

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Listeria.....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Charakteristika.....	2
1.1.2. Das Humanpathogen <i>Listeria monocytogenes</i> und das Krankheitsbild Listeriose .....	3
1.1.3. Der Infektionszyklus von <i>Listeria monocytogenes</i> .....	10
<b>1.2. Die Immunreaktion des Wirtes gegen <i>Listeria monocytogenes</i>.....</b>	<b>12</b>
1.2.1. Die Zell-vermittelte Immunantwort gegen <i>Listeria monocytogenes</i> .....	13
1.2.2. Das angeborene Immunsystem: Pattern-Recognition Rezeptoren (PRR) .....	14
1.2.2.1. Die Toll-like (TLR) und NOD-like (NLR) Rezeptoren.....	15
1.2.2.2. Die RIG-I-like (RLR) Rezeptoren und DNA-Sensoren.....	17
1.2.3. Die Typ-I Interferonantwort.....	20
1.2.4. Unterscheidung zwischen toten oder lebendigen Mikroorganismen durch das Immunsystem .....	22
<b>1.3. Sekretion von Proteinen .....</b>	<b>25</b>
1.3.1. Sekretionssysteme in <i>Listeria monocytogenes</i> .....	26
1.3.2. Der generelle Sec-Transportweg .....	29
2.2.2.1. Die SecYEG- Translokase .....	32
2.2.2.2. Das SecA1-Protein.....	33
2.2.2.3. Das SecA2-Protein.....	34
2.2.2.4. Proteinsekretion via SecA2.....	37
<b>1.4. Membranvesikel.....</b>	<b>39</b>
<b>1.5. Zielsetzung dieser Arbeit.....</b>	<b>41</b>
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>43</b>
<b>2.1. Material.....</b>	<b>43</b>

~ I ~

2.1.1.	Bakterienstämme .....	43
2.1.2.	Eukaryotische Zelllinien.....	43
2.1.3.	Plasmide .....	43
2.1.4.	Oligonukleotide .....	44
2.1.5.	Größenstandards für DNA und Protein .....	46
2.1.6.	Antikörper.....	46
2.1.7.	Chemikalien.....	46
2.1.9	Enzyme, Kits und gebrauchsfertige Chemikalien .....	47
2.1.8.	Verbrauchsmaterialien.....	48
2.1.9.	Antibiotika.....	50
2.1.10.	Anzuchtmedien für prokaryotische Zellen.....	50
2.1.11.	Medien und Puffer für die Zellkultur.....	51
2.1.10	Puffer und Lösungen .....	52
2.1.11	Geräte .....	58
2.1.12	Software und Datenbank .....	61
<b>2.2.</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>61</b>
2.2.1.	Kultivierung von Bakterien .....	61
2.2.2.	Herstellung kompetenter Bakterien .....	62
2.2.2.1.	Chemisch kompetente <i>Escherichia coli</i> .....	62
2.2.2.2.	Elektrokompetente <i>Listeria monocytogenes</i> .....	62
2.2.3.	Transformation von kompetenten Bakterien .....	63
2.2.2.3.	Transformation von chemisch kompetenten <i>Escherichia coli</i> .....	63
2.2.2.4.	Transformation von elektrokompetenten <i>Listeria monocytogenes</i> .....	63
2.2.4.	Molekulare Arbeiten auf DNA-Ebene.....	63
2.2.4.1.	Polymerase-Kettenreaktion.....	63
2.2.4.2.	Agarosegelektrophorese.....	65

