

**Selektion Internalin-bindender Peptide –
Neue Wege zur Verhinderung der Infektiosität und
des Wachstums von *Listeria monocytogenes***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

an der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften
der Universität Bayreuth

vorgelegt von

Julia Kenzel, geb. Bittner

aus Krasnoturjinsk

Coburg 2020

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2015 bis Januar 2020 in Coburg am Institut für Bioanalytik, Hochschule Coburg in Kooperation mit der Universität Bayreuth unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. Susanne Aileen Funke und Herrn Prof. Dr. Andreas Römpp angefertigt.

Die Doktorarbeit wurde von Juni 2018 bis Januar 2020 aufgrund von Elternzeit unterbrochen.

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Biologie, Chemie und Geowissenschaften der Universität Bayreuth genehmigten Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin/ eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.).

Dissertation eingereicht am: 09.03.2020

Zulassung durch die Promotionskommission: 18.03.2020

Wissenschaftliches Kolloquium: 06.07.2020

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Matthias Breuning

Prüfungsausschuss:

Prof. Dr. Susanne A. Funke (Gutachter/in)

Prof. Dr. Klaus Ersfeld (Gutachter)

Prof. Dr. Andreas Römpp (Vorsitz)

Prof. Dr. Birte Höcker

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Die Spezies <i>Listeria monocytogenes</i> als Auslöser von Listeriose	5
1.2 Pathogenese und Infektionszyklus von <i>L. monocytogenes</i>	6
1.3 Internalin-vermittelte Invasion von <i>L. monocytogenes</i> in Wirtszellen	9
1.3.1 Familie der Internaline	9
1.3.2 Internalin A – Struktur und Interaktion mit E-Cadherin	10
1.3.3 Internalin B – Struktur und Interaktion mit c-Met	13
1.4 Phagen-Display zur Selektion spezifischer Peptide.....	16
1.5 Bisherige Behandlungs- und Nachweismethoden von <i>L. monocytogenes</i>	19
1.6 Komponenten des Hopfens in der Lebensmittelkonservierung	20
1.6.1 Klassifizierung von antimikrobiellen Hopfeninhaltsstoffen.....	21
1.6.2 Hopfenkomponenten – antimikrobielle Aktivität und einige Vertreter.....	23
1.7 Zielsetzung der Arbeit	27
2 Materialien und Methoden	29
2.1 Materialien	29
2.1.1 Verwendete Antikörper	29
2.1.2 Verwendete Plasmide und Primer	30
2.1.3 Verwendete Enzyme und Proteine	30
2.1.4 Im Phagen-Display verwendete Phagenbibliothek	30
2.1.5 Verwendete Peptide	30
2.1.6 Verwendete Bakterienstämme	31
2.1.7 Verwendete Hopfeninhaltsstoffe und Peptid-Konjugate	32
2.1.8 Medien und Lösungen	32
2.2 Mikrobiologische Methoden.....	36

2.2.1	Kultivierung der Bakterien	36
2.2.2	Bestimmung von CFU/ml (<i>colony forming units/ml</i>).....	36
2.2.3	Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)	36
2.2.4	Calciumchlorid-Methode zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen ..	37
2.2.5	Hitzetransformation von <i>E. coli</i>	37
2.3	Molekularbiologische Methoden	38
2.3.1	Extraktion der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> DH5 α	38
2.3.2	Genexpression	38
2.3.3	Zellaufschluss	38
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	39
2.4.1	Affinitätschromatographie	39
2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	39
2.4.3	Dialyse	39
2.4.4	Anionenaustauschchromatographie	40
2.4.5	Ultrafiltration	40
2.4.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.4.7	Coomassie-Färbung	41
2.4.8	Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie	41
2.4.9	Western Blot	41
2.4.10	Interaktionsnachweis zwischen zwei Proteinen mittels ELISA	41
2.5	Phagen-Display zur Selektion spezifischer Peptide.....	42
2.5.1	Biopanning der ersten Selektionsrunde	42
2.5.2	Bestimmung des <i>Output</i> -Titers.....	43
2.5.3	Amplifizierung der Eluate	43
2.5.4	Bestimmung des <i>Input</i> -Titers	44
2.5.5	Biopanning der Selektionsrunden 2 - 4	44
2.5.6	Anreicherungs-ELISA	44
2.5.7	Amplifizierung einzelner Phagenklone	45

2.5.8	Einzelphagen-ELISA.....	45
2.5.9	Extraktion der einzelsträngigen Phagen-DNA	46
2.5.10	Sequenzierung und Analyse der Phagen-DNA	46
2.5.11	Phagen-ELISA.....	46
2.5.12	Synthese der selektierten Peptide	47
2.6	Interaktionsstudien mittels ELISA.....	47
2.6.1	Interaktionsnachweis zwischen selektierten Peptiden und Zielprotein	47
2.6.2	Interaktionsnachweis zwischen selektierten Peptiden und <i>L. monocytogenes</i>	48
2.6.3	Inhibierung der Protein-Protein-Interaktion mittels selektierten Peptiden	48
2.6.4	Statistische Auswertung	48
2.7	Interaktionsstudien mittels Fluoreszenzmikroskopie.....	48
3	Ergebnisse	50
3.1	Proteinreinigung von Internalin A	50
3.2	Proteinreinigung von GST-E-Cadherin	52
3.3	Interaktionsnachweis zwischen GST-InlA(36-496) und hEcad(1-621)	53
3.4	Proteinreinigung von Internalin B	54
3.5	Interaktionsnachweis zwischen GST-InlB(36-321) und c-Met(1-932).....	56
3.6	Phagen-Display zur Selektion InlA-bindender Peptide	57
3.6.1	Anreicherungs-ELISA der vier Panningrunden	57
3.6.2	Einzelphagen-ELISA der isolierten Phagenklone	58
3.6.3	Identifizierung InlA-bindender Peptide.....	59
3.6.4	Bindungsaffinität der positiven Phagenklone.....	61
3.7	Interaktionsnachweis zwischen rekombinantem InlA und synthetischen Peptiden JB1, JB2, JB3, JB4, JB5	62
3.8	Interaktionsnachweis zwischen <i>L. monocytogenes</i> und den synthetischen InlA-Peptiden JB1, JB2, JB3, JB4, JB5 mittels ELISA	65

3.9	Interaktionsnachweis zwischen <i>L. monocytogenes</i> und dem synthetischen InlA-Peptid JB1 mittels Fluoreszenz-Mikroskopie	66
3.10	Inhibition der Interaktion zwischen GST-InlA und Ecad durch JB1 und JB2	67
3.11	Interaktionsnachweis zwischen IGF2R und GST-InlA bzw. GST-InlB.....	71
3.12	Phagen-Display zur Selektion InlB-bindender Peptide	73
3.12.1	Selektion InlB-bindender Phagenklone	73
3.12.2	Sequenzierung einzelsträngiger Phagen-DNA zur Identifizierung InlB-bindender Peptide	75
3.12.3	Bindungsaffinität der positiven Phagenklone.....	76
3.13	Interaktionsnachweis zwischen rekombinantem InlB und synthetischen Peptiden JB6, JB7, JB8.....	77
3.14	Interaktionsnachweis zwischen <i>L. monocytogenes</i> und den synthetischen InlB-Peptiden JB6, JB7, JB8.....	78
3.15	MHK-Bestimmung von Hopfeninhaltsstoffen auf <i>L. monocytogenes</i>	79
3.15.1	MHK-Bestimmung von Hulupinsäure.....	80
3.15.2	MHK-Bestimmung von Xanthohumol	81
3.15.3	MHK-Bestimmung von Lupulon.....	82
3.15.4	Toxizität der Internalin-bindenden Peptide	83
3.16	MHK-Bestimmung der Xanthohumol-Peptid-Konjugate.....	84
4	Diskussion	88
4.1	Proteinreinigung von Internalin A(36-496) und Internalin B(36-321) und der Interaktionsnachweis mit dem jeweiligen humanen Rezeptor E-Cadherin bzw. Met.....	88
4.2	Phagen-Display zur Selektion Internalin-bindender Peptide.....	90
4.3	Mittels Phagen-Display selektionierte Internalin A-bindende Peptide.....	91
4.3.1	Eliminierung Target-unspezifischer Peptidsequenzen	91
4.3.2	InlA-bindende Peptidsequenzen JB1 und JB3 interagieren mit IGF2R und identifizieren die Interaktion zwischen IGF2R und InlA/InlB	92

4.3.3	InIA-bindende Peptidsequenz JB3 interagiert mit Zellmodellen der Blut-Hirn-Schranke (BBB)	94
4.3.4	Interaktionsnachweise der InIA-bindenden Peptidsequenzen	94
4.3.5	Interaktionsnachweis der InIA-bindenden Peptide an <i>L. monocytogenes</i> und ihre Relevanz für neue Detektionsmethoden	95
4.3.6	InIA-bindende Peptide reduzieren die InIA-Ecad-Interaktion.....	99
4.4	Mittels Phagen-Display selektionierte Internalin B-bindende Peptide.....	100
4.5	Antimikrobielle Wirkung von Hopfenkomponenten auf <i>L. monocytogenes</i>	102
4.6	Verknüpfung von JB8 mit Xanthohumol zur Steigerung der antimikrobiellen Aktivität	104
4.7	Fazit und Ausblick	107
	Literaturverzeichnis.....	109
	Abkürzungsverzeichnis.....	122
	Danksagung.....	124

Zusammenfassung

Die Nachfrage der Konsumenten nach frischen und natürlich behandelten Lebensmitteln sowie die hohen Anforderungen in der Lebensmittelsicherheit fordern neue und innovative Strategien zur Detektion und Eliminierung von Lebensmittelpathogenen. *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) zählt zu den häufigsten und gefährlichsten durch Lebensmittel übertragenen Pathogenen und ist der Verursacher von Listeriose, die trotz Antibiotika-behandlung eine Mortalitätsrate von bis zu 30 % aufweist. Derzeit verfügbare Methoden zur *Listeria*-Detektion sind kostspielig und zeitintensiv. Ziel dieser Arbeit war es, innovative Ansätze zu entwickeln, die zur Detektion des Bakteriums und zur Prävention der *Listeria*-Infektion beitragen sollen. Frühere Studien mit Antikörpern gegen *L. monocytogenes* lieferten eine unzureichende Selektivität und Spezifität. Die Verwendung spezifischer Peptide bietet hierbei eine Alternative und eignet sich besonders durch die hohe Stabilität und die kostengünstige standardisierte Produktion der Peptide.

Hierfür wurde die Selektion *L. monocytogenes*-bindender Peptide erstmals mit einem Protein-basierten Phagen-Display durchgeführt. Bisher publizierte Peptide wurden unter Verwendung ganzer Zellen selektioniert, wodurch das Target der resultierenden Peptide unbekannt ist.

In dieser Arbeit wurden Peptide aus 12 Aminosäuren identifiziert, die an *L. monocytogenes*-spezifische Oberflächenproteine Internalin A und Internalin B binden. Internalin A und Internalin B induzieren durch ihre Interaktion mit humanen Rezeptoren, E-Cadherin bzw. c-Met, die Invasion des Bakteriums in humane Wirtszellen und sind für den Infektionszyklus essenziell. Für die Selektion wurden zunächst rekombinante Proteine Internalin A(36-496) und Internalin B(36-321) gereinigt und ihre Bindung an den jeweiligen humanen Rezeptor verifiziert. Anschließend konnten in dieser Arbeit Internalin A-bindende Peptide mit den Aminosäuresequenzen GLHTSATNLYLH (JB1) und DSQFNKYSIATV (JB2) selektioniert werden. Ihre Bindung an sowohl rekombinantes Internalin A als auch an ganze Zellen *L. monocytogenes* wurde erfolgreich untersucht. Zudem konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von JB1 und JB2 an Internalin A die Interaktion zwischen Internalin A und E-Cadherin verhindert wird, wodurch die Internalisierung in epitheliale Wirtszellen verhindern werden könnte.

Außerdem konnte erstmals gezeigt werden, dass Internalin A und Internalin B neben E-Cadherin bzw. c-Met mit dem humanen hepatischen Rezeptor IGF2R (*insuline like growth factor 2 receptor*) interagieren. Die Bindung des Bakteriums mit IGF2R ermöglicht die Invasion in Hepatozyten, der listeriale Interaktionspartner war bislang jedoch nicht bekannt.

In einem weiteren Phagen-Display wurden die Peptide YSLRLTSVTAPT (JB6) und LTPHKHHKHLHA (JB8) gegen Internalin B selektioniert. Die Interaktion beider Peptide mit rekombinantem Internalin B und *L. monocytogenes* konnte erfolgreich gezeigt werden. JB8 wurde anschließend für die synthetische Kopplung an eine antimikrobiell wirkende Hopfenkomponente verwendet. Hopfenkomponenten aus der weiblichen Hopfenpflanze *Humulus lupulus* sind für ihre antimikrobielle Aktivität gegen grampositive Bakterien bekannt. Sie wirken als Ionophore und schädigen die bakterielle Zellmembran oder den Transmembran-Protonengradienten. Hopfenextrakte werden bereits in der Konservierung von Lebensmitteln eingesetzt, um das Wachstum von *L. monocytogenes* zu verhindern. Konzentrationsbedingte negative Geschmacksveränderungen sollen durch eine Verringerung der Dosierung vermieden werden. Durch die Verknüpfung der Hopfenkomponente mit einem Internalin B-bindenden Peptid sollte die Substanz gezielt an die Bakterienmembran lokalisiert und damit die anti-listeriale Wirkung verstärkt werden. Die Auswahl einer für die Verknüpfung geeigneten Hopfenkomponente sowie die Bestimmung optimaler Versuchsbedingungen erfolgten durch Messungen der minimalen Hemmkonzentration (MHK) dreier Substanzen: Hulupinsäure, Xanthohumol und Lupulon. Dabei wurde für Xanthohumol eine MHK von 2,5 µg/ml bei pH 6,0 und 30 °C ermittelt und diese Hopfenkomponente mit Peptid JB8 verknüpft. Xanthohumol und Lupulon erwiesen sich als weniger geeignet. Eine antimikrobielle Aktivität des Konjugats Xanthohumol-JB8 konnte zwar gezeigt werden, die postulierte Verringerung der MHK im Vergleich zu Xanthohumol konnte allerdings zunächst nicht erzielt werden. Allerdings sind hierbei viele Parameter, wie die Art der Verknüpfung, entscheidend und können weiterführend optimiert werden.

Die erstmals gegen Oberflächenproteine von *L. monocytogenes* selektionierten Internalin A- und Internalin B-bindenden Peptide JB1, JB2, JB6 und JB8 liefern jedoch einen entscheidenden Beitrag für die Entwicklung neuer Detektionsmethoden von *L. monocytogenes* sowie zur Verhinderung des pathogenen Mechanismus. Markierungen der spezifischen Peptide mit beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffen könnten eine schnelle Detektion des Bakteriums in humanen Zellen oder Lebensmittelproben ermöglichen. Zusätzlich könnten diese spezifischen Peptide zur Inhibition der Interaktion zwischen den Internalinen und den humanen Rezeptoren verwendet werden, um den Eintritt des Pathogens in Wirtszellen zu verhindern.

Summary

The increase in consumer demand for fresh and naturally processed foods, together with high-quality standards for food safety improvement, has fueled research for new and innovative strategies for detection and elimination of food pathogens. *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) is one of the most prevalent and deadliest foodborne pathogens. It causes listeriosis, which shows a mortality rate up to 30 % of the reported human infections, in spite of antibiotic treatment. The currently available methods for *listeria*-detection are mostly culture techniques which are cost and time intensive. To enhance the detection and identification of the pathogen and to meet current demands for food safety testing, more rapid methods are required. The aim of this thesis was to develop innovative concepts for the detection and inhibition of the *listeria*-infection. Previous studies with antibodies against *L. monocytogenes* provided no sufficient selectivity and sensitivity. The use of specific peptides is an attractive alternative and offers high stability and low-cost standardized production.

Therefore, for the first time, *L. monocytogenes*-binding peptides were selected via a protein-based phage display. Previously published peptides were selected using whole cells as targets in the phage display approach resulting in peptides with unknown targets on the bacterial surface. Here, 12 aminoacid-peptides, interacting with the *L. monocytogenes*-specific surface proteins internalin A and internalin B, were identified. Internalin A and internalin B bind at human receptors E-cadherin and c-Met, respectively. The interaction induces the internalization of the pathogen into human host cells and is essential for its infection cycle. For the selection, recombinant proteins internalin A(36-496) and internalin B(36-321) were purified and investigated for their binding to the respective human receptors. Afterwards, two internalin A-binding peptides – GLHTSATNLYLH (JB1) and DSQFNKYSIATV (JB2) – were developed. Their interaction to recombinant internalin A and to *L. monocytogenes* cells was shown successfully. In addition, by binding internalin A, JB1 and JB2 inhibited the interaction between internalin A and E-cadherin, resulting in a potential inhibition of invasion into epithelial host cells.

For the first time, it could be shown that internalin A and internalin B interact with the human hepatic receptor IGF2R (*insuline like growth factor 2 receptor*). The interaction between IGF2R and the pathogen enables the invasion into hepatocytes. The listerial interaction partner was yet unknown.

In this study, peptides YSLRLTSVTAPT (JB6) and LTPHKHHKHLHA (JB8) were selected via a second phage-display against internalin B. The binding of both peptides to recombinant

internalin B and *L. monocytogenes* was demonstrated. JB8 was used for the synthesis of a conjugate with an antimicrobial hop compound. Hop compounds, deriving from the female hop plant *Humulus lupulus*, are known for their antimicrobial activity against Gram-positive bacteria. By acting as ionophores, they destroy the microbial cell membrane or the transmembrane gradient. Hop extracts are already used for food preservation and inhibition of growth of *L. monocytogenes* but can result in bitter taste from high agent concentrations that are needed for bacterial death. Thus, lower concentrations of hop extracts are needed to reduce the negative effect on the product. By conjugation of the hop component with an internalin B-binding peptide, the substance should be located directly at the bacterial membrane and enhance the anti-listerial activity.

The antimicrobial activity of three hop compounds (hulupinic acid, xanthohumol, lupulon) was investigated to select the ideal components for the peptide and hop compound hybrid. For the conjugation with JB8, xanthohumol was selected with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2.5 µg/ml (pH 6.0, 30 °C). Xanthohumol and lupulon was proven to be less suitable. The antimicrobial activity of the hybrid xanthohumol-JB8 was shown successfully, but a reduction of MIC in comparison to xanthohumol could not be realized. However, lots of parameters, such as the type of conjugation, are crucial and have to be optimized.

Nevertheless, for the first time peptides JB1, JB2, JB6 and JB8, binding internalin A and internalin B, respectively, were developed. The identification of these peptides is a significant contribution for the development of new *L. monocytogenes*-detection methods and for the inhibition of the pathogenic mechanism. Labeling of these peptides with a fluorophore could facilitate rapid detection of *listeria* in human cells or in food samples. Additionally, these specific peptides might be used to inhibit the interaction between internalin and human receptors and thus to avoid the entry of the pathogen into host cells.

1 Einleitung

Lebensmittelassoziierte Krankheiten stellen ein wachsendes Problem für die öffentliche Gesundheit dar. Laut der Weltgesundheitsorganisation und der *European Food Safety Authority* sterben etwa 2,2 Millionen Menschen jährlich an kontaminierten Lebensmitteln oder verunreinigtem Trinkwasser (EFSA 2017; World Health Organization 2010). Überträger sind Mikroorganismen in Lebensmitteln, sogenannte Lebensmittelpathogene, die Lebensmittel sowohl bei der Produktion und Verpackung als auch während des Transports und der Lagerung kontaminieren können. Zu diesen zählen hauptsächlich Bakterien und Pilze, aber auch einige Viren und Protozoen.

Bei der Erkrankung wird zwischen Lebensmittelvergiftung und Lebensmittelinfektionen unterschieden. Lebensmittelvergiftungen werden durch sezernierte Toxine und durch Lebensmittelkontaminationen mit beispielsweise *Staphylococcus aureus* und *Clostridium botulinum* hervorgerufen. Die im Körper stattfindenden biologischen Prozesse werden dadurch unmittelbar beeinflusst und die Vergiftung äußert sich in Symptomen wie Übelkeit und Erbrechen. Infektiöse Krankheitserreger in Lebensmitteln haben Lebensmittelinfektionen zur Folge. Zu den Symptomen der Lebensmittelinfektionen zählen Durchfall und starke Bauchschmerzen. Bakterielle Auslöser sind dabei unter anderem *Salmonella*, *Escherichia coli* und *Listeria monocytogenes* (Keweloh, 2011).

1.1 Die Spezies *Listeria monocytogenes* als Auslöser von Listeriose

Die Häufigkeitsrate von *Listeria monocytogenes*-Infektionen ist zwar geringer als von anderen Lebensmittelpathogenen wie *Salmonella* und *Campylobacter*, allerdings ist die Mortalitätsrate von *Listeria monocytogenes*-Infektionen, die zu Listeriose führen, deutlich höher (EFSA 2017). 20–30 % der gemeldeten Listeriose-Fälle verlaufen tödlich, weshalb das Bakterium zu den gefährlichsten Lebensmittelpathogenen zählt (World Health Organization 2004). Laut der *European Food Safety Authority* (EFSA) ist Listeriose die einzige lebensmittelassoziierte Erkrankung, die seit Jahren weiterhin einen signifikanten Anstieg in der EU zeigt (EFSA 2017).

Bei dem Bakterium *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) handelt es sich um ein grampositives, fakultativ anaerobes, intrazelluläres Pathogen, das ubiquitär vorkommt (Ryser and Marth, 2007; Wilson, 2011). Es zeigt eine hohe Toleranz gegenüber extremen Bedingungen

innerhalb der pH-Werte (pH 4,7 bis pH 9,2) (Petran and Zottola, 1989), der Temperaturen (1 °C bis 45 °C) (Junttila et al., 1988) sowie hohen Salzkonzentrationen (Shahamat et al., 1980). Das Bakterium ist daher unter verschiedenen Umweltbedingungen zu finden.

L. monocytogenes ist neben *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* und *L. grayi* eine der sechs Spezies innerhalb der Gattung *Listeria*. Dabei ist jedoch nur *L. monocytogenes* für den Menschen pathogen. Von den 13 Serotypen *L. monocytogenes*, die nach ihren somatischen und Flagellum-Antigenen eingeteilt werden, sind für den Großteil der Listeriose-Fälle die Serotypen 4b, 1/2a, 1/2b und 1/2c verantwortlich (Brenner et al., 2005; Paterson, 1940; Ryser and Marth, 2007; Wiedmann et al., 1997). Die vier Serotypen unterscheiden sich in ihrer Pathogenität. So wird aus Lebensmitteln hauptsächlich der Serotyp 1/2a isoliert, während der Großteil der humanen Epidemien durch Serotyp 4b verursacht wird (Boerlin et al., 1991; Doumith et al., 2004; Wiedmann et al., 1997).

Sequenzierungen des *L. monocytogenes*-Genoms zeigen sehr viele Gene, die für Oberflächenproteine, transkriptionelle Regulatoren und Zuckeraufnahmesysteme codieren. Der Vergleich der infektiösen Spezies *L. monocytogenes* mit der nicht-pathogenen Spezies *L. innocua* zeigt, dass *L. innocua* 15 % der *L. monocytogenes*-Gene fehlen. Dabei sind insbesondere Gene, die für Virulenzfaktoren codieren und das intrazelluläre Wachstum von *L. monocytogenes* gewährleisten, nicht vorhanden (Gouin et al., 1994).

1.2 Pathogenese und Infektionszyklus von *L. monocytogenes*

Humane Infektionen mit Listerien erfolgen hauptsächlich durch den Konsum von kontaminierten Nahrungsmitteln, insbesondere von *ready-to-eat*-Produkten sowohl tierischer als auch pflanzlicher Herkunft. Man findet Listerien aber auch in rohem Fleisch und Gemüse sowie Milchprodukten. Das Bakterium kann Biofilme ausbilden und eine lange Zeit unter diversen Umweltbedingungen auf unterschiedlichen Materialien überdauern. Daher kann die Kontamination sowohl während der Lebensmittelproduktion als auch während des Vertriebs, der Verpackung, des Transports und der Lagerung erfolgen (Ryser and Marth, 2007). Im Zeitalter der *ready-to-eat*-Produkte stellt der Erreger somit ein immer größeres Problem für die öffentliche Gesundheit dar. Erst im Dezember 2017 wurde für viele Hähnchenprodukte von der Zur Mühlen Markenvertriebs GmbH & Co KG eine Rückrufaktion gestartet, da hier Verunreinigungen mit Listerien festgestellt wurden (Produktwarnung, 2017).

Nach erfolgter Aufnahme durch kontaminierte Lebensmittel und Resorption der Listerien über den Gastrointestinaltrakt, kann der Erreger die intestinale Barriere passieren und über die Lymphe und den Blutstrom zur Leber und zur Milz gelangen. Durch seine Fähigkeit die Blut-Hirn-Schranke und die Plazenta-Schranke zu überwinden, kann das Bakterium sowohl in neuronales Gewebe vordringen als auch den Embryo befallen (Abbildung 1) (Rácz et al., 1972; reviewed in Vázquez-Boland et al., 2001).

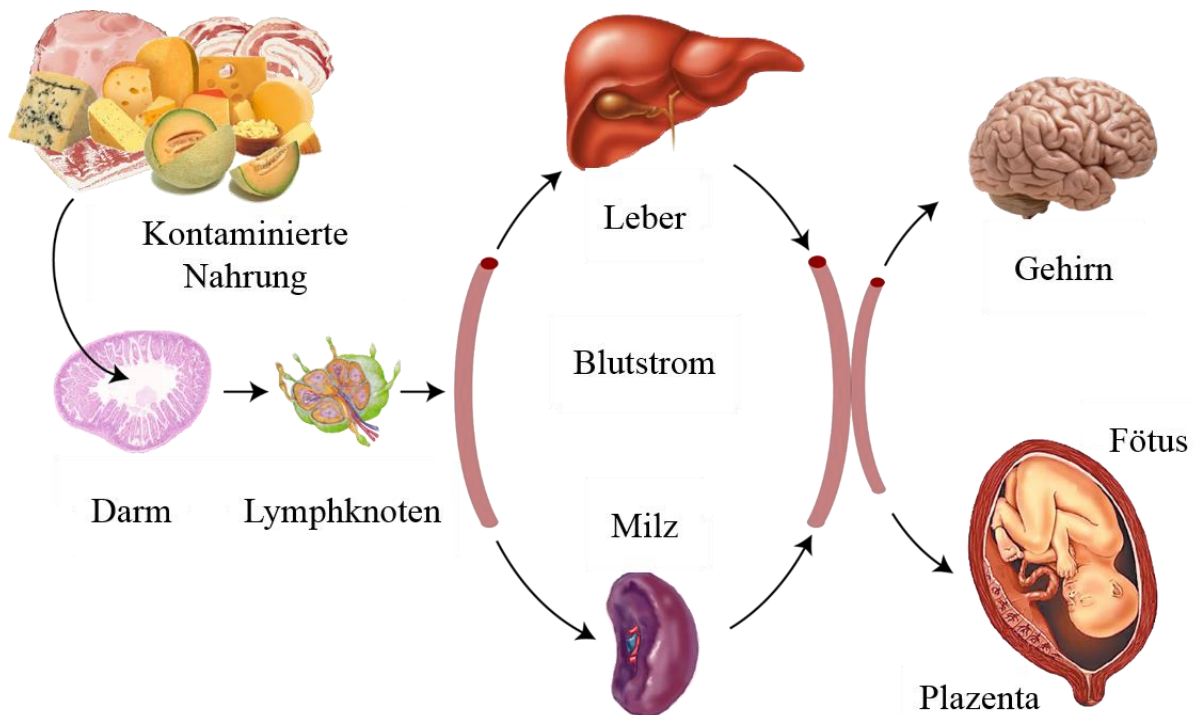


Abbildung 1: Pathophysiologie der Infektion durch *L. monocytogenes*. Das fakultativ intrazelluläre Pathogen wird mit verunreinigter Nahrung aufgenommen und passiert die intestinale Barriere. Über die Lymphe und das Blut gelangt es zur Leber und Milz. Durch Überwinden der Blut-Hirn- und der Plazenta-Schranke erreicht der Erreger das Gehirn und die Plazenta. Modifiziert nach Cossart 2011.

Infektionen mit *L. monocytogenes* können inapparent oder grippeähnlich, von leichtem Fieber, Durchfall und Bauchschmerzen begleitet, verlaufen. Allerdings kann die Infektion auch eine schwere, lebensbedrohliche Listeriose auslösen. Hauptsächlich betroffen sind dabei immunsupprimierte Personen, Kleinkinder, schwangere Frauen und ältere Menschen. Die Erkrankung kann zu Meningitis, Sepsis, septischem Schock und spontanem Abort führen (Ryser and Marth, 2007).

Der Infektionszyklus beginnt mit der Adhäsion des Bakteriums an die Oberfläche der eukaryotischen Zelle und die Invasion in die Wirtszelle. Dabei erkennt *L. monocytogenes*

Proteine der extrazellulären Matrix humaner Wirtszellen, mit denen es über eigene bakterielle Oberflächenproteine, sogenannte Internaline (InlA und InlB), interagiert. Während der Invasion wird das Bakterium von einer phagozytischen Vakuole umschlossen, die es nach Eintritt in die Wirtszelle mittels des Toxins Listeriolysin O (LLO) in Kombination mit Phospholipasen (PlcA und PlcB) lysiert. Dabei hat die LLO-abhängige Porenbildung Veränderungen des pH-Wertes und der Kalzium-Konzentrationen innerhalb der Vakuole zur Folge, die eine Zerstörung der Membran bewirken. Im Zytoplasma repliziert der Erreger und bildet an einem Pol des Bakteriums mit Hilfe des *actin assembly inducing proteins* ActA Aktinfilamente aus, die die Mobilität im Zytoplasma und somit das Eindringen in benachbarte Zellen gewährleisten. Nach Invasion in eine neue Zelle wird das Listerium durch Phagozytose umhüllt, so dass es von einer Doppelmembranvakuole umschlossen ist. Diese wird erneut mittels LLO, PlcA und PlcB zerstört und dem Bakterium somit ein neuer intrazellulärer Proliferationszyklus ermöglicht (Abbildung 2) (Dabiri et al., 1990; Gaillard et al., 1987; Kocks et al., 1992; Marquis et al., 1995).

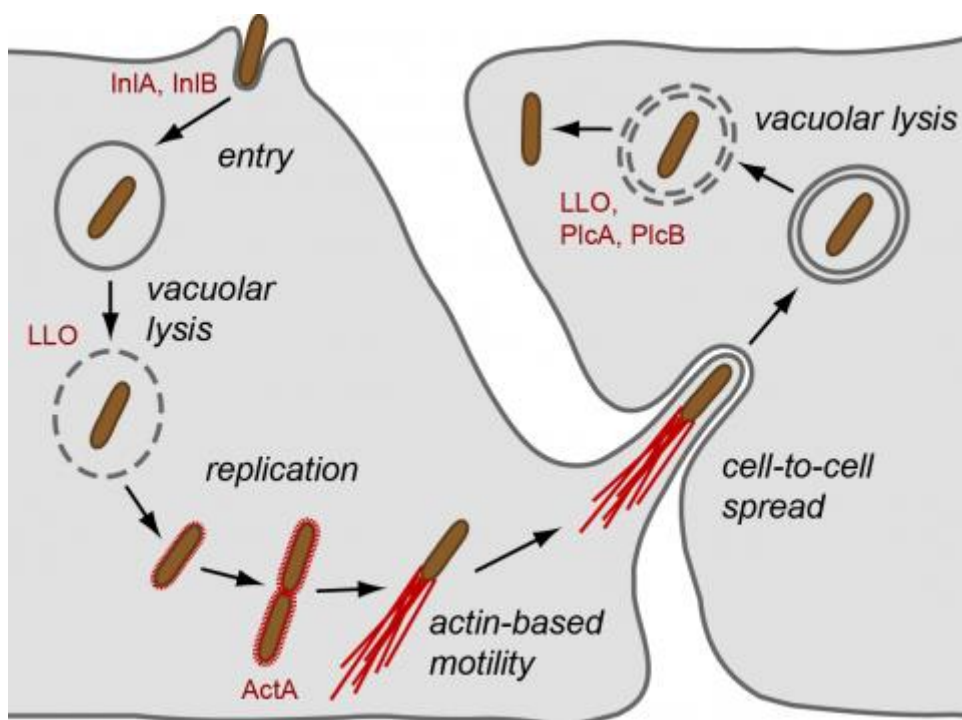


Abbildung 2: Intrazellulärer Zellzyklus von *L. monocytogenes*. Die Invasion in die Wirtszellen erfolgt durch Bindung des Bakteriums mittels bakterieller Oberflächenproteine InlA und InlB an die humane Zelle. Durch die Sekretion des porenbildenden Toxins Listeriolysin O (LLO) und bakteriellen Phospholipasen PlcA und PlcB wird die phagozytische Vakuole lysiert, wodurch das Bakterium im Zytoplasma replizieren kann. Mit Hilfe des *actin assembly inducing proteins* ActA wird Aktin in Form von kometenähnlichen Schwänzen ausgebildet und damit das Bakterium mobilisiert, wodurch es benachbarte Zellen infizieren kann. Die Doppelmembranvakuole, in die das Bakterium nun eingeschlossen ist, wird erneut durch LLO, PlcA und PlcB lysiert und ein neuer Infektionszyklus ermöglicht (Pizarro-Cerdá et al., 2012).

1.3 Internalin-vermittelte Invasion von *L. monocytogenes* in Wirtszellen

1.3.1 Familie der Internaline

Internaline sind bakterielle Oberflächenproteine, die in pathogenen *Listeria*-Spezies gefunden wurden. Die ersten Mitglieder dieser Proteinfamilie wurden Internalin A (InlA) und Internalin B (InlB) benannt. Es wurde gezeigt, dass sie die bakterielle Internalisierung in normalerweise nicht-phagozytische Wirtszellen vermitteln (Gaillard et al., 1991). Seitdem wurden sieben weitere homologe Proteine identifiziert – InlC, InlC2, InlD, InlE, InlF, InlG, and InlH (Dramsi et al., 1997; Engelbrecht et al., 1996; Raffelsbauer et al., 1998).

Alle Proteine der Internalin-Familie besitzen ein Signalpeptid sowie eine *leucin-rich repeat* (LRR)-Region und eine *B-repeat*-Region, die durch eine *inter-repeat* (IR)-Region getrennt sind (Abbildung 3). Bis auf InlC sind alle *L. monocytogenes* Internaline an der bakteriellen Zelloberfläche verankert und unlöslich. Die LRR-Region zeichnet sich durch 22 Aminosäure-lange Wiederholungseinheiten mit Leucin in bestimmten Positionen aus und bildet eine rechtsgängige pseudo-helikale Struktur mit alternierenden β -Strängen und Helices (Abbildung 3C). Die LRR-Domäne der Internaline ist bei spezifischen Protein-Protein-Interaktionen, die für die Phagozytose essenziell sind, involviert (Kobe and Deisenhofer, 1993; Marino et al., 1999).

Internaline InlA und InlB vermitteln die Interaktion von *L. monocytogenes* mit den Wirtszellen (Dramsi et al., 1995; Gaillard et al., 1991). Alle anderen Internaline (InlC, InlC2, InlD, InlE, InlF, InlG, and InlH) besitzen zwar ebenfalls ein Signalpeptid und die LRR-Domäne, sind aber bei der Invasion in Wirtszellen nicht beteiligt (Dramsi et al., 1997; Raffelsbauer et al., 1998).

Die listerialen Internalin-Proteine InlA und InlB, codiert von den Genen *inlA* und *inlB*, zeigen zwar Sequenzhomologien und sind nah verwandt, besitzen aber eine unterschiedliche Anzahl an LRRs und spielen bei der Infektion verschiedener Zelltypen eine entscheidende Rolle (siehe 1.3.2; 1.3.3).

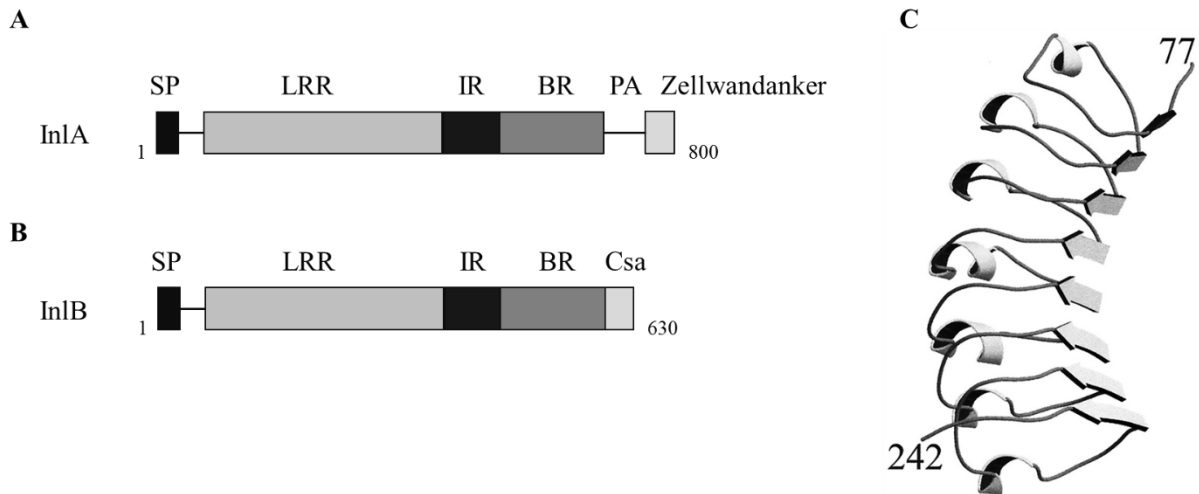


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Internaline InlA und InlB sowie der LRR-Region. A) InlA. Vom amino-Terminus zum carboxy-Terminus: Signal-Peptid (aa 1-35), *leucin rich repeats*-Region (LRR) (aa 73-423), *inter repeat*-Region (IR) (aa 424-517), *B-repeat*-Region (BR) (aa 518-706), Preanker-Region (PA) (aa 707-766), Zellwandanker (767-800). Modifiziert nach Lecuit et al., 1997. B) InlB. Vom amino-Terminus zum carboxy-Terminus: Signal-Peptid (aa 1-35), *leucin rich repeats*-Region (LRR) (aa 73-248), *inter repeat*-Region (IR) (aa 249-342), *B-repeat*-Region (BR) (aa 343-398), Zelloberflächenanker (Csa) (399-630). Modifiziert nach Braun et al., 1999. C) Struktur der LRR-Region am Beispiel von InlB (77-242). Jedes *leucin-rich repeat* alterniert zwischen einem β -Strang (als Pfeil dargestellt) und einer Helix. Die β -Stränge bilden die konkave und die Helices die konvexe Seite des Moleküls. Die β -Stränge sind gekrümmt und geben der Struktur eine rechtsgängige superhelikale Krümmung. Modifiziert nach Marino et al., 2000.

1.3.2 Internalin A – Struktur und Interaktion mit E-Cadherin

Das Protein InlA ist für die Phagozytose von *L. monocytogenes* in humane epitheliale Zellen essenziell (Gaillard et al., 1991). Es ist 88 kDa schwer (800 Aminosäuren) und weist 15,5 LRR-Wiederholungen auf (Lingnau et al., 1995). Die LRRs sind am N-Terminus positioniert, während der C-Terminus einen Zellwandanker mit einem Peptidoglycan-verknüpfenden LPxTG-Motiv enthält, gefolgt von einer hydrophoben Transmembran-Region (Dhar et al., 2000) (Abbildung 3A). Die Verankerung mittels des LPxTG-Motivs und einer Sortase gewährleistet die kovalente Positionierung des Internalins an der bakteriellen Zelloberfläche, die für die Invasion des Bakteriums in Wirtszellen essenziell ist (Lebrun et al., 1996).

Der Eintritt von *L. monocytogenes* in Epithelzellen erfolgt über die Interaktion des InlA mit dem humanen epithelialen Rezeptor E-Cadherin (Ecad), einem Kalzium-abhängigen interzellulären Transmembran-Glycoprotein (Mengaud et al., 1996).

Ecad (120 kDa, 882 Aminosäuren) besteht aus fünf extrazellulären Domänen (EC1-EC5), einer Transmembranhelix und einer intrazellulären Domäne (Overduin et al., 1995). Das Protein zählt zur Familie der Cadherine und vermittelt normalerweise die Ausbildung der *adherens junctions*.

Über die LRR-Domäne interagiert InlA mit der ersten N-terminalen extrazellulären Domäne des Ecad (EC1). Dies induziert die Phosphorylierung von Ecad mittels Tyrosin-Kinase Src und die Freilassung des Catenins p120, was die Ubiquitinierung des Ecad mittels Ubiquitin-Ligase Hakai ermöglicht (Bonazzi et al., 2008; Fujita et al., 2002). Dadurch wird die bei der Bildung von *adherens junctions* wirkende Signalkaskade aktiviert. In dieser Signalkaskade werden zwei Catenine an die bakterielle Internalisierungsstelle rekrutiert: β -Catenin bindet an die C-terminale zytoplasmatische Domäne von Ecad und rekrutiert dabei α -Catenin (Lecuit et al., 2000). α -Catenin interagiert schließlich mit dem GAP-Protein ARHGAP10, welches die Lokalisierung stabilisiert. Die anschließende Aktinpolymerisierung wird durch den Arp2/3-Komplex, einem Aktin-Nukleator, sowie der RhoGTPase Rac1 induziert (Abbildung 4) (Drees et al., 2005; Sousa et al., 2005; Sousa et al., 2007).

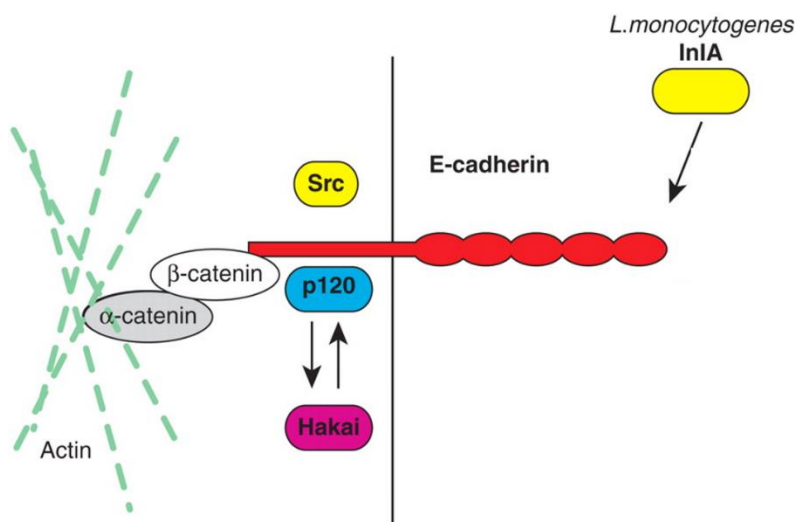


Abbildung 4: Signalkaskade der InlA-vermittelten Invasion von *L. monocytogenes* in humane Epithelzellen. Das bakterielle Oberflächenprotein InlA interagiert mit dem Adhäsionsprotein E-Cadherin und initiiert damit die *adherens junctions*-Signalkaskade, bei der Ecad durch die Tyrosin-Kinase Src phosphoryliert wird. Das Ecad-gebundene Catenin p120 wird dabei freigelassen und die Ubiquitin-Ligase Hakai rekrutiert. Nach der Ubiquitinierung werden β - und α -Catenine an die Eintrittsstelle rekrutiert, was die Aktinpolymerisierung mittels Arp2/3-Komplex und RhoGTPase Rac1 induziert (Bonazzi et al., 2014).

Bei der Interaktion ist die LRR-Domäne des InlA für die Bindung und Invasion essenziell und ausreichend (Abbildung 5). Eine Blockierung der LRR-Region, durch beispielsweise monoklonale Antikörper, hat die Verhinderung der InlA-vermittelten Invasion in Wirtszellen zur Folge (Lecuit et al., 1997).

Bei Ecad ist insbesondere die Aminosäure Pro16 essenziell (Abbildung 5). Ecad aus Maus und Ratte besitzt an dieser Position anstatt eines Prolins eine Glutaminsäure, weshalb die InlA-vermittelte Invasion in Zellen, die mEcad exprimieren, nicht erfolgen kann (Lecuit et al., 1999).

Die Bindung des Bakteriums an die Epithelzelle erfolgt zwar über die extrazelluläre Domäne EC1, der Eintritt des Bakteriums wird jedoch über die intrazytoplasmatische Domäne des Ecad vermittelt (Lecuit et al., 2000).

Schubert et al. (2002) zeigten die 3-dimensionale Kristallstruktur des InlA-Ecad-Komplexes (Abbildung 5), wobei sie nur Teilfragmente der beiden Proteine (InlA36-496, Ecad1-100) verwendeten. Hiermit bestätigten sie, dass die Interaktion zwischen InlA und Ecad über die funktionelle LRR-Domäne des InlA und über die N-terminale Domäne des Ecad erfolgt und somit beide Domänen für die Invasion essenziell und ausreichend sind (Lecuit et al., 1997; Schubert et al., 2002).

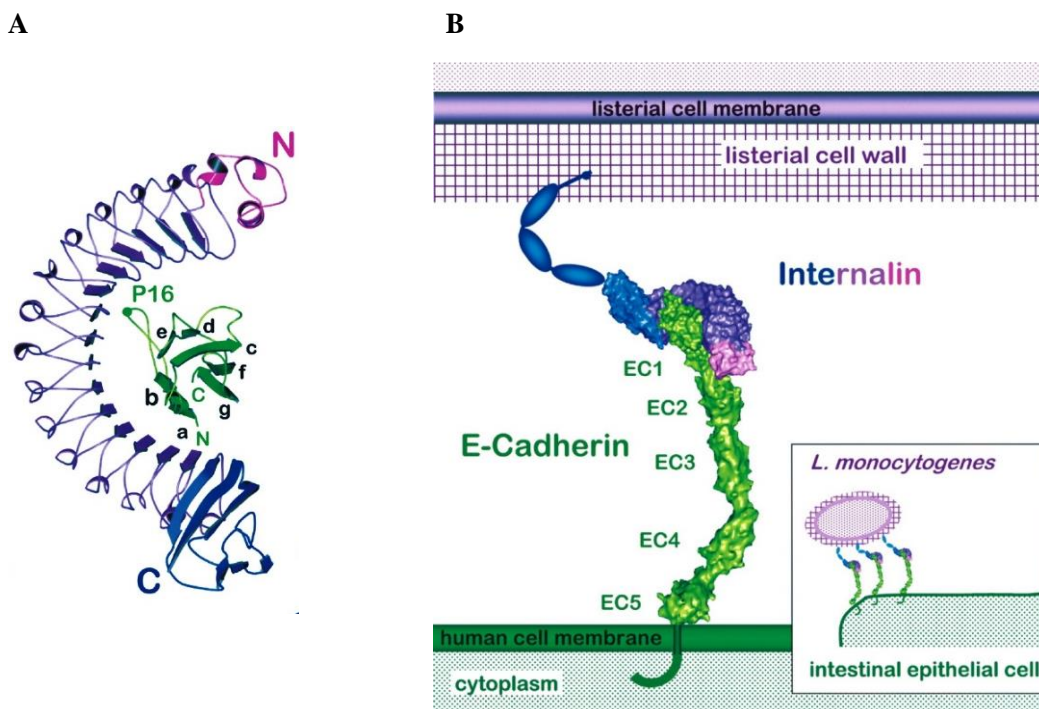


Abbildung 5: Struktur des InlA-Ecad-Komplexes. A) Die LRR-Region (aa 79-414, violett) des InlA bildet einen Komplex mit der ersten extrazellulären Domäne (EC1) des Ecad (1-100, grün), wobei die Aminosäure Prolin16 (P16) essenziell ist. B) Das kovalent in die Zellwand von *L. monocytogenes* verankerte InlA (violett) erkennt und bindet Ecad (grün) an der humanen epithelialen Zellmembran. Beide Proteine sind in hoher Kopienzahl auf den entsprechenden Zellen vertreten (Schubert et al., 2002).

