

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Identifizierung und Charakterisierung metabolischer und struktureller Targets für antimikrobielle Substanzen in *Listeria monocytogenes*

KRISTINA SCHAUER

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. H. H. D. Meyer

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer
2. apl. Prof. Dr. M. A. Ehrmann

Die Dissertation wurde am 25.03.2010 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 31.05.2010 angenommen.

*„Man muss wohl zwei oder drei Raupen aushalten,
wenn man die Schmetterlinge sehen will.“*

Le Petit Prince

Inhalt

A. Zusammenfassung	1
Summary	3
B. Einleitung	5
1. <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2. Infektionszyklus von <i>L. monocytogenes</i>	7
3. Organisation und Regulation der Virulenzgene von <i>L. monocytogenes</i>	9
4. Metabolische und strukturelle Targets von <i>L. monocytogenes</i>	13
5. Genomweite Ansätze zur Identifizierung Virulenz-assoziiierter Gene	15
6. Identifizierung Virulenz-assoziiierter Targets bei <i>L. monocytogenes</i> mittels Insertionsduplikationsmutagenese	16
7. Ziel der Arbeit	17
C. Material und Methoden	18
I. Material	18
1. Bakterienstämme	18
2. Zelllinien	19
3. Plasmide und Vektoren	19
4. Enzyme und Enzymreaktionspuffer	20
5. Primäre und sekundäre Antikörper	21
6. PCR-Primer	22
7. Chemikalien und Kits	24
8. Nährmedien	24
9. Zusätze zu den Nährmedien	26
9.1 Antibiotika	26
9.2 Weitere Zusätze	26
10. Puffer und Lösungen	26
10.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung	26
10.2 Puffer und Lösungen zur Protein-Isolierung	27
10.3 Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese	28
10.4 Puffer und Lösungen für Protein-Analyse	28
10.5 Puffer und Lösungen für colorimetrisches Verfahren	29
10.6 Lösungen zur Resuspendierung von Zellen	30
11. Medien und Lösungen für Zellkultur	30
12. Geräte	31
13. Datenbanken	31
II. Methoden	32
1. Kultivierung von Bakterien	32
1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	32
1.2 Kultivierung von <i>Listeria monocytogenes</i>	32
1.3 Konservierung von Bakterien (Glycerinkultur)	32
2. Molekulargenetische Methoden	32
2.1 DNA-Isolierung	32
2.1.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> durch alkalische Lyse	32
2.1.2 Klonanalyse: HB-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	33
2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> mit GenElute Spin Miniprep Kit	33

INHALT

2.1.4	Plasmidisolierung aus <i>L. monocytogenes</i>	33
2.1.5	Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>L. monocytogenes</i>	34
2.2	Reinigung, Konzentrierung und Denaturierung von DNA	34
2.2.1	Phenolextraktion	34
2.2.2	Alkoholfällung	35
2.2.3	Alkalische Denaturierung von Plasmid-DNA	35
2.2.4	Entsalzen von Plasmid-DNA	35
2.2.5	CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation	35
2.2.6	Konzentrationsbestimmung von DNA	36
2.3	Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen	36
2.3.1	Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen	36
2.3.2	Agarosegelelektrophorese	36
2.3.3	Bestimmung des Molekulargewichts von DNA	37
2.4	Klonierung von DNA-Fragmenten	37
2.4.1	Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase	37
2.4.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel	37
2.4.3	Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA	37
2.4.4	Shotgun-Klonierung	38
2.5	DNA-Transfer	38
2.5.1	Transformation von <i>E. coli</i>	38
2.5.1.1	Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl ₂ -Methode	38
2.5.1.2	Transformation kompetenter Zellen	38
2.5.2	Elektroporation von <i>E. coli</i>	38
2.5.2.1	Herstellung kompetenter Zellen	38
2.5.2.2	Elektroporation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	39
2.5.3	Elektroporation von <i>L. monocytogenes</i>	39
2.5.3.1	Herstellung kompetenter Zellen	39
2.5.3.2	Elektroporation kompetenter <i>L. monocytogenes</i> -Zellen	40
2.5.4	Konjugation von <i>L. monocytogenes</i>	40
2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	40
2.6.1	PCR mit Gesamt-DNA als Template	40
2.6.2	PCR mit ganzen Zellen als Template	41
2.6.3	Touchdown-PCR	41
2.6.4	Nested-PCR	42
2.7	Allgemeine Konstruktion von <i>L. monocytogenes</i> -Stämmen	42
2.7.1	Deletions- und Insertionsmutagenese in <i>L. monocytogenes</i>	42
2.7.2	Konstruktion von Expressionsplasmiden	45
3.	Proteinanalytische Methoden	46
3.1	Präparation von listeriellen Proteinen	46
3.1.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Flüssigkultur	46
3.1.2	Herstellung von Gesamtzellextrakten aus mit <i>L. monocytogenes</i> infizierten eukaryotischen Zellen	46
3.1.3	Serielle Extraktion von zellwandassoziierten Proteinen	46
3.1.4	Isolierung von Überstandsproteinen	47
3.2	Aufreinigung von <i>Taq</i> DNA-Polymerase	47
3.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	47
3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
3.5	Coomassiefärbung	48
3.6	Western-Blot	48
3.7	Immunologischer Nachweis	49

INHALT

4.	Allgemeine biochemische Methoden	49
4.1	Messung der [³ H]-Thiamin-Aufnahme	49
4.2	Mutanalysinassay	50
4.3	Colorimetrisches Verfahren zur Bestimmung von verstoffwechselbaren Kohlenstoffquellen	50
5.	Zellkultur	50
5.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	50
5.2	Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen	50
5.3	Subkultivierung von eukaryotischen Zellen	51
5.4	Bestimmung der Lebendzellzahl	51
5.5	Beschichten der Zellkulturgefäße mit Gelatine	51
5.6	Mycoplasmandetektion	52
6.	Methoden zur Analyse des Pathogenitätsverhaltens von <i>L. monocytogenes</i>	52
6.1	Herstellung von Infektionsaliquots	52
6.1.1	Ansetzen von Infektionskulturen zum Screening der <i>L. monocytogenes</i> EGD Insertionsmutantenbank in Caco-2	52
6.1.2	Herstellung der Infektionsaliquots von <i>L. monocytogenes</i> -Deletionsmutanten	52
6.2	Gentamycinassay	52
6.2.1	Untersuchung der intrazellulären Replikation von <i>L. monocytogenes</i>	53
6.2.2	Invasionsassay für <i>L. monocytogenes</i> in eukaryotische Zellen	53
6.2.3	Untersuchung der Adhäsion von <i>L. monocytogenes</i> an eukaryotische Zellen	53
6.3	Analyse der Kolonisationsfähigkeit im Mausmodell	54
6.4	Bestimmung des Bakterientiters in den infizierten eukaryotischen Zellen	54
7.	Wachstumsanalysen	54
7.1	Wachstumsanalyse der <i>L. monocytogenes</i> -Stämme	54
7.2	Wachstumsanalyse unter Stressbedingungen	55
7.3	Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur	55
8.	Statistik	55
D. Ergebnisse		56
1.	Identifizierung Virulenz-assoziiertes Gene in <i>L. monocytogenes</i>	56
1.1	Screening der <i>L. monocytogenes</i> EGD Insertionsmutantenbank	56
1.2	Identifizierung und Charakterisierung attenuierter Insertionsmutanten	57
1.3	Vergleich von Screeningdaten mit Mikroarrayanalysen	61
1.4	Validierung der <i>L. monocytogenes</i> EGD Insertionsmutantenbank	61
1.5	Phänotypische Analyse der Deletionsmutanten von <i>L. monocytogenes</i> im Mausmodell	64
2.	Analyse des Kohlenstoffmetabolismus in <i>L. monocytogenes</i>	65
2.1	Etablierung eines colorimetrischen Verfahrens zur Ermittlung der Stoffwechselaktivität von <i>L. monocytogenes</i>	65
2.2	Charakterisierung der Stoffwechselaktivität von sechs <i>Listeria</i> -Arten und den ausgewählten <i>L. monocytogenes</i> EGD Insertionsmutanten	67
3.	Funktionale Charakterisierung der potenziell neuen virulenz-assoziierten Faktoren von <i>L. monocytogenes</i>	70
3.1	Untersuchung des Glycerolmetabolismus von <i>L. monocytogenes</i>	70
3.2	Genetische und biochemische Analyse der Thiaminbiosynthese von	72

<i>L. monocytogenes</i> und Untersuchung ihrer Rolle in der Pathogenität	74
3.2.1 Phänotypische Untersuchung der Deletionsmutanten im Zellkultursystem	74
3.2.2 Nachweise der Pathogenitätsdeterminanten <i>actA</i> und <i>hly</i>	75
3.2.3 Wachstumseigenschaften der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp	76
3.2.3.1 Das Wachstum der <i>pdxK</i> - und <i>thiD</i> -Mutanten im Minimalmedium	76
3.2.3.2 Das Wachstum der <i>pdxK</i> -, <i>thiD</i> - und <i>thiT</i> -Mutanten in Gegenwart von 4-Amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin	77
3.2.3.3 Das Wachstum der <i>thiT</i> -Mutante im Minimalmedium mit Thiamin, Thiaminmonophosphat und Thiaminpyrophosphat	79
3.2.3.4 Das Wachstum der <i>thiT</i> -Mutante in Gegenwart von Pyrithiamin	80
3.2.4 [³ H]-Thiamin-Aufnahme-Kinetik in DH5α/pDG148-Stu- <i>thiT</i>	82
3.3 Charakterisierung der Teichonsäuren-Biosynthese von <i>L. monocytogenes</i>	83
3.3.1 Phänotypische Analyse der Teichonsäuren-Mutanten von <i>L. monocytogenes</i> im Zellkultursystem	83
3.3.2 Detektion der Pathogenitätsdeterminante <i>actA</i> in den Stämmen EGDΔ <i>lmo1085</i> und EGDΔ <i>tagB</i>	87
3.3.3 Physiologische und biochemische Analyse der Teichonsäuren-Mutanten von <i>L. monocytogenes</i>	88
3.3.3.1 Wachstum der aus Caco-2 isolierten Stämme auf Vollmedium	89
3.3.3.2 Wachstum unter Stressbedingungen	90
3.3.3.3 Untersuchung der Zellwandstabilität mittels Mutanolysinassay	92
3.4 Charakterisierung eines putativen Oligopeptid-ABC-Transporters	93
3.4.1 Analyse des Pathogenitätsverhaltens von <i>lmo0135-0137</i> -Deletionsmutante	93
3.4.2 Wachstum der <i>lmo0135-0137</i> -Deletionsmutante in Gegenwart von verschiedenen Peptiden	95
E. Diskussion	98
1. Identifizierung von metabolischen und strukturellen Targets bei <i>L. monocytogenes</i>	98
2. Der Glycerolstoffwechsel und seine Rolle für <i>L. monocytogenes</i> während der intrazellulären Replikation	104
3. Thiamin und seine Funktion im Stoffwechsel	109
4. Teichonsäuren – Bestandteile der Zellwand Gram-positiver Bakterien	117
5. Der listerielle Oligopeptid-ABC-Transporter Lmo0135-0137	128
6. Ausblick	130
F. Literatur	131
G. Anhang	141
Abkürzungen	141
Tabellen	143
Plasmidkarten	151
Publikationen	152
Posterpräsentationen, Workshops	153
Danksagung	154

A. Zusammenfassung

Listeria monocytogenes ist ein Gram-positives, saprophytisch lebendes Bakterium, welches aber auch zur intrazellulären Replikation fähig ist. Viele der an der Pathogenität von *L. monocytogenes* beteiligten Virulenzfaktoren, ihre Regulation und ihre Aufgaben während der Infektion sind bereits sehr detailliert charakterisiert worden. Weit weniger ist jedoch über die metabolischen Eigenschaften einerseits und die strukturellen Komponenten andererseits bekannt, die als Virulenz-assoziierte Faktoren bezeichnet werden und die es dem fakultativ intrazellulären Pathogen *L. monocytogenes* erlauben, mit dem Wirt zu interagieren und die Stoffwechselprodukte von infizierten Wirtszellen für seine eigene Vermehrung zu nutzen.

Um Virulenz-assoziierte Gene zu identifizieren, die für die intrazelluläre Lebensphase von *L. monocytogenes* von entscheidender Bedeutung sind, wurde in der vorliegenden Arbeit eine durch Insertionsduplikationsmutagenese (IDM) erzeugte *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank auf Defizienz in der Adhäsion, Invasion und intrazellulären Replikation in der humanen nicht professionell phagozytischen Epithelzelllinie Caco-2 untersucht. Es wurden 160 individuelle Genloci identifiziert, die zum weiteren Screening von antilisteriellen und allgemein antimikrobiellen Substanzen geeignet sein können. Die Klassifizierung der identifizierten Genloci ergab, dass ein großer Teil der Gene sich in die Gruppen „Stoffwechsel von Aminosäuren“, „Transport- und Bindeproteine“ und vor allem „Kohlenstoffmetabolismus“ einordnen lässt, die im prozentualen Vergleich in Bezug auf ihren Anteil im gesamten *Listeria*-Genom überrepräsentiert sind. Zur Validierung der *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank wurden zehn definierte *in-frame Listeria*-Deletionsmutanten konstruiert, die sechs verschiedene funktionelle Klassen repräsentieren, und ihr Phänotyp im Zellkulturmodell untersucht. Alle Deletionsmutanten wiesen eine prägnant verminderte intrazelluläre Replikation auf, wodurch die aus dem Screening der Insertionsmutantenbank gewonnenen Erkenntnisse und gleichzeitig die Eignung von IDM zur Mutagenisierung des gesamten Genoms eines Mikroorganismus bestätigt werden konnten.

Das Cytosol der Wirtszelle bietet den intrazellulär lebenden Bakterien eine Vielzahl an verschiedenen Nährstoffen an, die von diesen jedoch nicht ohne geeignete Aufnahmesysteme und Abbauewege verwertet werden können. Neben den Hexose-Phosphaten stehen *L. monocytogenes* im Wirtscytosol auch einige C3-Quellen als Kohlenstoffquelle zur Verfügung, von denen sich Glycerol als geeignete Kohlenstoffquelle zu erweisen scheint. Von den zwei Abbauewegen des Glycerols findet in *L. monocytogenes* die Verstoffwechslung mittels der Glycerolkinasen GlpK1 (Lmo1538) bzw. GlpK2 (Lmo1034) und der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase GlpD zu Dihydroxyaceton-Phosphat bevorzugt statt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Glycerolkinase GlpK1 für ein extrazelluläres Wachstum von *L. monocytogenes* absolut notwendig ist, während die Glycerolkinase GlpK2 nur beim intrazellulären Wachstum eine Aktivität zu haben scheint.

Beim intrazellulären Abbau von Hexosen zieht *L. monocytogenes* der Glycolyse den Pentosephosphatweg vor, bei dem viele daran beteiligte Enzyme die biologisch aktive Form des Thiamins, Thiaminpyrophosphat, als Cofaktor benötigen. Durch Infektionsexperimente

konnte gezeigt werden, dass Thiamin und seine Vorstufen während der intrazellulären Lebensphase von *L. monocytogenes* einen limitierenden Faktor darstellen, wodurch *L. monocytogenes* intrazellulär auf die eigene Thiaminsynthese als auch Thiamintransport angewiesen ist. In diesem Zusammenhang konnte auch festgestellt werden, dass bei der *de novo* Thiaminbiosynthese sowohl die erste als auch die zweite Phosphorylierung des 4-Amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidins (HMP), dem Pyrimidin-Ring von Thiamin, von der bifunktionalen HMP-Kinase ThiD ausgeführt wird. In Abwesenheit eines funktionellen ThiD-Proteins fand zudem kein Wachstum statt, womit die Abwesenheit der Verbindung zur Purinsynthese über ThiC und somit die Unvollständigkeit der *de novo* Thiaminbiosynthese in *L. monocytogenes* bestätigt werden konnten.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit erstmalig ein Thiamintransporter für *Listeria* identifiziert, charakterisiert und als ThiT annotiert. In Aufnahmeexperimenten mit radioaktiv markiertem Thiamin wurde außerdem gezeigt, dass der Thiamintransporter ThiT eine hohe Ähnlichkeit zum EcfAA^T-Transportsystem aufweist und somit der neuen Klasse der ABC-Transportsysteme zuzuordnen ist, die im Vergleich zu klassischen ABC-Transportern einen anderen Aufbau, aber vor allem keine extrazelluläre Substratbindeuntereinheit besitzt. Der listerielle Thiamintransporter setzt sich demnach aus dem integralen Membranprotein ThiT, der T-Komponente, und zwei *energy-coupling*-Modulen mit ATPase Aktivität, den A-Komponenten, die von *Imo2601-2599* kodiert werden, zusammen. Die Expression des Thiamintransporters und möglicherweise einiger an der *de novo* Thiaminbiosynthese beteiligten Enzyme wird während des Wachstums von Thiaminpyrophosphat negativ reguliert. In Aufnahmetests mit dem Thiaminanalogen Pyrithiamin konnte nämlich gezeigt werden, dass bei hohen Thiaminkonzentrationen im nichtäquimolaren Thiamin/Pyrithiamin-Gemisch eine Pyrithiaminresistenz und bei niedriger Thiaminkonzentration eine Pyrithiaminsensitivität vorliegt.

Weiterhin als wichtig für das intrazelluläre Überleben von *L. monocytogenes*, nicht jedoch für das *in vitro* Wachstum, stellte sich das ABC-Transportersystem Lmo0135-0137 heraus, da sowohl im Zellkultur- als auch im Mausmodell eine signifikante Attenuation der Deletionsmutante EGD Δ *lmo0135-0137* konstatiert werden konnte. Basierend auf der putativen Funktion als Oligopeptidpermease könnte zu seinen möglichen Aufgaben *in vivo* eine Versorgung der Listerien mit Aminosäuren in Form von kleinen Peptiden oder eine Schutzfunktion gegen antimikrobiell wirkende Peptide gehören.

Neben dem vielseitigen Metabolismus trägt auch die Oberflächenbeschaffenheit des Bakteriums zum intrazellulären Überleben und zur effizienten Proliferation bei. Mit EGD Δ *tagB* und EGD Δ *lmo1085*, denen jeweils ein Homolog des Proteins B der Teichonsäurensynthese fehlt, ließ sich zeigen, dass die Teichonsäuren von *L. monocytogenes* an der Aufrechterhaltung der Vitalität unter Stressbedingungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit konnten durch ein umfangreiches Screening der *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank von im Zellkultursystem und der anschließenden funktionellen Charakterisierung ausgewählter Mutanten neue Virulenz-assoziierte Faktoren identifiziert werden, die neue strukturelle und metabolische Targets für antimikrobielle Substanzen darstellen könnten.

A. Summary

Listeria monocytogenes is a Gram-positive facultative intracellular bacterium that lives in decaying plant matter in the soil. Many virulence factors involved in the pathogenicity of *L. monocytogenes*, their regulation, and their role during infection have already well characterized in great detail. In contrast, much less is known about the metabolic properties and structural components, which are denoted as virulence-associated factors that allow *L. monocytogenes* to interact with the host and to use the metabolic products of infected host cells for its replication.

To identify virulence-associated genes, which are of decisive importance for the intracellular life of *L. monocytogenes*, an insertion mutant library of *L. monocytogenes* EGD was generated by insertion-duplication-mutagenesis (IDM) was examined in this study towards its deficiency in adhesion, invasion and intracellular replication in the human non-professional phagocytic epithelium cell line Caco-2. One hundred and sixty individual genes were identified, which could be further screened as targets for anti listerial or other general anti microbial substances. A classification of the identified genes proved that a large part of these genes can be grouped into „metabolism of amino acids“, „transport and binding proteins“ and especially „carbon metabolism“ which are in addition overrepresented in this screen with respect to their presence in the *Listeria* genome. To validate the utility of IDM for identifying pathogenicity genes, a total of ten defined in-frame deletion mutants were constructed representing six different functional classes and their phenotype in the cell culture infection assay were examined. All deletion mutants showed a reduced intracellular replication confirming the suitability of IDM for genome mutagenesis of microorganisms.

The cytosol of host cells offers intracellular living bacteria a wide variety of potential nutrients, however, these cannot be used without suitable transport systems and metabolic pathways. In addition to hexose phosphates, several C3 substances are available to *L. monocytogenes* in the host cytosol of which could serve *L. monocytogenes* as carbon sources of which glycerol seems to be the most suitable one. *L. monocytogenes* uses two alternate degradative pathways for glycerol metabolism and it was found that glycerol is primarily degraded by the glycerol kinases GlpK1 (Lmo1538) or GlpK2 (Lmo1034) and glycerol-3-phosphate dehydrogenase GlpD to dihydroxyacetone-phosphate. Moreover, it could be shown that glycerol kinase GlpK1 is essential for extracellular growth of *L. monocytogenes* while the glycerol kinase GlpK2 seems to have an activity only when *L. monocytogenes* is growing intracellularly.

During the intracellular degradation of hexoses *L. monocytogenes* prefers the pentose phosphate pathway (PPP) over glycolysis. Many enzymes involved in the PPP need thiamine pyrophosphate as a cofactor. In infection experiments, it was shown that thiamine and its precursors represent a limiting factor for *L. monocytogenes* during the intracellular life phase proving that the pathogen is dependent on *de novo* thiamine biosynthesis and thiamine transport. In addition, it could be shown that during the *de novo* biosynthesis of thiamine, both the first and the second phosphorylation step of the 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methyl

pyrimidine (HMP), the pyrimidine ring of thiamine, is mediated by the bifunctional HMP kinase ThiD. In growth experiments, the absence of ThiD resulted in a zero growth phenotype, confirming that the connection to the purine synthesis mediated in other organisms by ThiC is missing, thus the incompleteness of the *de novo* thiamine biosynthesis could be proven for *L. monocytogenes*.

Furthermore, in this work a hitherto unknown listerial thiamine transporter was identified, characterized and annotated as a ThiT. Uptake assays using radio-labelled thiamine revealed, that the thiamine transporter ThiT is highly similar to the EcfAA'T-transport system and therefore belongs to the new class of ABC-transport systems, which possess a different composition in particular because of a missing extracellular substrate binding protein in comparison to classical ABC-transporters. The listerial thiamine transporter consists therefore of the integral membrane protein ThiT, the T component, and two energy-coupling modules with ATPase activity, the A components which are encoded by *Imo2601-2599*. The expression of the thiamine transporter, and possibly of several enzymes involved in the *de novo* thiamine biosynthesis, is regulated by the biologically active form of the thiamine, thiamine pyrophosphate. Using pyrithiamine uptake assays, it could be shown that resistance towards pyrithiamine was observed in the presence of high thiamine concentrations in a non-equimolar mixture of thiamine/pyrithiamine, whereas low thiamine concentrations rendered *L. monocytogenes* sensitive towards pyrithiamine.

Furthermore, deletion of the ABC-transporter system Lmo0135-0137 resulted in a significant attenuation in the cell culture infection assay as well as in mouse infection experiments, thus is important for the intracellular survival of *L. monocytogenes*, but, not for *in vitro* growth. Based on the putative function as an oligopeptide permease, its possible *in vivo* role could be to supply *Listeria* with amino acids as small peptides or it could be involved in protection of *L. monocytogenes* against antimicrobial peptides.

In addition to its versatile metabolism, the composition of the bacterial surface contributes to its intracellular survival and to efficient proliferation. The deletion mutants EGD Δ *tagB* and EGD Δ *Imo1085*, in each case missing a homologue of the protein B of the teichoic acid synthesis, revealed that the teichoic acids of *L. monocytogenes* play an important role under stress conditions *in vitro* as well as *in vivo*.

In this work, new virulence-associated factors were identified by an extensive screening of an *L. monocytogenes* EGD insertion mutant library in the cell culture system. Subsequent functional characterization of some selected mutants identified new structural and metabolic targets for antimicrobial substances.

B. Einleitung

1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*), der Erreger der Listeriose beim Menschen, ist ein Gram-positives, stäbchenförmiges, nicht sporenbildendes, fakultativ anaerobes Bakterium, das phylogenetisch eng mit den Gattungen *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* und *Staphylococcus* verwandt ist. Es besitzt einen niedrigen GC-Gehalt (36-42%), ist Oxidase-negativ, Katalase-positiv und β -hämolytisch [Collins *et al.*, 1991; Sallen *et al.*, 1996]. Die Gattung *Listeria* umfasst derzeit sechs Arten: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* und *L. grayi*, von denen nur die ersten beiden Spezies opportunistische Pathogene sind. Während *L. monocytogenes* sowohl als human- als auch tierpathogen eingestuft wird, ruft *L. ivanovii* bis auf Einzelfälle ausschließlich Infektionen bei Wiederkäuern hervor. Die übrigen *Listeria*-Spezies gelten als apathogene, saprophytische Umweltkeime [Seeliger, 1984; Rocourt, 1988; Cummins *et al.*, 1994].

Listerien kommen in der Natur ubiquitär vor und können aus verschiedensten Quellen wie Wasser, Böden, von Pflanzenoberflächen, aber auch dem Gastrointestinaltrakt des Menschen und verschiedener Tiere (Schaf, Ziege) isoliert werden [Weis & Seeliger, 1975; Farber & Peterkin, 1991]. Aufgrund der Fähigkeit sich an unterschiedliche Umweltbedingungen anzupassen, sind Listerien in der Lage unter extremen Bedingungen zu überleben und sogar zu wachsen. Sie tolerieren Temperaturen von -1°C bis 45°C, pH-Werte von 4,5 bis 9,0 und Salzkonzentrationen bis 10% (w/v) sowie längere Perioden des Trocknens und Gefrierens mit anschließendem Auftauen [Lou & Yousef, 1998]. Die optimalen Wachstumsbedingungen für Listerien sind jedoch 30°C bis 37°C und ein neutraler bis leicht alkalischer pH. Bei Umgebungstemperaturen um 20°C sind die Bakterien peritrich begeißelt und beweglicher als bei höheren Temperaturen mit nur polarer Geißelformation infolge einer starken Reduktion der Flagellinsynthese [Junttila *et al.*, 1988; Peel *et al.*, 1988].

Diese außerordentliche Widerstandsfähigkeit gegenüber äußeren Einflüssen stellt ein großes Problem für die Lebensmittelindustrie dar, da Listerien die konventionellen Methoden der Nahrungsmittelkonservierung überleben und auch bei fachgerechter Lagerung der Lebensmittel eine kritisch hohe Keimzahl erreichen können [Vazquez-Boland *et al.*, 2001a]. Eine Ingestion der Bakterien lässt sich jedoch nicht vermeiden, denn Listerien sind auch auf rohen Nahrungsmitteln wie Obst, Gemüse, Milch und Fleisch zu finden. Ungenügende Hygienemaßnahmen bei der Verarbeitung von Produkten führen daher immer wieder zu epidemischen Ausbrüchen der Erkrankung in Nordamerika und Europa, weshalb sich die Listeriose zunehmend zu einer Infektionskrankheit von allgemeinem Interesse entwickelte [Bille, 1990; Ryser, 1999]. Der letzte große Ausbruch fand in August 2008 in Kanada in Toronto statt, bei dem eine Person an den Folgen der Infektion verstarb und 16 weiteren Personen nach dem Verzehr vom kontaminierten Fleisch infiziert waren [www.publichealth.gc.ca].

Eine Infektion mit Listerien erfolgt in der Regel über den Gastrointestinaltrakt durch kontaminierte Lebensmittel wie Milchprodukte, ungekochtes Gemüse, Fleisch, Fisch, Geflügel und industriell hergestellte, tiefgekühlte Fertigprodukte [Dalton *et al.*, 1997]. Die Listerien infizieren zunächst das Darmepithel und dringen dann durch die Enterozyten und die M-Zellen in das dahinter liegende lymphoide Gewebe vor. Dort werden die Bakterien von Makrophagen und dendritischen Zellen phagozytiert. Mit ihrer Hilfe gelangen Listerien über das Blut oder die Lymphe schließlich in die Leber und Milz. In der Leber wird der größte Teil der Bakterien phagozytiert und abgetötet [Jensen *et al.*, 1998]. Dies ist der entscheidende Punkt für den weiteren Verlauf der Infektion, denn gelangen Listerien ins Blut, können sie sich auch auf andere Organe ausbreiten. Bei systemischer Verbreitung kann sogar die Blut-Hirn-Schranke überwunden werden, wodurch es zu einer Entzündung der Gehirnhaut (Meningitis) und/oder des Gehirns (Meningoenzephalitis/ Enzephalitis) kommt [Schuchat *et al.*, 1991]. Weiterhin sind Listerien in der Lage neben der Darmwand und der Blut-Hirn-Schranke auch die dritte essentielle Barriere im menschlichen Körper, nämlich die Plazenta, zu überwinden und den Fötus zu infizieren, was oft in einer Fehl- oder Totgeburt resultiert [Schuchat *et al.*, 1991; Abram *et al.*, 2003].

Ob es bei einer Infektion mit *Listeria* zu einem Ausbruch der Listeriose kommt, hängt von zahlreichen Faktoren, wie z. B. der Anzahl der aufgenommenen Bakterien, deren Virulenz und der Immunkompetenz des Wirtes ab [Farber & Peterkin, 1991]. Etwa 10% der Bevölkerung tragen *L. monocytogenes* als Bestandteil ihrer Darmflora ohne jegliche Beeinträchtigungen ihrer Gesundheit [Gray & Killinger, 1966; Jones, 1990]. Um den gesunden Gastrointestinaltrakt manifest zu infizieren, muss eine Keimzahl von 10^6 - 10^9 Listerien aufgenommen werden. Bei immunkompetenten Personen führt eine *L. monocytogenes* Infektion lediglich zu Grippe-ähnlichen Symptomen, Diarrhöe und Bauchschmerzen, da es hier zur Ausbildung einer Zell-vermittelten Immunantwort und somit zu einer schnellen Eliminierung der Listerien aus dem Körper kommt. Bei immunkompromittierten Personen, Neugeborenen, älteren Menschen, schwangeren Frauen und ihren ungeborenen Kindern kann die Listeriose dagegen zu Infektionen des zentralen Nervensystems bzw. zur Infektion des Fötus führen [Benshushan *et al.*, 2002; Rouquette & Berche, 1996].

Obwohl die Listeriose relativ selten auftritt, weist sie dafür eine sehr hohe Mortalitätsrate von ca. 30% auf und zählt trotz frühzeitiger Antibiotikabehandlung zu den gefährlichsten bakteriellen Infektionskrankheiten [Schuchat *et al.*, 1991]. Dies liegt unter anderem daran, dass es noch keine einsetzbaren Impfstoffe für den Menschen gibt und auch die Krankheitsdiagnose aufgrund vielfältiger Krankheitssymptome schwierig ist, da Listerien außergewöhnliche stoffwechselphysiologische Besonderheiten besitzen [Kreft, 1992].

2. Infektionszyklus von *L. monocytogenes*

Listeria monocytogenes ist ein fakultativ intrazelluläres Bakterium. Diesem Bakterium, als auch weiteren Vertretern dieser Gruppe wie *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Legionella* und *Yersinia*, ist die Fähigkeit gemeinsam, in eukaryontische Zellen einzudringen, sich sowohl extrazellulär als auch intrazellulär in den Wirtszellen zu vermehren und über die Zellgrenzen hinweg auszubreiten (Abb.1). Als Wirtszellen können entweder professionell phagozytische Zellen wie Makrophagen oder dendritische Zellen, aber auch nicht professionell phagozytische Zellen wie z.B. Epithelzellen, Hepatozyten, Endothelzellen, Fibroblasten oder verschiedene Nervenzelltypen fungieren [Gaillard *et al.*, 1987; Dramsi *et al.*, 1998; Kuhn *et al.*, 1997; Pron *et al.*, 2001]. Die Fähigkeit, die Vakuolen zu verlassen und frei im Cytoplasma der Wirtszelle zu replizieren, unterscheidet *L. monocytogenes* jedoch von dem Großteil der intrazellulären Pathogene.

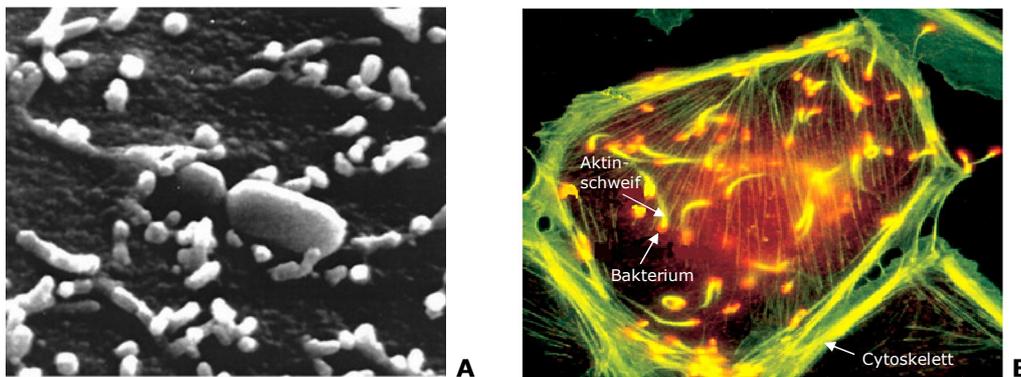


Abb.1: Mikroskopische Aufnahmen von *Listeria monocytogenes*: **A.** elektronenmikroskopische Aufnahme von Listerien an Mikrovilli 60 min nach der Infektion von Caco-2-Zellen [Vazquez-Boland *et al.*, 2001a]; **B.** fluoreszenz-mikroskopische Aufnahme von mit Listerien infizierten Fibroblasten. Die Bakterien (rot) wurden mit einem Antikörper gegen das ActA-Protein markiert und Aktin (grün) mit Phalloidin angefärbt [mit freundlicher Genehmigung von J. Theriot].

Die Infektion durch *L. monocytogenes* beginnt gewöhnlich durch den Verzehr kontaminierter Nahrung, wodurch das Pathogen in den unteren Dünndarm gelangt. Hier adhären Listerien an Epithelzellen und werden über die induzierte Phagozytose aufgenommen (Abb.2). Für die Adhäsion sind neben den allgemeinen und unspezifischen Wechselwirkungen vor allem spezifische Interaktionen zwischen listeriellen und eukaryontischen Oberflächenmolekülen verantwortlich. Sie werden durch die bakteriellen Virulenzfaktoren Internalin A (InIA) und Internalin B (InIB), sowie das Oberflächenprotein ActA, das an Proteoglykane bindet, vermittelt [Suárez *et al.*, 2001]. Als spezifischer Rezeptor für InIA auf der Oberfläche von Epithelzellen dient E-Cadherin, ein Ca^{2+} -abhängiges Transmembran-Glycoprotein, welches vorrangig basolateral von den Zellen exprimiert wird und dadurch die Zell-Zell-Adhäsion ermöglicht [Dussurget *et al.*, 2004]. Demgegenüber fungiert Met, der Rezeptor des Hepatozytenwachstumsfaktors (HGFR), als Hauptrezeptor für InIB auf der Wirtszelloberfläche. Met gehört zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren und wird nach der Bindung von InIB

autophosphoryliert, wodurch eine Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase erfolgt, die zur effizienten Aufnahme der Listerien in epitheliale Zellen beiträgt [Shen *et al.*, 2000; Ireton *et al.*, 1996]. Außerdem wird durch die Interaktion von InIB mit dem Epithel der wirtseigene Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK)-Signalweg aktiviert, und in den Makrophagen kommt es zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B [Mansell *et al.*, 2000].

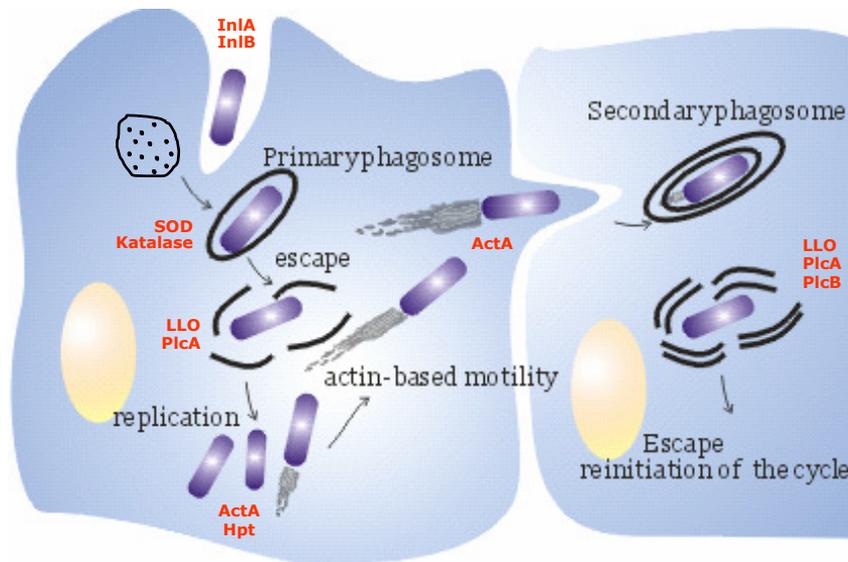


Abb.2: Schematische Darstellung des Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes* [modifiziert nach Vazquez-Boland *et al.*, 2001b]. Die beteiligten Virulenzfaktoren sind rot dargestellt.

Die erfolgreiche Bindung der Internaline A und B an ihre Rezeptoren bewirkt in den Epithelzellen eine Anhäufung von Aktin-regulatorischen Proteinen und eine Umlagerung des Aktincytoskeletts, die eine Plasmamembranausstülpung, so genannte *membrane ruffles*, hervorruft. Auf diese Weise werden Listerien nach dem dynamischen Prozess eines Reißverschluss-Mechanismus (*zipper-*) in eine intrazelluläre primäre Vakuole, auch das primäre Phagosom genannt, aufgenommen [Ireton *et al.*, 1996]. Im Phagosom sind die Bakterien zunächst einer Vielzahl von antibakterieller Abwehrmechanismen („oxidativer burst“) der Wirtszelle ausgesetzt. Dazu gehören z.B. die Ansäuerung des Phagosoms und die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen wie H_2O_2 , O^{2-} , $OH\cdot$ und $HOCl$ in großer Menge, die in kurzer Zeit zur Abtötung avirulenter Bakterien führen. Diese toxischen Sauerstoffverbindungen werden von Listerien mit Hilfe der Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase in unschädliche Endprodukte umgewandelt [Kreft, 1992]. Zudem verzögern bzw. verhindern Listerien die Reifung des Phagosoms zum Phagolysosom, nicht jedoch die weitere pH-Senkung innerhalb der Vakuole. Diese bewirkt ihrerseits aber eine vermehrte Expression und Sekretion von Listeriolysin O (LLO), einem Cholesterol-bindenden, porenbildenden Hämolyysin, und der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PlcA), so dass es innerhalb von 30 Minuten zur Zerstörung der phagosomalen Membran kommt und somit zur Freisetzung der Listerien ins Cytosol der Epithelzelle [Conte *et al.*, 1996; Alvarez-Dominguez *et al.*, 1997]. Im Cytosol vermehren sich Listerien zunächst mit einer Generationszeit von

etwa einer Stunde, wobei Hexosephosphate und Glycerol, welches beim Abbau der phagosomalen Membran entsteht, als wichtigste Kohlenstoff- und Energiequellen verwendet werden [Slaghuis *et al.*, 2004; Chico-Calero *et al.*, 2002; Joseph *et al.*, 2006]. Aufgrund der Temperaturabhängigkeit der Flagellinsynthese ist die intrazelluläre Motilität der Bakterien durch starke Reduktion der Geißeln eingeschränkt. Über die Expression des Zellwand-assoziierten ActA-Proteins können Listerien jedoch ca. zwei Stunden nach der Invasion wirtseigenes Aktin an einem Pol der Zelle rekrutieren und durch anschließende Reorganisation der Actinmonomere kometenschweifähnliche Aktinpolymere ausbilden (Abb.1B). Das fortwährende Einfügen von Aktinmonomeren zwischen Schweif und Bakterium ermöglicht Listerien schließlich eine Bewegung in Richtung des nicht Aktin-tragenden Pols mit einer konstanten Geschwindigkeit von 0,3 $\mu\text{m/s}$ [Brundage *et al.*, 1993; Chakraborty, 1996; Ireton & Cossart, 1997]. Gelangen Listerien durch diese ungerichtete Bewegung an die Zellperipherie, induziert der Kontakt mit der Cytoplasmamembran die Ausbildung von einer pseudopodienartigen Ausstülpung. Das Pseudopodium mit dem Bakterium an der Spitze erstreckt sich in den Bereich der benachbarten Zelle und wird dann von dieser phagozytiert, so dass sich Listerien in den neu infizierten Zellen zunächst in einem von einer Doppelmembran umgebenden, sekundären Phagosom befinden. Dieser Vorgang wird als „cell-to-cell-spread“ bezeichnet und beschreibt die Fähigkeit der Pathogene, sich im Wirt auszubreiten, ohne dass der Kontakt mit dem extrazellulären Milieu aufgenommen wird [Tilney & Portnoy, 1989]. Um erneut ins Cytosol zu gelangen, sekretiert *L. monocytogenes* wieder Listeriolysin O, PlcA und zusätzlich noch eine zweite Phospholipase C (PlcB), die von *plcB* kodiert wird. PlcB, das als inaktives Enzym von *Listeria* sekretiert und erst an der Zelloberfläche durch die Prozessierung einer spezifischen Metalloprotease (Mpl) aktiviert wird. PlcA und PlcB können sich gegenseitig zum Teil substituieren, da nur das Fehlen beider Phospholipasen C starke Einschränkungen bei der intrazellulären Replikation mit sich mitbringt. Zusammen bewirken diese Virulenzfaktoren dann die Lyse des sekundären Phagosoms, wodurch die Listerien erneut frei im Cytosol vorliegen und ihren intrazellulären Vermehrungszyklus von neuem aufnehmen [Smith, *et al.*, 1995; Cossart *et al.*, 2003]. Auf diese Weise infizieren Listerien eine Zelle nach der anderen und entgehen somit den humoralen Abwehrmechanismen des Wirtes. Eine erfolgreiche Eliminierung des Pathogens ist deshalb nur durch die zellvermittelte Immunantwort möglich [Cossart & Bierne, 2001].

3. Organisation und Regulation der Virulenzgene von *L. monocytogenes*

Für den korrekten Ablauf des intrazellulären Infektionszyklus von *L. monocytogenes* ist eine differentielle Genexpression als Antwort auf die sich verändernden Umweltbedingungen von entscheidender Bedeutung. Ein großer Teil der Virulenzgene ist deshalb in einer 9,6 kb großen *Listeria monocytogenes* Pathogenitätsinsel 1 (LIPI-1) lokalisiert (Abb.3), die mit einigen Abweichungen auch in *L. ivanovii* und *L. seeligeri* vorzufinden ist [Vazquez-Boland *et al.*,

2001b; Kreft *et al.*, 2002; Schmid *et al.*, 2005]. Die Expression dieser und weiterer anderer Virulenzgene wird in *L. monocytogenes* durch den **positiven Regulationsfaktor A** (PrfA) reguliert, einem Transkriptionsaktivator aus der Familie der Crp/Fnr-Transkriptionsregulatoren [Chakraborty *et al.*, 1992; Goebel *et al.*, 2006]. Diese Regulatoren binden in den Promotorbereichen an eine spezifische palindromische Konsensussequenz und verstärken dadurch die Anlagerung der RNA-Polymerase (RNAP) an den Promotor. Auch alle bisher untersuchten, PrfA-regulierten Virulenzgene besitzen in ihren -35-Promotorregionen eine 14 bp große konservierte, palindromische DNA-Sequenz, die sog. PrfA-Box (5' -TTAACA NN TGTTAA- 3' mit NN = AA, TT), die essentiell für die Erkennung durch den Regulator ist. Eine leichte Abweichung von dieser Konsensussequenz beeinflusst daher die Bindungsaffinität von PrfA, die umso größer ist, je genauer das Palindrom mit der obigen DNA-Sequenz der PrfA-Box übereinstimmt. Auf diese Weise kann durch unterschiedliche Bindungsstärke von PrfA eine differentielle Aktivierung der Virulenzgene stattfinden, d.h. Gene mit hoher Affinität der Promotoren (*hly* und *plcA*) werden schon bei niedriger PrfA-Konzentration, wie sie zu Beginn des Infektionszyklus vorzufinden ist, aktiviert, die Promotoren mit geringerer Affinität (*mpl* und *actA*) benötigen dagegen eine höhere PrfA-Konzentration, die erst im Laufe des Infektionszyklus entsteht [Williams *et al.*, 2000; Lalic-Multhaler *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2005].

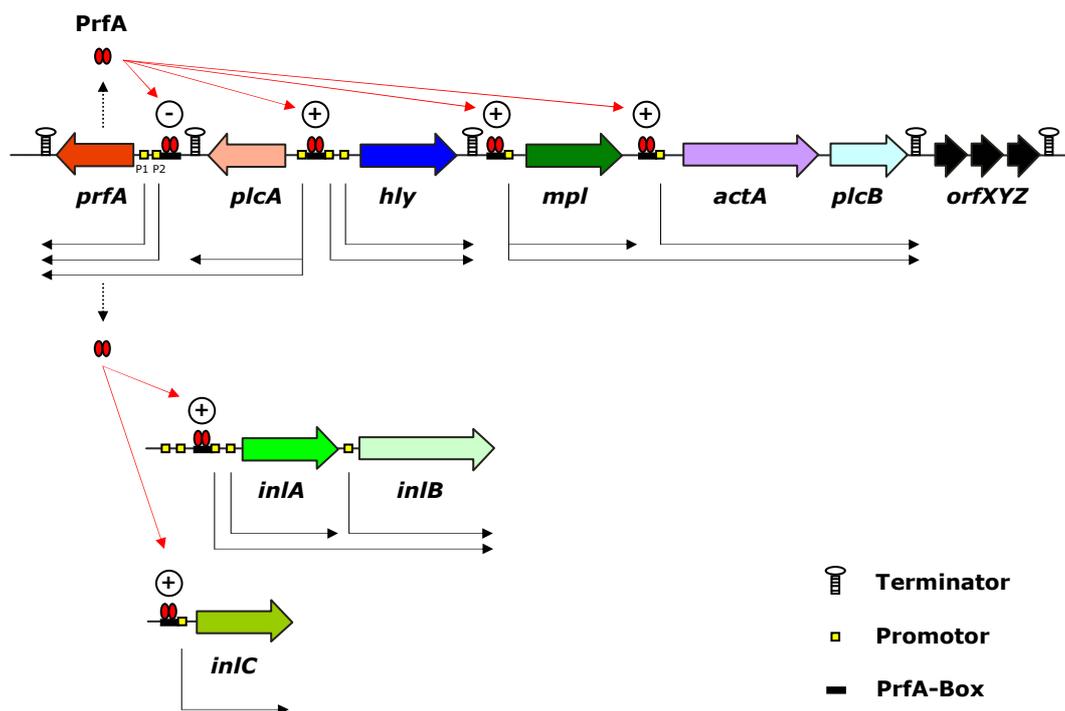


Abb.3: Die Pathogenitätsinsel LIPI-1 von *Listeria monocytogenes* und die Operonstruktur der Internaline A, B und C. Die schwarzen Pfeile zeigen die verschiedenen Transkripte, die roten Pfeile weisen auf die PrfA-Regulation hin: (+) bzw. (-) = Transkriptionsinduktion bzw. Transkriptionsrepression. [modifiziert nach Kreft *et al.*, 2001].

Neben den in LIPI-1 liegenden Genen werden noch weitere listerielle Gene durch PrfA reguliert. Hierzu gehören unter anderem diverse Internaline, aber auch zahlreiche sowohl am

allgemeinen als auch dem intrazellulären Stoffwechsel beteiligten Gene, die verstreut auf dem *Listeria*-Chromosom liegen. Die großen Internaline A und B sind z.B. in einem Operon organisiert, während das Gen für das kleine Internalin C, das im Zusammenspiel mit anderen kleinen Internalinen an der Invasion verschiedener eukaryontischen Zelltypen beteiligt ist, dagegen separat an einer anderen Stelle im *Listeria*-Genom liegt. Die postulierte, transkriptionelle Organisation der im Virulenzgencluster lokalisierten, PrfA-kontrollierten Gene sowie der Internaline A, B und C ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.

Die Expression der Virulenzgene ist beim Wachstum in der Natur, dem natürlichen Habitat von *L. monocytogenes*, nicht essentiell, weshalb auch bei niedrigen Temperaturen nur eine schwache monocistronische PrfA-Transkription von den Promotoren P1 und P2 des *prfA*-Gens stattfindet [Leimeister-Wächter *et al.*, 1992; Renzoni *et al.*, 1997]. Dabei kontrolliert ein RNA-Thermosensor posttranskriptionell die Bildung von PrfA durch eine inhibitorische Sekundärstruktur am 5'-Ende der mRNA, welche die Ribosomenbindungsstelle maskiert und erst bei Temperaturen über 30°C denaturiert [Johansson *et al.*, 2002]. Bei höheren Temperaturen steigt die PrfA-Konzentration an und die neu synthetisierte PrfA-Menge reicht aus, um zunächst *hly*, *plcA* und *mpl* zu aktivieren. Ausgehend vom *plcA*-Promotor wird dann die PrfA-Konzentration zusätzlich über ein bicistronisches *plcA/prfA*-Transkript (positive Autoregulation) weiter erhöht, sodass es auch zur Aktivierung der PrfA-abhängigen Promotoren mit mehr Basenaustauschen in der PrfA-Box kommt. PrfA reguliert nicht nur die meisten Virulenzgene, sondern auch seine eigene Expression. Durch die Bindung vom in hoher Konzentration vorliegenden PrfA-Protein an die degenerierte PrfA-Box von P2 des *prfA*-Gens wird die positive Autoregulation unterbrochen. Schließlich kommt es an dem P2-Promotor zur Ausbildung eines PrfA-RNAP-Komplexes, der sterisch die Synthese des weiteren PrfA zu reprimieren scheint und somit die PrfA-Konzentration erniedrigt [Freitag *et al.*, 1993; Freitag & Portnoy, 1994; Scotti *et al.*, 2007].

Die Gesamtaktivität von PrfA wird jedoch nicht allein von seiner Konzentration bestimmt, die von der Expression des *prfA*-Gens abhängt, sondern auch von der spezifischen Aktivität des PrfA-Proteins, die erst durch die Bindung von Cofaktoren, wie z.B. cAMP beim Crp-Regulator, moduliert wird. Demnach kann PrfA in zwei Zuständen, im funktionell aktiven und inaktiven, vorliegen und über die Bindung eines **PrfA** aktivierenden **Faktors** (Paf) von einem in den anderen Zustand überführt werden. In dem funktionell aktiven Zustand, dem PrfA-Paf-Komplex, kann PrfA mit höherer Affinität an die PrfA-Boxen der PrfA-regulierten Promotoren binden und die Expression der PrfA-abhängigen Virulenzgene induzieren. Diese Transkriptionsaktivierung und somit erhöhte Synthese der Virulenzgene findet aber nur so lange statt, wie der Cofaktor Paf im bakteriellen Cytoplasma vorhanden ist. Dieser kann schnell inaktiviert werden, wenn die entsprechenden Signale aus dem *L. monocytogenes* umgebenden Lebensraum fehlen. Der Cofaktor scheint demzufolge nicht nur die spezifische Aktivität von PrfA zu erhöhen, sondern beeinflusst auch über PrfA die Regulation der Virulenzgene, indem er die Übermittlung von verschiedenen Umweltsignalen übernimmt [Vega *et al.*, 1998; Vázquez-Boland *et al.*, 2001a; Scotti *et al.*, 2007].

Die Zahl der Umweltfaktoren ist ebenso groß wie auch vielfältig, zudem treten sie häufig in verschiedenen Kombinationen auf und erhöhen dadurch die Komplexität der Regulationsvorgänge. Zu den bereits gut untersuchten Faktoren gehören z.B. Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Eisenkonzentration und Nährstoffangebot [Mekalanos, 1992].

Bei niedrigen Temperaturen und hohem pH-Wert ist die Expression der Virulenzgene im Allgemeinen verringert und wird bei einer Temperatur von 37°C sowie intrazellulär erhöht. Für eine verstärkte Transkription der PrfA-abhängigen Gene sind außerdem Hitze-, oxidativer sowie osmotischer Stress verantwortlich [Johansson *et al.*, 2002; Myers *et al.*, 1993; Sokolovic & Goebel, 1989; Sokolovic *et al.*, 1990]. Auch Eisenmangel führt in verstärktem Maße zu erhöhter PrfA-Produktion, infolgedessen eine zunehmende Listeriolysin-Synthese beobachtet wurde [Coward & Foster, 1985; Geoffrey *et al.*, 1989].

Weiterhin konnte auch eine Korrelation zwischen der Zusammensetzung des umgebenden Mediums und der Genexpression von *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. In einem an fermentierbaren Zuckern sehr reichen Medium wie BHI (**B**rain **H**eart **I**nfusion) findet nur eine schwache Transkription der Virulenzgene statt. Im Gegensatz dazu erhöht die Zugabe von Aktivkohle oder dem polymeren Harz XAD-4 zum Medium die PrfA-Produktion und die damit verbundene Synthese der PrfA-abhängigen Gene, wobei das Wachstum jedoch unverändert bleibt [Ripio *et al.*, 1996]. Das gleiche Phänomen bezüglich der Expression der Virulenzgene kann auch beobachtet werden, wenn in BHI wachsende Listerien in das Zellkulturmedium MEM (*minimum essential medium*) überführt werden, in dem allerdings kein Bakteriumwachstum stattfindet [Bohne *et al.*, 1994; Sokolovic *et al.*, 1993].

Eine weitere wichtige Funktion von PrfA steht im Zusammenhang mit der Kohlenstoff-Katabolitrepression. In einem Cellobiose-haltigen Medium wird nämlich trotz der konstanten PrfA-Menge die Transkription von *plcA* und *hly* reprimiert, was darauf hindeutet, dass hier eine Regulation der spezifischen Aktivität von PrfA durch einen unbekanntes Cofaktor erfolgt [Milenbachs *et al.*, 1997; Renzoni *et al.*, 1997; Park & Kroll, 1993]. Eine bedeutende Rolle als Umweltsignal, vor allem intrazellulär, wird auch dem Glucose-1-Phosphat zugewiesen, welches als Abbauprodukt des Glykogens in den Wirtszellen vorliegt und *L. monocytogenes* neben anderen Hexose-Phosphaten als alleinige Kohlenstoffquelle dienen kann. Die Aufnahme erfolgt über einen **H**exose-**P**hosphat-**T**ransporter (Hpt), der ebenfalls der PrfA-Regulation untersteht [Chico-Calero *et al.*, 2002].

Durch vergleichende Genomanalysen und neuere angewandte Methoden wie Transkriptom- und Proteomanalysen konnten inzwischen viele weitere Gene identifiziert werden, die möglicherweise eine wichtige Funktion sowohl im intrazellulären Metabolismus als auch im Verlauf des Infektionszyklus und in der Virulenz zu tragen scheinen [Chatterjee *et al.*, 2006; Milohanic *et al.*, 2003].

4. Metabolische und strukturelle Targets von *L. monocytogenes*

Aufgrund der fakultativ intrazellulären Lebensweise ist *Listeria monocytogenes* auf die Nutzung wirtseigener Metabolite angewiesen. Dazu sind zahlreiche Umstellungen bezüglich der metabolischen Prozesse in dem Bakterium, aber auch in der Wirtszelle, notwendig, damit es unter intrazellulären Bedingungen zu einer erfolgreichen Replikation der Listerien kommen kann. Wenn auch Listerien sich durch eine extreme metabolische Flexibilität auszeichnen, ist die Anpassung an den Wirtstoffwechsel keineswegs trivial. Einen Hinweis darauf liefert die Beobachtung, dass die meisten durch Mikroinjektion ins Cytosol von verschiedenen Wirtszellen eingebrachten Bakterien (*B. subtilis*, *S. enterica*, *E. coli*) unfähig sind zu wachsen und sich zu vermehren, obwohl das Cytosol der Wirtszelle einen geschützten Lebensraum mit guter Nährstoffversorgung bietet [Goetz *et al.*, 2001]. Die Tatsache, dass das Cytosol offensichtlich nährstoffreich ist, wird außerdem durch eine vom Wildtyp nicht unterscheidbare Vermehrung auxotropher *Listeria*-Mutanten in den Säugerzellen bestätigt [Marquis *et al.*, 1993; Moors & Portnoy, 1995]. Demnach können *Listeria*-Mutanten mit einer Aminosäuren-Auxotrophie unverändert im Wirtscytosol replizieren, weil sie ihren Aminosäurenbedarf durch die Aufnahme von kleinen Peptiden mit Hilfe des OppA-Oligopeptidtransporters und anderer Di- und Tripeptidtransporter decken können [Borezee *et al.*, 2000].

Die Anpassung an die physiologischen Gegebenheiten im Cytosol verläuft bei verschiedenen Pathogenen auf unterschiedliche Art. Die intrazelluläre Vermehrung von *Mycobacterium tuberculosis* hängt z. B. von den Enzymen des Glyoxylatzyklus ab, da Fettsäuren der Wirtszelle als Kohlenstoff- und Energiequelle dienen [McKinney *et al.*, 2000]. Dagegen ist *L. monocytogenes* bei der Replikation im Cytosol der Wirtszelle vom Glycerolstoffwechsel und dem von PrfA-regulierten Hexosephosphat-Transportsystem (Hpt) abhängig [Chico-Calero *et al.*, 2002; Joseph *et al.*, 2006].

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Gattung *Listeria* die außergewöhnliche Fähigkeit besitzt, sich metabolisch besser an die cytosolische Umgebung anzupassen als andere Pathogene, wie *Salmonella* oder *Bacillus*, die eigentlich als stoffwechselvielseitig gelten. Es ist daher nicht erstaunlich, dass nicht nur klassische spezifische Virulenzfaktoren, sondern auch Gene für bestimmte Stoffwechselwege durch horizontalen Gentransfer übertragen werden und dementsprechend zur Evolution des Pathogens beitragen [Dobrindt *et al.*, 2004]. Möglicherweise fand auf diesem Weg auch der Transfer der Gen-Cluster für die Synthese von Vitamin B₁₂ und den Abbau von Ethanolamin und Propandiol von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium zu *Listeria* statt [Buchrieser *et al.*, 2003].

Ethanolamin, das zusammen mit Glycerol durch die listerielle Phospholipase PlcB beim intrazellulären Abbau der phagosomalen Membran entsteht, wird von der in einem dieser Cluster liegenden, Vitamin B₁₂-abhängigen Ethanolamin-Ammonium-Lyase (EutBC) zu Acetaldehyd und Ammonium umgewandelt. Somit fungiert Ethanolamin für *L. monocytogenes* intrazellulär sowohl als Kohlenstoff- als auch Stickstoffquelle [Joseph *et al.*, 2006].

Eine wichtige Rolle neben den *Listeria*-spezifischen Stoffwechselwegen spielen auch die strukturellen Beschaffenheiten der bakteriellen Zelle. Dazu gehören die Komponenten der Membran, der Zellwand sowie die damit in Wechselwirkung tretenden Bestandteile.

Anhand morphologischer Kriterien lässt sich eine Gram-positive Bakterienzelle in drei distinkte zelluläre Kompartimente unterteilen: das Cytosol, die Cytoplasmamembran und die Zellwand [Giesbrecht *et al.*, 1976]. Im Cytosol findet der größte Teil aller molekularen Prozesse statt und es wird von der Cytoplasmamembran, dem zweiten Kompartiment, abgegrenzt. Auf die Cytoplasmamembran mit integralen und peripheren Proteinen folgt anschließend eine aus mehrschichtigem Peptidoglykan (Murein) bestehende Zellwand, die die äußere Umhüllung der Zelle darstellt und der Bakterienzelle ihre Form und mechanische Festigkeit verleiht. Häufig sind in der Peptidoglykanschicht noch anionische Polymere wie Teichuron-, Teichon- und Lipoteichonsäuren enthalten. Letztere sind kovalent über eine Phosphodiesterbindung an die Glycolipide der Cytoplasmamembran gebunden und durchdringen somit die gesamte Peptidoglykanschicht. Allerdings kommen diese amphiphilen Polymere hauptsächlich bei den Gram-positiven Bakterien mit einem niedrigen GC-Gehalt vor, bei einem GC-Gehalt über 50% finden sich Lipoglykane anstelle von Lipoteichonsäuren [Ghuysen *et al.*, 1994].

Der Zelle einiger Bakterien sind zudem Exopolysaccharide (EPS) aufgelagert. Dabei handelt es sich entweder um feste, an der Zelle angelagerte Polysaccharidkapseln oder locker mit der Zelloberfläche assoziierte und ins Medium abgegebene Schleime (van den Bulk *et al.*, 1991). Andere Gram-positive Bakterien besitzen wiederum statt Exopolysacchariden eine parakristalline Proteinstruktur, die so genannte S-Layer, welche meist aus einem, manchmal aus zwei verschiedenen Proteinen oder Glykoproteinen zusammengesetzt ist. Diese bilden über die gesamte Zelloberfläche eine gitterartige Schicht aus hexagonalen oder viereckigen Untereinheiten aus, wodurch auch bei den Gram-positiven Bakterien ein weiteres, dem Periplasma der Gram-negativen Bakterien entsprechendes Kompartiment entsteht [Sleytr, 1997].

Nach bisherigen Untersuchungen lassen sich neben dem mehrschichtigen Peptidoglykan viele dieser Komponenten auch auf der Zelloberfläche von *Listeria monocytogenes* finden, darunter Ribitolteichonsäuren und aufgrund des niedrigen GC-Gehalts Lipoteichonsäuren mit Polyglycerolphosphat-Rückgrat. Da im Genom von *L. monocytogenes* nur ein Cluster für die Synthese der Teichonsäuren vorhanden ist, kann die Bildung mehrerer verschiedener Teichonsäuren ausgeschlossen werden. Teichuronsäuren sowie Exopolysaccharide und S-Layer wurden bei *L. monocytogenes* nicht gefunden [Fiedler, 1988; Glaser *et al.*, 2001].

Einige dieser strukturellen Komponenten spielen nur eine sekundäre Rolle für das Wachstum der Bakterien und sind daher unter optimalen Laborbedingungen entbehrlich. Die geringen Veränderungen bzw. das vollständige Fehlen anderer Zelloberflächenkomponenten wirken sich dagegen sofort z. B. in verringertem Wachstum aus, was sich folglich sogar in einer verminderten Virulenz des Pathogens äußern kann [Weidenmaier *et al.*, 2008b]. Auf Grund dessen können sich einige der vielen Syntheseschritten für strukturelle Komponenten der Bakterienzelle als potenzielle strukturelle Targets für die Entwicklung der neuen, antimikrobiellen Substanzen erweisen.

5. Genomweite Ansätze zur Identifizierung Virulenz-assoziiierter Gene

Die Pathogenität eines Mikroorganismus und seine Anpassungsfähigkeit an die sich stets verändernden Umweltbedingungen beruht nicht allein auf den spezifischen Virulenzfaktoren, die bei vielen pathogenen Bakterien bereits sehr gut untersucht sind, sondern auch auf dem Zusammenspiel dieser mit der strukturellen Beschaffenheit und der metabolischen Flexibilität des Pathogens. Um genau diese Targets, die oft zusammenfassend als Virulenz-assoziierte Faktoren bezeichnet werden, zu identifizieren und charakterisieren, wurden bereits zahlreiche Methoden für verschiedene pathogene Organismen etabliert und erfolgreich eingesetzt.

Eine der ältesten Methoden stellt die klassische Transposonmutagenese dar, bei der durch die zufällige Insertion eines Transposons in eine genetische Einheit das Leseraster des Gens unterbrochen wird. Auf diese Weise konnten zuerst die Virulenz-assoziierten Gene von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium identifiziert werden [Fields *et al.*, 1986]. Das am häufigsten angewandte Verfahren ist jedoch die signaturmarkierte Mutagenese (*signature tagged mutagenesis*, STM) [Hensel *et al.*, 1995]. Sie beruht zwar auf der Transposonmutagenese, jedoch ist hier jedes Transposon mit einer unterschiedlichen DNA-Sequenz markiert. Dies ermöglicht die Identifizierung von avirulenten Klonen aus Mutantenpools nach Infektion eines Tiermodellsystems. Die inaktivierten Gene der Mutanten, die im Vergleich zum Ausgangspool nach der Reisolierung aus dem *in vivo*-Infektionsmodell fehlen, sind dementsprechend für Virulenz bzw. für intrazelluläre Replikation essentiell. Einen erfolgreichen Einsatz fand dieses Verfahren vor allem bei *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und vielen anderen pathogenen Bakterien, unter anderem auch bei *L. monocytogenes* [Polissi *et al.*, 1998; Herbert *et al.*, 2002; Autret *et al.*, 2001]. Für Studien der differentiellen Genexpression als Antwort auf Umweltveränderungen wird oft die *in vivo*-Expressionstechnologie (IVET) eingesetzt. Dabei wird ein promotorloses Reporter-gen verwendet, das chromosomal deletiert ist und dessen Genprodukt nach einer DNA-Fragment-Reporter-Fusion einen Phänotyp zur positiven Selektion bedingt. Bei *L. monocytogenes* diente das für Listeriolysin kodierende Gen *hly* als Reporter-gen, so dass anhand der hämolytischen Eigenschaften Gene mit verstärkter intrazellulärer Expression identifiziert werden konnten [Dubail *et al.*, 2000; Gahan *et al.*, 2000]. Die heute gut etablierte DNA-Array-Technologie ermöglicht ebenfalls die Transkriptomanalysen in Abhängigkeit von verschiedenen Infektionsstadien, Wirtszelltypen und Umwelteinflüssen. Außerdem bietet sie den Vorteil einer schnellen Identifizierung aller zum Zeitpunkt der Probenentnahme differentiell transkribierten Gene [Joseph *et al.*, 2006; Chatterjee *et al.*, 2006]. Wertvolle Erkenntnisse aus dem komplexen regulatorischen Netzwerk der Zelle werden auch mittels Proteomanalyse gewonnen, der systematischen Analyse aller von einem Genom zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimierter Proteine. Durch dieses Verfahren wurden vor kurzem sowohl die *L. monocytogenes* Stamm-spezifischen Proteomunterschiede untereinander als auch in Bezug auf die extrazelluläre und intrazelluläre Lebensweise ermittelt [Donaldson *et al.*, 2009; Dumas *et al.*, 2008].

All diese und viele weitere Verfahren zur Identifizierung Virulenz-assoziiertes Gene liefern Ergebnisse mit unterschiedlichem Informationsgehalt, wodurch sie nicht direkt miteinander konkurrieren und in keinem Fall sich gegenseitig ersetzen können. Im Gegenteil, die Anwendung von mehreren verschiedenen Verfahren zu derselben Fragestellung kann schneller zum Gesamtbild eines Vorgangs führen, weil die einzelnen Methoden sowohl ähnliche als auch unterschiedliche, vor allem aber, ergänzende Informationen erbringen. So ergeben sich aus den Genomsequenzen zunächst Informationen über die Anlagen und grundlegende Fähigkeiten eines Organismus, während der Aufschluss über die dynamischen Prozesse innerhalb der Zelle in Abhängigkeit von verschiedenen Umwelteinflüssen aus Transkriptom- und Proteomanalysen gewonnen wird.

6. Identifizierung Virulenz-assoziiertes Targets bei *L. monocytogenes* mittels Insertionsduplikationsmutagenese

Die intensive Erforschung der an der Virulenz von *Listeria monocytogenes* beteiligten Gene, deren Regulation und ihrer Aufgabe während der Infektion führten zu dem heute vorhandenen detaillierten Bild über den Ablauf des Infektionszyklus. Im Gegensatz dazu ist über die strukturelle Komponenten und metabolische Eigenschaften, die es *L. monocytogenes* erlauben, eine erfolgreiche Interaktion mit dem Wirt einzugehen und die Stoffwechselprodukte von infizierten Wirtszellen für seine eigene Vermehrung zu nutzen, weit weniger bekannt.

Um Gene zu identifizieren, die für die intrazelluläre Lebensphase für *L. monocytogenes* von entscheidender Bedeutung sind, wurde ein zu den oben bereits diskutierten Methoden alternatives Mutagenese- und Screeningverfahren etabliert, das es ermöglicht, zufällige Mutanten von *L. monocytogenes* zu generieren, diese im Zellkultursystem auf Defizienz in der intrazellulären Replikation zu screenen und anschließend den für den selektierten Phänotyp verantwortlichen mutagenisierten Genlocus eindeutig zu bestimmen. Dieses Verfahren der **Insertionsduplikationsmutagenese (IDM)** basiert auf einem pLSV101-Vektor, dessen Replikationsfähigkeit in Gram-positiven Bakterien von der Temperatur abhängig ist und in den chromosomale Fragmente von *L. monocytogenes* kloniert wurden. Eine Erhöhung der Temperatur von permissiven 30°C auf nicht-permissive 42°C führt in *L. monocytogenes* zur Rekombination des klonierten Genfragments mit dem homologen Genbereich und Insertion des Vektors ins Bakteriumchromosom. Dadurch wird das entsprechende Gen von *L. monocytogenes* unterbrochen und liegt somit inaktiviert vor. Nach diesem Prinzip konnte eine *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank konstruiert werden, die insgesamt 1491 generierte, vitale Insertionsmutanten des Stammes *L. monocytogenes* EGD umfasst [Joseph *et al.*, 2006]. Unter Verwendung dieser Mutantenbank sollen speziell solche Mutanten identifiziert und charakterisiert werden, die in den einzelnen Schritten des Infektionszyklus blockiert bzw. gehemmt sind, denn sie könnten spezifische metabolische bzw. strukturelle Targets für das Auffinden antilisterieller Substanzen darstellen, die ihrerseits spezifisch die Aufnahme der Listerien und deren intrazelluläre Vermehrung unterbinden. Zusätzlich könnte

das Auffinden von antilisteriellen Substanzen zur Entwicklung generell antimikrobieller Stoffe beitragen, da durch Insertion des Vektors auch Gene für allgemeine bakterielle Replikation betroffen sein könnten.

