

Praktikumsbericht

28.08.2017 - 22.09.2017

Meike Höhl

ETH zürich

Inhaltsverzeichnis

Vorwort.....	2
Einleitung.....	3
Methoden.....	4
1. Immunmarkierung von Listerien und anschliessende Konfokal-Mikroskopie...4	
2. Infektionsreihen von HeLa-Zellen mit 1042 im Vergleich zu 1042 Δ 1095.....5	
Zwischenerkenntnis.....	7
3. Lokalisierung des Internalins <i>InlB</i> innerhalb der Listerien 1042 und 1042 Δ 1095 sowie 1042 Δ 1095::pPL2(1095).....8	
Diskussion und Fazit.....	10

Vorwort

An der ETH habe ich im Institut für Lebensmittelwissenschaften, Ernährung und Gesundheit im Labor von Prof. Dr. Loessner für Mikrobiologie gearbeitet. Dabei war mein direkter Supervisor Eric Sumrall, der momentan als Doktorand an dem Bakterium *Listeria Monocytogenes* forscht. Während meines Praktikums habe ich seine Arbeit begleitet und dabei ein kleines Nebenprojekt über die Untersuchung des Infektionsprozesses dieser Bakterien verfolgt.

Im Folgenden werde ich die von uns durchgeführten Experimente und ihre Ergebnisse im Kontext seiner Arbeit vorstellen.

Einleitung

Antibiotikaresistenzen sind inzwischen ein ernstzunehmendes Problem, da sie die Bekämpfung von bakteriellen Infektionen stark beeinträchtigen. Hinzukommt dabei, dass immer weniger Forschung im Bereich der Entwicklung neuer Antibiotika betrieben wird. Eine Alternative zu Antibiotika aber stellen Bakteriophagen dar. Da diese eine unglaubliche genetische Diversität aufweisen, könnte die Nutzung von Phagen ein nahezu unerschöpfliches antibakterielles Potential bedeuten, wenn sie effizient und vorsichtig nutzbar gemacht werden. Wie Bakterien allerdings im Detail auf den Befall mit Phagen reagieren ist noch unklar und es ist daher in diesem Zusammenhang unerlässlich die Abwehrmechanismen der Bakterien zu untersuchen.

In diesem Zusammenhang wird am Bakterium *Listeria Monocytogenes* geforscht. Dabei handelt es sich um ein gram positives, fakultativ intrazelluläres Pathogen, das in Immungeschwächten schwere Infektionen hervorrufen kann. In der Umwelt ist es weitverbreitet, Infektionen haben ihren Ursprung aber zumeist in Lebensmitteln. Die meisten Stämme sind für den Menschen nicht gefährlich, da Infektionen hauptsächlich von den Typen 1/2a und 4b verursacht werden. Wie in allen grampositiven Bakterien dient als Gerüst und finale Abgrenzung zur Umwelt die Zellwand. Da Listerien eukaryotische Zellen befallen können, dazu in der Lage sind Membranbarrieren zu durchqueren und auch in extremen Umgebungen überleben können, lässt sich annehmen, dass viele der Zellwandbestandteile in diese Prozesse involviert sind. Eine Veränderung dieser Bestandteile sollte damit zu einer Veränderung von Pathogenität und Lebensfähigkeit führen.

So haben verschiedene vorherige Studien meines Supervisors bereits gezeigt, dass die Entstehung von Mutationen, wie sie auch die Abwehr von Bakteriophagen ermöglichen, sich im Phänotyp des Bakteriums durch eine Veränderung der Teichonsäuren (WTA) oder Lipoteichonsäuren (LTA) in der Zellwand äußern.