Gasanov et al. (2006) identifizierten den *insulin-like growth factor II receptor* (IGF2R) als einen weiteren Rezeptor für die Invasion von *L. monocytogenes* in humane Zellen.

IGF2R, auch als Kation-unabhängiger Mannose-6-Phosphat-Rezeptor (M6PR) bekannt, ist für die Bindung von Mannose-6-Phosphat (M6P) verantwortlich. Es wird in hepatischen Sternzellen exprimiert, wobei der Hauptanteil innerhalb der Zelle und nur 5 – 10 % auf der Zelloberfläche zu finden ist. Der an der Zelloberfläche assoziierte IGF2R ist an der Regulation

des Zellwachstums beteiligt, da er extrazelluläre Liganden (beispielsweise IGF2) internalisieren und den Abbau von lysosomalen Enzymen regulieren kann (Morgan et al., 1987; Kiess et al., 1993; Grimme et al., 2000; Byrd and MacDonald, 2000; Devi et al., 1999).

Gasanov et al. zeigten, dass *L. monocytogenes* IGF2R-exprimierende humane Zellen sowie ein Peptid, dessen Aminosäurefolge einer Sequenz in IGF2R entspricht, binden kann. Die Interaktion zwischen diesen Zellen und *L. monocytogenes* konnte durch Mannose-6-Phosphat (M6P) kompetitiv gehemmt werden, so dass das Bakterium mit M6P um die Bindestelle zu konkurrieren scheint. Die Invasionsrate in IGF2R-exprimierende Zellen war zudem deutlich höher als in Zellen, die kein IGF2R exprimieren. Als möglicher bakterieller Interaktionspartner wurde dabei InlB postuliert (Gasanov et al., 2006).

1.3.3 Internalin B – Struktur und Interaktion mit c-Met

InlB induziert die Invasion in Hepatozyten, Endothel- und Epithelzellen und Fibroblasten (Dramsi et al., 1995; Lingnau et al., 1995; Parida et al., 1998). Es ist ein 65 kDa schweres Protein (630 Aminosäuren) mit 7,5 LRR-Regionen am N-Terminus. Im Gegensatz zu InlA besitzt es am C-Terminus kein LPxTG-Motiv und keine hydrophobe Region (Dramsi et al., 1997; Raffelsbauer et al., 1998). Stattdessen wird die Verankerung des InlB-Proteins in die bakterielle Zelloberfläche über eine C-terminale Domäne aus 232 Aminosäuren, bekannt als *cell surface anchor* (Csa)-Domäne, vermittelt (Abbildung 3B). Diese besteht aus mehreren Wiederholungseinheiten, die mit den Aminosäuren GW beginnen, und bindet die Lipoteichonsäure der bakteriellen Membran (Braun et al., 1997; Jonquières et al., 1999).

Der humane Rezeptor für InlB ist dabei die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Met, die als Oberflächenprotein auf vielen Zellen, wie beispielsweise Hepatozyten, exprimiert wird und die physiologisch als Ligand für den Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) fungiert (Braun et al., 1999; Shen et al., 2000). Die Interaktion zwischen HGF und dem Rezeptor c-Met ist unter normalen physiologischen Bedingungen essenziell für das Zellwachstum, die Geweberegeneration sowie die Wundheilung (Bussolino et al., 1992; Bevan et al., 2004).

Nach der Interaktion des InlB mit der Zielzelle wird eine Signalkaskade aus Membranstülpung und Tyrosin-Phosphorylierung einiger Proteine in Gang gesetzt, wodurch die Invasion des Bakteriums in die Wirtszelle initiiert wird.

Durch die Bindung der LRR-Region des InlB an c-Met (Met) werden einige Adapterproteine (Gab1, Cbl, Shc) Tyrosin-phosphoryliert und die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) rekrutiert (Ireton et al., 1996). Die Ubiquitinligase Cbl ubiquitiniert Met Clathrin-abhängig. Dieser Mechanismus wird auch bei der Internalisierung von Met nach Interaktion mit seinem

natürlichen Liganden HGF induziert (Veiga and Cossart, 2005). Die rekrutierte PI3K aktiviert die RhoGTPase Rac1 und induziert die Aktinpolymerisierung durch die Aktivierung des Arp2/3-Komplexes (Bierne et al., 2001) (Abbildung 6).

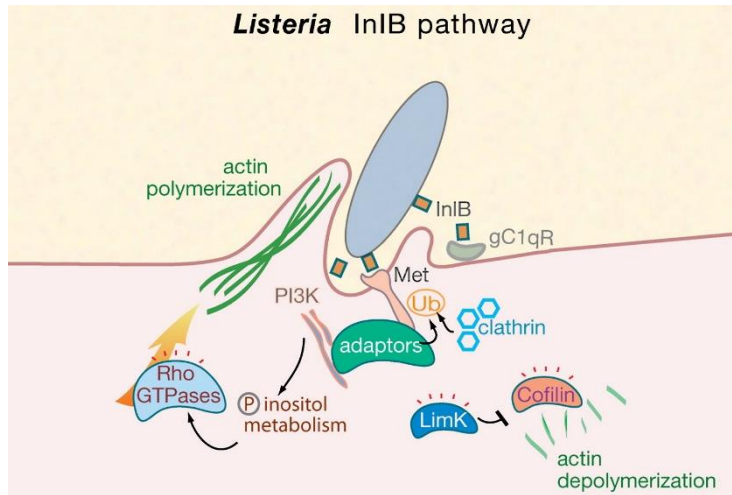


Abbildung 6: Signalkaskade der InIB-vermittelten Invasion von *L. monocytogenes* in humane Wirtszellen. Das Oberflächenprotein InIB interagiert mit dem humanen Rezeptor Met, wodurch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) rekrutiert wird und Adapterproteine phosphoryliert werden. Met wird Clathrin-abhängig ubiquitiniert und die Aktinpolymerisierung durch die Aktivierung der RhoGTPase Rac1 induziert. Die für die Endocytose notwendige Balance zwischen Aktin-Polymerisierung und -Depolymerisierung wird durch die Lim-Kinase und Cofilin gewährleistet (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006).

Die Struktur, der für die Zell-Wirt-Interaktion erforderlichen LRR-Domäne von InIB wurde von Marino et al. (1999) publiziert (Abbildung 3C). Dabei sind die Aminosäuren 36-248 für die Bindung an den Met-Rezeptor essenziell (Niemann et al., 2007). Mit den aromatischen Seitenketten der LRR-Region seiner konkaven Seite bindet InIB an Met (Machner et al., 2003) (Abbildung 7).

Met ist ein zweikettiges Heterodimer, das durch zwei Disulfidbrücken verbunden ist. Am N-Terminus befindet sich eine sogenannte Semaphorin-Domäne (Gherardi et al., 2003), gefolgt von einer Cystein-reichen (PSI) Domäne (Kozlov et al., 2004). Nach vier Immunoglobulin-ähnlichen Domänen (Immunoglobulin-Plexin-Transkription-Domänen, IPT) (Ig1-Ig4), einer Transmembranhelix, einer Juxtamembran- und einer Tyrosinkinase-Domäne folgt eine C-terminale multifunktionale Andockstelle (Gherardi et al., 2003; Niemann et al., 2007) (Abbildung 7). Die Bindestelle für die LRR-Region von InIB befindet sich dabei auf der ersten Immunoglobulin-ähnlichen Domäne von Met (Ig1). Eine weitere schwächere Interaktion erfolgt zwischen der *inter-repeat*-Region von InIB und der Semaphorin-Domäne von Met, die ebenfalls für die Aktivierung des Rezeptors notwendig ist. Zusätzlich ist eine Rezeptor-

Dimerisierung bzw. Oligomerisierung, die durch die GW-Domänen des InlB hervorgerufen wird, entscheidend (Banerjee et al., 2004; Niemann et al., 2007).

InlB stellt in der Bindung und Aktivierung des Met-Rezeptors jedoch keinen Imitator des physiologischen Liganden HGF dar. Der Hepatozyten-Wachstumsfaktor bindet sowohl mit seinem N- als auch seinem C-Terminus an die Sema-Domäne des Met-Rezeptors (Holmes et al., 2007; Stamos et al., 2004), während die Bindung des Bakteriums an Met nur über den N-terminalen Cap-LRR-IR-Bereich von InlB und die Ig1-Domäne von Met erfolgt. *L. monocytogenes* scheint sich somit einen neuen Mechanismus für die Aktivierung der Invasion in die Wirtszelle angeeignet zu haben (Niemann et al., 2007).

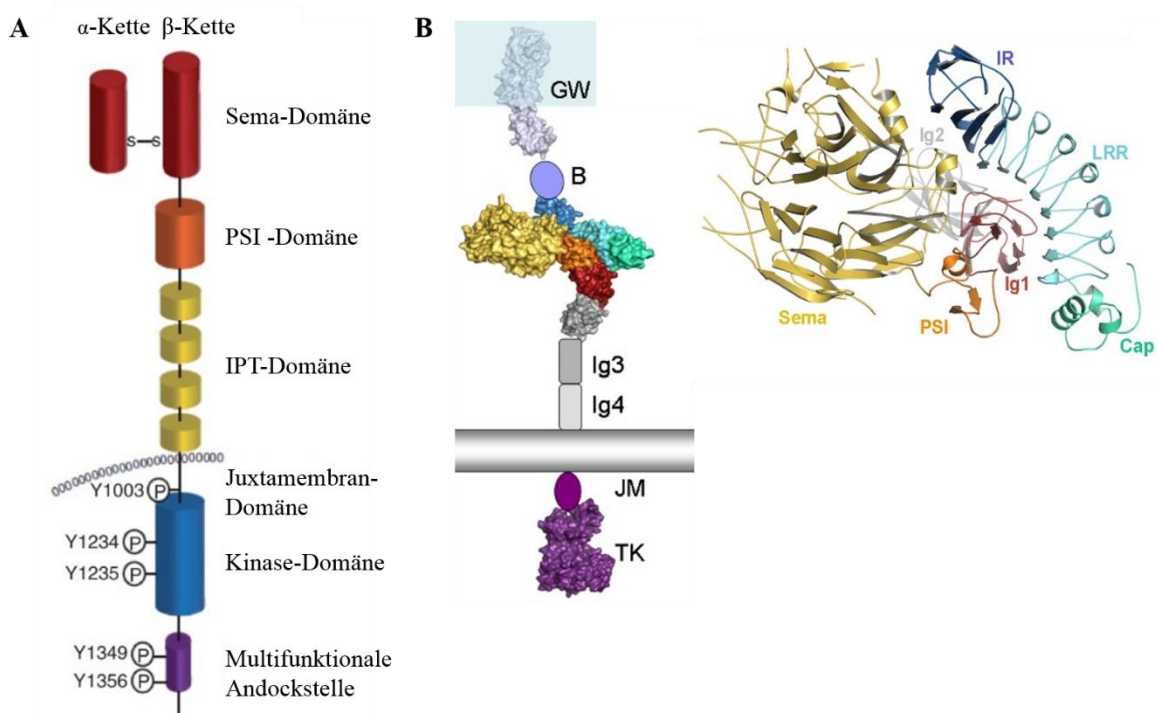


Abbildung 7: Struktur der humanen Rezeptor-Tyrosin-Kinase Met (A) und des Met-InlB-Komplexes (B). A) Der extrazelluläre Teil von Met, einem durch Disulfidbrücken verbundenem Dimer, besteht aus einer Semaphorin (Sema)-Domäne, der Plexin-Semaphorin-Integrin (PSI)-Domäne sowie vier Immunoglobulin-Plexin-Transkription-Domänen (IPT, Ig1-Ig4), die mit einer Transmembranhelix verknüpft sind. Intrazellulär befinden sich eine Tyrosinkinase-Domäne, eine Juxtamembran-Domäne und C-terminale Sequenzen einer multifunktionalen Andockstelle. Modifiziert nach Organ and Tsao 2011. B) Die Ausbildung des Met-InlB-Komplexes erfolgt über die konkave Seite der Cap-LRR-IR-Domäne des InlB und der Ig1-Region sowie der Sema-Domäne des Met-Rezeptors. Grün: Cap-Domäne, hellblau: *leucin-rich repeats*, dunkelblau: *inter repeats*, gelb: Sema-Domäne, orange: PSI-Domäne, rot: Ig1, grau: Ig2-Ig4, violett: Juxtamembran-Domäne und Tyrosin-Kinase-Domäne. Modifiziert nach Niemann et al., 2007.

Neben Met wurde gC1q-R als ein weiterer Rezeptor für InlB identifiziert (Braun et al., 2000) (Abbildung 6). gC1q-R ist ein Membranprotein, das normalerweise mit der globulären Kopfregion von C1q des Komplementsystems interagiert und von Lymphozyten, Neutrophilen

und Hepatozyten exprimiert wird (Ghebrehiwet and Peerschke 1998). Braun et al. (2000) zeigten, dass gC1q-R außerdem von der Membran gelöstes InlB binden kann. Die Bindung erfolgt dabei über die GW-Domäne des InlB (Marino et al., 2002). Da gC1q-R jedoch keine Transmembran-Domäne besitzt, fungiert dieser vermutlich eher als Corezeptor und nicht als ein Signalrezeptor. Die Invasion in die Wirtszelle erfordert zusätzliche Interaktionen mit weiteren Oberflächenstrukturen. Die genaue Funktion der Interaktion mit gC1g-R ist nicht bekannt, scheint aber für den Eintritt in Wirtszellen ebenfalls notwendig zu sein (Braun et al., 2000).

Außerdem wurden Glykosaminoglykane als weitere Rezeptoren gezeigt, deren Interaktionen die InlB-vermittelte Initialisierung unterstützen (Jonquières et al., 2001).

1.4 Phagen-Display zur Selektion spezifischer Peptide

Der Begriff Phagen-Display bezeichnet eine durch George P. Smith 1985 etablierte molekularbiologische Methode. Dabei handelt es sich um eine relativ schnelle und kostengünstige Selektionstechnik, mit der Proteine und Peptide als Bindepartner bestimmter Targets identifiziert werden können.

Durch den Einsatz dieser Methode wurden im Bereich der Krebsforschung (Arap et al., 1998), Pflanzenforschung (Sanmartín et al., 2011), Protein-Protein-Interaktionen (Bitto and McKay 2003), Infektionskrankheiten (Rajik et al., 2009) und des Epitop-Mappings (Dore et al., 1998; van Nieuwenhove et al., 2012) wichtige Erkenntnisse gewonnen. Auch auf dem Gebiet der Arzneimittelforschung findet sie immer mehr Einsatz. Häufig wird sie zur Identifizierung von Peptidliganden und Antikörpern, die die Funktionen bestimmter Rezeptoren inhibieren, verwendet und bietet somit viele neue therapeutische Ansätze (Giuliani et al., 2007; Wu et al., 2007).

Die Selektion von Peptiden mit hoher Affinität und Spezifität zum Target erfolgt unter Verwendung einer Bibliothek aus Peptid-präsentierenden Phagen. Diese Phagen-Bibliothek enthält 10^8 - 10^{11} Phagen mit unterschiedlichen Peptidsequenzen und umfasst damit eine große Anzahl an potentiellen Bindepartnern.

Für die Präsentation der Peptide hat sich als Vektor die Verwendung des filamentösen Bakteriophagen M13 etabliert. M13 zeichnet sich durch seine einzelsträngige DNA und die Eigenschaft nur gramnegative, F-Pili enthaltende Bakterien zu infizieren, aus (Caro and Schnös

1966; Salivar et al., 1964). Damit wird gewährleistet, dass nur die zur Vermehrung eingesetzten *E. coli* ER2738 infiziert werden. Außerdem wird bei der Freisetzung der Viruspartikel von M13 die Wirtszelle nicht lysiert (Hofmann-Berling et al., 1964; Salivar et al., 1964). Für die Präsentation der Peptidsequenzen wird neben Hüllprotein pVIII hauptsächlich das Hüllprotein pIII (insbesondere für kurze Peptidsequenzen) des M13-Phagen verwendet, welches in fünffacher Kopienzahl vorliegt (Markland et al., 1991; Fuh and Sidhu, 2000). Dabei wird das Peptid-codierende Gen in die Phagen-DNA kloniert. Der neue Phage exprimiert an seiner Oberfläche die entsprechende Peptidsequenz N-terminal fusioniert mit dem pIII-Protein (Cwirla et al., 1990; Parmley and Smith et al., 1988). Das Fusionsprotein liegt dabei in fünffacher Kopienzahl vor (Rodi and Makowski, 1999). Die Phagen-Infektiösität wird bei kurzen Peptidsequenzen (< 50 Aminosäuren) nicht beeinträchtigt (Cwirla et al., 1990).

Käuflich erwerbbar Phagen-Bibliotheken beinhalten Phagen, die Peptide aus sieben oder zwölf Aminosäuren präsentieren und die direkt für die Selektion eingesetzt werden können.

Das Prinzip der Selektion von spezifischen Peptiden, das allgemein als Biopanning bezeichnet wird, basiert auf dem Prinzip der Affinität und ist in Abbildung 8 dargestellt.

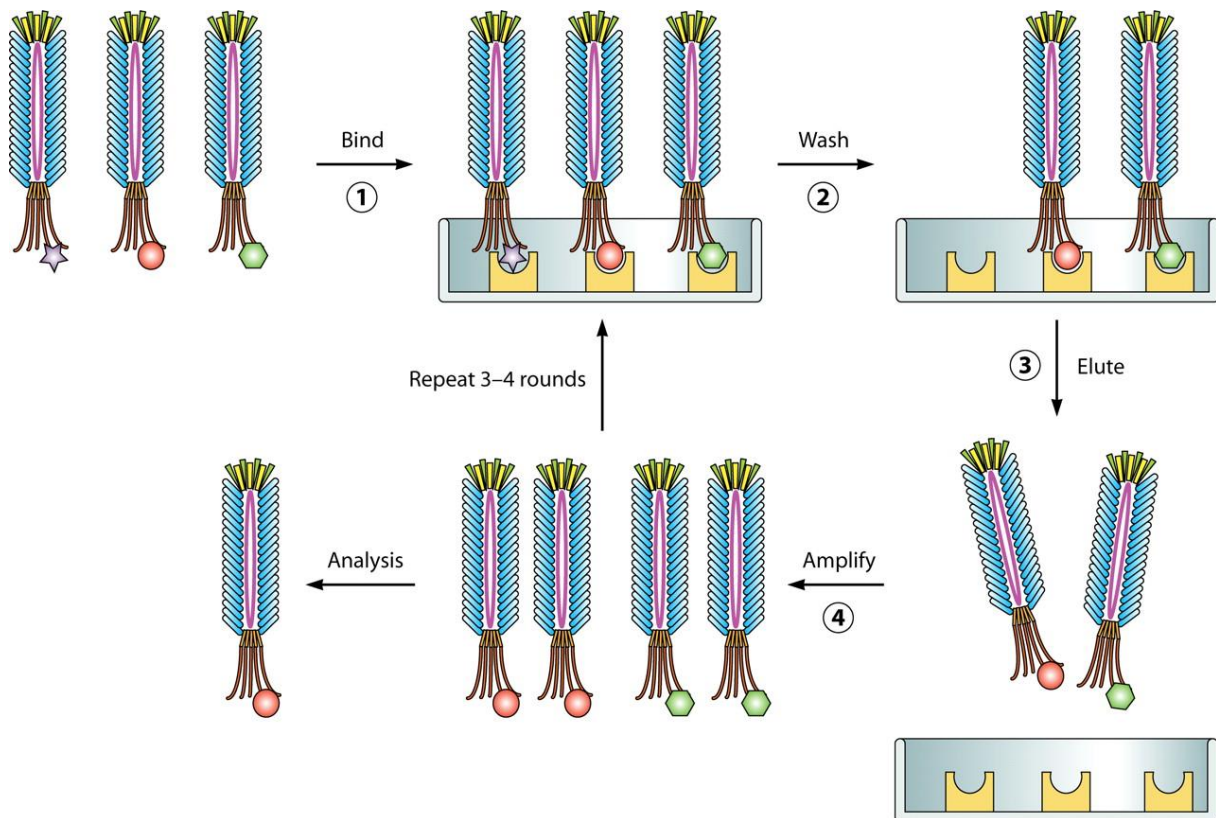


Abbildung 8: Prinzip der Selektion von Target-spezifischen Peptiden mittels Phagen-Display. 1) Eine Phagen-Bibliothek aus bis zu 10^{10} Peptid-präsentierenden Phagenklonen wird mit dem immobilisierten Target (gelb) inkubiert. 2) Durch Waschschrte werden Phagen mit geringer oder keiner Affinität zum Target entfernt. 3) Gebundene Phagenklone werden eluiert und 4) angereichtert. Diese werden für eine neue Panningrunde eingesetzt. Die Selektionsrunde wird insgesamt drei bis vier Mal wiederholt. Anschließend wird die ssDNA der Target-spezifischen Phagen isoliert, sequenziert und die inserierte Peptidsequenz ermittelt (Huang et al., 2012).

Dabei wird das Target, beispielsweise rekombinante Proteine oder ganze Zellen, auf einer stabilen Fläche immobilisiert (Watters et al., 1997). Dies erfolgt entweder direkt oder bei sehr kleinen Molekülen nach Konjugation mit Biotin oder BSA (Rinderserumalbumin). Im Anschluss wird das Target mit der Phagenbibliothek inkubiert und anschließend Phagen, deren präsentierte Peptide keine oder eine sehr geringe Affinität zum Target aufweisen, mittels mehrerer Waschschrte entfernt. Die gebundenen Phagen werden eluiert und in *E. coli* angereichtert, bevor das Eluat in einer neuen Panningrunde eingesetzt wird. In Summe werden drei bis vier Panningrunden durchgeführt, um den Selektionsdruck und damit die Effizienz zu erhöhen. Die einzelnen Phagen der Eluate werden schließlich separiert und erneut auf ihre Bindungsaffinität zum Target überprüft. Einzelstrang-DNA positiver Phagenklone wird sequenziert und die inserierte Peptidsequenz ermittelt und analysiert (Cwirla et al., 1990; Scott and Smith, 1990).

Obwohl das Prinzip des Biopannings relativ simpel ist, so wird das Resultat von vielen Faktoren beeinflusst: der Struktur des immobilisierten Targets, der Komplexität der Bibliothek, der

Bindungsaffinität, von Kreuzreaktionen, falsch-positiven Klonen und vielen experimentellen Parametern (reviewed in Menendez and Scott, 2005). Dennoch konnten mittels Phagen-Display identifizierte Peptide bereits therapeutisch und diagnostisch genutzt werden. Peptide, die an die Bakterienmembran von *Staphylococcus aureus* binden, ermöglichen beispielsweise die Detektion des Pathogens (Rao et al., 2013). Peptide, die den Eintritt von HIV inhibieren, wurden als mögliche anti-HIV-Therapeutika publiziert (Welch et al., 2010).

1.5 Bisherige Behandlungs- und Nachweismethoden von *L. monocytogenes*

Die Behandlung von Listeriose erfolgt in der Regel mit Antibiotika wie Ampicillin und Amoxicillin (Penicilline) und Gentamicin, die bakterizid und synergetisch wirken (reviewed in Temple and Nahata, 2000). Der Einsatz von Antibiotika bringt jedoch die Problematik von Resistenzstämmen mit sich, die Resistenzen für ein oder mehrere Antibiotika aufweisen (Christensen et al., 2011; Poyart-Salmeron et al., 1990). Trotz Antibiotikabehandlung liegt die Mortalitätsrate nach *L. monocytogenes*-Infektionen bei 30 % (EFSA 2017). Daher steigt die Nachfrage nach alternativen Behandlungen und anti-listerial wirkenden Substanzen.

Peptide mit antimikrobieller Aktivität bieten eine Alternative zu traditionellen Antibiotika. Die Wirkungsweise der antimikrobiellen Peptide (AMP) erfolgt durch Zerstörung der Zellmembran oder durch Interaktion mit intrazellulären Komponenten, die in der Inhibition von bestimmten zellulären und enzymatischen Prozessen resultiert (Mihajlovic et al., 2010). Anti-listeriale Aktivität zeigt beispielsweise das Antibiotikum Khal, das von dem AMP Halocidin abgeleitet wurde und die Wirtszelle ohne Membranschäden passieren und intrazelluläre Listerien angreifen kann (Jang et al., 2007). Die unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der AMP erschweren es den Pathogenen Resistenzen zu entwickeln und bieten somit viele therapeutische Strategien. Außerdem ermöglichen diese den Einsatz in der Lebensmittelkonservierung zur Verhinderung des bakteriellen Wachstums.

Die bisherigen Nachweismethoden von *L. monocytogenes*-Infektionen erstrecken sich hauptsächlich auf zeitintensive Zellkultur-Techniken (U.S. Food and Drug Administration). Die Etablierung neuer und schnellerer Detektionsmethoden hat daher in den letzten Jahren eine hohe Relevanz in der Forschung der Lebensmittelsicherheit gefunden. Dabei werden immunologische Techniken wie Biosensoren (Ohk and Bhunia, 2013) und ELISA (Portanti et

al., 2011) sowie genotypische Techniken wie RT-PCR (*real-time polymerase chain reaction*) (Pochop et al., 2012) und DNA *microarray* (Bang et al., 2013) verwendet. Durch große Ähnlichkeiten in morphologischen und biochemischen Eigenschaften aller *Listeria*-Spezies wird bei der Detektion die Differenzierung zwischen dem gefährlichen Pathogen *L. monocytogenes* und anderen *Listeria*-Spezies stark erschwert, was wiederum ein zeitintensiver und kostspieliger Faktor ist (Banada et al., 2008). Bislang konnte in der Anwendung kein Assay erfolgreich etabliert werden.

Schnelle Diagnostik erfordert daher die Kombination aus immunologischen und Zellkulturmethoden mit der Verwendung von spezifischen und sensitiven Oberflächenbindern, wie beispielsweise Antikörpern, Proteinen oder Peptiden. Da die Entwicklung und Produktion von Antikörpern aus Tiermodellen langwierig und kostenintensiv ist, bietet das Phagen-Display eine alternative Methode zur Identifizierung von spezifischen hochaffinen Liganden. Paoli und Brewster (2007) identifizierten mittels Phagen-Display ein *L. monocytogenes*-bindendes Antikörper-Fragment, das keine Kreuzreaktionen mit anderen *Listeria*-Spezies zeigte. *L. monocytogenes*-spezifische Peptide zur Differenzierung der pathogenen Spezies und anderen *Listeria* wurden von Morton et al. (2013) ebenfalls mit Hilfe des Phagen-Displays identifiziert. Des Weiteren wurden selektionierte Peptide publiziert, die an die Pathogenoberfläche binden und eine antimikrobielle Wirkung aufweisen (Flachbartova et al., 2016). Für die Selektion aller Liganden wurden jedoch ganze Zellen als Target verwendet, so dass die exakte Bindestelle der Peptide und der Antikörperfragmente nicht eindeutig benannt werden konnte (Morton et al., 2013; Paoli and Brewster, 2007).

Dennoch ist Phagen-Display eine sehr effektive Methode zur Identifizierung von Pathogenbindenden Peptiden, die sowohl eine schnelle Detektion der Mikroorganismen als auch eine therapeutische Anwendung bei multiplen Resistenzen ermöglichen können (Kenzel et al., 2017).

1.6 Komponenten des Hopfens in der Lebensmittelkonservierung

Die Nachfrage der Konsumenten nach frischen und nicht chemisch behandelten Lebensmittelprodukten steigt immer weiter. Dabei soll vor allem der Einsatz von chemischen Konservierungsstoffen vermieden werden, wodurch die Verwendung natürlich vorkommender Verbindungen mit antimikrobieller Aktivität weiter an Bedeutung gewinnt.

So werden viele pflanzliche Öle, spezifische Proteine wie Lysozyme und Bakteriozine auf ihre antimikrobielle Wirkung untersucht, um Verwendung in der Lebensmittelkonservierung zu finden (Branen and Davidson, 2004; Lopez-Pedemonte et al., 2003; Otaibi and Al-Demerdash, 2009).

Humulus Lupulus (Hopfen) ist eine Pflanzengattung aus der Familie der Cannabaceae, die in den Blüten der weiblichen Hopfenpflanze Harze und essenzielle Öle produziert und die seit vielen Jahren beim Bierbrauen verwendet wird. Dabei verleihen Komponenten des Hopfens, die sogenannten Hopfenbittersäuren und Polyphenole, dem Bier nicht nur seinen charakteristischen bitteren und aromatischen Geschmack, sondern besitzen zusätzlich antioxidative und antimikrobielle Eigenschaften (Stevens, 1967; Walker and Blakebrough, 1952). Die wachstumshemmende Wirkung erstreckt sich auf viele Bakterien, aber auch auf einige Schimmelpilze und Protozoen (Mizobuchi and Sato, 1985; Srinivasan et al., 2004).

Der Einsatz von Hopfenkomponenten als Konservierungsmittel in *ready-to-eat*-Fleischprodukten und anderen Lebensmitteln gewinnt daher immer mehr an Interesse (Kramer et al., 2014; Shen et al., 2009). Bereits 1996 zeigte Larson et al., dass Hopfenextrakte das Wachstum von *L. monocytogenes* in Milch und bestimmten Käsearten hemmen.

1.6.1 Klassifizierung von antimikrobiellen Hopfeninhaltsstoffen

Die Hopfenblüte setzt sich aus mehreren Komponenten zusammen (Tabelle 1), wobei sich insbesondere die Harze durch ihre antimikrobiellen Eigenschaften auszeichnen. Ein weiterer wichtiger antimikrobiell wirkender Bestandteil des Hopfens sind die Prenylflavonoide, die zu den Polyphenolen gehören.

Tabelle 1: Chemische Zusammensetzung der *Humulus Lupulus*-Blüten (Stevens, 1967; Palamand et al., 1973; Briggs et al., 1982).

Hopfenkomponente	Anteil (%)
Harze	15 - 30
Essenzielle Öle	0,5 - 3
Proteine	15
Monosaccharide	2
Polyphenole	4
Pektine	2
Aminosäuren	0,1
Lipide und Wachse	5 - 25
Asche	8
Feuchtigkeitsgehalt	10
Zellulose etc	43

Laut der *European Brewery Convention and the American Society of Brewing Chemists* werden Harze, die aus den Lupulindrüsen des Hopfens gewonnen werden, in zwei Hauptgruppen aufgeteilt: Die in Hexan löslichen Weich- und die unlöslichen Hartharze. Hartharze sind in Hexan zwar unlöslich, aber löslich in Ether und kaltem Methanol. Die Hartharze werden in drei weitere Kategorien unterteilt, die α -, β - und die δ -Hartharze (Abbildung 9A) (Palamand et al., 1973). Die Weichharze untergliedern sich in α -Säuren und β -Säuren (Abbildung 9A) (Briggs et al., 1982; Krauss et al., 1969).

Zu den α -Säuren gehören Humulone und ihre Verwandten Cohumulone und Adhumulone. Vertreter von β -Säuren sind Lupulone und ihre Verwandten Colupulone und Adlupulone (Krauss et al., 1969). Alle Hopfensäuren besitzen eine alicyclische Struktur (2,4-Cyclohexadien-1-on), werden jedoch nach ihren Acylgruppen in α -Säuren und β -Säuren unterteilt (Abbildung 9B) (Stevens, 1967).

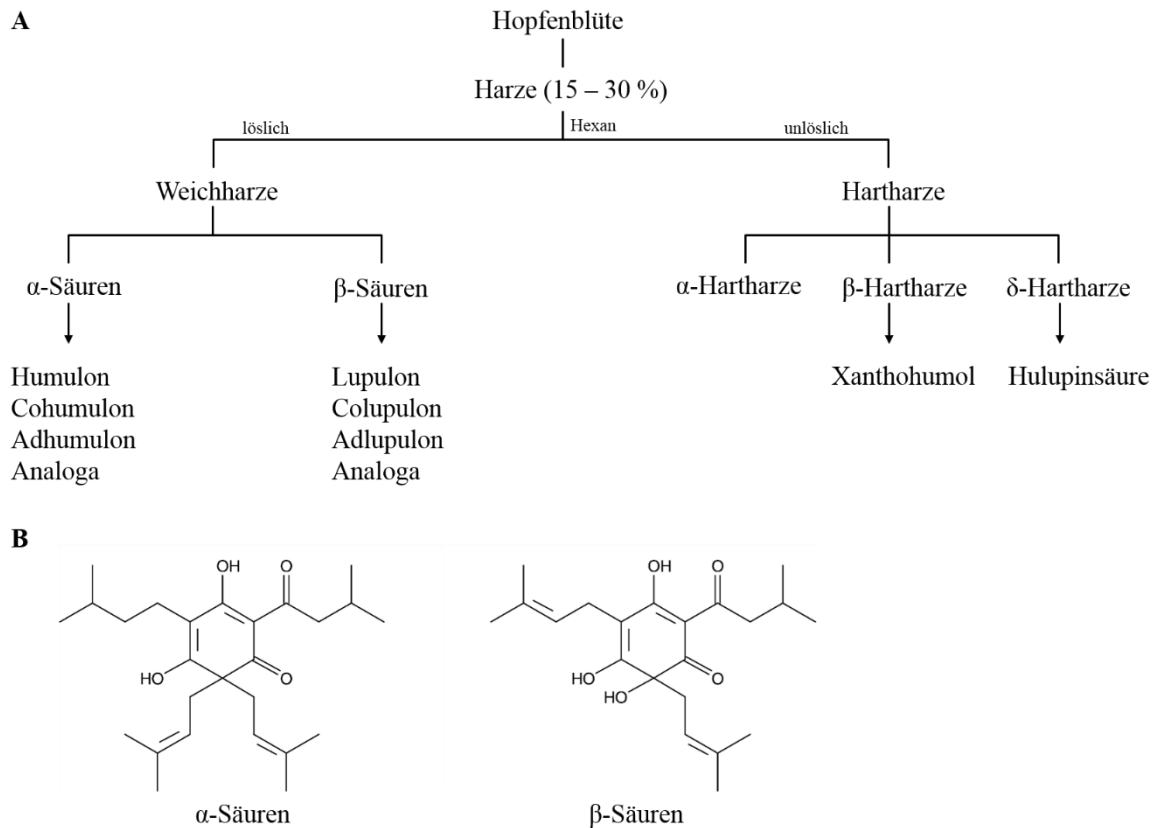


Abbildung 9: Vereinfachte Klassifizierung und Nomenklatur der Hopfeninhaltsstoffe (A) mit den Strukturformeln von α - und β -Säuren (B). Modifiziert nach Sakamoto and Konings, 2003.

α -Säuren konvertieren während des Brauprozesses durch Umlagerung und Isomerisierung in iso- α -Säuren, die sich im Vergleich zu der ursprünglichen Substanz durch eine deutlich höhere Löslichkeit und einen bitteren Geschmack auszeichnen. Daher werden beim Bierbrauen hauptsächlich diese Substanzen eingesetzt. β -Säuren als solche werden im Brauprozess nicht verwendet, da sie schlechter löslich sind und keinen vergleichbaren Isomerisierungsprozess durchlaufen (Krauss et al., 1996).

Die Oxidation von β -Säuren erzeugt die bitteren Hulupone, diese oxidieren weiter zu der nicht bitteren Hulupinsäure (Regan and Elvidge, 1969). Die Hulupinsäure gehört zur Familie der Hemiterpene und ist als Oxidationsprodukt der β -Säuren in Wasser löslich. Die Substanz wird dennoch als δ -Hartharz klassifiziert (Abbildung 9A) (Burton and Stevens, 1965).

1.6.2 Hopfenkomponenten – antimikrobielle Aktivität und einige Vertreter

Die antimikrobielle Wirkung von Hopfenkomponenten konnte insbesondere gegen grampositive Bakterien gezeigt werden, während gramnegative Bakterien durch ihre Doppelmembran nahezu resistent sind (Hough et al., 1957; Shimwell, 1937). Bereits 1973

postulierten Teuber and Schmalreck, dass die lipophile Region der Zellmembran die Angriffsstelle für Hopfenkomponenten darstellt. Heute ist bekannt, dass die Substanzen über ihre hydrophoben Bereiche mit der Bakterienzellwand interagieren und durch Schädigung der Membran ihre Permeabilität erhöhen. Im Genaueren agieren die Hopfenkomponenten als Ionophore, die den Transport von Ionen durch die Zellmembran katalysieren (Abbildung 10) (Van Cleemput et al., 2009). Es wird zwischen „echten Ionophoren“, die die Plasmamembran frei passieren können und den „Quasi-Ionophoren“, die stationäre Poren in der Membran bilden, unterschieden. Protonophore, zu denen die Hopfenkomponenten zählen, sind Ionophore, die Protonen transportieren (Pressmann, 1976; Simpson, 1993a).

Unter Einfluss von Protonophoren wird der intrazelluläre pH-Wert enorm verringert, da Protonen aus dem extrazellulären in den intrazellulären Raum transportiert werden. Im Austausch diffundieren Mn^{2+} -Ionen nach außen. Dies bewirkt eine Störung des Transmembran-Protonengradienten, der mit essenziellen Enzymreaktionen interferiert und den für den Organismus überlebensnotwendigen Nährstofftransport inhibiert (Abbildung 10) (Salmond et al., 1984).

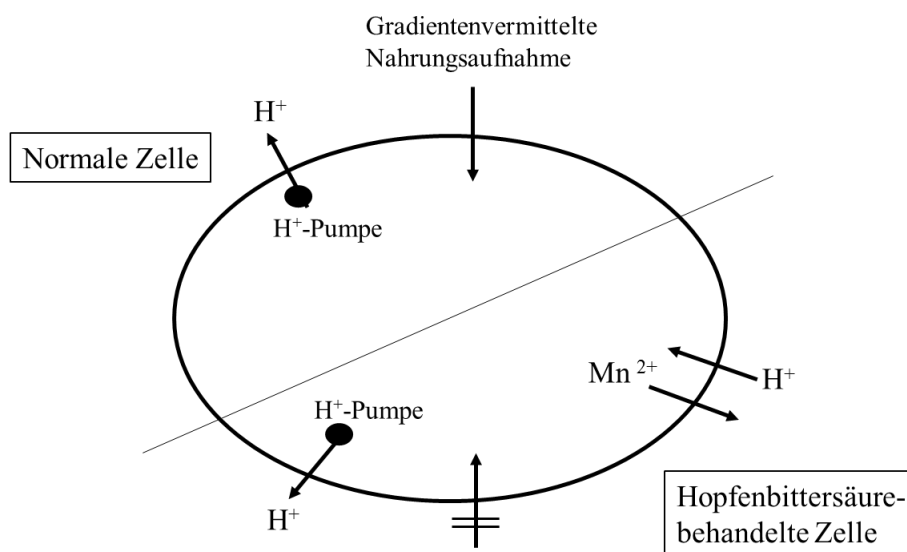


Abbildung 10: Schema des antimikrobiellen Wirkmechanismus von Hopfenbittersäuren. In einer unbehandelten Zelle ist die Zellmembran impermeabel für H^+ -Ionen. Die Nahrungsaufnahme der Zelle erfolgt durch einen H^+ -getriebenen Gradienten, bei dem die H^+ -Pumpe Ionen nach außen transportiert. Bei einer Hopfenbittersäure-behandelten Zelle, wirkt die Substanz als Protonophor und transportiert H^+ -Ionen in den intrazellulären Raum. Als Ausgleich diffundieren Mn^{2+} -Ionen nach außen. Das verhindert den Aufbau eines H^+ -Gradienten und damit die Nahrungsaufnahme. Modifiziert nach Simpson, 1993a.

Aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität und der damit verbundenen Wechselwirkung mit der bakteriellen Lipidmembran, zeigen bei den Hopfenkomponenten vor allem Prenylflavonoide und Hopfenbittersäuren eine starke antimikrobielle Aktivität (Schmalreck and Teuber, 1975). Innerhalb der Hopfenbittersäuren weisen β -Säuren eine höhere antimikrobielle Wirkung als α -Säuren auf (Hough et al., 1957; Shimwell, 1937). Der pKa-Wert der α -Säuren liegt zwischen 4,0 und 5,5, während es sich bei β -Säuren mit ihrem pKa-Wert zwischen 5,5 und 7,8 um schwache Säuren handelt (Simpson, 1993d). Schwachen Säuren wird durch die höhere Menge an undissoziierten Säuremolekülen der Eintritt durch die Bakterienmembran erleichtert, wodurch die Aktivität der β -Säuren gesteigert wird (Simpson, 1993c). Zudem ist bei einem niedrigeren pH-Wert des Mediums die antimikrobielle Wirkung der Substanzen höher, da auch hier die undissoziierte Form der Hopfenbittersäuren das Passieren der bakteriellen Membran vereinfacht (Simpson, 1993a).

Der wichtigste Vertreter der Hopfen- β -Säuren ist das Lupulon (Abbildung 11A). Die antimikrobielle Wirkung der Lupulone auf *L. monocytogenes* in Medium wurde bereits 1995 von Barney et al. patentiert. Larson et al. untersuchten 1996 den Einsatz in Lebensmitteln. Studien zur anti-listerialen Aktivität in Lebensmitteln in Kombination mit anderen antimikrobiellen Substanzen und unter unterschiedlichen Temperaturen sowie die Wirkung auf Stress-adaptierte *L. monocytogenes* sind Bestandteil vieler weiterer Publikationen (Shen and Sofos, 2008; Wang and Shen, 2015). Mittlerweile wurde Lupulon von der U.S. Food and Drug Administration für den antimikrobiellen Einsatz bei gekochtem Fleisch und bei Futtermitteln als allgemein sicher anerkannt.

Neben den Hopfenbittersäuren besitzen auch Prenylflavonoide, die zu den Polyphenolen gehören, antimikrobielle Aktivität gegen grampositive Bakterien (Bhattacharya et al., 2003; Mizobuchi and Sato, 1985). Ein gut charakterisierter Vertreter ist das Xanthohumol (Abbildung 11B), das erstmals 1913 von Power et al. isoliert wurde. Neben antimikrobiellen zeigt Xanthohumol auch fungizide, antioxidative und antivirale Wirkungsweisen (Buckwold et al., 2004; Mizobuchi and Sato, 1985).

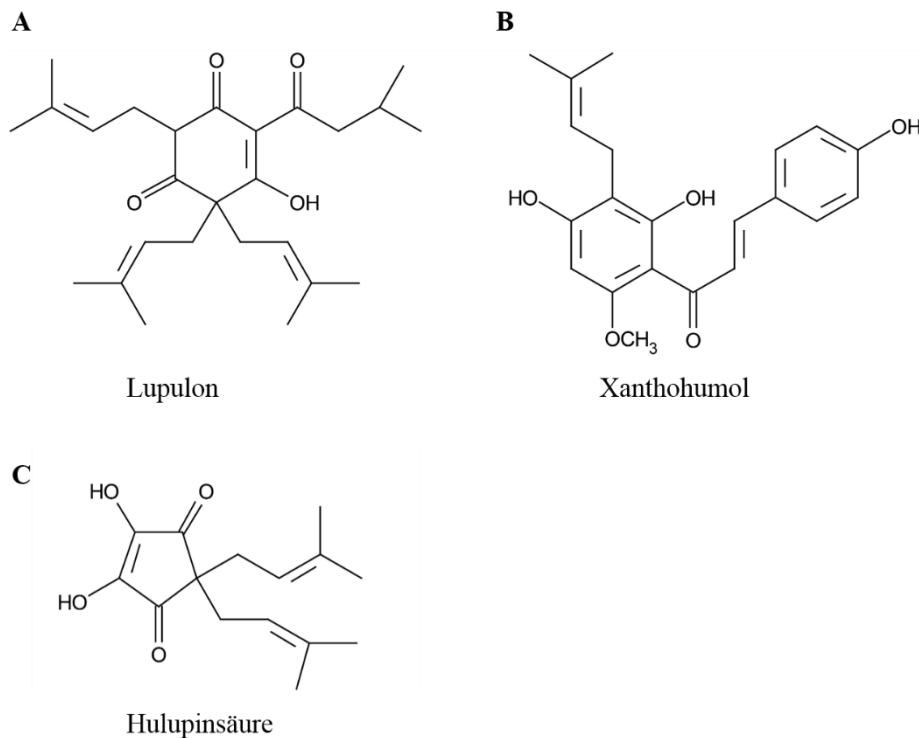


Abbildung 11: Strukturformeln von Lupulon (A), Xanthohumol (B) und Hulpinsäure (C).

Auch in der Gesundheitsforschung gewinnt die Verwendung von natürlichen Substanzen immer mehr an Bedeutung. Für Xanthohumol wurden viele entzündungshemmende und krebschemopräventive Funktionen postuliert (Cho et al., 2018; Colgate et al., 2015; Gerhäuser et al., 2002; Yao et al., 2015). Tabata et al. zeigten 1997, dass Xanthohumol die Diacylglycerol-O-Acyltransferase inhibiert und damit das Risiko für Diabetes, Atherosklerose und metabolische Funktionsstörungen von einigen Organen reduziert. Neuste Studien beschreiben eine antikarzinogene Aktivität von Xanthohumol gegen Brustkrebs, da die Substanz einen G₀/G₁-Zellzyklusarrest in Brustkrebszelllinien induziert (Sun et al., 2018).

Die antimikrobiellen Eigenschaften von Xanthohumol, Lupulonen und Humulonen zeigen jedoch vor allem eine große Wirkung bei bakteriellen Erkrankungen. Daher werden ihre antimikrobielle Aktivität und die Wirkmechanismen weiterhin auf unterschiedliche Mikroorganismen, wie beispielsweise *C. difficile*, den anaeroben Erreger der nosokomialen Diarrhö, untersucht (Cermak et al., 2017). Wei et al. (2014) zeigten, dass der Einsatz von Lupulon bei *Mycobacterium tuberculosis* die Expression von mehreren Genen steigern oder mindern kann. So sind beispielsweise Gene die für das 50S ribosomale Protein codieren, betroffen, wodurch die Translation inhibiert wird.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die durch *L. monocytogenes*-Infektionen bedingte relativ hohe Mortalitätsrate und die steigende Anzahl an Antibiotika-Resistenzen erfordern neue Grundsätze und Strategien in der Lebensmittelforschung. Die Technik des Phagen-Displays findet dabei häufig Anwendung bei der Selektion spezifischer Peptide, die schnelle Detektionsmethoden von Mikroorganismen sowie antimikrobiell-wirkende Substanzen als neue therapeutische Ansätze etablieren sollen. Bislang wurden hierbei jedoch Peptide gegen ganze *L. monocytogenes*-Zellen selektioniert, deren genaue Targets bisher nicht bekannt sind.

Daher sollten in dieser Arbeit erstmals mit einem Protein-basierten Phagen-Display spezifische Peptide gegen Oberflächenproteine Internalin A (InlA) und Internalin B (InlB) aus *L. monocytogenes* selektioniert werden. Diese Peptide sollen erste Ansätze für künftige diagnostische und präventive Methoden schaffen.

Die Reinigung der beiden rekombinanten Proteine InlA und InlB sowie die einzelnen experimentellen Schritte des Phagen-Displays mussten zunächst etabliert werden. Die anschließend identifizierten InlA- und InlB-affinen Peptidsequenzen sollten analysiert und mit bereits bekannten Peptiden verglichen werden. Die positiven Peptide sollten chemisch synthetisiert und ihre Bindung an *L. monocytogenes* nachgewiesen werden. Des Weiteren sollten mit den Peptiden unterschiedliche innovative Ansätze verfolgt werden:

InlA-bindende Peptide sollten durch ihre Bindung die Interaktion zwischen InlA und dem humanen Rezeptor E-Cadherin inhibieren. Die Interaktion der beiden Proteine ist für die Invasion von *L. monocytogenes* in humane Epithelzellen essenziell, so dass die Inhibition der InlA-Ecad-Interaktion in einer verminderten Initialisierung des Bakteriums in die Wirtszelle resultieren könnte. Dies könnte den Infektionszyklus des Pathogens hemmen und neue weiterführende therapeutische und präventive Ansätze bieten. Zunächst sollte jedoch der Inhibitionsnachweis mit rekombinanten Proteinen InlA und Ecad gezeigt werden.