7. Ziel der Arbeit

Um das bakterielle Genom im *high-throughput*-Format auf Gene untersuchen zu können, die unter bestimmten Bedingungen essentiell sind, müssen Mutantenbanken erstellt werden, welche in ihrem Phänotyp veränderte Mutanten enthalten. In früheren Studien wurden Mutanten hauptsächlich durch chemische Mutagenese isoliert, wobei bei dieser Methode zusätzlich Mutationen in anderen Genen nicht auszuschließen sind. Eine Alternative dazu bietet das Verfahren der Insertionsduplikationsmutagenese (IDM), das es ermöglicht, definierte Mutanten eines Organismus zu konstruieren.

Das Ziel dieser Arbeit war weitere Untersuchung einer bereits vorhandenen und durch IDM erzeugten *Listeria monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank auf speziell solche Mutanten, die spezifisch in der Adhäsion und der Invasion von *L. monocytogenes* in die humane Epithelzelllinie Caco-2 und der intrazellulären Replikation in diesen Wirtszellen signifikante Defekte aufweisen und somit zum Auffinden metabolischer und struktureller Targets führen könnten, die zum Screening von antilisteriellen und allgemein antimikrobieller Substanzen geeignet sein könnten. Zudem sollte die *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank durch Konstruktion von definierten Deletionsmutanten und ihre Charakterisierung hinsichtlich der Virulenz und der Kolonisationsfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp validiert werden. Dazu sollte der Phänotyp der Deletionsmutanten sowohl im Zellkultur- als auch im Tiermodell untersucht werden. Weiterhin sollten verschiedene biochemische Analysen mit ausgewählten Deletionsmutanten durchgeführt werden, um die betreffende Stoffwechsel- bzw. Transportwege näher charakterisieren zu können.

Zusätzlich sollten in der vorliegenden Arbeit weitere Kohlenstoffquellen identifiziert werden, die *in vitro* und *in vivo* ein Wachstum von *L. monocytogenes* ermöglichen. Hierfür sollte ein colorimetrisches Verfahren etabliert werden, welches die Zellatmung mit der Metabolisierung der dargebotenen Kohlenstoffsubstrate verbindet und dadurch die Identifizierung neuer verwertbarer Kohlenstoffquellen erlaubt.

C. Material und Methoden

I. Material

1. Bakterienstämme

Listeria-Stämme:

Stamm	Genotyp / relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
EGD	<i>Listeria monocytogenes</i> Sv 1/2a, Wildtyp	Max-Plank-Institut, Berlin; Kaufmann, 1993
EGDe	Derivat von EGD	Mackaness, 1964; Glaser <i>et al.</i> , 2001
CLIP 11262	<i>Listeria innocua</i> Sv 6a	Glaser <i>et al.</i> , 2001
SLCC 5334	<i>Listeria welshimeri</i> Sv 6b	Hain <i>et al.</i> , 2006a
SLCC 3954	<i>Listeria seeligeri</i> Sv 1/2b	Hain <i>et al.</i> , 2006b
CLIP 12515	<i>Listeria grayi</i>	Rocourt <i>et al.</i> , 1992
PAM 55	<i>Listeria ivanovii</i> Sv 5	Hain <i>et al.</i> , 2006b
EGD Δ <i>actA</i>	in-frame Deletion des <i>actA</i> -Gens	Goetz <i>et al.</i> , 2001
EGD Δ <i>hly</i>	in-frame Deletion des <i>hly</i> -Gens	Slaghuis <i>et al.</i> , 2004
EGD Δ <i>inIAB</i>	in-frame Deletion der <i>inIA</i> - und <i>inIB</i> -Gene	Bergmann <i>et al.</i> , 2002
EGD Δ <i>inIACGHE</i>	in-frame Deletion der Gene <i>inIA</i> , <i>inIC</i> , <i>inIG</i> , <i>inIH</i> und <i>inIE</i>	Bergmann <i>et al.</i> , 2002
EGD Δ <i>glpD</i>	in-frame Deletion des <i>glpD</i> -Gens	Joseph <i>et al.</i> , 2006
EGD Δ <i>Imo1538</i>	in-frame Deletion des <i>Imo1538</i> -Gens	Joseph <i>et al.</i> , 2006
EGD Δ <i>Imo1538glpD</i>	in-frame Deletion der Gene <i>Imo1538</i> und <i>glpD</i>	diese Arbeit; Joseph <i>et al.</i> , 2006
EGD Δ <i>Imo1031-1036</i>	in-frame Deletion der Gene <i>Imo1031-1036</i>	diese Arbeit
EGD Δ <i>pdxK</i>	in-frame Deletion des <i>pdxK</i> -Gens	diese Arbeit; Schauer <i>et al.</i> , 2009
EGD Δ <i>thiD</i>	in-frame Deletion des <i>thiD</i> -Gens	diese Arbeit; Schauer <i>et al.</i> , 2009
EGD Δ <i>thiT</i>	in-frame Deletion des <i>thiT</i> -Gens	diese Arbeit; Schauer <i>et al.</i> , 2009
EGD-pPL2	EGD,tRNA ^{Arg} ::pPL2; Cm ^R	diese Arbeit
EGD Δ <i>pdxK</i> -pPL2- <i>pdxK</i>	EGD Δ <i>pdxK</i> ,tRNA ^{Arg} ::pPL2- <i>pdxK</i> ; Cm ^R ; Komplementation des <i>pdxK</i> -Gens	diese Arbeit
EGD Δ <i>ispE</i>	in-frame Deletion des <i>ispE</i> -Gens	diese Arbeit
EGD Δ <i>oppF</i>	in-frame Deletion des <i>oppF</i> -Gens	diese Arbeit
EGD Δ <i>tagB</i>	in-frame Deletion des <i>tagB</i> -Gens	diese Arbeit
EGD Δ <i>Imo0135-137</i>	in-frame Deletion der Gene <i>Imo0135-137</i>	diese Arbeit
EGD Δ <i>Imo0618</i>	in-frame Deletion des <i>Imo0618</i> -Gens	diese Arbeit
EGD Δ <i>Imo1085</i>	in-frame Deletion des <i>Imo1085</i> -Gens	diese Arbeit
EGD Δ <i>Imo1506</i>	in-frame Deletion des <i>Imo1506</i> -Gens	diese Arbeit
EGD Δ <i>Imo2734</i>	in-frame Deletion des <i>Imo2734</i> -Gens	diese Arbeit
EGD Δ <i>Imo2781</i>	in-frame Deletion des <i>Imo2781</i> -Gens	diese Arbeit

Tab.1: In dieser Arbeit verwendete *Listeria*-Stämme.

Escherichia coli:

Stamm	Genotyp / relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
DH5α	F ⁻ , <i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺), <i>relA1</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>)-U169, Φ80 <i>dlacZΔM15</i> , <i>supE44</i> , <i>λthi-1</i> , <i>gyrA96</i> (Nal ^R)	Hanahan, 1983
SM10	F ⁻ , Km ^R , Tra ^R , <i>λthi-1</i> , <i>thr-1</i> , <i>leuB6</i> , <i>recA1</i> , <i>tonA21</i> , <i>lacY1</i> , <i>supE44</i> , [RP4-2(Tc::Mu)], (Mu _C ⁺)λ ⁻	Simon <i>et al.</i> , 1983

Tab.2: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

2. Zelllinien

Zelllinie	relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
Caco-2	humane, epitheliale Dickdarmadenokarzinomzellen	ATCC®: HTB-37TM
Cos-1	fibroblastenähnliche Affennierenzellen	Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg
HBMEC	humane, mikrovaskuläre Hirndothelzellen	Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg
HeLa	humane, epithelähnliche Gebärmutterhalskarzinomzellen	Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg
HEp-2	humane, epithelähnliche Kehlkopfkarcinomzellen	Lehrstuhl für mikrobielle Ökologie, TU München
J774A.1	murine Monocyten-Makrophagenzellen	DSMZ: ACC 170
MDCK	epithelähnliche Kaninchennierenzellen	Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg

Tab.3: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien.

3. Plasmide und Vektoren

Plasmid/Vektor	relevante Eigenschaften	Herkunft / Referenz
pLSV101	<i>E. coli</i> - <i>Listeria</i> -Shuttlevektor, Em ^R , ori _{Gram+} ori _{ts}	Joseph <i>et al.</i> , 2006
pLSV101- <i>glpD</i> _{del}	Deletionsplasmid für das <i>glpD</i> -Gen, Em ^R	Joseph <i>et al.</i> , 2006
pKS0135-137 _{del}	Deletionsplasmid für die Gene <i>lmo0135-137</i> , Em ^R	diese Arbeit
pKS0190 _{del}	Deletionsplasmid für das <i>ispE</i> -Gen, Em ^R	diese Arbeit
pKS0317 _{del}	Deletionsplasmid für das <i>thiD</i> -Gen, Em ^R	diese Arbeit
pKS0618 _{del}	Deletionsplasmid für das <i>lmo0618</i> -Gen, Em ^R	diese Arbeit
pKS0662 _{del}	Deletionsplasmid für das <i>pdxK</i> -Gen, Em ^R	diese Arbeit
pKS1031-1036 _{del}	Deletionsplasmid für die Gene <i>lmo1031-1036</i> , Em ^R	diese Arbeit
pKS1085 _{del}	Deletionsplasmid für das <i>lmo1085</i> -Gen, Em ^R	diese Arbeit
pKS1429 _{del}	Deletionsplasmid für das <i>thiT</i> -Gen, Em ^R	diese Arbeit
pKS1506 _{del}	Deletionsplasmid für das <i>lmo1506</i> -Gen, Em ^R	diese Arbeit
pKS2192 _{del}	Deletionsplasmid für das <i>oppF</i> -Gen, Em ^R	diese Arbeit
pKS2734 _{del}	Deletionsplasmid für das <i>lmo2734</i> -Gen, Em ^R	diese Arbeit
pKS2781 _{del}	Deletionsplasmid für das <i>lmo2781</i> -Gen, Em ^R	diese Arbeit
pKStagB _{del}	Deletionsplasmid für das <i>tagB</i> -Gen, Em ^R	diese Arbeit

pDG148-Stu	<i>E. coli</i> - <i>Listeria</i> -Shuttlevektor, Amp ^R , Kan ^R , P _{spac} (IPTG induzierbar)	Joseph <i>et al.</i> , 2001
pDG148-Stu- <i>thiT</i>	Expressionsplasmid, P _{spac} - <i>thiT</i> (592 bp <i>StuI</i> - Fragment des <i>thiT</i> -Gens), Amp ^R , Kan ^R	diese Arbeit
pPL2	<i>Listeria</i> -Integrationsvektor, Cm ^R	Lauer <i>et al.</i> , 2002
pPL2- <i>pdxK</i>	Komplementationsplasmid, pPL2::1,1 kb <i>XbaI</i> / <i>BamHI</i> -Fragment des <i>pdxK</i> -Gens, Cm ^R	diese Arbeit
pPL2-1429	Komplementationsplasmid, pPL2::1,6 kb <i>XbaI</i> / <i>BamHI</i> -Fragment des <i>thiT</i> -Gens, Cm ^R	diese Arbeit
pHPS9	<i>E. coli</i> - <i>Listeria</i> -Shuttlevektor, Em ^R , Cm ^R	Haima <i>et al.</i> , 1990
pHPS9-1429	Komplementationsplasmid, pHPS9::1,2 kb <i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i> -Fragment des <i>thiT</i> -Gens, Em ^R , Cm ^R	diese Arbeit

Tab.4: In dieser Arbeit verwendete Plasmide und Vektoren in *E. coli* und *L. monocytogenes*.

4. Enzyme und Enzymreaktionspuffer

Enzym	Bezugsquelle
Restriktionsendonukleasen	Fermentas/BioLabs
T4-DNA-Ligase	Invitrogen
Alkalische Phosphatase	Fermentas
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Fermentas/TUM Abt. Mikrobiologie (K. Schauer)
T4 DNA-Polymerase	Fermentas
Mutanolysin	Sigma
Proteinase K	Roth
RNase A	Sigma
Lysozym	Sigma

Tab.5: In dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Restriktionsendonukleasen und Reaktionsbedingungen:

Enzym	Erkennungssequenz 5' → 3'	Reaktionspuffer	Temperatur
<i>BamHI</i>	G/GATCC	Buffer BamHI	37°C
<i>BcuI</i> (<i>SpeI</i>)	A/CTAGT	Buffer Tango TM	37°C
<i>BglII</i>	A/GATCT	Buffer O	37°C
<i>Bsu15I</i> (<i>ClaI</i>)	AT/CGAT	Buffer Tango TM	37°C
<i>Cfr9I</i> (<i>XmaI</i>)	C/CCGGG	Buffer Tango TM	37°C
<i>EcoRI</i>	G/AATC	Buffer EcoRI	37°C
<i>Eco47III</i>	AGC/GCT	Buffer O	37°C
<i>Eco147I</i> (<i>StuI</i>)	AGG/CCT	Buffer B	37°C
<i>HaeI</i>	RGCGC/Y	NEBuffer 4	37°C
<i>HindIII</i>	A/AGCTT	Buffer R	37°C
<i>KpnI</i>	GGTAC/C	Buffer Tango TM	37°C
<i>PaeI</i> (<i>SphI</i>)	GCATG/C	Buffer B	37°C
<i>PdmI</i> (<i>XmnI</i>)	GAANN/NNTTC	Buffer Tango TM	37°C
<i>PstI</i>	CTGCA/G	Buffer O	37°C
<i>PvuII</i>	CAG/CTG	Buffer G	37°C
<i>XbaI</i>	T/CTAGA	Buffer Tango TM	37°C

Tab.6: In dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen.

Enzymreaktionspuffer (10x konzentriert):

Buffer BamHI	10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)	Buffer O	50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	5 mM	MgCl ₂		10 mM	MgCl ₂
	100 mM	KCl		100 mM	NaCl
	1 mM	2-Mercaptoethanol		0,1 mg/	BSA
	0,02 %	Triton X-100		ml	
	0,1 mg/	BSA			
	ml				
Buffer EcoRI	50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)	Buffer G	10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	10 mM	MgCl ₂		10 mM	MgCl ₂
	100 mM	NaCl		50 mM	NaCl
	0,02 %	Triton X-100		0,1 mg/	BSA
	0,1 mg/	BSA		ml	
	ml				
NEBuffer 4	20 mM	Tris-Acetat (pH 7,9)	Buffer B	10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	10 mM	Mg-Acetat		10 mM	MgCl ₂
	50 mM	K-Acetat		0,1 mg/	BSA
	1 mM	Dithiothreitol		ml	
Buffer Tango™	33 mM	Tris-Acetat (pH 7,9)	Buffer R	10 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
	10 mM	Mg-Acetat		10 mM	MgCl ₂
	66 mM	K-Acetat		100 mM	KCl
	0,1 mg/	BSA		0,1 mg/	BSA
	ml			ml	

Ligase-Puffer (Firma Invitrogen)

5. Primäre und sekundäre Antikörper

Antikörper	relevante Eigenschaften	Herkunft
anti-Hly	polyklonales Kaninchen-anti-Hly-Antiserum	Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg
anti-ActA	polyklonales Kaninchen-anti-ActA-Antiserum	Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg
anti-InIA	polyklonales Kaninchen-anti-InIA-Antiserum	Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg
anti-InIB	polyklonales Kaninchen-anti-InIB-Antiserum	Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Würzburg
anti-rabbit	alkalische Phosphatase-konjugierter, affinitätsgereinigter Maus-anti-Kaninchen-IgG (H+L)	Dianova

Tab.7: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

6. PCR-Primer

Primer	Sequenz 5' → 3'	Bemerkung / Referenz
LSV3	AGTACCATTACTTATGAG	Joseph <i>et al.</i> , 2006
LSV-4380 rev	AGGGTTTTCCCAGTCACG	Joseph <i>et al.</i> , 2006
GlpD'a	GGCTGAGAGATTTAAATCC	Joseph <i>et al.</i> , 2006
GlpD'd	GCCTTATCTTCGCTTACG	Joseph <i>et al.</i> , 2006
Lmo1030A	GCCTGCTGTTGGTTGC	Deletionsprimer zu <i>lmo1031-1036</i>
Lmo1030B	GAAGATCTCCCAATTTTAAATCGCCTC	Deletionsprimer zu <i>lmo1031-1036</i>
Nested1030AB	CGGGATCCGATAAAACGAATGGTTG	Deletionsprimer zu <i>lmo1031-1036</i>
Lmo1037C	GAAGATCTCTCCTTTTTTGAAAGATAGC	Deletionsprimer zu <i>lmo1031-1036</i>
Lmo1037D	GTCATGGAGTTATCCAGAG	Deletionsprimer zu <i>lmo1031-1036</i>
Nested1037CD	GGAAATCCGTGCCCCCTTATAGC	Deletionsprimer zu <i>lmo1031-1036</i>
Lmo0663A	CGGGATCCCGCATCCACCCAGAC	Deletionsprimer zu <i>pdxK</i>
Lmo0663B	GAAGATCTTCTGCAATAGTTAATG	Deletionsprimer zu <i>pdxK</i>
Lmo0660C	GAAGATCTTCTTGGCATGGCGCTT	Deletionsprimer zu <i>pdxK</i>
Lmo0660D	CGGAATCCGCAAGCGCAAGAAC	Deletionsprimer zu <i>pdxK</i>
Lmo0317A	GCTGGGCGTGCGG	Deletionsprimer zu <i>thiD</i>
Lmo0317B	GAAGATCTTCACTTGTGGAAAAGTCA	Deletionsprimer zu <i>thiD</i>
Lmo0317C	GAAGATCTTCAACCATTTTGTACCG	Deletionsprimer zu <i>thiD</i>
Lmo0317D	CCGATACTCCGTCCG	Deletionsprimer zu <i>thiD</i>
NestedLmo0317AB	GGGGATCCCGTGGAAATGCAGGAGAAC	Deletionsprimer zu <i>thiD</i>
NestedLmo0317CD	CGGAATCCGACAATTGGTATTG	Deletionsprimer zu <i>thiD</i>
Lmo1429A	CGCACGCCTTAACGG	Deletionsprimer zu <i>thiT</i>
Lmo1429B	GAAGATCTTCCGATTAATCGTTTGTGTTGC	Deletionsprimer zu <i>thiT</i>
Lmo1429C	GAAGATCTTCTGAAGACCTACCAAAATTATTC	Deletionsprimer zu <i>thiT</i>
Lmo1429D	GAGCGTCTTAGTTTGACGGG	Deletionsprimer zu <i>thiT</i>
Nested 1429AB	CGGGATCCCGCACTGATACATC	Deletionsprimer zu <i>thiT</i>
Nested 1429CD	CGGAATCCGGTTAATCATC	Deletionsprimer zu <i>thiT</i>
Lmo0189A	GGTATAGACTTAATCC	Deletionsprimer zu <i>ispE</i>
Lmo0189B	GAAGATCTTGCAATGGTTTTTGGCATTATTTTC	Deletionsprimer zu <i>ispE</i>
Lmo0191C	GAAGATCTAGTGAAGGCGAGAACG	Deletionsprimer zu <i>ispE</i>
Lmo0191D	GACTACGTCATTCGTCC	Deletionsprimer zu <i>ispE</i>
Lmo0189NestedAB	CGGGATCCGTTAGCCCTTCCAACCTG	Deletionsprimer zu <i>ispE</i>
Lmo0191NestedCD	CGGAATCTCGAATGCTCACACCG	Deletionsprimer zu <i>ispE</i>
Lmo2193A	GGGATGCGTCAACGG	Deletionsprimer zu <i>oppF</i>
Lmo2193B	GAAGATCTTCTCTTTTGTTCAGTCATTC	Deletionsprimer zu <i>oppF</i>
Lmo2191C	GAAGATCTCATGCTAAGTTAACTGCTG	Deletionsprimer zu <i>oppF</i>
Lmo2193NestedAB	CGGGATCCGTAACCATCCAAGCGC	Deletionsprimer zu <i>oppF</i>
Lmo2191D	CAATAATGATAGGACGTC	Deletionsprimer zu <i>oppF</i>
Lmo2191NestedCD	CGGAATCATCCTCAGTCATACGAAG	Deletionsprimer zu <i>oppF</i>
Lmo1087A	CTGTAGCGTTTCATGC	Deletionsprimer zu <i>tagB</i>
Lmo1087B	GAAGATCTTCGCTATATTTTTCACTATC	Deletionsprimer zu <i>tagB</i>
Lmo1090C	GAAGATCTTCGCAAGTGAACGCATGG	Deletionsprimer zu <i>tagB</i>
Lmo1090D	GACGATGTAATCTCCCG	Deletionsprimer zu <i>tagB</i>
Lmo1087NestedAB	CGGGATCCCGGTGTATGGGGCGATGG	Deletionsprimer zu <i>tagB</i>
Lmo0135A	GGAGTAGAGGTTGGCG	Deletionsprimer zu <i>lmo0135-0137</i>
Lmo0135B	GAAGATCTTAATAAAAATTTCTTCATCTAAC	Deletionsprimer zu <i>lmo0135-0137</i>
Lmo0137C	GAAGATCTGACGTGCTGAGAAAAGG	Deletionsprimer zu <i>lmo0135-0137</i>

MATERIAL UND METHODEN

Lmo0137D	<u>CTGGATCCGCTTGCTGGCTC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo0135-0137</i>
Lmo0135NestedAB	<u>CGGGATCCAACTGGGGAAGATATG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo0135-0137</i>
Lmo0137NestedCD	<u>GGAATCAAGCTCTTGGTCTTTG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo0135-0137</i>
Lmo0619A	<u>GCGAATCATTGTTTGGTC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo0618</i>
Lmo0619B	<u>GAAGATCTAAGTGTCAATTTCTCCATTTATC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo0618</i>
Lmo0617C	<u>GAAGATCTTCTGTGTATCTATTTATG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo0618</i>
Lmo0617D	<u>GCCGCAACAATCATTG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo0618</i>
Lmo0619NestedAB	<u>CGGGATCCCTGGTCTAGCGTATAACC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo0618</i>
Lmo0617NestedCD	<u>CGGAATTCGCCCATACTAGC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo0618</i>
Lmo1085A	<u>GGAAGTAAACGTGGATG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo1085</i>
Lmo1085B	<u>GAAGATCTTCCGACAATTATACGAATGCATC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo1085</i>
Lmo1085C	<u>GAAGATCTTCGAGCTCGAATTATTGATTATG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo1085</i>
Lmo1085D	<u>GCCACGAACTGGAATATCTG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo1085</i>
Nested1085AB	<u>GGGGATCCCGCAGTACAGATTATGTTTTCG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo1085</i>
Nested1085CD	<u>CGGAATTCGCGAGGGATAACGGTATC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo1085</i>
Lmo1507A	<u>GCATCAAGTAGCTCATC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo1506</i>
Lmo1507B	<u>GAAGATCTTCTCTTAAAAAATTCATGTG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo1506</i>
Lmo1505C	<u>GAAGATCTATGAATCCAAAAACAATTC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo1506</i>
Lmo1505D	<u>CCATAATAACGCATTTAC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo1506</i>
Lmo1507NestedAB	<u>CGGGATCCCATAGTCATCTGCGCC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo1506</i>
Lmo1505NestedCD	<u>CGGAATTCAGTCGGCTCATCAGC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo1506</i>
Lmo2734A	<u>GACTCGCAGCAGAC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo2734</i>
Lmo2734B	<u>GAAGATCTTCGGAATGTGCAACAACATG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo2734</i>
Lmo2734C	<u>GAAGATCTTCGGAAGGATTTGCAACTATTTTG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo2734</i>
Lmo2734D	<u>CGAATTGGCTGTCCTTC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo2734</i>
Nested2734AB	<u>CGGGATCCCGCCAATCGGAC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo2734</i>
Nested2734CD	<u>GTAGGAATTCATTCAATG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo2734</i>
Lmo2783A	<u>CCGATTGTATATAACTTGAG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo2781</i>
Lmo2782B	<u>GAAGATCTCTTATCCAAATAAACAGCC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo2781</i>
Lmo2780C	<u>GAAGATCTACTAAATTAACAGGGCGAG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo2781</i>
Lmo2779D	<u>TCAATCGTCGCAAACGG</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo2781</i>
Nested2783AB	<u>CGGAATTCGACACCAAGTGGTTGC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo2781</i>
Nested2779CD	<u>CGGGATCCCTACCAGCTGTAAGTGCC</u>	Deletionsprimer zu <i>lmo2781</i>
PL95	<u>ACATAATCAGTCCAAAGTAGATGC</u>	Lauer <i>et al.</i> , 2002
NC16	<u>GTCAAAACATACGCTCTTATC</u>	Lauer <i>et al.</i> , 2002
NC17*	<u>CTTTACTCTCAGGCAGC</u>	Lauer <i>et al.</i> , 2002
Lmo1429 uni-pPL2	<u>CGGGATCCCGAAAAAGCACAAAACAC</u>	Komplementationsprimer zu <i>thiT</i>
Lmo1429 rev-pPL2	<u>GCTCTAGAGCCTACACACCTCCA</u>	Komplementationsprimer zu <i>thiT</i>
pdxK uni-pPL2	<u>CGCGGATCCGCGAAGAAGAAGTCAAAG</u>	Komplementationsprimer zu <i>pdxK</i>
pdxK rev-pPL2	<u>GCTCTAGAGCCGTACGGTTTCCATCCAG</u>	Komplementationsprimer zu <i>pdxK</i>
MPHB	<u>TTCAAGTCTACCGTGGATTG</u>	Haima <i>et al.</i> , 1990
MPHE	<u>ATTAAGTTGGGTAACGCCAG</u>	Haima <i>et al.</i> , 1990
Lmo1429 rev-pPL2n	<u>CGGAATTCGCCTACACACCTCCA</u>	Komplementationsprimer zu <i>thiT</i>
DG148-Stu for	<u>CCGGCATACTCTGCG</u>	pDG148-Stu-spezifischer Primer
DG148-Stu rev	<u>GGTGTGGCATAATGTG</u>	pDG148-Stu-spezifischer Primer
Lmo1429Ue_for	<u>AAGGAGGAAGCAGGTTTACGTTTTGTTTG</u>	Überexpressionsprimer zu <i>thiT</i>
Lmo1429Ue_rev	<u>GACACGCACGAGGTTTATTTGGTAAGAAT</u>	Überexpressionsprimer zu <i>thiT</i>

Tab.8: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotid-Primer. Durch die Primer eingeführten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

7. Chemikalien und Kits

Bezugsquelle	Chemikalien / Material
Amersham	Hybond-P PVDF Transfermembran
AppliChem	D-Arabinose, Bacitracin
ARC	[³ H]Thiamin
Backer	Ethanol, Methanol
BD Biosciences	Endothelial cell growth supplement (ECGS), Nu-Serum IV
Biozym	Agarose Seakem LE
Biochrom	DMEM, Gentamicin, Heparin, MEM-Vitamine, Natriumpyruvat, PBS, PBS mit Ca ²⁺ /Mg ²⁺ , steriles Reinstwasser, Penicillin G, RPMI 1640, Trypanblau, Trypsin/EDTA und Plastik für die Zellkultur
GibcoBRL	Select Agar, Select Peptone 140, Select Yeast Extract
Merck	L-Alanin, BHI-Medium, Borsäure, Bromphenolblau, Calciumchlorid, L-Cystein, 1,2-Diamino-cyclohexantetraessigsäure (CDTA), Dithiothreitol (DTT), Eisen(III)-chlorid, L-Isoleucin, Kaliumacetat, Kaliumthiocyanat (KSCN), Lactose, Lysozym, Magnesiumchlorid, Magnesiumsulfat, Mannosamin, β-Mercaptoethanol, Natriumhydroxid, Oxford-Medium, L(+)-Rhamnose, Thiamin, L-Valin
Millipore	MF TM -Membranfilter 0,43 μm HA (HAWP04700), MF TM -Membranfilter 0,025 μm (VSWP02500)
Minerva	Venor [®] GeM-Mykoplasmen Detektions Kit
PeqLab	Elektroporationsküvetten (2 mm Elektrodenabstand)
Perbio	fetales calf serum (FCS)
Qiagen	QIAprep Spin Midiprep Kit, QIAquick Gel Extaction Kit, QIAquick PCR Purification Kit
Riedel-deHaën	Schwefelsäure
Roth	Aceton, Ammoniumperoxidsulfat, Ampicillin, Biotin, BCIP, Chloroform, Citronensäure, Colistin, DAPI, DMSO, Eisencitrat, Eisessig, Essigsäure, Ethidiumbromidlösung, Gasperslen, L-Glutamin, Glutathion, Glycerol, Glycin, HEPES, L-Histidin, Inosin, Isoamylalkohol, Isopropanol, IPTG, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumchlorid, Kanamycin, Mueller-Hinton-Agar, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumchlorid, Natriumdeoxycholat, NBT, Phenol-Chloroform, Polymyxin B, D-Ribose, Rinderserumalbumin, Roti-Nanoquant, Rotiphorese 30, Saponin, SDS, Szintillationscocktail, TEMED, Thymidin, Tris-HCl, Tween 80, Uridin, X-Gal, Xylitol, D(+)-Xylose
Serva	Dextrin, Erythromycin, N-Laurylsarkosyl, L-Leucin, Triton-X-100
Sigma	Adenosin, Ammoniumchlorid, D-Arabinose, Arbutin, L-Arginin, D-Cellobiose, Chloramphenicol, Coomassie Blue, β- & γ-Cyclodextrine, Dimethylformamid, Dinatriumhydrogenphosphat, EDTA, EGTA, β-D-Fructose, L-Fucose, D-Galactose, Gelatine, Gellan Gum, GenElute TM HP Plasmid Miniprep Kit, Glucose, L-Glutaminsäure, 5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazol (HET), D- & L-Mannose, L-Methionin, Mineralöl, Mutanolysin, Pluronic F-68, Pyriithiamin, Riboflavin, Saccharose, Tetrazoliumviolett, Thiaminmonophosphat, Thiaminpyrophosphat, Thioctsäure, Trichloressigsäure (TCA), Triethanolamin-HCl, Tween 20, Uridin-5'-Phosphat, D-Xylose und alle hier nicht aufgeführten Chemikalien und Materialien
Whatman	3 MM Papier, Membranfilter ME25 mit Porengröße von 0,45 μm

Tab.9: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien und Kits.

8. Nährmedien

Die Medien werden nach den aufgeführten Rezepten zusammengestellt und für 20 Minuten bei 120°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf ca. 50°C werden weitere Zusätze wie Antibiotika steril zugesetzt.

MATERIAL UND METHODEN

BHI (brain heart infusion)	37 g	BHI auf 1l auffüllen Festmedium: 15 g Agar zugeben
LB (Luria-Bertani)	10 g 5 g 5 g	Pepton Yeast-Extrakt NaCl auf 1l auffüllen, pH 7,5 Festmedium: 15 g Agar zugeben
Superbroth	32 g 20 g 5 g 5 ml	Trypton Yeast-Extrakt NaCl NaOH (1 N) auf 1l auffüllen, pH 7,5

Dieses Medium wurde für die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen bei der Proteinaufreinigung verwendet. Es ist eine reichere Variante des LB-Mediums und stellt den Bakterien damit mehr Ressourcen für die Produktion des überexprimierten Proteins zur Verfügung.

MM (Premaratne <i>et al.</i> , 1991; modifiziert)		Stammlösung
	30,96 g	Na_2HPO_4
	6,56 g	KH_2PO_4
	0,1 g	L-Leucin
	0,1 g	L-Isoleucin
	0,1 g	L-Valin
	0,1 g	L-Methionin
	0,1 g	L-Arginin
	0,1 g	L-Histidin
	0,1 g	L-Cystein
	0,6 g	L-Glutamin
	0,41 g	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
	88 mg	Eisen-III-Citrat*
	0,5 mg	Riboflavin
	1 mg	Thiamin
	0,5 mg	Biotin
	0,005 mg	Thioctsäure
	10 g	Glucose oder alternative Kohlenstoffquelle
		4 x
		100 x
		immer frisch ansetzen
		10 x
		56,8 x
		100 x
		100 x
		100 x
		20%

mit Millipore auf 1l auffüllen und sterilfiltrieren
Festmedium: 15 g Agar

Das Medium soll nach Möglichkeit immer frisch angesetzt werden, da einige Bestandteile gemeinsam mit der Zeit ausfallen. Mehrere Bestandteile wurden zuvor zusammen in Stammlösungen angesetzt und sterilfiltriert. Das komplette Minimalmedium kann eine Woche bei Raumtemperatur und einen bis zwei Monate bei +4°C gelagert werden. Für Festmedium werden Agar und Wasser autoklaviert, auf ca. 50°C abgekühlt und mit vorgewärmten Stammlösungen zusammengegeben.

* Das Eisen-III-Citrat muss beim Lösen ein paar Stunden erwärmt werden.

SOC	20 g	Pepton
	5 g	Yeast-Extrakt
	3,9 g	Glucose
	0,6 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	2,5 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O
	2,1 g	MgCl ₂ x 6H ₂ O
		mit Millipore auf 1l auffüllen und sterilfiltrieren pH 7,0
MH-Agar (Mueller-Hinton)	38 g	MH-Agar auf 1l auffüllen, vor dem Autoklavieren aufkochen
Oxford-Agar	28,75 g	Oxford-Agar auf 1l auffüllen

9. Zusätze zu den Nährmedien

9.1 Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Konzentration für <i>E. coli</i>	Konzentration für <i>L. monocytogenes</i>
Ampicillin (Amp)	H ₂ O	150 µg/ml	-
Chloramphenicol (Cm)	70% Ethanol	10 µg/ml	7,5 µg/ml
Erythromycin (Em)	96% Ethanol, DMSO*	300 µg/ml	5-10 µg/ml
Gentamicin (Gen)	H ₂ O	-	10 µg/ml
Kanamycin (Kan)	H ₂ O	20 µg/ml	5 µg/ml
Penicillin G (PenG)	H ₂ O	-	5 µg/ml
Polymyxin	H ₂ O	-	30-50 µg/ml

Tab.10: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.

* für LB-Medium

9.2 Weitere Zusätze

Agar:	15 mg/l	
IPTG-X-Gal-Platten:	2 ml/l	2% X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid) in DMF
	0,15 ml/l	0,2 M IPTG

10. Puffer und Lösungen

10.1 Puffer und Lösungen zur DNA-Isolierung

BDI	50 mM	Glucose
	10 mM	CDTA
	25 mM	Tris-HCl, pH 7,5

MATERIAL UND METHODEN

BDII	0,2 M 1% (w/v)	NaOH SDS
TE (1x)	10 mM 1 mM	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA
AKI	6,7% (w/v) 50 mM 1 mM 100 µg/ml	Saccharose Tris-HCl, pH 8,0 EDTA RNase
P1	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Tris-HCl, pH 8,0 EDTA RNase A
P2	200 mM 1 %	NaOH SDS
P3	3 M	K-Acetat, pH 5,5
Chloroform-Isoamylalkohol	Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 24:1	
Phenol-Chloroform	neutrales Phenol und Chloroform im Verhältnis 1:1	

10.2 Puffer und Lösungen zur Protein-Isolierung

Puffer A	50 mM 50 mM 1 mM 4 mg/ml	Tris-HCl, pH 7,9 Glucose EDTA Lysozym
Puffer B	10 mM 50 mM 1 mM 0,5 % 1 %	Tris-HCl, pH 7,9 KCl EDTA Tween 20 Triton X-100
Puffer C	50 mM 100 mM 0,1 mM 0,5 mM 1 % 50 %	Tris-HCl, pH 8,0 NaCl EDTA DTT Triton X-100 Glycerol
Puffer D	50 mM 100 mM 0,1 mM 0,5 mM 1 % 75 %	Tris-HCl, pH 8,0 NaCl EDTA DTT Triton X-100 Glycerol

10.3 Puffer und Lösungen für Agarosegelelektrophorese

TAE (50x)	2 M 50 mM	Tris-Base EDTA mit Essigsäure auf pH 8,0 einstellen mit Millipore auf 1l auffüllen
Agarose	0,8-1,5 % (w/v)	Agarose in TAE (1x) aufkochen
Gel-Lade-Puffer (5x)	40 % 125 mM 0,03 % (w/v)	Glycerin EDTA Bromphenolblau, pH 8,0
Ethidiumbromidlösung		10 mg/ml in Millipore

10.4 Puffer und Lösungen für Proteinanalyse

McIlvaine Puffer (Citronensäure-Phosphat-Puffer)	16 g/l 9 g/l	Na ₂ HPO ₄ Citronensäure, pH 5 und pH 5,5
Probenpuffer (5x) (Laemmli-Puffer)	30 mM 10 % 10 % 20 % 0,1 %	Tris-HCl, pH 6,8 Glycerol SDS β-Mercaptoethanol Bromphenolblau
Trenngel 12,5% (30 ml)	12,5 ml 6,63 ml 7,5 ml 0,2 ml 2,85 ml 0,02 ml 0,3 ml	Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 H ₂ O 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 15%-iges SDS Glycerol TEMED 10%-iges APS
Sammelgel (10 ml)	2,2 ml 6,4 ml 7,5 ml 0,1 ml 0,006 ml 0,1 ml	Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1 H ₂ O 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 15%-iges SDS TEMED 10%-iges APS
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	30,3 g/l 144,1 g/l 10 g/l	Tris-HCl Glycin SDS
Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) 25 % (v/v) 10 % (v/v) 65 % (w/v)	Coomassie Blue Isopropanol Eisessig H ₂ O

MATERIAL UND METHODEN

Entfärber	40 %	Essigsäure
	10 %	Methanol
	50 %	H ₂ O
Blotpuffer (10x)	143 g/l	Glycin
	30 g/l	Tris-HCl
	10 g/l	SDS
	200 ml	Methanol
Blotpuffer (1x)	100 ml	Blotpuffer (10x)
	200 ml	Methanol
	700 ml	H ₂ O
TBS (10x)	100 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1,5 mM	NaCl
TBS-T	100 ml	TBS (10x)
	1 ml	Tween 20
	899 ml	H ₂ O
AP-Puffer (alkalische Phosphatase)	100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
	150 mM	NaCl
	5 mM	MgCl ₂
Detektionslösung	132 µl	BCIP (50 mg/ml in DMF)
	66 µl	NBT (50 mg/ml in 70%-igem DMF) in 10 ml AP-Puffer

10.5 Puffer und Lösungen für colorimetrisches Verfahren

IF-0 (inoculating fluid) (Bochner <i>et al.</i> , 2001; modifiziert)	100 mM	NaCl			
	30 mM	Triethanolamin-HCl, pH 7,1			
	5 mM	NH ₄ Cl			
	2 mM	NaH ₂ PO ₄			
	0,25 mM	Na ₂ SO ₄			
	0,05 mM	MgCl ₂			
	1 mM	KCl			
	1 µM	FeCl ₃ -HCl			
	0,01 %	Tetrazoliumviolett			
	200 mg/l	Gellan Gum			
	300 mg/l	Pluronic F-68			
		20 min bei 120°C autoklavieren			
	AS (additive solution)	10 ml	MgCl ₂ x 6H ₂ O	} I	Stammlösung
		CaCl ₂ x 2H ₂ O	17,6 g/l		
10 ml		L-Arginin	} II		0,63 g/l
		L-Glutaminsäure		1,01 g/l	
30 ml		L-Cystein, pH 8,5	} III*		0,24 g/l
		Uridin-5'-monophosphat		0,37 g/l	

10 ml	Hefeextrakt	6 g/l
10 ml	Tween 80	6 g/l
30 ml	H ₂ O	
	*pH 8,5 mit NaOH einstellen	

10.6 Lösungen zur Resuspendierung von Zellen

PBS-Puffer	8 g	NaCl
	0,2 g	KCl
	0,2 g	KH ₂ PO ₄
	1,26 g	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O, pH 7,0

SMHEM	272 mM	Saccharose
	1 mM	MgCl ₂
	2 mM	HEPES, pH 7,2

11. Medien und Lösungen für Zellkultur

RPMI-Komplettmedium	500 ml	RPMI 1640 mit stabilem Glutamin
	50 ml	FCS

HBMEC-Komplettmedium	410 ml	RPMI 1640 mit stabilem Glutamin
	50 ml	FCS
	50 ml	Nu-Serum IV
	5 ml	100 mM Natriumpyruvat
	5 ml	MEM-Vitamin Mix
	0,5 ml	Heparin 500 U/ml
	3 ml	ECGS

PBS mit Ca²⁺ / Mg²⁺	0,1 g	CaCl ₂
	0,1 g	MgCl ₂
		auf 1l mit PBS auffüllen

Trypsin/EDTA-Lösung	0,05 %	Trypsin
	0,02 %	EDTA

Trypanblaulösung	0,1 %	Trypanblau in PBS
-------------------------	-------	-------------------

Lösung A	5 ml	FCS
	20 ml	Zellkulturmedium ohne FCS

Lösung B	5 ml	FCS
	15 ml	Zellkulturmedium ohne FCS
	5 ml	DMSO

Fixierlösung	Methanol und Eisessig im Verhältnis 3:1	
---------------------	---	--

DAPI-Lösung	0,5 mg/ml	DAPI
	0,1 mg/ml	Thimerosal (evt. zur Konservierung)

12. Geräte

CO₂-Inkubatoren, Hera Cell von Heraeus und APT.Line CB von Binder
Elektroporationsgerät, Gene Pulser, BioRAD
Fluoreszenzmikroskop, Olympus BX51, Olympus
Gelelektrophoresekammer, PerfectBlue Gelsystem Mini M, PEQLAB Biotechnologie
Heizblock, TB1, Biometra
Hybridisierungsöfen, Micro-4, Hybaid
ImageMaster^R VDS, GE Healthcare
Kühlzentrifugen, Sigma 3K30 und Eppendorf 5402
Mikroplate Reader, Spectra Classic, Tecan
Ribolyser, FastPrep^R-24, MP Biomedicals
Robocycler Gradient 96, Stratagene
Schüttel- & Mikroinkubator, DIS-2, LTF Labortechnik
Schüttler, Certomat^R M, Sartorius
Schüttler & Spectrometer, Bioscreen C, LabSystem
Scintillationszähler, TriCarb, Perkin Elmer
SDS-PAGE, Minigel Twin, Biometra
Semi-Dry-Blotter, Pegasus, Phase
Speedvac-Konzentrator, Concentrator 5301, Eppendorf
Spektrophotometer, NanoDrop 1000, Thermo Scientific
Sterilbank, Laminair HB2448, Heraeus
Thermocycler, T1, Biometra
Tischzentrifuge, Centrifuge 5415D, Eppendorf
Ultrazentrifuge, Optima LE-80K, Beckman Coulter
UV-Spektrometer, Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech

13. Datenbanken

<http://genolist.pasteur.fr/ListiList/>
<http://leger2.gbf.de/cgi-bin/expLeger.pl>
http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/
<http://www.brenda-enzymes.org>
<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>
<http://www.dsmz.de>
<http://www.ebi.ac.uk/embl/index.html>
<http://www.lgcstandards-atcc.org/>
<http://www.microbesonline.org>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
<http://www.sanger.ac.uk>
<http://www.pedant.gsf.de>
<http://www.theSEED.org>

II. Methoden

1. Kultivierung von Bakterien

1.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgt auf festem oder in flüssigem LB-Medium, ggf. unter Zusatz von Antibiotika. In kleinerem Maßstab werden die Bakterien, ausgehend von einer Einzelkolonie, im Roller (180 rpm) bei 37°C kultiviert. Größere Volumina werden im Luftschüttler bei 200-250 rpm inkubiert. Bei Kulturausstrichen auf Festmedien erfolgt die Inkubation bei 37°C im Brutschrank. Zur Regeneration nach der Elektroporation werden die *E. coli*-Zellen in SOC-Medium kultiviert.

1.2 Kultivierung von *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes wird auf festem oder in flüssigem BHI- oder LB-Medium, ggf. unter Zusatz von Antibiotika, bei 30-42°C im Brutschrank oder Schüttler (240 U/min) über 1-2 Tage angezogen. Die Inkubation und Kultivierung der elektroporierten *L. monocytogenes*-Zellen erfolgt auf dem BHI-Medium bei 30°C für 2 Tage.

1.3 Konservierung von Bakterien (Glycerinkultur)

- Bakterien von einer frischen Agar-Platte in ein Eppendorfgefäß überführen
- 400/850 µl frisches Medium zugeben, Zellen resuspendieren und ggf. Antibiotikum zugeben
- 600/150 µl 87% Glycerin zugeben, mischen
- Lagerung bei -20°C bzw. -80°C

2. Molekulargenetische Methoden

2.1 DNA-Isolierung

2.1.1 Plasmidisolierung aus *E. coli* durch alkalische Lyse

(nach Birnboim und Doly, zur Isolierung großer Mengen Plasmid-DNA)

- 40 ml Bakterienflüssigkultur (Übernachtskultur) in Zentrifugenröhrchen überführen
- 5 min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Pellet in 8 ml BD I resuspendieren
- 16 ml BD II (frisch zubereitet) zugeben, invertieren
- 10 min bei RT inkubieren
- 12 ml 3 M Na-Acetat pH 4,8 zugeben, sofort mehrmals invertieren
- 10 min 0°C inkubieren
- 10 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand auf zwei Zentrifugengefäße aufteilen, Pellet verwerfen
- 1 Volumen Isopropanol zugeben, invertieren
- 20 min bei 10.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand verwerfen, Pellet trocknen lassen
- Pellet in 4,8 ml TE-Puffer resuspendieren
- Reinigung der Plasmid-DNA durch CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

2.1.2 Klonanalyse: HB-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

- 1,5 ml Bakterienflüssigkultur in Eppendorfggefäß bei 13.000 rpm 5 min pelletieren
- Zellpellet in 0,3 ml P1 durch Vortexen resuspendieren (alternativ können Zellen einer Stocherplatte abgenommen und resuspendiert werden)
- 0,3 ml P2 zugeben, 6x invertieren
- 5 min bei RT inkubieren
- 0,3 ml P3 zugeben, 6x invertieren
- 10 min auf Eis inkubieren
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand in neues Eppendorfggefäß überführen
- 600 µl Isopropanol zugeben, invertieren
- 20 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- 0,5 ml 70% (v/v) Ethanol zugeben
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet bei 70°C trocknen
- DNA in 20 µl H₂O oder 1 x TE-Puffer resuspendieren

2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* mit GenElute Spin Miniprep Kit

(zur schnellen Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA)

- Bakterien von der Agar-Platte in ein Eppendorfggefäß überführen
- Zellen in 200 µl Resuspensionslösung aufnehmen
- 200 µl Lysis-Puffer zugeben, 6-8x invertieren
- 5 min bei RT inkubieren
- 350 µl Neutralisation-Puffer zugeben, 6-8x invertieren
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand auf die vorbereitete GenElute-Säule Säule geben
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- Säule mit 750 µl Wasch-Puffer waschen
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- Zentrifugationsschritt wiederholen, um die Reste des Wasch-Puffers zu entfernen
- Säule in ein neues Eppendorfggefäß überführen
- DNA eluieren: 50 µl Elution-Puffer oder bidest. H₂O, 1min bei RT stehen lassen
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren

2.1.4 Plasmidisolierung aus *L. monocytogenes*

- 50 ml BHI-Medium mit *L. monocytogenes* animpfen und 1-2 Tage bei 30-37°C unter ständigem Schütteln anziehen
- 10 min bei 6.000 rpm und 4°C in Greinerröhrchen zentrifugieren
- Pellet mit 10 ml 10% (v/v) Glycerin waschen
- ü/N bei -20°C einfrieren
- Pellet in 1,5 ml P1 mit 7 mg/ml Lysozym resuspendieren
- 25 min (max. 30 min) bei 37°C inkubieren
- 1,5 ml P2 zugeben, 6x invertieren
- 8 min bei RT inkubieren
- 1,5 ml P3 (pH 5,5) zugeben, 6x invertieren
- 10 min bei 0°C inkubieren
- 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorfggefäß überführen

- 3,5 ml neutrales Phenol/Chloroform zugeben, durch Invertieren homogenisieren
- 5 min bei 0°C inkubieren
- 15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- 3,5 ml Chloroform-Isoamylalkohol zugeben, invertieren
- 20 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- 1/10 Vol. Na-Acetat (pH 8,0) und 1 Vol. Isopropanol (4 ml) zugeben, 6x invertieren
- 20 min bei -20°C inkubieren
- 20 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet mit 2,5 ml 70% (v/v) Ethanol waschen
- 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand und Rücklauf vollständig abziehen und Pellet bei 37°C trocknen
- DNA in 50 µl TE-Puffer resuspendieren
- Endkonzentration: 5 µl ~ 1µg DNA

2.1.5 Isolierung von Gesamt-DNA aus *L. monocytogenes*

- Bakterien von der Agar-Platte in ein Eppendorfgefäß überführen oder 3 ml einer Übernachtskultur (ü/N-Kultur) 2 min bei 13.000 rpm abzentrifugieren
- Zellen in 0,5 ml AK I-Lösung mit 10 mg/ml Lysozym resuspendieren (vortexen)
- 60-90 min bei 37°C inkubieren
- 25 µl Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) zugeben, 6-8x invertieren
- 20 min bei 50°C inkubieren
- 200 µl von 5%-igem SDS zugeben, vorsichtig 6-8x invertieren
- 10 min bei 70°C inkubieren und langsam auf RT abkühlen lassen
- 200 µl neutrales Phenol-Chloroform zugeben, durch Invertieren homogenisieren
- mind. 20 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Oberphase in ein neues Eppendorfgefäß überführen, Phenolisierungsschritt wiederholen
- 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH 8,0 und 1 Volumen Isopropanol zugeben, invertieren
- präzipitierte DNA mit einer abgeschnittenen gelben Pipettenspitze in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- DNA 2x mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol waschen
- DNA in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- in 50-200 µl bidest. H₂O oder TE-Puffer resuspendieren, ggf. 30 min bei 37°C inkubieren
- Lagerung bei 4°C

2.2 Reinigung, Konzentrierung und Denaturierung von DNA

2.2.1 Phenolextraktion

- 1 Vol. Phenol-Chloroform zu 1 Vol. DNA-Lösung zugeben, mischen
- 15 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- obere Phase abheben und in ein neues Eppendorfgefäß überführen
- Vorgang ggf. wiederholen
- Konzentrierung der DNA durch Alkoholfällung
- resuspendieren in bidest. H₂O oder TE-Puffer

2.2.2 Alkoholfällung

(zur Konzentrierung und Reinigung von DNA und zur Entfernung kurzer DNA-Fragmente)

- 1 Vol. DNA-Lösung mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat pH 8,0 versetzen und mischen
- 2 Vol. 100% Ethanol (bei kleinen DNA-Volumina) oder 1 Vol. Isopropanol (bei großen DNA-Volumina) zugeben, invertieren
- 20-30 min bei -20°C inkubieren
- 20 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet 2x mit 300 µl 70% (v/v) Ethanol waschen
- 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand entfernen, Pellet bei 70°C trocknen
- DNA in bidest. H₂O oder TE-Puffer resuspendieren

2.2.3 Alkalische Denaturierung von Plasmid-DNA

- 18 µl DNA-Lösung
- je 2 µl 2 M NaOH und 2 mM EDTA zugeben
- 5 min bei RT inkubieren
- 2 µl 2 M NH₄-Acetat, pH 4,6 zugeben, mischen
- 75 µl 100% Ethanol zugeben, mischen
- 10 min bei -80°C inkubieren
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 200 µl 70% (v/v) Ethanol waschen
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet bei 70°C trocknen
- resuspendieren in bidest. H₂O oder TE-Puffer
- auf Eis stellen und schnell verwenden

2.2.4 Entsalzen von Plasmid-DNA

(zur Aufreinigung von Plasmid-DNA zur Elektroporation)

- Membranfilter (0,025 µm von Millipore) mit der glänzenden Seite nach oben in einer Petrischale mit bidest. H₂O für 1 min equilibrieren lassen
- DNA auf den Filter geben und 20 min bei RT inkubieren
- gereinigte DNA vom Filter abnehmen und zur Elektroporation einsetzen oder bei -20°C lagern

2.2.5 CsCl-EtBr-Dichtegradientenzentrifugation

- 4,65 g CsCl einwiegen
- 4,3 ml der resuspendierten DNA zugeben, mischen durch Invertieren
- 300 µl Ethidiumbromidlösung (1,5-2 mg/ml) zugeben, mischen
- Quickseal-Ultrazentrifugenröhrchen (Beckman) blasenfrei befüllen und verschließen
- mindestens 8 h bei 50.000 rpm und 15°C zentrifugieren (Ultrazentrifuge)
- unter UV-Licht ($\lambda=305$ nm) Plasmid-DNA (untere Bande, obere Bande entspricht der chromosomalen DNA) mit Spritze abziehen und in Eppendorfggefäß überführen
- Ethidiumbromid extrahieren: 300 µl CsCl-gesättigtes Isopropanol zugeben, schütteln, obere Phase verwerfen, zwei- bis viermal wiederholen bis die Oberphase farblos ist
- Unterphase in einen sterilen Dialyseschlauch überführen
- zweimal mindestens 4 h gegen 2 l Millipore dialysieren

2.2.6 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration einer wässrigen DNA-Lösung kann photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei $\lambda = 260 \text{ nm}$ ermittelt werden. Bei dieser Wellenlänge weisen die Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum auf, für das die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich sind. Eine o.D._{260} von 1 entspricht einer dsDNA-Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$. Die Reinheit der Lösung wird durch die Ermittlung des Quotienten $\text{o.D.}_{260}/\text{o.D.}_{280}$ (DNA-/Proteingehalt) bestimmt. Reine DNA liefert einen Quotienten von 1,7-2,0. Zur Konzentrationsbestimmung von DNA wurde in dieser Arbeit das Spektrophotometer „NanoDrop“ verwendet.

2.3 Techniken zur Charakterisierung von DNA-Molekülen

2.3.1 Hydrolyse von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltungen der Plasmid- und Gesamt-DNA werden den Empfehlungen des Herstellers der Restriktionsenzyme entsprechend durchgeführt. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgt durch Inkubation bei $65\text{-}85^\circ\text{C}$ für 10-20 min. Hitzeresistente Enzyme werden durch Phenolisierung inaktiviert.

2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Zur Charakterisierung der DNA-Fragmente bzw. -Moleküle wird die Gelelektrophorese verwendet. Aufgrund der negativen Ladung, die die Phosphatreste der DNA verleihen, kann die DNA im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Bei der Auftrennung in Agarosegelen ist die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA von der Größe und der Konformation (ss, ds, linear, oc, ccc) der Moleküle abhängig. Maßgeblich für die DNA-Wanderungsgeschwindigkeit ist die aus unterschiedlichen Agarosekonzentrationen resultierende Dichte des Netzwerkes. Je höher die Agarosekonzentration ist, desto geringer ist die Wanderungstrecke der DNA-Moleküle unter gleich bleibenden Bedingungen. Die Agarosekonzentration wird der Größe der zu trennenden DNA-Moleküle angepasst. In dieser Arbeit wurde 0,8-2% Agarose verwendet.

Fragmentlänge [kb]	Agarosekonzentration [% (w/v)]
1-30	0,5
0,8-12	0,7
0,5-7	1,0
0,4-6	1,2
0,2-3	1,5
0,1-2	2,0

Tab.11: Agarosekonzentrationen und die entsprechenden Trennbereiche der Fragmente.

- Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle aufkochen und auf ca. 60°C abkühlen lassen
- in den Gelträger gießen, Kamm einsetzen und das Gel fest werden lassen (ca. 20 min)
- in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer einsetzen und den Kamm entfernen
- DNA-Proben mit ca. 1/5 Volumen Gel-Lade-Puffer (5x) versetzen
- Geltaschen mit Proben beladen
- Auftrennung bei einer Spannung von 90-120 V
- anschließend die Färbung des Gels in einer Ethidiumbromidlösung
- Gel wässern und unter UV-Licht ($\lambda=320 \text{ nm}$) fotografieren
- Gel ggf. in TAE-Puffer entfärben

2.3.3 Bestimmung des Molekulargewichts von DNA

Die Mobilität von DNA-Molekülen bei der Gelelektrophorese ist, unter geeigneten Bedingungen, umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes. Das Molekulargewicht eines Fragmentes kann durch Vergleich mit der Mobilität von DNA-Fragmenten bekannter Größe ermittelt werden. In dieser Arbeit wurde der Längenmarker „GeneRuler™ DNA Ladders Mix, 100-10.000 bp“ (Fermentas) als Größenstandard verwendet.

2.4 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.4.1 Dephosphorylierung von Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase

- 40 µl hydrolysierte Vektor-DNA (Spaltansatz)
- 5 µl 10 x Phosphatase-Puffer zugeben, mischen
- 1 µl alkalischer Phosphatase zugeben und mit bidest. H₂O auf 50 µl auffüllen
- 30 min bei 37°C inkubieren, anschließend Enzym 15 min bei 65°C inaktivieren
- Phenolextraktion und Alkoholfällung
- DNA in 40 µl bidest. H₂O aufnehmen

2.4.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“

- DNA-Restriktionsfragment mit Skalpell aus dem Agarosegel ausschneiden
- 3 Gelvol. (100 mg Gel = 100 µl) QG zugeben und 10-15 min bei 50°C schmelzen lassen
- 1 Gelvolumen Isopropanol zugeben und invertieren
- Säule in Sammelgefäß einsetzen, Lösung auf die Säule geben
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 500 µl QG auf Säule geben
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 750 µl PE auf Säule geben
- 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Durchlauf verwerfen
- 2 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, um PE-Reste zu entfernen
- Säule auf Eppendorfgefäß setzen und 50-100 µl bidest. H₂O auf die Mitte der Säule geben
- 1 min bei RT stehen lassen, anschließend 1 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Eluat zur Ligation, zur Nested-PCR einsetzen oder bei -20°C lagern

2.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA

Vektor-DNA und Insert-DNA werden nach der Restriktionsspaltung und Inaktivierung in geeignetem Verhältnis gemischt, wobei das Mischungsverhältnis von der Konzentration der DNA abhängig ist. Das optimale Verhältnis von Vektor-DNA zu Insert-DNA liegt zwischen 1:3 bis 1:5. Die Ligation verläuft optimal in einem geringen Reaktionsvolumen bei hoher DNA-Konzentration.

Standard-Ansatz (40 µl):	25-30 µl	Vektor-Insert-Gemisch
	4 µl	Ligase-Puffer (10x)
	1 µl	T4-DNA-Ligase
	ad 40 µl	bidest. H ₂ O
		4 h bei RT oder über Nacht bei 16°C ligieren
		10 min bei 70°C inaktivieren

2.4.4 Shotgun-Klonierung

Die Shotgun-Klonierung ist die Ligation von Vektor-DNA mit einem Gemisch von hydrolysierten DNA-Fragmenten, die direkt nach der Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen für die Klonierung verwendet werden. Es werden alle oder einzelne Fragmente nach dem Zufallsprinzip mit dem Vektor ligiert.

2.5 DNA-Transfer

2.5.1 Transformation von *E. coli*

2.5.1.1 Herstellung kompetenter Zellen nach der CaCl₂-Methode

- 1 ml ü/N-Kultur in 50 ml LB-Medium überimpfen
- bei 37°C im Schüttler inkubieren bis zur o.D.₆₀₀ von 0,5-0,8 , entspricht dem Titer von ca. $2 \times 10^8 \text{ ml}^{-1}$ (2-4 h)
- 5 min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 5 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendieren
- 30 min bei 0°C inkubieren
- 5 min bei 5.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Pellet vorsichtig in 2 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ resuspendieren
- 15 min bei 0°C inkubieren
- zu 2 ml Zellsuspension 292 µl 87% Glycerin zugeben und resuspendieren
- Zellen à 200 µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotieren und bei -80°C lagern

2.5.1.2 Transformation kompetenter Zellen

- kompetente Zellen auf Eis auftauen lassen
- mit Ligationsansatz bzw. Plasmid-DNA mischen
- 30 min auf Eis inkubieren
- 2,5 min Hitzeschock bei 42°C
- 5 min bei 0°C inkubieren
- 0,7 ml LB- oder SOC-Medium zugeben, invertieren
- 30-60 min bei 37°C unter Schütteln inkubieren
- 50 µl und 100 µl auf je eine Agarplatte mit Selektionsmedium ausplattieren
- Zellen 2 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet im Rücklauf resuspendieren und auf Selektionsmedium ausplattieren
- über Nacht bei 37°C inkubieren

2.5.2 Elektroporation von *E. coli*

2.5.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

- 250 ml LB-Medium mit 2,5 ml ü/N-Kultur animpfen
- bei 37°C bis zu einer o.D.₆₀₀ von 0,5-0,75 im Schüttler inkubieren (2-2,5 h)
- Zellsuspension 15 min auf Eis stellen, alle weiteren Schritte bei 0°C durchführen, alle Lösungen vorkühlen
- 250 ml Zellsuspension 15 min bei 6.000 rpm zentrifugieren
- Überstand und Rücklauf verwerfen

- Zentrifugengefäß 2x mit bidest. H₂O vorsichtig ausschütteln, ohne das Pellet zu lösen
- Pellet vorsichtig in 5 ml bidest. H₂O resuspendieren
- 250 ml bidest. H₂O zugeben, durch Vortexen mischen
- 15 min bei 6.000 rpm zentrifugieren, Überstand sofort entfernen
- Pellet im Rücklauf mit einer Pipette resuspendieren
- Zellsuspension auf zwei 40 ml-Zentrifugengefäße aufteilen
- 25 ml 15% Glycerin zugeben, mischen
- Zellen 15 min bei 7.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml 15% Glycerin resuspendieren
- Zellen à 100 µl in vorgekühlte Eppendorfggefäße aliquotieren
- Aliquots sofort verwenden oder bei -80°C lagern

2.5.2.2 Elektroporation kompetenter *E. coli*-Zellen

- Einstellungen des Gene Pulser (BioRAD):

Kapazität:	25 µF
Parallelwiderstand:	400 Ω
Spannung:	12,5 kV/cm
- kompetente Zellen auf Eis auftauen lassen
- DNA und Elektroporationsküvette (d=2 mm) auf Eis vorkühlen
- aufgetaute kompetente Zellen mit der zu transformierenden DNA mischen und in die Elektroporationsküvette geben
- 30-60 s auf Eis inkubieren
- Küvette von außen abtrocknen, in die Apparatur stellen und Puls auslösen
- sofort 1 ml SOC-Medium zugeben, mischen
- den Inhalt der Küvette in ein Eppendorfggefäß geben
- 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubieren
- 50 µl und 100 µl auf je eine Agarplatte mit Selektionsmedium ausplattieren
- Zellen 2 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet im Rücklauf resuspendieren und auf Selektionsmedium ausplattieren
- über Nacht bei 37°C inkubieren

2.5.3 Elektroporation von *L. monocytogenes*

2.5.3.1 Herstellung kompetenter Zellen

- 100 ml BHI-Medium mit 2 ml ü/N-Kultur animpfen (1:50 Verdünnung)
- bei 37°C bis zu einer o.D.₅₅₀ von 0,5-0,6 im Schüttler inkubieren
- Penicillin G zugeben (Endkonz. 5 µg/ml)
- bei 37°C bis zu einer o.D.₅₅₀ von 0,69 weiter inkubieren
- Zellsuspension für 10 min auf Eis stellen
- 10 min bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugieren, alle weiteren Schritte auf Eis durchführen, alle Lösungen vorkühlen
- Überstand und Rücklauf verwerfen
- Pellet 2x mit 1/10 Volumen SMHEM waschen
- Pellet in 1/100 Volumen SMHEM resuspendieren
- Zellen à 200-250 µl in vorgekühlte Eppendorfggefäße aliquotieren
- Aliquots sofort verwenden oder bei -80°C lagern

2.5.3.2 Elektroporation kompetenter *L. monocytogenes*-Zellen

- | | | |
|---|---------------------|--------------|
| - Einstellungen des Gene Pulser (BioRAD): | Kapazität: | 25 μ F |
| | Parallelwiderstand: | 200 Ω |
| | Spannung: | 12,5 kV/cm |
- kompetente Zellen auf Eis auftauen lassen
 - DNA und Elektroporationsküvette (d=2 mm) auf Eis vorkühlen
 - aufgetaute kompetente Zellen mit 2-4 μ g zu transformierender DNA mischen und in die Elektroporationsküvette überführen
 - 30-60 s auf Eis inkubieren
 - Küvette von außen abtrocknen, in die Apparatur stellen und Puls auslösen
 - sofort 1 ml BHI-Medium zu den Zellen zugeben, mischen
 - den Inhalt der Küvette in ein Eppendorfgefäß geben
 - 6 h bei 30°C unter Schütteln inkubieren
 - 50 μ l und 100 μ l auf je eine Agarplatte mit Selektionsmedium ausplattieren
 - Zellen 2 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand verwerfen
 - Pellet im Rücklauf resuspendieren und auf Selektionsmedium ausplattieren
 - 2-3 Tage bei 30°C inkubieren

2.5.4 Konjugation von *L. monocytogenes*

(Lauer *et al.*, 2002; modifiziert)

- ü/N-Kultur von *E. coli*- und *L. monocytogenes*-Stämmen bei 30°C anziehen
- 50 ml LB/Cm25-Medium mit 0,5 ml *E. coli*-ü/N-Kultur und 5 ml BHI-Medium mit 50 μ l *L. monocytogenes*-ü/N-Kultur animpfen
- bei 30°C bis zu einer o.D.₆₀₀ von 0,5-0,55 im Schüttler inkubieren
- 2,5 ml *E. coli*-Kultur (Donor) mit 1,5 ml *L. monocytogenes*-Kultur (Rezipient) mischen
- 5 min bei 7.500 rpm und RT zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet mit 10 ml BHI waschen (nur leicht schwenken, nicht resuspendieren)
- 5 min bei 7.500 rpm und RT zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 0,5 ml BHI aufnehmen (mit einer Spitze mischen, nicht resuspendieren)
- MFTM-Membranfilter 0,43 μ m HA auf vorgewärmte BHI-Agarplatte ohne Antibiotika legen
- 0,5 ml Zellen auf dem Filter verteilen, trocknen lassen
- 2 h bei 30°C inkubieren, Platte nicht umdrehen
- Zellen vorsichtig vom Filter abnehmen und in 2,5 ml BHI resuspendieren
- 100-300 μ l auf je eine Agarplatte mit Polymyxin30/Cm7,5 ausplattieren
- über Nacht bei 30°C und anschließend 2-3 Tage bei 37°C inkubieren

2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.6.1 PCR mit Gesamt-DNA als Template

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt unter geeigneten Bedingungen DNA-Segmente selektiv mittels verschiedener hitzestabiler DNA-Polymerasen und spezifischen Oligonukleotid-Primern zu amplifizieren. Zwei zum Anfang und Ende des zu amplifizierenden Fragmentes komplementären Primer lagern sich an das Template an und mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und dNTPs werden die komplementären DNA-Enden synthetisiert. Als Template kann ungespaltene, verdünnte Gesamt-DNA oder hydrolysierte, 1:100 in bidest. H₂O verdünnte Plasmid-DNA eingesetzt werden.

Standard-PCR-Ansatz (50 µl):	1x	Reaktionspuffer (10x)	5 µl
	25 mM	MgCl ₂	3 µl
	20 mM	dNTP Mix (5 mM von jedem dNTP)	2 µl
	10 pmol	Primer1/ Primer2	je 2 µl
	2-100 ng	Template	1-10 µl
	5 u/µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,1 µl
		bidest. H ₂ O	ad 50 µl

Standard-PCR-Bedingungen:	initiale Denaturierung	1x	5 min	94°C	
	Denaturierung	}	1 min	94°C	
	Annealing		30x	40 sec	T _A
	Elongation		t _E	72°C	
	Finale Elongation	1x	10 min	72°C	

Die Annealingtemperatur (T_A) wurde jeweils der Schmelztemperatur der verwendeten Primern (T_M= 2°C x (A+T) + 4°C x (C+T)) angepasst. Die optimale Annealingtemperatur liegt 0,5-5°C unter dem niedrigeren beider errechneter Schmelzpunkte. Diese Faustregel gilt allerdings nur für Oligonukleotide mit ca. 18-24 Nukleotide. Beim Auftreten unspezifischer PCR-Produkte wurde die Annealingtemperatur erhöht. Die Elongationszeit (t_E) richtete sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments und der verwendeten DNA-Polymerase: proof-reading DNA-Polymerase 1 kb/15 sec, *Taq* DNA-Polymerase 1 kb/1 min.

Nach Abschluss der PCR-Reaktion wird das PCR-Produkt durch Agarosegelelektrophorese charakterisiert. Die Klonierung amplifizierter DNA kann nach vorhergehender Phenolextraktion und Alkohol-fällung oder nach Aufreinigung mittels QIAquick PCR Purification Kit erfolgen. Zur Weiterverarbeitung wird das PCR-Produkt bei 4°C oder -20°C gelagert.

2.6.2 PCR mit ganzen Zellen als Template

(zur schnellen Überprüfung der Transformanten)

- Zellen mit gelber Pipettenspitze von der Agarplatte in ein Eppendorfggefäß überführen
- 500 µl Millipore zugeben, Zellen resuspendieren
- 2 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand entfernen
- Zellen im Rücklauf resuspendieren
- 1 µl dieser Zellsuspension als Template einsetzen
- alternativ eine Einzelkolonie direkt im PCR-Ansatz resuspendieren
- zur Lyse der Zellen den ersten Denaturierungsschritts auf 10 min verlängern

2.6.3 Touchdown-PCR

Um in einer PCR die Spezifität der PCR-Produkte zu erhöhen und eine größere Ausbeute dieser Produkte zu erhalten, kann die Methode der Touchdown-PCR angewendet werden. Zudem eignet sich diese Methode auch für PCRs mit Oligonukleotiden, die stark unterschiedliche Schmelztemperaturen haben. Dabei handelt es sich um eine Standard-PCR, bei der die Annealingtemperatur pro Zyklus abgesenkt wird. Man startet die PCR 2-3°C über der ermittelten Annealingtemperatur und senkt sie dann in den ersten 10-15 Zyklen pro Zyklus um 0,2-0,5°C. Dadurch wird das Annealing der Oligonukleotide bei hohen Temperaturen begünstigt und somit eine hohe Spezifität der PCR-Produkte erreicht. Anschließend werden nochmals 10-15 Zyklen mit der ursprünglich ermittelten Temperatur durchgeführt. In dieser Arbeit wurde diese PCR-Methode angewendet, wenn sich die Oligonukleotidpaare in ihrer Schmelztemperatur stark unterschieden.

