

Diss. ETH Nr. 18877

**Identifizierung und Anwendungen von
Phagenproteinen zum Nachweis von
Listeria spp.**

Abhandlung
zur Erlangung des Titels

DOKTORIN DER WISSENSCHAFTEN

der

ETH ZÜRICH

Vorgelegt von

JULIA KAPS
Dipl. Biol. Univ., Universität Regensburg
geboren am 23.11.1981
in Regensburg, Deutschland

Angenommen auf Antrag von

Prof. Dr. Martin Loessner, Referent
Dr. Stefan Miller, Koreferent

2010

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
Zusammenfassung	VII
Summary	IV
1 Einleitung	1
1.1 Der Genus <i>Listeria</i>	1
1.1.1 Taxonomie und generelle Eigenschaften	1
1.1.2 Die Zellwand von <i>Listeria</i>	2
1.1.3 Pathogenität von <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.1.4 Nachweis von <i>Listeria</i> in Lebensmitteln	5
1.2 Bakteriophagen	6
1.2.1 Definition, Morphologie und Taxonomie	6
1.2.2 Phagenvermehrung.....	7
1.2.3 Wirtserkennung und Phagenadsorption	9
1.2.3.1 Wirtserkennung bei Phagen Gram-negativer Bakterien	10
1.2.3.2 Wirtserkennung bei Phagen Gram-positiver Bakterien	10
1.3 <i>Listeria</i> Phagen.....	12
1.3.1 Generelle Eigenschaften von <i>Listeria</i> Phagen	12
1.3.2 Anwendungen von <i>Listeria</i> Phagen.....	14
1.3.3 Bindeproteine von <i>Listeria</i> Phagen	15
1.3.3.3 Zellbindedomäne der Endolysine von Bakteriophagen	15
1.3.3.4 Rezeptor Bindeproteine der Phagen	16
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Material.....	18
2.1.1 Chemikalien	18
2.1.2 Medien	18

2.1.3	Lösungen und Puffer	19
2.1.4	Oligonukleotide	20
2.1.5	Vektoren.....	21
2.1.6	Geräte	21
2.1.7	Sonstige Materialien.....	22
2.2	Bakterien, Bakteriophagen und ihre Wachstumsbedingungen	23
2.2.1	<i>E. coli</i> Stämme	23
2.2.2	Nicht- <i>Listeria</i> Stämme	23
2.2.3	<i>Listeria</i> Stämme	24
2.2.4	Bakteriophagen	24
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	26
2.3.1	Standardmethoden.....	26
2.3.2	DNA Isolierung aus Bakteriophagen und <i>Listeria</i> Zellen	26
2.3.2.1	DNA Freisetzung aus Bakteriophagen über Denaturierung der Kapsid-Proteine.....	26
2.3.2.2	DNA Isolierung aus <i>Listeria</i> Zellen	26
2.3.3	PCR (<i>polymerase chain reaction</i>).....	26
2.3.4	DNA-Sequenzierung und Auswertung.....	27
2.3.5	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	27
2.4	Proteinchemische und -analytische Methoden	28
2.4.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot.....	28
2.4.2	Expressionstest.....	28
2.4.3	Test auf lösliche Proteinexpression.....	29
2.4.4	Proteinexpression von Grosskulturen.....	30
2.4.5	Zellaufschluss	30
2.4.6	Native Proteinreinigung über Affinitätschromatographie	31
2.4.6.1	Streptavidin Mutein Matrix.....	31
2.4.6.2	Ni-NTA Sepharose	31
2.4.7	Gewinnung unlöslicher Proteine.....	31
2.4.7.1	Isolierung der <i>Inclusion bodies</i>	32
2.4.7.2	Solubilisierung der <i>Inclusion bodies</i>	32
2.4.7.3	Rückfaltung denaturierter Proteine.....	32

2.4.8	Dialyse	33
2.4.9	Bestimmung der Proteinkonzentration über UV/VIS-Absorptions- spektroskopie	33
2.4.10	Aufkonzentrierung von Proteinlösungen.....	34
2.5	Charakterisierung der Bindeproteine	35
2.5.1	Bindestudien	35
2.5.1.1	Magnetische Separation	35
2.5.1.2	Zell-ELISA.....	37
2.5.1.3	Sandwich-ELISA	38
2.5.1.4	Peroxidase-Test.....	39
2.5.2	Präparative Gelfiltration.....	40
2.5.3	Thermische Denaturierung - Circular Dichroismus.....	40
2.5.4	Untersuchung zu den Liganden der Rezeptor Bindeproteine.....	41
3	Ergebnisteil	42
3.1	Screening nach RBPs von <i>Listeria</i> Phagen	42
3.1.1	Identifizierung potentieller RBP-Gene	42
3.1.2	Testablauf zur Identifizierung möglicher RBPs.....	43
3.1.3	Identifikation möglicher RBPs	45
3.1.3.1	<i>Listeria</i> Phagen A006, A118, A500, B025, B054 und PSA	47
3.1.3.2	<i>Listeria</i> Phage P35.....	50
3.1.3.3	<i>Listeria</i> Phage A511.....	51
3.1.3.4	Zusammenfassung.....	52
3.2	Charakterisierung der Bindeproteine	57
3.2.1	Bindespektren der Bindeproteine	57
3.2.1.1	Wechselwirkung innerhalb des Genus <i>Listeria</i>	58
3.2.1.2	Wechselwirkung ausserhalb des Genus <i>Listeria</i>	63
3.2.2	Homotrimere Struktur	63
3.2.3	Bindestärke von A006Gp17 und Lwe1237	67
3.2.3.1	Bindestärke im Zell-ELISA	68
3.2.3.2	Bindestärke in der magnetische Separation.....	70

3.2.4	Thermische Stabilität.....	72
3.2.4.1	Funktionalität nach Inkubation der RBPs bei Temperaturen von 30 °C bis 95 °C	72
3.2.4.2	Bestimmung der thermischen Stabilität über CD-Spektroskopie..	73
3.2.5	Untersuchungen zur Optimierung von A006Gp17.....	75
3.2.5.1	Synthetisches Gen	76
3.2.5.2	N-terminale Verkürzungen	78
3.2.6	Phagenliganden auf der <i>Listeria</i> Zelloberfläche	80
4	Diskussion.....	83
	Literaturverzeichnis	98
	Appendix	111

Danksagung

Curriculum vitae

Abkürzungsverzeichnis

AA	Aminosäure
Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis-[3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfon-Säure]
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain heart Infusion</i>
cfu	<i>Colony-forming unit</i>
CD	Circular Dichroismus
C-terminal	Carboxy-terminal
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTE	Dithioerythritol
dTTP	Desoxythymintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELFA	<i>Enzym-linked fluorescent assay</i>
Gp	Genprodukt
HRP	Meerrettichperoxidase
IPTG	Isopropyl-Beta-D-Thiogalactopyranosid
kD	kilo Dalton
LSP	lytisches Strukturprotein
min	Minuten
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
N-terminal	Amino-terminal
Ns-Tag	N-terminaler <i>Strep</i> -Tag-II
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline

PBST	Phosphat gepufferte Saline mit Tween-20
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
pNPP	p-Nitrophenyl Phosphat
ProCC	“Profos culture collection”
RBP	Rezeptor Bindeprotein
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SLCC	<i>Special Listeria Culture Collection</i> , Universität Heidelberg
Sv	Serovar
Tab.	Tabelle
TMP	<i>Tape measure protein</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween-20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
tRNA	transfer RNA
U	Unit
v/v	Volumenanteile
WSLC	Weihenstephaner <i>Listeria Collection</i>
w/v	Gewichtsanteile

Zusammenfassung

Verursacher von Listeriose, einer schwerwiegenden humanen Infektion, ist *Listeria monocytogenes*. Diese Krankheit äussert sich bei immunsupprimierten Patienten mit Symptomen wie beispielsweise Sepsis, Meningitis oder Enzephalitis. *Listeria monocytogenes* wird hauptsächlich durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel übertragen. Daher muss zum Schutz des Verbrauchers eine mögliche Verunreinigung mit *Listeria* im Lebensmittel und Produktionsanlagen schnell erkannt werden. Dabei kann neben *Listeria*-spezifischen Antikörpern auch die spezifische Bindung von Bakteriophagen an ihren Wirt genutzt werden.

Zum einen können *Listeria* Zellen über Zellbindedomänen von Endolysinen (CBDs) gebunden werden. Die CBDs von *Listeria* Phagen wurden bereits mehrfach charakterisiert. Ausserdem wurde gezeigt, dass sie zum *Listeria* Nachweis verwendet werden können.

Zum anderen verwenden Phagen Bindeproteine zur Anheftung an den Wirt zu Beginn der Infektion. Diese Rezeptor Bindeproteine (RBPs) binden spezifisch an einen Liganden der Wirtsoberfläche und ermöglichen dem Phagen damit die Injektion seines Genoms in die Wirtszelle. Die RBPs von *Listeria* Phagen wurden zu Beginn dieser Arbeit noch nicht beschrieben. Daher sollen sie identifiziert, charakterisiert und ihr Einsatz zum *Listeria* Nachweis im Vergleich mit der CBD des *Listeria* Phagen A511 untersucht werden.

In dieser Arbeit konnten erfolgreich potentielle Bindeproteine der *Listeria* Phagen A006, A118, A500, A511, B025, B054, P35 und PSA identifiziert, exprimiert und charakterisiert werden. Darüber hinaus wurde ein Protein mit einer phagen-ähnlichen Sequenz aus *Listeria welshimeri* isoliert, welches sich ebenfalls als potentielles Bindeprotein herausstellte. Über Sequenzanalysen der jeweiligen Aminosäuresequenzen und den Vergleich der Bindespektren mit den jeweiligen Phagenwirtsspektren wurde festgestellt, dass es sich bei den identifizierten potentiellen Bindeproteinen aus A006, A511, B025, B054, P35, PSA und *Listeria welshimeri* vermutlich um die RBP Moleküle im Phagenviron handelt. Die identifizierten potentiellen Bindeproteine der Phagen A118 und A500 bilden dagegen vermutlich lytische Strukturproteine im Phagenviron.

Mit zwei der identifizierten RBPs (A006Gp17 und Lwe1237) werden unter anderem alle untersuchten *Listeria* Stämme der wichtigen human-pathogenen Serovare 1/2a,

1/2b und 4b gebunden. Zudem weisen sie bezüglich ihrer unspezifischen Wechselwirkungen und ihrer Genuspezifität bessere Eigenschaften für den *Listeria* Nachweis auf, als dies für die CBD511 der Fall ist.

Beim Vergleich mit einem RBP eines *E. coli* O157 spezifischen Phagen (Eco-O157), das beim *E. coli* O157 Nachweis im „enzym-linked fluorescent assay“ hervorragende Ergebnisse zeigte, ergaben die RBPs bei Verwendung als Fängermolekül ähnliche Bindestärken. Als Nachweismolekül deuten die Ergebnisse allerdings auf eine geringere Sensitivität hin als sie mit Eco-O157 erreicht wurde. Somit sind die RBPs im derzeitigen Zustand vermutlich eher als Fängermoleküle beim *Listeria* Nachweis geeignet.

Erste Untersuchungen zur Charakterisierung von A006Gp17 und Lwe1237 deuten darauf hin, dass sie, wie viele andere Proteine dieser Art, in nativer Form als SDS-resistente Homotrimere vorliegen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der N-Terminus von A006Gp17 nicht für die Bindung an die Bakterienoberfläche notwendig ist. Somit ist dieser Teil vermutlich für die Anheftung an den Phagen verantwortlich, wogegen C-terminal die Bindung an den Wirt stattfindet. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen zudem eine mögliche Beteiligung von Teichonsäuren an der Phagenadsorption an ihren Wirt.

Summary

The causative agent of listeriosis, a severe human disease, is *Listeria monocytogenes*. In immunosuppressed patients this illness may cause sepsis, meningitis or encephalitis. *Listeria monocytogenes* is mainly transmitted via contaminated foods. In order to protect consumers from an infection with *Listeria*, it is important to test a contamination in food products as well as food manufacturing equipment within a short time. Therefore the specific binding of *Listeria* phage to its host can be used as an alternative for antibodies.

Binding proteins of phages are on the one hand cell wall binding domains from endolysins (CBD). CBDs from *Listeria* phages have already been described and can be used for detection of *Listeria* spp.

On the other hand, phages use a binding molecule for host recognition. These receptor binding proteins (RBPs) specifically attach to a ligand on the host surface. Following the attachment, the phage can inject its genome into the host. RBPs of *Listeria* phages have not been described in literature at the beginning of this work. Therefore these molecules should be identified, characterized and applied for *Listeria* detection in comparison with the CBD of *Listeria* phage A511.

Within this doctoral thesis potential binding proteins of the following phages were obtained: A006, A118, A500, A511, B025, B054, P35 and PSA. Furthermore, an additional protein with a phage-like sequence was isolated from *Listeria welshimeri* (Lwe1237) and was shown to be a potential binding protein as well. Sequence analysis and correlation between binding range and phage host range gave evidence that the identified proteins of A006, A511, B025, B054, P35, PSA and of *Listeria welshimeri* are RBPs in phageviro. The binding proteins of phage A118 and A500 seems to show another function in phageviro, these proteins are believed to be lytic structural proteins.

Two of the RBPs (A006gp17 and Lwe1237) recognized all tested strains of the most important human pathogenic serovars 1/2a, 1/2b and 4b. Furthermore, they exhibited less unspecific binding and a better genus specificity than CBD511.

Compared to a RBP from an *E. coli* specific phage (Eco-O157), with good results in *E. coli* O157 detection in "enzyme-linked fluorescent assay", both RBPs offered the same affinities when applied as capture molecules. However, as detection molecules

they seem to be less sensitive than Eco-O157. In the present state, A006Gp17 and Lwe1237 are probably only suited as capture molecules for *Listeria* detection.

First characterization of both RBPs gave evidence that these proteins are homotrimeric molecules in their native state, as it was shown for many RBPs of bacteriophages from Gram-negative and -positive bacteria. Additionally, it was shown that the N-terminal region of A006gp17 is not critical for binding properties. Therefore this part is probably responsible for adsorption of the protein to the base plate of the phage, whereas the binding region is built from the C-terminal part. Furthermore, in this doctoral thesis it was confirmed that teichoic acids play a critical role in phage adsorption.

1 Einleitung

1.1 Der Genus *Listeria*

1.1.1 Taxonomie und generelle Eigenschaften

Der Genus *Listeria* gehört zur Ordnung der *Bacillales* und ist nah verwandt zu den Genera *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* und *Brochothrix*, die alle durch einen niedrigen GC-Gehalt von 36 – 42 mol % charakterisiert sind (Jones, 1988; Garrity, 2005; Rocourt und Buchrieser, 2007).

Die Taxonomie von *Listeria* innerhalb und ausserhalb des Genus war lange unklar und änderte sich über die Jahre häufig (Rocourt und Buchrieser, 2007). Heutzutage besteht der Genus *Listeria* aus 6 Spezies: *Listeria monocytogenes*, *innocua*, *ivanovii*, *seeligeri*, *welshimeri* und *grayi*, von denen *Listeria monocytogenes* die grösste Relevanz als human-pathogene Spezies aufweist (Farber und Peterkin, 1991; Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Der Genus teilt sich in zwei nah verwandte, aber dennoch unterschiedliche Gruppen. Zur einen gehört *Listeria grayi* und zur anderen *Listeria monocytogenes*, *innocua*, *ivanovii*, *seeligeri* und *welshimeri* (Rocourt und Buchrieser, 2007). Die *Listeria* Spezies können über die Fähigkeit zur Hämolyse (*Listeria monocytogenes* und *Listeria ivanovii*) und bezüglich der Verstoffwechslung bestimmter Zucker wie D-Xylose, L-Rhamnose, α -Methyl-D-Mannosid und Mannitol unterschieden werden (Rocourt und Buchrieser, 2007).



Abb. 1.1 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Listeria monocytogenes*.

Quelle: [http:// bioinfo. bact. wisc. edu/ themicrobialworld / Listeria. EMfla. jpg.](http://bioinfo.bact.wisc.edu/themicrobialworld/Listeria.EMfla.jpg)

Listeria ist fakultativ anaerob, meist Katalase positiv, Oxidase negativ und bildet keine Sporen oder Kapseln (Farber und Peterkin, 1991; Rocourt und Buchrieser, 2007; Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Listeria Zellen sind Gram-positive Stäbchen mit abgerundeten Enden von etwa 0,5 μm Breite und 1 – 2 μm Länge (Abb. 1.1). Ein weiteres Charakteristikum ist ihre

Beweglichkeit bei 20 – 25 °C durch peritriche Begeißelung. Bei 37 °C sind sie unbeweglich, da die Expression der Flagellen über 30 °C reprimiert wird (Peel *et al.*, 1988; Rocourt und Buchrieser, 2007).

Darüber hinaus sind diese Bakterien einfach kultivierbar, anspruchslos und robust. Sie sind in der Lage bei Temperaturen zwischen 1 und 45 °C, mit einem Optimum bei 30 – 37 °C zu wachsen. Ihre Kältetoleranz wurde von Gray *et al.* (1948) beschrieben. Diese Arbeitsgruppe nutzte den daraus entstehenden Wachstumsvorteil gegenüber anderen Bakterien erstmals zur selektiven Anreicherung. Ausserdem können *Listeria* Zellen bei einer Konzentration bis zu 10 % (w/v) Natriumchlorid überleben und sich innerhalb eines breiten pH-Spektrums (4,5 bis 9) mit einem Optimum bei pH 7 vermehren (Rocourt und Buchrieser, 2007).

Listeria kann demnach unter extremen Bedingungen überleben und kommt ubiquitär vor. Sie wurden bereits aus Boden- und Wasserproben, sowie aus verrottendem Pflanzenmaterial, Matsch, Abwasser und aus Ausscheidungen von Menschen und Tieren isoliert (Weis und Seeliger, 1975; Farber und Peterkin, 1991). Aus diesem Grund kommen sie auch in Rohmaterialien vor, die für die Lebensmittelproduktion verwendet werden.

1.1.2 Die Zellwand von *Listeria*

Die Gram-positiven *Listeria* Zellen sind mit einer dicken Peptidoglykanschicht umgeben (Schleifer und Kandler, 1972). Alternierende Einheiten zweier Disaccharide bilden die Glykanstränge, die über Peptidbrücken verbunden sind (Abb. 1.6, Seite 15).

Weitere Bestandteile der Zellwand sind Zellwandproteine, Lipoteichonsäuren und Teichonsäuren. Lipoteichonsäuren sind an der Zellmembran verankert, wogegen Teichonsäuren kovalent am Peptidoglykan gebunden sind (Wicken und Knox, 1975; Bierne und Cossart, 2007).

Die Teichonsäuren stellen den Grossteil der substituierten Kohlenhydrate der Zellwand dar. Aufgrund ihrer Phosphatgruppen ist die Oberfläche der *Listeria* Zellen negativ geladen. Ausserdem stellen sie Liganden für Bakteriophagen dar (Lambert *et al.*, 1975; Fiedler und Ruhland, 1987; Wendlinger *et al.*, 1996). Über ihre Zusammensetzung und ihre Zuckersubstituten werden auch die *Listeria* Serovare (Sv) definiert (Fiedler *et al.*, 1984; Fiedler und Ruhland, 1987).

Die Sv-Gruppen sind in der Regel nicht auf einzelne *Listeria* Spezies beschränkt (Donker-Voet, 1959; Seeliger, 1975). Es gibt 15 verschiedene somatische Antigene und fünf verschiedene flagellare Antigene (Tab. 1.1). Durch verschiedene Kombination der somatischen und der flagellaren Antigene werden die 16 Sv des Genus *Listeria* bestimmt. *Listeria grayi* ist dabei deutlich verschieden von den anderen Sv, denn es weist ein flagellares Antigen (E) auf, das kein anderer *Listeria* Sv zeigt.

Tab. 1.1 Zusammensetzung der somatischen (O) und flagellaren (H) Antigene der *Listeria* Serovare.

Nach Donker-Voet (1959) und Seeliger (1975). (): Antigen ist nicht immer auf der Zelloberfläche vorhanden.

Serovar	Antigene Faktoren														
	somatische „O“-Antigene										flagellare „H“-Antigene				
1/2a	I	II	(III)									A	B		
1/2b	I	II	(III)									A	B	C	
1/2c	I	II	(III)										B		D
3a		II	(III)	IV					(XII)	(XIII)		A	B		
3b		II	(III)	IV					(XII)	(XIII)		A	B	C	
3c		II	(III)	IV									B		D
4a			(III)		(V)		VII		IX			A	B	C	
4ab			(III)		V	VI	VII		IX	X		A	B	C	
4b			(III)		V	VI						A	B	C	
4c			(III)		V		VII					A	B	C	
4d			(III)		(V)	VI		VIII				A	B	C	
4e			(III)		V	VI		(VIII)	(IX)			A	B	C	
5			(III)		(V)	VI		(VIII)		X		A	B	C	
6a			(III)		V	(VI)	(VII)		(IX)		XV	A	B	C	
6b			(III)		(V)	(VI)	(VII)		IX	X	XI	A	B	C	
7			(III)								XII	XIII	A	B	C
<i>L. grayi</i>			(III)												E

Die antigene Zusammenstellung der unterschiedlichen Sv scheint einen Einfluss auf die Virulenz von *Listeria monocytogenes* zu haben. So wird die Mehrheit der Krankheitsfälle beim Menschen auf Stämme der Sv 1/2a, 1/2b und 4b zurückgeführt (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Es wurden jedoch in Finnland auch mehrere humane Infektionen in Verbindung mit *Listeria* des Sv 3a beobachtet (Lukinmaa *et al.*, 2003).

1.1.3 Pathogenität von *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes gilt als die einzige human-pathogene Spezies innerhalb des Genus *Listeria* (Farber und Peterkin, 1991; Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Listeriose, die Krankheit, die durch diesen Keim ausgelöst wird, wird hauptsächlich durch

kontaminierte Lebensmittel verursacht. Häufig mit *Listeria* kontaminierte Nahrungsmittel sind Weichkäse und andere Rohmilchprodukte, sowie rohes Fleisch, Fisch, Gemüse und Salat (Farber und Peterkin, 1991). Generell gehören Fertiggerichte, die vor Verzehr nicht mehr erhitzt werden, zu den Risiko-Lebensmitteln (Vazquez-Boland *et al.*, 2001).

Nach Eindringen der *Listeria* Zellen in den Darm binden sie an lymphoides Gewebe und induzieren ihre Endozytose. In der Zelle kann sich das Bakterium vermehren und die Nachbarzellen ohne Kontakt mit der extrazellulären Matrix infizieren. Über die Lymphknoten gelangen die *Listeria* Zellen in die Blutbahn und verbreiten sich systemisch. Sie infizieren zunächst Milz und Leber. Dort werden die Bakterien entweder vom Immunsystem dezimiert oder sie breiten sich weiter in Gehirn oder Placenta aus (Cossart und Toledo-Arana, 2008).

Im intrazellulären Infektionszyklus (Abb. 1.2) findet die Internalisierung des Bakteriums über Oberflächenproteine der Internalin Familie (InIA und InIB) statt. Diese Proteine sind an der spezifischen Anheftung und an der Induktion der Endozytose beteiligt. 30 min nach dem Eindringen in die Zelle wird die Membran der Vakuole mit Hilfe von Listeriolysin-O (LLO) und der Phospholipase A (PlcA) aufgelöst. LLO ist ein porenformendes Cytolysin, das durch den sauren pH-Wert der Vakuole aktiviert wird.

Im Cytoplasma kann sich das Bakterium vermehren, sich über das Aktin der Wirtszelle bewegen und sich von Zelle zu Zelle ausbreiten. Bei der Rekrutierung des Aktins ist das Protein ActA beteiligt. Durch das Eindringen in die Nachbarzelle wird eine Vakuole gebildet, die mit 2 Membranen umhüllt ist. Diese werden durch LLO und eine zweite Phospholipase, die Phospholipase B (PlcB), zerstört. Im Cytoplasma angelangt beginnt der intrazelluläre Infektionszyklus erneut (Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Cosart und Toledo-Arana, 2008).

Listeriose kann in zwei Formen vorkommen. Als eine nicht-invasive Magen-Darm-Infektion, die *Listeria monocytogenes* bei gesunden, immun-kompetenten Menschen hervorruft. Die Symptome sind leichtes Fieber, Erbrechen und Durchfall. Bei Immunkomprimierten, wie Neugeborenen, älteren Menschen und schwangeren Frauen (Farber und Peterkin, 1991), kann eine invasive Form der Infektion auftreten. Diese ist meist mit schwerwiegenden Symptomen wie Meningitis oder Enzephalitis oder mit weniger häufigen Symptomen wie Endokarditis, Myokarditis oder

Pneumonie verbunden. Diese invasive Infektion verläuft zu 20 bis 30 % tödlich. Somit ist Listeriose eine Infektion mit einer sehr hohen Sterberate im Vergleich zu anderen bakteriellen Infektionen (Farber und Peterkin, 1991; Schuchat *et al.*, 1991; Vazquez-Boland *et al.*, 2001). Daher und wegen der Fähigkeit von *Listeria* sich unter extremen Wachstumsbedingungen (pH, Salz), wie beispielsweise im Kühlschrank, vermehren zu können, stellt *Listeria monocytogenes* durchaus einen wichtigen Aspekt in der Lebensmittelindustrie und eine ernstzunehmende Bedrohung für die Konsumenten dar (Bille *et al.*, 2006).

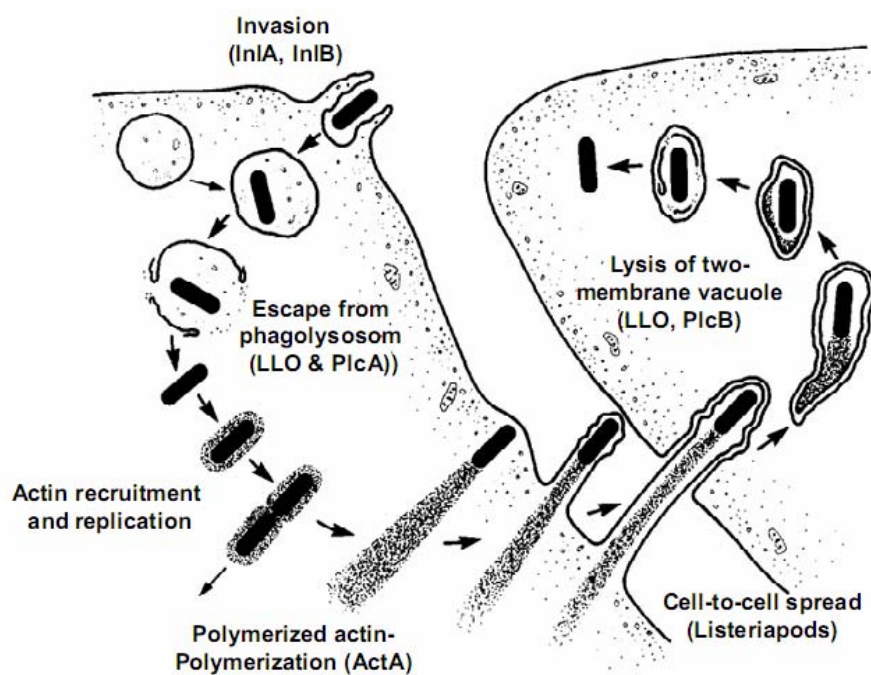


Abb. 1.2 Intrazellulärer Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes*.

(modifiziert von Tilney *et al.*, 1989)

1.1.4 Nachweis von *Listeria* in Lebensmitteln

Zur Prävention einer Listeriose Infektion müssen Lebensmittel und ihre Produktionsanlagen auf eine *Listeria* Kontamination hin kontrolliert werden. Das konventionelle Nachweisverfahren für *Listeria* ist die Methode gemäss ISO 11290-1. Diese beinhaltet eine zweistufige selektive Anreicherung der Keime in Lebensmittelproben, mit anschliessendem Ausstreichen auf Selektivagar. Nach einer Inkubation der Agarplatten auf 35 +/- 2 °C wird durch verschiedene biochemische Analysen die Identität von *Listeria*-ähnlichen Kolonien untersucht. Diese Methode ist

sehr sensitiv und spezifisch, jedoch durch die Anreicherungsschritte und die physiologische Charakterisierung sehr langwierig (Rees und Dodd, 2006).

Alternativ stehen Methoden zur Verfügung, die die Anreicherung im *Listeria* Nachweis verkürzen, indem eine effiziente Probenvorbereitung, wie z. B. die immunomagnetische Separation, eingeführt wird (Skjerve *et al.*, 1990; Fluit *et al.*, 1993). Andere Verfahren beschleunigen den Nachweis von *Listeria* durch einen Bakteriennachweis über z. B. immunologische Methoden (Mattingly *et al.*, 1988).

Für beide Ansätze werden Moleküle, die spezifisch mit *Listeria* wechselwirken, eingesetzt. Neben Antikörpern kann dabei auch die spezifische Bindung von Phagen an ihren Wirt genutzt werden.

1.2 Bakteriophagen

1.2.1 Definition, Morphologie und Taxonomie

Bakteriophagen oder einfach Phagen stellen eine Gruppe von Viren dar, die spezifisch Bakterien infizieren. Wie die meisten Viren haben auch sie eine sehr einfache Struktur. Im Wesentlichen bestehen sie aus DNA bzw. RNA, welche von einer Proteinhülle (Kapsid) umgeben ist (Ackermann, 2003). Insgesamt haben Phagen einen Grössenbereich zwischen 25 und 200 nm (Mayer, 2003). Sie wurden erstmals von Frederick Twort (1915) und unabhängig davon von Félix Hubert d'Hérelle (1917) beschrieben.

Schon bald nach ihrer Entdeckung erfolgten die ersten Bemühungen Bakteriophagen zu klassifizieren. Die heute noch verwendete Taxonomie beruht auf den Arbeiten von Bradley *et al.* (1965 und 1967). Er unterteilte die Bakteriophagen anhand ihres Erbmaterials (einzel- oder doppelsträngige RNA bzw. DNA) und ihrer Morphologie in sechs Hauptgruppen (Morphotypen A-F). Durch genauere Differenzierung und Eingliederungen neu entdeckter Phagen wurde das System von Bradley erweitert (Ackermann und Dubow, 1987). Zum jetzigen Zeitpunkt werden die Bakteriophagen in 14 Familien unterteilt (13 davon in Abb. 1.3 zu sehen, *Rudiviridae* nicht dargestellt).

Zur Ordnung der *Caudovirales*, den so genannten geschwänzten Phagen, lassen sich 96 % der bis heute bekannten Phagen zuordnen (Ackermann, 2003). Sie zeigen einen meist ikosaedrischen Kopf, in dem sich doppelsträngige DNA befindet, einen

Phagenschwanz und eine Basisplatte, an der die Schwanzfasern haften. Die Morphologie des Schwanzes ist für die Unterscheidung in *Myoviridae* (langer, kontraktile Schwanz; Abb. 1.3, 2), in *Podoviridae* (kurzer nicht-kontraktile Schwanz; Abb. 1.3, 3) und in *Siphoviridae* (langer, nicht-kontraktile Schwanz; Abb. 1.3, 1) ausschlaggebend (Kutter und Sulakvedize, 2005). *Siphoviridae* machen mit 61 % den grössten Anteil der geschwänzten Phagen aus. Neben den Phagen mit Kopf-Schwanz-Struktur gibt es schwanzlose und filamentöse Phagen, die mit einem Anteil von 4 % eine kleine Randgruppe darstellen (Ackermann, 2003).

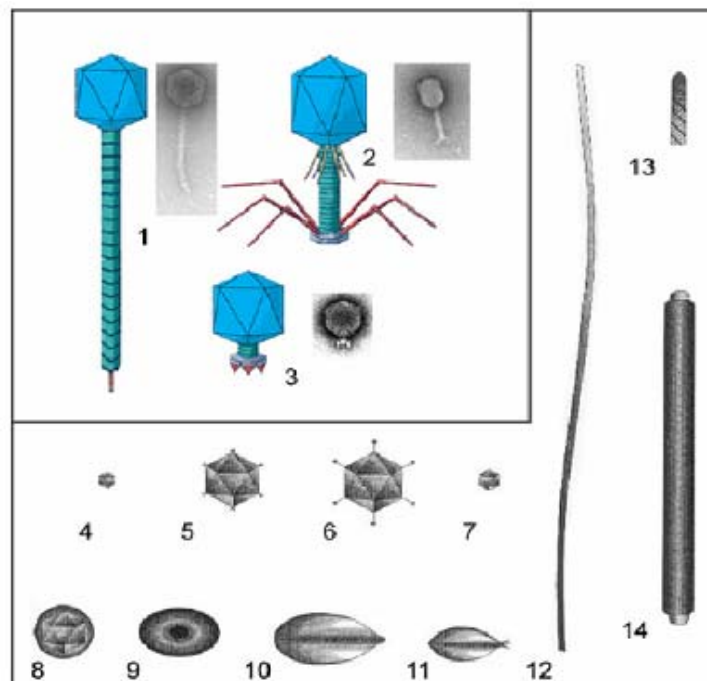


Abb. 1.3 Darstellung der Morphologietypen von Bakteriophagen.

(Abb. modifiziert nach van Regenmortel *et al.*, 2000). 1: *Siphoviridae*, 2: *Myoviridae*, 3: *Podoviridae*, 4: *Microviridae*, 5: *Corticiviridae*, 6: *Tectiviridae*, 7: *Leviviridae*, 8: *Cystoviridae*, 9: *Plasmaviridae*, 10: *SNDV-like*, 11: *Fuselloviridae*, 12: *Inoviridae* (*Inovirus*), 13: *Inoviridae* (*Plectovirus*), 14: *Lipothrixviridae*.

1.2.2 Phagenvermehrung

Phagen sind obligate intrazelluläre Parasiten, die, um sich vermehren und neue infektiöse Partikel bilden zu können, von der Stoffwechsellistung des Wirts abhängig sind (Klaus *et al.*, 1992). Bakteriophagen lassen sich in zwei unterschiedliche Typen unterteilen: virulenten Phagen, die sich ausschliesslich über den lytischen Zyklus vermehren, sowie temperenten Phagen, die zusätzlich in der Lage sind den lysogenen Zyklus auszuführen.

Der lytische Zyklus besteht aus vier Hauptschritten, die alle Bakteriophagen gemein haben. Die wirtsspezifische Adsorption, die Injektion des Phagengenoms, die Replikation und der Zusammenbau der Phagenpartikel, sowie die Freisetzung der Phagen.

Bei der Adsorption haften spezifische Rezeptor Bindeproteine (RBPs) der Phagen an Oberflächenstrukturen der Wirtsstämme. Dieser Prozess wird unter 1.2.3 noch genauer beschrieben. Nach der Anheftung wird das Phagengenom in die Wirtszelle injiziert, wobei das Kapsid ausserhalb der Zelle bleibt. Einmal in der Zelle ist der Phage durch seine „frühen“ Genprodukte in der Lage den Stoffwechsel des Wirts auf seine Bedürfnisse umzuprogrammieren. Dazu gehört auch die Inaktivierung von Proteasen und Restriktionsendonukleasen der Wirtszelle (Guttman *et al.*, 2005). Im Anschluss wird das Phagengenom repliziert und transkribiert und die Strukturproteine, die von den späten Genen kodiert werden, werden exprimiert. Der Aufbau des Kopfes erfolgt über ein so genanntes Prokapsid und wird von „Gerüst“-Proteinen unterstützt. Beim Aufbau des Phagen-Schwanzes ist das *tape measure* Proteine (TMP) involviert, das beim Phagen λ für die Determination der Schwanzlänge verantwortlich ist (Katsura, 1990). Nachdem die DNA in den Phagen-Kopf verpackt wurde, bildet sich der komplette Phagenpartikel. Die Freisetzung dieser Partikel erfolgt bei Phagen der Ordnung *Caudovirales* vorwiegend über ein zweistufiges System (Wang *et al.*, 2000; Young *et al.*, 2000). Dabei wird die Plasmamembran vermutlich zunächst vom Holin perforiert. Dadurch haben die Phagen-Endolysine Zugang zum Peptidoglykan. Die Endolysine spalten nach spezifischer Bindung das Peptidoglykan und zerstören somit die Zellwand, worüber neue Phagenpartikel aus der Zelle entlassen werden. Diese können dann eine neue Wirtszelle infizieren (Ackermann, 2003).

Im lysogenen Zyklus wird das Phagengenom nach der Injektion meist in das Chromosom der Wirtszelle als Prophage integriert. Manche Prophagen replizieren allerdings auch autonom in Form eines Plasmids (Klaus *et al.*, 1992). Im Prophagen-Zustand wird das Phagengenom mit der Wirtszelle repliziert und an die Nachkommen des Wirts weitergegeben.

Bakterien, die Prophagen aufweisen, sind häufig immun gegenüber einer erneuten Infektion mit ähnlichen Phagen (Homoimmunität), allerdings nicht gegenüber heterologen Phagen. Es ist daher möglich das Bakterien mehrere Prophagen aufweisen (Polylysogenie). Im Prophagen Status werden nur sehr wenige Gene

exprimiert. Diese Genprodukte hemmen den lytischen Infektionszyklus und können über die Interaktion mit neu injizierter Phagen-DNA Superinfektionen verhindern (Klaus *et al.*, 1992; Birge, 1994).

Obwohl der Prophagen-Status sehr stabil ist, ist er nicht beständig. Der Prophage kann unter verschiedenen Stressbedingungen für den Wirt aus dem lysogenen Zustand in den lytischen Zyklus wechseln, beispielsweise wenn der Wirt mit UV-Licht bzw. mit Mitomycin C behandelt wird (Loessner *et al.*, 1991a; Guttman *et al.*, 2005).

1.2.3 Wirtserkennung und Phagenadsorption



Abb. 1.4 T4 Phage nach der Adsorption an seinen Wirt *E. coli*.

(Abb. aus [http:// www.cosmosmagazine. com/ node / 1024](http://www.cosmosmagazine.com/node/1024))

Bei geschwänzten Phagen erfolgt die Adsorption an den Wirt über eine Wechselwirkung von Phagenproteinen der Basisplatte (Rezeptor Bindeprotein = RBP) mit Liganden auf der Zelloberfläche des Wirts. Bei manchen Phagen liegt ein solches Protein zentral als einzelnes Element vor, bei anderen liegen drei, vier, sechs oder zwölf davon in Clustern an der Basisplatte vor.

Die möglichen Liganden unterscheiden sich bei Gram-negativen bzw. Gram-positiven Bakterien aufgrund der unterschiedlichen Zelloberfläche. Bei Gram-negativen Bakterien können die Phagen an das Lipopolysaccharid (LPS) und an Proteine der äußeren Membran binden. Bei Gram-positiven Bakterien stellen Peptidoglykan, (Lipo)Teichonsäuren und Oberflächenproteine mögliche Ligandenstrukturen dar (Kutter und Sulkavelidze, 2005).

1.2.3.1 Wirtserkennung bei Phagen Gram-negativer Bakterien

Die Wirtserkennung und damit die RBPs sind vor allem für Phagen Gram-negativer Bakterien der Ordnung *Caudovirales* im Detail untersucht worden.

Darunter ist die Phagenanheftung der Familie *Myoviridae* am Beispiel des T4 Phagen im Detail bekannt (Miller *et al.*, 2003; Mesyanzhinov *et al.*, 2004). Bei diesem Phagen gibt es zwei RBPs die *long tail fibre* und die *short tail fibre* Proteine. Sechs *long tail fibre* Einheiten vermitteln über eine reversible Bindung an LPS die Wirtserkennung. Über eine Wechselwirkung von drei dieser Fasern wird eine Konformationsänderung der Basisplatte eingeleitet. Dadurch werden die sechs homotrimeren *short tail fibre* Proteine zugänglich, über die T4 quasi irreversibel an den Kern des LPS bindet. Die *long tail fibre* bestehen aus vier aneinander gereihten Proteinen, von denen drei in homotrimerer Form vorliegen. Unter anderem auch das Gp37 Protein, welches an der Spitze der Faser sitzt und die Wirtsspezifität vermittelt. Auch die Schwanz- und Basisplattenstruktur von P22, der zu den Podoviridae einer weiteren Familie der geschwänzten Bakteriophagen gehört, ist im Detail untersucht (Tang *et al.*, 2005). An dessen Basisplatte befinden sich sechs *tailspike* Proteine um einen ringförmigen Kern. Mit Hilfe dieser homotrimeren Proteine (Gp9) bindet und hydrolysiert dieser Phage sukzessive das LPS von *Salmonella* (Baxa *et al.*, 1996). Auf diese reversible Bindung, die die Wirtsspezifität vermittelt, folgt vermutlich wie bei T4 ein zweites Bindeereignis (Prevelige, 2006).

Der Phage λ , ein Vertreter der Siphoviridae weist ebenfalls zwei *tail fibre* Arten auf (Hendrix und Casjens, 2006). Zum einen das *side tail fibre* Protein, das in homotrimerer Form eine der insgesamt vier Basisplatten Fasern bildet. Diese *tail fibre* vermitteln vermutlich wie die Fasern des T4 Phagen die spezifische Wirtserkennung. Zum anderen ein *short tail fibre*, der im Zentrum der Basisplatte sitzt und an LamB Proteine der äusseren Membran bindet (Heller *et al.*, 1992).

1.2.3.2 Wirtserkennung bei Phagen Gram-positiver Bakterien

Über die Anheftung und die RBPs von Phagen Gram-positiver Bakterien ist bisher wenig bekannt.

Das erste Protein, das die Wirtsspezifität eines Phagen gegen Gram-positive Bakterien vermittelt, wurde bei dem *Streptococcus thermophilus* Phagen DT1 und sechs nah verwandter Phagen beschrieben (Duplessis und Moineau, 2001). Durch Untersuchungen von chimären Phagen, bei denen das RBP eines Phagen durch ein

homologes Protein eines zweiten Phagen mit unterschiedlicher Wirtsspezifität ausgetauscht wurde, zeigte sich, dass dieses Protein für die Wirtsspezifität verantwortlich ist.

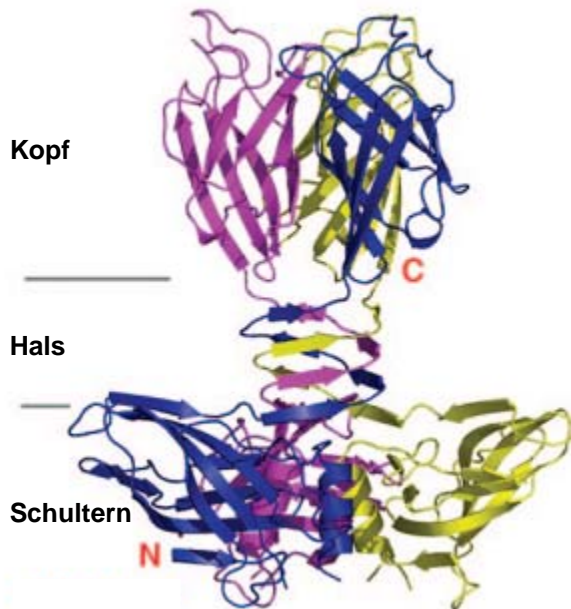


Abb.1.5 RBP des Lactococcus Phagen P2.

(Abb. aus Spinelli *et al.*, 2006b)

Über ähnliche Versuche entdeckten Stuer-Lauridsen *et al.* (2003) kurz darauf die Proteine von vier Phagen gegen *Lactococcus lactis* (*Siphoviridae*, c2-Spezies), die die Wirtsspezifität vermitteln. Auf die reversible Bindung dieser Proteine an Kohlenhydrate der Zellwand folgt die Wechselwirkung eines zweiten Phagenproteins mit dem PIP-Protein der Zelloberfläche (Geller *et al.*, 1993; Monteville *et al.*, 1994). Es könnte also auch bei Phagen Gram-positiver Bakterien eine Zwei-Schritt-Adsorption ablaufen. In den folgenden Jahren wurden die RBPs mehrerer anderer *Lactococcus lactis* Phagen beschrieben (Dupont *et al.*, 2004; Vegge *et al.*, 2006). Von einigen dieser Proteine wurde die Kristallstruktur bestimmt (Spinelli *et al.*, 2006a; Spinelli *et al.*, 2006b; Ricagno *et al.*, 2006). Es handelt sich um homotrimere Proteine, die einen modularen Aufbau, bestehend aus Schultern, Hals und Kopf, zeigen (Abb. 1.5). Die Schultern (N-terminal) verankern das Protein in der Basisplatte und der Kopf (C-terminal) vermittelt die spezifische Wechselwirkung mit dem Wirt. Beide Domänen werden durch den Hals miteinander verbunden. Vor kurzem wurde darüber hinaus die komplette Struktur der Basisplatte eines dieser *Lactococcus lactis* Phagen aufgeklärt (Sciara *et al.*, 2008).

Darüber hinaus entdeckten Schuch und Fischetti (2006) eine Determinante der *Bacillus* Phagen W bzw. γ , die an die Wirtsoberfläche bindet.

1.3 *Listeria* Phagen

1.3.1 Generelle Eigenschaften von *Listeria* Phagen

Der erste *Listeria* Phage wurde im Jahre 1945 von Schultz beschrieben. Bis heute sind über 400 Phagen gegen *Listeria monocytogenes*, *ivanovii*, *innocua*, *seeligeri* und *welshimeri* gefunden und beschrieben worden, jedoch keiner gegen *Listeria grayi*. 120 Vertreter dieser Phagen wurden mittels Elektronenmikroskopie untersucht, wobei nur Phagen mit zwei unterschiedlichen Morphotypen entdeckt wurden. Die Mehrheit zeigt ein isometrisches Kapsid sowie einen langen, nicht kontraktilen Schwanz und gehört damit zur Familie der *Siphoviridae*. Wenige der untersuchten Phagen zeichnen sich durch einen kontraktilen Schwanz aus und gehören damit zur Familie der *Myoviridae* (Loessner und Calendar, 2006).