Für alle Untersuchungen der Protein-Protein-Interaktionen mussten im Vorfeld die jeweiligen experimentellen Bedingungen optimiert und etabliert werden.

InlB-bindende Peptide sollten im Interesse der Firma RAPS GmbH & Co. KG, einem großen Lebensmittel-Hersteller, mit einer antimikrobiell-wirkenden Hopfenkomponente synthetisch verknüpft werden. Hopfeninhaltsstoffe finden zwar bereits ihren Einsatz im Lebensmittelbereich, jedoch können konzentrationsabhängig unerwünschte Geschmackseffekte auftreten. Durch die hohe Affinität des Peptids zur Listerien-Oberfläche sollte das verknüpfte Konstrukt und damit die Hopfenkomponente gezielt an die

Bakterienmembran lokalisiert werden. Damit sollte die Wirkung der anti-listerialen Substanz verstärkt und die notwendige Dosierung reduziert werden. Hierfür sollte im ersten Schritt zunächst die minimale Hemmkonzentration (MHK) unterschiedlicher Hopfenkomponenten (Hulupinsäure, Xanthohumol, Lupulon) sowie die idealen experimentellen Bedingungen ermittelt werden, um eine bestmöglich geeignete Hopfenkomponente für die Verknüpfung auszuwählen. Schließlich sollte die minimale Hemmkonzentration der Peptid-verknüpften Substanz ermittelt und mit der MHK der einzeln verwendeten Hopfenkomponente verglichen werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), GE Healthcare (Freiburg), Merck Chemicals GmbH (Darmstadt), New England BioLabs GmbH (NEB; Frankfurt a. M.), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen), Thermo Fisher Scientific/Life Technologies GmbH (Darmstadt) und VWR International GmbH (Ismaning) bezogen.

2.1.1 Verwendete Antikörper

Primäre Antikörper	Verwendung	Hersteller	Bestellnr.	Verwendete Konzentration
anti-E-Cad, rb	ELISA	Abcam, Cambridge	ab155833	1 µg/ml
anti-FITC:HRP, sheep	Ph.D., ELISA	AbD Serotec, Puchheim	640005	k.A., 1:5000
anti-GFP, rb	WB, ELISA	Carl Roth	3998.1	1 µg/ml
anti-Listeria, m	ELISA	Abcam, Cambridge	ab11439	1 µg/ml
anti-M13:HRP	Ph.D.	GE Healthcare	27-9421- 01	k.A., 1:5000
Streptavidin:HRP	ELISA	Thermo Fisher	21130	0,1 µg/ml

Sekundäre Antikörper	Verwendung	Hersteller	Bestellnr.	Verwendete Konzentration
anti-m:AP	WB	Bethyl Lab., Inc., Montgomery	A90- 616AP	0,2 µg/ml
anti-rb:AP	WB	Carl Roth	4751.1	1 µg/ml
anti-m:HRP	ELISA	Carl Roth	4750.1	1 µg/ml
anti-rb:HRP	WB, ELISA	Carl Roth	4759.1	1 µg/ml

2.1.2 Verwendete Plasmide und Primer

Plasmid	<i>insert</i>	<i>tag</i>	Vektor	Hersteller
pGEX-InlA	InlA36-496	GST	pGEX-6P1	erhalten von Dr. J. van den Heuvel, HZI, Braunschweig
pETM-InlB	InlB36-321	GST	pETM30	erhalten von Prof. Dr. H. Niemann, Uni Bielefeld
pGEX-hEcad	hEcad1-259	GST	pGEX-6P	erhalten von Dr. J. van den Heuvel, HZI, Braunschweig

Primer	Sequenz	Hersteller
-96 gIII <i>sequencing primer</i>	5'-GTATGGGATTTTGCTAAACAAC-3'	Sigma-Aldrich

2.1.3 Verwendete Enzyme und Proteine

AcTev Protease	10000 U/ml, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Benzonase® Nuclease	250 U/μl, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
c-Met (1-932), h	His-tag, 0,2 mg/mL, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ecad (1-621), h	His-tag, 1 mg/ml, Abcam, Cambridge
GST	3,9 mg/mL, Life Technologies GmbH, Darmstadt
IGF-IIR (1510-2108), h	100 μg/ml, R & D Systems, bio_techne GmbH, Wiesbaden
PreScission Protease	2000 U/ml, GE Healthcare, Freiburg

2.1.4 Im Phagen-Display verwendete Phagenbibliothek

Ph.D.-12	New England BioLabs, Frankfurt a.M.
----------	-------------------------------------

2.1.5 Verwendete Peptide

Folgende synthetische Peptide wurden in dieser Dissertation verwendet. Die Synthese der 12-mer Peptide erfolgte durch die Firma JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin) in einem Reinheitsgrad von mindestens 95 %. Die Peptide wurden in 1x TBS gelöst (1 mg/ml) und bei -20 °C gelagert.

Bezeichnung	Aminosäure-Sequenz	Konjugat, C-terminal
JB1	H-GLHTSATNLYLH-Lys(FAM)-NH ₂	5(6)-Carboxyfluorescein
JBBt1	H-YSLRLTSVTAPT-Ttds-Lys(Biotin)-NH ₂	Biotin
JB2	H-DSQFNKYSIATV-Lys(FAM)-NH ₂	5(6)-Carboxyfluorescein
JB3	H-SGVYKVAYDWQH-Lys(FAM)-NH ₂	5(6)-Carboxyfluorescein
JBBt3	H-SGVYKVAYDWQH-Ttds-Lys(Biotin)-NH ₂	Biotin
JB4	H-QFDYMRPANDTH-Lys(FAM)-NH ₂	5(6)-Carboxyfluorescein
JBBt4	H-QFDYMRPANDTH-Ttds-Lys(Biotin)-NH ₂	Biotin
JB5	H-SNSIDKVNRPIN-Lys(FAM)-NH ₂	5(6)-Carboxyfluorescein
JBBt5	H-SNSIDKVNRPIN-Ttds-Lys(Biotin)-NH ₂	Biotin
JB6	H-YSLRLTSVTAPT-Lys(FAM)-NH ₂	5(6)-Carboxyfluorescein
JBBt6	H-YSLRLTSVTAPT-Ttds-Lys(Biotin)-NH ₂	Biotin
JB7	H-SHHYRGHDPNLF-Lys(FAM)-NH ₂	5(6)-Carboxyfluorescein
JBBt7	H-SHHYRGHDPNLF-Ttds-Lys(Biotin)-NH ₂	Biotin
JB8	H-LTPHKHHKHLHA-Lys(FAM)-NH ₂	5(6)-Carboxyfluorescein
JBBt8	H-LTPHKHHKHLHA-Ttds-Lys(Biotin)-NH ₂	Biotin
FBt1	H-DQFVHDVKGTKH-Ttds-Lys(Biotin)-NH ₂	Biotin

2.1.6 Verwendete Bakterienstämme

<i>Escherichia coli</i>	Genotyp	Verwendung	Hersteller
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA- argF)U169, hsdR17(rK- mK+), λ ⁻	Vervielfältigung der Plasmid-DNA	Life Technologies, Darmstadt
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])	Genexpression	Life Technologies, Darmstadt
<i>E. coli</i> ER2738	F' proA ⁺ B ⁺ lacIq Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10(TetR)/fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5	Phagen-Display	New England BioLabs, <i>Ph.D.</i> <i>Phage Display</i> <i>Libraries Kit</i> , Frankfurt a. M.

<i>Listeria monocytogenes</i>	Serotyp	Stammnummer	Hersteller
<i>L. monocytogenes</i>	4b	ATCC 13932	BfR, Berlin
<i>L. monocytogenes</i>	1/2a	ATCC 19111	BfR, Berlin

2.1.7 Verwendete Hopfeninhaltsstoffe und Peptid-Konjugate

Die Hopfenkomponenten Lupulon, Xanthohumol und Hulupinsäure wurden in DMSO gelöst. Lupulon wurde bei -20 °C, Xanthohumol und Hulupinsäure bei 4 °C gelagert.

Die Synthese der Peptid-Xanthohumol-Konjugate erfolgte durch die Firma JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin) in einem Reinheitsgrad von mindestens 95 %. Diese wurden in 1x TBS gelöst (1 mg/ml) und bei -20 °C gelagert.

Substanz	Strukturformel	Hersteller
Hulupinsäure	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Xanthohumol	C ₂₁ H ₂₂ O ₅	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Lupulon (Gemisch aus Lupulon und Colupulon)	C ₂₆ H ₃₈ O ₄ / C ₂₅ H ₃₆ O ₄	erhalten von Prof. Dr. M. Pieschetsrieder, FAU, Erlangen
Xanthohumol-JB1 Linker: Ttds-Cys		JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin
Xanthohumol-JB8 Linker: Ttds-Cys		JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin

2.1.8 Medien und Lösungen

Ampicillin	100 mg/ml in H ₂ O; verwendete Konzentration: 100 µg/ml
BHI-Medium	0,75 % (w/v) Schweinehirn-Infus 1 % (w/v) Schweineherz-Infus 1 % (w/v) Pepton 2 % (w/v) Glucose 0,5 % (w/v) NaCl 2,5 % (w/v) Na ₂ HPO ₄ in ddH ₂ O gelöst und durch Autoklavieren sterilisiert
BHI-Medium (pH 6,0)	BHI-Medium mit Essigsäure auf pH 6,0 eingestellt
BHI-Agar	1,5 % (w/v) Agar-Agar in BHI-Medium

2 Materialien und Methoden

Blockingpuffer (ELISA)	1x TBS 1 % (w/v) BSA
Blockingpuffer (Phagen-Display)	100 mM NaHCO ₃ , pH 8,6 5 mg/ml (w/v) BSA
Blockingpuffer (WB)	1x PBS 0,05 % (v/v) Tween-20 5 % (w/v) Milchpulver
CaCl ₂ -Lösung	100 mM, pH 9,0
Carbonatpuffer, 50 mM	15 mM Na ₂ CO ₃ 35 mM NaHCO ₃ pH 9,8
Coomassie-Lösung	0,25 % Coomassie Blau R250 50 % Methanol 10 % Eisessig
Dialysepuffer	10 mM HEPES in MilliQ-Wasser, pH 7,5
Elutionspuffer	20 mM Tris/HCl 1 mM DTT 10 mM reduziertess Glutathion pH 8,2
Entfärbelösung	9 % Eisessig 9 % Methanol 9 % Glycerin
Fixierlösung	2,5 % (v/v) Glutaraldehyd in 1x PBS
IPTG-Stammlösung	500 mM in H ₂ O sterilfiltriert
IPTG/Xgal	5 g/l IPTG 4 g/l Xgal in Dimethylformamid
IPTG/Xgal/LB-Platten	1 ml IPTG/Xgal-Stock pro 1 l LB-Agar
Kanamycin	100 mg/ml in H ₂ O; verwendete Konzentration: 100 µg/ml
LB-Agar	1,5 % (w/v) Agar-Agar in LB-Medium
LB-Medium	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl

2 Materialien und Methoden

	in ddH ₂ O gelöst und durch Autoklavieren sterilisiert
Lysepuffer	500 U Benzonase 5 mM PefaBloc in 7 ml 1x PBS
1x PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,4 mM KH ₂ PO ₄ 10 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O pH 7,5
PBST	1x PBS 0,01 % (v/v) Tween-20
PefaBloc-Stammlösung	200 mM in sterilem H ₂ O
Puffer A	10 mM HEPES in MilliQ-Wasser, pH 7,5
Puffer B	10 mM HEPES in MilliQ-Wasser, pH 7,5 1 M NaCl
10x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS pH 8,3
4x SDS-Probenpuffer	40 % (v/v) Glycerin 250 mM Tris-HCl, pH 6,8 8 % (w/v) SDS 0,015 % (w/v) Bromphenolblau 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Spaltpuffer (PreScission)	50 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM DTT pH 7,5
Spaltpuffer (TEV)	50 mM Tris/HCl, pH 8,0 0,5 mM EDTA 1 mM DTT
1x TBS (ELISA)	20 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl

2 Materialien und Methoden

1x TBS (Ph.D.)	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
Tetracyclin	20 mg/ml in 1:1 EtOH:H ₂ O; verwendete Konzentration: 20 µg/ml
TMB-Substrat	TMB Peroxidase EIA Substrate Kit, Bio-Rad, München 90 % 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidinlösung in Dimethylformamid 10 % Wasserstoffperoxidlösung
1x Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin pH 8,3
Top-Agar	7 g/l Agar-Agar in LB-Medium
Waschpuffer (WB)	1x PBS 0,05 % (v/v) Tween-20

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung der Bakterien

E. coli-Bakterien wurden in LB-Medium, *L. monocytogenes* in BHI-Medium bei 37 °C und 120 rpm kultiviert. Agar-Platten wurden bei 30 °C (*L. monocytogenes*) bzw. 37 °C (*E. coli*) inkubiert. Zur Selektion transformierter Bakterien wurden 100 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin zum Medium gegeben.

Zur langfristigen Lagerung der Bakterienzellen wurden diese in 25 ml Medium über Nacht kultiviert, mit 15 % sterilem Glycerin (v/v) versetzt und in Cryo-Röhrchen aliquotiert. Die Zellsuspension wurde langsam auf -80 °C abgekühlt und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Bestimmung von CFU/ml (*colony forming units/ml*)

Eine *L. monocytogenes*-Übernacht-Kultur wurde verdünnt und bis $OD_{595} = 0,1$ bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe ($10^5 - 10^8$) erstellt. Jeweils 10 µl wurden auf BHI-Agar ausplattiert und die Platten bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Kolonien wurden am folgenden Tag ausgezählt. Die gesamte Bestimmung erfolgte in Triplikaten und der Mittelwert wurde unter Berücksichtigung des Volumens und der Verdünnungsstufe als die koloniebildende Einheit per Milliliter (CFU/ml) für folgende Versuche festgelegt. Der Mittelwert ergab die koloniebildende Einheit von $1,8 \times 10^9$ CFU/ml. Diese wurde für alle Experimente nach Einstellen der $OD_{595} = 0,1$ als Ausgangswert verwendet.

2.2.3 Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Eine *L. monocytogenes* Übernacht-Kultur wurde 1:100 in BHI (pH 6,0) verdünnt und bis $OD_{595} = 0,1$ inkubiert. Die Zellsuspension wurde, wie unter 2.2.2 ermittelt, auf 5×10^6 CFU/ml eingestellt. In jedes *well* einer sterilen Polystyrol-Mikrotiterplatte wurden 100 µl BHI-Medium vorgelegt. Hopfenbittersäuren (Xanthohumol, Hulupinsäure bzw. Lupulon) bzw. InlB-bindende Peptide wurden in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (in BHI verdünnt) zugegeben. Als Positivkontrolle diente das Antibiotikum Kanamycin (100 µg/ml). Anschließend wurden 20 µl Bakterien-Suspension (5×10^6 CFU/ml) zugegeben, um eine finale Konzentration von 5×10^5 CFU/ml zu erreichen. Als Negativkontrolle wurde 180 µl BHI-Medium mit 20 µl Bakterien-Suspension versetzt.

Die Platte wurde mit atmungsaktiver Folie verschlossen und die OD_{595} für 18 h alle 20 Minuten bei 30 °C im FLUOstar Optima Microplate Reader (BMG Labtech, Ortenberg) gemessen. Die

Eigenabsorption der Substanzen bei A_{595} wurde durch Ansätze ohne die Bakterien-Suspension (20 μ l BHI) für jede Substanz-Konzentration ermittelt, als Blindwert festgelegt und von den entsprechenden Rohdaten abgezogen. Die Auswertung erfolgte mit der MARS-Software (BMG Labtech, Ortenberg).

Die niedrigste Konzentration von Hopfenbittersäuren bzw. Peptiden, bei denen kein bakterielles Wachstum durch OD_{595} -Messungen festgestellt werden konnte, wurde als die Minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt. Jeder Ansatz wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.2.4 Calciumchlorid-Methode zur Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* DH5 α - bzw. *E. coli* BL21-Zellen wurde jeweils eine Bakterienkolonie mit 50 mL LB-Medium in einen Erlenmeyerkolben überführt und bei 37 °C und 140 rpm im Schüttelinkubator über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 5 mL LB-Medium mit 50 μ l der Übernachtskultur inokuliert und erneut bei 37 °C und 140 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien in vorgekühlte Falcons überführt und 10 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellen 7 min bei 4 °C und 1600 x g zentrifugiert wurden. Die pelletierten Zellen wurden in 2,5 ml gekühlter 100 mM Calciumchlorid-Lösung (pH 9) resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (5 min, 1300 x g, 4°C). Das Zellpellet wurde in 360 μ l 100 mM Calciumchlorid-Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden à 60 μ l aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

2.2.5 Hitzetransformation von *E. coli*

50 μ l der chemisch kompetenten *E. coli* DH5 α bzw. *E. coli* BL21 (DE3) wurden mit 0,5 μ g DNA versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 40 s bei 42 °C und eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf antibiotikaenthaltende LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Extraktion der Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5 α

Für die Plasmid-Präparation wurden 5 ml LB-Medium mit Ampicillin bzw. Kanamycin (100 $\mu\text{g/ml}$) mit einer Einzelkolonie der transformierten *E. coli* DH5 α inokuliert und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien pelletiert (10000 x g, 1 min) und die DNA mit Hilfe des „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ (peqlab Biotechnologies GmbH, Erlangen) nach Herstellerprotokoll isoliert. Eluiert wurde hierbei mit 50 μl sterilem Wasser.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA in Lösung erfolgte durch eine spektrophotometrische Messung mit dem ScanDrop (Analytik Jena, Jena) bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.3.2 Genexpression

E. coli BL21 (DE3) wurden analog 2.2.5 mit dem jeweiligen Plasmid hitzetransformiert und 100 ml LB-Amp- bzw. LB-Kan-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert. Inkubiert wurde über Nacht bei 37 °C und 120 rpm. Anschließend wurden 500 ml Medium mit 5 ml über-Nacht-Kultur versetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 – 0,8 bei 37 °C und 140 rpm kultiviert. Die Genexpression erfolgte durch Induktion mit 0,2 mM IPTG (InlA-, Ecad-Expression) bzw. 0,1 mM IPTG (InlB-Expression) und Inkubation bei 20 °C (InlA-, Ecad-Expression) bzw. 22 °C (InlB-Expression) über Nacht.

Vor und nach erfolgter Induktion wurde jeweils 1 ml Kultur entnommen und 1 min bei 10000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 μl 4x SDS-Probenpuffer pro gemessener OD₆₀₀-Einheit resuspendiert, 5 min bei 95 °C denaturiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

Am folgenden Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation (20 min, 4 °C, 5000 x g) geerntet.

2.3.3 Zellaufschluss

Das Zellpellet wurde in 7 ml Lysepuffer resuspendiert und zu 3 ml Lysis-Matrix (MPTM Lysing Matrix, MP Biomedicals, Eschwege) gegeben. Die Lyse erfolgte bei 6 m/s für 30 s im *FastPrep24 Tissue and Cell Homogenizer* (MP Biomedicals, Eschwege). Im Anschluss wurde die Lysis-Matrix abzentrifugiert und das Zelllysate bei 4 °C, 5000 x g für 40 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 8 M Harnstoff aufgelöst und der Überstand mit den löslichen Bestandteilen für die Affinitätschromatographie verwendet.

Für die SDS-PAGE wurden jeweils 20 μl vom Zelllysateüberstand und resuspendierten pelletierten Zelllysate entnommen.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Affinitätschromatographie

Der Überstand des Zellaufschlusses wurden mit 1 ml 50%-Glutathionsepharose 4B (Herstellung des 50%-*slurrys* nach Anleitung des Herstellers, GE Healthcare, Freiburg) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert. Das Gemisch wurde auf eine Glassäule mit Fritte gegeben und der Durchlauf aufgefangen. Anschließend wurde die Sepharose drei Mal mit 5 ml kaltem 1x PBS gewaschen und schließlich das Protein eluiert.

Von allen Waschschrritten wurden 20 µl entnommen, mit 60 µl H₂O verdünnt und für SDS-PAGE vorbereitet.

Elution des Proteins mittels Protease

Die Sepharose wurde mit 5 ml Spaltpuffer äquilibriert und mit Protease versetzt. Dabei wurde für die Spaltung des GST-InlA-Fusionsproteins 80 µl (160 U) PreScission-Protease in 1 ml Spaltpuffer verwendet und 4 h bei 4 °C inkubiert. Die Spaltung des GST-InlB-Proteins erfolgte mit 20 µl (200 U) AcTev-Protease in 1,5 ml Spaltpuffer über Nacht bei 4 °C.

Das Eluat wurde anschließend durch fünfmaliges Waschen mit jeweils 1,5 ml Spaltpuffer aufgefangen, dabei wurden jeweils 20 µl für SDS-PAGE entnommen.

Elution des GST-Fusionsproteins mit reduziertem Glutathion

Die Sepharose wurde mit 1 ml Elutionspuffer versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Eluat wurde anschließend aufgefangen und der Elutionsschritt weitere drei Mal wiederholt. Nach jedem Schritt wurden 20 µl für SDS-PAGE entnommen.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration der einzelnen Eluate wurde am ScanDrop (Analytik Jena, Jena) bei 280 nm gemessen und die Proteinkonzentration und -menge nach dem Lambert Beer'schen Gesetz errechnet. Relevante Fraktionen wurden für den nächsten Reinigungsschritt vereint.

2.4.3 Dialyse

Der Dialyseschlauch (MWCO 3,5 kDa; Carl Roth, Karlsruhe) wurde in destilliertem Wasser für 15 min äquilibriert und mit vereinten Proteineluaten befüllt. Dialysiert wurde in 2 l Dialysepuffer bei 4 °C über Nacht.

2.4.4 Anionenaustauschchromatographie

MonoQ-Sepharose Fast Flow (Anionsepharose, GE Healthcare, Freiburg) wurde nach Angabe des Herstellers vorbereitet und 2 ml in eine Säule mit Fritte gegeben. Die Sepharose wurde mit Puffer A äquilibriert und die dialysierte Proteinprobe hinzugegeben. Mit Hilfe eines Gradientenmischers wurde mit 20 ml Puffer A und 20 ml Puffer B ein NaCl-Gradient (0 – 100 % Puffer B) erzeugt und dabei 2 ml-Fractionen aufgefangen. Die Fractionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und relevante Fractionen vereint.

2.4.5 Ultrafiltration

Eine Amicon Ultra-15 10F Filtereinheit (Merck KGaA, Darmstadt) wurde mit Puffer A bei 4000 x g, 8 °C 10 min äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinlösung durch Zentrifugation auf 500 µl Endvolumen eingengt und die Proteinkonzentration und Proteinmenge durch Absorptionsmessung bestimmt.

2.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proben wurden mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt, bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese zur Auftrennung der Proteine nach Größe erfolgte bei 170 V und 400 mA für 45 min in 1x SDS-Laufpuffer. Als Größenstandard wurde „Precision Plus Protein™ Standard Dual Color“ (Bio-Rad, München) verwendet.

Trenngel (12 %):

- 4 ml Acrylamid (30 %)
- 2,5 ml 1,5 M Tris/HCl-Puffer pH 8,8 (Bio-Rad)
- 3,4 ml H₂O
- 0,1 ml 10 %ige SDS-Lösung
- 50 µl 10%ige APS-Lösung
- 5 µl TEMED

Sammelgel (5 %):

- 0,85 ml Acrylamid (30 %)
- 1,25 ml 0,5 M Tris/HCl-Puffer pH 6,8 (Bio-Rad)
- 2,85 ml H₂O
- 50 µl 10%ige SDS-Lösung

25 µl 10%ige APS-Lösung

5 µl TEMED

2.4.7 Coomassie-Färbung

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Proteingel in Coomassie-Lösung für 30 min gefärbt. Unspezifische Färbungen wurden mit Entfärbelösung über Nacht entfernt. Alle dargestellten SDS-Gele wurden mit Hilfe des Detektionssystems „GelDoc™ XR+ Imaging System“ (Bio-Rad, München) aufgenommen.

2.4.8 Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie

5 µg des gereinigten Proteins wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und Coomassie gefärbt. Die Proteinbande wurde anschließend ausgeschnitten und an Proteome Factory AG, Berlin zur Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie geschickt.

2.4.9 Western Blot

Nach Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran (0,2 µm), die vorher kurz in Transferpuffer aktiviert wurde, transferiert. Der Transfer erfolgte in einer Blotapparatur bei 400 mA für 1 h. Anschließend wurde die Membran bei RT in Blockingpuffer und mit dem jeweiligen primären Antikörper (in Blockingpuffer verdünnt) für jeweils 1 h inkubiert. Nachdem die Membran drei Mal für jeweils 5 min mit Waschpuffer gewaschen wurde, wurde diese mit in Blockpuffer verdünntem sekundärem Antikörper (Alkalische-Phosphatase-gekoppelt) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und erneut drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Die Visualisierung erfolgte durch Zugabe des AP-Substrats „AP Conjugate Substrate Kit“ (Bio-Rad) und der Verwendung des Detektionssystems „GelDoc™ XR+ Imaging System“ (Bio-Rad, München).

2.4.10 Interaktionsnachweis zwischen zwei Proteinen mittels ELISA

Für jeden Protein/Protein-Interaktionsnachweis mussten die einzelnen Pufferbedingungen optimiert werden und sind für die jeweiligen Proteine der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Protein1/Protein2	Puffer	Zusammensetzung
Ecad/GST-InlA	Blockingpuffer	1 % (w/v) BSA in 1x TBS
	Verdünnungspuffer GST-InlA	0,1 % (w/v) BSA in 1x TBS
	Waschpuffer	1x TBS, 0,1 % (v/v) Tween-20
	Verdünnungspuffer Antikörper	1 % (w/v) BSA in 1x TBS
Met/GST-InlB	Blockingpuffer	1 % (w/v) BSA in 1x TBS
	Verdünnungspuffer GST-InlB	0,1 % (w/v) BSA in 1x TBS
	Waschpuffer	1x TBS, 0,1 % (v/v) Tween-20
	Verdünnungspuffer Antikörper	1 % (w/v) BSA in 1x TBS
IGF2R/GST-Inl	Blockingpuffer	2 % (w/v) Milchpulver in 1x TBS
	Verdünnungspuffer GST-Inl	1x TBS, 0,1 % (v/v) Tween-20
	Waschpuffer	1x TBS, 0,1 % (v/v) Tween-20
	Verdünnungspuffer Antikörper	1x TBS, 0,1 % (v/v) Tween-20

100 µl des Zielproteins (Protein 1) wurde in 100 mM NaHCO₃, pH 8,6 verdünnt über Nacht bei 4 °C und 300 rpm immobilisiert (Ecad: 10 µg/ml; Met: 1 µg/ml; IGF2R: 1 µg/ml). Blockiert wurde mit 200 µl Blockingpuffer 1 h bei 4 °C und 300 rpm. Nach vier Waschsritten mit 100 µl 1x TBS wurden unterschiedliche Konzentrationen Protein 2 in Verdünnungspuffer zugegeben und für 1 h bei 21 °C inkubiert. Anschließend sowie nach allen weiteren Schritten wurde vier Mal mit jeweils 100 µl Waschpuffer gewaschen. 100 µl des jeweiligen primären und sekundären Antikörpers (in Verdünnungspuffer Antikörper) wurden 1 h bei 21 °C und 300 rpm inkubiert und anschließend durch Zugabe von 100 µl TMB-Substrat, 100 µl 20 %-ige H₂SO₄ und Absorptionsmessung bei 450 nm am Plattenleser *Multiscan Go* (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt) die Interaktion detektiert. Im ELISA wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.5 Phagen-Display zur Selektion spezifischer Peptide

2.5.1 Biopanning der ersten Selektionsrunde

Zur Immobilisierung wurden 150 µl des gereinigten Proteins InlA bzw. InlB in einer Endkonzentration von 100 µg/ml in 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,6) in ein *well* einer Polystyrol-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen) gegeben, diese mit gasdurchlässiger Folie verschlossen und über Nacht bei 4 °C und 300 rpm inkubiert. Am

nächsten Tag wurde die Lösung verworfen und das *well* mit 200 µl Blockingpuffer für 1 h bei 4 °C und 300 rpm blockiert.

Anschließend wurde sechs Mal mit 200 µl TBST (0,1 % Tween-20) gewaschen. 10 µl (entspricht 1×10^{11} Phagen) der Ph.D.-12TM *Phage Display Library* (NEB, Frankfurt a. M.) wurden zu 100 µl TBST (0,1 % Tween-20) gegeben und in das *well* überführt. Es folgten eine einstündige Inkubation bei RT und 300 rpm und anschließend sechs Waschschriffe mit 200 µl TBST (0,1 % Tween-20). Die gebundenen Phagen wurden durch 15-minütige Inkubation mit 100 µl 0,2 M Glycin-HCl (pH 2,2) + 1 mg/ml (w/v) BSA eluiert. Das Eluat wurde überführt und mit 15 µl 1 M Tris-HCl, pH 9,1 neutralisiert.

2.5.2 Bestimmung des *Output*-Titers

Zur Bestimmung des *Output*-Titers wurden 10 ml LB-Tet mit einer Einzelkolonie *E. coli* ER2738 inokuliert und bei 37 °C und 140 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Das Phageneluat wurde $10^1 - 10^4$ -fach mit LB-Medium verdünnt und jeweils 5 µl zu 100 µl kultivierter Zellen gegeben. Das Gemisch wurde kurz gevortext und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die infizierten Zellen zu 1,5 ml geschmolzenem Top-Agar (45 °C) gegeben und sofort auf bei 37 °C vorgewärmte LB/IPTG/Xgal-Platten ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, am darauffolgenden Tag die Plaques gezählt und der *Output*-Titer in *plaque forming units* (pfu) pro ml ermittelt.

2.5.3 Amplifizierung der Eluate

Zur Amplifizierung der selektionierten Phageneluate aus 2.5.1 wurden 20 ml LB-Tet-Medium mit einer Einzelkolonie *E. coli* ER2738 inokuliert und bei 37 °C und 140 rpm bis zu einer frühen log-Phase (OD₆₀₀ = 0,01 – 0,05) kultiviert. Im Anschluss wurde die Kultur mit dem restlichen Phageneluat infiziert und bei 37 °C für weitere 4,5 h inkubiert. Die Kultur wurde für 10 min bei 4 °C und 5000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde überführt und erneut zentrifugiert. Die oberen 80 % des Überstands wurden in ein frisches Gefäß überführt, mit 1/6 Volumen 20% PEG/2,5 M NaCl versetzt und über Nacht bei 4 °C präzipitiert.

Am nächsten Tag wurde das Phagen-Präzipitat bei 4 °C und 5000 x g für 40 min pelletiert und der Überstand vollständig verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml 1x TBS resuspendiert und für 5 min bei 4 °C und 12000 x g erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde überführt und mit 1/6 Volumen 20 % PEG/2,5 M NaCl für 60 min auf Eis präzipitiert. Anschließend wurde bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 200 µl TBS aufgenommen. Nach erneuter

Zentrifugation (1 min, 12000 x g, 4 °C) wurde der Überstand (amplifiziertes Phageneluat) überführt und bei -20 °C gelagert.

2.5.4 Bestimmung des *Input*-Titers

Der Titer des amplifizierten Phageneluate (*Input*-Titer) erfolgte analog 2.5.2. Das Phageneluat wurde hierbei jedoch $10^1 - 10^{11}$ verdünnt und die Verdünnungsstufen $10^8 - 10^{11}$ auf LB/IPTG/Xgal-Platten ausplattiert. Der *Input*-Titer wurde durch Auszählen der Plaques ermittelt.

2.5.5 Biopanning der Selektionsrunden 2 - 4

Zur weiteren Selektion wurde eine weitere Panningrunde analog 2.5.1 - 2.5.4 durchgeführt. Dabei wurde das amplifizierte Phageneluat der ersten Panningrunde anstatt der Phagenbibliothek verwendet. Unter Berücksichtigung des *Input*-Titers wurde das Volumen eingesetzt, welches 1×10^{11} Phagen entsprach. In den folgenden Waschschrritten wurde die Tween-20-Konzentration auf 0,5 % erhöht.

Anschließend folgten zwei weitere Selektionsrunden mit den angereicherten Eluaten der jeweils vorherigen Panningrunde.

2.5.6 Anreicherungs-ELISA

Mit Hilfe des Anreicherungs-ELISAs sollte die erfolgte Selektion der Phageneluate überprüft werden. Hierfür wurde das Zielprotein in 0,1 M NaHCO₃, pH 8,6 und einer Konzentration von 100 µg/ml (100 µl/well) in einer 96-well-Mikrotiterplatte (Polystyrol) immobilisiert (4 °C, über Nacht). Als Negativkontrolle dienten jeweils 100 µl NaHCO₃. Am nächsten Tag wurde die Lösung verworfen und mit 200 µl Blockingpuffer für 2 h bei 4 °C und 300 rpm blockiert. In einer weiteren Mikrotiterplatte wurden je zwei wells pro Panningrunde mit 80 µl Blockingpuffer und 80 µl des jeweiligen Phageneluats (2.5.3) für 20 min bei RT unter Schütteln inkubiert.

Die geblockten wells wurden sechs Mal mit 100 µl TBST (0,1 % bzw. 0,5 % Tween-20 entsprechend der verwendeten Konzentration in den Panningrunden) gewaschen und anschließend mit den inkubierten Phageneluaten für 1 h bei RT und 300 rpm inkubiert. Nach weiteren sechs Waschschrritten wurden 200 µl eines anti-M13:HRP-Antikörpers (1:5000 in Blockingpuffer verdünnt) in jedes well pipettiert und 1 h bei RT und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde erneut sechs Mal gewaschen und die TMB-Substrat-Lösung (100 µl)

zugegeben. Die erfolgte Enzymreaktion konnte durch einen blauen Farbumschlag visualisiert und mit 100 μ l 20 %-iger Schwefelsäure gestoppt werden. Die Detektion erfolgte durch Absorptionsmessung bei 450 nm mittels Plattenleser *Multiscan Go* (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt).

2.5.7 Amplifizierung einzelner Phagenklone

Jeweils 5 μ l der Phageneluate der Panningrunden drei und vier wurden zur Infektion von *E. coli* ER2738 analog 2.5.2 verwendet und die infizierten Zellen anschließend auf LB/IPTG/Xgal-Platten ausplattiert.

Am nächsten Morgen wurden pro zu testendem Phagenklon 15 ml LB-Tet-Medium mit *E. coli* ER2738 inokuliert und bis $OD_{600} = 0,01 - 0,05$ bei 37 °C und 140 rpm kultiviert. Anschließend wurden blaue Plaques mit einer sterilen Pipettenspitze singulär von LB/IPTG/Xgal-Platten gepickt, einzeln zu den über-Tag-Kulturen gegeben und weitere 4,5 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 5000 x g. Der Überstand wurde jeweils in ein neues Gefäß überführt und erneut zentrifugiert. 80 % des Überstands wurden entnommen. Die amplifizierten Phagen wurden durch Zugabe von 1/6 Volumen 20 % PEG/2,5 M NaCl über Nacht bei 4 °C präzipitiert. Das Präzipitat wurde am nächsten Morgen durch Zentrifugation (40 min, 4 °C, 5000 x g) gefällt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml 1x TBS resuspendiert. Anschließend wurde für 5 min bei 4 °C und 12000 x g zentrifugiert, der Überstand überführt und die Phagen mit 1/6 Volumen 20 % PEG/NaCl für 60 min auf Eis gefällt. Das Präzipitat wurde pelletiert (10 min, 4 °C, 12000 x g) und in 200 μ l 1x TBS aufgenommen. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.5.8 Einzelphagen-ELISA

Der Einzelphagen-ELISA dient dem Nachweis der Bindungsaffinität der einzelnen peptidpräsentierenden Phagenklone zum Zielprotein. Die Durchführung des ELISAs erfolgte analog 2.5.6. Hier wurden jedoch die amplifizierten einzelnen Phagenklone (2.5.7) eingesetzt und deren Bindung mittels ELISA überprüft.

Im Anschluss wurden alle positiven Phagenklone mit 50 % (v/v) Glycerin versetzt und bei -20 °C gelagert.

2.5.9 Extraktion der einzelsträngigen Phagen-DNA

Die ssDNA aller Phagenklone, die im Einzelphagen-ELISA eine deutliche Bindungsaffinität aufwiesen, wurde mittels *QIAprep spin M13 Kit* (QIAGEN, Hilden) isoliert. Pro Phagenklon wurden 10 ml LB-Tet-Medium mit einer Kolonie *E. coli* ER2738 inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,02 bei 37 °C und 140 rpm kultiviert. 3 ml der Kultur wurden anschließend mit 5 µl der jeweiligen Phagenklon-Suspension infiziert und für 4,5 h bei 37 °C und 140 rpm inkubiert. Die Isolierung der ssDNA erfolgte nach Herstellerprotokoll „QIAprep® M13 Handbook“ (QIAGEN). Eluiert wurde mit 100 µl Wasser.

Die ssDNA-Konzentration wurde mittels ScanDrop (Analytik Jena, Jena) bei 260/280 nm gemessen.

2.5.10 Sequenzierung und Analyse der Phagen-DNA

Die Sequenzierung der isolierten ssDNA erfolgte durch GATC Biotech AG (Köln). Hierfür wurden 5 µl der ssDNA mit 5 µl -96 *gIII sequencing primer* (Sigma-Aldrich, Steinheim) versetzt.

Die 12-mer Peptidsequenzen wurden mit Hilfe der FinchTV Software dechiffriert und mit In-Silico (<http://in-silico.net>) bzw. ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>) translatiert. Die Physiochemischen Eigenschaften wurden mit Hilfe des Servers *Antimicrobial Peptide Database* (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) ermittelt.

Die Sequenzen wurden mittels Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) auf ihren Konsensus untersucht und mit den Tools BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) und SAROTUP (<http://immunet.cn/sarotup/>) auf Ähnlichkeiten mit bereits bekannten Peptiden und Proteinen geprüft. Die Hydrophobizität, Nettoladung und das Molekulargewicht wurden mit dem Antimicrobial Peptide Database Server (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) ermittelt.

2.5.11 Phagen-ELISA

Der Phagen-ELISA diente dem Vergleich der Bindungsaffinität der einzelnen Phagenklone für das Zielprotein. Hierfür wurden die einzelnen Phagenklone analog 2.5.7 amplifiziert. Dabei wurden die *E. coli*-Zellen mit jeweils 5 µl Phagenklon-Suspension infiziert. Anschließend wurde der Titer wie unter 2.5.4 beschrieben ermittelt.

1 µg des Zielproteins wurde in 0,1 M NaHCO₃, pH 8,6 in einer 96-well-Mikrotiterplatte (Polystyrol) immobilisiert (4 °C, über Nacht, 300 rpm). Als Negativkontrolle wurde jeweils

100 µl NaHCO₃ sowie 5 % (w/v) BSA aufgetragen. Am nächsten Tag wurde die Lösung verworfen und mit 200 µl Blockingpuffer (1x PBS + 5 % (w/v) BSA) für 1 h bei RT und 300 rpm blockiert. Anschließend wurde vier Mal mit 100 µl TBST (0,1 % Tween-20) gewaschen. Unter Verwendung des ermittelten Titors wurde pro zu testendem Phagenklon ein Volumen ermittelt, das jeweils 3×10^{10} pfu entsprach, und dieses auf 160 µl mit Blockingpuffer aufgefüllt. Das Gemisch wurde zu den *wells* gegeben und für 1 h bei RT und 300 rpm inkubiert. Nach weiteren vier Waschschritten mit 100 µl 1x TBST (0,1 % Tween-20) wurden 200 µl eines anti-M13:HRP-Antikörpers (1:5000 in Blockingpuffer verdünnt) in jedes *well* pipettiert und 1 h bei RT und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde vier Mal gewaschen und die TMB-Substrat-Lösung (100 µl) zugegeben. Die erfolgte Enzymreaktion konnte durch einen blauen Farbumschlag visualisiert und mit 100 µl 20 %-iger Schwefelsäure gestoppt werden. Die Detektion erfolgte durch Absorptionsmessung bei 450 nm mittels Plattenleser *Multiscan Go* (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt).

2.5.12 Synthese der selektionierten Peptide

Ausgewählte 12-mer Peptide wurden FAM- oder Biotin-markiert chemisch synthetisiert (2.1.5). Die Synthese erfolgte durch die Firma JPT Peptide Technologies GmbH (Berlin) in einem Reinheitsgrad von 95 %.

2.6 Interaktionsstudien mittels ELISA

2.6.1 Interaktionsnachweis zwischen selektionierten Peptiden und Zielprotein

Zum Interaktionsnachweis wurden 10 µg/ml bzw. als Negativkontrolle 0 µg/ml des Zielproteins im Carbonatpuffer auf einer Polystyrol-Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen) immobilisiert (über Nacht, 4 °C, 300 rpm). Am nächsten Tag wurde drei Mal mit 300 µl PBS gewaschen und mit 300 µl Blockingpuffer (5 % BSA in 1x PBS) 1 h bei 23 °C inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit 300 µl PBS wurden die entsprechenden FAM-Peptide in steigender Konzentration 0 µg/ml – 50 µg/ml in PBS verdünnt (jeweils 100 µl) zugegeben und für 15 min bei 23 °C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde drei Mal mit 300 µl PBST (0,01 % Tween-20) gewaschen und mit einem anti-FITC:HRP-AK (in PBST) 1 h bei 23 °C inkubiert. Nach weiteren Waschschritten (3x 300 µl PBST) wurde die Interaktion mittels 100 µl TMB-Substrat und einer Absorptionsmessung bei 450 nm detektiert. Es wurden im gesamten Experiment Dreifachbestimmungen durchgeführt.

2.6.2 Interaktionsnachweis zwischen selektionierten Peptiden und *L. monocytogenes*

Eine *L. monocytogenes*-über-Nacht-Kultur bzw. eine *E. coli*-über-Nacht-Kultur als Negativkontrolle wurden auf $OD_{600} = 1$ eingestellt. Anschließend wurden jeweils 3 ml entnommen und für 10 min bei $3000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 3 ml PBST gewaschen und erneut in 3 ml PBST aufgenommen. $100 \text{ }\mu\text{l}$ Bakterien wurden mit $100 \text{ }\mu\text{l}$ FAM-Peptid ($0 \text{ }\mu\text{g/ml}$, $20 \text{ }\mu\text{g/ml}$ bzw. $50 \text{ }\mu\text{g/ml}$) und $100 \text{ }\mu\text{l}$ anti-FITC:HRP-AK (jeweils in PBST) versetzt und auf $500 \text{ }\mu\text{l}$ Endvolumen mit PBST aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 2 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und 300 rpm inkubiert und anschließend 5 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und $5000 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde zwei Mal mit $250 \text{ }\mu\text{l}$ PBST gewaschen und erneut in $250 \text{ }\mu\text{l}$ PBST resuspendiert. $100 \text{ }\mu\text{l}$ der Suspension wurden in eine Mikrotiterplatte überführt und mit $100 \text{ }\mu\text{l}$ TMB-Substrat versetzt. Nach Stoppen der Reaktion mit 20 %-iger H_2SO_4 , wurde die Absorption bei 450 nm gemessen. Alle Ansätze erfolgten in Dreifachbestimmung.

2.6.3 Inhibierung der Protein-Protein-Interaktion mittels selektionierten Peptiden

Die Versuchsdurchführung erfolgte mittels ELISA analog der Durchführung für die Ecad/GST-InlA-Interaktion (2.4.10). GST-InlA ($100 \text{ }\mu\text{l}$ in 1x TBS) wurde hier jedoch zunächst mit dem entsprechenden FAM-Peptid bzw. FAM als Negativkontrolle ($100 \text{ }\mu\text{l}$ in 1x TBS, $0 - 100 \text{ }\mu\text{g/ml}$) für 2,5 h bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und 300 rpm vorinkubiert. Das Gemisch wurde anschließend für 1 h ($21 \text{ }^\circ\text{C}$, 300 rpm) zum immobilisierten ($1 \text{ }\mu\text{g/ml}$) und blockiertem Ecad in die wells gegeben.

2.6.4 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corp.) vorgenommen. Die generierten Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichungen dargestellt.

2.7 Interaktionsstudien mittels Fluoreszenzmikroskopie

Eine *L. monocytogenes*-Übernacht-Kultur wurde 1:100 verdünnt und bis $OD_{600} = 0,1$ inkubiert. 10^9 Zellen wurden danach zu 1,5 ml BHI-Medium gegeben und bei $3000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in $100 \text{ }\mu\text{l}$ 1x PBS aufgenommen und zu 1,8 ml Fixierlösung gegeben. Nach einer Inkubation für 20 min bei RT unter Schütteln wurde erneut zentrifugiert und das Pellet in 1 ml 1x PBS aufgenommen. Es folgten ein weiterer

Zentrifugationsschritt und die Aufnahme in 400 μl 1x PBS. Jeweils 30 μl Bakteriensuspension wurden auf die einzelnen *wells* des Objektträgers gegeben und für ca. 45 min bei 90 °C getrocknet. Anschließend wurde zwei Mal mit 30 μl PBS gewaschen und mit jeweils 30 μl Peptidlösung (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach vier Waschschritten mit 30 μl 1x PBS, wurden pro *well* 30 μl DAPI-Lösung (1:1000) zugegeben und 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde vier Mal mit je 30 μl PBS gewaschen und 5 μl Mounting Medium (Carl Roth, Karlsruhe) zu jedem *well* gegeben. Die Proben wurden mit einem Deckgläschen verschlossen und mit Nagellack versiegelt. Mikroskopische Bilder wurden an dem Fluoreszenz-Mikroskop „AXIO Observer. Z1“ (Carl Zeiss AG, Oberkochen) unter Verwendung eines 63x/1.40 Objektivs (Carl Zeiss AG), der Kamera „AxioCam 506 mono“ und der Software „ZEN pro 2012“ (Carl Zeiss AG) aufgenommen. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte mit dem Programm Adobe Photoshop CC 2014 (Adobe Systems Inc.).

3 Ergebnisse

3.1 Proteinreinigung von Internalin A

Zur Selektion InIA-bindender Peptide sowie für Interaktionsstudien sollte rekombinantes InIA bzw. GST-InIA gewonnen werden. GST-InIA sollte in späteren Experimenten die Detektion mittels anti-GST-Antikörper ermöglichen. InIA ohne GST-tag sollte im Phagen-Display verwendet werden.

Dabei sollte nur mit einem Teilfragment des Proteins gearbeitet werden, das bereits Schubert et al. (2002) verwendet haben. Dieses beinhaltet mit den Aminosäuren 36-496 die für die Interaktion und Invasion in Wirtszellen essenzielle und ausreichende Domäne (Lecuit et al., 1997; Schubert et al., 2002; siehe 1.3.2). Die Proteinreinigung erfolgte in Anlehnung an die von Schubert et al. (2002) beschriebene Methode, wurde jedoch stark modifiziert.

InIA (Aminosäuren 36-496) wurde dabei entweder als GST (Glutathion-S-Transferase)-InIA-Fusionsprotein (Abbildung 12 B) oder mit Hilfe einer Protease ohne GST-tag gereinigt (Abbildung 12 A).

Nach Transformation von *E. coli* BL21 mit dem Plasmid pGEX-InIA(36-496) wurde das Gen durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) exprimiert. Die Expression des GST-InIA-Fusionsproteins konnte dabei nach Induktion (NI) im SDS-Gel (Abbildung 12) als eine Bande bei 70 kDa visualisiert werden, die dabei eine deutlich höhere Intensität als vor Induktion (VI) aufwies. Nach anschließendem Zellaufschluss und Zentrifugation wurde vom Überstand (Ü) und Pellet (P) die gleiche Gesamtproteinmenge aufgetragen. In Abbildung 12 A hatte die Geltasche einen Defekt, so dass die Pellet-Probe auslief und somit keinen ausreichenden Vergleich bietet. In Abbildung 12 B wurde jedoch ersichtlich, dass GST-InIA sowohl in der löslichen als auch in der unlöslichen Fraktion in vergleichbarer Menge vorlag. Da in den weiteren Reinigungsschritten lediglich mit der löslichen Fraktion gearbeitet wurde, führte dies an dieser Stelle zum Proteinverlust.