2.6.4 *Nested-PCR*

Die *Nested-PCR* wird eingesetzt, wenn einerseits extrem geringe Templatemengen vorliegen und andererseits um falsche Amplifikationsprodukte wegzuselektieren, die mit zunehmender Zyklenzahl durch Fehlhybridisierungen entstehen. Hierbei wird nach einer primären PCR ein zweites Primerpaar eingesetzt, das innerhalb des amplifizierten Fragments liegt. So kann auch eine höhere Spezifität des Produktes erreicht werden. In dieser Arbeit wurde die *Nested-PCR* bei der Konstruktion der Deletionsplasmide eingesetzt, bei der ein Ligationsansatz zweier vorher amplifizierter Fragmente als Template diente. Für weitere Klonierungsschritte wurde den *Nested-Primern* an ihren 5'-Enden zusätzlich eine Schnittstelle für *EcoRI* bzw. *BamHI* eingefügt.

2.7 Allgemeine Konstruktion von *L. monocytogenes*-Stämmen

2.7.1 Deletion- und Insertionsmutagenese in *L. monocytogenes*

Die homologe Rekombination ist eine verbreitete Methode, um mit Hilfe eines temperatursensitiven Vektors Deletions- oder Insertionsmutanten herzustellen bzw. chromosomale Genabschnitte auszutauschen [Wuenscher *et al.*, 1991]. Der Vektor kann aufgrund des temperatursensitiven Origins in Gram-positiven Bakterien nur bei permissiver Temperatur von 30°C, nicht aber bei 37-43°C, replizieren. Trägt der Vektor homologe Fragmente zum Genom des zu verändernden Bakterienstammes, so kann bei nicht-permissiver Temperatur die Rekombination eines klonierten Genfragments mit dem homologen Genbereich und Integration des Vektors ins bakterielle Genom erfolgen. Auf diese Weise kann der Vektor weiterhin auch bei nicht-permissiven Temperaturen als Bestandteil des bakteriellen Chromosoms repliziert werden. Als zusätzlichen Selektionsmarker tragen die meisten temperatursensitiven Vektoren eine oder mehrere Antibiotikaresistenzen, deren Ausbildung bei nicht-permissiven Temperaturen nur durch die Integration des Vektors ins bakterielle Chromosom gewährleistet werden kann. Für die Konstruktion der Deletions- und Insertionsmutanten wurde in dieser Arbeit der listerienspezifische, temperatursensitive Vektor pLSV101 verwendet, der eine Erythromycinresistenz als Selektionsmarker trägt.

Bei der Insertionsmutagenese trägt das rekombinante Plasmid nur ein kleines Fragment des zu inaktivierenden Gens, das mittels PCR amplifiziert und in den temperatursensitiven Vektor kloniert werden kann. Für die homologe Rekombination sind allerdings mindestens 100 bp des chromosomalen Bereichs erforderlich. Je größer dieser Bereich ist, desto wahrscheinlicher tritt das Ereignis der homologen Rekombination ein, jedoch sollte dieser Bereich nicht größer als ein Drittel der Gesamtlänge des zu unterbrechenden Gens betragen und die Insertion nahe seines 5'-Endes stattfinden, damit das entsprechende Gen inaktiviert vorliegen kann.

Dagegen erfordert die Konstruktion der Deletionsmutanten das Vorhandensein zweier homologer Genfragmente im rekombinanten Plasmid, die im Bakterienchromosom das zu deletierende Gen flankieren (Abb.4). Bei einer erfolgreichen Deletion findet zunächst bei nicht-permissiver Temperatur die Integration des Vektors ins Genom über das eine homologe Fragment und bei anschließender Erniedrigung der Temperatur seine Excision über das andere homologe Fragment und somit die Mitnahme des zu deletierenden Gens statt.

Konstruktion von Deletionsplasmiden

Bei der Herstellung eines Deletionsplasmides werden zunächst die beiden direkt *upstream* und *downstream* der zu deletierenden Gensequenz gelegenen homologen Bereiche (Fragmente AB und CD) in den temperatursensitiven Vektor pLSV101 (Anhang S.151) kloniert. Die Fragmente werden dabei so gewählt, dass sie eine ungefähre Länge von 600 bp besitzen und das Leseraster des zu

deletierenden Gens nach der Deletion beibehalten, so dass die Translation *downstream* der Deletion gelegener Gene nicht beeinflusst wird.

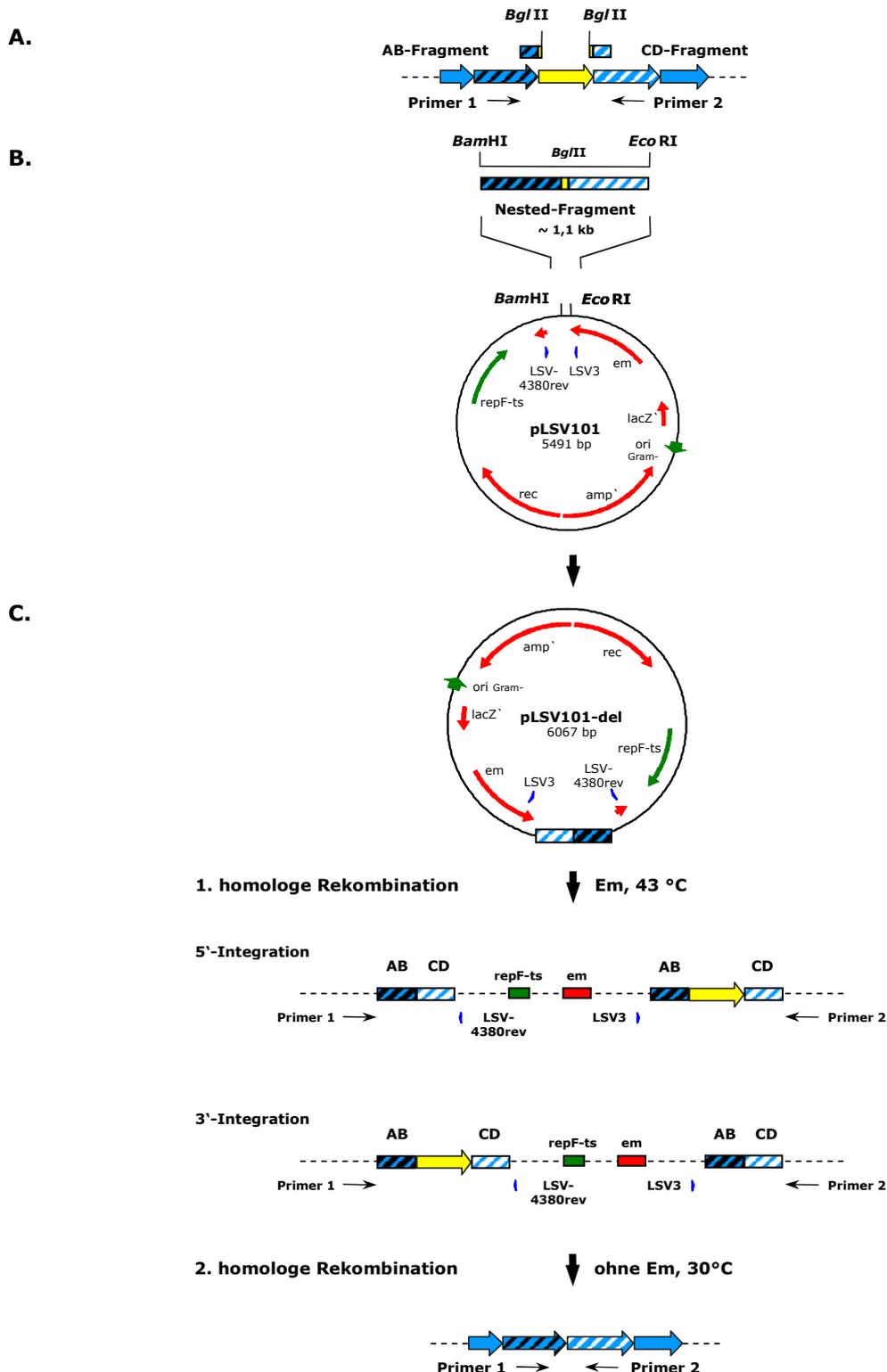


Abb.4: Allgemeine Darstellung der Deletionsmutagenese bei *L. monocytogenes*. **A.** Amplifikation homologer Genbereiche (AB- und CD-Fragmente), die jeweils flankierend im 5'- bzw. 3'-Bereich des zu deletierenden Gens liegen. **B.** Ligation der homologen AB- und CD-Fragmente über die eingefügte *Bgl*II-Schnittstelle, Amplifikation des Nested-Fragments und seine Klonierung über die eingefügte *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstellen in den temperatursensitiven Shuttlevektor pLSV101. **C.** Integration des Deletionsplasmids über homologe Rekombination ins *L. monocytogenes*-Chromosom bei nicht-permissiver Temperatur von 43°C und seine Excision bei permissiven 30°C unter Mitnahme des zu deletierenden Gens.

Die Herstellung der beiden Fragmente AB und CD erfolgt durch PCR mit chromosomaler DNA des Ausgangsstammes als Template. An die entsprechenden Primer werden zusätzlich an beiden Enden Restriktionsschnittstellen angefügt, durch die später die Insertion in den Vektor erfolgt. Insgesamt werden sechs verschiedene Primer für die Herstellung einer Deletionsmutante benötigt, die bei entsprechender Konstruktion miteinander kombiniert werden können. Die Primer A und B für die Generierung von Fragment AB sind so zu situieren, dass ein ca. 600 bp großes Produkt entsteht, das an seinem 3'-Ende das Startcodon und 18 weitere *downstream* Basenpaare des zu deletierenden Gens kodiert. Das ebenfalls ca. 600 bp große Fragment CD kodiert den *downstream* Bereich des Zielgens, wobei der 5'-Bereich vom Fragment CD das Stopcodon und 36 bp *upstream* des Stopcodons umfasst. Zusätzlich wird bei den Primern B und C in ihren 5'-Termini jeweils im nicht-homologen, „überhängenden“ Bereich die gleiche Schnittstelle (*Bg/II*) eingeführt, während die Primer NestedAB und NestedCD eine zweite (*Bam*HI) und dritte (*Eco*RI), von B und C „diverse“ Restriktionsschnittstelle im Überhang enthalten. Beim Design dieser Primer ist es wichtig zu berücksichtigen, dass Sequenzen im 5'-Überhang der Primer NestedAB und NestedCD letztlich in der Deletionsmutante inseriert bleiben und daher *in-frame* sein müssen. Die Primer A und D enthalten keine Schnittstellen und keine nicht-homologe Bereiche. Zudem ist bei der Konstruktion der Primer allgemein zu beachten, dass die Primer A und D sowie NestedAB als auch NestedCD eine ähnliche Annealingtemperatur haben sollen, wodurch sie zur Überprüfung der chromosomalen Deletion als auch für die Sequenzierung der Deletionsmutante eingesetzt werden können. Die Fragmente AB und CD werden vor der Insertion in den pLSV101-Vektor mit dem *Bg/II*-Enzym geschnitten, miteinander ligiert und das entstandene ABCD-Fragment als Template für die anschließende Nested-PCR eingesetzt. Nach der Restriktion mit den Enzymen *Bam*HI und *Eco*RI kann das NestedABCD-Fragment als Gesamtfragment in den Vektor integriert werden. Das Deletionsplasmid mit den klonierten Fragmente AB und CD wird in einem Gram-negativen Zwischenwirt, z.B. *E. coli* DH5 α , konstruiert und anschließend sequenziert oder das Restriktionsmuster erstellt und mit dem ermittelten verglichen.

Konstruktion von Deletionsmutanten

- Deletionsplasmid in *L. monocytogenes* über Elektroporation transformieren
- transformierte Zellen auf Selektionsplatten (BHI/Em5) ausplattieren und bei 30°C für 1-3 Tage inkubieren
- erhaltene Klone auf das Vorhandensein des Deletionsplasmids mittels PCR überprüfen, unter Verwendung von Vektor-spezifischen Primern LSV3 und LSV4380rev
- eine Einzelkolonie von einer positiven Transformante in 1 ml BHI resuspendieren
- 20-50 μ l auf BHI/Em5-Platte ausplattieren und bei 43°C für 1-2 Tage inkubieren
- Integration des Deletionsplasmids ins bakterielle Chromosom mittels PCR überprüfen, unter Verwendung von Vektor-spezifischen Primern (LSV3 bzw. LSV4380rev) und Oligonukleotiden, die flankierend des klonierten Bereiches liegen (Primer A bzw. D)
- Subkultivierung der positiven Klone in BHI ohne Antibiotikum bei 30°C: morgens 6 ml mit 60 μ l ü/N-Kultur und abends 10 ml mit 10 μ l Tagkultur animpfen
- nach jeder fünften Subkultivierung auf den Verlust der Erythromycinresistenz durch Ausplattieren auf BHI-Platten mit Em5 und ohne überprüfen
- Em-sensitive Klone auf Deletion des Gens mittels PCR unter Verwendung der Primer A und D überprüfen, denn eine zweite homologe Rekombination führt entweder zur Herstellung des wildtypischen Genlokus oder zur Entfernung des zu deletierenden chromosomalen Bereichs
- Sequenzierung der Deletionsmutante

2.7.2 Konstruktion von Expressionsplasmiden

Für die Konstruktion der Expressionsplasmide wurde in dieser Arbeit der Vektor pDG148-Stu (Anhang S.151) verwendet, der eine konditionale Expression des klonierten Gens mittels IPTG erlaubt und aufgrund der vor dem Startcodon des klonierten Gens vorhandenen Ribosomenbindungsstelle eine hohe Translationseffizienz aufweist. Die Konstruktion der Expressionsplasmide basiert auf der ligationunabhängigen Klonierung (*ligation independent cloning*, LIC) und ist in Abbildung 5 dargestellt [Joseph *et al.*, 2001].

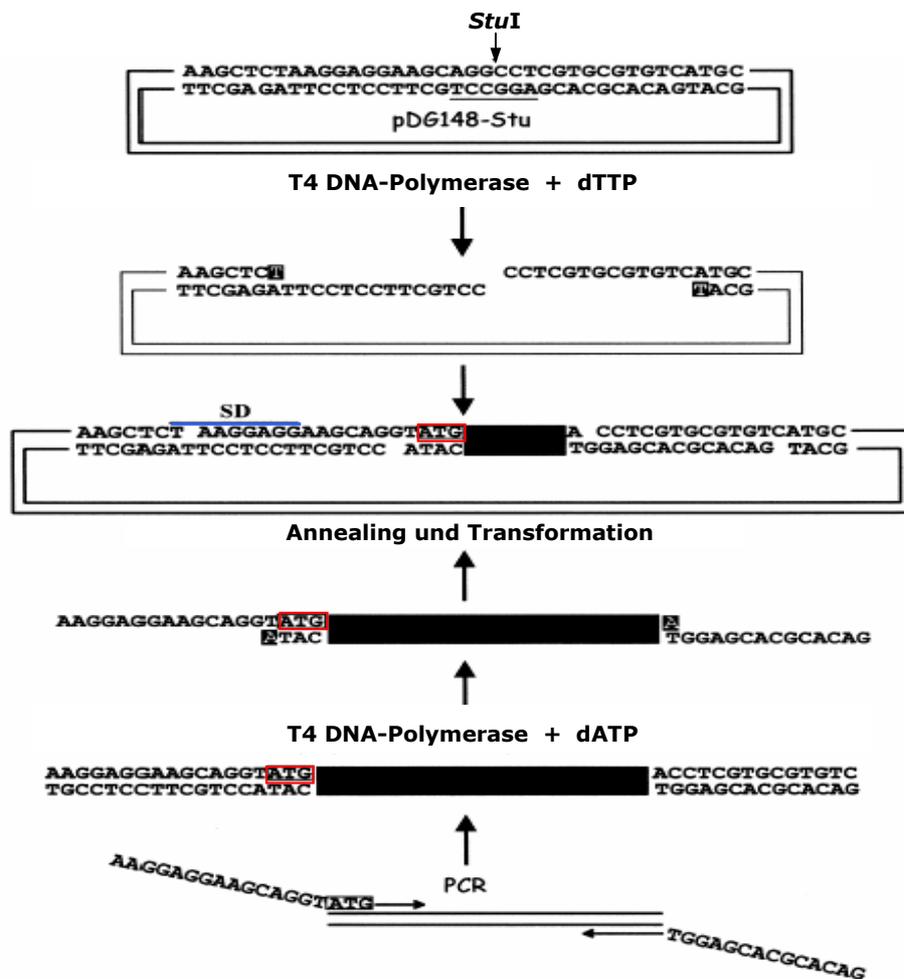


Abb.5: Ligationunabhängige Klonierung (*ligation independent cloning*, LIC) von Genen in den pDG148-Stu-Vektor [Joseph *et al.*, 2001]. SD, Shine-Dalgarno-Sequenz; ATG, Startcodon.

Ligationunabhängige Klonierung

- Konstruktion der Primer für die Amplifikation des zu klonierenden Gens mit den in Abbildung 10 dargestellten Adaptorsequenzen
- Spaltung des pDG148-Stu-Vektors mit *StuI*
- Behandlung mit T4 DNA-Polymerase:

1 u	T4 DNA-Polymerase
4 µl	T4 DNA-Puffer (5x)
0,5 µl	dATP bzw. dTTP (100 mM)
2 µl	DTT (100 mM)
5 µl	Insert bzw. pDG148-Stu (<i>StuI</i>)
ad 50 µl	bidest. H ₂ O (Nukleasen-frei)
- Ansätze für 15 min bei 12°C inkubieren

- Annealing: 2 µl Insert (T4)
1 µl pDG148-Stu (*StuI*/T4)
1 µl EDTA (100 mM)
- 5 min bei 22°C inkubieren oder 30 min bei RT ohne EDTA-Zusatz
- Annealing-Ansatz sofort für Transformation in *E. coli* DH5α verwenden

3. Proteinanalytische Methoden

3.1 Präparation von listeriellen Proteinen

3.1.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Flüssigkultur

- ü/N-Kultur im Verhältnis 1:50 für Wildtypstämme und 1:10 für Integranen in 50 ml BHI-Medium verdünnen
- bei 37°C bis zu einer o.D.₆₀₀ von 1 (WT-Stämme) bzw. 0,8 (Integranen) im Schüttler inkubieren
- 10 ml der Kultur für 10 min bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Pellet in 100 µl bzw. 80 µl 2x Laemmli-Puffer aufnehmen
- Zellsuspension für 20 min bei 100°C kochen
- 5 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugieren, Überstand abnehmen und Pellet verwerfen
- 10-20 µl vom Überstand in SDS-PAGE einsetzen
- Proteinextrakte sofort verwenden oder bei -20°C lagern

3.1.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus mit *L. monocytogenes* infizierten eukaryotischen Zellen

- $3,3 \times 10^6$ Zellen in 25 cm²-Flasche aussäen und 22 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren
- Zellen mit MOI=200 infizieren und für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren
- Zellen 2x mit PBS (Ca²⁺/Mg²⁺) waschen und 6 ml RPMI-Komplettmedium mit 10 µg/ml Gentamicin zugeben
- 14 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubieren
- Zellen 1x mit PBS waschen und mit eiskaltem 0,1%-Triton-X-100 lysieren, alle weiteren Schritte auf Eis durchführen und alle Lösungen vorkühlen
- 10 min bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugieren, Überstand und Rücklauf verwerfen
- Pellet 2x mit PBS waschen, um Triton-X-100-Reste zu entfernen
- Pellet in 100 µl Tris-HCl (pH 8,0) resuspendieren
- 50 mg Zirkonia-Silikatkügelchen in ein Schraubgefäß abwiegen, Zelllysat zugeben
- Zellen in Ribolyser aufschließen: 6x für jeweils 20 s bei 6,5 m/s, zwischen den einzelnen Vorgängen kurz auf Eis inkubieren, um starkes Erwärmen zu vermeiden
- 10-15 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Überstand abnehmen und für SDS-PAGE einsetzen oder bei -20°C lagern
- SDS-PAGE: Überstand mit 2x Laemmli-Puffer im Verhältnis 1:1 mischen und 10 min bei 100°C kochen

3.1.3 Serielle Extraktion von zellwandassoziierten Proteinen

- 300 ml BHI-Medium von der Platte animpfen und ü/N bei 37°C und 180 rpm inkubieren
- 12 min bei 4.000 g und 25°C zentrifugieren
- 50 ml vom Überstand für Isolierung der Überstandsproteine abnehmen und auf Eis lagern

- Pellet mit 5 ml PBS waschen, Überstand verwerfen
- Pellet in 600 µl 1 M Tris-HCl (pH 7,5) resuspendieren und 30 min bei 37°C und 150 rpm inkubieren
- 12 min bei 4.000 g und 25°C zentrifugieren, Überstand abnehmen und bei -20°C lagern
- Pellet mit 5 ml PBS waschen, Überstand verwerfen
- Pellet in 600 µl 1 M KSCN resuspendieren und 30 min bei 37°C und 150 rpm inkubieren
- 12 min bei 4.000 g und 25°C zentrifugieren, Überstand abnehmen und bei -20°C lagern, Pellet verwerfen

3.1.4 Isolierung von Überstandsproteinen

- 50 ml vom Überstand (3.1.3) für 10 min bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- 45 ml vom Überstand abnehmen, Pellet verwerfen
- 5 ml TCA (Endkonz. 10%) zugeben, sofort mehrmals invertieren
- ü/N bei 8°C auf Eis inkubieren, um Überstandsproteine zu fällen
- 30 min bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet mit 5 ml Aceton waschen
- 30 min bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 1 ml Aceton resuspendieren
- 10 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet in 500 µl Laemmli-Puffer (2x) aufnehmen, 10 min bei 100°C kochen
- Proteingemisch für SDS-PAGE einsetzen oder bei -20°C lagern

3.2 Aufreinigung von *Taq* DNA-Polymerase

- 400 ml SB/Amp150-Medium mit 5 ml *E. coli*-ü/N-Kultur mit dem pTAQ-Vektor animpfen
- bei 37°C bis zu einer o.D.₆₀₀ von 0,6 im Schüttler inkubieren
- IPTG zugeben (Endkonz. 0,5 mM)
- 16-19 h bei 37°C im Schüttler weiter inkubieren
- 15 min bei 2.500 rpm und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zellen in 12 ml Puffer A mit 4 mg/ml Lysozym resuspendieren
- 15 min bei RT inkubieren
- 12 ml Puffer B zugeben, invertieren
- 1 h bei 75°C im Schüttelwasserbad inkubieren
- 2x 10 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugieren, Überstand in ein neues Gefäß überführen
- mindestens 20 min bei 20.000 rpm und 15°C zentrifugieren (Ultrazentrifuge)
- DNase zugeben (Endkonz. 1 µg/ml), 1-2 h bei 37°C inkubieren
- RNase A zugeben (Endkonz. 1 µg/ml), 20 min bei 75°C inkubieren
- 10 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugieren
- 1 Volumen Puffer C zugeben, invertieren
- 1 Volumen Puffer D zugeben, gut invertieren und bei -20°C lagern

3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinbestimmungen wurden mit dem Roti-Nanoquant-System (Roth) in Mikrotiterplatten durchgeführt, das auf einer modifizierten Proteinbestimmung nach Bradford beruht. Dieses System ist sensitiver als der ursprüngliche Bradford-Test und zeigt im Bereich von 0,2-20 µg Protein einen linearen Verlauf. Allerdings ist das System anfällig gegenüber Detergenzien, weshalb in solchen Fällen die Messung im NanoDrop-Spektrophotometer durchgeführt wurde.

- Arbeitslösung: 1 Teil Roti-Nanoquant (5x-Konz.) mit 4 Teilen bidest. H₂O mischen
- 50 µl Probe mit 200 µl Arbeitslösung vermischen, Farbreaktion bleibt bei RT ca. 1h stabil
- Messung der Extension bei $\lambda=590$ nm und $\lambda=450$ nm in Microplate Reader
- Referenz: 250 µl bidest. H₂O
- Quotient aus $\lambda_{590}/\lambda_{450}$ bilden und über eine Eichgerade mit BSA die Proteinmenge ermitteln

3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Charakterisierung der Proteine bzw. Proteinextrakte wird die vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet, mit der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Proteinauftrennung findet unter denaturierenden Bedingungen statt. Durch die Bindung von SDS an die hydrophoben Regionen der Proteine entstehen SDS-Protein-Komplexe, dessen negative Ladung proportional zum Molekulargewicht der Proteine ist. Die reduzierende Wirkung von Mercaptoethanol führt zusätzlich dazu, dass alle Disulfidbrückenbindungen aufgelöst werden, wodurch die Proteine unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung und Konformation, der Größe nach im Spannungsfeld aufgetrennt werden. Die Prozentigkeit der Gels wird je nach Größe des nachzuweisenden Proteins gewählt. Als Größenstandard wurde in dieser Arbeit der Längenmarker „PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-170 kDa“ (Fermentas) verwendet.

Trennbereich [kDa]	Gelkonzentration [% (w/v)]
60-200	8
16-75	10
12-45	15

Tab.12: Konzentration der SDS-Gele mit den zugehörigen Trennbereichen.

- polymerisiertes Gel in eine vertikale mit SDS-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer einsetzen, vorhandene Luftblasen und Kamm entfernen, Taschen mit Laufpuffer ausspülen
- Proteinproben mit Laemmli-Puffer (2x) versetzen, 10 min bei 100°C kochen
- Proben und 5 µl Längenmarker auftragen
- Auftrennung: 18 mA pro Gel und 80-100 V für 20 min (Vorlauf)
18 mA pro Gel und 120-150 V bis Bromphenolbande herausläuft (Trennung)
- anschließend die Färbung des Trenngels mit Coomassie oder Immunfärbung

3.5 Coomassiefärbung

- Trenngel 5 min bei RT mit bidest. H₂O waschen, um SDS-Reste zu entfernen
- Trenngel mit Färbelösung bedecken und 1-2 h bei RT auf einem Schüttler inkubieren (alternativ: 1 min bei 700 W in der Mikrowelle und 10 min bei RT auf einem Schüttler)
- Trenngel zweimal 5 min bei RT mit bidest. H₂O waschen
- Trenngel mit Entfärber bedecken und 2-3 h bei RT bzw. ü/N auf einem Schüttler inkubieren (alternativ: 1 min bei 700 W in der Mikrowelle und anschließend nach Sicht)
- das Gel in bidest. H₂O bei RT für 24 h inkubieren, um Hintergrund vollständig zu entfernen

3.6 Western-Blot

- Proteinproben durch SDS-PAGE auftrennen und das Trenngel in Blotpuffer legen
- drei zuvor mit Blotpuffer getränkte Whatmanpapiere auf die als Anode dienende Platte eines Semi-Dry-Blotters luftblasenfrei legen
- auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran für 10 sec in 100%-igem Methanol inkubieren

- PVDF-Membran für 5 min in bidest. H₂O waschen und 10 min im Blotpuffer äquilibrieren
- das Trenngel passend und blasenfrei auf drei Whatmanpapiere platzieren
- PVDF-Membran luftblasenfrei auf das Trenngel legen
- drei weitere mit Blotpuffer getränkte Whatmanpapiere auf die PVDF-Membran legen und Kathodenplatte aufsetzen
- Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran für 1 h bei RT und 0,9 mA/cm² Gelfläche
- PVDF-Membran 1 h bei RT oder ü/N bei 4°C mit Blockingpuffer (TBS-T mit 10% (v/v) FCS) unter Schwenken absättigen
- Membran für Proteindetektion einsetzen oder in Folie eingeschweißt bei -20°C lagern

3.7 Immunologischer Nachweis

- den 1. Antikörper 1:1000 in TBS-T mit 10% (v/v) FCS verdünnen
- Blockingpuffer abgießen, Membran für 1 h bei RT mit dem 1. Antikörper inkubieren
- 1. Antikörper abnehmen und bei 4°C lagern (mehrmals wieder verwendbar)
- Membran zweimal 10 min bei RT mit TBS-T waschen
- Membran einmal 10 min bei RT mit TBS-T/0,5 M NaCl waschen
- den 2. Antikörper 1:15.000 in TBS-T mit 10% (v/v) FCS verdünnen
- Membran 1 h bei RT mit dem 2. Antikörper inkubieren, Lösung abgießen
- 2x 10 min bei RT mit TBS-T waschen
- Membran 2 min in AP-Puffer bei RT äquilibrieren, Lösung abgießen
- Detektionslösung zugeben und im Dunkeln färben, bis die Membran ausreichend gefärbt ist
- Detektionslösung gegen 3%-ige TCA-Lösung (stoppt die Färbereaktion) austauschen
- Membran zwischen Whatmanpapier trocknen und im Dunkeln aufbewahren

4. Allgemeine biochemische Methoden

4.1 Messung der [³H]-Thiamin-Aufnahme

- ü/N-Kultur im LB-Medium 1:50 verdünnen
- bei 37°C bis zu einer o.D.₅₅₀ von 0,5 im Schüttler inkubieren
- IPTG zugeben (Endkonz. 2 mM) und weitere 3 h bei 37°C im Schüttler inkubieren
- 10 min bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet 2x mit kaltem McIlvaine Puffer (pH 5,0) waschen
- Pellet im kalten McIlvaine Puffer resuspendieren und auf die o.D.₅₅₀ von 10 einstellen
- Zellen bis zur Durchführung des Test auf Eis lagern
- 50 µl Zellsuspension zu 450 µl McIlvaine Puffer zugeben
- 2 min bei 37°C und ständigem Rühren erwärmen
- 12,5 µl Glucose (40%) zur Energetisierung zugeben, 1 min bei 37°C inkubieren
- 6,25 µl von Thiaminmischung zugeben und die Messung starten
- Thiaminmischung: [³H]-Thiamin (1:10 verdünnt) mit unmarkiertem Thiamin (10 mM) im Verhältnis 1:10 (v/v) mit einer spezifischen Aktivität von 0,19 Ci/mmol
- GN-6 Pall 0,45 µm-Nitrocellulosefilter mit NaCl-Lösung (0,5 mM) äquilibrieren
- zum Messpunkt 60 µl Probe entnehmen und durch Nitrocellulosefilter durchfiltrieren
- Filter 2x mit 5 ml NaCl-Lösung waschen
- Filter in ein Plastikgefäß überführen und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit versetzen
- Standard für Gesamtmenge an eingesetzter Radioaktivität: 60 µl vom Ansatz unfiltriert
- Menge an Radioaktivität im Szintillationszähler messen
- Filter evt. in der Szintillationsflüssigkeit ü/N bei RT inkubieren, zweite Messung durchführen

4.2 Mutanolysinassay

- ü/N-Kultur in BHI-Medium ansetzen und bei 30°C unter Schütteln inkubieren
- ü/N-Kultur 10 min bei 6.000 rpm zentrifugieren
- Pellet im frischen BHI-Medium aufnehmen, auf die gleiche o.D.₆₀₀ einstellen
- Kultur 1:20 in BHI-Medium verdünnen und 5,5 h bei 30°C unter Schütteln inkubieren
- o.D.₆₀₀ von 1,0 im Gesamtvolumen von 20 ml einstellen
- 10 min bei 6.000 rpm zentrifugieren
- Pellet in Lysis-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, pH 6,8) aufnehmen
- Mutanolysin zugeben (Endkonz. 50 U/ml), bei 30°C inkubieren
- alle 15 min eine Probe entnehmen und Lysegrad bei o.D.₅₅₀ bestimmen

4.3 Colorimetrisches Verfahren zur Bestimmung von verstoffwechselbaren Kohlenstoffquellen

- 20 ml LB-Medium mit ca. 5 Einzelkolonien animpfen, ü/N bei 37°C im Schüttler inkubieren
- 10 min bei 6.000 rpm und RT zentrifugieren, Überstand verwerfen
- Pellet einmal mit 10 ml PBS waschen, Rücklauf entfernen
- Pellet in 1 ml IF-0 aufnehmen, o.D.₅₉₀ bestimmen
- Zellen auf o.D.₅₉₀ von 0,1-0,5 in 11 ml IF-0 verdünnen
- 1 ml AS (*additive solution*) zugeben und invertieren, nicht vortexen
- 100 µl/Well an Zellsuspension in eine 96-Well-Platte vorlegen
- 10 µl/Well Substrat (50 mM) zugeben, Platte 1 min bei 1000 rpm schütteln
- Platte in einer Tüte mit angefeuchteten Papiertüchern bei 37°C für 24 h inkubieren
- Messung der Extension bei $\lambda=600$ nm ohne Filter in Microplate Reader

5. Zellkultur

5.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle eukaryotische Zelllinien wurden im begasten Zellkulturbrutschrank bei 5% CO₂ und 37°C in ihren entsprechenden Medien kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte in der Regel alle 2-3 Tage. Die verwendeten Puffer und Medien wurden stets auf 37°C in einem Wasserbad vorgewärmt.

5.2 Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zellen

Die eukaryotischen Zellen wurden über längeren Zeitraum in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Um Kristallbildung sowie Dehydratation der Zellen zu vermeiden, wurden 10-12% DMSO als Gefrierschutzmittel hinzugefügt.

Einfrieren

- Zellen durch Trypsinieren bzw. mechanisch vom Flaschenboden ablösen
- Zellsuspension abzentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zellpellet in Lösung A resuspendieren (1,5 ml pro 75 cm²-Zellkulturflasche)
- Lösung B (1,5 ml pro 75 cm²-Zellkulturflasche) tropfenweise unter ständigem Schwenken des Greinerröhrchens zugeben
- Zellen à 1,5-1,8 ml in Kryoröhrchen aliquotieren
- ü/N bei -80°C in einer Kryobox lagern, anschließend in flüssigen Stickstoff überführen

Auftauen

- Zellen bei 37°C im Wasserbad auftauen, sofort zu 10 ml Medium mit FCS zugeben
- Zellsuspension abzentrifugieren, Überstand verwerfen
- Zellen in frischem Medium mit FCS resuspendieren und in eine Zellkulturfläche überführen
- Zellen erst nach dem Erreichen der Konfluenz (Monolayer) das erste Mal passagieren

5.3 Subkultivierung von eukaryotischen Zellen

- Medium abnehmen, 2x mit 10 ml PBS waschen
- mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (pro 75 cm²-Kulturflasche) den Monolayer benetzen
- 3-5 min bei 37°C inkubieren, das Ablösen der Zellen makroskopisch und mikroskopisch beobachten (Makrophagen werden durch mechanisches Abkratzen abgelöst)
- 10 ml Kompletmedium zugeben
- Zellen durch Auf- und Abpipettieren resuspendieren und in Greinerröhrchen überführen
- 5 min bei 500 rpm zentrifugieren (700 rpm für HEp-2 und 1000 rpm für J774A.1)
- Zellpellet in frischem Kompletmedium durch Auf- und Abpipettieren gut resuspendieren
- Zellsuspension je nach Zelllinie um den Faktor 2-12 mit Kompletmedium in neuen Zellkulturflaschen verdünnen
- Zellen durch leichtes Schwenken gleichmäßig in der Kulturflasche verteilen
- im Zellkulturbrutschrank bei 5% CO₂ und 37°C inkubieren
- im Verlauf der ersten 4-6 h erfolgt die Adhäsion der Zellen, in dieser Zeit dürfen sie keinen Scherkräften ausgesetzt werden

5.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Differenzierung zwischen den lebenden und toten Zellen wurde in dieser Arbeit der Farbstoff Trypanblau verwendet. Dieser Farbstoff dringt schnell durch die defekte Membran der toten Zellen ins Zellinnere ein und lässt sie dadurch blau erscheinen. Die lebenden Zellen nehmen dagegen Trypanblau nur sehr langsam auf und sind unter dem Mikroskop als helle Zellen sichtbar.

- 50 µl der abgelösten Zellen mit 50 µl 0,1%-iger Trypanblaulösung versetzen
- mind. 4 Großquadrate (à 16 Kleinquadrate) in der Neubauer-Zählkammer auszählen
- arithmetisches Mittel ermitteln und Lebendzellzahl berechnen:

$$\text{Lebendzellzahl/ml} = \text{arithmetisches Mittel} \times \text{Verdünnungsfaktor (2)} \times \text{Kammerfaktor (10.000)}$$

5.5 Beschichten der Zellkulturgefäße mit Gelatine

Viele Zelllinien sind in der Lage, auf unbehandelten Oberflächen zu adhären. Bei einigen von ihnen ist es jedoch nicht bekannt, ob hierdurch wichtige Zellmerkmale verändert werden oder sogar verloren gehen. Aus diesem Grund wurden für die Kultivierung der HBMEC-Zelllinie stets gelatinebeschichteten Kulturflaschen verwendet.

- mit 4 ml einer 0,2%-igen Gelatine den Boden einer 75 cm²-Kulturflasche benetzen
- 3x durch die Bunsenbrennerflame ziehen, überschüssige Gelatine abnehmen
- erneut durch die Bunsenbrennerflame ziehen, bis Newtonsche-Ringe zu sehen sind
- beschichtete Flasche sofort verwenden oder bei 4°C für max. 3 Monate lagern

5.6 Mycoplasmendetektion

- 10^4 Zellen in eine Petrischale aussäen, 48 h im Zellkulturbrutschrank inkubieren
- Medium abnehmen, 2x mit PBS waschen
- Zellen 10 min bei RT mit 5 ml Fixiermittel fixieren
- Fixiermittel abnehmen, Petrischale unter der Sterilbank trocknen lassen
- Farbstofflösung ansetzen: DAPI-Lösung in 5 ml McIlvaine Puffer 1:1000 verdünnen
- Farbstofflösung auf fixierte Zellen geben, 5-10 min bei RT im Dunkeln inkubieren
- Farbstofflösung abnehmen, Zellen 2x mit bidest. H₂O waschen
- Präparat im Fluoreszenzmikroskop bei 100x Vergrößerung mit DAPI-Filter mikroskopieren

Nicht kontaminierte Zellen zeigen einen scharf abgegrenzten, leuchtenden Zellkern. Bei kontaminierten Zellen ist zusätzlich Fluoreszenz im Cytoplasma zu sehen. Eine starke Kontamination mit Mycoplasmen lässt sich außerdem an sichtbaren Konturen des gesamten Zellkörpers feststellen, da sich die Bakterien auf der Zelloberfläche befinden. In dieser Arbeit wurde die Mycoplasmendetektion sowohl mit DAPI-Farbstoff als auch mittels Venor[®]GeM-Mykoplasmen Detektions Kit durchgeführt.

6. Methoden zur Analyse des Pathogenitätsverhaltens von *L. monocytogenes*

6.1 Herstellung von Infektionsaliquots

6.1.1 Ansetzen von Infektionskulturen zum Screening der *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank in Caco-2

- 1 ml BHI/Em5-Medium mit einer Einzelkolonie in einer 24-Well-Platte animpfen
- ü/N bei 43°C und 120 rpm im Mikrotiterplatteschüttler inkubieren
- vor der Infektion 3 min bei 500 rpm schütteln
- 2 µl der ü/N-Kultur zur Infektion einsetzen
- cfu von ü/N-Kultur durch Ausplattieren ermitteln und mit cfu der aus eukaryotischen Zellen isolierten Bakterien verrechnen

6.1.2 Herstellung der Infektionsaliquots von *L. monocytogenes*-Deletionsmutanten

- ü/N-Kultur in frischem BHI-Medium 1:25 verdünnen
- bei 37°C bis zu einer o.D.₅₅₀ von 1,0 im Schüttler inkubieren
- 20 ml der Kultur 10 min bei 6.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Pellet einmal mit kaltem PBS waschen
- Zellen in PBS/Glycerol (Endkonz. 15%) aufnehmen
- Zellen à 1 ml in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotieren und bei -80°C lagern
- am Tag danach cfu der Bakterienaliquots im ersten und letzten Eppendorfgefäß bestimmen

6.2 Gentamicinassay

Die Kolonisationsfähigkeit verschiedener *Listeria*-Stämme in unterschiedlichen eukaryotischen Zelllinien wurde in dieser Arbeit mit Hilfe des Gentamicinassays (*Gentamicin Protection Assays*) analysiert [Jones *et al.*, 1994]. Die Variabilität des Gentamicinassays ermöglicht es, sowohl Invasivität, Adhäsion als auch intrazelluläre Replikation zu untersuchen.

6.2.1 Untersuchung der intrazellulären Replikation von *L. monocytogenes*

- 22-24 h vor der Infektion $2,5 \times 10^5$ Zellen/Well in 1 ml Kompletmedium in einer 24-Well-Platte aussäen
- direkt vor der Infektion die Zellzahl/Well in zwei Wells bestimmen
- Infektionslösung in FCS-freiem Medium mit $\text{MOI}=1$ für J774A.1 bzw. $\text{MOI}=10$ für andere Zelllinien bezogen auf die ermittelte Zellzahl/Well ansetzen
- Zellen 2x mit 500 μl PBS/ $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ waschen
- 500 μl /Well an Infektionslösung zugeben
- 60 min im Zellkulturbrutschrank bei 5% CO_2 und 37°C inkubieren
- Infektionslösung abnehmen, 2x mit 500 μl PBS/ $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ waschen
- 500 μl /Well an Kompletmedium mit Gentamicin (Endkonz. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugeben, um extrazelluläre Bakterien abzutöten (*post infection*)
- 60 min im Zellkulturbrutschrank bei 5% CO_2 und 37°C inkubieren ($t=1\text{h}$)
- Medium abnehmen, 500 μl /Well an Kompletmedium mit Gentamicin (Endkonz. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugeben
- 6 h im Zellkulturbrutschrank bei 5% CO_2 und 37°C inkubieren ($t=7\text{h}$)
- Zellen 2x mit 500 μl PBS/ $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ waschen
- 1 ml/Well an eiskaltem 0,1%-Triton X-100 zugeben
- durch Auf- und Abpipettieren die Zellen lysieren, Lysat in ein Eppendorfgefäß überführen
- Lysat 1 min vortexen, um alle eukaryotische Zellen zu lysieren
- Verdünnungsreihen ansetzen und auf BHI-Platten ausplattieren
- cfu/ml am nächsten Tag ermitteln
- weitere Messwerte zu anderen Zeitenpunkten werden auf die gleiche Weise genommen

Zur Ermittlung der absoluten Vermehrungsrate wird cfu/ml des aus eukaryotischen Zellen isolierten Stammes durch seine cfu/ml in der Infektionslösung geteilt. Die relative Replikationsrate ergibt sich durch Gleichsetzung des Wildtypstammes mit 100% und die relativen Werte aller weiteren Stämme im Bezug zum Wildtyp.

6.2.2 Invasionsassay für *L. monocytogenes* in eukaryotische Zellen

Beim Invasionsassay werden die Zellen nach 60-minütiger Inkubation im Kompletmedium mit Gentamicin (Endkonz. 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), entspricht dem $t=1$ beim Replikationsassay (6.2.1), zwei Mal mit PBS/ $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und mit eiskaltem 0,1%-igen Triton X-100 lysiert. Als Kontrollen für die Ermittlung der Invasionsrate wurden in dieser Arbeit die Stämme *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* EGD ΔinIAB eingesetzt.

6.2.3 Untersuchung der Adhäsion von *L. monocytogenes* an eukaryotischen Zellen

Für die Analyse der frühen Assoziation von *L. monocytogenes* mit eukaryotischen Zellen wird auf die *post infection*-Zeit im Gentamicin-haltigen Kompletmedium verzichtet. Um die Anzahl intrazellulärer Bakterien dabei gering zu halten, wird die Infektionszeit von 60 min auf 35 min verkürzt, so dass sich im Lysat fast ausschließlich adhärenente Bakterien befinden. Nach der verkürzten Infektion werden die Zellen drei Mal mit PBS/ $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und mit eiskaltem 0,1%-igen Triton X-100 lysiert. Die absolute Adhäsionsrate wird anschließend aus der Anzahl adhärenenter bzw. invadierter Bakterien in Prozent zur eingesetzten Bakterienmenge errechnet. Als Kontrollen dienen die Stämme *L. monocytogenes* EGD und *L. monocytogenes* EGD $\Delta\text{inIACGHE}$.

6.3 Analyse der Kolonisationsfähigkeit im Mausmodell

Die Mausinfektionsversuche mit *L. monocytogenes*-Stämmen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Gernot Geginat von der Universität Heidelberg durchgeführt. Die Tiere wurden ausschließlich über eine intravenöse Applikation infiziert.

- Bakterienaliquots: $3,5 \times 10^3$ Listerien in 0,2 ml endotoxinfreiem PBS einstellen
- 6-10 Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse unter Rotlicht anwärmen, um eine stärkere Durchblutung und bessere Darstellung der lateralen Schwanzvene zu erreichen
- Bakterienaliquot langsam mit einer Einmal-Tuberkulinspritze mit aufgesetzter 0,4 mm Einmalkanüle in eine der seitlichen Schwanzvenen des fixierten Tieres injizieren
- nach Infektion Tiere täglich beobachten, um im Falle auftretender Krankheit sofort gemäß dem Tierschutzgesetz handeln zu können
- pro Gruppe mind. drei Mäuse verwenden
- cfu von Listerien in Leber und Milz zu bestimmten Zeitpunkten ermitteln
- Mäuse durch zervikale Dislokation töten und unter aseptischen Bedingungen Leber und Milz entnehmen
- Organe wiegen, in 1 ml kaltem bidest. H₂O homogenisieren
- 1 ml bidest. H₂O zugeben und mit Ultraschall behandeln
- Verdünnungsreihen von Homogenisaten ansetzen und auf BHI-Platten ausplattieren

6.4 Bestimmung des Bakterientiters in den infizierten eukaryotischen Zellen

Zur Berechnung des Titers [cfu/ml Bakterienkultur] werden die Kolonien auf den ausplattierten Verdünnungsstufen gezählt und der gewichtete Mittelwert gebildet. Dabei werden die Anzahlen der Kolonien der einzelnen Verdünnungsstufen addiert und die Summe je nach der Anzahl der Verdünnungsstufen durch 11 bei zwei Verdünnungsstufen, durch 111 bei drei Verdünnungsstufen usw. dividiert. Ist eine Verdünnungsstufe wegen einer starken Kontamination nicht auszählbar, geht sie nicht in den gewichteten Mittelwert ein. Es wird z.B. durch 101 dividiert, wenn die zweite der drei Verdünnungsstufen nicht auszählbar ist. Mehrmals ausplattierte Verdünnungsstufe wird durch ihre Anzahl, z.B. 131, ebenfalls in die Berechnung miteinbezogen. Der auf diese Weise erhaltene Wert wird mit dem Verdünnungsfaktor der höchsten Verdünnungsstufe und mit dem Faktor 10 (es wurde nur 1/10 eines Milliliters ausplattiert) multipliziert. Das Ermitteln eines gewichteten Mittelwertes statt des arithmetischen Mittelwertes hat den Vorteil, dass die niedrigen Verdünnungsstufen zu einem größeren Anteil in den Mittelwert eingehen als die höheren und dadurch den Verdünnungsfehler ausgleichen. Durch diese Berechnung geht die niedrigste Verdünnungsstufe mit 100%, die folgenden nur mit 10%, 1% usw. in den Mittelwert ein.

7. Wachstumsanalysen

7.1 Wachstumsanalyse der *L. monocytogenes*-Stämme

Zur Analyse des Wachstums der *L. monocytogenes*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp wurden 50 ml Flüssigmedium in 200 ml Erlenmeyerkolben aus der ü/N-Kultur beimpft. Die o.D.₅₅₀ der ü/N-Kulturen wurde dabei mit dem Verdünnungsfaktor verrechnet, wodurch die o.D.₅₅₀ zu Beginn der Messung in allen Ansätzen etwa gleich war. Der Verdünnungsfaktor betrug 1000 für das BHI-Medium und 500 bzw. 300 für das Minimalmedium. Die Proben wurden in konstanten Abständen über einen Zeitraum entnommen und die o.D.₅₅₀ gemessen. Die Wachstumsanalyse der *L. monocytogenes*-Stämme erfolgte in einem Schüttler bei 37-43°C und 240 rpm.

7.2 Wachstumsanalyse unter Stressbedingungen

Zur Analyse des Wachstums von Bakterienstämmen unter verschiedenen Stressbedingungen wurden die ü/N-Kulturen zunächst auf die gleiche o.D.₅₅₀ eingestellt und eine 10⁻⁵-Verdünnungsstufe angesetzt. Bei Wachstumsanalysen in Anwesenheit verschiedener Antibiotika unterschiedlicher Konzentrationen wurden 100 µl dieser Verdünnungsstufe auf MH-Agarplatten ausplattiert und ein mit Antibiotikum getränkter Filter in die Mitte der Platte platziert. Nach 24-48 h der Inkubation bei 37°C wurde der Hemmhof gemessen. Die Salztoleranz der *L. monocytogenes*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp wurde durch Zusatz von 3% NaCl zum BHI-Festmedium und anschließende Inkubation bei 37°C untersucht. Das Wachstum bei niedriger Temperatur von 8°C wurde ebenfalls auf dem BHI-Festmedium über einen Zeitraum von vier Wochen analysiert.

7.3 Titerbestimmung von Bakterien in Flüssigkultur

Die Anzahl der Bakterien in Flüssigkulturen kann durch eine photometrische Messung der optischen Dichte (o.D.) bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt werden. Als Referenz dient das sterile Medium, in dem die Bakterien angezogen wurden. Bis zu einer o.D.₆₀₀ < 1,0 entspricht eine o.D.₆₀₀ von 0,1 bei *E. coli* einem Titer von 2x10⁷ Zellen/ml und bei *L. monocytogenes* einem Titer von 1x10⁷ Zellen/ml.

8. Statistik

Die in den einzelnen Versuchen ermittelten absoluten Werte unterliegen trotz identischen Versuchsbedingungen zum Teil starken Schwankungen. Um Ergebnisse aus verschiedenen Versuchen miteinander vergleichen zu können, müssen daher auch kleine Abweichungen in die Auswertung der Daten miteinbezogen werden. Beim Zusammenfassen mehrerer Experimente zu einer gemeinsamen Darstellung, werden aus diesem Grund stets absolute, prozentuale Werte zur Referenz genommen. Alle in dieser Arbeit ausgeführten Versuche wurden mindestens dreimal im Dreifachansatz durchgeführt und für deren statistischen Auswertungen die Programme Excel und WINKS 4.70 verwendet. Die letzteren verhelfen zur Aufstellung der richtigen und nicht willkürlichen Behauptung, ob ein signifikanter Unterschied zwischen zwei Versuchsgruppen vorliegt, falls sich die Differenz zwischen den Mittelwerten dieser Versuchsgruppen um ein vielfaches der Standardabweichung unterscheidet, oder die beiden Versuchsgruppen identisch sind, wenn der Unterschied der Mittelwerte weniger als eine Standardabweichung beträgt. Eine Angabe über die Konsistenz zweier Mittelwerte gibt z.B. der t-Test. Zudem erlaubt er eine Aussage, ob eine Messung mit der früheren Messung folgerichtig ist und somit die einzelnen Versuchsparameter über die Zeit unverändert konstant geblieben sind. Bei mehr als zwei Versuchsgruppen erweist sich der t-Test jedoch als sehr aufwendig, wodurch sich auch die Wahrscheinlichkeit, zur falschen Signifikanz zu gelangen, erhöht. An dieser Stelle setzen die multiplen Mittelwertvergleiche an, die ein korrektes vielfaches Testen ermöglichen und Fehlentscheidungen minimieren. Der all-pair-Vergleich nach Tukey stellt so einen multiplen Mittelwertvergleich dar, bei dem alle Versuchsgruppen gegeneinander auf die mögliche Signifikanz getestet werden. Diesem Verfahren liegen eine spezielle Teststatistik und eine andere Wahrscheinlichkeitsverteilung als dem t-Test zugrunde, weshalb bei dem all-pair-Vergleich nach Tukey die Normalverteilung der Daten verletzt werden darf. Nur bei sehr schiefen Verteilungen und kleinen Gruppengrößen ist der Test nicht mehr anwendbar.

D. Ergebnisse

1. Identifizierung Virulenz-assoziiierter Gene in *L. monocytogenes*

Um Virulenz-assoziierte Gene zu identifizieren, die für die intrazelluläre Lebensphase von *L. monocytogenes* von entscheidender Bedeutung sind, wurde ein Mutagenese- und Screeningverfahren etabliert, das es ermöglicht, zufällige Mutanten von *L. monocytogenes* zu generieren und diese in einem Zellkultursystem entsprechend dem natürlichen Infektionsverlauf auf Defizienz in der Adhäsion, Invasion und intrazellulären Replikation in der nicht professionell phagozytischen Epithelzelllinie Caco-2 zu untersuchen.

Die Konstruktion der *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank basierte auf der Insertionsduplikationsmutagenese (IDM), einem auf homologer Rekombination und Vektorinsertion beruhenden Verfahren. Hierfür wurde zunächst die chromosomale DNA vom *L. monocytogenes* PKP1 Stamm, dem das Virulenzgencluster *plcA/hly/mpl/actA/plcB* fehlt, durch Ultraschall gesichert und mit *MboI* hydrolysiert. DNA-Fragmente mit Längen von 300-700 bps wurden anschließend über die *MboI* kompatible *BamHI*-Schnittstelle in den temperatursensitiven Vektor pLSV101 kloniert. Die in dem Klonierungszwischenwirt (*E. coli*) generierten Transformanten wurden dann gepoolt und aus ihnen die Plasmid-Pool-DNA präpariert, welche im Anschluss in *L. monocytogenes* EGD transformiert wurde. Die Selektion der *Listeria*-Klone mit einem *in trans* liegenden Vektor fand auf BHI-Platten mit 5 µg/ml Erythromycin bei 30°C statt. Auf diese Weise erhaltene *Listeria*-Klone wurden daraufhin bei nicht-permissiven 42°C angezogen, wodurch insgesamt 1491 vitale *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutanten generiert werden konnten. Diese repräsentieren nach der von Lee *et al.* aufgestellten Formel 28,92% des gesamten *Listeria*-Genoms, welches 2853 Gene umfasst [Glaser *et al.*, 2001].

1.1 Screening der *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank

Vor Beginn dieser Arbeit wurden bereits 720 dieser Insertionsmutanten im Zellkultursystem untersucht, von denen 90 starke Defekte in der intrazellulären Replikation in Caco-2 Zellen aufwiesen, jedoch nur 69 singuläre Genloci repräsentierten [Joseph *et al.*, 2006]. Die übrigen 771 Insertionsmutanten wurden auf ihre intrazelluläre Replikation in Caco-2 Zellen in der vorliegenden Arbeit untersucht. Um die Reproduzierbarkeit des bereits optimierten Screeningverfahrens in Form eines Gentamicinassays (*gentamicin protection assays*) zu gewährleisten, wurden zunächst in Vorversuchen 20 bereits charakterisierte *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutanten erneut untersucht. Dafür wurden $2,5 \times 10^5$ Caco-2 Zellen/Well in eine 24-Well-Platte 22-24 Stunden vor der Infektion ausgesät. Die Zellzahl direkt vor der Infektion lag bei $2,3-2,8 \times 10^5$ Zellen/Well. Aufgrund der hohen Anzahl der zu untersuchenden Insertionsmutanten konnte in einem Einzelklon-Screening nicht für jede Mutante einzeln die *multiplicity of infection* (MOI) in Form von Infektionsaliquots (Glycerolstocks) definierter Zellzahl exakt eingestellt werden, weshalb in Vorversuchen

getestet wurde, wie viele μl einer Übernachtskultur einzusetzen sind, um eine MOI von 10, d.h. 10 Bakterienzellen auf jeweils eine Epithelzelle, zu erreichen. Die Inokulation von 2 μl ü/N-Kultur in 500 μl RPMI 1640-Medium und die anschließende Infektion damit von einem Well ergab reproduzierbar eine MOI von ca. 6-12. Zur Kontrolle wurde jedoch weiterhin in jeder Infektionsrunde die Bakterienzahl in den Infektionsansätzen bestimmt. Zusätzlich wurde vor Infektionsbeginn die Zahl der Caco-2 Zellen pro Well für zwei der 24 Wells ermittelt, um die aus Caco-2 Zellen isolierte Bakterienzahl mit der tatsächlichen MOI der jeweiligen Infektionsrunde verrechnen zu können. Die Bakterienstämme mit einer starken Abweichung der tatsächlichen MOI von der MOI=10 wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen, sondern im nächsten Infektionsversuch wiederholt. Jeder Stamm wurde in zweifachem Ansatz in jedem Infektionsversuch mitgeführt, *L. monocytogenes* EGD diente als Kontrollstamm.

Zur Selektion von Insertionsmutanten mit eingeschränkter Vermehrung in Caco-2 Zellen wurde als Kriterium festgelegt, dass die Replikation einer Mutante in mindestens zwei unabhängigen Infektionsversuchen mindestens vierfach im Vergleich zum Wildtyp vermindert sein muss. Um die Anwesenheit und den möglichen Einfluss des pLSV101-Vektors in den Insertionsmutanten zu berücksichtigen, wurde eine weitere Kontrollgruppe aus den nicht attenuierten Insertionsmutanten gebildet. Demzufolge wurde eine Insertionsmutante erst dann als attenuiert angesehen und weiter charakterisiert, wenn auch bei dem Vergleich mit dieser Kontrollgruppe eine um den Faktor vier verminderte Replikation vorlag. Auf diese Weise konnten aus den 771 *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutanten weitere 173 Mutanten selektioniert werden, die eine Attenuation in der intrazellulären Überlebensfähigkeit in der Darmepithelzelllinie Caco-2 zeigten. Insgesamt lieferte die aus 1491 vitalen Mutanten bestehende *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank 263 weiter zu charakterisierende Insertionsmutanten, die nachfolgend alle zusammen betrachtet werden.

1.2 Identifizierung und Charakterisierung attenuierter Insertionsmutanten

Parallel zum Screening der *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank im Zellkultursystem wurden alle als attenuiert eingestuft Insertionsmutanten *in vitro* auf ihr Wachstum in Vollmedium (BHI/Em5) bei 42°C untersucht, um dadurch ausschließen zu können, dass die potentiell attenuierten Mutanten aufgrund eines allgemeinen Wachstumsdefekts als replikationsdefizient aufgefasst werden. Die Messungen wurden mit dem Bioscreen C-Gerät über einen Zeitraum von 24 Stunden durchgeführt. Die Daten zum Wachstumsverhalten der 263 im Zellkultursystem selektionierten Insertionsmutanten stammen aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen. In Abbildung 6 ist exemplarisch das Ergebnis einer dieser Messungen dargestellt. Als Kontrolle diente der *Listeria*-Wildtypstamm *L. monocytogenes* EGD. *L. monocytogenes* EGD mit einem *in trans* liegenden pLSV101-Vektor konnte als weitere wildtypisch wachsende und gleichzeitig erythromycinresistente Kontrolle nicht mitgeführt werden, da der Vektor aufgrund des temperatursensitiven Origins in Gram-positiven Bakterien nur bei permissiver Temperatur von 30°C, nicht aber bei 37-43°C replizieren kann, wodurch die Vektor-Insertion in den Mutantenstämmen nur bei 37-43°C stabil erhalten bleibt.

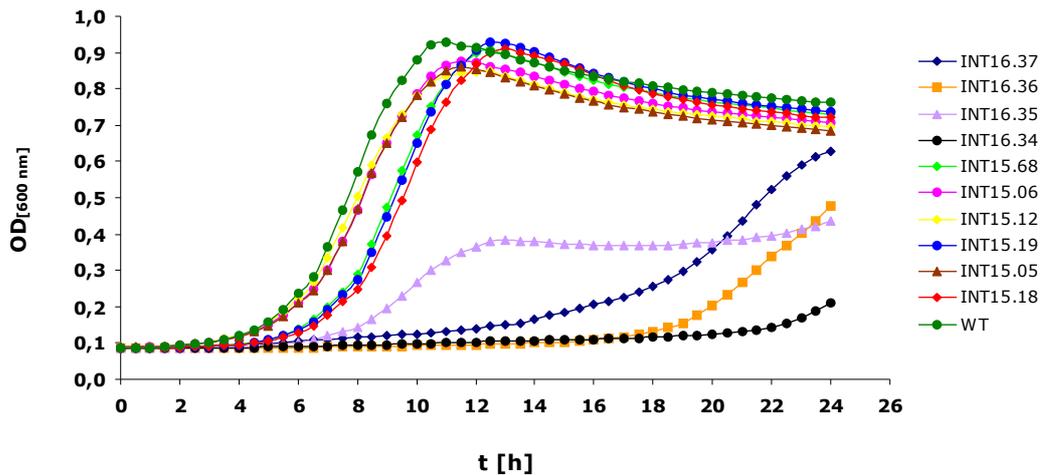


Abb.6: Wachstum ausgewählter *Listeria*-Insertionsmutanten (INT) in BHI-Flüssigkultur mit Em5 ($\mu\text{g/ml}$). Als Kontrolle diente der *Listeria*-Wildtypstamm (WT), der ohne Zusatz von Erythromycin inkubiert wurde.

Die Wachstumsmessungen der *Listeria*-Insertionsmutanten im Vollmedium zeigten, wie exemplarisch in Abbildung 6 dargestellt, dass die meisten der Insertionsmutanten reproduzierbar wie der Wildtyp wuchsen, lediglich 10 Insertionsmutanten wiesen ein stark verzögertes bzw. ein verkürztes logarithmisches Wachstum auf. Diese wurden keinen weiteren Charakterisierungen unterzogen.

Von den auf diese Weise selektierten 253 Insertionsmutanten wurde darauf folgend durch Ansequenzierung der in den pLSV10-Vektor klonierten, homologen Fragmente und den Abgleich der erhaltenen Sequenz gegen die annotierte *L. monocytogenes* EGDe Genomsequenz des Instituts Pasteur (<http://www.genolist.pasteur.fr/ListiList/>) sowie mit bekannten Genen und Proteinen aus anderen Datenbanken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> und <http://www.sanger.ac.uk>) der chromosomale Insertionsloкус bestimmt. Dafür wurden die Mutantenstämme auf BHI/Em5-Platten ausgestrichen und bei 30°C inkubiert, um die Excision des rekombinanten Vektors zu erzielen. Mittels Kolonie-PCR und unter Verwendung der Vektor-spezifischen Primer LSV3 und LSV4380rev konnten dann die klonierten Fragmente amplifiziert werden. Die PCR-Produkte wurden aufgereinigt und mit dem Primer LSV4380rev von der Firma BioLux (Stuttgart) bzw. MWG (Ebersberg) sequenziert.

Die anschließende Analyse der insgesamt 253 Sequenzen ergab, dass 28 Gene zweimal, 19 dreimal, 7 viermal sowie ein Gen fünfmal durch eine Insertion getroffen wurden. Dabei traten sowohl absolut identische Insertionen als auch multiple Insertionen in einem Gen bzw. einer chromosomalen Region auf, die sich nur durch die Insertionsstelle unterschieden. Diese redundanten Sequenzen, insgesamt 91 Stück, wurden bei der weiteren Charakterisierung der im Zellkultursystem selektierten Insertionsmutanten nicht mehr berücksichtigt. Folglich konnten insgesamt 160 individuelle Genloci identifiziert werden.

Nach der Identifizierung der Genloci wurden die Insertionsmutanten den vom Institut Pasteur vorgegebenen funktionellen Genklassen zugeordnet (Abb.7), wodurch sowohl ein Gesamtbild des ganzen Screenings in Caco-2 Zellen entstand als auch die prägnanten Tendenzen für Gengruppen, die für intrazelluläre Replikation benötigt werden, zu erkennen waren.

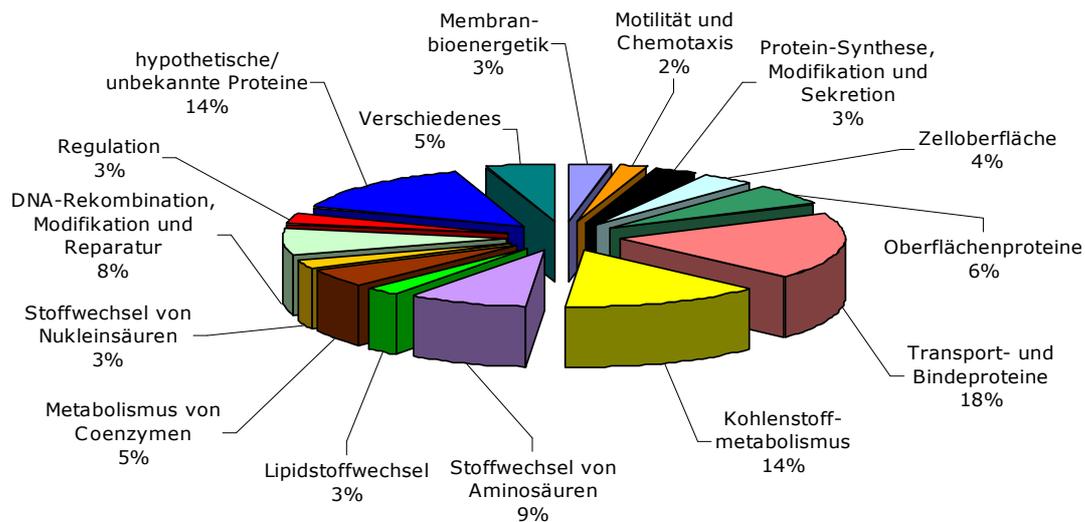


Abb.7: Funktionelle Klassifizierung der 160 in Caco-2 Zellen replikationsverminderten *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutanten.

Somit ergab die Klassifizierung der *Listeria*-Insertionsmutanten bezüglich ihrer Genfunktion, dass der größte Teil der im Zellkultursystem als attenuiert identifizierten Mutanten den Klassen „Transport- und Bindeproteine“, „Kohlenstoffmetabolismus“ sowie „Stoffwechsel von Aminosäuren“ zuzuordnen war, was nahe liegt, weil intrazelluläres Überleben als auch eine erfolgreiche Vermehrung im Cytosol vom Stofftransport und den stoffwechselassoziierten Genen abhängt. Auch die Gruppe der „unbekannten Proteine“ ist mit 14% stark vertreten. Die übrigen Klassen sind im Vergleich zu den bereits erwähnten weniger stark repräsentiert, weshalb hier eine Aussage nur eingeschränkt möglich ist. Dennoch lassen sich auch diese Gengruppen nicht vernachlässigen, wie weitere Analysen hinsichtlich des Attenuationsgrades zeigten. Es konnte nämlich festgestellt werden, dass die Insertionsmutanten in Genen der Klassen „Stoffwechsel von Nukleinsäuren“ und „Metabolismus von Coenzymen“ eine vergleichsweise stärkere Attenuation in Caco-2 Zellen aufwiesen als andere Insertionsmutanten (Tabelle 16, Anhang S.143).

Die Vielfalt der nach der Klassifizierung der Insertionsmutanten erhaltenen funktionellen Gruppen lässt außerdem erkennen, dass die durch IDM Mutagenese konstruierte *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank eine sehr hohe Diversität aufweist. Die in Abbildung 8 dargestellte zirkuläre Genomkarte zeigt dazu die Verteilung der Insertionen im *Listeria*-Genom, die über das gesamte Genom recht gleichmässig verteilt sind und keine so genannte *hot spots*, Akkumulationen unabhängiger Insertionen in einem Gen, verzeichnen lassen. Zwei Auffälligkeiten konnten dennoch festgestellt werden. Zum einem war eine Ansammlung von Insertionen im Bereich von 613.836 bp - 636.423 bp vorzufinden. Die Insertionen in diesem Bereich ließen sich fast ausnahmslos zu der Klasse „Oberflächenproteine“ zuordnen. Zum anderen war die Region von 2.054.493 bp - 2.059.511 bp (*ilv*-Operon) mit drei unterschiedlichen Insertionen mehr als andere Bereiche getroffen, die Gene enthält, deren Produkte im Zusammenhang mit dem Aminosäurestoffwechsel stehen.

