchstens zwei Nukleotidunterschiede in der Kernsequenz; ein maximaler Schwellenwert von 70 für die Summe der Qualitätswerte an nicht übereinstimmenden Positionen). Durch die Umwandlung der gemappten Sequenzen in SAM-Dateien unter Verwendung von „SAM Tools“ (LI et al., 2009) wurden die nicht gemappten Sequenzen im weiteren Auswertungsprozess ausgeschlossen. Diese SAM-Dateien wurden in einem weiteren Schritt in BAM-Formate umgewandelt, welche wiederum in BAM.BAI-Dateien im Programm „Picard Tools“ (CARVER et al., 2010) indiziert wurden. Die Visualisierung der gemappten Reads erfolgte über BamView (CARVER et al., 2010) durch die Software Artemis (RUTHERFORD et al., 2000). Außerdem konnten durch Artemis die Countanzahl sowie die RPKM-Werte (= reads per kilobase per million mapped reads) jedes einzelnen Gens für jede Bedingung bestimmt und für die Auswertung verwendet werden. Zur Analyse der unterschiedlichen Genexpressionen als auch zur Abschätzung der biologischen Schwankungen wurde das Statistikprogramm R mit den Paketen edgeR und limma ausgewählt (ROBINSON et al., 2010). Hierbei wurde darauf geachtet, dass nur die Gene in die Auswertung miteinbezogen wurden, deren Countzahl in mindestens einer der zu vergleichenden Bedingungen mindestens zehn betrug. Die

jeweiligen zu untersuchenden Gene und Bedingungen wurden als Textdateien in R eingespeist. Für das durchschnittliche Streuungsmaß wurde, wie im „EdgeR User’s Guide“ für genetisch identische Modellorganismen beschrieben, der Wert 0,1 eingesetzt. Als signifikant unterschiedlich reguliert angesehen wurde die Transkription der Gene, die ein  $\log_2$  relatives Expressionslevel von  $\geq 2$  oder  $\leq -2$  und einen p-Wert von höchstens 0,05 besaßen.

### 2.5.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die Transkriptionsanalyse einzelner ausgewählter Gene wurde mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Die dabei verwendete RNA wurde wie unter Kap. III.2.5.1 beschrieben isoliert.

#### qRT-PCR-Oligonukleotide

Die qRT-PCR-Oligonukleotide (Kap. III.1.1) wurden mit Hilfe des Programms Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) ausgewählt. Sie sind zwischen 18 bis 23 Nukleotide lang und liegen optimalerweise in der Mitte der zu untersuchenden Gensequenz. Die Annealing Temperatur wurde zwischen 54 und 56 °C gewählt. Die Produktlänge hatte optimalerweise eine Länge von 150 bis 170 Bp. Um unspezifische PCR-Produkte zu vermeiden, wurden die Oligonukleotidsequenzen gegen das *L. monocytogenes* EGDe Genom geblastet (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

#### Bestimmung der Primereffizienzen

Um die Primereffizienzen (E) der ausgewählten qRT-PCR-Oligonukleotide zu bestimmen, wurde eine Standardkurve der jeweiligen primerspezifischen PCR-Produkte generiert. Hierbei wurden die durch PCR amplifizierten und durch das E.Z.N.A. Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek; Kap. III.2.3.4) aufgereinigten PCR-Produkte mit DEPC-dH<sub>2</sub>O  $10^{-2}$  bis  $10^{-8}$  verdünnt und als Template in die qRT-PCR-Reaktion eingesetzt. Verdünnungen, welche geeignete Ct-Werte lieferten, wurden in die Berechnung der Standardkurve miteinbezogen. Die Steigung der Kurve fand anschließend für die folgende Gleichung (BUSTIN, 2000) Verwendung:

$$E = 10^{(-1/\text{Steigung})} \quad (E = \text{Primereffizienz})$$

Primer, deren Effizienzen zwischen 1,6 und 2,1 lagen, wurden für die anschließenden qRT-PCR-Reaktionen eingesetzt.

#### Reverse Transkription

Für die reverse Transkription der isolierten RNA wurde diese zunächst auf eine Konzentration von 100 ng/µl mit Hilfe des ND-1000 Spectrometers (NanoDrop®) eingestellt. Anschließend wurde 1 µg RNA mit 6 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O und 4 µl eines All-in-One Reaktionsgemisches (qScript cDNA Super-Mix, Quanta) in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß vermischt. In diesem qScript cDNA Super-Mix befanden sich alle für eine reverse Transkription benötigten Reagenzien, wie Puffer, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, *random*-Oligonukleotide, RNase-Inhibitoren, qScript Reverse Transkriptase und Stabilisatoren. Die reverse Transkription wurde in einem Thermocycler mit folgenden Einstellungen durchgeführt:

25 °C	5 min
42 °C	30 min
85 °C	5 min

Nach der Reaktion wurden jeweils 80 µl DEPC-dH<sub>2</sub>O den Proben zugegeben und diese anschließend bei -20 °C gelagert.

#### Real-Time PCR

Für die Real-Time PCR-Reaktion wurde der PerfeCta SYBR Green FastMix (Quanta) verwendet, welcher Puffer, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, AccuFast *Taq* DNA-Polymerase, SYBR Green I Farbstoff und Stabilisatoren enthielt. Die Proben wurden pro Ansatz folgendermaßen zusammengefügt:

5 µl	cDNA bzw. DEPC-dH <sub>2</sub> O
10 µl	2 x PerfeCta SYPR Green FastMix
1 µl	10 pmol/µl qRT-PCR <i>forward</i> Primer
1 µl	10 pmol/µl qRT-PCR <i>reverse</i> Primer
3 µl	DEPC-dH <sub>2</sub> O
<hr/>	
Σ 20 µl	

Für jedes biologisch unabhängige Experiment wurde ein technisches Duplikat und eine Negativkontrolle (DEPC-dH<sub>2</sub>O statt der jeweiligen cDNA als Template) mitgeführt.

Im Anschluss daran wurde das Gemisch in SmartCycler™ Reaktionsgefäße (PEQLAB Biotechnologie GmbH) überführt, in der Spectrafuge Mini (Labnet International, Inc.) kurz abzentrifugiert und in den SmartCycler™ (Cepheid) gestellt. Für die Validierung der NGS-Daten wurde die qRT-PCR im iCycler (BioRad) durchgeführt. Dafür wurde das zu analysierende Gemisch in eine für den iCycler kompatible 96 Well-Platte (ThermoFast® 96-Platten mit halbhohen Seiten; ABgene) pipettiert, diese in einer Laborzentrifuge mit passendem Aufsatz bei niedrigster Umdrehungszahl kurz abzentrifugiert und in den iCycler gestellt.

Die qRT-PCR-Reaktion lief in beiden Geräten unter dem Programm mit folgender Einstellung ab:

Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	
Denaturierung	95 °C	20 s	} 40 Zyklen
Annealing	53 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
Schmelzkurve	53-37 °C	0,2 °C/s	

Eine Überprüfung der Spezifität des Amplifizierungsprozesses fand statt, indem die jeweiligen Schmelzkurven kontrolliert wurden.

### Auswertung

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit Hilfe der REST® (Relative Expression Software Tool) Software (PFAFFL et al., 2002) bzw. der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001). Bei der REST® Auswertung wurden die relativen Expressionsraten der untersuchten Gene bestimmt, indem die Transkription des Zielgens mit der Transkription eines Referenzgens verglichen wurde. Das mathematische Modell dieser Auswertungsmethode basiert auf folgender Gleichung (PFAFFL et al., 2002):

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta Cp_{\text{target}}(\text{MEAN}_{\text{control}} - \text{MEAN}_{\text{sample}})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta Cp_{\text{ref}}(\text{MEAN}_{\text{control}} - \text{MEAN}_{\text{sample}})}}$$

R = Verhältnis/Relative Genexpression  
 E = Primereffizienz  
 CP = Crossing Point

Die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode beruht ebenfalls auf der Berechnung der relativen Transkription des gewünschten Gens in Bezug auf ein Referenzgen, aber ohne Miteinbezug der Primereffizienzen. Mit Hilfe dieser Auswertung wurden die relativen mRNA-

Expressionslevel in % bestimmt. Die dazugehörigen Formeln lauten (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001):

$$\Delta Ct = Ct_{(\text{target gene})} - Ct_{(\text{reference gene})}$$
$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(\text{treatment group})} - \text{mean } \Delta Ct_{(\text{control group})}$$

Ausgehend von  $\Delta\Delta Ct$  wird die relative mRNA-Expression in % mit der Formel

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100 \%$$

umgerechnet.

Als Referenz wurde die Transkriptionsmenge des *Housekeeping* Gens *rpoB* oder der 16S ribosomalen RNA (16S rRNA) verwendet (CHRISTENSEN et al., 2004). *RpoB* kodiert für die  $\beta$ -Untereinheit der RNA-Polymerase und die 16S rRNA ist ein Teil der 30S-Untereinheit der bakteriellen Ribosomen. Sowohl *rpoB* als auch die 16S rRNA wurden bereits in zahlreichen Studien zur internen Normalisierung für qRT-PCR-Analysen verwendet (CHRISTENSEN et al., 2004; TASARA and STEPHAN, 2007).

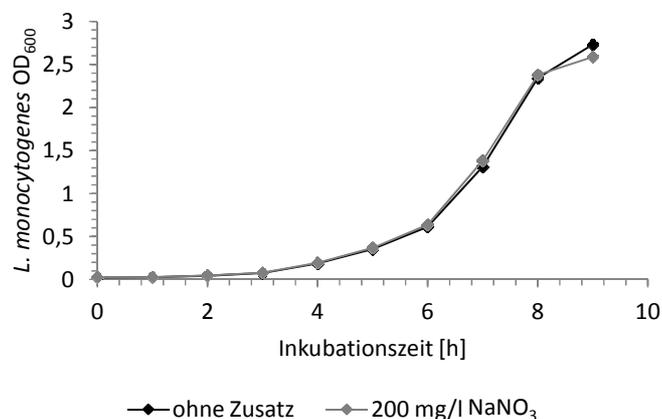
## IV. Ergebnisse

### 1. Molekulare Effekte von Nitrat bzw. Nitrit auf *L. monocytogenes*

Nitrat oder Nitrit werden in der Fleischindustrie bei der Herstellung von Rohwürsten als Pökelszusätze eingesetzt. Dies dient der Konservierung der Produkte, führt zur Ausbildung des Pökelaromas und der roten Pökelfarbe und soll das Wachstum unerwünschter Pathogene inhibieren. Das Bakterium *L. monocytogenes* ist eines der Lebensmittelpathogene, die in diversen Fleischprodukten nachgewiesen wurden und die die menschliche Gesundheit beeinträchtigen können. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Nitrat bzw. Nitrit auf das Wachstum und das Transkriptom von *L. monocytogenes* zu untersuchen.

#### 1.1 Wachstumsverhalten von *L. monocytogenes* in Anwesenheit von Nitrat

Ein möglicher Einfluss von Nitrat auf das Wachstum von *L. monocytogenes* wurde *in vitro* mittels Wachstumsanalysen untersucht. Die Zellen wurden in An- und Abwesenheit von 200 mg/l  $\text{NaNO}_3$  in BHI (pH 7) bei 24 °C inkubiert (Abb. 5). Die Versuche wurden dreimal reproduziert.



**Abb. 5: Nitrat-abhängiges Wachstum von *L. monocytogenes*.** Repräsentative Wachstumskurve von *L. monocytogenes* EGDe in BHI (pH 7) bei 24 °C ohne Zusatz (schwarze Linie) bzw. mit 200 mg/l  $\text{NaNO}_3$  (graue Linie).

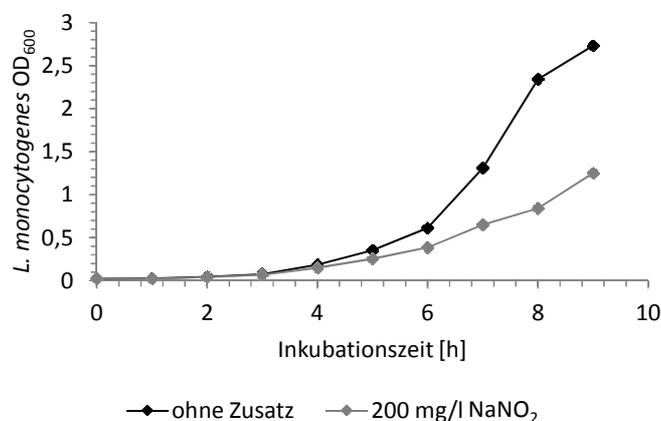
Das Wachstum von *L. monocytogenes* wird durch die Anwesenheit von  $\text{NaNO}_3$  nicht beeinflusst.

### 1.2 Transkriptomanalysen von *L. monocytogenes* in An- und Abwesenheit von Nitrat

Für die Untersuchung einer möglichen Nitrat-induzierten transkriptionellen Veränderung in *L. monocytogenes*, wurde das Transkriptom von *L. monocytogenes* EGDe in An- und Abwesenheit von 246 mg/l (= 2,89 mM)  $\text{NaNO}_3$  mittels DNA-Microarrays verglichen. Dazu wurden die Zellen bei 24 °C bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,30 bis 0,35 inkubiert und mit  $\text{NaNO}_3$  induziert. Die Referenzkultur wurde ohne Zugabe von  $\text{NaNO}_3$  weiter inkubiert. Sowohl die mit  $\text{NaNO}_3$  inkubierte Zellsuspension als auch die Referenzkultur wurden zwei Stunden post Nitratinduktion geerntet und deren RNA isoliert. Es wurden insgesamt sechs biologisch unabhängige Microarray-Experimente durchgeführt. Dabei wurden drei cDNA-Sets der ohne Nitrat inkubierten Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3-dCTP und drei cDNA-Sets der mit Nitrat inkubierten Zellen mit Cy5-dCTP markiert. Bei den restlichen drei Sets fand anschließend eine umgekehrte Fluoreszenzmarkierung statt, um unterschiedliche Effizienzen in der Farbstoffmarkierung auszuschließen. Es zeigte sich, dass durch die Anwesenheit von Nitrat das Transkriptom von *L. monocytogenes* nicht verändert wird.

### 1.3 Wachstumsverhalten von *L. monocytogenes* in Anwesenheit von Nitrit

Um zu untersuchen, ob möglicherweise Nitrit, das ausgehend von Nitrat im Wurstprodukt gebildet (SANZ et al., 1997) oder direkt dem Wurstprodukt zugegeben wird, das *in vitro* Wachstum von *L. monocytogenes* beeinflusst, wurde das Wachstum von *L. monocytogenes* EGDe in An- und Abwesenheit von 200 mg/l  $\text{NaNO}_2$  in BHI (pH 7) bei 24 °C analysiert (Abb. 6). Die Versuche wurden dreimal reproduziert.

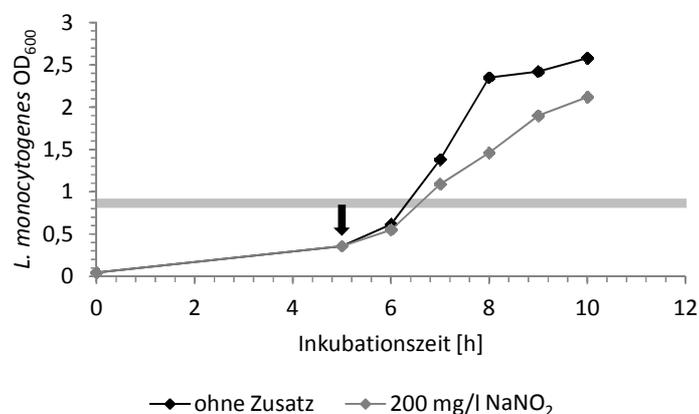


**Abb. 6: Nitrit-abhängiges Wachstum von *L. monocytogenes*.** Repräsentative Wachstumskurve von *L. monocytogenes* EGDe in BHI (pH 7) bei 24 °C ohne Zusatz (schwarze Linie) bzw. mit 200 mg/l  $\text{NaNO}_2$  (graue Linie).

Zellen, die mit 200 mg/l  $\text{NaNO}_2$  inkubiert wurden, zeigten ein deutlich verzögertes Wachstum in der exponentiellen Wachstumsphase als Zellen, die ohne  $\text{NaNO}_2$  inkubiert wurden.  $\text{NaNO}_2$  übt somit – im Gegensatz zu  $\text{NaNO}_3$  – einen inhibierenden Effekt auf das Wachstum von *L. monocytogenes* aus.

#### 1.4 Identifizierung des Nitrit-abhängigen Transkriptoms von *L. monocytogenes*

Um die inhibierende Wirkung von Nitrit auf das Wachstum von *L. monocytogenes* näher zu untersuchen, wurde das Transkriptom von *L. monocytogenes* in An- und Abwesenheit von 200 mg/l (= 2,89 mM)  $\text{NaNO}_2$  mittels DNA-Microarrays analysiert. Zunächst wurde die Kultur bis zum Erreichen einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,30 bis 0,35 inkubiert und anschließend mit  $\text{NaNO}_2$  induziert. Die Referenzkultur wurde ohne  $\text{NaNO}_2$ -Zugabe weiter inkubiert. Zwei Stunden nach  $\text{NaNO}_2$ -Induktion war der Wachstumsunterschied zwischen den beiden Kulturen deutlich erkennbar (Abb. 7), weswegen zu diesem Zeitpunkt die mit Nitrit inkubierten Zellen für die Transkriptionsstudien abgeerntet wurden. Die dazugehörige Kontrollkultur wurde entsprechend früher abzentrifugiert, um eine identische Wachstumsphase zu gewährleisten.



**Abb. 7: Bestimmung der  $\text{NaNO}_2$ -Inkubationsdauer für die Transkriptionsanalysen.** Die Zellen wurden bei 24 °C in 200 ml BHI (pH 7) bis zum Erreichen einer optischen Dichte von  $\text{OD}_{600} = 0,30$  inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 ml der Kultur in 200 ml Kolben aufgeteilt. Einer wurde mit 200 mg/l  $\text{NaNO}_2$  induziert (durch den schwarzen Pfeil in der Abbildung markiert; graue Linie), der andere diente als Kontrollansatz (schwarze Linie). Die  $\text{OD}_{600}$  der induzierten und nicht-induzierten Zellen wurden nach der Induktion stündlich gemessen. Der in der Grafik grau unterlegte Bereich zwischen  $\text{OD}_{600} = 0,80$ - $0,90$  kennzeichnet die Wachstumsphase, in der die Zellen für die RNA-Isolierung abgeerntet wurden.

Es wurden fünf biologisch unabhängige Experimente durchgeführt. Bei drei Sets wurde die cDNA der Proben ohne  $\text{NaNO}_2$  mit Cy3-dCTP und die der Proben mit  $\text{NaNO}_2$  mit Cy5-dCTP markiert. Bei zwei Sets fand eine umgekehrte Markierung statt.

Insgesamt konnten 50 Gene identifiziert werden, welche Nitrit-abhängig transkribiert wurden. 34 Gene zeigten eine stärkere und 16 Gene eine schwächere Transkription in Anwesenheit von 200 mg/l NaNO<sub>2</sub>. Diese sind in den Tab. 5A und 5B aufgelistet.

**Tab. 5A: Liste von Genen, deren Transkription durch Nitrit aktiviert wurde.**

Gen	Annotation <sup>a)</sup>	log <sub>2</sub> RTL <sup>b)</sup>	genomische Anordnung <sup>c)</sup>
<i>lmo0133</i> <sup>2) 3) 4)</sup>	ähnlich dem Protein Yjdl aus <i>E. coli</i>	2,0 ± 0,9	<i>op lmo0133-lmo0134</i>
<i>lmo0278</i>	ähnlich einem Zucker-ABC-Transporter (ATP-Bindeprotein)	1,3 ± 0,3	
<i>lmo0433</i> <sup>2) 3) 4)</sup>	<i>inlA</i> , Internalin A	1,4 ± 0,5	<i>op lmo0433-lmo0434</i>
<i>lmo0515</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	konserviertes hypothetisches Protein	1,5 ± 0,4	
<i>lmo0539</i> <sup>1) 2) 3) 4) 5)</sup>	ähnlich einer Tagatose-1,6-Diphosphat-Aldolase	1,4 ± 0,3	
<i>lmo0596</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	ähnlich unbekanntem Proteinen	2,2 ± 0,5	<i>op lmo0599-lmo0601</i>
<i>lmo0610</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	ähnlich den Internalin-Proteinen, putatives Peptidoglykan-gebundenes Protein (LPXTG motif)	1,5 ± 0,7	
<i>lmo0722</i> <sup>1) 2) 3) 4) 5)</sup>	ähnlich einer Pyruvat-Oxidase	2,1 ± 1,1	
<i>lmo0781</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	ähnlich der Mannose-spezifischen Phosphotransferase-System (PTS)-Komponente IID	1,3 ± 0,4	<i>op lmo0782-lmo0781</i>
<i>lmo0782</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	ähnlich der Mannose-spezifischen PTS-Komponente IIC	1,5 ± 0,6	<i>op lmo0782-lmo0781</i>
<i>lmo0783</i> <sup>1) 2) 3) 4) 5)</sup>	ähnlich der Mannose-spezifischen PTS-Komponente IIB	1,4 ± 0,4	<i>op lmo0784-lmo0783</i>
<i>lmo0915</i>	ähnlich dem PTS-Enzym IIC	1,2 ± 0,5	<i>op lmo0914-lmo0918</i>
<i>lmo0994</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	CS	2,4 ± 0,9	
<i>lmo0995</i> <sup>3) 4)</sup>	ähnlich dem Protein YkrP aus <i>B. subtilis</i>	2,4 ± 0,7	
<i>lmo1293</i> <sup>3)</sup>	<i>glpD</i> , Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase	1,3 ± 0,3	
<i>lmo1425</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	<i>opuCD</i> , Betain/Carnitin/Cholin-ABC-Transporter (Membranprotein)	1,8 ± 0,9	<i>op lmo1428-lmo1425</i>
<i>lmo1426</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	<i>opuCC</i> , Betain/Carnitin/Cholin-ABC-Transporter (Osmoprotektant-bindendes Protein)	1,0 ± 0,5	<i>op lmo1428-lmo1425</i>
<i>lmo1427</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	<i>opuCB</i> , Betain/Carnitin/Cholin-ABC-Transporter (Membranprotein)	2,1 ± 0,4	<i>op lmo1428-lmo1425</i>
<i>lmo1538</i>	Glyzerinkinase	1,1 ± 0,4	<i>op lmo1539-lmo1538</i>
<i>lmo1539</i> <sup>5)</sup>	Glyzerin-Permease	1,3 ± 0,3	<i>op lmo1539-lmo1538</i>
<i>lmo2067</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	konjugierte Gallensäure-Hydrolase	2,5 ± 0,8	
<i>lmo2157</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	<i>sepA</i>	1,4 ± 0,7	

<i>lmo2158</i> <sup>1) 2) 3) 4) 5)</sup>	ähnlich dem Protein YwmG aus <i>B. subtilis</i>	1,7 ± 0,5	
<i>lmo2181</i>	ähnlich unbekanntem Proteinen	1,9 ± 0,4	op <i>lmo2186-lmo2181</i>
<i>lmo2182</i>	Ferrichrom-ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein)	1,6 ± 0,4	op <i>lmo2186-lmo2181</i>
<i>lmo2183</i>	Ferrichrom-ABC-Transporter (Permease)	1,6 ± 0,3	op <i>lmo2186-lmo2181</i>
<i>lmo2184</i>	Ferrichrom-ABC-Transporter (Bindeprotein)	1,5 ± 0,4	op <i>lmo2186-lmo2181</i>
<i>lmo2230</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	ähnlich einer Arsenat-Reduktase	2,4 ± 0,6	
<i>lmo2391</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	konserviertes hypothetisches Protein, ähnlich dem Protein YhfK aus <i>B. subtilis</i>	1,5 ± 0,5	
<i>lmo2571</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	ähnlich einer Nikotin-Amidase	1,2 ± 0,4	op <i>lmo2573-lmo2570</i>
<i>lmo2573</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	ähnlich einer Zink-bindenden Dehydrogenase	1,3 ± 0,5	op <i>lmo2573-lmo2570</i>
<i>lmo2673</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	konserviertes hypothetisches Protein	2,8 ± 0,9	op <i>lmo2673-lmo2674</i>
<i>lmo2695</i> <sup>2) 3) 4) 5)</sup>	Dihydroxyacetonkinase	2,2 ± 0,4	op <i>lmo2695-lmo2697</i>
<i>lmo2748</i> <sup>1) 2) 3) 4) 5)</sup>	ähnlich dem Stressprotein YdaG aus <i>B. subtilis</i>	2,6 ± 1,2	

Tab. 5B: Liste von Genen, deren Transkription durch Nitrit inhibiert wurde.

