

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Modulation der TLR- und Inflammasom- Signaltransduktion durch bakterielle TIR-Proteine

Christine Cirl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. H. H. D. Meyer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. S. Scherer
2. apl. Prof. Dr. Th. Chr. Miethke
3. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c., Ph.D. (Melbourne)

H. Wagner, i. R.

Die Dissertation wurde am 04.02.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 29.06.2009 angenommen.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 "Pattern-recognition" Rezeptoren des angeborenen Immunsystems: Die Rolle der Toll-like Rezeptoren und des Inflammasoms	1
1.1.1 Toll-like Rezeptoren	2
1.1.1.1 Signaltransduktion der Toll-like Rezeptoren	4
1.1.1.2 MyD88-abhängige Signalwege	4
1.1.1.3 Trif-abhängige / MyD88-unabhängige Signalwege	6
1.1.1.4 Endogene negative Regulation der Toll-like Rezeptor Signaltransduktion	7
1.1.2 Zytoplasmatische "Pattern-recognition" Rezeptoren: RNA-Helikasen und NOD-like Rezeptoren	8
1.1.2.1 RNA-Helikasen	8
1.1.2.2 NOD-like Rezeptoren und das Inflammasom	8
1.2 CFT073 als Modellorganismus uropathogener <i>E. coli</i> Stämme	12
1.3 Struktur und Homologien eukaryontischer und bakterieller TIR-Proteine	16
1.3.1 Strukturelle und funktionelle Charakteristika der TIR-Domäne	16
1.3.2 Virale und bakterielle TIR-Proteine: Vorkommen und Bedeutung als Virulenzfaktor	17
1.3.3 TcpC und TcpB – TIR-Domänen Proteine aus CFT073 und <i>Brucella melitensis</i>	18
1.4 Zielsetzung	22
2 Material & Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Biologische Materialien	23
2.1.2 Plasmide	24
2.1.3 Oligodesoxynukleotide	24
2.1.3.1 Oligodesoxynukleotide zur DNA-Sequenzierung	24
2.1.3.2 Oligodesoxynukleotide für PCR-Reaktionen	25
2.1.3.3 Oligodesoxynukleotide zur Stimulation von TLR9	28
2.1.4 Antikörper, Enzyme und sonstige Proteine	28
2.1.5 Chemikalien	29
2.1.6 Standards und Kits	33
2.1.7 Geräte	34
2.1.8 Sonstiges Material	35
2.1.9 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen	37
2.2 Molekularbiologische Methoden	44
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> -Stämmen	44
2.2.2 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	44
2.2.3 DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i>	45

2.2.3.1	Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA	45
2.2.3.2	Präparation von einzelsträngiger Plasmid-DNA	45
2.2.4	Isolierung von genomischer DNA, RNA	47
2.2.5	Präparation von cDNA	47
2.2.6	Gelelektrophorese zur Reinigung von DNA / RNA	47
2.2.7	Gelextraktion	48
2.2.8	Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von Genen	48
2.2.9	<i>In vitro</i> Modifizierung von DNA	48
2.2.9.1	5'-Phosphorylierung von DNA-Fragmenten	48
2.2.9.2	Ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel	49
2.2.9.3	Ortsspezifische Mutagenese zur Einführung von Punktmutationen	50
2.2.10	Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen	50
2.2.11	Vektordephosphorylierung und Ligation von DNA Fragmenten	51
2.2.12	Sequenzierung und Sequenzanalyse doppelsträngiger DNA	52
2.3	Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	52
2.4	Proteinchemische Methoden	53
2.4.1	Gewinnung und Rückfaltung von Inclusion Bodies	53
2.4.2	Chromatographische Verfahren	54
2.4.2.1	Streptavidin-Affinitätschromatographie	54
2.4.2.2	Affinitätschromatographie an HisPur™ Cobalt-Agarose	55
2.4.2.3	Analytische Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)	56
2.4.2.4	Entsalzung von Proteinlösungen an PD-10 Säulen	57
2.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese - native Gelelektrophorese	57
2.4.4	Silberfärbung von Proteinen	59
2.4.5	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	59
2.4.6	Konzentrierung von Proteinen	60
2.4.7	Trichloressigsäure-Fällung von Proteinen	60
2.4.8	Protein Sequenzierung – Edman-Abbau	60
2.4.9	Pull-Down Assays an Steptavidin Agarose / Strep-Tactin Macrorep Beads	61
2.4.10	Aufreinigung von myc- oder flag-gelabelten Proteinen und <i>in vitro</i> Verdau	62
2.4.11	Caspase-Assay	63
2.4.12	Protease-Assay	64
2.5	Immunchemische Methoden – Western Blotting	64
2.5.1	Western Blotting	64
2.5.2	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - ELISA	66
2.6	Infektions- Stimations- und Wachstumsassays, Zellkultur	66
2.6.1	Gewinnung primärer Knochenmarkszellen	66
2.6.2	Infektion mit uropathogenen <i>E. colis</i> und Restimulationsexperimente	67
2.6.3	Stimulierungsassays: TLR-Stimulation, Inflammasom-Aktivierung und Induktion der TcpC Produktion in CFT073	68

2.6.4	Wachstumsassays mit uropathogen und apathogen <i>E. coli</i> Stämmen	69
2.7	Konfokalmikroskopie - Lebendzell TC-tag Detektion mittels der TC-FIAsH™ Technologie	70
2.8	Computerprogramme und Datenbanken	71
3	Ergebnisse	72
3.1	Expression essentieller rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	72
3.2	TcpC und TcpB beeinflussen gezielt den TLR-Signalweg und interagieren mit MyD88	77
3.2.1	Die Infektion mit TcpC und TcpB exprimierenden Stämmen führt zur Modulation der Zyotokinsekretion sowie zur verstärkten intrazellulären Erregerpräsenz	77
3.2.2	TcpC und TcpB interagieren direkt mit dem Adapterprotein MyD88	81
3.3	TcpC agiert als induzierbarer sekretierter Virulenzfaktor – Inhibition der Sekretion durch PAβN	86
3.4	Aufnahme von TcpC in die Wirtszelle	91
3.4.1	TLR-Stimulation mit rekombinantem TIR-TcpC	92
3.4.2	Inhibition der Aufnahme von TIR-TcpC durch Methyl-β-Cyclodextrin	95
3.4.3	Der basische C-Terminus von TcpC ist entscheidend für dessen spontane Aufnahme	96
3.5	Proteolytische Aktivität von TcpB und TcpC	98
3.5.1	Proteolytische Aktivität und Phänotyp von TcpC-Varianten sowie TcpB	98
3.5.2	<i>In vitro</i> Verdau von IRAK-1, IRAK-4 und MyD88 mit TcpB	100
3.6	TcpC induziert die IL-1β Sekretion durch Aktivierung des Inflammasoms, was das Wachstum von CFT073 fördert	101
3.6.1	IL-1β als Effektormolekül des Inflammasoms	101
3.6.1.1	TcpC induziert die Sekretion von IL-1β	101
3.6.1.2	Die TcpC-induzierte Caspase-1 Aktivierung und IL-1β Sekretion ist unabhängig von MyD88, jedoch ASC abhängig	103
3.6.1.3	TIR-TcpC und TIR-TcpC elongated alleine induzieren Caspase-1 Aktivierung und die Freisetzung von IL-1β	107
3.6.1.4	Interaktionsstudien mit TcpC-Varianten und intrazellulären Inflammasom-Komponenten	109
3.6.2	IL-1β als möglicher Wachstumsfaktor für pathogene <i>E. colis</i>	111
3.6.3	Das CFT073 Usherprotein PapC bindet murines IL-1β	114
4	Diskussion	118
4.1	Tcps – ein neuer Typus von Virulenzfaktoren mit inhibitorischem Effekt auf das TLR-Signaltransduktionsgeschehen	118
4.2	Sequenzspezifische und strukturelle Charakteristika von TcpC als Basis für Sekretion und Aufnahme	123
4.3	Die TcpC induzierte IL-1β Sekretion im Kontext der Inflammasomaktivierung	128
4.4	IL-1β als Wachstumsfaktor für CFT073: Bindungs- und Signaltransduktionsstudien sowie Einfluss auf die Virulenz des Erregers	134
5	Zusammenfassung	141
6	Abkürzungen	143
7	Literaturverzeichnis	148

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der 2-Signal-abhängigen Caspase-1 Inflammasom-Aktivierung.	11
Abbildung 2: Expression fimbriärer Adhäsine in <i>E. coli</i> CFT073.	15
Abbildung 3: Alignment von TcpC und TcpB mit humanen TIR-enthaltenden Adaptoren sowie TLR4-TIR.	19
Abbildung 4: Genomische Lokalisation von tcpC (Genlocus: c2398) und tcpB.	20
Abbildung 5: Tertiärstruktur von hTLR1-TIR im Vergleich zu kalkulierten Strukturen von TcpB und TcpC.	21
Abbildung 6: SDS-PAGE Analyse zum Vergleich der reinen im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Proteine.	76
Abbildung 7: TcpC sowie TcpB reduzieren die Zytokinsekretion der Wirtszelle.	78
Abbildung 8: Vergleich der intrazellulären und der Gesamterregerlast in Abhängigkeit von TcpC.	80
Abbildung 9: IL-1 β Sekretion von HCV29 Zellen nach 5 h der Infektion mit den genannten Erregern.	81
Abbildung 10: Infektion von wt und MyD88 ^{-/-} BMMs mit CFT073 und tcpC::kan.	82
Abbildung 11: Intrazelluläre Erregerlast nach Infektion von Wildtyp und MyD88 ^{-/-} Mäusen.	83
Abbildung 12: TcpC und TcpB interagieren mit MyD88.	85
Abbildung 13: TcpC wird induzierbar als Volllängenprotein exprimiert.	87
Abbildung 14: Stimulation von RAWs mit filtrierten und hitzeinaktivierten Infektionsexperimentüberständen.	88
Abbildung 15: TcpC Sekretion im Transwellsystem.	89
Abbildung 16: PABN reduziert die Sekretion von TcpC und dadurch dessen TNF-Suppressionseigenschaften.	90
Abbildung 17: Sekretion und Aufnahme in die Wirtszelle von FIAsh-gelabeltem TcpC.	92
Abbildung 18: TIR-TcpC wird von der Wirtszelle aufgenommen und reduziert deren TNF Sekretion.	94
Abbildung 19: M β CD reduziert die Aufnahme sowie die inhibitorische Wirkung von TIR-TcpC.	95
Abbildung 20: Der C-Terminus von TcpC ist entscheidend für dessen TLR-inhibitorischen Phänotyp.	96
Abbildung 21: Aufnahme der TIR-TcpC Mutante TIR 5.3 in BMMs und DCs.	97
Abbildung 22: TcpC und TcpB, nicht jedoch TcpC(S176A) zeigen proteolytische Aktivität.	99
Abbildung 23: <i>In vitro</i> Verdau von IRAK-1, IRAK-4 und MyD88 mit TcpB.	100
Abbildung 24: TcpC induziert die Sekretion von IL-1 β .	102
Abbildung 25: Die TcpC-induzierte IL-1 β Sekretion ist MyD88-unabhängig.	103
Abbildung 26: TcpC induziert ASC-abhängig Caspase-1 Aktivierung und IL-1 β Sekretion.	105
Abbildung 27: Sekretion und Aufnahme von TcpC(C12S).	106
Abbildung 28: TIR-TcpC und TIR-TcpC elongated aktivieren Caspase-1 und induzieren die IL-1 β Sekretion.	108
Abbildung 29: TcpC-Varianten binden spezifisch weder ASC, NALP3 noch Caspase-1.	110
Abbildung 30: IL-1ra reduziert die intra- und extrazelluläre Bakterienlast.	112
Abbildung 31: IL-1 β fördert das Wachstum von CFT073, was durch IL-1ra antagonisiert werden kann.	113
Abbildung 32: Alignment zwischen PapC und dem löslichen humanen IL-1R.	115
Abbildung 33: PapC-short bindet murines IL-1 β .	116
Abbildung 34: Hochvirulente UPEC Isolate tragen ein tcpC-Gen.	121
Abbildung 35: CFT073 sowie tcpC::kan + pTcpC(C12S) induzieren ASC-abhängig die IL-1 β Sekretion.	130
Tabelle 1: Übersicht charakterisierter humaner und muriner Toll-like Rezeptoren.	3
Tabelle 2: Charakteristika des Genoms von CFT073 (Welch et al., 2002).	13
Tabelle 3: Rekombinante Proteine – eine Übersicht.	75

1 Einleitung

1.1 "*Pattern-recognition*" Rezeptoren des angeborenen Immunsystems: Die Rolle der Toll-like Rezeptoren und des Inflammasoms

Das Immunsystem der Vertebraten basiert auf zwei Säulen: Der angeborenen sowie der adaptiven Immunität. Das angeborene Immunsystem dient der schnellen und effizienten Erkennung infektiöser Pathogene, wie Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten oder Protozoen. Diese unmittelbare Erregererkennung wird hauptsächlich von Phagozyten wie Makrophagen, Monozyten, dendritischen Zellen (DCs) sowie natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), aber auch löslichen Faktoren wie dem Komplementsystem wahrgenommen (Janeway & Medzhitov, 2002). Diese Antigen-präsentierende Zellen (APCs) übermitteln die Infektion an den adaptiven Arm des Immunsystems (T- und B-Zellen) in Form präsentierter Erreger-Antigene sowie durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen, wodurch eine hochspezifische Immunantwort initiiert werden kann (Medzhitov *et al.*, 1997).

Die hochselektive Erkennung konservierter Erregermusterstrukturen, der "*Pathogen-associated molecular patterns*" (PAMPs), beruht auf Keimbahn kodierten Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, den sog. "*Pattern-recognition*" Rezeptoren (PRRs) (Takeda & Akira, 2004). PRRs können gemäß ihrer zellulären Lokalisation in drei Klassen unterteilt werden (membranständige, zytoplasmatische sowie sekretorische PRRs), zweckmäßiger erscheint jedoch eine Unterteilung in funktionelle Klassen in opsonisierende, phagozytische sowie instruktiv-/ signalgebende PRRs (Padovan *et al.*, 2007). Die PAMP-Moleküle sind stets essentielle Komponenten des jeweiligen Erregers, wie etwa Zellwandbestandteile oder DNA- bzw. RNA-Fragmente. Zudem sind die Musterstrukturen v.a. unter verschiedenen bakteriellen Taxa weit verbreitet, sie finden sich jedoch nie auf der eukaryontischen Wirtszelle. Opsonisierende PRRs sind lösliche Rezeptoren, welche ins Serum oder ins Gewebe sezerniert werden, wo sie mikrobielle Produkte oder ganze Zellen erkennen und durch Bindung zu deren Phagozytose beitragen. Beispiele sind etwa die Collectine und Pentraxine (Ogden *et al.*, 2001). Phagozytierende PRRs sind an der Internalisierung von Mikroben oder mikrobieller Produkte beteiligt. Es handelt sich bei diesen PRRs um Plasmamembranproteine, teils mit signalgebender zytoplasmatischer Domäne, welche auf vielen APCs zu finden sind. Integrine,

C-Typ Lektine und Scavenger-Rezeptoren sind dieser Familie zuzuordnen. Erstere zeichnen sich durch ihre ausgeprägte phagozytische Funktion aus, wohingegen Lektine und Scavenger-Rezeptoren die Internalisierung von Pathogenen erleichtern und Immunantworten initiieren. Dectin-1, ein C-Typ Lektin repräsentiert einen Rezeptor der angeborenen Immunität, welcher spezifisch fungale β -Glucane (β 1,3, β 1,6) erkennt und über seine "*Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*" (ITAM-Motive) Zytokinantworten aber auch Toleranz auslösen kann (Dillon *et al.*, 2006; Gross *et al.*, 2006). Instrukтив-/ signalgebende PRRs als dritte Gruppe sind dazu befähigt, Signale in APCs auszulösen und dadurch deren Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung zu regulieren und protektive Immunantworten in Gang zu setzen. Zu dieser Gruppe gehören die membranständigen Toll-like Rezeptoren (TLRs) sowie die zytoplasmatischen NOD-like Rezeptoren (NLRs), auf welche im Folgenden näher eingegangen wird.

1.1.1 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören zu den wichtigsten Proteinen der angeborenen Immunität, da sie als primäre Sensoren zur Erkennung invadierender Erreger befähigt sind und zur Auslösung adaptiver Immunantworten beitragen (Kawai & Akira, 2006). Das erste Mitglied dieser Proteinfamilie – genannt Toll - wurde in *Drosophila melanogaster* beschrieben, wo es die dorso-ventrale Polarität während der Embryogenese beeinflusst (Hashimoto *et al.*, 1988). Bald erkannte man jedoch, dass das Protein eine zusätzliche Rolle in der Ausbildung effektiver Immunreaktionen gegen fungale Infektionen erfüllt (Lemaitre *et al.*, 1996). Nur ein Jahr später wurde das erste Toll-homologe Protein in Säugern – TLR4 - beschrieben (Medzhitov *et al.*, 1997). Alle bis dato charakterisierten TLRs gehören der Gruppe der Typ-1 Transmembranproteine an. Sie besitzen eine extrazelluläre "*leucin-rich repeat*" Sequenz (LRR) sowie eine konservierte intrazelluläre Toll-/Interleukin-1 Rezeptor Domäne (TIR-Domäne). Es wird davon ausgegangen, dass die LRR-Domäne direkt in die Erkennung von PAMPs involviert ist (Takeda & Akira, 2004). Aktuell sind 10 funktionell aktive humane sowie 13 murine TLRs beschrieben, wobei jedes Molekül spezifische PAMPs und deren synthetische Analoga als exogene Liganden erkennt.

Auch endogene Moleküle sterbender oder toter Zellen können vom TLR-System detektiert werden (Vabulas *et al.*, 2002). TLR4 etwa erkennt u.a. Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien (Poltorak *et al.*, 2001). TLR2 ist als Heterodimer mit TLR1 oder TLR6

dazu befähigt, verschiedene Komponenten wie Peptidoglycan und Micrococci zu erkennen (Wang *et al.*, 2001) und zudem zwischen Triacyl- (TLR1/TLR2) und Diacyl-Lipopeptiden (TLR2/TLR6) zu diskriminieren (Takeuchi *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 2001). Auch eine Vielzahl weiterer mikrobieller und viraler Struktur motive wie Flagellin (Hayashi *et al.*, 2001), ssRNA sowie bestimmte siRNAs (Hemmi *et al.*, 2002; Heil *et al.*, 2004; Hornung *et al.*, 2005) können durch die Bindung an TLRs identifiziert werden. Eine Übersicht über aktuell charakterisierte Liganden findet sich in Tabelle 1. Durch dieses vielfältige Repertoire an Erkennungsmotiven werden viele Humanpathogene wie etwa diverse uropathogene *E. coli* (Zhang *et al.*, 2004; Svanborg *et al.*, 2006), *Listeria monocytogenes* (Torres *et al.*, 2004), *Staphylococcus aureus* (Takeuchi *et al.*, 2000) und *Chlamydomphila pneumoniae* (Rodriguez *et al.*, 2006) vom TLR-System detektiert und hierdurch eine protektive Immunantwort ausgelöst.