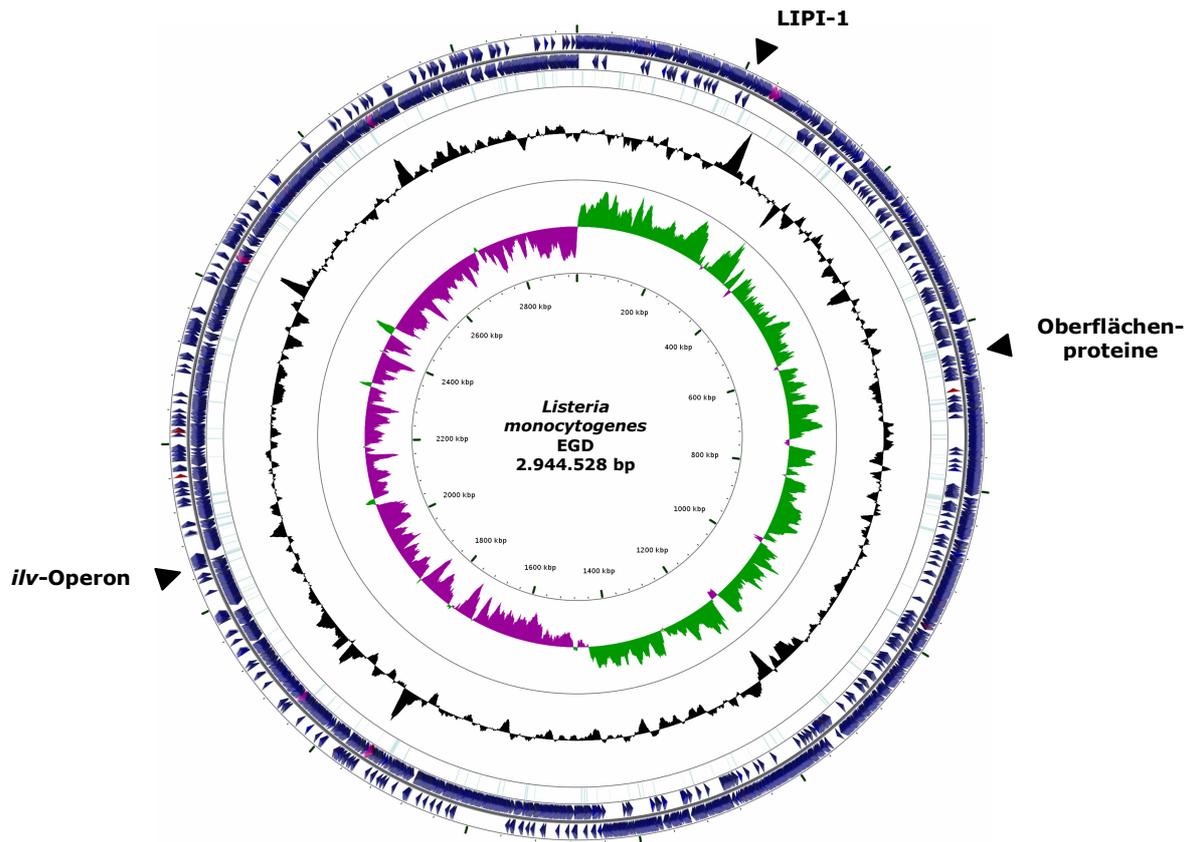


Abb.8: Zirkuläre Genomkarte von *L. monocytogenes* EGD mit genomischer Verteilung der identifizierten Insertionen. Die beiden äußeren Ringe zeigen die Protein-kodierenden Gene (*CDS*) für beide Ableserichtungen, rRNA- und tRNA-Gene sind in Magenta hervorgehoben. Im dritten Ring von außen sind alle Positionen der Insertionsmutanten mit einer verminderten intrazellulären Replikation in Caco-2 Zellen visualisiert. Die beiden inneren Kreise stellen den GC-Gehalt und GC skew+ (grün) bzw. GC skew- (magenta) dar. Die Genomkarte wurde mittels des CGView Server (http://stothard.afns.ualberta.ca/cgview_server/) erstellt [Grant & Stothard, 2008].

Als fakultativ intrazelluläres Pathogen muss *L. monocytogenes* in der Lage sein, in verschiedene eukaryontische Zellen eindringen zu können, bevor sich das Bakterium im Cytosol seiner Wirtszelle vermehren kann. Auch an diesen Prozessen beteiligte Genprodukte tragen zu einer effizienten intrazellulären Replikation bei. Um bei den im Zellkultursystem als attenuiert identifizierten Insertionsmutanten differenzieren zu können, ob der beobachtete Effekt tatsächlich auf den Replikationsdefekten beruht und nicht aus dem veränderten Adhäsions- oder Invasionsverhalten resultiert, wurden die Insertionsmutanten auf ihre Fähigkeit, an Caco-2 Zellen zu adhären und in diese zu invadieren, untersucht. Hierfür wurde die Infektionszeit im Gentamicinassay von 60 min auf 35 min verkürzt, um bei der anschließenden Lyse der Caco-2 Zellen ausschließlich adhärenierte Listerien zu erhalten. Bei der Überprüfung der Invasionsfähigkeit wurde dagegen die Infektionszeit von 60 min beibehalten und die infizierten Caco-2 Zellen eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Neben dem *Listeria*-Wildtyp dienten die Stämme *L. monocytogenes* EGD Δ *inIACGHE* bzw. *L. monocytogenes* EGD Δ *inIAB* als weitere Kontrollen, denen die für die Adhäsion bzw. die Invasion notwendigen Virulenzfaktoren fehlen. Dabei stellte sich heraus, dass aus den 160 selektionierten Insertionsmutanten bei sieben Mutanten Defekte in der Adhäsion und bei fünf in der Invasion

vorliegen. Darunter befindet sich u.a. das bekannte *inlA*-Gen, das für den Virulenzfaktor Internalin A kodiert und in spezifische Interaktion mit E-Cadherin der Epithelzellen involviert ist. Die erzielten Daten zur Adhäsion, Invasion, intrazellulären Replikation für alle in diesem Screening identifizierten Gene sind, soweit möglich unter Angabe der vorhergesagten oder experimentell bestätigten Proteinfunktion, ihrer Anordnung in einer Operonstruktur im Bezug auf einen möglichen polaren Effekt, ihrer Regulation über die PrfA-Box und einer *L. monocytogenes* EGD Stammspezifität, in der Tabelle 16 im Anhang aufgelistet.

1.3 Vergleich von Screeningdaten mit Mikroarrayanalysen

Die Vielzahl der heute vorhandenen unterschiedlichen Methoden, die zur Untersuchung von Fragestellungen zur Verfügung stehen, ermöglicht es schneller zum Gesamtbild eines Vorgangs zu gelangen, weil die einzelnen Methoden sowohl ähnliche als auch unterschiedliche, vor allem aber, ergänzende Informationen erbringen. Auch für *L. monocytogenes* liegen bereits viele verschiedene Befunde vor. Aufschluss über die dynamischen Prozesse innerhalb der Zelle in Abhängigkeit von verschiedenen Umwelteinflüssen werden z.B. aus Transkriptomanalysen gewonnen. Unter den zahlreichen für *L. monocytogenes* erstellten Genexpressionsprofilen sind unter anderem auch bereits intrazellulären Expressionsprofile aus den Zelllinien Caco-2 und J774A.1 zu finden [Joseph *et al.*, 2006; Chatterjee *et al.*, 2006]. Der Vergleich dieser Daten mit denen aus dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Caco-2 Screening ergab, dass von den 160 identifizierten Genen 27 in Caco-2, nur 19 in J774A.1 und 9 Gene in beiden Zelllinien hochreguliert waren. Besonders auffällig ist in erster Linie die Tatsache, dass die meisten der hochregulierten Gene auch den drei prozentual größten funktionellen Klassen „Transport- und Bindeproteine“, „Kohlenstoffmetabolismus“ und „Stoffwechsel von Aminosäuren“ angehören. Darüber hinaus ist die Übereinstimmung der Daten in 27 Genen für die Caco-2 Zelllinie aus beiden Methoden als enorm hoch und statistisch signifikant anzusehen. Die Überprüfung der statistischen Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests (*Chi-square test*) nach Pearson (<http://graphpad.com/quickcalcs/index.cfm>). Der dabei ermittelte beidseitige p-Wert (*P value*) liegt bei 0,004 und ist somit kleiner als das vorab festgesetzte Signifikanzniveau $\alpha=0,01$. Demzufolge gilt das Ergebnis der Übereinstimmung in 27 Genen als statistisch signifikant. Die intrazellulären Expressionsdaten zu den beiden Zelllinien sind in der Tabelle 16 im Anhang zusammengestellt.

1.4 Validierung der *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank

Die Insertionsmutagenese stellt eine Technik dar, mit der sich schnell zielgerichtete Mutationen einführen lassen. Allerdings kann der Phänotyp der auf diese Weise konstruierten Insertionsmutante sowohl eine Folge der Mutation als auch eines polaren Effektes auf stromabwärts gelegene Gene sein. Um polare Effekte auszuschließen, wurde zunächst die chromosomale Insertionsstelle jeder Insertionsmutante bioinformatisch auf benachbarte

Transkriptionseinheiten und Operonstrukturen hin untersucht (Tabelle 16, Anhang S.143). Für einen Teil der Insertionsmutanten konnte der Einfluss eines polaren Effekts auf ihr phänotypisches Verhalten verworfen werden, da die Transkriptionseinheiten entweder von einem starken Promotor oder einem schwachen Promotor und einem Terminator flankiert waren. Für den anderen Teil der Mutanten konnte ein polarer Effekt nicht eindeutig ausgeschlossen werden, weil das inaktivierte Gen als Bestandteil eines Operons vorhergesagt ist. Hierbei wurde zusätzlich zwischen den Transkriptionseinheiten eines am selben oder unterschiedlichen funktionalen Stoffwechselweg beteiligten Einheiten unterschieden. Ein durch die Insertion verursachter polarer Effekt des pLSV101-Vektors ist jedoch relativ unwahrscheinlich, wie dies bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde [Joseph *et al.*, 2006]. Der Nachweis erfolgte über die Ermittlung der Expressionsstärke von unmittelbar benachbarten Genen im Vergleich zum Wildtyp mittels Real-Time-PCR. Sie ergab, dass die Koexpression der im Operon nachfolgenden Gene gewährleistet ist und die Genexpressionsstärke im Vergleich zum Wildtyp sogar öfter höher lag, woraus zu schließen war, dass die Transkription von den Plasmid-ständigen Promotoren ausgehen muss.

Eine weitere Möglichkeit, sekundäre Effekte der IDM Mutagenese, wie z.B. die polare terminationsinduzierte Reduktion der Genexpression eines *downstream* vom Insertionsort liegenden Gens, auszuschließen und gleichzeitig die bereits vorhandenen Ergebnisse verifizieren zu können, ist die Konstruktion nichtpolarer (*in-frame*) Deletionsmutanten. Aus diesem Grund wurden *in-frame Listeria*-Deletionsmutanten von zehn ausgewählten Genen konstruiert, die im Caco-2 Screening selektioniert wurden und sechs verschiedene funktionelle Klassen repräsentieren. Die Konstruktion der Deletionsmutanten erfolgte, wie unter 2.7.1 beschrieben, mit Hilfe desselben rekombinanten pLSV101-Vektors. Nach der erfolgreichen Deletion, die mittels PCR überprüft wurde, wurden alle Deletionsmutanten zusätzlich auf ihre Sensitivität gegenüber Erythromycin getestet, indem mehrere Parallelausstriche auf entsprechenden Agarplatten und anschließende Inkubation bei 30°C durchgeführt wurden. Sämtliche Mutanten wiesen eine Sensitivität gegenüber Erythromycin auf, woraus zu schließen war, dass der zur Deletionsmutagenese eingesetzte pLSV101-Vektor aus den Bakterienzelle eliminiert wurde. Im Anschluss darauf wurde der die Deletion umgebende Bereich über PCR mit Gesamt-DNA als Template amplifiziert, um durch die Sequenzierung des PCR-Produkts und nachfolgende Sequenzanalyse die Gendeletion endgültig zu belegen. Weiterhin wurden die hergestellten Deletionsmutanten ebenfalls auf ihre intrazelluläre Replikation in Caco-2 Zellen und auf ihr Wachstumsverhalten in Vollmedium untersucht.

Das Wachstum der Deletionsmutanten wurde im Spektrometer Bioscreen C über einen Zeitraum von 14 Stunden bei 37°C durchgeführt, wobei pro Stamm und Zeitwert drei unabhängige Messungen aufgenommen und aus diesen der arithmetische Mittelwert gebildet wurden. Beim Vergleich der Insertionsmutanten mit den Deletionsmutanten stellte sich jedoch keinerlei Wachstumsverminderung heraus.

Die Untersuchung der Deletionsmutanten im Bezug auf ihre Fähigkeit, sich intrazellulär in Caco-2 Zellen zu vermehren, verlief unter denselben Versuchsbedingungen wie im Screening mit einer einzigen Ausnahme: die Infektion erfolgte nicht aus einer Übernachtskultur, sondern

aus vorher hergestellten und auf eine bestimmte Bakterienzahl eingestellten Infektionsaliquots. Auf diese Weise konnte die Konstanz und Reproduzierbarkeit der gewünschten MOI=10 gewährleistet und somit die Anzahl der zu wiederholenden Gentamicinassays gering gehalten werden. Durch eine Normierung der Bakterienzahl auf den Prozentsatz des Wildtypwertes konnten verschiedene Versuche miteinander verglichen werden (Abb.9). Insgesamt liegen für jede Deletionsmutante Daten aus drei unabhängigen Tests vor. Die nachfolgende Tabelle 13 gibt einen Überblick über die für Deletion ausgewählte Gene.

Stamm	putative Funktion deletierter Gene	polarer Effekt
EGD Δ Imo0618	Proteinkinase	nein
EGD Δ pdxK	Pyridoxinkinase	nein
EGD Δ ispE	4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritolkinase (Isoprenoidbiosynthese)	nein
EGD Δ tagB	Protein B der Teichonsäuren-Synthese	möglich
EGD Δ Imo1085	Protein B der Teichonsäuren-Synthese	möglich
EGD Δ Imo1506	ABC-Transporter für antimikrobielle Peptide, Permease	möglich
EGD Δ oppF	Oligopeptid-ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein	nein
EGD Δ Imo2781	β -Glucosidase	möglich
EGD Δ Imo2734	Hydrolase	möglich
EGD Δ Imo1031-1036	Fucose-Isomerase; 2x Transketolasen; Glycerolkinase; β -Glycosid-PTS-System (Enzyme IIABC); unbekanntes Protein	möglich

Tab.13: Übersicht über die für die Validierung der *Listeria*-Insertionsmutantenbank deletierten Gene.

Der Vergleich der Deletionsmutanten mit den analogen Insertionsmutanten lieferte, wie die Abbildung 9 zeigt, ein deutliches Ergebnis: alle Mutanten weisen, mit Ausnahme von EGD Δ pdxK, eine prägnant verminderte intrazelluläre Replikation auf, womit die Attenuation der Insertionsmutanten in Caco-2 Zellen nicht auf einen polaren Effekt zurückzuführen sei.

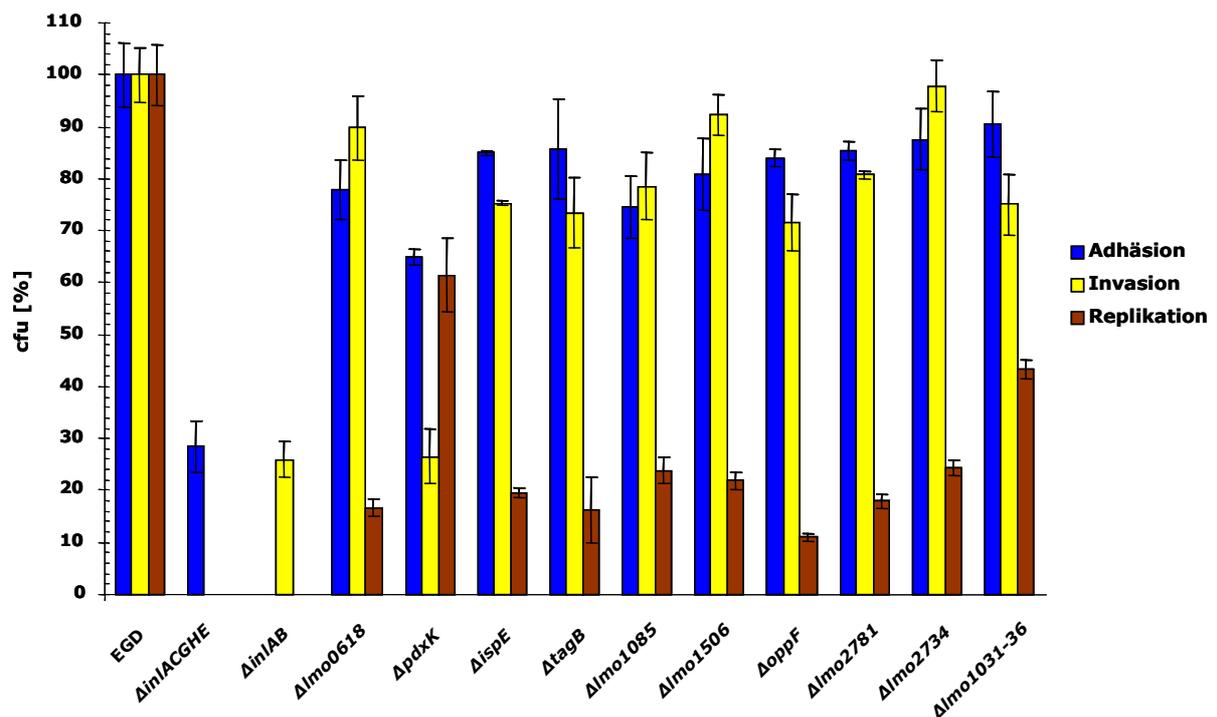


Abb.9: Graphische Darstellung vom intrazellulären Replikationsverhalten von *L. monocytogenes* EGD (WT) und den zur Validierung der Insertionsmutantenbank konstruierten *Listeria*-Deletionsmutanten in Caco-2 Zellen.

1.5 Phänotypische Analyse der Deletionsmutanten von *L. monocytogenes* im Mausmodell

Die Pathogenität der *Listeria*-Stämme ist primär von der Anwesenheit der Pathogenitätsfaktoren abhängig. Die Produkte anderer Gene sind möglicherweise nur indirekt an der Pathogenität beteiligt. Durch Mutationen in solchen Genen kann es zu einer verminderten Virulenz kommen, die auf der Beeinträchtigung der Infektions- und der Kolonisationsfähigkeit des Wirtsorganismus durch die Bakterien beruht.

Die Korrelation zwischen den Veränderungen im Pathogenitätsverhalten und den durch eine eingeführte Mutation aufgetretene Veränderungen der *Listeria*-Mutanten sollte in einem murinen *L. monocytogenes* Infektionsmodell untersucht und statistisch nachgewiesen werden. Dazu wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Gernot Geginat von der Universität Heidelberg jeweils fünf 6-10 Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse mit dem *Listeria*-Wildtyp und den *Listeria*-Deletionsmutanten intravenös mit einer Dosis von $3,5 \times 10^3$ Listerien/0,2 ml infiziert. Bei einer intravenösen Infektion werden primär Makrophagen befallen, wodurch sich Listerien im gesamten Organismus ausbreiten können. Die am stärksten betroffenen Organe stellen Leber und Milz dar, in denen nach drei Tagen der Bakterientiter bestimmt wurde (Abb.10). Bei BALB/c-Mäusen entspricht dieser Tag etwa dem Höhepunkt der murinen Listeriose und somit dem höchsten *Listeria*-Wildtyp Titer, der ab dem sechsten Tag nach der Infektion rückläufig wird, bis die Mäuse schließlich wieder symptomfrei werden.

Für die statistische Auswertung der Mausinfektionsversuche wurde der all-pair-Vergleich nach Tukey verwendet, bei dem alle Versuchsgruppen gegeneinander auf die mögliche Signifikanz getestet werden. Zur Datenauswertung wurde das Programm WINKS 4.70 genutzt. Eine statistische Signifikanz lag vor, wenn p-Wert (*P value*) kleiner als das vorab festgesetzte Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ war.

Im Gegensatz zu den Daten aus dem Zellkultursystem, in dem alle *Listeria*-Deletionsmutanten eine verminderte intrazelluläre Replikation aufwiesen, konnte im Mausmodell nur bei den Deletionsmutanten EGD Δ *ispE* und EGD Δ *mo0135-0137* ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zum Wildtyp in Leber und Milz beobachtet werden. Diesbezüglich scheinen die in die Isoprenoidsynthese involvierte 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritolkinase und der Oligopeptidtransporter beim Überleben der Listerien *in vivo* eine wichtige Rolle zu spielen und können somit als neue virulenz-assoziierte Faktoren betrachtet werden. Ein im Vergleich zum Wildtyp leicht geringer Bakterientiter ließ sich auch bei der Deletionsmutante EGD Δ *mo1085* erkennen. In diesem Stamm wurde ein *L. monocytogenes* spezifisches Gen, welches für ein Protein B der Teichonsäuren-Synthese kodiert, deletiert, wodurch möglicherweise Veränderungen in der Zusammensetzung der Teichonsäuren auftreten könnten. Allerdings fiel die Differenz in den Bakterientitern nicht als statistisch signifikant aus.

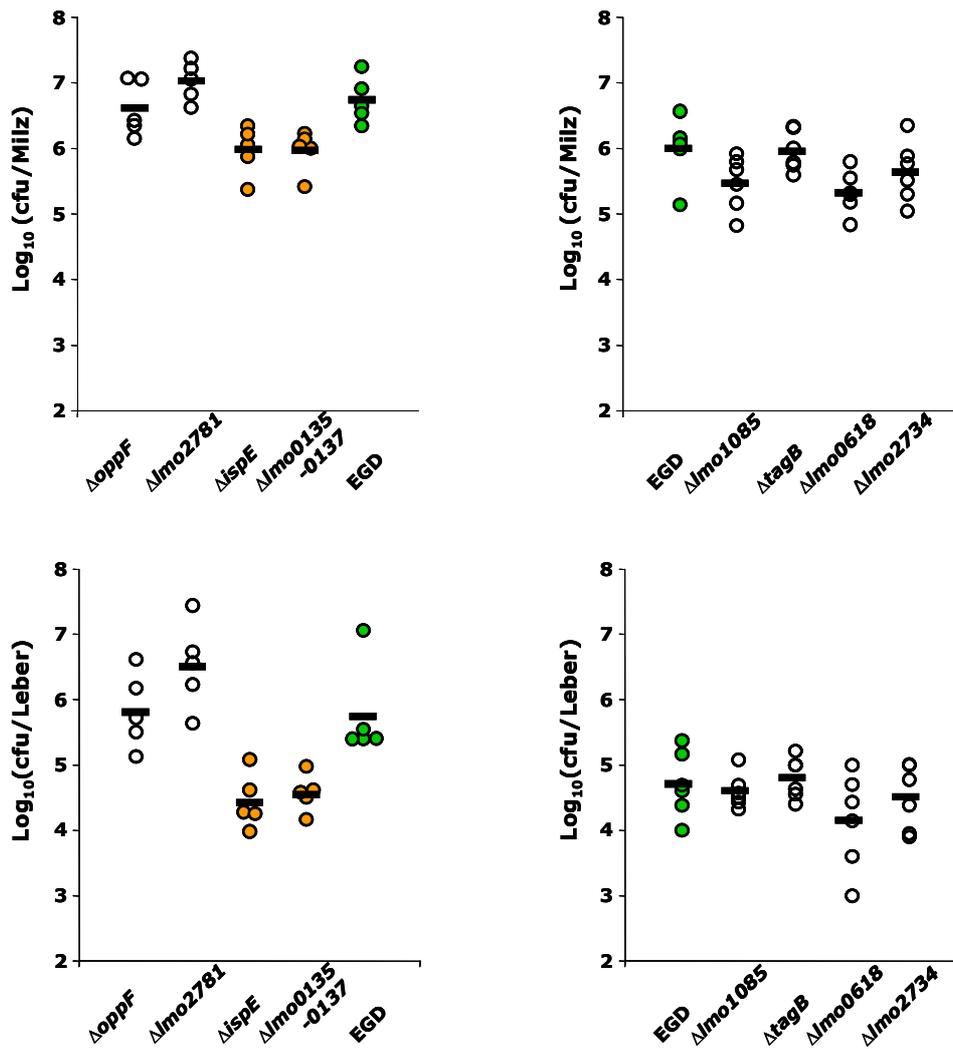


Abb.10: Bakterientiter von *L. monocytogenes* EGD und der *Listeria*-Deletionsmutanten in Milz und Leber. Den BALB/c-Mäusen wurden nach drei Tagen der Infektion die Organe entnommen und in diesen die Anzahl der *L. monocytogenes* cfu (*colony forming units*) bestimmt. Eine Markierung entspricht einem Tier; die waagerechten Striche geben die Mittelwerte auf der logarithmischen Achse an. Der Wildtypstamm ist grün und die signifikant attenuierte *Listeria*-Stämme orange gekennzeichnet.

2. Analyse des Kohlenstoffmetabolismus in *L. monocytogenes*

2.1 Etablierung eines colorimetrischen Verfahrens zur Ermittlung der Stoffwechselaktivität von *L. monocytogenes*

Bei der Charakterisierung pathogener Mikroorganismen gilt die erste Aufmerksamkeit der intensiven Untersuchung spezifischer Virulenzfaktoren. Für viele mikrobielle Erreger, unter anderem auch *L. monocytogenes*, sind derartige Virulenzfaktoren gut bekannt und bereits auf ihre Struktur, Regulation, Expression und Funktion während der extra- und intrazellulären Prozesse untersucht. Im Gegensatz dazu sind die unspezifischen, virulenz-assoziierten Faktoren nur wenig erforscht, zu denen auch bestimmte Stoffwechselleistungen gehören, die es dem Pathogen ermöglichen, in einem neu besiedelten Habitat zu überleben und sich erfolgreich zu vermehren. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein colorimetrisches

Verfahren etabliert, welches die Zellatmung mit der Metabolisierung der verfügbaren Substrate verbindet und dadurch die Identifizierung neuer Nährstoffquellen erlaubt. Im Mittelpunkt standen zuerst verschiedene Kohlenstoffquellen, die *in vitro* als auch *in vivo* ein Wachstum von *L. monocytogenes* ermöglichen.

Die Grundlage dieses Verfahrens bildet die irreversible Reduktion des farblosen Redox-Farbstoffs Tetrazoliumviolett zu einem purpurnen Formazan durch respiratorische Aktivität, die sich durch Verwertung einer eingesetzten Kohlenstoffquelle entwickelt und colorimetrisch ermitteln lässt. Als Reaktionslösung (IF-0) wurde ein Mix aus verschiedenen Salzen, Spurenelementen und Tetrazoliumviolett verwendet, dem für eine leicht gelartige Konsistenz das wasserlösliche Polysaccharid Gellan Gum hinzugefügt wurde. Dadurch sollte eine gleichmäßige Verteilung der Bakterien und des zu testenden Substrats gewährleistet und das Absinken der Bakterien vermindert werden. Gellan Gum kann von *L. monocytogenes* nicht verstoffwechselt werden, und bot deshalb eine zusätzliche Kontrolle gegenüber Kreuzkontaminationen. So blieb die mit *L. monocytogenes* inokulierte Reaktionslösung ohne Zusatz einer Kohlenstoffquelle über Wochen hinweg klar, sie verfärbte sich jedoch schon nach einigen Minuten, wenn eine Verunreinigung vorlag. Dadurch konnte garantiert werden, dass die Verfärbung der Reaktionslösung ausschließlich auf die Metabolisierung des eingesetzten Kohlenstoffsubstrats zurückzuführen ist. Die Anzucht der Bakterien erfolgte hierfür in LB-Medium bei 37°C, die danach mehrmals mit PBS gewaschen wurden, um alle Mediumreste und sekretierte Stoffwechselendprodukte zu entfernen. In Vorversuchen wurden auch andere Vollmedien wie BHI und BUG von BIOLOG als auch Minimalmedium getestet, wobei die Ergebnisse im Vergleich zu LB-Medium deutlich schlechter ausfielen. Die Bestimmung der biochemischen Abbauleistung für verschiedene Kohlenstoffquellen erfolgte in 100 µl Ansätzen im Mikrotiterplattenformat (96-Well-Platte). Die Mikrotiterplatten wurden nach der Inokulation mit *L. monocytogenes* für 24 h bzw. für 48 h für langsam verwertbare Substrate wie Glycerol bei 37°C inkubiert und anschließend bei $\lambda=600$ nm ohne Filter im Microplate Reader gemessen. Die Abbaumuster verschiedener Kohlenstoffsubstrate von *L. monocytogenes* und die getesteten Verbindungen sind in Abbildung 11 dargestellt.

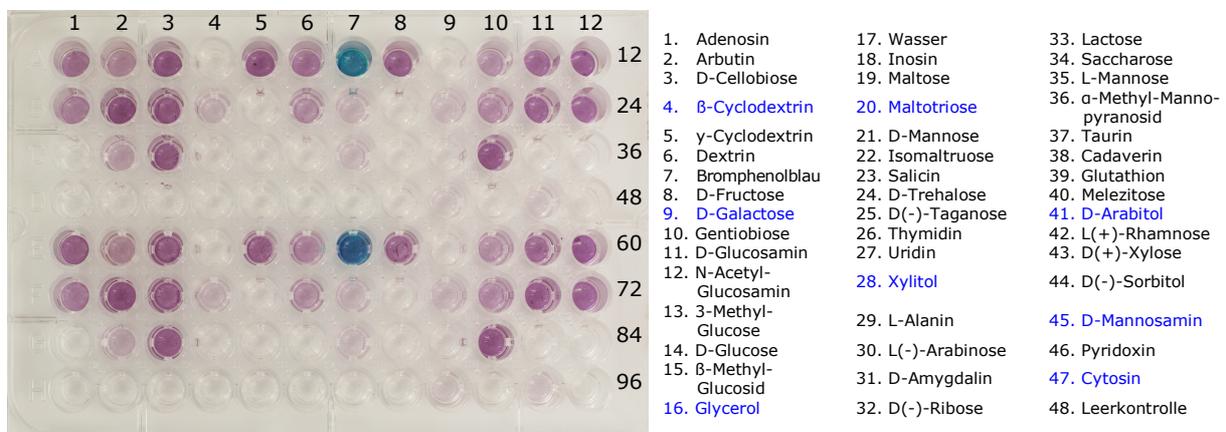


Abb.11: Abbaumuster der von *L. monocytogenes* EGD verwertbaren Kohlenstoffquellen (zweifacher Ansatz). Die langsam verstoffwechselbaren Kohlenstoffsubstrate sind in blau hervorgehoben. Bromphenolblau (7) diente lediglich als Marker, dass die Platte bereits inokuliert wurde. H₂O (17), D(+)-Xylose (43) wurden als Negativkontrollen eingesetzt und Well 48 fungierte als Leerwert.

Des Weiteren wurde mittels diesem Verfahren versucht, auch das Abbaumuster von Kohlenstoffquellen von sich intrazellulär befindenden Listerien aufzustellen. Zu diesem Zweck wurden Caco-2 Zellen mit Listerien infiziert und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ in einem Zellkulturbrutschrank inkubiert, worauf dann die Isolierung der Bakterien aus den eukaryotischen Zellen und ihr direkter Einsatz für den Test stattfanden. Im Allgemeinen ließ sich das Verfahren auch auf die aus Caco-2 Zellen isolierten Listerien anwenden, jedoch stellte die isolierte Bakterienmenge ein Hindernis dar. Es konnte nicht jedes Mal eine für den Test ausreichende Menge an Bakterien gewonnen werden, da beim Aufschluss der Caco-2 Zellen mit eiskaltem Wasser über einen Zeitraum von 30 Minuten anscheinend auch ein Teil der Bakterien verloren gegangen war. Außerdem konnte eine leichte Schwankung bezüglich der Substratverwertung beobachtet werden, die trotz gleich bleibenden Bedingungen nicht eliminiert werden konnte.

2.2 Charakterisierung der Stoffwechselaktivität von sechs *Listeria*-Arten und den ausgewählten *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutanten

Die Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen hängt von zahlreichen Faktoren ab, beginnend mit der genetischen Ausstattung als auch von den jeweiligen Umweltbedingungen wie pH, Druck, Atmosphäre oder Temperatur, weswegen unterschiedliche Stoffwechselwege benutzt werden, um Energie für die Zelle zu generieren. Zudem spielen sie eine essentielle Rolle bei der Besiedelung von unterschiedlichen Habitaten. Unter diesem Gesichtspunkt wurden die sechs *Listeria*-Arten nach Anzucht in LB-Vollmedium unter Verwendung des etablierten Verfahrens untereinander und die beiden pathogenen Arten, *L. monocytogenes* und *L. ivanovii*, miteinander verglichen (Abb.12).

Beim Vergleich der Stoffwechselaktivitäten der sechs *Listeria*-Arten konnte unter den für das colorimetrische Verfahren gewählten Bedingungen keine Korrelation zwischen pathogenen und apathogenen nachgewiesen werden. Allerdings liegen deutliche Unterschiede zwischen *L. monocytogenes* und den übrigen *Listeria*-Arten vor. Demnach ist *L. monocytogenes* in der Lage, die Substrate Dextrin, β -Methyl-Glucosid, Maltose, Maltotriose und D-Mannose besser als Kohlenstoffquelle zu metabolisieren als die anderen *Listeria*-Arten. Dafür konnte bei den anderen *Listeria*-Arten eine wesentlich höhere Stoffwechselaktivität in Bezug auf D-Cellobiose, Thymidin, Uridin und Cytosin beobachtet werden.

ERGEBNISSE

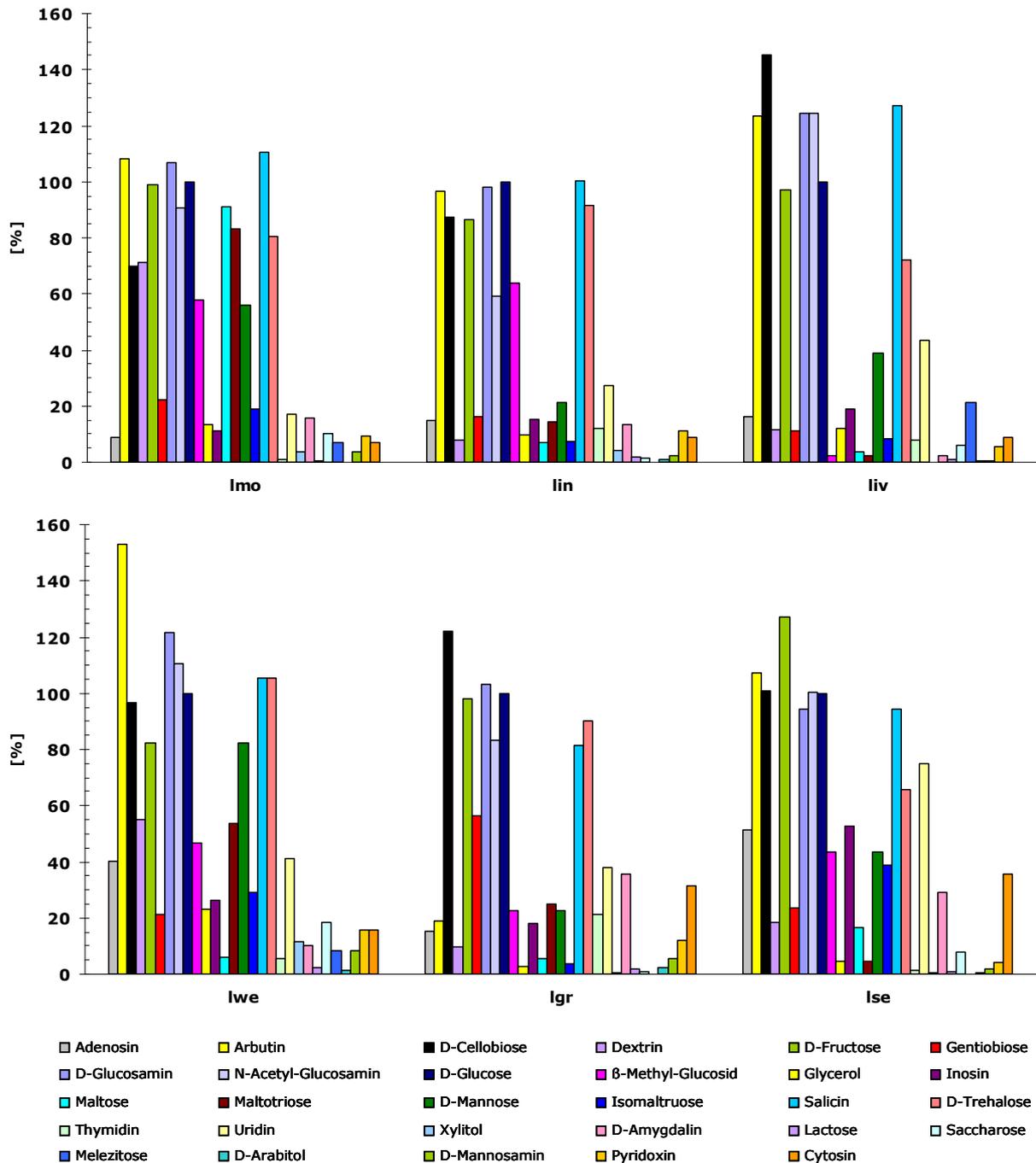


Abb.12: Abbaumuster ausgewählter Kohlenstoffquellen von sechs *Listeria*-Arten. Für den Vergleich wurde die Stärke der Substratmetabolisierung an der Glucose-Verwertung (100%) normiert. lgr, *L. grayi*; lin, *L. innocua*; liv, *L. ivanovii*; Imo, *L. monocytogenes*; lse, *L. seeligeri*; lwe, *L. welshimeri*.

Die graphische Darstellung 13 verbildlicht diese Verschiebung der Stoffwechselaktivität noch mal deutlicher, indem die Stoffwechselaktivität einzelner Substrate gegenüber der gesamten Metabolisierung der jeweiligen *Listeria*-Art dargestellt wird.

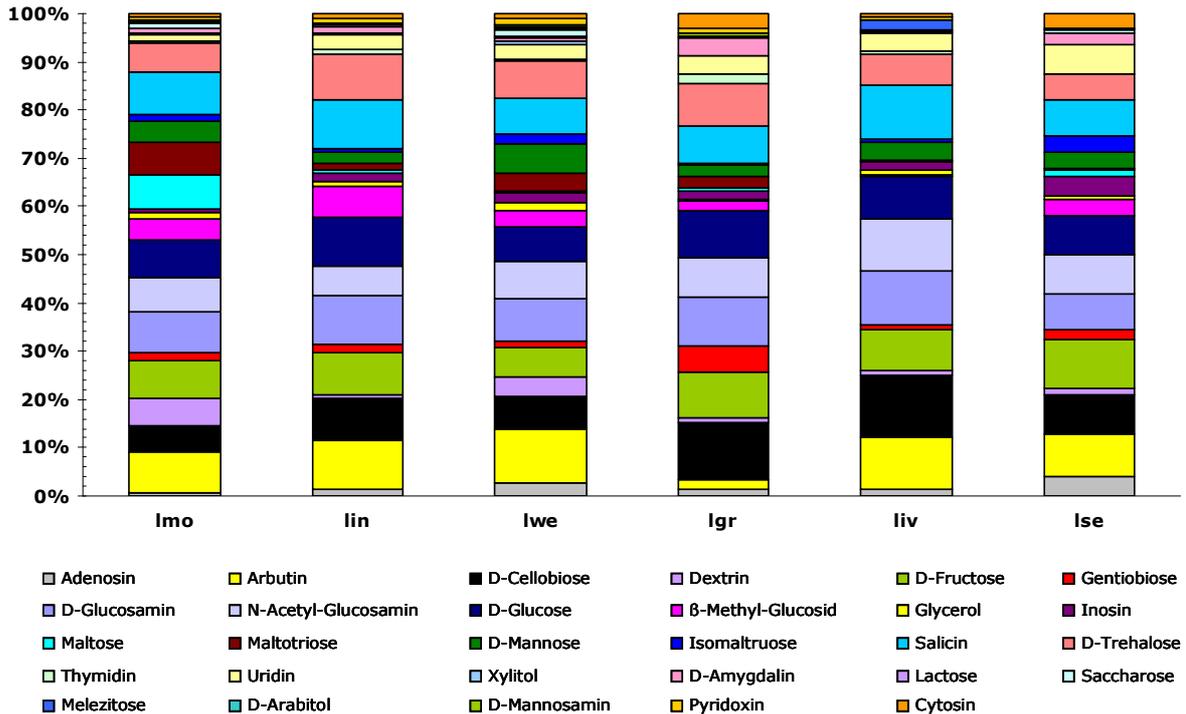


Abb.13: Vergleich der Metabolisierung einiger als Kohlenstoffquelle dienender Substrate hinsichtlich der gesamten Stoffwechselaktivität der jeweiligen *Listeria*-Art. Für den Vergleich wurde die Stärke der Substratmetabolisierung zunächst an der Glucose-Verwertung (100%) normiert. lgr, *L. grayi*; lin, *L. innocua*; liv, *L. ivanovii*; lmo, *L. monocytogenes*; lse, *L. seeligeri*; lwe, *L. welshimeri*.

Wie die Klassifizierung der *Listeria*-Insertionsmutanten bezüglich ihrer Genfunktion ergab, ist der größte Teil der im Zellkultursystem als attenuiert identifizierten Mutanten den Klassen „Kohlenstoffmetabolismus“, „Stoffwechsel von Aminosäuren“ sowie „Transport- und Bindeproteine“ zuzuordnen. Darüber hinaus wurden mit diesem Screeningverfahren auch *L. monocytogenes* spezifische Proteine und Transportsysteme identifiziert, die offenbar für das intrazelluläre Überleben wichtig sind. Zur näheren Charakterisierung dieser putativen Transporter bzw. an dem Stoffwechsel beteiligten Enzyme werden verschiedene biochemische Methoden eingesetzt. Unter anderem bietet sich hierfür das in dieser Arbeit zur Identifizierung neuer Kohlenstoffsubstrate etablierte colorimetrische Verfahren an. Auf Grund dessen wurde für alle zu diesen funktionellen Klassen zugeordneten Insertionsmutanten ein Profil der Stoffwechselaktivität mittels dieses Verfahrens erstellt, der jedoch keine weitere Erkenntnisse über die Funktionalität der inaktivierten Gene brachte, da die Profile der Mutanten sich nicht von dem des Wildtyps unterschieden.

3. Funktionale Charakterisierung der neuen potenziellen Virulenz-assoziierten Faktoren von *L. monocytogenes*

3.1 Untersuchung des Glycerolmetabolismus von *L. monocytogenes*

Bei der Betrachtung der im Caco-2 Screening identifizierten Gene der Klasse „Kohlenstoff-metabolismus“ fiel auf, dass die Insertionen in den Genen *glpD* und *Imo1538*, die für eine Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase und eine Glycerolkinase kodieren, zwar ein wildtypisches Wachstum im Vollmedium erlauben, aber zu einer verminderten intrazellulären Replikation in Caco-2 Zellen führen. Dieser Befund und die Tatsache, dass *L. monocytogenes* auch noch ein Spezies-spezifisches *Imo1031-1036*-Operon besitzt, das zwar durch die Insertionen in den Genen *Imo1032* und *Imo1031* selektioniert wurde, aber zugleich eine weitere Glycerolkinase *Lmo1034* kodiert, deuten auf Glycerol als mögliche von *L. monocytogenes* intrazellulär genutzte Kohlenstoffquelle hin.

Um eine Beteiligung dieser Gene am Glycerolstoffwechsel näher analysieren zu können, wurden Einzel- und Mehrfachdeletionsmutanten im Rahmen dieser und einer vorangegangenen Arbeit [Joseph *et al.*, 2006] erzeugt und zuerst auf das Wachstum sowohl in Vollmedium als auch in einem definierten Minimalmedium mit jeweils 50 mM Glucose bzw. Glycerol als alleiniger Kohlenstoffquelle bei 37°C untersucht (Abb.14).

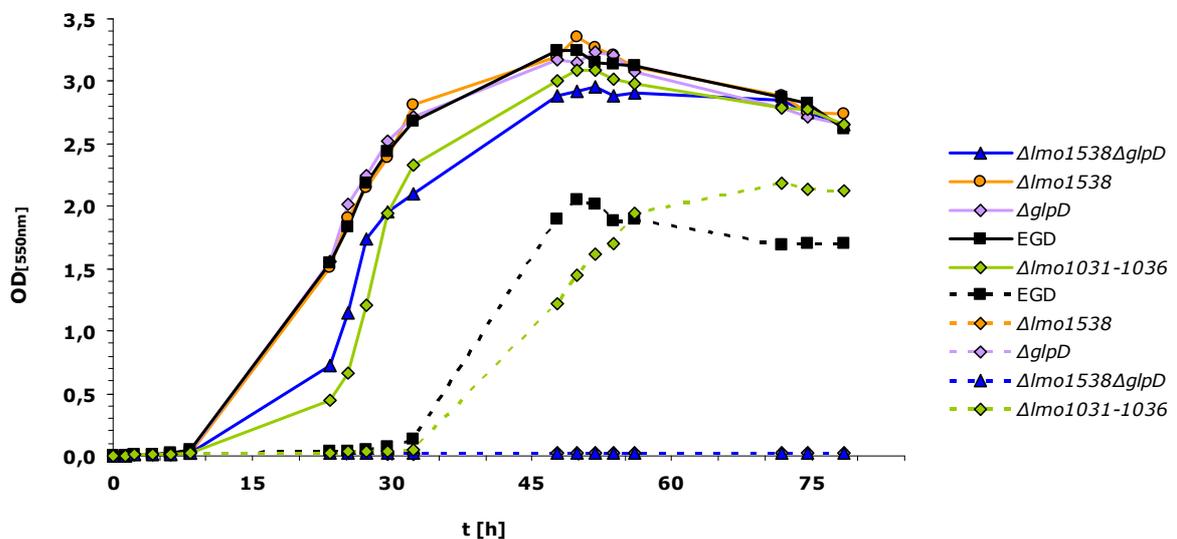


Abb.14: Wachstum von *L. monocytogenes* EGD und Deletionsmutanten in definiertem Minimalmedium mit 50 mM Glucose (durchgezogene Linie) bzw. Glycerol (gestrichelte Linie). Dieses Wachstumsverhalten konnte durch wiederholte Versuche bestätigt werden.

In Vollmedium (Daten nicht gezeigt) und in Glucose-haltigem Minimalmedium zeigten alle untersuchten Stämme, wie erwartet, das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp *L. monocytogenes* EGD. Die Verwertung von Glycerol als Kohlenstoffquelle führt beim Wildtyp ebenfalls zu keinem signifikanten Wachstumsunterschied in der logarithmischen Wachstumsphase, weist jedoch eine längere lag-Phase von ca. 19 h auf und erreicht schon bei einer optischen Dichte von 2,05 die stationäre Wachstumsphase, wogegen der Wildtyp mit Glucose

als Kohlenstoffquelle erst bei einer optischen Dichte von 3,25 in die stationäre Phase gelangt. Dennoch ist ein effizientes Wachstum auch mit der C3-Kohlenstoffquelle Glycerol möglich. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, zeigt in Glycerol-haltigem Minimalmedium im Vergleich zum Wildtyp nur die Deletionsmutante *EGDΔlmo1031-1036* weiterhin keinen signifikanten Unterschied in der Wachstumsrate. Zu Beginn des Wachstums verhält sich die Mutante *EGDΔlmo1031-1036* ähnlich wie der Wildtyp, verlangsamt dann nach 50 h ihre Wachstumsgeschwindigkeit, gelangt jedoch trotzdem mit einer Verzögerung von ca. 6 h auf die gleiche optische Dichte in der stationären Phase. Die Deletionsmutanten *EGDΔlmo1538*, *EGDΔglpD* und *EGDΔlmo1538ΔglpD* weisen dagegen kein Wachstum in Glycerol-haltigem Minimalmedium auf. Dieser Wachstumsverlust ist somit auf die genannten fehlenden Gene zurückzuführen, wodurch gleichzeitig auch ihre Beteiligung am Glycerolstoffwechsel nachgewiesen werden konnte.

Außerdem werden diese Wachstumsergebnisse und die Annahme, dass Glycerol intrazellulär eine Kohlenstoffquelle für *L. monocytogenes* darstellen könnte, durch Expressionsdaten in Glycerol-haltigem Minimalmedium zusätzlich bekräftigt. So werden die Gene *Δlmo1538*, *ΔglpD* und *Δlmo1539*, kodierend für den Glyceroltransporter GlpF-1, da Glycerol eine nicht-PTS-abhängige Kohlenstoffquelle darstellt, in Glycerol-haltigem Minimalmedium verstärkt exprimiert. Bei den Genen *Δlmo1034* und *glpF*, die für eine weitere Glycerolkinase Lmo1034 und einen zweiten Glyceroltransporter GlpF-2 kodieren, konnte hingegen keine erhöhte Transkription festgestellt werden [Joseph *et al.*, 2008]. Lmo1034 könnten also für eine intrazelluläre Glycerolverwertung durch *L. monocytogenes* nötig sein.

Um die Annahme über die intrazelluläre Verwertung von Glycerol fundierter zu belegen, wurde im Folgenden das intrazelluläre Überleben und Vermehrung der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp in Caco-2 Zellen untersucht (Abb.15).

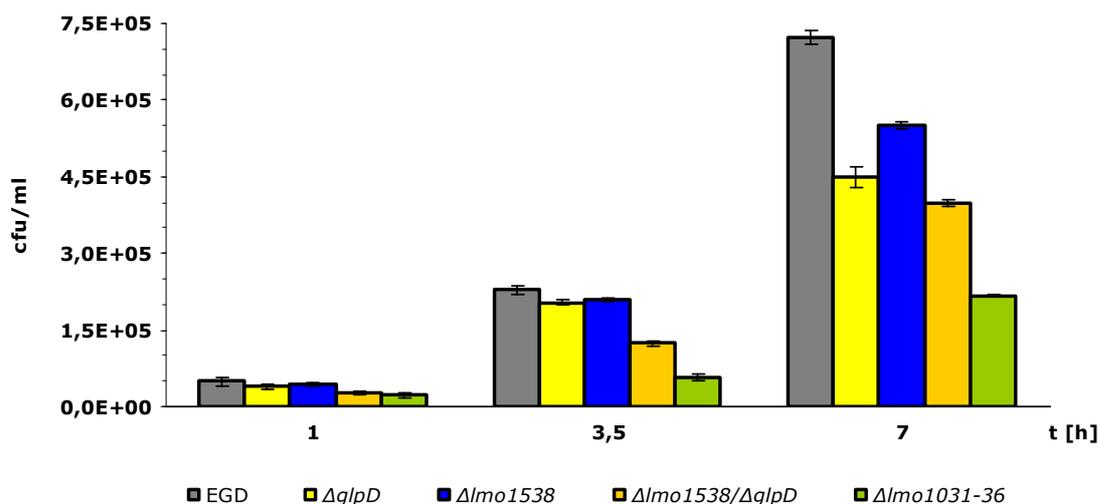


Abb.15: Invasion und intrazelluläre Replikation von *L. monocytogenes* EGD und der am Glycerolmetabolismus beteiligten Deletionsmutanten in Caco-2 Zellen. Die Werte stammen aus den drei unabhängigen Versuchen.

Wie der Abbildung 15 zu entnehmen ist, weisen die Mehrfachdeletionsmutanten *EGDΔlmo1538ΔglpD* und *EGDΔlmo1031-1036* im Vergleich zum Wildtyp und den Einfachdeletionsmutanten eine leichte, aber nicht signifikante Reduktion in der Invasion (t=1h) der

Caco-2 Zellen auf. In der intrazellulären Replikation zeigen jedoch alle Deletionsmutanten deutliche Unterschiede zum Wildtyp, obwohl zum Zeitpunkt $t=3,5h$ nach der Infektion die Replikationsrate der Deletionsmutanten $EGD\Delta lmo1538$ und $EGD\Delta glpD$ nur geringfügig von der des Wildtypstammes abweicht. Zum Zeitpunkt $t=7h$ kann jedoch auch bei diesen Stämmen eine sichtliche Verminderung in der Replikation festgestellt werden. Bei der Mutante $EGD\Delta lmo1538\Delta glpD$ ist zudem eine leicht stärkere Attenuation zu sehen, als in den entsprechenden Einfachdeletionsmutanten. Sehr starke Replikationsdefekte zu fast allen Zeitpunkten nach der Infektion liegen dafür bei der Deletionsmutante $EGD\Delta lmo1031-1036$ vor, die keinerlei Unterschiede zum Wildtyp in den *in vitro* Versuchen zeigte.

Der Vergleich dieser Resultate über die intrazelluläre Replikation der Deletionsmutanten in Caco-2 Zellen mit den vorliegenden intrazellulären Expressionsprofilen von *L. monocytogenes* in Caco-2 und J774A.1 ergab zudem, dass das Gen *glpD* in Caco-2 und das Gen *lmo1538* in beiden Zelllinien verstärkt exprimiert werden (Tabelle 16, Anhang S.143).

3.2 Genetische und biochemische Analyse der Thiaminbiosynthese von *L. monocytogenes* und Untersuchung ihrer Rolle in der Pathogenität

Bei den meisten Bakterien liegen die Gene der Thiaminbiosynthese geclustert vor, wobei jedes Cluster getrennt voneinander reguliert wird. Im Genom von *L. monocytogenes* ist bisher nur ein Thiaminbiosynthese-Cluster *tenA-thiMDE* (*lmo0315-0318*) gefunden worden, das aus vier Genen besteht, die alle typische Proteine der Thiaminsynthese kodieren. Aufgrund von Homologievergleichen der Aminosäuresequenzen mittels PSI-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) konnte allen Genen eine putative Funktion zugeordnet werden: das Gen *tenA* kodiert für eine Thiaminase II, das Gen *thiM* für eine HET (5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazol)-Kinase, das Gen *thiD* für eine HMP (4-Amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin)-Kinase und das Gen *thiE* für eine Thiaminphosphat-Synthase. Die tatsächlichen Aufgaben dieser Gene sind allerdings noch ungeklärt. Weitere an der Thiaminbiosynthese beteiligten Gene liegen dagegen einzeln oder zusammen mit Genen anderer Funktion in einem Operon und sind über das ganze *Listeria*-Genom verteilt [Glaser *et al.*, 2001; Rodionov *et al.*, 2002].

Das in dieser Arbeit näher untersuchte *thiD*-Gen (*lmo0317*) aus dem Thiaminbiosynthese-Cluster kodiert für eine aus 267 Aminosäuren bestehende, hypothetische 4-Amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin (HMP)-Kinase mit einem Molekulargewicht von 28,79 kDa. Das Enzym ist in die Synthese des Pyrimidin-Rings von Thiamin involviert und führt dabei die zweite Phosphorylierung von HMP durch. Zudem wird die HMP-Kinase ThiD benötigt, um frei vorliegendes, von außen aufgenommenes HMP zu HMP-PP umzuwandeln. Die Phosphorylierung des HMP-P zu HMP-PP kann aber auch von der Pyridoxalkinase PdxK (*Lmo0662*), einer Kinase mit einem offensichtlich sehr breitem Substratspektrum, durchgeführt werden, die fälschlicherweise zunächst ebenfalls als eine HMP-Kinase annotiert war [Begley *et al.*, 1999]. Nach Sequenzvergleichen auf Aminosäureebene liegt für das Protein ThiD (*Lmo0317*) eine 69%-ige Übereinstimmung mit dem homologen YjbV-Protein von

Bacillus subtilis vor. Das Protein PdxK (Lmo0662) weist aber eine 75%-ige Übereinstimmung auf Aminosäurenebene zum YwdB-Protein aus *B. subtilis* auf, welches bis jetzt als ThiD annotiert war und aufgrund bereits vorliegender Analysen zu PdxK umbenannt werden soll [Park *et al.*, 2004].

Neben der *de novo* Thiaminsynthese sind die meisten Bakterien zudem in der Lage, Thiamin mittels eines Transporters aufzunehmen und in den Stoffwechsel einzuschleusen. Bei der Suche nach einem putativen listeriellen Thiamintransporter ergaben sowohl die Proteinvergleiche als auch die bioinformatischen Genomprofile, dass das Gen *lmo1429* dafür kodieren könnte [Rodionov *et al.*, 2002]. Das außerhalb des Thiaminbiosynthese-Clusters liegende *lmo1429*-Gen kodiert für ein aus 186 Aminosäuren bestehendes Membranprotein mit einem Molekulargewicht von 20,42 kDa. Aus Homologievergleichen ließen sich stark homologe Proteine bei verschiedenen anderen Organismen wie *B. cereus*, *B. weihenstephanensis*, *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp. und *Enterococcus faecalis* finden (Abb.16).

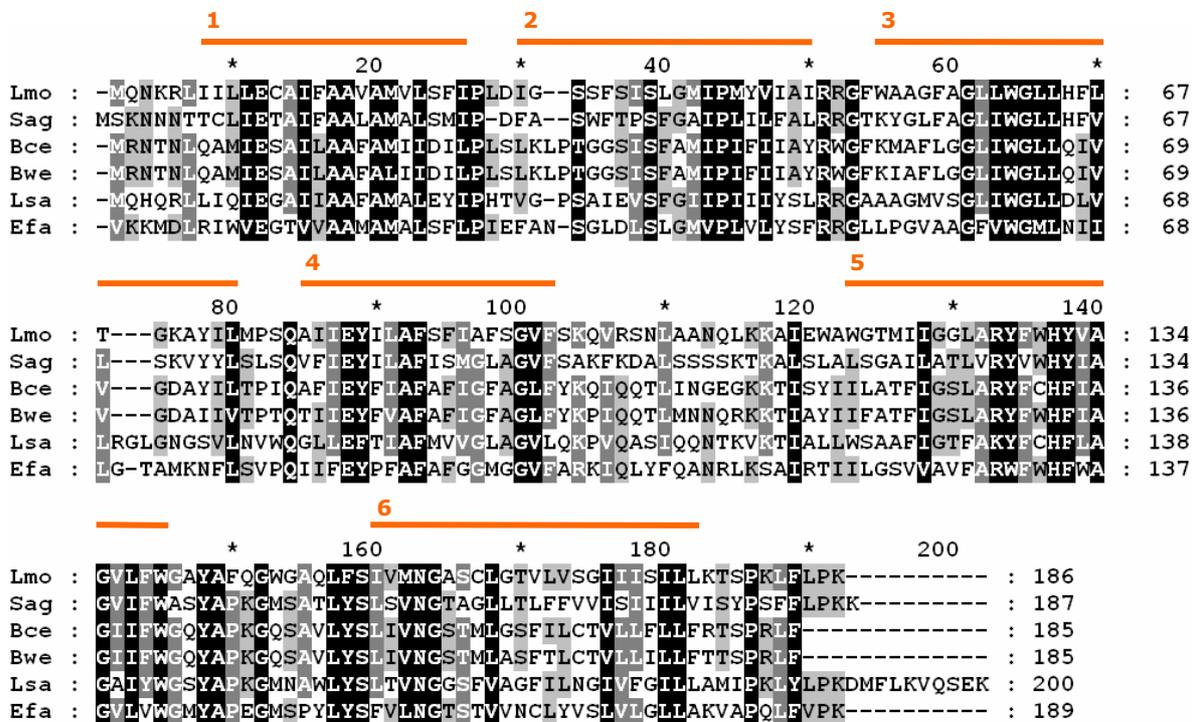


Abb.16: Proteinalignment von Lmo1429 (ThiT) von *L. monocytogenes* EGD (Lmo) und Homologen aus *B. cereus* (Bce, ZP_04291756.1), *B. weihenstephanensis* (Bwe, 5844859), *Streptococcus agalactiae* (Sag, 1013621), *Lactobacillus sakei* spp. (Lsa, 3777428) und *Enterococcus faecalis* (Efa, ZP_05564575.1). Die Graustufen geben die Übereinstimmung in den einzelnen Aminosäuren (AS) wieder. Es werden nur identische AS berücksichtigt, keine konservativen Austausche. Übereinstimmung: schwarz (100%), dunkelgrau ($\geq 80\%$) und hellgrau ($\geq 60\%$). Die putativen Transmembranhelices von Lmo1429 (ThiT), die mithilfe des Vorhersageprogramms TMHMM ermittelt wurden, sind als rote horizontale Linien dargestellt.

Bis auf in *Lactobacillus casei* wurde jedoch keines dieser Homologe funktionell charakterisiert. Die Vorhersagen über die enzymatische Aktivität basieren lediglich auf den Ähnlichkeiten zu den bekannten ABC-Transportern wie ThiBPQ von *Salmonella* und *E. coli* oder ThiUVWY (YkoFEDC) von *B. subtilis*, zu dem im *Listeria*-Genom keine ähnlichen Proteine gefunden werden konnten [Webb *et al.*, 1998; Schyns *et al.*, 2005]. Eine hohe Übereinstimmung von 65% auf der Aminosäurenebene weist das Lmo1429-Protein allerdings zu einem Homolog

YuaJ aus *B. weihenstephanensis* auf, welches einen putativen Thiamin-ABC-Transporter darstellt. Zunächst als Membranprotein annotiert muss Lmo1429-Protein mehrere für Membranproteine typische Transmembrandomänen besitzen, um in der Membran lokalisiert zu sein und mit seinen Loops die notwendige katalytische Oberfläche auszubilden. Die Hydrophathieanalyse mittels des Vorhersageprogramms TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>) ließ sechs hydrophobe Bereiche in Lmo1429 erkennen, die Transmembrandomänen darstellen könnten (Abb.16). Darüberhinaus ergaben die DNA-Sequenzanalysen eine mögliche in der 5'-Region des Gens liegende *thi*-Box, die charakteristisch für einige am Thiaminstoffwechsel beteiligten Gene ist und ein Indiz für die direkte Regulation der Genexpression durch Thiaminpyrophosphat (TPP) mittels eines Riboswitch-Mechanismus darstellt [Rodionov *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002]. In Anlehnung an die nachfolgende durchgeführte Charakterisierung und aufgrund der daraus resultierenden eindeutigen Identifizierung als Thiamintransporter wird das Gen *lmo1429* deshalb als *thiT* bezeichnet. Für die weiteren Untersuchungen wurden von den beiden Genen, *thiD* (*lmo0317*) und *thiT* (*lmo1429*), die *in-frame* Deletionsmutanten EGD Δ *thiD* und EGD Δ *thiT* erstellt.

3.2.1 Phänotypische Untersuchung der Deletionsmutanten im Zellkultursystem

Die für die Pathogenität relevanten Gene lassen sich allgemein in zwei Gruppen gliedern: Gene, deren Genprodukte direkt an der Virulenz beteiligt sind und zu denen listerielle Virulenzfaktoren ActA, Hly, InlA etc. gehören und Gene, deren Produkte indirekt involviert sind. Es besteht jedenfalls die Möglichkeit, dass die Deletion des Gens dazu führt, dass die Wirtszellen nicht mehr effektiv kolonisiert oder intrazelluläre Replikation von Bakterien beeinträchtigt werden kann, so dass sich ein indirekter Effekt auf die Virulenz ergibt.

Um Hinweise auf die Rolle von ThiD und ThiT bei der Interaktion zwischen *L. monocytogenes* und der Zelllinie Caco-2 zu erhalten, wurden Infektionsversuche mit den Deletionsmutanten EGD Δ *thiD* und EGD Δ *thiT* durchgeführt. Diese wurden über Nacht in Thiamin-haltigem Minimalmedium angezogen und anschließend für weitere 12 h in einem Thiamin-freien Minimalmedium inkubiert. Die Analyse der Kolonisation und intrazellulären Vermehrung im zeitlichen Verlauf lieferte folgendes Ergebnis (Abb.17):

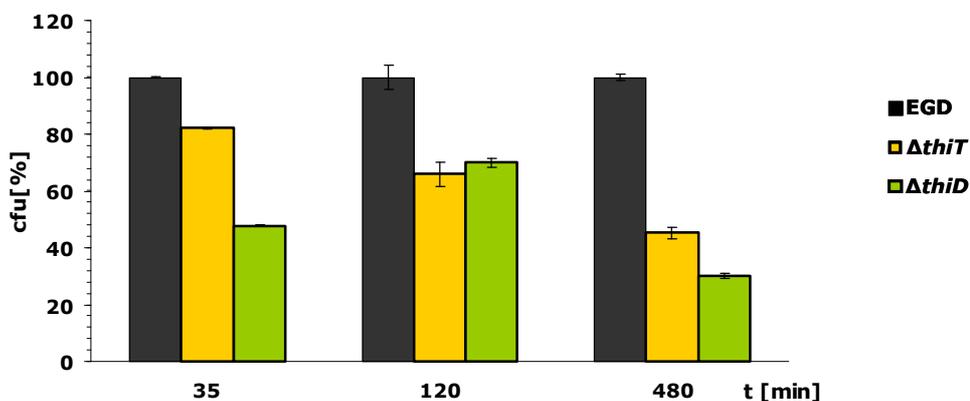


Abb.17: Kolonisation und intrazelluläre Replikation von EGD Δ *thiD* und EGD Δ *thiT* im Vergleich zu *L. monocytogenes* EGD in Caco-2 Zellen.

Dabei zeigen die beiden Deletionsmutanten verglichen mit dem Wildtyp einen mit der Zeit abnehmenden Bakterientiter, der nach 480 Minuten um den Faktor 2,2 für EGD Δ *thiT* und 3,3 für EGD Δ *thiD* gegenüber dem Wildtyp niedriger ist. Der ausgeprägte Unterschied in der Attenuation zwischen den beiden Mutanten ist wahrscheinlich dadurch begründet, dass die *thiT*-Mutante noch in der Lage ist, die *de novo* Synthese von Thiamin durchzuführen, und trotz des fehlenden Transporters Thiamin durch seine Diffusion von außen zu beziehen, wodurch der Thiaminspiegel in der Bakterienzelle insgesamt höher zu sein scheint, als bei der *thiD*-Mutante. Es lässt sich somit feststellen, dass ThiD und ThiT eine wichtige Rolle bei der *de novo* Synthese und dem Transport spielen und bei der Replikation der Listerien im Cytosol von Caco-2 Zellen von großer Bedeutung sind.

3.2.2 Nachweise der Pathogenitätsdeterminanten *actA* und *hly*

Es ist bekannt, dass Thiaminderivate (z.B. TPP) durch direkte Bindung an messenger-RNAs die Expression vieler Gene steuern. Auch bei *L. monocytogenes* könnte z.B. Thiaminpyrophosphat die Expression bestimmter Gene mittels eines Riboswitch-Mechanismus regulieren und dadurch indirekt einen Einfluss auf die Genexpression anderer Gene nehmen, die für die Pathogenität von Bedeutung sind. Aus diesem Grund wurden die Deletionsmutanten auf die Anwesenheit von zwei für ein wildtypisches Pathogenitätsverhalten verantwortlichen Virulenzfaktoren ActA und Hly untersucht. Dabei ist ActA für die Zell-zu-Zell-Ausbreitung verantwortlich und Hly zusammen mit PlcA bzw. auch PlcB für die Freisetzung der Listerien aus dem primären bzw. sekundären Phagosom erforderlich. Für den Nachweis wurden die Gesamtproteinextrakte aus einer Schüttelkultur und aus Caco-2 reisolierten Listerien verwendet (Abb.18).

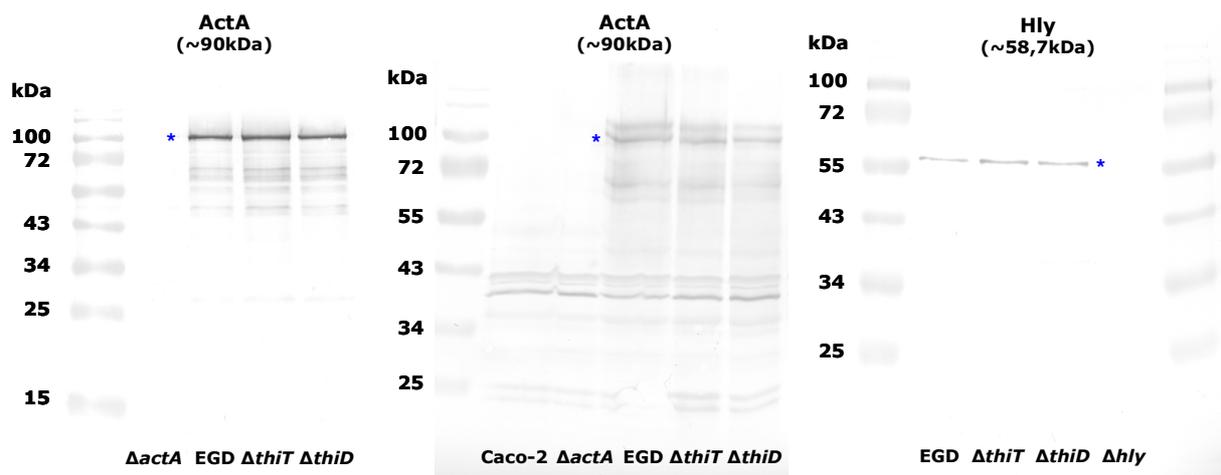


Abb.18: Nachweis von ActA und Hly in Gesamtproteinextrakten aus *L. monocytogenes* EGD, EGD Δ *thiD* und EGD Δ *thiT* mittels Western-Blot. Die Stämme EGD Δ *actA* und EGD Δ *hly* sowie der Lysat von nicht infizierten Caco-2 Zellen dienten als Kontrollen. Es wurden die gleichen Proteinmengen aufgetragen. Mit blauen Sternchen sind die Proteinbanden für ActA bzw. Hly markiert.

Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, ist die *actA*- und *hly*-Expression in allen untersuchten Stämmen gleich stark bzw. fehlt gänzlich bei den eingesetzten Kontrollen. Das bedeutet, dass die Mutanten hinsichtlich der Pathogenitätsdeterminanten *actA* und *hly* dem Wildtypstamm entsprechen und ihre Virulenz direkt mit der des Stammes *L. monocytogenes* EGD verglichen werden kann. Bei der zusätzlich markanten Bande in den Gesamtproteinextrakten aus Caco-2 Zellen reisolierten Listerien und den einigen weiteren erscheinenden Banden handelt es sich um Abbauprodukte von ActA, die durch das polyklonale anti-ActA-Kaninchenserum erkannt werden.

Folglich kann davon ausgegangen werden, dass alle zwischen den Mutanten und dem Wildtyp festgestellten Virulenzunterschiede durch die Deletion der betreffenden Gene *thiD* und *thiT* zustande kommen.

3.2.3 Wachstumseigenschaften der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp

Thiamin, als Cofaktor von zahlreichen Enzymen, spielt eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Zelle. Daher besteht die Möglichkeit, dass das Fehlen der Gene *thiD* und *thiT*, die an der *de novo* Synthese und der Thiamintransport beteiligt sind, dazu führen könnte, dass die Mutanten in ihrem Wachstum stark beeinträchtigt sind oder ihre Wachstumseigenschaften unter bestimmten Bedingungen verändern. Diese Bedingungen können hinterher genutzt werden, um die Deletionen zu bestätigen und um die Mutanten näher zu charakterisieren. Auf diese Weise können außerdem Hinweise auf die Funktion der Produkte der deletierten Gene erhalten werden. Sowohl die *thiD*- als auch die *thiT*-Mutante wurden mehreren Wachstumstests unterzogen, um ihre Eigenschaften im Vergleich zu *L. monocytogenes* EGD genauer zu untersuchen.