Gen	Annotation <sup>a)</sup>	log <sub>2</sub> RTL <sup>b)</sup>	genomische Anordnung <sup>c)</sup>
<i>lmo0482</i>	ähnlich den konservierten hypothetischen Proteinen, sehr ähnlich dem YloN Protein aus <i>B. subtilis</i>	-1,8 ± 0,5	
<i>lmo0593</i> <sup>1) 2) 3) 4)</sup>	ähnlich Transportproteinen (evtl. Formatttransportprotein)	-1,2 ± 0,4	
<i>lmo0834</i>	CS	-1,5 ± 0,4	op <i>lmo0834-lmo0835</i>
<i>lmo0835</i>	putatives Peptidoglykan-gebundenes Protein (LPXTG motif)	-1,2 ± 0,4	op <i>lmo0834-lmo0835</i>
<i>lmo1831</i>	<i>pyrE</i> , Orotat-Phosphoribosyltransferase	-4,6 ± 1,7	op <i>lmo1840-lmo1831</i>
<i>lmo1832</i>	<i>pyrF</i> , Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase	-4,5 ± 1,4	op <i>lmo1840-lmo1831</i>
<i>lmo1833</i>	<i>pyrD</i> , Dihydroorotase-Dehydrogenase	-4,7 ± 1,6	op <i>lmo1840-lmo1831</i>
<i>lmo1834</i>	<i>pyrDII</i> , Dihydroorotase-Dehydrogenase (Elektronentransferprotein)	-4,8 ± 1,5	op <i>lmo1840-lmo1831</i>
<i>lmo1835</i>	<i>pyrAB</i> , Carbamoylphosphat-Synthetase (katalytische Untereinheit)	-5,0 ± 1,2	op <i>lmo1840-lmo1831</i>
<i>lmo1836</i>	<i>pyrAa</i> , Carbamoylphosphat-Synthetase (Glutaminase-Untereinheit)	-5,6 ± 1,0	op <i>lmo1840-lmo1831</i>
<i>lmo1837</i>	<i>pyrC</i> , Dihydroorotase	-5,5 ± 0,9	op <i>lmo1840-lmo1831</i>

<i>lmo1838</i>	<i>pyrB</i> , Aspartat-Carbamoyltransferase	$-5,7 \pm 0,9$	<i>op lmo1840-lmo1831</i>
<i>lmo1839</i>	<i>pyrP</i> , Uracil-Permease	$-6,2 \pm 1,0$	<i>op lmo1840-lmo1831</i>
<i>lmo1840</i>	<i>pyrR</i> , Pyrimidin-Operon-Regulatorprotein	$-3,6 \pm 1,0$	<i>op lmo1840-lmo1831</i>
<i>lmo2069</i>	<i>groES</i> , Klasse I Hitzeschock-Protein (Chaperonin) GroES	$-1,3 \pm 0,6$	<i>op lmo2069-lmo2068</i>
<i>lmo2802</i>	<i>gidB</i> , Protein GidB	$-1,3 \pm 0,5$	

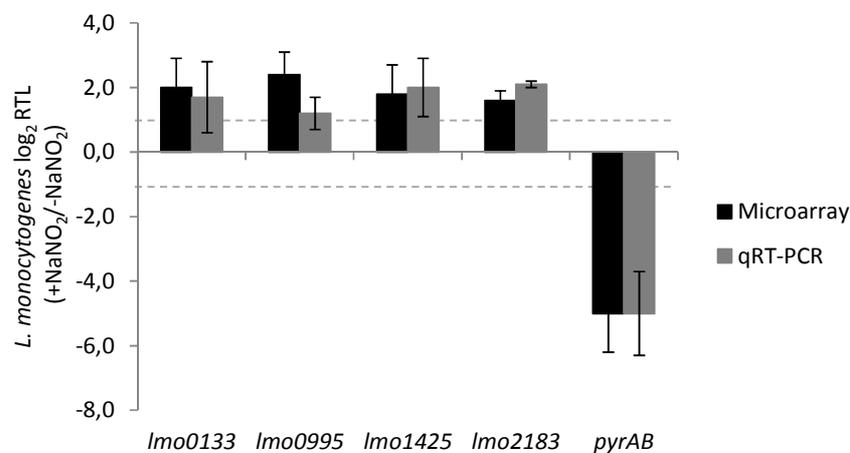
<sup>a)</sup> gemäß *ListiList* des *Institut Pasteur* (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>), CS = codierende Sequenz

<sup>b)</sup> RTL = Relatives Transkriptionslevel = Transkription in Gegenwart von 200 mg/l Nitrit/Transkription in Abwesenheit von Nitrit

<sup>c)</sup> *op* = Operon (TOLEDO-ARANA et al., 2009)

<sup>1) 2) 3) 4) 5)</sup>  $\sigma^B$  aktivierte Transkription gemäß <sup>1)</sup> (HAIN et al., 2008); <sup>2)</sup> (OLIVER et al., 2009), <sup>3)</sup> (RAENGPRADUB et al., 2008), <sup>4)</sup> (OLIVER et al., 2010) oder <sup>5)</sup> (MUJAHID et al., 2013)

Zur Validierung der Microarray-Daten wurde die Nitrit-abhängige Transkription der Gene *lmo0133*, *lmo0995*, *lmo1425*, *lmo2183* und *lmo1835* (*pyrAB*) zusätzlich über qRT-PCR untersucht. Für die Durchführung wurden drei biologisch unabhängige RNA-Sets verwendet (Abb. 8).



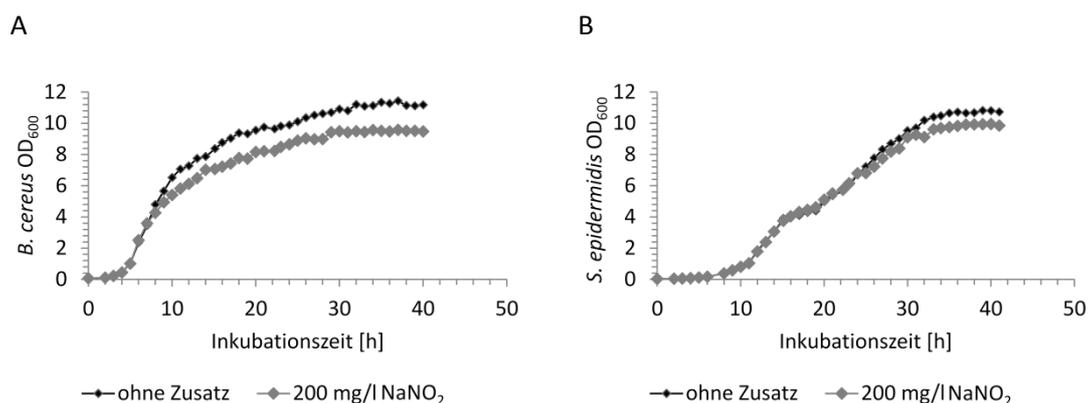
**Abb. 8: Validierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR.** Dargestellt sind die log<sub>2</sub> RTLs der Gene *lmo0133*, *lmo0995*, *lmo1425*, *lmo2183* und *pyrAB* aus den Microarray-Experimenten (schwarze Säulen) und qRT-PCR-Messungen (graue Säulen) in An- und Abwesenheit von 200 mg/l NaNO<sub>2</sub>. Die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen von fünf (Microarray) bzw. drei (qRT-PCR) biologisch unabhängigen Messungen mit den jeweiligen mitgeführten Duplikaten. Die RTLs der untersuchten Gene wurden gegen das RTL des Haushaltsgens *rpoB* normalisiert. Gene, deren log<sub>2</sub> RTLs sich über 1 und unter -1 befanden (gestrichelte Linie), wurden als reguliert angesehen.

Die Transkription der Gene *lmo0133*, *lmo0995*, *lmo1425* und *lmo2183* (log<sub>2</sub> RTLs =  $1,7 \pm 1,1$ ;  $1,2 \pm 0,5$ ;  $2,0 \pm 0,9$ ;  $2,1 \pm 0,1$ ) wurde durch die Zugabe von Nitrit aktiviert und die Transkription des Gens *pyrAB* (log<sub>2</sub> RTL =  $-5,0 \pm 1,3$ ) inhibiert. Dies stimmte mit den bereits vorhandenen Microarray-Daten überein, so dass diese als valide betrachtet werden können.

Bei der Analysierung der Microarray-Resultate konnte eine Transkriptionshemmung aller zehn Gene des *pyr*-Operons in Gegenwart von Nitrit identifiziert werden (*Imo1831-Imo1840*: *pyrE*, *pyrF*, *pyrD*, *pyrDII*, *pyrAB*, *pyrAa*, *pyrC*, *pyrB*, *pyrP* und *pyrR*;  $\log_2$  RTLs =  $-4,6 \pm 1,7$ ;  $-4,5 \pm 1,4$ ;  $-4,7 \pm 1,6$ ;  $-4,8 \pm 1,5$ ;  $-5,0 \pm 1,2$ ;  $-5,6 \pm 1,0$ ;  $-5,5 \pm 0,9$ ;  $-5,7 \pm 0,9$ ;  $-6,2 \pm 1,0$ ;  $-3,6 \pm 1,0$ ). Die Pyr-Proteine sind am Pyrimidin-Metabolismus beteiligt. Uridinmonophosphat (UMP) ist das wichtigste Intermediat in der Pyrimidin-Synthese und kann auf drei verschiedene Arten hergestellt werden: *De novo* von Glutamin ausgehend über Carbamoylphosphat und Orotat (Beteiligung von *pyrE*, *pyrF*, *pyrD*, *pyrDII*, *pyrAB*, *pyrAa*, *pyrC*, *pyrB* und *pyrP*), über die Phosphorylierung von Uridin oder über die Phosphoribosylierung von Uracil, welches über die Uracil-Permease (*pyrP*) in die Zelle aufgenommen werden kann. Die letzten beiden Reaktionen werden über die Uridinkinase (*udk*, *Imo1497*) oder die Uracil-Phosphoribosyltransferase (*upp*, *Imo2538*) bzw. PyrR (*Imo1840*) katalysiert, wobei PyrR neben seiner Uracil-Phosphoribosyltransferase-Aktivität ebenfalls als bifunktionales Pyrimidin-Regulatorprotein fungieren kann (vgl. [www.genome.jp/kegg](http://www.genome.jp/kegg)).

### 1.5 Einfluss von Nitrit auf das Wachstumsverhalten von *B. cereus* und *S. epidermidis*

Um den Einfluss von Nitrit auf das Wachstum anderer Gram-positiver Organismen zu testen, wurden Wachstumskurven von *B. cereus* und *S. epidermidis* mit und ohne  $\text{NaNO}_2$  erstellt. Die Versuche wurden dreimal reproduziert. Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abb. 9 zu sehen.



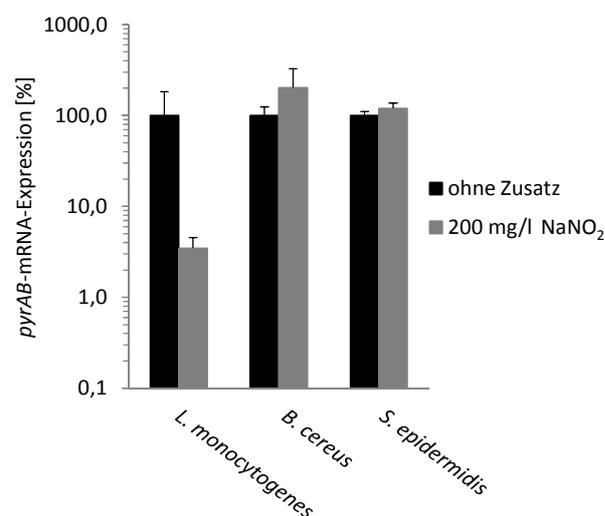
**Abb. 9: Nitrit-abhängiges Wachstum von *B. cereus* und *S. epidermidis*.** Repräsentative Wachstumskurven von *B. cereus* (A) und *S. epidermidis* (B) in gepuffertem BHI-Medium (pH 7) bei einer Inkubationstemperatur von 24 °C ohne (schwarze Linie) bzw. mit 200 mg/l  $\text{NaNO}_2$  (graue Linie).

Das Wachstum von *B. cereus* und *S. epidermidis* wurde durch die Anwesenheit von Nitrit im Gegensatz zu *L. monocytogenes* nur leicht gehemmt. *L. monocytogenes* weist somit *in vitro*

eine höhere Sensitivität gegenüber dem Pökelsalz  $\text{NaNO}_2$  auf, als dies bei den beiden anderen Gram-positiven Bakterien der Fall ist.

### 1.6 Nitrit-abhängige *pyrAB*-Transkription in *B. cereus* und *S. epidermidis*

Eine deutliche Wirkung von Nitrit auf Transkriptionsebene in *L. monocytogenes* zeigte sich in der Transkriptionshemmung der *pyr*-Gene (vgl. Kap. IV.1.4). In diesem Zusammenhang wurde auch die Transkription der *pyr*-Gene in *B. cereus* und *S. epidermidis* analysiert. Für die Untersuchung der Transkription der *pyr*-Gene wurde die Transkription des *pyrAB*-Gens, welches sich bei beiden Organismen in der Mitte des *pyr*-Operons befindet, mittels qRT-PCR in An- bzw. Abwesenheit von  $\text{NaNO}_2$  analysiert. Es wurden pro Bakterium jeweils drei biologisch unabhängige Messungen durchgeführt (Abb. 10).



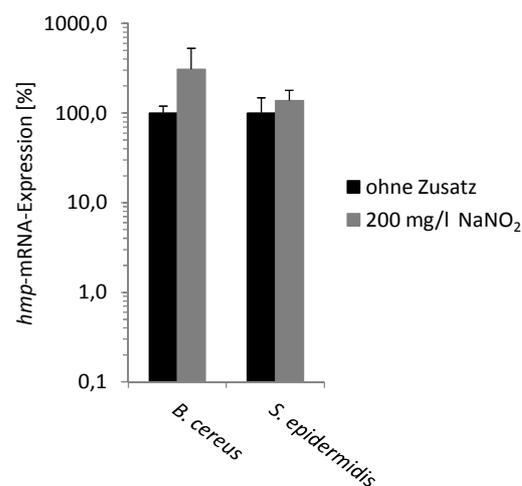
**Abb. 10: Nitrit-abhängige *pyrAB*-Transkription in *B. cereus* und *S. epidermidis*.** Dargestellt ist die *pyrAB*-mRNA-Expression (%) in *L. monocytogenes*, *B. cereus* und *S. epidermidis* in Ab- (schwarze Säulen) und Anwesenheit (graue Säulen) von 200 mg/l  $\text{NaNO}_2$ . Die *pyrAB*-mRNA-Menge der Zellen, welche ohne Nitrit inkubiert wurden, wurde als 100 % definiert. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen von drei biologisch unabhängig durchgeführten Experimenten inklusive den jeweiligen Duplikaten wieder. Als Referenz diente die Transkription des Haushaltsgens *rpoB*.

Die Transkription von *pyrAB* wurde in *S. epidermidis* durch die Anwesenheit von Nitrit nicht beeinflusst. In *B. cereus* wirkte sich Nitrit, im Gegensatz zu *L. monocytogenes*, aktivierend auf die Transkription von *pyrAB* aus (Verdreifachung der *pyrAB*-Transkription in Anwesenheit von Nitrit). Somit hat Nitrit nicht nur einen geringeren Einfluss auf das Wachstum von *B. cereus* und *S. epidermidis* als auf das Wachstum von *L. monocytogenes*. Es lassen sich

darüber hinaus auch auf Transkriptionsebene in Bezug auf die *pyrAB*-Transkription Unterschiede feststellen.

### 1.7 Nitrit-abhängige *hmp*-Transkription in *B. cereus* und *S. epidermidis*

Einer der Hauptgründe für die unterschiedliche Wirkung von Nitrit auf das Wachstum und die *pyrAB*-Transkription der Gram-positiven Bakterien *L. monocytogenes* und *B. cereus* bzw. *S. epidermidis* könnte in der An- bzw. Abwesenheit des NO-detoxifizierenden Flavohämoglobin Hmp liegen. Ein solches System ist in *L. monocytogenes* nicht annotiert (GLASER et al., 2001). Wie bereits erwähnt, ist NO eines der Hauptderivate von Nitrit und entsteht durch dessen Reduktion. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der höheren Nitrit-resistenz und dem Vorhandensein von Hmp zu untersuchen, wurden Transkriptionsstudien von *hmp* in *B. cereus* und *S. epidermidis* in An- und Abwesenheit von Nitrit mittels qRT-PCR durchgeführt (Abb. 11).

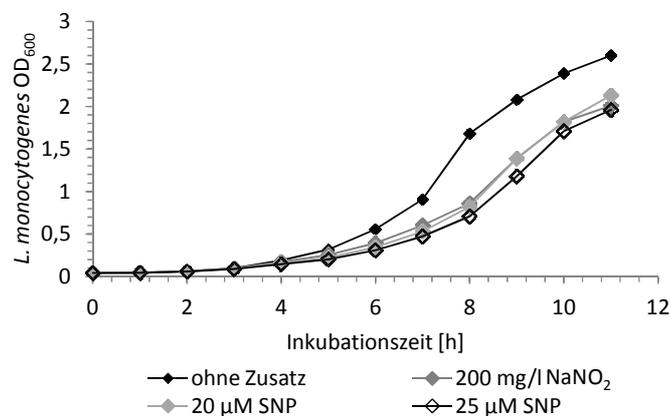


**Abb. 11: Nitrit-abhängige *hmp*-Transkription in *B. cereus* und *S. epidermidis*.** Aufgezeigt ist die mRNA-Expression des *hmp*-Gens in *B. cereus* und *S. epidermidis* in Abwesenheit (schwarze Säulen) und Gegenwart von 200 mg/l NaNO<sub>2</sub> (graue Säulen). Die transkribierte mRNA-Menge der nicht-induzierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichungen von drei biologisch unabhängigen Messungen inklusive den dazugehörigen Duplikaten. Die Transkription des Haushaltgens *rpoB* diente als Referenz.

Nitrit hat einen aktivierenden Einfluss auf die *hmp*-Transkription in *B. cereus* (dreifache Menge an mRNA in Anwesenheit von Nitrit), aber keinen signifikanten Effekt auf die *hmp*-Transkription in *S. epidermidis*. Dies lässt vermuten, dass dieser Organismus einen alternativen Abwehrmechanismus gegen Nitrit und dessen Derivate besitzt.

### 1.8 Vermindertes Wachstum von *L. monocytogenes* in Anwesenheit des NO-Donors SNP

In der Literatur wird häufig berichtet, dass nicht Nitrit selbst, sondern unter anderem dessen Derivat NO als antimikrobielles Agens im Pökelprozess wirkt (CAMMACK et al., 1999; FANG, 1997). Deshalb wurde das Wachstum von *L. monocytogenes* in An- und Abwesenheit des NO-Donors SNP (Natrium-Nitroprussid) untersucht. Eine repräsentative Wachstumskurve der drei durchgeführten Experimente wird in Abb. 12 gezeigt.

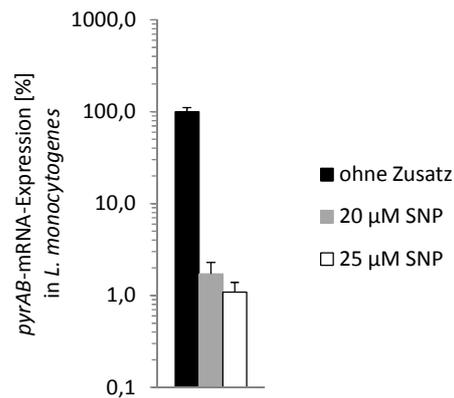


**Abb. 12: SNP-bedingte Wachstumshemmung von *L. monocytogenes*.** Repräsentative Wachstumskurve von *L. monocytogenes* EGDe in gepuffertem BHI-Medium (pH 7) bei 24 °C ohne (schwarze Linie) bzw. mit 200 mg/l NaNO<sub>2</sub> (dunkelgraue Linie), 20 µM (hellgraue Linie) oder 25 µM SNP (schwarze Linie mit farblich nicht gefüllten Diamanten).

Die Zugabe von 20 bzw. 25 µM SNP resultierte in einer ähnlichen Wachstumshemmung wie die, die in Gegenwart von 200 mg/l NaNO<sub>2</sub> beobachtet werden konnte. Daher wurde für weitere Analysen mit diesen SNP-Konzentrationen weitergearbeitet.

### 1.9 Untersuchung der SNP-abhängigen Transkription von *pyrAB* in *L. monocytogenes*

Ein Effekt der Nitrit-abhängigen Transkription in *L. monocytogenes* war die transkriptionelle Inaktivierung der *pyr*-Gene (vgl. Kap. IV.1.4). Deswegen wurde die Transkription von *pyrAB* in *L. monocytogenes* in An- und Abwesenheit von 20 bzw. 25 µM SNP mittels qRT-PCR untersucht. Es wurden zwei biologisch unabhängige Messungen durchgeführt (Abb. 13).

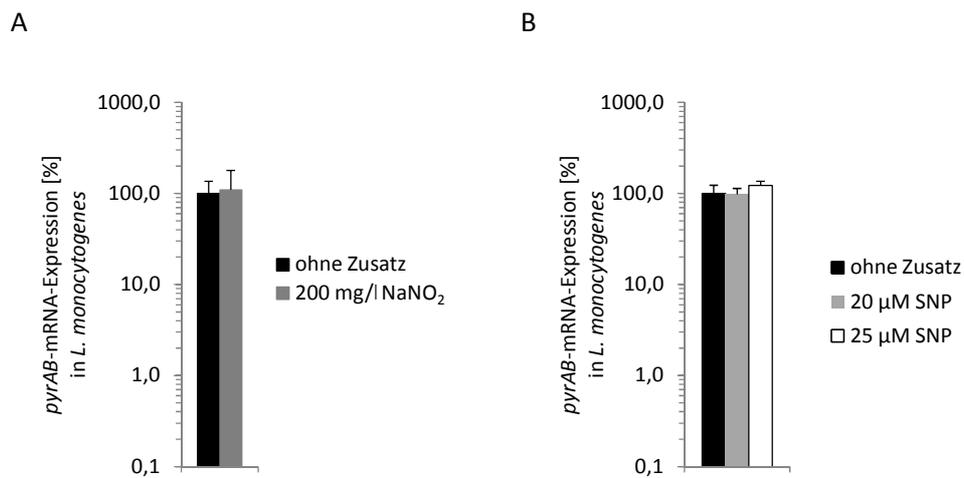


**Abb. 13: SNP-induzierte Transkriptionshemmung von *L. monocytogenes pyrAB*.** Aufgezeigt ist die Menge an *pyrAB*-mRNA in nicht-induzierten (schwarze Säule) und mit 20 (graue Säule) bzw. 25 µM SNP (weiße Säule) inkubierten Zellen in %. Die *pyrAB*-Transkription in den Zellen, welche mit keinerlei Additiven inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen zweier biologisch unabhängiger qRT-PCR-Durchgänge. Als Referenzgen diente *rpoB*.

Die Anwesenheit von 20 bzw. 25 µM SNP resultierte wie die von 200 mg/l NaNO<sub>2</sub> in einer Inhibierung der Transkription des *pyrAB*-Gens (vgl. Abb. 10).

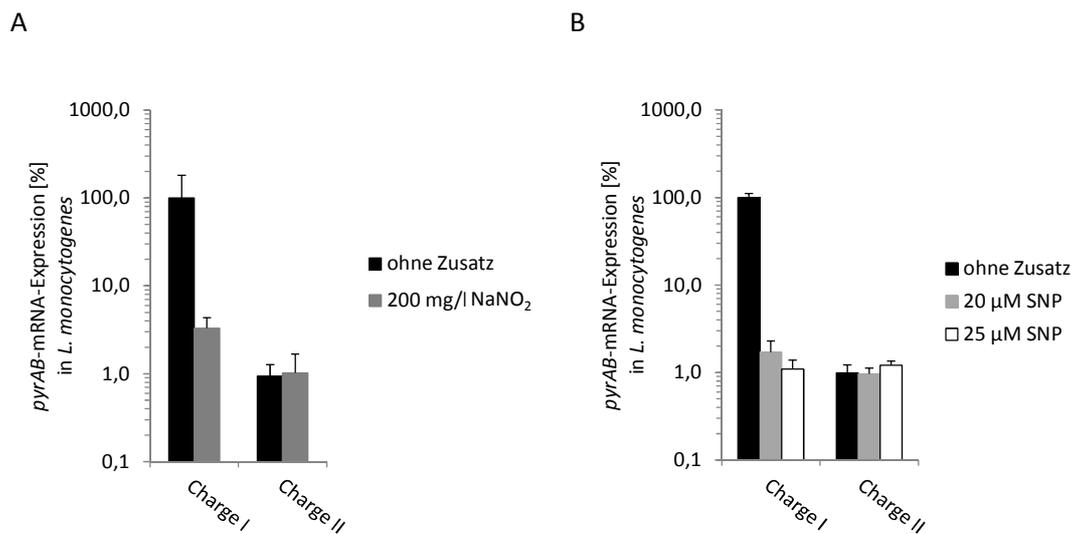
#### 1.10 Medienabhängige Inhibierung der *pyrAB*-Transkription in Anwesenheit von Nitrit und SNP

Wie bereits gezeigt, hemmt die Zugabe von 200 mg/l NaNO<sub>2</sub> bzw. 20 oder 25 µM SNP die *pyrAB*-Transkription (vgl. Kap. IV.1.4 und IV.1.9). Verwendet man allerdings für die Durchführung der qRT-PCR-Experimente BHI-Pellets einer anderen Charge des gleichen Herstellers (Charge II), lässt sich die Inhibierung der *pyrAB*-Transkription durch die Zugabe von Nitrit bzw. SNP nicht mehr feststellen (Abb. 14).



**Abb. 14: Einfluss von Nitrit auf die *pyrAB*-Transkription in *L. monocytogenes* in Charge II.** Dargestellt sind die jeweiligen *pyrAB*-mRNA-Mengen in % in den Zellen, welche in Gegenwart von (A) Nitrit (dunkelgraue Säule) bzw. (B) SNP (20 µM: hellgraue Säule; 25 µM: weiße Säule) oder ohne jegliche Additive (schwarze Säulen) in BHI-Charge II inkubiert wurden. Die mRNA-Expression der nicht-induzierten Zellen wurde auf 100 % gesetzt. Als Referenz diente *rpoB*. Die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen dreier biologisch unabhängiger qRT-PCR-Messungen.

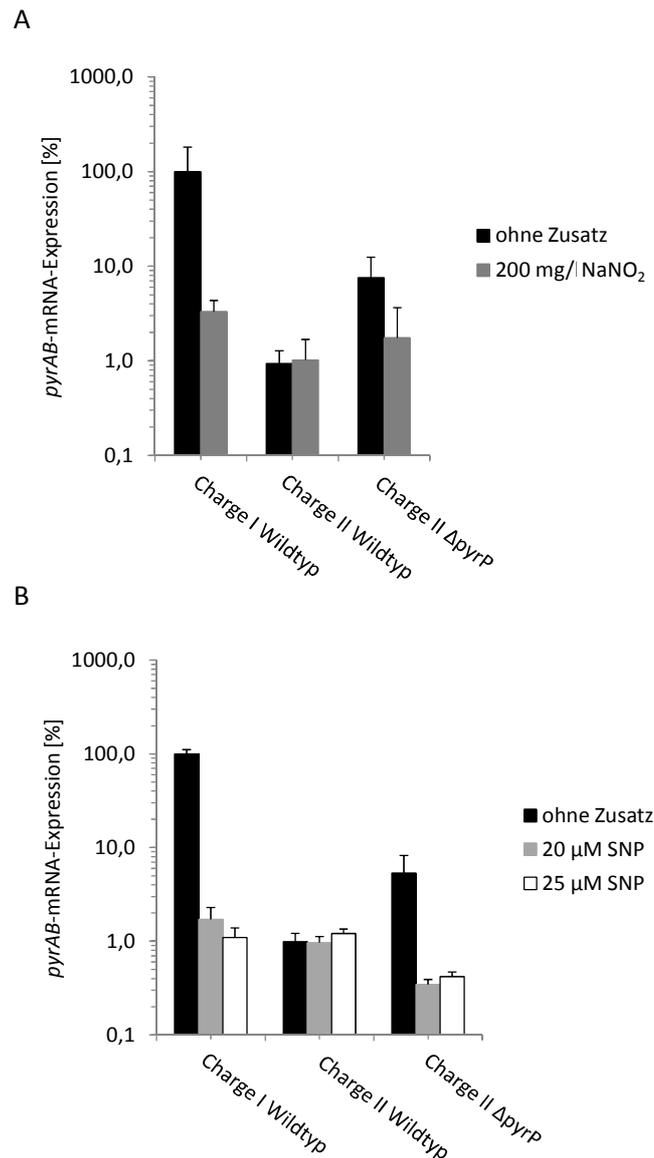
Vergleicht man die *pyrAB*-Transkription in den Zellen, die in Gegenwart von 200 mg/l NaNO<sub>2</sub>, 20 bzw. 25 µM SNP oder ohne Zusätze im Charge I und II Medium inkubiert wurden, so konnte im Charge II Medium ohne Zusätze nur eine geringe *pyrAB*-Transkription beobachtet werden (Abb. 15). Somit kann keine weitere Inhibierung der Transkription durch Nitrit und/oder SNP stattfinden (Abb. 15).