TLR	TLR1/TLR2	TLR2/TLR6	TLR2/TLR2 (?)	TLR3	TLR4
Lokalisation	Oberfläche	Oberfläche	Oberfläche	Intrazellulär	Oberfläche, Golgi
Wichtigste Liganden	Triacyl-Lipopeptide, OspA, Zymosan, Glycosylphosphatidylinositol-Anker Proteine (<i>T. cruzi</i>)	Diacyl-Lipopeptide, LTA, Peptidoglycan, Zymosan, Glycosylphosphatidylinositol-Anker Proteine (<i>T. cruzi</i>)	unbekannt	dsRNA	LPS, Hsp60, virales RSV, Taxol, Fibrinogen, Hyaluronsäure, Polysaccharid-Fragmente des Heparansulfats
Adapter	MyD88, TIRAP	MyD88, TIRAP	MyD88, TIRAP	Trif	MyD88, TIRAP, Trif, TRAM
TLR	TLR5	mTLR7, hTLR8	TLR9	TLR11	TLR10*, 12**, 13**
Lokalisation	Oberfläche	Endosomal	Endosomal, Oberfläche	Murines Urothel	Oberfläche*, Urothel **
Wichtigste Liganden	Flagellin	ssRNA, Imidazoquinolin, Loxoribin, manche siRNAs	CpG-DNA (nicht-methyliert), viral und bakteriell	Profilin (<i>T. gondii</i>), UPECs	unbekannt
Adapter	MyD88	MyD88	MyD88	MyD88	MyD88

Tabelle 1: Übersicht charakterisierter humaner und muriner Toll-like Rezeptoren. Deren beschriebene subzelluläre Lokalisation in verschiedenen Zelltypen, stimulierende Liganden (biologische und chemische) sowie TLR-spezifische zytoplasmatische Adapter sind gemäß http://www.biomol.de/infos_imgenex.html?id=411) aufgeführt.

TLRs zeigen ein ubiquitäres Expressionsmuster, auch auf nicht-hämatopoetischen epithelialen und endothelialen Zellen (Hopkins & Sriskandan, 2005). Während viele Zellen nur bestimmte TLRs exprimieren, finden sich auf Makrophagen, DCs und Neutrophilen, den wichtigsten Sentinel-Zellen des Immunsystems, nahezu alle TLRs. Die meisten TLRs finden sich an der Zelloberfläche, TLR3, 7, 8 und 9 jedoch können membranständig in intrazellulären Kompartimenten wie dem Endosom gefunden werden (vgl. Tabelle 1).

1.1.1.1 Signaltransduktion der Toll-like Rezeptoren

Die Signaltransduktion des TLR-Systems wird durch Dimerisierung der Rezeptormoleküle nach Ligandenbindung ausgelöst. Im Anschluss werden Adapter an die zytoplasmatische TIR-Domäne rekrutiert und konservierte inflammatorische Signalwege ausgelöst, die alle in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren "*Nuclear factor κB*" (NF-κB) und des "*Activator protein-1*" (AP-1) kulminieren (Kawai & Akira, 2007). Derzeit sind vier verschiedene aktivierende Adapter beschrieben, welche von den einzelnen TLRs selektiv über TIR-TIR-Interaktion rekrutiert werden (vgl. Tabelle 1): "*Myeloid differentiation primary response gene 88*" (MyD88), das "*TIR-domain containing adaptor protein*" (TIRAP), auch genannt MyD88 *adaptor-like* (MAL), "*TIR-domain containing adaptor inducing INFβ*" (Trif) sowie das "*Trif-related adaptor molecule*" (TRAM) (Athman & Philpott, 2004).

1.1.1.2 MyD88-abhängige Signalwege

MyD88 ist das zentrale Protein, welches von fast allen TLRs mit Ausnahme von TLR3 als zytosolischer Adapter genutzt wird (Kawai *et al.*, 1999). Das Protein besteht aus einer C-terminalen TIR-Domäne, die zur direkten Bindung an die TIR-Domäne der TLRs befähigt ist, sowie einer N-terminalen "*death domain*" (DD) (Muzio *et al.*, 1997). In Folge der Stimulation bindet MyD88 an den entsprechenden TLR, woraufhin über die DD ein Mitglied der Interleukin-1 Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK) rekrutiert wird, welche ebenso über N-terminale DDs verfügen. Bis dato sind vier Mitglieder der IRAK-Familie beschrieben: IRAK1, IRAK2, IRAK4 und IRAK-M. Hiervon besitzen IRAK1 sowie IRAK4 intrinsische Serin/Threonin-Kinase Aktivität, während IRAK2 und IRAK-M wohl katalytisch inaktiv sind, da ihnen essentielle Aminosäuremotive (HRD-Loop und DFG-Motif) fehlen, die zum Hydroxylgruppentransfer bzw. der Mg²⁺-Chelatierung im Rahmen der Substratphosphorylierung benötigt werden (Janssens & Beyaert, 2003). IRAK4 bindet zunächst das TLR-

ständige MyD88 um über DD-DD-Interaktion IRAK-1 zu rekrutieren und zu phosphorylieren. IRAK1 autophosphoryliert sich im Gegenzug selbst und assoziiert mit dem "*Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*" (TRAF6), welches über eine für E3 Ubiquitin-Ligasen typische N-terminalen RING-Domäne verfügt (Cao *et al.*, 1996). Neuere Studien belegen, dass auch IRAK2 anstelle von IRAK1 an den Komplex rekrutiert werden kann, jedoch erst in der späten Phase der TLR-Aktivierung (Kawagoe *et al.*, 2008). Der IRAK1-TRAF-6 Komplex dissoziiert dann vom Rezeptorkomplex und bindet die Ubiquitin Ligasen Ebc13 und Uev1A, die zur Polyubiquitinierung von Lys63 des TRAF6 Moleküls führen (Chen, 2005). TRAF6 aktiviert hierauf Ubiquitin-abhängig die "*Transforming growth factor- β -activated kinase 1*" (TAK1). Dieses bindet zusätzlich die "*TAK1-binding proteins*" TAB1, TAB2 und TAB3, wobei die Polyubiquitinerkennung von TAB2 und TAB3 über Zinkfinger-Domänen notwendig für die TAK1 Aktivierung sind. TAK1 gehört zur Familie der Mitogen-aktivierten Protein Kinase Kinase Kinasen (MAPKKKs). Dessen Phosphorylierung initiiert zwei Signalwege: Einerseits phosphoryliert TAK1 den Inhibitor der κ B Kinase β (IKK β), einen Bestandteil des IKK-Komplexes, der nebst IKK β aus der katalytischen Untereinheit IKK α sowie den regulatorischen Untereinheit NEMO/IKK γ besteht (Chen *et al.*, 2006). Die katalytischen IKKs führen zur Phosphorylierung und dem anschließendem proteasomalen Abbau des Inhibitors von κ B (I κ Bs), woraufhin NF- κ B in den Zellkern translozieren kann. Ausserdem ist TAK1 dazu befähigt MKK3 und MKK6, zwei MAPKKs zu phosphorylieren, die ihrerseits die MAPKs p38 und die c-JUN N-terminale Kinase (JNK) phosphorylieren. Auch die MAPK "*Extracellular signal-regulated kinase*" ERK wird TAK-abhängig als Antwort auf TLR-Stimuli über die MAPKK MEK1 und MEK2 aktiviert (Sato *et al.*, 2005). Dies führt zur Aktivierung von AP-1, einem dimeren Leucin-Zipper Transkriptionsfaktor, welcher aus Mitgliedern der Jun, Fos, Maf und der Familie Aktivierender Transkriptionsfaktoren (ATF) gebildet wird, wobei für die inflammatorische Antwort v.a. c-Jun und ATF-2 eine zentrale Rolle spielen (Wang *et al.*, 2001; Shaulian & Karin, 2002). Schlussendlich führen beide Wege MyD88-abhängig zur Transkription proinflammatorischer Zytokine und Chemokine wie "*Tumor necrosis factor- α* " (TNF), Interleukin-6 (IL-6), IL-8, IL-1 β , IL-12 und CXCL8 (Hayden & Ghosh, 2004). In einigen Fällen wird hierfür zusätzlich der Adapter TIRAP/MAL benötigt. So zeigen TIRAP/MAL-defiziente Mäuse etwa eine verringerte Zytokinproduktion nach Stimulation mit TLR1/2, TLR2/6 bzw. TLR4 Liganden (Hornig *et al.*, 2002).

1.1.1.3 Trif-abhängige / MyD88-unabhängige Signalwege

Makrophagen und DCs MyD88-defizienter Mäuse zeigen keine Aktivierung von NF- κ B oder von MAPKs nach Stimulation von TLR2, TLR5, TLR7 und TLR9, was darauf hindeutet, dass MyD88 den einzigen Adapter für diese TLRs darstellt (Hayashi *et al.*, 2001; Kawai *et al.*, 2001; Hemmi *et al.*, 2002). Dennoch zeigen diese Mäuse nach LPS-Stimulation nach wie vor eine – wenn auch verspätete - NF- κ B sowie MAPKs Aktivierung (Kawai *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen führten zur Entdeckung weiterer TLR-Adapter neben MyD88. Zunächst wurde TIRAP/MAL als weiterer für TLR2 und TLR4 Antworten spezifischer Adapter beschrieben (Yamamoto *et al.*, 2002), wobei dieses Molekül ergänzend zu MyD88 agiert. Der Adapter, welcher gänzlich MyD88-unabhängige Signaltransduktionwege mediiieren kann ist Trif. Dieser Adapter wird nach TLR3 und TLR4 Stimulation an die zytosolische TIR-Domäne der entsprechenden TLRs rekrutiert, wobei neben NF- κ B und den MAPKs im Gegensatz zur MyD88 und TIRAP/MAL-abhängigen Stimulierung auch der Interferon- β (INF- β) Promotor aktiviert wird (Oshiumi *et al.*, 2003). Dies geschieht über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors "*Interferon regulatory factor 3*" (IRF3) durch die IKK-ähnliche Kinase "*TANK-binding kinase-1*" (TBK-1) (Fitzgerald *et al.*, 2003). IRF3-induziert die Transkription von INF- β , dass seinerseits zur Transkription INF-induzierbarer Gene wie CXCL10 führt und dadurch eine antivirale Antwort auslöst (Yamamoto *et al.*, 2002). Trif aktiviert NF- κ B im TLR4 Signalweg einerseits über den Hilfsadapter TRAM, da keine direkte Interaktion mit dem TLR zu bestehen scheint (Yamamoto *et al.*, 2003). Dieser Weg läuft wie bei MyD88-Signalwegen über TRAF6, für welches Trif drei typische TRAF6 Bindedomänen besitzt. Zusätzlich besitzt Trif ein C-terminal lokalisiertes "*Receptor interacting protein homotypic interaction motif*" (RIP HIM), welches für die Interaktion mit Proteinen der RIP-Familie ("*Receptor interacting protein*") verantwortlich ist (Meylan *et al.*, 2004) und über Trif-RIP1-Bindung ebenso zur NF- κ B Aktivierung im TLR3-Signalweg führen kann.

Studien an hypothalamischen Neuronen zeigen, dass auch der IL-1-Rezeptor Signalweg, welcher homolog zu etlichen TLRs auf MyD88 als einziges Adaptermolekül zurückgreift, teilweise MyD88-unabhängig verlaufen kann. So kommt es auch in der Abwesenheit von MyD88 zur Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase Akt. Dies geschieht durch die direkte Bindung der p85 Einheit der Phosphatidylinositol 3-Phosphat-Kinase an die phosphorylierte TIR-Domäne des IL-1-Rezeptors, wodurch Akt eine neuroprotektive Funktion erfüllen kann.

Die Tyrosin-Kinase Src hingegen, die eine weitere wichtige Signalkomponente des IL-1-Rezeptor Signalweges darstellt, benötigt MyD88 zur vollen Aktivierung und Induktion proinflammatorischer Moleküle wie IL-6 und Cyclooxygenase (Davis *et al.*, 2006).

1.1.1.4 Endogene negative Regulation der Toll-like Rezeptor Signaltransduktion

So wichtig die Erkennung invadierender Pathogene über das TLR-System für das Immunsystem ist, so gefährlich ist eine unkontrollierte, hyperinflammatorische Reaktion, die zur bakteriellen Sepsis, zur chronischen Inflammation oder zu Autoimmunerkrankungen führen kann. Daher ist es nicht überraschend, dass die Zelle über diverse Kontrollmechanismen und regulatorische Moleküle verfügt, die eine exzessive Immunantwort nach TLR-Stimulation zu verhindern vermag (Liew *et al.*, 2005). Beispielsweise ist das bereits erwähnte IRAK-M, dem die typische Kinase-Aktivität der IRAK-Kinasen fehlt, dazu befähigt, die Dissoziation des IRAK1-IRAK4 Komplexes von MyD88 zu verhindern und dadurch die Signalkaskade zu NF- κ B und den MAPKs zu unterbinden (Kobayashi *et al.*, 2002). Zudem sind lösliche Formen von TLR2 und TLR4 beschrieben (Iwami *et al.*, 2000; LeBouder *et al.*, 2003), die beide wohl die Interaktion zwischen den TLRs und deren Korezeptoren wie MD2 und CD14 unterbinden oder deren Liganden komplexieren ohne jedoch eine Immunantwort zu initiieren. Ein weiterer negativer Regulator ist das "*Toll-interacting protein*" (TOLLIP), das die IRAK1 Aktivierung zu inhibieren scheint, indem es dessen Autophosphorylierung unterdrückt (Zhang & Ghosh, 2002). Für MyD88 ist als Modulator eine Splicevariante, MyD88short, beschrieben, welches nicht mehr in der Lage ist IRAK4 zu binden und zudem die IRAK1 Phosphorylierung fördert (Burns *et al.*, 2003). RIP3 stellt einen Negativ-Regulator der Trif-abhängigen Signalwege dar, da es die Interaktion zwischen Trif und RIP1 inhibiert (Meylan *et al.*, 2004). Ein noch kontrovers diskutiertes Molekül, das die Trif-Aktivität negativ moduliert ist SARM (O'Neill *et al.*, 2003; Carty *et al.*, 2006). Dieses besteht aus einer TIR sowie einer α -(SAM) und HEAT/Armadillo Domäne (ARM). Es vermag im Vergleich zu den anderen TIR-Adaptoren keine NF- κ B Antwort auszulösen, es scheint jedoch den Trif-Signalweg zu inhibieren. Des Weiteren sind Transmembranproteine beschrieben, die in das TLR-Geschehen eingreifen können: Hierzu gehören die "*Single immunoglobulin IL-1-receptor related proteins*" (SIGIRRs) und ST2. Diese Moleküle binden an TLR4, wobei SIGIRR IRAK1 und TRAF6 sequestriert,

wohingegen ST2 MyD88 und TIRAP binden und dadurch zu neutralisieren vermag (Wald *et al.*, 2003; Brint *et al.*, 2004).

1.1.2 Zytosolische "*Pattern-recognition*" Rezeptoren: RNA-Helikasen und NOD-like Rezeptoren

Die bereits beschriebenen Rezeptoren TLR3, TLR7/8 sowie TLR9 besitzen alle die Fähigkeit, virale Nukleinsäuren zu erkennen. Auf Grund Ihrer Lokalisation in endosomalen Kompartments kann die Erkennung der PAMPs jedoch erst nach Internalisierung sowie Prozessierung der Erreger stattfinden. Viren, Bakterien wie *Listeria monocytogenes*, die direkt ins Zytosol eindringen oder aus dem Phagosom evadierende Pathogene wie Shigellen, würden daher nicht erkannt, weshalb das Immunsystem über weitere auf die zytosolische PAMP-Erkennung spezialisierte Abwehrmoleküle verfügt.

1.1.2.1 RNA-Helikasen

Zu den zytosolischen, nicht-TLR Sensoren zählen die RNA-Helikasen "*Retinoic acid-inducible gene 1*" (RIG-I) und "*Melanoma differentiation-associated gene 5*" (Mda5) sind dazu befähigt, aktiv replizierende Viren im Zytosol der Wirtszelle zu detektieren (Kang *et al.*, 2002; Yoneyama *et al.*, 2004). Bei beiden handelt es sich um DExD/H-Box enthaltende RNA-Helikasen, welche je zwei C-terminal lokalisierte "*Caspase-recruiting domain*" (CARD) ähnliche Domänen tragen. Die Helikase-Domäne wird für die Erkennung der viralen dsRNA benötigt, wohingegen die CARD-Domänen durch CARD-CARD-Interaktion mit dem "*Interferon promoter stimulator-1*" (IPS-1) das Signal zu IRF-3, NF- κ B sowie den MAPKs weiterleiten und somit der INF- β Promotor aktiviert werden kann (Kawai *et al.*, 2005). LGP2, eine weitere RNA-Helikase, ist verwandt zu RIG-I und Mda5. Da diesem Protein jedoch die CARD-Domänen fehlen, wird es als Negativregulator der antiviralen Immunität diskutiert (Yoneyama *et al.*, 2005).

1.1.2.2 NOD-like Rezeptoren und das Inflammasom

Eine weitere wichtige Familie der zytosolischen "*Pattern-recognition*" Rezeptoren stellen die "*Nucleotide-binding oligomerization domain*"- (NOD) ähnlichen Rezeptoren, sog. NLRs dar. Die NLRs sind auch bekannt als CATERPILLER Proteine ("*CARD, transcription enhancer, R (purine)-binding, pyrin, lots of leucine repeats*") (Harton *et al.*, 2002) oder NOD-LRRs

(Inohara *et al.*, 2005). All diese Proteine besitzen wie die TLRs eine LRR-Sequenz und eine "Nucleotide-binding domain" (NBD), welche sie zur zytosolischen PAMP Erkennung befähigt, sowie eine CARD oder "Pyrin domain" (PYD) zur gegenseitigen Interaktion (Creagh & O'Neill, 2006). Zu den NLRs zählen Proteine wie NOD1 (auch bekannt als CARD4), NOD2 (ebenso CARD15) die NALP-Proteinfamilie ("*NACHT*-, *LRR and pyrin-domain containing protein*"), "*ICE-protease activating factor*" (IPAF) sowie die Familie der "*Neuronal apoptosis inhibitor proteins*" (NAIPs) (Ting *et al.*, 2006). All diese Proteine sind dazu befähigt, intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden des angeborenen Immunsystems zu initiieren.