Das Genom (doppelsträngige DNA) der bisher bekannten *Listeria* Phagen ist zwischen 36 und 135 kb gross und weist einen GC-Gehalt von 35 bis 41 mol % auf (Loessner, 2000; Zimmer *et al.*, 2003; Klumpp *et al.*, 2008; Dorscht *et al.*, 2009). Die Phagen sind strikt Genuspezifisch, die Wirtsspektren innerhalb der Spezies und Sv können allerdings variabel sein (Loessner und Calendar, 2006). Nahezu alle *Listeria* Phagen sind temperent (Loessner und Rees, 2005). Durch die Sequenzierung ganzer Genome von einem *Listeria innocua* Stamm und vier *Listeria monocytogenes* Stämmen ist bekannt, dass Prophagen und kryptische *Listeria* Phagen bis zu 7,6 % des bakteriellen Genoms ausmachen (Glaser *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2004).

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit sind *Listeria* Phagen, deren Genomsequenz bekannt ist. Diese sind in Abb. 1.2 mit ihren wichtigsten Merkmalen aufgeführt.

Tab. 1.2 Für diese Arbeit relevante *Listeria* Phagen mit ihren wichtigsten Merkmalen.

1: Referenzen mit den Sequenzdaten der jeweiligen Phagen, () : Der Phage lysiert nicht alle Stämme dieses Serovars.

Phage	A006	A118	A500	A511	B025	B054	P35	PSA
Familie	<i>Siphoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Myoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>	<i>Siphoviridae</i>
Lebenszyklus	temperant	temperant	temperant	virulent	temperant	temperant	virulent	temperant
Kapsid Durchmesser	62 nm	61 nm	62 nm	80 nm	63 nm	64 nm	58 nm	61 nm
Schwanzlänge	280 nm	300 nm	274 nm	180 nm	252 nm	244 nm	110 nm	180 nm
Genomgröße	38,1 kb	40,8 kb	38,9 kb	134,5 kb	42,7 kb	42,7 kb	35,8 kb	37,6 kb
GC-Gehalt	35,5 mol %	36,1 mol %	36,7 mol %	36,1 mol %	35,1 mol %	36,2 mol %	40,8 mol %	34,8 mol %
Wirtsspektrum (sv)	1/2	1/2	4	(1/2), 4, 5, 6	5, 6	5, 6	(1/2)	4b
Referenz: ¹	Dorscht <i>et al.</i> , 2009	Loessner, 2000	Dorscht <i>et al.</i> , 2009	Klump <i>et al.</i> , 2008	Dorscht <i>et al.</i> , 2009	Dorscht <i>et al.</i> , 2009	Dorscht <i>et al.</i> , 2009	Zimmer <i>et al.</i> , 2003

1.3.2 Anwendungen von *Listeria* Phagen

Phagen und ihre Bestandteile können auch für zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten wie beispielsweise zur Zerstörung oder zum Nachweis des Wirts eingesetzt werden. Einige interessante Beispiele werden im Folgenden aufgeführt.

Die erste Anwendung von *Listeria* Phagen war das so genannte *phage typing* (Audurier *et al.*, 1979). Dabei wird der Genus *Listeria* mit Hilfe der Lysespektren verschiedener Phagen in Phagovaren unterteilt. Frühere Systeme zeigten eine maximale Typisierbarkeit der untersuchten Stämme von 70 %. Durch die Entdeckung neuer Phagen und die Weiterentwicklung dieser Methode durch Loessner und Busse (1990) konnten 90 % aller untersuchten Stämme typisiert werden. Bei ihren Untersuchungen wurden Stämme der Sv-Gruppe 3 häufig als nicht typisierbar beschrieben, wogegen Stämme der Sv-Gruppe 4 eine hohe Sensitivität gegenüber vielen Phagen aufweisen (Loessner und Calendar, 2006).

Für den Nachweis von lebenden Zellen sind *Listeria* Phagen besonders wegen ihrer strikten Genuspezifität geeignet (Loessner und Calendar, 2006). So konnten durch den Einsatz eines Reporter Phagen, A511::luxAB, *Listeria* Kontaminationen in Lebensmittelproben durch die Messung der Biolumineszenz nachgewiesen werden (Loessner *et al.*, 1996).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für Phagen ist deren Einsatz als Bio-Desinfektionsmittel (Roy *et al.*, 1993). Es wurden verschiedene, kontaminierte Lebensmittelproben mit den lytischen *Listeria* Phagen A511 und P100 behandelt und eine Reduktion der *Listeria* Zellen bis zu 5 Logs beobachtet (Guenther *et al.*, 2009). Bei Fütterungsstudien mit Ratten wurde kein Hinweis auf eine Toxizität dieser Phagen in Lebensmitteln erhalten (Carlton *et al.*, 2005).

Listeria Phagen Endolysine zeigen nach rekombinanter Expression in *E. coli* eine hohe lytische Aktivität bei externer Zugabe, obwohl der Phage diese Proteine zur Spaltung des Peptidoglykans von der Innenseite nutzt. Nach Zugabe von geringen Mengen Endolysins zu einer trüben *Listeria* Lösung klärt sich die Lösung innerhalb von Sekunden auf (Loessner und Calendar, 2006). Diese Eigenschaft wird zum Beispiel zum Aufbrechen von *Listeria* Zellen zur Reinigung von genomischer DNA verwendet (Loessner *et al.*, 1995). Des Weiteren wurden diese Enzyme (Endolysin A511) bereits zur biologischen Kontrolle von *Listeria* in Milchprodukten über rekombinante Expression in *Lactococcus lactis* Stämmen mit nachfolgender Sekretion verwendet (Gaeng *et al.*, 2000).

1.3.3 Bindeproteine von *Listeria* Phagen

Listeria Phagen weisen zwei Typen von Bindeproteinen auf: die RBPs zur Anheftung des Phagen an den Wirt und die Zellbindedomäne der Endolysine, die zur Freisetzung von neu gebildeten Phagenpartikeln am Ende des lytischen Infektionszyklus benötigt werden.

1.3.3.3 Zellbindedomäne der Endolysine von Bakteriophagen

Die Endolysine von verschiedenen *Listeria* Phagen sind bereits in der Literatur beschrieben und charakterisiert (Loessner, 2005; Loessner und Calendar, 2006). Die Endolysine von A118 und A500 sind L-Alanoyl-D-Glutamat Endopeptidasen, wogegen die der Phagen A511 und PSA N-Acetylmuramoyl-L-Alanin Amidase darstellen (Abb. 1.6). Die meisten Endolysine weisen N-terminal die katalytische Domäne auf, die mit einer C-terminalen Zellbindedomäne (CBD) über eine Linker-Region verbunden ist (Korndörfer *et al.*, 2006; Korndörfer *et al.*, 2008).

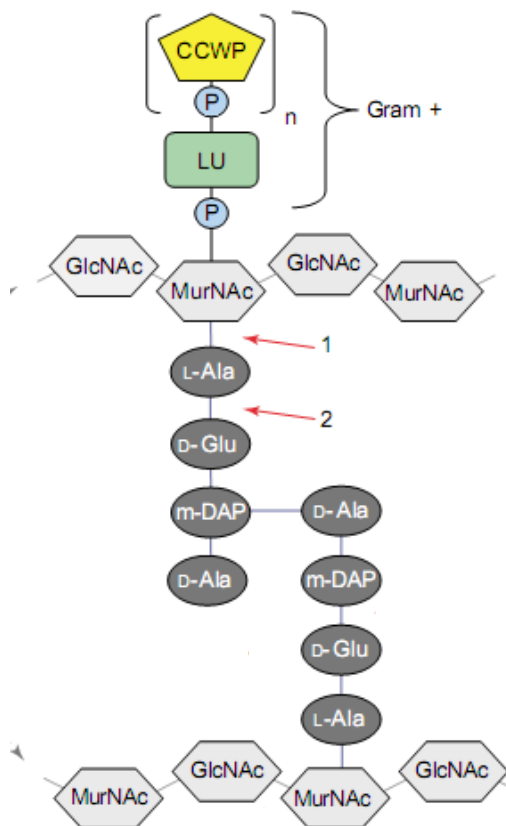


Abb. 1.6 Interpeptidbrücke des Peptidoglykans von *Listeria* (Typ A1).

Die Interpeptidbrücke besteht aus Meso-Diaminopimelinsäure (m-DAP) das direkt mit dem D-Alanin (D-Ala) verbunden ist. Die Tetrapeptide der Brücke werden direkt von Endolysinen attackiert. 1. N-Acetylmuramoyl-L-Alanine Amidase, 2. eine L-Alanoyl-D-Glutamate Endopeptidase. CCWP: Kohlenhydrat Zellwandpolymer, D-Glu: D-Glucose, GlcNAc: N-Acetylglucosamin, L-Ala: L-Alanin, LU: Linker-Einheit, MurNAc: N-Acetylmuraminsäure, P: Phosphatgruppe. (Abb. abgewandelt aus Loessner, 2005)

Über die CBDs eröffnen sich interessante Möglichkeiten zum spezifischen Nachweis von *Listeria*. Dieser kann zum einen über eine Fluoreszenzmarkierung dieser Domäne erfolgen (Loessner *et al.*, 2002). Zum anderen können die CBDs auf Festkörper wie magnetische Partikel immobilisiert werden. Über diese Anwendung konnten mit den CBD der Endolysine der Phagen A118 und A500 *Listeria* Zellen effizienter aus kontaminierten Lebensmitteln angereichert werden, als dies mit Antikörpern der Fall ist (Kretzer *et al.*, 2007).

1.3.3.4 Rezeptor Bindeproteine der Phagen

Über die Determinanten der *Listeria* Phagen, die die Adsorption vermitteln, war zu Beginn dieser Arbeit noch nichts bekannt. Kürzlich wurde jedoch von einer Doktorandin unserer Arbeitsgruppe ein hypothetisches Modell der Basisplatte des Phagen A118 beschrieben (Abb. 1.7; Biemann, 2009). In dieser Arbeit konnte über GFP-Fusion und spezifische Kollokalisierung an *Listeria* Zellen das RBP dem Gp20 zugeordnet werden. Des Weiterem wurde das Gp19 über Zymogramm Analysen mit denaturierten Phagenstrukturproteinen als lytisches Strukturprotein (LSP) identifiziert.

Untersuchungen zu den Phagen Liganden auf der Wirtsoberfläche wurden für einige *Listeria* Phagen durchgeführt (Wendlinger *et al.*, 1996). Dabei wurde festgestellt, dass bei dem Phagen A118 die Teichonsäuresubstituenten N-Acetylglucosamin und Rhamnose bei der spezifischen Bindung an die Sv-Gruppe 1/2 eine Rolle spielt. Bei dem Phagen A500 wird die Wechselwirkung mit Stämmen der Sv-Gruppe 4 über N-Acetylglucosamin vermittelt. Der Phage A511 erkennt dagegen Wirte unabhängig von Spezies und Sv. Dementsprechend wurde eine Bindung am Peptidoglykan beobachtet, die wahrscheinlich zusätzliche Sv-unabhängige Kohlenhydratbestandteile benötigt.

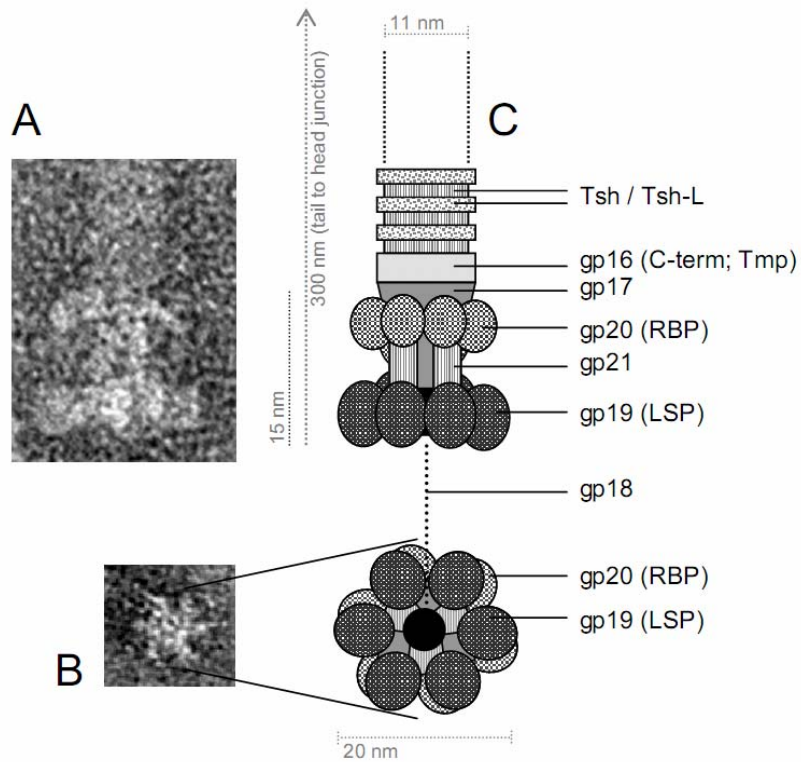


Abb. 1.7 Transmissions-Elektronen Mikroskop Aufnahmen mit hypothetischer Protein Architektur der Schwanzspitze von A118.

Transmissions-Elektronen Mikroskop Aufnahmen der Schwanzspitze (A) in Seitenansicht und (B) Untenansicht. (C) Angenommenes Modell der Schwanzspitze. (Abb. aus Biemann, 2009)

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Bindeproteine von verschiedenen *Listeria* Phagen zu identifizieren. Diese sollen im Anschluss bezüglich ihrer Eignung zum Nachweis von *Listeria* hin charakterisiert werden.

Dafür sollen zunächst potentielle RBP-Gene im Genom von *Listeria* Phagen identifiziert werden. Diese sollen im Anschluss rekombinant in *E. coli* exprimiert und die Proteine über Affinitätschromatographie gereinigt werden. Durch verschiedene Bindeversuche soll eine Wechselwirkung mit lebenden *Listeria* Zellen gezeigt werden. Die so identifizierten Bindeproteine sollen ausserdem bezüglich ihres Bindespektrums ausserhalb und innerhalb des Genus *Listeria*, ihrer Struktur, ihrer Rezeptor bindenden Region, ihrer Thermostabilität und ihres Liganden auf der *Listeria* Oberfläche untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle nicht eigens in der Tab. 2.1 aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) oder Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) verwendet und hatten den Reinheitsgrad p.a. Für molekularbiologische Arbeiten wurden die Enzyme von der New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland) und die benötigten Kits von der Firma Qiagen AG (Hilden, Deutschland) bezogen.

Tab. 2.1 Bezugsquelle der in dieser Arbeit verwendeten Feinchemikalien, Enzyme, Längenstandards und magnetischen Partikeln.

Chemikalien	Bezeichnung	Bezugsquelle
Agarosen	Agarose ultra pure	Peqlab GmbH (Erlangen, Deutschland)
Antibiotika	Ampicillin, Kanamycin	Applichem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
DNA-Polymerase	Phusion DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)
Größen/Längenstandards	GeneRuler 1kb DNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland)
	Protein MW Marker	
	Protein Prestained MW Marker	
IPTG		Gerbu GmbH (Gailberg, Deutschland)
Konjugate	<i>Strep</i> -Tactin HRP Konjugat	IBA GmbH (Göttingen, Deutschland)
	<i>Strep</i> -Tactin AP Konjugat	
Magnetische Partikel (MP)	MC-Beads	MicroCoat GmbH (Bernried, Deutschland)
Zusatz zu Proteinlösungen	Prionex	Fluka Chemie AG (Basel, Schweiz)

2.1.2 Medien

In dieser Arbeit wurden die unten aufgeführten Medien verwendet. Für Trockennährböden in Petrischalen wurden die Medien mit 15 g/l Agar versetzt.

Tab. 2.2 Bezugsquelle der Nährmedien und des Agars.

Nährmedium oder Nähragar	Bezugsquelle oder Literaturangabe
Medienbestandteile	
Bacto Agar	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Bacto Hefeextrakt	
Bacto Peptone	
Bacto Trypton	
Nährmedien für Bakterien	
BHI (Brain heartd infusion broth)	Oxoid Deutschland GmbH (Wesel, Deutschland)
LB	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
MRS (deMan Rogosa Sharpe)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
TB (Tryptose Medium)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Selektive Nährmedien für <i>Listeria</i>	
LX	bioMérieux SA (Lyon, Frankreich)
Selektiver Nähragar für <i>Listeria</i>	
Oxford base	BioLab Inc (Budapest, Ungarn)

2.1.3 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit Millipore Wasser angesetzt und vor Verwendung steril filtriert oder autoklaviert.

Tab. 2.3 Häufig in dieser Arbeit verwendete Lösungen und Puffer.

Pufferbezeichnung	Zusammensetzung
ABTS-Substratlösung	0,1 M Citronensäure, 0,2 M Di-Natriumphosphat, 0,005 % (v/v) Wasserstoffperoxid, 0,1 % (w/v) 2,2 Azino-bis(3-ethyl)benzthiazolin 6-Sulfonsäure, pH 5
Dialysepuffer	20 mM Tris-HCl, 50 mM Natriumchlorid, 2 mM EDTA, pH 8
ELISA-Waschpuffer	10 mM Tris-HCl, 300 mM Natriumchlorid, 0,1 % (v/v) Tween-20, pH 7,6
Fairbanks Lösung A	25 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Comassie Blue R
Fairbanks Lösung D	10 % (v/v) Essigsäure
PBS	10 mM Natriumphosphat, 150 mM Natriumchlorid, pH 8
PBST	10 mM Natriumphosphat, 150 mM Natriumchlorid, 0,1 % (v/v) Tween-20, pH 8
pNPP-Substratlösung	0,1 M Diethanolamin, 0,15 M Natriumchlorid, 0,5 mM Magnesiumchlorid, 15 mM p-Nitrophenyl Phosphate, pH 9,8
Proteinverdünnungspuffer	10 mM Tris-HCl, 300 mM Natriumchlorid, 0,1 % (v/v) Tween-20, 1 % (v/v) Prionex, pH 7,6
SDS-Probenpuffer	50 mM Tris-HCl, 1,5 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) Glycerin, 2,5 % (v/v) Mercaptoethanol, 5 g/l Bromphenolblau

2.1.4 Oligonukleotide

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungsarbeiten wurden die Oligodesoxynukleotide mit den entsprechenden Schnittstellen von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) bezogen und hatten den Reinheitsgrad HPLC.

Tab. 2.4 Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Klonierungsprimer. Unterstrichen sind die benutzten Restriktionsschnittstellen (ggatcc: BamHI, gtcgac: Sall, ctgcag: PstI).

Name	Sequenz
A006gp16_f	5'- <u>ccagggatcc</u> catatgagcttaggattcac-3'
A006gp16_r	5'-taggtcgacctcgagtaaaaaagttcttggcc-3'
A006gp17_f	5'-ttagtggatccactagtgctagcatggtattgatattagatg-3'
A006gp17_r/ A006gp17-syn_r	5'-ctatcagcctgcaggt <u>ctgac</u> ttaatctaaaacataaaaataattg-3'
A006gp17-syn_V1_f	5'-tgcttagggatcccatatggattcattggtattcAAAattattgaag-3'
A006gp17-syn_V2_f	5'-tgcttagggatcccatatggatttgaataatgtaattgtaacagatc-3'
A006gp17-syn_V3_f	5'-tgcttagggatcccatatgggggagttgcaaatttggagttctcag-3'
A006gp17-syn_V4_f	5'-tgcttagggatcccatatggtaaatgaaaatataacaaatgccccag-3'
A006gp17-sv3_f	5'-ttagtggatccactagtgctagcatggtattgatattagatg-3'
A006gp17-sv3_r	5'-ctatcagcctgcaggt <u>ctgac</u> ttaatctaaaatataaaaataattg-3'
A118gp19_f	5'-gctcatcggatccactagtcatatggttaaatcttgataaatgg-3'
A118gp19_r	5'-tggtgctgcaggtcgacttagaatatctgacctcc-3'
A118gp20_f	5'-cctctcgacggatccactagtcatatgacaaatcaaactctttaaactc-3'
A118gp20_r	5'-gtaaactgcaggtcgacctaatgccaacttcgtataatatcg-3'
A500gp19_f	5'-gccagggatcccatatggatttaaaaaaatggcaag-3'
A500gp19_r	5'-taggtcgacgagctctcatggttctaaccactc-3'
A500gp20_f	5'-agccagggatcccatatgactgaaaacggtatttc-3'
A500gp20_r	5'-tag gtcgacgagctctcatggtgtcacctct-3'
A511gp98_f	5'-gcagggatcccatatgactacagttaaaagaatgc-3'
A511gp98_r	5'-taggtcgacgagctctaaaacaaaacgtattacatgtcc-3'
A511gp99_f	5'-gcagggatccatgagtgatgtagaatcagg-3'
A511gp99_r	5'-tagcagctcgagctctcagctattttctaagcag-3'
A511gp104_f	5'-cgactgaactgggatcccatatgcccAAacttttAAAAatatac-3'
A511gp104_r	5'-tagtactgcaggtcgacttatggaaacatcgtttctttaatgc-3'
A511gp106_f	5'-cgtacgagggatcccatatggcagatttcaatttttag-3'
A511gp106_r	5'-ctcgtactgcaggtcgacctattcatctttcattaaac-3'
A511gp108_f	5'-tgcttagggatcccatatgtctagatacgaccatag-3'
A511gp108_r/ B025gpgp18_f	5'-agtagccctgcaggtcgacttatttaaataatgaaatgtc-3'
B025gpgp18_r	5'-taggtcgacgagctctaatagcgggtatttcttgaattg-3'
B025gpgp19_f	5'-gccagggatcccatatgacaataaaaaagattgg-3'
B025gpgp19_r	5'-taggagctcgtcgacctaaaaaattgctactgttc-3'
B054gp25_f	5'-tgcttagggatcccatatgtccggttaaagatttttagggaaatta-3'
B054gp25_r	5'-ataacctgcaggtcgac ttaaattggtaacttaaagt-3'
B054gp26_f	5'-tgcttagggatcccatatggccattgattcatatattccaacaaca-3'
B054gp26_r	5'-ataacctgcaggtcgac tcacactcctaaaatatac-3'
Lwe1237_f	5'-tgcttagggatcccatatgagtgctttaagaaaaataaatgc-3'
Lwe1237_r	5'-agtagccctgcaggtcgacttaattctatatctaataaaatttc-3'
P100gp39_f	5'-tgcttagggatcccatatgaggtcagtagtcgaagt-3'
P35gp16_f	5'-tgcttagggatcccatatggctaataattcaaaaaag-3'
P35gp16_r	5'-agtagccctgcaggtcgactcactccaatttttcgc-3'
P35gp17_f	5'-tgcttagggatcccatatgggagtttttaggcgcaaacg-3'
P35gp17_r	5'-agtagccctgcaggtcgactcaggtaggatagaaatag-3'

Fortsetzung von Tab. 2.4

Name	Sequenz
PSAgp14_f	5'-ctgcctgctggatcccatatgataccaattttatatgagtc-3'
PSAgp14_r	5'-ataacctgcaggtcgactcatttactcacctcgtttac-3'
PSAgp15_f	5'-ctcagggatccgctagcatgactgctttaagaaaaataaacg-3'
PSAgp15_r	5'-aacttgctgcaggtcgactcatgttgtcacctcttttag-3'

2.1.5 Vektoren

Tab. 2.5 In dieser Arbeit bei Klonierungsarbeiten verwendete Vektoren.

His-Tag: 6 Codons für Histidin (Qiagen AG, Hilden, Deutschland), *Strep*-Tag-II (Voss und Skerra, 1997), Js-Tag: aus der α -Untereinheit der *Klebsiella pneumoniae* Oxalacetatdecarboxylase (Patent: WO/2008/077397).

Bezeichnung:	Quelle:	Beschreibung:
pET21a-NsHis	Dr. Michael Schütz (Profos AG)	Amp, Expressionsvektor mit Codons für den <i>Strep</i> -Tag-II und für den His-Tag zur 5'-Fusion an das jeweilige Gen (N-terminaler Proteintag), Sequenz siehe Appendix III
pQE30	Qiagen AG (Hilden, Deutschland)	Amp, Expressionsvektor mit Codons für den His-Tag zur 5'-Fusion an das jeweilige Gen (N-terminaler Proteintag)
pQE30-HisJs	(diese Arbeit)	Amp, Expressionsvektor mit Codons für den His-Tag und für den Js-Tag zur 5'-Fusion an das jeweilige Gen (N-terminaler Proteintag), Sequenz siehe Appendix III
pQE30-Js	Dr. Michael Schütz (Profos AG)	Amp, Expressionsvektor mit Codons für den Js-Tag zur 5'-Fusion an das jeweilige Gen (N-terminaler Proteintag), Sequenz siehe Appendix III
pSTBlue-1	Novagen Inc (Madison, USA)	Amp, Klonierungsvektor mit Blau/Weiß Screening

2.1.6 Geräte

Tab. 2.6 Bezugsquellen der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Bezugsquelle
Agarosegelelektrophoresekammern	PerfectBlue Gelsystem Mini	PeqLab GmbH (Erlangen, Deutschland)
	PerfectBlue Gelsystem Midi	
	PerfectBlue Gelsystem Maxi	
Chromatographieanlage	ÄKTApurifier	Amersham Biosciences GmbH (Freiburg, Deutschland)
Elektroblotter	PerfectBlue „Semi-dry“ Elektroblotter	PeqLab GmbH (Erlangen, Deutschland)
ELISA-Messgeräte	Sunrise Remote	Tecan GmbH (Männedorf, Schweiz)
Hochdruckhomogenisator	Microfluidizer M110L	Microfluidics Corp. (Newton MA, USA)

Fortsetzung von Tab. 2.6

Magnetseparator	DynaMag™-2	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
SDS-Gelapparatur	Mighty Small E250/260	Invitrogen GmbH (Carlsbad, USA)
Spektrometer	CD-Spektrometer J815CD UV/VIS-Spektrometer V550	Jasco GmbH (Tokyo, Japan)
Thermocycler	G-Storm GS1	Gene Technologies Corp (Somerville, USA)
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Thermostat	Peltier Thermostat PT31	Krüss Optronic GmbH (Hamburg, Deutschland)
Überkopffrolator	Rotator Drive STR4	Stuart Scientific Co. Ltd (Redhill, England)
Ultra Turax	IKA T18 basic	IKA Labortechnik AG (Staufen, Deutschland)
Ultraschall Homogenisator	HD 2070	Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)
Vortexer	Genie 2 G560-E	Scientific Industries Inc (Bohemia, USA)
Waagen	Analysenwaage Kern 770	Kern (Balingen, Deutschland)
Zentrifugen	Multifuge 3 S-R	Heraeus Kendro (Hanau, Deutschland)
	Standzentrifuge RC5C (Rotor SS34, SLA1500 und SLC4000)	Kendro Sorval (Hanau, Deutschland)
	Heraeus Kendro (Hanau, Deutschland)	Tischzentrifuge Biofuge Fresco

2.1.7 Sonstige Materialien

Tab. 2.7 Sonstige in dieser Arbeit verwendete Materialien.

Material	Bezeichnung	Bezugsquelle
Mikrotiterplatten	Streptavidin C1-Beschichtung	Microcoat GmbH (Bernried, Deutschland)
	Deepwell-Platten	Cornig Inc (Corning, USA)
	Immuno™ Plates, MaxiSorp U96	Nunc GmbH & Co. KG, (Langenselbold, Deutschland)
Chromatographiesäule	HiLoad Superdex 200 prep grade 16/60,	GE Medical Systems Deutschland GmbH & Co. KG (München, Deutschland)
Quarzglasküvetten	Halbmikro und Mikro	Helma GmbH (Müllheim, Deutschland)
Polyvinylidendifluorid Membran	Hybond-P PVDF Membran	GE Medical Systems Deutschland GmbH & Co. KG (München, Deutschland)
Kunststoff Säule mit Filter	Empty Disposable PD-10 Columns	GE Medical Systems Deutschland GmbH & Co. KG (München, Deutschland)
semipermeable Membran mit Poren definierter Grösse	Spectra Por Membran 8 – 10 kD	Carl Roth GmbH und Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Zentrifugalkonzentratoren	Vivaspin 20, VS2032, Membran 50 kDa	Sartorius Stedim Biotech SA (Aubagne Cedex, Frankreich)
Spritzenvorsatzfilter	PES-Membran, 25 mm, 0,2 µm	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)

2.2 Bakterien, Bakteriophagen und ihre Wachstumsbedingungen

Die verwendeten Bakterienstämme stammen zum einen von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), der SLCC (*Special Listeria Culture Collection*, Universität Heidelberg), der ATCC (*American Type Culture Collection*) oder der WSLC (*Weihenstephaner Listeria Collection*). Zum anderen wurden Eigenisolate verwendet.

2.2.1 *E. coli* Stämme

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, bei 37 °C in LB-Medium, welches für Platten mit 15 g/l Agar versehen wurde (Sambrook *et al.*, 1989). Bei Bedarf wurden entsprechende Antibiotika in folgenden Mengen zugegeben: 100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin und 10 µg/ml Rifampicin. Zur längeren Lagerung wurden 0,5 ml einer stationären Kultur mit 0,5 ml einer 25 % (v/v) Glycerin-Lösung gemischt und ungefähr 1 h bei RT inkubiert. Anschliessend wurden diese Glycerinkulturen bei -80 °C aufbewahrt.

Tab. 2.8 Auflistung der in dieser Arbeit zur Proteinexpression verwendeten *E. coli* Stämme.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Quelle
M15 [pREP4]	Nal ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺	Qiagen AG (Hilden, Deutschland)
BL21-CodonPlus-RIL	F- <i>ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>dcm+</i> Tetr <i>gal endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW Camr</i>]	Stratagen AG (La Jolla, USA)
HMS174 (DE3)	F- <i>recA1 hsdR</i> (r _{K12} m _{K12} ⁺) Rif ^r λ (DE3)	Novagen Inc (Madison, USA)

2.2.2 Nicht-*Listeria* Stämme

Verwendete Nicht-*Listeria* Stämme sind mit ihren Wachstumsbedingungen im Appendix I aufgeführt. Sie wurden für Experimente in der späten logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Diese wurde durch eine 1/5-Verdünnung von stationären Kulturen im jeweiligen Medium und ein weitere Inkubation für 1 – 2 h erreicht. Die Zellmenge wurde durch Messung der OD₆₀₀ abgeschätzt. Eine OD₆₀₀ von ~ 1 entspricht ungefähr einer Zelldichte von 10⁹ cfu/ml.

2.2.3 *Listeria* Stämme

Listeria Stämme zur Phagenvermehrung wurden in TB Medium bei RT angezogen. Zur Kultivierung der *Listeria* Phagen A118, A511 und P35 wurde *Listeria monocytogenes* Sv 1/2a (WSLC 1001) verwendet und für A500 *Listeria monocytogenes* Sv 4b (WSLC 1042).

Für Bindeversuche verwendete *Listeria* Stämme sind mit ihrem Serovar (Sv), falls bekannt, in Appendix II aufgeführt. Sie wurden in LX-Medium bei 35 +/- 2 °C unter Schütteln (220 rpm) gezogen. In allen Experimenten wurden *Listeria* Zellen in der späten logarithmischen Wachstumsphase verwendet (2.2.2). Die Menge an *Listeria* Zellen wurde durch Messung der OD₆₀₀ abgeschätzt. Bei dem chromogenen Nährmedium LX war in Vorversuchen über Plattieren von seriellen Verdünnungen bestimmt worden, dass eine OD₆₀₀ von ~ 4 circa einer Zelldichte von 10⁹ cfu/ml entspricht.

2.2.4 Bakteriophagen

Die *Listeria* Phagen A118, A500, A511 und P35 wurden in Flüssigkulturen der jeweiligen Wirte (siehe 2.2.3) in Anlehnung an Loessner *et al.* 2000, vermehrt. In Kürze: es wurden 100 µl einer ÜN-Kultur zu 10 ml TB Medium, das vorab mit 2 mM CaCl₂ und 10 mM MgSO₄ versetzt wurde, gegeben. Nach einer Inkubation von 2 h auf RT unter schütteln, wurden die *Listeria* Phagen eines Einzelplaques mit der flüssig Kultur vermischt und erneut ÜN inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellbruchstücke abzentrifugiert (6000 g, 15 min), der Überstand sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Zur Bestimmung der Phagentiter und des Lysespektrum von A511 wurde nach der Doppelschicht-Weichagar Methode (Adams, 1959) vorgegangen. Dabei wurden 500 µl einer spät-logarithmischen *Listeria* Kultur mit 4 ml vortemperiertem (45 °C) TB Top-Agar (TB Medium mit 0,7 % (w/v) Agar) versetzt. Zusätzlich wurden 0,1 ml einer entsprechenden in TB Medium verdünnten Phagensuspension dazu gegeben und auf TB Agar ausgebracht. Nach Erstarren des Top-Agar wurden die Platten ÜN bei RT inkubiert und am nächsten Tag die Plaques ausgewertet.

Von den *Listeria* Phagen A006, B025, B054 und PSA wurde ausschließlich die Sequenzinformation des veröffentlichten Genoms betrachtet.

Alle in dieser Arbeit verwendeten *Listeria* Phagen sind in Tabelle 2.9 aufgelistet.

Tab. 2.9 Auflistung von in dieser Arbeit verwendeten *Listeria* Phagen.

Phage	Morphotyp	Quelle	Sequenzzugangsnummer (NCBI)	Referenz
A006	<i>Siphoviridae</i>	Lysogener Stamm WSLC 1006	DQ003642	Loessner, 1991a; Dorscht <i>et al.</i> , 2009
A118	<i>Siphoviridae</i>	Lysogener Stamm WSLC 1006	AJ242593	Loessner und Busse, 1990; Loessner 2000
A500	<i>Siphoviridae</i>	Lysogener Stamm ATCC 23074	DQ003637	Loessner und Busse, 1990; Dorscht <i>et al.</i> , 2009
A511	<i>Myoviridae</i>	Abwasser	DQ003638	Loessner und Busse, 1990; Klumpp <i>et al.</i> , 2008
B025	<i>Siphoviridae</i>	Lysogener Stamm WSLC 2025	DQ003639	Loessner und Busse, 1990; Dorscht <i>et al.</i> , 2009
B054	<i>Myoviridae</i>	Lysogener Stamm WSLC 2054	DQ003640	Zink und Loessner, 1992; Dorscht <i>et al.</i> , 2009
P35	<i>Siphoviridae</i>	Silage	DQ003641	Hodgson, 2000; Dorscht <i>et al.</i> , 2009
PSA	<i>Siphoviridae</i>	Lysogener Stamm WSLC1042	AJ312240	Loessner <i>et al.</i> , 1994; Zimmer <i>et al.</i> , 2003

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Standardmethoden

Routinemässig wurden die allgemein üblichen Methoden für Restriktionsverdau, Ligation und DNA-Agarosegele unter Berücksichtigung der Herstellerangaben angewandt (Sambrook *et al.*, 1989).

Plamid-DNA wurde mit dem „Qiaquick Spin MiniPrep Kit“ (Qiagen AG, Hilden, Deutschland) gereinigt. Über Agarosegele aufgetrennte DNA-Fragmente wurde mittels „Qiaquick Gel Extraktion Kit“ (Qiagen AG) extrahiert.

2.3.2 DNA Isolierung aus Bakteriophagen und *Listeria* Zellen

2.3.2.1 DNA Freisetzung aus Bakteriophagen über Denaturierung der Kapsid-Proteine

Zur Freisetzung von Phagen-DNA wurde 3 µl eines Phagenlysat mit 3 µl Guanidinhydrochlorid (6 M) und 3 µl Natriumphosphatpuffer (1 M HNa_2Po_4 , pH 12) vermischt und 1 h bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde 1:50 mit Wasser verdünnt und anschliessend direkt in die PCR eingesetzt.

2.3.2.2 DNA Isolierung aus *Listeria* Zellen

Die genomische DNA von *Listeria* wurde mittels „QIAmp DNA Mini Kit“ (Qiagen AG, Hilden, Deutschland) isoliert. Abweichend von den Herstellerangaben wurde anstelle des Lysozyms 50 µg/ml des Endolysins des Phagen A511 eingesetzt (Loessner *et al.*, 1995).

2.3.3 PCR (*polymerase chain reaction*)

Die Amplifizierung der entsprechenden DNA Bereiche wurden in einem Thermocycler durchgeführt. Die Reaktionsansätze enthielten routinemässig ~ 100 ng Ziel-DNA, 100 pmol der jeweiligen Oligonukleotide (Tab. 2.4) und 0,25 µmol dATP, dCTP, dGTP und dTTP in 1 x Reaktionspuffer. Benutzt wurden die Ex-Taq bzw. die Phusion DNA Polymerase. Die Temperaturen während der Reaktion wurden nach

Herstellerangaben der Polymerasen festgelegt. Es wurden 40 Reaktionszyklen durchgeführt.

Die erhaltenen Reaktionsprodukte wurden mittels Grössenfraktionierung in Agarosegelen analysiert, gegebenenfalls aus dem Gel extrahiert und anschliessend über Sequenzierung weiter untersucht.

2.3.4 DNA-Sequenzierung und Auswertung

Sequenzierung von DNA wurde als Auftragsarbeit bei der Geneart AG (Regensburg, Deutschland) durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Computerprogramms „Chromas Lite“ analysiert und unter Verwendung des Blast-Suchalgorithmus des *national center for biotechnology information* (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mit bekannten Sequenzen verglichen. Für das Abgleichen von DNA-Sequenzen und der daraus abgeleiteten Aminosäure (AA)-Sequenzen wurde ClustalX (Version 2.0) verwendet.

2.3.5 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden 130 µl chemisch-kompetente Bakterien (Sambrook *et al.*, 1989) auf Eis aufgetaut und mit 10 µl Ligationsansatz gemischt. Nach einer Inkubation für 30 min auf Eis erfolgte der so genannte Hitzeschock für 45 s bei 42 °C im Thermomixer. Danach wurden die Zellen 2 min auf Eis abgekühlt und mit 900 µl LB-Medium versetzt, in dem sie anschliessend 60 min bei 37 °C im Thermomixer (500 rpm) geschüttelt wurden. Schliesslich wurde die Bakteriensuspension auf geeignetem LB-Selektivagar verteilt und über Nacht bei 35 +/- 2 °C inkubiert. Auf diese Weise wurden 10⁵ bis 10⁸ Transformanden pro µg Plasmid-DNA erhalten.

2.4 Proteinchemische und -analytische Methoden

2.4.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen (Laemmli, 1970). Die verwendeten Gele hatten, je nach Grösse des zu analysierenden Proteins, eine Acrylamidkonzentration zwischen 10 und 15 % (w/v). Für die SDS-PAGE wurden die Proteinlösungen in SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95 °C erhitzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 180 V Gleichspannung für 40 min in den SDS-Gelapparaturen.

Die Comassie-Färbung der Proteine wurde im Anschluss über eine modifizierte Methode nach Fairbanks *et al.* (1971) durchgeführt. Hierfür wurden die Gele aus der Elektrophoresekammer herausgenommen und mit Fairbanks Lösung A gefärbt. Mit Fairbanks Lösung D wurden die Gele im Anschluss entfärbt. Die Nachweisgrenze dieser Färbemethode liegt bei 0,2 – 0,4 µg Protein/mm² Gel.

Zur Analyse eines biotinylierten (Js-Tag) oder mit einem *Strep*-Tag-II (Ns-Tag) versehenem Zielproteins, wurden die Proteine mittels Western Blot auf eine Membran übertragen und mit *Strep*-Tactin HRP Konjugat nachgewiesen.

Hierfür wurde der Proteintransfer auf eine Polyvinylidendifluorid mittels einem Elektrobloetter durchgeführt. Der Aufbau des Blots erfolgte nach Herstellerangaben mit einem abweichenden Transferpuffer (45 mM Borsäure, 10 % (v/v) Methanol, pH 9). Die rekombinaten Zielproteine mit Biotin oder *Strep*-Tag-II wurden auf der Membran über *Strep*-Tactin HRP Konjugat mit chromogener Färbung nach Herstellerangaben identifiziert. Die Sensitivität dieser Methode beträgt > 7 ng/Bande.

2.4.2 Expressionstest

Um den am besten exprimierenden Klon unter den Transformanten zu finden, wurden je 6 - 12 Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher in je 1 ml LB-Medium, das zuvor mit geeigneten Antibiotika versehen worden war, überimpft. Zusätzlich wurde jede Kolonie auf eine Agarplatte ausgestrichen, über Nacht bei 35 +/- 2 °C inkubiert und als Rückstellprobe bei 4 °C gelagert. Die Flüssigkulturen wurden bei 37 °C unter Schütteln im Thermomixer (900 rpm) für 2 – 3 h inkubiert. Von einer Probe wurden

30 µl auf 1000 µl LB-Medium gegeben und als nicht induzierte Kontrollprobe weiter inkubiert. Die restlichen Proben wurden mit 1 mM IPTG induziert und für mindestens 3 h weiter inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen zentrifugiert (Biofuge Fresco, 13000 rpm, 4 °C, 5 min), das Pellet je nach Grösse in 100 – 300 µl SDS-Probenpuffer (2.4.1) aufgenommen und für 5 min bei 95 °C erhitzt. Je Ansatz wurden 15 µl auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteinexpression nach Comassie-Färbung überprüft (2.4.1). Der Klon mit der stärksten Expressionsbande wurde, nachdem das einligierte DNA-Stück über Sequenzierung (2.3.4) seiner Plasmid-DNA-Sequenz kontrolliert worden war, durch Anlegen einer Glycerinkultur konserviert (2.2.1).

2.4.3 Test auf lösliche Proteinexpression

Mit dieser Methode wurde überprüft, in welcher Fraktion nach Zellaufbruch und fraktionierender Zentrifugation sich das Zielprotein befindet. Darüber hinaus wurde mit diesem Test untersucht, ob sich die Menge an löslichem Protein durch Expression bei verschiedenen Temperaturen verändert.

Hierfür wurde pro Ansatz zweimal 1 ml LB-Medium, dem zuvor das geeignete Antibiotikum zugegeben worden war, mit je 30 µl einer stationären Kultur angeimpft. Nach dreistündiger Inkubation der Proben bei unterschiedlichen Temperaturen (RT, 30 °C bzw. 37 °C) unter Schütteln im Thermomixer (900 rpm), erfolgte die Induktion je einer der beiden Proben mittels 1 mM IPTG. Die andere Probe diente als nicht-induzierte Kontrolle. Nach weiterer Inkubation der Proben für mindestens 3 h bei der jeweiligen Temperatur, wurden die Kulturen zentrifugiert (Biofuge Fresco, 13 000 rpm, 4 °C, 5 min) und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in jeweils 250 µl Aufschlusspuffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8) resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen mittels zweimaliger Inkubation im Ultraschall Homogenisator für 30 s auf Eis lysiert. Danach erfolgte die fraktionierende Zentrifugation der Zellaufschlüsse (Biofuge Fresco, 13 000 rpm, 4 °C, 20 min) und die Überführung der Überstände in neue Reaktionsgefässe. Die Pellets wurden im gleichen Volumen Aufschlusspuffer resuspendiert. Beide Fraktionen (Überstand und Pellet) wurden über SDS-PAGE (2.4.1) auf die Anwesenheit des Zielproteins hin untersucht.

2.4.4 Proteinexpression von Grosskulturen

Um grössere Mengen an rekombinantem Zielprotein zu erhalten, wurde eine Grossanzucht im 2 l Massstab durchgeführt.

Dazu wurden 2 l LB-Medium, mit geeignetem Antibiotikum, mit 30 ml einer stationären Übernachtskultur des entsprechenden plasmidtragenden *E. coli* Stamms angeimpft. Diese Kulturen wurden nun unter Schütteln bei der Temperatur inkubiert, bei der die beste Proteinausbeute zu erwarten war (Test auf lösliche Proteinexpression). Bei einer OD_{600} von 0,4 – 0,8 erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG. Die Kulturen wurden zwischen 5 h bis über Nacht (je nach Temperatur) weiter inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sorvall, SLC 4 000, 5 000 rpm, 4 °C, 15 min) geerntet. Die erhaltenen Zellpellets können bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert werden.

Während der Untersuchungen zur Bindestärke des RBPs A511Gp108 wurde eine Metallionenabhängigkeit des Proteins vermutet. Daher wurden zum Zeitpunkt der Induktion von Grosskulturen 40 µl einer Lösung mit verschiedenen Metallionen (Tab. 2.10) beigemischt und im Anschluss der Einfluss der Ionen auf die Bindeeigenschaften des Proteins untersucht.

Tab. 2.10 Spurenelementlösung. Einwaage in 1 l HCl (5 M).