**Abb. 15: Medienabhängige *pyrAB*-Transkription in *L. monocytogenes*.** Angegeben sind die jeweiligen mRNA-Mengen an *pyrAB* in *L. monocytogenes* Zellen, welche in BHI-Charge I und II mit (A) Nitrit (dunkelgraue Säulen) bzw. (B) SNP (20 μM: hellgraue Säulen; 25 μM: weiße Säulen) oder ohne jegliche Additive (schwarze Säulen) angezogen wurden. Die mRNA-Expression in den nicht-induzierten Zellen, welche in Charge I inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt. *rpoB* diente als Referenzgen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zweier (Charge I ± SNP) bzw. dreier biologisch unabhängiger qRT-PCR-Messungen.

Ein Grund für die im Charge II Medium vorhandene geringe Basistranskription von *pyrAB* könnte möglicherweise in einer erhöhten Pyrimidin- bzw. Uracil-Konzentration im Medium zu finden sein. Sind bereits hohe Mengen an Uracil vorhanden, wirken sich diese negativ auf die Transkription der *pyr*-Gene aus. Es kommt zu einer negativen Feedback-Inhibierung (BONNER et al., 2001; LU et al., 1996).

Um diese These zu überprüfen, wurde eine *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta pyrP$  Mutante konstruiert. Diese kann den putativen Uracil-Transporter PyrP nicht mehr exprimieren. Anschließend wurde die Nitrit- und SNP-abhängige Transkription von *pyrAB* in den PyrP-defizienten Zellen mittels qRT-PCR untersucht (Abb. 16).

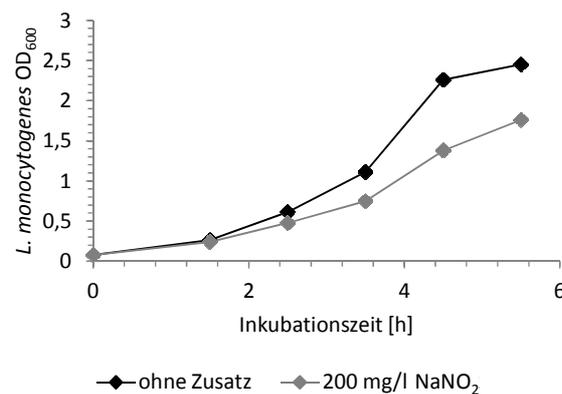


**Abb. 16: Nitrit-induzierte *pyrAB*-Transkription in *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ *pyrP*.** Analysiert wurde die *pyrAB*-Transkription im *L. monocytogenes* EGDe Wildtyp und der Mutante *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ *pyrP*, die in BHI-Charge I bzw. II mit (A) Nitrit (dunkelgraue Säulen) bzw. (B) SNP (20  $\mu$ M: hellgraue Säulen; 25  $\mu$ M: weiße Säulen) oder ohne Additive (schwarze Säulen) angezogen wurden. Die mRNA-Expression in den nicht-induzierten Zellen, welche in Charge I inkubiert wurden, wurde auf 100 % gesetzt. *rpoB* diente als Referenzgen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen zweier (Charge I Wildtyp  $\pm$  SNP) bzw. dreier biologisch unabhängiger qRT-PCR-Messungen.

Im Gegensatz zum Wildtyp konnte im Charge II Medium ohne Zusätze eine erhöhte Basistranskription von *pyrAB* in *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ *pyrP* festgestellt werden. Durch das Fehlen von PyrP können keine großen Uracilmengen aus dem Medium aufgenommen werden. Es kommt zu einer *de novo* Synthese von Uracil und zu einer Transkription der *pyr*-Gene. Durch die in der Deletionsmutante stattfindende *pyrAB*-Transkription können Nitrit und/oder SNP wieder inhibierend auf die Transkription von *pyrAB* wirken (Abb. 16).

### 1.11 Identifizierung weiterer Nitritangriffspunkte mit Hilfe einer *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank

Um weitere molekulare Angriffspunkte von Nitrit-Derivaten in der *L. monocytogenes* Zelle zu identifizieren, wurde das Wachstum einer *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank, welche circa 1600 Klone umfasst (JOSEPH et al., 2006; SCHAUER et al., 2010), in An- und Abwesenheit von 200 mg/l Nitrit durch Daniela Eder untersucht. In dieser Datenbank befinden sich *L. monocytogenes* Zellen, in denen das Plasmid pLSV101 zufällig in das Chromosom integriert ist und somit die Expression funktionsfähiger Proteine verhindert wird. Diese Insertion ist aufgrund des temperatursensitiven *ori* in Gram-positiven Bakterien bei 42 °C stabil. Ein Vorversuch zeigte, dass das Wachstum der Zellen auch bei 42 °C durch die Zugabe von NaNO<sub>2</sub> inhibiert wird (Abb. 17).



**Abb. 17: Wirkung von Nitrit auf das *L. monocytogenes* Wachstum bei 42 °C.** Repräsentative Wachstumskurve von *L. monocytogenes* Zellen, die in gepuffertem BHI-Medium (pH 7) in An- (schwarze Linie) und Abwesenheit (graue Linie) von 200 mg/l NaNO<sub>2</sub> bei einer Inkubationstemperatur von 42 °C angezogen wurden.

Es wurden pro Versuchsdurchführung 50 Mutanten gleichzeitig auf stärkeres oder schwächeres Wachstum in Anwesenheit von Nitrit analysiert. Die Definition eines stärkeren oder schwächeren Wachstums einer Mutante ergab sich einerseits aus dem Verhältnis der maximalen OD<sub>600</sub> mit Nitrit und der maximalen OD<sub>600</sub> ohne Nitrit ( $OD_{600\max}^{+\text{NO}_2^-} / OD_{600\max}^{-\text{NO}_2^-}$ ), andererseits aus der Berechnung des Wachstumsverhältnisses mit und ohne Nitrit aller Mutanten in einem Durchgang mit der dazugehörigen Standardabweichung. Das Wachstum von Mutanten, deren ( $OD_{600\max}^{+\text{NO}_2^-} / OD_{600\max}^{-\text{NO}_2^-}$ )-Verhältnis größer als der Mittelwert plus der Standardabweichung oder kleiner als der Mittelwert minus der Standardabweichung war, wurde in Anwesenheit von Nitrit als „stärker“ oder „schwächer“ bezeichnet. Es konnten insgesamt 16 Mutanten gefunden werden, deren Wachstum in

mindestens drei der vier Wachstumsanalysen pro Mutante durch Nitrit negativ beeinflusst wurde. Diese wurden mit Hilfe der pLSV101-spezifischen Primer durch GATC sequenziert und ihre Sequenz mit Hilfe von NCBI Blast gegen das *L. monocytogenes* EGD Genom geblastet (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Die Namen und Funktion der dabei identifizierten Gene sind in Tab. 6 aufgelistet.

**Tab. 6: Liste der durch Sequenzierung identifizierten Gene, deren Insertion sich im Vergleich zum Wildtyp nachteilig auf das *L. monocytogenes* EGD Wachstum in Gegenwart von Nitrit auswirkten.**

identifizierte Mutante	identifiziertes Gen	Annotation <sup>a)</sup>	genomische Anordnung <sup>b)</sup>
2-B5	<i>Imo1705</i> <sup>c)</sup>	ähnlich der Deoxyguanosinkinase/Deoxyadenosinkinase (I)- Untereinheit	
2-F9	<i>Imo2704</i> <sup>c)</sup>	<i>dnaX</i> ; DNA-Polymerase III ( $\gamma$ - und $\tau$ -Untereinheiten)	<i>op Imo2704-Imo2701</i>
3-F1	<i>Imo0794</i>	ähnlich dem Protein YwnB aus <i>B. subtilis</i>	
5-G2	<i>Imo0799</i>	CS	
6-B2	<i>Imo0941</i>	CS	<i>op Imo0942-Imo0940</i>
6-C3	<i>Imo0108</i>	ähnlich einem ABC-Transporter (ATP-bindendes Protein)	<i>op Imo0108-Imo0107</i>
7-B1	<i>Imo2488</i> <sup>c)</sup>	<i>uvrA</i> ; Excinuklease ABC (Untereinheit A)	<i>op Imo2489-Imo2488</i>
7-G3	<i>Imo0429</i>	ähnlich einer Zucker-Hydrolase	<i>op Imo0425-Imo0429</i>
12-D10	<i>Imo1363</i>	ähnlich einer Geranyltransferase	<i>op Imo1356-Imo1363</i>
12-F2	<i>Imo1042</i>	Molybdopterin-Biosynthese-Protein MoeA	<i>op Imo1041-Imo1047</i>
	<i>Imo1043</i>	Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid-Biosynthese-Protein MobB	
13-C 8	<i>Imo1675</i>	<i>menD</i> ; 2-Succinyl-6-Hydroxy-2,4-Cyclohexadien-1-Carboxylat-Synthase/2-Oxoglutarat-Decarboxylase	<i>op Imo1676-Imo1672</i>
14-F10	<i>Imo0587</i>	putativ sekretiertes Protein	
15-D5	<i>Imo1933</i>	ähnlich der GTP-Cyclohydrolase I	<i>op Imo1933-Imo1929</i>
16-B10	<i>Imo1811</i> <sup>c)</sup>	ähnlich der ATP-abhängigen DNA-Helikase G	<i>op Imo1812-Imo1811</i>
17-C4	<i>Imo2575</i>	ähnlich einem Kationen-Transportprotein (Efflux)	<i>op Imo2575-Imo2574</i>
17-H4	<i>Imo2430</i>	ähnlich einem Ferrichrom-ABC-Transporter (Permease) aus <i>B. subtilis</i>	

<sup>a)</sup> gemäß *ListiList* des Institut Pasteur (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>), CS = codierende Sequenz

<sup>b)</sup> op = Operon (TOLEDO-ARANA et al., 2009)

<sup>c)</sup> Gene, deren Produkte an der DNA-Synthese bzw. -Reparatur beteiligt sind

Unter den 16 sequenzierten Genen sind vier, deren Produkte an der DNA-Synthese bzw. DNA-Reparatur beteiligt sind (*Imo1705*, *Imo2704*, *Imo2488* und *Imo1811*). Inwieweit diese Systeme tatsächlich zum Schutz vor Nitrit bzw. dessen Derivate beitragen und wie ihre genaue Wirkungsweise ist, muss noch geklärt werden.

## 2. Temperaturabhängige Regulation des Stickstoffmetabolismus in *L. monocytogenes*

Das fakultativ intrazelluläre Bakterium *L. monocytogenes*, welches zum einen weit verbreitet in der Natur und zum anderen im menschlichen Wirt als Pathogen vorkommt, muss sich, je nach ökologischer Nische, an unterschiedliche Umweltbedingungen optimal anpassen. Eine dieser Bedingungen ist die Außentemperatur. Während die menschliche Körpertemperatur 37 °C beträgt, herrschen außerhalb des menschlichen Körpers niedrigere Temperaturen vor. Einige Studien konnten bereits eine temperaturabhängige Transkription in *L. monocytogenes in vitro* nachweisen (GARMYN et al., 2012; TOLEDO-ARANA et al., 2009; WILLIAMS et al., 2005). Die Daten dieser Studien stimmen jedoch nicht vollständig überein.

Ziel dieses Projekts ist es, das Transkriptom von *L. monocytogenes* EGDe unter Verwendung eines definierten Minimalmediums bei 24 °C (Raumtemperatur) und 37 °C (menschliche Körpertemperatur) zu vergleichen, um möglicherweise weitere temperaturabhängig transkribierte Gene zu identifizieren.

### 2.1 Identifizierung des temperaturabhängigen Transkriptoms in *L. monocytogenes*

Für die Untersuchung des temperaturabhängigen Transkriptoms in *L. monocytogenes* wurden die Zellen im Minimalmedium bei 24 °C bzw. 37 °C bis zum Erreichen einer optischen Dichte  $OD_{600} = 0,80-0,87$  angezogen. Als Stickstoffquelle diente Glutamin. Insgesamt wurden sechs biologisch unabhängige RNA-Sets generiert. Bei drei Sets wurde die cDNA der bei 24 °C inkubierten Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3-dCTP und die cDNA der bei 37 °C inkubierten Zellen mit Cy5-dCTP markiert. Bei den anderen drei RNA-Sets erfolgte die Fluoreszenzmarkierung genau entgegengesetzt. Gene, die eine temperaturabhängige Transkription zeigten, sind in Tab. 7 mit ihren jeweiligen Annotationen,  $\log_2$  RTL-Werten und Anordnungen auf dem Genom aufgelistet.

**Tab. 7A: Gene, welche bei 24 °C stärker transkribiert wurden als bei 37 °C.**

Gen	Annotation <sup>a)</sup>	log <sub>2</sub> RTL <sup>b)</sup>	genomische Anordnung <sup>c)</sup>
<i>lmo0201</i>	<i>plcA</i> ; Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C	1,4 ± 0,7	<i>op lmo0201-lmo0200</i>
<i>lmo0641</i>	ähnlich einer Schwermetall-transportierenden ATPase	1,5 ± 0,6	
<i>lmo0690</i> <sup>1) 2)</sup>	<i>flaA</i> ; Flagellinprotein	2,0 ± 1,6	
<i>lmo0692</i> <sup>1) 2)</sup>	<i>cheA</i> ; Zwei-Komponenten-Sensor-Histidinkinase CheA	2,6 ± 1,3	<i>op lmo0691-lmo0718</i>
<i>lmo0695</i> <sup>1) 2)</sup>	CS	2,9 ± 1,5	<i>op lmo0691-lmo0718</i>
<i>lmo0698</i> <sup>1) 2)</sup>	leicht ähnlich einem flagellären Switch-Protein	1,9 ± 0,9	<i>op lmo0691-lmo0718</i>
<i>lmo0707</i> <sup>1) 2)</sup>	Haken-assoziiertes Protein 2 FliD	1,8 ± 0,9	<i>op lmo0691-lmo0718</i>
<i>lmo0708</i> <sup>1) 2)</sup>	ähnlich einem hypothetischen Flagellenprotein	1,8 ± 0,9	<i>op lmo0691-lmo0718</i>
<i>lmo0710</i> <sup>1) 2)</sup>	Basalkörper-Zylinderprotein FlgB	1,4 ± 0,6	<i>op lmo0691-lmo0718</i>
<i>lmo0713</i> <sup>1) 2)</sup>	Basalkörper-M-Ring-Protein FliF	1,5 ± 0,8	<i>op lmo0691-lmo0718</i>
<i>lmo0715</i> <sup>1) 2)</sup>	CS	1,2 ± 0,6	<i>op lmo0691-lmo0718</i>
<i>lmo0726</i>	hypothetische CS	2,1 ± 0,6	
<i>lmo0727</i>	ähnlich einer L-Glutamin-D-Fruktose-6-Phosphat-Amidotransferase	1,6 ± 0,6	
<i>lmo0845</i>	ähnlich den Proteinen YxjH und YxjG aus <i>B. subtilis</i>	1,2 ± 0,5	
<i>lmo1001</i>	ähnlich dem Protein YkvS aus <i>B. subtilis</i>	1,2 ± 0,3	
<i>lmo1112</i>	sehr ähnlich dem TN916 ORF21	1,5 ± 0,5	
<i>lmo1298</i>	<i>glnR</i> ; Glutamin-Synthetase-Repressor GlnR	5,2 ± 1,6	<i>op lmo1298-lmo1299*</i>
<i>lmo1299</i>	<i>glnA</i> ; Glutamin-Synthetase GlnA	4,4 ± 1,0	<i>op lmo1298-lmo1299*</i>
<i>lmo1516</i> <sup>2) 3)</sup>	<i>amtB</i> ; Ammonium-Transporter AmtB (früher NrgA)	7,7 ± 0,7	<i>op lmo1516-lmo1517</i>
<i>lmo1517</i> <sup>3)</sup>	<i>glnK</i> ; PII Stickstoff-Regulatorprotein GlnK	7,3 ± 1,1	<i>op lmo1516-lmo1517</i>
<i>lmo1518</i> <sup>3)</sup>	CS	5,1 ± 1,1	
<i>lmo1870</i>	ähnlich einer alkalischen Phosphatase	1,3 ± 0,2	
<i>lmo2101</i>	ähnlich einem für die Pyridoxin-Synthese benötigten Protein	3,0 ± 1,2	<i>op lmo2101-lmo2102</i>
<i>lmo2102</i> <sup>3)</sup>	CS	3,0 ± 1,2	<i>op lmo2101-lmo2102</i>
<i>lmo2269</i>	CS	1,4 ± 0,8	<i>op lmo2269-lmo2264</i>
<i>lmo2486</i>	CS	1,4 ± 0,7	<i>op lmo2487-lmo2484</i>
<i>lmo2588</i>	ähnlich einem Wirkstoff-exportierenden Protein	1,8 ± 0,8	
<i>lmo2692</i>	CS	1,7 ± 0,5	<i>op lmo2694-lmo2692</i>

**Tab. 7B: Gene, welche bei 37 °C stärker transkribiert wurden als bei 24 °C.**

Gen	Annotation <sup>a)</sup>	log <sub>2</sub> RTL <sup>b)</sup>	genomische Anordnung <sup>c)</sup>
<i>Imo0050</i>	<i>agrC</i> ; Sensor-Histidinkinase (AgrC aus <i>Staphylococcus</i> )	-1,9 ± 0,5	op <i>Imo0048-Imo0051</i>
<i>Imo0051</i> <sup>1) 2) 3)</sup>	<i>agrA</i> ; Zwei-Komponenten-Response-Regulatorprotein (AgrA aus <i>Staphylococcus</i> )	-1,9 ± 0,5	op <i>Imo0048-Imo0051</i>
<i>Imo0096</i>	ähnlich dem Mannose-spezifischen PTS-System-Faktor IIAB	-2,0 ± 0,4	op <i>Imo0096-Imo0098</i>
<i>Imo0098</i>	ähnlich dem Mannose-spezifischen PTS-System-Faktor IID	-2,4 ± 0,5	op <i>Imo0096-Imo0098</i>
<i>Imo0099</i>	CS	-1,4 ± 0,3	
<i>Imo0423</i>	ähnlich einem Sigmafaktor (ECF-Typ) der RNA-Polymerase	-1,7 ± 0,5	op <i>Imo0423-Imo0421</i>
<i>Imo0434</i> <sup>1) 2)</sup>	<i>inlB</i> ; Internalin B	-1,8 ± 0,3	op <i>Imo0433-Imo0434</i>
<i>Imo0477</i> <sup>2)</sup>	putatives sekretiertes Protein	-2,2 ± 0,4	
<i>Imo0478</i> <sup>2) 3)</sup>	putatives sekretiertes Protein	-2,1 ± 0,4	
<i>Imo0560</i>	<i>gdh</i> ; NADP-spezifische Glutamat-Dehydrogenase	-3,8 ± 0,7	
<i>Imo0778</i> <sup>2)</sup>	CS	-3,0 ± 0,5	
<i>Imo0866</i>	CS	-1,6 ± 0,5	
<i>Imo0997</i>	<i>clpE</i> ; ATP-abhängige Protease	-1,6 ± 0,4	
<i>Imo1067</i>	ähnlich einem GTP-bindenden Elongationsfaktor	-1,4 ± 0,3	
<i>Imo1073</i>	ähnlich einem Metall-bindenden Protein (ABC-Transporter)	-1,5 ± 0,3	
<i>Imo1075</i>	ähnlich dem Teichonsäure-Translokation ATP-bindenden Protein TagH (ABC-Transporter)	-1,2 ± 0,6	op <i>Imo1074-Imo1075</i>
<i>Imo1303</i> <sup>3)</sup>	ähnlich dem Protein YneA aus <i>B. subtilis</i>	-1,6 ± 0,4	
<i>Imo1304</i> <sup>3)</sup>	ähnlich dem Protein YnzC aus <i>B. subtilis</i>	-1,4 ± 0,3	
<i>Imo1536</i> <sup>1)</sup>	ähnlich der Prephenat-Dehydratase PheA	-1,4 ± 0,5	op <i>Imo1537-Imo1536</i>
<i>Imo1671</i>	ähnlich ABC-Transportern und Adhäsionsproteinen	-1,4 ± 1,1	
<i>Imo1751</i>	ähnlich einer hypothetischen RNA-Methyltransferase	-1,5 ± 0,4	op <i>Imo1752-Imo1751</i>
<i>Imo1752</i> <sup>1)</sup>	CS	-1,4 ± 0,4	op <i>Imo1752-Imo1751</i>
<i>Imo1764</i>	<i>purD</i> ; Phosphoribosylglyzinamid-Synthetase	-2,2 ± 1,0	op <i>Imo1764-Imo1775</i>
<i>Imo1765</i>	<i>purH</i> ; Bifunktionelle Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxy-Formyl-Formyltransferase und Inosinmonophosphat-Cyclohydrolase	-2,0 ± 1,0	op <i>Imo1764-Imo1775</i>

<i>Imo1766</i>	<i>purN</i> ; sehr ähnlich den Phosphoribosylglyzinamid-Formyltransferasen	-1,9 ± 1,1	op <i>Imo1764-Imo1775</i>
<i>Imo1939</i>	<i>cmK</i> ; Cytidylatkinase	-1,1 ± 0,3	
<i>Imo1975</i> <sup>3)</sup>	ähnlich dem durch DNA-Schäden induzierbaren Protein DinP aus <i>E. coli</i>	-1,7 ± 0,3	
<i>Imo2105</i>	ähnlich einem Eisen-Transportprotein B	-2,3 ± 0,9	op <i>Imo2104-Imo2105</i>
<i>Imo2151</i>	ähnlich unbekanntem Proteinen	-1,5 ± 0,6	
<i>Imo2250</i>	<i>arpJ</i> ; Aminosäure-ABC-Transporter (Permeaseprotein)	-2,4 ± 0,5	op <i>Imo2250-Imo2252</i>
<i>Imo2252</i> <sup>3)</sup>	ähnlich einer Aspartat-Aminotransferase	-1,8 ± 0,4	op <i>Imo2250-Imo2252</i>
<i>Imo2271</i>	CS	-1,7 ± 0,4	
<i>Imo2548</i>	<i>rpmE</i> ; ribosomales Protein L31	-1,5 ± 0,7	
<i>Imo2551</i>	<i>rho</i> ; Transkriptionsterminator Rho	-1,2 ± 0,4	op <i>Imo2551-Imo2550</i>
<i>Imo2553</i>	konserviertes hypothetisches Protein	-1,3 ± 0,3	op <i>Imo2555-Imo2552</i>
<i>Imo2554</i>	ähnlich einer Galactosyltransferase	-1,4 ± 0,3	op <i>Imo2555-Imo2552</i>
<i>Imo2580</i>	ähnlich einem ABC-Transporter (ATP-Bindeprotein)	-1,6 ± 0,6	
<i>Imo2581</i> <sup>2)</sup>	konserviertes hypothetisches Protein	-2,5 ± 0,5	
<i>Imo2656</i>	<i>rpsL</i> ; ribosomales Protein S12	-1,3 ± 0,5	op <i>Imo2656-Imo2653</i>
<i>Imo2675</i> <sup>1) 3)</sup>	CS	-1,7 ± 0,3	op <i>Imo2675-Imo2676</i>
<i>Imo2676</i> <sup>1)</sup>	ähnlich einem UV-Schaden reparierenden Protein	-1,5 ± 0,3	op <i>Imo2675-Imo2676</i>
<i>Imo2760</i>	ähnlich einem ABC-Transporter (ATP-Bindeprotein)	-1,9 ± 0,5	
<i>Imo2810</i>	<i>gidA</i> ; Protein GidA	-1,5 ± 0,5	op <i>Imo2811-Imo2810</i>
<i>Imo2828</i>	CS	-1,3 ± 0,2	

<sup>a)</sup> gemäß *ListiList* des *Institut Pasteur* (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>), CS = codierende Sequenz

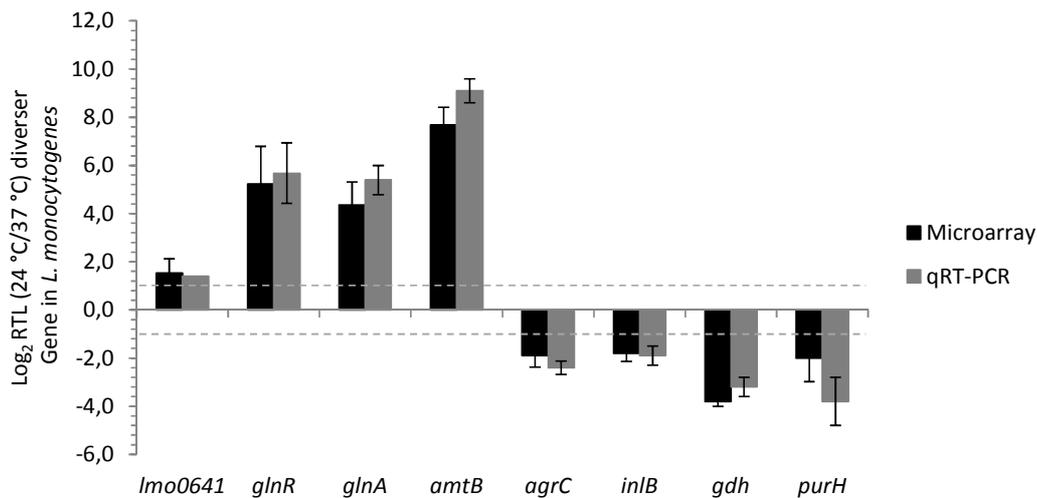
<sup>b)</sup> RTL = Relatives Transkriptionslevel = Transkription in Gegenwart von Glutamin bei 24 °C verglichen zu 37 °C

<sup>c)</sup> op = Operon (TOLEDO-ARANA et al., 2009); \*Operon wurde nicht durch Toledo-Arana identifiziert, ist jedoch in der Literatur für Gram-positive Bakterien weitgehend beschrieben (BOLOTIN et al., 2001; DOROSHCHUK et al., 2006; STRAUCH et al., 1988). Bei (WURTZEL et al., 2012) wurde kein eigener Transkriptionsstart für *glnA* identifiziert.

<sup>1), 2), 3)</sup> Gene, welche tendenziell die gleiche temperaturabhängige Transkription zeigten wie bereits bei <sup>1)</sup> (WILLIAMS et al., 2005), <sup>2)</sup> (TOLEDO-ARANA et al., 2009) und <sup>3)</sup> (GARMYN et al., 2012) beschrieben.

Es konnten 72 temperaturabhängig transkribierte Gene identifiziert werden. Davon wurden 28 bei 24 °C (Tab. 7A) und 44 bei 37 °C (Tab. 7B) stärker transkribiert.

Zur Validierung der Microarray-Experimente wurde die temperaturabhängige Transkription ausgewählter Gene (*Imo0641*, *glnR*, *glnA*, *amtB*, *gdh*, *argC*, *inlB* und *purH*) mittels qRT-PCR untersucht (Abb. 18).



