

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. <i>Listeria</i>.....	2
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
1.2. Die Immunreaktion des Wirtes gegen <i>Listeria monocytogenes</i>.....	12
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
1.3. Sekretion von Proteinen	25
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
1.4. Membranvesikel.....	39
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit.....	41
2. Material und Methoden	43
2.1. Material.....	43

~ 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
2.2.	Methoden	61
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.	Agarosegelelektrophorese.....	65

2.2.4.3.	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	66
2.2.4.4.	Agarosegelextraktion 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-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot.....	85
2.2.6.9.	Katalase-Aktivitätstest	86
2.2.6.10.	Superoxiddismutase-Aktivitätstest	87
2.2.6.11.	Hämolysin-Titertest	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
3.	Ergebnisse.....	95
3.1.	Funktionalität des rekombinanten SecA2-Proteins.....	95
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
3.2.	Beteiligung des SecA2-Proteins an der Sekretion von Nukleinsäuren....	112
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-assoziiierter RNAs.....	115

3.2.4.	SecA2-assoziierte RNAs unterscheiden sich von SecA1-assoziierten RNAs	117
3.2.5.	Induktion der IFN- β -Expression durch SecA2-assoziierte RNAs ist höher als durch SecA1-assoziierte RNAs.....	117
3.2.6.	SecA2-assoziierte RNAs sind hauptsächlich kleine, nicht-kodierende RNAs	119
3.3.	Die funktionelle Bedeutung der SecA2-assoziierten sRNA rli32 für	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	121
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- β -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- β -Expression in infizierten Makrophagen	130
3.3.6.	Der IFN- β -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- β -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
3.4.	Membranvesikel: Plan B der Sekretion?	143
3.4.1.	Vesikelbildung und Verpackung ist abhängig vom Nährmedium.....	143
3.4.2.	Auswirkung der rli32-Überexpression auf die Proteinzusammensetzung der Membranvesikel	146

3.5. Auswirkung der Deletion und Überexpression von rli32 auf Translationsebene	148
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
4. Diskussion	163
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-assoziiierter Enolase könnten post-translationale Modifikationen (PTMs) sein	175
4.9. SecA2 und SecA1 sind co-translational agierende Proteine in <i>Listeria monocytogenes</i>	177

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