Einige NLRs leiten durch die Pathogenerkennung die Aktivierung von Caspase-1 (früher "*Caspase-1/Interleukin-1 converting enzyme*", = ICE) ein. Die als Zymogen von 45 kDa vorliegende pro-Caspase-1 spaltet sich hierbei auto-katalytisch in ihre p10 sowie p20 Untereinheit. Diese assoziieren dann zu einem Heterotetramer, welches seinerseits u.a. pro-IL-1 β zu spalten vermag. Diese Aktivierung bedarf der initialen Bildung eines grossen Proteinkomplexes, dem sog. "Inflammasom" (Martinon *et al.*, 2002). Caspase-1 stellt das zentrale Effektorprotein dieses Komplexes dar, da sie für die Prozessierung und anschließende Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und IL-18 benötigt wird. Caspase-1 spaltet auch IL33, ein Zytokin, welches eine T_H2-Antworte ("*T helper 2*") hervorruft (Schmitz *et al.*, 2005). Die kontrollierte Prozessierung der pro-Caspase-1 bedarf diverser Gerüstproteine, wobei das Inflammasom genau dieses "*Scaffold*"-Plattform zur Assemblierung eines Multiproteinkomplexes bietet. Das erstmals von Tschopp und Kollegen beschriebene Caspase-1 Inflammasom besteht aus dem "*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*" (ASC), dem Sensorprotein NALP1 sowie den Caspasen 1 und 5. Seitdem wurde eine Vielzahl weiterer Inflammasom-Typen beschrieben, wobei der Nomenklatur meist das im Komplex enthaltenen NLR- sowie das Adapterprotein zu Grunde liegen (z.B. NALP3/ASC-Inflammasom) (Martinon *et al.*, 2006); (Franchi *et al.*, 2006). ASC, als Schlüsseladapter des Caspase-1 Inflammoms, besteht aus einer N-terminalen PYD sowie einer C-terminalen CARD-Domäne (Masumoto *et al.*, 1999). Durch homotypische Interaktionen mit anderen PYD- und CARD-enthaltenden Proteinen stellt ASC somit die Verbindungen zu den Sensor-NLRs, wie etwa NALP1 oder NALP3 her.

Die volle Assemblierung des Caspase-1-Inflammasoms und die Freisetzung von IL-1 β bedarf zweier Signale (s. Abbildung 1). Das erste Signal erfolgt durch einen beliebigen TLR

Agonisten wie LPS, Pam3CSK4 oder CpG-DNA, und dient der verstärkten Expression der induzierbaren Inflammasom-Komponenten pro-IL-1 β und Caspase-11 (als murines Analog zur humanen Caspase-4/5). ASC und pro-Caspase-1 werden von primären murinen Makrophagen und DCs konstitutiv exprimiert, RAW264.7 Makrophagen hingegen produzieren kein ASC weshalb auch das Caspase-1 Inflammasom in dieser Zelllinie nicht voll funktionsfähig ist (Pelegriin *et al.*, 2008). *In vitro* Studien belegen, dass das ausschlaggebende zweite Signal zur Inflammasom-Aktivierung durch Induktion eines oberflächenständigen purinergen Rezeptors vom P2X₇-Subtyp bereitgestellt wird, wobei ATP als wichtigster endogener Ligand für diese Rezeptoren beschrieben ist (Hogquist *et al.*, 1991). Des Weiteren kann die Bereitstellung des zweiten Signals durch Nigericin, einem Kalium-Ionophor, Aerolysin und Maitotoxin, porenbildenden Toxinen aus *Aeromonas hydrophila* bzw. *Gambierdiscus toxicus*, aber auch durch Harnsäurekristalle als "danger signal" sowie durch direkten Kontakt mit Pathogenen wie *Listeria monocytogenes* und *Salmonella typhimurium* erfolgen (Sutterwala *et al.*, 2007).

Als Folge der P2X₇-Rezeptor-Aktivierung kommt es zu einem raschen Efflux von Kalium-Ionen aus der Zelle, Perturbationen der Plasmamembran sowie einem Anschwellen der Zelle, wobei v.a. der Verlust an Kalium-Ionen essentiell für die Caspase-1 Aktivierung zu sein scheint (Perregaux & Gabel, 1994; Walev *et al.*, 1995). Zudem führt der K⁺-Verlust zur Aktivierung der Calcium-unabhängigen Phospholipasen A₂ (iPLA₂), was ebenfalls entscheidend zur IL-1 β Prozessierung beiträgt (Walev *et al.*, 2000).

Für die Aktivierung des NALP3/ASC-Inflammasoms wird nebst des P2X₇-Rezeptors der Halbkanal Pannexin-1 benötigt, welcher mit P2X₇ interagiert (Kanneganti, 2007). NALP3 wiederum stellt einen zentralen NLR dar, der seinerseits an der Erkennung einer Vielzahl von Inflammasom Stimuli wie bakterieller RNA, endogener Harnstoffkristalle aber auch exogenen ATPs beteiligt ist (Kanneganti *et al.*, 2006; Mariathasan *et al.*, 2006; Sutterwala *et al.*, 2006).

Eine Dysregulation der Inflammasom-Aktivierung mit überschießender IL-1 β Produktion, ausgelöst durch eine Mutation im NALP3-Gen, kann zu schweren Autoimmunerkrankungen wie dem Muckle-Wells Syndrom führen (Hoffman *et al.*, 2001). Für die Zelle stellt die 2-Signal-abhängige Aktivierung des Inflammasoms daher einen wichtigen Kontrollmechanismus dar, um sicherzustellen, dass eine proinflammatorischen Zytokinantwort nur durch invasive Pathogene oder Zelltod ausgelöst wird, nicht aber etwa durch harmlose kommensale Bakterien der Darmflora.

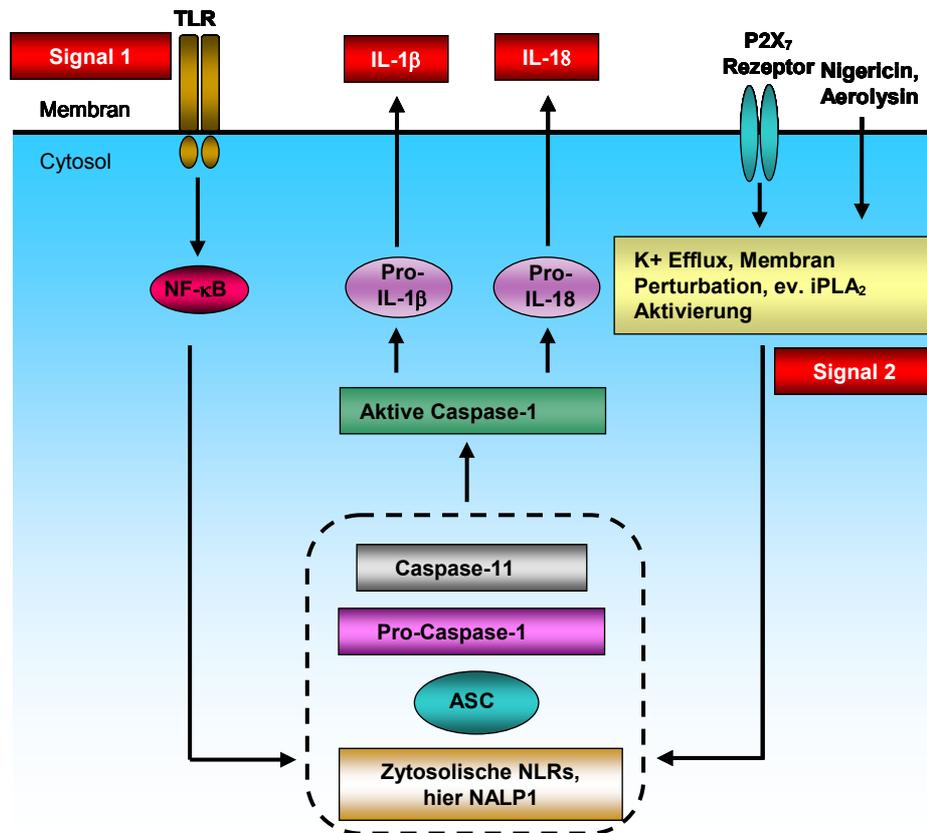


Abbildung 1: Schematische Darstellung der 2-Signal-abhängigen Caspase-1 Inflammasom-Aktivierung. TLR Stimulation sowie Aktivierung eines purinergen Rezeptors bzw. Kalium-Efflux aus der Zelle führen durch die Aktivierung und Prozessierung der Caspase-1 zur Freisetzung von IL-1 β sowie IL-18. Details s. Text. (Mariathasan & Monack, 2007).

Ein alternativer Weg der Inflammasom-Aktivierung erfolgt über den Adapter IPAF. Dieser Typ der Inflammasom-Assemblierung erfolgt ohne TLR-Stimulation als "Signal 1", da die Effektormoleküle seitens der stimulierenden Erreger unmittelbar ins Zytosol der Wirtszelle sekretiert werden. *Salmonella typhimurium* und *Shigella flexneri* sekretieren über ihre Typ III Sekretionssysteme die Proteine SipB und IpaB ins Zytosol der Wirtszelle. Es wird kontrovers diskutiert, ob diese Effektoren durch direkte Bindung oder indirekt durch Interaktion mit "Lipid Rafts" und GTPase Deaktivierung zur Caspase-1 Aktivierung befähigt sind (Hilbi *et al.*, 1998; Goosney *et al.*, 1999; Hersh *et al.*, 1999). Die Salmonelle scheint jedoch zudem über einen evolutionär recht alten Weg der flagellaren Sekretion monomeres Flagellin unmittelbar in die Wirtszelle einschleusen zu können, was zur IPAF Aktivierung und Oligomerisierung und dadurch zur Inflammasom-Aktivierung führt (Miao *et al.*, 2006);

(Franchi *et al.*, 2006). Das monomere Flagellin von *Legionella pneumophila* agiert ebenfalls Inflammasom-stimulatorisch (Molofsky *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006). Es wird vom Erreger über ein Typ IV Sekretionssystem in die Wirtszelle injiziert. Neben IPAF bedarf die Caspase-Aktivierung zudem der Komponente "*Neuronal apoptosis inhibitor protein 5*" (NAIP5, auch genannt Birc1e), welche als NLR-Protein u.a. über eine C-terminale LRR-Sensordomäne verfügt (Miller, 1999). Dieser erkennt das sekretierte Flagellin des Erregers und führt so zur Assemblierung eines Inflammasom-Komplexes aus IPAF und Caspase-1. Es ist bis dato noch unklar und umstritten, ob das "Flagellin-Signal" *per se* hinreichend zur vollen Inflammasom-Aktivierung durch die genannten Pathogene ist. Die *S. typhimurium* und *S. flexneri* vermittelte Makrophagen-Zytotoxizität verläuft zudem Flagellin-unabhängig aber abhängig von deren Sekretionsapparat sowie ev. durch die erwähnten Effektoren SipB sowie IpaB (Miao *et al.*, 2006). Als zweites unabhängiges "Kontrollsignal", vergleichbar dem TLR-Stimulus im Caspase-1 Inflammasom, wird daher die Membranperturbation in Folge der Proteininjektion durch die bakteriellen Sekretionsmaschinen vom Typ III und IV diskutiert (Roy *et al.*, 2004; Molofsky *et al.*, 2006).

1.2 CFT073 als Modellorganismus uropathogener *E. coli* Stämme

Escherichia coli (*E. coli*) zählt zu den am detailliertest charakterisierten bakteriellen Spezies. Bezüglich der Relevanz dieses Organismus für den Menschen, lassen sich *E. coli* Stämme in drei Gruppen unterteilen: (1) harmlose Kommensale, die Bestandteil der normalen Darmflora sind, (2) intestinal pathogene Stämme, welche nach Aufnahme mit kontaminierter Nahrung zu oft schweren Infektionen führen (z.B. enterohämorrhagische Colitis) sowie (3) extraintestinal pathogene Stämme (ExPECs) (Russo & Johnson, 2000). ExPECs sind einerseits häufig als Teil der gesunden intestinalen Flora zu finden. Auf Grund ihrer Fähigkeit der Kolonisierung anderer Habitats können sie jedoch zu schweren Harnwegsinfekten (HWI) (Johnson & Russo, 2002), zur Meningitis (Xie *et al.*, 2004) und zu schweren Sepsen führen (Fluit *et al.*, 2001).

Zur Gruppe der ExPECs zählen die uropathogenen *E. coli* Isolate (UPECs). Dieser Subtyp ist verantwortlich für 70-90% der weltweit jährlich registrierten 150 Millionen HWI-Fälle (Stamm & Norrby, 2001). Zudem verursachen UPECs ~40% aller nosokomialen HWIs und zählen damit zu den am häufigsten klinisch isolierten Pathogenen (Struelens *et al.*, 2004). Ein Vertreter dieses Pathovars ist CFT073, welcher ursprünglich aus dem Blut einer Patientin mit

akuter Pyelonephritis isoliert wurde (Mobley *et al.*, 1990). Das Genom dieses Erregers liegt komplett sequenziert vor und wurde detailliert mit dem Laborstamm *E. coli* K-12 MG1655 sowie dem enterohämorrhagischen Stamm EDL933 verglichen (Welch *et al.*, 2002). Die wichtigsten Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Das Genom ist mit 5,2 Mb um 590.209 bp größer als das des nicht-pathogenen MG1655 Stammes und in etwa aber vergleichbar mit dem von EDL933. Ein besonderes Charakteristikum stellt die relativ hohe Anzahl von 247 CFT073-spezifischen genomischen Pathogenitäts-Inseln dar, auf denen 2.004 Gene lokalisiert sind. Da sich nur etwa ein Zehntel dieser auch im Genom von EDL933 finden, handelt es sich vorwiegend um UPEC-typische Sequenzen. Für zwei Drittel der Gene, die in beiden Pathogenen zu finden sind, konnte bis dato entweder noch keine klare Funktion definiert werden, oder es handelt sich eindeutig um Gene, die durch ihren Phagenursprung oder spezifische Insertionssequenzen gekennzeichnet sind (Mahillon & Chandler, 1998).

Eigenschaften des Genoms von CFT073

Länge	5.231.428 bp
Plasmide	Keine
Protein-kodierende Gene	5.533
tRNAs	89 (1 Pseudogen, 1 neuartiges Arg, ein zusätzliches Arg, 3 phagenkodierte)
rRNAs	22 Gene verteilt auf 7 Operons
Prozentualer G+C Gehalt	50,47%
Konservierte Genom-Regionen (im Vgl. zu MG1655)	359 (3.925.047 bp, 75,02%)
CFT073-spezifische genomische Inseln / Gene	247 (1.306.391 bp, 24,98%) / 2.004, davon 1.827 CFT073-spezifische Gene
Kryptische Prophagen	5 (Produktion infektiöser Phagen wegen fehlender genetischen Information wohl nicht möglich)

Tabelle 2: Charakteristika des Genoms von CFT073 (Welch *et al.*, 2002).

Ein eindeutiges Kennzeichen für den horizontalen Gentransfer, welcher die Entstehung des CFT073 Genoms prägt, ist dessen mosaikartige Struktur, welche auf die inserierten Pathogenitäts-Inseln zurückzuführen ist. Man findet für alle Insel-kodierten Gene eine spezifische Form des *Codon Usage*: 52 der 61 protein-kodierenden Codons auf ORFs, welche auf genomischen Inseln lokalisiert sind, zeigen eine deutliche Abweichung vom *Codon Usage* der *Backbone*-Gene. Dies gilt vor allem für die Codons AUA (Ile), AGA (Arg) sowie AGG

(Arg), für *E. coli* normalerweise seltene Codons, die jedoch auf Inselgenen mit Frequenzen von 3,1, 4,0 bzw 4,5 zu finden sind (Welch *et al.*, 2002).

Im Unterschied zu enterohämorrhagischen Stämmen verfügt das Genom vom CFT073 nicht über ausreichend Gene zur Synthese eines funktionell aktiven Typ III Sekretionssystemes, welches den Transport von Virulenzfaktoren über beide bakteriellen Membranen sowie die Wirtsmembran direkt in deren Zytosol gestattet. Diverse UPEC-charakteristische Virulenzfaktoren erlauben es dem Erreger jedoch, sich den wechselnden biologischen Nischen anzupassen, welche es im Laufe eines aufsteigenden HWIs zu besiedeln gilt. Eine Vielzahl davon befindet sich auf den genannten Pathogenitäts-Inseln, die von Stamm zu Stamm stets hochspezifisch sind (Dobrindt *et al.*, 2004). Im Falle von CFT073 (Serotyp: O6:H1:K5 oder K2 (Manges *et al.*, 2001) handelt es sich bei diesen Virulenzfaktoren etwa um sekretierte Autotransporter Proteine, wie Sat, eine Serinprotease, welche durch Porenbildung in der Wirtsmembran zytopathisch auf Blasen- und Nierenepithelzellen wirkt (Guyer *et al.*, 2000). Weitere Beispiele sind das Hämolyisin-Gencluster *hlyCABD*, welches auf der *pheV* Insel kodiert vorliegt (Welch, 2001), Siderophore wie Iron, die zur Invasivität des UPECs beitragen (Feldmann *et al.*, 2007), oder sekretierte Polysaccharid-Kapselproteine vom Typ II, die CFT073 dazu befähigen, die Biofilmbildung von Kommensalen aktiv zu unterdrücken (Valle *et al.*, 2006).