**Abb. 18: Validierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR.** Dargestellt sind die  $\log_2$  RTLs der Gene *lmo0641*, *glnR*, *glnA*, *amtB*, *gdh*, *agrC*, *inlB* und *purH* von Zellen, welche im Minimalmedium bei 24 °C bzw. 37 °C angezogen wurden. Die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichungen von sechs (Microarray, schwarze Säulen) bzw. drei (qRT-PCR, graue Säulen) biologisch unabhängigen Messungen mit den jeweils mitgeführten Duplikaten. Die RTLs der untersuchten Gene wurden gegen das RTL des Haushaltsgens *rpoB* (*glnA*, *amtB*, *gdh*) bzw. des Gens der ribosomalen 16S RNA (*lmo0641*, *glnR*, *agrC*, *inlB*, *purH*) normalisiert. Die Gene, deren  $\log_2$  RTL-Werte größer 1 bzw. kleiner -1 (gekennzeichnet durch gestrichelte graue Linie) waren, wurden als reguliert angesehen.

Die Gene *lmo0641*, *glnR*, *glnA* und *amtB* zeigten eine stärkere Transkription bei 24 °C und die Gene *agrC*, *inlB*, *gdh* und *purH* eine stärkere Transkription bei 37 °C. Diese Ergebnisse stimmen mit den Microarray-Daten überein.

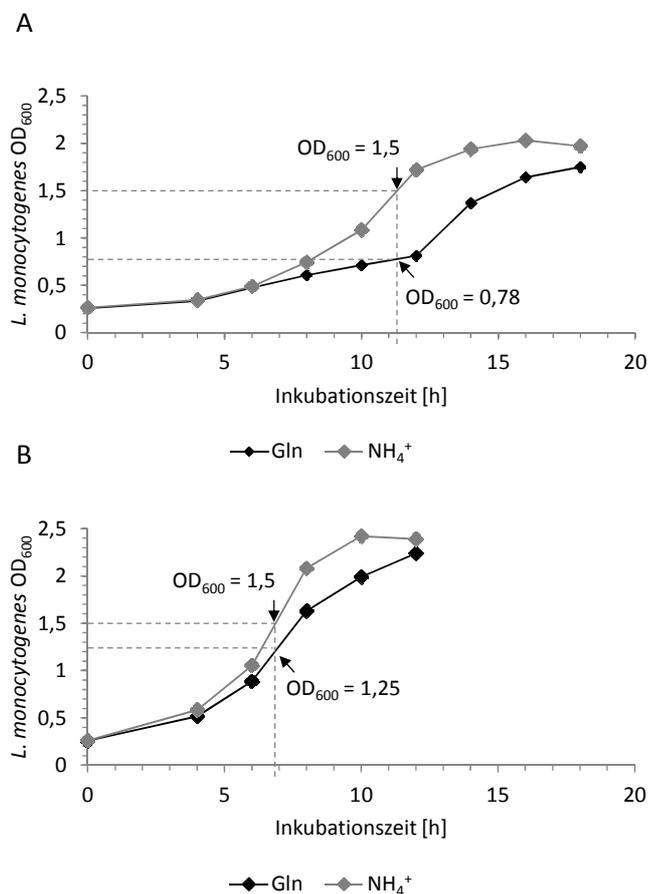
Unter den bei 24 °C stärker transkribierten Genen befanden sich *glnR* (*lmo1298*;  $\log_2$  RTL:  $5,2 \pm 1,6$ ), *glnA* (*lmo1299*;  $\log_2$  RTL:  $4,4 \pm 1,0$ ), *amtB* (*lmo1516*;  $\log_2$  RTL:  $7,7 \pm 0,7$ ) und *glnK* (*lmo1517*;  $\log_2$  RTL:  $7,3 \pm 1,0$ ). Diese Gene kodieren für den globalen Stickstoffregulator GlnR, die Glutamin-Synthetase GlnA, den Ammonium-Transporter AmtB sowie das PII Regulatorprotein GlnK. Alle diese Proteine sind am Stickstoffmetabolismus Gram-positiver Bakterien beteiligt (AMON et al., 2010).

Das Gen *gdh*, das für die NADP-abhängige Glutamat-Dehydrogenase kodiert und ebenfalls am Stickstoffmetabolismus beteiligt ist, zeigte hingegen eine stärkere Transkription bei 37 °C (*lmo0560*;  $\log_2$  RTL:  $-3,8 \pm 0,7$ ).

## 2.2 Temperaturabhängiges Wachstum von *L. monocytogenes* mit Glutamin als Stickstoffquelle

Aufgrund der durch die Microarray-Daten identifizierten temperaturabhängigen Transkription von Genen, deren Proteine eine wichtige Rolle im Stickstoffmetabolismus Gram-positiver Bakterien spielen, wurde anschließend das Wachstum von *L. monocytogenes*

im Minimalmedium bei 24 °C und 37 °C getestet. Das Medium enthielt dabei als einzige Stickstoffquelle entweder Glutamin oder Ammonium. Die Analysen wurden dreimal durchgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abb. 19 dargestellt.



**Abb. 19: Wachstum von *L. monocytogenes* mit Glutamin bzw. Ammonium als Stickstoffquelle.** Repräsentative Wachstumskurven von *L. monocytogenes* EGDe Zellen, die im Minimalmedium mit Glutamin (Gln) bzw. Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) als Stickstoffquellen bei (A) 24 °C bzw. (B) 37 °C inkubiert wurden. Die Bestimmung der  $\text{OD}_{600}$ -Werte erfolgte alle zwei Stunden. Die Pfeile markieren die  $\text{OD}_{600} = 1,5$  Werte, die durch die mit  $\text{NH}_4^+$  angezogenen Zellen erreicht wurden, und die dazugehörigen  $\text{OD}_{600}$ -Werte der mit Glutamin inkubierten Zellen.

Zur genaueren Analyse des Experiments wurde der Zeitpunkt, bei dem die mit Ammonium inkubierten Zellen eine  $\text{OD}_{600}$  von 1,5 erreichten, als Referenz für das Wachstum in Gegenwart von Glutamin verwendet. Während die Zellen mit Glutamin bei 24 °C zu diesem Zeitpunkt eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,78 aufwiesen, vermehrten sie sich bei 37 °C bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 1,25. Glutamin als Stickstoffquelle führte damit bei 37 °C zu einem stärkeren Zellwachstum als bei 24° C. Des Weiteren war zu beobachten, dass sich Ammonium für *L. monocytogenes* bei beiden Temperaturen als die bessere Stickstoffquelle erwies.

### 2.3 Identifizierung des GlnR-Regulons in *L. monocytogenes* bei 24 °C und 37 °C

Die in den Microarray-Experimenten identifizierte temperaturabhängige Transkription der Gene *glnRA*, *amtB-glnK* und *gdh* weist auf eine temperaturabhängige Regulation des Stickstoffmetabolismus in *L. monocytogenes* EGDe hin (vgl. Kap. IV.2.1). Da es sich bei GlnR um einen Hauptregulator des Stickstoffmetabolismus in *B. subtilis* handelt (SCHREIER et al., 1989), kann vermutet werden, dass dieser Regulator eventuell an der temperaturabhängigen Regulation der Stickstoffgene in *L. monocytogenes* beteiligt ist. GlnR-Bindemotive in den Promotersequenzen der Gene *glnRA* und *amtB-glnK* konnten bereits *in silico* detektiert werden (DOROSHCHUK et al., 2006), was diese Überlegung stützt. Um die Beteiligung von GlnR an der temperaturabhängigen Regulation der Stickstoffgene in *L. monocytogenes* experimentell zu untersuchen, wurde das Transkriptom von *L. monocytogenes* EGDe mit dem einer *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ *glnR* Mutante bei 24 °C bzw. 37 °C mittels NGS verglichen. Hierfür wurden die beiden Stämme im Minimalmedium mit Glutamin als Stickstoffquelle bei der jeweiligen Temperatur bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,80 bis 0,85 inkubiert. Gene, deren Transkription durch das Fehlen von GlnR bei 24 °C, bei 37 °C oder bei beiden Temperaturen beeinflusst wurde, sind mit Namen, Annotationen und genomischen Anordnungen in Tab. 8 aufgelistet.

**Tab. 8: Das temperaturabhängige Regulon von GlnR in *L. monocytogenes* EGDe.**

Gen	Annotation <sup>a)</sup>	log <sub>2</sub> RTL <sup>b)</sup>		genomische Anordnung <sup>c)</sup>
		24 °C	37 °C	
<i>Imo0117</i>	<i>ImaB</i> ; Antigen B	0,95	-7,31	<i>op Imo0115-Imo0129</i>
<i>Imo0209</i>	CS	-0,52	2,07	
<i>Imo0257</i>	ähnlich einem unbekanntem Protein	-2,47	1,71	
<i>Imo0407</i>	CS	-3,28	-0,09	<i>op Imo0405-Imo0408</i>
<i>Imo0408</i>	CS	-3,15	n. d.	<i>op Imo0405-Imo0408</i>
<i>Imo0439</i>	leicht ähnlich einem Peptid-Synthetase-Element	-0,56	-7,77	
<i>Imo0449</i>	CS	n. d.	-7,31	
<i>Imo0534</i>	ähnlich unbekanntem Proteinen	n. d.	2,25	<i>op Imo0533-Imo0534</i>
<i>Imo0560</i> <sup>+) </sup>	<i>gdh</i> ; NADP-spezifische Glutamat-Dehydrogenase	6,27	-0,76	
<i>Imo0604</i>	ähnlich dem Protein YvIA aus <i>B. subtilis</i>	n. d.	-7,22	
<i>Imo0613</i>	ähnlich einer Oxidoreduktase	-3,02	n. d.	<i>op Imo0612-Imo0613</i>
<i>Imo0751</i>	CS	-0,24	-8,56	<i>op Imo0748-Imo0751</i>
<i>Imo0796</i>	konserviertes hypothetisches Protein	-2,38	-2,80	
<i>Imo0819</i>	CS	-3,02	n. d.	<i>op Imo0818-Imo0821</i>

<i>Imo0829</i>	<i>nifJ</i> ; Pyruvat-Flavodoxin-Oxidoreduktase	2,05	0,87	
<i>Imo0943</i>	<i>fri</i> ; nicht Häm-Eisen-bindendes Ferritin	-0,34	-2,14	
<i>Imo0962</i>	<i>lemA</i> ; Listeria Epitop LemA	3,02	n. d.	op <i>Imo0962-Imo0693</i>
<i>Imo1028</i>	ähnlich dem Protein YkzG aus <i>B. subtilis</i>	-3,02	n. d.	op <i>Imo1028-Imo1027</i>
<i>Imo1069</i>	ähnlich dem Protein Yia aus <i>B. subtilis</i>	-0,51	-2,60	
<i>Imo1082</i>	ähnlich einer dTDP-Zucker-Epimerase	1,37	2,04	op <i>Imo1080-Imo1084</i>
<i>Imo1241</i>	CS	-2,89	0,86	
<i>Imo1272</i>	konserviertes hypothetisches Protein; ähnlich dem Protein YlqF aus <i>B. subtilis</i>	-0,64	-3,09	op <i>Imo1269-Imo1273</i>
<i>Imo1285</i>	konserviertes hypothetisches Protein; ähnlich dem Protein YneT aus <i>B. subtilis</i>	1,33	-7,56	op <i>Imo1285-Imo1287</i>
<i>Imo1298</i> <sup>+) </sup>	<i>glnR</i> ; Glutamin-Synthetase-Repressor GlnR	3,57	7,00	op <i>Imo1298-Imo1299*</i>
<i>Imo1299</i> <sup>+) </sup>	<i>glnA</i> ; Glutamin-Synthetase GlnA	2,40	5,14	op <i>Imo1298-Imo1299*</i>
<i>Imo1321</i>	konserviertes hypothetisches Protein, ähnlich dem Protein YlxS aus <i>B. subtilis</i>	n. d.	-7,63	op <i>Imo1315-Imo1327</i>
<i>Imo1330</i>	<i>rpsO</i> ; ribosomales Protein S15	n. d.	-7,31	
<i>Imo1376</i>	ähnlich einer 6-Phosphogluconat- Dehydrogenase	-2,08	0,74	
<i>Imo1385</i>	ähnlich einem unbekanntem Protein	0,02	2,02	op <i>Imo1385-Imo1386</i>
<i>Imo1454</i>	<i>rpoD</i> ; RNA-Polymerase-Sigmafaktor RpoD	-1,80	-3,11	
<i>Imo1461</i>	CS	-0,43	-7,90	
<i>Imo1516</i> <sup>+) </sup>	<i>amtB</i> ; Ammonium-Transporter AmtB (früher NrgA)	-2,69	n. d.	op <i>Imo1516-Imo1517</i>
<i>Imo1517</i> <sup>+) </sup>	<i>amtK</i> ; PII Stickstoff-Regulatorprotein GlnK	-3,85	n. d.	op <i>Imo1516-Imo1517</i>
<i>Imo1518</i> <sup>+) </sup>	CS	-4,64	n. d.	
<i>Imo1522</i>	ähnlich unbekanntem Proteinen	n. d.	-7,83	op <i>Imo1523-Imo1522</i>
<i>Imo1524</i>	<i>apt</i> ; Adenin-Phosphoribosyltransferase	-7,46	n. d.	op <i>Imo1525-Imo1524</i>
<i>Imo1526</i>	ähnlich unbekanntem Proteinen	-1,72	-3,71	
<i>Imo1569</i>	ähnlich unbekanntem Proteinen	n. d.	-7,12	op <i>Imo1569-Imo1566</i>
<i>Imo1602</i>	ähnlich unbekanntem Proteinen	0,24	-2,32	op <i>Imo1602-Imo1601</i>
<i>Imo1604</i>	ähnlich dem 2-Cys-Peroxiredoxin	2,34	n. d.	
<i>Imo1631</i>	<i>trpD</i> ; Anthranilat- Phosphoribosyltransferase	-2,04	0,18	op <i>Imo1633-Imo1627</i>
<i>Imo1666</i>	an Peptidoglykan gebundenes Protein (LPXTG)	-2,08	-0,99	op <i>Imo1669-Imo1666</i>
<i>Imo1672</i>	<i>menE</i> ; O-Succinyl-Benzoat-CoA-Ligase	n. d.	-2,91	op <i>Imo1676-Imo1672</i>
<i>Imo1700</i>	CS	-2,32	-1,20	op <i>Imo1699-Imo1700</i>
<i>Imo1711</i>	sehr ähnlich einer Aminopeptidase	-2,06	1,12	op <i>Imo1711-Imo1712</i>
<i>Imo1733</i>	ähnlich einer Glutamat-Synthase (kleine Untereinheit)	2,53	-0,38	op <i>Imo1734-Imo1733</i>

<i>Imo1734</i>	ähnlich einer Glutamat-Synthase (große Untereinheit)	2,34	0,02	<i>op Imo1734-Imo1733</i>
<i>Imo1742</i>	<i>adeC</i> ; Adenin-Desaminase	3,40	0,04	<i>op Imo1747-Imo1741</i>
<i>Imo1745</i>	ähnlich einem Zwei-Komponenten-Response-Regulator	2,32	0,33	<i>op Imo1747-Imo1741</i>
<i>Imo1764</i> <sup>+) </sup>	<i>purD</i> ; Phosphoribosylglyzinamid-Synthetase	2,75	-0,26	<i>op Imo1775-Imo1764</i>
<i>Imo1765</i> <sup>+) </sup>	<i>purH</i> ; Bifunktionelle Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxy-Formyl-Formyltransferase und Inosinmonophosphat-Cyclohydrolase	2,93	-0,09	<i>op Imo1775-Imo1764</i>
<i>Imo1766</i> <sup>+) </sup>	<i>purN</i> ; Phosphoribosylglyzinamid-Formyltransferase	2,69	-0,19	<i>op Imo1775-Imo1764</i>
<i>Imo1767</i>	<i>purM</i> ; Phosphoribosylaminoimidazol-Synthetase	2,66	-0,85	<i>op Imo1775-Imo1764</i>
<i>Imo1768</i>	<i>purF</i> ; Glutamin-Phosphoribosylpyrophosphat-Amidotransferase	3,47	-0,05	<i>op Imo1775-Imo1764</i>
<i>Imo1769</i>	<i>purQ</i> ; Phosphoribosylformylglyzinamid-Synthetase I	2,92	1,09	<i>op Imo1775-Imo1764</i>
<i>Imo1770</i>	<i>purL</i> ; Phosphoribosylformylglyzinamid-Synthetase II	3,02	-0,24	<i>op Imo1775-Imo1764</i>
<i>Imo1771</i>	ähnlich einem unbekanntem Protein	3,53	0,35	<i>op Imo1775-Imo1764</i>
<i>Imo1772</i>	<i>purC</i> ; Phosphoribosylaminoimidazol-Succinocarboxamid-Synthetase	2,15	-0,46	<i>op Imo1775-Imo1764</i>
<i>Imo1773</i>	<i>purB</i> ; Adenylosuccinat-Lyase	2,29	0,28	<i>op Imo1775-Imo1764</i>
<i>Imo1775</i>	<i>purE</i> ; Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase I	3,72	2,10	<i>op Imo1775-Imo1764</i>
<i>Imo1808</i>	<i>fabD</i> ; Malonyl-CoA-Acyl-Transportprotein-Transacylase	2,01	0,33	<i>op Imo1810-Imo1807</i>
<i>Imo1809</i>	<i>plsX</i> ; Fettsäure/Phospholipid-Synthese-beteiligtes Protein PlsX	2,24	-0,46	<i>op Imo1810-Imo1807</i>
<i>Imo1847</i>	ähnlich den Adhäsionsbindeproteinen und Lipoproteinen mit multipler Spezifität für Metallkationen (ABC-Transporter)	2,16	0,04	<i>op Imo1849-Imo1849</i>
<i>Imo1870</i> <sup>+) </sup>	ähnlich einer alkalischen Phosphatase	-7,46	n. d.	
<i>Imo1888</i>	ähnlich hypothetischen Proteinen	0,64	-2,65	
<i>Imo1901</i>	<i>panC</i> ; Pantothenat-Synthetase	2,34	0,50	<i>op Imo1902-Imo1900</i>
<i>Imo1951</i>	ähnlich unbekanntem Proteinen	n. d.	-7,12	<i>op Imo1952-Imo1946</i>
<i>Imo1954</i>	<i>drm</i> ; Phosphopentomutase	3,76	-6,64	<i>op Imo1955-Imo1953</i>
<i>Imo2035</i>	<i>murG</i> ; Peptidoglykan-Synthese-Enzym, putative Phospho-N-Acetylmuramyl-Pentapeptidtransferase	-0,98	3,02	<i>op Imo2038-Imo2034</i>
<i>Imo2041</i>	ähnlich unbekanntem Proteinen	0,08	-3,06	<i>op Imo2042-Imo2039</i>

<i>Imo2047</i>	<i>rpmF</i> ; ribosomales Protein L32	0,98	-2,25	
<i>Imo2048</i>	ähnlich unbekanntem Proteinen	0,65	-2,77	
<i>Imo2115</i>	ähnlich einem ABC-Transporter (Permeaseprotein)	2,87	-0,50	op <i>Imo2114-Imo2115</i>
<i>Imo2198</i>	<i>trpS</i> ; Tryptophanyl-tRNA-Synthetase	-2,63	-0,36	
<i>Imo2200</i>	ähnlich einem Transkriptionsregulator	n. d.	-7,12	op <i>Imo2200-Imo2199</i>
<i>Imo2208</i>	ähnlich einem unbekanntem Protein	n. d.	-7,63	op <i>Imo2209-Imo2208</i>
<i>Imo2230</i>	ähnlich einer Arsenat-Reduktase	0,24	-2,77	
<i>Imo2275</i>	Protein gp28 [Bakteriophage A118]	-2,53	n. d.	op <i>Imo2273-Imo2276</i>
<i>Imo2294</i>	Protein gp9 [Bakteriophage A118]	3,53	n. d.	op <i>Imo2301-Imo2278</i>
<i>Imo2300</i>	putative Terminase des Bakteriophagen A118 (große Untereinheit)	0,15	-7,48	op <i>Imo2301-Imo2278</i>
<i>Imo2334</i>	ähnlich einem Transkriptionsregulator	0,12	-7,12	
<i>Imo2370</i>	ähnlich einer Aminotransferase	2,53	0,08	
<i>Imo2381</i>	ähnlich den an der Cholat- und Na <sup>+</sup> -Resistenz und pH-Homöostase beteiligten Proteinen	-1,20	-7,31	op <i>Imo2378-Imo2384</i>
<i>Imo2382</i>	ähnlich den an der Cholat- und Na <sup>+</sup> -Resistenz und pH-Homöostase beteiligten Proteinen	n. d.	-7,40	op <i>Imo2378-Imo2384</i>
<i>Imo2412</i>	ähnlich konservierten hypothetischen Proteinen	2,46	0,25	op <i>Imo2415-Imo2411</i>
<i>Imo2434</i>	sehr ähnlich den Glutamat-Decarboxylasen	-2,04	0,50	
<i>Imo2452</i>	ähnlich einer Carboxylesterase	-2,06	0,69	op <i>Imo2454-Imo2448</i>
<i>Imo2477</i>	<i>galE</i> ; UDP-Glukose-4-Epimerase	-2,73	0,84	op <i>Imo2477-Imo2475</i>
<i>Imo2511</i>	ähnlich den konservierten hypothetischen Proteinen wie dem Protein YvyD aus <i>B. subtilis</i>	0,04	-7,70	
<i>Imo2534</i>	<i>atpE</i> ; H <sup>+</sup> -transportierende ATP-Synthase	2,22	-0,89	op <i>Imo2536-Imo2528</i>
<i>Imo2562</i>	CS	3,49	-7,22	op <i>Imo2562-Imo2560</i>
<i>Imo2574</i>	CS	-0,75	-7,63	op <i>Imo2575-Imo2574</i>
<i>Imo2580</i> <sup>+) </sup>	ähnlich einem ABC-Transporter (ATP-Bindeprotein)	n. d.	-7,22	
<i>Imo2581</i> <sup>+) </sup>	konserviertes hypothetisches Protein	-1,40	-2,61	
<i>Imo2619</i>	<i>rpsN</i> ; ribosomales Protein S14	2,04	0,86	op <i>Imo2633-Imo2606</i>
<i>Imo2625</i>	<i>rplP</i> ; ribosomales Protein L16	2,23	0,43	op <i>Imo2633-Imo2606</i>
<i>Imo2674</i>	ähnlich einer Ribose-5-Phosphat-Epimerase	-0,70	2,26	op <i>Imo2673-Imo2674</i>
<i>Imo2692</i> <sup>+) </sup>	CS	-2,43	1,04	op <i>Imo2694-Imo2692</i>
<i>Imo2716</i>	<i>cydC</i> ; für die Expression von Cytochrombd benötigtes Protein	2,11	1,42	op <i>Imo2718-Imo2715</i>

<i>Imo2724</i>	ähnlich unbekanntem Proteinen	-2,53	-0,20	<i>op Imo2726-Imo2724</i>
<i>Imo2748</i>	ähnlich dem Stressprotein YdaG aus <i>B. subtilis</i>	-0,68	-7,83	
<i>Imo2845</i>	ähnlich den Transmembran-Efflux-Proteinen	-2,06	1,49	

<sup>a)</sup> gemäß *ListiList* des *Institut Pasteur* (<http://genolist.pasteur.fr/ListiList>), CS = codierende Sequenz

<sup>b)</sup> RTL = Relatives Transkriptionslevel = Transkription in *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ *glnR* verglichen zur Transkription in *L. monocytogenes* EGDe bei 24 °C bzw. 37 °C

<sup>c)</sup> *op* = Operon (TOLEDO-ARANA et al., 2009); \*Operon wurde nicht durch Toledo-Arana identifiziert, ist aber in der Literatur für Gram-positive Bakterien weitgehend beschrieben (BOLOTIN et al., 2001; DOROSHCHUK et al., 2006; STRAUCH et al., 1988). Bei (WURTZEL et al., 2012) wurde kein eigener Transkriptionsstart für *glnA* identifiziert.

<sup>†)</sup> als temperaturabhängig transkribiert identifiziert (vgl. Kap. IV.2.1)

Grau markierte Zahlen =  $\log_2$  RTL -2 > bzw. < 2 und/oder  $p > 0,05$

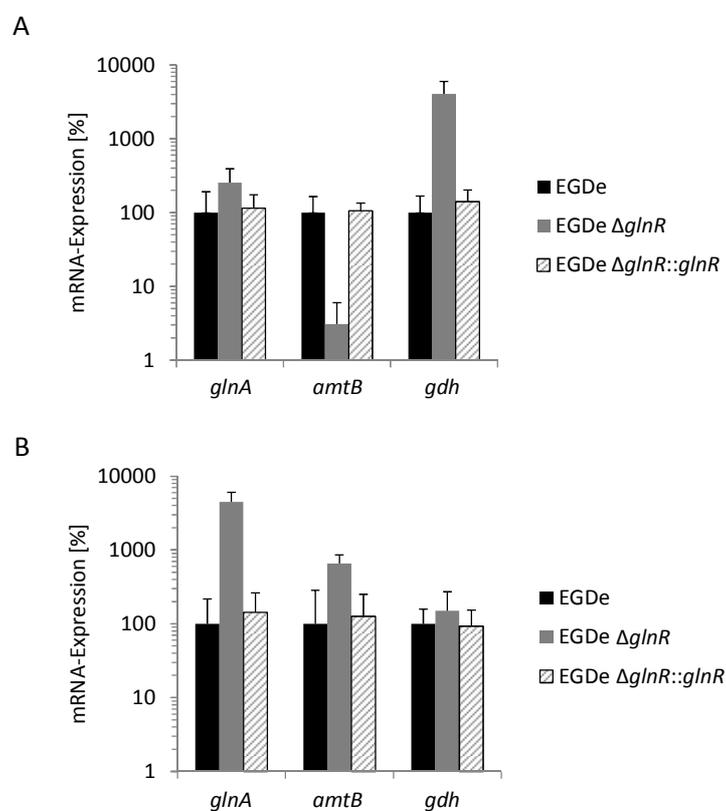
n. d. = nicht definierbar, da Countanzahl bei beiden Stämmen unter 10

Durch das Fehlen von GlnR wurde die Transkription von insgesamt 102 Genen beeinflusst. Darunter befanden sich 56 Gene, die bei 24 °C, 41 Gene, die bei 37 °C, und fünf Gene (*Imo0796*, *glnR*, *glnA*, *purE*, *Imo2562*), die bei beiden Temperaturen in der Mutante im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich transkribiert wurden. Dies zeigt, dass sich die Abwesenheit von GlnR je nach Temperatur zum größten Teil unterschiedlich auf das *L. monocytogenes* Transkriptom auswirkt.

Es konnten 13 Gene gefunden werden, die bereits in dieser Arbeit als temperaturabhängig transkribiert identifiziert wurden (Kap. IV.2.1). Darunter befanden sich die Stickstoffgene *glnRA*, *amtB-glnK* und *gdh*.