40 g $FeSO_4 \times 7 H_2O$
10 g $MgSO_4 \times H_2O$
10 g $AlCl_3 \times 6 H_2O$
4 g $CoCl_2$
2 g $ZnSO_4 \times 7 H_2O$
2 g $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$
1 g $CuCl_2 \times 2 H_2O$
0,5 g H_3BO_3

2.4.5 Zellaufschluss

Das in der Grossanzucht (2.4.4) entstandene Zellpellet wurde in 35 ml Aufschlusspuffer (je nach Reinigungsart) nach Zugabe von DNase (100 µg/ml) und Magnesiumdichlorid (30 mM) resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit Hilfe des Hochdruckhomogenisators auf Eis. Nach der Zellyse folgte die Trennung der löslichen und unlöslichen Zellbestandteile durch Zentrifugation (Sorvall, SS 34, 12000 rpm, 4 °C, 30 min) mit nachfolgender Analyse

eines Aliquots jeder Fraktion über SDS-PAGE. Bei nachfolgender Affinitätsreinigung des Zielproteins aus der löslichen Fraktion (2.4.6.1 oder 2.4.6.2) wurde der Überstand weiter verwendet, bei Rückfaltung des Zielproteins aus den *Inclusion Bodies* (2.4.7) das unlösliche Pellet.

2.4.6 Native Proteinreinigung über Affinitätschromatographie

2.4.6.1 Streptavidin Mutein Matrix

Rekombinante Proteine, die über den Js-Tag während der Expression in vivo biotinyliert worden waren und keinen His-Tag tragen, wurden über die Streptavidin Mutein Matrix von der Firma Roche GmbH (Mannheim, Deutschland) angereichert. Hierfür wurde das „Säulen Reinigungsprotokoll“ nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.6.2 Ni-NTA Sepharose

Proteine mit einem His-Tag wurden über Ni-NTA Sepharose von der Firma Qiagen AG (Hilden, Deutschland) angereichert.

Hierfür wurde vorab eine leere Kunststoff Säule mit Filter mit 5 ml Ni-NTA Agarose befüllt und mit dem vierfachen Säulenvolumen des Puffers I (25 mM Tris-HCl, 500 mM Natriumchlorid, 20 mM Imidazol, pH 8) äquilibriert. Der Überstand aus dem Zellaufschluss (2.4.5) in Puffer I wurde über die Säule gegeben. Verunreinigungen wurden entfernt, indem man das zehnfache Säulenvolumen des Puffers I auf die Säule gab. Das gebundene Protein wurde mit dem vierfachen Säulenvolumen mit Puffer II (25 mM Tris-HCl, 500 mM Imidazol, pH 8) eluiert und in 1 – 2 ml Fraktionen gesammelt. Eine Probe jedes Reinigungsschrittes und jedes Eluats wurde über SDS-PAGE (2.4.1) analysiert. Die Protein enthaltenden Eluat-Fraktionen wurden vereinigt und gegen den entsprechenden Puffer dialysiert (2.4.8).

Die Ni-NTA Agarose wurde im Anschluss nach Herstellerangaben regeneriert.

2.4.7 Gewinnung unlöslicher Proteine

Einige Proteine wurden unlöslich in sphärischen Einschlusskörperchen (*Inclusion bodies*) exprimiert. Die vollständig synthetisierten Proteine liegen hier meist nur partiell gefaltet vor. Zur Isolierung müssen die *Inclusion bodies* solubilisiert, d.h. das

enthaltene Protein muss komplett denaturiert werden. Schliesslich erfolgt in der Rückfaltung die Renaturierung des Proteins, wobei es bei korrekter Faltung seine native Struktur annimmt. Diese Schritte werden in Anlehnung an Rudolph und Lilie (1996) durchgeführt.

2.4.7.1 Isolierung der *Inclusion bodies*

Nach Expression des Zielproteins in *E. coli* und dem Zellaufschluss in Aufschlusspuffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM Natriumchlorid, 20 mM EDTA, pH 8) wurde die unlösliche Fraktion in 40 ml Waschpuffer mit 2,5 % (v/v) Triton X-100 mit Hilfe des Ultra-Turax resuspendiert. Anschliessend wurde die Fraktion durch Zentrifugation (Sorvall, SS34, 15 000 rpm, 10 min, 4 °C) erneut pelletiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschvorgang wurde einmal im selben Puffer und zweimal mit Waschpuffer mit 1 % (v/v) TritonX-100 wiederholt. Im Anschluss wurde ein Waschschrift mit 30 ml Waschpuffer, der mit 10 mM Dithioerythrit versetzt wurde, ein weiterer ohne Zusatz zum Waschpuffer und zwei Waschschrift in Wasser durchgeführt. Schliesslich wurden die *Inclusion bodies* in 2 ml Wasser aufgenommen und können so bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C oder -20 °C gelagert werden.

2.4.7.2 Solubilisierung der *Inclusion bodies*

Zur Solubilisierung wurden 100 µl *Inclusion bodies* in 10 µl 1 M NaOH Lösung gegeben. Nach gründlicher Homogenisierung am Vortexer für maximal 30 s, erfolgte die Zugabe von 9 Volumina Solubilisierungspuffer (20 mM Tris-HCl, 8 M Harnstoff, 1 mM Zinksulfat, 20 mM Natriumcitrat, 10 mM Dithioerythrit, pH 8) mit anschliessender erneuter Mischung. Der im Solubilisierungspuffer enthaltene Harnstoff zählt zu den chaotropen Reagenzien. Solche Reagenzien verhindern die Ausbildung nicht-kovalenter Bindungen der AA-Seitengruppen und damit bedingen sie eine Entfaltung der Polypeptidkette. Das Reduktionsmittel Dithioerythrit verhindert die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbrücken. Im Solubilisierungsansatz sollten die Proteine also als komplett denaturierte Polypeptidkette vorliegen.

2.4.7.3 Rückfaltung denaturierter Proteine

Zur Rückfaltung der denaturierten Proteine wurde folgender Renaturierungsansatz verwendet.

Das denaturierte Protein wurde tropfenweise im Verhältnis 1 : 16 unter Rühren bei 4 °C in Rückfaltungspuffer (20 mM Tris-HCl, 300 mM Arginin, 10 mM Dithioerythrit, 20 mM Citrat, 0,1 mM Zinksulfat, pH 8) verdünnt. Die Reagenzien im Rückfaltungspuffer fördern nach Rudolph und Lilie (1996) die Rückfaltung der Proteine. Der Rückfaltungsansatz wurde nun über Nacht bei 4 °C unter leichtem Rühren inkubiert. Durch die Verdünnung sinkt die Harnstoffkonzentration auf ~ 0,5 M, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen AA-Seitengruppen wieder ermöglicht werden. Dies führte meist zur Rückfaltung des Proteins in seinen vermutlich nativen Faltungszustand. Eventuell auftretende Proteinaggregate wurden im Anschluss an die Rückfaltung durch Zentrifugation (Sorvall, SS34, 15 000rpm, 30 min, 4 °C) entfernt. Dieser Ansatz wurde gegen den entsprechenden Puffer dialysiert (2.4.8).

2.4.8 Dialyse

Mittels Dialyse durch eine semipermeable Membran mit Poren definierter Größe wurden Proteine von kleineren Molekülen getrennt (Lottspeich und Zorbas, 1998). Dabei wurde vom Dialysepuffer mindestens das 100 fache Volumen der zu dialysierenden Proteinlösung eingesetzt. Alle Dialysen erfolgten mit mindestens zweimaligem Pufferwechsel unter Rühren bei 4 °C für 24 h.

2.4.9 Bestimmung der Proteinkonzentration über UV/VIS-Absorptionsspektroskopie

In Proteinen absorbieren vor allem die aromatischen AA wie Tryptophan, Tyrosin und in geringem Masse auch Phenylalanin mit einem Maximum bei 280 nm (Whitford, 2005). Da die Höhe der Absorption eines bestimmten Moleküls von dessen Menge abhängt, kann bei einem bekannten Extinktionskoeffizient (Pace *et al.*, 1995) für ein Protein, unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes über die Extinktion bei 280 nm und die Schichtdicke der Küvette die Proteinkonzentration bestimmt werden. Die Nachweisgrenze dieser spektroskopischen Proteinmengenbestimmung bei 280 nm liegt bei ~ 20 µg Protein/ml.

Durch zusätzliche Betrachtung der Absorption bei 250 und 320 nm kann man eine Abschätzung über den Grad möglicher Verunreinigungen in der Proteinlösung

vornehmen. Reine Proteinlösungen zeigen ein Verhältnis der Absorption bei 250 : 280 : 320 nm von 1 : 3 : 0. Somit kann man auch das Vorhandensein von z. B. DNA, mit einem Maximum bei 260 nm einschätzen. Zusätzlich ermöglicht diese Methode auf Anwesenheit von Aggregaten, die eine Lichtstreuung bei Wellenlängen über 310 nm aufweisen, zu testen.

Die Absorptionsmessung erfolgte bei RT in einem UV/VIS-Spektrometer mit einer UV-Präzisionsküvette (Halbmikro). Der Messbereich lag zwischen 240 und 340 nm. Als Basislinie wurde jeweils der Puffer verwendet, in dem das Protein gelöst war. Die Korrektur erfolgte mit der Software „Spectra Analysis“ (Jasco GmbH, Tokio, Japan).

2.4.10 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Das Aufkonzentrieren von Proteinen nach der präparativen Gelfiltration (2.5.2) erfolgte mittels Zentrifugalkonzentratoren nach Anleitung des Herstellers.

2.5 Charakterisierung der Bindeproteine

2.5.1 Bindestudien

2.5.1.1 Magnetische Separation

Mit Hilfe dieser Methode wurde die Bindung möglicher RBPs an *Listeria* Zellen nachgewiesen, sowie ihr Bindespektrum innerhalb und ausserhalb des Genus *Listeria* untersucht. Das zu untersuchende Protein bindet über ein eingeführtes Biotin bzw. einen eingeführten *Strep*-Tag-II an mit Streptavidin beschichtete magnetische Partikel. Wenn es sich um ein RBP handelt, wechselwirkt es darüber hinaus mit der Zelloberfläche bestimmter *Listeria* Zellen. Dieser Komplex aus magnetischen Partikeln und Zellen kann anschliessend am Magneten separiert werden und die daran gebundenen Zellen über Plattierung auf Selektivagar nachgewiesen werden.

Die Methode wurde in Doppelansätzen durchgeführt. Es wurden verschiedene Kulturen in der späten logarithmischen Wachstumsphase verwendet (2.2.2 bzw. 2.2.3). Ausgehend von diesen Kulturen wurden serielle Verdünnungen in PBST hergestellt und 100 µl der 10³- und 10²-Verdünnungsstufe in Duplikaten plattiert. Sie dienten zur Bestimmung der in den Testansatz eingesetzten Zellzahl.

Es wurde eine definierte Menge des jeweiligen Proteins in ein Reaktionsgefäss vorgelegt. Zu diesem wurden zuerst 500 µl Zellen in PBST mit einer Konzentration von 10⁴ cfu/ml und im Anschluss 200 µg/ml magnetische Partikel zu jedem Ansatz pipettiert. Die Proben wurden nun für 20 min im Überkopffrotator (RT, 15-30 rpm/min) inkubiert. Der entstandene Partikel/Zell-Komplex wurde anschliessend 5 min an einem Magneten abgezogen und der Überstand gesammelt. Der Komplex wurde in 1 ml PBST resuspendiert, für 10 min im Überkopffrotator inkubiert, erneut am Magneten abgezogen und die Überstände gesammelt. Nun wurden die Ansätze und die vereinte Überstände unverdünnt und 1/10-verdünnt auf Oxford-Agar ausgebracht. Die Platten wurden über Nacht bei 35 +/- 2 °C inkubiert.

Die Auswertung erfolgte am darauf folgenden Tag durch Auszählen der auf den Platten gewachsenen Kolonien. Dabei wurden sowohl die ausplattierten Partikel-Lösungen, sowie die Überstände ausgezählt. Der Anteil der Zellen, die an die MP gebunden haben, wurden im Vergleich zur gefundenen Gesamtzellzahl ausgewertet (Bindeeffizienz relativ zu den insgesamt gefundenen Zellen = CE_r). Es

wurden lediglich die Testergebnisse verwertet, bei denen die Gesamtwiderfindungsrate zwischen 80 und 120 % der eingesetzten Zellzahl betrug. Potentielle RBP Kandidaten wurden zunächst mit 10 µg/ml in den Test eingesetzt. Wurde dabei eine spezifische Bindung an *Listeria* Zellen festgestellt, wurde einmalig die Konzentration für die maximale Bindeeffizienz, durch den Einsatz verschiedener Proteinkonzentrationen, bestimmt. Für die weitere Charakterisierung des Bindeproteins wurde diese Proteinkonzentration eingesetzt.

Über diese Methode wurde auch die Bindestärke der RBPs gemessen.

Die Bindung zwischen einem Liganden [A] und einem Bindeprotein [B] zu einem Protein/Ligand-Komplex [AB] stellt einen Gleichgewichtsprozess ($A + B \rightleftharpoons AB$) dar. Dieser ist durch eine Konstante charakterisiert, die je nach Bindestärke zwischen Protein und Ligand eine bestimmte Grösse aufweist. Ist z.B. der Ligand einer Gleichgewichtsreaktion konstant, ist die Proteinkonzentration zur Komplexkonzentration proportional, bis eine Sättigung des Liganden eintritt. Diese wird je nach Stärke der Bindung zwischen Protein und Ligand unterschiedlich schnell erreicht (Abb. 2.1). Deshalb ist die Proteinkonzentration bei halbmaximaler Sättigung umso niedriger je besser die Bindestärke zwischen Protein und Ligand ist. Daher kann diese Konzentration (apparente Affinität) als Mass der Bindestärke verwendet werden.

Zur Bestimmung der Bindestärke einer Präparation von RBPs wurde also bestimmt, welcher Anteil Zellen aus einer Lösung in Abhängigkeit von der Konzentration an Bindeprotein an die magnetischen Partikel gebunden wird. Dabei wurden die Zellzahl, die Menge an Streptavidin-beschichteten magnetischen Partikeln, die Pufferbedingungen und die Inkubationsdauer konstant gehalten. Auf Grund der hohen Bindestärke der Biotin/Streptavidin Wechselwirkung [10^{-15} M (Haun and Wasi, 1990)] kann dieses Bindeereignis bei der Bewertung der Bindestärke vernachlässigt werden.

Für die Auswertung wird die Bindeeffizienz der wieder gefundenen Zellen verwendet und mittels SigmaPlot (Version 7) gegen die eingesetzte Proteinkonzentration aufgetragen. Die Proteinkonzentration bei halbmaximaler Sättigung entspricht der apparenten Affinität.

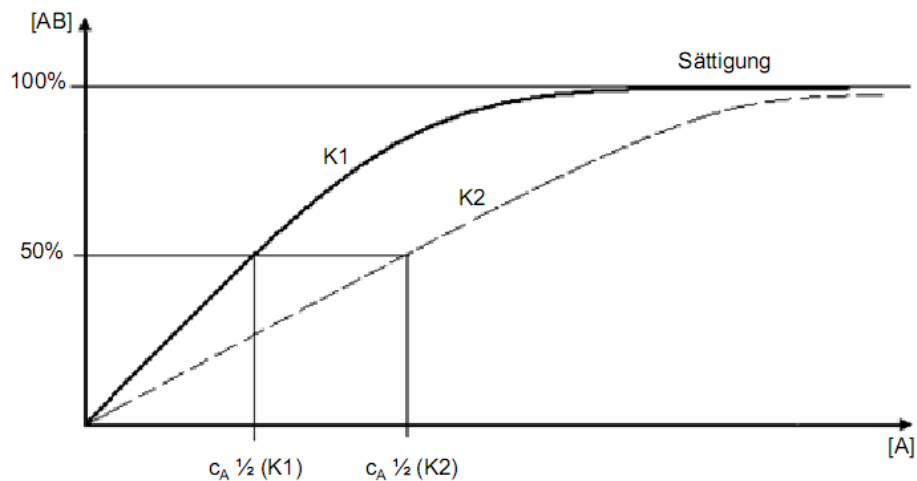


Abb. 2.1 Bestimmung der halbmaximalen Sättigung. Aufgetragen ist die relative Anzahl der Komplexe [AB] gegen die eingesetzte Konzentration an Ligand [A]; Halbmaximale Bindeeffizienz wird angegeben als die Konzentration an [A], bei der die Hälfte der möglichen Komplexe [AB] vorliegen. Im Fall von Bindeproteinen wäre die Bindestärke von K1 grösser als die Bindestärke von K2, d.h. die Affinität von K1 wäre höher.

2.5.1.2 Zell-ELISA

Im Zell-ELISA wurden Zellen auf Mikrotiterplatten immobilisiert. Diese Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen RBPs inkubiert und anschliessend nicht gebundenes Protein ausgewaschen. An das Biotin bzw. den *Strep*-Tag II des gebundenen Proteins wurde wiederum *Strep*-Tactin alkalische Phosphatase (AP) Konjugat gebunden. Nach Entfernung von nicht gebundenem Konjugat wurde ein Substrat der AP zugegeben, dessen Umsatz nach festgesetzter Zeit bestimmt wurde. Diese Methode wurde verwendet um die Bindestärke der RBPs hinsichtlich ihrer Eignung als Nachweismoleküle zu bewerten. Da es sich bei der Wechselwirkung um einen Gleichgewichtsprozess handelt, kann auch hier die apparente Affinität als Mass der Bindestärke bei konstantem Liganden bestimmt werden (2.5.1.1, Abb. 2.1). Im Test werden die Pufferbedingungen, die Menge an *Strep*-Tactin AP Konjugat und Substrat, sowie die Inkubationszeiten konstant gehalten. Das Bindeereignis zwischen Biotin und Streptavidin kann aufgrund der hohen Bindestärke der Biotin/Streptavidin Wechselwirkung vernachlässigt werden.

Der Zell-ELISA wurde mindestens in Doppelbestimmung durchgeführt. Die Mikrotiterplatten (MaxiSorp U96) wurden je Vertiefung mit 100 μ l einer 10^9 cfu/ml Bakterien-Kultur (2.2.2 und 2.2.3) in PBS für 1 h bei RT beschichtet. Nach der Beschichtung wurde die Zelllösung entfernt, je Vertiefung 200 μ l PBS auf die Zellen

gegeben und die Waschlösung abpipettiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nicht von Bakterien bedeckte Stellen auf der Mikrotiterplatte wurden nun mit 200 µl Blockierungslösung (PBS, 1 % (v/v) Prionex, pH 8) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C blockiert. Zur Bestimmung der eingesetzten Zellzahl wurde ein Aliquot der Zelloösung seriell in PBS verdünnt und jeweils 100 µl der Verdünnungsstufe 10^3 und 10^2 in Duplikaten ausplattiert.

Nach Blockierung und drei Waschschriften mit 200 µl ELISA-Waschpuffer wurde je Vertiefung 100 µl RBP Proteinlösung mit definierter Proteinmenge im Bereich von 0,1 bis 10 µg/ml in Proteinverdünnungspuffer auf die Zellen gegeben und für 1 h im Thermomixer (RT, 500 rpm) inkubiert. Im Anschluss wurden erneut drei Waschschriften mit ELISA-Waschpuffer durchgeführt. Nun wurden in die Vertiefungen 100 µl einer *Strep*-Tactin AP Konjugat Lösung (1 : 5 000, verdünnt in Proteinverdünnungspuffer) gegeben und für weitere 30 min im Thermomixer (RT, 500 rpm) inkubiert. Nach vier Waschungen mit ELISA-Waschpuffer wurden 100 µl pNPP-Substratlösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und bei RT inkubiert. 30 min nach Zugabe der Substratlösung wurde die Absorption bei 405/600 nm im ELISA-Messgerät gemessen.

Für die Bestimmung der apparenten Affinität wurde die Absorption gegen die jeweilige Proteinkonzentration aufgetragen. Die Proteinkonzentration bei halbmaximaler Sättigung dieser Kurve entsprach der apparenten Affinität.

2.5.1.3 Sandwich-ELISA

Mit Hilfe dieser Methode wurde das Bindespektrum *Listeria* von einigen RBPs innerhalb des Genus untersucht.

Dabei wurde erneut die starke Wechselwirkung der biotinylierten RBPs an Streptavidin ausgenutzt. Das Protein wurde auf Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten gekoppelt und daran wiederum die *Listeria* Zellen immobilisiert. Der Zellenachweis erfolgte durch die Wechselwirkung des CBD511-AP Konjugats (Profos AG, Regensburg) mit den Zellen und durch den chromogenen Substratumsatz der Phosphatase am gebundenen Konjugat.

Diese Methode wurde in Doppelbestimmungen durchgeführt. Es wurde je Vertiefung einer Mikrotiterplatte (Streptavidin beschichtet) 100 µl RBP Lösung mit 1 µg/ml in Proteinverdünnungspuffer für 30 min im Thermomixer (RT, 500 rpm) inkubiert. Anschliessend wurde die Proteinlösung abpipettiert, 200 µl ELISA-Waschpuffer pro

Vertiefung zugegeben und dieser erneut entfernt. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nun wurde das gebundene Protein mit 100 µl einer 10^8 cfu/ml *Listeria* Zelllösung in ELISA-Waschpuffer für 1,5 h im Thermomixer (RT, 500 rpm) inkubiert. Nach dreimaliger Waschung wurde das CBD511-AP Konjugat über eine Inkubation für 1 h mit 100 µl Konjugatlösung (0,1 U/ml PLBP-AP Konjugat in Proteinverdünnungspuffer) pro Vertiefung, an die Zellen gebunden. Nach vier Waschungen wurde die Aktivität der AP im entstandenen Sandwich durch Inkubation mit 100 µl pNPP-Substratlösung nachgewiesen. Die Färbereaktion wurde durch Messung der Absorption bei 405 nm gegen 600 nm in einem ELISA-Messgerät gemessen.

Bei der Auswertung wurde der Quotient aus dem Signal mit Zellen und dem Signal ohne Zellen nach 30 min Färbereaktion bestimmt. Zeigte dieses Signal/Hintergrund Verhältnis einen Wert > 10 wurde die Bindung an diesen *Listeria* Stamm als stark beurteilt. Bei Werten zwischen 3 und 10 galt die Bindung als schwach und bei Werten < 3 wurde das Bindeereignis als negativ bewertet.

2.5.1.4 Peroxidase-Test

Der Peroxidase-Test wurde für die ersten Bindestudien einiger potentieller RBP Kandidaten verwendet. Bei dieser Methode wurden zunächst die potentiellen RBPs mit *Listeria* Zellen inkubiert. Wechselwirken diese mit den Zellen konnte dies nach Bindung des *Strep*-Tactin HRP Konjugats an den *Strep*-Tag-II des Protein über deren Peroxidase-Aktivität nachgewiesen werden.

Diese Methode wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt. Hierfür wurden die Mikrotiterplatten (*Deepwell*) zunächst zur Verhinderung von unspezifischer Bindung von Proteinen an den Wandungen über Nacht bei 4 °C mit 600 µl PBST blockiert. Anschliessend wurde 200 µl *Listeria* Zelllösung in der späten logarithmischen Wachstumsphase (circa 1×10^9 cfu/ml, 2.2.3) in jede Vertiefung gegeben, die im Anschluss mit 10 µg/ml Protein versetzt wurde. Nach 15 min Inkubation bei RT wurden die Mikrotiterplatten zentrifugiert (Multifuge 3 S-R, 3600 rpm, 10 min, 4 °C). Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in je 200 µl PBST resuspendiert und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Pellets in 200 µl *Strep*-Tactin HRP Lösung (1 : 5000 in PBST) resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Daraufhin folgten zwei Waschschriffe mit je 200 µl PBST. Am Ende wurden die Komplexe in 200 µl ABTS-Substratlösung resuspendiert. Die Färbereaktion wurde nach einer

Inkubationsdauer von maximal 30 min durch Messung der Absorption bei 405/600 nm in einem ELISA-Messgerät gemessen.

Bei der Auswertung wurde die Signalintensität im Vergleich zum Signal von Ansätzen ohne Protein bewertet.

2.5.2 Präparative Gelfiltration

Zur Beurteilung des Assoziationszustands der Proteinpräparationen der RBPs wurde eine präparative Gelfiltration durchgeführt.

Sie erfolgte mit einer Chromatographiesäule nach Herstellerangaben an einer Chromatographieanlage. Als Laufpuffer wurde 10 mM Tris-HCl, 50 mM Natriumchlorid bei pH 8 verwendet.

Das apparente Molekulargewicht des untersuchten Proteins wurde nach Eichung der Säule mit Proteinen bekannter Grösse ermittelt werden. Sowohl die Eichsubstanzen als auch das rekombinante Protein wurden in einem Volumen von 2 ml (Proteinkonzentration zwischen 0,8 und 1 mg/ml) auf die Säule gegeben. Die eingesetzte Gesamtmenge an aufgetragenem Protein wird im Ergebnisteil unter 3.2.2 genannt.

2.5.3 Thermische Denaturierung - Circular Dichroismus

Die thermische Stabilität der RBPs wurde über die Messung eines Temperaturübergangs in der Circular Dichroismus (CD) Spektroskopie bestimmt.

Die Messungen wurden an einem CD-Spektrometer durchgeführt und erfolgten in einer Quarzglasküvette (Hellma Optics GmbH, Jena, Deutschland). Die RBP-Lösungen wurde im Fern-UV CD-Bereich bei 220 nm untersucht. Die Aufheizung der Probe erfolgte mit Hilfe eines regelbaren Thermostats mit einer Geschwindigkeit von 1 °C/min. Das CD-Signal wurde alle 0,1 °C mit einer Integrationszeit von 1 s bei einer Bandbreite von 2 nm registriert. Um die Sekundärstrukturänderung während der thermischen Aufheizung in einem breiteren Wellenlängenbereich verfolgen zu können, wurden alle 10 °C drei Spektren mit einer Messgeschwindigkeit von 100 nm/min aufgenommen und akkumuliert. Die Proteinkonzentrationen und die Pufferbedingungen sind im Ergebnisteil unter 3.2.4.2 angegeben.

2.5.4 Untersuchung zu den Liganden der Rezeptor Bindeproteine

Zur Abgrenzung der Ligandenstrukturen der RBPs wurden zunächst unterschiedliche Zellpräparationen von *Listeria* Stämmen angefertigt. Dabei wurden zum einen die Oberflächenproteine der Zellwand über eine SDS-Behandlung denaturiert. Zum anderen wurden die Zellen mit Trichloressigsäure inkubiert, wodurch vermutlich ein Grossteil der Teichonsäuren entfernt wird (Wendlinger *et al.* 1996, Steen *et al.*, 2003).

Es wurden *Listeria* Stämme verwendet, von denen eine Wechselwirkung mit dem jeweiligen RBP bekannt ist (3.2.1.1). Um zu erkennen, ob sich die Zelloberfläche durch obige Zellbehandlung so verändert, dass Protein unspezifisch daran bindet, wurden zusätzlich Stämme eingesetzt, an die die untersuchten Proteine nicht binden. Von diesen Zellsuspensionen wurden 500 µl in PBS (10^9 cfu/ml) mit einer SDS-Lösung (20 % (w/v)) bzw. eine Trichloressigsäure-Lösung (20 % (v/v)) versetzt und für 15 min bei 95 °C erhitzt. Zur Kontrolle wurden 500 µl Zellen mit 500 µl Wasser versetzt und ebenfalls erhitzt. Anschliessend wurden die Zellen zentrifugiert (Biofuge Fresco, 13 000 rpm, 4 °C, 5 min), der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml PBST aufgenommen und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde viermal mit Wasser wiederholt.

Nun wurden 500 µl der behandelten Zellen mit 500 µl RBP Proteinlösung (2 µg/ml) in Proteinverdünnungspuffer versetzt und für 1 h im Überkopffrotator (RT, Stufe: 2 bis 3, 15-30 rpm/min) inkubiert. Zusätzlich erfolgte ein Kontrollansatz mit unbehandelten Zellen. Anschliessend wurden die Zellen über Zentrifugation pelletiert und der Überstand als Nachweisproteinlösung in den Zell-ELISA eingesetzt. Die Mikrotiterplatten wurden dabei mit Zellen beschichtet, von denen eine Bindung an das jeweilige untersuchte Protein bekannt ist.

Bei der Auswertung wurde die Absorption bei 405/600 nm bewertet. Wurde im Zell-ELISA kein Signal gemessen, hat das Protein während der Behandlung an die Zellen gebunden und ist somit nicht mehr im Überstand vorhanden. Dies spricht für einen intakten Liganden auf der Zelloberfläche. War nach Zellbehandlung noch RBP im Überstand, dass über ein Signal im Zell-ELISA nachgewiesen wurde, wurde der Ligand durch die jeweilige Behandlung zerstört.

3 Ergebnisteil

3.1 Screening nach RBPs von *Listeria* Phagen

3.1.1 Identifizierung potentieller RBP-Gene

Viele Genome bekannter Phagen der Familie der *Myoviridae* und *Siphoviridae* sind in funktionelle Cluster unterteilt, die zu unterschiedlichen Zeiten des Lebenszyklus der Phagen exprimiert werden (Loessner *et al.*, 2000; Zimmer *et al.*, 2003; Brüssow, 2001 und 2006). Diese Cluster bestehen aus: Den „späten“ Gene, die für den Phagenaufbau und die Zelllyse verantwortlich sind, den Lysogenie-Kontrollgenen, die während des Prophagen Status aktiv sind und nur in lysogenen und nicht in rein lytischen Phagen vorkommen, und den „frühen“ Genen, die in der frühen Phase der Infektion eine Rolle spielen. Innerhalb der „späten“ Gene sind die Gene oft ebenfalls nach dem zeitlichen Ablauf des Phagenaufbaus angeordnet (Chopin *et al.*, 2001; Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004; Schuch und Fischetti, 2006). So folgen den Genen, die den Phagenkopf kodieren, die Gene, die den Phagenschwanz kodieren und diesen die Gene, die die Basisplatte und damit vermutlich die RBPs kodieren. Auch bei den bisher bekannten RBPs von Phagen Gram-positiver Bakterien liegen die dafür kodierenden Gene in dieser Region (Duplessis und Moineau, 2001; Dupont *et al.*, 2004; Schuch und Fischetti, 2006; Vegge *et al.*, 2006).

In Analogie zu der Position der RBP-Gene im Genom anderer Gram-positiver Phagen wurden als mögliche RBP-Gene der *Listeria* Phagen die offenen Leseraster (ORF) innerhalb der Gene, die für die Basisplatte kodieren, angenommen. Diese liegen bei *Listeria* Phagen meist zwischen dem *tmp*-Gen und der Lysekassette, die oft aus dem *hol*-Gen und dem *ply*-Gen besteht. Die Identität dieser Gene wurde über vergleichende Analyse der daraus abgeleiteten Aminosäuren (AA) Sequenzen mit bekannten Proteinen im NCBI abgeleitet oder von Dorscht *et al.* (2009) übernommen. Das *tmp*-Gen kodiert für das *tape measure* Protein (TMP), dessen Länge proportional zur Länge des Phagenschwanzes ist. Die Mechanismen zur Bestimmung der Schwanzlänge des Phagen wurde für den Bakteriophagen λ im Detail untersucht (Katsura, 1990). Das *hol*-Gen kodiert für das Holin und liegt in *Listeria* Phagen meist direkt vor dem *ply*-Gen, das für das Endolysin kodiert (Loessner *et al.*, 1995; Dorscht *et al.*, 2009).

Bei einer vergleichenden Analyse der abgeleiteten AA-Sequenzen der ORFs, die zwischen *tmp*- und *hol*-Gen liegen, mit Sequenzen bekannter RBPs konnten kaum signifikante Homologien gefunden werden. Eine Zuordnung dieser ORFs zu RBPs war also meist nicht direkt möglich. Deshalb wurden zur Identifizierung solcher Proteine innerhalb der *Listeria* Phagen verschiedene Leserahmen heterolog in *E. coli* exprimiert und auf *Listeria* Bindung getestet.

Der Grossteil bisher bekannter RBPs Gram-positiver Phagen zeigt eine Proteingrösse von > 20 kD und einen theoretischen pI zwischen 5 und 8 (Duplessis und Moineau, 2001; Dupont *et al.*, 2004; Schuch und Fischetti, 2006; Vegge *et al.*, 2006).

Folgende Kriterien zur Identifizierung der RBPs wurden herangezogen:

- Lage im Genom: Untersuchung der Leserahmen zwischen dem *tmp*-Gen und dem *hol*-Gen (wenn vorhanden)
- Bereiche mit signifikanter Homologie zu Bereichen in bekannten RBPs anderer Bakteriophagen und anderer für die Phagenanheftung interessanter Proteine
- Homologien zu während dieser Arbeit bereits identifizierten RBPs
- Proteingrösse: > 20 kD; theoretischer pI zwischen 5 und 8

3.1.2 Testablauf zur Identifizierung möglicher RBPs

In Tabelle 3.1 wird auf die detaillierte Beschreibung der einzelnen Methoden im Abschnitt „Material und Methoden“ verwiesen.

Bestimmte ORFs wurden nachdem sie unter Berücksichtigung der oben genannten Kriterien ausgewählt wurden (3.1.1) aus dem jeweiligen Genom des *Listeria* Phagen, soweit dieser verfügbar war, über PCR amplifiziert. Waren die potentiellen RBP-Gene aus nicht verfügbaren, temperenten Phagen, wurden verschiedene *Listeria* Stämme mittels PCR auf Anwesenheit dieser Gene im Genom hin untersucht. Die PCR-Fragmente wurden über Sequenzierung auf Übereinstimmung mit den bekannten Sequenzen von *Listeria* Phagen untersucht und daraufhin die Fragmente für weitere Untersuchungen verwendet, die die grösste Übereinstimmung zu den in der NCBI angegebenen Sequenzen aufwiesen (Tab 3.1, Schritt 1).

Die Gene wurden anschliessend über die bei der PCR eingefügten Schnittstellen in die Vektoren HisJs-pQE30, Js-pQE30 und/oder NsHis-pET21a einligiert. Diese Vektoren wurde bei der Suche nach den RBPs verwendet, da die daraus entstehenden rekombinanten Proteine über den N-terminalen His-Tag bzw. Js-Tag schnell und mit guter Ausbeute gereinigt werden konnten. Ausserdem sind über die N-terminale *in vivo* Biotinylierung bzw. den Ns-Tag effiziente Bindetests durch die starke Affinität von Biotin bzw. Ns-Tag zum Streptavidin möglich. Die so entstandenen Plasmide wurden in den entsprechenden *E. coli* Stamm transformiert. Die Klone, die das Plasmid erfolgreich aufgenommen hatten, wurden mit Hilfe eines Expressionstests ermittelt. Das Zielgen eines dieser Klone wurde anschliessend erneut über Sequenzierung auf Übereinstimmung mit bekannten Sequenzen von *Listeria* Phagen hin kontrolliert (Tab. 3.1, Schritt 2).

Nach Expression und Zellaufschluss mit fraktionierender Zentrifugation im 1 ml Massstab wurde die Löslichkeit des Zielproteins untersucht (Tab. 3.1, Schritt 3).

Anschliessend erfolgte die Expression des Zielproteins im 2 l Massstab, die Zellen wurden aufgeschlossen und durch Zentrifugation in die löslichen und unlöslichen Bestandteile getrennt. Befand sich das Zielprotein nur zu einem kleinen Teil in der löslichen Fraktion, wurde es daraus über Affinitätschromatographie (mit Js-Tag über Streptavidin-Mutein Matrix, mit His-Tag über Ni-Sepharose) gereinigt. Befand es sich komplett in der unlöslichen Fraktion wurde es aus den *Inclusion bodies* rückgefaltet. Die auf einem SDS-Polyacrylamidgel nach Comassie-Färbung abgeschätzte Reinheit des angereicherten Zielproteins war, wenn nicht anders vermerkt, > 70 %. Nach Umpuffern der Proteinlösung wurde die Proteinkonzentration bestimmt (Tab. 3.1, Schritt 4).

Das angereicherte Zielprotein wurde anschliessend in einen Bindetest mit lebenden *Listeria* Zellen eingesetzt (Tab. 3.1, Schritt 5). Der Standardtest für die ersten Bindetests war die magnetische Separation, bei A511Gp98 und Gp99 wurde allerdings der Peroxidasetest verwendet. Die Bindung eines jeden potentiellen RBP wurde mit je einem *Listeria* Stamm eines jeden Sv untersucht. Bei phagen-ähnlichen Sequenzen aus *Listeria* Stämmen wurde der Stamm, aus dem die Sequenz isoliert worden war, auch in den Bindetest eingesetzt.

Tab. 3.1 Methoden zur der Identifizierung von potentiellen RBPs und Querverweise auf ihre Beschreibung im Abschnitt Material und Methoden.

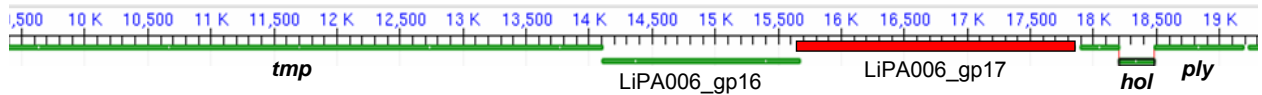
Schritt	Testphase	Methode	Material und Methoden
1	Generierung der DNA-Sequenz	Isolierung von Phagen-DNA	2.3.2.1
		Isolierung von <i>Listeria</i> DNA	2.3.2.2
		PCR	2.3.3
		Sequenzierung	2.3.4
2	Klonierung	Standardmethoden	2.3.1
		Vektoren	2.1.5
		<i>E. coli</i> Stämme	2.2.1
		SDS-PAGE und Western blot	2.4.1
		Expressionstest	2.4.2
		Sequenzierung	2.3.4
3	Löslichkeit	Test auf lösliche Proteinexpression	2.4.3
4	Expression und Reinigung	Proteinexpression von Grosskulturen	2.4.4
		Zellaufschluss	2.4.5
		Affinitätschromatographie mit Streptavidin-Mutein Matrix	2.4.6.1
		Affinitätschromatographie mit Ni-Sepharose	2.4.6.2
		Gewinnung unlöslicher Proteine	2.4.7
		Dialyse	2.4.8
		Bestimmung der Proteinmenge	2.4.9
5	Bindetests	Magnetische Separation	2.5.1.1
		Peroxidasetest	2.5.1.4

3.1.3 Identifikation möglicher RBPs

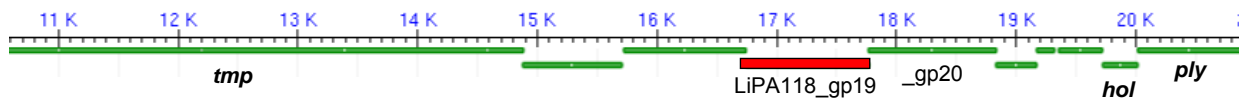
Alle untersuchten Gene, die nach oben genannten Kriterien (3.1.1) RBPs kodieren könnten, sind in Tab. 3.3 auf Seite 55 zusammengefasst. Bei allen untersuchten *Listeria* Phagen ist die Sequenzinformation des gesamten Genoms vorhanden. Wie in Abb. 3.1 zu sehen ist, liegen die Gene, die für die Basisplatte kodieren, bei diesen Phagen meist zwischen dem *tmp*-Gen und dem *hol*-Gen. Die Identifizierung der RBPs von *Listeria* Phagen mit einem solchen Genomaufbau wird im Folgenden zusammen behandelt. Die *Listeria* Phagen, deren Genomstruktur sich im Bereich der Gene, die für die Basisplatte kodieren, von der oben genannten unterscheidet, werden separat behandelt.

A.

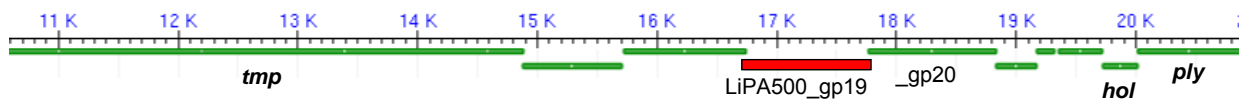
A006:



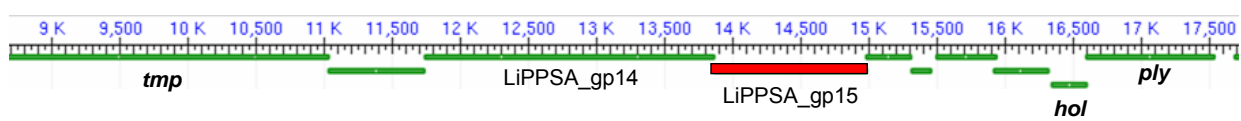
A118:



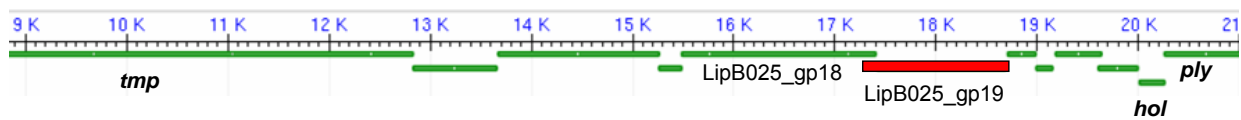
A500:



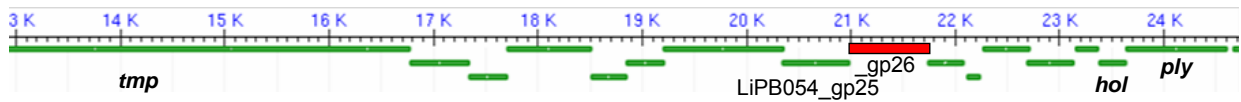
PSA:



B025:



B054:

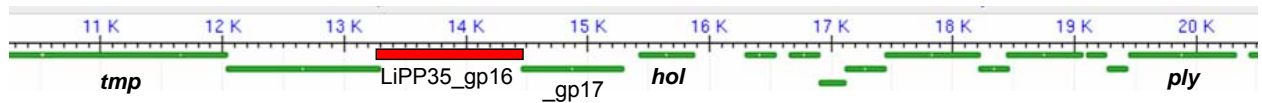


Listeria welshimeri Sv 6b str. SLCC5334:



B.

P35:



A511:

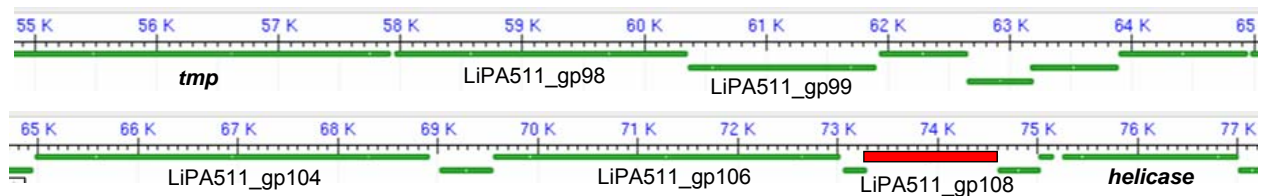


Abb. 3.1 (vorherige Seite) Genomabschnitt zwischen *tmp*-Gen und Lysekassette (falls vorhanden) verschiedener *Listeria* Phagen.

(A) *Listeria* Phagen mit Basisplatten-Genen zwischen dem *tmp*-Gen und der Lysekassette (*hol*-Gen und *ply*-Gen) (A006, A118, A500, PSA, B025, B054 und der phagen-ähnliche Genomabschnitt aus *Listeria welshimeri* Sv 6b), (B) *Listeria* Phagen, die einen von A abweichenden Genomaufbau aufweisen (P35 und A511). Benannte Genprodukte wurden nach Testablauf 3.1.2 heterolog in *E. coli* exprimiert, angereichert und auf *Listeria* Bindung getestet. Genprodukte, die Bindung an *Listeria* zeigten, wurden rot markiert. Die Genomabschnitte der jeweiligen Phagen wurden aus NCBI kopiert und anschliessend bearbeitet (Nukleotidsequenz, Format: Graphik; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/157325422?report=graph&from=1&to=7449>). *tmp*: *tape measure* Protein, *hol*: Holin, *ply*: Endolysin.

3.1.3.1 *Listeria* Phagen A006, A118, A500, B025, B054 und PSA

Die putativen Basisplattengene dieser *Listeria* Phagen sitzen zwischen dem *tmp*-Gen und dem *hol*-Gen (Abb. 3.1). In diesem Bereich befinden sich bei A006 3 ORFs, bei A118, A500 und PSA 7 ORFs und bei B025 8 ORFs. Der *Listeria* Phage mit den meisten Genen in dieser Region ist B054 mit 13 ORFs. Innerhalb dieser Basisplattengene sind schwache Homologien zwischen A118, A500, B025, B054 und PSA vorhanden (Dorscht *et al.*, 2009). Zu Genen des *Listeria* Phagen A006 wurden in dieser Region keine Homologien zu den bekannten *Listeria* Phagen gefunden.

Potentielle Homologien zu RBPs anderer Bakteriophagen wurden zu Beginn dieser Arbeit nur bei einem ORF des *Listeria* Phagen A006 gefunden. A006Gp16 ergab im BlastP (NCBI) 24 % identische AA (homologe AA: 39 %) zu dem RBP des *Bacillus anthracis* Phagen *Gamma* (Schuch und Fischetti, 2006).

Einen weiteren Anhaltspunkt bei der Suche nach den RBPs in diesen *Listeria* Phagen lieferte Loessner *et al.* (2000), der A118Gp20 als „putative long tail fibre Protein“ bezeichnete. Dieses Protein und das N-terminal stark homologe A500Gp20 wurden in einer kürzlich veröffentlichten Doktorarbeit unserer Arbeitsgruppe als RBP bestätigt (Bielmann, 2009).

Die restlichen, potentiellen Kandidaten wurden aufgrund ihrer Grösse, ihres theoretischen *pI* und ihrer Lage im Genom ausgewählt (siehe Tab. 3.2 auf Seite 55).

Die Gene wurden nach dem unter 3.1.2 beschriebenen Testablauf amplifiziert und kloniert. Die rekombinanten Proteine wurden exprimiert und angereichert, sowie auf *Listeria* Bindung getestet.