Die mit Abstand wichtigsten Virulenzfaktoren im Falle von CFT073 stellen jedoch dessen Fimbrien oder Pili dar. Hierbei handelt es sich um röhrenförmige Adhäsine an der Oberfläche des Bakteriums, welche den Erreger dazu befähigen sich an Zielstrukturen der Wirtszelle anzuheften und diese anschließend zu kolonisieren. CFT073 verfügt auf Genomebene über zwölf Fimbrien-Cluster, zehn vom Chaperon-Usher-Typ sowie zwei Typ IV Pili (Welch *et al.*, 2002). Redundant, gleich auf zwei genomischen Inseln (*pheV* und *pheU*) lokalisiert, findet sich das Operon zur Synthese des Pap-Pilus (Pyelonephritis-assoziiertes Pilus) und damit des PapG-Adhäsins. Die Pap-Pili sind spezifisch für Uropathogene und finden sich speziell bei Pyelonephritis-Isolaten (Källenius *et al.*, 1981). Sie binden an Gal(α 1-4)Gal β Einheiten von Membranglykosphingolipiden, wie man sie an der Oberfläche von Erythrozyten der P-Blutgruppe sowie Uroepithelzellen findet (Leffler & Svanborg-Edén, 1981). Strukturell besteht der Pap-Pilus aus ca. 1000 Kopien des Strukturproteins PapA, die ein rigides Grundgerüst vorgeben. Als Usherprotein fungiert PapC, welches in der äußeren Membran lokalisiert ist. Das Periplasmaprotein PapD bindet als Chaperon alle über Typ II Sekretion translozierte

Pilus-Komponenten, katalysiert deren Faltung und transportiert die Untereinheiten zu PapC, welches diese dann an die Oberfläche schleust. Die flexible Spitze des Pilus wird von wenigen Kopien der Untereinheiten PapE, PapF sowie dem distal gelegenen Rezeptoradhäsion PapG gebildet (Kuehn *et al.*, 1992). Es sind mehrere PapG Varianten beschrieben, wobei klinisch v.a. PapGII und PapGIII Allele von Interesse sind, da erstere häufig bei Pyelonephritis-Isolaten zu finden sind, letztere hingegen bei Cystitis-Erregern (Lane & Mobley, 2007). Nebst den Pap-Pili kodiert das Genom von CFT073 noch für eine Vielzahl weiterer Adhäsionsproteine, die seine Virulenz entscheidend beeinflussen. So kodiert das *loc* Operon für ein weiteres Adhäsion der Chaperon-Usher Familie, F1C (Pere *et al.*, 1985). Strukturell verwandt mit dem Pap-Pilus, wenngleich unter Bakterien deutlich weiter verbreitet als dieser, finden sich bei CFT073 Typ-1 Fimbrien, welche an α -Mannose Einheiten von Glykoproteinen binden können (Connell *et al.*, 1996). Speziell die Transkription und Expression dieses Fimbrientyps wird während der frühen Phase der Infektion intensiv hochreguliert (s. Abbildung 2) (Snyder *et al.*, 2004).

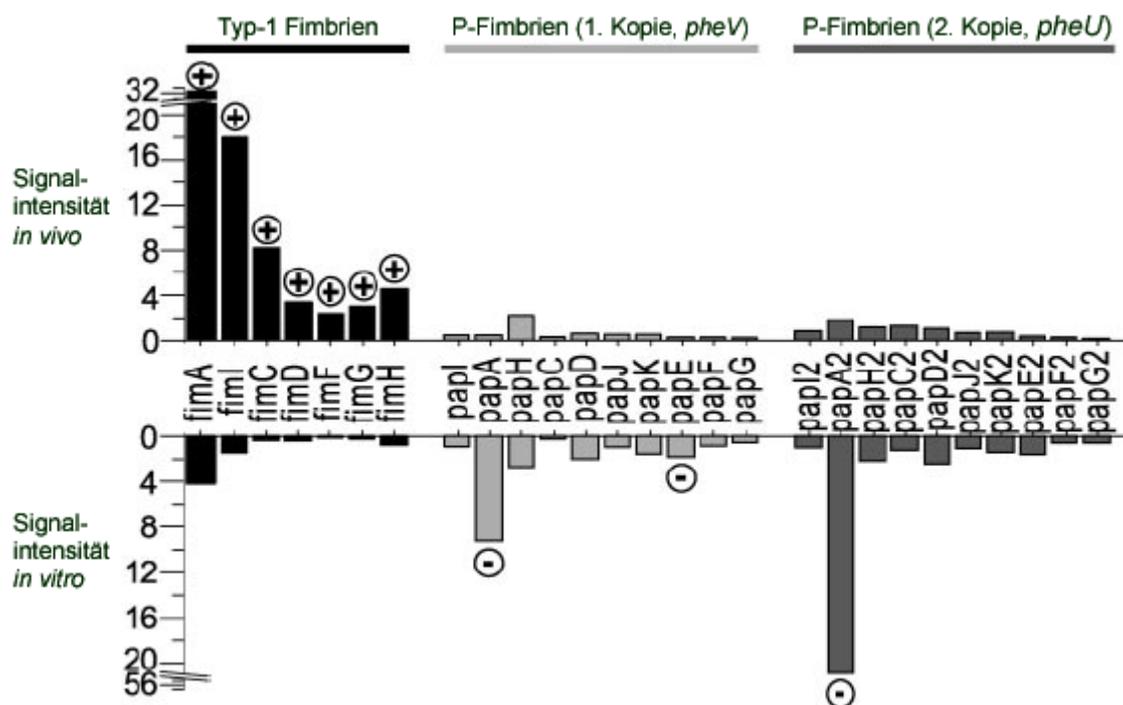


Abbildung 2: Expression fimbrialer Adhäsine in *E. coli* CFT073 (Snyder *et al.*, 2004). Die Signalintensität steht für die relative Expression eines Gens *in vivo* im Rahmen eines HWIs, bzw. *in vitro* bei statischem Wachstum in LB-Kultur. + bzw. - Zeichen symbolisieren markante Regulationen der Transkription / Expression im Vergleich zwischen *in vivo* und *in vitro* Wachstum.

Fimbrien sind für Uropathogene nicht nur wichtig, um die spezifische Anheftung ans Wirtsepithel zu vermitteln. Zudem scheinen diese Adhäsine das Potential zu besitzen, TLR4-

abhängige Signaltransduktionswege zu manipulieren, was ihre Bedeutung als Virulenzfaktor noch unterstreicht. So werden nach Pap-Pilus Bindung an Glykosphingolipide die Adapter Trif/TRAM an TLR4 rekrutiert, während Typ-1 Fimbrien nach Bindung ihres Liganden MyD88-abhängige TLR4 Antworten initiieren (Fischer *et al.*, 2006).

1.3 Struktur und Homologien eukaryontischer und bakterieller Toll/Interleukin-1-receptor like (TIR)-Proteine

1.3.1 Strukturelle und funktionelle Charakteristika der TIR-Domäne

Das Wissen um die strukturelle Beschaffenheit der TIR-Domäne leitet sich hauptsächlich von kristallographischen Studien an diversen humanen TLR-TIR-Domänen sowie einer NMR-Struktur der TIR Domäne humanem MyD88s ab (s. <http://www.rcsb.org>). Mutagenesestudien, proteinchemische Analysen und Experimente mit KO Mäusen liefern darüber hinaus wichtige Informationen über die funktionellen Charakteristika von TIR-Proteinen. Sowohl die TIR-Domänen von TLR1 und TLR2 (Xu *et al.*, 2000) als auch die von TLR10 (Nyman *et al.*, 2008) bestehen aus einer zentralen 5-strängigen parallelen β -Faltblattstruktur, die von beiden Seiten von fünf Helices flankiert wird. Die Sequenzen unterschiedlicher TIR-Domänen weisen lediglich einen Homologiegrad von 20-30% auf, was Raum für deren funktionelle Diversität lässt. Dennoch erkennt man in der Kernsequenz der Domäne stets drei hochkonservierte Sequenzen an strukturell verankerten Positionen: Das sog. Box1, Box2 und das Box3 Motiv (s. Abbildung 3, 1.3.3) (Akira & Sato, 2003). Amino- und Carboxyterminus dieser größtenteils hydrophoben Kernsequenz liegen nur 14 Å voneinander entfernt, weshalb man auch von einer funktionellen Kasette sprechen kann (Xu *et al.*, 2000). Das Box1 Motiv kolokalisiert in etwa mit dem ersten β -Faltblatt (β A) strukturell bekannter TIR-Domänen. Box2 umfasst das zweite Faltblatt (β B), eine als BB-Loop bezeichnete Verbindungsschleife und die sich anschließende Helix (α B). Ein Prolin im BB-Loop ist essentiell für die korrekte zytoplasmatische Signaltransduktion durch die TIR-Domäne. Findet sich an dieser Stelle, wie im TLR4 von C3H/HeJ Mäusen, ein Histidin, werden die Tiere hyporesponsiv gegenüber LPS-Stimulation (Hoshino *et al.*, 1999). Zudem bildet der BB-Loop zusammen mit Teilen der Helix α A, dem Faltblatt β B und aromatischer Seitenketten (Phenylalanin oder Tyrosin) der β A-Region im Box1 Motiv eine weniger hydrophobe Oberflächenregion ("*S-Interface*"), die

nicht nur für die Rezeptoroligomerisierung nach Stimulation des TLRs sondern auch für die Rekrutierung TIR-enthaltender Adapter eine wichtige Rolle spielt (Xu *et al.*, 2000). Eine weitere Plattform für die Interaktion von TIR-Proteinen stellt der DD-Loop dar, der Verbindungsloop zwischen dem vierten Faltblatt β D und der vierten Helix α D. So bildet sich das TLR1-TLR2-Heterodimer durch Kontaktbildung der BB- und DD-Loops der beiden Rezeptor-TIR-Domänen (Gautam *et al.*, 2006). Mutagenesestudien am Box3 Motiv schließlich demonstrieren, dass auch diese Sequenz, welche sich im Falle von TLR1 und 2 auf der fünften Helix befindet, entscheidend für homotypische TIR-TIR-Interaktionen ist (Li *et al.*, 2005). Gerade die exponierten Loop-Regionen werden derzeit intensiv als mögliche Zielstrukturen zur spezifischen Inhibition der TLR-Signalkaskade analysiert. Zu diesem Zwecke werden sog. BB-Loop Mimetika kreiert, sodass diese niedermolekularen synthetischen Peptide exakt die Struktur der Loop-Regionen nachahmen und dadurch überschießende proinflammatorische Antworten des TLR- und IL-1-Rezeptorweges zu unterbinden vermögen (Loiarro *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2006).

1.3.2 Virale und bakterielle TIR-Proteine:

Vorkommen und Bedeutung als Virulenzfaktor

Durch *in silico* Analysen lassen sich potentielle TIR-Domänen in nahezu allen phylogenetischen Taxa, sei es in Viren, Bakterien und Hefen sowie im höheren Eukaryonten finden. Funktionelle Daten existieren jedoch bis jetzt fast nur für Drosophila, murine und humane TIR-Proteine. Die Beschäftigung mit diesen eukaryontischen Proteinen zeigte jedoch früh, dass auch bakterielle Proteine existieren, die strukturelle Ähnlichkeit zu TIR-Domänen im wohlcharakterisierten TLR-Signalweg aufweisen. CheY etwa, ein "*response regulator*" der bakteriellen Chemotaxis, zeigt eine ähnliche Rückgrat-Topologie wie eukaryontische TIR-Proteine, im Gegensatz zu diesen verfügt es jedoch über eine Kationen-Bindestelle (Stock *et al.*, 1990; Rock *et al.*, 1998). Interessanterweise verwendet hier jedoch ein Bakterium ein strukturell homologes Molekül zur Signaltransduktion in Folge eines externen Stimulus. Auf Grund der zentralen Bedeutung der TIR-Proteine für eine erfolgreiche Immunantwort ist es nicht verwunderlich, dass innerhalb der letzten Jahre mehrere virale und bakterielle Proteine pathogener Stämme funktionell charakterisiert wurden, die eine eindeutige Sequenzhomologie zu TIR-Domänen des TLR-Abwehrapparates aufweisen und das Signalgeschehen zu modulieren vermögen. Hierzu zählen das "*TIR-like protein A*" (TlpA) aus *Salmonella enterica*

Serovar Enteritidis (Newman *et al.*, 2006), "*P. denitrificans* TIR-like protein" (PdTLP) aus *Paracoccus denitrificans*, sowie ein Protein aus *Staphylococcus aureus*, "*S. aureus* TIR-like protein" (SaTLP) (Low *et al.*, 2007), aber ebenso virale Proteine des Vaccinia Virus, A46R und A52R (Bowie *et al.*, 2000). Gerade der N-Terminus all dieser Proteine ist hochgradig variant, was auf den unterschiedlichen Erregerursprung und unterschiedliche Virulenzmechanismen hindeutet. Innerhalb der Kernsequenz der TIR-Domäne zeigen sich jedoch deutliche Homologien was das Box1 und Box2, nicht jedoch das Box3 Motiv betrifft. Newman *et al.* zeigten für TlpA, dass es die TLR- sowie MyD88 abhängige NF- κ B Aktivierung unterdrücken und die intrazelluläre Erregerlast erhöhen kann. Für PdTLP demonstrierten Low *et al.* dessen Interaktion mit den TIR-Domänen von hTLR4 und mMyD88. Bowie und Kollegen konnten den Beweis erbringen dass A46R sowie A52R IL-1- und TLR4-abhängige Signalwege inhibiert, wobei A52R die TRAF6 und IRAK2 Komplexbildung stört (Harte *et al.*, 2003), während für A46R das Potential zur Bindung an TLR4, MyD88, TIRAP, Trif und TRAM aufgezeigt werden konnte (Stack *et al.*, 2005).

1.3.3 TcpC und TcpB – TIR-Domänen Proteine aus CFT073 und *Brucella melitensis*

Eigene Arbeiten konzentrierten sich auf zwei weitere bakterielle TIR-Proteine: das "*TIR domain containing protein C*" (TcpC, 307 AS, 36,4 kDa) aus CFT073 sowie das "*TIR domain containing protein B*" (TcpB, 250 AS, 28,0 kDa) aus *Brucella melitensis*, einem fakultativ intrazellulärem Bakterium, welches in frühen Endosomen zu finden ist und sich im endoplasmatischen Retikulum repliziert (Gorvel & Moreno, 2002). Beide Proteine wurden in gängigen Datenbanken zu Beginn der Arbeit noch als hypothetische Proteine geführt. Die Primärsequenz beider Proteine weist C-terminal lokalisiert eine TIR-Domäne mit eindeutiger Homologie zu humanen TIR-Proteinen auf. Dies betrifft das Box1 und in geringerem Maße das Box2 Motiv (s. Abbildung 3). Innerhalb des Box3 Motives ähneln sich die Proteine untereinander stark, es besteht jedoch keine Homologie zu den eukaryontischen Pendanten. Der N-Terminus beider Proteine weist keinerlei Ähnlichkeit auf und enthält keine weiteren konservierten Domänen mit Ausnahme einer hydrophoben Transmembranregion im Falle von TcpC (AS 20-42). Auffällig ist zudem die C-terminale Region von TcpC, die auf Grund der hohen Dichte an Argininen und Lysinen einen ausgeprägt basischen pI besitzt.

Betrachtet man die genomische Lokalisation der Gene, welche TcpB und TcpC kodieren, so erkennt man, dass beide auf genomischen Inseln zu finden sind. *TcpC* (Genlocus: c2398) auf

der *serU* Insel, *tcpB* auf der *phe* t-RNA Insel des jeweiligen Erregers (s. Abbildung 4). Hierauf sind wohl auch die Besonderheiten des *Codon Usage* von TcpC zurückzuführen: Nahezu alle Arginine- sowie etliche Leucine und Isoleucine werden von *E. coli* K12 untypischen Codons kodiert. Zudem machen die drei genannten AS mit einem Prozentsatz von 26,4 alleine etwa ein Viertel der Proteinzusammensetzung von TcpC aus (s. Abbildung 3).

TcpC	MIAYENIEFFFLCLVNVVLGNMNYILFFIFLSIAIPFLLFLAWKQHLKTKEIRSYLLKEGY	60
TcpB	-----MSKEKQAQ	8
hMyD88-TIR	-----MAAGGPGAGSAAAPVSSSTSSPLAALNMRVRRRLSFLFNVRTQVAADWTAL	
hTLR4-TIR	-----	
hTRIF-TIR	-----	
hTRAM-TIR	-----	
hTIRAP-TIR	-----	
TcpC	NIIFNDEGNSYLAFNISNATFRAGNLTSNDYFQASISYIHDIRWWEKVEAKKINNIFII	120
TcpB	SKAHKAQQAISAKSLSTQKSKMSELERATRGGAAIGKKRADIAKKIADKAKQLSSYQAK	68
hMyD88-TIR	AEEMDFEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLELLTKLGRDDVLLLELGPSE	
hTLR4-TIR	-----	
hTRIF-TIR	-----	
hTRAM-TIR	-----	
hTIRAP-TIR	-----	
	Box1	
TcpC	YISNIDFPSQKLFYRNKSLAEIDWAKLQAIHFHQPYEIQNDVMQDNNNTH YDFFISHAKE	180
TcpB	QFKADEQAVKKVAQEQRKLSDEKHEAFIKQSLSSMRTTASATMEAE YDFFISHASE	128
hMyD88-TIR	EDCQKYILKQQEAEKPLQVAAVDSSVPTAELAGITLDDPLGHMPER FDFAFCYCP	
hTLR4-TIR	----- AFVIYSSQ	
hTRIF-TIR	-----EQKFY NFVILHARA	
hTRAM-TIR	----- FVILHAED	
hTIRAP-TIR	----- CHSSE	
	:.	
	Box2 / BB-Loop	
TcpC	DKDTFVRPLVDELNRL GV--IWYDEQTL EVGDSLRR-NIDLGLRKANYGIVILSHNF--	235
TcpB	DKEAFVQDLVAALRDL GAK--IFYDAYTLK VGDSLRR-KIDQGLANSKFGIVVLSEHF--	183
hMyD88-TIR	DIQFVQEMIRQLEQTNYP LK-LCVSDRDVLP GT CVWS-IASELIEKRCRRMVVVSDD--	
hTLR4-TIR	DEDWVRNELVKNL EEGVP PFQCLHYRDFIP GV AIAANIHEGFHKSRKVI VVVSQHF--	
hTRIF-TIR	DEHIALRVREKLEA-LGV PDGATFCEDFQV PGRGELS-CLQDAIDHSAFI ILLLT SNFDC	
hTRAM-TIR	DTDEALRVQNLQDDFGI KPGIIFAE--MPCGR QHLQ-NLDDAVNGSAWT ILLLTENF--	
hTIRAP-TIR	DLVAAQDLVSYLEGSTAS LR-CFLQLRDAT PGGAIVS-ELCQALSSSHCRVLLITPGF--	
	* * * * * Box3	
TcpC	-LNKKWTQYELDSLINRAVYDDNKIILPIWHNINAQEVSKYSHYLADKMALQTSLS YSVKE	294
TcpB	-FSKQWPARELDGLTAMEIG-GQTRILPIWHKVSYDEVRRFSPSLADKVALNTSLK SVVE	241
hMyD88-TIR	YIQSKECDFQTKFALSLSFGAHQKRLIPIKYKAMKKEFPSILRFITVCDYTNPCTK SWFW	
hTLR4-TIR	-IQSRWCI FEYEIAQTWQFLSSRAGIIFIVLQKVEKTLRQQVELYRLLSRNTYLE WEDS	
hTRIF-TIR	RLSLHQVNQAMMSNLTRQGSPDCVIPFLPLESSPAQLSSDTASLLSGLVRLDEHSQ IFAR	
hTRAM-TIR	-LRDTWCNFQFYTSLMNS-----	
hTIRAP-TIR	-LQDPWCKYQMLQALTEA-----	
	:	
TcpC	IARELAEIAYRRR-	307
TcpB	IAKELHSLI----	250
hMyD88-TIR	TRLAKALSLP----	
hTLR4-TIR	VLGRHIFWRRLRKA	
hTRIF-TIR	KVANT-----	
hTRAM-TIR	-----	
hTIRAP-TIR	-----	

Abbildung 3: Alignment der bakteriellen TIR-Proteine TcpC und TcpB mit humanen TIR-enthaltenden Adaptern sowie der TIR-Domäne von TLR4. Für die bakteriellen Tcps ist die Aminosäureposition angegeben. Dick hervorgehoben sind AS, welche zu den konservierten Box1-3 Motiven gehören. Im Box2 Motiv ist zusätzlich die Lage des BB-Loops (Verbindungsloop zwischen β B und α B) für diejenigen Adapter und TLR4 skizziert, welche ein für die Signaltransduktion essentielles Prolin tragen (s. Kap. 1.3.1). Identische Aminosäuren sind mit einem Stern, biophysikalische nahe verwante durch einen Doppelpunkt und ähnliche mit einem Punkt markiert.