3.2.3.1 Das Wachstum der *pdxK*- und *thiD*-Mutanten im Minimalmedium

Das Wachstum der *pdxK*- und *thiD*-Mutanten unter Standardbedingungen (37°C, Vollmedium) entspricht dem des Wildtyps (Daten nicht gezeigt), weil das Vollmedium eine ausreichende Menge an Thiamin enthält, welches nur in sehr geringen Mengen benötigt wird und durch aktiven sowie passiven Transport in die Bakterienzelle gelangt, weshalb die eingeführte Mutation in der *de novo* Thiaminbiosynthese phänotypisch nicht in Erscheinung tritt. Um zu überprüfen, ob sich die *thiD*-Mutante auch im Minimalmedium (MM) mit einer definierten Thiaminmenge von 1 mg/l wie der Wildtyp verhält, wurden Wachstumsmessungen in 50 ml MM-Flüssigmedium durchgeführt. Die Deletionsmutante EGD Δ *pdxK* wurde ebenfalls auf ihr Wachstumsverhalten im Minimalmedium überprüft. Dabei ergab sich in der Abbildung 19 dargestelltes Wachstumsverhalten.

Die Wachstumsmessungen der *thiD*- und *pdxK*-Mutanten und des Wildtyps *L. monocytogenes* EGD zeigen nur einen geringen Wachstumsunterschied zwischen Mutanten und Wildtyp, wobei der Unterschied zwischen EGD Δ *pdxK* und *L. monocytogenes* EGD im Vergleich zu EGD Δ *thiD* deutlich größer ausfällt.

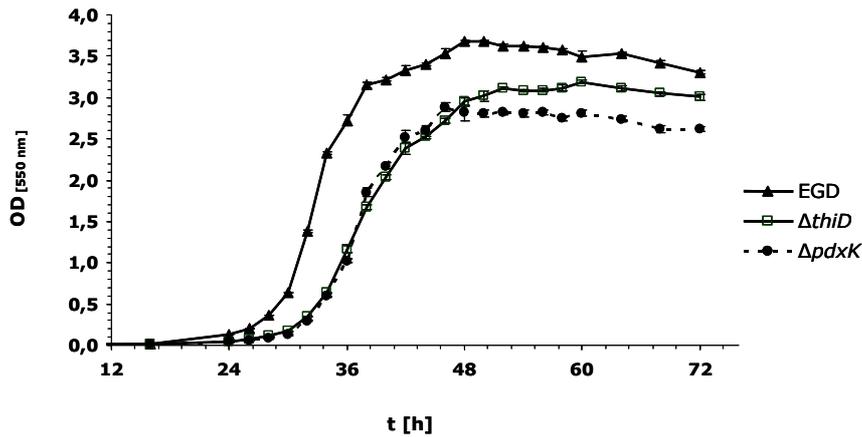


Abb.19: Wachstum von *L. monocytogenes* EGD und Deletionsmutanten in definiertem Minimalmedium mit 50 mM Glucose als Kohlenstoffquelle und 1 mg/l Thiamin. Dieses Wachstumsverhalten konnte auch durch wiederholte Versuche bestätigt werden.

Dieser Effekt könnte darauf beruhen, dass die Kinase PdxK aufgrund ihres offensichtlich sehr breiten Substratspektrum gleichzeitig an mehreren weiteren Stoffwechselwegen beteiligt ist, die wiederum alle miteinander direkt oder indirekt verknüpft zu sein scheinen. Zumal die *thiD*-Mutante nur einen sehr leichten Wachstumsunterschied gegenüber dem Wildtyp aufweist, könnte es bedeuten, dass die im Zellkultursystem festgestellte verminderte intrazelluläre Replikation nicht durch ein verzögertes Wachstum begründet ist, sondern durch einen direkten Effekt der Mutation auf die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit der Listerien.

3.2.3.2 Das Wachstum der *pdxK*-, *thiD*- und *thiT*-Mutanten in Gegenwart von 4-Amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin (HMP)

Das Thiamin besteht aus zwei Heterozyklen, einem Pyrimidin-Ring (4-Amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin, HMP) und einem Thiazol-Ring (5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazol, HET), die über eine Methylen-Gruppe miteinander verbunden sind. In Bakterien leitet sich die HMP-Bildung von 5-Aminoimidazolribonukleotid (AIR) ab, einem Zwischenprodukt in der Purinbiosynthese, wobei der Synthesemechanismus noch größtenteils ungeklärt ist [Begley *et al.*, 1999; Lawhorn *et al.*, 2004]. Die Verknüpfung zwischen der Purin- und Thiaminbiosynthese stellt das *thiC*-Genprodukt her, das im *L. monocytogenes*-Genom nicht gefunden werden konnte, wodurch die *de novo* Thiaminsynthese als nicht komplett gilt [Glaser *et al.*, 2001]. Der nächste Schritt in der Synthese des Pyrimidin-Rings gehört zu den Aufgaben der HMP-Kinase ThiD und der Pyridoxalkinase PdxK, die die Phosphorylierungen von HMP zu HMP-PP ausführen. Zur Analyse der Substratspezifität dieser Enzyme wurden Wachstumsversuche mit den entsprechenden Deletionsmutanten durchgeführt, bei denen Thiamin im Minimalmedium durch HMP ersetzt wurde. Gleichzeitig sollte durch diesen Versuch auch untersucht werden, ob HMP neben Thiamin ebenfalls das Substrat des putativen ThiT-Transporters darstellt oder ein separater HMP-Transporter existiert. Um die Aufnahme von HMP durch die Bakterien zu erzielen und danach die

Enzymaktivität von ThiD bzw. PdxK zu beobachten, wurden die untersuchten Stämme über einen längeren Zeitraum in Minimalmedium ohne Thiamin inkubiert, um den intrazellulären Thiaminvorrat zu erschöpfen. Dafür wurden die Stämme zunächst in 10 ml Minimalmedium mit Zusatz von 100 µl LB-Medium über Nacht bei 37°C angezogen. Danach wurden die Bakterienkulturen 1:10 in frischem Thiamin-freien Minimalmedium verdünnt und weitere 12 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen erneut 1:100 in frischem Thiamin-freien Minimalmedium verdünnt und solange bei 37°C inkubiert, bis alle Bakterienkulturen die stationäre Phase erreicht hatten. 1×10^6 Zellen dieser Kulturen wurden dann auf Minimalmedium-Agarplatten ohne Thiamin ausgestrichen, auf die ein mit 20 µl einer 120 mM HMP-Lösung getränktes Filterplättchen gelegt wurde. Die Platten wurden für drei Tage bei 37°C inkubiert. Es ergab sich folgendes Bild (Abb.20):



Abb.20: Wachstum von *L. monocytogenes* EGD und der Deletionsmutanten EGD Δ *thiD*, EGD Δ *pdxK* und EGD Δ *thiT* auf definiertem Minimalmedium mit 50 mM Glucose als Kohlenstoffquelle und HMP statt Thiamin. Dieses Wachstumsverhalten konnte auch durch wiederholte Versuche bestätigt werden.

Der Wildtyp zeigt dabei, wie erwartet, keine Wachstumseinschränkungen, wogegen die *thiD*-Mutante eine völlige Wachstumsdefizienz aufweist. Die *pdxK*-Mutante scheint in ihrem Wachstum leicht geschwächt zu sein, was möglicherweise an der Beteiligung von PdxK an anderen Stoffwechselwegen liegt und die *thiT*-Mutante zeigt wiederum ein wildtypisches Wachstum. Diese Ergebnisse bestätigen eindeutig, dass das *thiD*-Gen für eine HMP-Kinase kodiert und in der Lage ist, sowohl die erste Phosphorylierung von HMP zu HMP-P als auch die zweite von HMP-P zu HMP-PP auszuführen, weil sonst das Wachstum von EGD Δ *pdxK* unter diesen Bedingungen nicht möglich wäre, denn der Pyridoxalkinase PdxK wird nur die zweite Phosphorylierung zugeschrieben. Außerdem ergibt sich hier ein Hinweis auf die Existenz eines HMP-Transporters, da die *thiT*-Mutante trotz des fehlenden Thiamintransporters keine Wachstumsunterschiede im Vergleich zum Wildtyp zeigt, d.h. die Mutante muss in der Lage sein HMP aufzunehmen, um es anschließend in die *de novo* Synthese einzuschleusen. Würde die HMP-Aufnahme über den Thiamintransporter ThiT erfolgen, so sollte die *thiT*-Mutante ebenfalls wie *thiD*-Mutante eine völlige Wachstumsdefizienz aufweisen.

3.2.3.3 Das Wachstum der *thiT*-Mutante im Minimalmedium mit Thiamin, Thiaminmonophosphat und Thiaminpyrophosphat

Unter Standardbedingungen (37°C, Vollmedium) zeigt die *thiT*-Mutante das gleiche Wachstumsverhalten wie der Wildtyp *L. monocytogenes* EGD (Daten nicht gezeigt), weil das Vollmedium eine weit ausreichende Menge an Thiamin enthält, so dass immer noch genügend Thiamin durch Diffusion in die Bakterienzelle gelangt und die *de novo* Synthese unterstützt, weshalb die eingeführte Mutation im Thiamintransport phänotypisch nicht in Erscheinung tritt. Um diese Mutation auch im Phänotyp bestätigen zu können, wurden Wachstumsanalysen von *EGDΔthiT* in definiertem Minimalmedium in Anwesenheit von verschiedenen Thiaminderivaten durchgeführt. Es wurden Thiamin, Thiaminmonophosphat (TMP) und Thiaminpyrophosphat (TPP) in der Endkonzentration 1 mg/l getestet. Dies brachte folgendes Ergebnis (Abb.21):

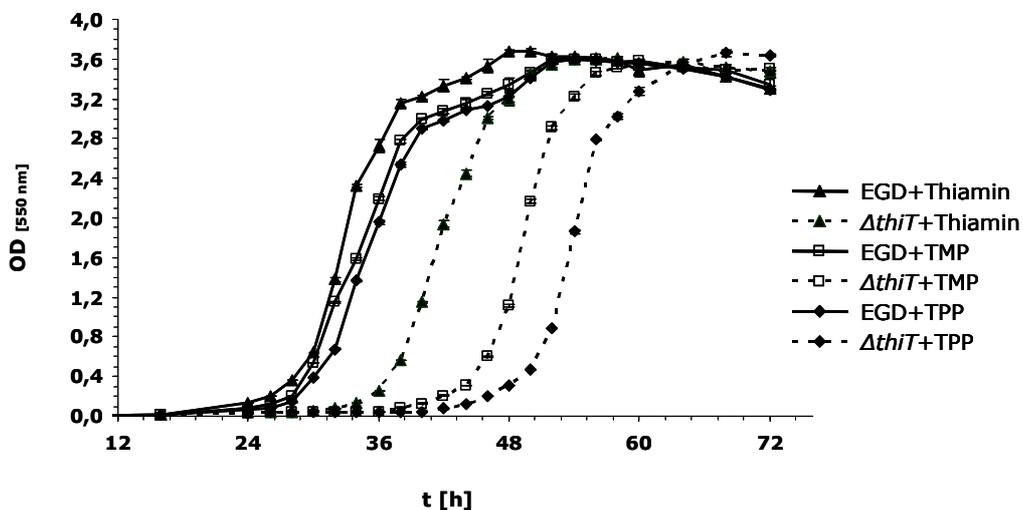


Abb.21: Wachstum von *L. monocytogenes* EGD (durchgezogene Linie) und *EGDΔthiT* (gestrichelte Linie) in definiertem Minimalmedium mit 50 mM Glucose als Kohlenstoffquelle und verschiedenen Thiaminderivaten: Thiamin, Thiaminmonophosphat (TMP) und Thiaminpyrophosphat (TPP). Dieses Wachstumsverhalten konnte auch durch wiederholte Versuche bestätigt werden.

Die Wachstumsmessungen des Wildtyps zeigen keine Bevorzugung gegenüber den getesteten Thiaminderivaten. In allen drei Ansätzen (mit Thiamin, TMP und TPP) ist ein ähnliches Wachstum zu sehen und die Kulturen erreichen nach 48 h eine optische Dichte von 3,6. Während bei der *thiT*-Mutante im Vollmedium keinerlei Unterschiede gegenüber dem Wildtyp in Bezug auf das Wachstum zu sehen waren, weist der Stamm *EGDΔthiT* in Minimalmedium dagegen deutliche Unterschiede in seinem Wachstumsverhalten auf. In der logarithmischen Wachstumsphase verhält sich die *thiT*-Mutante wildtypisch und zeigt auch keinen Unterschied in der Wachstumsrate, indem sie die gleiche optische Dichte von 3,6 erreicht. Dafür weist die Mutante in allen Ansätzen verglichen mit dem Wildtypstamm eine längere lag-Phase, die für den Ansatz mit Thiamin bei ca. 10 h, für den Ansatz mit TMP bei ca. 14 h und für den Ansatz mit TPP bei ca. 20 h liegt. Dennoch ist ein effizientes Wachstum auch mit der *thiT*-Deletion möglich, weil Thiamin passiv in die Bakterienzelle diffundiert und den Verlust des Thiamintransporters dadurch komplementiert. Damit lässt sich sowohl die wildtypische

Wachstumsrate als auch die verlängerte lag-Phase von *thiT*-Mutante in dem Ansatz mit Thiamin erklären: Der passive Transport benötigt längere Zeit, um die gleiche Menge an Thiamin in die Zelle zu bringen als der aktive Transport, sobald aber eine ausreichende Thiaminmenge in der Zelle vorliegt, tritt ein wildtypisches Wachstum ein. Die Tatsache, dass dieser Effekt auch bei den Ansätzen mit TMP und TPP jedoch mit noch längeren lag-Phase zu beobachten ist, lässt vermuten, dass die phosphorylierten Formen von Thiamin nicht passiv diffundieren und wahrscheinlich auch nicht vom ThiT-Transporter transportiert werden können, solange sie nicht zu Thiamin dephosphoryliert werden. Dies wird von den sauren Phosphatasen durchgeführt. Die zusätzliche Zeitaufwendung für die Dephosphorylierung begründet somit die im Vergleich zum Wachstum mit Thiamin noch längere lag-Phase in den Ansätzen mit TMP und TPP. Im Gegensatz dazu fällt dieser Unterschied in der Länge der lag-Phase beim Zusatz verschiedener Thiaminderivate bei dem Wildtyp nicht auf, denn er wird durch die schnelle Aufnahme durch den aktiven Transport seitens ThiT-Transporter überdeckt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das *thiT*-Gen tatsächlich für einen Thiamintransporter kodiert, dessen Substratspezifität sich offensichtlich auf keine Thiaminvorstufen wie HMP, sondern nur auf die dephosphorylierte Thiaminform erstreckt.

Um einen weiteren Nachweis zu erbringen, dass die Veränderungen in der Virulenz als auch im Wachstum unter bestimmten Bedingungen nur auf der eingeführten Mutation in dem *thiT*-Gen beruhen, wurde versucht, die Deletion durch eine Komplementierung wieder aufzuheben, um dadurch bei der Mutante EGD Δ *thiT* wieder wildtypisches Verhalten zu erzielen. Hierfür wurde das *thiT*-Gen in verschiedene Vektoren kloniert und in EGD Δ *thiT*-Stamm transformiert. Als Vektoren wurden pHPS9, pPL2 und pDG148-Stu verwendet (Anhang S.151). Aus ungeklärten Gründen konnte allerdings bei EGD Δ *thiT* mit keinem der Vektoren eine Komplementierung erreicht werden. Alle drei Vektoren sind für die Komplementierung geeignet und wurden bei *L. monocytogenes* als auch bei einigen anderen Bakterien erfolgreich zu diesem Zwecke eingesetzt, was auch durch die Komplementierung der Deletionsmutante EGD Δ *pdxK*, die als Kontrolle diente, mit dem pPL2-Vektor erfolgreich bestätigt werden konnte.

3.2.3.4 Das Wachstum der *thiT*-Mutante in Gegenwart von Pyrithiamin

Pyrithiamin ist ein Thiaminanalogen und wird über denselben Transportweg wie Thiamin in die Zelle aufgenommen. Im Gegensatz zu Thiamin hemmt Pyrithiamin durch seine Bindung an die Thiaminpyrophosphokinase ThiN (Lmo1817) ihre enzymatische Aktivität, wodurch der letzte Schritt der *de novo* Thiaminsynthese unterbrochen wird [Liu *et al*, 2006]. Die Thiaminpyrophosphokinase ThiN katalysiert die direkte Phosphorylierung des Thiamins zu Thiaminpyrophosphat (TPP), das die biologisch aktive Form des Thiamins ist. Der antagonistische Effekt von Pyrithiamin auf das Wachstum von Organismen wird deshalb oft zum Nachweis von Thiamintransport eingesetzt und soll hier ebenso einen weiteren Nachweis zur Funktion des *thiT*-Gens erbringen. Hierzu wurden die Stämme *L. monocytogenes* EGD und EGD Δ *thiT* unter denselben Bedingungen, wie unter 3.2.3.2 beschrieben, angezogen und anschließend 1×10^6 Zellen auf Minimalmedium-Agarplatten mit 0,01 mg/l Thiamin

ausgestrichen, auf die ein mit 10 µl einer 2 mM Pyrithiamin-Lösung getränktes Filterplättchen gelegt wurde. Die Thiaminkonzentration von 0,01 mg/l ist die niedrigste Thiaminmenge, bei der *L. monocytogenes* noch ein effizientes Wachstum auf Minimalmedium-Agarplatten zeigt. Die Platten wurden für drei Tage bei 37°C inkubiert. Es ergab sich folgendes Bild (Abb.22):

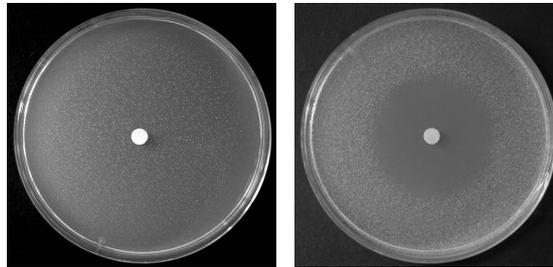


Abb.22: Wachstum von *L. monocytogenes* EGD und EGD Δ *thiT* in Gegenwart von Pyrithiamin auf Minimalmedium-Agarplatten mit 0,01 mg/l an Thiamin. Dieses Wachstumsverhalten konnte auch durch wiederholte Versuche bestätigt werden.

Die Resistenz der *thiT*-Mutante gegen Pyrithiamin im Gegensatz zum sensitiven Wildtyp ist deutlich zu erkennen: Die Deletionsmutante zeigt keine Bildung eines Hemmhofes um das mit Pyrithiamin getränkte Filterplättchen und weist beinahe ein wildtypisches Wachstum auf, während beim Wildtyp ein im Durchmesser 4,2 cm großer Hemmhof zu erkennen ist und das Wachstum nur am Plattenrand stattfindet. Das leicht verminderte Wachstum von EGD Δ *thiT* kann damit erklärt werden, dass die *thiT*-Mutante ihren Thiaminbedarf nur über die *de novo* Synthese und im Vergleich zum aktiven Transport langsamer ablaufende Diffusion erhält. Dieses Ergebnis bestätigt somit eindeutig, dass das *thiT*-Gen für einen Thiamintransporter kodiert. Außerdem ergaben sich hier Hinweise auf die Regulation der Thiaminaufnahme durch Thiamin. Einerseits wurden die gewählten Versuchsbedingungen dem antagonistischen Effekt des Pyrithiamins angepasst, welches bei nichtäquimolaren Gemischen (Thiamin und Pyrithiamin) von der Größe der relativen Anteile beeinflusst wird und von dem Phosphorylierungsgrad des Thiamins und der Sauerstoffversorgung abhängt [Hagendorn *et al.*, 1975]. Andererseits sollte dadurch auch die Auswirkung von Thiamin auf die Aufnahmeaktivität von ThiT untersucht werden. Aus diesen Gründen wurde in Vorversuchen getestet, welche minimale Thiaminkonzentration nötig ist, um das Wachstum von *L. monocytogenes* noch zu ermöglichen, denn auf Standardminimalmedium mit 1 mg/l Thiamin konnte auch bei dem Wildtyp keine Sensitivität gegenüber Pyrithiamin beobachtet werden, das als Zeichen der veränderten Aufnahmeaktivität von ThiT gedeutet werden kann. Es kann also davon ausgegangen werden, dass sowohl der Rückgang der Transportaktivität von ThiT beim Wildtyp bei hoher Thiaminkonzentration als auch die Pyrithiaminsensitivität des Wildtyps bei niedriger Thiaminkonzentration sich durch Inaktivierung des ThiT-Proteins oder eine Inhibierung seiner Expression erklären ließe. Da für das *thiT*-Gen eine *thi*-Box vorhergesagt ist, ist es wahrscheinlicher, dass die Expression des *thiT*-Gens durch TPP über diese *thi*-Box reprimiert wird.

3.2.4 [³H]-Thiamin-Aufnahme-Kinetik in DH5α/pDG148-Stu-*thi*T

Um die Transportaktivität des Thiamintransporters ThiT näher zu charakterisieren, wurden Aufnahmeversuche mit [³H]-Thiamin heterolog in *E. coli* DH5α/pDG148-Stu-*thi*T durchgeführt. Bei der Aufnahme von radioaktiv markiertem Thiamin wurden Messproben in verschiedenen Zeitintervallen über unterschiedlich lange Zeiträume hinweg genommen, wobei stets das gleiche in Abbildung 23 dargestellte Ergebnis zustande kam.

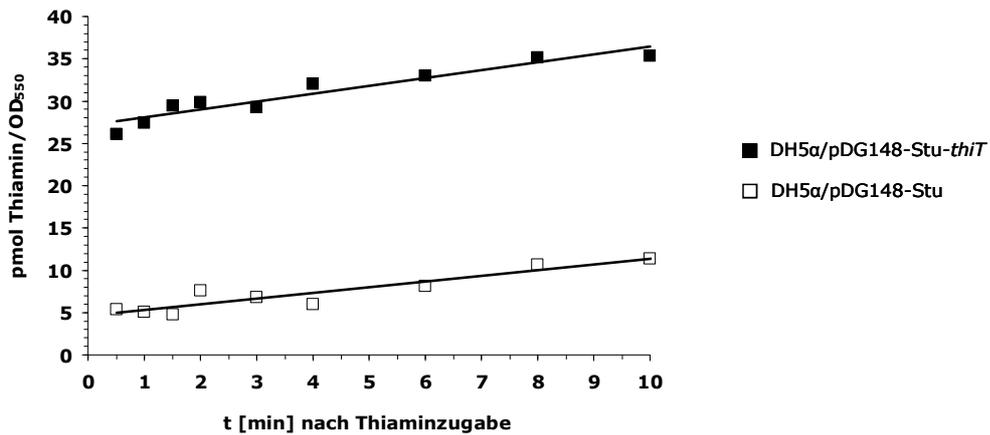


Abb.23: [³H]-Thiamin-Aufnahme-Kinetik in DH5α/pDG148-Stu-*thi*T und DH5α/pDG148-Stu.

Erwartet wurde eine lineare, bei niedrigem Ausgangsniveau startende und mit der Zeit ansteigende Transportaktivität, die, wie Abbildung 23 zeigt, nicht gegeben war. *E. coli* DH5α/pDG148-Stu-*thi*T besaß zwar eine lineare Kinetik, die aber bereits zu Beginn der Messung hohe Werte und über den zeitlichen Messraum gesehen nur einen geringfügigen Anstieg aufwies. Auch der Kontrollstamm *E. coli* DH5α/pDG148-Stu scheint minimal Thiamin aufzunehmen. Darüber hinaus lässt sich jedoch ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Stämmen erkennen, der sich in der fünffach höheren Transportaktivität von DH5α/pDG148-Stu-*thi*T äußert. Der nur leichte Anstieg der Transportaktivität könnte mehrere Gründe haben, von denen einer definitiv ausgeschlossen werden kann, und zwar, dass bereits zu Beginn der Messung fast die gesamte [³H]-Thiaminmenge gebunden und transportiert worden ist. Die Kontrollmessung des Überstandes, bei der der gesamte Ansatz 30 Sekunden nach der Thiaminzugabe abzentrifugiert wurde, ergab nämlich, dass beinahe die gesamte zur Messung zugegebene [³H]-Thiaminmenge noch im Überstand vorhanden war. Dementsprechend lässt sich vermuten, dass der listerielle ThiT-Transporter entweder eine sehr hohe Affinität bzw. Bindung zu seinem Substrat, dem Thiamin, hat und nur langsam dieses ins Zellinnere transportiert, wogegen aber die Wachstumsversuche im Minimalmedium sprechen, oder, was offensichtlicher erscheint, die dargestellte Messreihe nur die Bindung von Thiamin an den Transporter ThiT aber keinen Transport zeigt.

3.3 Charakterisierung der Teichonsäuren-Biosynthese von *L. monocytogenes*

3.3.1 Phänotypische Analyse der Teichonsäuren-Mutanten von *L. monocytogenes* im Zellkultursystem

Eine Funktion als Virulenzfaktor konnte den Teichonsäuren von *L. monocytogenes* bei der Interaktion der Bakterien mit Wirtszellen bisher nicht zugeschrieben werden. Ihre indirekte Beteiligung an der Kolonisation der Wirtszellen erscheint jedoch möglich. Aus diesem Grund wurden die Teichonsäuren-Mutanten von *L. monocytogenes* auf die Kolonisation verschiedener eukaryotischer Zelllinien untersucht, um einen möglichen Einfluss der Veränderungen im Oberflächenphänotyp der *Listeria*-Mutanten auf die Kolonisation zu überprüfen.

Hierzu wurden die Zelllinien Caco-2, Cos-1, HBMEC, HeLa, HEp-2 und J774A.1 mit dem Wildtypstamm *L. monocytogenes* EGD und den Mutanten EGD Δ *mo1085* und EGD Δ *tagB*, denen jeweils ein unterschiedliches Gen für das Protein B der Teichonsäuren-Synthese fehlt, infiziert, dann zu verschiedenen Zeitpunkten die Bakterien aus den eukaryotischen Zellen isoliert und der Bakterientiter durch Anlegen von Verdünnungsreihen und Ausplattieren auf BHI-Medium bestimmt. Die Titer der untersuchten *Listeria*-Stämme sind im zeitlichen Verlauf in Abbildung 24 dargestellt.

ERGEBNISSE

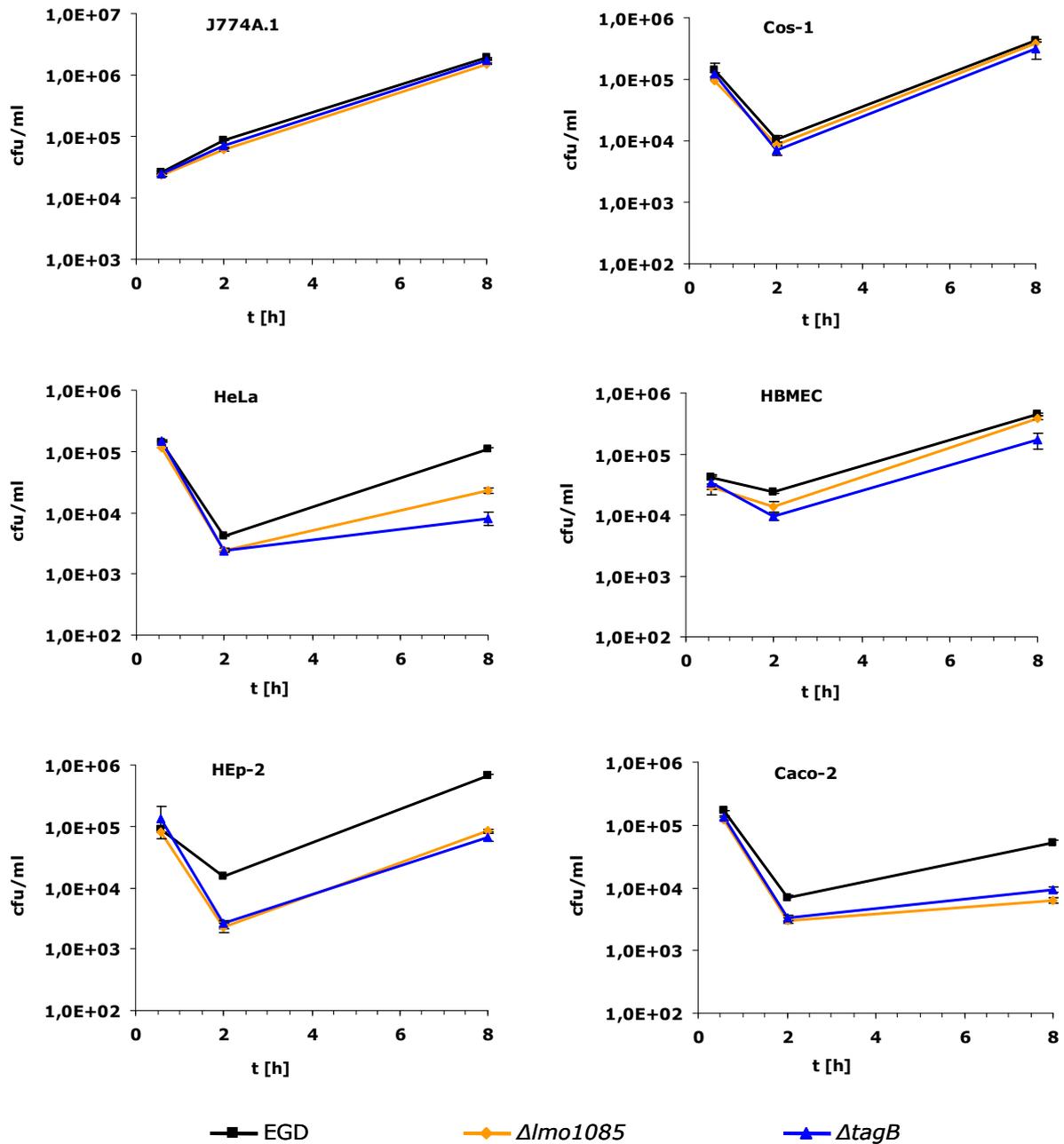


Abb.24: Kolonisation von verschiedenen Zelllinien durch $EGD\Delta lmo1085$ und $EGD\Delta tagB$ im Vergleich zu *L. monocytogenes* EGD. J774A.1, murine Monocyten-Makrophagenzellen; Cos-1, fibroblastenähnliche Affennierenzellen (Grünen Meerkatzen); HeLa, humane, epithelähnliche Gebärmutterhalskarzinomzellen; HBMEC, humane, mikrovaskuläre Hirnendothelzellen; HEp-2, humane, epithelähnliche Kehlkopfkarzinomzellen; Caco-2, humane, epitheliale Dickdarmadenokarzinomzellen.

Mit Ausnahme von der Zelllinie J774A.1, zeigen die obigen Darstellungen das typische Verhalten von Bakterientiter aus infizierten nicht professionell phagozytischen Zellen. Etwa nach einer Stunde nach der Infektion nimmt die Bakterienzahl zunächst rapide ab, da nicht alle bei der Infektion eingesetzten Bakterien an den Wirtszellen adhären und von diesen anschließend internalisiert werden. Nach der Freisetzung der Bakterien aus dem Phagosom in das Cytosol der Wirtszelle, beginnt auch ihre intrazelluläre Vermehrung, wodurch der Bakterientiter wieder stetig ansteigt. J774A.1 Zellen sind dagegen professionell phagozytische

Zellen, bei denen die Induktion der Bakterienaufnahme, im Gegensatz zu den anderen Zelllinien, nicht notwendig ist, weshalb das Absinken des Bakterientiters nicht stattfindet.

Beim Vergleich der Kolonisationsfähigkeit von *Listeria*-Mutanten und *Listeria*-Wildtyp lässt sich in J774A.1 und Cos-1 Zellen kein signifikanter Unterschied feststellen. Die Inaktivierung der Gene *Imo1085* bzw. *tagB*, die beide ein Protein B der Teichonsäuren-Synthese kodieren, hat demnach keinen Effekt auf die Invasivität der Stämme und bewirkt auch keine Verminderung der intrazellulären Replikation in diesen Zelllinien. Dies könnte aber auch darauf beruhen, dass es sich bei den beiden Zelllinien um nicht humane bzw. epithelähnliche Zellen handelt.

Im Gegensatz dazu zeigt der Verlauf der Kolonisation und der intrazellulären Replikation der beiden Teichonsäuren-Mutanten in den Zelllinien HeLa, HBMEC, HEp-2 und Caco-2 einen deutlichen Unterschied zum Kontrollstamm *L. monocytogenes* EGD. Im Vergleich lässt es sich erkennen, dass die Invasivität (t=2h) der Mutanten und folglich auch die intrazelluläre Vermehrung (t=8) wesentlich geringer als die des Wildtyps sind. Dies ist daran zu erkennen, dass der Bakterientiter der beiden Deletionsmutanten zum Zeitpunkt t=2h um den Faktor 1,74 bis 6,08 und zum Zeitpunkt t=8h um den Faktor 2,67 bis 10,10 in allen oben genannten Zelllinien niedriger ist als der des Kontrollstammes, wobei die Invasivität der Teichonsäuren-Mutanten am stärksten in den HEp-2 Zellen und die intrazelluläre Vermehrung in den Caco-2 Zellen beeinträchtigt ist. Zu dem Zeitpunkt t=35 min konnte dagegen in keiner der getesteten Zelllinien ein abweichendes Verhalten der Mutanten im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden. Demzufolge scheint die Adhäsion bei keinem der Mutantenstämme beeinträchtigt und eine direkte Beteiligung der Teichonsäuren an der Adhäsion ausgeschlossen zu sein. Es stellt sich daher die Frage, ob die Unterschiede in der intrazellulären Replikation und ihrer Intensität von einer verminderten Kolonisationsfähigkeit abhängen.

Dazu wurden Caco-2 Zellen über 16 Tage bei 37°C und 5% CO₂ in einem Zellkulturbrutschrank unter kontinuierlichem Mediumwechsel inkubiert, um auf diese Weise die Ausdifferenzierung der Caco-2 Zellen zu polaren Epithelzellen zu bewirken. Eine besondere Eigenschaft der polarisierten Zellen ist, dass diese Zellen mindestens zwei sowohl in der Struktur als auch in der Funktion voneinander unterschiedliche Seiten besitzen. Die Plasmamembran des Darmepithels wird in zwei Regionen unterteilt: die apikale Seite, die dem Darmlumen zugewandt und auf Nährstoffaufnahme spezialisiert ist, und die basolateralen Seiten. Die letzteren übernehmen den Transport der Nährstoffe von der Zelle ins Blut. Des Weiteren wirkt sich die Verschiedenheit der Plasmamembran auch auf die Infektionsmöglichkeiten von *L. monocytogenes* aus. Bei polarisierten Zellen können die Adhäsion und die sich daran anschließende Invasion nur an der apikalen Seite erfolgen. Die Analyse der Teichonsäuren-Mutanten in polarisierten Caco-2 Zellen im Vergleich zu nicht polarisierten Zellen bezüglich der möglichen Abhängigkeit der verminderten intrazellulären Replikation von den Defekten in der vorangegangenen Invasion lieferte die in der Abbildung 25 dargestellten Ergebnisse.

ERGEBNISSE

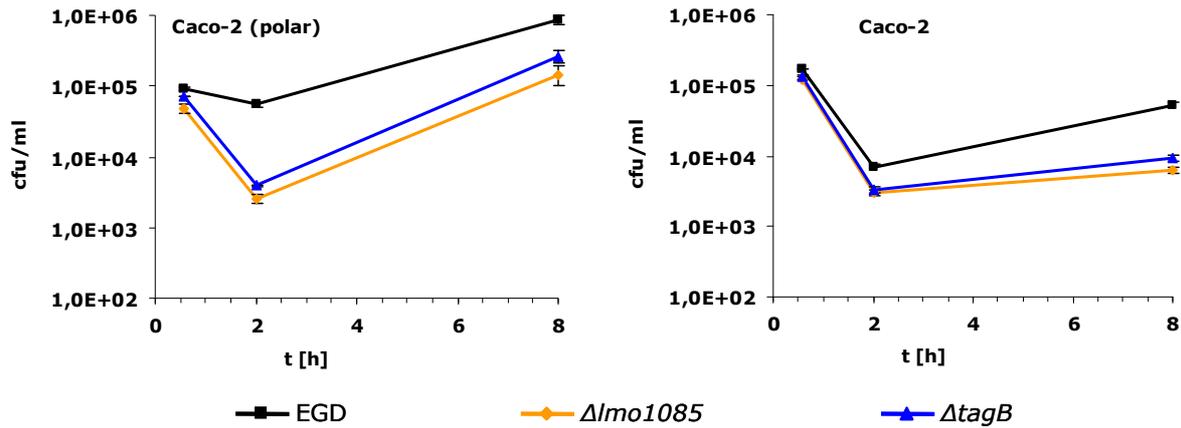


Abb.25: Kolonisation und intrazelluläre Replikation von $EGD\Delta lmo1085$ und $EGD\Delta tagB$ im Vergleich zu *L. monocytogenes* EGD in polarisierten und nicht polarisierten Caco-2 Zellen.

Bei der Betrachtung der Kolonisationsverläufe und der intrazellulären Vermehrung der in der Abbildung 25 dargestellten Stämme $EGD\Delta lmo1085$ und $EGD\Delta tagB$ im Vergleich zum Wildtyp wird deutlich, dass durch die Inaktivierung des Protein B der Teichonsäuren-Biosynthese der Phänotyp der Mutanten nach $t=8h$ unabhängig von der Polarität der Caco-2 Zellen unverändert bleibt, obwohl die Deletionsmutanten signifikant schlechter die polarisierten Epithelzellen invadieren. Der Bakterientiter der beiden Mutanten ist nämlich im Vergleich zum Wildtyp in den polarisierten Caco-2 Zellen zum Zeitpunkt $t=2h$ um den Faktor 21,37 niedriger und in den nicht polarisierten Zellen nur 2,11 beträgt. Der Attenuationsgrad nach $t=8h$ liegt für polarisierten Zellen bei 6,10 und für nicht polarisierten Zellen bei 8,39. Dies wird in der prozentuellen Darstellung der Werte für die Kolonisationsfähigkeit und die intrazelluläre Replikation nochmals deutlicher hervorgehoben (Abb.26).

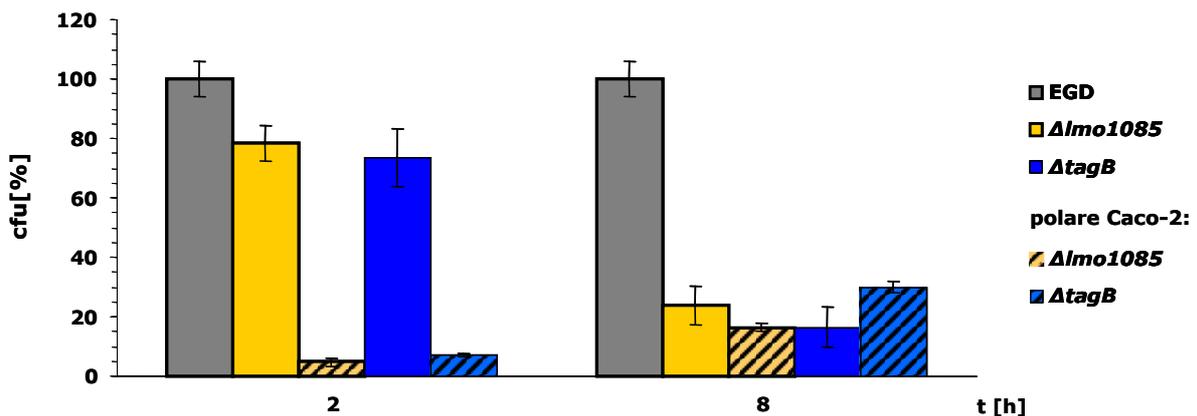


Abb.26: Prozentuelle Darstellung der Kolonisation und der intrazellulären Replikation von $EGD\Delta lmo1085$ und $EGD\Delta tagB$ im Vergleich zu *L. monocytogenes* EGD in polarisierten und nicht polarisierten Caco-2 Zellen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Vergleich zum Wildtyp ein signifikanter Unterschied in der Kolonisation der Mutantenstämme zu erkennen ist. Ein Zusammenhang zwischen der Kolonisation der Wirtszellen durch die Teichonsäuren-Mutanten und ihrer verminderten intrazellulären Vermehrung scheint jedoch nicht vorhanden zu sein, da eine

ebenfalls stärkere Attenuation in der intrazellulären Replikation in den polarisierten Caco-2 Zellen als Folge der viel stärkeren Defekten in der Invasion nicht vorliegt. Dies bestätigen sowohl der Kolonisationsverlauf als auch die zum Zeitpunkt t=8h ermittelten Bakterientiter. Die Untersuchungen in einem murinen *L. monocytogenes* Infektionsmodell ergaben dagegen für beide Stämme EGD Δ *lmo1085* und EGD Δ *tagB* keine signifikante Attenuation, lediglich die Deletionsmutante EGD Δ *lmo1085* zeigte in der Milz einen im Vergleich zum Wildtyp leicht geringeren Bakterientiter (Abb.10, S.65).

3.3.2 Detektion der Pathogenitätsdeterminante *actA* in den Stämmen EGD Δ *lmo1085* und EGD Δ *tagB*

L. monocytogenes benötigt verschiedene bakterielle Faktoren, um in nicht professionell phagozytische Zellen eindringen zu können. Zu diesen Faktoren zählen vor allen viele Oberflächenproteine wie z.B. Internaline, ActA, Ami, FpbA oder das Protein p60. Die Veränderungen in der Oberflächenbeschaffenheit durch Mutation der Teichonsäuren könnten sich somit in einer veränderten Zusammensetzung der Oberflächenproteine widerspiegeln. Vor allem die Rolle von ActA sollte genauer betrachtet werden. Neben der Aktin-vermittelten intrazellulären Bewegung und dadurch möglichen Ausbreitung von Zelle zu Zelle fungiert ActA auch als bakterieller Ligand für die Erkennung des ubiquitär verbreiteten HSPG (Heparansulfat-Proteoglykan)-Rezeptors auf verschiedenen Wirtszellen, wodurch das ActA-Protein die Anheftung und Invasion von *L. monocytogenes* in ihre Wirtszelle vermittelt. Um dies zu überprüfen, wurden zum einen die Gesamtproteinextrakte erstellt und zum anderen nur die Oberflächenproteine von den Stämmen *L. monocytogenes* EGD, EGD Δ *lmo1085* und EGD Δ *tagB* extrahiert, um sie anschließend im SDS-PAGE-Gel (Abb. 27) und im Western-Blot (Abb.28) zu analysieren. Neben der ActA-Expression wurde auch die Expression von InIB untersucht.

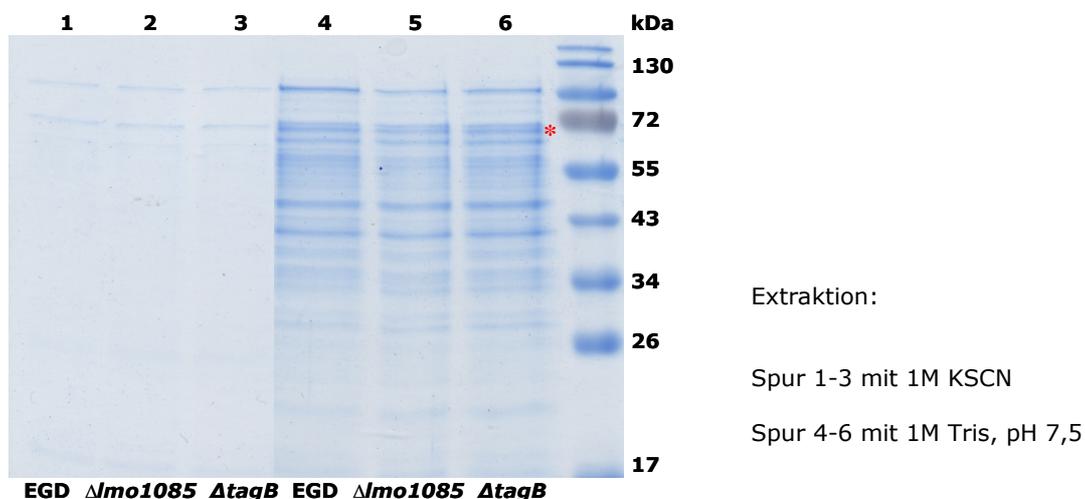


Abb.27: Analyse der Oberflächenproteinextrakte aus *L. monocytogenes* EGD, EGD Δ *lmo1085* und EGD Δ *tagB* in einem 12,5%-igen SDS-PAGE-Gel. Von jedem Extrakt wurde die gleiche Proteinmenge aufgetragen. Mit einem roten Sternchen ist die Proteinbande für InIB markiert.

Die im SDS-Gel aufgetrennten Oberflächenproteinextrakte von *EGDΔ*imo1085** und *EGDΔ*tagB** sowie die Western-Blot-Analysen der Gesamtproteinextrakte hinsichtlich des Vorhandenseins von ActA (Abb.28) und InIB (Daten nicht gezeigt) zeigen keinen Unterschied zum Wildtyp. Wie in Abbildung 28 zu erkennen ist, ist die *actA*-Expression in allen drei Stämmen gleich stark. Bei der zusätzlichen markanten Bande und einigen weiteren auf der Originalmembran schwach erscheinenden Banden handelt es sich um Abbauprodukte von ActA, die ebenfalls durch das polyklonale anti-ActA-Kaninchenserum erkannt werden.

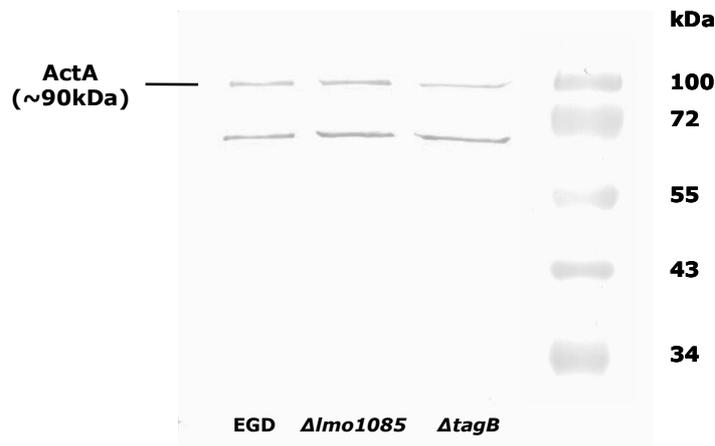


Abb.28: Nachweis von ActA in Gesamtproteinextrakten aus *L. monocytogenes* EGD, *EGDΔ*imo1085** und *EGDΔ*tagB** mittels Western-Blot. Es wurden die gleichen Proteinmengen aufgetragen.

Aus dem Ergebnis über den Nachweis der Pathogenitätsdeterminanten ActA und InIB lässt sich somit schließen, dass deren Expressionslevel in den Teichonsäure-Mutanten denen im Wildtyp entsprechen. Die zuvor beobachtete verminderte Invasionsfähigkeit der Teichonsäure-Mutanten beruht also nicht auf einer verminderten Expression der an der Oberfläche lokalisierten Virulenzfaktoren InIB oder ActA, sondern scheint eher ein direkter Effekt zu sein, der durch die Veränderungen in der Teichonsäuren durch Einführen von Mutationen in Gene *tagB* und *Imo1085*, die für das Protein B der Teichonsäuren-Biosynthese kodieren, vermittelt wird. Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass die Expression oder Funktionalität anderer Oberflächenproteine durch die veränderten Teichonsäuren vermindert sein könnte.

3.3.3 Physiologische und biochemische Analyse der Teichonsäuren-Mutanten von *L. monocytogenes*

Die Ausprägung einer Mutation im Phänotyp ist an eine Reihe von Folgeprozessen gebunden, so dass die genotypischen Veränderungen je nach der Mutationsart entweder sofort oder erst nach mehreren Generationen unter geeigneten Bedingungen phänotypisch erkennbar sind. Die Untersuchung der Mutanten hinsichtlich der engen Bindung der biochemischen Funktionen an zelluläre Strukturen und der Bedeutung von Querverbindungen zwischen primär verschiedenen Stoffwechselbereichen der Zelle ist somit unerlässlich.

3.3.3.1 Wachstum der aus Caco-2 isolierten Teichonsäuren-Mutanten auf Vollmedium

Die erste Kontaktaufnahme des Pathogens mit seiner Wirtszelle erfolgt durch Oberflächensignalmoleküle und kann entweder zu einer kompatiblen oder inkompatiblen Reaktion führen. Bei der Entwicklung einer kompatiblen Reaktion werden durch die Zell-Zell-Wechselwirkungen physiologische Antworten induziert, welche für weitere Interaktionen notwendig sind. Es kann aber auch zur Auslösung einer Abwehr der Wirtszelle kommen. Bei Pflanzen äußert sich die inkompatible Reaktion meist in Form eines lokalen schnellen Absterbens der Pflanzenzellen in der Umgebung der Infektionsstelle und ist durch die Bildung von Nekrosen äußerlich erkennbar. Durch das Zurückhalten der Bakterien in dieser Zone werden die umliegenden Gewebe effektiv geschützt. Die tierischen Zellen besitzen ebenfalls zahlreiche Mechanismen zur Abwehr von Bakterien, die jedoch oft nicht äußerlich erkennbar sind und sich normalerweise aus dem Zusammenspiel verschiedener Mechanismen zusammensetzen. Sowohl die Abwehrmechanismen der eukaryotischen Zellen gegenüber dem Pathogen als auch die Schutzmechanismen des Pathogens gegenüber der eukaryotischen Abwehr sind noch weitgehend unbekannt. Auch *L. monocytogenes* ist diesbezüglich noch wenig erforscht worden.

Bei den Untersuchungen der Teichonsäuren-Mutanten im Zellkultursystem mit der Zelllinie Caco-2 fiel allerdings auf, dass die zum Zeitpunkt $t=35$ min isolierten und zur Bestimmung des Bakterientiters auf BHI-Medium ausplattierten und über Nacht bei 37°C bebrüteten Listerien eine zum Wildtypstamm abweichende Koloniemorphologie aufwiesen (Abb.29).

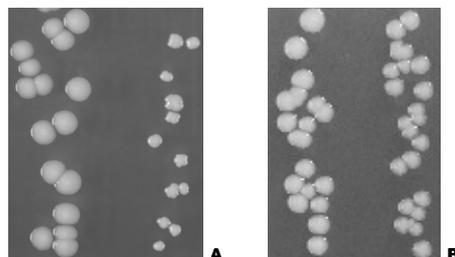


Abb.29: Koloniemorphologie von aus Caco-2 Zellen isolierten *L. monocytogenes* EGD (links im Bild) und exemplarisch $\text{EGD}\Delta\text{lmo1085}$ (rechts im Bild) auf BHI-Medium: **A.** zum Zeitpunkt $t=35$ min; **B.** zum Zeitpunkt $t=2\text{h}$.

Listeria-Stämme wachsen auf BHI-Agar zumeist in Form von glatten, glänzenden, leicht gelblichen Kolonien. Diese Zelloberfläche kommt durch den Gehalt an den anionischen Polymeren, den Teichon- und Lipoteichonsäuren, zustande. Die Teichonsäuren-Mutanten weisen unter optimalen *in vitro* Bedingungen dieselbe wildtypische Koloniemorphologie und keine Wachstumsdefekte im Vollmedium auf. Die nach 35 Minuten nach der Infektion aus Caco-2 Zellen isolierten Listerien demonstrieren im Gegensatz dazu eine kleinere und mit einem zackigen Rand, jedoch weiterhin glatte und glänzende Koloniemorphologie, wodurch sie im Vergleich zu den Wildtypkolonien gut erkennbar sind (Abb.28A). Der deutliche Unterschied in der Koloniemorphologie zwischen dem Wildtyp und den beiden Teichonsäuren-Mutanten trat zudem nicht nur beim Ausplattieren von unverdünntem Zelllysate, sondern auch in den

daraus angelegten und ausplattierten Verdünnungsstufen auf. Dieser Effekt konnte allerdings zu keinen anderen Zeitpunkten eines Infektionsversuches beobachtet werden (Abb.28B), weshalb der Einfluss von 0,1%-itigem Detergenz Triton-X-100, welches zur Lyse der eukaryotischer Zellen eingesetzt wurde, definitiv ausgeschlossen werden kann. Die festgestellten Unterschiede in der Kolonimorphologie beruhen demnach nur auf der Inaktivierung der betroffenen Gene.

3.3.3.2 Wachstum unter Stressbedingungen

Der Zellwand von *L. monocytogenes* ist eine Schicht stark wasserhaltigen Materials aufgelagert, die durch die Präsenz von Teichon- und Lipoteichonsäuren entsteht. Sie ist für *L. monocytogenes* zwar nicht lebenswichtig, ihr Besitz verschafft dem Bakterium vermutlich aber sowohl *in vivo* als auch im Boden eine bessere Versorgung mit Nährstoffen. Denn in dieser leicht schleimartigen Schicht werden z.B. Exoenzyme konzentriert, die dadurch leichter an ihre Substrate herankommen. Die Spaltprodukte stellen die Nahrungsquelle von *L. monocytogenes* dar und werden ebenfalls in dieser Schicht in hoher Konzentration gesammelt.

Die Teichonsäuren-Mutanten zeigen im Vollmedium unter optimalen *in vitro* Bedingungen keine Wachstumsdefekte. Um zu untersuchen, ob durch die veränderte Teichonsäuren-Synthese Unterschiede bei den Mutantenstämmen hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens unter Stressbedingungen bestehen, wurden die Deletionsmutanten, EGD Δ *mo1085* und EGD Δ *tagB*, und der Wildtyp sowohl auf Salztoleranz und Temperaturempfindlichkeit als auch auf Sensitivität gegenüber verschiedenen Peptidantibiotika hin untersucht.

Die Salztoleranz der *L. monocytogenes*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp wurde durch Zusatz von 3% NaCl zum BHI-Festmedium und anschließende Inkubation bei 37°C für 24 h untersucht. Das Wachstum bei niedriger Temperatur von 8°C wurde ebenfalls auf BHI-Festmedium über einen Zeitraum von vier Wochen analysiert. Der Phänotyp des Wildtyps und exemplarisch der Deletionsmutante EGD Δ *tagB* ist in Abbildung 30 dargestellt.

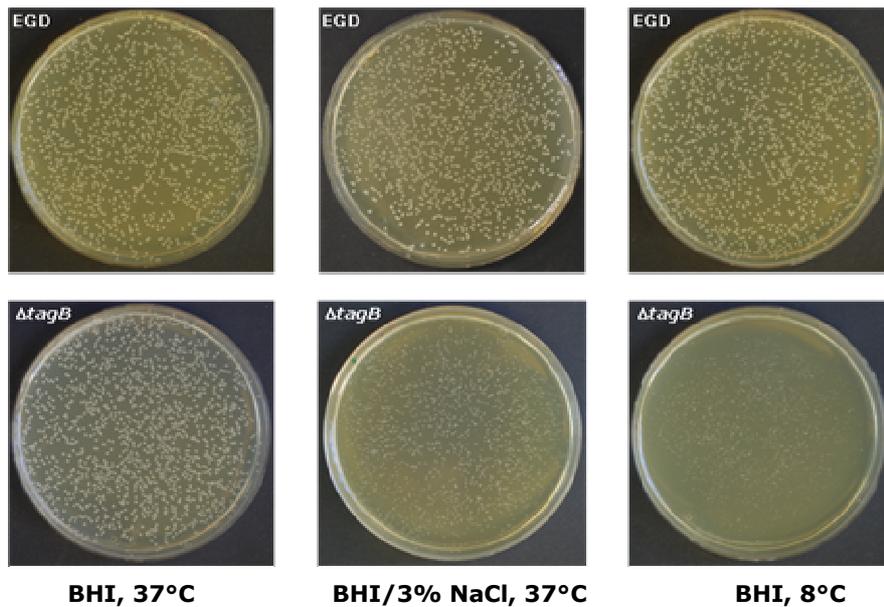


Abb.30: Vergleich des Wachstums von *L. monocytogenes* EGD und exemplarisch EGD Δ tagB unter optimalen Bedingungen und Stressbedingungen auf BHI-Medium. Bei 37°C wurden die Platten für 24 h und bei 8°C für vier Wochen inkubiert.

Der Kontrollstamm *L. monocytogenes* EGD zeigt, wie erwartet, unter allen getesteten Bedingungen eine identische Koloniemorphologie, die sich in Form von runden, glatten, glänzenden Kolonien darstellt. Die tagB-Mutante weist trotz des inaktivierten Gens auf BHI-Medium bei 37°C ebenfalls die gleiche Morphologie wie der Wildtyp auf, was darauf schließen lässt, dass die Teichonsäuren unter optimalen Laborbedingungen für das Wachstum entbehrlich sind. Bei höherer Salzkonzentration und niedriger Temperatur zeigt die tagB-Mutante allerdings eine vom Wildtyp abweichende Koloniemorphologie. Die Salzkonzentration von 3% führt bei der Deletionsmutante EGD Δ tagB bei gleich langer Inkubationszeit zur Bildung kleinerer Kolonien, die nach weiteren 12 h Bebrütung dieselbe Größe wie der Wildtyp erreichen. Das Koloniebild der tagB-Mutante bei niedriger Temperatur von 8°C weist dagegen gleichzeitig mehrere Abweichungen zum Wildtyp auf. Die Kolonien besitzen einen zackigen Kolonierand und sind unterschiedlich groß, wobei der größte Teil klein ist. Eine ähnliche Koloniemorphologie wurde auch für Imo1085-Mutante beobachtet.

Weiter wurden die beiden Deletionsmutanten auf ihre Sensitivität gegenüber den drei Peptidantibiotika, Bacitracin, Colistin und Polymyxin B, mittels Agardiffusionsverfahren untersucht. Hierfür wurde eine Bakteriensuspension definierter Dichte auf Mueller-Hinton-Agarplatten, welche für die Sensitivitätstestung auf Antibiotika empfohlen werden, ausplattiert, ein Filterpapierplättchen mit definierter Antibiotikakonzentration in die Mitte der Platte aufgelegt und die Platte anschließend für 48 h bei 37°C inkubiert. Anhand der Hemmhofdurchmesser, die um die Plättchen entstehen, wurden dann Rückschlüsse auf die Sensitivität des jeweiligen Stammes gegenüber dem eingesetzten Antibiotikum gezogen. Im Vergleich zum Wildtyp konnte nur für EGD Δ tagB und das Peptidantibiotikum Colistin, welches mit Phospholipid-Komponenten der Cytoplasmamembran reagiert und sie dadurch permeabel macht, eine geringe Sensitivität beobachtet werden. Der Hofdurchmesser betrug dabei 9 mm gegenüber 5 mm beim Wildtyp.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich somit schließen, dass die inaktivierten Gene *tagB* und *Imo1085* und folglich auch die Teichonsäurensynthese eine wichtige Rolle beim Überleben unter Stressbedingungen spielen könnten.

3.3.3.3 Untersuchung der Zellwandstabilität mittels Mutanolysinassay

Die Inaktivierung eines Gens kann z.B. dazu führen, dass die Mutante in ihrem Wachstum beeinträchtigt oder sogar gehemmt ist. Bei den Genen der Teichonsäuren-Biosynthese ist es denkbar, dass die Inaktivierung bereits von einem der Gene einen Einfluss auf den Zellwandstoffwechsel ausüben könnte, da diese beiden Stoffwechselwege eng miteinander gekoppelt sind. Die Veränderungen in der Zellwand können minimal sein, so dass das Wachstum der Bakterien noch gewährleistet wird, oder es können gravierendere Folgen auftreten, wie z.B. das Platzen der Zellen, weil die Zellmembran allein nicht dem im Inneren der Zelle herrschenden osmotischen Druck widerstehen kann.

Die *tagB*- und *Imo1085*-Mutanten verhalten sich unter optimalen Laborbedingungen wildtypisch, zeigen andererseits Wachstumsdefekte bei höher Salzkonzentration und niedrigerer Temperatur. Um einen eventuellen Einfluss der Teichonsäuren-Biosynthese auf die Stabilität der Zellwand auszuschließen, wurden die beiden Deletionsmutanten auf die Sensitivität gegenüber Mutanolysin getestet. Mutanolysin ist eine N-Acetylmuramidase aus *Streptomyces globisporus* 1829, ein bakteriolytisches Enzym, welches in der Lage ist, das Peptidoglykan der Zellwand zu depolymerisieren. Zur Analyse der Mutanolysinwirkung auf *Listeria*-Stämme wurde die Lyse von Bakterien in 20 ml Lysis-Puffer (50 mM NaH₂PO₄) bei 30°C mit und ohne Zusatz von Mutanolysin gemessen. Das Resultat ist in Abbildung 31 dargestellt.

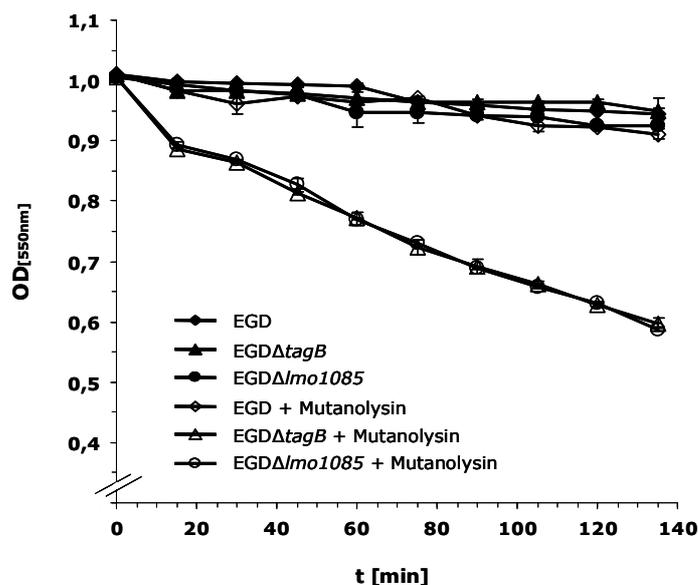


Abb.31: Mutanolysinsensitivität der *Listeria*-Stämme EGD, EGDΔ*Imo1085* und EGDΔ*tagB*.

Der Vergleich der lytischen Aktivität von Mutanolysin gegenüber den getesteten *Listeria*-Stämmen lässt erkennen, dass die *tagB*- und *Imo1085*-Mutanten um den Faktor 1,57

sensitiver auf Mutanolysin reagieren, denn bereits nach einer Stunde wurden im Vergleich zu den Kontrollstämmen ohne Zusatz von Mutanolysin und dem Wildtyp mit Mutanolysin ca. 20% der Gesamtzellen von EGD Δ *lmo1085* und EGD Δ *tagB* lysiert.

Dies deutet darauf hin, dass die Teichonsäuren und infolgedessen auch ihre Synthese in den Zellwandstoffwechsel involviert sein müssen und eine höhere lytische Mutanolysinaktivität auf die Unvollständigkeit bzw. das Fehlen der Teichonsäuren zurückzuführen ist.

3.4 Charakterisierung eines Oligopeptid-ABC-Transporters

Bei Bakterien sind Bindeprotein-abhängige Transportsysteme (ABC-Transporter) an diversen Prozessen beteiligt. Unter anderem dienen sie der Aufnahme von Nährstoffen, wie Zuckern, Aminosäuren, Peptiden, anorganischen Ionen oder Vitaminen und sind für die bakterielle Pathogenese und die Sporulation von Bedeutung. Außerdem sind sie durch den Transport von Signalmolekülen an Signaltransduktionsvorgängen beteiligt. Die zu transportierenden Substrate werden in der Regel auf der extrazellulären Seite der Membran durch ein Bindeprotein spezifisch gebunden und auf die Permease übertragen, auf der cytoplasmatischen Seite der Membran wird ATP durch ATPase-Untereinheit gebunden und hydrolysiert, wodurch die für den Transport benötigte Energie bereitgestellt wird.

Ein erfolgreiches Replizieren von *L. monocytogenes* im Cytosol ihrer Wirtszelle ist unter anderem auf die Fähigkeit des Pathogens, ihren Metabolismus an die Gegebenheit der Wirtszelle anzupassen, indem z.B. alternative Stoffwechselwege und Aufnahmesysteme für verschiedene Substrate induziert werden, zurückzuführen. Infolgedessen ist es auch nicht erstaunlich, dass auch im Caco-2 Screening der *L. monocytogenes* Insertionsmutantenbank „Transport- und Bindeproteine“ mit 18% die größte funktionelle Klasse darstellt. Ein Vertreter dieser funktionellen Klasse, der ABC-Transporter Lmo0135-0137, wurde in dieser Arbeit näher untersucht.

3.4.1 Analyse des Pathogenitätsverhaltens von *lmo0135-0137*-Deletionsmutante

Sequenzvergleiche auf Aminosäureebene und die Annotierung der Gene ergaben zunächst, dass es sich bei dem zu untersuchenden Transporter um einen Oligopeptid-ABC (*ATP binding cassette*)-Transporter handeln könnte, der durch drei in einem Operon organisierte Gene kodiert wird. Dabei kodiert das Gen *lmo0135* für ein 58,29 kDa großes, aus 524 Aminosäuren bestehendes extrazelluläres Bindeprotein der Familie 5, der die extrazellulären Oligopeptid-Bindeproteine wie z.B. OppA, AmiA oder AppA zugeordnet werden. Im N-terminalen Bereich verfügt das Lmo0135-Protein über einen für diese Proteinfamilie markanten Lipidanker, durch den das Bindeprotein in der Cytoplasmamembran in unmittelbarer Nähe der Permease-Untereinheit verankert wird. Die beiden anderen Gene des Operons, *lmo0136* und *lmo0137*, kodieren für Transmembranproteine, die laut dem Sequenzvergleich für einen Peptid/Dipeptid/Oligopeptid-ABC-Transporter typische Domänen aufweisen und somit die Permease-Untereinheit des ABC-Transporters bilden könnten. Beim Genomvergleich mit der

SEED Datenbank stellte sich zudem heraus, dass diesem *Listeria*-Operon ein SAM Riboswitch (S-Adenosyl-Methionin-Riboswitch) vorangeht, durch den normalerweise Gene der Methionin- und Cystein-Biosynthese reguliert werden. Dementsprechend lässt sich vermuten, dass dieser ABC-Transporter in die Aufnahme von Cystein- und/oder Methionin-haltigen Proteinen oder Peptiden involviert sein könnte.

In *E. coli* existieren drei verschiedene Peptid-Transportsysteme mit überlappender Substratspezifität: Dpp, Tpp und Opp. Die Dipeptidpemease Dpp transportiert aus zwei oder drei L-Aminosäuren bestehende Peptide und wird von den Genen *dppA-E* kodiert, die in einem Operon organisiert sind. Die Tripeptidpermease Tpp hat eine hohe Affinität zu hydrophoben Tripeptiden, transportiert aber auch einige Dipeptide. Die Oligopeptidpermease Opp transportiert Peptide einer Länge von zwei bis sechs D- oder L-Aminosäuren. Im *L. monocytogenes*-Genom sind bisher sechs chromosomale Peptidpermease-Operons gefunden worden. Die Substratspezifitäten dieser Permeasen sind bis auf die des *opp*-Operons [Borezee *et al.*, 2000] allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Dabei handelt es sich hier wie bei anderen Bakterien um Di- und Tripeptidpermeasen (Lmo0555 und Lmo1712) sowie um Oligopeptidpermeasen (Lmo0135-0137; Lmo2192-2196, entspricht OppA-F; Lmo1265 und Lmo0152) mit zum Teil überlappender Substratspezifität.

Alle drei Gene des putativen Oligopeptid-ABC-Transporters Lmo0135-0137 wurden beim Screening der *L. monocytogenes* Insertionsmutantenbank in Caco-2 Zellen identifiziert und zeigen eine signifikante Attenuation in der intrazellulären Replikation, die für die Insertionsmutanten in den Genen *Imo0136* und *Imo0137* bei einem Faktor von 4,95 bzw. 9,74 liegt. Die Insertionsmutante in dem *Imo0135*-Gen ist in ihrer intrazellulären Vermehrung sogar um den Faktor 13,75 im Vergleich zum Wildtyp vermindert. Da eine Insertion in allen drei Genen eine Verminderung der intrazellulären Replikation in Caco-2 Zellen bewirkt, wurde eine Deletionsmutante $EGD\Delta Imo0135-0137$ konstruiert, der das gesamte Operon fehlt, und anschließend ebenfalls im Zellkultursystem auf ihre Replikation untersucht (Abb. 32A und 33).

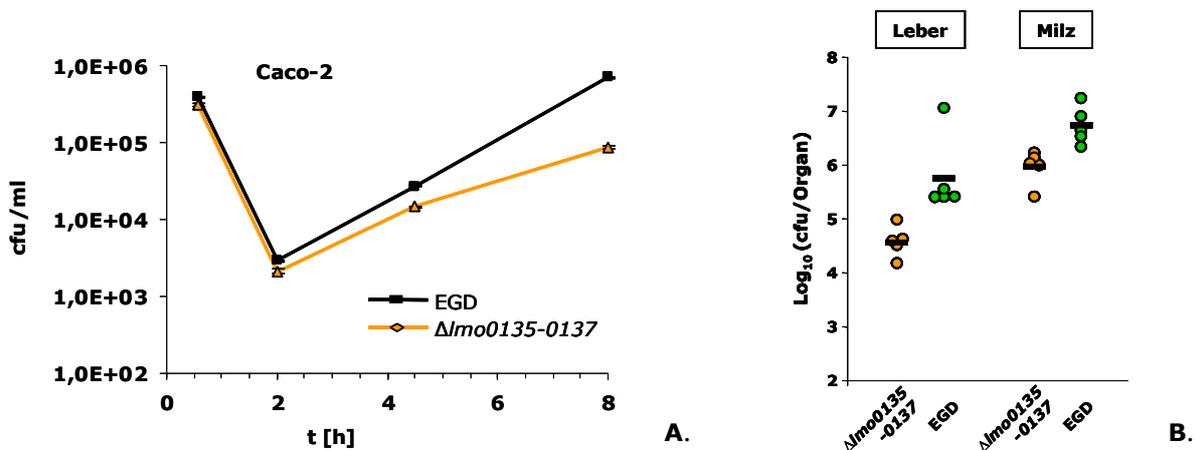


Abb.32: *In vivo* Verhalten der Deletionsmutante $EGD\Delta Imo0135-0137$: **A.** Kolonisation und intrazelluläre Replikation von $EGD\Delta Imo0135-0137$ in Caco-2 Zellen im Vergleich zu *L. monocytogenes* EGD; **B.** Bakterientiter von *L. monocytogenes* EGD und $EGD\Delta Imo0135-0137$ in Milz und Leber. Den BALB/c-Mäusen wurden nach drei Tagen der Infektion die Organe entnommen und in diesen die cfu der Listerien bestimmt. Eine Markierung entspricht einem Tier; die waagerechten Striche geben die Mittelwerte auf der logarithmischen Achse an. Der Wildtypstamm ist grün und die Mutante orange gekennzeichnet.