Die potentiellen RBP-Gene der *Listeria* Phagen A118 und A500 wurden aus dem jeweiligen Phagengenom amplifiziert. Dagegen wurden die RBP-Gene der Phagen A006, B025, B054 und PSA aus dem Genom lysogenen *Listeria* Stämmen amplifiziert. Die Homologie dieser Genprodukte zu den Originalphagenproteinen wird in Tabelle 3.2 angegeben.

Nach Klonierung der Gene in den jeweiligen Vektor wurden A006Gp16-2, A006Gp17, A118Gp19, A500Gp19, A500Gp20, PSAGp15, B025Gp19 und B054Gp26 löslich exprimiert und konnten damit über native Affinitätschromatographie gereinigt werden. Dabei wurden Proteinausbeuten zwischen 0,1 und 2 mg Protein pro Gramm Bakterienpellet (Nassgewicht) erhalten. Eine Ausnahme mit einer Ausbeute von 9 mg Protein pro Gramm Bakterienpellet (Nassgewicht) stellte A500Gp19 dar.

A118Gp20 wurde in NsHis-pE21a und HisJs-pQE30 einligiert und in HMS174(DE3) bzw. M15 kompetente Zellen transformiert. Beiden Varianten zeigten keine Expressionsbande auf Höhe des A118Gp20. Erst durch die Transformation des pET21a-NsHis-A118gp20 in BL21-CodonPlus-RIL wurde das Protein - allerdings komplett unlöslich - exprimiert. Auch A006Gp16-1, PSAGp14, B025Gp18 und B054Gp25 wurden in der unlöslichen Fraktion gebildet. Diese Proteine wurden aus einem Teil der *Inclusion bodies* rückgefaltet. Dabei wurden hochgerechnet Proteinausbeuten von 0,03 – 1 mg pro Gramm Bakterienpellet (Nassgewicht) erhalten. B054Gp25 konnte auf diesem Weg nicht gereinigt werden.

Die Proteinpräparationen wurden im Anschluss zur magnetischen Separation von lebenden *Listeria* Zellen eingesetzt. Dabei zeigten A006Gp17, A118Gp19, A500Gp19, B025Gp19, B054Gp26 und PSAGp15 eine Wechselwirkung mit *Listeria* Zellen. Mit HisJs-A006Gp17, Js-A118Gp19, HisJs-A500Gp19 wurden Bindeeffizienzen von > 80 % relativ zu den insgesamt gefundenen Zellen in der magnetischen Separation erzielt. Die Proteine HisJs-A118Gp19, HisJs/NsHis-B025Gp19, HisJs-B054Gp26 und Js-PSAGp15 zeigten mit maximalen Bindeeffizienzen von weniger als 50 % sehr schwache Bindeeigenschaften. Die Bindung von HisJs-A118Gp19 scheint durch den His-Tag beeinflusst zu werden, da das Protein ohne His-Tag (Js-A118Gp19) sehr gute Bindeeffizienzen aufweist.

Die bei Biemann (2009) als RBP beschriebenen Proteine GFP-A118Gp20 bzw. GFP-A500Gp20 zeigen in diesen Proteinpräparationen bzw. diesem Testformat ohne Fusion an GFP keine spezifische Bindung an *Listeria*.

A118Gp20 wurde mit NS-Tag bzw. Js-Tag unlöslich exprimiert und daher aus *inclusion bodies* rückgefaltet. Bei dieser Art von Reinigung werden die Proteine nach vollständiger Denaturierung rückgefaltet. Dabei kann der native Zustand des Proteins oder fehlgefaltetes Protein gebildet werden (Rudolph und Lilie, 1996). Es ist damit bei der Proteinpräparation von A118Gp20 nicht sicher gestellt, dass das Protein seine native Tertiärstruktur eingenommen hat. Es könnte demnach sein, dass A118Gp20 dieser Präparation keine Bindung an *Listeria* Zellen zeigt, weil es nicht in einer funktionsfähigen Form vorliegt.

Js-A500Gp20 wurde zu einem sehr geringen Anteil in der löslichen Fraktion exprimiert und konnte daher über native Affinitätschromatographie gereinigt werden. Eine phagenspezifische Bindung (*Listeria* der Sv-Gruppe 4; Loessner und Busse, 1990) wurde allerdings auch bei dieser Proteinpräparation in der magnetischen Separation nicht beobachtet. A500Gp20 dieser Präparation zeigte jedoch eine schwache Bindung an mehrere *Listeria* Stämme der Sv-Gruppe 3 (11 von 18 untersuchten Stämmen). Vermutlich liegt auch Js-A500Gp20 nicht in der nativen und damit funktionsfähigen Form vor. Bei dieser Präparation könnte z.B. der N-terminale Js-Tag die korrekte Faltung des Proteins behindern.

Bei Biemann (2009) wurde die Bindung von GFP-A118/A500Gp20 über ein anderes Testformat nachgewiesen. In dieser Arbeit wurde eine Kolo-kalisation von beiden Proteinen an *Listeria monocytogenes* Sv 1/2 bzw. Sv 4b gezeigt. Im Unterschied dazu wurden die Proteine in der vorliegenden Arbeit auf magnetischen Partikeln immobilisiert zum *Listeria* Nachweis eingesetzt. Die Immobilisierung der Proteine an einer Festphase in diesem Testformat könnte z.B. ebenfalls die Bindung der Proteine an die Zellen verhindern.

Hinsichtlich der Stabilität der verschiedenen Präparation zeigten sich Unterschiede. Während mit A006Gp17, A118Gp19, A500Gp19, B054Gp26 und PSAGp15 nach längerer Lagerung der Ansätze bei 4 °C kein Abfall der Bindeaktivität festzustellen war, zeigte die Präparation von B025Gp19 nach einer Lagerung von einer Woche bei 4°C keine Bindeaktivität mehr. Auch über SDS-PAGE konnte das Protein nicht mehr nachgewiesen werden. Dies spricht für einen proteolytischen Abbau des Zielproteins.

3.1.3.1.1 RBP aus *Listeria welshimeri* sv 6b

Bei einigen RBPs von Bakteriophagen Gram-negativer Bakterien ist bekannt, dass die Domäne, die die Bindung an die Basisplatte vermittelt, N-terminal liegt und die Domäne, die die wirtsspezifische Bindung vermittelt, von zentralen oder C-terminalen Bereichen gebildet wird (Freiberg *et al.*, 2003; Thomassen *et al.*, 2003; Barbirz *et al.*, 2008; Walter *et al.*, 2008). Dies könnte sich bei den RBPs der *Listeria* Phagen ähnlich verhalten. Aus diesem Grund war der ORF Lwe1237 im Genom von *Listeria welshimeri* Sv 6b (SLCC5334) interessant. Dieser wird als Phagen-verwandtes Gen beschrieben und die daraus abgeleitete AA-Sequenz zeigt signifikante Homologie zu PSAGp15, das als Bindeprotein identifiziert worden war. N-terminal [1 – 245 von 367 AA] sind diese zueinander zu 86 % identisch. Im C-terminalen Bereich (245 – 367 AA) zeigen sie zueinander keine signifikanten Homologien. Dies könnte auf ein Bindeprotein mit einem anderen Bindepektrum hindeuten, als das von PSAGp15. Das Gen, das Lwe1237 kodiert, liegt ebenfalls zwischen einem *tmp*-Gen und einem *hol*-Gen (Abb. 3.1).

Nach Expression, Anreicherung und Bindetest des Lwe1237 nach Testablauf 3.1.2, wurde auch für dieses Protein eine Wechselwirkung mit *Listeria* beobachtet. Es konnte in grossen Mengen löslich exprimiert werden und bindet spezifisch an *Listeria* Zellen mit einer maximalen Bindeeffizienz von > 80 % relativ zu den insgesamt wieder gefundenen Zellen (siehe Tab. 3.3 auf Seite 55).

3.1.3.2 *Listeria* Phage P35

Bei diesem Phagen ist der Genombereich zwischen dem *tmp*-Gen und dem *ply*-Gen anders aufgebaut als bei oben genannten *Listeria* Phagen. Es befinden sich zwischen dem *hol*-Gen und dem *ply*-Gen, die in den meisten anderen *Listeria* Phagenengenomen direkt hintereinander liegen, mehrere ORFs, die gemäss den angelegten Kriterien (3.1.1) für RBPs kodieren könnten (Dorscht *et al.*, 2009). Da die bisher identifizierten RBP-Gene alle vor dem *hol*-Gen liegen, wurden zuerst die Gene, die zwischen dem *tmp*-Gen und dem *hol*-Gen (LiPP35_Gp16 und Gp17) liegen, wie im Testablauf unter 3.1.2 beschrieben, untersucht (Tab. 3.3). Beide Gene wurden kloniert und die Proteine in *E. coli* exprimiert. Beide Genprodukte wurden zum Teil löslich exprimiert. Eine erfolgreiche Reinigung über Affinitätschromatographie wurde jedoch nur bei P35Gp16 erreicht. Dieses Genprodukt wurde im folgenden Bindetest als ein potentielles RBP des *Listeria*

Phagen P35 identifiziert. Daraufhin wurden keine weiteren Untersuchungen mit P35Gp17 durchgeführt.

3.1.3.3 *Listeria* Phage A511

Im Genom von A511 befinden sich zwischen dem putativen *tmp*-Gen und dem Ende der „späten“ Gene weder ein *hol*-Gen noch ein *ply*-Gen (Abb. 3.1; Klumpp *et al.*, 2008). Das Gen des Endolysins (A511Gp79) liegt im A511 vor dem *tmp*-Gen (A511Gp97), wogegen das *hol*-Gen noch nicht eindeutig identifiziert werden konnte (Klumpp *et al.*, 2008). Die „späten“ Gene enden in diesem Phagen mit 4 ORFs unbekannter Funktion denen sich die „frühen“ Gene für DNA Replikation und Transkription anschliessen, die mit dem *helicase*-Gen beginnen (Klumpp *et al.*, 2008). In dem Bereich zwischen dem *tmp*-Gen und dem *helicase*-Gen wurden 13 offene Leserahmen beschrieben.

Innerhalb dieser Leserahmen wurde LiPA511_Gp99 als „putative tail fibre“ Gen annotiert (Klumpp *et al.*, 2008), daher wurden zunächst die Gene LiPA511Gp98 und LiPA511Gp99 in die Untersuchung mit einbezogen. Ein anderer Hinweis auf den Genomort des RBP-Gens wurde durch homologe AA (42 %) von A511Gp103 (LiPA511_Gp103) zu einem „baseplate J family protein“ aus *Acidiphilium cryptum* JF-5 gefunden. Das Gen des „baseplate J“ Proteins des Phagen P2 liegt in der Genomkassette „WVJI“, gefolgt von den Genen, die für die tail fibre H und G kodieren (Haggard-Ljungquist *et al.*, 1995). Bei ähnlichem Genomaufbau in A511 würden die RBP-Gene hinter LiPA511_Gp103 liegen. Es wurden also zusätzlich die Genprodukte der drei folgenden Leserahmen (LiPA511_Gp104, Gp106 und Gp108), die grösser als 20 kD sind, wie im Testablauf unter 3.1.2 beschrieben, untersucht (siehe Tab. 3.3 auf Seite 55). Bei den Tests erwies sich der Grossteil der Genprodukte als schlecht exprimierbar und wenig löslich (A511Gp104 und Gp106: 0%, Gp108: 20 - 80 %). A511Gp108 wurde über Affinitätschromatographie gereinigt, wogegen A511Gp104 und Gp106 aus den *Inclusion bodies* rückgefaltet werden mussten. Anschließend wurden die Proteine auf *Listeria* Bindung untersucht. Dabei wurde das Genprodukt NsHis-A511Gp108 (Gen: LiPA511_Gp108), mit einer maximalen Bindeeffizienz von > 80 % relativ zu den insgesamt gefundenen Zellen in der magnetischen Separation, als RBP identifiziert. Dieses RBP stellte sich jedoch als schwierig in der Handhabung heraus.

3.1.3.3.1 A511Gp108

Für die umfangreichen Testungen der Bindeeigenschaften des A511Gp108 musste dieses mehrfach nachproduziert werden. Dabei zeigte sich im direkten Vergleich, dass mit den nachproduzierten Chargen nur eine Bindeeffizienz von weniger als 50 % relativ zu den insgesamt wieder gefundenen Zellen erreicht werden konnte, anstatt einer Effizienz von 80 %, wie sie mit der ersten Charge erreicht worden war. Bei genauer Überprüfung der jeweiligen Expressions- und Reinigungsbedingungen wurde festgestellt, dass als einziger Unterschied zu der ersten Proteincharge eine andere Mediencharge für die weiteren Proteinchargen verwendet worden war (Medienkomponenten der ersten Proteincharge sind nicht mehr kommerziell erhältlich). Während der Expression der ersten Charge wurde im AnzuchtKolben ein schwärzlicher Niederschlag festgestellt, der bei nachfolgenden Expressionschargen nicht mehr zu finden war. Es wurde vermutet, dass es sich bei dem Niederschlag um unlösliche Metallverbindungen handeln könnte. Metallionen sind als Bestandteil von RBPs in der Literatur beschrieben. So komplexiert das RBP p12 aus dem *E. coli* Phagen T4 zum Beispiel Zink (Thomassen *et al.*, 2003). Um zu ermitteln, ob Metallionen auch bei der Bindeaktivität des A511Gp108 eine Rolle spielen, wurden die Bindeeigenschaften nach Expression des Proteins bei Anwesenheit von Metallionen untersucht. Hierfür wurde bei einer neuen Expression des A511Gp108 eine Mischung aus Metallionen, die für das Wachstum von *E. coli* Kulturen essentiell sind, beigemischt (2.4.4). Nach Proteinreinigung und einem darauf folgenden Bindetest (siehe Testablauf 3.1.2) konnte die Bindeeffizienz wieder auf > 80 % angehoben werden.

Weitere Untersuchungen zur Identifizierung des Metallions, das an der Bindung beteiligt sein könnte, waren aus zeitlichen Gründen nicht möglich.

3.1.3.4 Zusammenfassung

Insgesamt wurden aus 8 bekannten *Listeria* Phagen und aus einem phagen-ähnlichem Genomabschnitt aus *Listeria welshimeri* Sv 6b Proteine identifiziert, die eine Bindung an *Listeria* zeigen. In Abb. 3.1 sind die untersuchten Gene im Genomkontext gezeigt. In Tab. 3.2 sind die untersuchten Gene, die berechneten Molekulargewichte der daraus abgeleiteten Proteine und ihr theoretischer pI sowie einige Ergebnisse des Testablaufs nach 3.1.2

zusammengestellt. Die Gene, deren Produkte an Listerien binden, sind in der Abbildung und in der Tabelle rot markiert.

Da alle in dieser Arbeit identifizierten Bindeproteine eine spezifische Bindung an *Listeria* aufweisen wurde untersucht, ob diese Proteine oder Gruppen davon gemeinsame Sequenzmotive besitzen, die auf ihre Funktion hinweisen. Solche Motive könnten als Ausgangspunkt für eine zukünftige Suche nach Bindeproteinen unbekannter Phagen verwendet werden. Dafür wurden vergleichende Analysen der Sequenzen im ClustalX und im BlastP von NCBI durchgeführt.

Es zeigte sich, dass es kein Motiv gibt, das in allen hier untersuchten Bindeproteinen vorhanden ist. Manche Proteine weisen allerdings ein gemeinsames Motiv auf, über das sie in eine Gruppe zusammengefasst werden konnten.

Die Bindeproteine A511Gp108, B025Gp19, Lwe1237 und PSAGp15 wurde aufgrund des zentral in den Genen vorliegenden Sequenzmotivs „QAKAD_AL“ zu einer Gruppe zusammengefasst (Abb. 3.2). Dieses Sequenzmotiv wurde auch bei den von Biemann (2009) identifizierten RBPs A118Gp20 und A500Gp20 gefunden. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Proteine A118Gp20, A500Gp20, A511Gp108, B025Gp19, Lwe1237 und PSAGp15 dieselbe Funktion im jeweiligen Phagen ausüben. Es könnte sich bei diesen Proteinen also ebenfalls um die RBPs der jeweiligen Phagen handeln.

A118Gp20	GSQAKADSA LN SAK---AYTDSKMSDYGAWINVPLASGYSTGDSNTPQYRLVAKQTSTGL	275
A500Gp20	SAQAKADKALADAK---TFE--LASAVQSVTLTPKNGFVASQPLVARYIKFGNRFLVIV	274
PSAGp15	GAQAKADKALADAK---AFFELSSSVQS-VTLTPKNGFVASQPLIARYIKFGNRFLVIV	292
Lwe1237	GAQAKADKALNDAKVDAALYEPKITVTAWAAPALKTGFSILSSAYPPPLYRLKGSTLQLK	297
B025Gp19	GAQAKADQALADAK----ADQAKANQALIDANIYTDNSSKEKLVWSGSSYFLDTHTF	334
A511Gp108	GSQAKADKALADGKTYTDSVNSALQAIQNSAQMYKLTADDGKPIDASAMATPPTSVA	207

Abb. 3.2 Sequenzmotiv innerhalb der Aminosäuresequenz verschiedener Bindeproteine.

Die Bindeproteine A118Gp19 bzw. A500Gp19 zeigen dieses Sequenzmotiv nicht. Das deutet darauf hin, dass sie bei der Phagenadsorption eine andere Funktion ausüben als die RBPs. Sie könnten wie von Biemann (2009) beschrieben die LSPs der Phagen A118 und A500 bilden, die neben ihrer hydrolytischen Aktivität eine Binfunktion aufweisen. Lytische Phagenenzyme mit einer enzymatisch aktiven Domäne und einer Zellbindedomäne wurden für verschiedene Phagen bereits mit den Endolysinen beschrieben (Loessner, 2005).

Innerhalb der abgeleiteten AA-Sequenz von A006Gp17, B054Gp26 und P35Gp16 konnte kein übereinstimmendes Sequenzmotiv gefunden werden.

Tab. 3.2 (nächste Seite) Zusammenfassung aller untersuchten RBP-Kandidaten.

Herkunft, Gen- und Proteinnamen, Grösse, theoretische pI und Ähnlichkeit zur Originalphagensequenz der Proteine und Ergebnisse der Testung, wie in 3.1.2 beschrieben, sind aufgelistet. Die Sequenzdaten bei Genen, die von der Originalphagensequenz abweichen, sind in Appendix IV aufgelistet. Rote Balken markieren RBP-Gene, deren Genprodukte im Folgenden weiter charakterisiert werden. AA: Aminosäuren, Unbe.: Unbekannt, Ns-Tag: N-terminaler *Strep*-Tag-II.

Die Bindung der potentiellen RBP-Proteine an die *Listeria* Zellen wurde in der magnetischen Separation bzw. im Peroxidasetest untersucht:

+: Bindeeffizienz > 50 % relativ zu den insgesamt wieder gefundenen Zellen,

(+): Bindeeffizienz zwischen 10 und 50 %,

-: kein Signal im Peroxidasetest oder Bindeeffizienz < 10 %.

1: Anteil homologer Aminosäuren bezogen auf die Originalsequenz des Phagenproteins, Angabe nur bei Gen-Amplifikaten aus *Listeria* Genomen

2: Theoretisch berechneter pI

3: Anteil des Zielproteins am Gesamtprotein der löslichen Fraktion

4: Aus 1 g Bakterienpellet (Nassgewicht)

5: schwache Wechselwirkung mit *Listeria* Stämmen der Sv-Gruppen 3 und 7

Phage	Gen	Protein	Protein (NCBI) oder Quelle	homologe AA (in %)	AA	Grösse (in kD)	pI ²	Vektor	Löslichkeit (in % ³)	Reinigung	Ausbeute (in mg ⁴)	Bindung
A006	Lmono_gp16-1	A006 Gp16-1	<i>L. monocytogenes</i> Sv 1/2a (ProCC S1521)	98	522	58,5	5,3	NsHis-pET21	0	Rückfaltung	~ 1	-
	Lmono_gp16-2	A006 Gp16-2	<i>L. monocytogenes</i> Sv 3c (ProCC S1138)	98	522	58,5	5,3	HisJs-pQE30	~ 10	Ni-Sephrose	~ 0,6	-
	Lmono_gp17	A006 Gp17	<i>L. monocytogenes</i> (ProCC S2562)	100	721	78,8	4,8	HisJs-pQE30	~ 50	Ni-Sephrose	~ 1	+
A118	LIPA118_gp19	A118 Gp19	NP_463480	---	342	37,2	5,2	Js-pQE30 HisJs-pQE30	~ 90	Ni-Sephrose Streptavidin-Mutein	~ 0,1	+
	LIPA118_gp20	A118 Gp20	NP_463481	---	357	39,2	4,9	NsHis-pET21a	~ 0	Rückfaltung	~ 0,03	-
A500	LIPA500_gp19	A500 Gp19	AA52806	---	341	37,3	4,9	HisJs-pQE30	~ 90	Ni-Sephrose	~ 9	+
	LIPA500_gp20	A500 Gp20	AA52807	---	355	38,9	5,0	HisJs-pQE30 Js-pQE30	0 ~ 10	Rückfaltung Streptavidin-Mutein	~ 0,2 ~ 0,1	(+) (+)
PSA	Lmono_gp14	PSA Gp14	<i>L. monocytogenes</i> sv 4b (ProCC S776)	99	708	78,5	5,1	NsHis-pET21	0	Rückfaltung	~ 0,7	-
	Lmono_gp15	PSA Gp15	<i>L. monocytogenes</i> sv 4b (ProCC S776)	100	373	41,0	4,6	HisJs-pQE30 Js-pQE30	0 ~ 40	--- Streptavidin-Mutein	--- ~ 0,4	--- (+)
B025	Linno_gp18	B025 Gp18	<i>L. innocua</i> sv 4b (ProCC S1005)	99	639	71,1	5,5	NsHis-pET21	0	Rückfaltung	~ 0,8	-
	Lmono_gp19	B025 Gp19	<i>L. monocytogenes</i> sv 1/2 (ProCC S1095)	100	424	47,0	5,3	NsHis-pET21 HisJs-pQE30	0 ~ 10	Rückfaltung Ni-Sephrose	~ 0,18 ~ 0,3	(+) (+)

Phage	Gen	Protein	Protein (NCBI) oder Quelle	homologe AA (in %)	AA	Grösse (in kD)	pI ²	Vektor	Löslichkeit (in % ³)	Reinigung	Ausbeute (in mg ⁴)	Bindung
B054	Linno gp25	B045 Gp25	<i>L. innocua</i> sv 6a (ProCC S1148)	99	213	23,0	5,3	HisJs- pQE30	0	---	---	---
	Linno gp26	B054 Gp26	<i>L. inno</i> sv 6a (ProCC S1148)	99	242	26,3	5,3	HisJs- pQE30	~ 10 (bei RT)	Ni- Sepharose	~ 1,7	(+)
P35	LIPP35 gp16	P35 Gp16	AA Y53201	---	387	43,7	8,3	HisJs- pQE30	~ 90	Ni- Sepharose	~ 15	+
	LIPP35 gp17	P35 Gp17	AA Y53202	---	278	30,6	9,1 6	HisJs- pQE30	~ 30	nicht möglich	---	---
A511	LIPA511 gp98	A511 Gp98	YP_001468478	---	795	88,5	5,1	NsHis- pET21	~ 10	Ni- Sepharose	~ 0,5	-
	LIPA511 gp99	A511 Gp99	YP_001468479	---	510	56,7	4,8	NsHis- pET21	~ 20	Ni- Sepharose	~ 0,5	-
	LIPA511 gp104	A511 Gp104	YP_001468484	---	1309	145,9	4,9	NsHis- pET21	0	Rückfaltung	~ 1,6	-
	LIPA511 gp106	A511 Gp106	YP_001468486	---	1151	128,1	5,3	NsHis- pET21	0	Rückfaltung	~ 1,4	-
	LIPA511 gp108	A511 Gp108	YP_001468488	---	430	46,7	6,1	NsHis- pET21 HisJs- pQE30 Js-pQE30	~ 20 ~ 80 ~ 50	Ni- Sepharose Ni- Sepharose Streptavidin- Mutein	~ 2 ~ 2,5 ~ 2,3	+ - -
Unbe.	lwe1237	Lwe 1237	<i>L. welshimeri</i> (ATCC 35897)	100	463	50,2	5,0	HisJs- pQE30	~ 70	Ni- Sepharose	~ 4	+

3.2 Charakterisierung der Bindeproteine

Im Anschluss an die Identifizierung der insgesamt neun potentiellen Bindeproteine, wurden diese genauer charakterisiert. Dabei wurden die Proteine hinsichtlich ihrer Eignung zum *Listeria* Nachweis nach folgenden Kriterien bewertet:

- die Abdeckung aller Sv-Gruppen mit einem Bindeprotein oder einer Mischung verschiedener Bindeproteine
- ihre Wechselwirkung mit Nicht-*Listeria* Stämmen, die häufig in Lebensmitteln und Umweltproben vorkommen
- ihre Bindestärke hinsichtlich ihrer Eignung als Fänger- bzw. Detektionsmolekül

Zur Auswahl passender Bindeproteine für einen *Listeria* Nachweis, wurden zunächst ihre Bindespektren innerhalb des Genus *Listeria* hinsichtlich einer Abdeckung aller Sv-Gruppen bewertet. Im Anschluss wurden die Bindespektren ausserhalb des Genus *Listeria* hinsichtlich einer Genus-spezifischen *Listeria* Bindung untersucht. Anschliessend sollten ein oder mehrere Bindeproteine, mit denen möglichst Stämme jeder Sv-Gruppen gebunden werden, weiter charakterisiert werden.

3.2.1 Bindespektren der Bindeproteine

Bisher wurden neun mögliche Bindeproteine identifiziert, wobei acht aus bekannten *Listeria* Phagen stammen. Von diesen Phagen (A006, A118, A500, A511, B025, B054, P35 und PSA) sind die Lysespektren beschrieben (Tab. 3.3). Bei A511Gp108 wurde gemäss der Lyse des Phagens von einer Bindung an *Listeria* Stämme unabhängig von Sv und Spezies ausgegangen. Bei A006Gp17, A118Gp19 und P35Gp17 wurde eine Wechselwirkung mit Stämmen der Sv-Gruppe 1/2 vermutet. Eine Wechselwirkung mit Stämmen der Sv-Gruppen 4, 5 und/oder 6 wurde von A500Gp19, B025Gp19, B054Gp26 und PSAGp15 vermutet, da die jeweiligen Phagen Stämme dieser Sv-Gruppen lysieren. Für Lwe1237 wurde mindestens eine Bindung an *Listeria welshimeri* mit Sv 6b angenommen, da dessen Sequenz in einem phagen-ähnlichen Genomabschnitt von *Listeria welshimeri* Sv 6b entdeckt wurde.

Eine Wechselwirkung ausserhalb des Genus *Listeria* war nicht bekannt, da bisher bekannte *Listeria* Phagen nur Stämme innerhalb des Genus lysieren (Loessner und Calendar, 2006; siehe S. 63).

Im Folgenden wurden die Wirtsspektren innerhalb und ausserhalb des Genus *Listeria* experimentell untersucht.

3.2.1.1 Wechselwirkung innerhalb des Genus *Listeria*

Die Bindeeigenschaften der Bindeproteine innerhalb der Gattung *Listeria* wurden mit Hilfe der magnetischen Separation nach 2.5.1.1 untersucht. Bei P35Gp16 und A500Gp19 wurde die Bindung zum Teil im Sandwich-ELISA, wie unter 2.5.1.3 beschrieben, getestet. In Appendix II sind alle untersuchten Stämme mit den Einzelergebnissen zu den jeweiligen Proteinen aufgeführt und in Abb. 3.3 sind die Ergebnisse zusammengefasst dargestellt.

- **A006Gp17:** Dieses Protein zeigte eine starke Bindung (Bindeeffizienz > 50 % relativ zu den insgesamt gefundenen Zellen) an alle der 22 untersuchten *Listeria* Stämme der Sv-Gruppe 1/2. Mit den untersuchten Stämmen (11) ausserhalb dieser Sv-Gruppe wechselwirkt es nicht.
- **A118Gp19:** Dieses Protein wechselwirkt mit allen untersuchten *Listeria* Stämmen der Sv-Gruppe 1/2 (22), zeigte jedoch an zwei Stämmen nur eine schwache Bindung (Bindeeffizienz zwischen 10 und 50 %). An untersuchte Stämme der Sv-Gruppe 3 und 7 (9) sowie an Stämme der anderen Sv-Gruppen (28) bindet es nicht.
- **P35Gp16:** Mit P35Gp16 wurden insgesamt 17 Stämme aus der Sv-Gruppe 1/2 untersucht. Davon bindet es stark an 12 Stämme, an weitere drei Stämme war die Bindung schwach und mit zwei der getesteten Stämme war keine Wechselwirkung festzustellen (Bindeeffizienz < 10 %). Bei den Untersuchungen ausserhalb dieser Sv-Gruppe wurde eine sehr schwache Wechselwirkung mit zwei Stämmen des Sv 5 von 5 untersuchten Stämmen festgestellt.
- **A500Gp19:** Mit A500Gp19 wurden insgesamt 20 *Listeria* Stämme der Sv-Gruppe 4 untersucht. Davon zeigten nur die *Listeria* Stämme mit dem Sv 4b (7) und 4c (2) eine durchgängig starke Wechselwirkung. Innerhalb der Sv 4a (1 von 3) und 4ab (2 von 3) werden nur vereinzelt Stämme gebunden. Mit keinem der untersuchten *Listeria* Stämme der Sv 4d (3) und 4e (2) zeigte das

Protein eine Wechselwirkung. Von den drei untersuchten *Listeria* Stämmen des Sv 6a bindet das A500Gp19 an zwei dieser Stämme.

- **PSAGp15:** Dieses Protein bindet wie A500Gp19 alle untersuchten *Listeria* Stämme des Sv 4b (5), allerdings nur mit einer schwachen Bindeeffizienz.
- **B025Gp19:** Dieses Protein bindet an drei *Listeria* Stämme innerhalb der Sv-Gruppen 4, 5 und 6 von insgesamt 11 untersuchten Stämmen. Dabei zeigte es jedoch nur an einen Stamm mit Sv 6b und an einen Stamm mit Sv 5 eine starke Bindung mit ungefähr 50 % Bindeeffizienz. An den restlichen Stämme (Sv 4a) bindet es sehr schwach.
- **B054Gp26:** Dieses Protein wechselwirkt mit 8 der insgesamt 12 untersuchten *Listeria* Stämme der Sv-Gruppen 4, 5 und 6. Davon zeigte es an 7 Stämme (Sv 4a, 5 und 6a) eine sehr schwache und an einen Stamm (Sv 5) eine starke Bindung.

Sv	A006Gp17 (HisJs)	A118Gp19 (Js)	P35Gp16 (HisJs)	A500Gp19 (HisJs)	PSAGp15 (Js)	B025Gp19 (NsHis)	B054Gp26 (HisJs)	A511Gp108 (NsHis)	Lwe1237 (HisJs)
1/2a	9/9	8(1)/9	6(1)/8					2/3	0/2
1/2b	6/6	6/6	2(2)/5	0/1				1/3	0/2
1/2c	7/7	6(1)/7	4/4	0/1	0/1	0/1	0/1	2/2	0/2
3a	0/4	0/2	0/3	0/1			0/1	0/2	0/3
3b	0/2	0/4	0/3	0/1		0/1	0/1	0/4	0/2
3c	0/1	0/2	0/3	0/2				0/2	0/1
4a		0/2	0/2	1/3		(1)/2	(1)/1		3/3
4ab		0/2	0/2	2/3		0/2		1/1	2/2
4b	0/1	0/7	0/1	7/7	(5)/5	0/1	0/1	7/7	6/6
4c		0/4	0/2	2/2	0/1			2/2	2/2
4d		0/2	0/2	0/3				2/2	(3)/3
4e		0/1	0/2	0/2				1/1	(2)/2
5	0/1	0/1	(2)/4			1/2	1(5)/7	8/8	8/8
6a	0/1	0/5	0/2	2/3		0/1	(1)/2	5/5	5/5
6b		0/4	0/3			1/3		5/5	4/4
7	0/1	0/1	0/1				0/1	0/1	0/1

Abb. 3.3 Bindspektren verschiedener Bindeproteine innerhalb des Genus *Listeria*.

Die Bindspektren wurden mit der magnetische Separation (2.5.1.1) oder dem Sandwich-ELISA (2.5.1.3) erstellt. x/y: x Anzahl stark gebundener *Listeria* Stämme (Bindeeffizienz > 50 % relativ zu den insgesamt gefundenen Zellen), y Anzahl der insgesamt getesteten Stämme, (x): Anzahl schwachgebundener Stämme (Bindeeffizienz von 10 – 50 %). Grün: alle getesteten *Listeria* Stämme dieses Sv werden durchgängig stark gebunden, hellgrün: alle getesteten *Listeria* Stämme dieses Sv werden schwach oder stark gebunden, grau/grün straffiert: nicht alle Stämme dieser Sv-Gruppe werden gebunden, grau: keine der getesteten *Listeria* Stämme dieses Sv werden gebunden. Sv: Serovar

- **A511Gp108:** Für dieses Protein wurde eine durchgängige Bindung aller untersuchten Stämme der Sv-Gruppen 4, 5 und 6 beobachtet. Innerhalb der Sv-Gruppe 1/2 bindet es nicht alle untersuchten Stämme.

Im Einzelnen wurden insgesamt 48 *Listeria* Stämmen innerhalb der *Listeria* Sv untersucht. Dabei zeigte es eine starke Bindung an alle getesteten *Listeria* Stämme der Sv 4ab (1), 4b (7), 4c (2), 4d (2), 4e (1), 5 (8), 6a (5) und 6b (5). Innerhalb der Sv-Gruppe 1/2 wechselwirkt das Protein mit 6 von insgesamt 10 untersuchten Stämmen. An die untersuchten Stämme innerhalb der Sv-Gruppen 3 (8) und 7 (1) konnte keine Bindung des A511Gp108 festgestellt werden. Das A511Gp108 weist also ein breiteres Bindespektrum auf, als die bisher untersuchten Bindeproteine.

- **Lwe1237:** Dieses Protein bindet an alle untersuchten Stämme der Sv-Gruppen 4 (ausser schwach an Sv 4d und 4e), 5 und 6.

Bei den Untersuchungen mit diesem Protein wurden insgesamt 35 *Listeria* Stämme der Sv-Gruppen 4, 5 und 6 untersucht. Davon bindet es an die Sv 4a (3), 4ab (2), 4b (6), 4c (2), 5 (8), 6a (5) und 6b (4) mit starken Bindeeffizienzen. Mit den Stämmen des Sv 4d (3) und 4e (2) wechselwirkte das Protein schwach. An die zusätzlich untersuchten Stämme der Sv-Gruppen 1/2 (5), 3 (6) und 7 (1) konnte keine Bindung des Lwe1237 festgestellt werden. Dieses Protein weist demnach, ähnlich dem A511Gp108, ein breiteres Bindespektrum auf, als es bei den anderen Bindeproteinen beobachtet wurde.

Zur Kontrolle ob es sich bei den hier identifizierten Bindeproteinen um die Proteine handeln könnte, die die Wirtsspezifität des Phagen vermitteln, wurden die Bindespektren mit den Lysespektren der jeweiligen Phagen verglichen (Tab. 3.3).

Für die *Listeria* Phagen A006, A118 und P35 wird ein Wirtsspektrum innerhalb der Sv-Gruppe 1/2 beschrieben. Die jeweiligen untersuchten Proteine binden ebenfalls an Stämme dieser Sv-Gruppe. Daher könnten sie für die wirtsspezifische Bindung des Phagen an seinen Wirt verantwortlich sein.

A500Gp19 bindet an Stämme der Sv-Gruppe 4 und 6, wogegen das Wirtsspektrum des Phage A500 innerhalb der Sv-Gruppe 4 beschrieben wird. Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, dass Gp19 bei der Phagenadsorption nicht die wirtsspezifische Bindung vermittelt, sondern eine andere Funktion ausübt bei der ebenfalls eine Bindung benötigt wird.

Dies könnte mit der Funktionszuordnung der Gp19 Proteine der Phagen A118 und A500 von Biemann (2009) übereinstimmen. In dieser Arbeit wurden diese Proteine als lytische Strukturproteine im Phagenviron beschrieben. Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzanalysen der Gp19 Proteine sprechen dafür, dass sie nicht die Funktion des RBPs im Phagenpartikel übernehmen (3.1.3.4).

Die Bindeproteine der Phagen PSA, B025 und B054 binden sehr schwach an die hier untersuchten Stämme, daher wurden die Bindespektren nur mit wenigen Stämmen getestet. Die Bindespektren stimmen weitestgehend mit den Lysespektren der Phagen überein. Daher könnte es sich bei diesen Proteinen um die jeweiligen RBPs dieser Phagen handeln. Auch die Sequenzanalysen von PSAGp15 und B025Gp19 (3.1.3.4) sprechen für eine ähnliche Funktion wie die der Gp20 Proteine der Phagen A118 und A500. Diese Moleküle wurden von Biemann (2009) den RBPs zugeordnet. A511Gp108 weist ein breiteres Bindespektrum als die anderen Bindeproteine auf. Eine Sv-Gruppen unabhängige Bindung an alle *Listeria* Stämme, wie sie teilweise in der Literatur beschrieben wird (Loessner und Calendar, 2006), wurde allerdings nicht beobachtet. Daher wurde vermutet, dass der *Listeria* Phage A511 mehrere unterschiedliche Bindeproteine zur Phagenadsorption aufweisen könnte. Dies ist bei einigen Phagen Gram-negativer Bakterien, wie zum Beispiel bei dem Phagen K1-5 (Scholl *et al.*, 2001), der Fall. Um diese Möglichkeit bei dem *Listeria* Phagen A511 zu untersuchen, wurde das Lysespektrum des Phagen mit dem Bindespektrum des A511Gp108 verglichen. Dafür wurde ein Lysespektrum von A511 mit mehreren der *Listeria* Stämme erstellt, die im Bindespektrum für A511Gp108 untersucht wurden.

Beim Vergleich der Bindespektren des Proteins A511Gp108 mit dem Lysespektrum des *Listeria* Phagen A511 wurde festgestellt, dass die Lyse des Phagen und die Bindung des Bindeproteins bei 40 untersuchten *Listeria* Stämmen übereinstimmen. Allerdings bindet A511Gp108 an vier Stämme, die vom Phagen nicht lysiert werden. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass auch bei lytischen Phagen nicht jede Infektion erfolgreich verläuft. Die Adsorption ist bei der Lyse allerdings nur der erste Schritt von vielen Ereignissen, die vom Wirt inhibiert werden können.

Es werden also alle Stämme von A511Gp108 gebunden, die auch vom Phagen lysiert werden. Demnach könnte A511Gp108 das RBP des Phagen A511 bilden. Auch die Sequenzanalyse unter 3.1.3.4 spricht für die Funktion des RBP von A511Gp108, da dieses Protein durch ein Sequenzmotiv mit den Proteinen

A118/A500Gp20, PSAGp15 und B025Gp19 in eine Gruppe zusammengefasst werden kann.

Lwe1237 wurde in einer phagen-ähnlichen Sequenz von *Listeria welshimeri* Sv 6b identifiziert, daher kann dessen Bindespektrum mit keinem bekannten Phagen verglichen werden. Es kann allerdings über ein Sequenzmotiv mit den Proteinen A118/A500Gp20, A511Gp108, PSAGp15 und B025Gp19 in einer Gruppe zusammengefasst werden. Dies könnte dafür sprechen, dass es sich bei diesem Protein, wie bei den anderen Proteinen dieser Gruppe um ein RBP eines unbekanntes Prophagen handelt.

Während der Lyse ist die Phagenadsorption allerdings nur der erste Schritt von einer Reihe von Ereignissen. Die Lyse kann zum Beispiel trotz erfolgreicher Phagenadsorption über die Degradierung des Phagengenoms oder die Integration des Phagengenoms in das Wirtsgenom bei temperenten Phagen nicht erfolgen (Knippers, 2001; Guttman *et al.*, 2005). Daher ist das Lysespektrum der jeweiligen Phagen nur ein Anhaltspunkt für das tatsächliche Adsorptionsspektrum des Phagen. Um das tatsächliche Adsorptionsspektrum der Phagen zu ermitteln müsste der so genannte „pull down assay“ angewendet werden (Bielmann, 2009). Erst über die Ermittlung eines Adsorptionsspektrum der jeweiligen Phagen und den Vergleich mit den Bindespektren der hier identifizierten Proteinen könnte eine endgültige Aussage über eine Korrelation zwischen Phagenadsorption und Bindespektrum der jeweiligen Proteine getroffen werden.

Tab. 3.3 Phagenbindeproteine mit ihren Bindespektren. (): Bindung an einzelne Stämme dieses Serovars.

Phage	Wirtsspektrum	Referenz	Bindeprotein	Mögliches Bindespektrum
A511	breites Wirtsspektrum	Klumpp <i>et al.</i> , 2008	Gp108	teilweise 1/2; 4, 5, 6
A006	1/2	Dorscht <i>et al.</i> , 2009	Gp17	1/2
A118	1/2	Loessner, 2000	Gp19	1/2
P35	75 % aller 1/2 Stämme	Hodgson, 2000	Gp16	(1/2)
PSA	Sv 4b	Zimmer <i>et al.</i> , 2003	Gp15	4b
A500	4	Dorscht <i>et al.</i> , 2009	Gp19	4b, 4c, (4a), (4ab), (6a)
B025	5, 6	Dorscht <i>et al.</i> , 2009	Gp19	(4), (5), (6)
B054	5, 6	Dorscht <i>et al.</i> , 2009	Gp26	(4), (5), (6)
unbekannt	---	---	Lwe1237	4,5,6

3.2.1.2 Wechselwirkung ausserhalb des Genus *Listeria*

Zur Bestimmung der Wechselwirkung der möglichen Bindeproteine an Bakterien ausserhalb des Genus *Listeria* wurden Lebensmittel-relevante (Jay *et al.*, 2005), in LX-Medium wachsende und/oder zu *Listeria* nah verwandte Gram-positive Stämme (Garrity, 2005) untersucht. Eine Wechselwirkung der Proteine mit diesen Stämmen wurde mit Hilfe der magnetischen Separation nach 2.5.1.1 getestet. Verwendet wurden dabei nur Proteine, die alle Stämme mindestens einer Sv-Gruppe oder eines Sv stark (Bindeeffizienz > 50 % relativ zu den insgesamt gefundenen Zellen) binden (A006Gp17, A118Gp19, A500Gp19, A511Gp108 und Lwe1237). Die Einzelergebnisse dieser Testung sind in Appendix I zusammengefasst.

Jedes Protein wurde auf Kreuzreaktion mit mehr als 25 verschiedenen Spezies untersucht. Dabei zeigte kein Protein eine Bindung an die getesteten Nicht-*Listeria* Stämme.

Für einen Nachweis von *Listeria* spp. können die Sv-Gruppen 1/2, 4, 5 und 6 über eine Kombination verschiedener Proteine (A006Gp17, Lwe1237 und A511Gp108) abgedeckt werden. Da sich A511Gp108 als schwierig in der Handhabung herausgestellt hat (siehe 3.1.3.3.1, S. 53), wurden A006Gp17 und Lwe1237 weiter charakterisiert und auf ihre Eignung für den Einsatz zum *Listeria* Nachweis hin untersucht.

Für eine vollständige Abdeckung des Genus *Listeria* müssen zukünftig weitere RBPs identifiziert werden, die an die Sv 4d und 4e, sowie an die Sv-Gruppen 3 und 7 stark binden.

3.2.2 Homotrimere Struktur

Viele RBPs, wie zum Beispiel die RBPs der *Lactococcus*-Phagen TP901-1 und p2, sind im nativen Zustand Homotrimere (Ricagno *et al.*, 2006). Um zu ermitteln, ob auch die hier untersuchten Proteine A006Gp17 und Lwe1237 im nativen Zustand als Homotrimere vorliegen und ob das Zielprotein in einem einheitlichen Zustand vorliegt, wurde eine präparative Gelfiltration durchgeführt. Hierfür wurden Aliquots der Präparationen aus 3.1.3.1 einer Gelfiltration unterzogen und die gesammelten Fraktionen über SDS-PAGE und UV/VIS-Spektroskopie weiter untersucht.

Sowohl mit der Präparation des A006Gp17 als auch mit der des Lwe1237 wurden in der Gelfiltration jeweils zwei Hauptfraktionen erhalten (Tab. 3.4): zum einen eine Fraktion bei der Lauflänge, die dem Homotrimer entsprechen würde (Fraktion C), zum anderen eine Fraktion, die Proteinkomplexe grösser 600 kD hinweist (Fraktion B), da diese im Ausschlussvolumen der Säule laufen. Bei A006Gp17 wurde zusätzlich ein Peak beobachtet, der auf niedermolekulare Verunreinigungen der Proteinpräparation hindeutet. Dabei handelt es sich nicht um Proteine, da sich in der folgenden Analyse dieser Fraktion mittels SDS-PAGE keine Bande zeigte.

Tab. 3.4 Ergebnisse der präparativen Gelfiltration mit A006Gp17 und Lwe1237.

Die Durchführung der präparativen Gelfiltration erfolgte nach 2.5.2. Von A006Gp17 wurden insgesamt 2 mg und von Lwe1237 1,6 mg aufgetragen.