2.2.4.3.	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	66
2.2.4.4.	Agarosegeleextraktion von DNA-Fragmenten .....	66
2.2.4.5.	Plasmidisolierung.....	67
2.2.4.6.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	67
2.2.4.7.	Verdau mittels Restriktionsenzymen .....	68
2.2.4.8.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	69
2.2.4.9.	Sequenzierung von PCR-Produkten und Plasmiden.....	69
2.2.4.10.	Herstellung der Komplementanten und Überexpressionsstämme von <i>Listeria monocytogenes</i> .....	70
2.2.5.	Arbeiten auf RNA-Ebene .....	72
2.2.5.1.	Methoden der RNA-Isolierung .....	72
2.2.5.2.	Konzentrationsbestimmung von RNA.....	74
2.2.5.3.	Quantifizierung und Qualitätskontrolle der RNA.....	74
2.2.5.4.	Transfektion bakterieller RNA in eukaryotischen Zellen.....	75
2.2.5.5.	Reverse Transkription.....	75
2.2.5.6.	Quantitative Real-Time-PCR.....	76
2.2.5.7.	In vitro-Transkription.....	78
2.2.6.	Arbeiten auf Protein-Ebene .....	78
2.2.6.1.	Isolierung von Proteinen durch subzelluläre Fraktionierung.....	78
2.2.6.2.	Isolierung von Membranvesikeln .....	79
2.2.6.3.	Isolierung des rekombinanten SecA1- und SecA2-Proteins mittels Affinitätschromatographie .....	80
2.2.6.4.	Isolierung von Ribosomen .....	81
2.2.6.5.	Isolierung von Polysomen .....	82
2.2.6.6.	Quantifizierung von Proteinen.....	83
2.2.6.7.	Co-Sedimentation von SecA-Proteinen mit Ribosomen.....	84

2.2.6.8.	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelektrophorese und Western Blot.....	85
2.2.6.9.	Katalase-Aktivitätstest.....	86
2.2.6.10.	Superoxiddismutase-Aktivitätstest .....	87
2.2.6.11.	Hämolsin-Titer test .....	88
2.2.6.12.	Massenspektrometrische Analysen.....	88
2.2.7.	Zellkultur .....	91
2.2.7.1.	Kultivierung und Lagerung von P388D1-Makrophagen .....	91
2.2.7.2.	Gewinnung und Kultivierung von <i>Bone Marrow-derived Macrophages</i> . .....	91
2.2.7.3.	Gewinnung von <i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i> .....	92
2.2.7.4.	Infektionsversuch mit P388D1-Makrophagen.....	92
2.2.7.5.	Zellpräparation für die Immunfluoreszenzmikroskopie .....	93
2.2.8.	Statistische Analyse.....	94
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>95</b>
<b>3.1.</b>	<b>Funktionalität des rekombinannten SecA2-Proteins .....</b>	<b>95</b>
3.1.1.	Reinigung rekombinanter SecA2- und SecA1-Proteine .....	95
3.1.2.	Identifizierung SecA2 co-isolierter Proteine .....	99
3.1.3.	Co-Sedimentation der SecA-Proteine mit Ribosomen .....	104
3.1.4.	Assoziation von SecA2 mit translatierenden Ribosomen.....	105
3.1.5.	Assoziation von SecA2 mit modifizierten Ribosomenbindestellen an die Ribosomen .....	110
<b>3.2.</b>	<b>Beteiligung des SecA2-Proteins an der Sekretion von Nukleinsäuren....</b>	<b>112</b>
3.2.1.	SecA2-Deletion führt zur verminderten Sekretion an RNA.....	113
3.2.2.	Deletion von SecA2 führt zur verminderten IFN-β-Expression durch ..... sec-RNA .....	114
3.2.3.	Isolierung SecA2-assozierter RNAs.....	115