Mit dem Überstand wurde eine GST-Affinitätschromatographie durchgeführt und mit Hilfe mehrerer Waschschriffe (Durchfluss DF + Waschschriffe W1 – W3) unerwünschte Proteine, allerdings auch ein Teil des Zielproteins, von der Matrix gewaschen. Die Anzahl und die Intensität der Banden nahmen in den Waschschriffen ab, wodurch deutlich wurde, dass Verunreinigungen und unspezifische Bindepartner entfernt wurden. Die Elution von InIA ohne GST-tag erfolgte durch Inkubation mit der *PreScission* Protease, die ein spezifisches Epitop

3 Ergebnisse

zwischen dem GST-tag und InlA erkennt und an dieser Stelle (zwischen den Aminosäuren Gln und Gly) ein Verdau erfolgt. Somit lag nach dem Verdau in den Eluaten (E1 – E4) das InlA ohne den 26 kDa-schweren GST-tag vor und zeigte eine Bande beim Molekulargewicht von 40 kDa (Abbildung 12 A, blauer Balken). Zusätzlich waren schwache Banden des unverdauten GST-InlA bei 70 kDa sowie des GST (27 kDa) in den Eluaten zu erkennen, die im nächsten Reinigungsschritt entfernt werden mussten. Für den weiteren Experimentverlauf wurden die Eluate 1 – 3 vereint.

GST-InlA (70 kDa) wurde mittels reduziertem Glutathion von der Glutathionsepharose eluiert und in den Eluaten (E1 – E3) aufgefangen (Abbildung 12 B, grüner Balken). Anschließend wurden die Eluate 2 und 3 vereint.

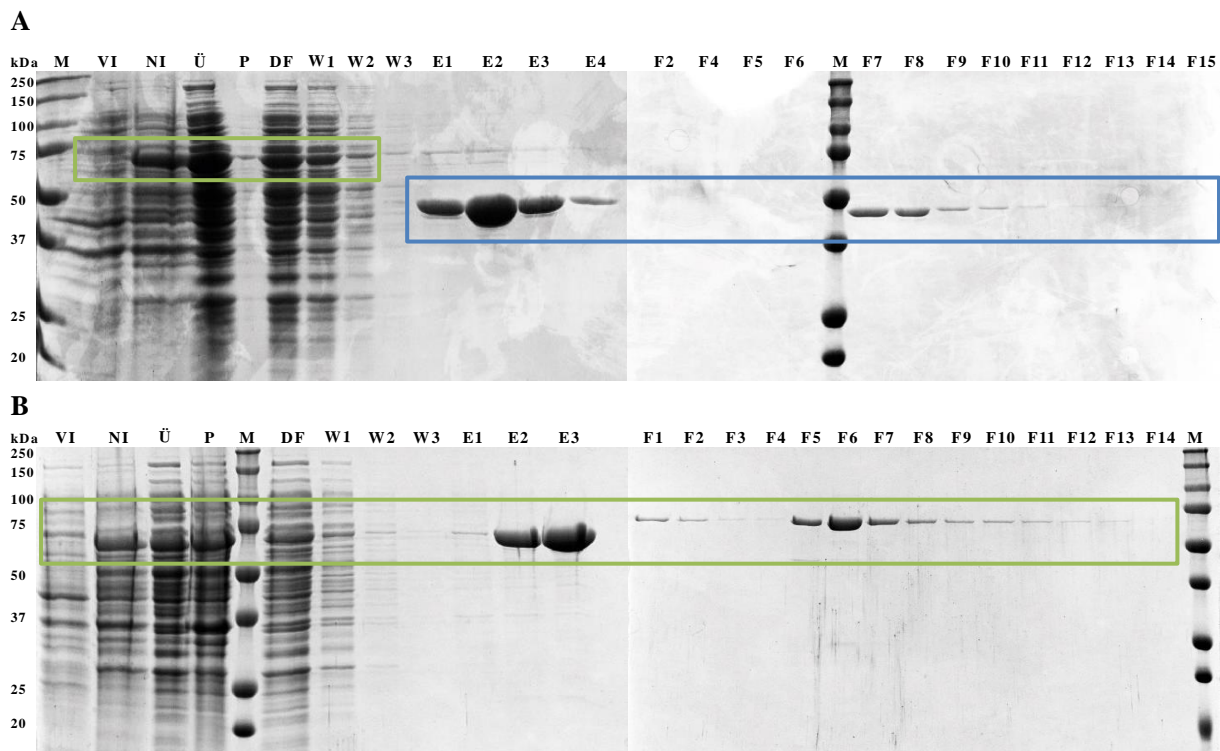


Abbildung 12: Proteinreinigung von InlA (A) (40 kDa, blau markiert) und GST-InlA (B) (70 kDa, grün markiert). Mit pGEX-InlA (36-496) transformierte *E. coli*-Zellen wurden bis $OD_{600}=0,6$ kultiviert (VI). Die durch 0,2 mM IPTG induzierte Expression erfolgte über Nacht (NI). Die Zellen wurden aufgeschlossen und pelletiert (P), der Überstand (Ü) mit Glutathionsepharose versetzt und inkubiert. Das Gemisch wurde in eine Glassäule mit Fritte gegeben und der Durchfluss (DF) aufgefangen, bevor drei Mal gewaschen wurde (W1 – W3). Das gebundene Protein wurde anschließend mittels PreScission-Protease (A) bzw. mittels reduziertem Glutathion (B) eluiert (E) und mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Dabei wurde ein NaCl-Gradient (0 – 100 % NaCl) gefahren und 2 ml-Fraktionen (F) aufgefangen. Nach jedem Schritt wurden SDS-Proben vorbereitet und jeweils 20 μ l auf ein SDS-Gel aufgetragen. VI, NI: 100 μ l 4x SDS-PP pro OD_{600} -Einheit. Ü, P: Gleiche A_{280} -Menge. DF – W3: Jeweils 20 μ l entnommen und mit 60 μ l H_2O verdünnt. E1 – F15: Jeweils 20 μ l entnommen. M: 5 μ l Proteinmarker *Precision Plus Protein™ Standard Dual* (Bio-Rad).

Sowohl InlA als auch GST-InlA zeigten in den Eluat-Proben kleinere Verunreinigungen und mussten daher im zweiten Schritt mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt werden. Die dabei gesammelten Fraktionen (F) wurden mittels SDS-PAGE analysiert, um Fraktionen mit der stärksten Intensität und Reinheit zu vereinen und aufzukonzentrieren.

Aus jeweils 500 ml Kultur konnten rund 560 µg InlA und 580 µg GST-InlA gereinigt werden.

3.2 Proteinreinigung von GST-E-Cadherin

Für Vorexperimente der Interaktionsstudien wurde der humane epitheliale Rezeptor Ecad (Aminosäuren 1-259) als GST-Fusionsprotein gereinigt (Abbildung 13). Hierfür wurden mit pGEX-hEcad(1-259) transformierte *E. coli* BL21-Zellen kultiviert und die Genexpression mit 0,2 mM IPTG induziert (NI), was durch eine intensive Bande bei 37 kDa im SDS-Gel visualisiert werden konnte. Der Überstand (Ü), der das Zielprotein und andere lösliche Proteine enthielt, wurde mit Glutathionsepharose inkubiert. Nicht bindende und unspezifische Proteine wurden von der Matrix gewaschen (DF – W3) und GST-Ecad mittels reduziertem Glutathion eluiert (E1 – E3). Nachdem E2 und E3 vereint wurden, wurden die im Gel deutlich sichtbaren Verunreinigungen in den Eluaten mittels Anionenaustauschchromatographie entfernt (F1 – F15) und Fraktionen F5 bis F8 aufkonzentriert. Aus einem 500 ml-Ansatz konnten auf diese Weise 550 µg Protein gereinigt werden.

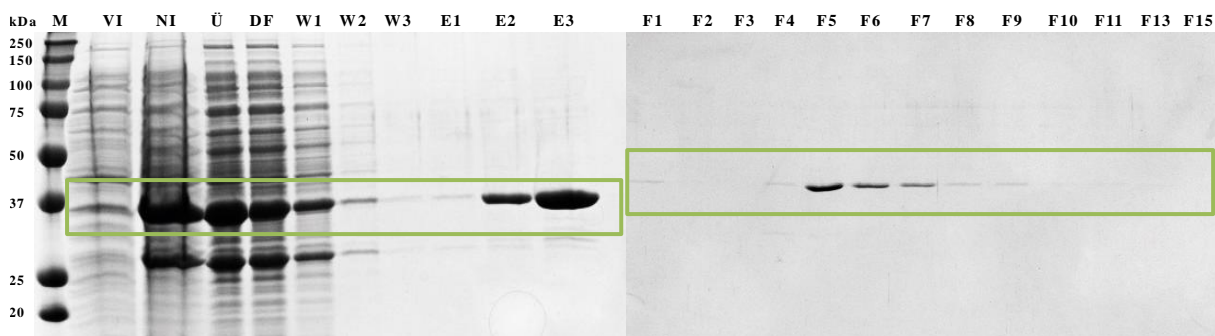


Abbildung 13: Proteinreinigung von GST-Ecad(1-259) (37 kDa, grün markiert). Mit pGEX-hEcad transformierte *E. coli*-Zellen wurden bis $OD_{600}=0,6$ kultiviert (VI). Die mit 0,2 mM IPTG induzierte Expression erfolgte über Nacht (NI). Die Zellen wurden aufgeschlossen und pelletiert, der Überstand (Ü) mit Glutathionsepharose versetzt und inkubiert. Das Gemisch wurde in eine Glassäule mit Fritte gegeben und der Durchfluss (DF) aufgefangen, bevor drei Mal gewaschen wurde (W1 – W3). Das gebundene GST-Ecad wurde anschließend mittels reduziertem Glutathion eluiert (E1 – E3) und mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Dabei wurde ein NaCl-Gradient (0 – 100 % NaCl) gefahren und 2 ml-Fraktionen (F) aufgefangen. Nach jedem Schritt wurden SDS-Proben vorbereitet und jeweils 20 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen. VI, NI: 100 µl 4x SDS-PP pro OD_{600} -Einheit. Ü – W3: Jeweils 20 µl entnommen und mit 60 µl H_2O verdünnt. E1 – F15: Jeweils 20 µl entnommen. M: 5 µl Proteinmarker *Precision Plus ProteinTM Standard Dual* (Bio-Rad).

3.3 Interaktionsnachweis zwischen GST-InlA(36-496) und hEcad(1-621)

Die Interaktion zwischen dem listerialen Protein InlA und dem humanen Rezeptor Ecad wurde bereits von Mengaud et al. (1996) publiziert. Nun sollte mittels ELISA überprüft werden, ob diese bei dem gereinigten Proteinfragment InlA(36-496) weiterhin gezeigt werden kann. Hierfür wurde Ecad(1-621) ohne den GST-tag käuflich erworben und im ELISA mit dem gereinigten GST-InlA verwendet. Die Bindung des GST-InlA an immobilisiertes Ecad wurde durch einen anti-GST-Antikörper detektiert (Abbildung 14A). Die Optimierung der geeigneten Versuchsbedingungen ist nicht separat aufgeführt. Die hier dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die unter 2.4.10 beschriebenen optimierten Parameter.

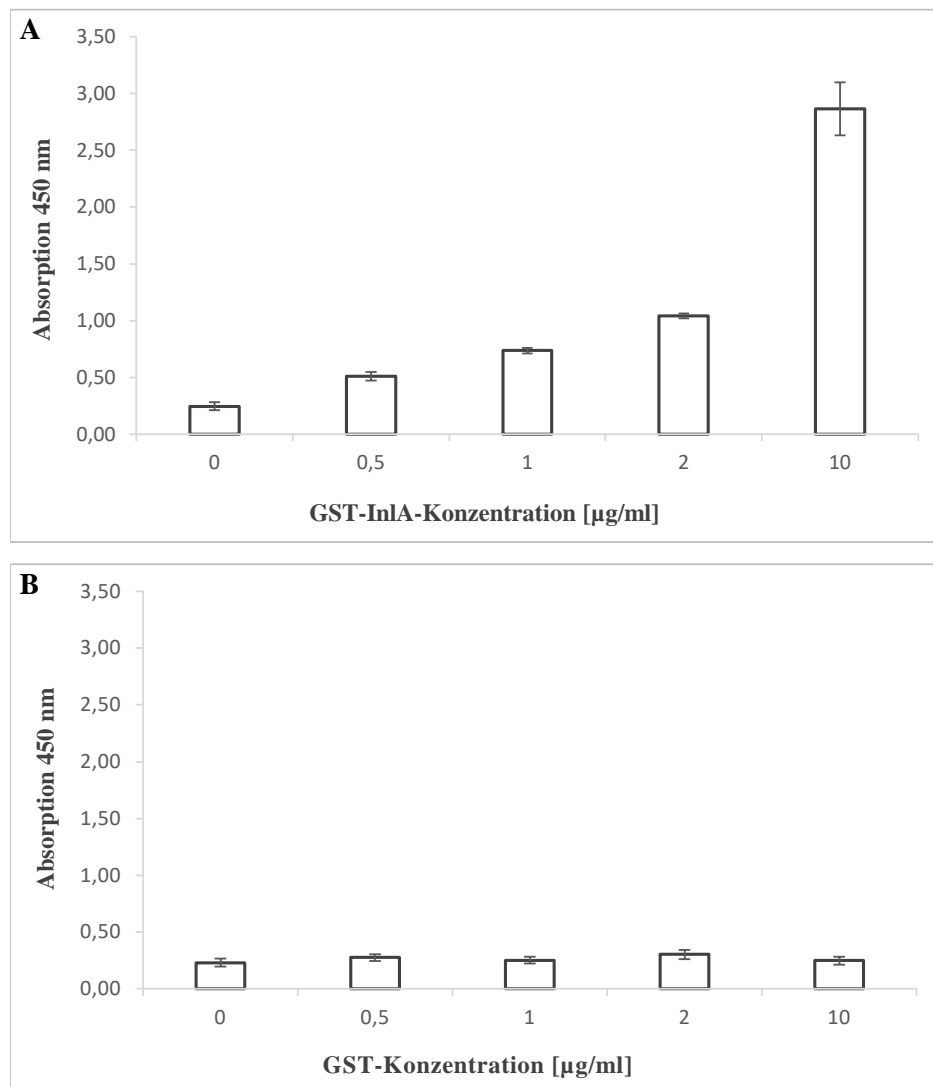


Abbildung 14: Rekombinantes GST-InlA(36-496) interagiert mit humanem Ecad(1-621). Immobilisiertes Ecad (10 µg/ml) wurde mit GST-InlA (A) bzw. GST als Negativkontrolle (B) in steigender Konzentration (0 – 10 µg/ml) inkubiert. Gebundenes GST-InlA bzw. GST wurde durch die Verwendung eines gegen GST gerichteten Antikörpers und Absorptionmessung bei 450 nm detektiert. Der Versuch erfolgte in Dreifachbestimmung. Die Standardabweichungen der Mittelwerte sind in Form von Fehlerbalken dargestellt.

Die gemessene Absorption bei 450 nm entspricht dem gemessenen Interaktionssignal, das mit steigender GST-InlA-Konzentration zunimmt. Somit interagiert das gereinigte Proteinfsegment GST-InlA(36-496) mit humanem Ecad. Ein durch GST hervorgerufenes unspezifisches Interaktionssignal wurde durch einen GST/Ecad-ELISA überprüft und ausgeschlossen (Abbildung 14B).

3.4 Proteinreinigung von Internalin B

Für die Selektion von InlB-bindenden Peptiden wurde rekombinantes InlB gereinigt. Nachfolgende Interaktionsstudien erforderten zusätzlich die Proteinreinigung des Fusionsproteins GST-InlB, welches die Detektion mittels anti-GST-Antikörper ermöglicht. Hierfür wurde ein Teilfragment des Vollängenkonstrukts verwendet. Dieses beinhaltet die Aminosäuren 36-321 und umfasst somit die für die InlB-Met-Interaktion essenzielle LRR-Domäne des Proteins (Braun et al., 1999). Die Proteinreinigung erfolgte in Anlehnung an die von Niemann et al. (2007) beschriebene Methode, wurde jedoch stark modifiziert.

Die Genexpression von InlB(36-321) erfolgte in mit pETM-InlB(36-321) transformierten *E. coli* BL21. Nach anschließendem Zellaufschluss wurde mit dem Überstand (Ü), der die lösliche Protein-Fraktion enthält, eine GST-Affinitätschromatographie durchgeführt. Mit Hilfe der SDS-PAGE ließ sich die Effizienz der einzelnen Waschschrte verfolgen. Die Elution erfolgte mittels reduziertem Glutathion (GST-InlB, Abbildung 15 B) oder mittels Verdau mit einer Tev-Protease zwischen InlB und GST-tag (InlB, Abbildung 15 A). GST-InlB ließ sich bei 60 kDa und InlB nach Entfernen des tags bei 35 kDa im SDS-Gel visualisieren.

Euate E1 – E4 von InlB ohne GST-tag wurden nach dem Vereinen erneut mit Glutathion-Sepharose inkubiert, um Verunreinigungen mit ungeschnittenem GST-InlB zu entfernen. Das verdaute Protein wurde durch Waschschrte von der Matrix gelöst und als Eluat E6, E7 und E8 gesammelt. Diese Euate enthielten deutlich reineres Protein (Abbildung 15 A). Die Reinheit sowohl von InlB als auch von GST-InlB konnte in einem weiteren Reinigungsschritt mittels Anionenaustauschchromatographie (Abbildung 15, F1-F8) erhöht werden, bevor die vereinten Proteinfaktionen (F2-F4) konzentriert und die Proteinausbeute bestimmt wurde.

3 Ergebnisse

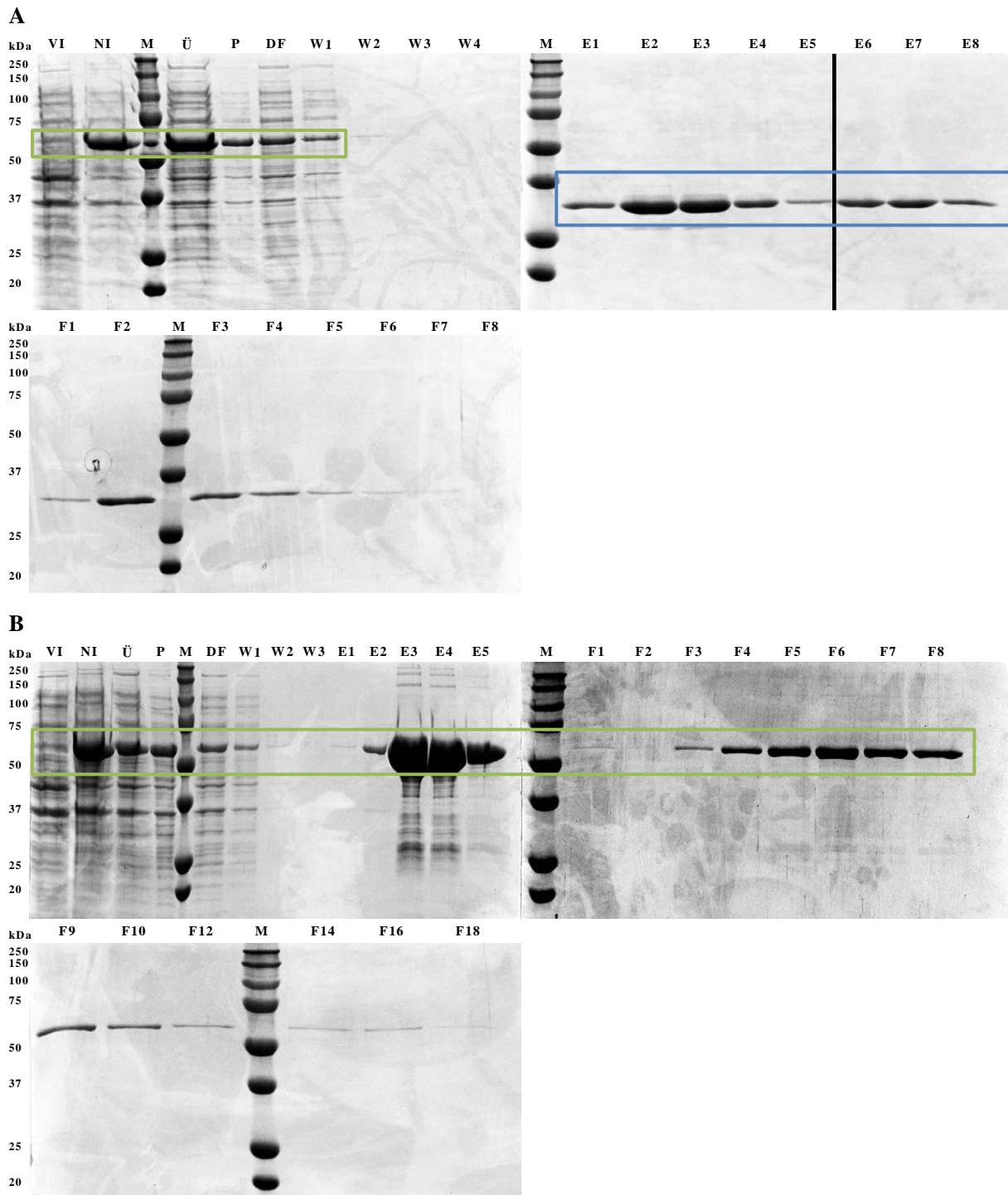


Abbildung 15: Proteinreinigung von InlB (A) (35 kDa, blau markiert) und GST-InlB (B) (60 kDa, grün markiert). Mit pETM-InlB(36-321) transformierte *E. coli*-Zellen wurden bis $OD_{600} = 0,6$ kultiviert (VI). Die durch 0,1 mM IPTG induzierte Expression erfolgte über Nacht (NI). Die Zellen wurden aufgeschlossen und pelletiert (P), der Überstand (Ü) mit Glutathionsepharose versetzt und inkubiert. Das Gemisch wurde in eine Glassäule mit Fritte gegeben und der Durchfluss (DF) aufgefangen, bevor drei Mal gewaschen wurde (W1 – W3). Das gebundene Protein wurde anschließend mittels AcTev-Protease (A) bzw. mittels reduziertem Glutathion (B) eluiert (E1 – E5). InlB ohne GST-tag (A) wurde zusätzlich erneut mit Glutathionsepharose inkubiert und eluiert (E6 – E8). Beide Proteine wurden anschließend mittels Anionenaustauschchromatographie gereinigt. Dabei wurde ein NaCl-Gradient (0 – 100 % NaCl) gefahren und 2 ml-Fractionen (F) aufgefangen. Nach jedem Schritt wurden SDS-Proben vorbereitet und jeweils 20 μ l auf ein SDS-Gel aufgetragen. VI, NI: 100 μ l 4x SDS-PP pro OD_{600} -Einheit. Ü, P: Gleiche A_{280} -Menge. DF – W3: Jeweils 20 μ l entnommen und mit 60 μ l H_2O verdünnt. E1 – F18: Jeweils 20 μ l entnommen. M: 5 μ l Proteinmarker *Precision Plus ProteinTM Standard Dual* (Bio-Rad).

Mit dieser Reinigungsmethode konnten aus einer 500 ml-Kultur rund 850 μg GST-InlB gewonnen werden. Bei InlB lag die gereinigte Proteinmenge bei lediglich 550 μg , da der zusätzliche Inkubationsschritt mit der Glutathion-Sepharose zum Proteinverlust führte. Die Proteinreinheit wurde dadurch aber deutlich erhöht. Diese ist beim Phagen-Display, in dem InlB ohne GST-tag eingesetzt wird, entscheidend.

3.5 Interaktionsnachweis zwischen GST-InlB(36-321) und c-Met(1-932)

Die Interaktion zwischen dem rekombinanten GST-InlB(36-321) und dem humanen Met-Rezeptor sollte nach der Reinigung mittels ELISA überprüft werden. Hierfür wurde humanes c-Met(1-932) käuflich erworben und in einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen des gereinigten GST-InlB wurde das Interaktionssignal mit Hilfe eines gegen den GST-tag gerichteten anti-GST-Antikörpers und Absorptionsmessung bei 450 nm detektiert (Abbildung 16). Die Interaktion konnte erfolgreich gezeigt werden und erreichte bereits bei 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ GST-InlB nahezu ihren Sättigungsbereich.

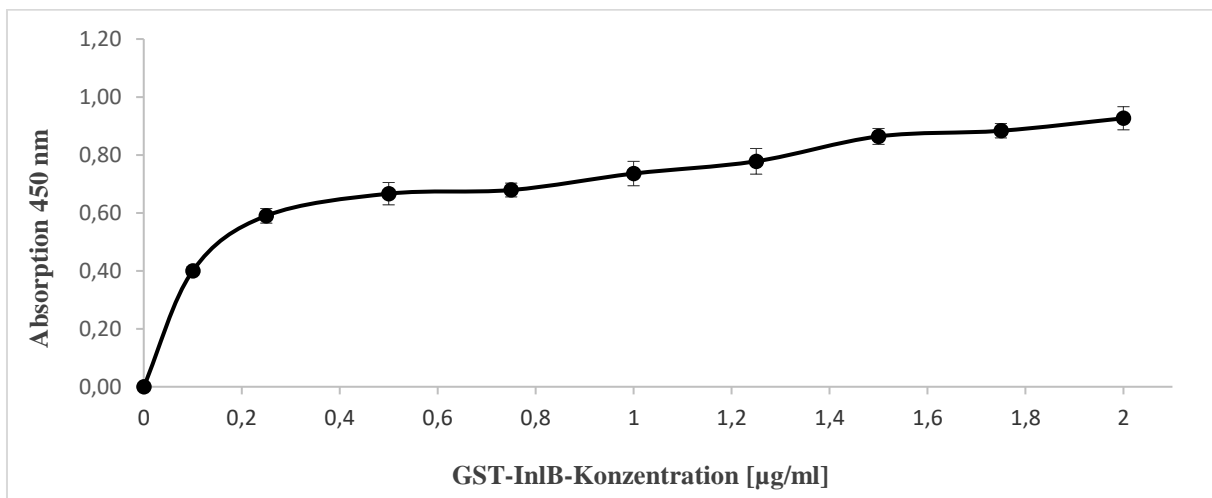


Abbildung 16: Rekombinantes GST-InlB(36-321) interagiert mit humanem c-Met(1-932). Immobilisiertes c-Met (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde mit GST-InlB in steigender Konzentration (0 – 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Die Bindung wurde unter Verwendung eines gegen GST gerichteten Antikörpers und Absorptionsmessung bei 450 nm detektiert. Der Versuch erfolgte in Dreifachbestimmung. Die Standardabweichungen der Mittelwerte sind in Form von Balken dargestellt.

3.6 Phagen-Display zur Selektion InlA-bindender Peptide

Mit Hilfe des Phagen-Displays sollten InlA-bindende Peptide selektioniert werden. Hierfür wurde rekombinantes InlA (Proteinreinigung unter 3.1) durch Adsorption immobilisiert und mit der Phagen-Bibliothek (Ph.D.-12, New England Biolabs, Frankfurt a. M., Germany) inkubiert. Alle Phagenklone der Bibliothek exprimieren randomisierte 12-mer Peptide an ihrer Oberfläche. Eingesetzt wurden 10^{11} pfu. Nach mehreren Waschschritten wurden gebundene Phagen eluiert und für die nächste Selektionsrunde angereichert. Es wurden insgesamt vier Runden durchgeführt und nach jedem Schritt der *Input*- und *Output*-Titer bestimmt. Anhand dessen wurde das Volumen für die nächste Panningrunde errechnet, um in jeder Runde die gleiche Menge an Phagen einzusetzen.

3.6.1 Anreicherungs-ELISA der vier Panningrunden

Das Phageneluat jeder Panningrunde wurde erneut angereichert und die Bindungsaffinität der selektionierten Phagensuspension nach jeder Runde gegenüber InlA mittels ELISA getestet. Als Negativkontrolle diente Puffer anstatt InlA (Abbildung 17).

In allen vier Selektionsrunden wiesen die Phagen eine deutlich geringere Bindungsaffinität zur Polystyrol-Oberfläche (NK) als zu InlA auf, wodurch eine erfolgreiche Selektion gegen InlA gezeigt und eine Mehrheit an Plastik-bindenden Phagen ausgeschlossen werden konnte. Die Signalstärke und somit die Bindungsaffinität stieg in der dritten und vierten Panningrunde, in denen der Selektionsdruck durch die Wiederholungen erhöht wurde. Somit wurden InlA-spezifische Phagenklone mit jeder Runde angereichert.

Für die Isolierung einzelner Phagenklone im nächsten Schritt wurden deshalb die Eluate der Selektionsrunden 3 und 4 verwendet. Die Eluate enthalten mehrere potentielle Binder mit unterschiedlichen Sequenzen und mussten daher separiert und einzeln im Einzelphagen-ELISA untersucht werden.

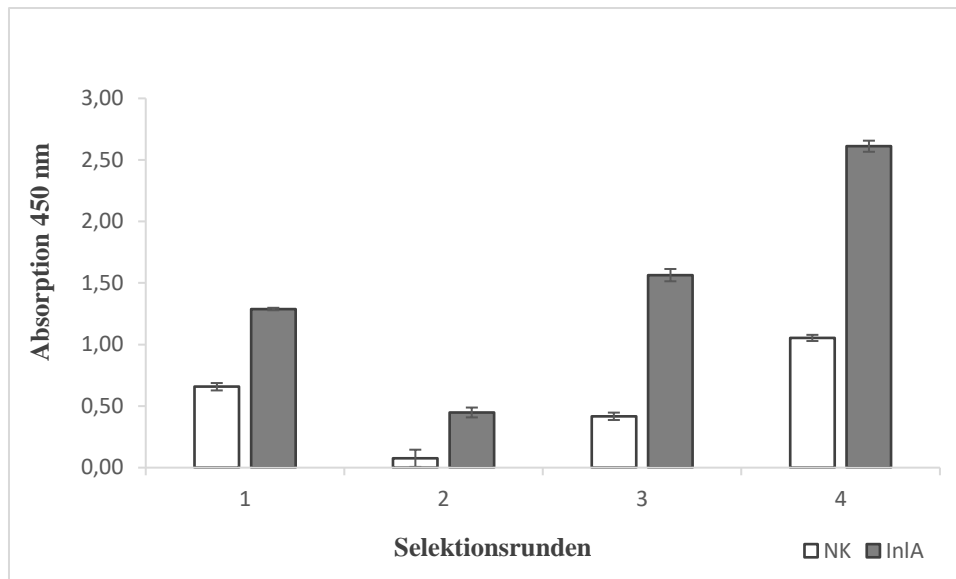


Abbildung 17: Bindungsaffinität der Phageneluaten des InIA-spezifischen Phagen-Displays steigt in den Panningrunden 3 und 4. Es wurden 100 µg/ml InIA immobilisiert. Als Negativkontrolle (NK) dienten *wells* ohne InIA. Der anschließenden Inkubation mit den amplifizierten Eluaten der vier Selektionsrunden folgten sechs Waschschritte. Die Bindung der Phagen an InIA bzw. die Polystyrol-Oberfläche (NK) wurde mittels anti-M13:HRP und Absorptionsmessung bei 450 nm detektiert. Das Experiment erfolgte in Doppelbestimmung. Angegeben sind die Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind in Form von Balken dargestellt.

3.6.2 Einzelphagen-ELISA der isolierten Phagenklone

Um einzelne Phagenklone zu testen, wurde *E. coli* mit den Phageneluaten der Panningrunden 3 und 4 infiziert und auf IPTG/Xgal/LB-Platten ausplattiert. Damit konnten Phagen-Plaques und somit einzelne Phagenklone visualisiert werden. Dadurch ließen sich Einzelphagen, die einzelne Peptidsequenzen auf ihrer Oberfläche präsentieren, separieren. Die einzelnen Klone wurden angereichert und auf ihre Bindungsaffinität gegenüber InIA im ELISA überprüft (Abbildung 18).

Beim Vergleich der Negativkontrollen (NK) mit den InIA-Proben wird deutlich, dass einige Phagenklone (beispielsweise Nr. 2, Nr. 6) nur ein sehr schwaches Signal und keine spezifische Bindung an InIA aufweisen. Diese konnten für weitere Untersuchungen ausgeschlossen werden. Klon Nr. 8 und Nr. 14 zeigten eine höhere Absorption in der Negativkontrolle als in der Probe mit InIA. Hierbei handelte es sich vermutlich um einen falsch positiven Polystyrol-Binder. Bei Phagenklonen wie beispielsweise Nr. 16 und Nr. 23 wurde ein deutlich höheres Signal in Anwesenheit von InIA als in der Negativkontrolle detektiert. Die Peptide an der Oberfläche dieser Phagenklone sind somit potentielle hochaffine Kandidaten für InIA-Binder.

Auf diese Weise wurden über 150 Phagenklone getestet (in Abbildung 18 sind exemplarisch 23 Phagenklone dargestellt) und 22 positive Kandidaten für die ssDNA-Sequenzierung im nächsten Schritt ausgewählt.

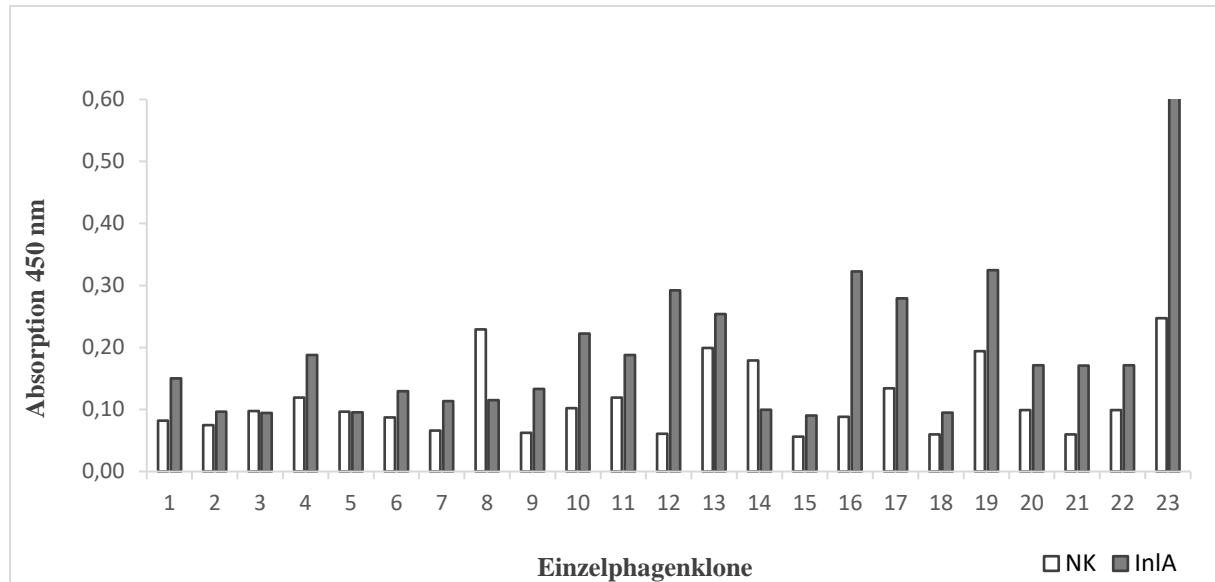


Abbildung 18: Durch Einzelphagen-ELISA überprüfte InIA-Spezifität der einzelnen Phagenklone. Es wurden 100 µg/ml InIA immobilisiert. Als Negativkontrolle (NK) dienten *wells* ohne InIA. Anschließend wurde mit den amplifizierten Einzelphagen inkubiert. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Bindung der Phagenklone an das InIA bzw. die NK mittels anti-M13:HRP und Absorptionsmessung bei 450 nm. Es wurden insgesamt 150 Klone überprüft, davon sind 23 exemplarisch dargestellt.

3.6.3 Identifizierung InIA-bindender Peptide

Zur Identifizierung der Peptidsequenzen, die eine hohe Bindungsaffinität zu InIA aufwiesen, wurden Phagenklone, die sich in 3.6.2 als positiv erwiesen, angereichert und die einzelsträngige Phagen-DNA isoliert. Die durch DNA-Sequenzierung erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden in Aminosäuresequenzen translatiert und somit die Peptidsequenzen, die auf der Oberfläche der positiven Phagenklone präsentiert wurden, identifiziert. Einige Sequenzierungen waren nicht auswertbar, da sie Phagen-DNA ohne das Peptid-spezifische Insert enthielten (Wildtyp M13-Kontaminanten) oder die Sequenzierung verfrüht abgebrochen wurde. Es wurden dennoch acht unterschiedliche Peptidsequenzen ermittelt, von denen einige wiederholt auftraten. In Tabelle 2 sind die 12-mer Peptidsequenzen und ihre Häufigkeit dargestellt. Mit Hilfe von Datenbanken wurden die physiochemischen Eigenschaften der Peptide ermittelt (Antimicrobial Peptide Database) (Tabelle 2) und mit bereits bekannten Sequenzen verglichen (MimoBLAST, MimoSearch).

Tabelle 2: Mittels Phagen-Display gegen InlA selektionierte Peptidsequenzen. Die Sequenzen wurden mittels ssDNA-Sequenzierung ermittelt. Gezeigt sind die Häufigkeiten der identifizierten Sequenzen von elf auswertbaren Sequenzierungen sowie deren durch *Antimicrobial Peptide Database* ermittelte Nettoladung, Hydrophobizität und das Molekulargewicht (MW). Den Sequenzen wurde eine nummerierte Bezeichnung zugeordnet.

Nr.	Sequenz	Häufigkeit	Nettoladung	Hydrophobizität	MW (Da)	Bezeichnung
1	GLHTSATNLYLH	3/11	0	33 %	1326.476	JB1
2	VVSPDMNLLLTN	2/11	-1	50 %	1309.557	-
3	QFDYMRPANDTH	1/11	-1	25 %	1488.61	JB4
4	SNSIDKVNRPIN	1/11	+1	25 %	1350.50	JB5
5	SLDGAGAALRTS	1/11	0	41 %	1118.214	-
6	GHYTNSEWGFQE	1/11	-2	16 %	1454.476	-
7	DSQFNKYSIATV	1/11	0	33 %	1372.495	JB2
8	SGVYKVAYDWQH	1/11	0	33 %	1452.586	JB3

Der Abgleich mit Datenbanken (TUPScan) ergab, dass es sich bei der Sequenz GHYTNSEWGFQE mit dem Motiv [LFW]-x-F-Q um eine unspezifische Antikörper-bindende Sequenz handeln könnte. Damit konnte diese Sequenz als potentieller InlA-Binder ausgeschlossen werden.

Sequenz VVSPDMNLLLTN wurde mit 60 %iger Wahrscheinlichkeit als ein schnellwachsender Phage, der durch mehrere Amplifizierungsschritte aufgrund seines schnellen Wachstums und nicht durch seine InlA-Affinität angereichert wurde, prognostiziert (TUPredict). Somit wurde diese Sequenz für weitere Experimente ebenfalls nicht mehr berücksichtigt.

Sequenz SLDGAGAALRTS wies eine vergleichsweise hohe Hydrophobizität von 41 % auf, was für eine Polystyrol-bindende Sequenz charakteristisch sein könnte und einen falsch positiven Klon vermuten ließ.

Sequenzen GLHTSATNLYLH und SGVYKVAYDWQH wurden in der Datenbanksuche als bereits publizierte IGF2R-bindende Peptide identifiziert (Chen et al., 2015). Diese wurden von Chen et al. mittels Phagen-Display gegen IGF2R (*insulin-like growth factor II receptor*) humaner hepatischer Sternzellen selektiert. IGF2R stellt neben seiner natürlichen Funktion einen Rezeptor für *L. monocytogenes* dar (Gasanov et al., 2006). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine IGF2R-bindungsaffine Sequenz ebenfalls an InlA binden kann, ist daher gegeben.

Die Sequenz SGVYKVAYDWQH wurde von Díaz-Perlas et al. erst kürzlich im Phagen-Display gegen Zellmodelle der Blut-Hirn-Schranke (BBB) selektiert (Díaz-Perlas et al., 2017). SGVYKVAYDWQH wurde dabei als BBB-Shuttle-Peptid publiziert. Da

L. monocytogenes die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, ließ dies auf einen Zusammenhang schließen.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte erschienen die Sequenzen GLHTSATNLYLH und SGVYKVAYDWQH als mögliche InlA-Binder besonders vielversprechend. Zusätzlich wurde die Peptidsequenz GLHTSATNLYLH bei der Sequenzierung bei drei von elf Klonen gefunden, woraus auf ein sehr affines InlA-bindendes Peptid geschlossen werden konnte.

Zur Vereinfachung erhielten die potentiellen InlA-bindenden Sequenzen eine nummerierte Bezeichnung, die Tabelle 2 entnommen werden kann.

3.6.4 Bindungsaffinität der positiven Phagenklone

Vor der Synthese der fünf Peptide, deren Sequenzen nach Datenbankrecherche weiterhin vielversprechend erschienen (JB1 – JB5), wurde die Bindungsaffinität der fünf Phagenklone für InlA untereinander verglichen, um Phagenklone mit der höchsten Affinität zu ermitteln. Hierfür wurde jeweils die gleiche Menge an Phagen (3×10^{10} pfu) im ELISA eingesetzt. Die pfu wurde vorher für jeden amplifizierten Phagenklon mittels Titer-Bestimmung einzeln ermittelt. Detektiert wurde im ELISA mit einem anti-M13:HRP. Die erhaltene Signalintensität war somit proportional zur Menge des gebundenen, HRP-konjugierten Antikörpers und damit proportional zur Menge der bindungs-affinen Phagen in jeder Phagenklon-Suspension. In Abbildung 19 sind die Bindungsaffinitäten für InlA bzw. für die Polystyrol-Oberfläche (NK) dargestellt. Da alle Phagenklone eine deutlich höhere Bindungsaffinität zu InlA als zur Negativkontrolle aufwiesen, konnten potentielle Polystyrol-Binder ausgeschlossen werden. Der Phagenklon mit der Peptidsequenz JB4 zeigte dabei die schwächste Bindung an InlA. Bei JB3-präsentierenden Phagen wurde die höchste Bindungsaffinität detektiert, gefolgt von JB5-, JB2- und JB1-Phagenklonen.

Im Vergleich der Signale des Einzelphagen-ELISAs (Abbildung 18) mit den Signalen des Phagen-ELISAs (Abbildung 19) zeigte sich, dass der Einsatz der gleichen pfu-Menge für eine endgültige Aussage über die Bindungsaffinität essenziell ist. So wurde im Einzelphagen-ELISA für den JB3-präsentierenden Phagenklon (Abbildung 18, Klon 22) und den JB4-präsentierende Phagenklon (Abbildung 18, Klon 21) eine vergleichbare Absorption detektiert. Mit der errechneten und analog eingesetzten pfu-Menge wurde allerdings deutlich, dass JB4 eine deutlich schwächere Affinität für InlA als JB3 aufweist (Abbildung 19). Somit liefert der Einzelphagen-ELISA eine erste Tendenz für positive Peptide, lässt allerdings keine endgültige Schlussfolgerung über die Bindungsaffinität für den Vergleich der Phagenklone untereinander zu.

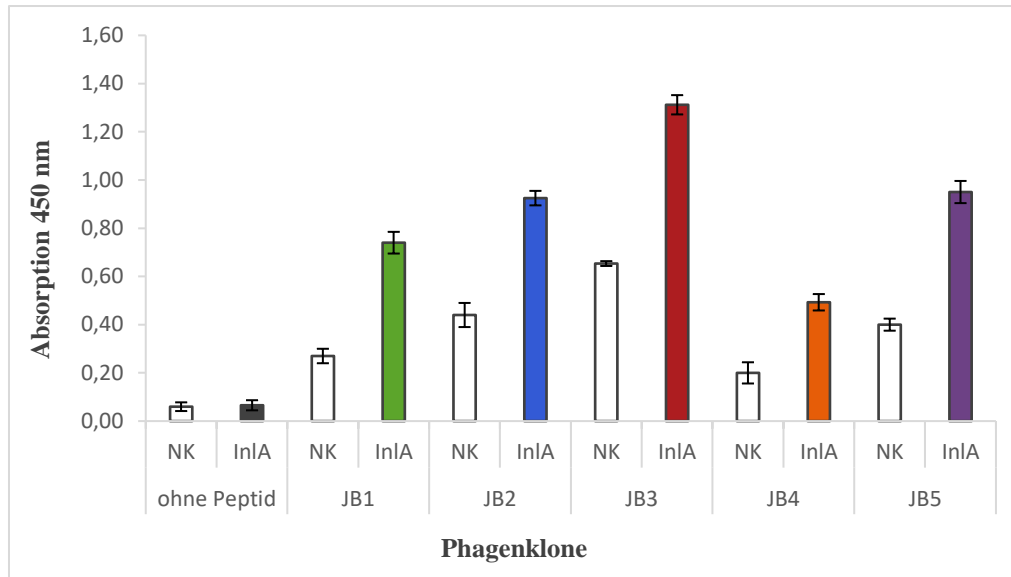


Abbildung 19: Die nach Sequenzierung als positiv eingestuft Peptid-präsentierenden Einzelphagenklone zeigen eine hohe Bindungsaffinität für InIA in Vergleich zur Negativkontrolle (NK). 1 µg InIA bzw. *wells* ohne InIA (NK) wurden mit 3×10^{10} pfu pro Phagenklon inkubiert. Waschschrinen folgte eine Detektion der gebunden Phagen mittels anti-M13:HRP und Absorptionsmessung bei 450 nm. Die erhaltene Signalintensität war dabei proportional zur Menge des gebunden, HRP-konjugierten Antikörpers und somit proportional zur Menge der bindungsaffinen Phagen in der jeweiligen Probe. Die Standardabweichung der Mittelwerte (Dreifachbestimmung) ist in Form von Balken dargestellt. JB1: GLHTSATNLYLH, JB2: DSQFNKYSIATV, JB3: SGVYKVAYDWQH, JB4: QFDYMRPANDTH, JB5: SNSIDKVNRPIN.

Da alle fünf getesteten Phagenklone eine signifikante Affinität für InIA aufwiesen, wurden diese als 5(6)-Carboxyfluorescein (FAM)- bzw. Biotin-markierte Peptide synthetisiert. Die Markierung erfolgte am C-Terminus des Peptids, um an dieser Stelle eine freie negativ geladene Carboxylatgruppe zu vermeiden. Das an den Phagen fusionierte Peptid enthielt während des Selektionsprozesses ebenfalls keine negative Ladung an dieser Stelle.

3.7 Interaktionsnachweis zwischen rekombinantem InIA und synthetischen Peptiden JB1, JB2, JB3, JB4, JB5

Phagen-präsentierte Peptide liegen auf den Phagenklonen in fünffacher Kopienzahl vor (Rodi and Makowski 1999). Bei synthetischen Peptiden kann ein Verlust des Interaktionssignals nicht ausgeschlossen werden, da die Bindung der Einzel-Peptide ohne den Aviditätseffekt vergleichsweise schwächer und nicht mehr detektierbar sein könnte. Zusätzlich könnte die Interaktion durch die Markierung mit FAM beeinträchtigt werden. Daher sollte nach Synthese der FAM-Peptide JB1, JB2, JB3, JB4 und JB5 überprüft werden, ob diese weiterhin mit InIA interagieren. Hierfür wurde InIA immobilisiert und mit FAM-markierten Peptiden in den

Konzentrationen 0 µg/ml – 50 µg/ml inkubiert. Detektiert wurde mittels anti-FITC:HRP und Absorptionsmessung. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne InIA und 20 µg/ml Peptid. In Abbildung 20 sind die gemessenen Absorptionen dargestellt.