Protein	theoretische Grösse des Monomers (in kD)	Fraktion	Grösse (in kD)	Ergebnis
A006Gp17 (Tag: HisJs)	86	B	> 600	Aggregate
		C	278	Trimer
Lwe1237 (Tag: HisJs)	50	B	> 600	Aggregate
		C	174	Trimer

Je ein Aliquot der Fraktionen B und C beider RBP-Präparationen wurde über SDS-PAGE weiter analysiert. Zur Testung, ob sich in den Hauptpeaks SDS-resistentes trimeres Protein (King und Laemmli, 1971) befindet, wurde jede Probe hitzedenaturiert und nicht-hitzedenaturiert aufgetragen. Exemplarisch ist die SDS-PAGE mit Fraktionen des Lwe1237 abgebildet (Abb. 3.4). Dort ist in Spur 2 und 4 eine homogene Proteinbande bei etwa 50 kD zu erkennen. Dies spricht dafür, dass sich in beiden Fraktionen nur Lwe1237 befindet. Wurden die Proben vor Auftrag auf das SDS-Gel nicht hitzedenaturiert, finden sich mit beiden Fraktionen aus der Gelfiltration Banden grösser 120 kD (Abb. 3.4, Spur 3 und 5). Dies spricht dafür, dass in beiden Hauptfraktionen Lwe1237 als Homomultimeres vorliegt: in der Fraktion bei Trimergrösse vermutlich als Homotrimeres und in der Fraktion des Ausschlussvolumen als Homomultimer, das vermutlich zum Teil aus SDS-resistenten Homotrimeren besteht. Diese Homomere sind stabil gegenüber dem stark denaturierenden SDS und laufen daher im SDS-Gel nach Eigenladung und nicht nach Grössenstandard.

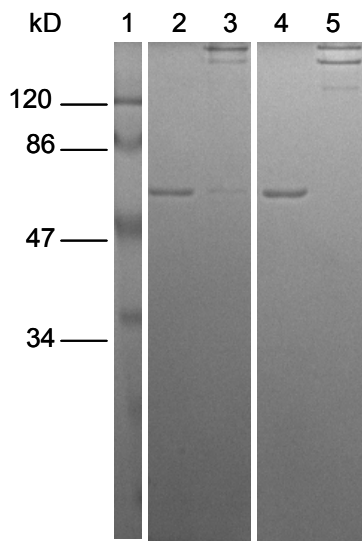


Abb. 3.4 SDS-PAGE der Lwe1237-Fractionen aus der präparativen Gelfiltration.

Analyse der Proteine auf einem 12 % (w/v) SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassiefärbung. Spur 1: Molekulargewichtsmarker, Spur 2 / 3: Aliquot der Fraktion des Ausschlussvolumens, hitzedenaturiert / nicht-hitzedenaturiert, Spur 4 / 5: Aliquot der Fraktion mit Trimergrösse, hitzedenaturiert / nicht-hitzedenaturiert.

Für A006Gp17 wurde ähnliches beobachtet. Auch hier zeigte sich bei der SDS-PAGE nach Hitzedenaturierung beider Fraktionen eine homogene Proteinbande (etwa 90 kD). Es handelt sich also auch bei A006Gp17 um eine Proteinlösung ohne signifikante Fremdprotein-Verunreinigung. Mit den Proben ohne Hitzedenaturierung fanden sich allerdings bei A006Gp17 nur in der Fraktion bei Trimergrösse, neben einer homogenen Bande bei etwa 90 kD, Banden > 120 kD. In der Fraktion des Ausschlussvolumens wurde nur diese homogene Proteinbande beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass in der Fraktion bei Trimergrösse ein homotrimeres Protein vorliegt, das stabil gegenüber dem stark denaturierenden SDS ist. Die Proteine im Ausschlussvolumen sind dagegen nicht stabil gegenüber SDS und liegen deswegen denaturiert vor.

Die Proben wurden darüber hinaus über UV/VIS-Absorptionsspektroskopie im Bereich von 240 bis 340 nm untersucht. Ein typisches Absorptionsspektrum einer Proteinlösung (Schmid, 1998) hat ein Maximum bei 280 nm, ein Minimum bei ca. 250 nm und zeigt keine Absorption bei Wellenlängen grösser als 310 nm. Eine ansteigende Basislinie im Wellenlängenbereich von 310 - 400 nm wird durch Lichtstreuung an grösseren Proteinaggregaten in der Probe hervorgerufen. Eine Verunreinigung der Proteinpräparation mit DNA (Absorption bei 260 nm) kann über das Verhältnis der Absorption bei 280 nm zu 260 nm abgeschätzt werden.

Die Maxima der Absorptionsspektren beider Fraktionen von Lwe1237 liegen, wie in Tab. 3.6 aufgeführt, bei etwa 280 nm. Der Quotient der Absorption bei 280 nm zu 260 nm liegt bei der Fraktion des Ausschlussvolumens bei etwa 1 und bei der

Fraktion bei Trimergrösse bei etwa 2. Ein Quotient von 1 spricht für DNA-Verunreinigung oder Aggregate in der Proteinpräparation. Die leicht erhöhte Absorption der Ausschlussfraktion bei 310 nm deutet eher auf Aggregate in der Proteinlösung, die eine Lichtstreuung verursachen, hin. Um eine DNA-Verunreinigung auszuschliessen müssten allerdings zusätzlich weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Tab. 3.5 Vergleich der UV/VIS-Spektren.

Analyse der Fraktionen aus der präparativen Gelfiltration von A006Gp17 und Lwe1237 über UV/VIS-Absorptionsspektren nach 2.4.9.

Protein	Fraktion	Absorptionsmaximum (in nm)	Verhältnis der Absorption bei 280/260 nm	Absorption bei 310 nm
A006Gp17	Ausschluss	278	1,5	~ 0,002
	Homotrimer	279	1,8	~ 0,002
Lwe1237	Ausschluss	277	1	~ 0,01
	Homotrimer	279	1,9	~ 0,001

Die UV/VIS-Absorptionsspektren der Fraktionen aus der Gelfiltration mit A006Gp17 zeigten ein ähnliches Bild (Tab. 3.6). Nur der Quotient der Absorption bei 280 nm zu 260 nm mit der Fraktion des Ausschlussvolumens ist mit etwa 1,5 etwas höher und die Absorption bei 310 nm zeigt keinen Unterschied zur Fraktion bei Trimergrösse. Diese Ergebnisse deuten im Gegensatz zu Lwe1237 eher auf eine DNA-Verunreinigung der Proteinlösung als auf Aggregate in der Lösung hin. Dies müsste allerdings über weiterführende Versuche genauer untersucht werden.

Um herauszufinden, ob die oligomere Proteinstruktur der Trimer-Fraktion bei 4 °C-Lagerung stabil ist oder ob sich erneut Aggregate bilden, wurden die gesammelten Fraktionen vereinigt und eine Woche bei 4 °C inkubiert. Anschliessend wurde die Proteinlösung mit Hilfe von Zentrifugalkonzentratoren konzentriert und erneut über Gelfiltration analysiert.

Es zeigte sich bei A006Gp17 und Lwe1237 nur ein Peak bei Trimergrösse und kein Peak im Ausschlussvolumen. Der homotrimere Proteinzustand verändert sich also über eine Woche Lagerung bei 4 °C nicht.

Zusammenfassend liegen die untersuchten Proteinpräparationen der RBPs in der präparativen Gelfiltration in zwei Fraktionen vor: einer Fraktion bei Trimergrösse und einer Fraktion im Ausschlussvolumen der Säule. Die Fraktionen beider Proteinlösungen zeigen in der SDS-PAGE keine signifikanten Verunreinigungen mit anderen Proteinen. Ausserdem kommen bei Lwe1237 in beiden Fraktionen SDS-resistente Oligomere vor. Im Gegensatz dazu liegen bei A006Gp17 nur in der Fraktion mit Trimergrösse SDS-resistente Oligomere vor. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass beide Proteine als SDS-resistente Homotrimere vorliegen. Die Proteinpräparationen weisen allerdings zusätzlich Aggregate auf, die zumindest bei Lwe1237 zum Teil SDS-resistent sind. Um beide Proteinzustände weiter zu charakterisieren wurden im Folgenden Untersuchungen zur Bindestärke durchgeführt.

3.2.3 Bindestärke von A006Gp17 und Lwe1237

Die Bindestärke der RBPs ist ein wichtiges Kriterium dafür, ob diese Proteine als Fänger- und/oder als Nachweismoleküle zum *Listeria* Nachweis eingesetzt werden können. Um die Eignung der RBPs als Fänger- bzw. Nachweismolekül von *Listeria* einschätzen zu können, wurden sie mit zwei bereits charakterisierten Bindemolekülen verglichen.

Zum einen wurde die Zellbindedomäne des Endolysins aus dem *Listeria* Phagen A511 (CBD511) mituntersucht. Die CBD511 liegt als Fusion aus der *in vivo* Biotinylierungsdomäne von der α -Untereinheit der *Klebsiella pneumoniae* Oxalacetatdecarboxylase und der CBD des Phagenendolysins von A511 vor. CBDs von *Listeria* Phagen Endolysinen eignen sich zur Immobilisierung und Anreicherung von *Listeria* Zellen an magnetischen Partikeln aus komplexen Lebensmittelmatrices (Kretzer *et al.*, 2007). Ausserdem wurden diese Moleküle nach Fluoreszenzmarkierung bereits zum *Listeria* Nachweis eingesetzt (Loessner *et al.*, 2002).

Zum anderen wurde ein Bindeprotein (Eco-O157), das ein Derivat von einem *E. coli* O157-spezifischen Phagenstrukturprotein ist, mituntersucht (Rozand und Feng, 2009). Dieses Molekül wurde im „enzyme linked fluorescent assay“ (ELFA) erfolgreich zum Nachweis von *E. coli* O157:H7 eingesetzt.

3.2.3.1 Bindestärke im Zell-ELISA

Hinsichtlich der Eignung der Proteine als Nachweismoleküle wurde ihre Bindestärke im Zell-ELISA bestimmt. Dafür wurde als Mass der Bindestärke eine apparente Dissoziation ermittelt, die der Proteinkonzentration bei halbmaximaler Sättigung der Signalintensität entspricht. Das zweite Bindeereignis im Zell-ELISA zwischen dem Biotin der Bindeproteine und dem Streptavidin der alkalischen Phosphatase kann aufgrund seiner starken Bindung [Dissoziationskonstante von 10^{-15} M (Haun und Wasi, 1990)] bei der Bewertung der Bindestärke vernachlässigt werden. Die Durchführung des Zell-ELISA, die Berechnungsgrundlage und die Bestimmung der apparenten Dissoziation werden unter 2.5.1.2 genauer erläutert.

Im Zell-ELISA wurden die biotinylierten Bindeproteine mit 0,01 – 10 µg/ml eingesetzt. Es wurden die Fraktionen mit Trimergrösse aus der Gelfiltration (3.2.2) von A006Gp17 und Lwe1237 eingesetzt. Des Weiteren wurde die Fraktion des Ausschlussvolumens beider Proteine untersucht, da aufgrund der SDS-Resistenz dieser Fraktion von Lwe1237, aktive Homotrimeren darin vermutet wurden. Ausserdem wurden als Kontroll- bzw. Referenzansätze beide Proteine vor der Trennung über die Gelfiltration, sowie CBD511 und Eco-O157 verwendet.

Die Mikrotiterplatten wurden bei den Ansätzen von A006Gp17 und CBD511 mit *Listeria monocytogenes* Sv 1/2c (SLCC 7154) beschichtet, bei den Ansätzen von Lwe1237 mit *Listeria monocytogenes* Sv 4b (Scott A) und bei solchen von Eco-O157 mit *E. coli* O157 (ATCC 43888). Die Signale des Zell-ELISA wurden gegen die eingesetzten Proteinkonzentrationen aufgetragen und aus der daraus entstehenden hyperbolischen Kurve wurden die apparenten Dissoziationen bei halbmaximaler Signalthöhe abgelesen (2.5.1.2, Abb. 2.1).

Die apparenten Dissoziationen werden in Abb. 3.5 aufgeführt und liegen zwischen $1,2 \times 10^{-10}$ und $2,1 \times 10^{-8}$ M Homotrimer. Die Bindestärke der Fraktion bei Trimergrösse von A006Gp17 liegt bei $7,8 \times 10^{-9}$ M Homotrimer und ist damit um den Faktor 10 schlechter als die Bindestärke der Ausschlussfraktion ($1,1 \times 10^{-9}$ M). Es befinden sich demnach in beiden Fraktionen der Gelfiltration aktive und damit native RBP Proteine. Ausserdem weisen die Proteine der Ausschlussfraktion eine höhere Bindestärke als die Fraktion bei Trimergrösse auf, die nicht allein auf Schwankungen während der Proteinkonzentrationsbestimmung mittels UV/VIS-Spektrometrie zurückgeführt werden kann. Die Proteine der Präparation vor der Trennung über die

Gelfiltration zeigten mit $2,0 \times 10^{-9}$ M Homotrimer eine ähnliche Bindestärke wie die der Ausschlussfraktion.

Im Vergleich mit den Referenzproteinen hat die definierte Fraktion bei Trimergrösse von A006Gp17 zwar eine stärkere Bindung an die Zellen als die CBD511, dessen apparente Dissoziation aufgrund sehr schwacher Signale im Zell-ELISA nicht bestimmt werden konnte. Die Bindung des Eco-O157 Proteins ist jedoch mit seiner etwa 100 fach niedrigeren apparenten Dissoziation ($1,2 \times 10^{-10}$ M Homotrimer) wesentlich stärker, als die des Homotrimers von A006Gp17.

Für die untersuchten Fraktionen von Lwe1237 wurde ein ähnliches Ergebnis wie für A006Gp17 erhalten (Abb. 3.5).

Mit CBD511 wurde im Zell-ELISA mehrfach kein oder nur ein sehr schwaches Signal erhalten. Daher scheint die CBD511 in diesem Testformat nicht als Nachweismolekül geeignet.

Eine signifikante unspezifische Wechselwirkung wurde mit keinem der untersuchten Proteine beobachtet.

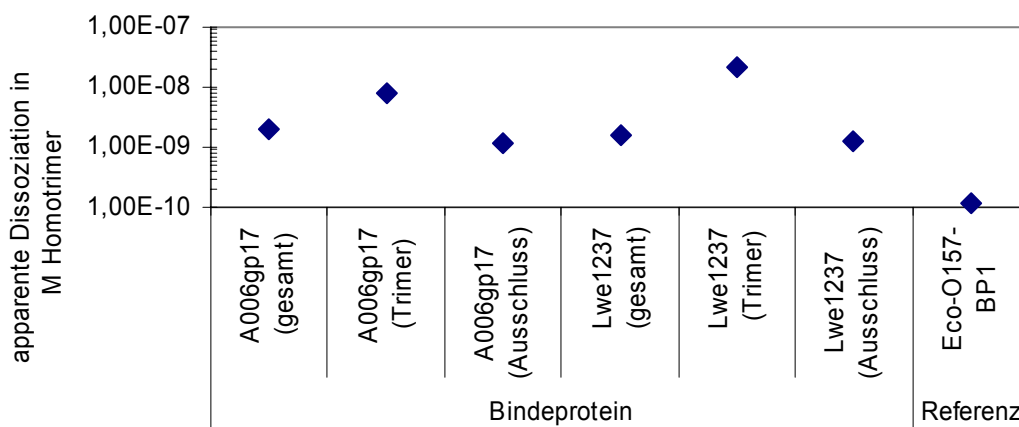


Abb. 3.5 Vergleich der apparenten Dissoziationen von A006Gp17 und Lwe1237 als Nachweismoleküle.

Ermittlung der apparenten Dissoziation der zwei Proteinpopulationen (Fraktion des Ausschlussvolumens und der Trimerfraktion aus der Gelfiltration, 3.2.2) und der Präparation vor der Gelfiltration (gesamt) von A006Gp17 und Lwe1237 sowie des Referenzproteins Eco-O157. Mit der CBD511 wurden zu schwache Signal für eine Bestimmung der Dissoziation erhalten.

Zusammenfassend wurden in der Fraktion bei Trimergrösse und der Ausschlussfraktion beider Proteine funktionelle und damit native RBPs vorgefunden. Die Ausschlussfraktion wies darüber hinaus bei beiden Proteinen eine starke

Bindung an die Zellen auf als die Trimerfraktion. Die starke Bindung kann vermutlich auf eine Wechselwirkung von mehreren nativen miteinander assoziierten RBPs mit einer Zelle zurückgeführt werden (Avidität).

A006Gp17 und Lwe1237 zeigen in der definierten, homotrimeren Fraktion eine höhere Bindestärke als die CBD511. Im Vergleich mit dem Eco-O157 Protein zeigen sie allerdings etwa 100 fach schlechtere Bindestärken. Dies deutet auf eine deutlich schlechtere Sensitivität der RBPs bei Verwendung als Nachweismoleküle verglichen mit Eco-O157 hin.

3.2.3.2 Bindestärke in der magnetische Separation

Hinsichtlich der Eignung der RBPs als Fängermoleküle wurde ihre Bindestärke in der magnetischen Separation ermittelt. Dafür wurde als Maß der Bindestärke ebenfalls eine apparente Dissoziation bestimmt, die der Proteinkonzentration bei halbmaximaler Sättigung der Bindeeffizienz entspricht. Das zweite Bindeereignis bei der magnetischen Separation zwischen dem Biotin der RBPs und dem Streptavidin der MP kann auch hier aufgrund seiner starken Bindung bei der Bewertung der Bindestärke vernachlässigt werden.

Die magnetische Separation sowie die Bestimmung der apparenten Dissoziation wurden, wie unter 2.5.1.1 beschrieben, mit Proteinkonzentrationen zwischen 0,001 und 1 µg/ml durchgeführt. Dabei wurde die gesamte Proteinpräparation (3.1.3.1) ohne eine Trennung über präparative Gelfiltration von A006Gp17 und Lwe1237 eingesetzt. Als Referenzproteine wurden Eco-O157 und die CBD511 verwendet.

Bei A006Gp17 und CBD511 wurde *Listeria monocytogenes* Sv 1/2c (SLCC 7154) verwendet, bei den Ansätzen mit Lwe1237 *Listeria monocytogenes* Sv 4b (ScottA) und bei solchen mit Eco-O157 *E.coli* O157 (ATCC 43888). Die berechneten Bindeeffizienzen der magnetischen Separation wurden gegen die eingesetzten Proteinkonzentration aufgetragen. Aus der daraus entstehenden, hyperbolischen Kurve wurde die Proteinkonzentration bei halbmaximaler Bindeeffizienz (apparente Dissoziation) abgelesen (2.5.1.1, Abb. 2.1).

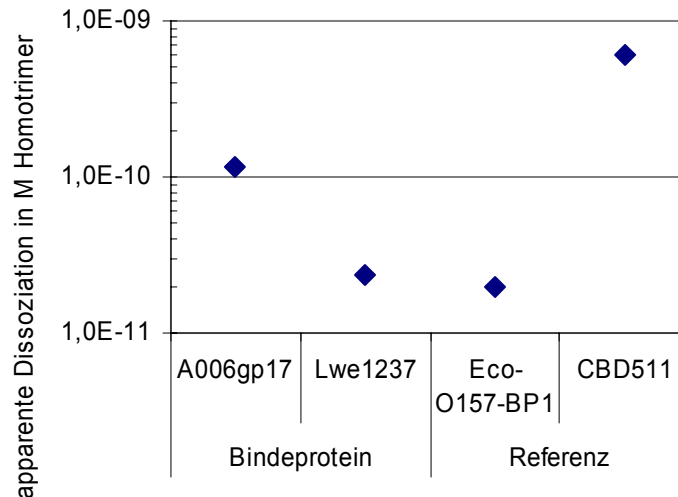


Abb. 3.6 Vergleich der apparenten Dissoziationen von A006Gp17 und Lwe1237 als Fänger-moleküle.

Ermittlung der Proteinkonzentrationen bei halbmaximaler Bindeeffizienz der RBPs A006Gp17 und Lwe1237 sowie der Referenzproteine Eco-O157 und die CBD511 über den Einsatz verschiedener Konzentrationen in die magnetische Separation nach 2.5.1.1.

Die apparenten Dissoziationen sind in Abb. 3.6 aufgeführt und liegen zwischen $2,3 \times 10^{-11}$ und $6,1 \times 10^{-10}$ M Homotrimer. Die Bindestärken von A006Gp17 ($1,2 \times 10^{-10}$ M Homotrimer) und Lwe1237 ($2,3 \times 10^{-11}$ M Homotrimer) unterscheiden sich maximal um einen Faktor 10 von der des Richtwertproteins Eco-O157 ($2,0 \times 10^{-11}$ M Homotrimer) und sind etwas stärker als die der CBD511 ($6,1 \times 10^{-10}$ M). Bei den apparenten Dissoziationen von A006Gp17 und Lwe1237 ist zu berücksichtigen, dass die Proteinpräparationen ohne Trennung von Trimer- und Aggregatfraktion verwendet wurden. Bei den nativen Trimerfraktionen wären die Bindestärken beider Proteine, wie die im Zell-ELISA (3.2.3.1) ermittelten, vermutlich schlechter.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse zur Bindestärke der beiden RBPs für einen Einsatz zum *Listeria* Nachweis als Fänger-moleküle. Die Bindestärken bei Verwendung als Nachweismoleküle deuten auf eine deutlich schlechtere Sensitivität hin, als sie mit Eco-O157 erzielt wird.

3.2.4 Thermische Stabilität

3.2.4.1 Funktionalität nach Inkubation der RBPs bei Temperaturen von 30 °C bis 95 °C

Zur ersten Einschätzung der thermischen Stabilität der RBPs wurde zunächst untersucht, ob sie nach kurzer Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen aktiv bleiben. Hierfür wurden die trimeren Fraktionen von A006Gp17 und Lwe1237 (3.2.2) nach 15 minütiger Inkubation bei 30, 45, 70 und 95 °C als Nachweismoleküle in den Zell-ELISA (2.6.1.2) eingesetzt. Die Mikrotiterplatten wurden bei Ansätzen mit A006Gp17 mit *Listeria monocytogenes* Sv 1/2c (SLCC 7154) und bei solchen mit Lwe1237 mit *Listeria monocytogenes* Sv 4b (ScottA) beschichtet.

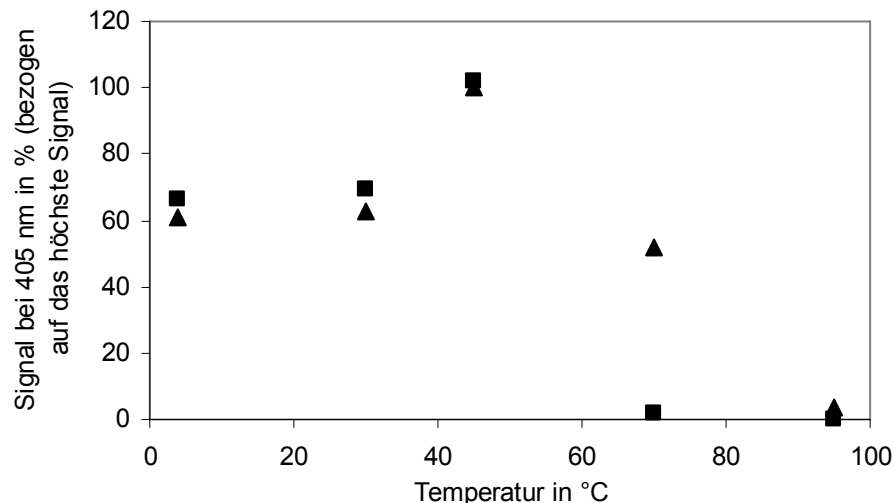


Abb. 3.7 Funktionalität von A006Gp17 und Lwe1237 nach Inkubation bei 30, 45, 70 und 95 °C.

Die Durchführung des Zell-ELISA wurde, wie unter 2.5.1.2 beschrieben, in Doppelbestimmungen durchgeführt. Es wurden 1 µg/ml des nativen, homotrimeren A006Gp17 und Lwe1237 (in 2,5 mM NaPi, 12,5 mM NaCl, pH 7,5) nach 15 min Inkubation bei 30, 45, 70 und 95 °C eingesetzt. (■). Lwe1237, (▲). A006Gp17.

Wie in Abb. 3.7 (▲) zu sehen ist, ergaben sich im Zell-ELISA mit A006Gp17 nach einer Inkubation bei 37 °C bis 70 °C spezifische Signale, die mit der Signalintensität der Kontrolle (4 °C) vergleichbar sind. Dies spricht für eine thermische Stabilität des Proteins bis mindestens 70 °C bei einer Inkubation von 15 min. Eine höhere Signalintensität als die der Kontrolle wurde nach einer Inkubation des Proteins bei 45 °C beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass sich der Proteinzustand so verändert, dass bessere Bindeeigenschaften entstehen. Dieses Phänomen könnte durch

Mehrfachbindung an eine Zelle nach Aggregatbildung. Untersuchungen bezüglich der Grösse beispielsweise über Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation der trimeren Fraktion nach Inkubation bei 45 °C konnten klären, ob Aggregate gebildet werden.

Im Zell-ELISA mit Lwe1237 (Abb. 3.13, ■) ergaben sich ähnliche Ergebnisse wie mit A006Gp17. Nach Inkubation bei 70 °C wurden allerdings im Gegensatz zu A006Gp17 keine Signale mehr im Zell-ELISA erhalten. Das Protein ist also bis mindestens 45 °C thermisch stabil. Eine Verbesserung der Bindeeigenschaften nach Inkubation bei 45 °C wurde auch mit diesem Protein beobachtet.

Diese Ergebnisse geben erste Hinweise auf eine thermische Stabilität des A006Gp17 bis mindestens 70 °C und des Lwe1237 bis 45 °C. Im Folgenden wurde die thermische Stabilität der Proteine mittels eines Temperaturübergangs in der CD-Spektroskopie genauer untersucht.

3.2.4.2 Bestimmung der thermischen Stabilität über CD-Spektroskopie

Proteine, die ausschliesslich aus α -Helices aufgebaut sind, haben im CD-Signal zwei definierte Minima bei etwa 208 und etwa 222 nm, während reine β -Faltblattproteine nur ein Minimum bei etwa 215 nm aufweisen. Da die Fern-UV CD-Spektren von entfalteten Proteinen von den Spektren nativer Proteine in der Regel stark verschieden sind (Minimum erst unterhalb 200 nm), bietet die Fern-UV CD-Spektroskopie hervorragende Möglichkeiten, Faltungs- und Konformationsübergänge von Proteinen zu verfolgen (Johnson, 1990).

Nachdem eine Aktivität von A006Gp17 nach einer 15 minütigen Inkubation bei 45 °C und des Lwe1237 nach einer Inkubation bei 70 °C beobachtet wurde, wurden nun die optischen Eigenschaften dieser Proteinen herangezogen, um die Entfaltung während eines Temperaturübergangs zu beobachten. Dafür wurden die nativen Trimerfraktionen aus der Gelfiltration (3.2.2) von A006Gp17 und Lwe1237 nach 2.5.3 vermessen.

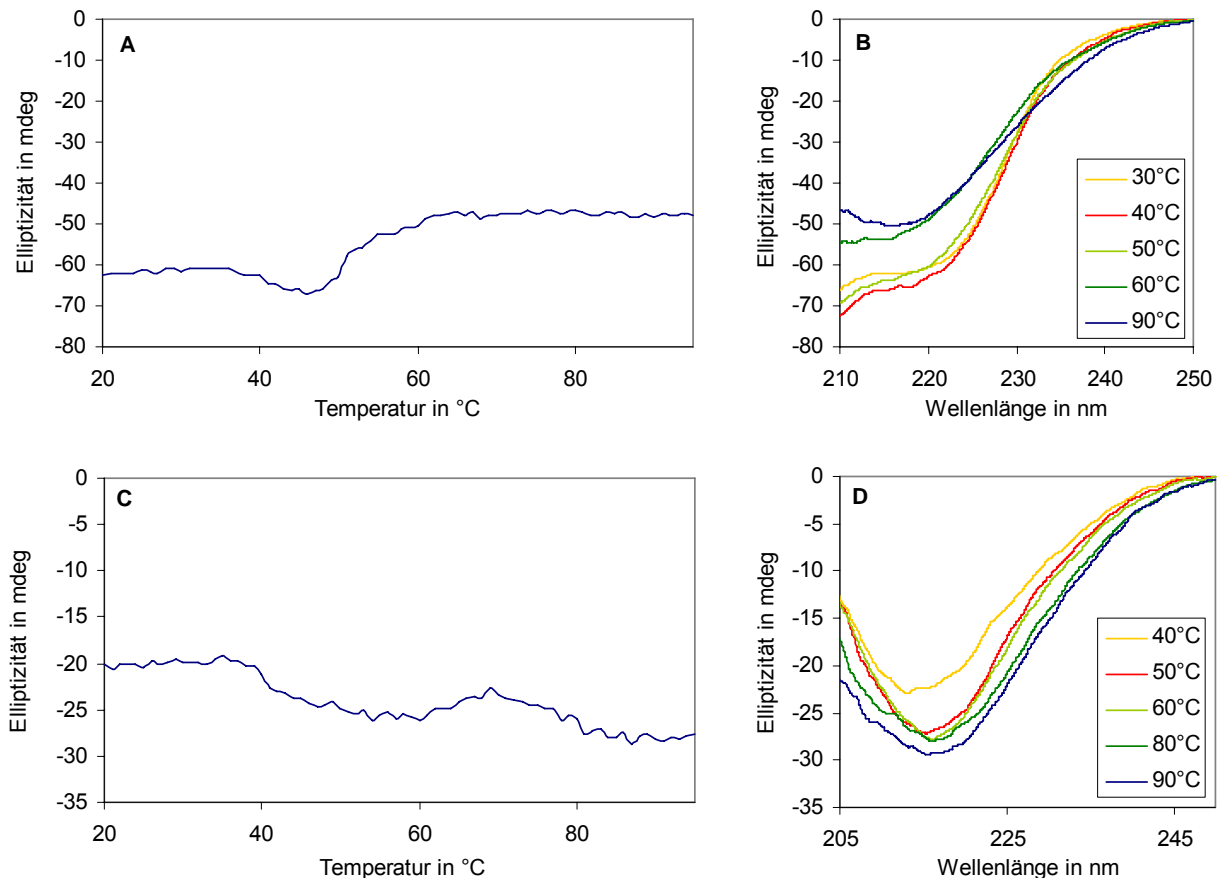


Abb. 3.8 Temperaturübergänge von A006Gp17 und Lwe1237.

Die thermische Entfaltung der Trimerfraktionen von A006Gp17 und Lwe1237 wurde während eines Temperaturanstiegs von 20 auf 95°C unter Rühren aufgenommen. Dabei wurden der Temperaturübergang (1 °C/min aufsteigend) bei 220 nm und alle 10 °C ein CD-Spektrum (3 Akkumulationen) vermessen. Die Proteinlösungen in 2,5 mM NaPi, 12,5 mM NaCl, pH 7,5 befanden sich dabei in einer verschliessbaren Halbmikro UV-Präzisionsküvette. A. / B. Lwe1237 mit 0,21 mg/ml, C. / D. A006Gp17 mit 0,13 mg/ml, A. / C. Temperaturübergang, B. / D. CD-Spektren.

Wie für Lwe1237 in Abb. 3.8, A. zu sehen ist, sinkt die Elliptizität bei 220 nm von 40 bis 45 °C leicht ab. Im Anschluss steigt die Elliptizität von 45 bis 60 °C leicht an und stagniert von 60 bis 95 °C bei einer Elliptizität von etwa -50 mdeg. Dies spricht dafür, dass Lwe1237 bis 95 °C möglicherweise noch nicht vollständig entfaltet vorliegt. Die CD-Spektren (210 – 250 nm) zeigen bis 50 °C eher einen Verlauf mit zwei Minima wie sie für α -helikale Proteine typisch ist (Abb. 3.8, B). Ab 60 °C verändert sich ihr Verlauf hin zu einem Minimum, was eher für β -Faltblattstrukturen spricht. Das Spektrum bei 90 °C entspricht demnach nicht unbedingt dem eines denaturierten Protein. Eine Ausbildung von β -Faltblattstrukturen wurde bereits bei der Prion-Domäne mehrerer infektiöser Proteine (Prion) wie beispielsweise bei dem von *Saccharomyces cerevisiae* beobachtet und ist bei diesem Protein mit Aggregation

verbunden (Baxa *et al.*, 2002). Demnach könnte auch bei Lwe1237 ab 60 °C eine Aggregation induziert werden, die mit einer Erhöhung der β -Faltblattstrukturen verbunden ist. Um dies genauer zu untersuchen müssten jedoch CD-Spektren in niedrigeren Wellenlängenbereichen gemessen werden.

Mit der Trimerfraktion von A006Gp17 zeigte sich, wie in Abb. 3.8, C. ersichtlich, während des Aufheizens der Probe kein Anstieg der Elliptizität bei 220 nm. Auch die CD-Spektren (205 – 250 nm) veränderten sich bis 95 °C nicht hin zu einem Spektrum, wie es typisch für ein entfaltetes Protein ist (Abb. 3.8, D.). Die Sekundärstruktur des Proteins scheint also während des Temperaturanstiegs nicht messbar zerstört zu werden.

Zusammenfassend wurde bei Lwe1237 (Homotrimer) eine Aktivität nach 15 min Inkubation bis 45 °C und bei A006Gp17 bis 70 °C festgestellt. In der CD-Spektroskopie während eines Temperaturübergangs zeigte A006Gp17 keine vollständige Entfaltung bis 95 °C. Lwe1237 wies eine Veränderung der Sekundärstruktur ab 45 °C auf, eine vollständige Entfaltung des Proteins war allerdings auch hier nicht zu beobachten.

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine hohe thermische Stabilität der RBPs A006Gp17 und Lwe1237.

3.2.5 Untersuchungen zur Optimierung von A006Gp17

Die geringen Reinigungsausbeuten an A006Gp17 Protein machen eine kommerzielle Nutzung, für die grosse Proteinmengen benötigt werden, teuer. Auch die Tatsache, dass die Proteinpräparationen der RBPs A006Gp17 und Lwe1237 in zwei unterschiedlichen Zuständen vorliegen, der Trimer- und der Ausschlussfraktion, stellt für einen Einsatz zum *Listeria* Nachweis ein Hindernis dar, da eine gleich bleibende Qualität wegen der „Aggregate“ nicht gewährleistet werden kann. Daher wurde zum einen versucht das Ausmass der Expression über ein synthetisches Gen zu steigern. Zum anderen wurde untersucht, ob N-terminale Verkürzungen des Proteins den Anteil in der löslichen Fraktion nach der Expression erhöhen und die Bildung von Aggregaten vermindern. Dies wurde exemplarisch an A006Gp17 untersucht.

3.2.5.1 Synthetisches Gen

Eine schwache Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* resultiert oft aus einer unterschiedlichen *Codon Usage* zwischen *E. coli* und dem zu exprimierenden Gen. Für Codons, die in Organismen selten vorkommen, gibt es in der Regel in diesem Organismus einen geringen Spiegel an tRNA-Molekülen. Dies kann dazu führen, dass Gene aus anderen Organismen, die häufig Codons tragen, die im Organismus, in dem sie exprimiert werden sollen, selten vorkommen, nur in geringen Mengen vollständig translatiert werden (Terpe, 2006). Zusätzlich kann auch die Bildung von Sekundärstrukturen innerhalb der mRNA eine effiziente Translation verhindern, da diese das Startcodon für die Translation verdecken können (Hatfield und Roth, 2007).

Die Analyse der DNA-Sequenz von A006Gp17 mit dem Programm „graphical codon usage analyse“ (<http://gcua.schoedl.de/>) ergab, dass es mehrere solcher für *E. coli* seltenen Codons (AGG, AGA: Arginin; AUA: Isoleucin) trägt. Daher wurde eine Expressionsverbesserung zunächst mit einem anderen *E. coli* Expressionsstamm BL21-RIL getestet. Dieser trägt ein Plasmid, das für die tRNAs kodiert, die in *E. coli* für Arginin, Isoleucin und Leucin selten vorkommen. Hierfür wurde das Plasmid pQE30-HisJs-A006Gp17 in den *E. coli* Stamm BL21-RIL transformiert und die Expression untersucht. Dabei zeigte sich keine Verbesserung der Expression im Vergleich zu der Expression in *E. coli* M15, der kein RIL-Plasmid trägt.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die schwache Expression an der Bildung von Sekundärstrukturen in der mRNA liegt und nicht an der unterschiedlichen *Codon Usage*. Um diese Sekundärstrukturen zu verhindern, wurde bei Geneart AG (Regensburg, Deutschland) ein synthetisches Gen (A006Gp17-syn) mit geeigneten Restriktionsschnittstellen in Auftrag gegeben. Bei der Konstruktion dieses Gens wurde über Sekundärstrukturvorhersage („RNAfold web server“, <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) darauf geachtet, dass die davon abgeleitete mRNA keine Sekundärstruktur im Startbereich für die Translation bildet. Zusätzlich wurde die *Codon Usage* bei Geneart AG auf Expression in *E. coli* hin optimiert.

Das synthetische Gen wurde in pQE30-HisJs nach Testablauf 3.1.2 kloniert und nach Expression und Reinigung des daraus resultierenden Proteins auf Bindung an *Listeria* Zellen getestet (Tab. 3.2). Nach Expression war im SDS-Polyacrylamidgel eine wesentlich stärkere Bande der richtigen Größe zu erkennen, als nach Expression des ursprünglichen Gens. Die Expression des Proteins wurde demnach

durch das synthetische Gen verbessert. Das RBP befand sich allerdings nach Zellaufschluss mit fraktionierender Zentrifugation zum Grossteil in der unlöslichen Fraktion (10 % Anteil des Zielproteins am Gesamtzielprotein der löslichen Fraktion). Durch die Verwendung des synthetischen Gens konnte trotz des hohen Anteils in der unlöslichen Fraktion die Proteinausbeute nach der Reinigung aus der löslichen Fraktion vervierfacht werden (A006Gp17: etwa 1 mg pro 1 g Bakterienpellet Nassgewicht, A006Gp17-syn: etwa 4 mg pro 1 g Bakterienpellet Nassgewicht). Das angereicherte RBP wurde anschliessend in die magnetische Separation eingesetzt. Dabei wurde festgestellt, dass es als Fängerprotein eine Bindung an *Listeria* Zellen zeigt.

3.2.5.1.1 Präparative Gelfiltration von A006Gp17-syn

Die Proteinpräparation von A006Gp17, liegt wie unter 3.2.2 beschrieben, in zwei Fraktionen vor: einer Fraktion bei Trimergrösse und einer Ausschlussfraktion. Daher sollte untersucht werden, ob die Proteinpräparation von A006Gp17-syn ähnlich vorliegt. Dafür wurde die Proteinlösung in die präparative Gelfiltration nach 2.5.2 eingesetzt. Es zeigte sich ein Peak bei ungefähr 188 kD. Dies entspricht bei 86 kD theoretischer Grösse von HisJs-A006Gp17-syn ungefähr einem Dimer. Diese Proteinpräparation liegt also nicht wie die von A006Gp17 vor. Das Genprodukt des synthetischen Gens weist, vermutlich aufgrund der stärkeren Expression, keine homotrimere Struktur auf, wie A006Gp17 auf. Daraufhin wurden die Bindeeigenschaften von A006Gp17-syn als Nachweismolekül untersucht.

3.2.5.1.2 Bindeeigenschaften von A006Gp17-syn

Nachdem A006Gp17-syn, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, eine andere Quartiär-Struktur als A006Gp17 aufweist, wurden die Bindeeigenschaften beider Proteine verglichen. Dafür wurde A006Gp17-syn hinsichtlich seiner Eignung als Nachweismolekül in den Zell-ELISA eingesetzt.

Dies wurde im Zell-ELISA, wie unter 2.5.1.2 beschrieben, untersucht. Dafür wurde eine Mikrotiterplatte mit 10^5 bis 10^9 cfu/ml *Listeria monocytogenes* Sv 1/2c (SLCC 7154) beschichtet und 1 µg/ml A006Gp17 bzw. A006Gp17-syn eingesetzt.

Es zeigte sich, dass mit A006Gp17 bis 10^6 cfu/ml *Listeria* Zellen ein signifikantes Signal im Zell-ELISA beobachtet werden konnte. Bei A006Gp17-syn als Nachweisprotein wurden dagegen keine Signale erhalten. Demnach weist

A006Gp17-syn schlechtere Bindeeigenschaften als A006Gp17 auf. Gänzlich inaktiv ist es allerdings nicht, denn als Fängermolekül in der magnetischen Separation kann es *Listeria* Zellen spezifisch anreichern.

Zusammenfassend konnte durch die Verwendung eines synthetischen Gens die Expression in *E. coli* M15 deutlich gesteigert werden. Dies führte allerdings zu einer Erhöhung des unlöslichen Proteinanteils. Trotzdem konnte die Ausbeute der Proteinreinigung aus der löslichen Fraktion um das vierfache verbessert werden.

Die präparative Gelfiltration zeigte allerdings, dass die Proteinpräparation von A006Gp17-syn vermutlich kein homotrimeres Protein aufweist. Ausserdem zeigte das Protein nur bei Verwendung als Fängermolekül in der magnetischen Separation, bei der die Bindestärke durch Mehrfachbindung an eine Zelle verstärkt ist (Avidität), eine Bindung an *Listeria* Stämme der Sv-Gruppe 1/2. Beim Einsatz als Nachweismolekül wurde keine Wechselwirkung mit den Zellen beobachtet.

Es wurde somit vermutlich durch die gesteigerte Expressionsrate des synthetischen Gens eine korrekte Faltung des Proteins verhindert und damit die Bindeeigenschaften des Proteins deutlich verschlechtert.

3.2.5.2 N-terminale Verkürzungen

Wie unter 3.1.3.1.1 bereits beschrieben, liegt bei manchen RBPs die Region zur Anheftung an die Basisplatte N-terminal und die Zellbinderegion C-terminal vor. Über hydrophobe AA einer möglichen N-terminalen Anheftungsstelle im A006Gp17 könnte das Protein aggregieren und/oder in die unlösliche Fraktion nach Zellaufschluss übergehen (Rudolph und Lilie, 1996; Loeffler und Petrides, 2003). Um dies zu untersuchen wurden N-terminal verkürzte Versionen des A006Gp17-syn hergestellt. Die Verkürzungen wurden so gewählt, dass es laut Sekundärstrukturvorhersage nach „RNAfold web server“ (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) nicht zu einer Faltung der mRNA kommt, die die Bindung des Ribosoms daran verhindern könnte. Ausserdem wurde die Sekundärstruktur der abgeleiteten AA-Sequenz über „BetaWrapPro“ (<http://groups.csail.mit.edu/cb/betawrappro/>) von mehreren Verkürzungen berechnet und diese gewählt, bei der die berechnete Struktur der verbleibenden AA zu der des Originalproteins am nächsten ist.

Tab. 3.6 Auflistung des untersuchten A006Gp17-syn und der A006Gp17-syn Verkürzungen im Vergleich mit A006Gp17.

Proteinamen, Grösse und theoretische pI der Proteine sowie die Ergebnisse der Testung (3.1.2) sind aufgeführt. Die Löslichkeit wird in % pro Anteil des Zielproteins am Gesamtprotein der löslichen Fraktion angegeben. Die Ausbeute beschreibt mg Protein pro 1 g Bakterienpellet (Nassgewicht). +: Bindeeffizienz > 50 % relativ zu den insgesamt gefundenen Zellen in der magnetischen Separation. ----: nicht weiter untersucht.

Protein	AA	Grösse (in kD)	pI	Löslichkeit (in %)	Ausbeute (in mg)	Bindung
A006Gp17	721	78,8	4,8	~ 50	~ 1	+
A006Gp17-syn				~ 10	~ 4	+
A006Gp17-syn-1	653	71,0	4,9	~ 20	----	----
A006Gp17-syn-2	620	67,1	4,9	~ 50	----	----
A006Gp17-syn-3	582	63,0	5,0	~ 10	----	----
A006Gp17-syn-4	455	49,2	4,9	~ 40	~ 1	+

Es wurden 4 Varianten 5'-verkürzter DNA des synthetischen Gens A006gp17-syn (A006gp17-syn-1, A006gp17-syn-2, A006gp17-syn-3 und A006gp17-syn-4) über PCR nach 2.3.3 amplifiziert (Tab. 3.6). Wie im Testablauf unter 3.1.2 beschrieben, wurden die Gene in pQE30-HisJs kloniert, die Zielproteine exprimiert und ihre Löslichkeit untersucht. Bei der Expression der verkürzten Varianten wurde keine deutliche Überexpressionsbande wie beim A006Gp17-syn beobachtet. Wie in Tab. 3.6 aufgeführt ist, wurde jedes der verkürzten RBPs zum Teil löslich exprimiert (10 – 50 % Anteil des Zielproteins in der löslichen Fraktion bezogen auf die Gesamtmenge an Zielprotein). A006Gp17syn-2 (50 %) und A006Gp17syn-4 (40 %) wiesen den höchsten Anteil an Zielprotein in der löslichen Fraktion auf. Die Löslichkeit konnte damit im Vergleich zu A006Gp17-syn durch Verkürzung 2 und 4 leicht verbessert werden. A006Gp17 wies allerdings einen vergleichbaren Anteil an löslichem Protein auf.

In grossem Massstab wurde zunächst das kürzeste Protein exprimiert, angereichert und auf *Listeria* Bindung getestet (Testablauf 3.1.2). Dabei konnte eine Proteinausbeute von etwa 1 mg pro Gramm Bakterienpellet (Nassgewicht), vergleichbar mit der des A006Gp17, erhalten werden. Über die Untersuchungen in der magnetischen Separation wurde festgestellt, dass das verkürzte RBP aktiv ist, also funktional exprimiert worden war (Tab. 3.6).