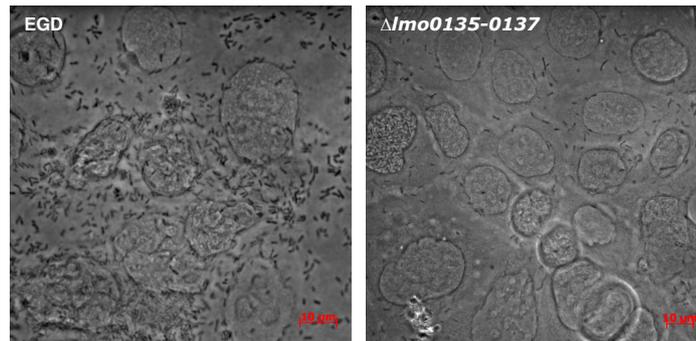


Abb.33: Phasenmikroskopische Aufnahmen von mit den *Listeria*-Stämmen infizierten Caco-2 Zellen 7h nach der Infektion. Der Vergrößerungsmaßstab ist in der rechten unteren Ecke im Bild angegeben. Die Skalierung liegt bei 10 μm .

Die Untersuchung der Transporter-Deletionsmutante im Bezug auf ihre Fähigkeit, sich intrazellulär in Caco-2 Zellen zu vermehren, ergab unter denselben Versuchsbedingungen wie im Screening das gleiche Ergebnis: die Mutante EGD Δ *Imo0135-0137* zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine um den Faktor 8,04 verminderte intrazelluläre Replikation, jedoch keine Defekte in der Adhäsion bzw. Invasion der Caco-2 Zelllinie. Die phasenmikroskopischen Aufnahmen der mit den *Listeria*-Stämmen infizierten Caco-2 Zellen, die nach 7h nach der Infektion aufgenommen wurden, beweisen zusätzlich visuell diesen Befund (Abb.33). Im linken Bild sind die Caco-2 Zellen so mit Bakterienzellen überfüllt, dass sich der Zellrand einzelner Caco-2 Zellen nur schwer erkennen lässt. Im rechten Bild ist dagegen die Umrandung der eukaryotischen Zelle gut sichtbar und die einzelnen Zellen beinhalten nur wenige Bakterienzellen. Neben diesen Ergebnissen zur verminderten intrazellulären Replikation der Transporter-Mutante in Caco-2 Zellen, wird die Wichtigkeit des Oligopeptidtransporters während der Infektion zusätzlich durch verstärkte Expression der Gene *Imo0135* und *Imo0136* in der Makrophagen-Zelllinie J774A.1 unterstützt (Tab.16, Anhang S.143).

Die Korrelation zwischen den durch eine eingeführte Mutation aufgetretenen Veränderungen in der *Listeria*-Mutante und den ausgeprägten Veränderungen in ihrem intrazellulären Pathogenitätsverhalten sollte auch in einem murinen *L. monocytogenes* Infektionsmodell nachgewiesen und statistisch bestätigt werden (Abb.32B). Wie im Zellkultursystem konnte auch in dem Mausmodell eine signifikante Attenuation der Deletionsmutante EGD Δ *Imo0135-0137* beobachtet werden. Insgesamt lässt sich daraus schließen, dass der Oligopeptid-ABC-Transporter Lmo0135-0137 für das intrazelluläre Überleben in den Wirtszellen eine wichtige Rolle spielen muss.

3.4.2 Wachstum der *Imo0135-0137*-Deletionsmutante in Gegenwart von verschiedenen Peptiden

Die Oligopeptid-ABC-Transporter sind zum Teil an der Synthese der Zellwand beteiligt, indem sie die Peptidbausteine der Zellwand durch die Cytoplasmamembran transportieren. Die Inaktivierung eines Oligopeptid-ABC-Transporters könnte daher die Wachstumseigenschaften des Bakteriums beeinflussen. Um zu überprüfen, ob die Deletion des Transporters Lmo0135-

0137 einen Einfluss auf das Wachstum unter Standardbedingungen (37°C, Vollmedium bzw. Minimalmedium) hat, wurden Wachstumsmessungen in Flüssigmedium durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Der Wachstumsvergleich zeigte allerdings keine Wachstumsunterschiede verglichen mit dem Wildtyp auf, woraus sich schließen lässt, dass der Oligopeptid-ABC-Transporter Lmo0135-0137 für die Synthese der Zellwand nicht von entscheidender Bedeutung ist, da das Wachstum von *Listerien* unter diesen Bedingungen durch die Deletion der Oligopeptidpermease nicht beeinträchtigt wird.

Die Oligopeptidpermeasen sind in Bakterien sehr weit verbreitet und für den Import kleiner Peptide in die Zelle verantwortlich. Die meisten Bakterien verfügen über mehrere Oligopeptid-ABC-Transporter mit unterschiedlichen Spezifitäten, wobei im Allgemeinen eine Längenspezifität vorliegt, aber keine Sequenzspezifität. Um zu untersuchen, über welche Längenspezifität der *Imo0135-0137*-Transporter verfügt, wurden Wachstumsmessungen in definiertem Minimalmedium mit Zusatz des Tetrapeptid Phe-Met-Arg-Phe-amid bzw. von Thymopeptin (Arg-Lys-Asp-Val-Tyr), einem Pentapeptid, statt einigen Standardaminosäuren des Minimalmediums durchgeführt. Die Ansätze wurden mit einer optischen Dichte von 0,001 angeimpft und für 48 h bei 37°C und ständigem Schütteln inkubiert. Die Messungen lieferten in Abbildung 34 dargestelltes Wachstumsverhalten:

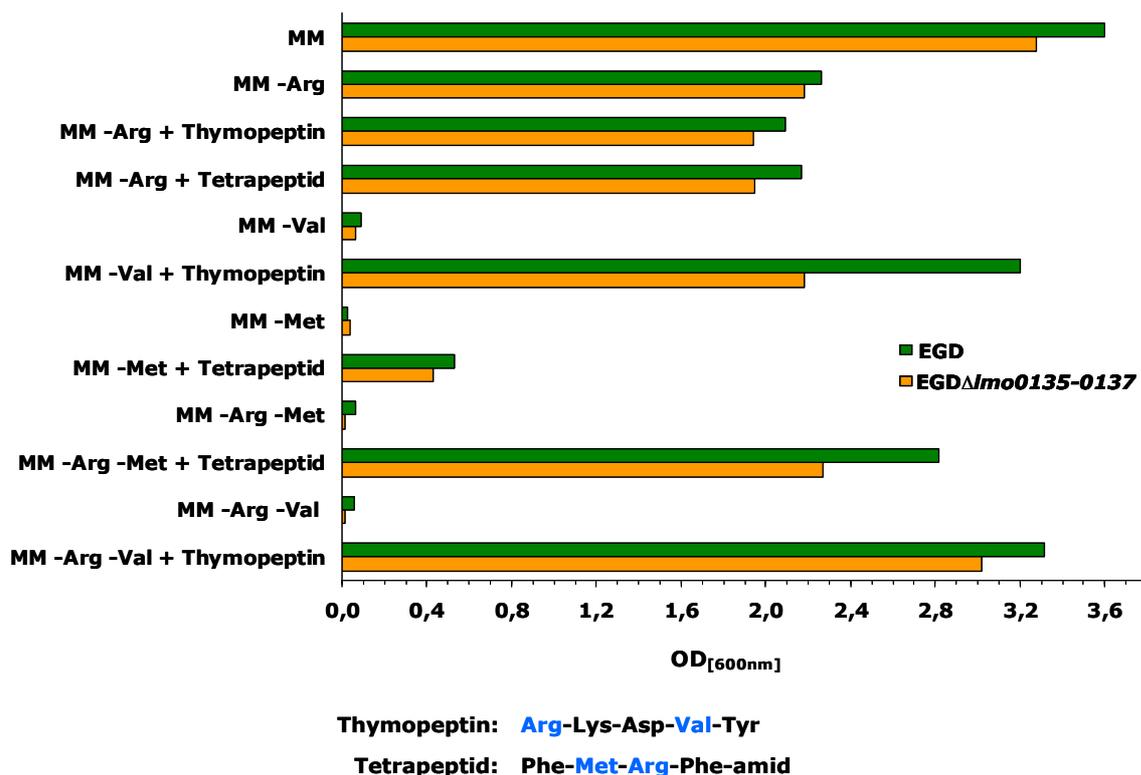


Abb.34: Wachstum der *Imo0135-0137*-Mutante nach 48 h im Vergleich zum Wildtyp in einem definierten Minimalmedium mit Zusatz von Peptiden statt einigen Aminosäuren. Arg, Arginin; Asp, Aspartat; Lys, Lysin; Met, Methionin; MM, Minimalmedium; Phe, Phenylalanin; Tyr, Tyrosin; Val, Valin.

Allgemein zeigen diese Messungen zunächst, dass während der Wildtyp und die Mutante im Standardminimalmedium ein für Minimalmedium typisches Wachstum zeigen, ist sowohl das Wachstum der Mutante als auch des Wildtyps im veränderten Minimalmedium leicht

beeinträchtigt. Offensichtlich führt die Aufnahme von Peptiden als Aminosäurenquelle und ihr anschließender proteolytischer Abbau zu einzelnen Aminosäuren zu einem höheren Energieverbrauch, sodass sich dieser in dem deutlichen Wachstumsunterschied äußert.

Weiterhin konnte kein Wachstumsunterschied festgestellt werden, wenn Arginin ganz weggelassen wurde bzw. durch die beiden Arginin-haltige Peptide ersetzt wurde. In allen drei Ansätzen war das gleiche reduzierte, aber wildtypische Wachstum zu beobachten, da Arginin nur eine Wachstum stimulierende Rolle in der Zusammensetzung des Minimalmediums spielt. Beim Fehlen von Valin im Minimalmedium war dagegen kein Wachstum bei beiden untersuchten *Listeria*-Stämmen zu sehen, weil Valin eine für das Wachstum der Listerien essentielle Aminosäure darstellt [Premaratne *et al.*, 1991]. Der Ersatz von Valin durch Thymopeptin bewirkte aber erneut ein leicht vermindertes, wildtypisches Wachstum, wobei die Transporter-Deletionsmutante eine leichte Verminderung im Wachstum aufwies. Die Versuche ohne Methionin und sein Ersatz durch das Methionin-haltige Tetrapeptid resultieren in einer Wachstumsdefizienz bzw. in nur einem minimalen Wachstum, welches in der optischen Dichte nicht den Wert von 0,5 übersteigt. Dieses Ergebnis bestätigt außerdem eindeutig, dass Methionin bei *L. monocytogenes* mehr als nur eine Wachstum stimulierende Rolle zu spielen scheint und der proteolytische Abbau des Tetrapeptids neben dem höheren Energieverbrauch auch eine für das optimale Wachstum nicht ausreichende Menge Methionin liefert.

Im Fall des gemeinsamen Weglassens von zwei Aminosäuren, die durch eins der getesteten Oligopeptide ersetzt wurden, konnte allerdings auch kein Unterschied im Wachstumsverhalten der Transporter-Mutante verglichen mit dem Wildtyp erzielt werden: beim Fehlen der Aminosäuren Arginin/Methionin und Arginin/Valin war kein Wachstum feststellbar und ihr Ersetzen durch das Tetra- bzw. Pentapeptid führte zu einem fast wildtypischen Wachstum.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich mit Hilfe der getesteten Oligopeptide die Längenspezifität nicht bestimmen als auch die putative Funktion als Oligopeptidtransporter nicht nachweisen ließ. Dies könnte allerdings als ein Indiz dafür gedeutet werden, dass der hier deletierte Oligopeptid-ABC-Transporter eine zum Teil überlappende Längenspezifität mit mindestens einem der drei anderen listeriellen Oligopeptidpermeasen hat und in durch diese in seiner Funktion *in vitro* ersetzbar ist. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass die gewählten Versuchsverhältnisse den Nachweis verhindert haben könnten, da unter *in vivo* Bedingungen, in Caco-2 Zellen und in der Maus, der Oligopeptid-ABC-Transporter Lmo0135-0137 eine wichtige Aufgabe beim Überleben der Listerien zu übernehmen scheint. Die Oligopeptidpermease könnte demnach unter den *in vivo* Bedingungen durch den Import von Signalmolekülen, in diesem Fall verschiedene kleine Peptide, eine Art *quorum sensing* ermöglichen, wessen Fehlen dann einen indirekten Effekt auf die Virulenz ergibt.

E. Diskussion

1. Identifizierung von metabolischen und strukturellen Targets bei *L. monocytogenes*

Um das *Listeria*-Genom im *high-throughput*-Format nach Genen zu untersuchen, die für die intrazelluläre Lebensphase von entscheidender Bedeutung sind, wurde mit Hilfe der Insertionsduplikationsmutagenese (IDM) eine *L. monocytogenes* EGD Mutantenbank erstellt. Das IDM-Verfahren basiert auf einem konditional replizierenden, in diesem Fall temperatursensitiven, pLSV101-Vektor, in den spezifische oder zufällige homologe Fragmente zum Genom des zu verändernden Bakterienstammes kloniert werden. Bei nicht-permissiver Temperatur kann damit die Rekombination des klonierten Genfragments mit dem homologen Genbereich und Integration des Vektors ins bakterielle Genom erfolgen [Joseph *et al.*, 2006]. In früheren Studien wurden Mutanten hauptsächlich durch chemische Mutagenese generiert, wobei bei dieser Methode zusätzliche Mutationen in anderen Genen nicht auszuschließen sind. Ebenfalls eine der ältesten Methoden stellt die klassische Transposonmutagenese dar, bei der durch die zufällige Insertion eines Transposons in eine genetische Einheit der Leseraster des Gens unterbrochen wird. Der Nachteil dieser Methode ist, dass es im Genom bevorzugte Stellen für Transposoninsertionen zu geben scheint, weshalb nicht von einer gleichmäßigen Abdeckung des Genoms ausgegangen werden kann. Eine Alternative dazu bietet das IDM-Verfahren, das es ermöglicht, schnell definierte Mutanten eines Organismus zu konstruieren und die Varianz in der zu konstruierenden Mutantenbank zu steigern, indem z.B. die zu klonierenden Fragmente per Random-PCR oder durch Scherung der chromosomalen DNA erzeugt werden. Die schnelle Identifizierung des klonierten Fragments mittels PCR bietet einen weiteren entscheidenden Vorteil der IDM, vor allem bei der Herstellung von definierten, jedoch ungerichteten Mutanten. Ein Nachteil bleibt aber weiterhin auch bei Insertionsduplikationsmutagenese bestehen, nämlich der durch Vektorinsertion entstehende polare Effekt auf die benachbarte Gene.

Die auf IDM basierend konstruierte *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank deckt 28,92% des gesamten *Listeria*-Genoms ab und weist eine gleichmäßige Verteilung der Insertionen über das Gesamtgenom von *L. monocytogenes* auf. In einem für das Screening der Insertionsmutanten etablierten Infektionsassay in Caco-2 Zellen wurden 160 individuelle Genloci identifiziert, deren Mutation sich in einer Defizienz der intrazellulären Replikation auswirkte. Für ein Gesamtbild des Screenings und zum Erkennen von prägnanten Tendenzen für Gengruppen, die für die intrazelluläre Replikation benötigt werden, wurden die identifizierten Gene in vom Institut Pasteur vorgegebene funktionelle Genklassen eingeteilt (Tab.16, Anhang S.143).

Die meisten der identifizierten Gene fallen in die Klassen „Transport- und Bindeproteine“, „Kohlenstoffmetabolismus“ sowie „Stoffwechsel von Aminosäuren“ und sind im prozentualen

Vergleich in Bezug auf ihren Anteil im gesamten *Listeria*-Genom überrepräsentiert, was nahe liegt, da intrazelluläres Überleben und erfolgreiche Replikation im Cytosol vom Stofftransport und von stoffwechselassoziierten Genen abhängig ist. Für die Analyse der StoffwechsellLeistungen der in diesen Genen betroffenen Insertionsmutanten wurde in dieser Arbeit ein colorimetrischen Verfahren etabliert, welches die Bestimmung der Stoffwechselaktivität von *L. monocytogenes* in Mikrotiterformat erlaubt. Für die untersuchten Insertionsmutanten konnten mit diesem Verfahren allerdings keine weiteren Hinweise bezüglich des intrazellulären Stoffwechsels von *L. monocytogenes* gewonnen werden. Dafür ergab der Vergleich einzelner *Listeria*-Arten untereinander in Bezug auf die bevorzugten Kohlenstoffquellen einen markanten Unterschied: Demnach ist *L. monocytogenes* in der Lage, die Substrate Dextrin, β -Methyl-Glucosid, Maltose, Maltotriose und D-Mannose besser als Kohlenstoffquelle zu metabolisieren als die übrigen *Listeria*-Arten. Einige dieser Kohlenstoffverbindungen stellen Zwischenprodukte des Glykogenabbaus dar, die bei dessen Abbau in der Leber und Niere entstehen. Es ist daher nicht erstaunlich, dass die Stoffwechselaktivität von *L. monocytogenes* diesen Substraten gegenüber hoch ist, denn neben der Milz ist die Leber das am stärksten betroffene Organ nach einer Infektion mit Listerien. Demgegenüber findet bei den anderen *Listeria*-Arten eine wesentlich bessere Stoffwechselaktivität in Bezug auf D-Cellobiose, Thymidin, Uridin und Cytosin statt. Cellobiose ist ein Abbauprodukt von Cellulose, dem Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwände, und ist reichlich im Boden vorhanden. Ebenso sind Thymidin, Uridin und Cytosin, jedoch in wesentlich geringerer Menge als Cellobiose, im Boden zu finden. Sie sind am Nukleotidstoffwechsel beteiligt und stammen im Boden offenbar aus dem Abbau freigesetzter DNA. Die Tatsache, dass *L. ivanovii* ebenfalls fakultativ pathogen ist, lässt die Korrelation zwischen den bevorzugt besser verstoffwechselbaren Kohlenstoffquellen und der Virulenz einzelner *Listeria*-Arten nicht zu. Die vorhandene Tendenz bezüglich der saprophytischen Lebensweise und den bevorzugten Kohlenstoffquellen sollte allerdings weiterverfolgt werden.

Die Vielzahl der heute vorhandenen unterschiedlichen Verfahren ermöglicht es schneller zum Gesamtbild eines Vorgangs zu gelangen, weil die einzelnen Methoden sowohl ähnliche als auch unterschiedliche, vor allem aber, ergänzende Informationen erbringen. Aufschluss über die dynamischen Prozesse innerhalb der Zelle in Abhängigkeit von verschiedenen Umwelteinflüssen werden z.B. aus Transkriptomalysen gewonnen. Der Vergleich der intrazellulären Expressionsprofile aus den Zelllinien Caco-2 und J774A.1 mit den aus dem Caco-2 Screening stammenden Daten ergab, dass von den 160 identifizierten Genen 27 in Caco-2, nur 19 in J774A.1 und 9 Gene in beiden Zelllinien hochreguliert waren [Joseph *et al.*, 2006; Chatterjee *et al.*, 2006]. Besonders auffällig ist in erster Linie die Tatsache, dass die meisten der hochregulierten Gene auch den drei prozentual größten funktionellen Klassen „Transport- und Bindeproteine“, „Kohlenstoffmetabolismus“ und „Stoffwechsel von Aminosäuren“ angehören. Darüber hinaus ist die Übereinstimmung der Daten in 27 Genen für die Caco-2 Zelllinie aus beiden Methoden als enorm hoch und statistisch signifikant anzusehen und beruht offenbar auf der Beachtung möglichst gleicher Versuchsbedingungen. Denn oft ist die hohe Anzahl geänderter Parameter und damit verbundenen physiologischen

Nebenwirkungen und Katabolitrepression die Ursache für die fehlende Korrelation zwischen der Genexpression und dem Phänotyp der jeweiligen Mutante, worauf die geringe Übereinstimmung zwischen dem intrazellulären Expressionsprofil aus J774A.1 und den Daten aus dem Caco-2 Screening beruht. Auch das zum Wildtyp identische Stoffwechselprofil aller Insertionsmutanten, welches mit Hilfe des colorimetrischen Verfahrens erstellt wurde, und die somit weiterhin fehlenden Hinweise bezüglich der Funktionalität der inaktivierten Gene könnte mit der Wahl unterschiedener Versuchsparameter im Vergleich zum Screening in Caco-2 Zellen begründet werden. Trotz alledem lässt sich feststellen, dass die identifizierten und den drei prozentual größten funktionellen Klassen zugeordneten Gene eine bedeutende Rolle für eine effiziente intrazelluläre Replikation spielen.

Das Nährstoffangebot des Wirtscytosols unterscheidet sich grundsätzlich von den optimalen *in vitro* Bedingungen in einem Vollmedium und steht nicht nur dem Pathogen zur Verfügung. Die Fähigkeit von *L. monocytogenes*, sich den Gegebenheiten der Wirtszelle mittels alternativer Stoffwechselwege und Aufnahmesysteme für verschiedene Substrate anzupassen, ermöglicht dem Pathogen weiterhin eine effiziente Replikation im Wirtscytosol. Wie bereits für den PrfA-regulierten Hexose-Phosphat-Transporter Hpt gezeigt wurde, führt die Deletion dieses Gens nur zu einer intrazellulär verminderten Replikation, was bedeutet, dass sich der intrazelluläre Kohlenstoffmetabolismus nicht nur auf die Verstoffwechslung von Hexose-Phosphaten fokussiert, die dieser Transporter ins Zellinnere transportiert, sondern auch andere im Wirtscytosol vorkommenden Kohlenstoffverbindungen wie z.B. Glycerol, Dihydroxyaceton oder auch Pyruvat erfolgreich nutzt [Chico-Calero *et al.*, 2002; Joseph *et al.*, 2006 & 2008]. Dies konnte auch durch die im Screening gefundenen Gene *glpD* und *lmo1538 (glpK1)* bestätigt werden, die eine Glycerol-3-P-Dehydrogenase und Glycerolkinase kodieren und eine wichtige Rolle beim Glycerolabbau spielen. Die Identifizierung von mehreren β -Glucosidasen (Lmo0261, Lmo0271, Lmo2446 und Lmo2781) lässt zudem vermuten, dass nicht nur einfache sondern auch komplexe Kohlenhydrate *L. monocytogenes* als Kohlenstoffquelle dienen können, deren Verwertung die Aufgabe von β -Glucosidasen ist. Die Transketolasen Lmo2660 und Lmo1032 sind am Pentosephosphatweg beteiligt, der von Listerien intrazellulär der Glycolyse vorgezogen wird, und sind somit essentiell für intrazelluläre Replikation [Joseph *et al.*, 2006]. Außerdem wurden eine Zucker-Hydrolase (Lmo2734), eine L-Fucose-Isomerase (Lmo1031) und eine Phospho-Glycerat-Mutase (Lmo1244) identifiziert, die beim intrazellulären Kohlenstoffmetabolismus ebenfalls eine wichtige Aufgabe zu übernehmen scheinen.

Die Aufnahme von Kohlenstoffverbindungen und die Anwesenheit effektiver Transportsysteme allgemein sind ein weiteres wichtiges Kriterium für das Überleben von *L. monocytogenes* im Cytosol der Wirtszelle. Insgesamt wurden im Screening in Caco-2 Zellen 30 am Transport beteiligten Gene identifiziert, wobei dem größten Teil dieser Gene kein eindeutiges Transportsubstrat zugeordnet werden konnte. Den PTS-Systemen Lmo1971 und Lmo1003 für Hexosen und Pentosen sowie den ABC-Transportern Lmo2124 und Lmo2850 für Maltodextrin und Rhamnose konnten jedoch eine Virulenz-assoziierte Funktion zugewiesen werden, da ihre Inaktivierung zur einer verminderten intrazellulären Replikation führte. Zudem sind einige

Komponenten des *L. monocytogenes* spezifischen PTS-Systems Lmo1971 intrazellulär in Caco-2 Zellen hochreguliert, weshalb den Pentosen erneut eine wichtige Bedeutung für das Überleben der Listerien zugeschrieben werden kann.

Außer den Zuckertransportsystemen befinden sich in dieser Genklasse auch sieben Transporter für Aminosäuren und antimikrobielle Peptide (Lmo0135-0137, Lmo0645, Lmo0787, OppF, Lmo0195, Lmo1506, Lmo1739). Dies lässt sich damit erklären, dass *L. monocytogenes* die Gene für die Nitratreduktion fehlen und das Bakterium deshalb für seine Stickstoffversorgung von reduzierten Stickstoffquellen wie Aminosäuren oder Ammoniak ganz abhängig ist [Glaser *et al.*, 2001]. Im Cytosol der eukaryotischen Zellen kommt Ammoniak aufgrund seines toxischen Effekts allerdings nur in sehr niedriger Konzentration vor, weshalb *L. monocytogenes* ihren Stickstoffbedarf intrazellulär durch die Aufnahme von Aminosäuren und Peptiden ausgleichen muss. Ein weiteres Indiz dafür stellt die verstärkte Expression einiger Aminosäuretransporter sowohl in murinen Makrophagen als auch im humanen Darmepithel dar [Joseph *et al.*, 2006; Chatterjee *et al.*, 2006]. Für die listerielle Oligopeptidpermease OppA-F konnte außerdem bereits gezeigt werden, dass sie in murinen Makrophagen das Pathogen mit kleinen Peptiden als N-Quelle versorgt, da sich ihre Inaktivierung in leicht verminderter intrazellulärer Replikation äußerte [Borezee, *et al.*, 2000]. Der in dieser Arbeit untersuchte Oligopeptidtransporter Lmo0135-0137 scheint ebenfalls für die intrazelluläre Versorgung mit Aminosäuren verantwortlich zu sein, da seine Inaktivierung sowohl im Zellkultur- als auch im Mausmodell eine signifikante Attenuation zeigt.

Des Weiteren werden auch die Gene *ilvBCD* für die Synthese der verzweigten Aminosäuren intrazellulär in Caco-2 Zellen stark exprimiert, da eine sehr niedrige Konzentration an diesen Aminosäuren im Wirtscytosol vorliegt und das Darmepithel nicht in der Lage ist, diese Aminosäuren selbst zu synthetisieren. Damit könnte die verminderte intrazelluläre Vermehrung der Insertionsmutanten in diesen drei Genen erklärt werden. Neben den verzweigten Aminosäuren ist eine intakte Synthese von Methionin (Lmo0594 und Lmo1495) und Serin (Lmo1235 und SerC) ebenfalls notwendig. Darüber hinaus wurde im Screening das Gen *argD* identifiziert, welches für eine N-acetyl-Ornithin-Aminotransferase kodiert und in die Umwandlung von Glutamat zu Ornithin involviert ist. Zudem werden sowohl das Gen *argD* als auch das im gemeinsamen Operon *argCJBDF* liegende Gen *argC* verstärkt in Caco-2 Zellen exprimiert, womit die Synthese von Arginin eine weitere bedeutsame Anpassung von *L. monocytogenes* an das Wirtscytosol zeigt. *eutB*, ein weiteres Gen des Aminosäurestoffwechsels, wurde ebenfalls als Virulenz-assoziiertes Gen identifiziert und ist an der Verwertung von Ethanolamin beteiligt. Ethanolamin, das zusammen mit Glycerol durch die listerielle Phospholipase PlcB beim intrazellulären Abbau der phagosomalen Membran entsteht, wird von der Vitamin B₁₂-abhängigen Ethanolamin-Ammonium-Lyase EutBC zu Acetaldehyd und Ammonium umgewandelt, die für *L. monocytogenes* intrazellulär eine Kohlenstoff- und eine Stickstoffquelle präsentieren. Folglich fungiert Ethanolamin für *L. monocytogenes* intrazellulär sowohl als Kohlenstoff- als auch Stickstoffquelle [Joseph *et al.*, 2006]. In Bezug auf den Aminosäurestoffwechsel lässt sich zusammenfassend feststellen,

dass die Aminosäuren entscheidend zum Überleben und zur effizienten Vermehrung von *L. monocytogenes* innerhalb der Caco-2 Zellen beitragen.

Einen anderen interessanten Anhaltspunkt bietet die Vitaminsynthese, die in die Genklasse „Metabolismus von Coenzymen“ einzuordnen ist. In einem definierten Minimalmedium ist das Wachstum von *L. monocytogenes* von dem Zusatz der Vitamine Biotin, Riboflavin und Thiamin abhängig, da die Gene für ihre Biosynthese ganz oder zum Teil im *Listeria*-Genom fehlen [Glaser *et al.*, 2001; Tsai *et al.*, 2003]. Vitamine sind jedoch für extrazelluläres als auch intrazelluläres Wachstum absolut erforderlich, weil sie Cofaktoren vieler Enzyme darstellen, die ihrerseits an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt sind. Für Thiamin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sowohl der Thiamintransport als auch die *de novo* Thiaminbiosynthese zur intrazellulären Vermehrung von *L. monocytogenes* einen wichtigen Beitrag leisten, denn Thiamin-haltige Enzyme sind mit zentralen Stoffwechselprozessen wie dem Pentosephosphatweg oder der Synthese von verzweigt-kettigen Aminosäuren verbunden [Schauer *et al.*, 2009]. Beide Stoffwechselwege sind für *L. monocytogenes* intrazellulär von großer Bedeutung, da der Pentosephosphatweg der bevorzugte Abbauweg von Hexosen ist und verzweigte Aminosäuren nicht von der Wirtszelle synthetisiert werden [Joseph *et al.*, 2006]. Außerdem wurden im Screening Gene für die Biosynthese weiterer B-Vitaminen wie Pyridoxin (*pdxK* und *Imo2102*) und Nicotinamid (*nadB* und *Imo2022*) identifiziert. Dabei fungiert Nicotinamid, ein Amid des Niacins, als Bestandteil von an zahlreichen Redoxreaktionen des Stoffwechsels beteiligten Coenzymen NAD⁺ und NADP⁺ und Pyridoxin trägt zur Transaminasenaktivität während des Aminosäurenabbaus bei, wodurch wieder einmal die Bedeutsamkeit des Aminosäurenstoffwechsels betont wird. Eine ebenso entscheidende Rolle fällt dem Biotin zu, das als Cofaktor der Pyruvat-Carboxylase *PycA* fungiert. Dieses Enzym stellt bei *L. monocytogenes* die einzige Möglichkeit dar, Oxalacetat über die Carboxylierung von Pyruvat und Phosphoenolpyruvat zu generieren, da der listerielle Citratzyklus unvollständig ist. Dementsprechend ist die *pycA*-Mutante außerstande, in Säugetierzellen zu replizieren, und zeigt eine hohe Virulenzabschwächung im Mausepsismodell [Eisenreich *et al.*, 2006; Schär *et al.*, 2010].

Des Weiteren konnten vier Gene, die mit der Synthese von Purinen (*purA*, *purQ*, *purS*) und Pyrimidinen (*pyrE*) verbunden sind, als Virulenz-assoziiert identifiziert werden, was bedeuten könnte, dass das Cytosol der Wirtszelle keine ausreichende Menge an Purinen und Pyrimidinen liefern kann, weshalb die Bakterien auf die eigene Synthese angewiesen sind. In *E. coli* ist *PurA*, eine Adenylosuccinat-Synthetase, außerdem an der Invasion von HBMEC Zellen beteiligt, da sich die Mutation in dem *purA*-Gen in der verminderten Invasivität äußert [Hoffman, *et al.*, 2001]. Ferner könnte dies auch bei *L. monocytogenes* der Fall sein, da die Insertionsmutante in diesem Gen eine im Vergleich zum Wildtyp um den Faktor 4 verminderte Adhäsionsfähigkeit in Caco-2 Zellen aufweist. Um eine genaue Aussage treffen zu können, sollte das listerielle *purA*-Gen deletiert und die Mutante auf ihre Adhäsion- und Invasionsfähigkeiten in verschiedenen Zelllinien untersucht werden.

Neben den bereits erwähnten drei größten Genklassen stellen die Klassen „Zelloberfläche“ und „Oberflächenproteine“ zusammen eine weitere große Gruppe mit für das intrazelluläre

Überleben von *L. monocytogenes* wichtigen Genen dar. Darunter befinden sich z.B. die Gene für die Teichonsäuren-Biosynthese (*tagB* und *lmo1085*), die offenbar eine Schutzfunktion sowohl intrazellulär als auch extrazellulär ausüben, und Penicillin bindende Proteine (*lmo0441* und *phpB*), zu deren Aufgaben als Transpeptidasen die Quervernetzung des Peptidoglykans gehört. Die Transpeptidase Lmo0441 spielt zudem in *L. monocytogenes* eine zentrale Rolle bei der β -Lactam-Resistenz und PhpB scheint essentiell für das Wachstum des Pathogens zu sein [Guinane *et al.*, 2006].

Die Genklasse „Oberflächenproteine“ beinhaltet weitere zehn Gene, die bevorzugt in die Virulenz von *L. monocytogenes* involviert sind. So wurden im IDM Screening drei klassische Virulenzfaktoren Ami, Vip und InlA identifiziert. InlA gehört zu den großen Internalinen und wird benötigt, um in nicht-professionell phagozytische Zellen eindringen zu können. Ami ist eine Autolysinamidase und dient vermutlich als primitiver Kolonisationsfaktor, der es Listerien ermöglicht mit der Wirtsoberfläche zu interagieren, die analoge Targets ihrer natürlichen Rezeptoren wie z.B. Lipoteichonsäuren exprimieren [Dussurget *et al.*, 2004]. Vip ist ebenfalls für die Invasion in einige Zelllinien erforderlich, wobei die Interaktion mit Gp96, einem eukaryotischen Chaperonprotein, eine wichtige Rolle spielt, welches im endoplasmatischen Retikulum und auch auf der Zelloberfläche zu finden ist [Cabanes *et al.*, 2005]. Die geringe Anzahl identifizierter Genen, die für bereits charakterisierte Virulenzfaktoren kodieren, ist einerseits damit zu begründen, dass die *L. monocytogenes* EGD Mutantenbank nur eine Genomsättigung von 28,92% aufweist. Andererseits wurde für die Herstellung der in den pLSV101-Vektor klonierten Fragmente der *L. monocytogenes* PKP1 Stamm verwendet, dem das Virulenzgencluster *plcA/hly/mpl/actA/plcB* fehlt. Aufgrund dessen konnten die entsprechenden Virulenzfaktoren in dem IDM Screening nicht gefunden werden. Dessen ungeachtet scheint die IDM-Methode jedoch gut geeignet für eine Mutagenisierung des gesamten Genoms eines Mikroorganismus zu sein. Außer InlA und Vip wurden im Screening vier weitere hypothetische Oberflächenproteine mit einem LPXTG-Motiv identifiziert, nämlich Lmo1666, Lmo0327 und die Internalin-ähnliche Proteine Lmo0514 und Lmo2026. Das LPXTG-Motiv ist ein konserviertes Pentapeptidmotiv und hat die Funktion eines Sortierungssignals. Dieses Signal ist essentiell für eine erfolgreiche Translokation des Proteins über die Membran und eine anschließende kovalente Verankerung in der Zellwand [Schneewind *et al.*, 1993]. Lmo2026, wie vor kurzem gezeigt, spielt dagegen eine Rolle während der listeriellen Vermehrung im Gehirn [Chen *et al.*, 2009]. Ein gewebespezifischer Phänotyp der Mutanten in den anderen LPXTG-Motiv tragenden Genen kann jedoch auch nicht ausgeschlossen werden. Obwohl Lmo0327 ein LPXTG-Motiv trägt, verfügt das Protein über eine Mureinhydrolase-Aktivität und unterliegt einer positiven Regulation durch Lmo0326. Dementsprechend könnte die Funktion dieses Oberflächenproteins in der Zellteilung und dem allgemeinen Umbau des Peptidoglykans liegen [Popowska *et al.*, 2006].

In vielen essentiellen zellulären Prozessen, wie der Membranstabilisation, der Zellwandsynthese und dem Elektronentransport, sind Isoprenoide involviert, die über zwei verschiedene Biosynthesewege, den Mevalonat- und den Methylerythritol-4-Phosphat (MEP)-Stoffwechselweg, in Bakterien synthetisiert werden. Das in dieser Arbeit als Virulenz-

assoziiert identifizierte *ispE*-Gen kodiert für eine 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D-Erythritol-Kinase, welche an der Synthese von Isoprenoidvorstufen über den MEP-Syntheseweg beteiligt ist. Die hierzu konstruierte Deletionsmutante weist keine Wachstumsdefizienz im Vollmedium auf, dafür aber zeigt sie eine verminderte intrazelluläre Replikation in Caco-2 Zellen und eine signifikante Attenuation im Mausmodell. Im Gegensatz zu diesen Infektionsstudien wird die Isoprenoidsynthese über den MEP-Syntheseweg nicht für listerielles Wachstum in Makrophagen benötigt. Für den Mevalonat-Syntheseweg ist wiederum aus anderen Studien bekannt, dass seine Unterbrechung keinen Einfluss auf die Virulenz von *L. monocytogenes* hat und bis zur Entdeckung des alternativen MEP-Synthesewegs deshalb unerklärbar blieb [Begley *et al.*, 2008]. Auf Grund dessen lässt sich für *L. monocytogenes* zusammenfassend feststellen, dass *in vivo* der Mevalonat-Pfad entbehrlich ist und die Synthese der Isoprenoide in den nicht-professionell phagozytischen Zellen über den MEP-Syntheseweg erfolgt. Außerdem bietet der MEP-Syntheseweg zusammen mit IspE acht mögliche Targets für antimikrobielle Substanzen, da die an der Synthese beteiligten Enzyme verschiedene Cofaktoren und Metallionen für ihre Aktivität benötigen und bereits gut untersucht sind [Hunter, 2007].

Weiterhin wurden im Screening der *L. monocytogenes* EGD Mutantenbank auch Gene gefunden, die an der allgemeinen Stressantwort beteiligt sind. Dazu gehören unter anderem die beiden Glycin-Betain-ABC-Transporter GbuA und OpuCA. Bei hoher Osmolarität, der *Listeria* vor allem während des Infektionszyklus beim Übergang aus dem Magen in den Darm begegnet, reagieren Listerien mit der Aufnahme von Osmolyten zum Ausgleich des Turgordrucks und gleichzeitigem Verhindern von Wasserverlust. Für OpuA konnte zudem gezeigt werden, dass der Transporter maßgeblich zur Virulenz im Mausmodell beiträgt [Wemekamp-Kamphuis *et al.*, 2002].

Insgesamt betrachtet lässt sich schließen, dass das in dieser Arbeit durchgeführte Screening der *L. monocytogenes* EGD Mutantenbank hinsichtlich des intrazellulären Verhaltens der einzelnen Insertionsmutanten in der Epithelzelllinie Caco-2, dass ein erfolgreiches Replizieren von *L. monocytogenes* im Cytosol auf die Fähigkeit des Pathogens, ihren Metabolismus an die Gegebenheit der Wirtszelle anzupassen, indem z.B. alternative Stoffwechselwege und Aufnahmesysteme für verschiedene Substrate entwickelt werden, zurückzuführen ist.

2. Glycerolstoffwechsel und seine Rolle für *L. monocytogenes* während der intrazellulären Replikation

Das Cytosol der Wirtszelle bietet den intrazellulär lebenden Bakterien eine Vielzahl an verschiedenen Nährstoffen an, die von diesen jedoch nicht ohne geeignete Aufnahmesysteme und Stoffwechselwege verwertet werden können. Der Transport von phosphorylierten Zuckern, wie Glucose-1-, Glucose-6- oder Mannose-6-Phosphat, erfolgt in *L. monocytogenes* über den PrfA-regulierten Hexose-Phosphat-Transporter Hpt, der vom *uhpT*-Gen kodiert wird. Da trotz seiner Deletion die EGD Δ *uhpT*-Mutante weiterhin zu einer, wenn auch verringerten, Replikation im Cytosol der Wirtszelle in der Lage ist, scheint *L. monocytogenes* ihren

intrazellulären Metabolismus nicht ausschließlich auf die Verstoffwechslung von Glukose-1-Phosphat zu fokussieren [Chico-Calero *et al.*, 2002]. Neben den Hexose-Phosphaten, den C6-Quellen, stehen *L. monocytogenes* im Wirtscytosol auch einige C3-Quellen wie Glycerol, Dihydroxyaceton oder auch Pyruvat als mögliche Kohlenstoffquelle zur Verfügung, wobei die höhere *in vitro* Wachstumseffizienz dem Glycerol zuzuschreiben ist, womit sich Glycerol als geeignete Kohlenstoffquelle zu erweisen scheint [Joseph & Goebel, 2007; Joseph *et al.*, 2008].

In *L. monocytogenes* gelangt das aus dem Nährmedium stammende Glycerol entweder mittels freier Diffusion oder durch erleichterte Diffusion über die Cytoplasmamembran ins Zellinnere. Letztere wird vom integralen Membranprotein GlpF katalysiert und ist Energieunabhängig. Das GlpF-Protein gehört zu der MIP (*major intrinsic protein*)-Familie der Aquaporine, den integralen Membrankanalanproteinen, und bildet einen substratspezifischen Kanal mit einer Porengröße von 0,4 nm [Heller *et al.*, 1980; Fu *et al.*, 2002]. Solche Aquaporine sind bei vielen Bakterien vertreten und ermöglichen einen selektiven, passiven Transport von kleinen, löslichen und neutralen Molekülen, wie Glycerol, Dihydroxyaceton, Harnstoff und einigen anderen über die Cytoplasmamembran [Fu *et al.*, 2000].

Im Anschluss an den Glyceroltransport kann das cytoplasmatische Glycerol auf zwei verschiedenen Wegen in *L. monocytogenes* metabolisiert werden: es wird entweder durch die Glycerol-Dehydrogenase in Dihydroxyaceton umgewandelt oder von der ATP-abhängigen Glycerolkinase K zu Glycerol-3-Phosphat (Glycerol-3-P) phosphoryliert, die in ihrem enzymatisch aktiven Zustand mit dem GlpF-Facilitator assoziiert vorliegt [Lin *et al.*, 1976; Voegelé *et al.*, 1993]. Die schnelle Umwandlung des Glycerols zum nächsten Zwischenprodukt des Glycerolmetabolismus ist von entscheidender Bedeutung, denn erst dadurch wird gewährleistet, dass die reversible Diffusion des Glycerols durch den GlpF-Facilitator zurück ins Außenmedium unterbleibt und dafür der kontinuierliche Glycerol-Flux in die Bakterienzelle aufrechterhalten bleibt. Allerdings spielt der GlpF-Facilitator erst bei niedrigen Glycerolkonzentrationen eine wichtige Rolle, da bei hoher Konzentration das Glycerol einfach durch die Cytoplasmamembran diffundieren kann [Richey & Lin, 1972].

Das in der Folge der Glycerol-Phosphorylierung im Cytosol gebildete Glycerol-3-Phosphat wird im nächsten Schritt entweder als Ausgangsstoff für die Triacylglycerol- und Phospholipid-Synthese verwendet oder durch die Glycerol-3-P-Dehydrogenase in Dihydroxyaceton-Phosphat (Dihydroxyaceton-P) umgewandelt. Auch bei der direkten Oxidation des Glycerols zum Zwischenprodukt Dihydroxyaceton und der darauf folgenden Phosphorylierung durch die Dihydroxyaceton-Kinase entsteht das Triosephosphat Dihydroxyaceton-P. Dieses steht mit dem weiteren Triosephosphat, nämlich Glycerolaldehyd-3-Phosphat, in einem Gleichgewicht, für welches die Triosephosphat-Isomerase verantwortlich ist. Auf diese Art wird Glycerol schließlich in die Glycolyse bzw. Gluconeogenese eingeschleust. Die zwei für *L. monocytogenes* postulierten Abbauege des Glycerols und ihre mögliche Regulation sind schematisch in der Abbildung 35 dargestellt.

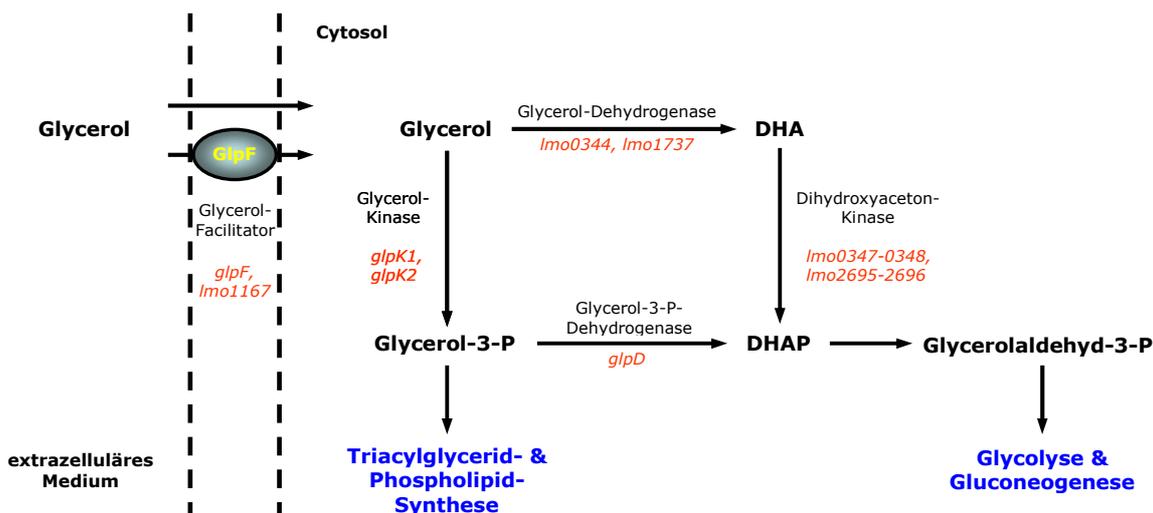


Abb.35: Postulierter Glycerolmetabolismus in *Listeria monocytogenes*. DHA, Dihydroxyaceton; DHAP, Dihydroxyaceton-Phosphat; GlpD, Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase; GlpF, Glycerol-Facilitator; P, Phosphat [konstruiert nach Joseph *et al.*, 2008].

Über die zuletzt in *L. monocytogenes* durchgeführten Gesamtgenom-Transkriptom-Analysen wurden in Gegenwart von Glycerol im Medium einige Gene mit starker Expression gefunden, deren Genprodukte eine wichtige Funktion beim Glycerolabbau zu übernehmen vermögen. So sind die an dem Abbauweg beteiligten Gene, im Gegensatz zu *B. subtilis*, nicht in einem gemeinsamen Operon im Genom von *L. monocytogenes* organisiert, das unter Kontrolle eines mit in diesem Operon liegenden Regulator steht. Ein Homolog zu dem GlpP-Regulator in *B. subtilis* fehlt in *Listeria* und das *glpD*-Gen (*Imo1293*), das für Glycerol-3-P-Dehydrogenase kodiert, befindet sich an einer anderen Stelle im Genom als die übrigbleibende, bicistronische Einheit *glpFK* (*Imo1539* und *Imo1538*), die für den GlpF1-Glycerol-Facilitator und GlpK1-Glycerolkinase kodieren. Darüber hinaus wurde für die letzten beiden Gene jeweils ein weiteres homologes, separat liegendes Gen lokalisiert und dementsprechend als *glpF2* (*Imo1167*) und *glpK2* (*Imo1034*) bezeichnet. Bei der GlpK2-Glycerolkinase handelt es sich zudem um eine *L. monocytogenes* spezifische Kinase, da sie nicht in der apathogenen Art *L. innocua* vorkommt. Sie ist zusammen mit sechs weiteren Genen in einem *L. monocytogenes* spezifischen Operon (*Imo1030-1036*) organisiert, in dem Transketolasen (*Imo1032*, *Imo1033*), eine putative Isomerase (*Imo1031*), eine für β -Glucoside spezifische PTS-Komponente EIIABC (*Imo1035*) und eine Glucosid-Hydrolase (*Imo1036*) liegen, die alle in den Kohlenstoffstoffwechsel involviert sind und unter der Kontrolle des Lmo1030-Regulators stehen. Außerdem konnten erst durch diese Studien weitere in einem Operon angeordnete Gene *Imo0344* (Dehydrogenase/Reduktase), *Imo0347-Imo0348* (Dihydroxyaceton-Kinase DhaK-1) und die Gene *Imo1737* (Glycerol-Dehydrogenase) und *Imo2695-Imo2696* (Dihydroxyaceton-Kinase DhaK-2) identifiziert werden. Erst diese ermöglichen es *L. monocytogenes*, wie auch *Klebsiella pneumoniae*, den zusätzlichen und über Dihydroxyaceton ablaufenden Abbauweg des Glycerols. Demzufolge wäre es sogar denkbar, dass *L. monocytogenes* in der Lage sein könnte, Dihydroxyaceton auch direkt als Kohlenstoffquelle zu verwerten [Forage & Lin, 1982; Joseph *et al.*, 2008].

Die Daten dieser Gesamtgenom-Transkriptom-Analyse von *L. monocytogenes* in Glycerolhaltigem Minimalmedium ergänzen die in dieser Arbeit zum Glycerolstoffwechsel gewonnenen Ergebnissen, die durch die Herstellung und anschließende Untersuchung von am Glycerolmetabolismus beteiligten Einzel- und Mehrfachmutanten von *L. monocytogenes* erzielt werden konnten. Durch Wachstumsexperimente im Minimalmedium mit Glycerol wurde festgestellt, dass die *glpD*-(Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase) und *lmo1538*-Deletionsmutanten (GlpK1-Glycerolkinase) sowie die Doppeldeletionsmutante in diesen beiden Genen eine völlige Wachstumsdefizienz aufwiesen. Folglich waren diese Deletionsmutanten zu keiner Oxidation von Glycerol zu Dihydroxyaceton und somit zu keiner Glycerolverwertung in der Lage. Im Gegensatz dazu zeigte die *lmo1031-1036*-Deletionsmutante unter denselben Wachstumsbedingungen ein wildtypisches Wachstum, obwohl ihr die *L. monocytogenes* spezifische GlpK2-Glycerolkinase fehlt. Daraus lässt sich schließen, dass die Verstoffwechslung von Glycerol mittels Glycerolkinase und Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase zu Dihydroxyaceton-P der bevorzugte der in der Abbildung 35 dargestellten Abbauege in *L. monocytogenes* zu sein scheint.

Zudem konnte für alle vier Mutanten $EGD\Delta lmo1538$ (GlpK1-Glycerolkinase), $EGD\Delta glpD$ (Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase), $EGD\Delta lmo1538\Delta glpD$ und $EGD\Delta lmo1031-1036$ (GlpK2-Glycerolkinase) in Caco-2 Zellen eine im Vergleich zum Wildtyp verringerte Replikation nachgewiesen werden [Joseph *et al.*, 2006 & 2008]. Demnach könnte Glycerol auch intrazellulär als Kohlenstoffquelle fungieren, wobei Phospholipide eine mögliche intrazelluläre Glycerolquelle darstellen. Diese entstehen beim Abbau des Phagosoms, in dem sich die Listerien nach der Aufnahme in die Wirtszelle befinden. Der Phospholipidabbau erfolgt offensichtlich durch ein gemeinsames Arbeiten von listeriellen Phospholipase C (PlcB), dessen Genexpression in Caco-2 Zellen sehr hoch ist, und zellulären Lipasen des Typs A unter Bildung von Glycerol, Fettsäuren und Ethanolamin [Joseph *et al.*, 2006; Joseph&Goebel, 2007]. Aus der Replikationsrate der obigen Deletionsmutanten in Caco-2 Zellen lässt sich außerdem erkennen, dass die Glycerol-3-P-Dehydrogenase GlpD und GlpK2-Glycerolkinase (*Lmo1034*) intrazellulär eine größere Bedeutung für die Glycerolverwertung haben könnten, da ihr Fehlen zu einer wesentlich höheren Attenuation der intrazellulären Replikation führt als dies bei *lmo1538*-Mutante (GlpK1-Glycerolkinase) der Fall ist. Zudem bewirkt das gemeinsame Fehlen der Gene *lmo1538* und *glpD* im Vergleich zu $EGD\Delta glpD$ zu keiner signifikant höheren Verminderung in der intrazellulären Replikation. Dieser Befund und die Tatsache, dass die Mutante $EGD\Delta lmo1031-1036$ (GlpK2-Glycerolkinase) am stärksten von allen Deletionsmutanten in Caco-2 Zellen attenuiert ist und zudem ein wildtypisches Wachstum in Glycerolhaltigem Minimalmedium aufweist, führen zu der Schlussfolgerung, dass die GlpK2-Glycerolkinase (*Lmo1034*) ausschließlich für die Phosphorylierung des Glycerols während der intrazellulären Lebensweise verantwortlich ist und unter extrazellulären *in vitro* Bedingungen inaktiv zu sein scheint. Das könnte auch die mögliche Erklärung für das Nullwachstum der *lmo1538*-Mutante in Glycerolhaltigem Minimalmedium sein. Eine enzymatisch aktive GlpK2-Glycerolkinase würde sonst die Aufgabe der GlpK1-Glycerolkinase übernehmen und auf diese Weise ein wildtypisches oder teilweise vermindertes Wachstum ermöglichen. Einen weiteren

Hinweis dafür geben die Daten der Gesamtgenom-Transkriptom-Analysen in Glycerol-haltigem Medium. Während das *Imo1538*-Gen eine starke Expression zeigt, wird das Gen *Imo1034* kaum transkribiert. Die GlpK1-Glycerolkinase (*Lmo1538*) ist somit für ein extrazelluläres Wachstum von *L. monocytogenes* absolut notwendig.

Die intrazelluläre Verwertung von Glycerol wird zusätzlich durch Transkriptom-Daten unterstützt, die für die in J774A.1 befindlichen Listerien eine verstärkte Expression der Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase GlpD und GlpK1-Glycerolkinase (*Lmo1538*) nachweisen konnten. In Caco-2 Zellen konnte dagegen nur eine verstärkte Expression der beiden Glycerolkinasen GlpK1 (*Lmo1538*) und GlpK2 (*Lmo1034*) beobachtet werden [Joseph *et al.*, 2006; Chatterjee *et al.*, 2006].

Die Regulation des Glycerolstoffwechsels erweist sich aufgrund der Verteilung der am Glycerolabbau beteiligten Gene über das gesamte *Listeria*-Genom als ein komplexer Vorgang. In Gram-negativen Bakterien, z.B. in *E. coli* oder *S. Typhimurium*, findet eine Interaktion zwischen dem unphosphorylierten $EIIA_{Glc}$, einer Komponente des PTS-Systems, und der Glycerolkinase K statt, wodurch die enzymatische Aktivität des Enzyms inhibiert wird [Hurley *et al.*, 1993; de Boer *et al.*, 1986; Postma *et al.*, 1984]. Die meisten Gram-positiven Bakterien besitzen jedoch kein frei liegendes $EIIA$, weil dieses durch eine Fusion mit dem Glucose-spezifischen $EIIBC$ in einem $EIIABC$ -Komplex vorliegt, weshalb die Regulation über unphosphoryliertes $EIIA_{Glc}$ nicht möglich ist [Huding & Hengstenberg, 1980; Christiansen & Hengstenberg, 1996]. Trotz der scheinbar $EIIA_{Glc}$ -unabhängigen Glycerolaufnahme bewirkt das Fehlen der allgemeinen PTS-Komponente EI und des hitzestabilen und Histidin-haltigen Proteins HPr jedoch einen Wachstumsverlust in einem Glycerol- bzw. Dihydroxyaceton-haltigen Medium [Beijer & Rutberg, 1992; Reizer *et al.*, 1984; Romano *et al.*, 1990]. Hinzukommend wurde bei *Enterococcus faecalis* und *Streptococcus faecalis* beobachtet, dass die Glycerolkinase K durch die Phosphorylierung mittels dieser PTS-Komponenten positiv in ihrer Kinase-Aktivität stimuliert werden kann [Deutscher *et al.*, 1986; Deutscher *et al.*, 1993]. Ein ähnlicher Mechanismus konnte auch bei *B. subtilis* nachgewiesen werden [Wehtje *et al.*, 1995]. Demzufolge deuten diese Erkenntnisse darauf hin, dass auch listerielle Glycerolkinasen (GlpK), analog zu denen von *B. subtilis*, durch HPr-His15~P aktiviert werden müssen und die Dihydroxyaceton-Kinasen (DhaK) das HPr-His15~P für die Phosphorylierung von Dihydroxyaceton benötigen [Joseph *et al.*, 2008].

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Glycerol eine Kohlenstoffquelle für den listeriellen intrazellulären Metabolismus darstellt und seine Verstoffwechslung mittels Glycerolkinase und Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase zu Dihydroxyaceton-P der bevorzugte Abbauweg in *L. monocytogenes* zu sein scheint. Für eine effiziente Glycerolverwertung über diesen Weg sind bei *L. monocytogenes* die Glycerolkinasen GlpK1 (*Lmo1538*) und GlpK2 (*Lmo1034*) sowie die Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase GlpD verantwortlich, wobei die Glycerolkinase GlpK1 für ein extrazelluläres Wachstum von *L. monocytogenes* absolut notwendig ist und Glycerolkinase GlpK2 nur beim intrazellulären Wachstum Aktivität zu haben scheint.

3. Thiamin und seine Funktion im Stoffwechsel

Am Stoffwechsel eines Organismus sind zahlreiche organische und anorganische Substanzen beteiligt, zwischen denen zum Teil enge Verknüpfungen bestehen, so dass bei Mangel oder gänzlichem Fehlen einiger dieser Grundstoffe sogar der Gesamtstoffwechsel zum Erliegen kommen kann. Zu solchen lebensnotwendigen Grundstoffen gehören unter anderem auch Vitamine - organische Verbindungen, die in sehr geringen Mengen benötigt werden und von höheren Tieren nicht selbst synthetisiert werden können. Aufgrund der chemischen Vielfalt der Vitamine lassen sich diese primär nach ihrer Löslichkeit in wasserlösliche und fettlösliche Vitamine klassifizieren. Zu den letzteren gehören Retinol, Calciferol, Tocopherol und Menaquinon (Vitamine A, D, E, K). Die Gruppe der wasserlöslichen Vitamine setzt sich zusammen aus Folsäure, Niacin, Pantothersäure, Ascorbinsäure (Vitamin C), Biotin (Vitamin H) und den B-Vitaminen: Thiamin (B_1), Riboflavin (B_2), Pyridoxin (B_6) und Cobalamin (B_{12}). Die Aufgaben der Vitamine sind gleichermaßen verschieden, so fungieren mehrere Vitamine als Vorstufen von Cofaktoren für enzymatische Reaktionen (Vitamin B-Gruppe), während andere an der Regulation der Transkription (Vitamin A), an Redoxreaktionen (Vitamine C und E) und an verschiedenen weiteren Vorgängen beteiligt sind.

Im Gegenteil zu den Eukaryonten sind die meisten Mikroorganismen in der Lage, Vitamine selbst zu synthetisieren oder diese mittels verschiedener Transportsysteme aufzunehmen, falls sie die Fähigkeit zu deren Biosynthese verloren haben oder die Vitamine nicht in physiologisch ausreichender Menge herstellen können. Somit können Gene bzw. Genprodukte der Vitaminbiosynthese und des Vitamintransports geeignete Angriffsorte für antimikrobielle Substanzen darstellen.

Eines der ersten und in seiner Funktion bereits weitgehend gut untersuchten Vitamine stellt das Thiamin (Vitamin B_1) dar. Das Thiamin besteht aus zwei Heterozyklen, einem Pyrimidin-Ring (4-Amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidin, HMP) und einem Thiazol-Ring (5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazol, HET), die über eine Methylen-Gruppe miteinander verbunden sind. Das unphosphorylierte Thiamin stellt die biologisch inaktive Form des Vitamins B_1 dar und wird durch die Phosphorylierung der Hydroxyethyl-Seitenkette des Thiazols in das Coenzym Thiaminpyrophosphat (TPP), die aktive Form des Thiamins, umgewandelt, welche bei der oxidativen Decarboxylierung und den Gruppenübertragungsreaktionen eine wichtige Rolle spielt. Entscheidend für die Funktion des Thiamins als Cofaktor ist seine $N=CH-S$ -Gruppe im Thiazol-Ring, weil das Kohlenstoffatom dieser CH -Gruppe einen stark sauren Charakter besitzt und durch das positiv geladene Stickstoffatom und den negativ geladenen Schwefel zusätzlich polarisiert ist. Es ionisiert unter Bildung eines Carbanions, welches anschließend leicht eine Bindung durch eine nukleophile Addition an positiv teilgeladene Kohlenstoffatome in den Carbonylgruppen eingeht. Das positiv geladene Stickstoffatom im Thiazol-Ring fungiert als Elektronenfaller und stabilisiert die darauf folgende Decarboxylierung. Das bei dieser Reaktion entstandene TPP-gebundene Carbanion, das einem aktiven Aldehyd entspricht, wird entweder freigesetzt (Decarboxylase-Reaktion) oder bei gleichzeitiger Oxidation auf Liponamid übertragen (Dehydrogenase-Reaktion) [Friedrich, 1988].

Auf Grund dessen wurde dem Thiamin schon sehr früh eine entscheidende Bedeutung im zentralen Kohlenstoffmetabolismus zugewiesen und die Enzyme, in denen TPP der essentielle Cofaktor ist, werden in folgende Enzymfamilien eingeteilt [Peters, 1936]:

- **Pyruvat-Dehydrogenase, α -Ketoglutarat-Dehydrogenase und Verzweigtkettige- α -Keto-Dehydrogenase-Komplex:** Diese Multienzymkomplexe sind an der oxidativen Decarboxylierung der α -Ketosäuren beteiligt, bei der die α -Ketosäure in mehreren Schritten unter NADH/H⁺-Gewinn decarboxyliert und der Rest auf Coenzym A übertragen wird.
- **Acetolactat-Synthase:** Die nicht-oxidative Decarboxylierung wird von der Acetolactat-Synthase katalysiert und findet bei der Biosynthese der verzweigten Aminosäuren Valin und Isoleucin statt. Bei der Reaktion wird zunächst ein Pyruvatmolekül decarboxyliert und anschließend an ein weiteres Pyruvat oder α -Ketobutyrat geknüpft, wodurch 2-Acetolactat und 2-Aceto-2-hydroxybutyrat entstehen.
- **Transketolasen:** Im Pentosephosphatweg werden zur Herstellung von NADPH sowie Ribose für die Nukleotidsynthese die C2-Einheiten durch Transketolasen von Ketosen auf Aldosen übertragen.
- **Pyruvatdecarboxylase:** Während der alkoholischen Gärung in Hefen katalysiert die Pyruvatdecarboxylase die Spaltung von Pyruvat zu Acetaldehyd und Kohlendioxid.

Die listeriellen Enzyme, die TPP als Cofaktor benötigen, sowie die dazu gehörigen Stoffwechselwege sind in der Tabelle 14 zusammengestellt.

Stoffwechselweg	Enzym	Gen
Citratzyklus/ Pyruvatmetabolismus	Pyruvat-Dehydrogenase, Pyruvat-Oxidase	<i>pdhA/pdhB (lmo1052-1053)</i> <i>lmo0722</i>
Valin- und Isoleucin- Biosynthese/Degradation	Acetolactat-Synthase, α -Acetolactat-Synthase, 2-Oxoisovalerat-Dehydrogenase	<i>ilvB (lmo1984)</i> <i>alsS (lmo2006)</i> <i>lmo1372-1373</i>
Pentosephosphatweg	Transketolasen	<i>lmo0342/lmo2660</i> <i>lmo1032*-1033*/</i> <i>tkl (lmo1305)</i>
<i>myo</i> -Inositol-Abbau	oxidative Malonsemialdehyd- Decarboxylase	<i>lmo0386</i>
Menaquinonbiosynthese	2-Oxoglutarat-Decarboxylase, 2-Succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadien-1- carboxylat (SHCHC)-Synthase	<i>menD (lmo1675)</i>
Isoprenoidbiosynthese	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase	<i>lmo1365</i>

Tab.14: TPP-abhängige Enzyme von *L. monocytogenes*. Mit * sind *L. monocytogenes*-spezifische Gene gekennzeichnet [Schauer *et al.*, 2009].

In Bakterien leitet sich die HMP-Bildung von 5-Aminoimidazolribonuklid (AIR) ab, einem Zwischenprodukt in der Purinbiosynthese, wobei der Mechanismus noch größtenteils ungeklärt ist [Begley *et al.*, 1999; Lawhorn *et al.*, 2004]. Anhand der Sequenzanalysen zahlreicher bakterieller Genome konnte bislang in diesem Zusammenhang nur das Gen *thiC* identifiziert werden, dessen Genprodukt allein oder zusammen mit anderen noch nicht identifizierten Proteinen die Verknüpfung zwischen der Purin- und Thiaminbiosynthese herstellt [Vander *et al.*, 1993; Rodionov *et al.*, 2002]. Bei einem Genomvergleich von *Listeria monocytogenes* mit anderen bereits sequenzierten Bakteriengenomenen wurde das *thiC*-Gen nicht gefunden, wodurch die *de novo* Thiaminsynthese als nicht komplett gilt [Glaser *et al.*, 2001]. Die Tatsache, dass *L. monocytogenes* zudem nicht in der Lage ist, ohne Thiamin in definiertem Minimalmedium zu wachsen, bestätigt somit zusätzlich die unkomplette Thiaminbiosynthese, was sich auf das Fehlen des *thiC*-Gens zurückführen ließe [Premaratne *et al.*, 1991].

Der komplexe Syntheseweg von HET-P, der mehrere Schritte umfasst, scheint dagegen bei *L. monocytogenes* vollständig zu sein. In *E. coli*, *S. Typhimurium* und *L. monocytogenes* dienen Cystein, Tyrosin, Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat als Vorstufen für HET. Die letzten beiden kondensieren unter Katalyse der 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Synthase zu 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat, das bereits den Hauptteil des Thiazol-Grundgerüsts ausbildet. Das Schwefelatom des Thiazolringes stellt ein Cystein bereit. Es wird von den Enzymen ThiF (Lmo1049) und ThiI (Lmo1592) auf den aktivierten C-Terminus des ThiS-Proteins, eines Schwefel-Akzeptors, übertragen, wodurch ein Thiocarboxylat entsteht. Gleichzeitig wird L-Tyrosin durch ThiH in Glyoxylat umgewandelt. Anschließend findet der letzte Schritt der HET-Synthese statt, bei dem ThiG die Kondensation von Glyoxylat, 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat und dem Schwefel des Thiocarboxylats zu HET-Phosphat (HET-P) katalysiert [Settembre *et al.*, 2003; Rodionov *et al.*, 2002].

Auf die Synthese der beiden Heterozyklen folgt dann ihre Verknüpfung durch die Thiaminphosphat-Synthase ThiE (Lmo0318) zu Thiaminmonophosphat (TMP), wobei die Verknüpfung ausschließlich von den phosphorylierten Formen HMP-Pyrophosphat (HMP-PP) und HET-P ausgeht. HET-P ist bereits das Endprodukt der Thiazol-Synthese, bei der Synthese des Pyrimidin-Rings wird jedoch vermutet, dass HMP-P das eigentliche Endprodukt ist und die bifunktionale HMP-Kinase ThiD (Lmo0317) die zweite Phosphorylierung des HMP übernimmt. Zudem wird die HMP-Kinase benötigt, um intrazellulär frei vorliegendes oder von außen aufgenommenes HMP zu HMP-PP umzuwandeln. Dies konnte in dieser Arbeit bei der Charakterisierung der *thiD*-Deletionsmutante bestätigt werden, denn bei den durchgeführten Wachstumsversuchen auf Minimalmedium mit HMP statt Thiamin zeigte die *thiD*-Mutante eine völlige Wachstumsdefizienz, d.h. die erste Phosphorylierung von HMP zu HMP-P wird ausschließlich durch ThiD ausgeführt. Die Phosphorylierung des HMP-P zum HMP-PP kann aber auch von der Pyridoxalkinase PdxK (Lmo0662), einer Kinase mit einem offenbar sehr breiten Substratspektrum, durchgeführt werden [Begley *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2004]. Die Deletionsmutante in diesem Gen wies jedoch nur leicht vermindertes Wachstum auf dem HMP-haltigen Minimalmedium-Agar auf, woraus zu schließen ist, dass bei *L. monocytogenes* auch der zweite Phosphorylierungsschritt von der bifunktionalen HMP-Kinase ThiD ausgeübt

wird. Auf diese Weise konnte die enzymatische Funktion von ThiD nachgewiesen und dem Enzym seine funktionelle Rolle in der *de novo* Thiaminsynthese zugeordnet werden [Schauer *et al.*, 2009].

Die Bildung des frei vorliegenden HMP ist auf die Freisetzung des Thiamins ins Außenmilieu von Mikroorganismen zurückzuführen, weil sie überschüssiges Thiamin nicht speichern können. Dort findet eine basenkatalytische Spaltung des HET-Ringes statt, wodurch Formylaminopyrimidin entsteht. Dieses Spaltungsprodukt kann von den Zellen wieder aufgenommen und mit Hilfe der Thiaminase II, kodiert von *tenA* (*lmo0315*), über Aminopyrimidin zu HMP umgewandelt und somit der Thiaminbiosynthese zur Verfügung gestellt werden. Auf Grund dessen und der Tatsache, dass TenA eine viel höhere Affinität zu Aminopyrimidin als zu Thiamin besitzt, wird der Thiaminase II eine Salvage-Funktion im Thiaminsyntheseweg zugewiesen [Jenkins *et al.*, 2007]. Außerdem ist das Gen *tenA* zusammen mit anderen Thiaminsynthesegenen (*thiMDE*) in einem Operon organisiert, womit eine Beteiligung von TenA an der *de novo* Synthese nahe liegt [Jurgenson *et al.*, 2009].