Eine Interaktion mit InIA konnte bei allen getesteten Peptiden mit steigender Konzentration gezeigt werden. Eine Linearität war dabei nicht darstellbar, was durch die Gegebenheiten der ELISA-Methode begründet werden kann. Da bei allen Peptiden nur sehr geringe Signale in den Negativkontrollen gemessen wurden, binden diese nicht an Polystyrol-Oberflächen. Somit handelt es sich bei den Peptiden GLHTSATNLYLH (JB1), DSQFNKYSIATV (JB2), SGVYKVAYDWQH (JB3), QFDYMRPANDTH (JB4), SNSIDKVNRPIN (JB5) um InIA-bindende Peptide.

Neben FAM-markierten Peptiden wurden außerdem Biotin-verknüpfte Peptide synthetisiert. Der über ein Streptavidin:HRP-Konjugat erfolgte Interaktionsnachweis wurde jedoch durch die Biotin-Markierung beeinträchtigt. Die gemessenen Absorptionssignale waren in diesem System deutlich schwächer (Daten nicht gezeigt). Diese Nachweismethode wurde somit ausgeschlossen und es wurden für die folgenden Experimente ausschließlich FAM-Peptide verwendet.

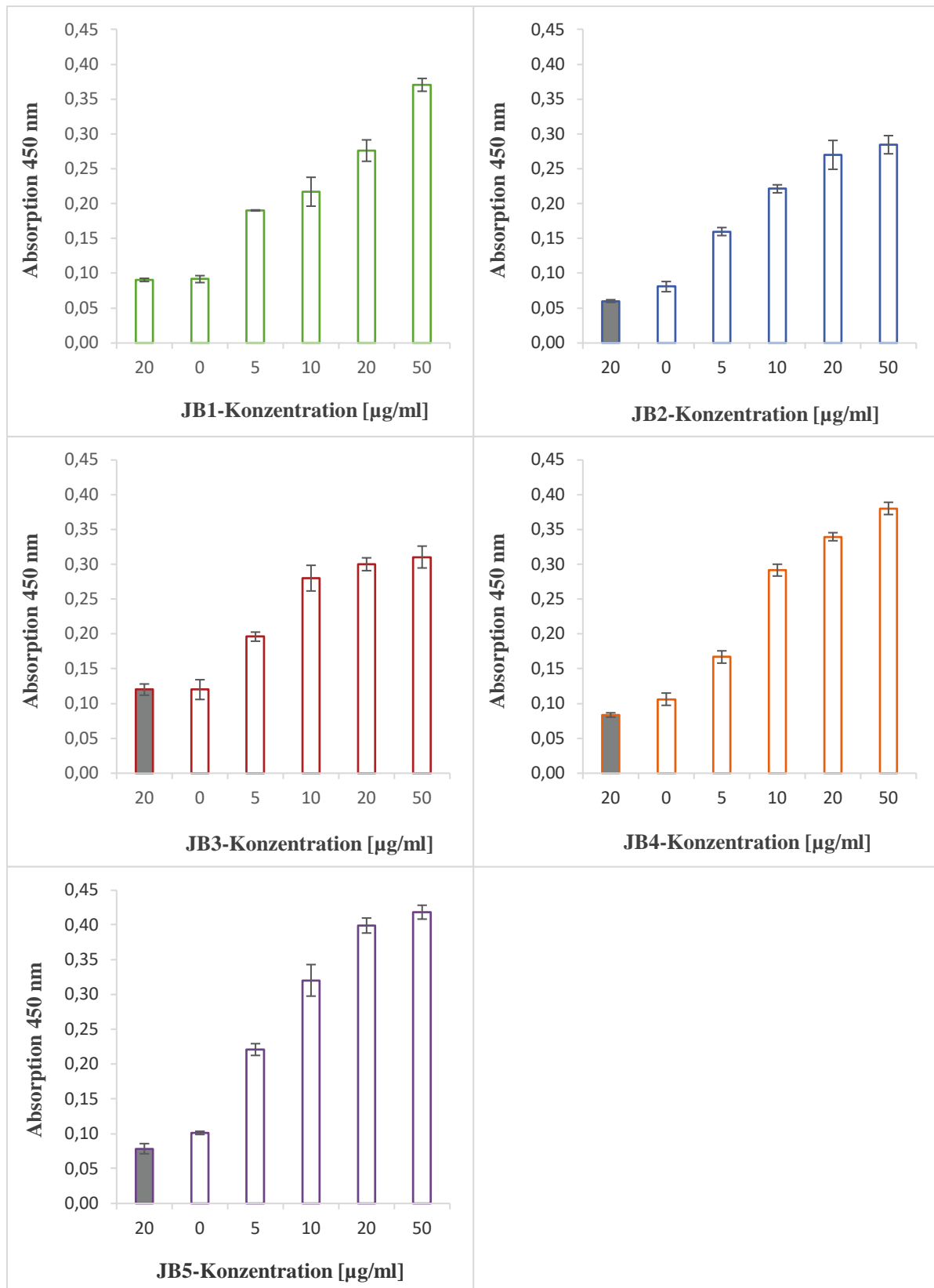


Abbildung 20: Synthetische FAM-markierte Peptide JB1, JB2, JB3, JB4 und JB5 interagieren mit immobilisiertem InIA. 10 µg/ml InIA wurden immobilisiert und mit FAM-Peptiden (0 µg/ml – 50 µg/ml) inkubiert. Wells ohne InIA (gefüllter Balken) dienten als Negativkontrolle. Die Detektion der gebundenen Peptide erfolgte mittels anti-FITC:HRP und Absorptionsmessungen bei 450 nm. Der Versuch erfolgte in Triplikaten. Die Standardabweichungen der gezeigten Mittelwerte sind in Form von Balken dargestellt. JB1: GLHTSATNLYLH, JB2: DSQFNKYSIATV, JB3: SGVYKVAYDWQH, JB4: QFDYMRPANDTH, JB5: SNSIDKVNRPIN.

3.8 Interaktionsnachweis zwischen *L. monocytogenes* und den synthetischen InlA-Peptiden JB1, JB2, JB3, JB4, JB5 mittels ELISA

Konformationsunterschiede zwischen dem rekombinanten InlA-Protein und seiner nativen Struktur auf den Zellen können dazu führen, dass eine bereits gezeigte Bindung zwischen rekombinantem Protein und Peptid möglicherweise bei Bakterienzellen nicht reproduziert werden kann. Im nächsten Schritt sollte daher gezeigt werden, dass die synthetisierten InlA-bindenden Peptide JB1, JB2, JB3, JB4 und JB5 mit nativen Strukturen von *L. monocytogenes* interagieren.

Hierfür wurden zwei unterschiedliche Serotypen (1/2a und 4b) getestet, um eine Serotypbedingte Spezifität auszuschließen. Als Negativkontrolle wurden die Zellen ohne Peptid inkubiert. Die gemessene Absorption repräsentiert die Bindung der jeweiligen Peptide an *L. monocytogenes* und ist in Abbildung 21A dargestellt.

Peptide JB3, JB4 und JB5 zeigten dabei kaum oder keinerlei Interaktion mit dem Bakterium. Hier konnte kein interaktionsspezifisches Signal in Anwesenheit der Peptide im Vergleich zu den Proben ohne Peptid detektiert werden. Die Peptide erwiesen sich für weitere Experimente als nicht geeignet.

Die konzentrationsabhängige Interaktion zwischen *L. monocytogenes* und Peptid JB1 konnte jedoch deutlich visualisiert werden. Die Bindung an *L. monocytogenes* Serotyp 4b war dabei schwächer als an Serotyp 1/2a, aber dennoch vorhanden.

Nach Inkubation mit JB2 wurde eine spezifische Bindung detektiert. Das Interaktionssignal des Peptids stieg mit steigender Peptid-Konzentration und zeigte keinen serotypbedingten Unterschied.

Für weitere Experimente wurden somit die Peptide JB1 und JB2 verwendet.

Zusätzlich wurde ein *Listeria*-unspezifisches Signal ausgeschlossen, indem die Peptide mit *E. coli*-Zellen, die kein InlA exprimieren, inkubiert wurden (Abbildung 21B). Diese wiesen keinerlei Interaktionssignale mit *E. coli* auf, was eine spezifische Interaktion der Peptide mit listerieller extrazellulärer Matrix stützt.

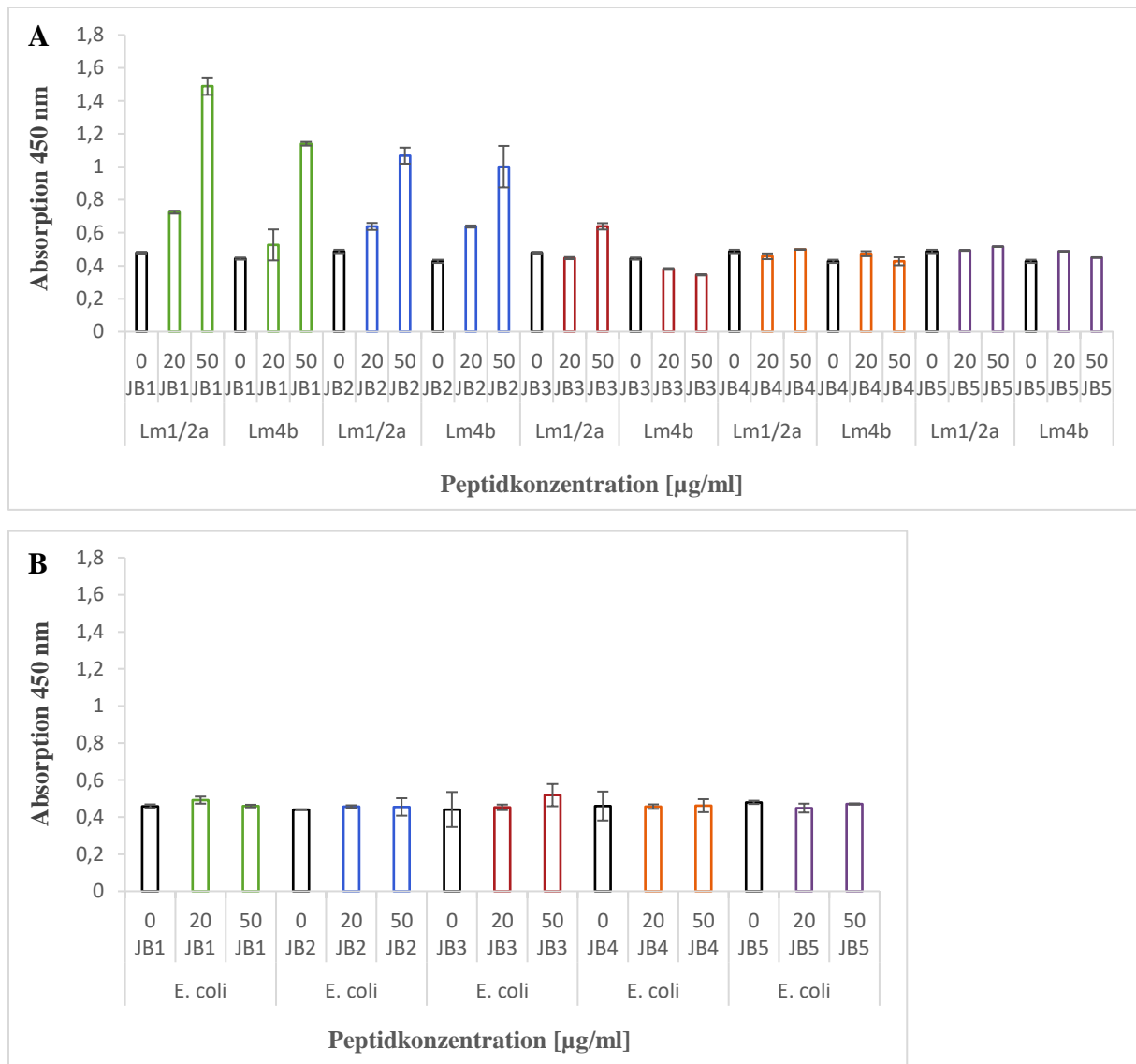


Abbildung 21: Synthetische InIA-bindende Peptide JB1 und JB2 interagieren mit *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* Serotyp 1/2a und 4b (A) und *E. coli* (B) wurde mit FAM-markierten Peptiden JB1 (GLHTSATNLYLH), JB2 (DSQFNKYSIATV), JB3 (SGVYKVAVDWQH), JB4 (QFDYMRPANDTH) und JB5 (SNSIDKVNRPIN) in den Konzentrationen 20 µg/ml und 50 µg/ml bzw. ohne Peptidzugabe inkubiert. Die Detektion der gebundenen Peptide erfolgte mittels anti-FITC:HRP und Absorptionsmessungen bei 450 nm. Der Versuch erfolgte in Dreifachbestimmung und zeigt die Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind in Form von Balken dargestellt.

3.9 Interaktionsnachweis zwischen *L. monocytogenes* und dem synthetischen InIA-Peptid JB1 mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

Als weiterer Nachweis einer Bindung der Peptide JB1 und JB2 an *L. monocytogenes* wurden die Zellen mit JB1-FAM inkubiert und mittels Fluoreszenzmikroskop untersucht. Eine Bindung konnte durch Überlagerung des FAM-Signals und der mit DAPI gefärbten Zellkernen

visualisiert werden (Abbildung 22). Das Ergebnis zeigte, dass die Peptide an die Bakterienzellen binden und bestätigte somit die mittels ELISA detektierte Interaktion.

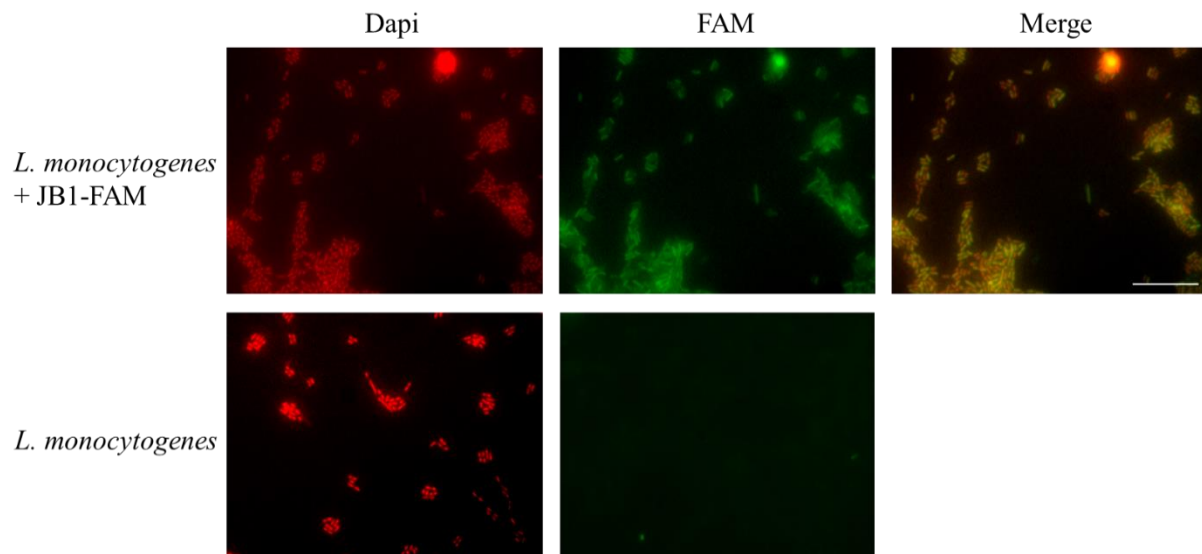


Abbildung 22: Interaktion zwischen *L. monocytogenes* und JB1-FAM ist mikroskopisch nachweisbar. 10^9 *L. monocytogenes*-Zellen (Serotyp 4b) wurden durch Zentrifugation geerntet, mit 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd fixiert, gewaschen und jeweils 30 μ l auf Objektträgern platziert. Nach Inkubation mit 100 μ g/ml JB1-FAM für 1 h bei RT, wurde die DNA mit DAPI (1:1000) gefärbt. Als Negativkontrollen dienten Zellen ohne Peptid-Inkubation. Der eingezeichnete Maßstab (–) entspricht 10 μ m.

3.10 Inhibition der Interaktion zwischen GST-InlA und Ecad durch JB1 und JB2

Die Interaktion zwischen InlA und Ecad ist für *L. monocytogenes* und die Invasion in Wirtszellen essenziell (Lecuit et al., 1997). Ein InlA-bindendes Peptid könnte diese Interaktion durch Blockierung der Bindestelle beeinträchtigen. Dies sollte im folgenden Experiment untersucht werden.

Es wurden unterschiedliche Konzentrationen GST-InlA mit dem jeweiligen Peptid vorinkubiert und anschließend zum immobilisierten Ecad gegeben. Die Bindung von GST-InlA an Ecad wurde mittels anti-GST-Antikörper nachgewiesen. Als Vergleich dienten Proben, in denen GST-InlA ohne Peptid vorinkubiert wurde.

In Abbildung 23 wird deutlich, dass die Interaktion zwischen GST-InlA und Ecad nach Inkubation mit den Peptiden JB1 und JB2 ein schwächeres Signal aufweist. Die gemessene Absorption in den Proben ohne Peptide (leere Balken) stieg wie bereits vorher gezeigt mit steigender GST-InlA-Konzentration. Diese Interaktion war jedoch bei gleichen GST-InlA-

3 Ergebnisse

Konzentrationen nach Inkubation mit JB1 (gefüllte Balken) deutlich geringer. Somit scheint die InIA-Ecad-Interaktion durch die Bindung des Peptids an InIA geschwächt zu werden. Für JB2 konnte dieser Effekt nur bei einer GST-InIA-Konzentration von 3 µg/ml beobachtet werden.

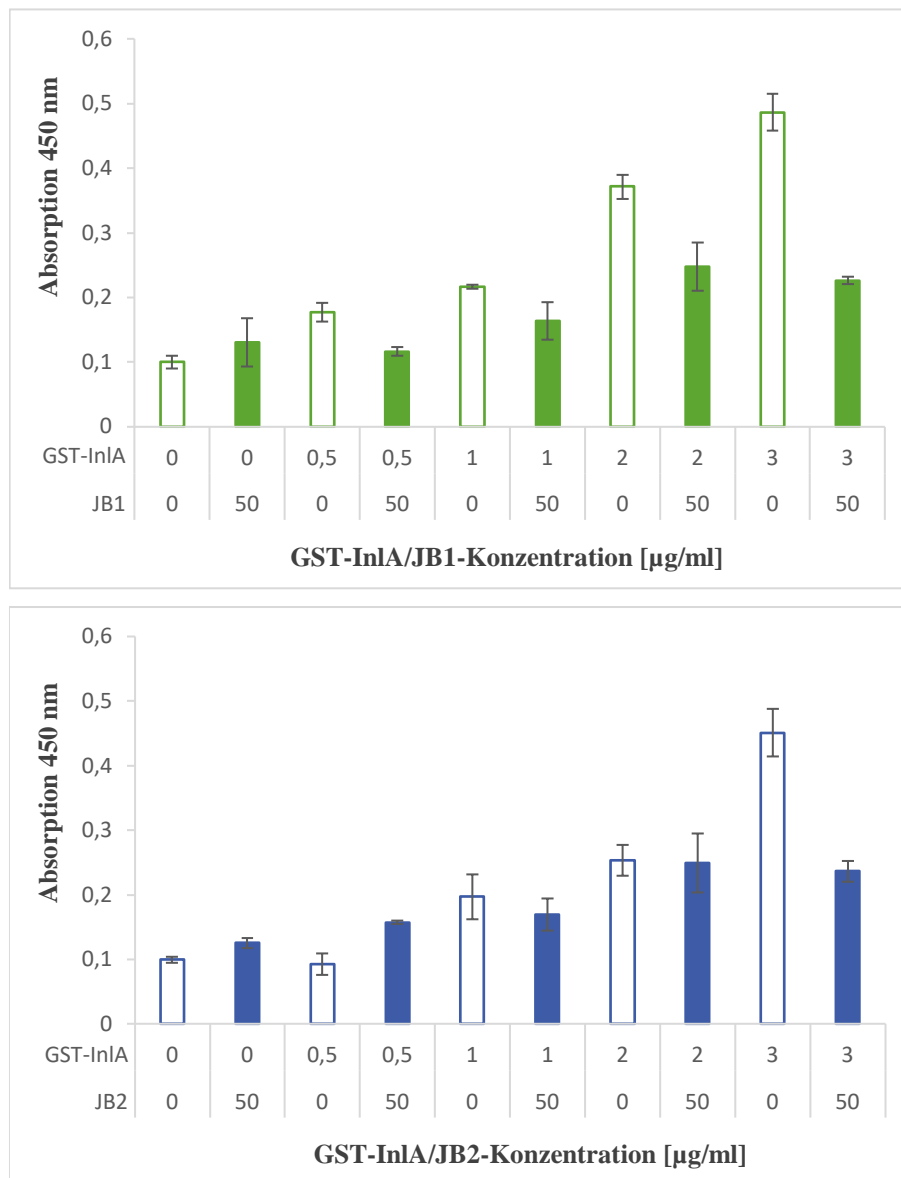


Abbildung 23: InIA-bindende Peptide JB1 und JB2 reduzieren die Interaktion zwischen GST-InIA und Ecad. Unterschiedliche GST-InIA-Konzentrationen (0, 0,5, 1, 2 bzw. 3 µg/ml) wurden mit 50 µg/ml JB1 oder JB2 (gefüllte Balken) bzw. ohne Peptide (leere Balken) vorinkubiert und anschließend zu immobilisiertem Ecad (1 µg/ml) gegeben. An Ecad gebundenes GST-InIA wurde mittels anti-GST-AK und Absorption bei 450 nm detektiert. Das Experiment erfolgte in Dreifachbestimmung. Die Standardabweichungen der gezeigten Mittelwerte sind in Form von Balken dargestellt.

Das Experiment wurde wiederholt, indem die Peptide in steigender Konzentration (5 µg/ml – 100 µg/ml) mit einer konstanten Konzentration an GST-InIA inkubiert wurden (Abbildung 24).

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen GST-InlA und Ecad mit steigender Peptid-Konzentration reduziert wurde. Bei JB1 wurde das minimale Interaktionssignal bereits bei 50 µg/ml JB1 erreicht und zeigte keinen weiteren Unterschied bei 100 µg/ml JB1. Die Inhibition durch JB2 verlief hingegen deutlich schwächer. Hier zeigte sich ein schwächeres Interaktionssignal erst ab 40 µg/ml JB2 und erreichte seinen niedrigsten Wert erst bei 100 µg/ml. JB1 scheint somit das effektivere Peptid zu sein.

Eine FAM-bedingte Beeinträchtigung der GST-InlA-Ecad-Interaktion wurde ebenfalls ausgeschlossen (Abbildung 24B). Somit konnte der hemmende Effekt auf die Bindung des Peptids an GST-InlA zurückgeführt werden.

3 Ergebnisse

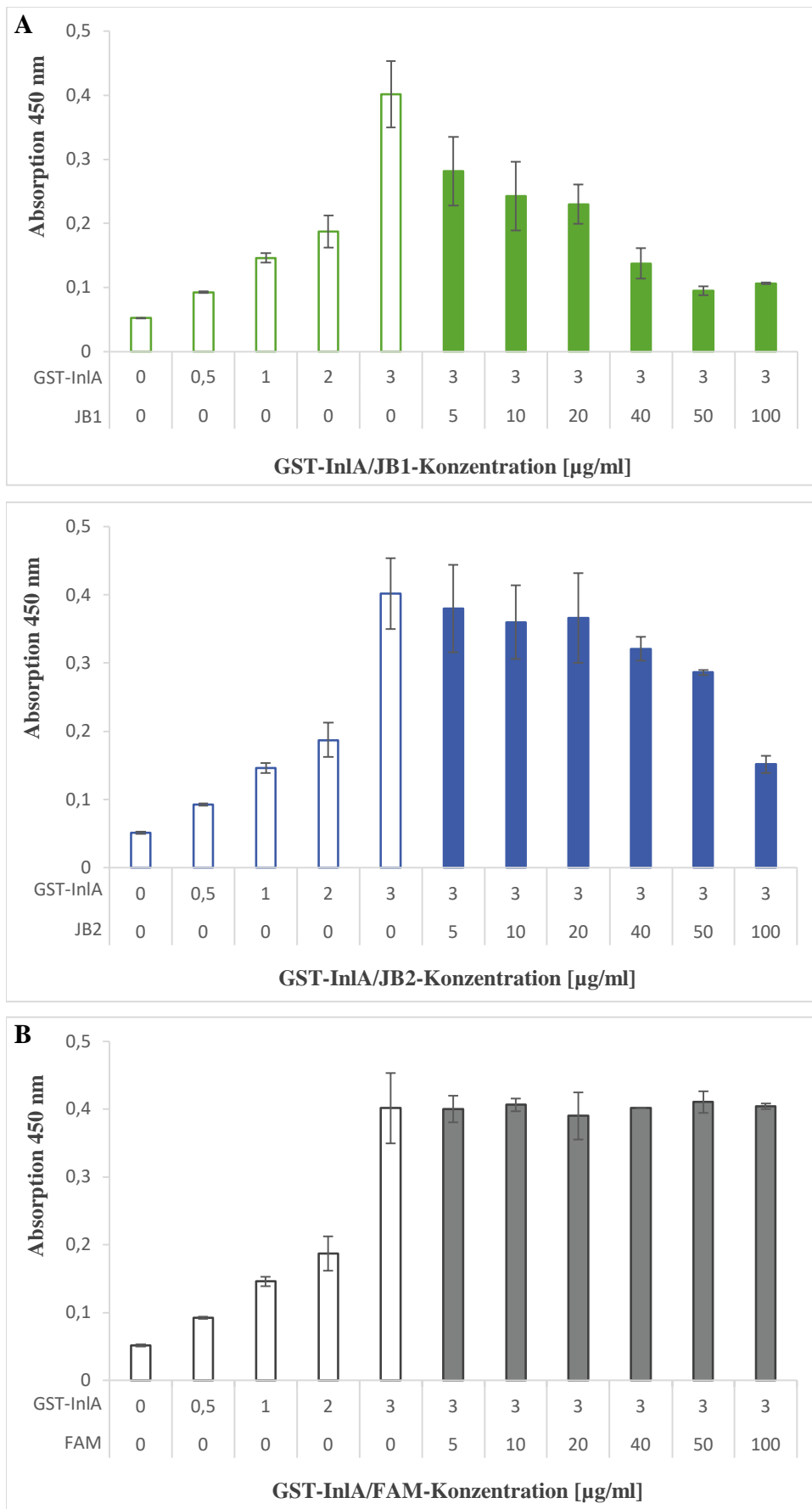


Abbildung 24: InIA-bindende Peptide JB1 und JB2 reduzieren die Interaktion zwischen GST-InIA und Ecad konzentrationsabhängig. GST-InIA-Konzentrationen (0 – 3 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 3 $\mu\text{g/ml}$) wurden ohne Peptide

(leere Balken) bzw. mit 5 – 100 µg/ml JB1 oder JB2 (gefüllte Balken) (A) oder als Negativkontrolle mit FAM (B) vorinkubiert und anschließend zum immobilisiertem Ecad (1 µg/ml) gegeben. An Ecad gebundenes GST-InlA wurde mittels anti-GST-AK und Absorption bei 450 nm detektiert. Der Versuch wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Standardabweichungen der gezeigten Mittelwerte sind in Form von Balken dargestellt.

3.11 Interaktionsnachweis zwischen IGF2R und GST-InlA bzw. GST-InlB

IGF2R wurde bereits als Rezeptor für die Bindung und Invasion von *L. monocytogenes* in hepatische Sternzellen beschrieben (Gasanov et al., 2006). Der listeriale Interaktionspartner ist dabei jedoch nicht bekannt. Durch Phagen-Display identifizierte InlA-bindende Peptide GLHTSATNLYLH (JB1) und SGVYKVVAYDWQH (JB3) wurden von Chen et al. (2015) als IGF2R-bindende Sequenzen publiziert. Da diese Peptidsequenzen außerdem InlA binden (Abbildung 20), liegt die Vermutung nahe, dass IGF2R einen Rezeptor für InlA darstellt und somit die Invasion von Listerien in Wirtszellen ermöglicht.

Diese Annahme wurde mittels ELISA überprüft (Abbildung 25). Dabei wurde die Bindung an InlB ebenfalls getestet. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl GST-InlA als auch GST-InlB mit IGF2R interagiert. Die gemessenen Absorptionen stiegen mit steigender Konzentration der Internaline. Dabei waren die Interaktionssignale von GST-InlB deutlich höher als von GST-InlA. Somit scheint GST-InlB stärker an IGF2R zu binden.

3 Ergebnisse

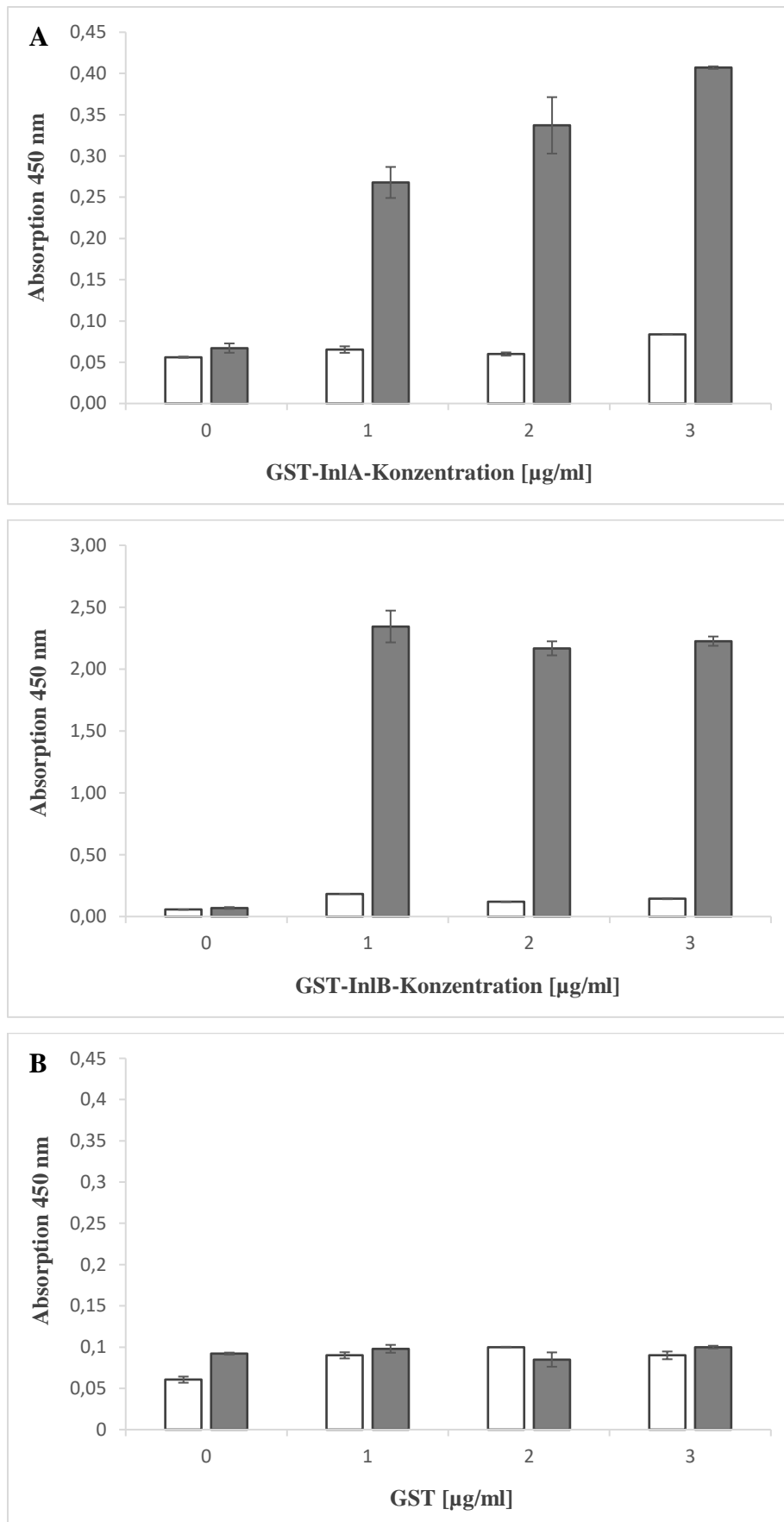


Abbildung 25: IGF2R interagiert mit GST-InlA und GST-InlB. 1 $\mu\text{g/ml}$ IGF2R (schwarze Balken) bzw. *wells* ohne IGF2R (weiße Balken) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen GST-InlA und GST-InlB (A)

inkubiert. Als Negativkontrolle diente die Inkubation mit GST in den gleichen Konzentrationen (B). Die Interaktion von GST-InlA bzw. GST-InlB wurde mit einem gegen GST gerichtetem Antikörper und Absorptionsmessung bei 450 nm visualisiert. Die Durchführung erfolgte in Dreifachbestimmung. Die Standardabweichungen der gezeigten Mittelwerte sind als Balken dargestellt.

3.12 Phagen-Display zur Selektion InlB-bindender Peptide

Die Selektion InlB-bindender Peptide mittels Phagen-Displays erfolgte unter Verwendung des rekombinanten InlB(36-321) (Abbildung 15) und 10^{11} pfu der Phagen-Bibliothek Ph.D.-12 (New England Biolabs, Frankfurt a. M., Germany). Gebundene Phagen wurden eluiert und angereichert. Es wurden insgesamt vier Selektionsrunden durchgeführt. Nach jeder Panningrunde wurde der *Input*- und *Output*-Titer bestimmt. Anhand dessen wurde das Volumen für die nächste Panningrunde errechnet, um in jeder Runde die gleiche Menge an Phagen einzusetzen.

3.12.1 Selektion InlB-bindender Phagenklone

Nach erfolgten Selektionsrunden gegen InlB wurden die vier amplifizierten Phageneluate auf ihre InlB-Spezifität getestet, indem sie separat mit immobilisiertem InlB inkubiert wurden (Abbildung 26). In allen vier Eluaten zeigten die Phagen eine geringere Bindungsaffinität zur Polystyrol-Oberfläche (NK) als zu InlB. Dennoch waren die Signalunterschiede zwischen Negativkontrolle und InlB relativ gering, so dass von einer Anreicherung möglicher Plastikbinder ausgegangen werden musste. Diese können im folgenden Einzelphagen-ELISA identifiziert und ausgeschlossen werden.

Da die Phagen der vierten Panningrunde die höchste Bindungsaffinität aufwiesen, wurden von diesem Eluat Einzelphagen separiert und getestet (Abbildung 27).

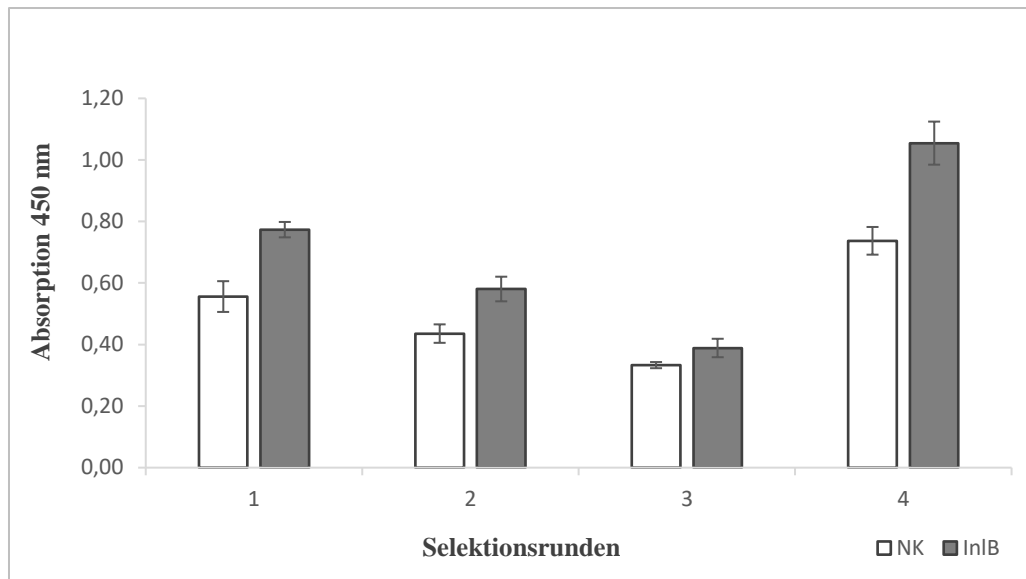


Abbildung 26: Bindungsaffinität der Phageneluats des Phagen-Displays gegen InlB. Es wurden 100 µg/ml InlA immobilisiert. Als Negativkontrolle (NK) dienten *wells* ohne InlA. Der anschließenden Inkubation mit den amplifizierten Eluaten der vier Selektionsrunden folgten sechs Waschschritte. Die Bindung der Phagen an InlB bzw. die Polystyrol-Oberfläche (NK) wurde mittels anti-M13:HRP und Absorptionsmessung bei 450 nm detektiert. Die Durchführung erfolgte in Doppelbestimmung. Gezeigt sind die Mittelwerte. Die Standardabweichung ist in Form von Balken dargestellt.

Hierfür wurde *E. coli* mit dem Phageneluat der vierten Selektionsrunde infiziert und auf IPTG/Xgal/LB-Platten ausplattiert. Damit ließen sich Einzelphagen, die einzelne Peptidsequenzen auf ihrer Oberfläche präsentieren, separieren. Die einzelnen Klone wurden angereichert und auf ihre Bindungsaffinität für InlB überprüft (Abbildung 27).

Phagenklone, die eine Bindung zur Polystyrol-Oberfläche aufwiesen (beispielsweise Nr. 11, Nr. 20) sowie Phagenklone, die nur sehr schwach an InlB zu binden schienen (beispielsweise Nr. 7, Nr. 22), wurden für den weiteren Verlauf ausgeschlossen. Einzelphagenklone, deren Peptid eine deutliche Bindungsaffinität zu InlB zeigte (Nr. 2, Nr. 3), sind potentielle Kandidaten für InlB-Binder. Die ssDNA dieser Phagenklone wurde isoliert und die bindende Peptidsequenz mittels Sequenzierung analysiert. In Summe wurden über 100 Phagenklone getestet und 19 positive Kandidaten mit der höchsten InlB-Affinität für die ssDNA-Sequenzierung ausgewählt.

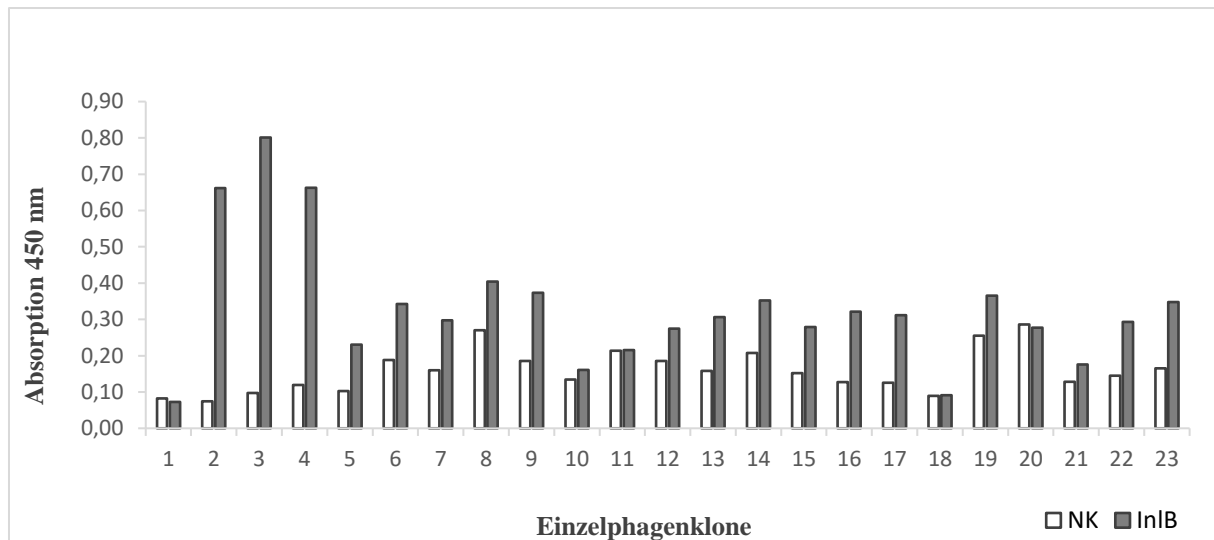


Abbildung 27: Identifizierung InIB-bindender Einzelphagen mittels Einzelphagen-ELISA. Es wurden jeweils 100 µg/ml InIB oder als Negativkontrolle (NK) *wells* ohne InIB separat mit Einzelphagen inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde die Bindung der Phagenklone an InIB bzw. die NK mittels anti-M13:HRP und Absorptionsmessung bei 450 nm detektiert. Es wurden insgesamt 100 Klone überprüft, davon sind 23 exemplarisch dargestellt.

3.12.2 Sequenzierung einzelsträngiger Phagen-DNA zur Identifizierung InIB-bindender Peptide

Zur Identifizierung von InIB-bindenden Peptidsequenzen wurden Phagenklone, die sich als positiv erwiesen (siehe 3.12.1), angereichert und die einzelsträngige Phagen-DNA isoliert. Die durch DNA-Sequenzierung erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden in Aminosäuresequenzen translatiert und somit die Peptidsequenzen, die auf der Oberfläche der positiven Phagenklone präsentiert wurden, ermittelt. Elf ausgewertete Sequenzierungen ergaben drei unterschiedliche Peptidsequenzen. Diese sind mit ihren Häufigkeiten, der jeweiligen Nettoladung, hydrophoben Eigenschaft und dem Molekulargewicht in Tabelle 3 zusammengefasst (errechnet mittels Antimicrobial Peptide Database – Calculator and Predictor). Die Sequenzen erhielten zur Vereinfachung nummerierte Bezeichnungen.

Die Datenbankrecherche (MimoBLAST, MimoSearch) ergab keine Übereinstimmungen mit bereits bekannten oder möglichen falsch positiven Sequenzen.

Tabelle 3: Mittels Phagen-Display gegen InlB selektionierte Peptidsequenzen. Die Sequenzen wurden mittels ssDNA-Sequenzierung ermittelt. Gezeigt sind die Häufigkeiten der identifizierten Sequenzen von elf auswertbaren Sequenzierungen sowie deren durch *Antimicrobial Peptide Database* ermittelte Nettoladung, Hydrophobizität und das Molekulargewicht (MW). Den Sequenzen wurde eine nummerierte Bezeichnung zugeordnet.

Nr.	Sequenz	Häufigkeit	Nettoladung	Hydrophobizität	MW (Da)	Bezeichnung
1	YSLRLTSVTAPT	3/11	+1	33 %	1302.499	JB6
2	SHHYRGHDPNLF	7/11	0	16 %	1473.579	JB7
3	LTPHKHHKHLHA	1/11	+2	25 %	1449.681	JB8

3.12.3 Bindungsaffinität der positiven Phagenklone

Vor der Peptidsynthese wurde die Bindungsaffinität der nach Sequenzierung positiven InlB-bindenden Phagenklonen erneut verifiziert, indem die gleiche Menge an Phagen (3×10^{10} pfu) im ELISA mit immobilisiertem InlB eingesetzt wurde. Die pfu wurde vorher für jeden amplifizierten Phagenklon einzeln bestimmt. Detektiert wurde im ELISA mit einem anti-M13:HRP. Die erhaltene Signalintensität war somit proportional zur Menge des gebundenen, HRP-konjugierten Antikörpers und damit proportional zur Menge der bindungs-affinen Phagen in jeder Phagenklon-Suspension. Alle drei Phagenklone wiesen eine deutlich höhere Bindungsaffinität zu InlB als zur Polystyrol-Oberfläche oder BSA auf, so dass Peptide mit Affinität zur Polystyrol-Oberfläche ausgeschlossen werden konnten (Abbildung 28). Das höchste Signal wurde dabei beim Phagenklon mit der Peptidsequenz JB8 detektiert. Die Peptidsequenz LTPHKHHKHLHA schien somit am stärksten an InlB zu binden. Wie bereits unter 3.6.4 bereits beobachtet, zeigte sich auch hier, dass nur der Einsatz der gleichen pfu-Menge einen Vergleich der einzelnen Phagenklone untereinander zulässt. Im Einzelphagen-ELISA entsprach Klon Nr. 23 der Phagen-präsentierenden Sequenz JB8 (Abbildung 27). Das gemessene Signal war dabei deutlich niedriger als von Klon Nr. 4, welches den Phagenklon mit der Sequenz JB6 repräsentiert. Unter Verwendung der gleichen pfu-Menge zeigte sich allerdings, dass JB8 eine deutlich stärkere Affinität zu InlB aufweist als JB6 (Abbildung 28).

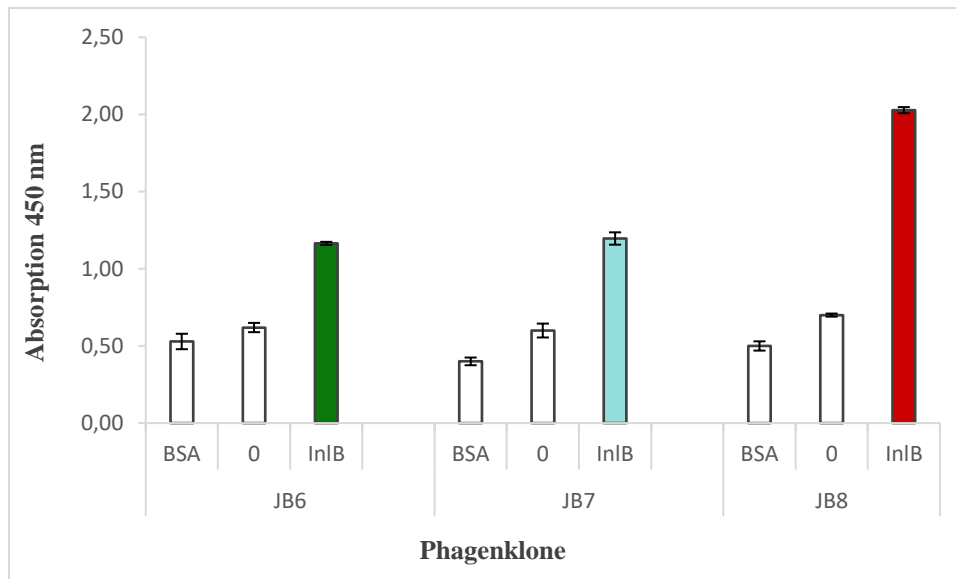


Abbildung 28: Die nach Sequenzierung als positiv erwiesenen Peptid-präsentierenden Einzelphagenklone zeigen eine hohe Bindungsaffinität für InIB in Vergleich zu den Negativkontrollen (0 µg/ml InIB bzw. BSA). 1 µg InIB, *wells* ohne InIB bzw. 5 % BSA wurden mit 3×10^{10} pfu pro Phagenklon inkubiert. Waschschrinen folgte eine Detektion der gebundenen Phagen mittels anti-M13:HRP und Absorptionsmessung bei 450 nm. Die erhaltene Signalintensität war dabei proportional zur Menge des gebundenen, HRP-konjugierten Antikörpers und somit proportional zur Menge der bindungsaffinen Phagen in der jeweiligen Probe. Die Standardabweichung der Mittelwerte (Dreifachbestimmung) ist in Form von Balken dargestellt. JB6: YSLRLTSVTAPT, JB7: SHHYRGHDPNLF, JB8: LTPHKHHKHLHA.

Da alle drei Phagen-präsentierten Peptidsequenzen eine InIB-Affinität aufwiesen, wurden diese für weitere Experimente als FAM-Peptide synthetisiert.

3.13 Interaktionsnachweis zwischen rekombinantem InIB und synthetischen Peptiden JB6, JB7, JB8

Die Sequenzen YSLRLTSVTAPT (JB6), SHHYRGHDPNLF (JB7) und LTPHKHHKHLHA (JB8) wurden als FAM-markierte Peptide synthetisiert. Die Interaktion zwischen diesen synthetischen Peptiden und InIB sollte im nächsten Schritt gezeigt werden.