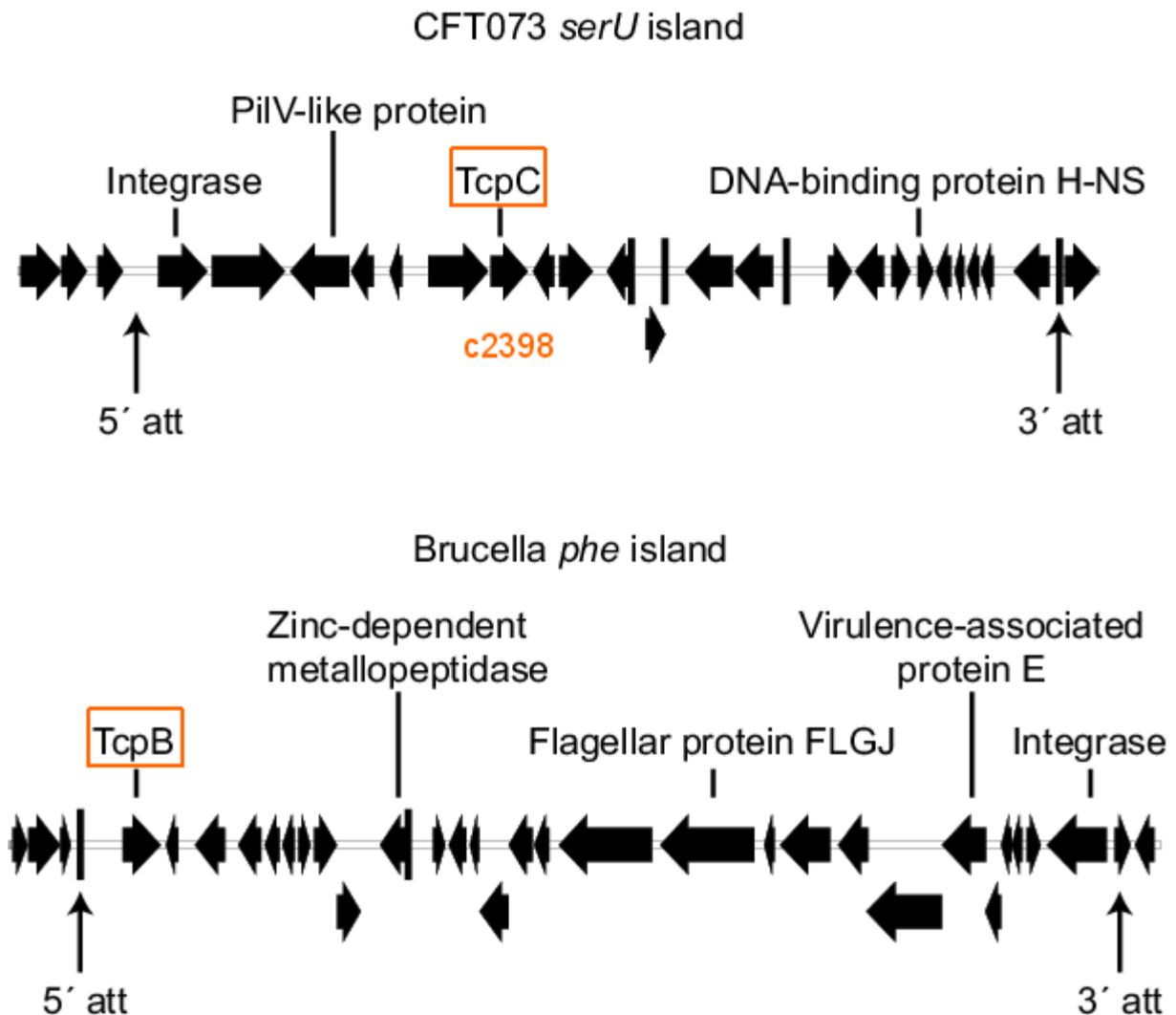


Abbildung 4: Genomische Lokalisation von *tcpC* (Genlocus: c2398) und *tcpB*. Details der Operon-Struktur der *serU* Insel von CFT073 sowie der *phe* t-RNA Insel von *B. melitensis* (Cirl *et al.*, 2008). Bekannte Proteine innerhalb der 5' und 3' attachment sites der jeweiligen Pathogenitäts-Insel sind namentlich genannt.

Noch eindeutiger als die Primärstruktur lässt die errechnete Tertiärstruktur der Tcps deren Verwandtschaftsgrad zu eukaryontischen TIR-Proteinen erkennen. Das zentrale Faltblattmotiv sowie die verbindenden Helices gleichen der Anordnung der kristallographisch bestimmten TIR-Domäne von TLR1 (s. Abbildung 5). Gerade der für Interaktionen funktionell essentielle oberflächenexponierte BB-Loop findet sich auch in den hypothetischen Strukturen für die bakteriellen TIR-Proteine wieder.

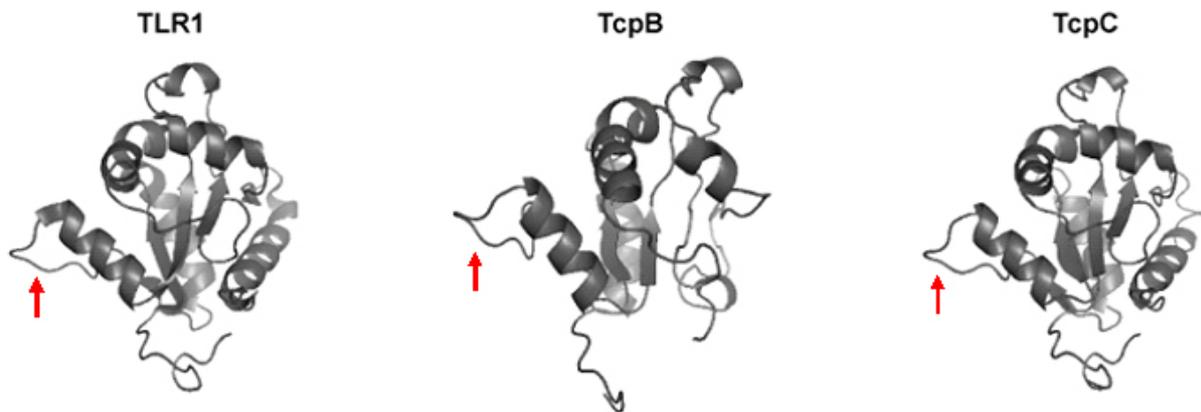


Abbildung 5: Tertiärstruktur der TIR-Domäne des humanen TLR1 (pdb-Eintrag: 1fyv) im Vergleich zu den *ab initio* kalkulierten Strukturen von TcpB und TcpC. Rote Pfeile zeigen die Lokalisation des BB-Loops innerhalb der einzelnen Proteine an. Die Berechnung der Strukturen erfolgte mit Hilfe des Programmes HMMSTR/Rosetta, die Visualisierung der Koordinaten erfolgte mit Hilfe des Programmes PyMol.

Zu Btp1 ("*Brucella TIR-containing protein*") einem TcpB-analogen Protein aus *Brucella melitensis* Biovar Abortus ist bekannt, dass es die Maturierung von DCs durch die Beeinflussung des TLR2-Signalweges beeinträchtigen kann (Salcedo *et al.*, 2008), jedoch liegen hierfür noch keine detaillierten proteinchemischen Analysen vor. Btp1 (NCBI: YP_413753) gleicht TcpB mit Ausnahme einer Aminosäure vollständig: An Position 138 befindet sich an Stelle eines Valins eine ebenfalls unpolare Alanin-Rest. Für diese Arbeit dienten daher TcpB und v.a. TcpC als Modellproteine zweier komplett unterschiedlich agierender Pathogentypen, um deren Potential der Beeinflussung der angeborenen Immunabwehr durch gezielte Expression TIR-enhaltender Proteine zu untersuchen.

1.4 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, ausgehend vom uropathogenen *E. coli* Stamm CFT073 und dem von diesem Erreger kodierten TIR-Protein TcpC exemplarisch den Einfluss bakterieller TIR-Proteine auf das TLR-abhängige Signaltransduktionsgeschehen zu analysieren. Als Ausgangspunkt der Arbeit dienten Studien von Susanne Dürr innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Miethke, welche sich mit dem immunmodulatorischen Effekt von TcpB befassten. Mit Hilfe rekombinanter, zweckmäßig markierter Proteine sowie bakterieller KO Varianten von CFT073 sollte *in vitro* detailliert untersucht werden, welche Rolle die Expression von TcpC für die Virulenz des UPEC-Stammes CFT073 spielt und welche Wirkung TcpC auf unterschiedliche humane und murine Zelllinien sowie primäre murine Zellen ausübt.

Aufbauend auf ersten Daten zum TLR-suppressiven Effekt von TcpC galt es, die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen dieses Phänomens zu klären. Hierfür sollte der Interaktionspartner des Tcps in der Wirtszelle charakterisiert werden.

Des Weiteren wurden Expression und Sekretion des TIR-Proteines seitens des Erregers sowie dessen Aufnahme in die Wirtszelle untersucht, um basierend auf diesem Wissen therapeutische Möglichkeiten zu definieren, diese Prozesse effizient zu unterbinden.

Ein weiterer Teil der Arbeit widmete sich der Fragestellung, weshalb IL-1 β von der Wirtszelle als Antwort auf TcpC in der frühen Phase der Infektion verstärkt sekretiert wird und im Gegenzug zu erhöhtem Erregerwachstum führt. Mittels Pull-Down Assays sollte einerseits die Möglichkeit der Interaktion von TcpC mit Komponenten des Inflammasoms getestet werden, andererseits sollte hiermit nach einem Molekül auf der CFT073-Oberfläche gesucht werden, welches IL-1 β zu binden vermag.

Schlussendlich sollte TIR-TcpC in ausreichender Menge und Reinheit produziert werden, um das rekombinante Protein einem Kooperationspartner für kristallographische Analysen zur Verfügung stellen zu können.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Biologische Materialien

E. coli-Stämme

BL21-Codon Plus®-RIL	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
BL21-Gold	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
CJ236	FΔ(<i>HindIII</i>)::cat(Tra ⁺ Pil ⁺ Cam ^R)/ <i>ungI</i> -, <i>relA1</i> , <i>dut-1</i> , <i>thi-1</i> , <i>spoT1</i> , <i>mcrA</i> . NEB, Schwalbach
CFT073	ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel
CFT073 <i>tcpC</i> :: <i>kan</i>	zur Verfügung gestellt von Andreas Wieser, Max von Pettenkofer-Institut, LMU München
CFT073 <i>tcpC</i> :: <i>kan</i> + pTepC	CFT073 <i>tcpC</i> :: <i>kan</i> komplementiert mit pACYC184 <i>TcpC</i> Operon, = KO+pTepC
CFT073 <i>tcpC</i> :: <i>kan</i> + pTepC(C12S)	CFT073 <i>tcpC</i> :: <i>kan</i> komplementiert mit pACYC184 <i>TcpC</i> Operon, Cystein 12 zu Serin mutiert, = KO+TepC(C12S)
CFT073 <i>tcpC</i> :: <i>kan</i> + pTepC(S176A)	CFT073 <i>tcpC</i> :: <i>kan</i> komplementiert mit pACYC184 <i>TcpC</i> Operon, Serin176 zu Alanin mutiert, = KO+TepC(S176A)
CFT073 <i>tcpC</i> :: <i>kan</i> + p _i TepB	CFT073 <i>tcpC</i> :: <i>kan</i> komplementiert mit pASK-IBA3+ <i>TcpB</i> , = KO+iTepB
CFT073 <i>tcpC</i> :: <i>kan</i> + pFLASH-TepC	CFT073 <i>tcpC</i> :: <i>kan</i> komplementiert mit pTepC, welches ein C-terminales FLASH-tag trägt
CFT073 <i>tcpC</i> :: <i>kan</i> + pFLASH-TepC hc (" <i>high copy</i> ")	CFT073 <i>tcpC</i> :: <i>kan</i> komplementiert mit pFLASH-TepC, dessen Strukturgene in pASK-IBA3+ umkloniert wurden
JM83	<i>ara</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), <i>rpsL</i> (= <i>strA</i>), φ80, <i>lacZ</i> ΔM15, (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985), ATCC-Stamm.
OneShot® TOP10	F-, <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>araleu</i>), 7697 <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>rpsL</i> (Str ^R), <i>endA1</i> , <i>nupG</i> . Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Mausstämmе

C57BL/6	Harlan Winkelmann GmbH, Borchem
Black6/ MyD88 ^{-/-}	zur Verfügung gestellt von Dr. S. Akira (Osaka, Japan), rückgekreuzt und gezüchtet von Dr. Nuria Rodriguez
Black6/ASC ^{-/-}	zur Verfügung gestellt und gezüchtet von Dr. Antje Heit

Viren

VCS-M13 Phage	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
---------------	------------------------------------

Zelllinien

HCV29	zur Verfügung gestellt von Dr. Sören Schubert, Max von Pettenkofer Institut, LMU München (Bean, 1974)
HEK293T	ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel
RAW264.7	ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel

2.1.2 Plasmide

pASK-IBA2	IBA GmbH, Göttingen
pASK-IBA3+	IBA GmbH, Göttingen, erhalten von Dr. Stefan Paschen
pASK-IBA5+	IBA GmbH, Göttingen
pASK-IBA45+	IBA GmbH, Göttingen, erhalten von Dr. Frank Schmitz
(alle mit Amp-Resistenz)	
pACYC184 +Operon pTpcC (Cm-Resistenz)	erhalten von Andreas Wieser, Max von Pettenkofer- Institut, LMU München

2.1.3 Oligodesoxynukleotide*2.1.3.1 Oligodesoxynukleotide zur DNA-Sequenzierung*

Oligodesoxynukleotide für die Sequenzierung wurden direkt von der GATC Biotech AG, Konstanz, bereitgestellt. Die 20-24mer Primer wurden jeweils so gewählt, dass sie 30-45 bp vor Beginn der Sequenz von Interesse annealen.

2.1.3.2 Oligodesoxynukleotide für PCR-Reaktionen

Alle Primer wurden HPLC-gereinigt in einer Konzentration von 0,02 µM von der Thermo Electron GmbH, Ulm, bezogen:

Oligodesoxynukleotide für Klonierungen und analytische PCR-Reaktionen:

TIR-TcpC-IBA2 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAGGCCCACTATGATTTTTTTCATATCCCATGC -3'
TIR- TcpC-IBA2 3'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTTCTTCTCCTGTATGCTATTTTCAGC -3'
TIR-TcpC-IBA3+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAAATGCACTATGATTTTTTTCATATCCCATGC -3'
TIR-TcpC-IBA3+ 3'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTTCTTCTCCTGTATGCTATTTTCAGC -3'
TIR-TcpC-IBA5+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCCCACTATGATTTTTTTCATATCCCATGC -3'
TIR-TcpC-IBA5+ 3'	5'- ATGGTAGGTCTCATATCATCTTCTCCTGTATGCTATTTTCAGC -3'
TcpC-IBA2 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAGGCCGTGCTAGCATATGAAAACATAGAATTT -3'
TcpC-IBA2 3'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTTCTTCTCCTGTATGCTATTTTCAGC -3'
TcpC-IBA5+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCCATAGCATATGAAAACATAGAATTTTTTAT - 3'
TcpC-IBA5+ 3'	5'- ATGGTAGGTCTCATATCATCTTCTCCTGTATGCTATTTTCAGC -3'
Delta-TcpC-IBA2 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAGGCCGTGCTAGCATATGAAAACATAGAATTT -3'
Delta-TcpC-IBA2 3'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTCGTATTATTGTTATCTTGCATGACG -3'
Delta-TcpC-IBA3+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAAATGATAGCATATGAAAACATAGAATTTTTTAT -3'
Delta-TcpC-IBA3+ 3'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTCGTATTATTGTTATCTTGCATGACG -3'
TIR-TcpC-tat-IBA3+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAAATGCACTATGATTTTTTTCATATCCCATGC -3'
TIR-TcpC-tat-IBA3+ 3'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTAACGCTATATAAAGAAGTTTGCAGTG -3'
TIR-TcpC-elong-IBA3+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAAATGAATATATTTATTATTTACATTTTTCGAATATTG -3'
TIR-TcpC-elong-IBA3+ 3'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTTCTTCTCCTGTATGCTATTTTCAGC -3'
TcpB-IBA2 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAGGCCATGTCTAAAGAGAAACAAGCCCAAT -3'
TcpB-IBA2 3'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTGGTCCCCCTGCAGGTTCGACC -3'
TcpB-IBA3+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAAATGTCTAAAGAGAAACAAGCCCAATCAA -3'
TcpB-IBA3+ 3'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTGATAAGGGAATGCAGTTCTTTTCGC -3'