Betrachtet man die Ergebnisse aus dem NGS-Experiment, lässt sich erkennen, dass *glnRA* in der GlnR-defizienten Mutante bei beiden Temperaturen stärker ( $glnR \log_2^{24^\circ\text{C}} = 3,57$ ;  $glnR \log_2^{37^\circ\text{C}} = 7,00$ ;  $glnA \log_2^{24^\circ\text{C}} = 2,40$ ;  $glnA \log_2^{37^\circ\text{C}} = 5,14$ ) und *amtB-glnK* bei 24 °C schwächer ( $amtB \log_2^{24^\circ\text{C}} = -2,69$ ;  $glnK \log_2^{24^\circ\text{C}} = -3,85$ ) transkribiert wird als im Wildtyp. Daraus kann geschlossen werden, dass sich GlnR im Wildtyp sowohl bei 24 °C als auch bei 37° C reprimierend auf die Transkription von *glnRA* und bei 24° C aktivierend auf die Transkription von *amtB-glnK* auswirkt. Der Einfluss von GlnR auf die *amtB-glnK*-Transkription bei 37 °C konnte aufgrund der zu geringen Countzahl bei dieser Temperatur nicht bestimmt werden. Im Gegensatz zu *glnRA* und *amtB-glnK* gehört *gdh* zu den Genen, die bei 37 °C im Wildtyp stärker transkribiert werden als bei 24 °C (vgl. Kap. IV.2.1). In der *L. monocytogenes*  $\Delta$ *glnR* Mutante fällt die Transkription von *gdh* bei 24° C stärker aus als im Wildtyp, wohingegen bei 37 °C keinerlei transkriptionelle Unterschiede zu sehen waren ( $gdh \log_2^{24^\circ\text{C}} = 6,27$ ;  $gdh \log_2^{37^\circ\text{C}} = -0,76$ ). Folglich übt GlnR auf die *gdh*-Transkription nur bei 24 °C einen reprimierenden Einfluss aus. Ob die temperaturabhängige Regulation dieser Gene direkt oder indirekt durch GlnR ausgeführt wird, lässt sich durch dieses Experiment nicht beantworten.

Zur Validierung der NGS-Daten wurde die Transkription der Gene *glnA*, *amtB* und *gdh* in *L. monocytogenes* EGDe und *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ *glnR* mittels qRT-PCR bei 24 °C und 37 °C analysiert (Abb. 20). Zusätzlich dazu wurde zum Ausschluss polarer Effekte durch die *glnR*-Deletion die Komplementationsmutante *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ *glnR*::*glnR* konstruiert (OSPINA, 2012) und die Transkription der Stickstoffgene in dieser Mutante mit der im Wildtyp verglichen (Abb. 20). Dabei wurden zwei der drei biologisch unabhängigen Experimente durch Alberto Ospina im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt (OSPINA, 2012).



**Abb. 20: GlnR-abhängige Transkription von *glnA*, *amtB* und *gdh* bei (A) 24 °C und (B) 37 °C.** Dargestellt sind die Mittelwerte der durch qRT-PCR-Messungen bestimmten mRNA-Expressionen von *glnA*, *amtB* und *gdh* in % in *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ *glnR* (graue Säulen) und *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta$ *glnR*::*glnR* (schwarz schraffierte Säulen) verglichen zur mRNA-Expression der Gene in *L. monocytogenes* EGDe (Wildtyp; schwarze Säulen). Die mRNA-Expression der Gene im Wildtyp wurden jeweils auf 100 % gesetzt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen (in der Grafik durch Fehlerbalken dargestellt) wurden aus drei biologisch unabhängigen Replikaten bestimmt. In jeder Messung wurden zwei technische Replikate pro Gen mitgeführt. Die Ct-Werte der untersuchten Gene wurden gegen die Ct-Werte von *rpoB* normalisiert.

Anhand der qRT-PCR-Experimente konnte festgestellt werden, dass es sich bei den NGS-Daten um valide Daten handelt. Die reprimierende Wirkung von GlnR auf die Transkription von *glnA* bei beiden Temperaturen und die aktivierende Wirkung auf die *amtB*-Transkription

bei 24 °C konnten bestätigt werden. Des Weiteren konnte ein reprimierender Einfluss von GlnR auf die Transkription von *amtB-glnK* bei 37 °C detektiert werden. Die Transkription von *gdh* wurde – wie in den NGS-Daten – nur bei 24 °C negativ beeinflusst. Bei 37 °C konnten keinerlei Unterschiede in der relativen mRNA-Expression zwischen Wildtyp und Deletionsmutante beobachtet werden. Durch die Komplementation von *glnR* in der Komplementationsmutante *L. monocytogenes* EGDe  $\Delta glnR::glnR$  konnte das Transkriptionsprofil des Wildtyps wiederhergestellt werden. Eventuelle polare Effekte durch die *glnR*-Deletion können dadurch ausgeschlossen werden.

## V. Diskussion

### 1. Der Pökelsatz Natriumnitrit als antimikrobielles Agens gegen *L. monocytogenes*

#### 1.1 Das Nitrit-abhängige Wachstum und Transkriptom von *L. monocytogenes*

NaNO<sub>3</sub> bzw. NaNO<sub>2</sub> wird seit Jahrzehnten zur Konservierung und Vermeidung von Kontaminationen durch Lebensmittelpathogene den rohen Fleisch- und Wurstprodukten zugegeben. NaNO<sub>3</sub> *per se* hat allerdings keinerlei Einfluss auf das Wachstum des Gram-positiven Lebensmittelpathogens *L. monocytogenes* (Kap. IV.1.1). Und auch auf Transkriptomebene lassen sich keine Unterschiede in Gegenwart und Abwesenheit von NaNO<sub>3</sub> feststellen (Kap. IV.1.2). Nach der Zugabe von NaNO<sub>3</sub> in das Wurstprodukt wird Nitrat durch die in der Starterkultur vorhandenen Bakterien zu Nitrit reduziert (GØTTERUP et al., 2007). Die in dieser Dissertation durchgeführten *in vitro* Studien zeigen, dass NaNO<sub>2</sub> – anders als NaNO<sub>3</sub> – eine wachstumshemmende Wirkung auf *L. monocytogenes* ausübt (Kap. IV.1.3). Auch *in situ* Studien konnten ein durch Nitrit induziertes Wachstumsdefizit von *L. monocytogenes* Zellen im Fleisch- bzw. Wurstmilieu feststellen (KABISCH et al., 2012; SCHRADER, 2010; XI et al., 2011). Daraus kann geschlossen werden, dass nur Nitrit, nicht aber Nitrat selbst zytotoxisch auf die Zellen wirkt.

Um den negativen Einfluss von NaNO<sub>2</sub> auf die *L. monocytogenes* Zellproliferation näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit Microarray-Studien durchgeführt (Kap. IV.1.4). Dabei wurde das Transkriptom von *L. monocytogenes* Zellen in An- bzw. Abwesenheit von 200 mg/l NaNO<sub>2</sub> untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Insgesamt konnten 50 Gene identifiziert werden, die Nitrit-abhängig transkribiert werden. Darunter sind 34 Gene, deren Transkription in Gegenwart von Nitrit aktiviert wird, und 16 Gene, deren Transkription in Gegenwart von Nitrit reprimiert wird. Interessanterweise sind 27 der durch Nitrit stärker transkribierten Gene Mitglieder des SigB-Regulons. Bereits durchgeführte Transkriptom- und Proteomstudien konnten eine aktivierende Wirkung von SigB auf die Expression dieser Gene feststellen (HAIN et al., 2008; MUJAHID et al., 2013; OLIVER et al., 2010; OLIVER et al., 2009; RAENGPRADUB et al., 2008). Der alternative Sigmafaktor SigB ist in vielen Gram-positiven Bakterien stark konserviert (HECKER et al., 2007) und spielt in *L. monocytogenes* in der allgemeinen Stressantwort und Virulenz eine wichtige Rolle (KAZMIERCZAK et al., 2003). Auch das mit *L. monocytogenes* phylogenetisch nah verwandte Bakterium *B. subtilis* reagiert auf nitrosativen Stress mit der Expression von Proteinen, die an der generellen Stressantwort beteiligt sind (HOCHGRÄFE et al., 2008; MOORE et al., 2004; ROGSTAM et al., 2007).

Unter den Genen, deren Transkription durch die Anwesenheit von Nitrit aktiviert, aber nicht durch SigB reguliert wird, befinden sich die Gene *Imo2182*, *Imo2183* und *Imo2184*, die für einen putativen Ferrichrom-ABC-Transporter kodieren (GLASER et al., 2001). Die Gene *Imo2182-Imo2184* sind auf dem *L. monocytogenes* Genom in der sogenannten *srtB*-Region lokalisiert und werden von den Genen *hbp2* (*Imo2185*; vormals *svpA* (BOREZÉE et al., 2001)) bzw. *srtB* (*Imo2181*) flankiert. Dabei kodiert *hbp2* für das Hn/Hb-Bindeprotein Hbp2 und *srtB* für die Sortase B, die das Protein Hbp2 an das Peptidoglykan der bakteriellen Zellwand verankert (BIERNE et al., 2004; XIAO et al., 2011). Sowohl Hbp2 als auch SrtB wird eine Beteiligung an der Aufnahme von Hämin zugesprochen (XIAO et al., 2011). Die Rolle des Genproduktes von *Imo2182-Imo2184* bei der Eisen-Akquisition ist hingegen noch unbekannt (JIN et al., 2006; NEWTON et al., 2005). Ein Grund für die erhöhte Transkription von *Imo2182-Imo2184* in Gegenwart von Nitrit könnte in einem erhöhten Bedarf an Eisenmolekülen liegen, durch die die Zelle durch Nitrit-Derivate inaktivierte Proteine neu assemblieren könnte (FUKUTO et al., 2000). Auch könnte die Nitrit-abhängige Expressionsinduktion des putativen Ferrichrom-Transporters dadurch erklärt werden, dass die *L. monocytogenes* Zellen in Gegenwart von Nitrit und dessen Derivaten möglicherweise eisenlimitierten Bedingungen im Medium ausgesetzt sind. Zwar handelt es sich bei dem in dieser Arbeit verwendeten BHI-Medium um ein eisenreiches Medium (NEWTON et al., 2005). Allerdings interagieren die durch Nitrit entstandenen RNS mit den im Medium vorhandenen Eisenmolekülen (FUKUTO et al., 2000), so dass die Eisenmoleküle für die Bakterienzelle unzugänglich gemacht werden könnten. Bestärkt wird diese Vermutung durch bereits durchgeführte Versuche mit *L. monocytogenes* EGDe in einem KRM-Medium in An- und Abwesenheit von Eisen. Dabei konnte eine erhöhte Transkription der Gene *Imo2182* und *Imo2183* unter eisenlimitierten Bedingungen festgestellt werden (LEDALA et al., 2010). Auch andere Forscher sehen in der extrazellulären Verfügbarkeit von Eisen eines der Haupttrigger für die Expression des Operons, in dem die Gene *Imo2182-Imo2184* lokalisiert sind (NEWTON et al., 2005).

Neben Genen, deren Transkription in Gegenwart von Nitrit aktiviert wird, konnten in dieser Arbeit auch Gene identifiziert werden, deren Transkription Nitrit-abhängig inhibiert wird. Darunter befinden sich alle zehn Mitglieder des *pyr*-Operons (*pyrR*, *pyrP*, *pyrB*, *pyrC*, *pyrAA*, *pyrAB*, *pyrDII*, *pyrD*, *pyrF*, *pyrE*), deren relative Transkriptionslevel sich zwei Stunden nach Nitritzugabe um das 20fache verminderten. Die *pyr*-Genprodukte sind an der *de novo* Synthese von Pyrimidinen beteiligt (<http://www.genome.jp/kegg>). In *B. subtilis* wird die Transkription der *pyr*-Gene durch den Repressor PyrR reguliert. PyrR gehört zur Familie der

Typ I Phosphotransferasen (SINHA and SMITH, 2001; TOMCHICK et al., 1998). Die Inhibierung der Transkription des *pyr*-Operons erfolgt in Gegenwart von UMP oder Uridintriphosphat (UTP) durch die Bindung von aktiviertem PyrR an die 5'-nichttranslatierte Region (5'-NTR) der *pyr*-mRNA (BONNER et al., 2001; LU et al., 1996). Aufgrund dieser Interaktion zwischen mRNA und PyrR wird ein durch die Sekundärstruktur der mRNA vorhandener Antiterminator destabilisiert und ein Anti-Antiterminator zusammen mit einem Terminator ausgebildet, was eine Transkription der *pyr*-Gene verhindert (LU et al., 1996). Liegen nur geringe UMP- bzw. UTP-Konzentrationen vor, findet keine PyrR-Bindung an die 5'-NTR der *pyr*-mRNA statt und die *pyr*-Gene können transkribiert werden (LU et al., 1996). Die genomische Anordnung der *pyr*-Gene in *B. subtilis* ist mit der in *L. monocytogenes* identisch (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), was darauf schließen lässt, dass in *L. monocytogenes* eine ähnliche Regulation der *pyr*-Gen-Transkription stattfindet wie in *B. subtilis*. Eine in den 70er Jahren veröffentlichte Studie konnte feststellen, dass der Einbau von Uracil in die *B. cereus* RNA durch die Zugabe eines erwärmten chemischen Gemisches, das 27 mM NaNO<sub>2</sub> enthielt, verhindert wird (HANSEN and LEVIN, 1975). Ausgehend davon wäre auch eine mögliche Inhibierung des Uracil-Einbaus in die *L. monocytogenes* RNA durch die Zugabe von 200 mg/l NaNO<sub>2</sub> denkbar, wodurch sich die Konzentration von freiem Uracil in der Zelle erhöhen würde. Die Akkumulation von Uracil in der *L. monocytogenes* Zelle würde anschließend zu einer Inhibierung der Transkription der *pyr*-Gene durch die Bindung von aktiviertem PyrR an die *pyr*-mRNA führen. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der in dieser Arbeit beobachteten Inhibierung der *pyr*-Gen-Transkription in *L. monocytogenes* in Gegenwart von Nitrit um einen sekundären Effekt handelt.

### **1.2 Auswirkungen von Nitrit auf das Wachstum und die *pyrAB*-Transkription anderer Gram-positiver Bakterien**

Um die aus den durchgeführten Experimenten gewonnenen Erkenntnisse über die Nitritantwort von *L. monocytogenes* auf andere Gram-positive Organismen zu erweitern, wurde zunächst das *in vitro* Wachstum von *B. cereus* und *S. epidermidis* in An- und Abwesenheit von NaNO<sub>2</sub> untersucht. Dabei zeigte sich, dass Nitrit – anders als bei *L. monocytogenes* – das Wachstum beider Bakterien nur leicht hemmt (Kap. IV.1.5). Die von Nitrit ausgehende geringe Wachstumsinhibierung von *B. cereus* konnte auch außerhalb dieser Arbeitsgruppe bei Temperaturen von 28 °C bis 37 °C unter neutralen pH-Bedingungen im BHI-Medium beobachtet werden (BENEDICT et al., 1993). Des Weiteren wurde das Wachstum von *S. aureus*, das in naher Verwandtschaft zu dem in dieser Dissertation

getesteten Organismus *S. epidermidis* steht, durch Nitrit nicht beeinflusst (BUCHANAN and SOLBERG, 1972). Die geringe Sensitivität von *S. aureus* gegenüber dem Pökelnzusatz  $\text{NaNO}_2$  wirkt sich insbesondere nachteilig auf die Fleischproduktion aus. So konnte in einer gepökelten Salami im Vergleich zu einer ungepökelten, langgereiften Salami keine Verminderung der *S. aureus* Keimzahl festgestellt werden (KABISCH et al., 2012). Auch die Zugabe von 154 mg/kg  $\text{NaNO}_2$  in luftgetrocknete Schweinswürste beeinträchtigte das Überleben von *S. aureus* nicht (BANG et al., 2008).

Da die Inhibierung der *pyr*-Gen-Transkription eine der deutlichsten Auswirkungen von Nitrit auf das *L. monocytogenes* Transkriptom darstellte, wurde die Nitrit-abhängige *pyr*-Gen-Transkription in den beiden Gram-positiven Bakterien *B. cereus* und *S. epidermidis* ebenfalls untersucht. Dabei diente das Gen *pyrAB* als Zielgen, das – wie in *L. monocytogenes* – auch in *B. cereus* und *S. epidermidis* in der Mitte des *pyr*-Operons lokalisiert ist (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Bei den Versuchen zeigte sich, dass Nitrit sich nicht nur unterschiedlich auf das Wachstum von *L. monocytogenes* und *B. cereus* bzw. *S. epidermidis* auswirkt. Auch die deutliche Transkriptionseinhibierung von *pyrAB* in *L. monocytogenes* in Anwesenheit von Nitrit konnte in *B. cereus* und *S. epidermidis* nicht detektiert werden. Während die *pyrAB*-Transkription in *S. epidermidis* Zellen, die mit Nitrit inkubiert wurden, sich nicht von denen, die ohne Nitrit inkubiert wurden, unterschied, konnte in *B. cereus* in Gegenwart von Nitrit die dreifache *pyrAB*-mRNA-Menge nachgewiesen werden (Kap. IV.1.6). Mehrere Transkriptomstudien, die die nitrosative Stressantwort der Bakterien *B. subtilis* und *S. aureus* untersuchten, konnten ebenfalls keine Inhibierung der *pyrAB*-Transkription in Gegenwart des Nitrit-Derivats NO, des NO-Donors SNP bzw. in Gegenwart von Nitrit selbst feststellen (MOORE et al., 2004; ROGSTAM et al., 2007; SCHLAG et al., 2007). Die unterschiedliche Reaktion der Bakterien *L. monocytogenes*, *B. cereus* und *S. epidermidis* auf nitrosativen Stress könnte damit erklärt werden, dass *B. cereus* und *S. epidermidis* – anders als *L. monocytogenes* – das NO-detoxifizierende Protein Hmp besitzen. Es ist bekannt, dass sowohl *B. subtilis* als auch *S. aureus* auf nitrosativen Stress mit der Expression des Proteins Hmp reagieren (HOCHGRÄFE et al., 2008; MOORE et al., 2004; NAKANO, 2002; RICHARDSON et al., 2006; ROGSTAM et al., 2007; SCHLAG et al., 2007). Hmp-defiziente *B. subtilis* und *S. aureus* Mutanten zeigten extreme Anpassungsschwierigkeiten gegenüber nitrosativem Stress (GONCALVES et al., 2006; ROGSTAM et al., 2007). Ein Hmp-Homolog ist in *L. monocytogenes* nicht annotiert (GLASER et al., 2001) und die in dieser Dissertation durchgeführten Transkriptomstudien zeigten, dass *L. monocytogenes* unter Nitriteinfluss keine Gene

transkribiert, deren Produkte an einer direkten Nitrit- bzw. RNS-Abwehr beteiligt sein könnten (Kap. IV.1.4).

Aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten qRT-PCR-Experimenten geht hervor, dass Nitrit in *B. cereus* die Transkription von *hmp* unter den hier gewählten Bedingungen tatsächlich induziert (Kap. IV.1.7). Daher kann vermutet werden, dass die stärkere Resistenz von *B. cereus* gegenüber Nitrit unter anderem mit der erhöhten Hmp-Expression einhergeht. *S. epidermidis* zeigt hingegen keine Nitrit-induzierte Transkription des Gens *hmp* (Kap. IV.1.7). Es konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass die *hmp*-Transkription in nitrosativem Stress ausgesetzten *S. aureus* Zellen unter aeroben Bedingungen niedrig ist und erst in einer sauerstofflimitierten Umgebung steigt (GONCALVES et al., 2006). Somit spielt wahrscheinlich Hmp in *S. epidermidis* – wie in *S. aureus* – nicht unter aeroben, sondern erst unter microaerophilen Bedingungen eine bedeutende Rolle in der Nitritabwehr. Folglich unterliegt vermutlich die in dieser vorgelegten Arbeit beobachtete Nitritresistenz in *S. epidermidis* einem anderen Abwehrmechanismus.

### **1.3 Der Einfluss des NO-Donors SNP auf das Wachstum und die *pyrAB*-Transkription von *L. monocytogenes***

Es wird davon ausgegangen, dass die antimikrobielle Wirkung von Nitrit während der Wurstfermentation nicht durch Nitrit *per se*, sondern durch die aus Nitrit entstehenden RNS, insbesondere durch NO, hervorgerufen wird (CAMMACK et al., 1999; FANG, 1997). Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich zu Nitrit das Wachstumsverhalten von *L. monocytogenes* und die *pyrAB*-Transkription in *L. monocytogenes* in An- und Abwesenheit des NO-Donors SNP untersucht. SNP ist ein nitrosatives Agens, das in der Lage ist, ein Nitrosonium-Ion an seine Umgebung abzugeben (HUGHES, 1999). SNP wurde bereits in anderen Forschungsgruppen für die Untersuchung der nitrosativen Stressantwort diverser Organismen verwendet (COMTOIS et al., 2003; FREY et al., 2002; MOORE et al., 2004; NAKANO, 2002; ROGSTAM et al., 2007). Eine Studie in *B. subtilis* konnte zeigen, dass die Stressantwort auf NO-Gas und SNP im Wesentlichen identisch ist und sich lediglich in der Induktion des SigB-Regulons unterscheidet. Während in Anwesenheit von NO-Gas das SigB-Regulon über die regulatorische Kaskade des Energiestresses induziert wurde, aktivierte SNP das Regulon über die regulatorische Kaskade des Umweltstresses (MOORE et al., 2004). *L. monocytogenes* Zellen, die mit 20 bzw. 25  $\mu\text{M}$  SNP inkubiert wurden, zeigten in dieser Arbeit eine ähnliche Wachstumshemmung wie in Gegenwart von 200 mg/l  $\text{NaNO}_2$  (Kap. IV.1.8). Und auch die Transkription von *pyrAB* wurde durch die SNP-Zugabe inhibiert (Kap. IV.1.9). Aufgrund dieser

Experimente ist es wahrscheinlich, dass nicht nur Nitrit, sondern auch das Nitrit-Derivat NO an der in dieser Arbeit identifizierten nitrosativen Stressantwort in *L. monocytogenes* beteiligt ist.

#### **1.4 Die medienabhängige Inhibierung der *pyrAB*-Transkription in *L. monocytogenes* in Anwesenheit von Nitrit bzw. SNP**

Die innerhalb dieser Dissertation festgestellte Nitrit- bzw. SNP-abhängige Inhibierung der *pyrAB*-Transkription ist allerdings stark medienabhängig. Verwendet man für die Untersuchung der *pyrAB*-Transkription eine andere BHI-Charge des gleichen Herstellers, kann diese Inhibierung in Gegenwart von Nitrit bzw. SNP nicht mehr nachgewiesen werden (Kap. IV.1.10). Bei dem BHI-Medium handelt es sich um ein sehr komplexes Medium, dessen Zusammensetzung nicht klar definiert ist. Variationen in den Konzentrationen diverser Medienbestandteile in unterschiedlichen Chargen sind somit möglich und sogar wahrscheinlich. qRT-PCR-Messungen zeigen, dass die Transkription von *pyrAB* in der zweiten Charge bereits in den ohne Nitrit bzw. SNP inkubierten Zellen sehr gering ist (Kap. IV.1.10). Eine weitere Inhibierung der *pyrAB*-Transkription durch Nitrit bzw. SNP kann somit nicht erfolgen.

Einige Forscher berichteten bereits von einer Reduzierung der *pyrAB*-Transkription in *Lactococcus lactis* durch die Zugabe von Uracil in das Nährmedium (MARTINUSSEN and HAMMER, 1998). Eine erhöhte Uracil-Konzentration im Medium der Charge II könnte auch eine mögliche Erklärung für die bereits in den unbehandelten *L. monocytogenes* Zellen festgestellte Inhibierung der *pyrAB*-Transkription sein. Liegt bereits eine gewisse exogene Menge an Uracil vor, kann dieses durch die dafür zuständigen Uracil-Transporter aufgenommen werden. In *B. subtilis* resultiert die Gegenwart von UMP oder UTP in einer Aktivierung des Pyrimidin-Repressors PyrR, der anschließend an die 5'-NTR der *pyr*-mRNA bindet (BONNER et al., 2001; LU et al., 1996). Durch die PyrR-mRNA-Interaktion entsteht sowohl eine Anti-Antiterminator- als auch eine Terminator-Struktur, wodurch die Transkription der *pyr*-Gene verhindert wird (LU et al., 1996). Dieser Regulationsmechanismus ist auch in *L. monocytogenes* denkbar.

In *B. subtilis* und *L. lactis* ist das Protein PyrP an der Aufnahme von Uracil in die Zelle beteiligt (MARTINUSSEN et al., 2001; TURNER et al., 1994). Das Genprodukt von *pyrP*, das in *L. monocytogenes* – wie *pyrAB* – im *pyr*-Operon lokalisiert ist (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), zeigt eine 51 %ige bzw. 55 %ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz zu PyrP von *L. lactis* IL1403 bzw. *B. subtilis* 168 (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Dies macht eine Beteiligung von PyrP an der Uracilaufnahme in *L. monocytogenes* sehr wahrscheinlich.

Tatsächlich kann in einer PyrP defizienten *L. monocytogenes* Mutante die *pyrAB*-Transkription in Charge II angezogenen Zellen erhöht werden (Kap. IV.1.10). Ausgehend von einer ähnlichen Regulation der *pyr*-Gen-Transkription in *L. monocytogenes* wie in *B. subtilis*, findet bei geringen UMP- oder UTP-Konzentrationen keine Interaktion des Repressors PyrR mit der *pyr*-mRNA statt (Lu et al., 1996). Die *pyr*-Gene werden transkribiert. Zwar fällt die in *L. monocytogenes*  $\Delta pyrP$  gebildete *pyrAB*-mRNA-Molekülmenge in Charge II nicht so hoch aus wie die in Charge I inkubierten Wildtyp Zellen, dennoch kann die inhibierende Wirkung von Nitrit bzw. SNP auf die *pyrAB*-Transkription in *L. monocytogenes*  $\Delta pyrP$  auch in Charge II nachgewiesen werden (Kap. IV.1.10). Die geringere *pyrAB*-Basistranskription in *L. monocytogenes*  $\Delta pyrP$  in Charge II im Vergleich zum Wildtyp in Charge I lässt sich durch das eventuelle Vorhandensein weiterer Uracil-Transporter erklären, die trotz der Abwesenheit von PyrP Uracil in die *L. monocytogenes* Zelle transportieren können.