Hierfür wurde InIB immobilisiert und mit dem jeweiligen Peptid in steigender Konzentration inkubiert. Detektiert wurde mittels anti-FAM:HRP und Absorptionsmessung bei 450 nm. Als Negativkontrolle dienten *wells* ohne InIB mit 20 µg/ml Peptid. Eine Interaktion mit InIB konnte bei allen getesteten Peptiden detektiert werden (Abbildung 29). Bei den Negativkontrollen wurde eine sehr niedrige Absorption gemessen. Somit binden die Peptide nicht an die Polystyrol-Oberfläche. Bei den Peptiden YSLRLTSVTAPT (JB6), SHHYRGHDPNLF (JB7), LTPHKHHKHLHA (JB8) handelt es sich demnach um InIB-bindende Peptide.

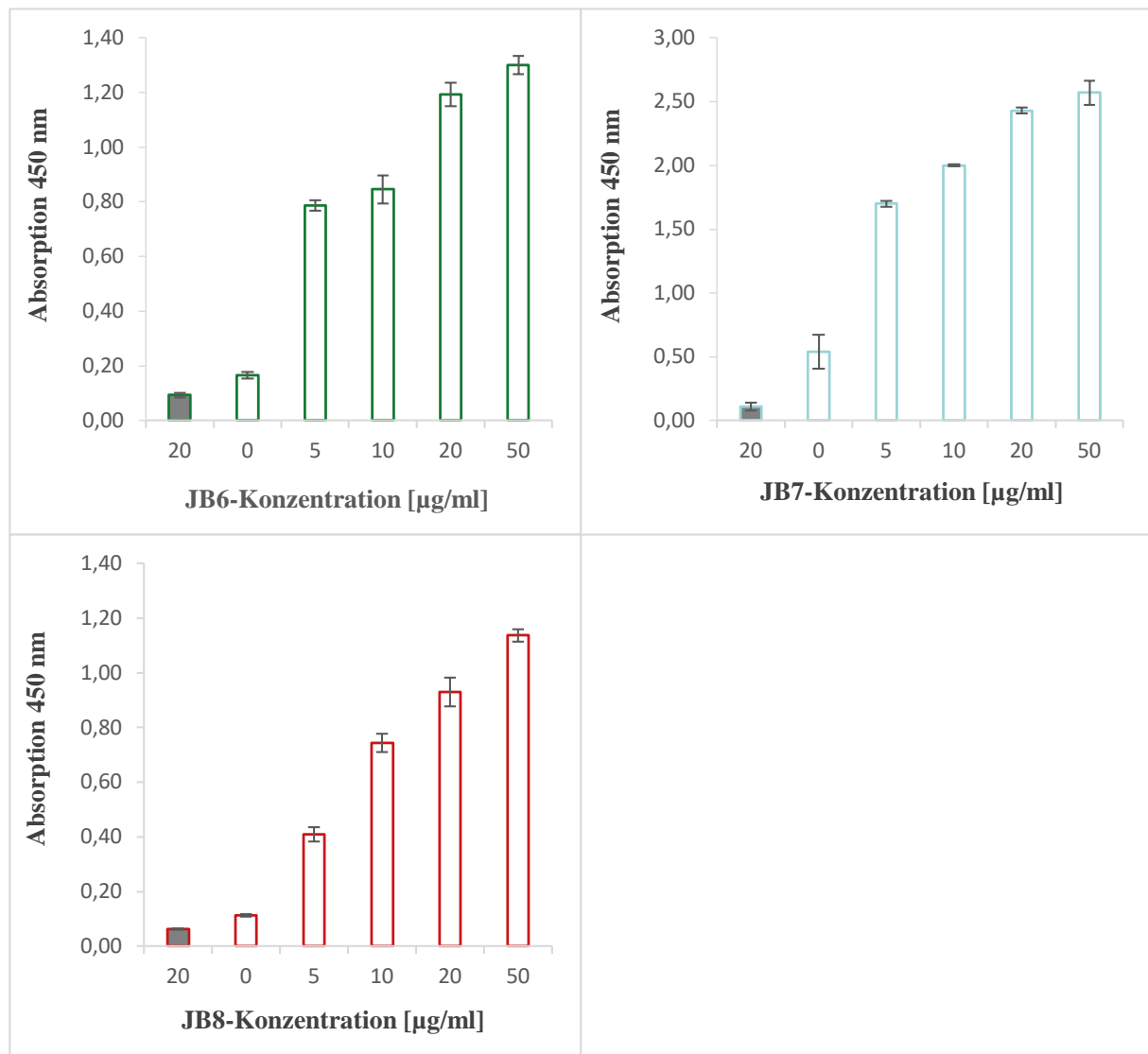


Abbildung 29: Synthetische FAM-markierte Peptide JB6, JB7 und JB8 interagieren mit immobilisiertem InlB. 10 µg/ml InlB (leere Balken) bzw. wells ohne InlB (gefüllter Balken) wurden mit FAM-Peptiden (0 µg/ml – 50 µg/ml) inkubiert. Die Detektion der gebundenen Peptide erfolgte mittels anti-FAM:HRP und Absorptionsmessungen bei 450 nm. Der Versuch erfolgte in Triplikaten. Die Standardabweichungen der Mittelwerte sind in Form von Balken dargestellt. JB6: YSLRLTSVTAPT, JB7: SHHYRGHDPNLF, JB8: LTPHKHHKHLHA.

3.14 Interaktionsnachweis zwischen *L. monocytogenes* und den synthetischen InlB-Peptiden JB6, JB7, JB8

Die Bindung der synthetisierten InlB-bindenden Peptide an ganze Zellen *L. monocytogenes* (Serotyp 4b und 1/2a) sollte im nächsten Schritt überprüft werden. Hierfür wurde das Bakterium mit den jeweiligen Peptiden inkubiert und die Interaktion mittels Absorptionsmessung verifiziert (Abbildung 30). Trotz seiner vorher gezeigten Bindung an InlB (Abbildung 29),

konnte eine Interaktion zwischen Peptid JB7 und *L. monocytogenes* nicht detektiert werden (Abbildung 30). Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte eine erhöhte Absorption und somit eine Bindung des Peptids JB6 an das Bakterium beider Serotypen detektiert werden. Hierbei wurde nur ein relativ schwaches Interaktionssignal gemessen. Die Interaktion zwischen Peptid JB8 und *L. monocytogenes* war jedoch deutlicher ausgeprägt und zeigte einen Absorptionswert von $A_{450} > 2$ bei einer Peptidkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Diese wurde Serotyp-unabhängig detektiert. Somit handelte es sich bei JB8 um ein für weitere Experimente geeignetes Peptid, das eine Affinität für sowohl rekombinantes InIB als auch für *L. monocytogenes* aufweist.

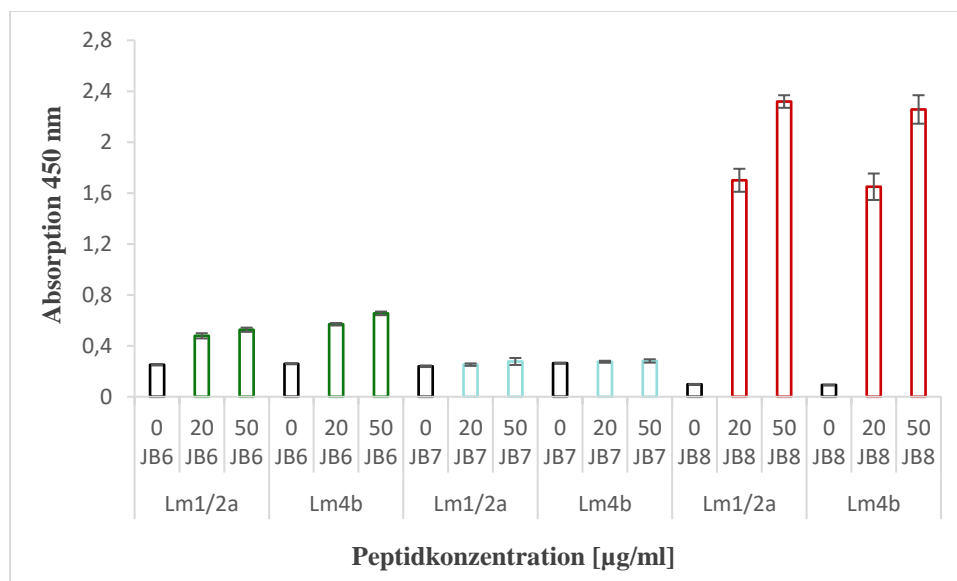


Abbildung 30: Synthetische InIB-bindende Peptide JB6 und JB8 interagieren mit *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* Serotyp 1/2a und 4b wurde mit FAM-markierten Peptiden JB6 (YSLRLTSVTAPT), JB7 (SHHYRGHDPNLF) und JB8 (LTPHKHHKHLHA) in den Konzentrationen 20 $\mu\text{g/ml}$ und 50 $\mu\text{g/ml}$ bzw. ohne Peptidzugabe inkubiert. Die Detektion der gebundenen Peptide erfolgte mittels anti-FITC:HRP und Absorptionsmessungen bei 450 nm. Der Versuch erfolgte in Dreifachbestimmung. Die Standardabweichungen der gezeigten Mittelwerte sind in Form von Balken dargestellt.

3.15 MHK-Bestimmung von Hopfeninhaltsstoffen auf *L. monocytogenes*

Um eine geeignete Hopfenkomponente für die Verknüpfung mit einem InIB-bindenden Peptid auszuwählen, wurde die minimale Hemmkonzentration von drei Substanzen bestimmt. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) wird als die minimale Konzentration einer Substanz, bei der kein bakterielles Wachstum detektiert werden kann, festgelegt. Diese wird durch Messungen des Bakterienwachstums in Anwesenheit der Komponente über mehrere Stunden ermittelt.

In diesem Experiment sollten unterschiedliche Hopfeninhaltsstoffe getestet werden und die Substanz mit der niedrigsten MHK für die synthetische Kopplung mit den *Listeria*-spezifischen Peptiden ausgewählt werden.

Hierfür wurden Vorexperimente durchgeführt, um die optimalen Bedingungen zu bestimmen. Hopfenbittersäuren zeigen eine höhere Wirkung bei niedrigeren pH-Werten und höheren Temperaturen. Daher wurden unterschiedliche pH-Werte und Temperaturen untersucht, bei denen die Wirkung der Substanzen gesteigert, das Wachstum des Bakteriums jedoch nicht eingeschränkt ist (Daten nicht gezeigt). Als optimale Versuchsbedingungen wurden eine Temperatur von 30 °C und ein pH-Wert des Mediums von pH = 6,0 ausgewählt. Beide Parameter wurden für die nachfolgenden MHK-Experimente eingestellt.

Zusätzlich wurde die ungefähre Wirkkonzentration der jeweiligen Substanz vorab mittels Plattendiffusionstest bestimmt, um den Bereich der zu testenden Konzentrationen einzuschränken (Daten nicht gezeigt).

3.15.1 MHK-Bestimmung von Hulupinsäure

L. monocytogenes wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen Hulupinsäure inkubiert und das Bakterienwachstum verfolgt. Dabei wurde die Eigenabsorption des Mediums und der Hulupinsäure in der jeweiligen Konzentration ebenfalls gemessen und von den entsprechenden Werten abgezogen. In Abbildung 31 sind die jeweiligen Wachstumskurven dargestellt. Durch den Vergleich mit der Wachstumskontrolle (0 µg/ml Hulupinsäure) wird deutlich, dass das Wachstumsverhalten des Bakteriums durch die Hulupinsäure nicht signifikant beeinträchtigt wird. Eine leichte Hemmung des Wachstums ist erst bei vergleichsweise sehr hohen Konzentrationen von 1000 µg/ml erkennbar. Somit wurde die Substanz für weitere Experimente ausgeschlossen.

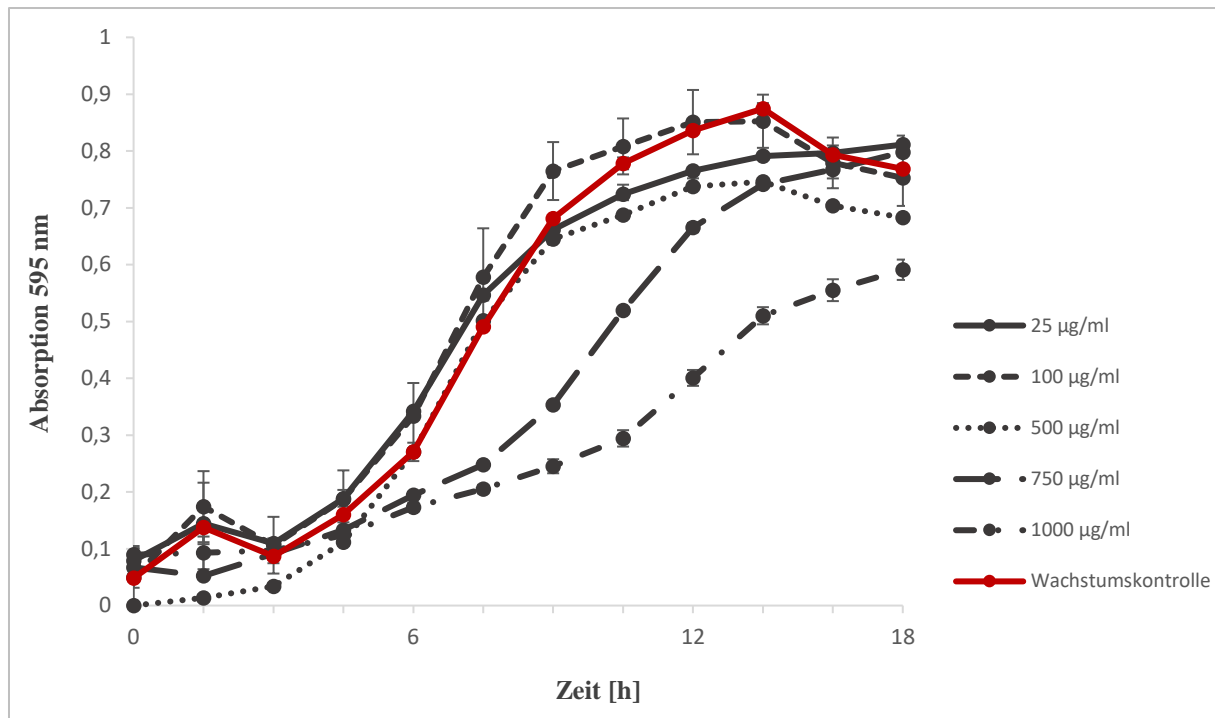


Abbildung 31: Wachstumskurve von *L. monocytogenes* in Anwesenheit von Hulupinsäure. 5×10^6 Zellen *L. monocytogenes* in BHI (pH 6,0) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Hulupinsäure (25 µg/ml – 1000 µg/ml) bzw. ohne Hulupinsäure für 18 h bei 30 °C inkubiert. Das Wachstum wurde alle 20 min mittels Absorptionsmessung bei 595 nm verfolgt. Als Blindwert wurden die Eigenabsorption des Mediums bzw. der jeweiligen Hulupinsäure-Konzentrationen im Medium gemessen und von den entsprechenden Werten abgezogen. Aufgetragen wurden die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. Die Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

3.15.2 MHK-Bestimmung von Xanthohumol

Die MHK von Xanthohumol auf *L. monocytogenes* wurde durch Inkubation der Bakterienzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Hopfenkomponente bestimmt. Die Absorptionsmessung bei 595 nm erfolgte für 18 h alle 20 min. Mit steigenden Xanthohumol-Konzentrationen wurde das Wachstum der Listerienzellen gehemmt. Die Konzentration, bei der kein Wachstum mehr erfolgte, wurde als die MHK festgelegt und lag für Xanthohumol bei 2,5 µg/ml (Abbildung 32).

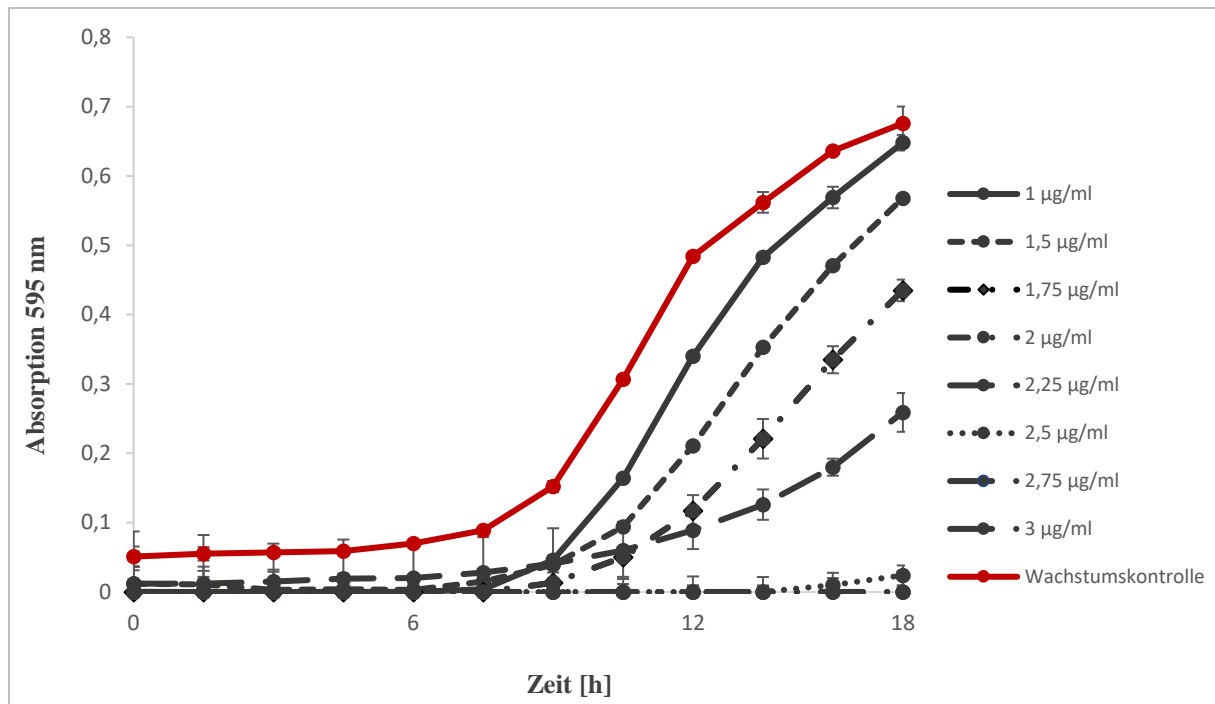


Abbildung 32: Minimale Hemmkonzentration von Xanthohumol auf *L. monocytogenes* liegt bei 2,5 µg/ml. 5×10^6 Zellen *L. monocytogenes* in BHI (pH 6,0) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Xanthohumol (1 µg/ml – 3 µg/ml) bzw. ohne Xanthohumol für 18 h bei 30 °C inkubiert. Das Wachstum wurde alle 20 min mittels Absorptionsmessung bei 595 nm verfolgt. Als Blindwert wurden die Eigenabsorption des Mediums bzw. der jeweiligen Xanthohumol-Konzentrationen im Medium gemessen und von den dazugehörigen Werten abgezogen. Aufgetragen wurden die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. Die Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

3.15.3 MHK-Bestimmung von Lupulon

L. monocytogenes wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen Lupulon (Gemisch aus Lupulon und Colupulon) inkubiert und das Wachstum mittels Absorptionsmessungen bei 595 nm verfolgt (Abbildung 33). Die MHK von Lupulon lag dabei bei 2,25 µg/ml, da bei dieser Konzentration kein weiteres Wachstum der Bakterien gemessen werden konnte.

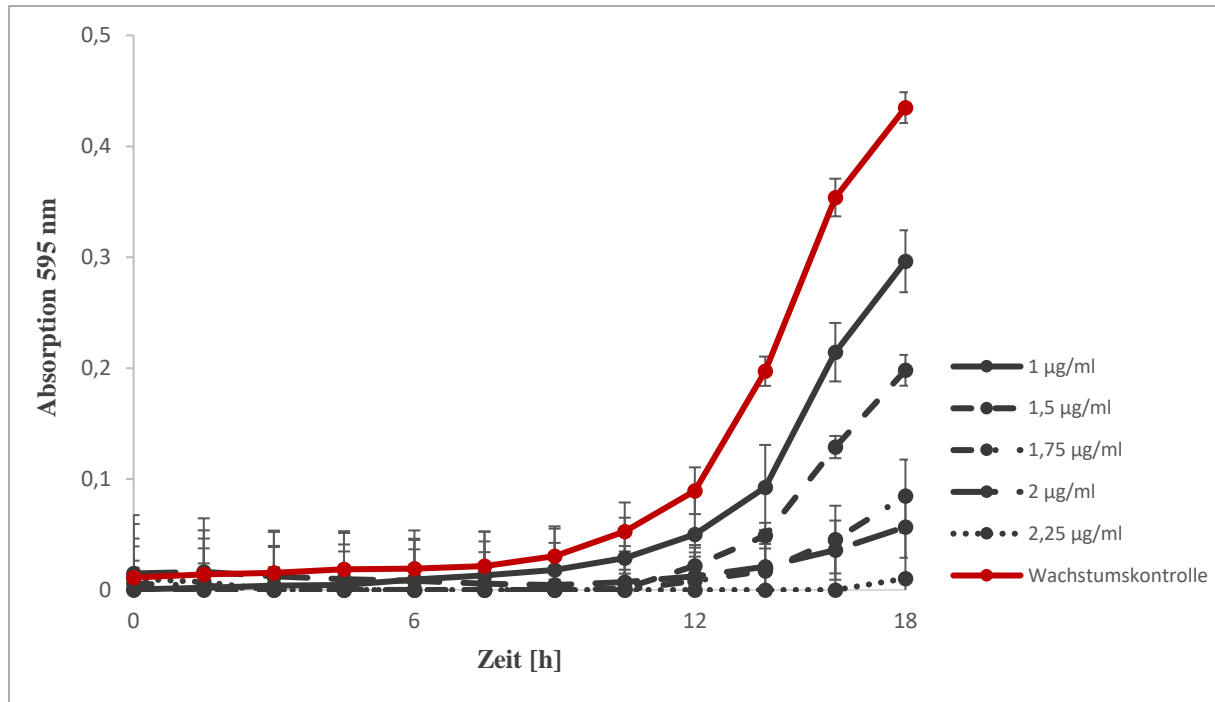


Abbildung 33: Minimale Hemmkonzentration von Lupulon auf *L. monocytogenes* liegt bei 2,25 µg/ml. 5×10^6 Zellen *L. monocytogenes* in BHI (pH 6,0) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Lupulon (1 µg/ml – 2,25 µg/ml) bzw. ohne Lupulon für 18 h bei 30 °C inkubiert. Das Wachstum wurde alle 20 min mittels Absorptionsmessung bei 595 nm verfolgt. Als Blindwert wurden die Eigenabsorption des Mediums bzw. der jeweiligen Lupulon-Konzentrationen im Medium gemessen und von den entsprechenden Werten abgezogen. Aufgetragen wurden die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. Die Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

3.15.4 Toxizität der Internalin-bindenden Peptide

Um eine antimikrobielle Wirkung der selektionierten InIA- bzw. InIB-bindenden Peptide zu prüfen, wurden diese mit *L. monocytogenes* über einen Zeitraum von 18 h inkubiert und das Wachstum des Bakteriums aufgezeichnet. Trotz einer hohen eingesetzten Konzentration von 100 µg/ml zeigten sowohl InIA-bindende (Abbildung 34 A) als auch InIB-bindende (Abbildung 34 B) Peptide keinen Einfluss auf das Bakterienwachstum. Antimikrobielle Eigenschaften der Peptide konnten somit ausgeschlossen werden.

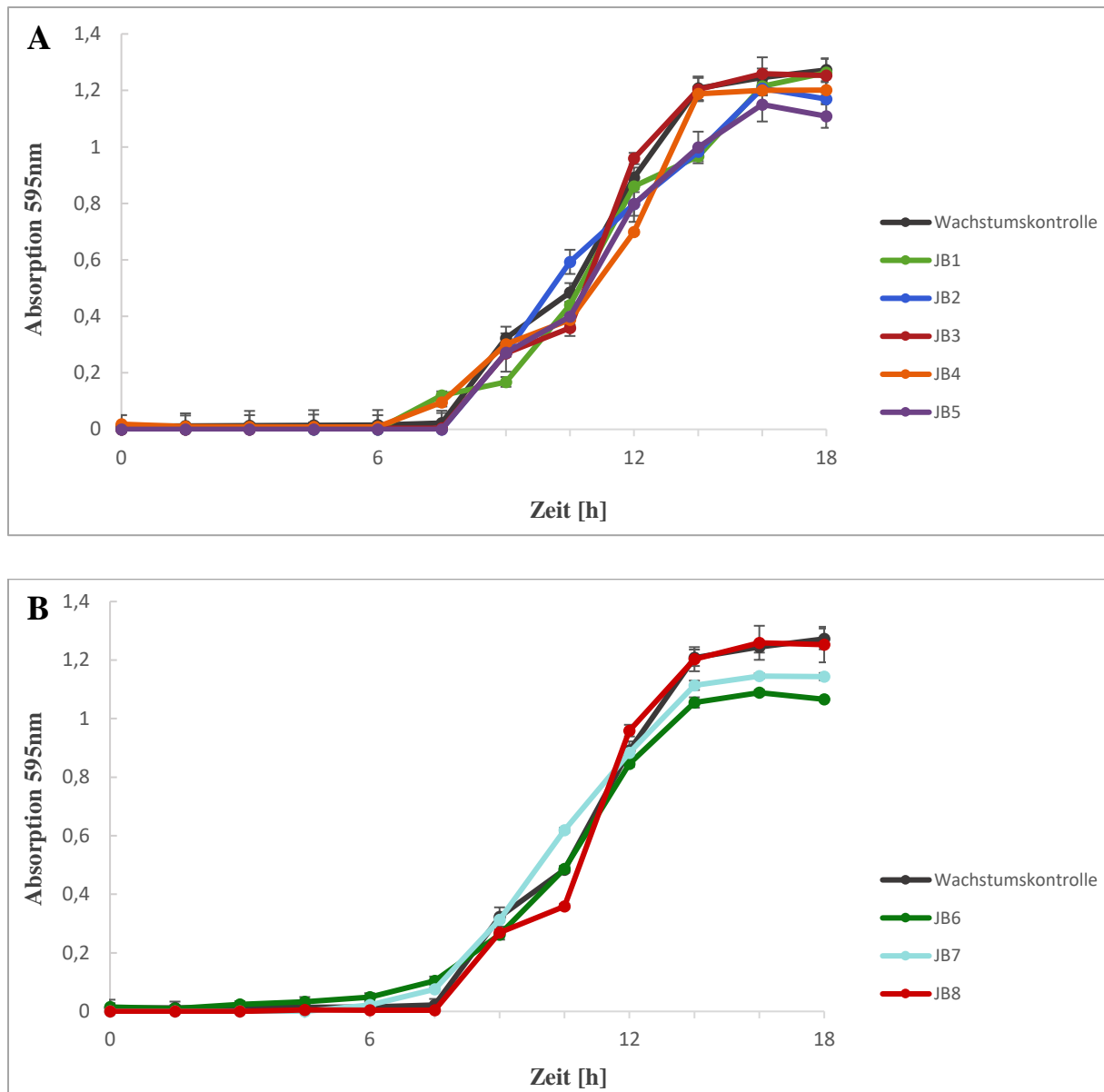


Abbildung 34: InLA- und InLB-bindende Peptide zeigen keine antimikrobielle Wirkung auf *L. monocytogenes*. 5×10^6 Zellen *L. monocytogenes* in BHI (pH 6,0) wurden mit 100 $\mu\text{g/ml}$ (A) JB1, JB2, JB3, JB4, JB5 bzw. (B) JB6, JB7, JB8 bzw. ohne Peptid für 30 °C inkubiert. Das Wachstum wurde 18 h alle 20 min mittels Absorptionsmessung bei 595 nm verfolgt. Als Blindwert wurde die Eigenabsorption des Mediums bzw. der Peptide im Medium gemessen und von den entsprechenden Werten abgezogen. Aufgetragen wurden die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. Die Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

3.16 MHK-Bestimmung der Xanthohumol-Peptid-Konjugate

Für die Synthese eines Konjugats aus Hopfenkomponente und Peptid wurden die selektierten Peptide JB1 (InLA-gerichtet) und JB8 (InLB-gerichtet) aufgrund ihrer hohen Bindungsaffinität zum entsprechenden Oberflächenprotein auf *L. monocytogenes* ausgewählt (siehe 3.8, 3.14). Sowohl Xanthohumol als auch Lupulon zeigten eine relativ geringe MHK

(siehe 3.15.2, 3.15.3). Xanthohumol ist allerdings in Reinform kommerziell erhältlich und ist laut Hersteller stabiler, so dass die Verknüpfung mit diesem Hopfeninhaltsstoff erfolgen sollte. Die Konjugation erfolgte als Auftragsarbeit über einen Ttds (*trioxatridecansuccinamic acid*)-Cystein-Linker. Dabei wurde das Cystein an eine Doppelbindung des Xanthohumols gekoppelt. Die MHK der Konjugate wurde bestimmt und mit der MHK des Xanthohumols verglichen (Abbildung 35). Dabei wurden die Substanzen analog der vorher bestimmten MHK von Xanthohumol eingesetzt (vgl. 3.15.2). 2,5 µg/ml Xanthohumol entsprachen dabei einer Molarität von 7,1 mM, 3 µg/ml entsprachen 8,5 mM Xanthohumol.

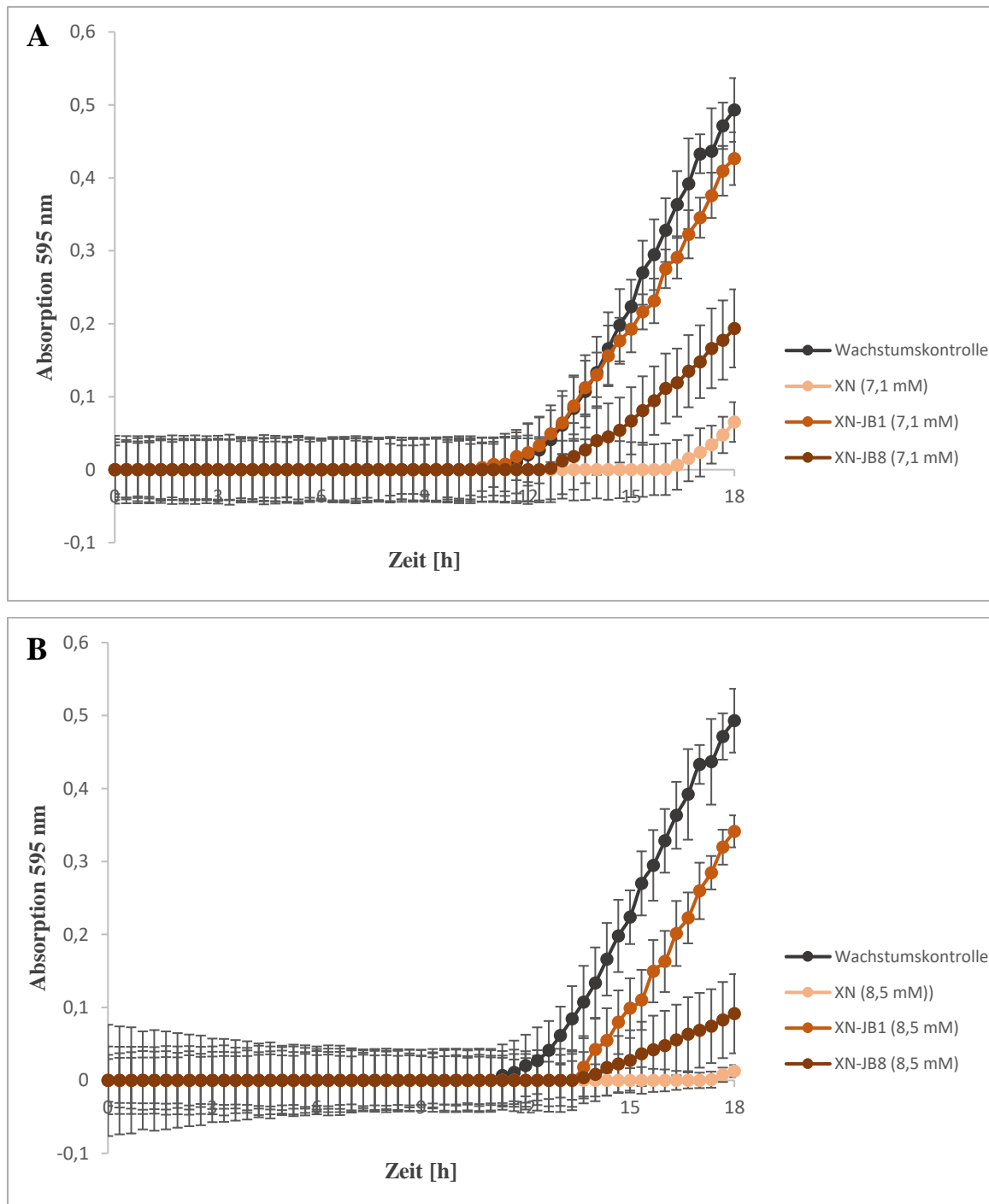


Abbildung 35: Minimale Hemmkonzentration von Xanthohumol (XN) durch die Verkopplung mit den Peptiden JB1 (XN-JB1) und JB8 (XN-JB8) deutlich erhöht. 5×10^6 Zellen *L. monocytogenes* in BHI (pH 6,0) wurden mit A) je 7,1 mM bzw. B) je 8,5 mM Xanthohumol, Xanthohumol-JB1 bzw. Xanthohumol-JB8 für 18 h bei 30 °C inkubiert. Das Wachstum wurde alle 20 min mittels Absorptionsmessung bei 595 nm verfolgt. Als Blindwert wurden die Eigenabsorption des Mediums bzw. der jeweiligen Substanz-Konzentrationen im Medium gemessen und von den entsprechenden Werten abgezogen. Aufgetragen wurden die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. Die Balken repräsentieren die Standardabweichungen.

Wie bereits vorher beobachtet, zeigte die Inkubation mit 7,1 mM und 8,5 mM Xanthohumol einen wachstumshemmenden Effekt auf die Bakterien im Vergleich zur Wachstumskontrolle (Abbildung 35).

Konjugat XN-JB8 wies ebenfalls eine antimikrobielle Wirkung auf und hemmte das bakterielle Wachstum insbesondere bei eingesetzter Konzentration von 8,5 mM. Jedoch war die antimikrobielle Aktivität deutlich schwächer als bei dem unverbundenen Xanthohumol und konnte entgegen den Erwartungen nicht gesteigert werden. Die Verknüpfung mit JB1 scheint die hemmende Wirkung des Xanthohumols noch stärker zu beeinflussen. Hier war das bakterielle Wachstum nahe der Wachstumskontrolle und somit kaum beeinträchtigt.

4 Diskussion

L. monocytogenes stellt mit seiner hohen Mortalitätsrate und der Fähigkeit unter extremen Bedingungen zu überdauern ein großes Problem in der Lebensmittelindustrie dar (Junttila et al., 1988; Petran and Zottola 1989; World Health Organization 2004). Daher steigt stetig die Nachfrage nach Methoden, um *L. monocytogenes* zu detektieren oder zu eliminieren. Spezifische Peptide, die an die Oberfläche des Bakteriums binden können, haben sich bei der Methodenentwicklung als sehr erfolgsversprechend gezeigt (Mihajlovic et al., 2010; Morton et al., 2013).

Im Vergleich zu organischen Substanzen zeigen Peptide eine höhere biologische Aktivität und Stabilität sowie eine niedrigere Toxizität. Sie binden ihre Targets mit hoher Affinität und Spezifität und weisen eine einfachere und kostengünstigere Herstellung in kontrollierbarer Qualität als beispielsweise Proteine und Antikörper auf. Daher nehmen sie bei der Entwicklung neuer alternativer Therapeutika einen immer größeren Stellenwert ein (Jang et al., 2007; reviewed in Vlieghe et al., 2010).

In dieser Arbeit wurden Peptide, die die Proteine InlA und InlB von *L. monocytogenes* binden, für den Einsatz bei innovativen Strategien selektioniert.

4.1 Proteinreinigung von Internalin A(36-496) und Internalin B(36-321) und der Interaktionsnachweis mit dem jeweiligen humanen Rezeptor E-Cadherin bzw. Met

InlA wurde als Proteinfragment der Aminosäuren 36-496 gereinigt. Die Aminosäuren sind nachweislich für die Interaktion und Invasion in Wirtszellen essenziell und ausreichend (Schubert et al., 2002). Die Proteinreinigung konnte sowohl für InlA(36-496) als auch für das Fusionsprotein GST-InlA(36-496) erfolgreich etabliert werden (Abbildung 12). Aus jeweils 500 ml Bakterienkultur wurden 560 µg InlA und 580 µg GST-InlA isoliert. Nach Inkubation von GST-InlA mit Glutathion-Sepharose wurde im Durchfluss und in der ersten Waschfraktion viel GST-InlA im SDS-Gel detektiert (Abbildung 12), was einen relativ hohen Proteinverlust repräsentiert. Die anschließende Anionenaustauschchromatographie reduzierte ebenfalls die gewonnene Proteinmenge. Für die folgenden Experimente war aber nicht die Proteinausbeute, sondern die Proteinreinheit entscheidend, da das Protein im Phagen-Display verwendet werden sollte. Verunreinigungen des Targets können in Selektion unspezifischer Bindepartner

resultieren. Mit diesem Verfahren konnte eine ausreichende Reinheit erzielt und die Reinigungen sowohl von GST-InlA als auch von InlA somit als erfolgreich angesehen werden. GST-InlA ermöglichte in späteren Experimenten die Detektion über den GST-*tag*. InlA ohne GST-*tag* wurde im Phagen-Display eingesetzt.

GST-Ecad(1-259) wurde ebenfalls rekombinant hergestellt (Abbildung 13) und für diverse Vorexperimente verwendet. Für die Verifizierung der Interaktion zwischen InlA(36-496) und humanem Ecad wurde Ecad ohne GST-*tag* käuflich erworben. Es konnte wie erwartet gezeigt werden, dass das gereinigte Protein GST-InlA(36-496) mit dem humanen Ecad(1-621) interagiert (Abbildung 14). Wie bereits publiziert, umfasst das InlA-Fragment mit den Aminosäuren 36-496 die für die Interaktion essenzielle LRR-Region (Aminosäuren 73-423, vgl. Abbildung 3) und ist daher ausreichend (Lecuit et al., 1997; Schubert et al., 2002). Die N-terminale Domäne des E-Cadherin, über die die Bindung an das InlA-Protein erfolgt, umfasst die Aminosäuren 1-100 und ist mit dem Teilprotein Ecad(1-621) ebenfalls abgedeckt.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Proteinreinigung von InlB und GST-InlB etabliert (Abbildung 15), wobei sich diese auf ein Proteinfragment mit den Aminosäuren 36-321 bezog. Aus jeweils 500 ml Bakterienkultur wurden 850 µg GST-InlB(36-321) bzw. 550 µg InlB(36-321) ohne GST-*tag* gewonnen. Die Reinigung von InlB(36-321) erforderte dabei mehrere Versuche und Optimierungsschritte bis ein Protein in ausreichender Reinheit gewonnen werden konnte. So musste schließlich eine zusätzliche Inkubation mit der Glutathion-Sepharose integriert werden, um Verunreinigungen mit GST-InlB zu minimieren. Die dabei gewonnene Proteinmenge von 550 µg war geringer als von GST-InlB mit 850 µg. Jedoch war die dadurch erzielte Reinheit des Proteins für das anschließende Phagen-Display essenziell.

GST-InlB(36-321) wurde für Interaktionsstudien mit dem humanen Rezeptor Met verwendet und ermöglichte die Detektion mittels GST-*tag*. Die Interaktion zwischen gereinigtem GST-InlB(36-321) und kommerziell erworbenem Met konnte konzentrationsabhängig gemessen werden (Abbildung 16). Das gereinigte Proteinfragment war dabei für die Bindung an Met ausreichend, da es mit den Aminosäuren 36-321 die für die Interaktion erforderliche LRR-Domäne des InlB (Aminosäuren 73-248, vgl. Abbildung 3) beinhaltet. Die Notwendigkeit der LRR-Region für die Invasion wurde von Braun et al. (1999) publiziert, indem sie unterschiedliche Varianten von InlB untersucht hatten. Hierbei wurden InlB-Varianten, in denen bestimmte Regionen (beispielsweise die LRR-Region) deletiert wurden, hergestellt, an *Latex-beads* gekoppelt und ihre Fähigkeit in Wirtszellen einzudringen, überprüft.

Somit erwiesen sich die gereinigten Proteine InlA(36-496), GST-InlA(36-496), InlB(36-321) und GST-InlB(36-321) als funktionell und für die nachfolgenden Experimente als geeignet.

4.2 Phagen-Display zur Selektion Internalin-bindender Peptide

In dieser Arbeit wurden erstmals Peptide gegen das Oberflächenprotein Internalin A und Internalin B von *L. monocytogenes* selektioniert. Phagen-Display findet seine Anwendung in vielen Publikationen zur Identifizierung von Peptiden, die spezifisch an Oberflächen von Mikroorganismen binden (Carnazza et al., 2008; Flachbartova et al., 2016; Rao et al., 2013). Es wurden jedoch bislang fast ausschließlich ganze Bakterien-Zellen als Target im Phagen-Display eingesetzt. Die Anwendung des sogenannten *whole-cell* Phagen-Displays ist vorteilhaft, wenn das Oberflächentarget nicht verfügbar oder im Immobilisierungsprozess instabil ist. Auch wenn über die zelluläre Oberflächenstruktur nur wenig bekannt ist, bietet der Einsatz von ganzen Zellen einen Vorteil. Zudem ist hier ein Reinigungsprozess des Zielproteins nicht notwendig. Jedoch erfolgt die Selektion im *whole-cell* Phagen-Display gegen mehrere Rezeptoren gleichzeitig, so dass die Identifizierung eines bestimmten Peptid-Bindepartners am Schluss nicht möglich ist. So bleibt das Target des Peptids unklar. Zusätzlich sind viele negative Selektionen notwendig, um unerwünschte Kreuzreaktionen mit anderen Mikroorganismen oder Spezies auszuschließen, da manche Oberflächenantigene nicht stammspezifisch sind und die Bindung des Peptids an mehrere Epitope der bakteriellen Zelloberfläche erfolgt (Morton et al., 2013). Gegen ein bestimmtes Oberflächenprotein gerichtete Phagen-Displays ermöglichen die Identifizierung von Peptiden, deren genaue Interaktionspartner bekannt sind und die mit nur einer bestimmten Spezies wechselwirken. Daher wurde in dieser Arbeit laut Literatur zum ersten Mal ein Protein-basierter Phagen-Display zur Selektion *L. monocytogenes*-bindender Peptide durchgeführt.

InlA und InlB sind Proteine, die nur in der pathogenen Spezies *L. monocytogenes* exprimiert werden (Gouin et al., 1994). Somit bieten Peptide, die InlA bzw. InlB binden, einen sehr spezifischen Indikator dieser Spezies. Des Weiteren eignen sich InlA und InlB als Targets, da sie auf der Oberfläche des Bakteriums lokalisiert, kovalent mit der Zellwand verankert und gut zugänglich sind (Marino et al., 1999). Peptid-Selektionen gegen bestimmte *L. monocytogenes*-Oberflächenproteine wurden laut aktueller Literatur bislang nicht durchgeführt und stellen in dieser Arbeit somit eine innovative Herangehensweise dar. Aufgrund ihrer Spezifität könnten sie sowohl bei therapeutischen als auch bei diagnostischen Ansätzen Verwendung finden.

4.3 Mittels Phagen-Display selektionierte Internalin A-bindende Peptide

Die Selektion erfolgte gegen vorher gereinigtes InIA(36-496). Die Verwendung des Teilfragments bietet den Vorteil, dass es die für die Interaktion essenziellen Aminosäuren 73-423 (LRR-Region) umfasst (Lecuit et al., 1997; Schubert et al., 2002) und die selektierten Peptide somit zielgerichtet an diese Region binden.

Für eine erste Einschätzung der Anreicherung wurden die isolierten Phageneluate im Anreicherung-ELISA überprüft (Abbildung 17). Die dritte und vierte Selektionsrunde ließen auf eine erfolgreiche Selektion schließen, da das Interaktionssignal der Negativkontrolle deutlich geringer ausfiel als das gemessene Signal mit InIA. Zudem waren die gemessenen Interaktionsstärken dieser beiden Runden deutlich höher, so dass die Anzahl der im Eluat enthaltenen spezifischen Phagenklone zuzunehmen schien. Weitere Selektionsrunden, die den Selektionsdruck weiter erhöhen, werden vom Hersteller allerdings nicht empfohlen. Hierbei steigt die Wahrscheinlichkeit, Phagen anzureichern, die einen Wachstums- oder Selektionsvorteil gegenüber anderen Phagenklonen haben. Dies würde wiederum zur Anreicherung von falsch positiven Klonen führen. Im Einzelphagen-ELISA wurden daher Phagenklone der Selektionsrunden 3 und 4 auf ihre InIA-Affinität getestet (Abbildung 18). Dabei wurden viele Phagenklone detektiert, die eine nur sehr schwache Affinität für InIA aufweisen. Daher mussten in Summe 150 Phagenklone aufwendig getestet werden, um schließlich 22 erfolgsversprechende Kandidaten aussuchen zu können. Nach der Sequenzierung waren elf Sequenzen auswertbar und wiesen acht unterschiedliche Peptidsequenzen auf (Tabelle 2). Zwei Sequenzen wurden mehrfach identifiziert. Wiederholt auftretende Sequenzen sind hierbei ein Indiz für hochaffine Peptidsequenzen.

4.3.1 Eliminierung Target-unspezifischer Peptidsequenzen

Die erhaltenen Peptidsequenzen wurden einer Datenbankrecherche unterzogen, um bereits bekannte Peptidsequenzen oder Ähnlichkeiten mit anderen Proteinen zu finden. Außerdem können auf diese Weise Target-unspezifische Peptide eliminiert werden. Diese stellen im Phagen-Display ein sehr großes Problem dar. Bei der Immobilisierung des Targets können freibleibende Polystyrol-Flächen zur Selektion von Plastikbindern führen (Adey et al., 1995). Daher erfolgt während der Durchführung ein Blockingschritt mit unspezifischem Protein (beispielsweise BSA), der jedoch nicht immer effizient ist. Zudem können auf diese Weise BSA-affine Peptide selektiert werden, was in weiteren Negativkontrollen ausgeschlossen werden muss (vgl. Abbildung 20) und mit bereits bekannten BSA-bindenden Peptiden in

Datenbanken verglichen werden sollte. Plastik-bindende Peptide zeichnen sich durch viele aromatische Aminosäurereste aus, die die hydrophoben Interaktionen mit der Polystyrol-Oberfläche begünstigen (Adey et al., 1995; reviewed in Menendez and Scott 2005). Auf diese Weise lassen sich anhand der Peptidsequenz bestimmte Motive erkennen und Plastik-Binder vorhersagen, die mit einer Datenbank abgeglichen werden können (Huang et al., 2010). Andere falsch positive Klone können zudem aus Peptiden, die Immunoglobuline binden, resultieren (Krook et al., 1998). Weitere Target-unspezifischen Peptide ergeben sich durch Phagenklone, die einen Wachstumsvorteil durch beispielsweise erhöhte Infektionsfähigkeiten aufweisen. Mutationen im Phagengenom, die die Replikation beschleunigen, begünstigen ebenfalls den Generationszyklus des Phagen (Brammer et al., 2008). Diese schnellwachsenden Phagen werden während der Amplifizierung angereichert und dominieren demnach im Phageneluat. Auch in dieser Arbeit mussten manche selektionierten Peptidsequenzen für weitere Experimente ausgeschlossen werden, da sie eine Tendenz zu Target-unspezifischen Peptiden aufwiesen. Die Sequenz VVSPDMNLLLTN wurde als ein schnellwachsender Phage identifiziert. GHYTNSEWGFQE als eine Antikörper-bindende Sequenz sowie SLDGAGAALRTS als ein möglicher Polystyrol-Binder wurden für die weitere Vorgehensweise ebenfalls nicht mehr berücksichtigt.