TIR-TcpC-IBA17+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCCCACTATGATTTTTTTCATATCCCATGC -3'
TIR-TcpC-IBA17+ 3'	5'- ATGGTAGGTCTCATATCATCTTCTCTGTATGCTATTTTCAGC -3'
TcpB-IBA17+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCCTCTAAAGAGAAACAAGCCCAATCAA -3'
TcpB-IBA17+ 3'	5'- ATGGTAGGTCTCATATCAGATAAGGGAATGCAGTTCTTTTCGC -3'
PapC-short-IBA3+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAAATGAATACAGATGTACTTGACGCGGC -3'
PapC-short-IBA3+ 3'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTGCGGGAGCGACCGGAGACAA -3'
PapC-long-IBA45+ 5'	5'- ATGGTACGTCTCAGCGCCGCATCGTTACAGATTTTCATTTGTTG -3'
PapC-long-IBA45+ 3'	5'- ATGGTACGTCTCAGGCCGGCACCTTCTGTCAGCGCCG -3'
Murines IL-1 β -IBA3+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAAATGCACTACAGGCTCCGAGATGAAC -3'
Murines IL-1 β -IBA3+ 3'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTGGAAGACACGGATTCCATGGTG -3'
Humanes IL-1 β -IBA3+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAAATGGCACCTGTACGATCACTGAACTG -3'
Humanes IL-1 β -IBA3+ 3'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTGGAAGACACAAATTGCATGGTGAA -3'
EGFP-IBA3+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG -3'
EGFP-IBA3+ 3'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTCTCGAGATCTGAGTACTTGTACAG -3'
FimD aus CFT073 5'	5'- ATGATGGCTTTTGCCGCACAGGCACCT -3'
FimD aus CFT073 5'	5'- ACCACATCACTAACTGAATATTCGTGCCTGA -3'
FimD-IBA3+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAAATGGCTTTTGCCGCACAGGCACCT -3'
FimD-IBA3+ 3	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTCACTAACTGAATATTCGTGCCTGA -3'
MSSA476 TIR-IBA3+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAGGCCTCAGTATTAGAACTAAATTA AAAAGTC -3'
MSSA476 TIR-IBA3+ 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTATTCTTAGAATTAACGATTACTTGATAA -3'
CpxP-IBA2 5'	5'- ATGGTAGGTCTCAGGCCCGCATAGTTACCGCTGCCGTC -3'
CpxP-IBA2 3'	5'- ATGGTAGGTCTCAGCGCTCTGGGAACGTGAGTTGCTACTAC -3'
delta c2398 Sören 5'	5'- GGCAACAATATGTATAATATC T -3'
delta c2398 Sören 3'	5'- GCCCAGTCTATTTCTGCTAAAGA -3'
diagnostisch TIRc2398 5'	5'- CACTATGATTTTTTTCATATCCCATGCAAAAGAG -3'
diagnostisch TIRc2398 3'	5'- TCTCCTGTATGCTATTTTCAGCCAACTCTCTTGC -3'

Oligodesoxynukleotide für Mutagenese-Reaktionen:

TcpC IBA2 S176A 5'	5'- CTATGATTTTTTCATAGCCCATGCAAAAAGAGGATA -3'
TcpC IBA2 S176A 3'	5'- TATCCTCTTTTGCATGGGCTATGAAAAAATCATAG -3'
TcpC IBA2 C12S 5'	5'- AACATAGAATTTTTTATAAGCTTGGTGAATGTTTTGGGC -3'
TcpC IBA2 C12S 3'	5'- GCCCAAAACATTCACCAAGCTTATAAAAATTCTATGTT -3'
TcpC IBA2 D101A 5'	5'- ATTTCTTATATCCACGCTTATAGATGGGAGTGG -3'
TcpC IBA2 D101A 3'	5'- CCACTCCCATCTATAAGCGTGGATATAAGAAAT -3'
TcpC IBA2 T287A 5'	5'- AAAATGGCACTGCAAGCTTCTTTATATAGCG -3'
TcpC IBA2 T287A 3'	5'- CGCTATATAAAGAAGCTTGCAGTGCCATTTT -3'
pACYC184-TcpC-C-FIAsH 5'	5'- CGAGAACGGTCCATACAACAGCCCGGGCAGCATCTTCTCCTGTATGC - 3'
pACYC184-TcpC-C-FIAsH 3'	5'- GCATACAGGAGAAGATGCTGCCCGGGCTGTTGTATGGACCGTTCTCG - 3'
TIR-TcpC-IBA5+ N- FIAsH 5' FLNCCP	5'- TCGAAAAAGGCGCCTTTTTAAATTGTTGTCTCACTATGATTTT -3'
TIR-TcpC-IBA5+ N- FIAsH 3' FLNCCP	5'- AAAATCATAGTGAGGACAACAATTTAAAAAGGCGCCTTTTTTCGA -3'
TIR-TcpC-IBA5+ N- FIAsH 5' GCCMEP	5'- AATTGTTGTCTGGATGCTGCATGGAACCTCACTATGATTTT -3'
TIR-TcpC-IBA5+ N- FIAsH 3' GCCMEP	5'- AAAATCATAGTGAGGTTCCATGCAGCATCCAGGACAACAATT -3'
TIR-TcpC-IBA5+ R297I 5'	5'- GTTAAGGAAATAGCAATAGAGTTGGCTGAAATA -3'
TIR-TcpC-IBA5+ R297I 3'	5'- TATTCAGCCAACCTCTATTGCTATTTCTTAAC -3'
TIR-TcpC-IBA5+ R307I 5'	5'- ATAGCATACAGGAGAATATGATATCTAACTAAGCTT -3'
TIR-TcpC-IBA5+ R307I 3'	5'- AAGCTTAGTTAGATATCATATTCTCCTGTATGCTAT -3'
TIR-TcpC-IBA5+ R305M 5'	5'- GAAATAGCATACATGAGAATATGATATCTAACT -3'
TIR-TcpC-IBA5+ R305M 3'	5'- AGTTAGATATCATATTCTCATGTATGCTATTTT -3'
TIR-TcpC-IBA5+ R306S 5'	5'- GAAATAGCATACATGAGCATATGATATCTAACTAA -3'
TIR-TcpC-IBA5+ R306S 3'	5'- TTAGTTAGATATCATATGCTCATGTATGCTATTTT -3'

2.1.3.3 Oligodesoxynukleotide zur Stimulation von TLR9

ODN 1826 (murin), 20mer	5'- TCCATGACGTTTCCTGACGTT -3'
ODN 2006, 24mer	5'- TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT -3'

2.1.4 Antikörper, Enzyme und sonstige Proteine

anti-β-Aktin	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
AffinityScript™ Reverse Transcriptase	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Antiserum gegen TcpC (Hase)	Eurogentec S.A., Seraign, Belgien
Peptide: EQTLEVGDSLRRNIDL, FLNKKWTQYELDSLI	
Antiserum gegen TcpC-TIR (murin)	zur Verfügung gestellt von Dr. Nina Wantia
2 boosts mit 25µg TcpC-TIR+10 nmol CpG	und Tanja Ertl, TU München
Tail-base Immunisierung, 2 Wochen Rhythmus	
Benzonase®	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Bovines Serum Albumin (BSA), Frakt. V	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Carboanhydrase	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
anti-mouse Caspase-1, p10 (m20)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
anti-mouse cleaved C1, p20 (m296)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Collagenase (<i>Clostridium hydrolyticum</i>)	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
anti-DnaK (<i>E. coli</i>)	Stressgen / Biomol GmbH, Hamburg
DuoSet® ELISA Kits	R&D Systems, Minneapolis, USA
anti-Flag (murin)	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
anti-GFP (goat)	Abcam plc, Cambridge, UK
Herculase II™	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
anti-goat IgG-HRP	Jackson Immunoresearch, Westgrove, USA
anti-mouse IgG-HRP	Jackson Immunoresearch, Westgrove, USA
anti-rabbit IgG-HRP	Jackson Immunoresearch, Westgrove, USA
mouse rIL-1β	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
mouse rIL-1ra (480-RM)	R&D Systems, Minneapolis, USA
anti-myc (murin)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
anti-MyD88 (N-19) sc8196 (goat)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
DNase I	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf

GM-CSF mouse	ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Israel
Lysozym aus Hühnereiweiß	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
M-CSF mouse	ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Israel
Ovalbumin	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Pfu, Taq	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
PfuUltra™ Fusion HS	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
PfxI, Pfx50	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Restriktionsendonukleasen (10u/μl):	
<i>BglII, BstEII, BstXI, Eco31I, Eco47III,</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>EcoRI, Esp3I, DpnI, HindIII, KpnI,</i>	
<i>NcoI, SacI, SacII, SalI, SalII, XbaI, XhoI,</i>	
<i>NsiI, SalI</i>	New England Biolabs, Schwalbach
Puffer für Restriktionsendonukleasen:	
NEB 2, NEB 3, NEB 4	New England Biolabs, Schwalbach
Y+/Tango™ 1x sowie	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Puffer blau, gelb, grün, orange, rot	
RNase Block RNase Inhibitor	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Strep-Tactin HRP-Konjugat	IBA GmbH, Göttingen
Strep-Tactin MacroPrep 50% Suspension	IBA GmbH, Göttingen
T4 DNA-Ligase (200 u/μl)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth, Stratagene, Amsterdam, Niederlande
T4-DNA Polymerase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.5 Chemikalien

Aceton	Apotheke des Klinikums Rechts der Isar
Acrylamid-Stammlösung 30%ig / Bis	BIO-RAD, München
Adenosin-5'-triphosphat (ATP) 100 mM	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Agarose, ultra pure	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ammoniumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin, Natrium-Salz (Amp)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Anhydrotetracyclin, Hydrochlorid (aTc)	IBA GmbH, Göttingen
L-Arginin	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
BD OptEIA™ TMB Substrat-Set	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
Blue Dextran	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Bromphenolblau	E. Merck KGaA, Darmstadt
Calciumchlorid	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
CASP	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Caspase Substrate:	Bachem AG, St. Helens, UK
Caspase 1 (Ac –YVAD - AMC)	
Caspasen 3/7 (Ac – DEVD – AMC)	
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio] -1-propanesulfonate = CHAPS	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Coomassie Brilliantblau R-250	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg
Methyl-β-Cyclodextrin (MβCD)	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
3-(Decyldimethylammonio)propansulfonat	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
D-Desthiobiotin	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf IBA GmbH, Göttingen
Dimethylformamid (DMF)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Entellan	E. Merck KGaA, Darmstadt
Entwickler / Fixierlösung	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach
Adefo GV 60	
Erythrozyten-Lyse-Puffer	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol <i>pro analysis</i>	E. Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol technisch	Apotheke des Klinikums Rechts der Isar
Ethidiumbromid (1% w/v in Wasser)	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Flagellin (<i>S. typhimurium</i>)	InvivoGen Europe, Toulouse, Frankreich

Formaldehyd (37% Lösung)	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Glycerin	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
β -Glycerophosphat	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Glycin	E. Merck KGaA, Darmstadt
2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure (HABA)	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
HEPES	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
HisPur Cobalt Resin (Nr. 89964)	Pierce Biotechnology, Rockford, U.S.A.
Höchst-Farbstoff 33258	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Igepal® CA-630 (NP-40)	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Imidazol	USB Corporation, Ohio, USA
Immersionsöl Typ B	Olympus Optical GmbH, Hamburg
Isopropanol	Apotheke des Klinikums Rechts der Isar
Kaliumdihydrogenphosphat	E. Merck KGaA, Darmstadt
N-Lauroylsarcosin	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
LPS	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
LPS ultrapure	InvivoGen Europe, Toulouse, Frankreich
Magnesiumchlorid	E. Merck KGaA, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES)	Pierce Biotechnology, Rockford, U.S.A.
Natriumacetat	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumchloridlösung, isotonisch	DeltaSelect GmbH, Dreieich
Natriumdodecylsulfat (SDS)	E. Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumhydroxid	E. Merck KGaA, Darmstadt; Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumthiosulfat	E. Merck KGaA, Darmstadt
N-Octyl α -D Glucopyranosid	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf

dNTP-Set (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)- (2RS)-propyl]-[R]-Cys-[S]-Serl-[S]-Lys- trihydrochlorid (Pam3CSK4)	InvivoGen Europe, Toulouse, Frankreich
peqGOLD TriFast™	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Phenol, ≥ 99%, redestilliert	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
L-Phenylalanin-L-Arginin-β-Naphtylamid (PAβN)	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
PKH26 Labeling Kit	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Polyinosine-polycytidylsäure (poly(I:C))	InvivoGen Europe, Toulouse, Frankreich
Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat (Tween 20)	Schuchardt & Co., Hohenbrunn
Protease-Inhibitor Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Pursept-A	Merz Pharma GmbH & Co. KGaA, Frankfurt am Main
RNAasin	Promega GmbH, Mannheim
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Salzsäure conc. (HCl)	E. Merck KGaA, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Sauerstoffgas	Linde, Weiterstadt
SlowFade® Gold	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin (TCEP)	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Ultra Qualität (Tris)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Xylencyanol	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf

2.1.6 Standards und Kits

DNA-Größenstandards:

100 bp DNA Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
1 kb DNA Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
D-Salt™ Polyacrylamide 6000 Desalting Columns	Pierce Biotechnology, Rockford, U.S.A.

Protein-Größenstandards:

SDS-PAGE Standard, <i>broad range</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
<i>prestained</i> SDS-PAGE Standard, <i>broad range</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
ProFound™ Biotinylated	Pierce Biotechnology, Rockford, U.S.A.
Protein Interaction Kit	
Protease Detektions Kit (PF0100)	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf

Kits zur DNA/RNA-Isolierung, Reinigung:

Endofree® Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGOLD Tissue DNA Mini Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
TC-FLAsH expression analysis kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TC-FLAsH™II in-cell tetracysteine tag detection kit (green), living cells mit 4',5'-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl) fluorescein-(1,2-ethandithiol)2	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

2.1.7 Geräte

Agfa Curix 60	AGFA, ehem. München
Äkta™ Purifier System mit Autosampler A-900 Probenloops (0,5, 1 und 50 ml), und Uvicord SII, Pump P-1	GE Healthcare Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig
Bio-Mag 10 Magnetrührer	BCC Spezialgeräte, Göttingen
Brutschränke: Innova 2100	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen
Elektroblot-Apparatur Trans-Blot SD	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Elektrophoresekammern	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
ELISA Reader Sunrise	TECAN, Schweiz
Heizrührer: Variomag Monotherm	H & P Labortechnik GmbH, München
Metallblockthermostat 2116	Gebrüder Liebisch, Bielefeld
Mikroskope und Zubehör: Leica MPS 52 Leica SP 5	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
PCR-Gerät Thermocycler T 3000	Biometra, Göttingen
pH-Meter Multical	WTW, Weilheim
pH-Elektrode (Typ 465)	Ingold Messtechnik, Steinbach
Pipetboy acu	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Pipetten (Gilson): P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson International B.V., Bad Camberg
Rollenmischer IDL TRM-V	Kühn & Bayer, Nidderau-Heldenbergen
Schüttelinkubator: Multitron	INFORS AG, Bottmingen, Schweiz
Spektrometer: Nanodrop®ND-1000 Spektrometer Ultrospec 3000pro	Nanodrop, Steinfurt GE Healthcare Buchler GmbH & Co. KG, Braunschweig
Sterilbank Hera Safe 240	Thermo Fisher Scientific, Deutschland

	Heraeus, Hanau
Twinkle LB 970	Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad
UV-Transilluminator 2000	BIO-RAD, München Deutschland
Quantity One Software	
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA
Waagen:	
Feinwaage CP124S	Sartorius GmbH, Göttingen
U5000D	Sartorius GmbH, Göttingen
Wasserbäder:	
Thermomix 1460	Braun Melsungen AG, Melsungen
Wipptisch WT12	Biometra, Göttingen
Zentrifugen:	
Sorvall RC 5B und RC 5C Plus mit Rotoren SA300, SS-34, SLA-1500 und SLA-3000	Kendro Laboratory Products GmbH, München
Eppendorf 5415 C	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg

2.1.8 Sonstiges Material

Affinitätschromatographiesäulen:	IBA GmbH, Göttingen
Strep-Tactin® MacroPrep® 5ml für ÄKTA sowie für Gravity Flow	
Deckgläschen	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
D-Salt Polyacrylamid 6000	Pierce Biotechnology, Rockford, U.S.A.
Dialyseschläuche:	
SnakeSkin® Pleated Dialysis Tubing	Pierce Biotechnology, Rockford, U.S.A.
Spectra/Por®, cut-off: 3,5 MW	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Disposable Polystyren Säulen, 1-5 ml	Pierce Biotechnology, Rockford, U.S.A.
Einweg-Spritzen 5, 10 und 25 ml	VWR International GmbH, Darmstadt
Eppendorf-Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml (Safelock)	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
Glasdouncer – Tissue Grind Tube 15ml und Pistill B	Kleinfeld Labortechnik GmbH, Gehrden

Glasplatten und Zubehör für SDS-PAGE	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Größenausschlusschromatographie-Säulen:	GE Healthcare Buchler GmbH & Co. KG,
Superdex 75 HR 10/30	Braunschweig
Superdex 75 HR 10/300	
Halb-Mikro-Küvetten	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
ibiTreat, 1 μ -Slide 8 well	ibidi Integrated BioDiagnostics, München
Konzentratoren:	Millipore GmbH, Schwalbach
Amicon® Ultra-4 und	
Amicon® Ultra-10	
5 und 10 kDa MW cut-off	
Nanosep™ 3K Omega	Pall GmbH, Dreieich
Kunststoffröhrchen:	
PP-Röhrchen, 15 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
PP-Röhrchen, 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Cellstar® PP-Röhrchen, 15 ml, 50 ml	Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen
Membranfilter:	
Immobilon™-P (0,45 μ m)	Millipore GmbH, Schwalbach
GVWP (0,22 μ m)	Millipore GmbH, Schwalbach
Nitrozellulose-Membranfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Mikrotiter-Platten:	
Falcon Micro Test III Flexible	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
Assay-Plates	
Nitrozellulose Membran	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Objektträger	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
PD-10-Säulen	GE Healthcare Buchler GmbH & Co. KG,
	Braunschweig
Pipetten-Spitzen :	G. Kisker GbR, Deutschland
	Peske Medizintechnik, Aindling
PVDF-Membran	Millipore GmbH, Schwalbach
Quarzglas-SUPRASIL® Küvette	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim
Röntgenfilme Fuji Super RX	A. Hartenstein, Deutschland

Sterilfilter:

Millex [®] HV (0,45 µm)	Millipore GmbH, Schwalbach
----------------------------------	----------------------------

Membransterilfilter (0,22 µm; Ø 5 cm)	Schleicher & Schuell, Dassel
---------------------------------------	------------------------------

Whatman-Filterpapier 3MM	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
--------------------------	---------------------------------

Zellkulturgefäße:

Transwell [®] Permeable Supports	Schubert & Weiss Omnilab GmbH, Wackersdorf
---	---

Zellkulturplatten Falcon	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
--------------------------	----------------------------------

Zellsiebe, 100µm Nylon	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
------------------------	----------------------------------

Zentrifugenbecher für Sorvall-Rotoren SA300, SLA-1500 und -3000	Nalgene Company, New York, USA
--	--------------------------------

2.1.9 Medien, Antibiotika und allgemeine Lösungen

Alle Medien sowie Lösungen für die Arbeit mit Bakterien, Bakteriophagen, Proteinen und DNA wurden im Autoklaven und / oder durch Filtration sterilisiert. Mit Ausnahme der Kulturmedien, welche mit entionisiertem Wasser angesetzt wurden, wurden prinzipiell alle Lösungen unter Verwendung von Millipore[®] Wasser hergestellt. Kulturplatten wurden bei 4°C und Lösungen, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Antibiotika wurden den Flüssigkeiten erst kurz vor der Verwendung zugesetzt. Die Lösungen, welche für chromatographische Versuche benötigt wurden, wurden vorab stets entgast.