Aus diesem Experiment geht hervor, dass die Inhibierung von *pyrAB* in Gegenwart von Nitrit bzw. SNP nur in einem uracilarmen Medium erfolgen kann, da in diesem die unbehandelten *L. monocytogenes* Zellen gezwungen sind, Uracil *de novo* zu synthetisieren. Die Transkription der *pyr*-Gene ist dafür notwendig. Die Wachstumshemmung durch Nitrit bzw. SNP ist allerdings medienunabhängig. Auch in Charge II konnte im Wildtyp das in Charge I beobachtete Wachstumsdefizit in Gegenwart von Nitrit bzw. SNP beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Somit handelt es sich bei der Nitrit- bzw. SNP-abhängigen Transkriptionsinhibierung von *pyrAB* um einen indirekten Effekt, der nicht bzw. nicht ausschließlich für die beobachtete Wachstumsinhibierung von *L. monocytogenes* in Gegenwart von Nitrit bzw. SNP (Kap. IV.1.3; Kap. IV.1.8) verantwortlich zu sein scheint.

### **1.5 Die Identifizierung möglicher weiterer bei der Nitrit-Antwort von *L. monocytogenes* wichtiger Gene**

Durch das Screenen einer *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank konnten 16 weitere Gene identifiziert werden, die für die Nitritantwort in *L. monocytogenes* von Bedeutung zu sein scheinen. Mutanten, die Insertionen in diesen Genen besitzen, zeigten in Anwesenheit von Nitrit ein schwächeres Wachstum als der Wildtyp (Kap. IV.1.11). Darunter befinden sich Mutanten, die Insertionen in Genen besitzen, deren Produkte an der DNA-Synthese, -Replikation bzw. -Reparatur beteiligt sind (*Imo1705*, *Imo1811*, *uvrA* (*Imo2488*), *dnaX* (*Imo2704*)). Einer der Hauptangriffspunkte der RNS ist die DNA. Die Gegenwart von

RNS kann zu erhöhten Mutationsraten, Strangbrüchen oder sogar zur Fragmentierung der DNA-Moleküle führen (BURNEY et al., 1999). Neusynthese und Reparatur der geschädigten DNA sind in diesem Fall notwendig, um die Genomstabilität weiterhin gewährleisten zu können. Das Screenen von *Mycobacterium tuberculosis* Insertionsmutanten identifizierte eine Mutante, die eine Insertion im Gen *uvrB* besitzt und sensitiver auf nitrosativen Stress reagierte als der Wildtyp (DARWIN et al., 2003). Das Protein UvrB ist wie UvrA eine Komponente des Nukleotid-Exzisionsreparatur-Systems (TRUGLIO et al., 2006). Dieses System scheint ein wichtiger Abwehrmechanismus gegen die durch RNS ausgelösten genotoxischen Effekte zu sein (NAKANO et al., 2005b). Das beobachtete schwächere Wachstum einer *L. monocytogenes uvrA* Mutante im Vergleich zum Wildtyp in Gegenwart von Nitrit könnte dadurch erklärt werden.

#### **1.6 Das Fehlen von NO-detoxifizierenden Systemen als möglicher Grund für die Nitrit-Sensitivität von *L. monocytogenes* während des Pökelprozesses**

Zusammenfassend geht aus den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten hervor, dass *L. monocytogenes* auf nitrosativen Stress – im Gegensatz zu anderen Gram-positiven Bakterien – ohne Aktivierung spezifischer RNS-Abwehrsysteme reagiert. Es sind nur indirekte Mechanismen vorhanden, wie die transkriptionelle Induktion von Genen, deren Produkte an der generellen Stressantwort beteiligt sind, um sich gegen die durch Nitrit entstehenden RNS zu schützen (Kap. IV.1.4). *L. monocytogenes* besitzt keine NO-detoxifizierenden Systeme wie zum Beispiel *B. cereus* oder *S. epidermidis* (GLASER et al., 2001). Diese NO-detoxifizierenden Systeme sind in *L. monocytogenes* wahrscheinlich auch nicht notwendig, da *L. monocytogenes* anders als *B. cereus* und *S. epidermidis* nicht in der Lage ist, Nitrat oder Nitrit zu reduzieren (GLASER et al., 2001).

Interessanterweise belegt eine Studie, durchgeführt mit *L. monocytogenes* Zellen inkubiert in BHI-Medium unter sauren Bedingungen (pH 6), dass in Anwesenheit von Nitrit 30 % der transkriptionell induzierten Gene auch in der Makrophagen-Vakuole im Zuge der angeborenen menschlichen Immunantwort stärker transkribiert werden (CHATTERJEE et al., 2006; WÜSTNER, 2010). Dies lässt auf ähnliche Stressbedingungen in der Makrophagen-Vakuole wie auch bei der Herstellung von Rohwürsten durch den Einsatz von Nitrit als Pökelsatz schließen. Sowohl während der Wurstreifung als auch in der Vakuole entstehen RNS, mit denen sich das Bakterium auseinandersetzen muss (HONIKEL, 2008; MACMICKING et al., 1997). Anders als beim Pökelprozess entkommt *L. monocytogenes* der Makrophagen-Vakuole und somit dem RNS-Stress, ohne NO-detoxifizierende Systeme zu benötigen

(ALVAREZ-DOMINGUEZ et al., 1997; MARQUIS et al., 1995; SMITH et al., 1995). Doch genau dieses Fehlen der NO-detoxifizierenden Systeme macht *L. monocytogenes* möglicherweise besonders anfällig für Nitrit, das – zusammen mit niedrigen pH-Werten – seine antimikrobielle Wirkung gegenüber *L. monocytogenes* während des Pökelprozesses somit vollständig entfalten kann.

## **2. Temperaturabhängige Regulation des Stickstoffmetabolismus in *L. monocytogenes***

### **2.1 Das temperaturabhängige Transkriptom von *L. monocytogenes***

Bei dem Bakterium *L. monocytogenes* handelt es sich um ein fakultativ intrazelluläres Pathogen. Es ist als Saprophyt ubiquitär in der Natur vorhanden, kann sich aber auch im Gastrointestinaltrakt diverser Säuger oder Vögel vermehren (FARBER and PETERKIN, 1991). Dabei kann es im Menschen zum Ausbruch der humanen Listeriose führen, welche eine Mortalitätsrate von 20 bis 40 % beträgt (GOULET et al., 2012; SCHLECH and ACHESON, 2000; SCHUCHAT et al., 1991). Je nach Habitat muss sich *L. monocytogenes* somit an die jeweiligen Gegebenheiten bzw. Umweltbedingungen anpassen. Ein bereits bekannter Indikator, der den Übergang von der saprophytischen zur pathogenen Lebensweise steuert, ist die Außentemperatur. Es existieren bereits einige Studien, die das temperaturabhängige Transkriptom von *L. monocytogenes* untersuchten (GARMYN et al., 2012; TOLEDO-ARANA et al., 2009; WILLIAMS et al., 2005). Allerdings wurden in diesen Studien die Bakterien in Vollmedien (BHI oder TSB) angezogen. Um weitere temperaturabhängig transkribierte, bisher unbekannte Gene in *L. monocytogenes* zu identifizieren, wurde in dieser Dissertation das temperaturabhängige Transkriptom von Zellen untersucht, die in einem chemisch definierten Minimalmedium mit Glutamin als Stickstoffquelle und mit Glukose als Kohlenstoffquelle inkubiert wurden.

Dabei zeigte sich, dass 28 Gene stärker bei 24 °C und 44 stärker bei 37 °C transkribiert werden (Kap. IV.2.1). Wie bereits in anderen Studien demonstriert (DONS et al., 1992; MICHEL et al., 1998; WILLIAMS et al., 2005) konnte auch hier eine stärkere Transkription einiger Flagellengene (*flaA*, *Imo0698*, *Imo0707*, *Imo0708*, *Imo0710*, *Imo0713*) bei 24 °C als bei 37 °C beobachtet werden. Die Außentemperatur dient hier als Umweltreiz. Bei Temperaturen unter 37 °C exprimiert *L. monocytogenes* Flagellen und ist somit selbständig motil. Bei 37 °C werden keine Flagellengene transkribiert (DONS et al., 1992; PEEL et al., 1988). Die Fortbewegung von Zelle zu Zelle bei 37 °C im Wirt erfolgt mit Hilfe eines Aktinschweifs aus Wirtsaktin (COSSART and KOCKS, 1994; DOMANN et al., 1992; KOCKS et al., 1992).

Auch eine verstärkte Expression der Virulenzgene bei Wirtszelltemperatur wird häufig beschrieben (GARMYN et al., 2012; LEIMEISTER-WÄCHTER et al., 1992; TOLEDO-ARANA et al., 2009; WILLIAMS et al., 2005). Die verstärkte Transkription der Virulenzgene *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB* bei 37 °C wird durch die Aktivität des Hauptvirulenzfaktors PrfA reguliert, dessen Expression unter anderem thermoreguliert ist (JOHANSSON et al., 2002; LEIMEISTER-WÄCHTER et al., 1992). An der 5'-NTR des *prfA*-Transkripts befindet sich ein RNA-Thermosensor, dessen Haarnadelstruktur bei einer Temperatur von 37 °C (menschliche Körpertemperatur) teilweise aufschmilzt. Dadurch werden die Ribosomenbindung und die Translation von PrfA ermöglicht. Bei niedrigeren Temperaturen (< 30 °C) bildet sich an der 5'-NTR der *prfA*-mRNA eine Sekundärstruktur, die die vorhandene Shine-Dalgarno-Sequenz maskiert. Eine Translation von PrfA kann dadurch nicht mehr stattfinden (JOHANSSON et al., 2002).

Allerdings konnte eine temperaturabhängige Transkriptionsinduktion der Gene *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* und *plcB* in dieser Arbeit bei 37 °C nicht detektiert werden. Auch sonst scheint sich das in dieser Arbeit identifizierte temperaturabhängige Transkriptionsprofil überwiegend von dem der vorherigen Studien zu unterscheiden (Kap. IV.2.1). Es lässt sich vermuten, dass die temperaturabhängige Transkription einiger Gene von der Wahl des Nährmediums abhängt.

## **2.2 Die temperaturabhängige Transkription der Stickstoffgene *glnRA*, *amtB-glnK* und *gdh* in *L. monocytogenes***

Die auffälligste Entdeckung der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Transkriptomstudien ist die temperaturabhängige Transkription von Genen, deren Produkte am Stickstoffmetabolismus beteiligt sind. Die Gene *glnR*, *glnA*, *amtB* und *glnK* werden bei 24 °C stärker transkribiert als bei 37 °C. *GlnR* kodiert für den Glutamin-Synthetase-Repressor GlnR, *glnA* für die Glutamin-Synthetase GlnA, *amtB* für den Ammonium-Transporter AmtB und *glnK* für das PII Stickstoff-Regulatorprotein GlnK (Glaser et al., 2001).

Eine stärkere Transkription der Gene *glnRA* und *amtB-glnK* lassen in *B. subtilis*, bei dem der Stickstoffmetabolismus als Modellorganismus für Gram-positive Bakterien gut untersucht ist (AMON et al., 2010; FISHER, 1999; SONENSHEIN, 2007), auf eine Abwesenheit bevorzugter Stickstoffquellen wie zum Beispiel Glutamin oder einer Kombination aus Glutamat und Ammonium schließen (FISHER et al., 1984; FISHER and WRAY, 2002; WRAY et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde Glutamin als Stickstoffquelle für *L. monocytogenes* verwendet. Überträgt man die aus *B. subtilis* gewonnenen Erkenntnisse bezüglich des Stickstoffmetabolismus auf *L. monocytogenes*, so scheint *L. monocytogenes* Glutamin bei 24 °C weniger effizient als Stickstoffquelle nutzen zu können als bei 37 °C. Diese Hypothese wird

durch die durchgeführten Wachstumsstudien bestätigt. Glutamin als Stickstoffquelle unterstützt das Wachstum bei 37 °C besser als bei 24 °C (Kap. IV.2.2). Auch die differenzielle Transkription der Gene *purD*, *purH* und *purN*, die Bestandteile des *pur*-Operons sind, könnte durch eine temperaturabhängige Nutzbarkeit von Glutamin als Stickstoffquelle erklärt werden. Die Genprodukte des *pur*-Operons sind an der *de novo* Synthese von Purinen beteiligt, indem sie die Bildung von Inosinmonophosphat (IMP) aus Glutamin und 5-Phospho- $\alpha$ -D-Ribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) katalysieren (<http://www.genome.jp/kegg>). Bei IMP handelt es sich um das Vorläufermolekül der beiden Nukleotide Adenosinmonophosphat (AMP) und Guanosinmonophosphat (GMP). Der physiologische Grund für die Transkriptionsinduktion bei 37 °C könnte in der in dieser Arbeit aufgestellten These zu finden sein, dass bei 24 °C weniger Glutamin in der Zelle vorhanden ist als bei 37 °C. Da bei der *de novo* Synthese von Purinen die Amidgruppe aus Glutamin entsteht, ist eine Korrelation der Purin-Synthese mit der Konzentration des Amidgruppen-Donors wahrscheinlich. Je mehr Glutamin in der Zelle vorhanden ist, desto stärker würde die Purin-Synthese ausfallen. Diese Überlegung wird durch eine in *B. subtilis* durchgeführte Transkriptomstudie bestärkt. In dieser konnte eine stärkere Transkription der *pur*-Gene nach Zugabe von Glutamin beobachtet werden (YE et al., 2009). Insgesamt deuten die Veränderungen im temperaturabhängigen Transkriptionsprofil dieser Studie darauf hin, dass *L. monocytogenes* seinen Metabolismus temperaturabhängig anpasst. Die Temperatur könnte als Umweltreiz wirken, der dem Bakterium signalisiert, in welcher ökologischen Nische (Wirt oder Umwelt) es sich befindet, um somit eine optimale Anpassung des Metabolismus an die entsprechende Nische mit ihrem charakteristischen Nährstoffangebot zu gewährleisten.

Allerdings ist die Anpassung des Stickstoffmetabolismus nicht nur temperaturabhängig, sondern auch mediumspezifisch. So konnte für *amtB-glnK* zwar bereits eine temperaturabhängige Transkription beobachtet werden (GARMYN et al., 2012; TOLEDO-ARANA et al., 2009). Das beobachtete höhere Transkriptionslevel von *glnRA* bei 24 °C im Vergleich zu 37 °C widerspricht hingegen einer anderen Transkriptomanalyse, die eine stärkere Transkription von *glnR* bei 37 °C feststellen konnte (GARMYN et al., 2012). Auch die stärkere Transkription des Gens *gdh* bei 37 °C, das für die NADP-spezifische Glutamat-Dehydrogenase kodiert, konnte in Zellen, die in BHI-Medium angezogen wurden, nicht bestätigt werden (WILLIAMS et al., 2005). Die in BHI inkubierten Zellen zeigten sogar eine stärkere Transkription bei 24 °C. Neben der Temperatur spielt also auch die Medienzusammensetzung eine wichtige Rolle, was deutlich zeigt, dass sich *L. monocytogenes* metabolisch an die entsprechende Umweltbedingung anpasst.

### 2.3 Die Rolle des Transkriptionsregulators GlnR bei der temperaturabhängigen Transkription der Gene *glnRA*, *amtB-glnK* und *gdh* in *L. monocytogenes*

Bei der Anpassung an Umweltbedingungen spielen häufig Transkriptionsregulatoren eine große Rolle. In *B. subtilis* als Modellorganismus für Gram-positive Bakterien ist die Regulation des Stickstoffmetabolismus gut charakterisiert. Neben CodY (FISHER, 1999; SONENSHEIN, 2005) sind vor allem die beiden Proteine GlnR und TnrA von Bedeutung. Sowohl GlnR als auch TnrA gehören zur Familie der MerR-ähnlichen Transkriptionsregulatoren (FISHER, 1999; SCHREIER et al., 1989). Unter Stickstoffüberschuss liegt GlnR in seiner aktiven Form vor und reprimiert die Transkription der Gene *tnrA*, *glnRA* und des Urease-Operons *ureABC* (BRANDENBURG et al., 2002; BROWN and SONENSHEIN, 1996; WRAY et al., 1997; ZALIECKAS et al., 2006). Im Falle eines Stickstoffmangels ist hingegen TnrA aktiv und reguliert die Transkription von ungefähr 25 putativen Zielgenen (YOSHIDA et al., 2003). TnrA induziert die Transkription von Genen, deren Produkte an der Rekrutierung alternativer Stickstoffquellen beteiligt sind. Darunter befinden sich die Gene *amtB*, *glnK*, *ureABC*, *nasA*, *nasB* und *nasDEF*. Letztere kodieren für die Nitrat- und Nitritreduktase. Auch die Transkription seines eigenen Gens (*tnrA*) wird durch TnrA aktiviert (BRANDENBURG et al., 2002; NAKANO et al., 1998; WRAY et al., 1996; WRAY et al., 1998; ZALIECKAS et al., 2006). TnrA kann gleichzeitig als Repressor fungieren, der die Transkription der Gene *gltAB* (kodiert für die Glutamat-Synthase) und *glnRA* reprimiert (BELITSKY and SONENSHEIN, 2004; BELITSKY et al., 2000). Die Repression der *glnRA*-Transkription durch TnrA erfolgt in einem geringeren Ausmaß als dies bei der Repression durch GlnR der Fall ist. Somit ist eine höhere Konzentration an *glnRA*-mRNA-Molekülen unter stickstofflimitierten als bei stickstoffreichen Bedingungen vorhanden (ZALIECKAS et al., 2006). Der Stickstoffmetabolismus von *L. monocytogenes* unterscheidet sich allerdings in einigen Punkten von dem von *B. subtilis*. *L. monocytogenes* besitzt keine Gene, die für eine Nitrit- oder Nitratreduktase kodieren (GLASER et al., 2001), und ist folglich – anders als *B. subtilis* – auf reduzierte Stickstoffquellen angewiesen. Auch ein TnrA-Homolog ist nicht annotiert (GLASER et al., 2001). Somit scheint die Regulation des Stickstoffmetabolismus von *L. monocytogenes* dem Stickstoffmetabolismus von *Streptococcus pneumoniae* und *L. lactis* ähnlicher zu sein als dem von *B. subtilis*. Beide Organismen besitzen, wie *L. monocytogenes*, nur ein GlnR-, aber kein TnrA-Homolog (BOLOTIN et al., 2001; HOSKINS et al., 2001; TETTELIN et al., 2001). Zudem scheint das listerielle GlnR-Homolog näher mit dem der *Streptococci* und *Lactobacilli* verwandt zu sein als mit dem der *Bacilli* (DOROSHCHUK et al., 2006). Für die nähere Untersuchung der Regulation des Stickstoffmetabolismus in *L. monocytogenes* wurde eine *L. monocytogenes*  $\Delta$ *glnR* Mutante erstellt und deren Transkriptom mit

dem des Wildtyps verglichen. Die Transkriptomanalysen wurden bei 24 °C und 37 °C durchgeführt, um eine mögliche Beteiligung von GlnR an der temperaturabhängigen Regulation der Stickstoffgene zu untersuchen. Es zeigte sich, dass das GlnR-Regulon je nach Temperatur stark variiert. Von den 102 als GlnR-abhängig transkribierten identifizierten Genen zeigten 97 eine GlnR-abhängige Transkription nur bei einer der beiden Temperaturen (Kap. IV.2.3). Für lediglich fünf (*Imo0796*, *glnR*, *glnA*, *purE*, *Imo2562*) war eine GlnR-abhängige Regulation bei sowohl 37 °C als auch bei 24 °C sichtbar.

13 Gene konnten identifiziert werden, deren Transkription durch GlnR reguliert wird und welche ein temperaturabhängiges Transkriptionsprofil zeigten. Unter diesen Genen befinden sich die Stickstoffgene *glnRA*, *amtB-glnK* und *gdh*, für welche die temperaturabhängige GlnR-Regulation mittels qRT-PCR validiert wurde. Die Transkription von *glnRA* wurde sowohl bei 24 °C als auch bei 37 °C durch GlnR negativ beeinflusst. Somit reprimiert GlnR seine eigene Transkription. Diese negative Autoregulation konnte bereits in anderen Bakterien wie *B. subtilis* (BROWN and SONENSHEIN, 1996; SCHREIER et al., 1989), *B. cereus* (NAKANO and KIMURA, 1991), *L. lactis* (LARSEN et al., 2006), *S. pneumoniae* (KLOOSTERMAN et al., 2006) und *Streptococcus mutans* (CASTELLEN et al., 2011) beobachtet werden. In *L. monocytogenes* ist die Repressorwirkung von GlnR auf die *glnRA*-Transkription bei 37 °C stärker als bei 24 °C, was mit den bereits durchgeführten Microarray-Studien übereinstimmt, die eine höhere Transkription von *glnRA* bei 24 °C zeigten (Kap. IV.2.1). Warum allerdings eine stärkere Repression durch GlnR bei 37 °C stattfindet, obwohl bei dieser Temperatur deutlich weniger *glnR* transkribiert wird als bei 24 °C, ist bis *dato* noch unklar. Eine mögliche Erklärung wäre eine Derepression der GlnR-abhängigen Repression der *glnRA*-Transkription trotz Anwesenheit einer höheren GlnR-Konzentration bei 24 °C.

EMSA-Studien (*electrophoretic mobility shift assays*) konnten zeigen, dass es sich bei der GlnR-abhängigen Transkription von *glnRA* um eine direkte Regulation handelt. GlnR bindet an die Promotorregion des Operons und reguliert damit seine Transkription (AUER, 2012; SCHINDELE, 2012).

Weitere Stickstoffgene, die anhand der NGS-Daten als GlnR-abhängig transkribiert identifiziert wurden, sind *amtB-glnK*. GlnR wirkt auf die Transkription von *amtB-glnK* je nach Temperatur reprimierend oder aktivierend. Bei 24 °C wird die Transkription positiv und bei 37 °C negativ beeinflusst, wodurch die stärkere Transkription von *amtB-glnK* bei 24 °C als bei 37 °C (Kap. IV.2.1) erklärt werden kann. Durch *in silico* Analysen konnten zwei GlnR-Bindemotive in der Promotorregion von *amtB-glnK* festgestellt werden (SCHINDELE, 2012). Eines befindet sich *upstream* eines putativen -35 Elements (*amtB\_1*), das andere

*downstream* des Transkriptionsstartpunktes (*amtB\_2*) (SCHINDELE, 2012). EMSA-Studien bestätigten eine GlnR-Bindung an den Promotor von *amtB-glnK* (AUER, 2012; SCHINDELE, 2012). Die GlnR-abhängige transkriptionelle Aktivierung von *amtB-glnK* könnte durch eine Bindung von GlnR an *amtB\_1* bei gleichzeitiger Nichtbesetzung von *amtB\_2* einhergehen. Wie eine Differenzierung der beiden Bindemotive durch GlnR stattfinden könnte, ist jedoch noch unklar. Frühere Studien konnten eine Interaktion von GlnR mit den beiden Proteinen GlnA oder GlnK nachweisen, in deren Folge die DNA-Bindeaffinität von GlnR beeinflusst wurde (CASTELLEN et al., 2011; WRAY and FISHER, 2008). Eine mögliche Beteiligung von GlnA und/oder GlnK an der Differenzierung von GlnR zwischen den beiden Bindemotiven in der *amtB-glnK* Promoterregion wäre auch an dieser Stelle denkbar.

Neben der *glnRA*- und *amtB-glnK*-Transkription wird zudem die Transkription des Gens *gdh* durch GlnR reguliert. Bei 24 °C wird die Transkription von *gdh* durch GlnR reprimiert, was eine geringere *gdh*-Transkriptmenge bei 24 °C im Vergleich zu 37 °C zur Folge hat (Kap. IV.2.1). Die direkte Beteiligung von GlnR an der Transkriptionsregulation von *gdh* konnte wie bei *glnRA* und *amtB-glnK* durch EMSA-Studien nachgewiesen werden (AUER, 2012; SCHINDELE, 2012).

Somit kann aufgrund der hier durchgeführten Experimente sowie der EMSA-Studien (AUER, 2012; SCHINDELE, 2012) vermutet werden, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachtete temperaturabhängige Transkription der Stickstoffgene *glnRA*, *amtB-glnK* und *gdh* unter dem direkten Einfluss des Transkriptionsregulators GlnR steht. Die Aufklärung der metabolischen Veränderungen, die dieser Regulation zu Grunde liegen, kann zum besseren Verständnis der Anpassung von *L. monocytogenes* an verschiedene ökologische Nischen beitragen.

## VI. Literaturverzeichnis

- Alvarez-Dominguez, C., Carrasco-Marin, E., and Leyva-Cobian, F., 1993. Role of complement component C1q in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophage-like cell lines. *Infect Immun* 61:3664-3672.
- Alvarez-Dominguez, C., Roberts, R., and Stahl, P.D., 1997. Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. *Journal of Cell Science* 110:731-743.
- Amon, J., Titgemeyer, F., and Burkovski, A., 2010. Common patterns - unique features: nitrogen metabolism and regulation in Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34:588-605.
- Archer, D.L., 2002. Evidence that ingested nitrate and nitrite are beneficial to health. *Journal of Food Protection*® 65:872-875.
- Auer, F., 2012. Further characterization of the GlnR dependent regulation of the nitrogen metabolism in *Listeria monocytogenes*. Technische Universität München, unpublished, Master Thesis.
- Bakardjiev, A.I., Theriot, J.A., and Portnoy, D.A., 2006. *Listeria monocytogenes* Traffics from Maternal Organs to the Placenta and Back. *PLoS Pathogens* 2:66.
- Bang, W., Hanson, D.J., and Drake, M.A., 2008. Effect of salt and sodium nitrite on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the production of air-dried fresh pork sausage. *Journal of food protection* 71:191-195.
- Belitsky, B.R. and Sonenshein, A.L., 2004. Modulation of activity of *Bacillus subtilis* regulatory proteins GltC and TnrA by glutamate dehydrogenase. *J Bacteriol* 186:3399-3407.
- Belitsky, B.R., Wray, L.V., Jr., Fisher, S.H., Bohannon, D.E., and Sonenshein, A.L., 2000. Role of TnrA in nitrogen source-dependent repression of *Bacillus subtilis* glutamate synthase gene expression. *J Bacteriol* 182:5939-5947.
- Benedict, R., Partridge, T., Wells, D., and Buchanan, R., 1993. *Bacillus cereus*: aerobic growth kinetics. *Journal of food protection* 56:211-214.
- Benshushan, A., Tsafir, A., Arbel, R., Rahav, G., Ariel, I., and Rojansky, N., 2002. *Listeria* infection during pregnancy: a 10 year experience. *The Israel Medical Association journal* 4:776-780.
- Bierne, H., Garandeau, C., Pucciarelli, M.G., Sabet, C., Newton, S., Garcia-del Portillo, F., Cossart, P., and Charbit, A., 2004. Sortase B, a new class of sortase in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 186:1972-1982.
- Blankenberg, D., Von Kuster, G., Coraor, N., Ananda, G., Lazarus, R., Mangan, M., Nekrutenko, A., and Taylor, J., 2010. Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Current Protocols in Molecular Biology* Chapter 19:Unit 19.10. 01-21.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S.D., and Sorokin, A., 2001. The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* 11:731-753.
- Bonner, E.R., D'Elia, J.N., Billips, B.K., and Switzer, R.L., 2001. Molecular recognition of *pyr* mRNA by the *Bacillus subtilis* attenuation regulatory protein PyrR. *Nucleic Acids Research* 29:4851-4865.
- Borezée, E., Pellegrini, E., Beretti, J.-L., and Berche, P., 2001. SvpA, a novel surface virulence-associated protein required for intracellular survival of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* 147:2913-2923.
- Borisov, V.B., Forte, E., Konstantinov, A.A., Poole, R.K., Sarti, P., and Giuffrè, A., 2004. Interaction of the bacterial terminal oxidase cytochrome *bd* with nitric oxide. *FEBS letters* 576:201-204.

