



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Fakultät für Klinische Medizin Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Modulation der Synthese von Listeriolysin, dem  
Hauptvirulenzfaktor von *Listeria monocytogenes*, durch  
subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen**

Autor: Alexander Hlawatsch  
Einrichtung: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
Doktorvater: Prof. Dr. H. Hof

Bei *L.monocytogenes* handelt es sich um einen grampositiven, fakultativ intrazellulären Keim, dessen Hauptvirulenzfaktor, Listeriolysin O, dem Bakterium ermöglicht, die Phagosomenmembran der Wirtszelle zu lysieren und somit in das Cytoplasma zu entkommen. Durch die intrazelluläre Lage von *L.monocytogenes* wird eine antibiotische Therapie erschwert. Dies gilt besonders auch für die in praxi angewandte Ampicillin-Gentamicin-Kombinationstherapie, da sowohl  $\beta$ -Lactame, als auch Aminoglykoside nur eine geringe Fähigkeit zur Penetration der Zellmembran aufweisen. Dasselbe trifft auch auf zahlreiche Antibiotika zu, die als Alternativsubstanzen denkbar wären, so daß ihre antimikrobiellen Effekte wahrscheinlich größtenteils auf der Wirkung subinhibitorischer Konzentrationen beruhen.

**Methodik:**

Zur Untersuchung der Auswirkungen subinhibitorischer Antibiotikakonzentrationen auf die Listeriolysinproduktion wurden die gentechnisch modifizierten Bakterienstämme *L.m. lisA::lacZ* und *L.m. prtP::lacZ* verwendet. In beiden Fällen unterlag das *lacZ*-Gen der Kontrolle der fusionierten Promotoren, so daß die  $\beta$ -Galaktosidase-Expression von *L.m. lisA::lacZ* mit der Promotoraktivität des Lysteriolysingens korrelierte, während bei *L.m. prtP::lacZ* die  $\beta$ -Galactosidase konstitutionell mit einer Streptokokkenprotease, welche für *L.m.* keinen Virulenzfaktor darstellt, exprimiert wurde und daher mit dem Ausmaß der Gesamtproteinsynthese korrelierte.

Eine bei beiden Stämmen zusätzlich eingebrachte Erythromycinresistenz ermöglichte es, durch Aufbau eines Selektionsdruckes die Plasmidstabilität zu gewährleisten. Die  $\beta$ -Galactosidase wurde mit Hilfe des Galacto-Light™-Chemiluminescent Reporter Assay der Firma Tropix Inc. nachgewiesen. Mit dem Hämolytintiter-Test konnte eine Korrelation zwischen der Promotoraktivität auf dem gentechnisch konstruierten Plasmid und der chromosomalen Transkription des Listeriolysingens nachgewiesen werden.

Durch die Bestimmung der Wachstumskurven mit der Koloniezählmethode und mit Trübungsmessungen gelang es, die Antibiotikakonzentrationen zu ermitteln, bei denen eine Hemmung der Listeriolysin-Expression nicht auf ein verändertes Wachstumsverhalten der Bakterien zurückzuführen war.

**Ergebnisse und Diskussion:**

Die angewendeten Testverfahren ermöglichten den Nachweis einer Reduktion der  $\beta$ -Galactosidase-Expression bei *L.m. lisA::lacZ* in subinhibitorischen Konzentrationen von Antibiotika mit Angriffspunkt an der Zellwand oder der Zellmembran, während dieser Effekt bei *L.m. prtP::lacZ* nicht auftrat.

Aufgrund dieser Ergebniskonstellation und der gleichermaßen erniedrigten Listeriolysinmengen im Hämolytintiter-Test konnte von einer selektiven Reduktion der Lysteriolysinpromotorenaktivität ausgegangen werden. Da dieser Effekt bei Antibiotika mit anderem Angriffspunkt nicht auftrat, wird eine Schädigung der bakteriellen Hüllstrukturen als Ursache angenommen.

Über den Zusammenhang zwischen Zellwandschädigung und selektiver Aktivitätsminderung konnten nur Vermutungen angestellt werden. Als wahrscheinlich kann jedoch eine über bislang unbekannt

Signaltransduktionsmechanismen vermittelte Störung in der Synthese oder Funktion des übergeordneten prfA-Regulatorproteins gelten, die eine Hemmung der prfA-abhängigen Listeriolysin-promotoren nach sich zieht.

Mit dieser experimentellen Arbeit wurde ein Beitrag zum Verständnis der Auswirkungen subinhibitorischer Antibiotikakonzentrationen auf die bakterielle Pathogenität geleistet.

Als nächster Schritt in der Analyse dieser Vorgänge müßte sich die weitere Forschung auf die Aufklärung und Charakterisierung des Zellwandrezeptors richten, der die beobachtete Reduktion der Lysteriolysinsynthese initiiert.