Antibiotika-Stammlösungen:

Für die Herstellung von Selektivmedien wurden folgende Antibiotika-Stammlösungen verwendet; die Lösungen wurden bei -20°C gelagert; wässrige Lösungen wurden sterilfiltriert (0,45 µm oder 0,22 µm Porengröße).

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in H ₂ O (1:1.000 zum Medium)
------------------	--

Kanamycin (Kan)	50 mg/ml in Wasser (1:1.000)
-----------------	------------------------------

Chloramphenicol (Cm)	34 mg/ml Ethanol 100% (1:1.000)
----------------------	---------------------------------

Induktor-Stammlösung:

Anhydrotetracyclin (aTc)	2 mg/ml in wasserfreiem DMF (1:10.000)
--------------------------	--

LB-Medium:

Bacto Trypton:	10 g/l
----------------	--------

Bacto Yeast Extract:	5 g/l
NaCl:	5 g/l
Bacto Agar (nur für Kulturplatten):	15 g/l

Medien wurden mit 5 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und im Autoklaven sterilisiert.

Allgemeine kommerzielle Puffer, Antibiotika und Medien:

Columbia Agar:	heipha Dr. Müller GmbH, Eppelheim
Gentamicin	Sigma Chemie GmbH, Schnelldorf
Goat Serum GIBCO®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Opti-MEM GIBCO®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS für die Zellkultur	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
RPMI 1640 und DMEM (4,5 g/l Glucose)	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich
SOC-Medium:	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH, Pasching Österreich

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese:

<u>TAE-Puffer:</u>		<u>10x Auftragspuffer für Agarose-Gele:</u>	
Tris	40 mM	Bromphenolblau	1 mg/ml
Essigsäure	20 mM	Xylencyanol	1 mg/ml
EDTA	1 mM	Glycerin	50% v/v

Puffer für Caspase-Assays:

MDB-Puffer:

HEPES, pH 7,0	10 mM
β-Glycerophosphat	40 mM
NaCl	50 mM
MgCl ₂	2mM
EGTA	5 mM

Vor Verwendung zufügen:

Chaps 10% in ddH ₂ O	1:100
BSA (10 mg/ml in ddH ₂ O)	1:100
Caspase Substrat (10mM Stock)	ad 200 μM

Bei zu hohem Hintergrund wurden ggf. 1% Glycerin und 10 mM DTT zugefügt.

Cobalt-Affinitätschromatographie-Puffer:Äquilibrierungs / Bindungspuffer (ÄB-Puffer):

Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
Dinatriumhydrogenphosphat	100 mM
NaCl	300 mM
Guanidinium-Hydrochlorid	6 M
Imidazol	10 mM

Elutionspuffer:

Tris/HCl, pH 8,0	10 mM
Dinatriumhydrogenphosphat	100 mM
NaCl	300 mM
Guanidinium-Hydrochlorid	6 M
Imidazol	150 mM

Regenerierungspuffer (MES-Puffer):

2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure	20 mM
NaCl	100 mM

pH auf 5-6 eingestellt.

Puffer zur Gelfiltrations-Chromatographie (GF-Puffer):

PBS entgast, ggf.mit NaCl	150 - 500mM
---------------------------	-------------

Puffer für SDS-PAGE, Native-PAGE und Western Blotting:1x Fling & Gregerson Laufpuffer:

Tris	50 mM
Glycin	190 mM
SDS	1 g/l

pH 8,8 stellt sich ein, SDS nicht für native Gele verwenden.

4x Lower-Tris:

Tris/HCl pH 8,85	3 M
SDS (nicht für native Gele)	4 g/l

4x Upper-Tris:

Tris/HCl pH 6,8	0,5 M
SDS (nicht für native Gele)	4 g/l

5x Auftragspuffer (Lämmli):

Tris/HCl pH 6,8	250 mM
SDS	7,5% w/v
Glycerin	25% v/v
Bromphenolblau	0,25 mg/ml
DTT	100 mM

(nur bei reduzierendem Auftragspuffer), SDS nicht für native Gele verwenden.

Färbelösung:

Essigsäure	10% v/v
Methanol	40% v/v
Coomassie Brilliantblau R-250	0,25% w/v

Entfärbelösung: Exakt wie die Färbelösung, jedoch ohne Coomassie Brilliantblau

Aufbewahrungslösung:

Essigsäure	7% v/v
Glycerin	2% v/v
Wasser	93% v/v

Semidry Transferpuffer für Western Blotting:

Tris Ultra	0,5 M
Glycin	40 mM
SDS 10 % Lösung	0,375% v/v
Methanol	20% v/v

Mit ddH₂O auf 1 l auffüllen

TBS und TBS-T 10x für Western-Blot:

Tris Ultra	1 M
NaCl	1,5 M

pH 7,6 mit HCl einstellen,

für TBS-T Puffer: 1x TBS Puffer mit 0,05% (v/v) Tween 20 versetzen.

Lösungen für die Silberfärbung:Stammlösung:

Methanol	50% v/v
Essigsäure	7,2% v/v
Wasser	42,8% v/v

Fixierungslösung:

Zu 40 ml der Stammlösung wurden vor Gebrauch 20 µl 40% w/v Formaldehyd zugesetzt.

Waschlösung:

Ethanol p.a.	50% v/v
Wasser	50% v/v

Vorbehandlungslösung (1.000x):

Natriumthiosulfat	200 mg/ml
-------------------	-----------

in Wasser gelöst und als Aliquots bei -20°C gelagert.

Färbelösung á 40 ml (stets frisch angesetzt):

Silbernitrat (200 mg/ml)	0,4 ml
Formaldehyd 40% w/v	40 µl

Entwicklerlösung á 40 ml in Wasser:

Natriumcarbonat (150 mg/ml)	8 ml
Formaldehyd 40% w/v	20 µl
1 x Vorbehandlungslösung (s.o.)	0,4 ml

Sonstige Puffer:AP-Puffer:

Tris	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

pH 8,8 mit HCl eingestellt

Benzonase-Puffer:

Tris/HCl pH 8,8	0,1 M
MgCl ₂	5 mM

Guanidinium-Puffer (Gua-Puffer) zur Proteindenaturierung :

Tris/HCl pH 8,0	50 mM
NaCl	100 mM
Guanidinium-Hydrochlorid	6 M
EDTA	10 mM
DTT (jeweils frisch zugefügt)	10 mM

Natriumacetatlösung, 3M: 3 M Natriumacetat mit Eisessig auf pH 4,8 eingestellt.

NP-40 Lyse-Puffer:

NaCl	150 mM
Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
Sigma CA-630 (NP40)	1% v/v

Vor Verwendung ggf. Protease-Inhibitoren (Roche) sowie 0,2 mM NaVO₃ zufügen

PBS:

KH ₂ PO ₄	4 mM
Na ₂ HPO ₄	16 mM
NaCl	115 mM

pH 7,4 stellt sich ein.

PBS/T 0,1 bzw. 0,5:

PBS mit 0,1% v/v bzw. 0,5% v/v Tween 20

Periplasma-Aufschlußpuffer (PPA-Puffer):

Saccharose	500 mM
Tris/HCl pH 8,0	100 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

RIPA-Lyse-Puffer:

Na ₂ HPO ₄ , pH 7,2-7,4	10 mM
NaF	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	2 mM
SDS	1% (w/v)
Natriumdeoxycholat	1% (w/v)
zuletzt: Sigma CA-630 (NP40)	1% (v/v)

Vor Verwendung Protease-Inhibitoren (Roche) sowie 0,2 mM NaVO₃ zufügen

RNase-Lösung (DNase-frei):

Tris/HCl, pH 7,5	1 mM
Natriumacetat, pH 5,2	10 mM
RNase A	10 mg/ml

Zur Inaktivierung von DNasen wurde die RNase A in Natriumacetat, pH 5,2 für 15 min auf 100°C erhitzt. Im Anschluss erfolgte die langsame, kontinuierliche Abkühlung bis zum Erreichen von Raumtemperatur. Durch die Zugabe von 0,1% v/v Tris/HCl wurde der pH-Wert auf 7,4 angepasst. Aliquots der Lösung wurden bei -20°C gelagert.

Rückfaltungspuffer (RF-Puffer):

Tris/HCl pH 8,0	200 mM
EDTA	10 mM
L-Arginine	500 mM
Cysteamin	6,5 mM
Cystamin	3,7 mM

Das Redoxkuppel sowie eine Protease-Inhibitor Tablette wurden der Lösung stets zuletzt und kurz vor Gebrauch zugefügt.

Streptavidin -Affinitätschromatographie-Puffer (SAC-Puffer):

Tris/HCl pH 8,0	100 mM
NaCl	150-500 mM
EDTA pH 8,0	1 mM

TBS-Puffer:

Tris/HCl pH 7,6	20 mM
NaCl	137 mM

TE-Puffer:

Tris/HCl pH 8,0	10 mM
EDTA	1 mM

Triton Lyse Puffer (TL-Puffer):

Tris/HCl pH 8,0	50 mM
NaCl	100 mM
N-Lauroylsarcosin	0,1% (v/v)
Triton X-100	0,05 oder 1% (v/v)
EDTA	1 mM

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*-Stämmen

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agar-Kulturplatten und Inkubation ü. N. bei 37°C erhalten. Die Selektion auf spezifische Plasmide erfolgte durch Zusatz der entsprechenden Antibiotika zum Nährmedium. Die Kulturplatten mit den Bakterienkolonien wurden mit Parafilm verschlossen bei 4°C aufbewahrt und maximal 4 Wochen zum Animpfen von Kulturen verwendet. Flüssigkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit LB-Medium unter Zusatz geeigneter Antibiotika angesetzt. Verwendete Volumina waren 4 ml im 13 ml Kulturröhrchen, sowie 100 ml und 1.000 ml im 250 ml- bzw. 2.000 ml-Erlenmeyerkolben mit einem Verschluss aus Aluminiumfolie. Bis zu einem Volumen von 50 ml wurden die Kulturen direkt mit einer Bakterienkolonie von der Agarplatte angeimpft. Kulturen mit einem Volumen von 2 l wurden im Verhältnis 1:50 mit einer stationären Übernachtskultur inokuliert. Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die Inkubation bei 30°C und 200 rpm im Schüttelinkubator. Zelldichten wurden in 1 cm Kunststoffküvetten durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) mit Hilfe eines Ultrospec 3000pro-Spektralphotometers bestimmt. Bei optischen Dichten größer als 1 wurden entsprechende Verdünnungen der Zellsuspension in Medium vermessen. Der Messwert wurde jeweils gegen das verwendete Medium abgeglichen.

Zur dauerhaften Konservierung von *E. coli*-Stämmen wurde 0,5 ml einer stationären Übernachtskultur in Selektivmedium mit 1 ml hitzesterilisiertem 50% v/v Glycerin gemischt und bei -20°C aufbewahrt.

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

Um Plasmid-DNA aufnehmen zu können, müssen *E. coli* Zellen zuvor in eine transformationskompetente Form überführt werden. Dazu wurde die klassische $CaCl_2$ -Methode (Cohen, 1988; Sambrook, 1989) eingesetzt, wodurch je nach *E. coli*-Stamm ca. 10^4 bis 10^7 Transformanden pro μg Plasmid-DNA erhalten werden.

50 ml LB-Medium (ggf. unter Zusatz erforderlicher Antibiotika) wurden im Verhältnis 1:100 mit einer stationären Übernachtskultur des zu transformierenden *E. coli*-Stammes angeimpft

und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,5$ inkubiert. Die Kultur wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation (5.000 rpm, 4°C, 10 min) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 40 ml eiskalter 0,1 M $MgCl_2$ -Lösung resuspendiert, die Suspension wie zuvor zentrifugiert, das erhaltene Sediment in 20 ml eiskalter 50 mM $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Zellen in 2 ml 50 mM $CaCl_2$, 15% v/v Glycerin resuspendiert und in Aliquots von 200 μ l entweder direkt für die Transformation verwendet oder bei -80°C gelagert. Alle eingesetzten Lösungen wurden im Dampfautoklaven sterilisiert und vor der Verwendung auf 4°C abgekühlt.

Zur Transformation dieser sowie kommerziell erworbener Stämme wurden die bei -80°C gelagerten Zellen mit typischerweise 1 ng Plasmid-DNA gemischt und für 25-30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 20-45 sec bei 42°C hitzeinkubiert und nach weiteren 5 min auf Eis mit 750 μ l SOC-Medium versehen und 1 h bei 37°C geschüttelt. Von dieser Zellsuspension wurden standardisiert 100 μ l auf LB-Agar, welcher mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, ausplattiert. Um keine Kolonien zu verlieren, wurde das verbleibende Zellpellet (gelöst in 100 μ l SOC-Medium) nach Zentrifugation ebenfalls auf LB-Agar überführt und ü. N. bei 37°C inkubiert.

2.2.3 DNA-Isolierung aus *E. coli*

2.2.3.1 Isolierung von doppelsträngiger Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Plasmid-Isolierungskits der Firmen Qiagen oder PeqLab im Mini- und Maxi-Maßstab verwendet. Diese beruhen auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen (Birnboim & Doly, 1979), gefolgt von der Adsorption der Plasmid-DNA an einem Trägermaterial (z. B. Anionenaustauscher, Silicagel), mehreren Waschschritten und der abschließenden Elution der DNA in üblicherweise 35–100 μ l Elutionspuffer.

2.2.3.2 Präparation von einzelsträngiger Plasmid-DNA

Die für die Mutagenese nach Kunkel *et al.* (Kunkel, 1987) benötigte zirkuläre, einzelsträngige DNA (ssDNA) wurde ausgehend von Plasmiden, die die intergenische Region des Phagen ϕ 1 trugen, präpariert. Durch Infektion des mit einem entsprechenden Plasmid transformierten *E.*

coli-Stamms CJ236 mit VCS-M13 Helfer-Bakteriophagen wurde die Plasmid-DNA in einzelsträngiger Form in Phagemide verpackt. Aus den sezernierten Phagemiden konnte die ssDNA dann isoliert werden (Viera & Messing, 1987). Die dabei als Verunreinigung mitisolierte ssDNA des Helferphagen mit einem Anteil von < 5% stellt keinen Störfaktor bei der nachfolgenden Mutagenese dar.

Der verwendete Stamm CJ236 besitzt ein F'-Plasmid und kann somit die für die Infektion mit filamentösen Bakteriophagen vom Typ M13 benötigten Sex-Pili ausbilden. Darüber hinaus bewirkt die chromosomale Mutation *dut*⁻ (dUTPase) einen partiellen Einbau von Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin in die DNA, was durch das Fehlen eines weiteren Enzymes (*ung*⁻ = Uracil-N-Glycosylase) von der Zelle nicht korrigiert werden kann.

4 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer Kolonie des *E. coli*-Stamms CJ236, der mit dem gewünschten Plasmid transformiert worden war, angeimpft und bei 30°C und 200 rpm ü. N. inkubiert. Mit dieser stationären Kultur wurden 20 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum im Verhältnis 1:100 inokuliert und bei 37°C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ = 0,26 (ca. 1,6•10⁸ Zellen/ml) geschüttelt. Dieser Kultur wurde 1 ml entnommen, mit VCS-M13 Helferphage entsprechend einer "multiplicity of infection" (MOI) von 16 infiziert und 1 h bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurde die infizierte Kultur vollständig in 20 ml LB_{Amp/Cm}-Medium überführt und ü. N. bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10.000 rpm, 4°C, 10 min), der Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit 10 µl einer 10 mg/ml RNase A-Lösung (DNase-frei) versetzt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden die Phagemidpartikel durch Zugabe von 5 ml frischer, steriler 3,5 M Ammoniumacetat, 20% PEG 8000, pH 7,4 für 30 min auf Eis gefällt. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert (12.500 rpm, 4°C, 15 min), das Präzipitat in 200 µl Hochsalz-Puffer (300 mM NaCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Lösung wurde für 30 min auf Eis inkubiert und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (14.000 rpm, 4°C, 2 min) entfernt.

Zur Abtrennung der Phagenhüllproteine wurde der Überstand über Gelextraktionssäulen der Firma QIAGEN aufgereinigt (vgl. Kap. 2.2.7) und die ssDNA in 20-35 µl TE-oder EB-Puffer gelöst und bei 4°C (über längere Zeiträume bei -20°C) aufbewahrt. Zur Abschätzung der isolierten DNA-Menge sowie zur Kontrolle des Reinheitsgrades wurde 1 µl einer 1:10 verdünnten Lösung auf ein analytisches Agarose-Gel aufgetragen. Die erhaltenen Ausbeuten lagen je nach Plasmid zwischen 10 und 100 µg ssDNA.

2.2.4 Isolierung von genomischer DNA, RNA

Die Isolierung bakterieller DNA aus CFT073 erfolgte mit Hilfe des peqGOLD Tissue DNA Mini Kits nach Herstellerangaben, wobei eine stationäre Bakterienkultur als Ausgangsmaterial diente. Zur Isolierung pro- und eukaryontischer RNA wurde der RNeasy® Mini Kit der Firma QIAGEN verwendet. Alle Schritte erfolgten nach Herstellerangaben.

2.2.5 Präparation von cDNA

Eukaryontische cDNA für die Klonierung von Genen aus RAW264.7 oder HCV29 Zellen wurde aus zuvor isolierter RNA unter Verwendung der AffinityScript™ Reverse Transcriptase (Stratagene) gemäß der Herstellerangaben synthetisiert. Im Annealingschritt wurden 90 ng Random Primer (bei prokaryontischer RNA 300 ng) sowie 250 ng Oligo(dT) Primer (nur bei eukaryontischer RNA) eingesetzt. Vor der Synthese erfolgte die Zugabe des RNase Inhibitors RNAsin.

2.2.6 Gelelektrophorese zur Reinigung von DNA / RNA

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe wurde die horizontale Agarose-Gelelektrophorese in Gegenwart von Ethidiumbromid (Sambrook, 1989) im analytischen Maßstab eingesetzt.