So hat beispielsweise in Listerien des stark pathogenen Stammes 1042 (Serotyp 4b) der Verlust des Gens Imo1095, welches für Galactosyltransferase kodiert und damit bestimmt, ob Galaktose an WTAs zu finden ist oder nicht, zur Folge, dass der resultierende Stamm wesentlich schlechter dazu in der Lage ist Mäuse, sowie Zellen aus Epithel-, Endothel- und Lebergewebe zu infizieren. Am stärksten ist dieser Effekt in HeLa-Zellen, bei denen fast keine Infektionen mit dem 1042 Stamm ohne Galaktose mehr zu beobachten sind.

Da der Verlust von Galaktose an den WTAs auch durch die kürzlich entwickelte für den Serotyp 4b spezifische Bakteriophage A500 erwirkt werden kann, ist es wichtig an genau dieser Stelle weitere Forschung zu betreiben, wenn neue Methoden zur Kontrolle von Listerien bzw. Bakterien im Allgemeinen eingesetzt werden sollen.

Hier setzt mein Projekt ein. Ziel ist es den Infektionsprozess der 1042 Listerien genauer zu untersuchen. Dazu werden der ursprüngliche Stamm 1042 und der Stamm ohne Galaktose 1042 Δ 1095 bzw. der Stamm 1042 Δ 1095::pPL2(1095), bei dem das Gen für die Galactosyltransferase zunächst entfernt und später wieder hinzugefügt wurde, verglichen: Zum einen in Bezug auf die Visualisierung und Quantifikation der Infektion und später in Bezug auf die Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse.

Methoden

1. Immunmarkierung von Listerien und anschließende Konfokal-Mikroskopie

Ziel

Ziel dieses Experimentes war es den Infektionsprozess der beschriebenen Bakterienstämme zu visualisieren. So sollte gezeigt werden, dass die Listerien des Stammes 1042 Δ 1095 tatsächlich nicht mehr in HeLa-Zellen eindringen können. Dazu wendeten wir verschiedene Immunmarkierungen auf die Bakterien und die Bestandteile der HeLa-Zellen an, um die unterschiedlichen Bereiche unter dem Mikroskop unterscheiden zu können.

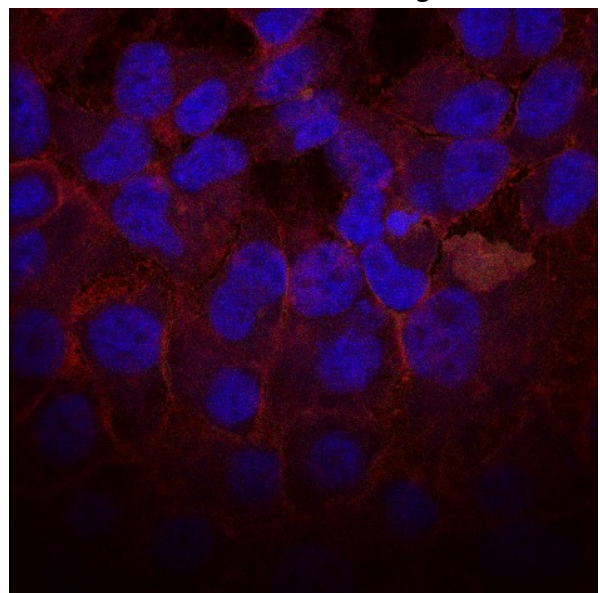
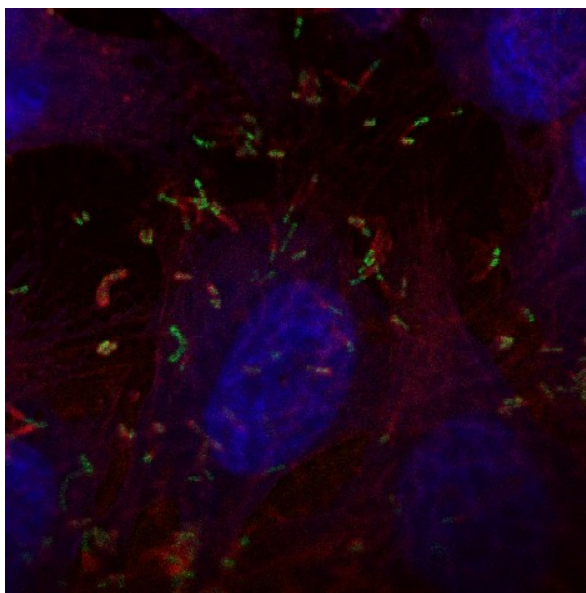
Vorgehen