Bei *L. monocytogenes* scheint dieser Salvage-Prozess während der intrazellulären Proliferation eine bedeutende Rolle zu spielen. Es ist bekannt, dass die cytosolische Thiaminkonzentration einiger eukaryotischer Zellen 2-3 μM beträgt; die der Caco-2 Zellen ist jedoch unbekannt [Bettendorff, 1995; Song *et al.*, 2002]. Bei der Analyse der in dieser Arbeit erstellten *thiD*-Mutante im Zellkultursystem wies diese im Vergleich zum Wildtyp eine um den Faktor 3,3 verminderte intrazelluläre Replikation auf, woraus zu schließen ist, dass die im Cytosol der eukaryotischen Zelle vorliegende Thiaminmenge für beide Zellen, Wirts- und Bakterienzelle, nicht ausreichend ist und *L. monocytogenes* bei der intrazellulären Lebensweise auf die *de novo* Synthese angewiesen ist, bei der HMP entweder aufgenommen oder durch TenA bereitgestellt wird [Schauer *et al.*, 2009]. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass die Deletion des *thiC*-Gens, welches im *Listeria*-Genom fehlt, in *E. coli* durch *tenA* aus *B. subtilis* komplementiert werden kann [Morett *et al.*, 2003]. Dementsprechend könnte auch die listerielle Thiaminase TenA unter bestimmten Bedingungen die Funktion der fehlenden HMP-Synthase ThiC übernehmen. Die Notwendigkeit der *de novo* Synthese für *L. monocytogenes* wird zudem auch durch das intrazelluläre Expressionsprofil in Caco-2 Zellen gestützt. Demnach findet intrazellulär eine starke Expression der Gene *thiF* und *thiD* statt, wogegen aber *thiI* kaum transkribiert wird [Joseph *et al.*, 2006].

Neben dem unphosphorylierten HMP kommt im Boden oder während der intrazellulären Lebensweise von *L. monocytogenes* im Cytosol auch das unphosphorylierte HET vor. Dieses gelangt durch Diffusion in die Zellen, wo es durch die Phosphorylierung zu HET-P, die von einer HET-Kinase ThiM (*lmo0316*) übernommen wird, in die *de novo* Thiaminsynthese eingeschleust wird.

Den letzten Schritt der Thiaminbiosynthese, die Phosphorylierung des TMP zur aktiven Form des Vitamins B₁, dem Thiaminpyrophosphat (TPP), wird von der Thiaminphosphatkinase ausgeführt.

Thiamintransport in *L. monocytogenes*

Allerdings ist die *de novo* Biosynthese nicht die einzige Möglichkeit, an das lebensnotwendige Vitamin B₁ zu gelangen. Die meisten Organismen sind nämlich auch in der Lage, Thiamin mittels verschiedener hoch affiner Transportsysteme aus dem Medium aufzunehmen. Der Verlust von ThiC bei *Listeria* und damit verbundene nicht vollständige Thiaminbiosynthese scheinen deshalb nur auf den ersten Blick einen Nachteil für den Organismus zu sein. In einem Habitat, das ausreichende Menge an Thiamin bietet, stellen sie vielmehr einen selektiven Vorteil dar, da die eingesparte Energie für andere wichtige endogene Prozesse eingesetzt werden kann. Der Wachstumsvorteil, den die Verwertung von externem Thiamin darbietet, macht sich vor allem in einer kürzeren Generationszeit bemerkbar. So braucht die gleiche Bakterienzahl für die Bildung eines konfluenten Rasens auf einer Minimalmedium-Agarplatte mit HMP drei Tage und auf einer Minimalmedium-Agarplatte mit Thiamin nur 12 Stunden.

Im Boden kommt Thiamin fast ausschließlich in phosphorylierter Form vor und muss vor der Aufnahme zunächst dephosphoryliert werden. In Hefen wandeln saure Phosphatasen, deren Funktion darin besteht, die Phosphoester zu hydrolysieren, TMP bzw. TPP zu freiem Thiamin um [Schweingruber *et al.*, 1991]. Bei Wachstumsanalysen von *L. monocytogenes* mit den unterschiedlichen Formen von Thiamin konnte jedoch kein signifikanter zeitlicher Unterschied in der Verwertung Thiamin, TMP oder TPP beobachtet werden, was ein Indiz auf ein hochaffines und schnelles Transportsystem gibt, bei dem die für die Dephosphorylierung verbrauchte Zeit nicht auffällt. Die zeitliche Verzögerung im Wachstum aufgrund der vorherigen Dephosphorylierung und der sich daran anschließenden Diffusion des Thiamins ins Zellinnere konnte aber unter denselben Wachstumsbedingungen bei der *thiT*-Mutante festgestellt werden. Das bedeutet, dass auch der listerielle Thiamintransporter nicht fähig ist, die phosphorylierten Thiaminformen zu transportieren und *L. monocytogenes* über Phosphatasen verfügen muss, die die Phosphatgruppen abspalten [Schauer *et al.*, 2009].

In *E. coli* und *S. Typhimurium* übernimmt ein ABC-Transporter, der von den *tbpAthiPQ*-Genen kodiert wird, die Aufgabe, freies Thiamin aufzunehmen [Webb *et al.*, 1998]. Anhand genomischer Analysen und auf Homologie-Basis bereits charakterisierter Thiamintransportern aus anderen Organismen konnte bei *L. monocytogenes* ebenfalls ein Transportsystem identifiziert werden, das allerdings nicht dem ABC-Transporter aus *E. coli* oder *S. Typhimurium* gleicht und deren Funktionsweise bis jetzt noch weitgehend unklar war. Es besteht aus nur einem integralen Membranprotein ThiT (Lmo1429), welches vermutlich durch Unterstützung anderer Proteine und unter ATP-Hydrolyse Thiamin in die Zelle transportiert. Diese Hypothese konnte durch heterolog in *E. coli* DH5 α /pDG148-Stu-*thiT* durchgeführten [³H]-Thiamin-Aufnahmeversuche bestätigt werden, denn es konnte lediglich die Bindung des Thiamins aber kein Transport beobachtet werden. In *Lactobacillus casei* wurde zudem ein Homolog zu ThiT gefunden, der dasselbe Bindeverhalten von Thiamin aber kein Transport zeigt [Eudes *et al.*, 2008]. Auch für Biotintransport und allgemein für Vitamintransport bei Gram-positiven Bakterien scheint dieses Modell zuzutreffen [Hebbeln *et al.*, 2007]. Darüber

hinaus ergaben bioinformatischen Genomvergleiche, dass dieses bei Gram-positiven Bakterien scheinbar weit verbreitete Transportmodell eine neue Klasse von ABC-Transportern darstellt, die einen ganz anderen Aufbau aufweisen und vor allem keine extrazelluläre Substratbindeuntereinheit besitzen. Ein Transporter dieser neuen Klasse der ABC-Transporter besteht demnach aus einer T-Komponente, einem kleinen integralen Membranprotein, und oft aus zwei A-Komponenten, den *energy-coupling*-Modulen mit ATPase Aktivität [Rodionov *et al.*, 2009]. Durch einen Loop an der A-Komponente wird der Kontakt zu der T-Komponente hergestellt und für den Transport benötigte Energie bereitgestellt. Ein für Biotintransport vorgeschlagenes und offensichtlich auch für Thiamintransport zutreffendes Modell eines EcfAA'T-Transportersystems ist in Abbildung 37 dargestellt.

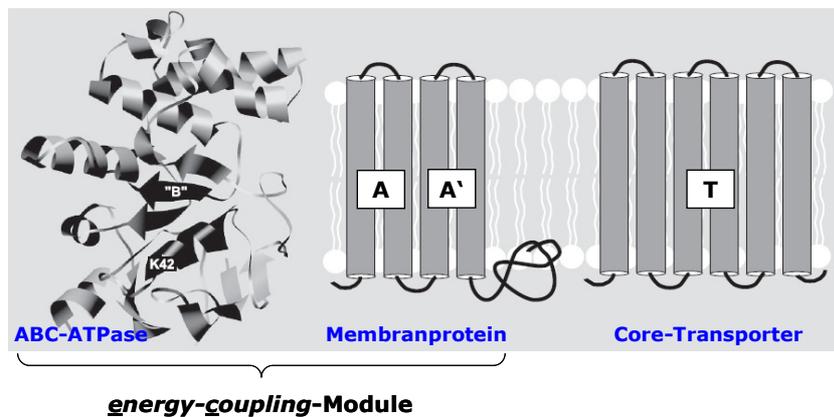


Abb.37: Modell eines EcfAA'T-Transportersystems für Biotin [modifiziert nach Hebbeln *et al.*, 2007; Rodionov *et al.*, 2009]

Dabei ist die T-Komponente spezifisch für das zu transportierende Substrat, das *energy-coupling*-Modul wird dagegen entweder nur von einer bestimmten T-Komponente oder auch von mehreren verschiedenen T-Komponenten genutzt. Die für das *energy-coupling*-Modul kodierenden Gene können ebenfalls zusammen mit der jeweiligen T-Komponente in einem Operon organisiert oder an einer anderen Stelle im Genom vorliegen. Bei *B. subtilis* wird das *energy-coupling*-Modul von den Genen *ybaDEF* kodiert und von den Transportersystemen für Thiamin, Biotin und Riboflavin verwendet [Rodionov *et al.*, 2009]. Die entsprechenden Homologe in *L. monocytogenes* könnten Lmo2601-2599 darstellen, die eine sehr hohe Übereinstimmung von 73-78% auf der Aminosäureebene zeigen und mit ThiT zusammen einen funktionalen Thiamintransporter bilden könnten.

Außer der Zugehörigkeit zu einer neuen Klasse der ABC-Transporter weist der listerielle Thiamintransporter ThiT eine hohe Affinität zu seinem Substrat und eine ebenso hohe Substratspezifität auf, da ausschließlich strukturell sehr ähnliche Verbindungen transportiert werden. So kann eine Aufnahme von Thiamin als auch von seinem Analogon Pyriithiamin mittels ThiT erfolgen, jedoch nicht die Aufnahme von HMP, obwohl HMP den Pyrimidin-Ring von Thiamin darstellt. Somit wird vermutet, dass es für HMP einen eigenen Transporter geben muss [Schauer *et al.*, 2009].

Neben der Charakterisierung des ThiT-Transporters *in vitro* wurde außerdem auch seine Rolle für den intrazellulären Metabolismus von *L. monocytogenes* untersucht. In den

durchgeführten Infektionsexperimenten konnte dabei ermittelt werden, dass das Fehlen von aktivem Transport eine 2,2-fache Attenuation in der intrazellulären Proliferation von *L. monocytogenes* vermittelt, die zwar niedriger als beim Fehlen der HMP-Kinase ThiD ausfällt und sich aber damit begründet lässt, dass Thiamin in geringem Maße auch durch Diffusion ins Cytosol gelangt. Nichtsdestoweniger ist auch der aktive Transport für effektives Replizieren im Cytosol der Wirtszelle notwendig, weil die Deletion von *thiT* und somit der intrazelluläre Thiaminbedarf von *L. monocytogenes* nicht durch die *de novo* Synthese und den passiven Thiamintransport allein komplementiert werden können.

Regulation der Genexpression durch TPP

Das neu synthetisierte oder aufgenommene, oder eindiffundierte Thiamin verbleibt erst durch anschließende Phosphorylierung in der Zelle. Die Phosphorylierung des Thiamins zu TPP erfolgt in *L. monocytogenes* auf zwei Wegen: entweder wird Thiamin zunächst von der Thiaminkinase ThiK zu TMP phosphoryliert und daraufhin von der Thiaminphosphatkinase zu TPP umgewandelt oder es finden eine direkte Phosphorylierung vom Thiamin zu TPP statt, die von der Thiaminpyrophosphokinase ThiN (Lmo1817) katalysiert wird.

Die Thiaminphosphorylierung zu TPP ist ein energieaufwendiger Prozess, der mindestens fünf Phosphorylierungen pro Molekül TPP benötigt. Damit der Energieaufwand minimal gehalten werden kann, wird die Expression der Transport- und einiger Biosynthesegene vom Endprodukt, dem TPP, über einen Riboswitch-Mechanismus reguliert [Winkler *et al.*, 2002]. Im Allgemeinen sind in der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) der unter Kontrolle des Riboswitch-Mechanismus stehenden Genen die *cis*-agierenden regulatorischen RNAs lokalisiert. Diese bilden im Transkript alternierende Sekundärstrukturen, entweder eine Terminator- oder Antiterminatorstruktur, welche zusätzlich von Sensormolekülen (z.B. TPP) stabilisiert werden können, wodurch entweder ein vorzeitiger Abbruch der Transkription stattfindet oder es zur Regulation der Translation kommt. Auf diese Weise werden bei *E. coli* die in die Thiaminbiosynthese involvierten Gene *thiM* und *thiC* reguliert, wobei die Regulation des *thiC*-Gens sowohl auf der Transkriptions- als auch auf der Translationsebene stattfindet, während es bei dem *thiM*-Gen dieser negative Rückkopplungsmechanismus lediglich auf der Translationsebene auftritt [Winkler *et al.*, 2002; Vitreschak *et al.*, 2004; Winkler, 2005].

Auch in *L. monocytogenes* wurden anhand der bereits vorhandenen Genomsequenz zahlreiche potentiell durch Riboswitch-Mechanismen regulierte Gene identifiziert, darunter auch das *prfA*-Gen, bei dem ein Thermosensormechanismus zur erhöhten Translationsinitiation führt [Johansson *et al.*, 2002]. Analog zu *E. coli* könnte TPP demnach auch in *L. monocytogenes* die Expression von Genen, die an der Biosynthese von Thiamin beteiligt sind, und das *thiT*-Gen über Riboswitch-RNA kontrollieren [Rodionov *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002]. Hinweise dafür lieferten Wachstumsversuche mit dem Thiaminanalogen Pyrithiamin, bei denen eine hohe Konzentration von Thiamin im nichtäquimolaren Gemisch (Thiamin/Pyrithiamin) Pyrithiaminresistenz und bei niedriger Thiaminkonzentration Pyrithiaminsensitivität hervorrief. Da das *thiT*-Gen außerdem eine *thi*-Box besitzt, könnte davon ausgegangen werden, dass bei

hoher cytosolischer Thiaminkonzentration TPP die Genexpression von *thiT* über diese *thi*-Box reprimiert, wodurch Pyrithiaminresistenz entsteht. Bei niedriger Konzentration findet dagegen die Synthese des ThiT-Transporters und damit verbundener Thiamintransport statt, bei dem zusammen mit Thiamin auch Pyrithiamin aufgenommen und die enzymatische Aktivität der Thiaminpyrophosphokinase ThiN (Lmo1817) gehemmt wird, wodurch wiederum Pyrithiaminsensitivität entsteht.

Es ist auch nicht auszuschließen, dass TPP möglicherweise ebenso die Expression anderer, nicht an der Thiaminsynthese oder Transport beteiligter Gene über Riboswitch-Mechanismus kontrolliert. Es wäre daher sinnvoll durch Northern-Hybridisierungen oder Promotor-expressionstudien herauszufinden, welche Transkripte bzw. Promotoren durch TPP beeinflusst werden. Eine Identifizierung der in ihrer Expression veränderten Genprodukte kann dann zur weiteren Aufklärung der Rolle von TPP und somit auch von Thiamin in *L. monocytogenes* beitragen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sowohl Thiamin als auch seine Vorstufen einen limitierenden Faktor bei der intrazellulären Lebensweise von *L. monocytogenes* darstellen und ihre *de novo* Synthese bzw. Transport dadurch potenzielle antimikrobielle Targets darstellen. Zudem sind die meisten in der Tabelle 14 aufgelisteten Enzyme, bei denen TPP als Cofaktor fungiert, am Pentosephosphatweg und der Biosynthese der verzweigten Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin beteiligt. Diese Aminosäuren können nicht von Caco-2 Zellen synthetisiert werden, weshalb auch die Expression der daran beteiligten Biosynthesegenen während der intrazellulären Replikation stark hochreguliert ist. Eine ebenfalls verstärkte Expression der in den Pentosephosphatweg involvierten Enzymen stellt ein Indiz dafür dar, dass *L. monocytogenes* den Pentosephosphatweg als Abbauweg von Hexosen der Glycolyse vorzieht. Folglich benötigt *L. monocytogenes* höhere Thiamin- bzw. TPP-Konzentrationen, um sich ein erfolgreiches Replizieren im Cytosol der Wirtszelle zu ermöglichen.

4. Teichonsäuren – Bestandteile der Zellwand Gram-positiver Bakterien

Die Produktion von Teichonsäuren ist bei Gram-positiven Bakterien sehr stark verbreitet und spielt eine wichtige Rolle sowohl beim Besiedeln der unterschiedlichsten ökologischen Nischen, als auch in der Pathogenese. Teichonsäuren sind sehr große und stark hydratisierte Moleküle, weshalb sie 20 bis 40% der Zellwandtrockenmasse ausmachen können und einen enorm hohen Wassergehalt aufweisen [Fiedler, 1988]. Je nach Zusammensetzung des Polymers aus Ribitol- oder Glycerolphosphateinheiten werden Ribitol- und Glycerolteichonsäuren unterschieden. Häufig werden die Teichonsäuren durch verschiedene Zucker wie Glucose, Galactose, Rhamnose und N-Acetylglucosamin sowie durch Nichtzuckersubstituenten wie z.B. Lysin, D-Alanin, Glutaminsäure oder Acetylgruppen modifiziert, die gemeinsam mit dem Polymer-Rückgrat dem Molekül einen zwitterionischen Charakter verleihen. Dabei sind die

zahlreichen Phosphatgruppen des Polymer-Rückgrats die Träger der negativen Ladung, dahingegen stammt die positive Ladung von freien Aminogruppen der Aminosäuresubstituenten [Neuhaus & Baddiley, 2003; Weidenmaier *et al.*, 2008b].

Genetik der Teichonsäuren-Biosynthese bei *L. monocytogenes*

Die Teichonsäuren von *Listeria monocytogenes* EGD Serovar 1/2a lassen sich strukturell, wie auch die Wandteichonsäuren anderer Bakterien, in zwei Teile gliedern: die Hauptkette, bestehend aus sich wiederholenden *repeating units*, und die „*linkage unit*“, einer Ankerstruktur aus einem Molekül N-Acetylglucosamin, einem Molekül N-Acetylmannosamin, einem Glycerolphosphat und zwei Glucosemolekülen (Abb.38). Die Ankerstruktur der Teichonsäuren ist hochkonserviert und weist bei den meisten Gram-positiven Bakterien einen Disaccharid-Terminus aus N-Acetylmannosamin und N-Acetylglucosamin-1-Phosphat auf, welcher über eine Phosphodiesterbindung an das C6-Atom der N-Acetylmuraminsäure des Peptidoglykans gebunden wird [Yokoyama *et al.*, 1989; Zhang *et al.*, 2006]. Die einzelnen *repeating units* der Teichonsäuren setzen sich aus einem Ribitolphosphat, das am C2- und C4-Atom über eine α -Verknüpfung ein Rhamnosedimer und N-Acetylglucosamin trägt, zusammen, und sind teilweise durch D-Alanin modifiziert. Aus ca. 21-30 dieser 1,5-verknüpften Ribitolphosphat-Einheiten wird die Hauptkette aufgebaut, wobei sowohl die Länge als auch die Gesamtmenge der Teichonsäuren in Abhängigkeit zu äußeren Umweltfaktoren stehen. Das molare Verhältnis von Ribitol zu Rhamnose, N-Acetylglucosamin und Phosphat in der Hauptkette beträgt etwa 1:1,3:0,8:1,1 [Fiedler, 1988; Zhang *et al.*, 2006].

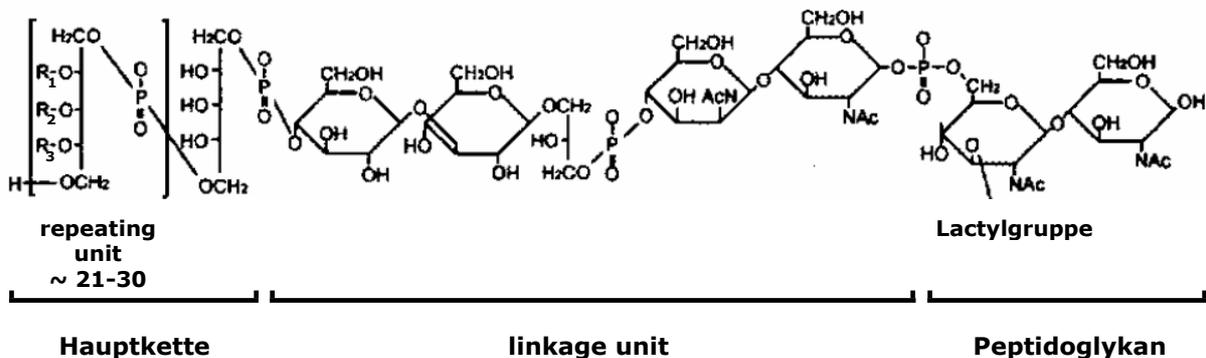


Abb.38: Struktur der Ribitolteichonsäuren von *Listeria monocytogenes*. Die Substituenten der Ribitolphosphat-einheiten sind mit R gekennzeichnet: R₁ = α -N-Acetylglucosamin, R₂ = OH-Gruppe und R₃ = α -Rhamnosedimer [Navarre *et al.*, 1999].

Die Unterschiede in der Modifikation der Ribitol-Einheiten verschiedener *Listeria*-Spezies liegen sowohl in der Art des Zuckersubstituenten als auch in seiner Position und Bindung am Ribitolphosphat. Demnach werden die *Listeria*-Spezies zunächst in vier Serotypen eingeteilt: Typ 1/2 (Serovar 1/2a, 1/2b und 1/2c), Typ 3 (Serovar 3a, 3b und 3c), Typ 4 (Serovar 4a, 4b, 4c, 4d und 4e) und Typ 7. Die Teichonsäuren des Serotyps 1/2 setzen sich aus Polyribitolphosphat-Einheiten zusammen, die N-Acetylglucosamin und Rhamnose als Substituenten tragen. Der Serotyp 3 hat bis auf die fehlende Rhamnose dieselbe Struktur der

repeating units. Im Gegensatz zu den ersten beiden Serotypen fungiert N-Acetylglucosamin beim Serotyp 4 nicht als Substituent der *repeating units*, sondern wird mit in die Polyribitolphosphat-Kette eingebaut. Zudem weicht die Position von N-Acetylglucosamin am Ribitol von der der Serotypen 1/2 und 3 ab und auch untereinander ist die N-Acetylglucosamin-Position nicht identisch. Als Modifizierung dienen dagegen Glucose und/oder Galactose. Der Serotyp 7 besitzt die am einfachsten zusammengesetzten Teichonsäuren, da seine *repeating units* keine Zuckersubstituenten tragen und somit reine Polyribitol-Polymere sind [Uchikawa *et al.*, 1986].

Die Biosynthese der Teichonsäuren ist sehr komplex und erfordert eine Vielzahl von Enzymen und regulatorischen Faktoren. Bei verschiedenen Gram-positiven Bakterien und auch bei den *Listeria*-Spezies variiert sie je nach dem Grundbaustein der repetitiven Alditolphosphat-Einheiten und seinen der Modifizierung dienenden Substituenten. Allgemein weist die Synthese der Teichonsäuren jedoch einige Regelmäßigkeiten auf und kann in folgende Stadien gegliedert werden [Neuhaus *et al.*, 2003]:

- Aufnahme der Substrate und ihre Umwandlung in Nukleosiddiphosphat-Zucker
- Aufbau der *linkage unit* am Undekaprenylphosphat, einem Isoprenoid-Carrier-Lipid
- Polymerisation der *repeating units* an der Ankerstruktur zum Polyalditolphosphat
- Modifikation der einzelnen *repeating units*
- Translokation der Teichonsäuren aus dem Cytosol und deren Bindung an Peptidoglykan

Die Substrataufnahme ist der erste wichtige Kontrollschritt, jedoch nicht spezifisch für die Teichonsäuren-Biosynthese. Der zweite Schritt ist die Umwandlung der Substrate in aktivierte Zuckermoleküle, welche als Vorstufen für die Synthese dienen. Die aktivierten Zucker werden außer für die Synthese der Teichonsäuren noch zur Polysaccharidsynthese, der Energiegewinnung und der Umwandlung in Zellmaterial eingesetzt, sodass auch dieser Syntheseschritt nicht als hoch spezifisch einzustufen ist. Lediglich der Aufbau der *linkage unit*, die Polymerisation der *repeating units*, die Modifizierung und der Transport der synthetisierten Teichonsäuren weisen für das betreffende Polyalditolphosphat eine hohe Spezifität auf.

Über die genaue Biosynthese der Teichonsäuren bei *Listeria monocytogenes* ist bis heute wenig bekannt. Viele Vermutungen und Hypothesen basieren auf den Erkenntnissen über andere Gram-positive Bakterien wie *B. subtilis* und *Staphylococcus aureus*. Der für *B. subtilis* 168 postulierte und als Modell für andere Organismen fungierende *tag*-Syntheseweg könnte auch auf die Teichonsäurensynthese von *L. monocytogenes* übertragbar sein und ist in modifizierter Form in Abbildung 39 dargestellt [Neuhaus *et al.*, 2003].

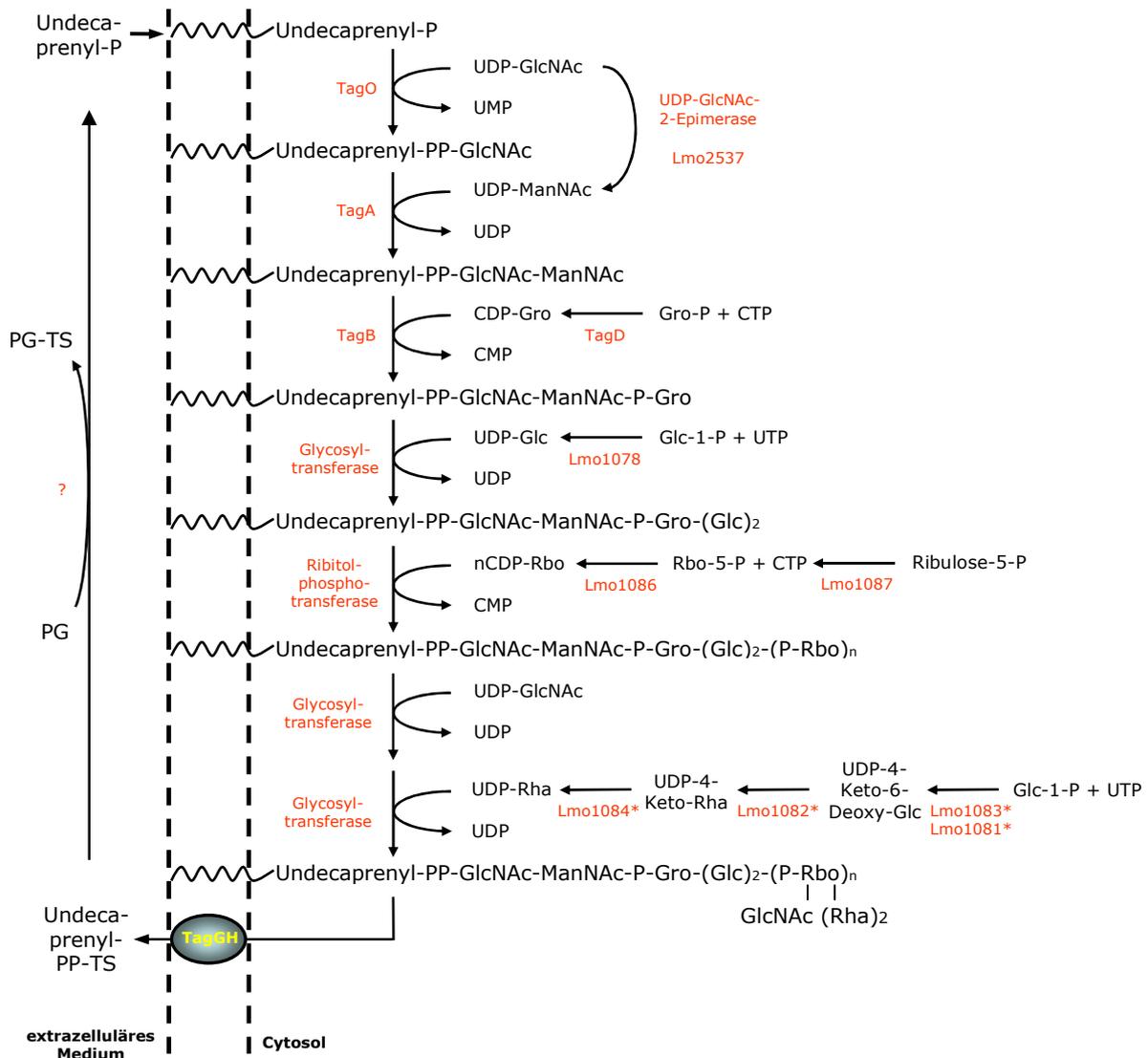


Abb.39: Synthese der Ribitolteichonsäuren in *Listeria monocytogenes*. Die entsprechenden Enzyme sind rot dargestellt. Ungeklärte Syntheseschritte sind mit „?“ und *L. monocytogenes*-spezifische Gene mit * gekennzeichnet. Glc, Glucose; GlcNAc, N-Acetylglucosamin; Gro, Glycerol; ManNAc, N-Acetylmannosamin; P, Phosphat; PG, Peptidoglykan; PP, Pyrophosphat; Rbo, Ribitol; Rha, Rhamnose; TagA, Glycosyltransferase; TagB, Glycerophosphotransferase; TagD, Glycerol-3-P-Cytidyltransferase; TagG, Translokase; TagH, ATP-Bindeprotein; TagO, Glycosyltransferase; TS, Teichonsäure.

Angesichts der Beteiligung von Undecaprenylphosphat, einem Isoprenoid-Carrier-Lipid, an der Synthese der Teichonsäuren erfolgt diese an der bakteriellen Membran. Allerdings ist die Membran für die enzymatische Aktivität der in die Synthese involvierten Enzyme nicht notwendig, da sie, abgesehen von der Translokase TagG, weder Transmembrandomänen besitzen noch an einen Lipidcarrier gebunden sind. Darüber hinaus sind die Enzyme im Cytosol lokalisiert, weshalb die Teichonsäuren-Synthese an der cytosolischen Seite der Membran stattfinden muss. Nach neuen Erkenntnissen scheint zudem die ATP-bindende Komponente TagH des ABC-Transporters TagGH eine Schlüsselrolle in der Teichonsäuren-Synthese zu spielen, indem sie vermutlich die an der Synthese beteiligten Enzyme zu einem Multienzymkomplex an der Translokase TagG verbindet und die nötige Energie für den aktiven Transport der synthetisierten Teichonsäuren bereitstellt [Navarre *et al.*, 1999; Ginsberg *et al.*,

2006; Formstone *et al.*, 2008]. Im Gegensatz zu den Teichonsäuren werden die Lipoteichonsäuren an der äußeren Seite der Cytoplasmamembran synthetisiert, obwohl alle Substrate im Cytosol vorbereitet werden. Die Bindung an verschiedene Lipidcarrier führt dann zu ihrer Translokation über die Cytoplasmamembran. Auch die Bereitstellung und der Ursprung der Substrate für die Synthese unterscheiden sich deutlich voneinander, woraus sich ableiten lässt, dass die Synthese der beiden Oberflächenpolymere über separate Biosynthesewege abläuft [Navarre *et al.*, 1999; Neuhaus *et al.*, 2003].

Die Regulation der Teichonsäuren-Biosynthese bei pathogenen Bakterien erweist sich ebenso wie die Synthese als sehr komplexer Vorgang, über den wenig bekannt ist. Die Expression der Teichonsäuren-Gene kann einer gemeinsamen Kontrolle mit anderen Genen unterliegen, die mit pathogenen Eigenschaften im Zusammenhang stehen, oder sie erfolgt unabhängig von den Virulenzfaktoren. Bei den Regulatoren handelt es sich entweder um Transkriptionsfaktoren oder um Zwei-Komponenten-Regulationssysteme. Die letzteren bestehen aus Sensor-Effektor-Paaren und befähigen die Bakterien zur Wahrnehmung ihrer Umwelt und ihres eigenen Stoffwechsellzustandes. Aufgrund der unterschiedlichen Lebensweisen von *L. monocytogenes*, frei lebend oder in einem Wirtsorganismus, könnte auch die Regulation der Teichonsäuren-Biosynthese unterschiedlich ausfallen und eine entscheidende Rolle in der Virulenz spielen [Dubail *et al.*, 2006]. Zudem liegen die Teichonsäuren-Gene bei *L. monocytogenes* nicht geclustert vor, sondern in mehreren Operons organisiert und an unterschiedlichen Stellen im *Listeria*-Genom lokalisiert. Dementsprechend könnten die einzelnen Operons getrennt voneinander und von Virulenzfaktoren reguliert werden.

Im Genom von *Listeria monocytogenes* sind bisher sechs mögliche Operons für die Teichonsäuren-Synthese gefunden worden, die alle aus Genen bestehen, die typische Proteine für eine Synthese der Polyalditolphosphate kodieren (Abb.40). Ein weiteres Operon, *dltABCD*, ist an der D-Alanin-Modifikation der Teichon- und Lipoteichonsäuren beteiligt [Glaser *et al.*, 2001]. Durch Homologievergleiche der Sequenzen mit bereits bekannten bakteriellen Genomen mittels PSI-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi> und <http://www.microbesonline.org>) konnte fast allen listeriellen Genen der Teichonsäuren-Synthese eine putative Funktion zugeordnet werden (Tab.15). Die tatsächlichen Aufgaben der meisten dieser Gene sind allerdings noch ungeklärt.

DISKUSSION

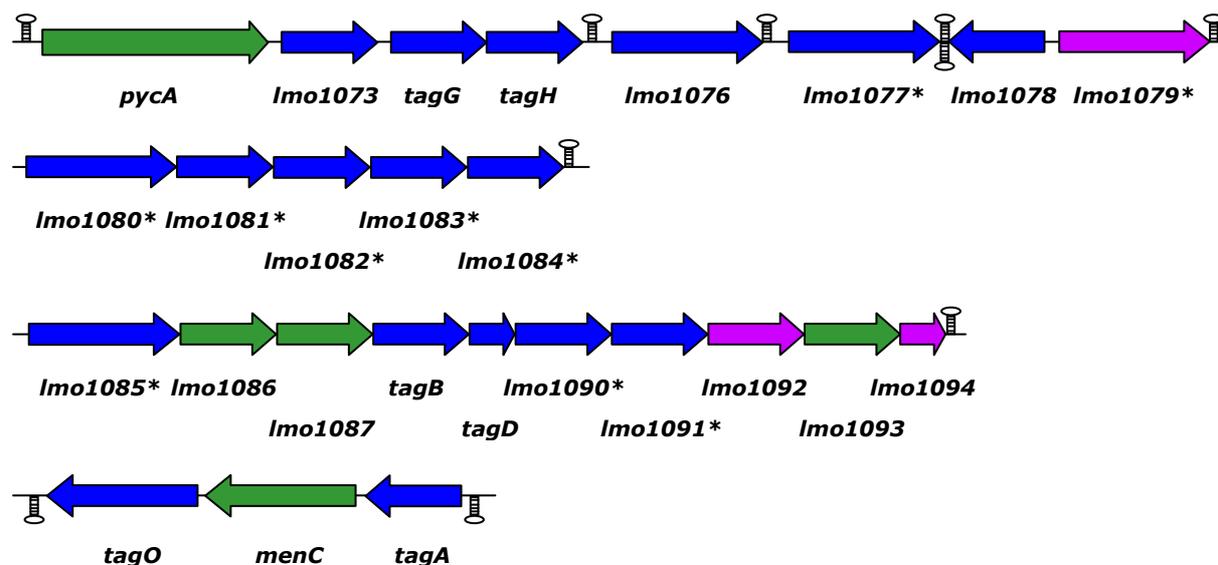


Abb.40: Physikalische Karte der bei *L. monocytogenes* an der Teichonsäuren-Synthese beteiligten Operons. Die *L. monocytogenes*-spezifische Gene sind mit „*“ gekennzeichnet. Die Zuordnung der Gene zu funktionellen Gruppen ist farblich hervorgehoben: ■ intermediärer Stoffwechsel, ■ zelluläre Prozesse, ■ unbekanntes Protein. T Terminator.

Gen	Enzym	Syntheseschritt
<i>pycA</i> (<i>Imo1072</i>)	Pyruvat-Carboxylase	-
<i>Imo1073</i>	Metall-Bindeprotein	-
<i>tagG</i> (<i>Imo1074</i>)	Translokase	Transport
<i>tagH</i> (<i>Imo1075</i>)	ATP-Bindeprotein	Transport
<i>Imo1076</i>	Autolysin (N-Acetylmuramoyl-L-Alaninamidase)	-
<i>Imo1077*</i>	Protein B der Teichonsäuren-Synthese	?
<i>Imo1078</i>	UDP-Glucose-Pyrophosphorylase	Zuckeraktivierung
<i>Imo1079*</i>	hypothetisches Protein YfhO	?
<i>Imo1080*</i>	hypothetisches Protein GgaB	?
<i>Imo1081*</i>	Glucose-1-P-Thymidyltransferase	L-Rhamnosese Synthese
<i>Imo1082*</i>	dTDP-3' 5'-Epimerase	L-Rhamnosese Synthese
<i>Imo1083*</i>	dTDP-D-Glucose-4,6-Dehydratase	L-Rhamnosese Synthese
<i>Imo1084*</i>	dTDP-L-Rhamnose-Synthetase (4'-Ketoreduktase)	L-Rhamnosese Synthese
<i>Imo1085*</i>	Protein B der Teichonsäuren-Synthese	?
<i>Imo1086</i>	CDP-Ribitol-Pyrophosphorylase	Ribitolsynthese
<i>Imo1087</i>	NADP-abhängige Alkoholdehydrogenase	Ribitolsynthese
<i>tagB</i> (<i>Imo1088</i>)	Glycerophosphotransferase	<i>linkage unit</i> -Synthese
<i>tagD</i> (<i>Imo1089</i>)	Glycerol-3-P-Cytidyltransferase (Protein D)	Glycerol-Aktivierung
<i>Imo1090*</i>	Glycosyltransferase	Modifikation der <i>repeating unit</i>
<i>Imo1091*</i>	Glycosyltransferase	Modifikation der <i>repeating unit</i>
<i>Imo1092</i>	hypothetisches Protein YueK	?
<i>Imo1093</i>	NH ₃ -abhängige NAD ⁺ -Synthetase	?

<i>lmo1094</i>	hypothetisches Protein	?
<i>tagO (lmo2519)</i>	Glycosyltransferase	<i>linkage unit</i> -Synthese
<i>menC(lmo2520)</i>	O-Succinylbenzoat-CoA-Synthase	?
<i>tagA (lmo2521)</i>	Glycosyltransferase	<i>linkage unit</i> -Synthese

Tab.15: Gene und Genprodukte der Teichonsäuren-Biosynthese von *L. monocytogenes*. Mit „*“ sind *L. monocytogenes*-spezifische Gene hervorgehoben. Die noch unbekannte Aufgabe einiger Enzyme in der Teichonsäuren-Synthese ist durch ein Fragezeichen und die eindeutige Beteiligung an anderen Stoffwechselwegen durch „-“ gekennzeichnet.

Bisherige Untersuchungen über die an der Teichonsäuren-Synthese beteiligten Enzyme von *L. monocytogenes* schließen nur zwei Enzyme ein: Lmo2537 und Lmo1078. Das Enzym Lmo2537, eine UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase, ist in die Synthese der *linkage unit* involviert. Sie wandelt UDP-N-Acetylglucosamin in UDP-N-Acetylmannosamin um und stellt somit die zweite für den Zusammenbau der Ankerstruktur benötigte Zuckervorstufe bereit. Die Blockierung der *linkage unit*-Synthese durch Inaktivierung des *lmo2537*-Gens führt demnach zu einem Ausfall der *linkage unit*-Synthese und in der Folge zu einer stark verringerten Teichonsäuren-Produktion und zu einer damit verbundenen verminderten Virulenz [Dubail *et al.*, 2006]. Das Enzym Lmo1078 ist eine UDP-Glucose-Pyrophosphorylase und katalysiert die Aktivierungsreaktion der Zuckervorstufe UDP-Glucose. Diese wird für die Glycosylierung der Teichonsäuren und die Biosynthese von Glycolipiden, der Ankerstruktur der Lipoteichonsäuren, benötigt. Eine erhöhte Sensitivität gegenüber niedrigen Temperaturen und hohen Salzkonzentrationen ist daher die Folge der fehlenden Enzymaktivität [Chassaing *et al.*, 2007]. Die putative Funktion der übrigen Enzyme wurde in Analogie zu *B. subtilis* aufgestellt.

Bedeutung der Teichonsäuren in der Bakterienphysiologie

Bereits aufgrund der physikochemischen Eigenschaften von Teichonsäuren lassen sich einige biologische Funktionen ableiten, welche den Bakterien unter normalen Umweltbedingungen Überlebensvorteile verschaffen. Als physikalische Barriere bieten die Teichonsäuren den Bakterien Schutz vor Austrocknung, dem Angriff von Detergenzien, hydrophoben Substanzen, Antibiotika, Bakteriocinen und Defensinen. Der anionische Charakter der Teichonsäuren ermöglicht eine Funktion der Moleküle als Ionenaustauscher und hilft somit, wichtige Mineralien, Nährstoffe oder Enzyme und vor allem Mg^{2+} und Ca^{2+} um die Bakterienkolonie zu konzentrieren. Diese Eigenschaft als Ionenaustauscher trägt außerdem zur Aufrechterhaltung des Protonengradienten, einer äußerst wichtigen Komponente des Energiemetabolismus, bei [Heptinstall *et al.*, 1970]. Ebenso relevant ist die Aufgabe der Teichonsäuren für das Zellwachstum und die Zellteilung, zumal sie möglicherweise die einzelnen Enzyme der Zellteilungsmechanik durch nicht-kovalente Bindung an der Zelloberfläche halten und die Aktivität von Autolysin, einem Peptidoglykan hydrolysierendem Enzym, durch Bereitstellung zweiwertiger Kationen regulieren. Für viele Bakteriophagen fungieren die Teichonsäuren neben dem Peptidoglykan als Rezeptoren, wobei vor allem die Modifizierung der Polymer-Einheiten die Phagenspezifität bestimmt. Eine weitere wichtige Funktion der Teichonsäuren ist

die Vermittlung der Anheftung von Bakterien an inerte und biologische Oberflächen, wie z.B. Bodenpartikel oder Pflanzenzellwände [Wendlinger *et al.*, 1996; Weidenmaier *et al.*, 2008b]. Neben den allgemeinen Funktionen wird den Oberflächenstrukturen der pathogenen Bakterien eine große Bedeutung in der Bakterien-Wirtszell-Interaktion zugewiesen. Für das pathogene Bakterium *Staphylococcus aureus* wurde z.B. eine positive Korrelation zwischen Wirtskolonisation und Teichonsäuren-Synthese festgestellt: Eine verminderte Adhäsion an Epithel- und Endothelzellen und sogar der vollständige Verlust der Kolonisationsfähigkeit im Tiermodell sind die Folge einer veränderten bzw. komplett fehlenden Teichonsäuren-Produktion [Weidenmaier *et al.*, 2004; Weidenmaier *et al.*, 2005; Weidenmaier *et al.*, 2008a]. Weiterhin dienen die Teichonsäuren bei *S. aureus* zur Maskierung der darunter liegenden Cytoplasmamembran und schützen dadurch das Bakterium vor der Wirtsabwehr durch kationische Peptide wie Defensinen und dem Angriff allgemein antimikrobiell wirkender Peptide. [Peschel *et al.*, 1999]. Ähnliche Beobachtungen ergaben sich auch bei *Streptococcus pyogenes*, der seine Resistenz gegenüber antimikrobiellen Peptiden und die Fähigkeit zur Invasion von Epithelzellen als Folge fehlender D-Alanin-Modifikation der Teichonsäuren verliert [Kristian *et al.*, 2005]. Die Rolle der Teichonsäuren bezüglich des Pathogenitätsverhaltens ist jedoch bei einer großen Anzahl von Gram-positiven Bakterienarten noch weitgehend unklar.

Neben den Teichonsäuren scheinen auch die Lipoteichonsäuren (*lipoteichoic acid*, LTA) wichtige Funktionen bei der Interaktion mit dem Wirt auszuüben. Oft dienen sie der Präsentation von wichtigen Virulenzfaktoren und anderen Oberflächenproteinen. Das listerielle Internalin B bietet hierzu ein Beispiel, weil es zwar zum Teil auch im Überstand zu finden, aber hauptsächlich durch Assoziation mit den Lipoteichonsäuren in der Zellwand gebunden ist [Jonquères *et al.*, 1999]. Weiterhin interagieren die LTA von *S. aureus*, *S. pneumoniae* und vieler anderer Gram-positiver Bakterien mit Rezeptoren von Makrophagen, unter anderem z.B. mit *Toll-like receptor 2* (TLR2) und beeinflussen die Produktion und Sekretion von Interleukinen. [Greenberg *et al.*, 1996; Keller *et al.*, 1992; Bhakdi *et al.*, 1991; Weidenmaier *et al.*, 2008b].

Funktion der Teichonsäuren bei *L. monocytogenes*

Die Oberfläche von *Listeria monocytogenes* wird nach bisherigen Untersuchungen nur durch Teichon- und Lipoteichonsäuren bestimmt. Die von *L. monocytogenes* produzierten Teichonsäuren übernehmen primär die bereits oben beschriebenen, allgemeinen Funktionen der stark hydratisierten Oberflächenpolymere. Für Bakteriophagen fungieren sie jedoch neben dem Peptidoglykan als Rezeptoren. Dabei dienen vor allem N-Acetylglucosamin und Rhamnose, die Modifizierungen der Ribitol-Einheiten, als Erkennungsstellen für die temperenten *Listeria*-Phagen A118 und A500. Der *Listeria*-Phage A511 lysiert dagegen die meisten *Listeria*-Stämme, da Peptidoglykan als sein Rezeptor agiert, womit sich auch sein breites Wirtsspektrum erklären lässt [Wendlinger *et al.*, 1996].

Durch vergleichende Analysen der Teichonsäuren verschiedener *Listeria*-Stämme in Bezug auf die Modifikation der Ribitol-Einheiten konnte nur eine Korrelation zwischen Teichonsäuren-Modifikation und den *Listeria*-Serogruppen nachgewiesen werden. Zwischen der Struktur der *repeating units* und *Listeria*-Spezies und somit möglicherweise auch der Virulenz der einzelnen *Listeria*-Arten konnte kein Zusammenhang festgestellt werden [Fiedler *et al.*, 1984]. Dennoch könnten die Teichonsäuren von *L. monocytogenes* eine indirekte Beteiligung an der Kolonisation der Wirtszellen haben. Die Ribitolpolymere unterstützen unter Ausbildung zahlreicher Zell-Zell-Kontakte eine stabilere Adhäsion, ihr Fehlen äußert sich aber nicht in der verminderten Adhäsionsfähigkeit des Pathogens. Eine Funktion als Virulenzfaktor konnte den Teichonsäuren von *L. monocytogenes* bei der Interaktion der Bakterien mit den Wirtszellen bisher nicht zugeschrieben werden. Die Teichonsäuren-Synthese ist jedoch für die intrazelluläre Lebensweise von *Listeria* unentbehrlich. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Unterbrechung der Synthese im Zusammenbau der *linkage unit*, einer Ankerstruktur, durch die das Polymer an das Peptidoglykan gebunden wird, zur Avirulenz dieses *Listeria*-Stammes führt. Verantwortlich hierfür ist die UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase, die von *lmo2537* kodiert wird und normalerweise UDP-N-Acetylglucosamin zu UDP-N-Acetylmannosamin umwandelt und somit das Ausgangsprodukt für die Synthese der Ankerstruktur bereitstellt. Die Deletion dieses Gens wirkt sich auf das Wachstum unter optimalen Kultivierungsbedingungen nicht negativ aus und führt primär nur zu unkompletten Teichonsäuren, deren Unvollständigkeit sich aber dann in der schnellen Eliminierung des Pathogens aus den Zielorganen Leber und Niere in dem Mausmodell zeigt [Dubail *et al.*, 2006]. Das Screening der *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank in Caco-2 Zellen bestätigt ebenfalls die Wichtigkeit einer intakten Teichonsäuren-Biosynthese für die intrazelluläre Lebensweise von *L. monocytogenes*, da zwei Gene *lmo1085* und *tagB* (*lmo1088*), die für zwei Homologe des Proteins B der Teichonsäuren-Biosynthese kodieren, identifiziert wurden. Die Genprodukte dieser Gene sind genau wie die UDP-N-Acetylglucosamin-2-Epimerase (*lmo2537*) an der Synthese der Ankerstruktur beteiligt, indem sie Glycerolphosphat an N-Acetylmannosamin anknüpfen. Der Einfluss dieses Defekts in der Teichonsäuren-Biosynthese auf das Pathogenitätsverhalten von *L. monocytogenes* wurde in dieser Arbeit an den dafür konstruierten Deletionsmutanten $EGD\Delta tagB$ und $EGD\Delta lmo1085$ näher untersucht. In den getesteten humanen Zelllinien scheinen die Teichonsäuren zum Überleben von *L. monocytogenes* im Cytosol der Wirtszelle beizutragen, da die *tagB*- und *lmo1085*-Mutanten eine im Vergleich zum Wildtyp deutlich verminderte Replikationsrate aufwiesen. Obwohl intrazellulär keine starke Expression der Gene für die Teichonsäuren-Biosynthese stattfindet, womit schon eine verringerte intrazelluläre Teichonsäuren-Produktion verbunden ist, reicht diese Menge für eine effiziente Proliferation im Cytosol der Wirtszellen vermutlich aus und erst ihr Fehlen bzw. ihre Unvollständigkeit zu Störungen in der intrazellulären Replikation führen [Dubail *et al.*, 2006]. Vermutlich bietet die Zellwand der *tagB*- und *lmo1085*-Mutanten aufgrund der Veränderungen in der Oberflächenbeschaffenheit keine geeigneten Möglichkeiten mehr für das Platzieren von Oberflächenproteinen, die während der intrazellulären Lebensweise jedoch nicht unter *in vitro* Bedingungen benötigt werden, denn beim Screening

der *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutantenbank in Caco-2 Zellen wurde ebenfalls eine Vielzahl für Oberflächenproteine kodierenden Gene identifiziert, die hierfür einen Hinweis sein könnten.

Die Attenuation der beiden Deletionsmutanten EGD Δ tagB und EGD Δ lmo1085 konnte allerdings im Mausmodell nicht bestätigt werden, es konnte nur eine schwache Tendenz einer Attenuation für den Deletionsstamm EGD Δ lmo1085 beobachtet werden, dem ein *L. monocytogenes* spezifisches Homolog des Proteins B der Teichonsäuren-Biosynthese fehlt, weshalb es möglich wäre, dass Lmo1085 intrazellulär eine wichtigere Rolle spielt als TagB. Andererseits ist es auch nicht auszuschließen, dass die Teichonsäuren von *L. monocytogenes* intrazellulär eine abgeänderte Struktur aufweisen könnten, für die Produkte anderer homologer Gene verantwortlich sind. Für das Protein B mit der enzymatischen Funktion einer Glycerophosphotransferase sind nämlich drei Homologe: Lmo1077, Lmo1085 und TagB vorhanden, von denen die ersten beiden *L. monocytogenes* spezifisch sind. Bei *B. subtilis* konnte so ein Wechsel in Abhängigkeit der vorherrschenden Umweltbedingungen bereits gezeigt werden, allerdings sind bei *B. subtilis* zwei verschiedene Operons dafür verantwortlich [Bhavsar *et al.* 2004]. Um diese Hypothese eindeutig bestätigen zu können, müssen allerdings weitere Mutanten erzeugt und erneut im Mausmodell überprüft sowie die Zusammensetzung der intrazellulären Teichonsäuren bestimmt werden.

Es wird außerdem vermutet, dass die phosphatreichen Teichonsäuren von *L. monocytogenes* genau wie bei *B. subtilis* als Phosphatspeicher fungieren und aus diesem Grund unter Phosphat-limitierenden Bedingungen sowie auch intrazellulär essentiell sind. Während bei *B. subtilis* die Glycerolteichonsäuren beim Mangel an Phosphat durch phosphatfreie Teichonsäuren ersetzt werden, muss *L. monocytogenes* spezielle Regulationsmechanismen zur reduzierten Expression der Gene für Teichonsäuren-Synthese entwickelt haben [Bhavsar *et al.* 2004; Dubail *et al.*, 2006].

Eine Beteiligung der Teichonsäuren von *L. monocytogenes* an der Aufrechterhaltung der Vitalität unter Stressbedingungen wie hohe Osmolarität, hohe und niedrige Temperaturen sowie Säureschock ist eine weitere und wichtige Aufgabe. Das Fehlen von UDP-Glucose-Pyrophosphorylase (Lmo1078), einem Enzym, das UDP-Glucose für die Glycosylierung der Teichonsäuren und der Biosynthese des Lipidankers der Lipoteichonsäuren bereitstellt, führt bei *L. monocytogenes* z.B. zur Sensitivität gegenüber niedrigen Temperaturen und hohen Salzkonzentrationen [Chassaing *et al.*, 2007]. Dieser Effekt konnte auch bei den Deletionsmutanten EGD Δ tagB und EGD Δ lmo1085 beobachtet werden. Während bei optimalen Laborbedingungen (37°C, Vollmedium) keine Wachstumsunterschiede feststellbar waren, führte der Zusatz von 3% NaCl zu einem leicht verminderten Wachstum. Der mögliche Grund dafür könnte eine verringerte Quervernetzung des Peptidoglykans sein, an der Transpeptidasen (Penicillin bindende Proteine, PBPs) beteiligt sind und deren Aktivität von hoher Salzkonzentration gestört wird, wenn die durch die Teichonsäuren gebotene physikalische Barriere nicht vorhanden ist [Piuri *et al.*, 2005].

Weiterhin bieten die Teichonsäuren Schutz vor dem Angriff einiger Peptidantibiotika. Besonders auffallend ist die erhöhte Sensitivität von *L. monocytogenes* gegenüber Bacitracin,

Colistin und Polymyxin B als Folge der fehlenden D-Alanin-Modifikation der Teichon- und Lipoteichonsäuren sowie bei der unvollständigen Biosynthese der Teichonsäuren. Das Peptidantibiotikum Bacitracin greift dabei in die Biosynthese der Zellwand ein, indem es die Regeneration der Membranlipidanker, die in die Synthese der Peptidoglykanketten involviert sind, inhibiert. Die beiden anderen Peptidantibiotika, Colistin und Polymyxin B, interagieren mit den Phospholipid-Komponenten der bakteriellen Cytoplasmamembran und machen sie permeabel. Durch den Efflux essentieller Substanzen aus der Zelle wirken diese Bakterizide selbst auf nicht proliferierende Zellen. Die antibakterielle Wirkung wird allerdings durch zweiwertige Ionen wie Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} und Polyphosphate reduziert bzw. verhindert. Bei strukturellen Veränderungen der Teichonsäuren kann dieser Schutzmechanismus aufgrund der nicht ausreichenden Menge an zweiwertigen Kationen auf der Zelloberfläche nicht mehr gewährleistet werden [Heptinstall *et al.*, 1970; Abachin *et al.*, 2002; Dubail *et al.*, 2006]. Eine solche Auswirkung, d.h. eine geringe Sensitivität, konnte für *EGD Δ tagB* und das Peptidantibiotikum Colistin beobachtet werden. Eine deutlich höhere Sensitivität konnte allerdings für Mutanolysin, eine N-Acetylmuramidase, festgestellt werden, welches aufgrund der fehlenden Teichonsäuren und somit geringeren Konzentration von Ca^{2+} und Mg^{2+} auf der Zelloberfläche der Mutanten zu ihrer Lyse führte.

Einen interessanten Befund lieferten die Infektionsversuche in ausdifferenzierten Caco-2 Zellen. Die nach 35 Minuten nach der Infektion aus Caco-2 Zellen isolierten und zur cfu-Bestimmung auf BHI-Agar ausplattierten Listerien demonstrierten im Gegensatz zum Wildtyp nach 12 h Inkubation bei 37°C eine kleinere und mit einem zackigen Rand, jedoch weiterhin glatte und glänzende Koloniemorphologie. Dieser Phänotyp könnte dadurch zustande kommen, dass entweder aufgrund der fehlenden Maskierung der Zelloberfläche durch Teichonsäuren die *Listeria*-Mutanten bei der Adhäsion als Pathogen von den Caco-2 Zellen signalisiert wurden oder der allgemeinen Abwehrreaktion durch antimikrobielle Peptide (AMP) unterlagen. Zu den antimikrobiellen Peptiden gehören z.B. Cathelicidine, β -Defensine und Histatine, die von verschiedenen Geweben, auch vom Darmepithel, produziert werden. AMPs interagieren mit der Bakterienmembran, lagern sich in diese ein und bilden auf diese Weise einen Kanal, der für Ionen durchgängig ist [Ganz, 2003].

Die antibakterielle Wirkung wird aber durch zweiwertige Ionen wie Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} und Polyphosphate reduziert bzw. verhindert, was auch auf den *Listeria*-Wildtyp zutrifft, während dieser Schutzmechanismus bei veränderten Teichonsäuren von *Listeria*-Mutanten aufgrund der nicht ausreichenden Menge an zweiwertigen Kationen auf der Zelloberfläche nicht mehr gewährleistet wird. Hinzu kommt noch der verringerte zwitterionische Charakter der Polymere, der nur durch die D-Alanin-Modifizierung der Lipoteichonsäuren zustande kommt. Da die meisten kationische Peptide positiv geladen sind, werden sie dementsprechend stark von der negativ geladenen Cytoplasmamembran angezogen, wo sie ihre bakterizide Wirkung entfalten können. Die D-Alanin-Modifizierung und somit die positive Ladung der Teichon- und Lipoteichonsäuren wirken dem entgegen [Peschel *et al.*, 2006; Weidenmaier *et al.*, 2003 & 2008]. Als potenzielle antimikrobielle Peptide könnten z.B. β -Defensine fungieren, vor allem

aber das humane β -Defensin 3 (HBD-3), für welches *L. monocytogenes* sensitiv ist [Gottlieb *et al.*, 2008].

Gesamt betrachtet, lässt sich schließlich feststellen, dass die Teichonsäuren von *L. monocytogenes* an der Aufrechterhaltung der Vitalität unter Stressbedingungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beteiligt sind.

Nichtsdestoweniger könnten die funktionelle Charakterisierung dieser Enzyme und die Untersuchung ihrer Rolle in der Pathogenität von entscheidender Bedeutung sein, da einige Enzyme der Teichonsäuren-Synthese eine hohe Substrat- bzw. Wirkungsspezifität aufweisen können. Es könnten z.B. eine oder mehrere der zahlreich vertretenden Glykosyltransferasen sein, deren Aufgabe es ist, ein aktiviertes Zuckermolekül auf einen in der Cytoplasmamembran verankerten Lipidcarrier zu übertragen. Das Enzym spaltet die energiereiche Phosphatbindung zwischen dem Nukleosiddiphosphat und dem Zucker und nutzt die freiwerdende Energie für die Bindung zwischen der Phosphatgruppe des Lipidcarriers und dem ersten Zucker der *linkage unit* bzw. für die glykosidische Bindung zwischen dem Zucker der Ankerstruktur. Durch die Spezifität der Glykosyltransferasen wird die Abfolge und Verknüpfung der Zucker in der *linkage unit* festgelegt. Dies könnte auch für die Glykosyltransferasen gelten, die an der Modifizierung der *repeating units* beteiligt sind. Denn die Zuckersubstituenten könnten eine entscheidende Rolle für die Erkennung durch Exporter und Polymerasen spielen. Auf Grund dessen können sich einige dieser spezifischen Syntheseschritte der Teichonsäuren-Synthese als potenzielle strukturelle Targets für die Entwicklung der neuen, antimikrobiellen Substanzen erweisen.

5. Der listerielle Oligopeptid-ABC-Transporter Lmo0135-0137

Die Oligopeptidpermeasen, die zur Familie der ABC-Transporter gehören, sind in Bakterien weit verbreitet und für den Import kleiner Peptide (Oligopeptide) in die Zelle verantwortlich. Dabei verfügen die meisten Bakterien über mehrere Peptidpermeasen mit unterschiedlichen Spezifitäten, wobei hauptsächlich Längen- aber keine Sequenzspezifität vorliegt [Tame *et al.*, 1994]. Im *L. monocytogenes*-Genom sind bisher sechs chromosomale Peptidpermease-Operons gefunden worden, von denen Lmo0135-0137, OppA-F (Lmo2192-2196), Lmo1265 und Lmo0152 als Oligopeptidpermeasen annotiert wurden. Die Substratspezifitäten dieser Permeasen sind bis auf die des *opp*-Operons [Borezee *et al.*, 2000] allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Darüber hinaus sind die Bindeprotein-abhängige Transportsysteme an diversen zellulären Prozessen beteiligt. Es gibt z.B. Oligopeptidpermeasen, die spezifische oder unspezifische an Signaltransduktionen beteiligte Oligopeptide transportieren und auf diese Weise bestimmte zelluläre Prozesse mitsteuern [Monnet, 2003]:

In *B. subtilis* werden z.B. durch eine Oligopeptidpermease extrazelluläre Peptide aufgenommen, die eine Signalfunktion besitzen und dadurch die Sporulation als auch die Ausbildung genetischer Kompetenz steuern [Perego *et al.*, 1996 & 1997; Lazazzera *et al.*,

1997]. Die Oligopeptidpermease BldK von *Streptomyces coelicolor* importiert ebenfalls ein extrazelluläres Signalmolekül, welches die Ausbildung von Luftmycels beeinflusst [Nodwell *et al.*, 1996].

Oligopeptidpermeasen sind außerdem in den Import von Peptiden als Nährstoffe involviert, die der Zelle hauptsächlich als Aminosäurenquelle dienen. Für bestimmte auxotrophe *Lactococcus lactis*-Stämme konnte gezeigt werden, dass für ihr Wachstum ein funktionierendes Peptidtransportsystem notwendig ist [Smid *et al.*, 1989].

Neben diesen allgemeinen Funktionen an diesen zellulären Prozessen, sind Oligopeptidpermeasen auch an der Virulenz verschiedener Pathogene beteiligt. In *B. cereus* und *B. thuringiensis* hängt z.B. die Aktivierung des zentralen Virulenzregulators PlcR von der Aufnahme spezifischer Peptide (PapR) ab, die über ein oligopeptidspezifisches Transportsystem erfolgt [Slamti&Lereclus, 2002]. Mutationen in den Genen *sapA-F* von *S. Typhimurium*, die ebenfalls für einen Oligopeptid-ABC-Transporter kodieren, führen zu einer erhöhten Sensitivität gegen antimikrobielle Peptide Melittin und Protamin und damit verbunden reduzierte Virulenz zur Folge [Groismann, 1994]. Für die einzige bis jetzt charakterisierte listerielle Opp-Oligopeptidpermease konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie durch den Transport von Oligopeptiden zum intrazellulären Wachstum und dem Überleben der Listerien in den Makrophagen, sowie in murinen Organen Leber und Milz, vor allem aber der Freisetzung der Bakterien aus dem Phagosom beiträgt [Borezee *et al.*, 2000].

Die in diese Arbeit deletierte Oligopeptidpermease Lmo0135-0137 scheint für die Pathogenität jedoch nicht für das *in vitro* Wachstum von *L. monocytogenes* relevant zu sein, da sowohl in Caco-2 Zellen als auch im Mausmodell eine signifikante Attenuation der Deletionsmutante $EGD\Delta lmo0135-0137$, *in vitro* aber wildtypische Wachstumseigenschaften beobachtet werden konnten. Dies wird zudem durch verstärkte Expression der Gene *lmo0135* und *lmo0136* in der Makrophagen-Zelllinie J774A.1 bestätigt [Chatterjee *et al.*, 2006]. Zusätzlich signalisieren die Arbeiten von Prot&Freitag eine möglicherweise indirekte Regulation der Oligopeptidpermease Lmo0135 durch den listeriellen Virulenzfaktor PrfA. Denn obwohl alle drei Gene des *lmo0135-0137*-Operons keine PrfA-Box besitzen, findet bei einer konstitutiven PrfA-Expression eine verstärkte Transkription des *lmo0135*-Gens statt [Prot&Freitag, 2007]. Somit besteht die Möglichkeit, dass die in dieser Arbeit untersuchte Oligopeptidpermease unter *in vitro* Bedingungen gar nicht aktiv ist bzw. exprimiert wird, womit sich das wildtypische Wachstumsverhalten im Minimalmedium unter Zusatz von verschiedenen Peptiden erklären ließe. Da im *Listeria*-Genom noch drei weitere Oligopeptidpermeasen gefunden worden sind, liegt die Vermutung nahe, dass eine oder mehrere dieser Oligopeptidpermeasen für den Peptidtransport *in vitro* von größerer Bedeutung sind.

Die genaue Funktion der Oligopeptidpermease Lmo0135-0137 während der intrazellulären Lebensweise bleibt jedoch weiterhin ungeklärt. Die Präsenz eines SAM Riboswitch vor diesem *Listeria*-Operon, durch den normalerweise Gene der Methionin- und Cystein-Biosynthese reguliert werden, lässt dementsprechend vermuten, dass dieser ABC-Transporter in die Aufnahme von Cystein- und/oder Methionin-haltigen Proteinen oder Peptiden involviert sein könnte. In diesem Fall würde der Lmo0135-0137-Oligopeptidtransporter die Versorgung der

Listerien mit Aminosäuren in Form von kleinen Peptiden übernehmen. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass kleine von der Wirtszelle produzierte und antimikrobiell wirkende Peptide die Substrate der hier untersuchten Oligopeptidpermease Lmo0135-0137 darstellen und der Oligopeptidpermease aus diesem Grund eine Schutzfunktion zugeschrieben werden könnte. Fernerhin wäre sogar eine Beteiligung an der Signaltransduktion denkbar. Die Oligopeptidpermease könnte demnach unter den *in vivo* Bedingungen durch den Import von Signalmolekülen, in diesem Fall verschiedene kleine Peptide, eine Art *quorum sensing*, d. h. eine interzelluläre Kommunikation, ermöglichen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der Oligopeptid-ABC-Transporter Lmo0135-0137 für das intrazelluläre Überleben in den Wirtszellen eine wichtige Rolle spielt, jedoch für das *in vitro* Wachstum entbehrlich ist.

6. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit ergaben viele neue Einblicke in die zellulären Prozesse von *L. monocytogenes* unter extrazellulären aber vor allem unter intrazellulären Lebensbedingungen. Zahlreiche neue Gene konnten identifiziert werden, die für ein intrazelluläres Überleben und erfolgreiches Replizieren von *L. monocytogenes* im Cytosol von Caco-2 Zellen notwendig sind. Die physiologische Relevanz vieler identifizierter Gene im Bezug auf das Überleben und die erfolgreiche Proliferation im Cytosol der Wirtszelle gilt es jedoch noch zu klären.

Hinsichtlich der Thiaminbiosynthese und dem Thiamintransport könnte untersucht werden, ob die Proteine der identifizierten Gene *Imo2599-2601* tatsächlich die A-Komponente, das *energy-coupling*-Modul, des listeriellen Thiamintransporters darstellen und sie zusammen mit der T-Komponente ThiT eine Thiaminaufnahme heterolog in *E. coli* ermöglichen. Des Weiteren sollte ein für HMP-Aufnahme verantwortlicher putativer Transporter identifiziert und charakterisiert werden, was dann das Gesamtbild der Thiaminbiosynthese und des Thiaminstoffwechsels allgemein komplettieren würde.

Einen interessanten Ansatz zur weiteren Aufklärung der Stoffwechselwege von *L. monocytogenes* in eukaryotischen Zellen bieten die in dieser Arbeit erzeugten Deletionsmutanten im Glycerolstoffwechsel. Mittels Massenspektrometrie (MS) könnten in Markierungsexperimenten an mit *L. monocytogenes* infizierten Zellkulturen unter Verwendung von verschiedenen ¹³C-markierten Verbindungen die metabolische Flüsse zwischen der Wirtszelle und dem Bakterium, insbesondere aber der Kohlenstoffmetabolismus, untersucht werden. Auf diese Art könnte die intrazelluläre Stoffwechselseitigkeit von *L. monocytogenes* näher charakterisiert und kompensatorische Stoffwechselwege präzisiert werden.