- Bortolussi, R., 2008. Listeriosis: a primer. *Canadian Medical Association Journal* 179:795-797.
- Brandenburg, J.L., Wray, L.V., Jr., Beier, L., Jarmer, H., Saxild, H.H., and Fisher, S.H., 2002. Roles of PucR, GlnR, and TnrA in regulating expression of the *Bacillus subtilis* ure P3 promoter. *J Bacteriol* 184:6060-6064.
- Braun, L., Ghebrehiwet, B., and Cossart, P., 2000. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *The EMBO journal* 19:1458-1466.
- Brown, S.W. and Sonenshein, A.L., 1996. Autogenous regulation of the *Bacillus subtilis* *glnRA* operon. *J Bacteriol* 178:2450-2454.
- Buchanan, R.L. and Solberg, M., 1972. Interaction of sodium nitrate, oxygen and pH on growth of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Science* 37:81-85.
- Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R., 1999. The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424:37-49.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25:169-193.
- Cammack, R., Joannou, C.L., Cui, X.Y., Torres Martinez, C., Maraj, S.R., and Hughes, M.N., 1999. Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1411:475-488.
- Camp, N.E., 2007. Methemoglobinemia. *Journal of Emergency Nursing* 33:172-174.
- Carver, T., Bohme, U., Otto, T.D., Parkhill, J., and Berriman, M., 2010. BamView: viewing mapped read alignment data in the context of the reference sequence. *Bioinformatics* 26:676-677.
- Castellen, P., Rego, F.G., Portugal, M.E., and Benelli, E.M., 2011. The *Streptococcus mutans* GlnR protein exhibits an increased affinity for the *glnRA* operon promoter when bound to GlnK. *Brazilian journal of medical and biological research* 44:1202-1208.
- Caulfield, J.L., Wishnok, J.S., and Tannenbaum, S.R., 1998. Nitric oxide-induced deamination of cytosine and guanine in deoxynucleosides and oligonucleotides. *Journal of Biological Chemistry* 273:12689-12695.
- Chakravorty, D. and Hensel, M., 2003. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and Infection* 5:621-627.
- Chao, A., Thun, M.J., Connell, C.J., McCullough, M.L., Jacobs, E.J., Flanders, W.D., Rodriguez, C., Sinha, R., and Calle, E.E., 2005. Meat consumption and risk of colorectal cancer. *JAMA: the journal of the American Medical Association* 293:172-182.
- Chatterjee, S.S., Hossain, H., Otten, S., Kuenne, C., Kuchmina, K., Machata, S., Domann, E., Chakraborty, T., and Hain, T., 2006. Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 74:1323-1338.
- Christensen, H., Kuhnert, P., Olsen, J.E., and Bisgaard, M., 2004. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1601-1609.
- Comtois, S.L., Gidley, M.D., and Kelly, D.J., 2003. Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* 149:121-129.
- Corker, H. and Poole, R.K., 2003. Nitric Oxide Formation by *Escherichia coli*: Dependence on Nitrite Reductase, the NO-sensing Regulator Fnr, and Flavohemoglobin Hmp. *Journal of Biological Chemistry* 278:31584-31592.
- Cossart, P. and Kocks, C., 1994. The actin-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 13:395-402.

- Cossart, P., Pizarro-Cerda, J., and Lecuit, M., 2003. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol* 13:23-31.
- Crawford, M.J. and Goldberg, D.E., 1998. Role for the *Salmonella* flavohemoglobin in protection from nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry* 273:12543-12547.
- Cross, A.J., Freedman, N.D., Ren, J., Ward, M.H., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A., Sinha, R., and Abnet, C.C., 2011. Meat consumption and risk of esophageal and gastric cancer in a large prospective study. *The American journal of gastroenterology* 106:432-442.
- Cross, A.J. and Sinha, R., 2004. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environmental and molecular mutagenesis* 44:44-55.
- Darwin, K.H., Ehrt, S., Gutierrez-Ramos, J.-C., Weich, N., and Nathan, C.F., 2003. The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. *Science* 302:1963-1966.
- DellaValle, C.T., Xiao, Q., Yang, G., Shu, X.-O., Aschebrook-Kilfoy, B., Zheng, W., Lan Li, H., Ji, B.T., Rothman, N., and Chow, W.H., 2013. Dietary nitrate and nitrite intake and risk of colorectal cancer in the Shanghai Women's Health Study. *International Journal of Cancer* [Epub ahead of print].
- Doi, A., Pack, S.P., Kodaki, T., and Makino, K., 2009. Reinvestigation of the molecular influence of hypoxanthine on the DNA cleavage efficiency of restriction endonucleases *Bgl*II, *Eco*RI and *Bam*HI. *The Journal of Biochemistry* 146:201-208.
- Domann, E., Leimeister-Wächter, M., Goebel, W., and 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. *Infect Immun* 59:65-72.
- Domann, E., Wehland, J., Rohde, M., Pistor, S., Hartl, M., Goebel, W., Leimeister-Wächter, M., Wuenscher, M., and Chakraborty, T., 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *The EMBO journal* 11:1981-1990.
- Dons, L., Olsen, J.E., and Rasmussen, O.F., 1994. Characterization of two putative *Listeria monocytogenes* genes encoding polypeptides homologous to the sensor protein CheA and the response regulator CheY of chemotaxis. *Mitochondrial DNA* 4:301-311.
- Dons, L., Rasmussen, O.F., and Olsen, J.E., 1992. Cloning and characterization of a gene encoding flagellin of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 6:2919-2929.
- Doroshchuk, N.A., Gelfand, M.S., and Rodionov, D.A., 2006. Regulation of nitrogen metabolism in gram-positive bacteria. *Molecular Biology (Moscow)* 40:919-926.
- Drabik-Markiewicz, G., van den Maagdenberg, K., de Mey, E., Deprez, S., Kowalska, T., and Paelinck, H., 2009. Role of proline and hydroxyproline in *N*-nitrosamine formation during heating in cured meat. *Meat science* 81:479-486.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., and Cossart, P., 1995. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of *inlB*, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* 16:251-261.
- Dramsi, S., Levi, S., Triller, A., and Cossart, P., 1998. Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study. *Infect Immun* 66:4461-4468.
- Drevets, D.A. and Bronze, M.S., 2008. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 53:151-165.
- Drevets, D.A., Sawyer, R.T., Potter, T.A., and Campbell, P.A., 1995. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun* 63:4268-4276.

- Duan, X., Yang, J., Ren, B., Tan, G., and Ding, H., 2009. Reactivity of nitric oxide with the [4Fe-4S] cluster of dihydroxyacid dehydratase from *Escherichia coli*. *The Biochemical journal* 417:783.
- Fang, F.C., 1997. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 99:2818-2825.
- Farber, J.M. and Peterkin, P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews* 55:476-511.
- Filippovich, S.Y., 2010. Bacterial NO synthases. *Biochemistry (Moscow)* 75:1217-1224.
- Fisher, S.H., 1999. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference! *Mol Microbiol* 32:223-232.
- Fisher, S.H., Rosenkrantz, M.S., and Sonenshein, A.L., 1984. Glutamine synthetase gene of *Bacillus subtilis*. *Gene* 32:427-438.
- Fisher, S.H. and Wray, L.V., 2002. Mutations in the *Bacillus subtilis glnRA* Operon That Cause Nitrogen Source-Dependent Defects in Regulation of TnrA Activity. *J Bacteriol* 184:4636-4639.
- Food Safety and Inspection Service, U.S.D.o.A., 2013. Arkansas Firm Recalls Chicken Polish Sausage and Chicken Brakfast Link Products Due To Potential *Listeria monocytogenes* Contamination. <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/recalls-and-public-health-alerts/recall-case-archive/archive/2013/FSIS-RC-021-2013> [Letzter Zugriff: 24. Februar 2013].
- Frey, A.D., Farrés, J., Bollinger, C.J., and Kallio, P.T., 2002. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins for alleviation of nitrosative stress in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 68:4835-4840.
- Fukuto, J.M., Cho, J.Y., and Switzer, C.H., 2000. The chemical properties of nitric oxide and related nitrogen oxides, p. 23-39. In: Ignarro, L. (Ed.), Nitric Oxide: Biology and Pathobiology. Academic Press, USA.
- Gaillard, J.-L. and Finlay, B.B., 1996. Effect of cell polarization and differentiation on entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocyte-like Caco-2 cell line. *Infect Immun* 64:1299-1308.
- Gandhi, M. and Chikindas, M.L., 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* 113:1-15.
- Gardner, P.R., Costantino, G., Szabó, C., and Salzman, A.L., 1997. Nitric oxide sensitivity of the aconitases. *Journal of Biological Chemistry* 272:25071-25076.
- Gardner, P.R., Gardner, A.M., Martin, L.A., and Salzman, A.L., 1998. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:10378-10383.
- Garmyn, D., Augagneur, Y., Gal, L., Vivant, A.-L., and Piveteau, P., 2012. *Listeria monocytogenes* Differential Transcriptome Analysis Reveals Temperature-Dependent Agr Regulation and Suggests Overlaps with Other Regulons. *PLoS ONE* 7:e43154.
- Garsin, D.A., 2010. Ethanolamine utilization in bacterial pathogens: roles and regulation. *Nature Reviews Microbiology* 8:290-295.
- Gilberthorpe, N.J. and Poole, R.K., 2008. Nitric Oxide Homeostasis in *Salmonella* Typhimurium: Roles of Respiratory Nitrate Reductase and Flavohemoglobin. *Journal of Biological Chemistry* 283:11146-11154.
- Gilmour, M., Graham, M., Van Domselaar, G., Tyler, S., Kent, H., Trout-Yakel, K., Larios, O., Allen, V., Lee, B., and Nadon, C., 2010. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics* 11:120.

- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K.D., Fsihi, H., Garcia-del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L.M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J.M., Ng, E., Nedjari, H., Nordtsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J.C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J.A., Voss, H., Wehland, J., and Cossart, P., 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294:849-852.
- Gomes, C.M., Giuffrè, A., Forte, E., Vicente, J.B., Saraiva, L.g.M., Brunori, M., and Teixeira, M., 2002. A Novel Type of Nitric-oxide Reductase *Escherichia coli* Flavorubredoxin. *Journal of Biological Chemistry* 277:25273-25276.
- Gomes, C.M., Vicente, J.B., Wasserfallen, A., and Teixeira, M., 2000. Spectroscopic studies and characterization of a novel electron-transfer chain from *Escherichia coli* involving a flavorubredoxin and its flavoprotein reductase partner. *Biochemistry* 39:16230-16237.
- Goncalves, V.L., Nobre, L.S., Vicente, J.B., Teixeira, M., and Saraiva, L.M., 2006. Flavohemoglobin requires microaerophilic conditions for nitrosative protection of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* 580:1817-1821.
- Gøtterup, J., Olsen, K., Knøchel, S., Tjener, K., Stahnke, L.H., and Møller, J.K., 2007. Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated *Staphylococci* and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system. *International Journal of Food Microbiology* 120:303-310.
- Goulet, V., Hebert, M., Hedberg, C., Laurent, E., Vaillant, V., De Valk, H., and Desenclos, J.-C., 2012. Incidence of Listeriosis and Related Mortality Among Groups at Risk of Acquiring Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases* 54:652-660.
- Gregory, S.H., Sagnimeni, A.J., and Wing, E.J., 1996. Expression of the *inlAB* operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry into hepatic cells in vivo. *Infect Immun* 64:3983-3986.
- Hain, T., Hossain, H., Chatterjee, S.S., Machata, S., Volk, U., Wagner, S., Brors, B., Haas, S., Kuenne, C.T., Billion, A., Otten, S., Pane-Farre, J., Engelmann, S., and Chakraborty, T., 2008. Temporal transcriptomic analysis of the *Listeria monocytogenes* EGD-e sigmaB regulon. *BMC Microbiology* 8:20.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580.
- Handelsblatt, 2011. Aldi-Lieferant ruft Wurst zurück. <http://www.handelsblatt.com/unternehmen/handeldienstleister/bakterien-fund-aldi-lieferant-ruft-wurst-zurueck/4486680.html> [Letzter Zugriff: 24. Februar 2014].
- Hansen, J.N. and Levin, R.A., 1975. Effect of Some Inhibitors Derived from Nitrite on Macromolecular Synthesis of *Bacillus cereus*. *Applied Microbiology* 30:862-869.
- Hausladen, A., Gow, A.J., and Stamler, J.S., 1998. Nitrosative stress: metabolic pathway involving the flavohemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14100-14105.
- Hecker, M., Pané-Farré, J., and Uwe, V., 2007. SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. *Annu Rev Microbiol* 61:215-236.
- Hill, B.G., Dranka, B.P., Bailey, S.M., Lancaster, J.R., and Darley-Usmar, V.M., 2010. What Part of NO Don't You Understand? Some Answers to the Cardinal Questions in Nitric Oxide Biology. *Journal of Biological Chemistry* 285:19699-19704.
- Hjelt, K., Lund, J., Scherling, B., Bendixen, S., Lundstram, K., Stovring, S., Voldsgaard, P., and Linnet, K., 1995. Methaemoglobinaemia among neonates in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatrica* 84:365-370.

- Hochgräfe, F., Wolf, C., Fuchs, S., Liebeke, M., Lalk, M., Engelmann, S., and Hecker, M., 2008. Nitric oxide stress induces different responses but mediates comparable protein thiol protection in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 190:4997-5008.
- Hof, H., 2004. An update on the medical management of listeriosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 5:1727-1735.
- Honikel, K.-O., 2008. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products. *Meat science* 78:68-76.
- Hord, N.G., Tang, Y., and Bryan, N.S., 2009. Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits. *The American Journal of Clinical Nutrition* 90:1-10.
- Hoskins, J., Alborn, W.E., Jr., Arnold, J., Blaszczyk, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S., Estrem, S.T., Fritz, L., Fu, D.J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J.S., Khoja, H., Kraft, A.R., Lagace, R.E., LeBlanc, D.J., Lee, L.N., Lefkowitz, E.J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S.M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C.W., Nicas, T.I., Norris, F.H., O'Gara, M., Peery, R.B., Robertson, G.T., Rockey, P., Sun, P.M., Winkler, M.E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, C.A., Baltz, R.H., Jaskunas, S.R., Rosteck, P.R., Jr., Skatrud, P.L., and Glass, J.I., 2001. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* 183:5709-5717.
- Hudson, J., 1992. Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*. *Letters in applied microbiology* 14:178-180.
- Hughes, M.N., 1999. Relationships between nitric oxide, nitroxyl ion, nitrosonium cation and peroxy nitrite. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1411:263-272.
- Jakszyn, P. and González, C.A., 2006. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World Journal of Gastroenterology* 12:4296-4303.
- Jiao, Y., Zhang, W., Ma, J., Wen, C., Wang, P., Wang, Y., Xing, J., Liu, W., Yang, L., and He, J., 2011. Early onset of neonatal listeriosis. *Pediatrics International* 53:1034-1037.
- Jin, B., Newton, S.M., Shao, Y., Jiang, X., Charbit, A., and Klebba, P.E., 2006. Iron acquisition systems for ferric hydroxamates, haemin and haemoglobin in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 59:1185-1198.
- Jira, W., 2004. Chemische Vorgänge beim Pökeln und Räuchern. Teil 1: Pökeln = Chemical reactions of curing and smoking. Part 1: Curing. *Fleischwirtschaft* 84:235-239.
- Johansson, J., Mandin, P., Renzoni, A., Chiaruttini, C., Springer, M., and Cossart, P., 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* 110:551-561.
- Jonquière, R., Pizarro-Cerdá, J., and Cossart, P., 2001. Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 42:955-965.
- Joseph, B. and Goebel, W., 2007. Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. *Microbes and Infection* 9:1188-1195.
- Joseph, B., Przybilla, K., Stuhler, C., Schauer, K., Slaghuis, J., Fuchs, T.M., and Goebel, W., 2006. Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening. *J Bacteriol* 188:556-568.
- Kabisch, J., Pichner, R., Kaspar, D., Wüstner, S., Müller, S., Scherer, S., and Gareis, M., 2012. Infektionserreger in Rohwurstzeugnissen: Wirkung von Nitritpökelsalz auf grampositive Erreger in Rohwurst. *Fleischwirtschaft* 92:93-99.
- Kathariou, S., 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of food protection* 65:1811-1829.
- Kazmierczak, M.J., Mithoe, S.C., Boor, K.J., and Wiedmann, M., 2003. *Listeria monocytogenes*  $\sigma$ B regulates stress response and virulence functions. *J Bacteriol* 185:5722-5734.

- Kennedy, L.J., Moore, K., Caulfield, J.L., Tannenbaum, S.R., and Dedon, P.C., 1997. Quantitation of 8-oxoguanine and strand breaks produced by four oxidizing agents. *Chem Res Toxicol* 10:386-392.
- Killday, K.B., Tempesta, M.S., Bailey, M.E., and Metral, C.J., 1988. Structural characterization of nitrosylhemochromogen of cooked cured meat: implications in the meat-curing reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36:909-914.
- Kirchner, M. and Higgins, D.E., 2008. Inhibition of ROCK activity allows InlF-mediated invasion and increased virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 68:749-767.
- Klarsfeld, A.D., Goossens, P.L., and Cossart, P., 1994. Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*. *Mol Microbiol* 13:585-597.
- Kloosterman, T.G., Hendriksen, W.T., Bijlsma, J.J., Bootsma, H.J., van Hijum, S.A., Kok, J., Hermans, P.W., and Kuipers, O.P., 2006. Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 281:25097-25109.
- Klose, K.E. and Mekalanos, J.J., 1997. Simultaneous prevention of glutamine synthesis and high-affinity transport attenuates *Salmonella* Typhimurium virulence. *Infect Immun* 65:587-596.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H., and Cossart, P., 1992. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. *Cell* 68:521-531.
- Kuhn, M., Kathariou, S., and Goebel, W., 1988. Hemolysin supports survival but not entry of the intracellular bacterium *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 56:79-82.
- Lado, B.H. and Yousef, A.E., 2007. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors, p. 157. In: Ryser, E.T. and Marth, E.I. (eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Taylor & Francis Group, USA.
- Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M., and Salzberg, S.L., 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biology* 10:R25.
- Larsen, R., Kloosterman, T.G., Kok, J., and Kuipers, O.P., 2006. GlnR-mediated regulation of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 188:4978-4982.
- Larsson, S.C., Orsini, N., and Wolk, A., 2006. Processed meat consumption and stomach cancer risk: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute* 98:1078-1087.
- Lecuit, M., Nelson, D.M., Smith, S.D., Khun, H., Huerre, M., Vacher-Lavenu, M.-C., Gordon, J.I., and Cossart, P., 2004. Targeting and crossing of the human maternofetal barrier by *Listeria monocytogenes*: Role of internalin interaction with trophoblast E-cadherin. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:6152-6157.
- Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C., and Cossart, P., 2001. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* 292:1722-1725.
- Ledala, N., Sengupta, M., Muthaiyan, A., Wilkinson, B.J., and Jayaswal, R., 2010. Transcriptomic response of *Listeria monocytogenes* to iron limitation and Fur mutation. *Appl Environ Microbiol* 76:406-416.
- Leimeister-Wächter, M., Domann, E., and Chakraborty, T., 1992. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J Bacteriol* 174:947-952.
- Lepoivre, M., Fieschi, F., Coves, J., Thelander, L., and Fontecave, M., 1991. Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 179:442-448.
- Lepoivre, M., Flaman, J.-M., Bobé, P., Lemaire, G., and Henry, Y., 1994. Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 269:21891-21897.

- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25:2078-2079.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 25:402-408.
- Lu, Y., Turner, R.J., and Switzer, R.L., 1996. Function of RNA secondary structures in transcriptional attenuation of the *Bacillus subtilis* *pyr* operon. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:14462-14467.
- Lundberg, J.O., Weitzberg, E., Cole, J.A., and Benjamin, N., 2004. Nitrate, bacteria and human health. *Nature Reviews Microbiology* 2:593-602.
- MacMicking, J., Xie, Q.-w., and Nathan, C., 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annual review of immunology* 15:323-350.
- Majumdar, D., 2003. The blue baby syndrome. *Resonance* 8:20-30.
- Marino, M., Hoffmann, T., Schmid, R., Möbitz, H., and Jahn, D., 2000. Changes in protein synthesis during the adaptation of *Bacillus subtilis* to anaerobic growth conditions. *Microbiology* 146:97-105.
- Marquis, H., Doshi, V., and Portnoy, D.A., 1995. The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infect Immun* 63:4531-4534.
- Martinussen, J. and Hammer, K., 1998. The *carB* gene encoding the large subunit of carbamoylphosphate synthetase from *Lactococcus lactis* is transcribed monocistronically. *J Bacteriol* 180:4380-4386.
- Martinussen, J., Schallert, J., Andersen, B., and Hammer, K., 2001. The Pyrimidine Operon *pyrRPB-carA* from *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* 183:2785-2794.
- Mengaud, J., Geoffroy, C., and Cossart, P., 1991. Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect Immun* 59:1043-1049.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege, R.M., and Cossart, P., 1996. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84:923-932.
- Michel, E., Mengaud, J., Galsworthy, S., and Cossart, P., 1998. Characterization of a large motility gene cluster containing the *cheR*, *motAB* genes of *Listeria monocytogenes* and evidence that PrfA downregulates motility genes. *FEMS Microbiol Lett* 169:341-347.
- Møller, J.K., Jensen, J.S., Skibsted, L.H., and Knöchel, S., 2003. Microbial formation of nitrite-cured pigment, nitrosylmyoglobin, from metmyoglobin in model systems and smoked fermented sausages by *Lactobacillus fermentum* strains and a commercial starter culture. *European Food Research and Technology* 216:463-469.
- Moore, C.M., Nakano, M.M., Wang, T., Ye, R.W., and Helmann, J.D., 2004. Response of *Bacillus subtilis* to Nitric Oxide and the Nitrosating Agent Sodium Nitroprusside. *J Bacteriol* 186:4655-4664.
- Mujahid, S., Orsi, R., Vangay, P., Boor, K., and Wiedmann, M., 2013. Refinement of the *Listeria monocytogenes*  $\sigma B$  regulon through quantitative proteomic analysis. *Microbiology* 159:1109-1119.
- Nakano, M.M., 2002. Induction of ResDE-dependent gene expression in *Bacillus subtilis* in response to nitric oxide and nitrosative stress. *J Bacteriol* 184:1783-1787.
- Nakano, M.M., Geng, H., Nakano, S., and Kobayashi, K., 2006. The nitric oxide-responsive regulator NsrR controls ResDE-dependent gene expression. *J Bacteriol* 188:5878-5887.

- Nakano, M.M., Hoffmann, T., Zhu, Y., and Jahn, D., 1998. Nitrogen and oxygen regulation of *Bacillus subtilis nasDEF* encoding NADH-dependent nitrite reductase by TnrA and ResDE. *J Bacteriol* 180:5344-5350.
- Nakano, T., Asagoshi, K., Terato, H., Suzuki, T., and Ide, H., 2005a. Assessment of the genotoxic potential of nitric oxide-induced guanine lesions by in vitro reactions with *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Mutagenesis* 20:209-216.
- Nakano, T., Katafuchi, A., Shimizu, R., Terato, H., Suzuki, T., Tauchi, H., Makino, K., Skorvaga, M., Van Houten, B., and Ide, H., 2005b. Repair activity of base and nucleotide excision repair enzymes for guanine lesions induced by nitrosative stress. *Nucleic Acids Research* 33:2181-2191.
- Nakano, Y. and Kimura, K., 1991. Purification and Characterization of a Repressor for the *Bacillus cereus glnRA* Operon. *The Journal of Biochemistry* 109:223-228.
- Newton, S., Klebba, P.E., Raynaud, C., Shao, Y., Jiang, X., Dubail, I., Archer, C., Frehel, C., and Charbit, A., 2005. The *svpA-srtB* locus of *Listeria monocytogenes*: Fur-mediated iron regulation and effect on virulence. *Mol Microbiol* 55:927-940.
- Niemann, H.H., Jäger, V., Butler, P.J.G., van den Heuvel, J., Schmidt, S., Ferraris, D., Gherardi, E., and Heinz, D.W., 2007. Structure of the Human Receptor Tyrosine Kinase Met in Complex with the *Listeria* Invasion Protein InlB. *Cell* 130:235-246.
- Oliver, H., Orsi, R., Wiedmann, M., and Boor, K., 2010. *Listeria monocytogenes*  $\sigma$ B has a small core regulon and a conserved role in virulence but makes differential contributions to stress tolerance across a diverse collection of strains. *Appl Environ Microbiol* 76:4216-4232.
- Oliver, H.F., Orsi, R.H., Ponnala, L., Keich, U., Wang, W., Sun, Q., Cartinhour, S.W., Filiatrault, M.J., Wiedmann, M., and Boor, K.J., 2009. Deep RNA sequencing of *L. monocytogenes* reveals overlapping and extensive stationary phase and sigma B-dependent transcriptomes, including multiple highly transcribed noncoding RNAs. *BMC Genomics* 10:641.
- Ospina, A., 2012. Further characterization of the nitrogen metabolism in *Listeria monocytogenes*. Technische Universität München, unpublished, Bachelor Thesis.
- Pamer, E.G., 2004. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature Reviews Immunology* 4:812-823.
- Parida, S.K., Domann, E., Rohde, M., Muller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J., and Chakraborty, T., 1998. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Mol Microbiol* 28:81-93.
- Peel, M., Donachie, W., and Shaw, A., 1988. Temperature-dependent Expression of Flagella of *Listeria manocytogenes* Studied by Electron Microscopy, SDS-PAGE and Western Blotting. *Journal of General Microbiology* 134:2171-2178.
- Pegg, R.B. and Shahidi, F., 2008. *Nitrite curing of meat: The N-nitrosamine problem and nitrite alternatives*. John Wiley & Sons, USA.
- Petran, R. and Zottola, E., 1989. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Science* 54:458-460.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30:e36.
- Poyart, C., Abachin, E., Razafimanantsoa, I., and Berche, P., 1993. The zinc metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is required for maturation of phosphatidylcholine phospholipase C: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* 61:1576-1580.