Die zu infizierenden HeLa-Zellen für dieses Experiment liessen wir in einer Chamber-Slide wachsen und bereiteten zudem Übernacht-Kulturen beider Listerien Stämme vor. Bei den Listerien handelte es sich dabei um eine besonders modifizierte Variante, da sie das Protein CBD-GFP exprimierten, welches grün fluoreszieren kann.

Am nächsten Tag infizierten wir die Zellen mit den Bakterien. Wir begannen damit die HeLa-Zellen mit Paraformaldehyd zu fixieren und behandelten sie ausserdem mit Ammoniumchlorid, um die Autofluoreszenz des Paraformaldehyds zu reduzieren. Für die weitere Markierung des Zellinneren nutzten wir zunächst Triton-X, sodass eine Perforation der Zellmembranen stattfand. Die so entstandenen «Löcher» machten es möglich, dass die Markierungen für Actin (Phalloidin-TRITC) und DNA (Hoechst) auch in die Zellen eindringen konnten. Wir bereiteten so Zellen vor, die durch ihr rotes Actingerüst sichtbar waren, durch Hoechst einen blauen Nucleolus aufwiesen und bei denen Bakterien durch das GFP, welches sie an ihrer Oberfläche trugen grün erschienen.

Ergebnis

Bei der anschließenden Mikroskopie bestätigte sich, dass die Listerien 1042 Δ 1095 ohne Galaktose an ihren WTAs nicht mehr dazu in der Lage waren in



die Zellen einzudringen. Dies zeigte sich daran, dass wir keine dieser Bakterien innerhalb der Zellen sehen konnten, während es dem unveränderten

Bakterienstamm 1042 hingegen möglich gewesen war die HeLa-Zellen zu infizieren, sodass wir hier große Anzahlen innerhalb der Zellen erkennen konnten.

Abb. 1: Infektion von HeLa-Zellen mit 1042
HeLa-Zellen mit 1042Δ1095

Abb. 2: Infektion von

2. Infektionsreihen von HeLa-Zellen mit 1042 im Vergleich zu 1042Δ1095

Ziel

Diese Infektionsreihen sollten uns verraten, um wieviel die Infektionsraten der Listerien in den HeLa-Zellen nach Verlust der Galaktose quantitativ betrachtet tatsächlich absinken. Nach der Mikroskopie erwarten wir auch hier ein Ergebnis von nahezu keinen Infektionen im Stamm ohne Galaktose. Dazu infizierten wir wieder HeLa-Zellen mit Bakterien und überimpften die Bakterien, welche erfolgreich in die Zellen eingedrungen waren in einer Verdünnungsreihe auf Petrischalen, um sie am nächsten Tag auszählen zu können.

Vorgehen

Die zu infizierenden HeLa-Zellen für dieses Experiment liessen wir in einer 96-well-plate wachsen und bereiteten zudem Übernacht-Kulturen beider Listerien Stämme vor.

Um die beiden Listerienstämme auch miteinander vergleichen zu können, musste zunächst die Anzahl der Bakterien in beiden Kulturen angeglichen werden. Dazu bestimmten wir mittels eines Spektrometers die optische Dichte unsere Proben. Daraufhin veränderten wir die Konzentrationen der Bakterien so, dass wir jeweils eine optische Dichte (OD) von 0.01 in unseren Infektionsmedien erreichten. Dies entspricht einer Anzahl von ungefähr 2×10^7 Bakterien pro Milliliter und zieht später eine MOI (Multiplicity of Infection, also Anzahl Bakterien pro Zelle) von circa 100 nach sich.