Zusammenfassend konnte die Löslichkeit durch die zwei Verkürzungen leicht verbessert werden. Da jedoch die verkürzten Proteine schwächer exprimiert werden als A006Gp17-syn, erhöhte sich die Ausbeute nach der Reinigung aus dem löslichen Anteil dadurch nicht.

Es wurde ausserdem gezeigt, dass die N-terminalen AA (1 - 266) nicht für die Bindung des Proteins an die Zelle entscheidend sind. Dieser Teil des Proteins stellt vermutlich, wie bei dem RBP des P22 Phagen (Danner *et al.*, 1993), die Anheftung an die Basisplatte dar. Die Struktur und die Bindestärke des verkürzten Proteins konnten aus Zeitgründen nicht weiter untersucht werden.

3.2.6 Phagenliganden auf der *Listeria* Zelloberfläche

Nach SDS-Behandlung von *Listeria* Zellen können nach Steen *et al.* (2003) Oberflächenproteine der Zellwand denaturiert werden. Zellwand assoziierte Polymere, zu denen Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren gehören, können durch Trichloressigsäure-Behandlung aus der Oberfläche Gram-positiver Bakterien zu einem grossen Anteil entfernt werden (Wendlinger *et al.*, 1996; Steen *et al.*, 2003). Um herauszufinden an welche dieser Zellwandkomponenten A006Gp17 und Lwe1237 binden, wurden *Listeria* Zellen, wie unter 2.5.4 beschrieben, mit SDS oder mit Trichloressigsäure behandelt.

Die Zellen wurden anschliessend mit den Bindeproteinen inkubiert, von denen eine spezifische Bindung an diesen Stamm bekannt ist. Zur Kontrolle wurden *Listeria* Stämme untersucht, von denen bekannt ist, dass sie keine Wechselwirkung mit diesem RBP zeigen. Um das Ausmass der Bindung an diese Zellen zu ermitteln, wurde im Zell-ELISA untersucht, ob nicht gebundenes Protein nach Zentrifugation im Überstand noch zum Zellenachweis ausreicht. Hierfür wurden Mikrotiterplatten zum Nachweis mit A006Gp17 mit *Listeria monocytogenes* Sv 1/2c (SLCC 7154) und zum Nachweis mit Lwe1237 mit *Listeria monocytogenes* Sv 4b (ScottA) beschichtet.

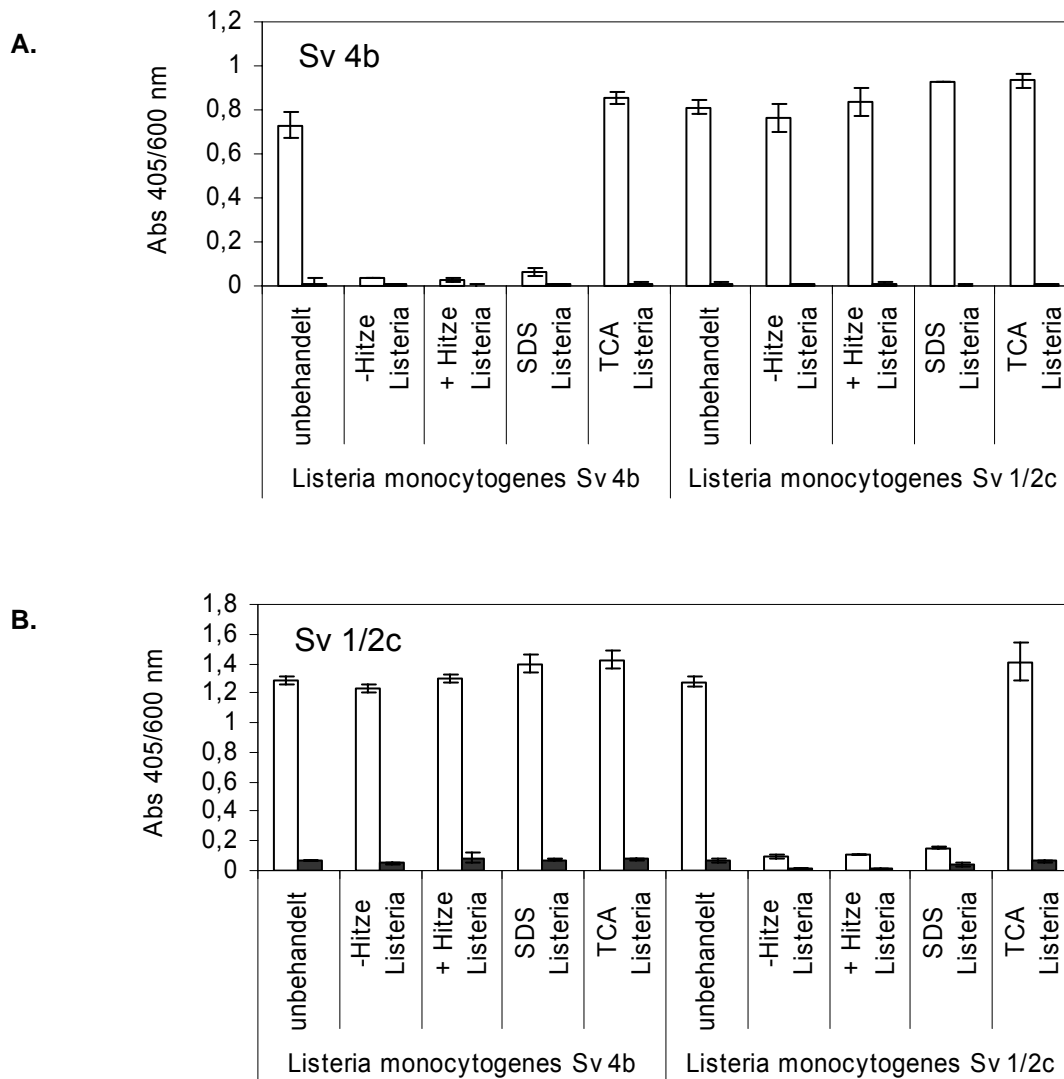


Abb. 3.9 Ermittlung der Rezeptor-Struktur auf der *Listeria* Zelloberfläche von A006Gp17 und Lwe1237.

Einsatz der RBPs unbehandelt und nach Inkubation mit nicht-hitzenaturierten, hitzenaturierten, SDS und Trichloressigsäure behandelten Zellen [*Listeria monocytogenes* Sv 1/2c und 4b, 2.5.4] in den Zell-ELISA (2.5.1.2). Die Mikrotiterplatten waren bei Lwe1237 (A.) mit *Listeria monocytogenes* Sv 4b und bei A006Gp17 (B.) mit *Listeria monocytogenes* Sv 1/2c beschichtet. weisse Balken. Mikrotiterplatten mit Zellen beschichtet, schwarze Balken. Mikrotiterplatten unbeschichtet. TCA: Trichloressigsäure

Bei Lwe1237 zeigt das Signal mit unbehandeltem Protein (Abb. 3.9, A), dass sich genügend Zellen für einen Nachweis mit diesem Protein auf der Mikrotiterplatte befinden. Nach Inkubation des Lwe1237 mit nicht-hitzenaturierten und hitzenaturierten *Listeria* Zellen (*Listeria monocytogenes* Sv 4b), die spezifisch an das Protein binden, wird das Protein so gebunden, dass es im Überstand nicht mehr zu einem Signal im Zell-ELISA führt. Ausserdem bindet das RBP in keinem Fall an einen Stamm (*Listeria monocytogenes* Sv 1/2c), von dem keine Bindung bekannt ist.

Über die Zellbehandlung wird also keine unspezifische Bindung der RBPs verursacht. Das Lwe1237 war erst nach Inkubation mit einem *Listeria* Stamm, der mit Trichloressigsäure behandelt wurde, wieder im Überstand nachweisbar. Das deutet darauf hin, dass diese Behandlung den Liganden des RBPs entfernt oder zerstört.

Bei den Untersuchungen mit A006Gp17 zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie mit Lwe1237 (Abb. 3.9, B). Auch hier war das Protein erst nach Inkubation mit Trichloressigsäure behandelten Zellen wieder im Überstand nachweisbar.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei dem Ligand auf der *Listeria* Zelloberfläche für A006Gp17 und Lwe1237 um (Lipo)Teichonsäuren handelt. Zur Bestimmung der genauen Struktur des Rezeptors müssten weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden.

4 Diskussion

Zu Beginn dieser Arbeit gab es nahezu keine Informationen zu den Proteinen von *Listeria* Phagen, über die der Phage an seinen Wirt bindet. Im Unterschied zu Phagen Gram-negativer Bakterien (Mesyanzhinov *et al.*, 2004; Tang *et al.*, 2005; Hendrix und Casjens, 2006) ist über die RBPs von Phagen Gram-positiver Bakterien nur wenig bekannt. Einzig bei einigen *Lactococcus*-Phagen (Stuer-Lauridsen *et al.*, 2003; Dupont *et al.*, 2004; Vegge *et al.*, 2006), bei sieben nah verwandten *Streptococcus thermophilus* Phagen (Duplessis und Moineau, 2001) und bei zwei *Bacillus* Phagen (Guo *et al.*, 2003; Schuch und Fischetti, 2006) waren diese Bindeproteine bereits beschrieben. Von diesen wurden bislang nur die RBPs der *Lactococcus*-Phagen genauer charakterisiert. Von einigen dieser Proteine ist die 3-D Struktur aufgeklärt, sowie ihre Lage in der Basisplatte des Phagen nachgewiesen.

Daher war es das Ziel dieser Arbeit, RBP-Gene aus verschiedenen *Listeria* Phagen zu identifizieren. Die Genprodukte sollten charakterisiert werden und ihre Eignung zum Nachweis von *Listeria* spp. untersucht werden.

Funktionszuordnung der Bindeproteine

Ausgangspunkt zur Identifizierung der Bindeprotein-Gene waren die Genome der *Listeria* Phagen A006, A500, B025, B054, P35 (Dorscht *et al.*, 2009), A511 (Klumpp *et al.*, 2008), A118 (Loessner *et al.*, 2000) und PSA (Zimmer *et al.*, 2003). Analog zur Lage im Genom bisher identifizierter RBP-Gene von Phagen Gram-positiver Bakterien (Duplessis und Moineau, 2001; Dupont *et al.*, 2004; Schuch und Fischetti, 2006; Vegge *et al.*, 2006), wurde angenommen, dass auch bei *Listeria* Phagen die RBP-Gene in dem Genombereich liegen, der die Basisplattenproteine kodiert. Wie bei den meisten *Lactococcus*, *Bacillus* und *Streptococcus* Phagen liegen diese Gene auch bei *Listeria* Phagen zwischen dem Gen, das für das *tail tape measure* Protein kodiert (*tmp*) und der Lysekassette, die meist aus dem *hol*-Gen und dem *ply*-Gen besteht (Loessner *et al.*, 1995; Dorscht *et al.*, 2009). Das *hol*-Gen kodiert das Holin und das *ply*-Gen das Endolysin des jeweiligen Phagen. In den bisher beschriebenen Genomen der *Listeria* Phagen liegen in diesem Bereich zwischen drei und 13 ORFs. Bei A118 war innerhalb dieser Gene zu Beginn dieser Arbeit von Loessner *et al.* (2000) A118Gp20 als putatives *long tail fibre* Protein annotiert. Ausserdem wurde für

A511Gp99 von Dorscht *et al.* (2009) eine N-terminale (10 – 280 von 510 AA), schwache Ähnlichkeit zu einem putativen RBP von LP65 (Chibani-Chennoufi *et al.*, 2004) beobachtet. Daraufhin wurde dieses Protein in den Untersuchungen zur Identifizierung der RBPs mit getestet.

Über in dieser Arbeit durchgeführte Sequenzvergleiche der abgeleiteten AA-Sequenzen der Gene, die die Basisplattenproteine der *Listeria* Phagen kodieren, wurde eine Ähnlichkeit des A006Gp16 zum Gp14 des *Bacillus* Phagen *gamma* identifiziert. Dieses Protein wurde von Schuch und Fischetti (2006) mit der wirtsspezifischen Adsorption des Phagen *gamma* in Verbindung gebracht.

Darüber hinaus gab es zu Beginn dieser Arbeit keine weiteren Anhaltspunkte welche Gene von *Listeria* Phagen RBPs kodieren könnten.

In dieser Arbeit wurden von jedem der oben genannten *Listeria* Phagen mindestens zwei Gene zwischen dem *tmp*-Gen und der Lysekassette nach den, im Ergebnisteil (3.1.1) aufgeführten Kriterien als potentielle RBPs kodierende Gene, ausgewählt. Diese Gene wurden entweder aus den isolierten Phagen oder aus *Listeria* Stämmen über PCR amplifiziert. Nach DNA-Sequenzierung wurden die Proteine rekombinant in *E. coli* exprimiert, angereichert und auf *Listeria* Bindung getestet (Tab. 3.2). Dabei wurden folgende Proteine identifiziert, die spezifisch an *Listeria* Zellen binden: A006Gp17, A118Gp19, A500Gp19, A511Gp108, P35Gp16, B025Gp19, B054Gp26 und PSAGp15 (Tab. 4.1). Die restlichen untersuchten Proteine ergaben in diesen Proteinpräparationen und in diesem Testformat keine spezifische Bindung (Tab. 3.2). Zusätzlich wurde über AA-Sequenzvergleiche das Gen lwe1237, das in einem phagen-ähnliche Sequenzbereich im Genom von *Listeria welshimeri* Sv 6b (SLCC5334) liegt, identifiziert. Dieses Gen liegt zwischen einem putativen *tmp*-Gen und einem putativen *hol*-Gen. Die davon abgeleitete AA-Sequenz ist im Bereich von 1 bis 251 AA (von insgesamt 367 AA) nahezu identisch zur AA-Sequenz des PSAGp15, wogegen es im C-terminalen Bereich keine Ähnlichkeiten zu PSAGp15 aufweist. Nachfolgende rekombinante Expression, Reinigung und Bindestudien zeigten, dass auch dieses Gen ein spezifisch an *Listeria* bindendes Protein kodiert (3.1.3.1.1).

Tab. 4.1 Zusammenstellung aller in dieser Arbeit identifizierten Bindeproteine mit den jeweiligen, möglichen Bindespektren im Vergleich mit den Wirtsspektren des jeweiligen Phagen. (): Bindung der Proteine an bzw. Lyse der Phagen von einzelne Stämme dieses Serovars.

Phage	Wirtsspektrum	Referenz	potentielles Bindeprotein	Bindespektrum
A511	breites Wirtsspektrum	Klumpp <i>et al.</i> , 2008	Gp108	(1/2), 4, 5, 6
A006	1/2	Dorscht <i>et al.</i> , 2009	Gp17	1/2
A118	1/2	Loessner, 2000	Gp19	1/2
P35	1/2 (75% der Stämme)	Hodgson, 2000	Gp16	(1/2)
PSA	Sv 4b	Zimmer <i>et al.</i> , 2003	Gp15	4b
A500	4	Dorscht <i>et al.</i> , 2009	Gp19	4b, 4c, (4a), (4ab), (6a)
B025	5, 6	Dorscht <i>et al.</i> , 2009	Gp19	(4), (5), (6)
B054	5, 6	Dorscht <i>et al.</i> , 2009	Gp26	(4), (5), (6)
unbekannter Prophage	unbekannt	---	Lwe1237	4,5,6

Um zu ermitteln, ob diese Proteine tatsächlich die Wirtsspezifität der Phagen determinieren, wurden ihre Bindespektren (3.2.1) mit den Wirtsspektren der dazugehörigen Phagen verglichen (Tab. 4.1).

A511Gp108 bindet vereinzelt an Stämme der Sv-Gruppe 1/2 und an alle Stämme der Sv-Gruppe 4 (außer 4a), 5 und 6. Dieses Bindespektrum korreliert mit dem in dieser Arbeit ermittelten Lysespektrum des Phagen A511 und mit dem mehrfach beschriebenen breiten Wirtsspektrum des Phagens (Loessner und Calendar, 2006; Klumpp *et al.*, 2008).

Die Phagen A118, A006 und P35 lysieren Stämme der Sv-Gruppe 1/2 (Hodgson, 2000; Loessner *et al.*, 2000), was mit den Bindespektren der Proteine A006Gp17, A118Gp19 und P35Gp16 korreliert.

A500Gp19 bindet an Stämme innerhalb der Sv-Gruppe 4 und an 2 der 3 untersuchten *Listeria* Stämme des Sv 6a. Das Wirtsspektrum des Phagens wird allerdings nur innerhalb der Sv-Gruppe 4 beschrieben (Dorscht *et al.*, 2009). Somit korreliert das Bindespektrum dieses Proteins nur teilweise mit dem Phagenwirtsspektrum.

Das Wirtsspektrum des Phagen PSA liegt innerhalb des Sv 4b (Zimmer *et al.*, 2003) und das der Phagen B025 und B054 innerhalb der Sv-Gruppen 5 und 6. Auch hier korrelieren die Bindespektren der Proteine PSAGp15, B025Gp19 und B054Gp26 weitestgehend mit dem Wirtsspektrum der jeweiligen Phagen. Für alle drei Proteine

müssten allerdings noch weitere Stämme untersucht werden, um sicher zu stellen, ob eine Korrelation von Bindespektrum und Wirtsspektrum vorliegt.

Lwe1237 wechselwirkt mit allen Stämmen der Sv-Gruppen 4 (4e und 4d schwach), 5 und 6. Da es sich bei dem Gen um eine phagen-ähnliche Sequenz aus *Listeria welshimeri* Sv 6b handelt, konnte bisher das Bindespektrum dieses Proteins nicht mit dem Wirtsspektrum eines Phagen verglichen werden. Aufgrund der starken Ähnlichkeit zwischen Lwe1237 und PSAGp15 wird allerdings davon ausgegangen, dass es eine ähnliche Funktion wie Gp15 in PSA in einem unbekanntem Phagen ausübt. Um dies zu untersuchen, müsste der vermutliche Prophage aus *Listeria welshimeri* mobilisiert werden und dessen Bindeproteinsequenz mit dem Lwe1237 abgeglichen werden. Handelt es sich um identische Proteine kann das Lysespektrum des Phagen erstellt werden und mit dem Bindespektrum von Lwe1237 verglichen werden.

Die Sequenzanalyse der abgeleiteten AA-Sequenz der hier identifizierten Bindeproteine ergab, dass es kein gemeinsames Sequenzmotiv für alle Bindeproteine gibt.

A511Gp108, B025Gp19, PSAGp15 und Lwe1237 konnten jedoch über ein zentrales Sequenzmotiv zu einer Gruppe zusammengefasst werden (Abb. 3.2, QAKAD_AL). Dieses Sequenzmotiv wurde auch in den als RBP beschriebenen Proteinen A118Gp20 und A500Gp20 identifiziert (Abb. 4.1; Biemann, 2009). Dies spricht dafür, dass es sich auch bei A511Gp108, B025Gp19, PSAGp15 und Lwe1237 um RBPs der dazugehörigen Phagen handelt.

A118Gp19 und A500Gp19 haben dieses Sequenzmotiv nicht. Sie übernehmen daher vermutlich nicht die Funktion des RBPs im Phagenpartikel. Biemann (2009) identifizierte A118Gp19 als LSP (Abb. 4.1). In dieser Arbeit wurde über Zymogrammanalysen mit denaturierten Phagenpartikeln gezeigt, dass dieses Protein eine hydrolytische Aktivität aufweist. Nach rekombinanter Expression in *E. coli* konnte allerdings keine peptidoglykan-hydrolytische Aktivität des Proteins beobachtet werden. Die Bindung dieses Proteins wurde nicht untersucht.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden bei Untersuchungen mit A118Gp19 ebenfalls Hinweise auf eine schwache hydrolytische Aktivität des Proteins erhalten. Bei der magnetischen Separation wurde beispielsweise eine Abnahme der Bindeeffizienz mit zunehmender Proteinkonzentration festgestellt (Daten nicht gezeigt). Außerdem zeigte das Protein beim Einsatz als Nachweismolekül im Zell-ELISA keine

spezifische Bindung an die *Listeria* Zellen (Daten nicht gezeigt). Dies könnte zum einen über eine Ablösung von Fragmenten aus der Zellwand durch die hydrolytische Aktivität des Proteins bedingt werden, die durch eine kompetitive Hemmung die Bindeeffizienz verschlechtern würden. Zum anderen könnte sich das enzymatisch aktive Protein nach jeder Spaltung vom Substrat lösen und würde durch die Waschschriffe entfernt.

Enzymatisch aktive Phagenproteine mit spezifischer Bindedomäne, die Endolysine, wurden bereits mehrfach beschrieben (Loessner, 2005). Ähnlich könnte es sich auch bei A118Gp19 und dem N-terminal stark Homologen A500Gp19 verhalten. Sie könnten eine Region für die spezifische Bindung und eine Region für eine enzymatische Aktivität aufweisen und somit die Funktion des LSP in der Basisplatte des Phagen übernehmen. Enzymatisch aktive Bindeproteine wurden auch bei mehreren Phagen Gram-negativer Bakterien, wie z.B. P22 und Det7, beschrieben (Baxa *et. al.*, 1996; Walter *et. al.*, 2008).

Innerhalb der AA-Sequenzen der Basisplattenproteine von A006, P35 und B054 wurde das Sequenzmotiv QAKAD_AL nicht identifiziert. Darüber hinaus zeigen die Bindeproteine dieser Phagen untereinander kein gemeinsames Sequenzmotiv. Es wurden daher vermutlich 3 unterschiedliche Gruppen von Bindeproteinen identifiziert. Da ihr Bindespektrum weitestgehend mit dem beschriebenen Wirtsspektrum des jeweiligen Phagen übereinstimmt, wird davon ausgegangen, dass es sich bei diesen Molekülen um die RBPs im Phagenviron handelt.

Bei der Wirtsllyse eines Phagens ist die Adsorption allerdings nur der erste Schritt von vielen Ereignissen. So stimmt das Lysespektrum eines Phagens nicht unbedingt mit dem Adsorptionsspektrum eines Phagens überein (Knippers, 2001; Guttman *et al.*, 2005). Daher müsste für alle hier untersuchten Phagen Adsorptionsspektren über den so genannten „pull down assay“ erstellt werden (Bielmann, 2009) und diese mit den jeweiligen Bindespektren verglichen werden. Stimmen diese überein ist es sehr wahrscheinlich, dass das Bindeprotein die wirtsspezifische Adsorption des Phagen vermittelt.

Zusammenfassend lassen die aufgeführten Ergebnisse darauf schließen, dass es sich bei den in dieser Arbeit identifizierten Bindeproteinen A006Gp17, A511Gp108, B025Gp19, B054Gp26, PSAGp15, P35Gp16 und vermutlich Lwe1237 um die RBPs der jeweiligen *Listeria* Phagen handelt. A118Gp19 und A500Gp19 stellen vermutlich

die LSPs der jeweiligen Phagen dar und weisen darüber hinaus eine Bindeaktivität auf.

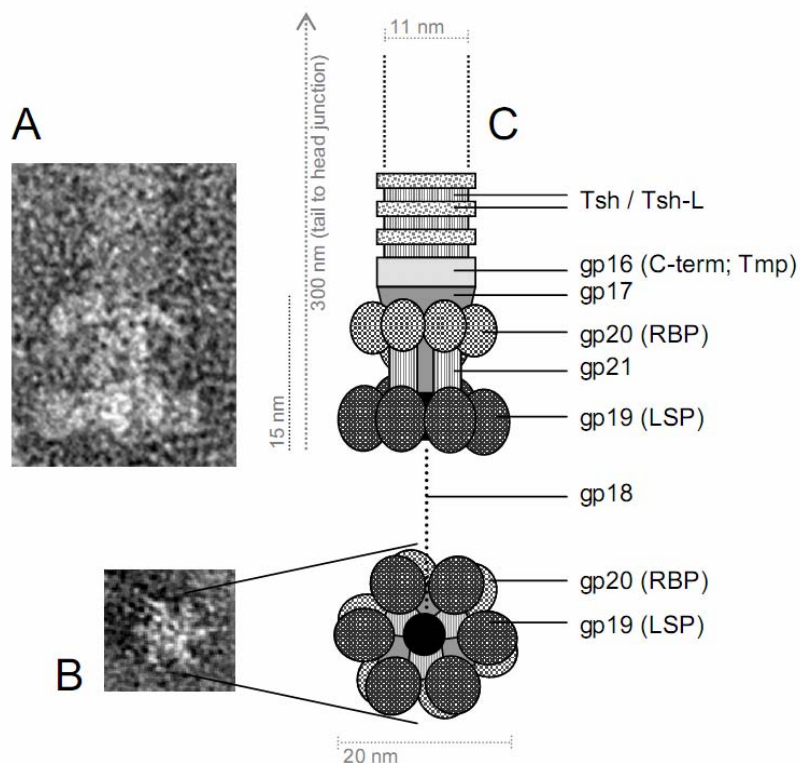


Abb. 4.1 Trans Elektronen Mikroskop Aufnahmen mit hypothetischer Protein Architektur der Schwanzspitze von A118.

Trans Elektronen Mikroskop Aufnahmen der Schwanzspitze (A) in Seitenansicht und (B) Untenansicht. (C) Angenommenes Modell der Schwanzspitze. (Abb. aus Biemann, 2009)

Übereinstimmung der Bindespektren mit der Sv-Gruppenzuordnung

Einige der hier identifizierten Bindeproteine und ihre dazugehörigen Phagen zeigen eine Korrelation mit der Sv-Gruppenzuordnung der untersuchten *Listeria* Stämme. So zeigen A006Gp17 und A118Gp19 eine spezifische Wechselwirkung mit allen untersuchten Stämmen der Sv-Gruppe 1/2. Die Zuordnung zu den verschiedenen Sv-Gruppen erfolgt nach Denka und Seiken über verschiedene Antiseren (Tab. 1.1), die vermutlich an Zuckersubstituenten der Teichonsäuren binden (Fiedler *et al.*, 1984; Fiedler und Ruhland, 1987). Die genauen antigenen Determinanten, die die verschiedenen Sv bestimmen, sind allerdings noch nicht bekannt. Da A006Gp17 und A118Gp19 dieselbe spezifische Bindung an Stämme der Sv-Gruppe 1/2 zeigen wie das Antiserum I, könnten in diesem Fall die antigenen Determinanten des

Antiserums I und die Ligandenstruktur beider Bindeproteine übereinstimmen. Damit stellen vermutlich Zuckersubstituenten der Teichonsäuren den Liganden dieser Bindeproteine dar. Eine Adsorption der Phagen A118 und A006 über Teichonsäuren wurde bereits beschrieben (Wendlinger *et al.*, 1996; Tran *et al.*, 1999; Cheng *et al.*, 2008). Auch bei mehreren Phagen anderer Gram-positiver Bakterien sind Teichonsäuren entscheidend für die Adsorption (Glaser *et al.*, 1966; Coyette und Ghuyssen, 1968; Chatterjee, 1969; Schleifer und Steber, 1974; Archibald, 1976; Givan *et al.*, 1982; Baptista *et al.*, 2008). Für Teichonsäuren als Bindepartner von A006Gp17 sprechen auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen (3.2.6). Zerstört man den Großteil der Teichonsäuren aus Zellpräparaten, findet keine Bindung mehr an die Zellwand statt. Zusammengefasst kann davon ausgegangen werden, dass der Bindepartner von A006Gp17 und A118Gp19 auf der Zelloberfläche von *Listeria* die Zuckersubstituenten der Teichonsäuren sind.

Bei Lwe1237 sprechen ebenfalls erste Untersuchungen für eine Bindung an Teichonsäuren (3.2.6). Lwe1237 zeigt eine starke Bindung an alle untersuchten Stämme der Sv 4a, 4ab, 4b, 4c, 5, 6a und 6b. Mit diesen Sv wechselwirken allerdings unterschiedliche Antisera von Denka und Seiken. Demnach stellen vermutlich die Zuckersubstituenten der Teichonsäuren die antigenen Determinanten, jedoch nicht den Bindepartner dieses Proteins dar. Das Rückgrad der Teichonsäuren weist nach Uchikawa *et al.* (1986a) innerhalb dieser Sv eine ähnliche Struktur auf, die sich von den Sv-Gruppen 1/2 und 3 deutlich unterscheidet. Daher könnte die Struktur des Rückgrads als Ligand von Lwe1237 dienen. Um Teichonsäuren als Phagen Liganden zu bestätigen müssten noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Bei anderen in dieser Arbeit identifizierten möglichen Bindeproteinen zeigt sich keine Übereinstimmung ihres Bindespektrums mit der Sv-Zuordnung von *Listeria*: A500Gp19, A511Gp108, B025Gp19, B054Gp26 und P35Gp16. Demnach ist nicht anzunehmen, dass einzig Zuckersubstituenten der Teichonsäuren die Rezeptoren darstellen.

Mögliche andere Rezeptorstrukturen auf der Zellwand Gram-positiver Bakterien stellen Oberflächenproteine und Peptidoglykan dar (Kutter und Sulkavelidze, 2005). Wendlinger *et al.* (1996) untersuchte die Liganden der Phagen A500 und A511 und stellte fest, dass keiner der beiden Phagen Oberflächenproteine zur Adsorption

benötigt. Nach Entfernung der Teichonsäuren aus der Zelloberfläche zeigte A500 (Wirtsspektrum: Sv-Gruppe 4) jedoch keine Bindung mehr an die Zellen. Außerdem wurde die Phagenadsorption durch Zugabe eines Bestandteils des Teichonsäurerückgrats, N-Acetylglucosamin, gehemmt. Die Zuckersubstituenten Galaktose und Glukose, die nach Uchikawa *et al.* (1986a) den Sv 4b bestimmen, haben jedoch keinen Einfluss auf die Adsorption von A500. Die Untersuchungen von Wendlinger *et al.* (1996) sprechen demnach für eine Anheftung des Phagens am Rückgrat des Polymerstrangs der Teichonsäuren. Für eine Erklärung wie eine Sv-unabhängige Bindung eines Phagen und damit des RBPs über eine Wechselwirkung mit dem Rückgrat der Teichonsäuren aussehen könnte, sind diese bisher allerdings zu wenig untersucht.

Bei dem einzigen hier untersuchten Phagen mit einem breiten Wirtsspektrum, A511, beschrieb Wendlinger *et al.* (1996) eine Sv-unabhängige Bindung an Peptidoglykan in Verbindung mit anderen Sv-unabhängigen Kohlenhydraten als Rezeptor. In dieser Arbeit zeigte das Bindspektrum des RBPs A511Gp108 und das Lysespektrum des Phagen (Sv-Gruppe 4, 5 und 6 sowie einzelne Stämme der Sv-Gruppe 1/2) ebenfalls ein breites Spektrum, die untersuchten Stämme Sv-Gruppe 3 wurden allerdings nicht gebunden bzw. vom Phagen lysiert. Da das Peptidoglykan Grundgerüst bei allen *Listeria* Spezies und Sv die gleiche Struktur aufweist (Bierne und Cossart, 2007), müssten alle Stämme gebunden werden. Für eine Erklärung warum die *Listeria* Sv 3a, 3b und 3c vom Phagen nicht lysiert und dem RBP nicht gebunden werden, ist die *Listeria* Oberfläche bis jetzt zu wenig untersucht.

Bezüglich der Liganden der RBPs von PSA, B025, B054 und P35 konnten in dieser Arbeit keine weitergehenden Untersuchungen durchgeführt werden. Da B025Gp19, B054Gp26 und P35Gp16 allerdings nicht Sv-spezifisch binden, wird davon ausgegangen, dass es sich bei den Liganden nicht um Zuckersubstituenten der Teichonsäuren handelt.

Zusammenfassend gibt es somit Bindeproteine und *Listeria* Phagen die mit der Sv-Zuordnung von *Listeria* korrelieren und solche für die eine derartige Korrelation nicht gefunden wurde. Bei Proteinen mit Sv-Gruppen-Übereinstimmung könnten die Zuckersubstituenten der Teichonsäuren, die vermutlich auch für die spezifische Oberflächenstruktur der Sv verantwortlich sind, die Liganden darzustellen. Weitergehende Untersuchung wie beispielsweise kompetitive Hemmung der Bindung

durch Zellwandpräparationen ohne Proteine oder ohne Teichonsäuren könnten über die Natur des jeweiligen Bindepartners Aufschluss bringen.

Binderegion der RBPs

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass A006Gp17 (721 AA) spezifisch an *Listeria* Zellen bindet, auch wenn es N-terminal um 266 AA verkürzt wird (3.2.5.2). Dies spricht dafür, dass sich die Binderegion von A006Gp17 im Bereich der 455 C-terminalen AA befindet. Eine zentrale oder C-terminale Rezeptorbinderegion wurde auch bei vielen anderen RBPs von Phagen Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien beobachtet (Freiberg *et al.*, 2003; Thomassen *et al.*, 2003; Ricagno *et al.*, 2006; Spinelli *et al.* 2006a; Barbirz *et al.*, 2008; Walter *et al.*, 2008). Bei diesen Proteinen ist der N-terminale Bereich für die Anheftung an den Phagenpartikel verantwortlich. Von daher kann angenommen werden, dass auch bei A006Gp17 der N-terminale Bereich die Anheftung an die Basisplatte vermittelt.

Diese Annahme wird gestützt durch die Tatsache, dass das A006Gp17 N-terminal (1 – 500 AA) signifikante Ähnlichkeiten (40 – 51 %) zu Strukturproteinen verschiedener *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* und *Streptococcus* Phagen aufweist. Es könnte sich daher beim N-terminalen Bereich um eine für bestimmte Phagen Spezies konservierte Anheftungsstelle an die Basisplatte handeln. Ähnlichkeiten zum C-terminalen Bereich (500 – 720 AA) von A006Gp17 zu phagen-ähnlichen Strukturproteinen anderer Bakterien wurden dagegen nicht gefunden. Somit könnte dieser Teil des Phagenproteins für die spezifische Bindung an die Bakterien mit unterschiedlichen Oberflächenstrukturen verantwortlich sein.

Bei den anderen in dieser Arbeit identifizierten Bindeproteinen gibt es ebenfalls Indizien, dass im N-terminalen Bereich die Domäne zur Anheftung an die Basisplatte liegt und im C-terminalen Bereich die Binderegion. A118Gp19 und A500Gp19 weisen beispielsweise N-terminal 54 % homologe AA (1 – 285 AA von 341 AA) auf, wogegen im C-terminalen Bereich keine signifikante Ähnlichkeit gefunden werden konnte. Das gleiche gilt für PSAGp15 und Lwe1237 (AA 1 - 252: nahezu identischen; AA 253 – 367: keine signifikante Ähnlichkeit). Der N-terminale Bereich der Bindeproteine A118Gp19, A500Gp19, A511Gp108, B025Gp19, B054Gp26, Lwe1237 und PSAGp15 zeigt außerdem zu Strukturproteinen verschiedener *Bacillus*-, *Lactobacillus*-, *Staphylococcus*-, *Streptococcus*- und *Clostridium*-Phagen signifikante

Ähnlichkeiten. Kaum Homologien zu Proteinen von Nicht-*Listeria* Phagen konnten allerdings im C-terminalen Bereich dieser Proteine gefunden werden.

Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass bei diesen Bindeproteinen eine N-terminale Anheftungsregion an die Basisplatte und eine C-terminal Binderegion ein allgemeines Prinzip sein könnte. Dies beschreibt auch Villafane *et al.* (2005) bei *tailspikes* von sieben zu P22 verwandten *Salmonella* Phagen.

Erste Charakterisierung der RBPs

Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen sprechen dafür, dass die RBPs A006Gp17 und Lwe1237 als Homotrimere vorliegen: So zeigten die Proteinpräparationen beider Proteine in der präparativen Gelfiltration einen Peak nach einer Laufzeit, die einem homotrimeren Protein entsprechen würde. Untersuchungen dieser Fraktion über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit nicht-itzedenaturiertem Protein ergaben eine deutlich höhere Bande als sie für ein Monomer zu erwarten wäre. Nach Hitzedenaturierung wurde eine einheitliche Proteinbande beobachtet, die einem Monomer entsprechen würde (3.2.2). Bindestudien hatten darüber hinaus gezeigt, dass die homotrimere Fraktion funktional ist (3.2.3.1). In der präparativen Gelfiltration konnte das Molekulargewicht der Proteine jedoch nur abgeschätzt werden, zumal es sich bei den bisher bekannten RBPs nicht um globuläre Proteine sondern um langgestreckte Moleküle handelt. Zur exakten Bestimmung des Molekulargewichts des nativen Proteins müsste eine Sedimentationsgleichgewichtszentrifugation durchgeführt werden (Stryer, 1999). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Proteine in nativer Form als Homotrimere vorliegen, die SDS-resistent sind. Von einer Vielzahl von RBPs ist bekannt, dass sie im nativen funktionalen Zustand ebenfalls als Homotrimere vorliegen. So haben beispielsweise Phagen der Familie der Siphoviridae wie λ (Hendrix und Casjens, 2006) und einige *Lactococcus* Phagen (Spinelli *et al.*, 2006a und 2006b; Ricagno *et al.*, 2006), Phagen der Familie der *Myoviridae* wie T4 (Mesyanzhinov *et al.*, 2004) sowie Phagen der Familie der *Podoviridae* wie P22 (Steinbacher *et al.*, 1997) homotrimere RBPs. Auch bei Viren, wie beispielsweise bei Adenovirus und bei Reovirus wurde eine homotrimere Struktur der Proteine gefunden, die die wirtsspezifische Bindung vermitteln (Chappell *et al.*, 2002; Burmeister, 2004).

In der präparativen Gelfiltration mit den Proteinpräparationen von A006Gp17 und Lwe1237 war neben des oben genannten Peaks bei etwa Homotrimergröße ein

großer Anteil im Ausschlussvolumen (> 600 kD) zu finden, was auf Aggregate hindeutet. Bei Lwe1237 bestehen diese Aggregate vermutlich zum Teil aus SDS-resistenten Homotrimeren, da in der SDS-PAGE mit nicht-hitzen-denaturierten Proben der Ausschlussfraktion neben einer Monomerbande eine Bande größer 120 kD vorlag. Nach Hitzedenaturierung wurde eine einheitliche Proteinbande beobachtet, wie sie für ein Monomer zu erwarten wäre.

Die Proteinfractionen im Ausschlussvolumen waren sowohl bei A006Gp17 als auch bei Lwe1237 funktional. Sie zeigten in beiden Fällen eine stärkere Bindung als die Proteine der Homotrimeren-Fraktion. Diese stärkere Bindung ist vermutlich durch eine Mehrfachbindung von funktionalen, miteinander assoziierten RBP-Trimeren bedingt (Avidität).

Ob diese funktionalen, assoziierten Proteine von definierter Größe sind - bei einem Ausschlussvolumen von 600 kD müssten mindestens fünf bis sechs dieser Homotrimere zusammenhängen - oder ob es uneinheitliche aneinander assoziierte Proteine sind, müsste ebenfalls über Sedimentationsgleichgewichtsupra-zentrifugation geklärt werden.

Neben der Resistenz gegenüber SDS (3.2.2) wurde eine hohe thermische Stabilität (3.2.4) der Trimerfraktionen von A006Gp17 und von Lwe1237 festgestellt. Stabilität gegenüber SDS und hohe Thermostabilität wurde bereits für einige RBPs von Gram-negativen Phagen gezeigt (Chen und King, 1991; Freiberg *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 2008).

Vergleich der hier identifizierten Bindepoteine mit den CBDs

Vergleicht man die Bindepoteigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten Bindepoteine (3.2.1) mit denen der CBDs (Loessner *et al.*, 2002, Schmelcher, 2007; Kretzer *et al.*, 2007) aus demselben Phagen, zeigt sich, dass die CBDs meist ein breiteres Bindespektrum aufweisen als die Bindepoteine. So bindet beispielsweise die CBD511 (Zellbindedomäne des Endolysins aus dem Phagen A511) *Listeria* Stämme aller Sv-Gruppen, wogegen A511Gp108 wie der Phage A511 nicht an Stämme der Sv 3a, 3b und 3c bindet, und nur vereinzelt an Stämme aus der Sv-Gruppe 1/2. Die CBD118 bindet an Stämme der Sv-Gruppen 1/2, 3 und 7 (Loessner *et al.*, 2002), A118Gp19 und der Phage binden dagegen nur Stämme der Sv-Gruppe 1/2. Die Zellbindedomäne des Endolysins des Phagen A500 bindet alle untersuchten Stämme der Sv-Gruppen 4, 5 und 6 (Loessner *et al.*, 2002;

Schmelcher, 2007). A500Gp19 bindet jedoch nur alle Stämme des Sv 4b und 4c, vereinzelt Stämme der Sv 4a, 4ab und 6a und keine untersuchten Stämme der Sv 4d, 4e und 6b.

CBDs von *Listeria* Phagen zeigen deutliche Kreuzreaktivität, d. h. eine Bindung an nahe verwandte Stämme außerhalb des Genus *Listeria* (Loessner *et al.*, 2002). Die CBD511 bindet z.B. an *Kurthia zopfii*, *Brochothrix thermosphacta* und einige *Bacillus*-Stämme und die CBD500 an einen der untersuchten *Bacillus cereus* Stämme und an *Rhodococcus rhodochrous* (Daten nicht gezeigt). Eine Kreuzreaktion der in dieser Arbeit identifizierten Bindeproteine wurde mit keinem der mehr als 25 getesteten Nicht-*Listeria* Spezies (bis zu 15 *Bacillus*, 3 *Kurthia zopfii*, 3 *Brochothrix* Stämme und 1 *Rhodococcus rhodochrous* Stamm) beobachtet (3.2.1.2).

Nach bisheriger Kenntnis sind demnach die Bindeproteine streng auf die Gattung *Listeria* beschränkt und zeigen innerhalb der Gattung ein engeres Wirtsspektrum als die Zellbindedomänen der Phagen-Endolysine. Die Liganden auf der Zelloberfläche für CBDs und den hier identifizierten Bindeproteinen müssen somit bei den hier untersuchten Phagen unterschiedlich sein.

Untersuchungen zur Bindestärke von A006Gp17 und Lwe1237

Die Bindestärken von A006Gp17 und Lwe1237 wurden im Vergleich mit anderen Bindeproteinen aus Phagen charakterisiert. Dabei wurde zum einen die CBD511 und zum anderen ein RBP (Eco-O157), das an *E. coli* O157-Zellen bindet und aus einem *E. coli* O157 spezifischen Phagen isoliert wurde, mit untersucht.

Als Maß der Bindestärke wurde eine apparente Dissoziation in der magnetischen Separation und im Zell-ELISA bestimmt. Dabei wurde beim Einsatz der gesamten Proteinpräparation ohne Trennung in Trimer- und Ausschlussfraktion in der magnetischen Separation mit A006Gp17 eine apparente Dissoziation von $1,2 \times 10^{-10}$ M Homotrimer und mit Lwe1237 eine Dissoziation von $2,3 \times 10^{-11}$ M Homotrimer erhalten. Im Zell-ELISA wurden dagegen bei Einsatz der gesamten Proteinpräparationen schlechtere Bindestärken mit etwa 2×10^{-9} M Homotrimer für beide Proteine erhalten. In der magnetischen Separation wurden somit um den Faktor 10 - 100 bessere Bindestärken beobachtet als im Zell-ELISA. Dies kann durch die unterschiedlichen Methoden erklärt werden. In der magnetischen Separation werden die Bindeproteine als Fängermolekül eingesetzt. Dabei können mehrere Proteine pro Zelle binden und somit die Bindestärke erhöhen. Die in der

magnetischen Separation gemessene Bindestärke ist damit aufgrund der Aviditätseffekte höher als die der Einzelbindung der Proteine an die Zelle im Zell-ELISA. Die apparenten Dissoziationswerte, die im Zell-ELISA bestimmt wurden, spiegeln somit die tatsächliche Bindestärke einer Einzelbindung eher wieder als die in der magnetischen Separation ermittelten Werte.

Die apparenten Dissoziationswerte der nativen Trimerfraktion betragen bei A006Gp17 8×10^{-9} M Homotrimer und bei Lwe1237 2×10^{-8} M Homotrimer und liegen damit im nanomolaren Bereich.

Beim Vergleich der Bindestärke von A006Gp17 und Lwe1237 mit dem *E. coli* Phagen RBP Eco-O157 zeigte sich, dass ihre Bindeeigenschaften als Fängermolekül in der magnetischen Separation vergleichbar zu Eco-O157 sind. Hinsichtlich ihrer Eignung als Nachweismolekül im Zell-ELISA zeigen die *Listeria* Phagen RBPs allerdings eine schlechtere Bindestärke als Eco-O157. Das RBP des *E. coli* O157 spezifischen Phagen hydrolysiert in seiner ursprünglichen Form LPS. Es zeigt daher dementsprechend schlechtere Bindeeigenschaften als Eco-O157, bei dem die hydrolytische Aktivität inaktiviert wurde. Eine ähnliche hydrolytische Aktivität könnten auch die hier verwendeten Bindeproteine z.B. gegen Teichonsäuren aufweisen. Nach Inaktivierung der Aktivität könnte somit auch bei diesen Proteinen die Bindestärke verbessert werden. Zur Bestätigung einer solchen enzymatischen Aktivität müssten allerdings weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Die in dieser Arbeit mit Hilfe der magnetischen Separation bestimmte apparente Dissoziation der CBD511 (6×10^{-10} M) zeigt, dass CBD511 als Fängermolekül eine ähnlich starke Bindung aufweist wie A006Gp17 und Lwe1237. Die von Loessner *et al.* (2002) und Schmelcher (2007) bestimmten Bindeaffinitäten der CBD118, 500 und 511 (Kd: $3,3 \times 10^{-8}$ – 7×10^{-9} M) sind damit um den Faktor 10 – 100 niedriger als die hier für die CBD511 in der magnetischen Separation bestimmte apparente Dissoziation. Dieser Affinitätsunterschied kann erneut durch die Mehrfachbindung bei der magnetischen Separation erklärt werden.