F. Literatur

- Abachin, E., C. Poyart, E. Pellegrini, E. Milošanić, F. Fiedler, P. Berche, and P. Trieu-Cuot.** 2002. Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **43(1)**:1-14.
- Abram, M., D. Schluter, D. Vuckovic, B. Wraber, M. Doric, and M. Deckert.** 2003. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **35**:177-182.
- Alvarez-Dominguez C, R. Roberts, and P. D. Stahl.** 1997. Internalized *Listeria monocytogenes* modulates intracellular trafficking and delays maturation of the phagosome. *J. Cell Sci.* **110**:731-743.
- Autret, N., I. Dubail, P. Trieu-Cuot, P. Berche, and A. Charbit.** 2001. Identification of new genes involved in the virulence of *Listeria monocytogenes* by signature-tagged mutagenesis. *Infect. Immun.* **69**:2054-2065.
- Begley, T. P., D. M. Downs, S. E. Ealick, F. W. McLafferty, A. P. Van Loon, S. Taylor, N. Campobasso, H. J. Chiu, C. Kinsland, J. J. Reddick, and J. Xi.** 1999. Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* **171(5)**:293-300.
- Begley, M., P. A. Bron, S. Heuston, P. G. Casey, N. Englert, J. Wiesner, H. Jomaa, C. G. Gahan, and C. Hill.** 2008. Analysis of the isoprenoid biosynthesis pathways in *Listeria monocytogenes* reveals a role for the alternative 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway in murine infection. *Infect. Immun.* **76**:5392-5401.
- Beijer, L., and L. Rutberg.** 1992. Utilisation of glycerol and glycerol 3-phosphate is differently affected by the phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **79**:217-220.
- Benshushan, A., A. Tsafir, R. Arbel, G. Rahav, I. Ariel, and N. Rojansky.** 2002. *Listeria* infection during pregnancy: a 10 year experience. *Isr. Med. Assoc. J.* **4**:776-780.
- Bergmann, B., D. Raffelsbauer, M. Kuhn, M. Goetz, S. Hom and W. Goebel.** 2002. InlA- but not InlB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. *Mol. Microbiol.* **43**:557-570.
- Bettendorff, L.** 1995. Thiamine homeostasis in neuroblastoma cells. *Neurochem. Int.* **26**:295-302.
- Bhakdi, S., T. Klonisch, P. Nuber, and W. Fischer.** 1991. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect. Immun.* **59**:4614-4620.
- Bhavsar, A. P., L. K. Erdman, J. W. Schertzer, and E. D. Brown.** 2004. Teichoic acid is an essential polymer in *Bacillus subtilis* that is functionally distinct from teichuronic acid. *J. Bacteriol.* **186(23)**:7865-7873.
- Bille, J.** 1990. Epidemiology of human listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. *Foodborne Listeriosis*. Elsevier, New York **pp**:71-74.
- Bochner, B. R., P. Gadzinski, E. Panomitros.** 2001. Phenotype microarrays for high-throughput phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Res.* **11(7)**:1246-1255.
- Bohne, J., Z. Sokolovic, and W. Goebel.** 1994. Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **11(6)**:1141-1150.
- Borezee E., E. Pellegrini, and P. Berche.** 2000. OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and Involved in intracellular survival. *Infect. Immun.* **68(12)**:7069-7077.
- Brundage, R. A., G. A. Smith, A. Camilli, J. A. Theriot, and D. A. Portnoy.** 1993. Expression and phosphorylation of the *Listeria monocytogenes* ActA protein in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90(24)**:11890-11894.
- Buchrieser, C., C. Rusniok, The *Listeria* Consortium, F. Kunst, P. Cossart, and P. Glaser.** 2003. Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **35(3)**:207-213.
- Cabanes, D., S. Sousa, A. Lecuit, M. Cebria, F. Garcia-del Portillo, and P. Cossart.** 2005. Gp96 is a receptor for a novel *Listeria monocytogenes* virulence factor, Vip, a surface protein. *Embo J.* **24(15)**: 2827-2838.

- Chakraborty, T., M. Leimeister-Wachter, E. Domann, M. Hartl, W. Goebel, T. Nichterlein, and S. Notermans.** 1992. Coordinate regulation of virulence genes in *Listeria monocytogenes* requires the product of the *prfA* gene. *J. Bacteriol.* **174**:568-574.
- Chakraborty, T.** 1996. The molecular mechanism of actin-based intracellular motility by *Listeria monocytogenes*. *Microbiologia* **12(2)**:237-244.
- Chassaing, D., and F. Auvray.** 2007. The *Imo1078* gene encoding a putative UDP-glucose pyrophosphorylase is involved in growth of *Listeria monocytogenes* at low temperature. *FEMS Microbiol. Lett.* **275(1)**:31-37.
- Chatterjee, S. S., H. Hossain, S. Otten, C. Kuenne, K. Kuchmina, S. Machata, E. Domann, T. Chakraborty, and T. Hain.** 2006. Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **74(2)**:1323-1338.
- Chen, J., X. Luo, L. Jiang, P. Jin, W. Wei, D. Liu, and W. Fang.** 2009. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiol.* **26(1)**: 103-111.
- Chico-Calero, I., M. Suárez, B. González-Zorn, M. Scotti, J. Slaghuis, W. Goebel, and J. A. Vázquez-Boland.** 2002. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99(1)**:431-436.
- Christiansen, I., and W. Hengstenberg.** 1996. Cloning and sequencing of two genes from *Staphylococcus carnosus* coding for glucose-specific PTS and their expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **250(3)**:375-379.
- Collins, M. D., S. Wallbanks, D. J. Lane, J. Shah, R. Nietupski, J. Smida, M. Dorsch, and E. Stackebrandt.** 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41(2)**:240-246.
- Conte, M., C. Longhi, M. Polidoro, G. Petrone, V. Buonfiglio, S. Di Santo, E. Papi, L. Seganti, P. Visca, and P. Valenti.** 1996. Iron availability affects entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocytelike cell line Caco-2. *Infect. Immun.* **64(9)**:3925-3929.
- Cossart, P. and H. Bierne.** 2001. The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Current. Opinion Immunology* **13(1)**:96-103.
- Cossart, P., J. Pizarro-Cerda, and M. Lecuit.** 2003. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol.* **13(1)**:23-31.
- Cowart, R.E. and B. G. Foster.** 1985. Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes*: minimum requirements and mechanism of acquisition. *J. Infect Dis.* **151(4)**:721-730.
- Cummins, A. J., A. K. Fielding, and J. McLauchlin.** 1994. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. *J. Infect.* **28(1)**:89-91.
- de Boer, M., C. P. Broekhuizen, and P. W. Postma.** 1986. Regulation of glycerol kinase by enzyme IIIIGlc of the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **167(1)**:393-395.
- Deutscher, J., and H. Sauerwald.** 1986. Stimulation of dihydroxyacetone and glycerol kinase activity in *Streptococcus faecalis* by phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation catalyzed by enzyme I and HPr of the phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **166(3)**:829-836.
- Deutscher, J., B. Bauer, and H. Sauerwald.** 1993. Regulation of glycerol metabolism in *Enterococcus faecalis* by phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation of glycerol kinase catalyzed by enzyme I and HPr of the phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **175(12)**:3730-3733.
- Dramsi, S., S. Lévi, A. Thriller, and P. Cossart.** 1998. Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study. *Infect. Immun.* **66**:4461-4468.
- Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, and J. Hacker.** 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2(5)**:414-444.
- Donaldson J.R., B. Nanduri, S. C. Burgess, M. L. Lawrence.** 2009. Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* strains F2365 and EGD. *Appl. Environ. Microbiol.* **75(2)**:366-373.
- Dubail, I., P. Berche, The European Listeria Genome Consortium, and A. Charbit.** 2000. Listeriolysin O as a reporter to identify constitutive and in vivo-inducible promoters in the pathogen *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **68(6)**:3242-3250.

- Dubail, I., A. Bigot, V. Lazarevic, B. Soldo, D. Euphrasie, M. Dupuis, and A. Chrbit.** 2006. Identification of an essential gene of *Listeria monocytogenes* involved in teichoic acid biogenesis. *J. Bacteriol.* **188(18)**:6580-6591.
- Dumas, E., B. Meunier, J. L. Berdagué, C. Chambon, M. Desvaux, M. Hébraud.** 2008. Comparative analysis of extracellular and intracellular proteomes of *Listeria monocytogenes* strains reveals a correlation between protein expression and serovar. *Appl. Environ. Microbiol.* **74(23)**:7399-7409.
- Dussurget, O., J. Pizarro-Cerda, and P. Cossart.** 2004. Molecular Determinants of *Listeria monocytogenes* Virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:587-610.
- Eisenreich, W., J. Slaghuis, R. Laupitz, J. Bussemer, J. Stritzker, C. Schwarz, R. Schwarz, T. Dandekar, W. Goebel, and A. Bacher.** 2006. ¹³C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:2040-2045.
- Eudes, A., G. B. Erkens, D. J. Slotboom, D. A. Rodionov, V. Naponelli, and A. D. Hanson.** 2008. Identification of genes encoding the folate- and thiamine-binding membrane proteins in firmicutes. *J. Bacteriol.* **190**:7591-7594.
- Farber, J. M., and P. I. Peterkin.** 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.* **55(3)**:476-511.
- Fiedler, F., J. Seger, A. Schrettenbrunner, and H. P. R. Seeliger.** 1984. The biochemistry of murein and cell wall teichoic acids in the genus *Listeria*. *System. Appl. Microbiol.* **5**:360-376.
- Fiedler, F.** 1988. Biochemistry of the cell surface of *Listeria* strains: a locating general veiw. *Infection* **16**:92-97.
- Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris, and F. Haffron.** 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83(14)**:5189-5193.
- Forage, R.G., and E. C. Lin.** 1982. DHA system mediating aerobic and anaerobic dissimilation of glycerol in *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418. *J. Bacteriol.* **151(2)**:591-599.
- Formstone, A., R. Carballindo-López, P. Noirot, J. Errington, and D.-J. Scheffers.** 2008. Localization and interactions of teichoic acid synthetic enzymes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **190(5)**:1812-1821.
- Freitag, N.E., L. Rong, and D. A. Portnoy.** 1993. Regulation of the *prfA* transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* **61(6)**:2537-2544.
- Freitag, N.E. and D. A. Portnoy.** 1994. Dual promoters of the *Listeria monocytogenes prfA* transcriptional activator appear essential in vitro but are redundant in vivo. *Mol. Microbiol.* **12(5)**:845-853.
- Friedrich, W..** 1988. Vitamins. *De Gruyter* pp:339-401.
- Fu, D., A. Libson, L. J. Miercke, C. Weitzman, P. Nollert, J. Krucinski, and R. M. Stroud.** 2000. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* **290**:481-486.
- Fu, D., A. Libson, and R. Stroud.** 2002. The structure of GlpF, a glycerol conducting channel. *Novartis Found Symp.* **245**:51-61; discussion 61-55, 165-168.
- Gahan, C. G. M. and C. Hill.** 2000. The use of listeriolysin to identify in vivo induced genes in the gram-positive intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **36(2)**:498-507.
- Gaillard, J. L., P. Berche, J. Mounier, S. Richard, and P. Sansonetti.** 1987. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* **55(11)**:2822-2829.
- Ganz, T..** 2003. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3(9)**:710-20.
- Geoffroy, C., J. L. Gaillard, J. E. Alouf, and P. Berche.** 1989. Production of thiol-dependent haemolysins by *Listeria monocytogenes* and related species. *J. Gen. Microbiol.* **135(3)**:481-487.
- Ghuysen, J. M. and R. Hakenbeck.** 1994. Bacterial cell wall. Elsevier Science BV, Amsterdam. pp:1-22.
- Giesbrecht, P., J. Wecke, and B. Reinicke.** 1976. On the morphogenesis of the cell wall of staphylococci. *Int. Rev. Cytol.* **44**:225-318.

- Ginsberg, C., Y.-H. Zhang, Y. Yuan, and S. Walker.** 2006. *In vitro* reconstitution of two essential steps in wall teichoic acid biosynthesis. *ACS Chem. Biol.* **1(1)**:25-28.
- Glaser, P., L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couve, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Dominguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dussurget, K.-D. Entian, H. Fsihi, F. G.-D. Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gomez-Lopez, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L.-M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueno, A. Maitournam, J. M. Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J.-C. Perez-Diaz, R. Purcell, B. Remmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J.-A. Vazquez-Boland, H. Voss, J. Wehland, und P. Cossart.** 2001. Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**:849-852.
- Goebel, W., S. Müller-Altrock, and J. Kreft.** 2006. Regulation of virulence genes in pathogenic *Listeria* *ssp.* In V. A. Fischetti, R. P. Novick, J. J. Ferreti, D. A. Portnoy, and J. I. Rood (Ed.), *Gram-positive pathogens* ASM Press, Washington, D.C. pp:634-644.
- Goetz, M., A. Bubert, G. Wang, I. Chico-Calero, J. A. Vazquez-Boland, M. Beck, J. Slaghuis, A. A. Szalay and W. Goebel.** 2001. Microinjection and growth of bacteria in the cytosol of mammalian host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:12221-12226.
- Gottlieb, C. T., L. E. Thomsen, H. Ingmer, P. H. Mygind, H. H. Kristensen, and L. Gram.** 2008. Antimicrobial peptides effectively kill a broad spectrum of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* strains independently of origin, sub-type, or virulence factor expression. *BMC Microbiol.* **8**:205.
- Grant, J. R. and P. Stothard.** 2008. The CGView Server: a comparative genomics tool for circular genomes. *Nucleic Acid Res.* **36 (Web Server issue)**:W181-W184.
- Gray, M. L. and A. M. Killinger.** 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* **30(2)**:304-328.
- Greenberg, J. W., W. Fischer, and K. A. Joiner.** 1996. Influence of lipoteichoic acid structure on recognition by the macrophage scavenger receptor. *Infect. Immun.* **64**:3318-3325.
- Groisman, E. A..** 1994. How bacteria resist killing by host-defense peptides. *Trends Microbiol.* **2**:444-4449.
- Guinane, C. M., P. D. Cotter, R. P. Ross, and C. Hill.** 2006. Contribution of penicillin-binding protein homologs to antibiotic resistance, cell morphology, and virulence of *Listeria monocytogenes* EGDe. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50(8)**:2824-2828.
- Hagendorn, H., and O. R. Schmidt.** 1975. Die Wirkung des Antivitamins Pyriithiamin auf den Stoffwechsel der thiaminautotrophen *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* **103**:83-88.
- Haima, P., D. van Sinderen, H. Schotting, S. Bron, and G. Venema.** 1990. Development of a β -galactosidase α -complementation system for molecular cloning in *Bacillus subtilis*. *Gene* **86**:63-69.
- Hain, T., C. Steinweg, C. T. Kuenne, A. Billion, R. Ghai, S. S. Chatterjee, E. Domann, U. Karst, A. Goesmann, T. Bekel, D. Bartels, O. Kaiser, F. Meyer, A. Puhler, B. Weisshaar, J. Wehland, C. Liang, T. Dandekar, R. Lampidis, J. Kreft, W. Goebel and T. Chakraborty.** 2006a. Whole-genome sequence of *Listeria welshimeri* reveals common steps in genome reduction with *Listeria innocua* as compared to *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **188(21)**:7405-7415.
- Hain, T., C. Steinweg and T. Chakraborty.** 2006b. Comparative and functional genomics of *Listeria* spp.. *J. Biotechnol.* **126(1)**:37-51.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.
- Hebbeln, P., D. A. Rodionov, A. Alfandega, and T. Eitinger.** 2007. Biotin uptake in prokaryotes by solute transporters with an optional ATP-binding cassette-containing module. *Proc. Natl. Sci. USA* **104**:2909-2914.
- Heller, K. B., E. C. Lin, and T. H. Wilson.** 1980. Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **144**:274-278.
- Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton, and D. W. Holden.** 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**:400-403.
- Heptinstall, S., A. R. Archibald, and J. Baddiley.** 1970. Teichoic acids and membrane function in bacteria. *Nature* **225(5232)**:519-521.

- Herbert, M. A., S. Hayes, M. E. Deadman, C. M. Tang, D. W. Hood, and E. R. Moxon.** 2002. Signature tagged mutagenesis of *Haemophilus influenzae* identifies genes required for *in vivo* survival. *Microb. Pathog.* **33(5)**:211-223.
- Hoffman, J. A., J. L. BAdger, Y. Zhang, and K. S. Kim.** 2001. Escherichia coli K1 purA and sorC are preferentially expressed upon association with human brain microvascular endothelial cells. *Microb. Pathog.* **31(2)**:69-79.
- Hudig, H., and W. Hengstenberg.** 1980. The bacterial phosphoenolpyruvate dependent phosphotransferase system (PTS): solubilisation and kinetic parameters of the glucose-specific membrane bound enzyme II component of *Streptococcus faecalis*. *FEBS Lett.* **114(1)**:103-106.
- Hunter, W. N..** 2007. The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **282(30)**:21573-21577.
- Hurley, J.H., H. R. Faber, D. Worthylake, N. D. Meadow, S. Roseman, D. W. Pettigrew, and S. J. Remington.** 1993. Structure of the regulatory complex of *Escherichia coli* IIIIGlc with glycerol kinase. *Science* **259**:673-677.
- Ireton, K., B. Payrastre, H. Chap, W. Ogawa, H. Sakaue, M. Kasuga, and P. Cossart.** 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science* **274**:780-782.
- Ireton K. and P. Cossart.** 1997. Host-pathogen interaction during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. *Ann. Rev. Genet.* **31**:113-138.
- Jensen, V. B., J. T. Harty, and B. D. Jones.** 1998. Interactions of the invasive pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* with M cells and murine Peyer's patches. *Infect. Immun.* **66(8)**:3758-3766.
- Jenkins, A. H., G. Schyns, S. Potot, G. Sun, and T. P. Begley.** 2007. A new thiamin salvage pathway. *Nat. Chem. Biol.* **3(8)**:492-497.
- Johansson, J., P. Mandin, A. Renzoni, C. Chiaruttini, M. Springer, and P. Cossart.** 2002. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Cell* **110(5)**:551-561.
- Jones, D..** 1990. Foodborne illness – foodborne listeriosis. *Lancet.* **336**:1171-1174.
- Jones, B. D. and S. Falkow.** 1994. Identification and characterization of a *Salmonella typhimurium* oxygen-regulated gene required for bacterial internalization. *Infect. Immun.* **62(9)**:3745-3752.
- Jonquière, R., H. Bierne, F. Fiedler, P. Gounon, and P. Cossart.** 1999. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* **34**:902-914.
- Joseph, P., J. R. Fantino, M. L. Herbaud, and F. Denizot.** 2001. Rapid orientated cloning in a shuttle vector allowing modulated gene expression in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **205**:91-97.
- Joseph, B., K. Przybilla, C. Stühler, K. Schauer, J. Slaghuis, T. M. Fuchs, and W. Goebel.** 2006. Identification of *Listeria monocytogenes* Genes Contributing to Intracellular Replication by Expression Profiling and Mutant Screening. *J. Bacteriol.* **188(2)**:556-568.
- Joseph, B. and W. Goebel.** 2007. Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. *Microb. Infec.* **9(10)**:1188-1195.
- Joseph, B., S. Mertins, R. Stoll, J. Schär, K. R. Umesha, Q. Luo, S. Müller-Altrock, and W. Goebel.** 2008. Glycerol metabolism and PrfA activity in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **190(15)**:5412-5430.
- Junttila, J. R., S. I. Niemala, and J. Hirn.** 1988. Minimum growth temperature of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.* **65(4)**:321-327.
- Jurgenson, C. T., T. P. Begley, and S. E. Ealick.** 2009. The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **78**:569-603.
- Kaufmann, S. H. E.** 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* **11**:129-163.
- Keller, R., W. Fischer, R. Keist, and S. Bassetti.** 1992. Macrophage response to bacteria: induction of marked secretory and cellular activities by lipoteichoic acids. *Infect. Immun.* **60**:3664-3672.
- Kreft, J.** 1992. *Listeria monocytogenes* - ein Modell für fakultativ intrazelluläre Bakterien. *BioEng.* **1**:65-70.

- Kreft, J. and J. A. Vazquez-Boland.** 2001. Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291(2)**:145-157.
- Kreft, J., J. A. Vazquez-Boland, S. Altrock, G. Dominguez-Bernal, and W. Goebel.** 2002. Pathogenicity islands and other virulence elements in *Listeria*. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **264(2)**:109-125.
- Kristian, S. A., V. Data, C. Weidenmaier, R. Kansal, I. Fedtke, A. Peschel, R. L. Gallo, and V. Nizet.** 2005. D-alanylation of teichoic acids promotes group A streptococcus antimicrobial peptide resistance, neutrophil survival, and epithelial cell invasion. *J. Bacteriol.* **187(19)**:6719-6725.
- Kuhn, M. and W. Goebel.** 1997. Responses by murine macrophages infected with *Listeria monocytogenes* crucial for the development of immunity to this pathogen. *Immunol. Rev.* **158**:57-67.
- Lalic-Multhaler, M., J. Bohne, and W. Goebel.** 2001. In vitro transcription of PrfA-dependent and -independent genes of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **42(1)**:111-120.
- Lauer, P., M. Y. N. Chow, M. J. Loessner, D. A. Portnoy, and R. Calendar.** 2002. Construction, characterization, and use of two *Listeria monocytogenes* site-specific phage integration vectors. *J. Bacteriol.* **184(15)**:4177-4186.
- Lawhorn, B. G., R. A. Mehl, and T. P. Begley.** 2004. Biosynthesis of the thiamin pyrimidine: the reconstitution of a remarkable rearrangement reaction. *Org. Biomol. Chem.* **2**:2538-2546.
- Lazizzera, B. A., J. M. Solomon, and A. D. Grossman.** 1997. An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signalling in *Bacillus subtilis*. *Cell* **89**:917-925.
- Lee, M. S., C. Seok, and D. A. Morrison.** 1998. Insertion-Duplikation Mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*: Targeting fragment length is a critical parameter in use as a random insertion pool. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(12)**:4796-4802.
- Leimeister-Wächter, M., E. Domann, and T. Chakraborty.** 1992. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J. Bacteriol.* **174(3)**:947-952.
- Liu, J.-Y., D. E. Timm, and T. D. Hurley.** 2006. Pyriothiamine as a substrate for thiamine pyrophosphokinase. *J. Biol. Chem.* **281(10)**:6601-6607.
- Lou, Y. and Yousef, A. E..** 1998. *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Marcel Dekker, New York. pp:131-224.
- Luo, Q., M. Herler, S. Muller-Altrock, and W. Goebel.** 2005. Supportive and inhibitory elements of a putative PrfA-dependent promoter in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **55(4)**:986-997.
- Mackness, G. B..** 1964. The Immunological basis of acquired cellular resistance. *J. Exp. Med.* **120**:105-120.
- Mansell, A., L. Braun, P. Cossart, and L. A. O'Neill.** 2000. A novel function of InIB from *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappaB in J774 macrophages. *Cell Microbiol.* **2(2)**:127-136.
- Marquis, H., H. G. Bouwer, D. J. Hinrichs, and D. A. Portnoy.** 1993. Intracytoplasmic growth and virulence of *Listeria monocytogenes* auxotrophic mutants. *Infect. Immun.* **61**:3756-3760.
- McKinney, J. D., K. H. zu Bentrup, E. J. Muñoz-Elías, A. Miczak, B. Chen, W.-T. Chan, D. Swenson, J. C. Sacchettini, W. R. Jacobs, and D. G. Russell.** 2000. Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406**:735-738.
- Mekalanos, J. J..** 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* **174(1)**:1-7.
- Milenbachs, A. A., D. P. Brown, M. Moors, and P. Youngman.** 1997. Carbon-source regulation of virulence gene expression in *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* **23(5)**:1075-1085.
- Milohanic, E., P. Glaser, J.-Y. Coppee, L. Frangeul, Y. Vega, J. A. Vazquez-Boland, F. Kunst, P. Cossart, and C. Buchrieser.** 2003. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol. Microbiol.* **47(6)**:1613-1625.
- Monnet, V..** 2003. Bacterial oligopeptide-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Science* **60**:2100-2114.
- Moors, M. A. and A. Portnoy.** 1995. Identification of bacterial genes that contribute to survival and growth in an intracellular environment. *Trends Microbiol.* **3**:83-85.
- Morett, E., J. O. Korbil, E. Rajan, G. Saab-Rincon, L. Olvera, M. Olvera, S. Schmidt, B. Snel, and P. Bork.** 2003. Systematic discovery of analogous enzymes in thiamin biosynthesis. *Nat. Biotechnol.* **21**:790-795.

- Myers, E.R., A. W. Dallmier, and S. E. Martin.** 1993. Sodium chloride, potassium chloride, and virulence in *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. **59(7)**:2082-2086.
- Navarre, W. W., and O. Schneewind.** 1999. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanism of their targeting to the cell wall envelope. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63(1)**:174-229.
- Neuhaus, F. C. and J. Baddiley.** 2003. A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **67(4)**:686-723.
- Nodwell, J. R., K. MacGovern, and R. Losick.** 1996. An Oligopeptid permease responsible for the import of an extracellular signal governing aerial mycelium formation in *Streptomyces coelicolor*. Mol. Microbiol. **22**:881-893.
- Park, S. F. and R. G. Kroll.** 1993. Expression of listeriolysin and phosphatidylinositol-specific phospholipase C is repressed by the plant-derived molecule cellobiose in *Listeria monocytogenes*. Mol. Microbiol. **8(4)**:653-661.
- Park, J. H., K. Burns, C. Kinsland, and T. P. Begley.** 2004. Characterisation of two kinases involved in thiamine pyrophosphate and pyridoxal phosphate biosynthesis in *Bacillus subtilis*: 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine kinase and pyridoxal kinase. J. Bacteriol. **186(5)**:1571-1573.
- Peel, M., W. Donachie, and A. Shaw.** 1988. Temperature-dependent expression of Flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. J. Gen. Microbiol. **134(8)**:2171-2178.
- Perego, M., and J. A. Hoch.** 1996. Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**:1549-1553.
- Perego, M.** 1997. A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates the effects of protein phosphatases of the phosphorelay. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**:8612-8617.
- Peschel, A., M. Otto, R. W. Rack, H. Kalbacher, G. Jung, and F. Götz.** 1999. Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins and other antimicrobial peptides. J. Biol. Chem. **274(13)**:8405-8410.
- Peschel, A., and H. G. Sahl.** 2006. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. Nature Rev. Microbiol. **4**:529-536.
- Peters, R.** 1936. The biochemical lesions in vitamin B1 deficiency. Lancet:1162-1165.
- Piuri, M., C. Sanchez-Rivas, and S. M. Ruzal.** 2005. Cell wall modifications during osmotic stress in *Lactobacillus casei*. J. Appl. Microbiol. **98**:84-95.
- Polissi, A., A. Pntoggia, G. Feger, M. Motti, H. Ferrari, and D. Simon.** 1998. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. **66(12)**:5620-5629.
- Popowska, M., and Z. Markiewicz.** 2006. Characterisation of *Listeria monocytogenes* protein Lmo0327 with murein Hydrolase activity. Arch. Microbiol. **186(1)**:69-86.
- Port, G. C., and N. E. Freitag.** 2007. Identification of novel *Listeria monocytogenes* secreted virulence factors following mutational activation of the central virulence regulator, PrfA. Infect. Immun. **75(12)**:5886-5897.
- Postma, P.W., J. W. Lengeler, and G. R. Jacobson.** 1993. Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. Microbiol. Rev. **57(3)**:543-594.
- Premaratne, R. J., W.-J. Lin, and E. A. Johnson.** 1991. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol. **57(10)**:3046-3048.
- Pron, B., C. Boumaila, F. Jaubert, P. Berche, G. Milon, F. Geissmann, and J. L. Gaillard.** 2001. Dendritic cells are early cellular targets of *Listeria monocytogenes* after intestinal delivery and are involved in bacterial spread in the host. Cell Microbiol. **3(5)**:331-340.
- Reizer, J., M. J. Novotny, I. Stuiver, and M. H. Jr. Saier.** 1984. Regulation of glycerol uptake by the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **159(1)**:243-250.

- Renzone, A., A. Klarsfeld, S. Dramsi, and P. Cossart.** 1997. Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect. Immun.* **65(4)**:1515-1518.
- Richey, D.P., and Lin, E.C.** 1972. Importance of facilitated diffusion for effective utilization of glycerol by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **112(2)**:784-790.
- Ripio, M. T., G. Dominguez-Bernal, M. Suarez, K. Brehm, P. Berche, and J. A. Vazquez-Boland.** 1996. Transcriptional activation of virulence genes in wildtype strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. *Res. Microbiol.* **147(5)**:371-384.
- Rocourt, J..** 1988. Taxonomy of the genus *Listeria*. *J. Infect.* **16(2)**:89-91.
- Rocourt, J., P. Boerlin, F. Grimont, C. Jacquet and J. C. Piffaretti.** 1992. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*." *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**:171-174.
- Rodionov, D. A., A. G. Vitreschak, A. A. Mironov, and M. S. Gelfand.** 2002. Comparative genomics of thiamin biosynthesis in prokaryotes. New genes and regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* **277(50)**:48949-48959.
- Rodionov, D. A., P. Hebbeln, A. Eudes, J. ter Beek, I. A. Rodionova, G. B. Erkens, D. J. Slotboom, M. S. Gelfand, A. L. Osterman, A. D. Hanson, and T. Eitinger.** 2009. A novel class of modular transporters for vitamins in prokaryotes. *J. Bacteriol.* **191**:42-51.
- Romano, A.H., M. H. Jr. Saier, O. T. Harriott, and J. Reizer.** 1990. Physiological studies on regulation of glycerol utilization by the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system in *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **172(12)**:6741-6748.
- Rouquette, C. and P. Berche.** 1996. The pathogenesis of infection by *Listeria monocytogenes*. *Microbiologia* **12(2)**:245-258.
- Ryser, E.T..** 1999. Foodborne listeriosis. *Listeria*, Listeriosis, and food safety. 2nd ed Marcel Dekker Inc., New York
- Sallen, B. A., S. Rajoharison, S. Desverenne, F. Quinn, and C. Mabilat.** 1996. Comparative analysis of 16S and 23S rRNA sequences of *Listeria* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46(3)**:669-674.
- Schär, J., R. Stoll, K. Schauer, D. I. M. Loeffler, E. Eylert, B. Joseph, W. Eisenreich, T. M. Fuchs, and W. Goebel.** 2010. Pyruvate carboxylase plays a crucial role in carbon metabolism of extra- and intracellularly replicating *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **192(7)**:1774-1784.
- Schauer, K., J. Stolz, S. Scherer, and T.M. Fuchs.** 2009. Both thiamine uptake and biosynthesis of thiamine precursors are required for intracellular replication of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* **191**:2218-2227.
- Schmid, M. W., E.Y. Ng, R. Lampidis, M. Emmerth, M. Walcher, J. Kreft, W. Goebel, M. Wagner, and K. H. Schleifer.** 2005. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Syst. Appl. Microbiol.* **28(1)**:1-18.
- Schneewind, O., D. Mihaylova-Petkov, and P. Model.** 1993. Cell wall sorting signals in surface proteins of gram-positive bacteria. *EMBO J.* **12**:4803-4811.
- Schuchat, A., B. Swaminathan, and C. V. Broome.** 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **4(2)**:169-183.
- Schyns, G., S. Potot, Y. Geng, T. M. Barbosa, A. Henriques, and J. B. Perkins.** 2005. Isolation and characterisation of new thiamine-deregulated mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **187(23)**:8127-36.
- Schweingruber, A. M., J. Dlugonski, E. Edenharter, and M. E. Schweingruber.** 1991. Thiamine in *Schizosaccharomyces pombe*: dephosphorylation, intracellular pool, biosynthesis and transport. *Curr. Genet.* **19(4)**:249-254.
- Scotti, M., H. J. Monzó, L. Lacharme-Lora, D. A. Lewis, and J. A. Vázquez-Boland.** 2007. The PrfA virulence regulon. *Microbes Infect.* **9(10)**:1196-1207.
- Seeliger, H. P..** 1984. Modern taxonomy of the *Listeria* group relationship to its pathogenicity. *Clin. Invest. Med.* **7(4)**:217-221.

- Settembre, E., T. P. Begley, and S. E. Ealick.** 2003. Structural biology of enzymes of the thiamin biosynthesis pathway. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13 (6)**:739-747.
- Shen, Y., M. Naujokas, M. Park, and K. Ireton.** 2000. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103(3)**:501-510.
- Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilization system for *in vitro* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology* **1**:784-791.
- Slaghuis, J., M. Götz, F. Engelbrecht, and W. Goebel.** 2004. Inefficient replication of *Listeria innocua* in the cytosol of mammalian cells. *J. Infect. Dis.* **189(3)**:393-401.
- Slamti, L., and D. Lereclus.** 2002. A cell-cell signalling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO Journal* **21**:4550-4559.
- Sleytr, U. B.** 1997. Basic and applied S-layer research: an overview. *FEMS Microbiol. Rev.* **20**:5-12.
- Smid, E. J., R. Plapp, and W. N. Könings.** 1989. Peptide uptake is essential for growth of *Lactococcus lactis* on the milk protein casein. *J. Bacteriol.* **171**:6135-6140.
- Sokolovic, Z. and W. Goebel.** 1989. Synthesis of listeriolysin in *Listeria monocytogenes* under heat shock conditions. *Infect. Immun.* **57(1)**:295-298.
- Sokolovic, Z., A. Fuchs, and W. Goebel.** 1990. Synthesis of species-specific stress proteins by virulent strains of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* **58(11)**:3582-3587.
- Sokolovic, Z., J. Riedel, M. Wuenscher, and W. Goebel.** 1993. Surface-associated, PrfA-regulated proteins of *Listeria monocytogenes* synthesized under stress conditions. *Mol. Microbiol.* **8(2)**:219-227.
- Song, Q., and C. K. Singleton.** 2002. Mitochondria from cultured cells derived from normal and thiamine-responsive megaloblastic anemia individuals efficiently import thiamine diphosphate. *BMC Biochem.* **3**:8.
- Suárez, M., B. Gonzalez-Zorn, Y. Vega, I. Chico-Calero, and J. A. Vazquez-Boland.** 2001. A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol.* **3(12)**:853-864.
- Tame, R. H., G. N. Murshudov, E. J. Donson, T. K. Neil, G. G. Dodson, C. F. Higgins, and A. J. Wilkinson.** 1994. The structural basis of sequence-independent peptide binding by OppA protein. *Science* **264**:1578-1581.
- Tilney, L. G., and D. A. Portnoy.** 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* **109(4)**:1597-1608.
- Tsai, H. N., and D. A. Hodgson.** 2003. Development of a synthetic minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Mikrobiol.* **69**:6943-6945.
- Uchikawa, K., I. Sekikawa, and I. Azuma.** 1986. Structural studies on teichoic acids in cell walls of several serotypes of *Listeria monocytogenes*. *J. Biochem.* **99**:315-327.
- van den Bulk, R.W., L. T. P. M. Zevenhuizen, J. H. G. Codewener, and J. J. M. Dons.** 1991. Characterization of the extracellular polysaccharide produced by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Phytopathology* **81**:619-623.
- Vander Horn, P. B., A. D. Backstrom, V. Stewart, and T. P. Begley.** 1993. Structural genes for thiamine biosynthetic enzymes (*thiCEFGH*) in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175(4)**:982-992.
- Vázquez-Boland, J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, B. González-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft.** 2001a. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* **14(3)**:584-640.
- Vazquez-Boland, J. A., G. Dominguez-Bernal, B. Gonzalez-Zorn, J. Kreft, and W. Goebel.** 2001b. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes Infect.* **3(7)**:571-584.
- Vega, Y., C. Dickneite, M. T. Ripio, R. Böckmann, B. González-Zorn, S. Novella, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, and J. A. Vázquez-Boland.** 1998. Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and cyclic AMP receptor protein: the PrfA* (Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA. *J. Bacteriol.* **180(24)**:6655-6660.

- Vitreschak, A. G., D. A. Rodionov, A. A. Mironov, and M. S. Gelfand.** 2004. Riboswitches: the oldest mechanism for the regulation of gene expression? *Trends Genet.* **20(1)**:44-50.
- Voegele, R. T., G. D. Sweet, and W. Boos.** 1993. Glycerol kinase of *Escherichia coli* is inactivated by interaction with the glycerol facilitator. *J. Bacteriol.* **175(4)**:1087-1094.
- Webb, E., K. Claas, and D. Downs.** 1998. thiBPQ encodes an ABC transporter required for transport of thiamine and thiamine pyrophosphate in *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **273(15)**:8946-8950.
- Wehtje, C., L. Beijer, R. P. Nilsson, and B. Rutberg.** 1995. Mutations in the glycerol kinase gene restore the ability of a *ptsGHI* mutant of *Bacillus subtilis* to grow on glycerol. *Microbiology* **141(Pt 5)**:1193-1198.
- Weidenmaier, C., S. A. Kristian, and A. Peschel.** 2003. A bacterial resistance to antimicrobial host defenses – an emerging target for novel anti-infective strategies? *Curr. Drug Targets* **4**:643-649.
- Weidenmaier, C., J. F. Kokai-Kun, S. A. Kristian, T. Chanturiya, H. Kalbacher, M. Gross, G. Nicholson, B. Neumeister, J. J. Mond, A. Peschel.** 2004. Role of teichoic acids in *Staphylococcus aureus* nasal colonization, a major risk factor in nosocomial infections. *Nat. Med.* **10(3)**:243-245.
- Weidenmaier, C., A. Peschel, Y. Q. Xiong, S. A. Kristian, K. Dietz, M. R. Yeaman, and A. S. Bayer.** 2005. Lack of wall teichoic acids in *Staphylococcus aureus* leads to reduced interactions with endothelial cells and to attenuated virulence in a rabbit model of endocarditis. *J. Infect. Dis.* **191(10)**:1771-1777.
- Weidenmaier, C., J. F. Kokai-Kun, E. Kulauzovic, T. Kohler, G. Thumm, H. Stoll, F. Götz, and A. Peschel.** 2008a. Differential roles of sortase-anchored surface proteins and wall teichoic acid in *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *Int. J. Med. Microbiol.* **298(5-6)**:505-513.
- Weidenmaier, C., and A. Peschel.** 2008b. Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* **6(4)**:276-287.
- Weis, J. and H. P. R. Seeliger.** 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.* **30(1)**:29-32.
- Wemekamp-Kamphuis, H. H., J. A. Wouters, R. D. Sleator, C. G. Gahan, C. Hill, and T. Abee.** 2002. Multiple deletions of the osmolyte transporters BetL, Gbu, and OpuC of *Listeria monocytogenes* affect virulence and growth at high osmolarity. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:4710-4716.
- Williams, J. R., C. Thayyullathil, and N. E. Freitag.** 2000. Sequence variations within PrfA DNA binding sites and effects on *Listeria monocytogenes* virulence gene expression. *J. Bacteriol.* **182(3)**:837-841.
- Winkler, W. C., A. Nahvi, and R. R. Breaker.** 2002. Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* **419**:952-956.
- Winkler, W. C.** 2005. Riboswitches and the role of noncoding RNAs in bacterial metabolic control. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **9(6)**:594-602.
- Wuenschel, M. D., S. Köhler, W. Goebel, and T. Chakraborty.** 1991. Gene disruption by plasmid integration in *Listeria monocytogenes*: insertional inactivation of the listeriolysin determinant *lisA*. *Mol. Gen. Genet.* **228(1-2)**: 177-182.
- Yokoyama, K., H. Mizuguchi, Y. Araki, S. Kaya, and E. Ito.** 1989. Biosynthesis of linkage units for teichoic acids in Gram-positive bacteria: disruption of related enzymes and their specification for UDP-sugars and lipid-linked intermediates. *J. Bacteriol.* **171**: 940-946.
- Zhang, Y.-H., C. Ginsberg, Y. Yuan, and S. Walker.** 2006. Acceptor substrate selectivity and kinetic mechanism of *Bacillus subtilis* TagA. *Biochemistry* **45(36)**: 10895-10904.

G. Anhang

Abkürzungen

% (w/v)	Gewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
ARC	American Radiolabeled Chemicals
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylpyrophosphat
bidest.	doppelt destilliert
BHI	Brain Heart Infusion
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ccc	<i>supercoiled</i>
CDTA	<i>trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
Cm	Chloramphenicol
Cm ^R	Chloramphenicol-resistent
del	Deletion
d.h.	das heißt
DIG	Digoxygenin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β-Aminoethylether)-tetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
Em	Erythromycin
Em ^R	Erythromycin-resistent
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
F	Farad
FCS	<i>fetales calf serum</i>
G	Guanin
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
Gen	Gentamicin
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
Kan	Kanamycin
l	Liter
<i>lacZ</i>	Gen für Lactoseverwertung
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
M	molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm

MG	Molekulargewicht
Millipore	entionisiertes Wasser aus der Millipore-Anlage
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MM	Minimalmedium
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumsalz
oc	<i>open circle</i>
o.D.	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PTS	Phosphotransferase-System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
ss	einzelsträngig
SSC	Sodium-Saline-Citrat
t	<i>time</i> (Zeit)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)Aminoethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
u	<i>unit</i>
µm	Mikrometer
ü/N	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Tabellen

gene name/ number	protein name or protein homology/similarity to	polar effect	ADH	INV	IR	RTL in Caco-2 ^a	RTL in J774A.1 ^b	INT
cell wall								
<i>lmo0441</i>	penicillin-binding protein (D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase)	no	1,04	3,58	11,49			14.21
* <i>lmo1085</i>	teichoic acid biosynthesis protein B	smp	1	2	18			09.46
<i>tagB (lmo1088)</i>	teichoic acid biosynthesis protein B	smp	1,93	2,67	26,22			14.39
<i>lmo1713</i>	actin-like ATPase involved in cell morphogenesis	no	1,17	3,03	5,25			12.07
<i>pbpB (lmo2039)</i>	penicillin-binding protein 2B	smp	1,08	2,59	5,5	0,5	-2,2	14.44
<i>lmo2555</i>	glycosyltransferase	smp	4,98	3,82	11,78			10.14
transport/binding proteins and lipoproteins								
<i>lmo0135</i>	oligopeptide ABC transport system, substrate binding protein	no	2,29	2,15	13,75		3,02	18.01
<i>lmo0136</i>	oligopeptide ABC transport system, permease	smp	3,13	2,36	4,95		2,53	18.02
<i>lmo0137</i>	oligopeptide ABC transport system, permease	no	1,67	1,84	9,74			18.03
<i>lmo0195</i>	ABC-type antimicrobial peptide transport system, permease	no	1,39	2,5	9,21		2,67	11.73
<i>lmo0495</i>	permease of the drug/metabolite transporter (DMT superfamily)	possible	1,21	2,25	6,11			15.64
<i>lmo0584</i>	conserved hypothetical membrane protein, putative permease	no	0	2,97	10,52		2,06	12.89
<i>lmo0645</i>	amino acid transporter	no	1	2	5			08.58
<i>lmo0650</i>	conserved membrane protein	possible	1	2	4	0,4		07.72
<i>lmo0787</i>	amino acid transporter	no	1	1	5			06.85
<i>lmo0810</i>	spermidine/putrescine-binding protein	no	1,78	3,07	10,67			12.57
<i>lmo1003</i>	phosphotransferase system enzyme I	no	1	1	5		-2,1	07.03
<i>gbuA (lmo1014)</i>	glycine betaine ABC transporter, ATP-binding protein	smp	0	3,39	9,71			12.31
* <i>lmo1416</i>	hypothetical transporter	no	0	1,1	7,67			15.52
<i>opuCA (lmo1428)</i>	glycine betaine/carnitine/choline ABC transporter, ATP-binding protein	smp	0	1,72	22,85	2,3		10.35
<i>lmo1431</i>	ABC transporter, ATP binding protein	no	3	3	7	0,6		02.12
<i>lmo1506</i>	ABC-type antimicrobial peptide transport system, permease	smp	0,74	2,76	6,72			14.26
<i>lmo1652</i>	ABC transporter, ATP binding protein	smp	2	2	6	1,9	2,19	06.96
<i>lmo1739</i>	amino acid ABC transporter	smp	1	2	8			09.23

<i>Imo1847</i>	ABC transporter specific for metal cations	no	0	2,3	8,44	0,3	-7,71	15.31	
<i>Imo1971</i>	pentitol PTS system, enzyme IIC component	smp	1	2	6	4,3	3,01	06.65	
<i>Imo2124</i>	maltodextrin ABC transport system, permease	smp	1	0	5			04.43	
<i>oppF (Imo2192)</i>	oligopeptide ABC-transporter, ATP-binding protein	no	4	8	31		-2,31	06.41	
<i>Imo2227</i>	ABC transporter, ATP-binding protein	possible	1,41	1,36	8,04			10.89	
<i>Imo2249</i>	low-affinity inorganic phosphate transporter	no	1	2	4			08.49	
<i>Imo2353</i>	hypothetical Na ⁺ /H ⁺ antiporter	no	0	2,27	6,28			12.68	
<i>Imo2380</i>	protein involved in resistance to chololate/Na ⁺ and in pH homeostasis	smp	1,63	2,34	7,65			10.50	
<i>Imo2430</i>	<i>B. subtilis</i> ferrichrome ABC transporter PhuG, permease	smp	0	5,01	110			17.88	
<i>Imo2816</i>	transport protein	no	2,04	2,02	9,25			11.60	
<i>Imo2818</i>	transmembrane efflux protein	smp	1	2	4	1,6		08.64	
<i>Imo2850</i>	sugar transport protein	smp	2	0	8			03.95	
sensors (signal transduction)									
<i>Imo0799</i>	blue-light photoreceptor with PAS domain	no	2	2	12			05.74	
<i>Imo1508</i>	two-component sensor histidine kinase	no	0	2,9	7,6			11.14	
membrane bioenergetics									
<i>Imo0090</i>	ATP synthase a chain, H ⁺ -transporting two-sector ATPase	smp	2	2	4	2,1		08.29	
<i>Imo0091</i>	ATP synthase g chain, H ⁺ -transporting two-sector ATPase	smp	0	2	8,33			10.77	
<i>nifJ (Imo0829)</i>	pyruvate-flavodoxin oxidoreductase	no	1,25	1,45	6,29			15.05	
<i>atpA (Imo2531)</i>	H ⁺ -transporting ATP synthase chain α	smp	1,76	2,74	11,31	0,5		10.29	
<i>atpB (Imo2535)</i>	H ⁺ -transporting ATP synthase chain β	smp	1,11	3,46	7,23			11.34	
mobility and chemotaxis									
<i>Imo0680</i>	flagella-associated protein FlhA	smp	1,79	2,33	7,25			16.76	
<i>Imo0700</i>	flagellar motor switch protein FlhY	smp	0	2,03	9	4,7		16.43	
<i>Imo0705</i>	flagellar hook-associated protein FlgK	smp	1	1	6			07.16	
protein secretion									
<i>sipX (Imo1269)</i>	signal peptidase type I	possible	1	1	8			05.47	

cell division									
<i>gidA</i> (<i>Imo2810</i>)	GidA protein		possible	1	1	6	2,7		07.18
cell surface proteins									
<i>vip</i> (<i>Imo0320</i>)	putative peptidoglycan bound protein with LPXTG motif		no	1,54	4,39	7,4	2,6		10.72
* <i>Imo0327</i>	putative murein hydrolase with LPXTG motif		no	1,01	2,04	7,06			13.33
* <i>Imo0433</i>	internalin A		no	285	5	195	5,6	2,84	04.12
<i>Imo0514</i>	internalin-like protein with LPXTG motif		no	0	1,41	9,29		6,9	17.54
<i>Imo0576</i>	hypothetical cell wall associated protein		no	1	1	6		3,04	07.05
<i>Imo0587</i>	<i>Y. pestis</i> YapH protein, secreted cell wall associated protein		no	1	2	5			07.86
* <i>Imo1666</i>	peptidoglycan linked protein with LPXTG motif		no	0	2	12,45			13.77
<i>Imo2026</i>	hypothetical peptidoglycan bound protein with LPXTG motif		no	0	1,42	12,6			16.50
<i>Imo2504</i>	cell wall binding protein, peptidase-related enzyme		no	1	2	7	0,4		02.22
<i>ami</i> (<i>Imo2558</i>)	autolysin, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase		no	0	5,25	5,5			11.45
transformation and competence									
<i>comGA</i> (<i>Imo1347</i>)	ComGA protein		possible	0	2,03	11,58			15.77
metabolism of carbohydrates and related molecules									
<i>glpQ</i> (<i>Imo0052</i>)	transmembrane protein with phosphodiesterase activity		possible	2	2	6			09.34
* <i>Imo0182</i>	α -xylosidase and α -glucosidase		smp	0	1,07	12,4			15.60
<i>Imo0261</i>	phospho- β -glucosidase		no	1	0	5			04.16
* <i>Imo0271</i>	phospho- β -glucosidase		possible	1	1	6			08.43
<i>Imo0517</i>	phosphoglycerate mutase		no	0	2,11	13,75			17.23
<i>Imo1031</i>	hypothetical L-fucose isomerase		smp	0	2,15	16,23			13.68
<i>Imo1032</i>	transketolase		smp	0	1,43	11,43			17.20
<i>Imo1166</i>	NADPH-dependent butanol dehydrogenase I		possible	0	1,55	6,15			12.92
<i>eutB</i> (<i>Imo1175</i>)	ethanolamine ammonia-lyase, heavy chain		smp	2	1	20	1,8		02.95
<i>Imo1244</i>	weakly similar to phosphoglycerate mutase 1		no	2	2	12	2,8		04.81
<i>glpD</i> (<i>Imo1293</i>)	glycerol-3-phosphate dehydrogenase		no	1	1	7		3,29	02.03
<i>glpK</i> (<i>Imo1538</i>)	glycerol kinase		no	1	0	7	2,6	2,46	05.28
<i>Imo2005</i>	oxidoreductase		no	0	3,87	10,73			10.79

<i>lmo2015</i>	α -mannosidase	no	0	1,67	9,33		11.31
<i>lmo2134</i>	fructose-1,6-bisphosphate aldolase type II	no	1,03	2,43	7,5		11.62
<i>lmo2172</i>	propionate CoA-transferase	possible	1	1	5		07.20
<i>lmo2247</i>	oxidoreductase	possible	1,76	2,92	7,4		08.26
* <i>lmo2446</i>	glycosidase	no	0	1,38	19,06		15.66
<i>lmo2660</i>	transketolase	smp	0	2,59	4,44	4,9	10.80
<i>lmo2734</i>	weakly similar to sugar hydrolase	smp	2	1	6	2,1	06.44
<i>lmo2764</i>	xylose operon regulatory protein/glucose kinase	smp	1,27	2,12	5,25		11.56
<i>lmo2781</i>	β -glucosidase	smp	1,36	1,96	9,37		17.19
<i>lmo2831</i>	phosphoglucomutase	no	2,22	3,25	10		10.12
metabolism of amino acids and related molecules							
<i>lmo0594</i>	homoserine O-acetyltransferase	no	1,14	3,86	6,5		12.22
* <i>lmo1235</i>	aspartokinase II α subunit	no	0	1,18	8,67	2,4	11.32
<i>lmo1495</i>	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase	possible	1	1	9		04.28
<i>argD (lmo1588)</i>	N-acetyl-ornithine aminotransferase	smp	1	1	5	1,9	08.80
<i>lmo1916</i>	peptidase	no	1,51	2,83	9,86		11.20
* <i>arob (lmo1927)</i>	3-dehydroquininate synthase	smp	1,32	1,4	4,02		10.56
<i>ilvD (lmo1983)</i>	dihydroxy-acid dehydratase	smp	1	2	8	1,4	07.90
<i>ilvB (lmo1984)</i>	acetylacetyl synthase (aceto-hydroxy-acid synthase)	smp	0	1,97	8	2,1	10.41
<i>ilvC (lmo1986)</i>	ketol-acid reductoisomerase	no	1,59	3,13	4,72	1,8	14.58
<i>lmo2051</i>	weakly similar to proteases	no	4	1	6		03.85
<i>lmo2434</i>	glutamate decarboxylase	no	1	0	3	2,2	06.04
<i>lmo2694</i>	lysine decarboxylase	possible	2	0	8		03.50
<i>lmo2770</i>	γ -glutamylcysteine synthetase and cyanophycin synthetase	no	1,06	2,23	6,8		11.24
<i>serC (lmo2825)</i>	phosphoserine aminotransferase	possible	1,24	3,65	8,27	2,6	17.49
metabolism of nucleotides and nucleic acids							
<i>purA (lmo0055)</i>	adenylosuccinate synthetase	no	4	0	13	0,5	06.43
<i>purQ (lmo1769)</i>	phosphoribosylformylglycinamide synthetase I	smp	1,21	2,79	22,66		13.40
* <i>purS (lmo1771)</i>	phosphoribosylformylglycinamide synthetase	smp	2	1	16		01.80
<i>pyrE (lmo1831)</i>	orotatephosphoribosyltransferase	no	1,18	2,46	8		15.93

metabolism of lipids									
<i>*ispE (Imo0190)</i>	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase (isoprenoid synthesis)	no	1,25	2,05	7,52	0,4			16.49
<i>Imo1005</i>	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	no	0	1,75	15,99				16.65
<i>Imo1363</i>	geranyltransferase	no	1,61	2,76	7,33				12.46
<i>Imo2450</i>	carboxylesterase	possible	1,25	3,04	6,14				13.46
metabolism of coenzymes and prosthetic groups									
<i>Imo0221</i>	hypothetical type III pantothenate kinase	possible	2	1	10	0,5			03.88
<i>pdxK (Imo0662)</i>	pyridoxine kinase	no	4	1	19			-2,12	03.86
<i>Imo1043</i>	molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis MobB	smp	0,91	2,48	9,45				13.34
<i>Imo1932</i>	heptaprenyl diphosphate synthase component I	smp	1,28	4,75	17,91				15.41
<i>Imo2022</i>	NifS-like protein required for NAD biosynthesis	no	1	1	4	2,1			09.67
<i>nadB (Imo2023)</i>	L-aspartate oxidase	smp	2	0	5				05.01
<i>Imo2102</i>	glutamine amidotransferase subunit PdxT (pyridoxine biosynthesis)	no	2,38	3,85	5,84			-6,22	10.16
<i>Imo2566</i>	biotin/lipoate A/B protein, ligase family	possible	1	2	9				03.72
DNA restriction/modification and repair									
<i>gyrB (Imo0006)</i>	DNA gyrase subunit B	smp	0	2,82	13,92	0,6			13.60
<i>Imo0157</i>	ATP-dependent helicase	possible	1	1	3				06.20
<i>mfd (Imo0214)</i>	transcription-repair coupling factor	possible	0	3,68	12,91				15.45
<i>Imo0313</i>	Mg ²⁺ -dependent deoxyribonuclease (TatD)	no	1	1	4				09.45
<i>Imo0588</i>	DNA photolyase	no	0	2,05	14				12.83
<i>mutM (Imo1564)</i>	formamidopyrimidine-DNA glycosylase	possible	1,01	1,26	7,38				17.18
<i>Imo1751</i>	hypothetical RNA methyltransferase	no	1	2	9				06.88
<i>*ansB (Imo1896)</i>	asparaginyl-tRNA synthetases	no	0,09	1,6	6				10.06
<i>Imo2050</i>	exonuclease ABC (subunit A)	no	1	2	7				08.11
DNA recombination									
<i>recN (Imo1368)</i>	RecN	no	1	1,91	10,4	1,8			11.36
<i>ruvB (Imo1532)</i>	Holliday junction DNA helicase RuvB	possible	1,07	2,25	16,67				14.57
<i>*recS (Imo1942)</i>	similar to ATP-dependent DNA helicase	no	1	1	8				07.12

<i>Imo0940</i>	unknown protein	no	3	2	6	04.94
<i>Imo0941</i>	unknown protein	sm	3	2	6	05.09
<i>Imo1379</i>	<i>B. subtilis</i> SpoIIIJ protein, hypothetical membrane protein	no	1	3	7	04.45
<i>Imo1402</i>	<i>B. subtilis</i> YmcA protein, hypothetical membrane protein	no	2	2	3	06.39
<i>Imo1575</i>	phosphoesterase (DHH superfamily)	no	1	1	5	09.58
* <i>Imo1700</i>	unknown protein	no	0,07	1,34	6,72	10.13
<i>Imo1830</i>	short-chain dehydrogenase	no	2	2	17	06.23
<i>Imo1866</i>	hypothetical phosphotransferase	possible	0	1,98	8,75	17.52
<i>Imo1920</i>	unknown protein	sm	1	1	24	08.54
<i>Imo2516</i>	conserved hypothetical protein	possible	0	1,18	5,2	15.21
<i>Imo2639</i>	unknown protein	possible	0	0,79	8	15.12
no similarity						
<i>Imo0729</i>	no similarity	no	1	1	7	09.11
<i>Imo1188</i>	no similarity	no	0	1,74	7,41	12.61
<i>Imo1219</i>	no similarity	no	1	2	7	09.68
<i>Imo2129</i>	no similarity	no	1,19	1,63	8,42	11.49

Tab.16: Funktionale Klassifizierung der 160 in Caco-2 Zellen replikationsverminderten *L. monocytogenes* EGD Insertionsmutanten und ihre Charakterisierung unter verschiedenen Bedingungen. Mit blau sind *L. monocytogenes* spezifische Gene hervorgehoben, die keine Homologe in *L. innocua* besitzen. Eine *upstream* vom Startcodon des Gens liegende PrfA-Box ist mit * gekennzeichnet. Die Spalten ADH, INV und IR stellen die Ergebnisse aus den Gentamycinassays in Caco-2 Zellen dar. Fett markierte Werte weisen auf die zusätzlich in Adhäsion und/oder Invasion verminderten Insertionsmutanten hin. Die beiden vorletzten Spalten fassen die zurzeit vorhandenen Daten der intrazellulären Transkriptomanalysen in Caco-2 und J774A.1 Zellen zusammen. ^a Transkriptionsstärke in Caco-2 ist definiert durch $\geq 1,6$ und $\leq 0,6$ [Joseph *et al.*, 2006]. ^b Transkriptionsstärke in J774A.1 ist definiert durch ≥ 2 und $\leq 0,22$ [Chatterjee *et al.*, 2006]. Die Daten zu den Insertionsmutanten mit den Integrantennummern 01.01 bis 09.96 stammen aus der vorangegangenen Dissertation von Karin Knuth (Würzburg). ADH, adhesion; INT, Integrantennummer; INV, invasion; IR, intracellular replication; RTL, relative transcript level; sm, same functional metabolic pathway.

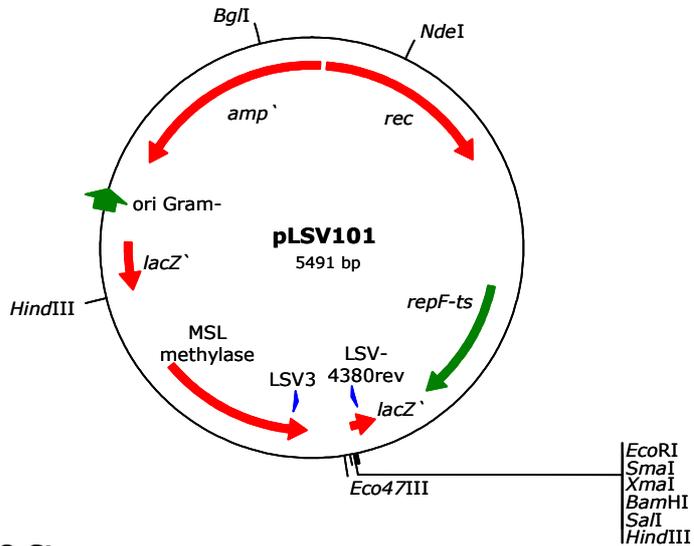
Stamm	putative Funktion deletierter Gene	Adhäsion [cfu/ml]	Invasion [cfu/ml]	intrazelluläre Replikation [cfu/ml]
*EGD	-	1,68E+05	7,01E+03	5,21E+05
*EGDΔ <i>inIAB</i>	Internaline A und B	-	3,11E+02	-
*EGDΔ <i>inIACGHE</i>	Internaline A, C, G, H und E	1,14E+03	-	-
EGDΔ <i>glpD</i>	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase	-	4,00E+04	4,50E+05
EGDΔ <i>Imo1538</i>	Glycerolkinase	-	2,60E+04	5,50E+05
EGDΔ <i>Imo1538ΔglpD</i>	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase; Glycerolkinase	-	2,60E+04	4,00E+05
EGDΔ <i>Imo1031-1036</i>	L-Fucose-Isomerase; Transketolase; Transketolase; Glycerolkinase; β-Glycosid- PTS-System (Enzyme IIABC); unbekanntes Protein	1,44E+03	8,28E+02	6,34E+04
EGDΔ <i>pdxK</i>	Pyridoxinkinase	8,05E+04	5,23E+04	3,98E+06
EGDΔ <i>thiD</i>	bifunktionale HMP-Kinase	5,93E+04	1,38E+05	1,96E+06
EGDΔ <i>thiT</i>	Thiamintransporter	1,02E+05	1,30E+05	2,94E+06
EGDΔ <i>ispE</i>	4-Diphosphocytidyl-2-C-Methyl-D- Erythritolkinase (Isoprenoidbiosynthese)	3,38E+03	5,28E+03	7,21E+04
EGDΔ <i>oppF</i>	Oligopeptid-ABC-Transporter, ATP-bindendes Protein	1,44E+05	1,81E+03	3,36E+04
EGDΔ <i>tagB</i>	Protein B der Teichonsäuren-Synthese	1,35E+04	3,33E+02	6,21E+03
EGDΔ <i>Imo0135-137</i>	Oligopeptid-ABC-Transporter, Substratbindeprotein, Permeaseproteine	1,54E+05	1,70E+03	3,86E+04
EGDΔ <i>Imo0618</i>	Proteinkinase	1,86E+04	7,71E+02	2,92E+04
EGDΔ <i>Imo1085</i>	Protein B der Teichonsäuren-Synthese	1,20E+05	1,11E+03	9,44E+03
EGDΔ <i>Imo1506</i>	ABC-Transporter für antimikrobielle Peptide, Permease	2,02E+04	2,21E+04	1,44E+05
EGDΔ <i>Imo2734</i>	Hydrolase	1,10E+05	4,92E+03	1,27E+05
EGDΔ <i>Imo2781</i>	β-Glucosidase	3,40E+03	5,66E+03	6,61E+04

Tab.17: Zellkulturdaten von der Analyse der Adhäsion, Invasion und intrazellulären Replikation im zeitlichen Verlauf eines Gentamycinassays. Die Werte der intrazellulären Replikation stammen aus Versuchen mit siebenstündiger Infektion. Die Werte der Deletionsmutanten kommen aus einem der drei unabhängigen Versuche. Zum Vergleich der Deletionsmutanten untereinander und mit dem Wildtyp wurden stets Mittelwerte aus den prozentualen Angaben der einzelnen Versuche gebildet. *Die Werte der Kontrollstämme sind Mittelwerte aus fast allen durchgeführten Versuchen, in denen Glycerolstocks mit definierter Bakterienzahl für die Infektion eingesetzt wurden.

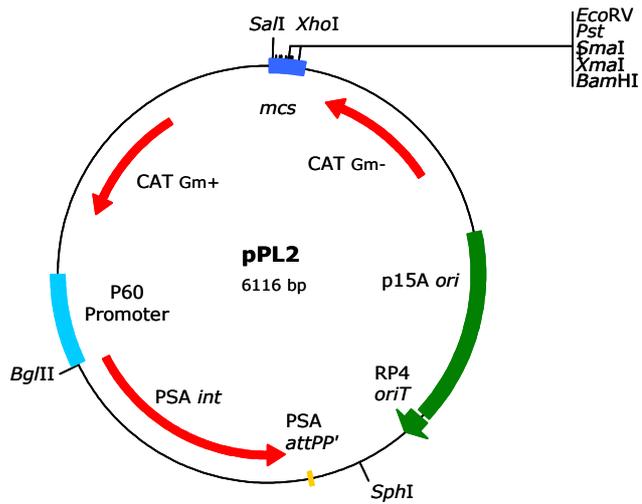
Plasmidkarten

In den folgenden Plasmidkarten sind nur ausgewählte Restriktionsschnittstellen eingezeichnet.

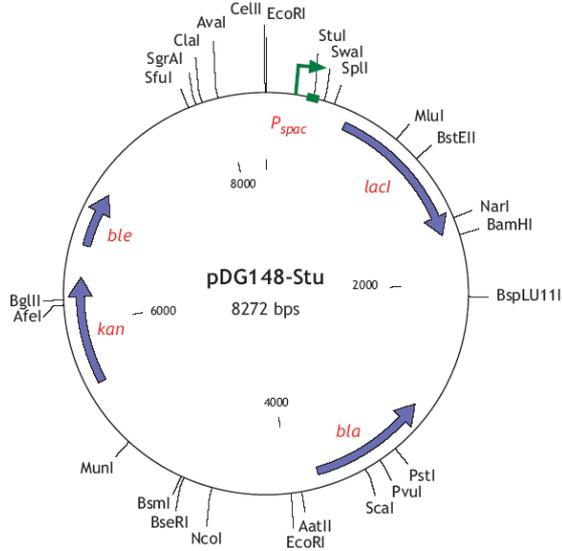
Shuttle-Vektor pLSV101



Expressionsvektor pDG148-Stu



Integrationsvektor pPL2



Publikationen

Joseph, B., K. Przybilla, C. Stühler, **K. Schauer**, J. Slaghuis, T. M. Fuchs, and W. Goebel. 2006. Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening. *J. Bacteriol.* 188(2):556-568.

Schauer, K., J. Stolz, S. Scherer, and T.M. Fuchs. 2009. Both thiamine uptake and biosynthesis of thiamine precursors are required for intracellular replication of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 191:2218-2227.

Schär J., R. Stoll, **K. Schauer**, D. I. Loeffler, E. Eylert, B. Joseph, W. Eisenreich, T. M. Fuchs, and W. Goebel. 2010. Pyruvate carboxylase plays a crucial role in carbon metabolism of extra- and intracellularly replicating *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 192(7):1774-1784.

Schauer, K., G. Geginat, C. Liang, W. Goebel, T. Dandekar, and T. M. Fuchs. 2010. Deciphering the intracellular metabolism of *Listeria monocytogenes* by mutant screening and modelling. *BMC Genomics*. (*submitted*)

Neuhaus, K., P. Satorhelyi, **K. Schauer**, T. M. Fuchs, and S. Scherer. 2010. Acid shock transiently induces *prfA* and the invasion capacity of *Listeria monocytogenes* at low environmental temperatures. (*in preparation*)

Joseph, B., S. Mertins, R. Stoll, S. Müller-Atlock, M. Taupp, P. Schreier, B. Knaup, **K. Schauer**, T. M. Fuchs, and W. Goebel. 2010. The effect of XAD-4 on the metabolism of *Listeria monocytogenes* and its impact on the activation of PrfA, the central regulator of listerial virulence. (*in preparation*)

Fuchs, T. M., **K. Schauer**, E. Eylert, S. Grubmueller, and W. Eisenreich. 2010. Glycerol metabolism of *Listeria monocytogenes*. (*in preparation*)

Posterpräsentation, Workshops

Posterpräsentation

Schauer K., K. Przybilla, W. Goebel, and T. M. Fuchs. Identification of structural and metabolic targets in *Listeria monocytogenes* for antilisterial and antibacterial substances. PROKAGEN 2005, 2nd European Conference on Prokaryotic Genomes, Dechema e.V.. 23.-26. September 2005, Göttingen.

Schauer K., K. Przybilla, W. Goebel, and T. M. Fuchs. Genome-wide identification of *Listeria monocytogenes* factors required for intracellular replication. Annual Conference of the VAAM. 19.-22. März 2006, Jena.

Schauer K., and T. M. Fuchs. Intracellular metabolism of *Listeria monocytogenes*. "Metabolism Meets Virulence" - International Symposium on Metabolism and Bacterial Virulence. 04.-07. April 2009, Hohenkammer.

K. Schauer wurde durch ein „FEMS Young Scientist Grant“ unterstützt.

Workshops

ERA-NET PathoGenoMics, Partnering Workshop. 01. Februar 2006, Hohenkammer.

1. Workshop Isotopolog Profiling. 05./06. Dezember 2008, Garching.

2. Workshop Isotopolog Profiling. 04./05. Dezember 2009, Garching.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen von Herzen danken, die mir während meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Thilo M. Fuchs für die Bereitstellung des interessanten und vielseitigen Themas, für seine aufgeschlossene Betreuung und wissenschaftlichen Anregungen, die mir wichtige Impulse für den weiteren Verlauf meiner Arbeit gegeben haben. Darüber hinaus möchte ich ihm auch für seine enorme Geduld und seine ständige Hilfsbereitschaft, alle Fragen und Schwierigkeiten zu klären, und für sein außerordentliches „positives Denken“ danken.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Siegfried Scherer für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl anfertigen zu dürfen sowie für sein Interesse an meinem Thema.

Mein Dank gilt auch PD Dr. Matthias Ehrmann für die Übernahme des Zweitgutachtens.

PD Dr. Jürgen Stolz danke ich für die vielen fruchtbaren Diskussionen und Beiträge insbesondere zum Thema „Vitamintransport“ und seine konstruktiven Korrekturvorschläge für das Thiamin-Manuskript.

Mein Dank gilt auch Dr. Karl-Heinz Gartemann für seine ständige Gesprächsbereitschaft und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei Samir und Fabian, die mich bei der Arbeit im Labor, wenn auch nur kurz, unterstützt haben.

Weiter möchte ich mich besonders bei allen Kollegen und Kolleginnen der AG Fuchs bedanken, vor allem bei Carsten, Fabian, Geraldine, Jochen, Lisa, Markus, Patrick, Roman und Shabi, die für ein lockeres, lustiges und rockiges Arbeitsklima mit dem Motto „VI SPELAR VAD VI VILL!“ gesorgt haben. Geraldine, dir danke ich extra für die empfohlene Tagesdosis Lachen, denn nicht nur Vitamine sind gesund! Dem „Zombie-Team“ danke ich, dass es mir an diversen Abenden und Nächten am Institut die Gesellschaft geleistet hat. Ihr wart wirklich klasse und ich werde immer gerne an diese Zeit zurück denken.

Ein spezielles Dankeschön geht auch an alle anderen Gleichgesinnten eines Doktorandenlebens, für ihre fachlichen Tipps und Ratschläge, für interessante und lustige Gespräche in der Mensa und auch für die Zeit außerhalb des Labors.

Auch bei allen anderen Mitgliedern des Instituts möchte ich mich bedanken, welche diese Arbeit auf die eine oder andere Art unterstützt haben. Danke vor allem an Hilde in unserer Spülküche, ohne sie wäre das Arbeiten ungleich schwerer gewesen, und natürlich auch an Maria und Gitti für das Bewältigen des bürokratischen Aufwandes, den meine Vertragsverlängerungen mit sich gebracht haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die ihr immer währendes Interesse für meine Arbeit gezeigt und mich während der ganzen Zeit in jeglicher Hinsicht mit allen Kräften unterstützt hat.

Mein tiefster Dank gilt Carsten, der mich in allen Phasen dieser Arbeit unermüdlich unterstützt und immer wieder aufs Neue – besonders in der Endphase der Arbeit – aufgemuntert und motiviert hat.