Anschliessend infizierten wir die HeLa-Zellen für zwei Stunden mit den vorbereiteten Listerien-kulturen. Dabei wurden jeweils drei Vertiefungen der 96-well-plate mit 1042 beziehungsweise 1042Δ1095 infiziert.

Zudem bestimmten wir die Menge von tatsächlich auf die Zellen gebrachten Bakterien, indem wir jeweils 10µl des Infektionsmediums auf eine Agarplatte impften. Dazu wurde das Medium zuvor einer Verdünnungsreihe unterzogen, um später nicht nur einen unzählbaren Film erzeugt zu haben.

Nach der für die Infektion nötigen Inkubationszeit behandelten wir die Zellen mit Gentamycin, einem Antibiotikum, das alle extrazellulären Bakterien abtötet. Die abgetöteten Bakterien entfernten wir durch mehrere Waschgänge und behandelten die Zellen anschliessend mit Triton-X. Die HeLa-Zellen wurden so lysiert bzw. aufgebrochen und die Bakterien, die zuvor erfolgreich Zellen infiziert hatten lagen in Lösung vor. Diese Lösung wurde ebenfalls einer Verdünnungsreihe unterzogen und mit jeweils 10µl pro Verdünnung in Petrischalen geimpft.

So entstanden insgesamt 16 Petrischalen. Vier von diesen erhielten die zur Infektion genutzten Bakterien – jeweils zweimal den unveränderten Stamm 1042 und zweimal den Stamm ohne Galactosyltransferase 1042Δ1095. In den übrigen 12 Petrischalen wuchsen die Bakterien, die es tatsächlich geschafft hatten die HeLa-Zellen zu infizieren. Für jeden Bakterienstamm gab es sechs Petrischalen,

die sich aus den drei verschiedenen jeweils doppelt ausgeführten Ansätzen pro Stamm ergaben.

Ergebnis

*

d1095

1042 (4b)

Nach der dreimaligen Wiederholung dieser Infektionsreihen, lagen uns Daten vor, die numerisch unterstrichen, was wir bereits unter dem Mikroskop gesehen hatten. Der Verlust der Galaktose durch die Löschung des Galactosyltransferase-Gens resultiert in einem Verlust der Infektionsfähigkeit des Stammes 1042. Die Platten, auf die die Lösung der aufgebrochenen zuvor mit den 1042 Δ 1095 Bakterien behandelten HeLa-Zellen geimpft worden war, zeigten keinerlei Bakterienkolonien.

Zwischenerkenntnis

Die oben beschriebenen Experimente haben visuell sowie quantitativ gezeigt, dass Listerien, wenn die Galaktose an ihren WTAs fehlt, nicht mehr in HeLa-Zellen eindringen können.

HeLa-Zellen verfügen lediglich über eine Art von Rezeptorprotein, das potentiell dazu in der Lage ist mit den Virulenzfaktoren der Listerien zu interagieren. Dabei handelt es sich um *C-Met*, welches die Erregungskaskade zur Endocytose von extrazellulären Partikeln einleitet.

Listerien verfügen auf der anderen Seite über zwei wesentliche Virulenzfaktoren. Dabei handelt es sich um die Internaline *InIA* und *INIB*. *C-Met* aber kann lediglich durch *InIB* aktiviert werden. Nach den vorangegangenen Versuchen ist es nun naheliegend, dass *InIB* und WTAs auf der Zellwand der Listerien miteinander interagieren.

Daraus leitet sich die Frage danach ab, wie diese Interaktion zwischen *InIB* und den WTAs aussieht. Um dieser Fragestellung auf den Grund zu gehen, wollten wir zunächst das *InIB* in den Listerien lokalisieren.