- Premaratne, R.J., Lin, W.J., and Johnson, E.A., 1991. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 57:3046-3048.
- Raengpradub, S., Wiedmann, M., and Boor, K.J., 2008. Comparative analysis of the sigma B-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. *Appl Environ Microbiol* 74:158-171.
- Richardson, A.R., Dunman, P.M., and Fang, F.C., 2006. The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity. *Mol Microbiol* 61:927-939.
- Richardson, A.R., Libby, S.J., and Fang, F.C., 2008. A Nitric Oxide-Inducible Lactate Dehydrogenase Enables *Staphylococcus aureus* to Resist Innate Immunity. *Science* 319:1672-1676.
- Richardson, A.R., Payne, E.C., Younger, N., Karlinsey, J.E., Thomas, V.C., Becker, L.A., Navarre, W.W., Castor, M.E., Libby, S.J., and Fang, F.C., 2011. Multiple Targets of Nitric Oxide in the Tricarboxylic Acid Cycle of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Cell Host Microbe* 10:33-43.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K., 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139-140.
- Rogers, P.A., Eide, L., Klungland, A., and Ding, H., 2003. Reversible inactivation of *E. coli* endonuclease III via modification of its [4Fe-4S] cluster by nitric oxide. *DNA repair* 2:809-817.
- Rogstam, A., Larsson, J.T., Kjelgaard, P., and von Wachenfeldt, C., 2007. Mechanisms of adaptation to nitrosative stress in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 189:3063-3071.
- Röszer, T., 2012. *The biology of subcellular nitric oxide*. Springer Science+Business Media S.A., Luxembourg.
- Rutherford, K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.A., and Barrell, B., 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* 16:944-945.
- Sanz, Y., Vila, R., Toldra, F., Nieto, P., and Flores, J., 1997. Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. *International Journal of Food Microbiology* 37:225-229.
- Schapiro, J.M., Libby, S.J., and Fang, F.C., 2003. Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8496-8501.
- Schauer, K., Geginat, G., Liang, C., Goebel, W., Dandekar, T., and Fuchs, T., 2010. Deciphering the intracellular metabolism of *Listeria monocytogenes* by mutant screening and modelling. *BMC Genomics* 11:573.
- Schindele, F.M., 2012. Further characterization of the nitrogen metabolism in *Listeria monocytogenes*. Technische Universität München, unpublished, Master Thesis.
- Schlag, S., Nerz, C., Birkenstock, T.A., Altenberend, F., and Gotz, F., 2007. Inhibition of staphylococcal biofilm formation by nitrite. *J Bacteriol* 189:7911-7919.
- Schlech, W.F. and Acheson, D., 2000. Foodborne Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases* 31:770-775.
- Schrader, K.D., 2010. Investigating the control of *Listeria monocytogenes* on uncured, non-nitrate-or-nitrite-added meat products. Iowa State University, Graduate Thesis and Dissertations.
- Schreier, H.J., Brown, S.W., Hirschi, K.D., Nomellini, J.F., and Sonenshein, A.L., 1989. Regulation of *Bacillus subtilis* glutamine synthetase gene expression by the product of the *glnR* gene. *J Mol Biol* 210:51-63.

- Schubert, W.-D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M.P., Domann, E., Wehland, J., Chakraborty, T., and Heinz, D.W., 2002. Structure of Internalin, a Major Invasion Protein of *Listeria monocytogenes*, in Complex with Its Human Receptor E-Cadherin. *Cell* 111:825-836.
- Schuchat, A., Swaminathan, B., and Broome, C.V., 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* 4:169-183.
- Scortti, M., Monzó, H.J., Lacharme-Lora, L., Lewis, D.A., and Vázquez-Boland, J.A., 2007. The PrfA virulence regulon. *Microbes and Infection* 9:1196-1207.
- Shabala, L., Lee, S.H., Cannesson, P., and Ross, T., 2008. Acid and NaCl limits to growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics. *Journal of food protection* 71:1169-1177.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., and Ireton, K., 2000. InlB-Dependent Internalization of *Listeria* Is Mediated by the Met Receptor Tyrosine Kinase. *Cell* 103:501-510.
- Simon, J., 2002. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiol Rev* 26:285-309.
- Sinha, S.C. and Smith, J.L., 2001. The PRT protein family. *Curr Opin Struct Biol* 11:733-739.
- Smith, G.A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N.C., Portnoy, D.A., and Goldfine, H., 1995. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* 63:4231-4237.
- Sonenshein, A.L., 2005. CodY, a global regulator of stationary phase and virulence in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Microbiol* 8:203-207.
- Sonenshein, A.L., 2007. Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology* 5:917-927.
- Strauch, M.A., Aronson, A.I., Brown, S.W., Schreier, H.J., and Sonenshein, A.L., 1988. Sequence of the *Bacillus subtilis* glutamine synthetase gene region. *Gene* 71:257-265.
- Suzuki, T., Yamaoka, R., Nishi, M., Ide, H., and Makino, K., 1996. Isolation and Characterization of a Novel Product, 2'-Deoxyoxanosine, from 2'-Deoxyguanosine, Oligodeoxynucleotide, and Calf Thymus DNA Treated by Nitrous-Acid and Nitric-Oxide. *Journal of the American Chemical Society* 118:2515-2516.
- Tasara, T. and Stephan, R., 2007. Evaluation of housekeeping genes in *Listeria monocytogenes* as potential internal control references for normalizing mRNA expression levels in stress adaptation models using real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett* 269:265-272.
- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K., and Fraser, C.M., 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293:498-506.
- Tilney, L.G. and Portnoy, D.A., 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Cell Biology* 109:1597-1608.
- Titov, V.Y. and Petrenko, Y.M., 2005. Proposed mechanism of nitrite-induced methemoglobinemia. *Biochemistry (Moscow)* 70:473-483.

- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., Loh, E., Gripenland, J., Tiensuu, T., Vaitkevicius, K., Barthelemy, M., Vergassola, M., Nahori, M.-A., Soubigou, G., Regnault, B., Coppee, J.-Y., Lecuit, M., Johansson, J., and Cossart, P., 2009. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* 459:950-956.
- Tomchick, D.R., Turner, R.J., Switzer, R.L., and Smith, J.L., 1998. Adaptation of an enzyme to regulatory function: structure of *Bacillus subtilis* PyrR, a *pyr* RNA-binding attenuation protein and uracil phosphoribosyltransferase. *Structure* 6:337-350.
- Truglio, J.J., Croteau, D.L., Van Houten, B., and Kisker, C., 2006. Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. *Chemical reviews* 106:233-252.
- Turnbull, P.C., Kramer, J.M., Jørgensen, K., Gilbert, R.J., and Melling, J., 1979. Properties and production characteristics of vomiting, diarrheal, and necrotizing toxins of *Bacillus cereus*. *The American Journal of Clinical Nutrition* 32:219-228.
- Turner, R.J., Lu, Y., and Switzer, R.L., 1994. Regulation of the *Bacillus subtilis* pyrimidine biosynthetic (*pyr*) gene cluster by an autogenous transcriptional attenuation mechanism. *J Bacteriol* 176:3708-3722.
- van Wonderen, J.H., Burlat, B., Richardson, D.J., Cheesman, M.R., and Butt, J.N., 2008. The nitric oxide reductase activity of cytochrome c nitrite reductase from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 283:9587-9594.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J., 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14:584-640.
- Vermeer, I., Pachen, D., Dallinga, J.W., Kleinjans, J., and Van Maanen, J., 1998. Volatile N-nitrosamine formation after intake of nitrate at the ADI level in combination with an amine-rich diet. *Environmental Health Perspectives* 106:459-463.
- Watkins, J. and Sleath, K.P., 1981. Isolation and Enumeration of *Listeria monocytogenes* from Sewage, Sewage Sludge and River Water. *Journal of Applied Microbiology* 50:1-9.
- Williams, T., Joseph, B., Beier, D., Goebel, W., and Kuhn, M., 2005. Response regulator DegU of *Listeria monocytogenes* regulates the expression of flagella-specific genes. *FEMS Microbiol Lett* 252:287-298.
- Winter, C.H., Brockmann, S.O., Sonnentag, S.R., Schaupp, T., Prager, R., Hof, H., Becker, B., Stegmans, T., Roloff, H.U., Vollrath, G., Kuhm, A.E., Mezger, B.B., Schmolz, G.K., Klittich, G.B., Pfaff, G., and Piechotowski, I., 2009. Prolonged hospital and community-based listeriosis outbreak caused by ready-to-eat scalded sausages. *Journal of Hospital Infection* 73:121-128.
- Wood, S., Maroushek, N., and Czuprynski, C.J., 1993. Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. *Infect Immun* 61:3068-3072.
- Wray, L.V., Atkinson, M.R., and Fisher, S.H., 1994. The nitrogen-regulated *Bacillus subtilis* *nrgAB* operon encodes a membrane protein and a protein highly similar to the *Escherichia coli* *glnB*-encoded PII protein. *J Bacteriol* 176:108-114.
- Wray, L.V., Jr., Ferson, A.E., and Fisher, S.H., 1997. Expression of the *Bacillus subtilis* *ureABC* operon is controlled by multiple regulatory factors including CodY, GlnR, TnrA, and SpoOH. *J Bacteriol* 179:5494-5501.
- Wray, L.V., Jr., Ferson, A.E., Rohrer, K., and Fisher, S.H., 1996. TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8841-8845.
- Wray, L.V., Jr. and Fisher, S.H., 2008. *Bacillus subtilis* GlnR contains an autoinhibitory C-terminal domain required for the interaction with glutamine synthetase. *Mol Microbiol* 68:277-285.

- Wray, L.V., Jr., Zalieckas, J.M., Ferson, A.E., and Fisher, S.H., 1998. Mutational analysis of the TnrA-binding sites in the *Bacillus subtilis* *nrgAB* and *gabP* promoter regions. *J Bacteriol* 180:2943-2949.
- Wright, R.O., Lewander, W.J., and Woolf, A.D., 1999. Methemoglobinemia: Etiology, Pharmacology, and Clinical Management. *Annals of Emergency Medicine* 34:646-656.
- Wuenscher, M.D., Köhler, S., Goebel, W., and Chakraborty, T., 1991. Gene disruption by plasmid integration in *Listeria monocytogenes*: insertional inactivation of the listeriolysin determinant *lisA*. *Molecular & general genetics MGG* 228:177-182.
- Wurtzel, O., Sesto, N., Mellin, J.R., Karunker, I., Edelheit, S., Becavin, C., Archambaud, C., Cossart, P., and Sorek, R., 2012. Comparative transcriptomics of pathogenic and non-pathogenic *Listeria* species. *Molecular Systems Biology* 8:583.
- Wüstner, S., 2010. Molecular effects of acidified nitrite on *Listeria monocytogenes*. Technische Universität München, unpublished, Master Thesis.
- Xi, Y., Sullivan, G.A., Jackson, A.L., Zhou, G.H., and Sebranek, J.G., 2011. Use of natural antimicrobials to improve the control of *Listeria monocytogenes* in a cured cooked meat model system. *Meat science* 88:503-511.
- Xiao, Q., Jiang, X., Moore, K.J., Shao, Y., Pi, H., Dubail, I., Charbit, A., Newton, S.M., and Klebba, P.E., 2011. Sortase independent and dependent systems for acquisition of haem and haemoglobin in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 80:1581-1597.
- Ye, B.-C., Zhang, Y., Yu, H., Yu, W.-B., Liu, B.-H., Yin, B.-C., Yin, C.-Y., Li, Y.-Y., Chu, J., and Zhang, S.-L., 2009. Time-resolved transcriptome analysis of *Bacillus subtilis* responding to valine, glutamate, and glutamine. *PLoS ONE* 4:e7073.
- Yoshida, K.-i., Yamaguchi, H., Kinehara, M., Ohki, Y.-h., Nakaura, Y., and Fujita, Y., 2003. Identification of additional TnrA-regulated genes of *Bacillus subtilis* associated with a TnrA box. *Mol Microbiol* 49:157-165.
- Zalieckas, J.M., Wray, L.V., Jr., and Fisher, S.H., 2006. Cross-regulation of the *Bacillus subtilis* *glnRA* and *tnrA* genes provides evidence for DNA binding site discrimination by GlnR and TnrA. *J Bacteriol* 188:2578-2585.
- Zhang, Y.Q., Ren, S.X., Li, H.L., Wang, Y.X., Fu, G., Yang, J., Qin, Z.Q., Miao, Y.G., Wang, W.Y., Chen, R.S., Shen, Y., Chen, Z., Yuan, Z.H., Zhao, G.P., Qu, D., Danchin, A., and Wen, Y.M., 2003. Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol Microbiol* 49:1577-1593.

## VII. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

5'-NTR	5'-nichttranslatierte Region
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
ATCC	American Type Culture Collection
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BAM	binäre Darstellung einer SAM-Datei
BAM.BAI	Indexform einer BAM-Datei
<i>BamHI</i>	Typ-II-Restriktionsenzym; isoliert aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BHI	Brain Heart Infusion
bzw.	beziehungsweise
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	<i>complementary</i> (komplementäre) DNA
Ct	<i>cycle threshold</i> (Schwellenwert-Zyklus)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure = DNS)
DTT	Dithiothreitol
E	Primereffizienz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>EcoRI</i>	Nuklease; aus <i>Escherichia coli</i> Stamm R isoliert
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Em10-Platten	BHI-Agarplatten, die 10 µg/ml Erythromycin enthalten
Em <sup>R</sup>	Erythromycin-resistent
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
FASTQ	textbasiertes Dateiformat, in dem die Nukleotidsequenzen mit ihren jeweiligen Qualitätswerten enthalten sind
FASTQSANGER	Sanger FASTQ-Format
Fe-S-Cluster	Eisen-Schwefel-Cluster
FTP	<i>File Transfer Protocol</i> (Datenübertragungsverfahren)
Gln	Glutamin
H <sub>2</sub> O	Wasser
Hb	Hämoglobin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
Hn	Hämin
HNO <sub>2</sub>	Salpetrige Säure
Kap.	Kapitel
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
LB	Luria Bertani
Lipid-OO <sup>•</sup>	Lipidperoxyl-Radikal
Lipid-OO-NO	Lipidperoxynitrit
log <sub>2</sub>	Logarithmus zur Basis 2
MethHb	Methämoglobin
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MMLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i> (Moloney Maus-Leukämievirus)

mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (messenger Ribonukleinsäure)
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Distickstofftrioxid
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid
NADP	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaNO <sub>2</sub>	Natriumnitrit
NaNO <sub>3</sub>	Natriumnitrat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	Next Generation Sequenzierung
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium-Ion
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sup>-</sup>	Nitrosyl-Anion
NO <sup>+</sup>	Nitrosonium-Kation
NO <sup>•</sup>	Stickstoffmonoxid-Radikal
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit-Ion
NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Stickstoffdioxid
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
ONOO <sup>-</sup>	Peroxyinitrit
ori	<i>origin of replication</i> (Replikationsursprung)
p	<i>probability</i> (Wahrscheinlichkeit)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PRPP	5-Phospho- $\alpha$ -D-Ribosyl-1-Pyrophosphat
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
REST	<i>relative expression software tool</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure = RNS)
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> (reaktive Stickstoff-Intermediate)
RPKM	<i>reads per kilobase per million mapped reads</i> (Reads pro Kilobase pro Millionen gemappten Reads)
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i> (ribosomale Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RTL	Relatives Transkriptionslevel
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. Typhimurium</i>	<i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium
SAM	tabulatorgetrennte Textdatei, die Sequenzalignments enthält
SAP	Shrimp Alkalische Phosphatase
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SNP	<i>sodium nitroprusside</i> (Natrium-Nitroprussid)
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
SSC	<i>saline sodium citrat</i> (Kochsalz-Natriumcitrat)
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
ÜNK	Übernachtkultur
UV	ultraviolett
ZIEL	Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung

Einheiten:

%	Prozent
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
Bp	Basenpaar
cm	Zentimeter
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
g	Gramm bzw. RZB (relative Zentrifugalbeschleunigung)
h	Stunde
kb	Kilobase
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
l	Liter
M	Molar (mol/l)
m	Meter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
pmol	Picomol
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen/Minute)
s	Sekunde
U	<i>Unit</i> (Einheit)
V	Volt
Ω	Ohm

Vorsatzzeichen/Vorsätze:

µ	mikro ( $10^{-6}$ )
k	kilo ( $10^3$ )
m	milli ( $10^{-3}$ )
n	nano ( $10^{-9}$ )
p	pico ( $10^{-12}$ )

Nukleobasen /Nukleotide:

A	Adenin
AMP	Adenosinmonophosphat
C	Cytosin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
G	Guanin

---

GMP	Guanosinmonophosphat
IMP	Inosinmonophosphat
T	Thymin
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat

Symbole:

$\Delta$	Delta
$\emptyset$	Durchmesser
$\leq$	kleiner gleich
$\geq$	größer gleich
$\infty$	Zeichen für „unendlich“

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b>	Vereinfachte Darstellung der Generierung von NO während der Wurstfermentation	8
<b>Abb. 2:</b>	Vereinfachte Darstellung einiger von NO ausgehenden chemischen Reaktionen, die im Wurstmilieu während der Fermentation stattfinden können	9
<b>Abb. 3:</b>	Plasmidkarte von pLSV101	27
<b>Abb. 4:</b>	Schematische Darstellung der Herstellung einer <i>L. monocytogenes</i> in-frame Deletionsmutante	28
<b>Abb. 5:</b>	Nitrat-abhängiges Wachstum von <i>L. monocytogenes</i>	43
<b>Abb. 6:</b>	Nitrit-abhängiges Wachstum von <i>L. monocytogenes</i>	44
<b>Abb. 7:</b>	Bestimmung der NaNO <sub>2</sub> -Inkubationsdauer für die Transkriptionsanalysen	45
<b>Abb. 8:</b>	Validierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR	48
<b>Abb. 9:</b>	Nitrit-abhängiges Wachstum von <i>B. cereus</i> und <i>S. epidermidis</i>	49
<b>Abb. 10:</b>	Nitrit-abhängige <i>pyrAB</i> -Transkription in <i>B. cereus</i> und <i>S. epidermidis</i>	50
<b>Abb. 11:</b>	Nitrit-abhängige <i>hmp</i> -Transkription in <i>B. cereus</i> und <i>S. epidermidis</i>	51
<b>Abb. 12:</b>	SNP-bedingte Wachstumshemmung von <i>L. monocytogenes</i>	52
<b>Abb. 13:</b>	SNP-induzierte Transkriptionshemmung von <i>L. monocytogenes pyrAB</i>	53
<b>Abb. 14:</b>	Einfluss von Nitrit auf die <i>pyrAB</i> -Transkription in <i>L. monocytogenes</i> in Charge II	54
<b>Abb. 15:</b>	Medienabhängige <i>pyrAB</i> -Transkription in <i>L. monocytogenes</i>	55
<b>Abb. 16:</b>	Nitrit-induzierte <i>pyrAB</i> -Transkription in <i>L. monocytogenes</i> EGDe $\Delta$ <i>pyrP</i>	56
<b>Abb. 17:</b>	Wirkung von Nitrit auf das <i>L. monocytogenes</i> Wachstum bei 42 °C	57
<b>Abb. 18:</b>	Validierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR	63
<b>Abb. 19:</b>	Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> mit Glutamin bzw. Ammonium als Stickstoffquelle	64
<b>Abb. 20:</b>	GlnR-abhängige Transkription von <i>glnA</i> , <i>amtB</i> und <i>gdh</i> bei (A) 24 °C und (B) 37 °C	70

---

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 1:</b>	In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme	16
<b>Tab. 2:</b>	In dieser Arbeit verwendete Plasmide	16
<b>Tab. 3:</b>	In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide	16
<b>Tab. 4:</b>	In dieser Arbeit verwendete Medienzusätze	19
<b>Tab. 5A:</b>	Liste von Genen, deren Transkription durch Nitrit aktiviert wurde	46
<b>Tab. 5B:</b>	Liste von Genen, deren Transkription durch Nitrit inhibiert wurde	47
<b>Tab. 6:</b>	Liste der durch Sequenzierung identifizierten Gene, deren Insertion sich im Vergleich zum Wildtyp nachteilig auf das <i>L. monocytogenes</i> EGD Wachstum in Gegenwart von Nitrit auswirkten	58
<b>Tab. 7A:</b>	Gene, welche bei 24 °C stärker transkribiert wurden als bei 37 °C	60
<b>Tab. 7B:</b>	Gene, welche bei 37 °C stärker transkribiert wurden als bei 24 °C	61
<b>Tab. 8:</b>	Das temperaturabhängige Regulon von GlnR in <i>L. monocytogenes</i> EGDe	65

---

## Eigene Publikationen und Konferenzbeiträge

### Eigene Publikationen

Goeke, D., Kaspar, D., Stoeckle, C., Grubmüller, S., Berens, C., Klotzsche, M., and Hillen, W., 2012. Short peptides act as inducers, anti-inducers and corepressors of Tet repressor. *J Mol Biol* 416:33-45.

Kabisch, J., Pichner, R., Kaspar, D., Wüstner, S., Müller, S., und Scherer, S., 2011. Wirkung von Nitrit auf Gram positive Infektionserreger in Rohwurstzeugnissen. *Mitteilungsblatt Fleischforschung Kulmbach* 50:215-228.

Kabisch, J., Pichner, R., Kaspar, D., Wüstner, S., Müller, S., Scherer, S., und Gareis, M., 2012. Infektionserreger in Rohwurstzeugnissen: Wirkung von Nitritpökelsalz auf grampositive Erreger in Rohwurst. *Fleischwirtschaft* 92:93-99.

Kaspar, D., Auer, F., Ospina, A., Schardt, J., Held, C., Ehrenreich, A., Scherer, S., and Müller-Herbst, S., 2014. Temperature-dependent regulation of GlnR target genes in *Listeria monocytogenes*. (In preparation)

### Konferenzbeiträge

#### *Vorträge*

Kaspar, D., Müller, S., Scherer, S. Wirkung von Natriumnitrit auf molekularbiologischer und genetischer Ebene. 45. Kulmbacher Woche, 2010, Kulmbach.

Kaspar, D., Wüstner, S., Eder, D., Kabisch, J., Pichner, R., Gareis M., Scherer, S., Müller, S. Nitrite induced gene expression in *Listeria monocytogenes*. 1<sup>st</sup> International Symposium on Fermented Meats, 2011, Freising.

#### *Posterpräsentationen*

Kabisch, J.; Pichner, R.; Müller, S.; Kaspar, D.; Kador, M.; Scherer, S.; Gareis, M. Wirkung von Nitrit auf Gram-positive Infektionserreger in Rohwurstzeugnissen. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelhygiene, 2010, Garmisch-Partenkirchen.

Kaspar, D., Eder, D., Kabisch, J., Pichner, R., Gareis, M., Scherer S., Müller, S. Molecular effect of nitrite on *Listeria monocytogenes*. 3<sup>rd</sup> Joint Conference German Society for Hygiene and Microbiology and Association for General and Applied Microbiology, 2010, Hannover.

Kaspar, D., Eder, D., Kabisch, J., Pichner, R., Gareis, M., Scherer S., Müller, S. Sodium nitrite inhibits the transcription of the *pyr* genes in *Listeria monocytogenes*. 4<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, 2011, Genf.

Kaspar, D., Eder, D., Scherer, S., Müller, S. Effect of temperature on the nitrogen metabolism in *Listeria monocytogenes*. Annual Conference of the VAAM, 2012, Tübingen.

**Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer, der mir die Bearbeitung dieser spannenden und vielseitigen Dissertation an seinem Lehrstuhl ermöglichte und mit seinen konstruktiven Ratschlägen und Diskussionen das Fortschreiten dieser Arbeit wesentlich vorantrieb. Danke auch für sein stets offenes Ohr bei Herausforderungen aller Art, die während des Anfertigens einer Doktorarbeit auftreten können.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liebl für die Übernahme des Zweitgutachtens und Herrn Prof. Dr. Dirk Haller für die Übernahme des Vorsitzes während meines Rigorosums.

Von Herzen bedanken möchte ich mich bei Dr. Stefanie Müller-Herbst, die mir während der gesamten Anfertigung meiner Doktorarbeit zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand, für mich da war und mich immer unterstützte. Danke für die konstruktive Zusammenarbeit und die vielen Ratschläge, die du mir gegeben hast!

Der erste Teil dieser Arbeit entstand in enger Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern des Max-Rubner-Instituts in Kulmbach, Jan Kabisch und Dr. Rohtraud Pichner. Bei ihnen möchte ich mich für die zahlreichen Diskussionen und Anregungen bedanken. Jetzt weiß ich, wie man theoretisch eine Wurst herstellt! 😊

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Armin Ehrenreich und Dr. Claudia Held vom Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München für die Einführung in die Geheimnisse der Microarrays und die Bereitstellung des Slide-Scanners.

Weiterhin möchte ich mich bei Daniela Eder für die exzellente technische Assistenz, insbesondere die Durchführung der Bioscreen-Messungen, bedanken. Sie hat einen großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt auch Stefanie Wüstner, Fabian Higl, Anna Mühlig, Christina Kantzow, Franziska Auer, Alberto Ospina und Franziska Schindele, die im Rahmen ihrer Praktika, Bachelor- und Masterarbeiten an den Themen dieser Doktorarbeit mitarbeiteten.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie möchte ich Danke sagen für das – wie ich finde – überdurchschnittlich gute Arbeitsklima. Mir begegneten immer alle mit einem fröhlichen und freundlichen Gesicht. Eine Tatsache, die mich in meiner Arbeit ungemein unterstützte und motivierte. Ich kam jeden Tag gerne ins Institut! Besonders bei Dr. Stefanie Müller-Herbst, Anna Mühlig, Daniela Eder, Romy Wecko, Dr. Genia Lücking, Dr. Tobias Bauer, Andrea Rütschle und Mandy Starke möchte ich mich für die sehr gute und freundschaftliche Zusammenarbeit bedanken. Anna Mühlig, Richard Landstorfer und Christopher Huptas schulde ich meinen Dank für die Hilfestellungen während der Durchführung meiner NGS-Experimente. Ohne die drei „NGS-Experten“ des Hauses hätte ich die Experimente wohl nicht in dieser kurzen Zeit durchführen können. Bei Brigitte Stable und Maria Thole möchte ich mich für die vielen bürokratischen Hilfestellungen und zahlreichen netten Gespräche bedanken. Hilde Maier danke ich für die stets sauberen und zur rechten Zeit gespülten Utensilien, die zur Durchführung eines Experiments notwendig sind. Sie scheute vor Extraschichten nicht zurück, wenn einzelne Sachen dringend benötigt wurden.

Ein spezielles Dankeschön geht an meine Kollegin und Freundin Dr. Jennifer Etschel für die vielen motivierenden, interdisziplinären und wissenschaftlichen Diskussionen am Telefon und die gegenseitigen Besuche in München und Nürnberg.

Von tiefstem Herzen bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester, die mich bereits mein ganzes Leben lang begleiten und mich in allem unterstützen. Ohne ihre guten Zusprüche (Danke auch an Alex) wäre das Leben wohl etwas schwieriger zu meistern.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meiner zweiten Familie (Christa, Franz und Thomas), die mir während der letzten Jahre Kraft gaben und mich immer motivierten.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Andi bedanken. Für seine aufbauenden Worte, seine Geduld, sein Verständnis und seine Zuversicht.