Bei Verwendung als Nachweismolekül konnte allerdings mit der CBD511 aufgrund zu schwacher Signale im Zell-ELISA keine apparente Dissoziation bestimmt werden. Da es als Fängermoleküle eine starke Bindung zeigt und die CBD511 nach Schmelcher (2007) eine starke Bindeaffinität mit einem Kd-Wert im nanomolaren Bereich zeigt, ist es verwunderlich, dass es im Zell-ELISA nicht ausreichend stark für einen Zelnachweis bindet. Vermutlich reicht die Stabilität der CBD511 für einen Test wie

den Zell-ELISA nicht aus. Aus früheren Untersuchungen zur thermischen Stabilität mit der CBD511 ist bekannt, dass dieses Protein im Temperaturübergang bereits ab 30 °C mit der Denaturierung beginnt. Daher könnte das Protein während der Inkubations- und Waschschrte im Zell-ELISA bei RT ebenfalls bereits zum Teil denaturieren, wodurch die Bindung abgeschwächt würde. Für eine Bestimmung der Bindestärke mit Hilfe des Zell-ELISA müsste demnach die Stabilität der CBD511 noch weiter untersucht werden.

Mit den von Schmelcher (2007) bestimmten K_d-Werten der CBDs aus verschiedenen Bakteriophagen (A006, A118, A500, A511, B025, P35, P40 und PSA) sind die in dieser Arbeit ermittelten apparenten Dissoziationswerte aufgrund der unterschiedlichen Methodik nicht direkt vergleichbar.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit identifizierten Bindeproteine A006Gp17 und Lwe1237 apparente Dissoziationswerte im nanomolaren Bereich. Demnach sind sie vermutlich hervorragend zum *Listeria* Nachweis in Lebensmitteln geeignet. Des Weiteren scheinen sie im ELISA Testformat besser zur *Listeria* Detektion geeignet als die CBD511.

Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden strukturelle Bindeproteine von einer Vielzahl von *Listeria* Phagen mit bekannter DNA-Sequenz identifiziert. Über deren abgeleitete AA-Sequenz wurden Ähnlichkeiten zu vielen anderen phagen-ähnliche Sequenzen außerhalb des Genus *Listeria* gefunden. Über diese Sequenzen könnten demnach rasch ähnliche Proteine von Phagen anderer Bakterien identifiziert werden.

Außerdem zeigen die hier identifizierten Bindeproteine im Vergleich zu den bereits bekannten CBDs meist ein engeres Bindespektrum und keine Bindung an die untersuchten Nicht-*Listeria* Stämme. Nach ersten Untersuchungen hinsichtlich der Bindestärke als Nachweismolekül sind sie darüber hinaus besser zur Detektion von *Listeria* geeignet als die CBD511.

Mit den Bindeproteinen A006Gp17 und Lwe1237 können die wichtigsten humanpathogenen *Listeria monocytogenes* Sv-Gruppen 1/2 und 4 gebunden werden. Zum Nachweis von *Listeria* spp. müssten allerdings zusätzlich Bindeproteine gefunden werden, die an die Stämme der Sv 3a, 3b, 3c, 4d und 4e stark binden. Da kein bisher bekannter *Listeria* Phage Stämme der Sv-Gruppe 3 lysiert, müsste nach unbekanntem Sv3-Phagen gesucht werden. Hierfür müssten Umweltproben mit Stämmen der Sv-Gruppen 3 und 7 inkubiert und die Filtrate auf Anwesenheit von Phagen getestet werden, indem sie auf Stämme dieser Sv-Gruppen ausgebracht wurden. Befinden sich Phagen in den Filtraten, die *Listeria* Stämme der Sv-Gruppe lysieren, müssten die Genome dieser Phagen isoliert und sequenziert werden. Im Anschluss daran könnten analog zu dieser Arbeit die Bindeproteine identifiziert werden.

Interessante Aspekte zu den in dieser Arbeit identifizierten Bindeproteinen wären außerdem weitergehende Untersuchungen zur Struktur, zur Stabilität und den Rezeptoren auf der Bakterienoberfläche.

Literaturverzeichnis

- Ackermann, H. W. (2003). Bacteriophage observation and evolution. *Res. Microbio.* 154, 245-251.
- Ackermann, H. W., Dubow M. S. (1987). Virus of Prokaryotes, in: Natural groups of bacteriophages. CRC Press, Boca Raton; S. 171-218.
- Adams, M. H. (1959). Bacteriophages. Interscience publishers Inc., New York.
- Archibald, A. R. (1976). Cell wall assembly in *Bacillus subtilis* Development of bacteriophage binding properties as a result of the pulsed incorporation of teichoic acids. *J. Bacteriol.* 127, 956-900.
- Audurier, A., Chatelain, R., Chalons, F., Piéchaud, M. (1979). Bacteriophage typing of 823 *Listeria monocytogenes* strains isolated in France from 1958 to 1978. *Ann. Microbiol. (Paris)*. 130B, 179-189.
- Baptista, C., Santos, M. A., Sao-Jose, C. (2008). Phage SPP1 reversible adsorption to *Bacillus subtilis* cell wall teichoic acids accelerates virus recognition of membrane receptor YueB. *J. Bacteriol.* 190, 4989-4996.
- Barbirz, S., Müller, J. J., Uetrecht, C., Clark, A. J., Heinemann, U., Seckler, R. (2008). Crystal structure of *Escherichia coli* phage HK620 tailspike: podoviral tailspike endoglycosidase modules are evolutionarily related. *Mol. Microbiol.* 69, 303-316.
- Baxa, U., Speransky, V., Steven, A. C., Wickner, R. B. (2002). Mechanism of inactivation on prion conversion of the *Saccharomyces cerevisiae* Ure2 protein. *PNAS* 99, 5253-5260.
- Baxa, U., Steinbacher, S., Miller, S., Weintraub, A., Huber, R., Seckler, R. (1996). Interactions of phage P22 tails with their cellular receptor, *Salmonella* O-antigen polysaccharide. *Biophys. J.* 71, 2040-2048.
- Bielmann, R. (2009). Specific receptor recognition and cell wall hydrolysis by bacteriophage structural proteins. Dissertation, ETH Zürich, Deutschland.
- Bierne, H., Cossart, P. (2007). *Listeria monocytogenes* surface proteins: for genome predictions to function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 377-397.
- Bille, J., Blanc, D. S., Schmid, H., Boubaker, K., Baumgartner, A., Siegrist, H. H., Tritten, M. L., Lienhard, R., Berner, D., Anderau, R., Treboux, M., Ducommun, J. M., Malinverni, R., Genne, D., Erard, P. H., and Waespi, U. (2006). Outbreak of

- human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005. *Euro. Surveill.* 11, 91-93.
- Birge, E. A. (1994). *Bacterial and bacteriophage genetics*. New York: Springer Verlag, S. 454.
- Bradley, D. E. (1965): The structure of the head, collar and base-plate of „T-even“ type bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.* 38, 395-408.
- Bradley, D. E. (1967). Ultra structure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 31, 230-314.
- Brüssow, H (2001). Phages of dairy bacteria. *Annu.Rev.Microbiol.* 39, 283-303.
- Brüssow, H. (2006). Prophage Genomics. In: *The Bacteriophages*, ed. R.Calendar, Oxford: Oxford University Press, S. 17-25.
- Burmeister, W. P., Guilligay, D., Cusack, S., Wadell, G., Arnberg, N. (2004). Crystal structure of species D adenovirus fiber knobs and their sialic acid binding sites. *J.Virol.* 78, 7727-36.
- Carlton, R. M., Noordmann, W. H., Biswas, B., de Meester, E. D., Loessner, M. J., (2005). Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study and application. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 43, 301-12.
- Chappell, J. D., Prota, A. E., Dermody, T. S., Stehle, T. (2002). Crystal structure of reovirus attachment protein sigma1 reveals evolutionary relationship to adenovirus fiber. *EMBO* 15, 1-11.
- Chatterjee, A. N. (1969). Use of bacteriophage-resistant mutants to study the nature of the bacteriophage receptor site of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 98, 519-527.
- Chen, B., King, J. (1991). Thermal unfolding pathway for the thermostable P22 tailspike endorhamnosidase. *Biochemistry* 30, 6260-6269.
- Cheng, Y., Promadej, N., Kim, J. W, Kathariou, S. (2008). Teichoic acid glycosylation mediated by *gtcA* is required for phage adsorption and susceptibility of *Listeria monocytogenes* serotyp 4b. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1653-1655.
- Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L., Marvin-Guy, L., Rami-Shojaei, S., Brüssow, H. (2004). *Lactobacillus plantarum* bacteriophage LP65: a new member of the SPO1-like genus of the family myoviridae. *J. Bacteriol.* 186, 7068-7083.

- Chopin, A., Boltin, A., Sorokin, A., Ehrlich, S. D., Chopin, M. C. (2001) Analysis of six prophages in *Lactococcus lactis* IL1403: different genetic structure of temperate and virulent phage populations. *Nucleic Acids Res.* 29, 644-651.
- Cossart, P., Toledo-Arana, A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect.* 10, 1041-1050.
- Coyette, J., Ghuysen, J. M. (1968). Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus* strain Copenhagen. IX. Teichoic acid and phage adsorption. *Biochem.* 7, 2385-2389.
- D'Herelle, F. (1917). Sur un microbe invisible anatagonistic des bacilles dysententeriques. *C. R. Acad. Sci.* 165, 373-375.
- Danner, M., Fuchs, A., Miller, S., Seckler, R. (1993). Folding and assembly of phage P22 tailspike endorhamnosidase lacking the N-terminal, head-binding domain. *Eur. J. Biochem.* 215, 653-661.
- Donker-Voet, J. (1959). A serological study on some strains of *Listeria monocytogenes* isolated in Michigan. *Am. J. Vet. Res.* 20, 176-179.
- Dorscht, J., Klumpp J., Biemann R., Schmelcher M., Born Y., Zimmer M., Calendar R., Loessner M. J. (2009). Comparative genomics analysis of *Listeria* bacteriophages. Reveals extensive mosaicism, programmed translational frameshifting, and a novel prophage insertion. *J. Bacteriol.* [Epub ahead of print]
- Duplessis, M., Moineau, S. (2001). Identification of a genetic determinant responsible for host specificity in *Streptococcus thermophilus* bacteriophages. *Mol. Microbiol.* 41, 325-336.
- Dupont, K., Vogensen, F. K., Neve, H., Bresciani, J., Josephsen, J. (2004) Identification of the receptor-binding protein in 936-species lactococcal bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5818-5824.
- Fairbanks, G., Steck, T. L., Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 10, 2606-2617.
- Farber, J. M., Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Reviews* 55, 476-511.
- Fiedler, F., and Ruhlmann, G. (1987). Structure of *Listeria monocytogenes* cell walls. *Bull. Inst. Pasteur* 85, 287-300.

- Fiedler, F., Seger, J., Schrettenbrunner, A., and Seeliger, H. P. R. (1984). The Biochemistry of murein and cell wall teichoic acids in the genus *Listeria*. System. Appl. Microbiol. 5, 360-376.
- Fluit, A., Torensma, R., Visser, M., Aarsman, C., Poppelier, M., Keller, B., Klapwijk, P., Verhof, J. (1993). Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. Appl. Environ. Microbiol. 59, 1289.
- Freiberg, A., Morona, R., Van Den Bosch, L., Jung, C., Behlke, J., Carlin, N., Seckler, R., Baxa, U. (2003). The tailspike protein of *Shigella* phage Sf6. J. Biol. Chem. 278, 1542-1548.
- Gaeng, S., Scherer, S., Neve, H., Loessner, M. J. (2000). Gene cloning and expression and secretion of *Listeria monocytogenes* bacteriophage-lytic enzymes in *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2951-2958.
- Garrity, G. M. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer Science und Business Media Inc..
- Geller, B. L., Ivey, R. G., Trempy, J. E., Hettinger-Smith, B. (1993). Cloning of a chromosomal gene required for phage infection of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* C2. J. Bacteriol. 175, 5510-5519.
- Givan, A. L., Glassey, K., Green, R. S., Lang, W. K., Anderson, A. J., Archibald, A. R. (1982). Relation between wall teichoic acid content of *Bacillus subtilis* and efficiency of adsorption of bacteriophages SP50 and 425. Arch. Microbiol. 133, 318-322.
- Glaser, L., Ionesco, H., Schaeffer, P. (1966). Teichoic acids as components of a specific phage receptor in *Bacillus subtilis*. Biochim. Biophys. Acta. 124, 415-417.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couve, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K. D., Fsihi, H., Garcia-del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gomez-Lopez, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L. M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J. M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Perez-Diaz, J. C., Purcell, R., Rimmel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vazquez-Boland, J. A.,

- Voss, H., Wehland, J., Cossart, P. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294, 849-852.
- Gray, M., Stafseth, J., Thorp, F., Scholl, L.B., Riley, W. F. (1948). A new technique for isolation Listerellae from bovin brain. *J. Bacteriol.* 55, 471-476.
- Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., Loessner, M. J. (2009). Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 93-100.
- Guo, S., Shu, D., Simon, M. N., Guo, P. (2003). Gene cloning, purification, and stoichiometry quantification of phi29 anti-receptor gp12 with potential use as special ligand for gene delivery. *Gene* 315, 145-52.
- Guttman, B., Raya, R., Kutter, E. (2005). Basic phage biology. In *Bacteriophages - Biology and Applications*, ed. E. Kutter and A. Sulakvelidze, pp 29-66. Boca Raton: CRC Press.
- Haggard-Ljungquist, E., Jacobsen, E., Rishovd, S., Six, E. W., Nilssen, O., Sunshine, M. G., Lindqvist, B. H., Kim, K. J., Barreiro, V., Koonin, E. V. (1995). Bacteriophage P2: genes involved in baseplate assembly. *Virology* 213, 109-121.
- Hatfield, G. W., Roth, D. A. (2007). Optimizing scaleup yield for protein production: Computationally optimized DNA assembly (CODA) and translation engineering. *Biotechnol. Annu .Rev.* 13, 27-42.
- Haun, M., Wasi, S. (1990). Biotinylated antibodies bound to streptavidin beads: a versatile solid matrix for immunoassays. *Anal. Biochem.* 191, 337-342.
- Heller, K. J. Molecular interaction between bacteriophage and the gram-negative cell envelope. *Arch. Microbiol.* 158, 235-248. Review.
- Hendrix, R. W., Casjens, S. (2006). Bacteriophage λ and its genetic neighborhood. In: *The bacteriophages*, ed. Calendar, R. Oxford: Oxford university press, S. 409-447.
- Hodgson, D. A. (2000). Generalized transduction of serotype 1/2 and serotype 4b strains of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 35, 312-323.
- Jay, J. M., Loessner, M. J., Golden, D. A. (2005). *Modern Food Microbiology*. Science + Business Media Inc..
- Johnson, W. C. (1990). *Protein Secondary Structure and CD: A Practical Guide*.
- Jones, D. (1988). The place of *Listeria* among gram-positive bacteria. *Infection*, 16 Suppl. 2, S. 85-88.

- Katsura, I. (1990). Mechanism of length determination in bacteriophage *lambda* tails. *Adv. Biophys.* 26, 1-18.
- King, J., Laemmli, U. K. (1971). Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 62, 465-477.
- Klaus, S., Krüger, D., Meyer, J. (1992). *Bakterienviren*. Jena: Gustav Fischer Verlag, S. 300.
- Klumpp, J., Dorscht, J., Lurz, R., Biemann, R., Wieland, M., Zimmer, M., Calendar, R., Loessner, M. J. (2008). The terminally redundant, nonpermuted genome of *Listeria* bacteriophage A511: a model for the SPO1-like myoviruses of gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 190, 5753-5765.
- Knippers, R. (2001). *Molekulare Genetik*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S. 26.
- Korndörfer I. P., Kanitz A., Danzer J., Zimmer M., Loessner M. J., Skerra A. (2008). Structural analysis of the L-alanoyl-D-glutamate endopeptidase domain of *Listeria* bacteriophage endolysin Ply500 reveals a new member of the LAS peptidase family. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 64, 644-650.
- Korndörfer I. P., Danzer J., Schmelcher M., Zimmer M., Skerra A., Loessner M. J. (2006). The crystal structure of the bacteriophage PSA endolysin reveals a unique fold responsible for specific recognition of *Listeria* cell walls. *J. Mol. Biol.* 364, 678-689.
- Kretzer, J. W., Lehmann, R., Schmelcher, M., Banz, M., Kim, K. P., Korn, C., Loessner, M. J. (2007). High affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1992-2000.
- Kutter, E.; Sulakvelidze, A. (2005), *Bacteriophages: Biology and Applications*. Boca Raton, CRC Press.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambert, P. A., Hancock, J. C., and Baddiley, J. (1975). The interaction of magnesium ions with teichoic acid. *Biochem. J.* 149, 519-524.
- Lan, Z., Fiedler, F., Kathariou, S. (2000) A sheep in wolf's clothing: *Listeria innocua* strains with teichoic acid-associated surface antigens and genes characteristic of *Listeria monocytogenes* serogroup 4. *J. Bacteriol.* 182, 6161–6168.
- Loeffler, G., Petrides, P. E. (2003). *Biochemie und Pathobiochemie*. Berlin: Springer-Verlag, S. 12.

- Loessner, M. J. (1991). Improved procedure for bacteriophage typing of *Listeria* strains and evaluation of new phages. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 882-884.
- Loessner, M. J. (2000). Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of *Listeria monocytogenes*: implications for phage evolution. *Mol. Microbiol.* 35, 324-340.
- Loessner, M. J. (2005). Bacteriophage endolysins: current state of research and applications. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 480-487.
- Loessner, M. J., Busse, M. (1990). Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1912-1918.
- Loessner, M. J., Calendar, R. (2006). The *Listeria* bacteriophages. In: The bacteriophages, ed. Calendar, R. Oxford: Oxford university press, S. 593-601.
- Loessner, M. J., Estela, L. A., Zink, R., Scherer, S. (1994). Taxonomical classification of 20 newly isolated *Listeria* bacteriophages by electron microscopy and protein analysis. *Intervirology* 37, 31–35.
- Loessner, M. J., Goepl, S., Busse, M. (1991). Comparative inducibility of bacteriophage in naturally lysogenic and lysogenized strains of *Listeria* spp. by UV light and Mitomycin C. *Lett. Appl. Microbiol.* 12, 196-199.
- Loessner, M. J., Kramer, K., Ebel, F., Scherer, S. (2002). C-terminal domains of *Listeria monocytogenes* bacteriophage murein hydrolases determine specific recognition and high-affinity binding to bacterial cell wall carbohydrates. *Mol. Microbiol.* 44, 335–349.
- Loessner, M. J., Rees, C. E., Stewart, G. S., Scherer, S. (1996). Construction of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for rapid and sensitive detection of viable *Listeria* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1133-1140.
- Loessner, M. J., Schneider, A., and Scherer, S. (1995). A new procedure for efficient recovery of DNA, RNA, and proteins from *Listeria* cells by rapid lysis with a recombinant bacteriophage endolysin. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1150-1152.
- Loessner, M. J., und Rees C. E. (2005). *Listeria* phages: Basics and Applications. In: Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology, ed. Waldor, M. K., Friedman, D. I., Sankar, L. A. Washington: ASM Press, S. 362-379.
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998). Bioanalytik. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Lukinmaa, S., Miettinen, M., Nakari, U. M., Korkeala, H., Siitonen, A. (2003). *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections: variation of sero- and

- genotypes during an 11-year period in Finland. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1694-1700.
- Mattingly, J.A., Butman, B.T., Plank, M. C., Durham, R. J., Robinson, B. J. (1988). Rapid monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Listeria* in food products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71, 679-681.
- Mayer, G. (2003). Medical Microbiology MBIM. 650/720. <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/phage.htm>.
- Mesyanzhinov, V. V., Leiman, P. G., Kostyuchenko, V. A., Kurochkina, L. P., Miroshnikov, K. A., Sykilinda, N. N., Shneider, M. M. (2004). Molecular Architecture of Bacteriophage T4. *Biochemistry (Moscow)* 69, 1190-1202.
- Miller, E. S., Kutter, E., Mosig, G., Arisaka, F., Kunisawa, T., Ruger, W. (2003). Bacteriophage T4 genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 86-156.
- Monteville, M. R., Ardestani, B., Geller, B. L. (1994). Lactococcal bacteriophages require a host cell wall carbohydrate and a plasma membrane protein for adsorption and ejection of DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3204-3211.
- Nelson, K. E., Fouts, D. E., Mongodin, E. F., Ravel, J., DeBoy, R. T., Kolonay, J. F., Rasko, D. A., Angiuoli, S. V., Gill, S. R., Paulsen, I. T., Peterson, J., White, O., Nelson, W. C., Nierman, W., Beanan, M. J., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Dodson, R. J., Durkin, A. S., Madupu, R., Haft, D. H., Selengut, J., Van Aken, S., Khouri, H., Fedorova, N., Forberger, H., Tran, B., Kathariou, S., Wonderling, L. D., Uhlich, G. A., Bayles, D. O., Luchansky, J. B., Fraser, C. M. (2004). Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res.* 32, 2386-2395.
- Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., Gray, T. (1995). How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411-2423.
- Peel, M., Donachie, W., and Shaw, A. (1988). Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J. Gen. Microbiol.* 134, 2171-2178.
- Prevelige, P. E. (2006). Bacteriophage P22. In: *The bacteriophages*, ed. Calendar, R. Oxford: Oxford university press, S. 457-468.
- Rees, C. E., Dodd, C. E. (2006). Phage for rapid detection and control of bacterial pathogens in food. *Adv. Appl. Microbiol.* 59, 159-186.

- Ricagno, S., Campanacci, V., Blangy, S., Spinelli, S., Tremblay, D., Moineau, S., Tegoni, M., Cambillau, C. (2006). Crystal structure of the receptor-binding protein head domain from *Lactococcus lactis* phage bIL170. *J.Virol.* 80, 9331-9335.
- Rocourt, J., Buchrieser, C. (2007). The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy and Identification. In: Ryser Marth.
- Roy, B., Ackermann, H. W., Pandian, S., Picard, G., Goulet, J. (1993). Biological inactivation of adhering *Listeria monocytogenes* by listeriaphages and a quaternary ammonium compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2914-2917.
- Rozand, C., Feng, P. C. H. (2009). Specificity analysis of a novel phage-derived ligand in an Enzyme-linked fluorescent assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *J. food protection* 72, 1078-1081.
- Rudolph, R., Lilie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.* 10, 49-56.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbour: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schleifer, K. H., Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36, 407-77.
- Schleifer, K. H., Steber, J. (1974). Chemische Untersuchungen am Phagenrezeptor von *Staphylococcus epidermidis*. *Arch. Microbiol.* 98, 251-270.
- Schmelcher, M. (2007). Engineering of bacteriophage endolysins for detection and control of *Listeria*. Dissertation, Swiss Federal Institute of Technology Zurich.
- Schmid, F. X. (1998). Spectral Methods of Characterizing Protein Conformation and Conformational Changes. In: *Protein structure, a practical approach*, ed. T.E.Creighton, Oxford: IRL Press, 251-285.
- Scholl, D., Rogers, S., Adhya, S., Merrill, C. R. (2001). Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it to infect and replicate on both K1 and K5 strains of *Escherichia coli*. *J. Virology* 75, 2509-2515.
- Schuch, R., Fischetti, V. A. (2006). Detailed genomic analysis of the *Wbeta* and *gamma* phages infecting *Bacillus anthracis*: implications for evolution of environmental fitness and antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 188, 3037-3051.
- Schuchat, A., Swaminathan, B., and Broome, C. V. (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4, 169-183.

- Schultz, E. W. (1945). *Listerella* infections: a review. Stanford Medical Bulletin 3, 135-151.
- Sciara, G., Blangy, S., Siponen, M., Mc Grath, S., van Sinderen, D., Tegoni, M., Cambillau, C., Campanacci, V. (2008). A topological model of the baseplate of lactococcal phage Tuc2009. J.Biol.Chem. 283, 2716-2723.
- Seckler, R. (1998). Folding and function of repetitive structure in the homotrimeric phage P22 tailspike protein. J. Struct. Biol. 122, 216-222.
- Seeliger, H. P. R. (1975). Serovars of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species. Proc 6th Int. Symp. Listeriosis in Sutton-Bonington. University of Leicester Press, Leicester, England.
- Skjerve, E., Rorvik, L. M., Olsvik, O. (1990). Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3478-3481.
- Spinelli, S., Campanacci, V., Blangy, S., Moineau, S., Tegoni, M., Cambillau, C. (2006a). Modular structure of the receptor binding proteins of *Lactococcus lactis* phages. The RBP structure of the temperate phage TP901-1. J.Biol.Chem. 281, 14256-14262.
- Spinelli, S., Desmyter, A., Verrips, C. T., de Haard, H. J., Moineau, S., Cambillau, C. (2006b). Lactococcal bacteriophage p2 receptor-binding protein structure suggests a common ancestor gene with bacterial and mammalian viruses. Nat. Strct. Mol. Biol. 13, 85-89.
- Steen, A., Buist, G., Leenhouts, K. J., El Khattabi, M., Grijpstra, F., Zomer, A. L., Venema, G., Kuipers, O. P., Kok, J. (2003). Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. J. Biol. Chem. 278, 23874-23881.
- Steinbacher, S., Miller, S., Baxa, U., Budisa, A., Weintraub, A., Seckler, R., Huber, R. (1997). Phage P22 tailspike protein: crystal structure of the head-binding domain at 2.3 Å, fully refined structure of the endorhamnosidase at 1.56 Å resolution, and the molecular basis of O-antigen recognition and cleavage. J. Mol. Biol. 267, 865-880.
- Stryer, L. (1999). Biochemie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, S. 53.
- Stuer-Lauridsen, B., Janzen, T., Schnabl, J., Johansen, E. (2003). Identification of the host determinant of two prolate-headed phages infecting *Lactococcus lactis*. Virology. 309, 10-17.

- Tang, L., Marion, W. R., Cingolani, G., Prevelige, P. E., Johnson, J. E. (2005). Three-dimensional structure of the bacteriophage P22 tail machine. *EMBO* 24, 2087-2095.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 211-222.
- Thomassen, E., Gielen, G., Schutz, M., Schoehn, G., Abrahams, J. P., Miller, S., van Raaij, M. J. (2003). The structure of the receptor-binding domain of the bacteriophage T4 short tail fibre reveals a knitted trimeric metal-binding fold. *J. Mol. Biol.* 331, 361-373.
- Tilney, L. G., D. A. Portnoy. (1989). Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J. Cell Biol.* 10,:1597-608.
- Tran, H. L., Fiedler, F., Hodgson, D. A., Kathariou, S. (1999). Transposon-induced mutations in two loci of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a result in phage resistance and lack of N-acetylglucosamina in the teichoic acid of cell wall. *App. Environ. Microbiol.* 65, 4793-4798.
- Twort, F. W. (1915). An investigation on the nature of the ultra-microscopic viruses. *Lancet* ii: 1241-1243.
- Uchikawa, K. I., Sekikawa, I., Azuma, I. (1986a). Structural studies on teichoic acids in cell wall of several serotypes of *Listeria monocytogenes*. *J. Biochem.* 99, 315-327.
- Van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., Wickner, R. B. (2000). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. San Diego, Academic press S. 1162.
- Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T. Dominguez-Bernal, Goebel, W., Gonzalez-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 584-640.
- Vegge, C. S., Vogensen, F. K., Mc Grath, S., Neve, H., van Sinderen, D., Brondsted, L. (2006). Identification of the lower baseplate protein as the antireceptor of the

- temperate lactococcal bacteriophages TP901-1 and Tuc2009. *J. Bacteriol.* 188, 55-63.
- Villafane, R., Costa, S., Ahmed, R., Salgado, C. (2005). Conservation of the N-terminals of some phage tail proteins. *Arch. Virol.* 150, 2609-2621.
- Voss, S., Skerra, A. (1997). Mutagenesis of a flexible loop in streptavidin leads to higher affinity for the Strep-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein Eng.* 10, 975-982.
- Walter, M., Fiedler, C., Grassl, R., Bieble, M., Rachel, R., Hermo-Parrado, X. L., Llamas-Saiz, A. L., Seckler, R., Miller, S., van Raaij, M. J. (2008). Structure of the receptor-binding protein of bacteriophage Det7: a podoviral tail spike in a *myovirus*. *J. Virol.* 82, 2265-2273.
- Wang, I. N., Smith, D. L., and Young, R. (2000). Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 799-825.
- Weis, J., and Seeliger, H. P. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.* 30, 29-32.
- Wendlinger, G., Loessner, M. J., Scherer, S. (1996). Bacteriophage receptors on *Listeria monocytogenes* cells are the N-acetylglucosamine and rhamnose substituents of teichoic acids or the peptidoglycan itself. *Microbiology* 142, 985-992.
- Whitford, D. (2005). Amino Acids: the Building Blocks of Proteins. In: *Proteins: structure and function*, ed. J. Wiley-Chichester, S. 13-38.
- Wicken, A. J., and Knox, K. W. (1975). Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen. *Science* 187, 1161-1167.
- Young, I., Wang, I., and Roof, W. D. (2000). Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol.* 8, 120-128.
- Zimmer, M., Sattelberger, E., Imman, R. B., Calendar, R., Loessner, M. J. (2003). Genom and proteome of *Listeria monocytogenes* phage PSA: an unusual case for programmed +1 translational frameshifting in structural protein synthesis. *Mol. Microbiol.* 50, 303-317.
- Zink, R., und Loessner, M. J. (1992). Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 296-302.

Appendix

Appendix I : Übersichtstabelle der getesteten Nicht-*Listeria* Stämme und ihre Wechselwirkung mit verschiedenen RBPs.

Stamm	ProCC	Spezies	Medium	Temp in °C	A006Gp17 (HisJs)	A11Gp19 (Js)	A500Gp19 (HisJs)	Lwe1237 (HisJs)	A511Gp108 (NsHis)
ATCC 33019	S2906	<i>Bacillus cereus</i>	LB	30	-	-	-	-	-
ATCC 6464	S2907	<i>Bacillus cereus</i>	LB	30	-	-	-	-	-
ATCC 7064	S2908	<i>Bacillus cereus</i>	LB	30	-	-	-	-	-
ATCC 11778	S2909	<i>Bacillus cereus</i>	LB	30	-	-	-	-	-
ATCC 10876	S2911	<i>Bacillus cereus</i>	LB	30	-	-	-	-	-
WS 2453	S1792	<i>Bacillus cereus</i>	LB	30	-	-	-	-	-
WS 1526	S2350	<i>Bacillus circulans</i>	LB	30	-	-	-	-	-
Isolat bMx (0006196)	S2939	<i>Bacillus circulans</i>	LB	30	-	-	-	-	-
Isolat bMx (9308083)	S2936	<i>Bacillus coagulans</i>	LB	30	-	-	-	-	-
DSMZ 2048	S1587	<i>Bacillus mycoides</i>	LB	30	-	-	-	-	-
WS 2641	S2340	<i>Bacillus mycoides</i>	LB	30	-	-	-	-	-
Eigenisolat	S534	<i>Bacillus</i> sp.	LB	30	-	-	-	-	-
WS 1534	S2351	<i>Bacillus spaericus</i>	LB	30	-	-	-	-	-
DSMZ 1970	S1795	<i>Bacillus subtilis</i>	LB	37	-	-	-	-	-
DSMZ 10	S310	<i>Bacillus subtilis</i>	LB	30	-	-	-	-	-
Eigenisolat	S471	<i>Bacillus thuringiensis</i>	LB	30	-	-	-	-	-
DSMZ 4712	S1600	<i>Brochothrix campestris</i>	BHI	30	-	-	-	-	-
DSMZ 20171	S1596	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	BHI	30	-	-	-	-	-
Isolat ETH Zürich (L 90)	S1172	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	BHI	30	-	-	-	-	-
DSMZ 20589	S1604	<i>Carnobacterium divergens</i>	LB	30	-	-	-	-	-
DSMZ 20623	S1605	<i>Carnobacterium divergens</i>	LB	30	-	-	-	-	-

Fortsetzung von Appendix I

Stamm	ProCC	Spezies	Medium	Temp in °C	A006Gp17 (HisJs)	A11Gp19 (Js)	A500Gp19 (HisJs)	Lwe1237 (HisJs)	A511Gp108 (NsHis)
DSMZ 4847	S1601	<i>Carnobacterium gallinarum</i>	LB	30	-	-	-	-	-
DSMZ 20722	S1608	<i>Carnobacterium piscicola</i>	LB	30	-	-	-	-	-
DSMZ 20577	S1799	<i>Cellulomonas turbata</i>	BHI	30	-	-	-	-	-
ATCC 13032	S1174	<i>Corynebacterium glutanicum</i>	Caso	30	-	-	-	-	-
DSMZ 20137	S1591	<i>Corynebacterium glutanicum</i>	Caso	30	-	-	-	-	-
DSMZ 20680	S1606	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	BHI	37	-	-	-	-	-
DSMZ 20633	S1607	<i>Enterococcus durans</i>	LB	37	-	-	-	-	-
ATCC 14933	S1176	<i>Enterococcus faecalis</i>	LB	37	-	-	-	-	-
DSMZ 2146	S1553	<i>Enterococcus faecium</i>	Caso	37	-	-	-	-	-
DSMZ20640	S1595	<i>Kurthia gibsonii</i>	Caso	37	-	-	-	-	-
DSMZ 20487	S1599	<i>Kurthia zopfii</i>	LB	30	-	-	-	-	-
DSMZ 20580	S1593	<i>Kurthia zopfii</i>	LB	30	-	-	-	-	-
DSMZ 2601	S1583	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS	37, stehend	-	-	-	-	-
DSMZ 20174	S1584	<i>Lactobacillus plantarum</i>	MRS	37, stehend	-	-	-	-	-
DSMZ 20030	S1187	<i>Micrococcus luteus</i>	LB	37	-	-	-	-	-
WS 2044	S1190	<i>Rhodococcus equi</i>	LB	30	-	-	-	-	-
DSMZ 43199	S1598	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	LB	30	-	-	-	-	-
DSMZ 346	S1551	<i>Staphylococcus aureus</i>	LB	37	-	-	-	-	-
Isolat (Klinikum Regensburg)	S461	<i>Staphylococcus aureus</i>	LB	37	-	-	-	-	-
Isolat (Klinikum Regensburg)	S462	<i>Staphylococcus aureus</i>	LB	37	-	-	-	-	-
DSMZ 11676	S1796	<i>Staphylococcus carnosus</i> ssp. <i>Utilis</i>	LB	37	-	-	-	-	-
DSMZ 20044	S1546	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	LB	37	-	-	-	-	-

Fortsetzung von Appendix I

Stamm	ProCC	Spezies	Medium	Temp in °C	A006Gp17 (HisJs)	A11Gp19 (Js)	A500Gp19 (HisJs)	Lwe1237 (HisJs)	A511Gp108 (NsHis)
Eigenisolat	S27	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	LB	37	-	-	-	-	-
Isolat (Klinikum Regensburg)	S1509	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	LB	37	-	-	-	-	-
DSMZ 6179	S1602	<i>Staphylococcus xylosum</i>	LB	37	-	-	-	-	-
DSMZ 20727	S1800	<i>Streptococcus equi ssp zooepidemicus</i>	LB	37	-	-	-	-	-
DSMZ 20523	S1603	<i>Streptococcus mutans</i>	LB	37	-	-	-	-	-

Bestimmung der Bindung an Nicht-*Listeria* Stämmen mit Hilfe magnetischer Separation nach Material und Methoden 2.5.1.1.

+ : Bindefizienz zwischen 50 - 100 % relativ zu den insgesamt wieder gefundenen Zellen,

(+) : Bindefizienz zwischen 10 - 50 %,

- : Bindefizienz zwischen 0 - 10 %.

Bei leeren Feldern wurde die Bindung nicht untersucht.

Abkürzungen: ATCC: *American type culture collection*, DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, ProCC: Profos culture collection, WS: Wehnstephan.

Appendix II : Übersichtstabelle der getesteten *Listeria* Stämme und ihre Wechselwirkung mit verschiedenen RBPs.

Stamm	ProCC	<i>Listeria</i> Spezies	Sv	A006 Gp17 (HisJs)	A118 Gp19 (Js)	P35 Gp16 (HisJs)	A500 Gp19 (HisJs)	PSA Gp15 (Js)	B025 Gp19 (NshHis)	B054 Gp26 (HisJs)	Lwe 1237 (HisJs)	A511 Gp108 (NshHis)	Phage A511
WSLC 1211	S1134	<i>monocytogenes</i>	1/2		+	^E						+	
WSLC 4453	S1156	<i>monocytogenes</i>	1/2		+	^E						-	
DSMZ 20600	S679	<i>monocytogenes</i>	1/2a	+	+	^F							+
ATCC 351	S992	<i>monocytogenes</i>	1/2a	+	+	^F					-	+	+
SLCC 6204	S993	<i>monocytogenes</i>	1/2a	+	+	^E					-	+	+
SLCC 7149	S994	<i>monocytogenes</i>	1/2a	+	+	^F						+	+
SLCC 7150	S995	<i>monocytogenes</i>	1/2a	+	(+)	(^E)						+	+
EGD klinisches Isolat	S1095	<i>monocytogenes</i>	1/2a	+	+	^F							+
Eigenisolat	S1521	<i>monocytogenes</i>	1/2a	+	+								
Eigenisolat	S1577	<i>monocytogenes</i>	1/2a	+	+	^E						-	
Eigenisolat	S1793	<i>monocytogenes</i>	1/2a	+	+	^E							+
SLCC 6031	S996	<i>monocytogenes</i>	1/2b	+	+	^E							+
SLCC 7136	S997	<i>monocytogenes</i>	1/2b	+	+	^E					-	-	
SLCC 7151	S998	<i>monocytogenes</i>	1/2b	+	+	- / (^E)						-	
SLCC 7152	S999	<i>monocytogenes</i>	1/2b	+	+	^E					-		+
WSLC 40140	S1153	<i>seeligeri</i>	1/2b	+	+	(^E)						+	+
WSLC 50149	S1158	<i>welshimeri</i>	1/2b	+	+								+
WSLC 1001	S772	<i>monocytogenes</i>	1/2c	+	+					-		+	+
SLCC 4950	S1000	<i>monocytogenes</i>	1/2c	+	+	^F							+
SLCC 6793	S1001	<i>monocytogenes</i>	1/2c	+	(+)								+
SLCC 7154	S1002	<i>monocytogenes</i>	1/2c	+	+	^F					-		+
SLCC 7290	S1003	<i>monocytogenes</i>	1/2c	+	+	^F							+
Eigenisolat	S1794	<i>monocytogenes</i>	1/2c	+	+							+	
Isolat bMx (8309024)	S2867	<i>monocytogenes</i>	1/2c	+	+	^F							
WSLC 1485	S1135	<i>monocytogenes</i>	3a	-	-	^E					-	-	

Fortsetzung von Appendix II

Stamm	ProCC	Listeria Spezies	Sv	A006 Gp17 (HisJs)	A118 Gp19 (Js)	P35 Gp16 (HisJs)	A500 Gp19 (HisJs)	PSA Gp15 (Js)	B025 Gp19 (NsHis)	B054 Gp26 (HisJs)	Lwe 1237 (HisJs)	A511 Gp108 (NsHis)	Phage A511
Eigenisolat	S1576	<i>monocytogenes</i>	3a	-	-	- ^E	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 11073	S2967	<i>monocytogenes</i>	3a	-	-	- ^E	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 11074	S2968	<i>monocytogenes</i>	3a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 11075	S2969	<i>monocytogenes</i>	3a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 11076	S2970	<i>monocytogenes</i>	3a	-	-	- ^E	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 1031	S1136	<i>monocytogenes</i>	3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 1444	S1137	<i>monocytogenes</i>	3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 11078	S2972	<i>monocytogenes</i>	3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 40127	S1154	<i>seeligeri</i>	3b	-	-	- ^E	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 40130	S1155	<i>seeligeri</i>	3b	-	-	- ^E	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 40132	S2982	<i>seeligeri</i>	3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 40133	S2983	<i>seeligeri</i>	3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 40137	S2987	<i>seeligeri</i>	3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 40138	S2988	<i>seeligeri</i>	3b	-	-	- ^E	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 40128	S3026	<i>seeligeri</i>	3b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 1032	S1138	<i>monocytogenes</i>	3c	-	-	- ^E	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 1435	S1139	<i>monocytogenes</i>	3c	-	-	- ^E	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 11084	S2976	<i>monocytogenes</i>	3c	-	-	- ^E	-	-	-	-	-	-	-
WSLC 1049	S1141	<i>monocytogenes</i>	4a	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Isolat bMx (8309028)	S2918	<i>monocytogenes</i>	4a	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
WSLC 1020	S1140	<i>monocytogenes</i>	4a	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
WSLC 11105	S1750	<i>monocytogenes</i>	4ab	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
WSLC 11101	S1749	<i>monocytogenes</i>	4ab	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
WSLC 1042	S775	<i>monocytogenes</i>	4b	-	-	-	+	(+)	(+)	(+)	+	+	+
ScottA klinisches Isolat	S776	<i>monocytogenes</i>	4b	-	-	-	+	(+)	(+)	(+)	+	+	+

Fortsetzung von Appendix II

Stamm	ProCC	Listeria Spezies	Sv	A006 Gp17 (HisJs)	A118 Gp19 (Js)	P35 Gp16 (HisJs)	A500 Gp19 (HisJs)	PSA Gp15 (Js)	B025 Gp19 (NstHis)	B054 Gp26 (HisJs)	Lwe 1237 (HisJs)	A511 Gp108 (NstHis)	Phage A511
SLCC 4013	S1004	<i>monocytogenes</i>	4b	-	-	-	+	(+)			+	+	-
SLCC 7194	S1006	<i>monocytogenes</i>	4b	-	-	-	+				+	+	
SLCC 7356	S1007	<i>monocytogenes</i>	4b	-	-	-	+				+	+	
ATCC 1945	S2684	<i>monocytogenes</i>	4b	-	-	-	+	(+)			+	+	
ATCC 19115	S2866	<i>monocytogenes</i>	4b	-	-	-	+	(+)			+	+	
WSLC 1019	S1142	<i>monocytogenes</i>	4c	-	-	-	+				+	+	+
Isolat bMx (8309031)	S2868	<i>monocytogenes</i>	4c	-	-	+ ^E	+				+	+	
WSLC 1033	S1143	<i>monocytogenes</i>	4d	-	-	-	- ^E				(+)	+	+
WSLC1048	S1144	<i>monocytogenes</i>	4d	-	-	- ^E	-				(+)	+	+
Isolat bMx (8309032)	S2919	<i>monocytogenes</i>	4d	-	-	- ^E	- ^E				(+)		
Isolat bMx (8309033)	S2920	<i>monocytogenes</i>	4e	-	-	- ^E	-				(+)		
WSLC 1018	S1145	<i>monocytogenes</i>	4e	-	-	-	-				(+)	+	+
WSLC 3009	S857	<i>ivanovii</i>	5	-	-	(+)			+	(+)	+	+	+
SLCC 2098	S1012	<i>ivanovii</i>	5	-	-	-	-		-	(+)	+	+	+
SLCC 2102	S1013	<i>ivanovii</i>	5	-	-	-	-		-	(+)	+	+	+
SLCC 4706	S1014	<i>ivanovii</i>	5	-	-	(+)			+		+	+	+
WSLC 3060	S1151	<i>ivanovii</i> ssp. <i>londoniensis</i>	5''	-	-	-					+	+	+
WSLC 30167	S1164	<i>ivanovii</i> ssp. <i>londoniensis</i>	5	-	-	-				(+)	+	+	+
WSLC 3010	S1149	<i>ivanovii</i> ssp. <i>ivanovii</i>	5''	-	-	-				-	+	+	+
WSLC 30165	S1150	<i>ivanovii</i> ssp. <i>ivanovii</i>	5''	-	-	-				(+)	+	+	+
SLCC 7159	S1008	<i>innocua</i>	6a	-	-	-	-				+	+	+
SLCC 7160	S1009	<i>innocua</i>	6a	-	-	-	-				+	+	+
SLCC 5326	S1010	<i>innocua</i>	6a	-	-	-	-			-	+	+	+

Fortsetzung von Appendix II

Stamm	ProCC	Listeria Spezies	Sv	A006 Gp17 (HisJs)	A118 Gp19 (Js)	P35 Gp16 (HisJs)	A500 Gp19 (HisJs)	PSA Gp15 (Js)	B025 Gp19 (NshHis)	B054 Gp26 (HisJs)	Lwe 1237 (HisJs)	A511 Gp108 (NshHis)	Phage A511
WSLC 2011	S1147	<i>innocua</i>	6a	-	-	-	+				+	+	-
WSLC 50146	S1157	<i>welshimeri</i>	6a	-	-	-	+				+	+	+
WSLC 50150	S1159	<i>welshimeri</i>	6a	-	-	-	+			(+)	+	+	-
WSLC 2012	S773	<i>innocua</i>	6b	-	-	-					+	+	+
Isolat bMx (8309036)	S2686	<i>innocua</i>	6b	-	-	-					+	+	+
Isolat bMx (0756065)	S2854	<i>innocua</i>	6b						+		+	+	
WSLC 41116	S1754	<i>seeligeri</i>	6b	-	-	-						+	+
Eigenisolat	S1575	<i>welshimeri</i>	6b	-	-	-					+	+	-
WSLC 1034	S1146	<i>monocytogenes</i>	7	-	-	- ^E				-	-	-	-

Die Bindetests wurden, wenn nicht anderes vermerkt, mit Hilfe der magnetische Separation (2.5.1.1) durchgeführt:

- + : Bindeeffizienz zwischen 50 - 100 % relativ zu den insgesamt wieder gefundenen Zellen,
- (+) : Bindeeffizienz zwischen 10 - 50 %,
- : Bindeeffizienz zwischen 0 - 10 % ;

Bei einer Kennzeichnung mit hoch E wurde der Bindetest über Sandwich-ELISA (2.5.1.3) durchgeführt:

- + : Signal/Hintergrundratio > 10,
- (+) : Signal/Hintergrundratio 3 – 10,
- : Signal/Hintergrundratio < 3.