3. Lokalisierung des Internalins InIB innerhalb der Listerien 1042 und 1042Δ1095 sowie 1042Δ1095::pPL2(1095)

Ziel

Eine Hypothese zur Erklärung des Verlusts der Pathogenität der Listerienstämme ohne Galaktose an den WTAS ist, dass durch eine Veränderung der WTAs das *InIB* seine Verankerung in der Zellmembran verliert und deshalb nicht mehr mit den Rezeptoren der HeLa-Zellen interagieren kann. Um dies zu untersuchen wollten wir besagtes Internalin in den Listerien lokalisieren, indem wir die Bakterien in die vier Fraktionen Supernatant, Zellwand, Zellmembran und Zytoplasma aufspalteten. Die Proteine dieser Fraktionen sollten mittels Gelelektrophorese aufgetrennt werden und dann in einem Western Blot die Detektion des *InIB* durch einen Antikörper stattfinden.

Vorgehen

Für alle Stämme bereiteten wir am Vortag Übernachtskulturen vor.

Am Tag der eigentlichen Fraktionierung folgte zunächst das Zentrifugieren der Kulturen. Den dabei entstandenen Supernatant filterten wir, um sicher zu gehen, dass darin keine Bakterien mehr enthalten waren, und fällten anschließend die darin enthaltenen Proteine mit Trichloressigsäure aus. Nach erneutem Zentrifugieren stellte das vorliegende Pellet die finale Supernatant-Fraktion dar.

Das ursprüngliche dann Bakterienpellet wurde zunächst gewaschen und in Lysis-Lösung bestehend aus Mutanolysin, RNase und Phenylmethylsulfonylfluorid gegeben, um die Zellwand von den Bakterien zu lösen und somit Protoplasten zu erhalten. Nach der Inkubation wurde die Lösung wieder zentrifugiert. Der dabei entstehende Supernatant wurde ebenfalls gefiltert und die darin enthaltenen Proteine mit Trichloressigsäure ausgefällt. Das dabei entstehende Pellet war die Zellwand-Fraktion.

Mit dem Protoplastpellet verfahren wir weiter, indem wir die Protoplasten in einer Lösung aus Natriumchlorid, Magnesiumchlorid und Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) in mehreren Gefrierzyklen aufbrachen. Die so entstehenden Fraktionen von Zellmembran und Zytoplasma trennten wir wie zuvor durch Zentrifugieren. Der Supernatant stellte das Zytoplasma dar, welches wir aufgrund seiner hohen Proteinkonzentration nicht auch mit Trichloressigsäure behandeln mussten, und das Pellet war unsere Membranfraktion.

Nach Herstellung der Proben sollte im nächsten Schritt die Auftrennung der darin enthaltenen Proteine erfolgen. Um dies mit Hilfe eines SDS-Page-Gels durchzuführen, mussten zunächst die Konzentrationen der verschiedenen Proben aneinander angeglichen werden, denn andernfalls würde die Auftrennung auf dem Gel nicht gleichmäßig funktionieren können. Zur Bestimmung der Ausgangskonzentrationen nutzen wir ein Test-Kit, das auf einer colormetrischen Auswertung beruhte. Grundlegend war dabei die Reduktion von Kupfer(II)- zu Kupfer(I)-Ionen mit einhergehendem Farbwechsel. So verläuft diese Reduktion in linearer Abhängigkeit von vorhandenen Proteinkonzentrationen ab, da sie durch diese katalysiert wird. Je stärker also die Farbintensität, desto größer die Proteinkonzentration. Nach der Messung von definierten Standards und einer daraus abgeleiteten linearen Funktion, welche eben den Zusammenhang zwischen Farbintensität und Proteinkonzentration wiedergab, konnten wir die Konzentrationen unserer Proben bestimmen. Daran anschließend glichen wir alle Konzentrationen an den geringsten

gemessenen Wert an und luden die Proben in das Gel. Dieses liessen wir bei 200V für eine halbe Stunde laufen und transferierten danach die Proteine mittels des iBlot-Systems vom Gel auf eine Membran.