4.3.2 In1A-bindende Peptidsequenzen JB1 und JB3 interagieren mit IGF2R und identifizieren die Interaktion zwischen IGF2R und In1A/In1B

Weitere Datenbankrecherchen zeigten, dass Sequenzen GLHTSATNLYLH (JB1) und SGVYKVAYDWQH (JB3) von Chen et al. (2015) bereits als IGF2R-bindende Peptide publiziert wurden. Die Arbeitsgruppe verwendete in Kombination rekombinantes humanes IGF2R sowie IGF2R-exprimierende hepatische Sternzellen (HSC) zur Selektion mittels Phagen-Display. IGF2R ist ein Rezeptor, der auf HSC exprimiert wird und lysosomale Enzyme reguliert (Grimme et al., 2000). Studien zeigen, dass die Expression von IGF2R während Leberfibrose (De Bleser et al., 1996) sowie bei vielen Krebserkrankungen (Ishiwata et al., 1997; Pavelić et al., 2003) hochreguliert ist. Da IGF2R extrazelluläre Liganden internalisieren kann (Grimme et al., 2000), wollte die Arbeitsgruppe um Chen et al. (2015) mit Hilfe von IGF2R-bindenden Peptiden Therapieansätze für die direkte Aufnahme von HSC-gerichteten Wirkstoffen gegen Fibrose bieten. Sie identifizierten unter anderem die Peptide GLHTSATNLYLH und SGVYKVAYDWQH und zeigten deren Bindung an IGF2R. Die zelluläre Aufnahme der Peptide in humane HSC konnte für GLHTSATNLYLH und SGVYKVAYDWQH allerdings nicht gezeigt werden (Chen et al., 2015).

In einer anderen Studie publizierten Gasanov et al. (2006) IGF2R als einen neuen Rezeptor für *L. monocytogenes*, der dem Pathogen die Bindung und Invasion in Fibroblasten-Zellen ermöglicht. IGF2R-exprimierende Zellen zeigten dabei eine deutlich höhere Invasionsrate durch *L. monocytogenes* als Zellen ohne IGF2R. Die Interaktion zwischen IGF2R und *L. monocytogenes* sowie die IGF2R-vermittelte Internalisierung konnten dabei durch den natürlichen Liganden Mannose-6-Phosphat von IGF2R inhibiert werden. Als bakteriellen Interaktionspartner für IGF2R postulierte das Team um Gasanov et al. (2006) das Protein InIB, da die IGF2R-vermittelte Invasionsrate einer InIB-defizienten *L. monocytogenes*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp reduziert war. Bei einer InIA-defizienten Mutante konnte dies nicht beobachtet werden. Jedoch verwendete die Arbeitsgruppe murine Zelllinien. Die Internalisierung von *L. monocytogenes* in Mauseellen wird nachweislich allerdings nicht von InIA vermittelt, da Ecad in Mäusen durch eine Aminosäuresubstitution nicht mit InIA interagieren kann (Lecuit et al., 1999). Außerdem war die Invasion der InIB-Mutante zwar reduziert, aber nicht inhibiert. Dies lässt auf das Mitwirken anderer Rezeptoren schließen (Gasanov et al., 2006). Somit kann InIA als ein weiterer potentieller Rezeptor für IGF2R an dieser Stelle nicht ausgeschlossen werden.

Unter Berücksichtigung, dass gegen InIA selektionierte Peptidsequenzen auch mit IGF2R interagieren (Chen et al., 2016) und dass IGF2R ein Rezeptor für die Invasion von *L. monocytogenes* in Wirtszellen ist (Gasanov et al., 2006), resultierte in unserer Arbeitsgruppe die Annahme, dass InIA einen Liganden für IGF2R darstellt und die Invasion vermittelt.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde daher die Interaktion zwischen GST-InIA und IGF2R getestet. Zusätzlich wurde die von Gasanov et al. (2006) postulierte Bindung von GST-InIB an IGF2R überprüft. Beide Interaktionen konnten in Abbildung 25 bestätigt werden. Der Interaktionsnachweis zwischen GST-InIA und IGF2R sowie GST-InIB und IGF2R konnte zusätzlich mit der Methode des *ligand overlay assays* verifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich der gemessenen Absorptionswerte zeigte, dass IGF2R deutlich stärker an GST-InIB bindet als an GST-InIA (Abbildung 25). Dennoch liefert dies den Hinweis, dass die Invasion von *L. monocytogenes* in IGF2R-exprimierende Zellen über die Interaktion mit InIA und InIB erfolgt. Dies muss jedoch in weiterführenden Experimenten unter Verwendung von InIA- bzw. InIB-deletierten *L. monocytogenes*-Zellen bestätigt werden.

4.3.3 InIA-bindende Peptidsequenz JB3 interagiert mit Zellmodellen der Blut-Hirn-Schranke (BBB)

Peptidsequenzen GLHTSATNLYLH (JB1) und SGVYKVAYDWQH (JB3) wurden erst kürzlich von Díaz-Perlas et al. (2017) gegen *in vitro* Zellmodelle der Blut-Hirn-Schranke (BBB) selektioniert. Da die meisten Wirkstoffe gegen Funktionsstörungen des zentralen Nervensystems die BBB nicht passieren können (reviewed in Pardridge 2012), wurde hier nach BBB-Shuttle-Peptiden gesucht. Diese sollen die therapeutischen Moleküle durch die BBB transportieren. Hierfür wurde mittels Phagen-Display gegen ein humanes BBB-Zellmodell selektioniert. Schließlich wurde die Sequenz SGVYKVAYDWQH als ein BBB-Shuttle-Peptid publiziert. Es wurde gezeigt, dass das Peptid die BBB passieren kann und postuliert, dass das Peptid Clathrin-vermittelt internalisiert wird (Díaz-Perlas et al., 2017).

L. monocytogenes kann ebenfalls die Blut-Hirn-Schranke passieren (Vázquez-Boland et al., 2001) und in der Signalkaskade für die Invasion in Wirtszellen ist Clathrin ebenso involviert (Veiga and Cossart 2005). Daher ließ der Aspekt, dass die gegen BBB selektionierte Sequenz SGVYKVAYDWQH als ein InIA-bindendes Peptid identifiziert wurde, auf einen Zusammenhang schließen und die Sequenz als ein *L. monocytogenes*-bindendes Peptid einordnen.

4.3.4 Interaktionsnachweise der InIA-bindenden Peptidsequenzen

Die Bindungsaffinität für InIA der Sequenzen JB1 - JB5 wurde in einem Phagen-ELISA überprüft (Abbildung 19). Hier wurde, anders als im Einzelphagen-ELISA, die gleiche pfu-Menge pro Phagenklon eingesetzt, um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen Affinitäten der einzelnen Peptid-präsentierenden Phagen zu gewährleisten. Alle Phagen-präsentierten Peptide zeigten dabei eine deutliche Affinität für InIA. Das gemessene Signal für Phagenklon mit Peptidsequenz JB4 war dabei deutlich geringer als das der anderen Peptide. Vergleicht man die in Tabelle 2 dargestellten Eigenschaften der Peptidsequenzen, fällt auf, dass innerhalb der erfolgsversprechenden Peptide JB1 - JB5 allein Peptid JB4 eine negative Nettoladung aufweist. Diese könnte in möglichen Abstoßungseffekten der negativ geladenen Oberfläche der Bakterienmembran und des negativ geladenen Peptids resultieren und daher zu einer reduzierten Interaktion führen (Jiang et al., 2008). Somit schien Peptid JB4 bereits an dieser Stelle kein geeignetes *L. monocytogenes*-bindendes Peptid zu sein, wurde dennoch vollständigshalber in weiteren Experimenten getestet und wie die Peptide JB1, JB2, JB3 und JB5 FAM-markiert synthetisiert.

Die Bindung der fünf synthetischen Peptide an rekombinantes InlA wurde erfolgreich verifiziert (Abbildung 20). Ein Absorptionsanstieg wurde mit steigender Peptid-Konzentration bei allen Peptiden detektiert. Eine Linearität konnte dabei nicht dargestellt werden. Diese Problematik geht aber mit den Bedingungen eines ELISA-Systems einher. Durch die manuelle Immobilisierung des Targets lassen sich mögliche Unterschiede in der Effizienz nicht ausschließen. Die hohe Anzahl an diversen Waschschrinen während der Durchführung kann außerdem im Ablösen des Targets, der Peptide oder der Antikörper resultieren. Des Weiteren kann der Detektionsantikörper limitierend sein. Somit lassen sich aus dem ELISA keine Aussagen über die Linearität treffen. Eine alternative Methode würde dabei eine Messung mit einem Biacore System darstellen. Dennoch ist der ELISA eine sehr spezifische und reproduzierbare Methode und eignet sich für die hier vorgesehene Anwendung. Im Vorfeld mussten in diversen Vorversuchen die Parameter des ELISAs optimiert werden, um die Bindung der Peptide an InlA deutlich zeigen zu können (Daten nicht separat dargestellt). Im ELISA-System haben Temperaturen und die Inkubationszeiten der einzelnen Schritte einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz. So wurden verschiedene Inkubationszeiten insbesondere nach Zugabe des Peptids getestet. Eine zu lange Inkubation (1 h) resultierte in unspezifischen Signalen und der Notwendigkeit einer längeren Blockingdauer, da es möglicherweise zu einer Immobilisierung des Peptids auf der Mikrotiterplatte kam. Bei einer zu kurzen Inkubationszeit (10 min) konnten die Peptide vermutlich nicht effizient binden, so dass im Experiment keine Interaktionssignale detektiert werden konnten. Die Stringenz der Waschschrine war ebenfalls entscheidend. Eine Tween-20-Konzentration von 0,01 % hat sich dabei bewährt. Zusätzlich wurde die für die Bindung ideale InlA-Konzentration von 10 µg/ml in Vorexperimenten ermittelt. Die hier dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die unter 2.6.1 aufgeführten und optimierten Bedingungen.

4.3.5 Interaktionsnachweis der InlA-bindenden Peptide an *L. monocytogenes* und ihre Relevanz für neue Detektionsmethoden

Schließlich wurde die Interaktion zwischen den Peptiden und *L. monocytogenes* überprüft. Für Peptide JB3, JB4 und JB5 konnte eine Interaktion allerdings nicht gezeigt werden (Abbildung 21A). Da rekombinantes Protein eine andere Konformation als seine native Struktur auf Zellen aufweisen kann, könnte resultieren, dass Peptide aus Protein-basierten Biopannings das gleiche Target auf den Zellen nicht mehr binden. JB4 ließ bereits von Beginn an aufgrund seiner negativen Nettoladung mögliche Abstoßungseffekte zur Bakterienmembran vermuten (vgl. 4.3.1). Außerdem zeigte es bereits im Phagen-ELISA (Abbildung 19) die niedrigste Affinität

für InlA. Das Ergebnis war für JB4 somit zu erwarten. Allerdings konnte im Phagen-ELISA für das Peptid JB3 ein sehr hohes Interaktionssignal detektiert werden (Abbildung 19), welches im Interaktionsnachweis mit *L. monocytogenes* sehr niedrig war (Abbildung 21A). Bei einer JB3-Konzentration von 50 µg/ml konnte beim Serotyp 1/2a ein Anstieg des Absorptionssignals erfasst werden. Dieser wurde beim Serotyp 4b jedoch nicht detektiert, weshalb das Peptid für weitere Experimente nicht mehr berücksichtigt wurde. Peptidsequenzen werden auf der Oberfläche der Phagen in fünffacher Kopienzahl präsentiert (Rodi and Makowski 1999), was die Bindungsstärke im Phagen-ELISA erhöht. Die Bindung des synthetischen Peptids an die native InlA-Struktur auf den Zellen konnte hier scheinbar nicht mehr effizient erfolgen. Auch könnte die Interaktion durch die FAM-Markierung beeinträchtigt worden sein. Ebenso konnte Peptid JB5 aufgrund seines fehlenden Interaktionssignals für weiteren Experimente nicht verwendet werden.

Die Bindung von JB1 und JB2 an *L. monocytogenes* wurde jedoch deutlich detektiert. Dabei wurden Serotyp 1/2a und Serotyp 4b getestet und keine signifikanten Abweichungen innerhalb der Serotypen gezeigt. Eine Interaktion mit *E. coli* wurde dabei ausgeschlossen (Abbildung 21B). Da *E. coli* keine Internaline exprimiert, war eine Interaktion der Peptide nicht zu erwarten. Damit konnte allerdings eine erste Spezifität der Gattung gezeigt werden. Im späteren Verlauf müssen weitere (sowohl grampositive als auch gramnegative) Bakterienstämme und insbesondere andere *Listeria*-Spezies untersucht werden, um eine Spezifität für *L. monocytogenes* zu verifizieren. Zusätzlich ließe sich die Spezifität der Peptide für InlA durch den Einsatz von *L. monocytogenes*-Zellen mit einer InlA-Deletion demonstrieren.

JB1 schien bereits bei der Sequenzierung erfolgsversprechend zu sein, da diese Peptidsequenz bei drei der elf ausgewerteten Sequenzierungen nachgewiesen wurde (Tabelle 2). Somit zeigte die Phagen-präsentierte Sequenz bereits an dieser Stelle eine hohe Affinität für InlA und wurde daher während der Selektion vermehrt angereichert.

Somit wurden in dieser Arbeit erstmals Peptide identifiziert, die das Oberflächenprotein InlA auf der Bakterienmembran von *L. monocytogenes* binden. Diese Peptide könnten spezifische diagnostische Techniken zur Detektion von *L. monocytogenes* realisieren. Die Markierung der Peptide mit einem Fluoreszenz-Farbstoff (in dieser Arbeit FAM) würde beispielsweise eine Visualisierung der Bakterien im Fluoreszenz-Mikroskop ermöglichen (vgl. Abbildung 22). Obwohl die Expression von InlA *L. monocytogenes*-spezifisch ist, muss dennoch auch hierfür die Spezifität der Peptide unter Einsatz von *L. innocua* und anderen *Listeria*-Stämmen verifiziert werden.

Die Etablierung schneller Detektionsmethoden scheiterte bislang an hochaffinen und speziesspezifischen Antikörpern. Es konnten keine monoklonalen oder polyklonalen Antikörper mit hoher Spezifität zur Detektion von *L. monocytogenes* entwickelt werden. Möglicherweise werden Oberflächenepitope von *L. monocytogenes* während der Antikörper-Produktion nicht effektiv prozessiert (Bhunja, 1997). *L. monocytogenes*-spezifische Peptide oder Antikörper-Fragmente stellen somit eine Alternative dar. Die Bedeutung speziesspezifischer Peptide wurde daher bereits durch vorherige Studien deutlich, in denen mittels Phagen-Display gegen *L. monocytogenes* selektioniert wurde.

Morton et al. (2013) machten es sich zum Ziel, Peptide zu identifizieren, die spezifisch zwischen dem Pathogen *L. monocytogenes* und anderen *Listeria*-Spezies unterscheiden können. Dabei wurden Selektionen gegen ganze Zellen *L. monocytogenes* durchgeführt. Aus den ersten Panningrunden resultierten Phagenklone, die eine ebenso hohe Affinität für *L. innocua* und *E. coli* wie für das Target *L. monocytogenes* aufwiesen. Durch zusätzliche Negativ-Selektionen gegen *L. innocua* und weitere Panningrunden konnten schließlich Phagenklone mit höherer Bindung an *L. monocytogenes* als an *L. innocua* identifiziert werden. Viele Phagenklone mussten jedoch ausgeschlossen werden, da sie weiterhin Kreuzreaktionen mit anderen Bakterien wie *E. coli* zeigten (Morton et al., 2013). In dieser Publikation wird die absolute Notwendigkeit einer aufwendigen Negativ-Selektion bei der Anwendung des *whole-cell* Phagen-Displays deutlich. Ohne eine Negativ-Selektion lassen sich Kreuzreaktionen durch speziess-unabhängige Antigene nicht ausschließen. Protein-basierte Phagen-Displays, wie in dieser Arbeit durchgeführt, bieten daher einen großen Vorteil und ermöglichen die direkte Selektion gegen speziesspezifische Oberflächenproteine. Durch die Protein-basierte Anwendung resultieren Peptide mit einem definierten Target auf der bakteriellen Zelloberfläche.

Interessanterweise veröffentlichte Morton et al. (2013) ausschließlich Ergebnisse mit Phagenklonen und keine Bindungsnachweise mit synthetischen Peptiden. Wie vorher beschrieben, werden Peptidsequenzen auf der Oberfläche der Phagen in fünffacher Kopienzahl präsentiert, wodurch es bei synthetischen Einzel-Peptiden durch den Verlust des Aviditätseffektes zu einer deutlich schwächeren Bindung kommen kann (Fuh and Sidhu, 2000). Dieser Aspekt sollte immer überprüft werden und hatte auch in dieser Arbeit zur Folge, dass einige hier synthetisierte, gegen InlA selektionierte Peptide keine Interaktion mit ganzen Zellen *L. monocytogenes* aufwiesen (Abbildung 21A).

Neben Peptiden können auch Antikörper-Fragmente auf der Oberfläche von Phagenklonen exprimiert werden und damit eine Selektion mittels Phagen Display ermöglichen. Die Arbeitsgruppe um Paoli et al. (2004) verwendete ganze *L. monocytogenes*-Zellen zur Selektion von affinen einzelkettigen Antikörper-Fragmenten (scFv-Fragmente), welche auf der Oberfläche filamentöser Bakteriophagen exprimiert wurden. Die scFv-Fragmente sollten einen Ansatz zur Detektion des Pathogens bieten. Die Panningrunden beinhalteten Negativ-Selektionen gegen *L. innocua* und *L. ivanovii*. Die Selektion führte zur Isolation eines scFv-Fragments mit im ELISA nachgewiesener Affinität für *L. monocytogenes* ohne Kreuzreaktion mit Nichtzielorganismen wie *E. coli* und *Streptococcus thermophilus* (Paoli et al., 2004). In einer weiterführenden Studie wurde die Spezifität des identifizierten scFv-Fragments für *L. monocytogenes* unabhängig vom Serotyp des Bakteriums gezeigt (Paoli and Brewster, 2007). Paoli und Brewster nahmen an, dass das scFv-Fragment mit einem Protein der Zelloberfläche interagiert, was sie in einem Western-Blot überprüfen und bestätigen konnten. Hierfür wurden Zellextrakte von *L. monocytogenes* für SDS-PAGE und Western-Blot verwendet und die Bindung des scFv-Fragments an ein 90 kDa-Protein detektiert (Paoli and Brewster, 2007). Dennoch ist der genaue Interaktionspartner nicht bekannt, was wiederum erneut die Problematik des *whole-cell* Phagen-Displays verdeutlicht. Dies kann durch die aufwendige Durchführung eines Protein-basierten Phagen-Displays umgangen werden, weshalb dieser in der hier vorliegenden Arbeit angewendet wurde. Antikörper haben außerdem den Nachteil, dass sie langwierig in der Produktion und sensitiv für Umwelteinflüsse sind. Auch Paoli und Brewster (2007) untersuchten den Temperatur-Einfluss auf die Affinität des scFv-Fragments. Hier konnte gezeigt werden, dass das Detektionspotential des Fragments bei Temperatur-Veränderungen stark variierte. In diesem Fall bieten spezifische Peptide, wie in dieser Arbeit selektioniert, einen enormen Vorteil für den weiteren Einsatz. Außerdem zeichnen sich Peptide durch ihre hohe Stabilität und kostengünstige standardisierte Produktion aus (Brigati et al., 2008). Trotzdem muss auch hier der Einfluss von Temperatur und anderen Umweltbedingungen auf die Peptidbindung für weitere Anwendungen überprüft werden.

Als neue Nachweismethoden könnten die hier identifizierten InlA-Peptide außerdem für die Kopplung an *beads* zur Immunomagnetischen Separation sowie für einen Lichtwellenleiter-Sensor zur spezifischen Detektion von *L. monocytogenes* eingesetzt werden (Mendonça et al., 2012). Des Weiteren lassen sich *L. monocytogenes*-spezifische Peptide möglicherweise auf der Quarz-Oberfläche von Biosensoren immobilisieren. Die Bindung des Bakteriums an die Sensoren können anschließend mittels Phasenkontrast-Mikroskopie in Echtzeit beobachtet

werden (Carnazza et al., 2007). Dies würde spezifische diagnostische Sonden zur Überwachung von *L. monocytogenes*-Kontaminationen in der Lebensmittelkontrolle ermöglichen.

4.3.6 InlA-bindende Peptide reduzieren die InlA-Ecad-Interaktion

In dieser Arbeit wurde das Ziel verfolgt, mit Hilfe von InlA-bindenden Peptiden die Interaktion zwischen InlA und Ecad zu verhindern. Wie von Lecuit et al. (1997) publiziert, ist die Interaktion beider Proteine für die Initialisierung von *L. monocytogenes* in humane Epithelzellen essenziell. Ein Peptid, das diese Interaktion inhibiert, könnte einen Ansatz zur Verhinderung der *L. monocytogenes*-Infektion bieten und damit für präventive Maßnahmen verwendet werden.

Hierfür wurden unterschiedliche Konzentrationen der Peptide JB1 (GLHTSATNLYLH) und JB2 (DSQFNKYSIATV) separat mit InlA inkubiert und anschließend die Interaktion zwischen InlA und Ecad detektiert (Abbildung 24). Dabei konnte festgestellt werden, dass die Interaktion mit steigender Peptid-Konzentration reduziert wird. In Anwesenheit von JB1 in der Konzentration 50 µg/ml war die detektierte Interaktion zwischen InlA und Ecad nahezu Null. Für JB2 war der Effekt weniger stark ausgeprägt. Dennoch wurde bei 100 µg/ml JB2 eine deutlich schwächere Interaktion zwischen InlA und Ecad nachgewiesen. Beide Peptide sind somit in der Lage durch ihre Bindung an InlA die Bindestelle für Ecad zu blockieren und die InlA-Ecad-Interaktion zu verhindern. Insbesondere JB1 scheint hierfür geeignet zu sein. Diese Peptidsequenz, die bereits nach der Selektion vermehrt auftrat (Tabelle 2), scheint ein besonders affiner Ligand für InlA zu sein. Die Peptide zeigen somit Potential, eine Interaktion zwischen *L. monocytogenes* und epithelialen Wirtszellen inhibieren zu können. Dies muss selbstverständlich durch weitere Experimente in der Zellkultur untersucht und bestätigt werden. Dabei muss geprüft werden, ob der gezeigte Interaktionsverlust zwischen InlA und Ecad effektiv und ausreichend ist, um eine Adhäsion des Bakteriums und die Invasion in Wirtszellen verhindern zu können. Zusätzlich haben *in vivo* diverse Bedingungen einen großen Einfluss, so dass die Interaktion zwischen InlA und den selektionierten Peptiden *in vivo* zunächst gezeigt werden muss. Besonders kritisch ist die Frage, ob die Peptide eine toxische Wirkung auf humane Zellen zeigen. Davon ist allerdings nicht auszugehen, da Peptide von allen lebenden Organismen produziert werden (Maróti et al., 2011). Außerdem wurden mittels Phagen-Display selektionierte Peptide anderer Studien bereits erfolgreich *in vivo* getestet (Funke et al., 2010). Mittels fluoreszenzmarkierter Peptide konnten beispielsweise sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bestimmte Bereiche in Gehirnen von Alzheimer-Mäusen gefärbt werden (van Groen et al., 2009).

Zu beachten ist, dass es sich bei den in dieser Arbeit selektierten Peptiden um natürlich vorkommende L-enantiomere Aminosäuren handelt. Diese lassen sich jedoch als D-Peptide für weitere Experimente synthetisieren. D-Peptide haben den Vorteil, dass sie weniger immunogen (Milton et al., 1992) und gegen den proteolytischen Abbau resistent sind, wodurch ihre Halbwertszeit enorm gesteigert wird (Van Regenmortel et al., 1998; Wei et al., 2005).

Bei der Lebensmittelkonservierung wird das antibiotisch wirkende Peptid Nisin A bereits effektiv und ohne Nebenwirkungen eingesetzt. Das porenbildende Nisin wirkt gegen grampositive Bakterien wie *L. monocytogenes*, hat dabei aber den Nachteil eines breiten Wirkungsspektrums (Campion et al., 2013; Elliason and Tatini, 1999; Wiedemann et al., 2001). Dadurch werden auch nicht-pathogene Bakterien angegriffen und es eignet sich aufgrund seiner geringen Speziesspezifität nicht zum Einsatz bei diagnostischen Methoden.

4.4 Mittels Phagen-Display selektierte Internalin B-bindende Peptide

Die Selektion InlB-bindender Peptide erfolgte gegen das rekombinante InlB(36-321). Das Protein-Fragment umfasst die für die Interaktion mit Met erforderliche LRR-Domäne 73-248 (Braun et al., 1999) und bietet damit den Vorteil, dass die selektierten Peptide explizit an die essenzielle Region des InlB binden und nicht an einen anderen Bereich des Vollängenkonstrukts.

Für die Selektion wurden vier Panningrunden durchgeführt und die Affinität der amplifizierten Eluate mittels Anreicherungs-ELISA überprüft (Abbildung 26). Die gemessenen Signale gegen die Polystyrol-Oberfläche waren zwar niedriger als die Signale gegen InlB, dennoch waren die Differenzen nicht stark ausgeprägt. An dieser Stelle war somit nicht auszuschließen, dass viele falsch positive Phagenklone selektiert wurden. Im Anreicherungs-ELISA wird jeweils ein ganzes Gemisch an Phagenklonen des Eluats getestet, so dass diese Methode lediglich einen ersten Eindruck über den Erfolg des Phagen-Displays vermitteln soll. Im anschließenden Einzelphagen-ELISA können Polystyrol-bindende Phagenklone separat visualisiert und eliminiert werden. Das Ergebnis des Anreicherungs-ELISAs spiegelte sich auch im Einzelphagen-ELISA durch viele Klone mit geringer Affinität für InlB wider (Abbildung 27). Dennoch zeigten von den 100 untersuchten Klonen einige eine starke Bindung an InlB und konnten für die DNA-Sequenzierung ausgewählt werden.

Innerhalb der elf ausgewerteten Sequenzierungen wurden allerdings lediglich drei unterschiedliche Peptidsequenzen identifiziert, die wiederholt auftraten (Tabelle 3). Wiederholt

vorkommende Sequenzen sprechen für eine hohe Affinität zum Target und sind somit erfolgsversprechend. Eine Datenbank-Recherche ergab außerdem keine Übereinstimmungen mit bereits bekannten Target-unspezifischen Peptiden. Somit konnte die hohe Häufigkeit der Sequenzen auf eine Affinität der Peptide für InlB und nicht auf eine Anreicherung von schnellwachsenden Phagen zurückgeführt werden.

Alle drei Peptidsequenzen zeigten auch im Phagen-ELISA (Abbildung 28), in dem die gleiche pfu-Menge eingesetzt wurde, eine deutliche Affinität für InlB. Insbesondere Peptid JB8 zeichnete sich hierbei durch eine besonders hohe Signalstärke aus. Die Absorptionen von JB6- und JB7-präsentierenden Phagen waren untereinander vergleichbar und niedriger als von JB8. Somit schien bereits an dieser Stelle JB8 ein besonders affines InlB-bindendes Peptid zu sein. Die Bindung der synthetisch hergestellten FAM-markierten Peptide JB6, JB7 und JB8 an rekombinantes InlB konnte erfolgreich gezeigt werden (Abbildung 29). Hierbei zeigte Peptid JB7 mit einer maximalen Absorption von $A_{450} = 2,6$ eine sehr hohe Affinität für InlB. Bei Interaktionsstudien mit ganzen Zellen *L. monocytogenes* war die Interaktion von JB7 allerdings nicht nachweisbar (Abbildung 30). Dieses Peptid konnte mit der nativen Struktur des InlB auf den Bakterienzellen nicht interagieren, da hier möglicherweise eine essenzielle Bindestelle für JB7 nicht mehr zugänglich war.

Die Bindung der Peptide JB6 sowie JB8 konnte allerdings erfolgreich und unabhängig vom Serotyp 4b und 1/2a detektiert werden. Dabei war das gemessene Signal und somit die Affinität bei JB8 deutlich höher, was mit dem hohen detektierten Interaktionssignal im Phagen-ELISA (Abbildung 28) übereinstimmt. Für die nachfolgende Verknüpfung mit einer Hopfenkomponente (siehe 4.6) wurde daher diese Peptidsequenz gewählt.

Im Vorfeld wurden die Peptide zusätzlich auf ihre Toxizität gegenüber *L. monocytogenes* überprüft. Von einer toxischen Wirkung der Peptide war nicht auszugehen, da eine Interaktion mit der Bakterienmembran nicht zwingend in antimikrobiellen Effekten resultiert. Dennoch wurden von Flachbartova et al. (2016) mittels Phagen-Display gegen *Listeria*-Zellen selektionierte Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften publiziert. Die Toxizität dieser Peptide wurde mit Hilfe von MHK-Studien gezeigt. Dabei wurde die antimikrobielle Aktivität bei einer Peptidkonzentration von 30 μM beobachtet (Flachbartova et al., 2016). Die für JB1 - JB8 in Abbildung 34 eingesetzte Peptid-Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ entspricht einer Molarität von 70 μM und liegt somit deutlich über der von Flachbartova et al. (2016) eingesetzten Konzentration. Dennoch konnten für die Internalin-bindenden Peptide keine Effekte auf das Wachstum der Bakterien beobachtet werden. Damit konnte gewährleistet werden, dass die Peptide per se keinen antimikrobiellen Einfluss haben.

4.5 Antimikrobielle Wirkung von Hopfenkomponenten auf *L. monocytogenes*

Da die Entstehung von multi-resistenten *Listeria*-Stämmen weiterhin steigt und in der Lebensmittelsicherheit ein großes Problem darstellt, steigt die Notwendigkeit in der Entwicklung neuer antimikrobiell-wirkender Substanzen (Aureli et al., 2003). Außerdem wächst beim Konsumenten die Nachfrage nach natürlich vorkommenden Konservierungsstoffen.

Daher verwendet die Firma Raps GmbH & Co. KG, Kulmbach, für ihre Lebensmittelprodukte bereits jetzt Hopfenextrakte, um das Wachstum von Mikroorganismen zu hemmen. Da jedoch konzentrationsabhängige unerwünschte Geschmackseffekte auftreten können, muss die Dosierung reduziert werden. Hierfür sollte ein Konjugat aus einer Hopfenkomponente und einem *L. monocytogenes*-bindenden Peptid erzeugt werden, um die Wirkkonzentration zu minimieren.

Die antimikrobielle Wirkung von Hopfenharzen auf *L. monocytogenes* wurde bereits in Medium (Barney et al., 1995) als auch in Lebensmitteln (Larson et al., 1996) gezeigt. Diese basiert auf ihrer Wirkung als Ionophore und ihrer Fähigkeit Ionen durch die Bakterienmembran zu transportieren (Van Cleemput et al., 2009). Die Hydrophobizität der Hopfensäuren hat dabei einen großen Einfluss auf die Interaktion mit der Bakterienmembran und mit der damit verbundenen antimikrobiellen Wirkung. Die Aktivität der Hopfenkomponenten ist dabei vom pH-Wert, von der Temperatur und der Salzkonzentration in der Umgebung abhängig. Die optimalen Bedingungen für die hier zu testenden Hopfenkomponenten wurden daher in Vorexperimenten ermittelt. Bei niedrigen Temperaturen wird die Mobilität der Substanzen in die Zellmembran reduziert, wodurch die ionophore Aktivität abnimmt (Simpson, 1993a). Die Ionisierungskonstante der Hopfenkomponenten ist vom pH-Wert der Lösung abhängig (Simpson, 1993b). Bei einem niedrigeren pH-Wert des Mediums wird durch die höhere Protonenkonzentration die undissoziierte Form der Hopfenkomponente erhöht. Das Passieren der bakteriellen Membran wird damit vereinfacht. Eine Erhöhung des pH-Wertes von pH 4 auf pH 7 resultiert in einer 800-fachen Verminderung der antibakteriellen Aktivität der Substanzen (Simpson, 1993a). Der für Listerien optimale pH-Wert des Mediums liegt jedoch bei 7,4 und musste somit angepasst werden. Es wurde ein pH-Wert von pH 6,0 (bei 30 °C) ermittelt, bei dem die jeweilige Hopfenkomponente wirken kann, das Wachstum der Bakterien jedoch nicht beeinträchtigt wird (Daten nicht separat dargestellt).

Um eine für die Verkopplung geeignete Hopfenkomponente auszuwählen, wurden die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) von drei Wirkstoffen getestet. Hulpinsäure, ein δ -Hartharz der Hemiterpene (Burton and Stevens, 1965), wurde aufgrund der relativ hohen MHK von über 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Abbildung 31) primär ausgeschlossen, da hier eine sehr hohe Dosierung in Lebensmitteln notwendig wäre. Zum einen würde dies in hohen Kosten, zum anderen in bitteren Geschmacksveränderungen des Produkts resultieren.

Für Xanthohumol wurde eine MHK von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ bei einem pH-Wert von 6,0 ermittelt. Hier konnte kein bakterielles Wachstum beobachtet werden (Abbildung 32). Diese Konzentration stimmt mit bekannten Literaturdaten überein. Kramer et al. (2014) veröffentlichten für kommerzielles Xanthohumol (Fa. Hopsteiner, Mainburg) eine MHK von 3,1 $\mu\text{g/ml}$ bei einem pH-Wert von 5,0. Der MHK-Wert bei pH 7,2 lag dabei mit 12,5 $\mu\text{g/ml}$ deutlich höher (Kramer et al., 2014). Wie bereits vorher publiziert, spiegelt sich auch hier der große Einfluss des pH-Wertes auf die antimikrobielle Aktivität der Substanzen wider (Simpson, 1992) und konnte in Vorexperimenten zu dieser Arbeit ebenfalls beobachtet werden (Daten nicht separat dargestellt).

Die von Kramer et al. (2014) publizierte MHK lag trotz pH 5,0 mit 3,1 $\mu\text{g/ml}$ über der in dieser Arbeit ermittelten MHK von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ (pH 6,0). Dies ist darauf zurückzuführen, dass Kramer et al. Xanthohumol mit einer Reinheit von 65 – 85 % verwendet hatten. Die in dieser Arbeit eingesetzte Substanz zeichnete sich durch eine Reinheit von 96 % aus, wodurch möglicherweise eine größere Wirkung erzielt werden konnte. Bhattacharya et al. (2003) setzten Xanthohumol in einer Reinheit von 99 % gegen *Streptococcus mutans* ein und erzielten bei pH 6,5 eine MHK von 2,0 $\mu\text{g/ml}$. Gegen *Staphylococcus aureus* wurde für Xanthohumol jedoch eine MHK von 15 $\mu\text{g/ml}$ bestimmt (Rozalski et al., 2013). Somit ist die antimikrobielle Wirkung der Substanz stark von dem jeweiligen Mikroorganismus abhängig.

Kramer et al. (2014) untersuchten neben Xanthohumol, das zu den Prenylflavonoiden gezählt wird, außerdem ein Extrakt aus Hopfen- β -Säuren. β -Säuren zeichnen sich durch eine besonders hohe antimikrobielle Aktivität aus (Hough et al., 1957; Bhattacharya et al., 2003). Auch Kramer et al. zeigten für die β -Säure eine MHK von 1,6 $\mu\text{g/ml}$ (pH 5,0), die unter der MHK von Xanthohumol lag (3,1 $\mu\text{g/ml}$, pH 5,0). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ebenfalls eine β -Säure, das Lupulon (Gemisch aus Lupulon und Colupulon), untersucht. Für Lupulon wurde eine MHK von 2,25 $\mu\text{g/ml}$ ermittelt (Abbildung 33), die jedoch mit Xanthohumol (2,5 $\mu\text{g/ml}$) vergleichbar war. Larson et al. (1996) zeigten für β -Säuren eine MHK von 1 $\mu\text{g/ml}$. Allerdings wurde hier ein Gemisch aus Lupulon, Colupulon und Adlupulon sowie α -Säuren eingesetzt.

Damit ist ein direkter Vergleich der MHKs nicht möglich, da das Zusammensetzungsverhältnis der Komponenten die antimikrobielle Aktivität beeinflusst.

Sowohl Xanthohumol als auch Lupulon sind mit den hier ermittelten MHK-Werten von 2,5 µg/ml und 2,25 µg/ml effektive Hopfenkomponenten und für die synthetische Kopplung an das *L. monocytogenes*-bindende Peptid geeignet.

In Lebensmitteln ist die Wirkkonzentration der Hopfenkomponenten dennoch deutlich höher (Larson et al., 1996). Kramer et al. (2014) untersuchten die antimikrobielle Wirkung der Substanzen gegenüber *L. monocytogenes* in Fleischmarinaden und konnten erst bei einer Konzentration von 1000 µg/ml einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum der Bakterien beobachten. Dies könnte an dem lipophilen Charakter der Komponenten liegen. Der Hauptanteil der Substanzen akkumuliert möglicherweise in der lipophilen Phase der Suspension, während die Bakterien in der wässrigen Phase lokalisiert sind. Dies erhöht wiederum die minimale Wirkkonzentration der Hopfenkomponenten.

Auch in Lebensmitteln war die Wirkung der Substanzen stark vom pH-Wert und der Temperatur abhängig (Kramer et al., 2014). Damit zeigt sich, dass der effektive Einsatz der Hopfenkomponenten in Lebensmitteln nur unter bestimmten Lagerbedingungen möglich ist. Auch muss die in dieser Arbeit ermittelte MHK im Medium bei einer Verwendung in Lebensmitteln angepasst werden. Dussault et al. (2016) untersuchten das Wachstum von *L. monocytogenes* in Fleisch-*ready-to-eat*-Produkten unter Einfluss unterschiedlicher Umweltfaktoren. Sie zeigten, dass kleinste Veränderungen im pH-Wert (von 5,8 auf 6,2) oder in der NaCl-Konzentration (von 1,2 % auf 0,4 %) das Wachstum des Bakteriums begünstigen (Dussault et al., 2016). Somit müssen bei Lebensmitteln, trotz Einsatz von antimikrobiellen Substanzen, die Umweltfaktoren berücksichtigt werden, um maximale Lebensmittelsicherheit zu gewährleisten.

4.6 Verknüpfung von JB8 mit Xanthohumol zur Steigerung der antimikrobiellen Aktivität

Um die Wirkkonzentration der Hopfenkomponente Xanthohumol zu minimieren, wurde ein Konjugat aus Xanthohumol und einem *L. monocytogenes*-bindenden Peptid erzeugt. Antimikrobiell wirkende Peptide werden bei vielen Pathogenen als Varianten von natürlichen antimikrobiellen Peptiden synthetisiert oder mittels Phagen-Display selektioniert (Sainath Rao

et al., 2013). In dieser Arbeit wurden allerdings Peptide, die spezifisch an Oberflächenproteine von *L. monocytogenes* binden, mit einer antimikrobiellen Substanz verknüpft. Durch die selektive Bindung des Peptids an die Bakterienmembran soll durch Kolokalisation der Hopfenkomponente das Target des Wirkstoffs spezifisch gefunden werden und somit die notwendige Konzentration in Lebensmitteln verringert werden (Abbildung 36).

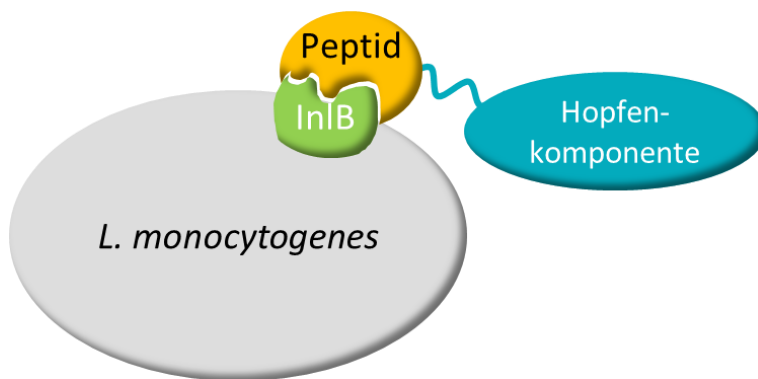


Abbildung 36: Schema des Konjugats aus InIB-bindendem Peptid und einer antimikrobiell wirkenden Hopfenkomponente. Durch die Verkopplung mit einem InIB-bindenden Peptid wird die Hopfenkomponente direkt an die Bakterienmembran gebracht, wo die als Ionophor wirkende Substanz ihre antimikrobiellen Eigenschaften entfalten kann. Die synthetische Verknüpfung erfolgt über einen Linker (beispielsweise Ttds-Cys).

Als Hopfenkomponente waren sowohl Xanthohumol als auch Lupulon mit ihren ermittelten MHK-Werten von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ und 2,25 $\mu\text{g/ml}$ für die Verkopplung geeignet. Beide Substanzen eignen sich außerdem für die Verwendung in Lebensmitteln, da sie keinen enorm bitteren Geschmack aufweisen und somit keinen direkten negativen Einfluss auf den Geschmack des Lebensmittelprodukts haben. Als Hauptbitterstoffe gelten die iso- α -Säuren, die während des Kochens der Stammwürze entstehen (Stevens, 1987). Da es sich bei dem verwendeten Lupulon allerdings um ein Gemisch aus Lupulon und Colupulon handelte, wäre eine Verknüpfung mit dem Peptid schwerer kontrollierbar. Außerdem schätzte der Hersteller der Konjugate (JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin) Xanthohumol stabiler ein, weshalb für die synthetische Kopplung Xanthohumol gewählt wurde.

Die Verkopplung wurde mit Peptid JB8 durchgeführt, da dieses InIB-Peptid die stärkste Bindung an *L. monocytogenes* zeigte (Abbildung 30). Zum Vergleich wurde zusätzlich eine Kopplung mit dem InIA-bindenden Peptid JB1 in Auftrag gegeben, da dieses Peptid ebenfalls eine hohe Affinität für *L. monocytogenes* zeigte (Abbildung 21) und somit einen guten Vergleich bietet. Daraus resultierten die Konjugate XN-JB8 und XN-JB1. Eine eventuelle antimikrobielle Wirkung der generierten Peptide wurde mittels MHK-Bestimmung

ausgeschlossen (Abbildung 34), so dass alle antimikrobiellen Effekte auf die Hopfenkomponente zurückgeführt werden können.

Schließlich wurde die MHK der Konjugate mit der MHK des Xanthohumols verglichen (Abbildung 35). Das Konjugat XN-JB8 zeigte eine antibakterielle Aktivität gegen *L. monocytogenes*, da das Bakterienwachstum reduziert wurde. Eine vollständige Inhibition des Wachstums konnte jedoch auch bei der höchsten eingesetzten Konzentration nicht erreicht werden. Entgegen der Annahme, dass Xanthohumol die Phospholipid-Membran der Bakterienzelle durchdringen muss, um aktiv wirken zu können (Alvesalo et al., 2006), zeigte das Konjugat XN-J8, dass die Substanz auch antimikrobiell wirken kann, wenn sich diese in unmittelbarer Nähe der Zelloberfläche befindet. In einer Studie von Rozalski et al. (2013) wurde bereits postuliert, dass neben der Penetration der Zellwand auch das Beschädigen der Zellmembran eine mögliche Wirkungsweise von Xanthohumol sein könnte. Dennoch wurde das bakterielle Wachstum von Xanthohumol deutlich effektiver gehemmt als von dem Konjugat XN-JB8 (Abbildung 35). Dieser Effekt könnte aus der Länge des Linkers und des Peptids resultieren. Möglicherweise ist durch die Verknüpfung des Xanthohumols der räumliche Abstand der Substanz zur Bakterienmembran so groß, so dass sie nicht vollständig wirken kann. Dies würde zudem erklären, warum das Konjugat XN-JB1 keinerlei antimikrobielle Aktivität zeigte (Abbildung 35). Durch die unterschiedlichen Aminosäuresequenzen der beiden Peptide ist hier eine noch größere räumliche Distanz zur Bakterienmembran denkbar. Der Linker Ttds-Cys wurde ausgewählt, da dieser laut Hersteller eine höhere Stabilität des Konstrukts gewährleistet. Dennoch könnten kürzere Linker oder andere Peptidsequenzen (beispielsweise JB6) zu einer Verbesserung der Aktivität führen. Linker, die sich nach der InlB-vermittelten Interaktion mit der Bakterienmembran spalten, könnten Xanthohumol einen besseren Zugang zur Bakterienmembran ermöglichen.

Zusätzlich könnte der gewählte pH-Wert die Bindung des Peptids an InlB negativ beeinflussen. Dies müsste in weiteren Experimenten bei unterschiedlichen pH-Werten überprüft werden.

Weiterhin ist durch die Verkopplung des Xanthohumols eine Veränderung der chemischen Struktur denkbar, wodurch die Wirksamkeit der Hopfenkomponente reduziert wird. Durch sequenzspezifische Änderungen der Peptide könnte dem Konstrukt eine zusätzliche Ladung verliehen werden, was gegebenenfalls einen positiven Effekt auf die Wirksamkeit haben könnte. In diesem Fall müsste allerdings die Affinität des Peptids für *L. monocytogenes* erneut überprüft werden.

Die in dieser Arbeit postulierte Hypothese, dass ein Konstrukt aus Hopfenkomponente und einem *L. monocytogenes*-bindenden Peptid die Wirksamkeit der antimikrobiellen Substanz

steigert, konnte zunächst nicht bestätigt werden. Jedoch kann in Anlehnung an die unter 4.3.6 beschriebene Zielsetzung untersucht werden, ob InIB-bindende Peptide die Interaktion zwischen InIB und dem humanen Rezeptor Met inhibieren können. Dies könnte wiederum die InIB-vermittelte Internalisierung von *L. monocytogenes* in Wirtszellen verhindern und damit weitere innovative Ansätze zur Unterbindung der pathogenen Mechanismen bieten.

4.7 Fazit und Ausblick

Das primäre Ziel der Arbeit war es, innovative Ansätze zu entwickeln, die zur Detektion des Bakteriums *L. monocytogenes* und zur Prävention der *Listeria*-Infektion beitragen sollen. Mit Hilfe eines Protein-basierten Phagen-Displays gegen *L. monocytogenes*-spezifische Oberflächenproteine InIA und InIB wurden hier erstmals InIA- und InIB-bindende Peptide JB1, JB2, JB6 und JB8 identifiziert. Eine Protein-basierte Anwendung profitiert, im Gegensatz zu bisher eingesetzten ganzen *L. monocytogenes*-Zellen, durch die Spezifität der resultierenden Peptide, die ein definiertes Target der Zelloberfläche binden. Die Expression von InIA und InIB ist spezifisch für *L. monocytogenes*. Dennoch muss im weiteren Verlauf zwingend die speziesspezifische Selektivität der Peptide durch Bindungsstudien mit weiteren *Listeria*-Spezies und anderen Bakterienstämmen überprüft und Kreuzreaktionen ausgeschlossen werden. Hierbei eignet sich unter anderem insbesondere die Spezies *L. innocua*, da diese kein InIA und InIB exprimiert und somit nicht virulent ist, sowie InIA-/InIB-deletierte *L. monocytogenes*-Zellen.

Anschließend ist ein Einsatz der in dieser Arbeit identifizierten Peptide zur Detektion von *L. monocytogenes* definitiv denkbar und kann in unterschiedlichen Bereichen Anwendung finden. Markierungen der spezifischen Peptide mit beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffen könnten eine schnelle und gezielte Detektion des Bakteriums in humanen Zellen oder Lebensmittelproben ermöglichen. Durch die Kopplung an Biosensoren könnte ebenfalls eine spezifische Überwachung von Kontaminationen in der Lebensmittelsicherheit gewährleistet werden.