3.2.4.	SecA2-assozierte RNAs unterscheiden sich von SecA1-assozierten RNAs .....	117
3.2.5.	Induktion der IFN- $\beta$ -Expression durch SecA2-assozierte RNAs ist höher als durch SecA1-assozierte RNAs.....	117
3.2.6.	SecA2-assozierte RNAs sind hauptsächlich kleine, nicht-kodierende RNAs .....	119
<b>3.3.</b>	<b>Die funktionelle Bedeutung der SecA2-assozierten sRNA rli32 für ..... <i>Listeria monocytogenes</i> .....</b>	<b>121</b>
3.3.1.	Verminderte rli32-Sekretion durch Deletion der Enolase .....	122
3.3.2.	Veränderung des Transkriptenlevels der sRNA rli32 durch Deletion und Überexpression in <i>Listeria monocytogenes</i> .....	124
3.3.3.	Die IFN- $\beta$ -Expression korreliert mit dem Transkriptenlevel der sRNA rli32.....	125
3.3.4.	Rli32-Überexpression fördert das intrazelluläre Wachstum von ..... <i>Listeria monocytogenes</i> .....	127
3.3.5.	Der rli32-Überexpressionsstamm erhöht die IFN- $\beta$ -Expression in infizierten Makrophagen .....	130
3.3.6.	Der IFN- $\beta$ -Signalweg spielt eine Rolle für das intrazelluläre Wachstum von <i>Listeria monocytogenes</i> .....	133
3.3.7.	Rli32-Überexpression erhöht die Resistenz von <i>Listeria monocytogenes</i> gegenüber Wasserstoffperoxid .....	134
3.3.8.	Punktmutationen in der sRNA rli32 verändern deren Potential zur Induktion der IFN- $\beta$ -Expression in Makrophagen .....	138
3.3.9.	Auswirkung der rli32-Überexpression auf Transkriptionsebene .....	139
3.3.10.	Sensitivität gegenüber Cefuroxim durch eine rli32-Überexpression..	142
<b>3.4.</b>	<b>Membranvesikel: Plan B der Sekretion? .....</b>	<b>143</b>
3.4.1.	Vesikelbildung und Verpackung ist abhängig vom Nährmedium.....	143
3.4.2.	Auswirkung der rli32-Überexpression auf die Protein Zusammensetzung der Membranvesikel .....	146

<b>3.5. Auswirkung der Deletion und Überexpression von rli32 auf Translationsebene .....</b>	<b>148</b>
3.5.1. Die <i>hly</i> -Promoter-induzierte Überexpression von rli32 führt zu verminderten Virulenzfaktoren.....	151
3.5.1. Enolase akkumuliert in den sekretierten Fraktionen von <i>Lm</i> -rli32 .....	153
3.5.2. Deletion von rli32 führt zur Reduktion von Zellwandproteinen in den Membranvesikeln .....	154
3.5.3. Deletion von rli32 führt zur Akkumulation von Transportern in den Membranvesikeln .....	156
3.5.4. Mögliche Funktion von rli32: Parallelen zu c-di-AMP weisen auf eine mögliche regulatorische Funktion im Stickstoffmetabolismus hin .....	159
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>163</b>
4.1. Sekretierte Nukleinsäuren von intrazellulären Bakterien agieren als ..... vita-PAMPs.....	163
4.2. SecA2 im Zusammenhang mit der Pathogenität von ..... <i>Listeria monocytogenes</i> .....	164
4.3. Beteiligung des SecA2 an der Sekretion von RNA.....	165
4.4. Rli32 ist ein Typ-I Interferon-β-induzierendes vita-PAMP .....	168
4.5. Sekretion von rli32 fördert das intrazelluläre Wachstum von ..... <i>Listeria monocytogenes</i> .....	170
4.6. Die physiologische Funktion von rli32 hat Einfluss auf die Zellhülle ..... von <i>Listeria monocytogenes</i> .....	171
4.7. SecA2-abhängige Sekretion erfolgt möglicherweise indirekt über Enolase. ....	173
4.8. Die möglichen „Schalter“ der Sekretion von RNA-assozierter Enolase könnten post-translationale Modifikationen (PTMs) sein .....	175
4.9. SecA2 und SecA1 sind co-translational agierende Proteine in ..... <i>Listeria monocytogenes</i> .....	177

<b>4.10. Hypothetisches Modell der SecA2-vermittelten Sekretion von RNAs .....</b>	<b>179</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>VIII</b>
<b>5.1. Zusammenfassung .....</b>	<b>VIII</b>
<b>5.2. Summary.....</b>	<b>X</b>
<b>6. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>XII</b>
<b>7. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XV</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XVI</b>
<b>9. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>XVIII</b>
<b>10. Anhang .....</b>	<b>LI</b>
<b>10.1. Abbildungen und Tabellen.....</b>	<b>LI</b>
<b>10.2. Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>LXIX</b>
<b>10.3. Kongressbeiträge .....</b>	<b>LXX</b>
<b>10.4. Danksagung .....</b>	<b>LXXII</b>
<b>10.5. Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>LXXIV</b>