Um vor dem Aufbringen des Antikörpers für InlB zu kontrollieren, ob die Übertragung der Proteine auf die Membran auch tatsächlich erfolgreich war, färbten wir die Membran mit Ponceau-Lösung, sodass wir die unterschiedlichen Banden in rot erkennen konnten. Nachdem wir die Banden überprüft hatten und die Farbe wieder entfernt wurde, blockten wir zunächst mit Bovine Serum Albumin (BSA - aus Rindern isolierte Proteine) und gaben schließlich, den für InlB spezifischen Antikörper hinzu.

Ergebnis

Nach Inkubation über Nacht konnten wir am nächsten Tag mit der Auswertung des Experiments beginnen. Dabei ergab sich sowohl für die unterschiedlichen Kompartimente der Bakterien als auch für die verschiedenen Stämme ein anderes Bild. So konnten wir InlB in der Membran des unveränderten Listerienstammes sowie in der Membran des 1042Δ1095::pPL2(1095) Stammes, also der Listerien, deren Galactosyltransferase-Gen erst entfernt und dann wieder hinzugefügt wurde, nachweisen. In allen anderen Fraktionen einschließlich der Membran des 1042Δ1095 Stammes konnten wir kein InlB detektieren. Die zu Beginn aufgestellte These, dass der Verlust der Galaktose an den WTAs der Listerien den Virulenzfaktor Internalin B beeinflusst, kann also unterstützt werden.

Diskussion und Fazit

Die Experimente haben insgesamt sowohl visuell als auch numerisch bewiesen, dass Galaktose an den Teichonsäuren auf der Zellwand der Listerien benötigt wird, damit diese HeLa-Zellen infizieren können. Weiterhin konnten wir zeigen, dass zwischen Infektionsfähigkeit, also dem Virulenzfaktor Internalin B, und der genauen Struktur des Polymergerüsts der Teichonsäuren ein Zusammenhang besteht.

In weiterführenden Versuchen muss nun erforscht werden, wie die Verbindung zwischen Teichonsäure und Internalin B tatsächlich aussieht. Schließlich konnte die Hypothese, dass das Internalin B sich bei fehlender Galaktose nicht mehr in der Zellmembran halten kann, nicht direkt bewiesen werden. Denn wäre dies der Fall gewesen, hätte in der Auswertung des Western Blots die Bande des Internalins nicht im Typ 1042Δ1095 fehlen dürfen, sondern sie hätte hier entsprechend in der Fraktion des Supernatants auftauchen müssen.

Das Fehlen der Bande an dieser Stelle muss aber nicht zwangsläufig bedeuten, dass dieses Protein nicht in den Supernatant gelangt. Dort wären Zersetzungsprozesse durch Enzyme oder andere Arten der Denaturierung möglich, sodass die Detektion mit dem Antikörper nicht mehr erfolgreich ablaufen kann.

Ein weiterer Grund für das Fehlen der Bande könnte auch in der Expression von InIB liegen. Gegebenenfalls sind nach Verschwinden der Galaktose die noch in der Zellmembran auftauchenden Mengen des Proteins so gering, dass sie nicht mehr ausreichend durch die chemilumineszierende Reaktion zur Auswertung des Western Blots sichtbar gemacht werden können. In diesem Fall läge die Ursache in der spezifischen Genetik der Bakterien, die potentiell Quantität des Internalins mit Galaktose bestückten Teichonsäuren in Verbindung gebracht haben könnte.

Insgesamt konnten wir in unseren Versuchen zeigen, dass im Allgemeinen Galaktose an den Teichonsäuren benötigt wird, damit das Internalin B seine Aufgabe erfüllen kann und Listerien pathogen und infektiös auf HeLa-Zellen wirken. Die spezifischen Gründe weshalb ein Fehlen von Galaktose an Teilen des Zellwandgerüsts nun aber Auswirkungen auf ein Protein in der Zellmembran hat, bleiben allerdings ungewiss und sind damit der Anknüpfungspunkt für weitere Forschung in diese Richtung.