Darüber hinaus wären therapeutische Anwendungen durch die Kopplung der Peptide an andere Wirkstoffe, beispielsweise antimikrobiell wirkende Peptide, ebenfalls denkbar. Hierfür müssten unterschiedliche Arten der Verknüpfung sowie unterschiedliche Substanzen getestet und die möglicherweise gesteigerte antimikrobielle Aktivität überprüft werden.

Für einen präventiven Ansatz konnte im weiteren Schritt die Interaktion zwischen InlA und dem humanen Rezeptor Ecad durch InlA-bindende Peptide erfolgreich gehemmt werden. Damit könnten diese spezifischen Peptide die Adhäsion und den Eintritt des Pathogens in humane Wirtszellen und damit den Infektionszyklus verhindern. Bisher erfolgten die Experimente mit rekombinanten Proteinen. Die verminderte Invasion des Bakteriums in humane Zellen unter Zugabe von InlA-bindenden Peptiden müsste daher zielführend *in vivo* verifiziert werden.

Da die Interaktion zwischen InlA und Ecad in einer frühen Phase der Infektion erfolgt, wäre der Einsatz der Peptide zur Inhibierung der InlA-Ecad-Interaktion als Prävention denkbar. Hierbei müsste die Einnahme der Peptide im Vorfeld, ohne eine diagnostizierte *Listeria*-Infektion bei beispielsweise immunsupprimierten Personen oder schwangeren Frauen, für die eine *L. monocytogenes*-Infektion fatal ist, erfolgen. Toxische Wirkungen der Peptide auf humane Zellen werden zwar nicht erwartet, müssten aber im Vorfeld ausgeschlossen werden. Fehlende negative Effekte auf beispielsweise die Darmflora müssten ebenfalls gezeigt werden. Obwohl Peptide für Umwelteinflüsse nicht sensitiv sind, muss die Interaktion der InlA-bindenden Peptide bei unterschiedlichen Parametern wie Temperatur und pH-Wert für weitere Anwendungen dennoch geprüft werden, um eine Wirksamkeit gewährleisten zu können.

In der Lebensmittelindustrie wäre eine Immobilisierung der Peptide auf der Verpackungsoberfläche oder der Einsatz beim Herstellungsprozess denkbar, um *L. monocytogenes* zu selektionieren und aus dem Produkt zu entfernen. In Lebensmittelprodukten, für dessen Herstellung Starterkulturen verwendet werden, müsste jedoch die Wirkung der Peptide auf die entsprechenden Starterkulturen getestet werden.

Aufgrund der gezeigten Interaktion zwischen IGF2R und InlA bzw. IGF2R und InlB *in vitro*, muss unter Verwendung von InlA- bzw. InlB-deletierten *L. monocytogenes*-Zellen überprüft werden, ob die Invasion in hepatische Sternzellen durch die Bindung von InlA- bzw. InlB an IGF2R erfolgt. Im nächsten Schritt ließe sich auch hier untersuchen, ob die Zugabe von InlA- und InlB-bindenden Peptiden die Interaktion mit der Wirtszelle und damit die Invasion des Bakteriums unterbindet. Dies könnte ebenfalls bei präventiven Ansätzen Anwendung finden.

Literaturverzeichnis

- Adey, N.B., Mataragnon, A.H., Rider, J.E., Carter, J.M. & Kay, B.K. (1995). Characterization of phage that bind plastic from phage-displayed random peptide libraries. *Gene*, 156(1), 27–31.
- Aileen Funke, S., van Groen, T., Kadish, I., Bartnik, D., Nagel-Steger, L., Brener, O., Sehl, T., Batra-Safferling, R., Moriscot, C., Schoehn, G., Horn, Anselm H C, Müller-Schiffmann, A., Korth, C., Sticht, H. & Willbold, D. (2010). Oral treatment with the d-enantiomeric peptide D3 improves the pathology and behavior of Alzheimer's Disease transgenic mice. *ACS chemical neuroscience*, 1(9), 639–648.
- Alvesalo, J., Vuorela, H., Tammela, P., Leinonen, M., Saikku, P. & Vuorela, P. (2006). Inhibitory effect of dietary phenolic compounds on *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures. *Biochemical pharmacology*, 71(6), 735–741.
- Arap, W., Pasqualini, R. & Ruoslahti, E. (1998). Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5349), 377–380.
- Aureli, P., Ferrini, A.M., Mannoni, V., Hodzic, S., Wedell-Weergaard, C. & Oliva, B. (2003). Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics. *International journal of food microbiology*, 83(3), 325–330.
- Banada, P.P. & Bhunia, A.K. (2008). Antibodies and Immunoassays for Detection of Bacterial Pathogens. In Zourob, M., Elwary, S. & Turner, A. (Hrsg.), *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems* (S. 567–602). New York, NY: Springer New York.
- Banerjee, M., Copp, J., Vuga, D., Marino, M., Chapman, T., van der Geer, Peter & Ghosh, P. (2004). GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are required for potentiation of Met activation. *Molecular microbiology*, 52(1), 257–271.
- Bang, J., Beuchat, L.R., Song, H., Gu, M.B., Chang, H.-I., Kim, H.S. & Ryu, J.-H. (2013). Development of a random genomic DNA microarray for the detection and identification of *Listeria monocytogenes* in milk. *International journal of food microbiology*, 161(2), 134–141.
- Barney, M.C., Lusk, L.T., Ting, P.L. & Ryder, D.S. (1995). METHOD OF INHIBITING LISTERIA (5,455,038).
- Bevan, D., Gherardi, E., Fan, T.-P., Edwards, D. & Warn, R. (2004). Diverse and potent activities of HGF/SF in skin wound repair. *The Journal of pathology*, 203(3), 831–838.
- Bhattacharya, S., Virani, S., Zavro, M. & Haas, G.J. (2003). Inhibition of *Streptococcus mutans* and Other Oral streptococci by hop (*Humulus lupulus* L.) constituents. *Economic Botany*(1), 118–125.
- Bhunia, A.K. (1997). Antibodies to *Listeria monocytogenes*. *Critical reviews in microbiology*, 23(2), 77–107.
- Bierne, H., Gouin, E., Roux, P., Caroni, P., Yin, H.L. & Cossart, P. (2001). A role for cofilin and LIM kinase in *Listeria*-induced phagocytosis. *The Journal of cell biology*, 155(1), 101–112.
- Bitto, E. & McKay, D.B. (2003). The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins. *The Journal of biological chemistry*, 278(49), 49316–49322.

- Boerlin, P. & Piffaretti, J.C. (1991). Typing of human, animal, food, and environmental isolates of *Listeria monocytogenes* by multilocus enzyme electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, 57(6), 1624–1629.
- Bonazzi, M., Veiga, E., Pizarro-Cerdá, J. & Cossart, P. (2008). Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InlA-mediated internalization of *Listeria monocytogenes*. *Cellular microbiology*, 10(11), 2208–2222.
- Brammer, L.A., Bolduc, B., Kass, J.L., Felice, K.M., Noren, C.J. & Hall, M.F. (2008). A target-unrelated peptide in an M13 phage display library traced to an advantageous mutation in the gene II ribosome-binding site. *Analytical biochemistry*, 373(1), 88–98.
- Branen, J.K. & Davidson, P.M. (2004). Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International journal of food microbiology*, 90(1), 63–74.
- Braun, L., Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G. & Cossart, P. (1997). InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Molecular microbiology*, 25(2), 285–294.
- Braun, L., Ghebrehiwet, B. & Cossart, P. (2000). gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *The EMBO journal*, 19(7), 1458–1466.
- Braun, L., Nato, F., Payrastra, B., Mazié, J.C. & Cossart, P. (1999). The 213-amino-acid leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* InlB protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI 3-kinase and membrane ruffling. *Molecular microbiology*, 34(1), 10–23.
- Brenner, D.J. & Staley, J.T. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, New York: Springer.
- Brigati, J.R., Samoylova, T.I., Jayanna, P.K. & Petrenko, V.A. (2008). Phage display for generating peptide reagents. *Current protocols in protein science*, Chapter 18, Unit 18.9.
- Briggs, D.E., Hough, J.S., Stevens, R. & Young, T.W. (1982). *Malting and brewing science*, New York: Kluwer Academic/Plenum.
- Buckwold, V.E., Wilson, Richard J H, Nalca, A., Beer, B.B., Voss, T.G., Turpin, J.A., Buckheit, R.W., Wei, J., Wenzel-Mathers, M., Walton, E.M., Smith, R.J., Pallansch, M., Ward, P., Wells, J., Chuvala, L., Sloane, S., Paulman, R., Russell, J., Hartman, T. & Ptak, R. (2004). Antiviral activity of hop constituents against a series of DNA and RNA viruses. *Antiviral research*, 61(1), 57–62.
- Burton, J.S. & Stevens, R. (1965). EVALUATION OF HOPS. XI.* THE HARD RESIN AND PRESENCE OF HULUPINIC ACID. *Journal of the Institute of Brewing*, 71(1), 51–56.
- Bussolino, F., Di Renzo, M F, Ziche, M., Bocchietto, E., Olivero, M., Naldini, L., Gaudino, G., Tamagnone, L., Coffer, A. & Comoglio, P.M. (1992). Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor, which stimulates endothelial cell motility and growth. *The Journal of cell biology*, 119(3), 629–641.
- Byrd, J.C. & MacDonald, R.G. (2000). Mechanisms for high affinity mannose 6-phosphate ligand binding to the insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptor. *The Journal of biological chemistry*, 275(25), 18638–18646.
- Campion, A.; Casey, P. G.; Des Field; Cotter, P. D.; Hill, C.; Ross, R. P. (2013). In vivo activity of nisin A and nisin V against *Listeria monocytogenes* in mice. *BMC microbiology*, 13, 23.

- Carnazza, S., Gioffrè, G., Felici, F. & Guglielmino, S. (2007). Recombinant phage probes for *Listeria monocytogenes*. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 19(39), 395011.
- Carnazza, S., Foti, C., Gioffrè, G., Felici, F. & Guglielmino, S. (2008). Specific and selective probes for *Pseudomonas aeruginosa* from phage-displayed random peptide libraries. *Biosensors & bioelectronics*, 23(7), 1137–1144.
- Caro, L.G. & Schnös, M. (1966). The attachment of the male-specific bacteriophage F1 to sensitive strains of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56(1), 126–132.
- Cermak, P., Olsovska, J., Mikyska, A., Dusek, M., Kadleckova, Z., Vanicek, J., Nyc, O., Sigler, K., Bostikova, V. & Bostik, P. (2017). Strong antimicrobial activity of xanthohumol and other derivatives from hops (*Humulus lupulus* L.) on gut anaerobic bacteria. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 125(11), 1033–1038.
- Chen, Z., Jin, W., Liu, H., Zhao, Z. & Cheng, K. (2015). Discovery of Peptide ligands for hepatic stellate cells using phage display. *Molecular pharmaceuticals*, 12(6), 2180–2188.
- Cho, J.-M., Yun, S.-M., Choi, Y.-H., Heo, J., Kim, N.-J., Kim, S.-H. & Kim, E.-H. (2018). Xanthohumol prevents dextran sulfate sodium-induced colitis via inhibition of IKK β /NF- κ B signaling in mice. *Oncotarget*, 9(1), 866–880.
- Christensen, E.G., Gram, L. & Kastbjerg, V.G. (2011). Sublethal triclosan exposure decreases susceptibility to gentamicin and other aminoglycosides in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(9), 4064–4071.
- Colgate, E.C., Miranda, C.L., Stevens, J.F., Bray, T.M. & Ho, E. (2007). Xanthohumol, a prenylflavonoid derived from hops induces apoptosis and inhibits NF-kappaB activation in prostate epithelial cells. *Cancer letters*, 246(1-2), 201–209.
- Cossart, P. (2011). Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium *Listeria monocytogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(49), 19484–19491.
- Cossart, P. & Toledo-Arana, A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes and infection*, 10(9), 1041–1050.
- Cwirla, S.E., Peters, E.A., Barrett, R.W. & Dower, W.J. (1990). Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16), 6378–6382.
- Dabiri, G.A., Sanger, J.M., Portnoy, D.A. & Southwick, F.S. (1990). *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(16), 6068–6072.
- De Bleser, P J, Scott, C.D., Niki, T., Xu, G., Wisse, E. & Geerts, A. (1996). Insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate-receptor expression in liver and serum during acute CCl₄ intoxication in the rat. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 23(6), 1530–1537.
- Devi, G.R., De Souza, A T, Byrd, J.C., Jirtle, R.L. & MacDonald, R.G. (1999). Altered ligand binding by insulin-like growth factor II/mannose 6-phosphate receptors bearing missense mutations in human cancers. *Cancer research*, 59(17), 4314–4319.
- Dhar, G., Faull, K.F. & Schneewind, O. (2000). Anchor Structure of Cell Wall Surface Proteins in *Listeria monocytogenes*†. *Biochemistry*, 39(13), 3725–3733.

- Díaz-Perlas, C., Sánchez-Navarro, M., Oller-Salvia, B., Moreno, M., Teixidó, M. & Giralt, E. (2017). Phage display as a tool to discover blood-brain barrier (BBB)-shuttle peptides: panning against a human BBB cellular model. *Biopolymers*, *108*(1).
- Dore, J.M., Morard, F., Vita, N. & Wijdenes, J. (1998). Identification and location on syndecan-1 core protein of the epitopes of B-B2 and B-B4 monoclonal antibodies. *FEBS letters*, *426*(1), 67–70.
- Doumith, M., Buchrieser, C., Glaser, P., Jacquet, C. & Martin, P. (2004). Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, *42*(8), 3819–3822.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P. & Cossart, P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. *Molecular microbiology*, *16*(2), 251–261.
- Dramsi, S., Dehoux, P., Lebrun, M., Goossens, P.L. & Cossart, P. (1997). Identification of four new members of the internalin multigene family of *Listeria monocytogenes* EGD. *Infection and immunity*, *65*(5), 1615–1625.
- Drees, F., Pokutta, S., Yamada, S., Nelson, W.J. & Weis, W.I. (2005). Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly. *Cell*, *123*(5), 903–915.
- Dussault, D., Vu, K.D. & Lacroix, M. (2016). Development of a model describing the inhibitory effect of selected preservatives on the growth of *Listeria monocytogenes* in a meat model system. *Food microbiology*, *53*(Pt B), 115–121.
- EFSA und European Centre for Disease Prevention and Control (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* *15*(12), 148.
- Elliason, D.J; Tatini, S.R (1999). Enhanced inactivation of *Salmonella typhimurium* and verotoxigenic *Escherichia coli* by nisin at 6.5°C. *Food microbiology*, *16*(3), 257–267.
- Engelbrecht, F., Chun, S.K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W. & Sokolovic, Z. (1996). A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Molecular microbiology*, *21*(4), 823–837.
- Flachbartova, Z., Pulzova, L., Bencurova, E., Potocnakova, L., Comor, L., Bednarikova, Z. & Bhide, M. (2016). Inhibition of multidrug resistant *Listeria monocytogenes* by peptides isolated from combinatorial phage display libraries. *Microbiological research*, *188-189*, 34–41.
- Fuh, G. & Sidhu, S.S. (2000). Efficient phage display of polypeptides fused to the carboxy-terminus of the M13 gene-3 minor coat protein. *FEBS letters*, *480*(2-3), 231–234.
- Fujita, Y., Krause, G., Scheffner, M., Zechner, D., Leddy, Hugo E Molina, Behrens, J., Sommer, T. & Birchmeier, W. (2002). Hakai, a c-Cbl-like protein, ubiquitinates and induces endocytosis of the E-cadherin complex. *Nature cell biology*, *4*(3), 222–231.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E. & Cossart, P. (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell*, *65*(7), 1127–1141.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S. & Sansonetti, P. (1987). In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infection and immunity*, *55*(11), 2822–2829.

- Gasanov, U., Koina, C., Beagley, K.W., Aitken, R.J. & Hansbro, P.M. (2006). Identification of the insulin-like growth factor II receptor as a novel receptor for binding and invasion by *Listeria monocytogenes*. *Infection and immunity*, 74(1), 566–577.
- Gerhauser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauff, J., Neumann, I., Scherf, H.-R., Frank, N., Bartsch, H. & Becker, H. (2002). Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Molecular cancer therapeutics*, 1(11), 959–969.
- Ghebrehiwet, B. & Peerschke, E.I. (1998). Structure and function of gC1q-R: a multiligand binding cellular protein. *Immunobiology*, 199(2), 225–238.
- Gherardi, E., Youles, M.E., Miguel, R.N., Blundell, T.L., Iamele, L., Gough, J., Bandyopadhyay, A., Hartmann, G. & Butler, P Jonathan G (2003). Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), 12039–12044.
- Giuliani, A., Pirri, G. & Nicoletto, S. (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Open Life Sciences*, 2(1), 1–33.
- Gouin, E., Mengaud, J. & Cossart, P. (1994). The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a nonpathogenic species. *Infection and immunity*, 62(8), 3550–3553.
- Grimme, S., Höning, S., Figura, K. von & Schmidt, B. (2000). Endocytosis of insulin-like growth factor II by a mini-receptor based on repeat 11 of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor. *The Journal of biological chemistry*, 275(43), 33697–33703.
- HOFFMANN BERLING, H. & MAZE, R. (1964). RELEASE OF MALE-SPECIFIC BACTERIOPHAGES FROM SURVIVING HOST BACTERIA. *Virology*, 22, 305–313.
- Holmes, O., Pillozzi, S., Deakin, J.A., Carafoli, F., Kemp, L., Butler, P J G, Lyon, M. & Gherardi, E. (2007). Insights into the structure/function of hepatocyte growth factor/scatter factor from studies with individual domains. *Journal of molecular biology*, 367(2), 395–408.
- Hough, J.S., Howard, G.A. & Slater, C.A. (1957). BACTERIOSTATIC ACTIVITIES OF HOP RESIN MATERIALS. *Journal of the Institute of Brewing*, 63(4), 331–333.
- Huang, J., Ru, B., Li, S., Lin, H. & Guo, F.-B. (2010). SAROTUP: scanner and reporter of target-unrelated peptides. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, 101932.
- Huang, J.X., Bishop-Hurley, S.L. & Cooper, M.A. (2012). Development of anti-infectives using phage display: biological agents against bacteria, viruses, and parasites. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(9), 4569–4582.
- Ireton, K., Payrastra, B., Chap, H., Ogawa, W., Sakaue, H., Kasuga, M. & Cossart, P. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5288), 780–782.
- Ishiwata, T., Bergmann, U., Kornmann, M., Lopez, M., Beger, H.G. & Korc, M. (1997). Altered expression of insulin-like growth factor II receptor in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 15(4), 367–373.
- Jang, W.S., Lee, S.-C., Lee, Y.S., Shin, Y.P., Shin, K.H., Sung, B.H., Kim, B.S., Lee, S.H. & Lee, I.H. (2007). Antimicrobial effect of halocidin-derived peptide in a mouse model of *Listeria* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(11), 4148–4156.

- Jiang, Z., Vasil, A.I., Hale, J.D., Hancock, Robert E W, Vasil, M.L. & Hodges, R.S. (2008). Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic alpha-helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 90(3), 369–383.
- Jonquières, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P. & Cossart, P. (1999). Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Molecular microbiology*, 34(5), 902–914.
- Jonquières, R., Pizarro-Cerdá, J. & Cossart, P. (2001). Synergy between the N- and C-terminal domains of InlB for efficient invasion of non-phagocytic cells by *Listeria monocytogenes*. *Molecular microbiology*, 42(4), 955–965.
- Junttila, J.R., Niemelä, S.I. & Hirn, J. (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. *The Journal of applied bacteriology*, 65(4), 321–327.
- Kenzel, J., Schlegelmilch, L. & Funke, S.A. (2018). Phage Display Selection of Specific Ligands for *Listeria monocytogenes*: Novel Tools for Diagnostic or Therapeutic Purposes. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 7(1), 31–38.
- Keweloh, H. (2011). *Mikroorganismen in Lebensmitteln. Theorie und Praxis der Lebensmittelhygiene*, Haan-Gruiten: Pfanneberg.
- Kiess, W., Hoeflich, A., Yang, Y., Kessler, U., Flyvbjerg, A. & Barenton, B. (1993). The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, function and differential expression. *Advances in experimental medicine and biology*, 343, 175–188.
- Kobe, B. & Deisenhofer, J. (1993). Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature*, 366(6457), 751–756.
- Kocks, C., Gouin, E., Tabouret, M., Berche, P., Ohayon, H. & Cossart, P. (1992). *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell*, 68(3), 521–531.
- Kozlov, G., Perreault, A., Schrag, J.D., Park, M., Cygler, M., Gehring, K. & Ekiel, I. (2004). Insights into function of PSI domains from structure of the Met receptor PSI domain. *Biochemical and biophysical research communications*, 321(1), 234–240.
- Kramer, B., Thielmann, J., Hickisch, A., Muranyi, P., Wunderlich, J. & Hauser, C. (2014). Antimicrobial activity of hop extracts against foodborne pathogens for meat applications. *Journal of applied microbiology*, 118(3), 648–657.
- Krauss, G., Cook, A.H. & Verzele, M. (1969). RECOMMENDATIONS concerning NOMENCLATURE OF HOP RESIN COMPONENTS. *Journal of the Institute of Brewing*, 75(4), 340–342.
- Krook, M., Mosbach, K. & Ramström, O. (1998). Novel peptides binding to the Fc-portion of immunoglobulins obtained from a combinatorial phage display peptide library. *Journal of immunological methods*, 221(1-2), 151–157.
- Larson, A.E., Yu, R.R., Lee, O.A., Price, S., Haas, G.J. & Johnson, E.A. (1996). Antimicrobial activity of hop extracts against *Listeria monocytogenes* in media and in food. *International journal of food microbiology*, 33(2-3), 195–207.
- Lebrun, M., Mengaud, J., Ohayon, H., Nato, F. & Cossart, P. (1996). Internalin must be on the bacterial surface to mediate entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Molecular microbiology*, 21(3), 579–592.

- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner, B. & Cossart, P. (1999). A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *The EMBO journal*, 18(14), 3956–3963.
- Lecuit, M., Hurme, R., Pizarro-Cerda, J., Ohayon, H., Geiger, B. & Cossart, P. (2000). A role for alpha- and beta-catenins in bacterial uptake. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(18), 10008–10013.
- Lecuit, M., Ohayon, H., Braun, L., Mengaud, J. & Cossart, P. (1997). Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infection and immunity*, 65(12), 5309–5319.
- Lingnau, A., Domann, E., Hudel, M., Bock, M., Nichterlein, T., Wehland, J. & Chakraborty, T. (1995). Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infection and immunity*, 63(10), 3896–3903.
- López-Pedemonte, T.J., Roig-Sagués, A.X., Trujillo, A.J., Capellas, M. & Guamis, B. (2003). Inactivation of spores of *Bacillus cereus* in cheese by high hydrostatic pressure with the addition of nisin or lysozyme. *Journal of dairy science*, 86(10), 3075–3081.
- Machner, M.P., Frese, S., Schubert, W.-D., Orian-Rousseau, V., Gherardi, E., Wehland, J., Niemann, H.H. & Heinz, D.W. (2003). Aromatic amino acids at the surface of InlB are essential for host cell invasion by *Listeria monocytogenes*. *Molecular microbiology*, 48(6), 1525–1536.
- Marino, M., Braun, L., Cossart, P. & Ghosh, P. (1999). Structure of the InlB leucine-rich repeats, a domain that triggers host cell invasion by the bacterial pathogen *L. monocytogenes*. *Molecular cell*, 4(6), 1063–1072.
- Marino, M., Braun, L., Cossart, P. & Ghosh, P. (2000). A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria* internalins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8784–8788.
- Marino, M., Banerjee, M., Jonquières, R., Cossart, P. & Ghosh, P. (2002). GW domains of the *Listeria monocytogenes* invasion protein InlB are SH3-like and mediate binding to host ligands. *The EMBO journal*, 21(21), 5623–5634.
- Markland, W., Roberts, B.L., Saxena, M.J., Guterman, S.K. & Ladner, R.C. (1991). Design, construction and function of a multicopy display vector using fusions to the major coat protein of bacteriophage M13. *Gene*, 109(1), 13–19.
- Maróti, G., Kereszt, A., Kondorosi, E. & Mergaert, P. (2011). Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Research in microbiology*, 162(4), 363–374.
- Marquis, H., Doshi, V. & Portnoy, D.A. (1995). The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. *Infection and immunity*, 63(11), 4531–4534.
- McLachlan, R.W., Kraemer, A., Helwani, F.M., Kovacs, E.M. & Yap, A.S. (2007). E-cadherin adhesion activates c-Src signaling at cell-cell contacts. *Molecular biology of the cell*, 18(8), 3214–3223.
- Mendonça, M., Conrad, N.L., Conceição, F.R., Moreira, A.N., da Silva, Wladimir P, Aleixo, J.A. & Bhunia, A.K. (2012). Highly specific fiber optic immunosensor coupled with

- immunomagnetic separation for detection of low levels of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii*. *BMC microbiology*, 12, 275.
- Menendez, A. & Scott, J.K. (2005). The nature of target-unrelated peptides recovered in the screening of phage-displayed random peptide libraries with antibodies. *Analytical biochemistry*, 336(2), 145–157.
- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege R-M & Cossart, P. (1996). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell*, 84(6), 923–932.
- Mihajlovic, M. & Lazaridis, T. (2010). Antimicrobial peptides in toroidal and cylindrical pores. *Biochimica et biophysica acta*, 1798(8), 1485–1493.
- Milton, R., Milton, S. & Kent, S. (1992). Total chemical synthesis of a D-enzyme: the enantiomers of HIV-1 protease show reciprocal chiral substrate specificity [corrected]. *Science*, 256(5062), 1445–1448.
- Mizobuchi, S. & Sato, Y. (1985). Antifungal Activities of Hop Bitter Resins and Related Compounds. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(2), 399–403.
- Morgan, D.O., Edman, J.C., Standring, D.N., Fried, V.A., Smith, M.C., Roth, R.A. & Rutter, W.J. (1987). Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature*, 329(6137), 301–307.
- Morton, J., Karoonuthaisiri, N., Charlermroj, R., Stewart, L.D., Elliott, C.T. & Grant, I.R. (2013). Phage display-derived binders able to distinguish *Listeria monocytogenes* from other *Listeria* species. *PLoS one*, 8(9), e74312.
- Niemann, H.H., Jäger, V., Butler, P Jonathan G, van den Heuvel, Joop, Schmidt, S., Ferraris, D., Gherardi, E. & Heinz, D.W. (2007). Structure of the human receptor tyrosine kinase met in complex with the *Listeria* invasion protein InlB. *Cell*, 130(2), 235–246.
- Ohk, S.-H. & Bhunia, A.K. (2013). Multiplex fiber optic biosensor for detection of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* from ready-to-eat meat samples. *Food microbiology*, 33(2), 166–171.
- Organ, S.L. & Tsao, M.-S. (2011). An overview of the c-MET signaling pathway. *Therapeutic advances in medical oncology*, 3(1 Suppl), S7-S19.
- Otaibi, M. A. I. & Al-Demerdash, H. (2008). Improvement of the quality and shelf concentrated yoghurt (labneh) by the addition essential oils. *African Journal of Microbiology Research*, 2.
- Overduin, M., Harvey, T., Bagby, S., Tong, K., Yau, P., Takeichi, M. & Ikura, M. (1995). Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science*, 267(5196), 386–389.
- Palamand, S.R. & Aldenhoff, J.M. (1973). Bitter tasting compounds of beer. Chemistry and taste properties of some hop resin compounds. *Journal of agricultural and food chemistry*, 21(4), 535–543.
- Paoli, G.C. & Brewster, J.D. (2007). A LISTERIA MONOCYTOGENES-SPECIFIC PHAGE-DISPLAYED ANTIBODY FRAGMENT RECOGNIZES A CELL SURFACE PROTEIN WHOSE EXPRESSION IS REGULATED BY PHYSIOLOGICAL CONDITIONS. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, 15(1), 77–91.
- Paoli, G.C., Chen, C.-Y. & Brewster, J.D. (2004). Single-chain Fv antibody with specificity for *Listeria monocytogenes*. *Journal of immunological methods*, 289(1-2), 147–155.

- Papkoff, J. (1997). Regulation of complexed and free catenin pools by distinct mechanisms. Differential effects of Wnt-1 and v-Src. *The Journal of biological chemistry*, 272(7), 4536–4543.
- Pardridge, W.M. (2012). Drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(11), 1959–1972.
- Parida, S.K., Domann, E., Rohde, M., Müller, S., Darji, A., Hain, T., Wehland, J. & Chakraborty, T. (1998). Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. *Molecular microbiology*, 28(1), 81–93.
- Parmley, S.F. & Smith, G.P. (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene*, 73(2), 305–318.
- Paterson, J.S. (1940). The antigenic structure of organisms of the genus *Listerella*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 51(3), 427–436.
- Pavelić, K., Kolak, T., Kapitanović, S., Radosević, S., Spaventi, S., Kruslin, B. & Pavelić, J. (2003). Gastric cancer: the role of insulin-like growth factor 2 (IGF 2) and its receptors (IGF 1R and M6-P/IGF 2R). *The Journal of pathology*, 201(3), 430–438.
- Petran, R.L. & Zottola, E.A. (1989). A Study of Factors Affecting Growth and Recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of food science*, 54(2), 458–460.
- Pizarro-Cerdá, J. & Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124(4), 715–727.
- Pizarro-Cerdá, J., Kühbacher, A. & Cossart, P. (2012). Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: an updated view. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(11).
- Pochop, J., Kačániová, M., Hleba, L., Lopasovský, L., Bobková, A., Zeleňáková, L. & Stričík, M. (2012). Detection of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food by Step One real-time polymerase chain reaction. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, 47(3), 212–216.
- Portanti, O., Di Febo, T., Luciani, M., Pompili, C., Lelli, R. & Semprini, P. (2011). Development and validation of an antigen capture ELISA based on monoclonal antibodies specific for *Listeria monocytogenes* in food. *Veterinaria italiana*, 47(3), 281-90, 271-80.
- Power, F.B., Tutin, F. & Rogerson, H. (1913). CXXXV. – The constituents of hops. *J. Chem. Soc., Trans.*, 103(0), 1267–1292.
- Poyart-Salmeron, C., Carlier, C., Trieu-Cuot, P., Courtieu, A.L. & Courvalin, P. (1990). Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *Lancet (London, England)*, 335(8703), 1422–1426.
- Pressman, B.C. (1976). Biological applications of ionophores. *Annual review of biochemistry*, 45, 501–530.
- Produktwarnung (2017). Rückruf: Listerien – Hersteller ruft Hähnchensnacks über verschiedene Handelsketten zurück.
- Rácz, P., Tenner, K. & Mérö, E. (1972). Experimental *Listeria enteritis*. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental listeria infection. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 26(6), 694–700.

- Raffelsbauer, D., Bubert, A., Engelbrecht, F., Scheinpflug, J., Simm, A., Hess, J., Kaufmann, S.H. & Goebel, W. (1998). The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Molecular & general genetics: MGG*, 260(2-3), 144–158.
- Rajik, M., Omar, A.R., Ideris, A., Hassan, S.S. & Yusoff, K. (2009). A novel peptide inhibits the influenza virus replication by preventing the viral attachment to the host cells. *International journal of biological sciences*, 5(6), 543–548.
- Rao, S.S., Mohan, Ketha V Krishna, Gao, Y. & Atreya, C.D. (2013). Identification and evaluation of a novel peptide binding to the cell surface of *Staphylococcus aureus*. *Microbiological research*, 168(2), 106–112.
- Regan, J.P. & Elvidge, J.A. (1969). CHEMISTRY OF HOP CONSTITUENTS. PART XXXIII REACTIONS OF β -ACIDS. *Journal of the Institute of Brewing*, 75(1), 10–14.
- Rodi, D.J. & Makowski, L. (1999). Phage-display technology--finding a needle in a vast molecular haystack. *Current opinion in biotechnology*, 10(1), 87–93.
- Rozalski, M., Micota, B., Sadowska, B., Stochmal, A., Jedrejek, D., Wieckowska-Szakiel, M. & Rozalska, B. (2013). Antiadherent and antibiofilm activity of *Humulus lupulus* L. derived products: new pharmacological properties. *BioMed research international*, 2013, 101089.
- Ryser, E.T. & Marth, E.H. (Hrsg.) (2007). *Listeria, listeriosis, and food safety*, Boca Raton: Taylor & Francis.
- Sainath Rao, S., Mohan, Ketha V K & Atreya, C.D. (2013). A peptide derived from phage display library exhibits antibacterial activity against *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS one*, 8(2), e56081.
- Sakamoto, K. & Konings, W.N. (2003). Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International journal of food microbiology*, 89(2-3), 105–124.
- SALIVAR, W.O., TZAGOLOFF, H. & PRATT, D. (1964). SOME PHYSICAL-CHEMICAL AND BIOLOGICAL PROPERTIES OF THE ROD-SHAPED COLIPHAGE M13. *Virology*, 24, 359–371.
- Salmond, C.V., Kroll, R.G. & Booth, I.R. (1984). The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 130(11), 2845–2850.
- Sanmartín, P., Villa, F., Silva, B., Cappitelli, F. & Prieto, B. (2011). Color measurements as a reliable method for estimating chlorophyll degradation to phaeopigments. *Biodegradation*, 22(4), 763–771.
- Schmalreck, A.F. & Teuber, M. (1975). Structural features determining the antibiotic potencies of natural and synthetic hop bitter resins, their precursors and derivatives. *Canadian journal of microbiology*, 21(2), 205–212.
- Schubert, W.D., Urbanke, C., Ziehm, T., Beier, V., Machner, M.P., Domann, E., Wehland, J., Chakraborty, T. & Heinz, D.W. (2002). Structure of internalin, a major invasion protein of *Listeria monocytogenes*, in complex with its human receptor E-cadherin. *Cell*, 111(6), 825–836.
- Scott, J.K. & Smith, G.P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science (New York, N.Y.)*, 249(4967), 386–390.
- Shahamat, M., Seaman, A. & Woodbine, M. (1980). Survival of *Listeria monocytogenes* in high salt concentrations. *Zentralblatt für Bakteriologie. 1. Abt. Originale. A: Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie*, 246(4), 506–511.

- Shen, C. & Sofos, J.N. (2008). Antilisterial activity of hops beta acids in broth with or without other antimicrobials. *Journal of food science*, 73(9), M438-42.
- Shen, C., Geornaras, I., Kendall, P.A. & Sofos, J.N. (2009). Control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by dipping in hops beta acids solutions. *Journal of food protection*, 72(4), 702–706.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M. & Ireton, K. (2000). InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*, 103(3), 501–510.
- Shimwell, J.L. (1937). ON THE RELATION BETWEEN THE STAINING PROPERTIES OF BACTERIA AND THEIR REACTION TOWARDS HOP ANTISEPTIC. *Journal of the Institute of Brewing*, 43(2), 111–118.
- Simpson, W.J. (1993a). CAMBRIDGE PRIZE LECTURE. STUDIES ON THE SENSITIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA TO HOP BITTER ACIDS. *Journal of the Institute of Brewing*, 99(5), 405–411.
- Simpson, W.J. (1993b). Influence of intracellular pH on light emission from a luxA/B derivative of *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. *Journal of bioluminescence and chemiluminescence*, 8(3), 141–145.
- Simpson, W.J. (1993c). IONIZATION BEHAVIOUR OF HOP COMPOUNDS AND HOP-DERIVED COMPOUNDS. *Journal of the Institute of Brewing*, 99(4), 317–326.
- Simpson, W.J. (1993d). Ionophoric action of trans-isohumulone on *Lactobacillus brevis*. *Journal of General Microbiology*, 139(5), 1041–1045.
- Simpson, W.J. & Smith, A.R. (1992). Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives. *The Journal of applied bacteriology*, 72(4), 327–334.
- Smith, G.P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science (New York, N.Y.)*, 228(4705), 1315–1317.
- Sousa, S., Cabanes, D., Archambaud, C., Colland, F., Lemichez, E., Popoff, M., Boisson-Dupuis, S., Gouin, E., Lecuit, M., Legrain, P. & Cossart, P. (2005). ARHGAP10 is necessary for alpha-catenin recruitment at adherens junctions and for *Listeria* invasion. *Nature cell biology*, 7(10), 954–960.
- Sousa, S., Cabanes, D., Bougnères, L., Lecuit, M., Sansonetti, P., Tran-Van-Nhieu, G. & Cossart, P. (2007). Src, cortactin and Arp2/3 complex are required for E-cadherin-mediated internalization of *Listeria* into cells. *Cellular microbiology*, 9(11), 2629–2643.
- Srinivasan, V., Goldberg, D. & Haas, G.J. (2004). Contributions to the antimicrobial spectrum of hop constituents. *Economic Botany* (58), 230–238.
- Stamos, J., Lazarus, R.A., Yao, X., Kirchhofer, D. & Wiesmann, C. (2004). Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *The EMBO journal*, 23(12), 2325–2335.
- Stevens, R. (1967). The Chemistry of Hop Constituents. *Chemical Reviews*, 67(1), 19–71.
- Sun, Z., Zhou, C., Liu, F., Zhang, W., Chen, J., Pan, Y., Ma, L., Liu, Q., Du, Y., Yang, J. & Wang, Q. (2018). Inhibition of breast cancer cell survival by Xanthohumol via modulation of the Notch signaling pathway in vivo and in vitro. *Oncology letters*, 15(1), 908–916.
- Tabata, N., Ito, M., Tomoda, H. & Omura, S. (1997). Xanthohumols, diacylglycerol acyltransferase inhibitors, from *Humulus lupulus*. *Phytochemistry*, 46(4), 683–687.
- Temple, M.E. & Nahata, M.C. (2000). Treatment of listeriosis. *The Annals of pharmacotherapy*, 34(5), 656–661.

- Teuber, M. & Schmalreck, A.F. (1973). Membrane leakage in *Bacillus subtilis* 168 induced by the hop constituents lupulone, humulone, isohumulone and humulinic acid. *Archiv fur Mikrobiologie*, 94(2), 159–171.
- Tobe, H., Muraki, Y., Kitamura, K., Komiyama, O., Sato, Y., Sugioka, T., Maruyama, H.B., Matsuda, E. & Nagai, M. (2014). Bone Resorption Inhibitors from Hop Extract. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(1), 158–159.
- U.S. Food and Drug Administration (2003). Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. *Bacteriological Analytical Manual Online*.
- van Cleemput, M., Cattoor, K., Bosscher, K. de, Haegeman, G., Keukeleire, D. de & Heyerick, A. (2009). Hop (*Humulus lupulus*)-derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. *Journal of natural products*, 72(6), 1220–1230.
- van Groen, T., Kadish, I., Wiesehan, K., Funke, S.A. & Willbold, D. (2009). In vitro and in vivo staining characteristics of small, fluorescent, Abeta42-binding D-enantiomeric peptides in transgenic AD mouse models. *ChemMedChem*, 4(2), 276–282.
- van Nieuwenhove, L., Büscher, P., Balharbi, F., Humbert, M., Dieltjens, T., Guisez, Y. & Lejon, V. (2012). Identification of mimotopes with diagnostic potential for *Trypanosoma brucei* gambiense variant surface glycoproteins using human antibody fractions. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(6), e1682.
- Van Regenmortel, M H & Muller, S. (1998). D-peptides as immunogens and diagnostic reagents. *Current opinion in biotechnology*, 9(4), 377–382.
- Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. & Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical microbiology reviews*, 14(3), 584–640.
- Veiga, E. & Cossart, P. (2005). *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nature cell biology*, 7(9), 894–900.
- Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J. & Khrestchatsky, M. (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug discovery today*, 15(1-2), 40–56.
- Walker, T.K. & Blakebrough, N. (1952). BACTERIOSTATIC POWER OF HUMULONE BOILING-PRODUCT. *Journal of the Institute of Brewing*, 58(1), 13–24.
- Wang, L. & Shen, C. (2015). Survival of Unstressed and Acid-, Cold-, and Starvation-Stress-Adapted *Listeria monocytogenes* in Ham Extract with Hops Beta Acids and Consumer Acceptability of HBA on Ready-to-Eat Ham. *BioMed research international*, 2015, 817042.
- Watters, J.M., Telleman, P. & Junghans, R.P. (1997). An optimized method for cell-based phage display panning. *Immunotechnology: an international journal of immunological engineering*, 3(1), 21–29.
- Wei, G.-X. & Bobek, L.A. (2005). Human salivary mucin MUC7 12-mer-L and 12-mer-D peptides: antifungal activity in saliva, enhancement of activity with protease inhibitor cocktail or EDTA, and cytotoxicity to human cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(6), 2336–2342.
- Wei, J., Liang, J., Shi, Q., Yuan, P., Meng, R., Tang, X., Yu, L. & Guo, N. (2014). Genome-wide transcription analyses in *Mycobacterium tuberculosis* treated with lupulone. *Brazilian journal of microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 45(1), 333–341.

- Welch, B.D., Francis, J.N., Redman, J.S., Paul, S., Weinstock, M.T., Reeves, J.D., Lie, Y.S., Whitby, F.G., Eckert, D.M., Hill, C.P., Root, M.J. & Kay, M.S. (2010). Design of a potent D-peptide HIV-1 entry inhibitor with a strong barrier to resistance. *Journal of virology*, 84(21), 11235–11244.
- Wiedemann, I.; Breukink, E.; van Kraaij, C.; Kuipers, O. P.; Bierbaum, G.; Kruijff, B. de; Sahl, H. G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *The Journal of biological chemistry*, 276(3), 1772–1779.
- Wiedmann, M., Bruce, J.L., Keating, C., Johnson, A.E., McDonough, P.L. & Batt, C.A. (1997). Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infection and immunity*, 65(7), 2707–2716.
- Wilson, B.A. (op. 2011). *Bacterial pathogenesis. A molecular approach*, Washington, DC: ASM Press.
- World Health Organization (2004). Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Technical report. *Microbiological Risk Assessment Series 5*.
- World Health Organization - SIXTY-THIRD WORLD HEALTH ASSEMBLY (2010). Food safety.
- Wu, H., Pfarr, D.S., Johnson, S., Brewah, Y.A., Woods, R.M., Patel, N.K., White, W.I., Young, J.F. & Kiener, P.A. (2007). Development of motavizumab, an ultra-potent antibody for the prevention of respiratory syncytial virus infection in the upper and lower respiratory tract. *Journal of molecular biology*, 368(3), 652–665.
- Yao, J., Zhang, B., Ge, C., Peng, S. & Fang, J. (2015). Xanthohumol, a polyphenol chalcone present in hops, activating Nrf2 enzymes to confer protection against oxidative damage in PC12 cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(5), 1521–1531.
- Zourob, M., Elwary, S. & Turner, A. (Hrsg.) (2008). *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems*, New York, NY: Springer New York.

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
ActA	<i>actin assembly inducing proteins</i>
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMP	antimikrobielle Peptide
APS	Ammonium-Peroxiddisulphat
ATCC	American Type Culture Collection
BBB	Blut-Hirn-Schranke
BHI	Hirn-Herz-Glucose-Bouillon
BSA	Rinderserumalbumin
C-terminal	carboxy-terminal
CFU	<i>colony forming units</i>
Cys	Cystein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
Ecad	humanes E-Cadherin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAM	5(6)-Carboxyfluorescein
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HSC	Hepatische Sternzellen
IGF2R	<i>insulin-like growth factor II receptor</i>
InI	Internalin
InIA	Internalin A
InIB	Internalin B
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	<i>inter-repeat</i>

Kan	Kanamycin
LB	Luteria-Betrani
LLO	Listeriolysin O
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>
Lys	Lysin
m	Maus
min	Minute
M6PR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MHK	minimale Hemmkonzentration
MW	Molekulargewicht
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
N-terminal	amino-terminal
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
pfu	<i>plaque forming units</i>
Ph.D.	Phagen-Display
Plc	Phospholipase C
rb	Hase
scFv	<i>single-chain antibody</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tet	Tetracyclin
Ttds	<i>trioxatridecansuccinamic acid</i>
TUP	Target-unspezifische Peptide
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
WB	Western-Blot
Xgal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid
XN	Xanthohumol

Danksagung

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. S. A. Funke für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe forschen zu dürfen und für die Bereitstellung des interessanten Themas. Danke, für das Vertrauen, die Gelassenheit, die ich nicht immer hatte, und eine stets offene Tür.

Herrn Prof. Dr. A. Römpf danke ich für die Übernahme der kooperativen Betreuung und Frau Dr. D. Brüggemann für den wertvollen Austausch. Außerdem bedanke ich mich bei den Mitgliedern des Prüfungsausschusses für Ihr Interesse und Ihre Zeit.

Für die finanzielle Förderung bedanke ich mich bei der Adalbert-Raps-Stiftung und dem Max Rubner-Institut.

Weiterhin gilt mein Dank Dr. J. van den Heuvel für die Bereitstellung des InlA-codierenden Plasmids und Prof. Dr. H. Niemann für das InlB-codierende Konstrukt. Prof. Dr. M. Pischetsrieder danke ich für das Zurverfügungstellen des Lupulons und Prof. Dr. M. Noll für die Listerien-Strämme.

Ich bedanke mich bei Antje, Eva und Katja für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Den Bachelor- und Masterstudenten Eileen Beck, Julia Schlaf, Denise Seufert, Lisa Mund, Lisa Schlegelmilch und Julia Scheler danke ich für Ihren Einsatz und die wertvollen Ergebnisse.

Mein großer Dank gilt dem gesamten Team der Bioanalytik, das mit seiner herzlichen Art für ein angenehmes Arbeitsklima und reibungslose Laborabläufe gesorgt hat (wenn nicht gerade etwas kaputt war. Aber auch das haben wir immer hinbekommen). Vielen Dank für die vielen tollen Kaffeerunden und Gespräche, die immer spaßigen Ausflüge und den ein oder anderen gemeinsamen Abend. Es war eine Freude mit euch zusammenzuarbeiten.

Bei Katja und Marina möchte ich mich herzlich für die offenen Ohren, die mit mir in den letzten Jahren viel Freude und Frust des Laboralltags durchgestanden haben, bedanken. Aber auch für die vielen außerdienstlichen Unternehmungen, die gedrehten Runden und vor allem für die Freundschaft. Außerdem danke ich Sandra für den „Schabernack“, um nicht zu vergessen warum Naturwissenschaften toll sind, und die gemeinsamen Fortbildungen.

Insbesondere danke ich meinen Eltern, die mich schon immer unterstützt und mir so viel ermöglicht haben.

Ein besonderer Dank gilt Christopher, der mir seit vielen Jahren den Rücken stärkt und mich stets motiviert. Ich freue mich auf das, was noch kommt

(Eidesstattliche) Versicherungen und Erklärungen

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit versichere ich eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe (vgl. Art. 64 Abs. 1 Satz 6 BayHSchG).

(§ 8 Satz 2 Nr. 3 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation nicht bereits zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe und dass ich nicht bereits diese oder eine gleichartige Doktorprüfung endgültig nicht bestanden habe.

(§ 8 Satz 2 Nr. 4 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich, dass ich Hilfe von gewerblichen Promotionsberatern bzw. –vermittlern oder ähnlichen Dienstleistern weder bisher in Anspruch genommen habe noch künftig in Anspruch nehmen werde.

(§ 8 Satz 2 Nr. 7 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass die elektronische Fassung der Dissertation unter Wahrung meiner Urheberrechte und des Datenschutzes einer gesonderten Überprüfung unterzogen werden kann.

(§ 8 Satz 2 Nr. 8 PromO Fakultät)

Hiermit erkläre ich mein Einverständnis, dass bei Verdacht wissenschaftlichen Fehlverhaltens Ermittlungen durch universitätsinterne Organe der wissenschaftlichen Selbstkontrolle stattfinden können.

.....

Ort, Datum, Unterschrift