Das Wirtsspektrum des Phagen A511 wurden über Lysehöfe im Bakterienrasen der jeweiligen *Listeria* Stämme untersucht:

- + : deutlicher Lysehof im Bakterienrasen,
- : kein Lysehof im Bakterienrasen.

Bei leeren Felder wurden die Binde- bzw. die Lyseeigenschaften des jeweiligen Stamms nicht untersucht. ATCC: *American type culture collection*, DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, ProCC: *Profos culture collection*, SLCC: *Special Listeria culture collection*, Sv: *Serovar*, WSLC: *Weihnstephaner Listeria collection*.

Appendix III : Vektor Sequenzen**pET21a-NsHIS**

TGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGGCGCATTAAAGCGCGGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTAC
ACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTCTTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCCG
TCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGA
TTAGGGTGATGGTTACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTT
CTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACCTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTTCTTTGATTTATAAGG
GATTTTGGCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACCGGAATTTAACAAAAAT
ATTAACGTTTTACAATTTTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAAT
ACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATAT
GAGTATTCAACATTTCCGTGTGCGCCCTTATTCCCTTTTTTTGCGGCATTTTTGCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGA
AACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAG
CGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCGGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGG
CGCGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACTATTTCTCAGAATGACTTGGT
TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAAC
CATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTTGCA
CAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAAACGACGAGCG
TGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTC
CCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGG
CTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGG
TAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGC
TGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTT
AAAATTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACG
TGAGTTTTTCCTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCTTTTCTTTCGCG
CGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAAACCACCCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCGCGATCAAGAGTACCAAC
TCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGG
CCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTTACCAGTGGCTGCTGCCAG
TGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAAC
GGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATG
AGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAAACAGGAGAGCG
CACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACTCTGACTTGAGCGT
CGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCCTTTTTACGGTTCTCTG
GCCTTTTGCTGGCCTTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAACCGCC
TTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGGAGGAAAGCGGAAAG
CGCCTGATGCGGTATTTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTTACACCCGCATATATGGTGCCTCTCAGTACAA
TCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTTCATGGCTGCGCCCCG
ACACCCGCCAACACCCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGAC
CGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAGCTC
ATCAGCGTGGTCTGAAGCGATTACAGATGTCTGCCTGTTTATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAAG
CGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTCTGTTTGGTCACTGATGCCTCCGT
TGAAGGGGATTTCTGTTTCATGGGGTAAATGATACCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCAGGATACGGGTTACTGA
TGATGAACATGCCCCGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACACTGGCGGTATGGATCGGCGGGACAGAGAAA
AATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCTGTTAATACAGATGTAGGTGTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCTGCG
GATGCAGATCCGGAACATAATGGTGCAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAAACCGGAAACCGAA
GACCATTATGTTGTTGCTCAGGTGCGAGACGTTTTGTCAGCAGCAGTGCCTTACGTTTCGCTCGCGTATCGGTGA
TTCATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAGCCGGGTCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCAC
CCGTGGGGCCGCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTTGGTGGCGGGACCAGTGACGAAGGC
TTGAGCGAGGGCGTGAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGATCATCGTCCGCTCCAGCGAAAGCGGTC
CTCGCCGAAATGACCCAGAGCGCTGCCGGCACCTGTCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCAATAAGTGC
GGCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCAAGGGCATCGGTGAGGA
TCCCGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTTACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCCGGGAAACCT
GTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCCAGGGTGGTTT
TTCTTTTTACCAGTGAGACGGGCAACAGCTGATTGCCCTTACACCGCTGGCCCTGAGAGAGTTGAGCAAGCGGT
CCACGCTGGTTTTGCCCCAGCAGGCGAAAATCCTGTTTATGATGGTGGTTAACGGCGGGATATAACATGAGCTGTCTT
CGGTATCGTCTATCCACTACCGAGATATCCGCACCAACGCGCAGCCCGGACTCGGTAATGGCGCGCATTTGCGC
CCAGCGCCATCTGATCGTTGGCAACCAGCATCGCAGTGGGAACGATGCCCTCATTACAGCATTTGCATGGTTTTGTT
GAAAACCGGACATGGCATTCCAGTCCCTTCCCGTTCCGCTATCGGCTGAATTTGATTGCGAGTGAAGATTTAT
GCCAGCCCGCAGACGACGCGCCGAGCAGACGAACTTAATGGGCCGCTAACAGCGCGATTTGTGTTGTTGACCCA
ATGCGACAGATGCTCCACGCCCAGTCCGCTACCGTCTTTCATGGGAGAAAATAATACTGTTGATGGGTGTCTGGT
CAGAGACATCAAGAAAATAACCGGGAACATTAGTGCAGGCAGCTTCCACAGCAATGGCATCTGTTGATCCAGCG
GATAGTTAATGATCAGCCACTGACGCGTTGCGCGAGAAGATTGTGCACCGCCGCTTTTACAGGCTTCGACGCGCG

TTCGTTCTACCATCGACACCACCACGCTGGCACCCAGTTGATCGGGCGGAGATTTAATCGCCGCGACAATTTGCG
 ACGGCGCGTGCAGGGCCAGACTGGAGGTGGCAACGCCAATCAGCAACGACTGTTTGCCCGCCAGTTGTTGTGCCA
 CGCGGTTGGGAATGTAATTCAGCTCCGCCATCGCCGCTTCCACTTTTTTCCCGCGTTTTTCGCAGAAAACGTGGCTGG
 CCTGGTTACCCACGCGGGAAACGGTCTGATAAGAGACACCCGGCATACTCTGCGACATCGTATAACGTTACTGGTT
 TCACATTCACCACCCTGAATTGACTCTCTTCCGGGCGCTATCATGCCATAACCGCGAAAAGGTTTTGCGCCATTCTGA
 TGGTGTCCGGGATCTCGACGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCAGTAGTAGGTTGAGGCCG
 TTGAGCACCGCCGCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGCCACGGGGCCTGCC
 ACCATAACCCACGCGAAAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCATCGGTGATGTCGGCG
 ATATAGGCGCCAGCAACCCGACCTGTGGCGCCGGTGTATGCCGGCCACGATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATC
 TCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGGAATTTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTCTAGAAAATAATTT
 TGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGCTGGAGCCACCCGAGTTTCGAAAAAGGCCACCATGGG
 TACCAGATCTCGCGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCC...

...GTCGACAAGCTTGCGGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCACCCTGAGATCCGGCTGCTAACAAAAGCCCGAAA
 GGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGAG
 GGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAACTATATCCGGAT

pQE30-HisJs

TAGGACATTACCTATAAAAATAGGCGTATCACGATGGCCCTTTTCGTCTTACCTCGTCACCGCGTTGGGATTTTAT
 TTGCTTTGTGAGCGGATAAACCTGTCAAGTGATTCAATTTGTGAGCGGATAACAATTTTACACAGAATTCATTTAA
 GAGGAAAATTAACCATGGGTACCAGATCTCGCGGATCGCATCACCATCACCATCACGGATCTATGGTTGGCGCC
 GTGACCGCCCCGCTGGCGGGCACTATCTGGAAGGTGCTGGCCAGCAAGGCCAGACGGTGGCCGAGGCGAGCTG
 CTGCTGATTCTGGAAGCCATGAAGATGGAACCGAAAATCCGCGCCGCGCAGGCCGGGACCGTGCAGCGTATCGCG
 GTGAAAGCCGGCGACGCGGTGGCGGTTCGGCGAAACCCCTGATGACCCTGGCTGGAGCAGGCCCGGTGCAGGATCC

...

...GTCGACCTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCC
 ATCTGGATTTGTTTACAGAACGCTCGGTTGCCGCCGGCGTTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGCTTGGCGAGA
 TTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATAACCAGGTTGATATATCCCAATGGCAT
 CGTAAAGAACATTTTGGAGCATTTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACG
 GCCTTTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTTCACATTTCTTGCCCGCCTGATG
 AATGCTCATCCGGAATTTTCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTCACCCCTGTTAC
 ACCGTTTTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTA
 CACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAAGGGTTTTATTGAGAATATG
 TTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACCTTCTTC
 GCCCCGTTTTTCAACATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAGGTTTCAT
 CATGCCGTTTTGTGATGGCTTCCATGTTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGC
 GGGCGTAATTTTTTAAAGGCAGTTATTGGTGCCTTTAAACGCTGGGGTAATGACTCTCTAGCTTGGAGCATCA
 AATAAAAAGCAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTTCGGTGAACGCTCTCCTGAG
 TAGGACAAATCCGCCCTCTAGAGTGCCTCGCGGTTTTTCGGTGTATGACGGTGAAAACCTTCGACACATGACGCTC
 CCGGAGACGGTACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTTCAGGGCGCGTTCAGCGGGTGT
 GCGGGTGTTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCAT
 CAGAGCAGATTGTAAGTGCAGGATGACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCA
 TCAGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTC
 ACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGC
 AAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCGGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACA
 AAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTCCCTTGAAGCT
 CCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGG
 CGTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG
 AACCCCGGTTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAAGCACGACT
 TATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGA
 AGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCG
 GAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGC
 AGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAAGC
 AAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCTTTTAAATTAATAAT
 GAAGTTTTAAATCAATTAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCAC
 CTATCTCAGCGATCTGTCTAATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGG
 AGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATACGCAA
 TAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTT
 GTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAAGTTAAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCG

TGGTGTACGCTCGTCGTTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCC
CCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTAT
CACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTG
AGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCCGGCGTCAATACGGGATA
ATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGA
TCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCA
CCAGCGTTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTT
GAATACTCATACTCTTCTTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATAT
TTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAG
AAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTAC

pQE30-Js

TAGGACATTACCTATAAAAATAGGCGTATCACGATGGCCCTTTTCGTCTTACCTCGTCACCGCGTTGGGATTTTAT
TTGCTTTGTGAGCGGATAACCCTGTCAAGTGATTCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTCATTAAA
GAGGAGAAATTAACCATGGTAGGTGCAGTTACAGCTCCGCTGGCGGGCACTATCTGGAAGGTGCTGGCCAGCGAA
GGCCAGACGGTGGCCGAGGCGAGGTGCTGCTGATTCTGGAAGCCATGAAGATGGAAACCGAAATCCGCGCCGCG
CAGGCCGGGACCGTGC GCGGTATCGCGGTGAAAGCCGGCGACGCGGTGGCGGTGGCGGAAACCTGATGACCTG
GCTGGAGCAGGCGCCGGTGCAGGATCC...

...GTGCACTGCAGCCAAGCTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCA
TCTGGATTTGTTCAGAACGCTCGGTTGCCGCGGGCGTTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGCTTGGCGAGATT
TTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATAACCACCGTTGATATATCCAATGGCATCGT
AAAGAACATTTTGGAGCATTTCAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGGCCT
TTTTAAAGACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTACATTTCTGCCCGCTGATGAATGC
TCATCCGGAATTTTCGTATGGCAATGAAAGACGGTGTGATGATGGGATAGTGTTCACCTTGTTCACCGTT
TTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATAT
ATTGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAACCTGGCCTATTTCCCTAAAAGGGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGT
CTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACTTCTTCGCCCCCGTT
TTCAACATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTACAGTTTCATCATGCCGTTT
GTGATGGCTTCCATGTCCGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGTGGCAGGGCGGGCGTAATT
TTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCTTAAACGCCTGGGGTAATGACTCTCTAGCTTGAGGCATCAAATAAAACGAAA
GGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAAATCCG
CCCTCTAGAGCTCTCGCGCTTTTCGGTGTGATGACGGTGAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTAC
AGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTTCGGGGC
GCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTATACTGGTTAACTATGCGGCATCAGACAGATTGTACT
GAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCGGCT
TCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATAC
GGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAA
AAAGGCCGCTTGTGCGGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAG
AGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTT
CGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGTTTTCTCATAGCTCACGCTG
TAGGTATCTCAGTTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAACCCCGTTACGCCGACCGC
TGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTG
GTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACAC
TAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCC
GGCAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTC
AAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTTCAT
GAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCAT
CCATAGTTGCCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAAT
GATACCAGGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCGAGCCGAGCCGAGCAGCAG
AGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCGGGAAGCTAGAGTAAGTATTTTCGCCAG
TTAATAGTTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTTGGTATGGCTTCATT
CAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGT
CCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATCTCTTA
CTGTGCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCG
GCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATAACGGGATAATAACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATC
ATTGAAAACGTTCTTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTC
GTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGC
CGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTTTCAATATTATTGAAGCATT
TATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATAACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCA

CATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTAT
CACGAGGCCCTTTTCGTCTTCAC

Appendix IV : RBP-Sequenzen, die von der Originalphagensequenz abweichen.

Lmono_gp16-1 (A006)

ATGAGCTTAGGATTACATATAAAAGGTATTCATTCATTTGATAAGCATGTGGAAAATAATTGACATTAACCACCA
TTGTTCCCTCAGAACGAAGGCAATACGGAAAGCGTCAGTGGTCGTATTGGCGCTTTTTATTTTGGACCAAATGTT
GGTCAACGAGGGATAACAATTAGAAATACAAATTATTGGAGATAGCCTTAAAGAATTAAGTGAGCGGGCTACATCT
GTCGCTGATTGGTTGATGCAGGTAGATGCAGAAGAACGCTCTTTGGTAATTGATGATGCGCCTGAAAAGACGTAT
TATGGTCGATTTGAAGGACCTACAGACTTAGATAGGCTTTTATATAACGGACGGGCAACGCTGAATTTTGTGTTGT
TCAGACCCGTATGTTTATTATGAACAAGAAGAATTTGAGCTAACTAGCGAAAAGTAACAAAATTACCAGTACGCGGT
TCACAACCTACCAGCCCTGTAATTGGAGCAGTTATAAAACAGGATGTCACCTTATATCGCTGTATCGAATAAAGAG
GATTACTTATACATTGGCGAAGGAGTTGATCCAGATTCTGGAGAAACTCCAGTTAAACCATCAGAAAATAATTTTA
AACGATCCAATGAATGTGTTAGCTACATGGACCCCATGAAAACAGTCAGATTTGACATTTCAATTAGACGCAAAAT
AACGGGATTATTGATGGGAGTTTCACTTCAACCGCAAATGTATTCCGAGCATCTGATTATGGTGTGGCGCACAG
TGGCATGGACCAATGAGTAAAGTAGTTCTTCCCAAGCACAGGATAACTGGCGTGTAAGAATGCGCCTTCAAAAC
ATAGCATCAGCACAAGCAACAAGGTAATATTAGAAGTGTATCTTGTGATGAAAAAGGAGCAAAAATGCAACG
TTTCAAATAAAAGATAATGCCACAATACCGAAGTCAATATTGTTAAAATATCTATTGGCGATCAAAAATGTTGCT
AATTATCCTGAAAAAGATTTGTTTAAATGAGGCAGGGAAAAGTTACTAAAACATACAAAACAGTTTCAACTAGAAAA
AAAGTTAATGGGAAATATAAAACAGTGACAGAAAAGGTGCAAAACAGGCGCATAACAACGAATACAGAGATTTTTAT
GGTTACTTTTATCCTAACCAAAATAGGCAATCAATTTACCGCCGAAATATCAAACTTGATAGCAATATAAAGCCT
GTCTGGACAAAAGAAAAAGTATTTGTAGACTGCTAATAAATACACAAAAAAATTAGCTCAATTAATATATAC
GCTGCAGCATCAGGCACACATGACCCAAATAGGGACTTATTTTTACAGATACACTTGTGAAAAATTAATATTT
GTTGCAAACACAGCTCCGCAAGTTATAGCTCATGCATCCGATGAATTAATGTTTGTATTTGAAAACAGAAACAAT
TATAAAAATGGCATTCTTTTTATGCAGAATCTAGCGATAGGAAGTCACTTTTTTAAGTTATTTGGTGGTACAACA
GAAATATTAATGTATCTCCGTTTGAAGCGGCAGATTGGACCGTATATGTTAGGCCAAGAACTTTTTTAA

Lmono_gp16-2 (A006)

ATGAGCTTAGGATTACATATAAAAGGTATTCATTCATTTGATAAGCATGTGGAAAATAATTGACATTAACCACCA
TTGTTCCCAAAAACGAAGGTAATACGGAAAGCGTCAGTGGTCGTATTGGCGCTTTTTATTTTGGCCCAAATGTT
GGTCAACGAGGGATAACAATTAGAAATACAAATTATTGGAGATAGCCTTAAAGAATTAAGCGAGCGGGCTACATCT
GTCGCTGATTGGTTGATGCAGGTAGATGCAGAAGAACGCTCTTTGGTAATTGATGATGCGCCTGAAAAGACGTAT
TATGGTCGATTTGAAGGATCTACAGACTTAGATAGGCTTTTATATAACGGACGGGCAACGCTGAATTTTGTGTTGT
TCAGACCCGTATATTTATTATGAACAAGAAGAATTTGAGCTAACTAGTGAAAAGTAACAAAATTACCAGTTCGTGGT
TCACAACCTACCAGCCCTGTGATTGGAGCAGTTATAAAACAGGATGTCACCTTATATCGCTATATCGAATAAAGAA
GATTACTTATACATTGGCGAGGGCGTTGATCCAGATTCTGGAGAAACTCCAGTTAAACCATCGGAAAATAATTTTA
AACGATCCAATGAATGTATTAGCTACATGGACCCCATGCAACAGTCAGATTTGACATTTCAATTAGACGCAAAAT
AACGGGATTATTGATGGGAGTTTTACTTCAACCGCAAATGTATTTCCGAGCATCTGATTATGGTGTGGAGCACAG
TGGCATGGTCCAATGAGTAAAGTAGTTCTTCCCAAGCGCAGGATAACTGGCGTGTAAGAATGCGCCTTCAAAAC
ATAGCGTCGGCACAAGCAACAAGGTAATATTAGAAGTGTATCTTGTGATGAAAAAGGAGCAAAAATGCAACG
TTTCAAATAAAAGATAATGCCGCAAATACCGAAGTAAATATTGTTAAAATATCTATTGGCGATCAAAAATGTTGCT
AATTATCCTGAAAAAGATTTGTTTAAATGAGGCTGGGAAAAGTTACTAAAACATACAAAACAGTATCAACCAGAAAA
AAAGTTAACGGAAAATATAAAACAGTGACAGAAAAGGTACAAAACAGGAGCATAACAACGAATACAGAGATTTTTAT
GGTTACTTTTATTTTAACTAAAATAGGTAATCAATTCCTGCTGAAATTAATCAAACTAGATAGTAATATAAAGCCT
GTCTGGACGAAGAAAAAGTATTTGTAGATACCGCTAATAAATACACAAAAAAATTAGCTCAATTAATATATAC
GCTGCGGCATCAGGCATACATGACCCTAACCGCATTTGTTTTTACAGATACACTTGTGAAAAATTAATATTT
GTTGCAAACACCGCTCCGCAAGTTATAGCGCATGCATCTGATGAATTAATGTTTGTATTTGAAAACAGAAACAAT
TATAAAAATGGCATTCTTTTTATGCAGAATCTAGCAATAGGAAGTCACTTTTTTTAAGTTATTTGGCGGTACAACA
GAAGTATTAATGTATCTCCGTTTGAAGCGGCAGATTGGACCGTATATGTTAGGCCAAGAACTTTTTT

Lmono_gp17-sv3 (A006)

ATGTTATTGATATTAGATGAAAATAAAGAAATTGTAATCTATATCTGCTGACTCCACAAATGGAACCTCATTAT
TTTAAATGATTCACACACCGAGAAAGTTATAGATTTTGAATCAACTTATGAGTTTTCTGTTTCGACAGATGACGAA

AGTTCAAATATTTAAACAGGTGGAAATTATGTGATGCTTCAAGACTTAGACGATGATTCATTGTTATTCAAAT
 ATTGAAGTGCAAGACATCCGAGATGACAATAGTTCGAAACCTCAAAAAAGAATCTTTTTCGCGAAAATGTTTTATC
 TTTGATTTGAATAATGTAATTGTGACAGATCGCGCTTTTTTCCAATAGTAATATTGGTCCCCTTTAACATATGTG
 CTTGGCGGGAGTGGATGGATTCCCTCAAGATACAGAAAATGTAGGGGCGATTGCAAAATTTGGAGTTCTCAGGATAT
 ATAACAGCTCAAGAAGCCCTACATCAAATTTGACTGCTTTTTGATTGCGAAGTTAAGTTTTATGTAAAAACATTT
 CAGGGAAGGATAGTTGGCTATTATTGTAAAGTCGCGAAACAGTTTTGGGGATAATGAAGGTGTTTGAATTTGAGAGC
 GGCACAGGCATTAAGGAATAACGAGGAAAGTATTATTTACGAACATTAAGACTGCTCTTATACCTCTTGGCGCA
 ACGCAAGCTGATGGGACACAATTAACATTTCTTCTGTTAATGGAGGATTGAATTACATCTATAATGATGAAGCA
 AATGAGCAATACAACCCAAGCGGCACAGGTTACTTAATGACTAAGATTGTAATGAAAAATAACAAATGCGGCA
 CGTTGAAACAATGGGGTACTTTAGAACTTAGAAAGTTATCATCGCCATCATATCAATGAAGCAAAATTTTTA
 ATGTTAGAACAAGTCTATGGTTTTGAAGCACATCGAATAAGAAAAGGCAGTTTTGTAAGAATTGTAGATTTAGAA
 ATGAGTCCCTCAATTACAGTACAAGCAAGGGTTATTGAGTTAAATATTTGTTATAGCGATATGTCAAAAAAGCACT
 TGTGTAGTTGGTGATTATATTGATATTAATTCGGCTACACCTGCGATTATAAATCAATTGAGGGAAAAACGCGAAA
 GTATCAACAAATGCTAATAAAGTTGCGTCAATCGCAAGTAATAAGGCTGAAAACAGCACAAACAAATCGCTAGTAGT
 GCCGAAAGTGTAGCAAATGATGCAAATACAAATGCAACAGATGCAAAAACAGTAGCAAATGATGCTAAAGATTCC
 GCTGTCACAGCAATAGATACAGCTAATGACGCGTTAATGAAAGCTGGTGATAACAATAAGCCTTTTTATGGTGAG
 CTACCGCCAGCTATTTCAAAGATAAACGATACGTGGTTCAAGATAGATGAAGTGAAAAATACTATAACAGGTGTT
 TTTAAGTGGGATGGGGTAATTTGGAAAGAAATACCTCTGGATTATAACGCTTTAAAAGTGGGGAGTTATCAGCG
 ATTACTGCGAAATTAGGTGATGTAGAGAGCGGAAGTATCACAGGCGCTGAATTTATTCACAATATTAATTTATCGT
 GATGATGAAGCAATTTGTTCACTGGGACGGTCACGATGAATGACAATGGTTTTAATGCTGCTACAGTACTGCCA
 ACTGGTGCCGGCTCTACTATTTAAAAAGTGATGTTACAACACTTGGTGGTGTGAAAAGTAGCACAGCAATTGATG
 GATCATAATATTTCTGGTGAATCAAGGAAACAATGTTAAGAGGGGATTCACTAGATTTCACTAAAAGATGGGCAA
 ACAACTTTATCTGTAATGCTGATTTATTTTACTCAATGCCGTGGCAAGATTTAATATTAACCTCTGGATATTC
 ACAGCAGAAGGGAATACTCCTCAATTTAGAATTATTTGCATCTTTGGTATCAGAATTGCCTTTTTCAGGGGGCAA
 GTGCAAAAATCAACCGCATGGACCTCTACAAATAACGCTTTTTGCGTCTGTTCTTTTCGAAGTTCAAACAACAAAA
 ACAGCGATGGCTTATGCACCGACAAACAAGTCTAGCGGCGGCGAGTGCATGCATCATCTAGTAACGCGATGGGA
 TTTATACCTGCGGACACTAGTATTACGTATTTGCGGTTAAATCAATTATTTTATATTTTAGATTA

Lmono_gp19-1 (A118)

ATGGTTGGCGCCGTGACCGCCCCGCTGGCGGGCACTATCTGGAAGGTGCTGGCCAGCGAAGGCCAGACGGTGGCC
 GCAGGCGAGGTGCTGCTGATTCTGGAAGCCATGAAGATGGAACCGAAAATCCGCGCCGCGCAGGCCGGGACCGTG
 CGCGGTATCGCGGTGAAAGCCGGCGACGCGGTGGCGGTGGCGGAAACCCCTGATGACCCTGGCTGGAGCAGGCGCC
 GGTGCAGGATCCACTAGTCATATGTTAAATCTTGATAAATGGGGAAATACACTTTTTGATTCTAATAAGTATCAG
 CAGTTTAATGCTAATATGGAAAAATTAGAAAAAGATTCAATTGGCAAAAAGATGTAGATATAAATGCAACAAATAAC
 AGAATTGATAATGTTGTTTTAGAAACTGGCGGAAATAATATTACTGAAGTAGTAGATGCTAGAACTAGCAAAAAC
 GGTCAAATCTACAGCACATTAACGCACGA
 TTAATGGTGACTATTCAACAATTGCGAGTATTAGCTGAATCAAATGCGCTACTTCAACTAGTAAACGACGAG
 AATAAAGTATTAATAAAGTAAATTAGATGAATTATATGGTAATTCTGCATCAAATATAGAATACTACGTTAGTTCCG
 ACTAGCGGTAATGATGTAACAGGAACAGGAGCTATTGATGCGCCTTTCAAAAACGATTCAAAAAGCTGTAAACATG
 GTTCCAAAAGTAAAGGTAGGGGGTTTTATTTACATTTTTTTGCGAACCTGGGCAGTATAACGAGGATGTTGTAGTT
 CAGTCGTTTTCTGGCGCGGAATGCTTTTTATATCCAACCTACTAATTTAGCGACAATCGACCCGACAACCTGGTCAA
 ACAGTTTTTTTTGTTAAAAGTATCCTGTTTTCTGGCATTATGTTTCAGTGTGTCGTTCAAGGTCTGAATTC AATG
 AGTACAGCAGTAAACAACAGTTCTACAGTTATTCAATTCGCGAGGTGTTGGTACGGTACAGTAACTAAATGCCGA
 TTTGACACTAATTTGAAAGCTACAAATATTACAACCTGTGCAATACAATCAATCGCGAGGTAAGTGTATAGCAAC
 TATTTTAAAATCAAACATTATTATGTCCTCTGAATATATGGGACATGCTTTATTTCGCATCAACAAACACTTGC
 GAAGCAACTTCTAACATTGGGCTAAAGGCTGCTAGTGGTGGTATTCTAGCTAAGTCTGGCACTCAAATCTAAAC
 GCTACTACTGCTGAGGTGAAGCAGGCGGGAGGTGAGATATTCTAA

Lmono_gp19-2 (A118)

ATGGTTGGCGCCGTGACCGCCCCGCTGGCGGGCACTATCTGGAAGGTGCTGGCCAGCGAAGGCCAGACGGTGGCC
 GCAGGCGAGGTGCTGCTGATTCTGGAAGCCATGAAGATGGAACCGAAAATCCGCGCCGCGCAGGCCGGGACCGTG
 CGCGGTATCGCGGTGAAAGCCGGCGACGCGGTGGCGGTGGCGGAAACCCCTGATGACCCTGGCTGGAGCAGGCGCC
 GGTGCAGGATCCACTAGTCATATGTTAAATCTTGATAAATGGGGAAATACACTTTTTGATTCTAATAAGTATCAG
 CAGTTTAATGCTAATATGGAAAAATTAGAAAAAGATTCAATTAGCAAAAAGATGTAGATATAAATGCAACTAATAAC
 AGAATTGATAATGTTGTTTTAGAAGCTAGCGGAAATAATATTACTGAAGTAGTAGATGCTAGAACTAGCAAAAAC
 GGTCAAGTCTACAGCACTTTAAACTCGCGGCTAAATGGTGACTATTCAGCAATTGCAAGTGATTTAGCTGAATCA
 AATGCGCTACTTCAAGCAGTAAACGAAGAAAATAAAGTATTAATAAAGTAAACTAGATGAATTTGTACGGTAATTTCT
 GCATCAAATATTGAGTATTATGTTAGTTCAAATAACGGTAACGATGTAACAGGAAACAGGAGCTATTGATGCGCCT
 TTCAAAACGATTCAAAAAGCTGTAAACATGGTTCCGAAGGTAAAGTAGGAGGATTTATTTACATTTTTTTCGCAA

CCTGGTCAGTATAACGAAGATGTAGTAGTACAGTCGTTTCAGCGGCGCAGAATGCTTTTATATCCAGCCTACAAAT
 CTAGCGACAATCGACCCGACAACCTGGACAAACAGGTTTTTTTTGTTAAAAAGTATTCTGTTTTCTGGCATCATGTTT
 CAGTGCCTGGTACAAGGACTTAATTCTATGAGTACGGCAGTGAATAATAATTCTACGGTAATTCAGTTTGCAAGG
 TGCTGGTACGGCACAGTTACTAAATGCCGATTTGACACTAATTTGAAAAGCAACTAATATTACAACTGTGCAATAC
 AATCAATCTCGAGGTAACCTGTTATAGCAACTATTTTAAAAATCAAAACATTATTATGTCTGTCGAGTACATGGGA
 CATGCTTTATTTGCATCAACAAATACATGCGAAGCAACTTCGAATGTCTGGCTTAAAAAGCTGCTAGCGGAGGCATT
 TTGGTTAAGTCTGGTACGCCAGTTTTAAACGCTACTACCGCAGAATTGAAAACAAGCGGGAGGTCAGATATTCTAA

Lmono_gp14 (PSA)

ATGATACCAATTTTTATATGAGTCAAAAAATACAGATTTTTGAAAATAATGGATTAGGTCTACTAAAAGACATTATC
 ACTGCAACAGTTGACGAAACATTGAATGGACCGTGTGAGTTGACAATTGAATATCCTGTAACAGCAAGGCTATTTC
 GATAAAATAAGTGACGAGTCTATTTTTCAAAGTAAAGTCAAATGAAGTGCAAAATTTTCAGCTTTTCCGAGCATA
 AATATAGTGCCTGACGAATTTACCAGCTCCATTATAGTGAAGGCTAAACATATTACAAATGATGCTACTTCAAAT
 TTTGTAGAAGATTTACGGTTCGAAAATATTACACTAGGTGCCGATTTAAATAAAATGTTTTCTTCTACTGCTTAT
 CCTTCTAAATTTTCTGGAACGTGACACATCGCTACGTTATCAAGTACTAGTATACAACGAAAAAATCCCTTGGAA
 ATTATTGCGGGAGTCAAGGCTCTCTCTTGGATACATGGGGAGGGGAGTTAGTTCTGTGATAACTTTAGTATAAAA
 CTATTAACGACGCTGGGAGAGATAAAGTTGCATCTATTAGATACCGGAAAAATTTAACTGGATTAGAAAATGAT
 GTAGTACGGAAAAATGTAATTTACTCGAATTTATCCATTTCGCGAATAAGCAAGATTCAAATGGTAATGAGCAAACG
 ATTTGATTGCCTGAAAAATATATAGATAGTGAACATATTAATGCATATTCGAATGTAAAAATCTTGGCAGTTGAT
 TACTCATCTGATGACACAGTACAGATGTAACAACACTTCGAAATGTAGCGGGTAAATATTTTATGAATAATAAG
 ACAGATATAACCAGAAATGAATATCAAAGTATCTTTTTGAGCCACTTTCTGAAATGACAGTTTATGAAAAATATAAA
 AATTTGGAAGCAGTTCGAGTTAGGAGACACAGTACAGTTTATCATCCAGATTTAAACGTAAATATAACTGCAAAA
 GCTGTTTCGAACAAAATATAATGTTATTACTGAAAAATATGAAGAAAATTGAGCTTGGTAGTGTGAAAAGCAGATTT
 ACAGACACATTTAAATCAGATATAAGCAAAATTTATCGACGAAGTTCCGACTCAGGATTGGATGCAGAAATGAATTA
 AAAGCAATAGGAGATAGTATCCAAGGCGCAAACGGAGGTAACATTTTATACTTTCCCAACATTTAAACCTTCGACC
 ATGTATTTTATGGACACTGACAATGTGAATACTGCAAAAAAAGTGTATGGTTATGAACAGAGAAGGTATAGCGTTT
 TATCAAAATGGGATAACCGGCATTTCTAAAACCGCATGGGGAATAGATGGTAAATTTGTTGCCGATTGGATTGGA
 ACAGGGACCTTAAGGGCTATCGATATTGAAGGGGTAAAGCATAACAGGCTCATCAGGTTTTTTTTGACACATTGTAT
 TCAAGTTTTTTACCAGGCTCTCCAGCACCTCAATATAAAGAAGAACTGAAAATGGGCGGAGGTGTTGGTTCCAT
 TTAACCGCAAAATCGGTGACAAAACCTTATCCCGCTATGCAAATGAGAATGAACACGAATGGAGATTTAGGGCTT
 GCTATTGAAGCTGTGAATGAAAATACGGGTGCGATAGATGCTGATATGGTTGTTAGACTGTCCCCTTTTTCGGGA
 ATTTGAAACACCTTTAATTCAAAGCGACGGTTGGTGCTGATTGGTGCTAATTTCTGATGGTAAAAACCGCTTCTATT
 GATCGCCATACTTGGATTTCCGGTGGCGGTCCACAATTACGTTATGTGCCGCATCGAGCTAGTAATTTTGGACT
 GCTAGTTTCAAAGAATATAAGAAAAATATACGTAAAGTAAAGAAAACTGCGTTTGGTAAAAACAGCTAAGCAAGTC
 ATAAACGAAACAGATGTTTTCACTTATTTCGCATATTGCTGATGAAACAAACGAAAAGAAAAATCGGATTTATAGCT
 GAACAAGCTTCTGATTCTGACTACAGCCGACGGAAAAGCAATTGACTTATATAAATCTGTTGCGTGGCTATAT
 CAATACGCAAAAGAAAACGAAGAAGAAAAGCAATTTAAAGCAGAGGTAAGAAAGATTGAAAAACTTAGTAAAT
 AAATTAGTAAACGAGGTGAGTAAATGA

Linno_Gp18 (B025)

ATGTCAAGAATTAATTTAAATACGAGTGACATAGGAGTCAGTTTAAACAAGGGCAAATATGAATGCCATAAATTGAT
 AATTTTAAAGCATTCAAATTTGTTTAAACGACAACCTACACAAATTTATAATAATCAAAAACTAAAAGATAATGGA
 GCCACACTACAAATCAAATAAATGTAACATCATCATACACGTTACAGAAAAATTTAGAATGGTTACAAGAGACA
 ATTGACAATCTAGTGATTGGAGCAAATGGTGACGGTGTGCTGAAACAAAAACAAGCTAGAGTTAGCTTTTTTGTAT
 AATAAAGCTTTTGAACAGTTAATAGTCTGCTTTTTTTTTCAGATTTTAAATTTGCATCTGATCGTTTACATGAGTTA
 GATGAAAATTTAAATAAATACATTACCAATGTTAAATTTGTTGGTGCTATAGGCGATGGAGTTAATGATGATACT
 GAAATTATTCAATCATTATTACTAAGTAATAAAAACAGAGCTTTTTCATTCTAATGGGACCTATGCAATCAAAAA
 AATCTATATGTACCTGCTAATACAACAATAACATTTGAAAAGCAAAGATGCTATTTTTTAAACGTATGTCAAGTGAT
 GTTAATTTATTTTATCAATTATGAAGATGGAGTTCCGCACAAGAACTATGATGGTAATGGAAATATAAATATT
 TTTGGTGAACGATTGATATAAATGGTGCTGAATTTCCAACAGTTTGTTCGCGAGTGATGTTAAGGCATGCTGAT
 AATTGTCATTTTAAAGATATGCTAGTTCTAGATACAGTAAATGGACATGCATTTGATGTCAATGGGTGTCGAAAT
 ATTTATTTTCGATAATGTAGAATGTTTAGGATGGAGAGACGTGACAGTGCATAAATCATTGATAGCGCAAGAAGCC
 TTTCAACTATCTGTTGCTTCCGAGGATGTTTACGATATAGCTGTTCAAATGCTTATTCTAATAGAGAGATTTAT
 TTTAATAATTGTAGAATGGTAATTCGAAAACAGCAGGTAGCGTGGCATATAATGTAGCAATTGGTAATCATAGC
 GCGTACACGGTTTTCAACGGTGTAAATATATACATTACAAATTTGTCAGTTTGTGGTGGCAATTTACTATGCTATT
 CGACTTTTTGGGTTTTAAGAATGATTTGTGCGAGGATTGAAAAGTGAATGATTATCTAGGTTTAAACAGCATTTGCAT
 AGTAGTGCGGTTTTACTTATAATCCTGATTTAAACAAAAAATATAGTGTAGATATGACAAAGTGAGAAATACAT
 TTTAAAGATGTTGATTTTTATTTCGAAAAAATCAATACAGATAGACAAGCTATTCTAATTTGTTGGTTCTACAAGT
 GAAGAAGGAATTAGGTTGAATTATTCAAGGAAAATATCTTTTAACAATGTAAGAATGAATGGAAACATACGAACGA

ACAACCAACCTCGCGTATATAAGAGATGCTATTTCTGTAATGTTTGATAATTTTACGGCTTACGATTTTTTAGCT
GGAATAAGAGGGACAAGAAACGAGTTTATTAGTTTTTCAAGGATTTCTTTAGATCATATTTCAACAGAAGCTGTT
TATTTTACAGATACTAAGTTTTTCAGAAATCACTACGTCTTCTTTTGTAAATTGTGCTATTGACAATAGCAATGGA
GTCGTTAGTTTTTCTAATGGGTGTGCTAATAACACAATAAGTGGTAGTAATATCCGATTGGGTGGATTAGGAAAT
CAAAAATATGGAGTTGTAATGACAACCTGATACTCACCCTGTCAATTCATTTAACAATTTTTTAGAAGGAATGATA
GGGGCCGCAGCAACAAGCGGAAGTAAATGCTATAATGGTTCATTATTCTATGAAGGTTCAAAAATGTACGTTGGA
TTGGTTGTAAACGGAATGTTTCAATTACAAGAAATAACCGCATAA

Linno_gp25 (B054)

ATGTCGGTTAAAGATTTTTTAGGGAAATTAACAGATGCTTTTTACAAAGTCAGAAAAGAGTAACATAGGGAAATTA
TTTTATTATTGTAGATCAGCAAATTTCCGCATTAACCTACGGCTCTTGAAAAACAGAGGCGTGCCGAGATATTGAT
AATGCGCAAGGGAAGGTACTGAATAACCTTGGTGAAAATGTTGGCCAGAACAGAGGACGAGCTACTGATGAGGTA
TATCGTGTTTTAATCCGTGGAAAAGTTGCAAGAAACGCAAGTGACGGAAACCACAAAATAAAATCATCCATGCAATC
GCAAAATCATTAGATTGCAATTATAAAGATATTCAAATAATCAATGCTAACGATTCTAATTCATCAGATGAACAT
GAGCCGGCAGCGATAATTATTA AAAAGATTCTCTTTCTGCTCTGAATGCAGTCGGCTTAAGTACTAATCAATTT
TTACAGATAGTAAACAGTCTGAAATCTGGTGGTGTAGAGTAGCATAACATCAATTTAGAAGGTTCTTTTTCTTTT
GCAAAAGGAGCAACGGAAGAGATAAGCGACGACGGTTTTTTCGGAGCTTGATCAATTTCTGGGAGGAACCTTAGG

Linno_gp26 (B054)

ATGTCACGATTTAATGCGAATTTAGCACCCCTGGGAAGCAACGGGAACAAAGCCACCAGACAGTACCATTCAAAC
GGATGGTTGGCGGGGACTAAGCCGCCGGCCGATTGGTTTAACTGGTATTTTAAATAGCACATATACAGCATTAAG
GAGCTACAAGAACTTGCTGCATTAATGCAGATTTAATAAATCATACAGGAAATACAAAATAATCCACACAGTGTA
ACAAAAGCTCAACTTGGTTTTAAGTGATGTAGAAAATTTTGGAAATTGCATCTCTGGATGAAGCTAAAAGCGGGTATT
GCCAGTAACAACTAATGACTCCTGCGAGTGTGTTAGCAGCAATAAAAAGAGCGATTTAATACGCAAAAATATCCTT
TTCGAAGGTGCAGCCTGGCCTTCCGGAATAACGTACAAATTCGCCAACAGTCAAAAAGTTTCTGATCAAAAATTA
GGCTTGATTTTCAATTTGGAGTGATTATGACGTTATCCCTGGTTCAGCAAGTGTGCAAATAATTATAACTTTGGC
TTTACATTCATCCCTAAATTTTTTGTGATAAGCATGCAGGAGCAAAACATAAATGTACCAGTCGCTACAAATTC
AATGCTCAAGTCGCTCAAATCACAATTA AACATTATATCTTACAGATACAACCTTTTGCAGGGCACGATTTAAAC
TCAAGTGGCTTAAATGCGAATGATGCTATTTTGGAGCTATATTTTAGGAGTGTGA

Curriculum vitae

Julia Kaps

Geboren am 23. November 1981 in Regensburg, Deutschland

- | | |
|-------------|---|
| 2006 – 2010 | Doktorats Student bei der Profos AG, Regensburg, Deutschland;
Betreuung durch Prof. Martin Loessner, Institut für Lebensmittel-
und Ernährungswissenschaften, ETH Zürich |
| 2006 | Praktikum bei der Profos AG, Regensburg, Deutschland; |
| 2001 – 2006 | Studium der Biologie an der Universität Regensburg, Note: 1,1

Diplomarbeit am Institut für medizinische Mikrobiologie und
Hygiene am Universitätsklinikum Regensburg;
Thema: Molekulare Untersuchungen zur Rolle des <i>immediate
early 1</i> -Proteins bei der Interferonresistenz humaner
Zytomegalieviren; |
| 2001 | Allgemeine Hochschulreife |
| 1992 – 2001 | Von-Müller-Gymnasium in Regensburg |

Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Dr. Stefan Miller und meinem Doktorvater Prof. Martin Loessner, die mir durch ihre Betreuung die vorliegende Arbeit erst ermöglichten.

Bei Dr. Stefan Miller möchte ich mich ausserdem für die konstruktive Durchsicht meiner Arbeit und das Übernehmen des Koreferats bedanken. Er und die anderen Vorstände der Profos AG, Dr. Wolfgang Mutter und Dr. Bernd Buchberger, haben die vorliegende Arbeit durch die Bereitstellung eines hervorragend ausgestattetem Arbeitsplatz in familiärer Atmosphäre erst möglich gemacht.

Einen besonderen Dank möchte ich an meinen Betreuer Dr. Michael Schütz richten. Er stand mir während meiner praktischen Arbeit und während der Erstellung dieses Manuskripts immer mit grossem Engagement, viel Geduld und fundierten Ratschlägen zur Seite. Durch die zahlreichen Diskussionen und Gespräche mit ihm habe ich sehr viel gelernt.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Nicole Bürger und Maxi Oelschner die mich so herzlich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen haben und mich bei meiner Arbeit tatkräftig unterstützt haben. Sie standen mir während der ganzen Zeit nicht nur fachlich sondern auch freundschaftlich zu Seite.

Besonders dankbar bin ich auch Dr. Monika Walter, die stets ein offenes Ohr für Probleme im Laboralltag hatte, mich bei der Erstellung und Auswertung der CD-Spektren unterstützt und diese Arbeit konstruktiv durchgesehen hat. Für die Diskussionsbereitschaft und die experimentelle Hilfe, vor allem im Bereich der Phagentechnologie, möchte ich mich bei Dr. Manfred Biebl, Elisabeth Olbrich, Sarah Feldkirchner und Teresa Wallner bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Profos AG, besonders bei Anja Phillip, Anna Scherzinger, Christoph Knappe, Daniela Eder, Dr. Martina Beißinger, Dr. Renate Grassl, Dr. Jan Kretzer, Jenny Flemke, Johanna Bartl, Karolina Heed, Sabine Diller, Sarah Werner und Stefan Deml bedanken, die mich freundschaftlich aufgenommen und stets für eine gute Atmosphäre gesorgt haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei allen Menschen bedanken, die im privaten Umfeld für mich wichtig sind und mein Leben positiv bereichert haben. Ein besonderer Dank gilt dabei meinem Freund Markus Lorenz und meinen Eltern Ingrid und Dieter Kaps, die mich während der gesamten Zeit liebevoll unterstützt haben.