Für die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurde je nach Größe der DNA-Fragmente eine 0,8% oder 1% w/v Suspension von Agarose in 1x TAE-Puffer in der Siedehitze homogenisiert, mit 1/10.000 Volumen einer 1% w/v Ethidiumbromidlösung versetzt und in eine horizontale Gelkammer mit Geltaschenformer gegossen. Das nach Erstarren der Lösung erhaltene Gel wurde in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und DNA/RNA-Lösung, die vorher mit 1/10 Volumen 10x Auftragspuffer versetzt worden war, beladen. Die Elektrophoresedauer betrug 50-100 min bei einer Spannung von 90-120 V. Anschließend wurden die DNA-Fragmente in Form der Ethidiumbromid-Interkalate durch Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht und analysiert.

2.2.7 Gelextraktion

Sollten DNA Fragmente zur Klonierung oder Sequenzierung nach Gelelektrophorese aus dem Agarose-Gel isoliert oder ssDNA von Proteinen abgetrennt werden, erfolgte dies unter Verwendung des QIAquick® Gel Extraction Kits gemäß der Herstellerangaben. Die DNA wurde in einem abschließenden Schritt in 30-50 µl Elution Buffer aufgenommen.

2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifizierung von Genen

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; engl.: *Polymerase Chain Reaction*; (Saiki, 1988) wurde in der vorliegenden Arbeit zum Zwecke der selektiven Amplifizierung von Genen für die nachfolgende Klonierung, die Mutagenese oder die cDNA-Synthese eingesetzt. Spezialprotokolle sind in den jeweiligen Unterpunkten aufgeführt.

Zur Klonierung von Genen wurde folgender Standardansatz gewählt: Ausgangs-DNA (~50-100 ng), je 125 ng 5' und 3' Primer, dNTPs (200-400 µM), adäquater Polymerase-Puffer mit MgSO₄, ggf. bei genomischer DNA 0,05% (v/v) DMSO, 1 µl Pfu- sowie 1 µl Taq-Polymerase (beide von Fermentas, ddH₂O ad 50 µl). Die PCR-Parameter lauteten wie folgt: (1) Denaturierung initial: 1-2 min 95°C, (2) Denaturierung: 30 sec 95°C, (3) Annealing: 1 min, 1-5°C unter der Schmelztemperatur des Primerpaares, (4) Elongation: 1 min/kb Plasmidlänge, 72°C, wdh. (2)-(4) 33mal, HOLD, 1,5°C. Die erhaltenen DNA Fragmente wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.9 *In vitro* Modifizierung von DNA

2.2.9.1 5'-Phosphorylierung von DNA-Fragmenten

Durch 5'-Phosphorylierung von Oligodesoxynukleotiden bzw. ungeschnittenen PCR-Fragmenten wurde deren kovalente Verknüpfung durch T4-DNA-Ligase mit dem freien 3'-Ende eines DNA-Moleküls ermöglicht. Dies war z. B. für die Zirkularisierung des bei der Polymerase-Reaktion *in vitro* synthetisierten DNA-Stranges im Verlauf der ortsgerichteten Mutagenese notwendig (siehe 2.2.9.2). Die Phosphorylierung geschah mit Hilfe der T4-Polynukleotidkinase (PNK, Invitrogen).

Oligodesoxynukleotide bzw. PCR-Fragmente (100 pmol) wurden hierzu nach Herstellerangaben mit 5 µl 10x T4-PNK-Puffer, 8 mM ATP und 20 units T4-PNK in einem Gesamtvolumen von 25 µl für 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Inaktivierung der PNK für 10 min bei 65°C. Der Anteil des phosphorylierten Oligonukleotides bzw. PCR-Fragments, der nicht sofort für die ortsgerichtete Mutagenese bzw. Ligierung eingesetzt wurde, wurde bei -20°C gelagert.

2.2.9.2 Ortsspezifische Mutagenese nach Kunkel

Für die ortsgerichtete Mutagenese zur Insertion eines TC-FlAsH-tags (CCPGCC, mit Spacern: FLNCCPGCCMEP) alternativ an den C- oder N-Terminus von TpcC-Varianten wurde die Vorschrift von (Geisselsoder, 1987) entsprechend der Methode gemäß Kunkel *et al.* (1987) angewendet. Dabei wird zunächst ein Oligodesoxynukleotid, welches die gewünschten Modifikation trägt, mit der komplementären ssDNA des zu mutierenden Plasmides unter Ausbildung entsprechender Basenfehlpaarungen hybridisiert. In der sich anschließenden Polymerase-Reaktion dient das Oligodesoxynukleotid dann als *Primer* für die Synthese des zweiten DNA-Strangs, der mit Hilfe einer geeigneten DNA-Ligase kovalent verknüpft und somit zirkularisiert wird. Aufgrund der Herkunft des parentalen Stranges aus dem *E. coli*-Stamm CJ236 (*dut*⁻, *ung*⁻) und dem damit verbundenen teilweisen Einbau von Desoxyuridin anstelle von Desoxythymidin wird ein Selektionsvorteil für den mutierten synthetischen Strang erzielt. Bei der Transformation eines *ung*⁺-Stamms mit dem semisynthetischen DNA-Hybrid wird der parentale Strang durch das zelleigene Ung-System partiell degradiert und somit auf die im neu synthetisierten Strang kodierten Mutationen selektiert.

Die Hybridisierung erfolgte jeweils in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit 1 µl 10x Hybridisierungspuffer (200 mM Tris/HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 20 mM MgCl₂), ca. 200 ng einzelsträngiger DNA (Abschnitt 2.2.3.2) und 1 µl (4 pmol) des phosphorylierten Oligodesoxynukleotids (Abschnitt 2.2.9.1). Der Ansatz wurde für 5 min auf 80°C erhitzt, im Verlauf von mindestens 4 h (besser ü.N.) langsam und auf ca. 20°C abgekühlt und auf Eis gestellt. Zur Neusynthese des zweiten DNA-Strangs wurde die Lösung zunächst auf Eis mit 3µl T4 DNA-Ligase-Puffer (+ATP), 6µl T4-DNA-Polymerase Puffer, 100-400 µM dNTP Lösung, 10 *units* T4 DNA-Polymerase (Invitrogen) sowie 10 *units* T4 DNA-Ligase (Fermentas) versetzt. Erst wurde für 5 min auf Eis, dann für 5 min bei RT und schließlich für 90 min bei 37°C inkubiert. 5 µl des Reaktionsansatzes wurden anschließend 1:10 mit TE-

Puffer verdünnt, 5 µl davon für die Transformation von *E. coli* OneShot® TOP10 verwendet und die restlichen 45 µl der Lösung bei -20°C gelagert. Die verbliebenen 7,5 µl der unverdünnten Lösung wurden zur Kontrolle der *in vitro*-Reaktion auf ein analytisches Agarose-Gel aufgetragen. Das per Sequenzierung auf korrekte Einführung der Insertion bestätigte TC-FIAsH-Konstrukt basierend auf dem Plasmid pTpcC wurde als pFIAsH-TpcC bezeichnet.

2.2.9.3 Ortsspezifische Mutagenese zur Einführung von Punktmutationen

Zur Einführung einzelner Punktmutationen oder Insertionen bis zu sechs Aminosäuren wurde ein Protokoll in Anlehnung an die Prozedur des QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene verwandt. Die Mutagenese-Primer wurden so konzipiert, dass die zu mutierende Base upstream und downstream von jeweils 15-18 korrekt annealenden bp flankiert wurde. Es wurde stets ein den identischen Bereich betreffendes Primer-Paar für den sense- sowie den antisense-Strang ausgewählt. Die Schmelztemperaturen lagen gewöhnlich zwischen 72°C und 85°C. Für den Mutagenese-Ansatz wurden 5-50 ng der Template dsDNA, welche zuvor aus einem *dam*⁺ *E. coli* Stamm isoliert worden war, mit 200 µM dNTPs, je 125 ng der jeweiligen Primer sowie 5 µl Polymerase-Puffer und 1-2 µl Polymerase (PfuUltra™ Fusion HS oder Pfx50) in einem 50 µl Reaktionsansatz vereint (ddH₂O ad 50µl). Die PCR-Parameter lauteten wie folgt: (1) Denaturierung initial: 30 sec 95°C, (2) Denaturierung: 30 sec 95°C, (3) Annealing: 1 min, 55°C, (4) Elongation: 1 min/kb Plasmidlänge, 68°C, wdh. (2)-(4) 13mal, HOLD, 1,5°C. Den Ansätzen wurde dann unmittelbar 5 µl Y+/Tango™ sowie 2 µl *DpnI* zugefügt und die maternale DNA für 1,5-2 h bei 37°C abverdaut. 7 µl des Edukts wurden dann in einen *dam*⁺ *E. coli* Stamm transformiert und erhaltene Kolonien nach Plasmid-Präparation mit Hilfe von Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung auf die Einführung der gewünschten Basensubstitution hin untersucht.

2.2.10 Spaltung doppelsträngiger DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Restriktionsanalyse von Plasmiden sowie von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden DNA-Moleküle mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Die enzymatische Reaktion erfolgte dabei jeweils in dem vom Hersteller empfohlenen Puffersystem bei der angegebenen Temperatur. Sollte eine Spaltung mit mehreren Restriktionsenzymen bei gleicher Temperatur erfolgen, wurde derjenige Puffer gewählt, in dem alle verwendeten Enzyme über

maximale Aktivität verfügten. Benötigten die Endonukleasen unterschiedliche Puffer oder verschiedene Reaktionstemperaturen, wurden die Reaktionen nacheinander, gegebenenfalls unter Erhöhung der Salzkonzentration durchgeführt. Bei analytischen Spaltungen wurden typischerweise ca. 0,5 µg Plasmid-DNA mit 5 *units* der Restriktionsendonuklease in einem Endvolumen von 10 µl für 1 h inkubiert. Für den Verdau von Plasmiden wurden dabei 2-10 µg DNA und 20 *units* des Restriktionsenzym eingesetzt. Isolierte und gereinigte PCR-Fragmente wurden ebenso in einem 50 µl Ansatz mit 20 *units* des jeweiligen Restriktionsenzym gespalten. Für alle Klonierungen in IBA-Vektoren erfolgte die Spaltung von Vektor sowie Insert mit *Eco3II*. Lediglich bei der Klonierung der *papC*-long Variante wurde das Insert mit *Esp3I* anstelle von *Eco3II* geschnitten. Als Besonderheit ist anzumerken, dass der *Eco3II* Verdau für mindestens 16-20 h bei 37°C durchgeführt wurde. Zur Kontrolle von IBA-Plasmiden wurden diese stets mit *XbaI* und *HindIII* verdaut. Für die Umklonierung von pASK-IBA2 TcpC(S176A) und (C12S) in das TcpC-Operon auf pACYC184 wurden die NEB-Enzyme *NsiI* und *SalI* verwandt, welche die direkte Umklonierung des CFT073 Gens c2398 ohne Veränderung des endogenen Promotors oder c2397 gestatteten. Durch Kunkel-Mutagenese erhaltene pFlAsH-TcpC-Varianten von pACYC184-TcpC konnten durch einen *BamHI*, *PstI* Verdau vollständig in pASK-IBA3 umkloniert werden. Das hieraus resultierende Konstrukt wurde als pFlAsH-TcpC hc ("*high-copy*") bezeichnet.

2.2.11 Vektordephosphorylierung und Ligation von DNA Fragmenten

Nach der Linearisierung von Vektoren durch Restriktionsendonukleasen wurden diese bevor mit der Klonierung eines Gens fortgefahren werden konnte durch Alkalische Phosphatase (CIAP) an 5' und 3'-Enden dephosphoryliert, um die Rezirkularisierung des Vektors zu verhindern. Hierzu wurden 2-10 µg linearisiertes Plasmid unmittelbar im Anschluss an den Restriktionsverdau mit CIAP-Puffer (1:6) versetzt und 2 µl CIAP zugefügt. Die Dephosphorylierung erfolgte für 30-60 min bei 37°C. Im Anschluss wurden verbleibende Enzyme und Pufferkomponenten des dephosphorylierten Vektors sowie des zu inserierenden und komplementär mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen DNA-Fragmentes durch Gelelektrophorese abgetrennt. Für den Ligationsansatz wurden Vektor und Insert im Verhältnis 1:3-1:4 zusammen mit ATP (200 µM), Ligase-Puffer (1:10) und 2µl T4-DNA-Ligase gemischt (ddH₂O ad 20µl). Der Ansatz wurde für 1 h bei 22°C und 2 h bei 37°C

inkubiert, bevor 2-7 μ l des Edukts in geeignete kompetente *E. coli* Stämme transformiert werden konnten.

2.2.12 Sequenzierung und Sequenzanalyse doppelsträngiger DNA

Durch Mutagenese veränderte oder durch Klonierung neu generierte DNA wurden zur Überprüfung der exakten Basenabfolge einer Sequenzanalyse unterworfen. Dazu wurde zirkuläre doppelsträngige Plasmid-DNA verwandt. Die Analyse erfolgte durch die Firma GATC Biotech (Konstanz).

2.3 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Expression rekombinanter Proteine (s. auch Kap. 3.1) wurden je 50 ml LB_{Amp}-Medium oder LB_{Amp/Cm}-Medium mit einer entsprechend transformierten Kolonie des *E. coli*-Stammes JM83 (periplasmatische Expression), bzw. BL21-Codon Plus®-RIL (zytoplasmatische Expression) angeimpft und bei 30°C und 200 rpm ü. N. im Schüttelinkubator kultiviert. Danach wurden 1 l LB_{Amp/(Cm)}-Medium in einem 2 l-Erlenmeyerkolben im Verhältnis 1:50 mit der stationären Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 25-30°C und 150 rpm geschüttelt und ihr Wachstum durch stündliche Probenentnahme zur Messung der OD₆₀₀ verfolgt. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 wurde mit einer Anhydrotetracyclinlösung (2 mg/ml) in DMF induziert (Endkonzentration: 200-250 μ g/l) und die Temperatur auf 23°C erniedrigt. Die Induktionsdauer betrug je nach verwendetem Plasmid 2,5 h (alle TcpC-Varianten) bis 5 h (Proteine, welche als Inclusion Body aufgereinigt wurden).

Zur Ernte der Zellen wurde die Kultur zügig auf sechs vorgekühlte Zentrifugenbecher verteilt und zentrifugiert (4°C, 15 min, 5.000 rpm). Der Medienüberstand wurde anschließend vollständig abgenommen und die sedimentierten Zellen im Rahmen der **periplasmatischen Expression** (Vektor: IBA2 mit N-terminaler OmpA-Signalsequenz) in insgesamt 1/100 des ursprünglichen Kulturvolumens an eiskaltem Saccharose-Aufschlusspuffer (PPA-Puffer) resuspendiert und in einem 50 ml Kunststoffröhrchen für die Dauer von 30 min auf Eis inkubiert. Protease-Inhibitoren (1/8 Tablette pro Kolben) wurden frisch zugesetzt. Während der Inkubation wurden 100 μ g einer frischen Lysozymlösung (10 mg/ml Stammlösung in ddH₂O) zugesetzt. Anschließend wurden die Sphäroplasten in zwei aufeinander folgenden Zentrifugationsschritten abgetrennt (5.000 rpm, 4°C, 15 min sowie 15.000 rpm, 4°C, 15 min).

Der periplasmatische Extrakt wurde danach zur Reinigung des rekombinanten Proteins mittels Affinitätschromatographie ü. N. (4°C) gegen das 100fache Volumen an entsprechendem Chromatographie-Puffer dialysiert (vgl. Abschnitt 2.4.2.1, 2.4.2.2).

Sofern eine **zytoplasmatische Expressionsstrategie** (Vektoren: IBA3+, IBA5+) gewählt wurde, erfolgte die Lyse der Zellen in 1/100 des Kulturvolumens mit eiskaltem Triton Lyse Puffer (TL-Puffer), welcher vor Gebrauch mit frischem Protease-Inhibitor (1/8 Tablette/l) versetzt wurde. Alternativ wurde dem Puffer 0,5% (w/v) 3-(Decyldimethylammonio)-propansulfonat zugesetzt, um die Löslichkeit von Membranproteinen wie PapC-short zu erhöhen. Während der Inkubation wurden 100-150 µg einer frischen LysozymbLösung (10 mg/ml Stammlösung in ddH₂O) zugesetzt. Anschließend wurde der Extrakt 5 min mit Ultraschall behandelt (je 20 sec Puls, 100% Intensität, 20 sec auf Eis). Hierauf erfolgte ein abschließender Zentrifugationsschritt (15.000 rpm, 4°C, 15 min) bevor der zytoplasmatische Extrakt gegen das 100fache Volumen an Chromatographiepuffer der Wahl ü. N. bei 4°C dialysiert wurde. Für die spätere Analyse mit Hilfe der SDS-PAGE wurde auch ein Gesamtzellaufschluss der Kultur im kleinen Maßstab durchgeführt: 1 ml der Kultur wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation (14.000 rpm, 4°C, 2 min) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 80 µl Benzonaselösung (12,5 U/ml in Benzonasepuffer) resuspendiert. Durch Zugabe von 20 µl 5x Auftragspuffer (reduzierend) für SDS-PAGE wurden die Zellen lysiert. Die freigesetzten Nukleinsäuren wurden durch Benzonase im Verlauf einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur hydrolysiert. Anschließend konnte der Gesamtzellaufschluss bis zur Analyse durch SDS-PAGE bei -20°C eingefroren gelagert werden.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Gewinnung und Rückfaltung von Inclusion Bodies

Zellpellets mit Proteinen, welche bei der zytoplasmatischen Expression als nichtlösliche Inclusion Bodies (IBs oder Einschlusskörperchen) ausfielen, wurden zunächst in 10 ml PBS aufgenommen und mit Ultraschall behandelt. Im Anschluss wurden die unbearbeiteten IBs pelletiert (4°C, 12.000 g, 30 min). Hierauf wurde das Pellet je 2-3mal mit 10 ml TL-Puffer (1% Triton v/v) mit Hilfe eines Homogenisators resuspendiert und daraufhin abzentrifugiert

(4°C, 12.000 g, 15 min, ebenso bei allen weiteren Schritten). Sobald das Zell-Proteinpellet eine weißliche Farbe annahm, wurden die IBs 2mal mit TL-Puffer, 0,05% Triton v/v gewaschen und resuspendiert. Um überschüssiges Triton X-100 auszuwaschen, erfolgten 2 abschliessende Waschschrte mit SAC-Puffer sowie 2 weitere Zentrifugationsschritte (4°C, 12.000 g, 15 min). Das Pellet wurde dann in 10-15 ml Guanidinium-Hydrochlorid-Puffer (Gua-Puffer) aufgenommen und 4 h bei 4°C bis zur vollständigen Lösung der Proteine auf einem Rollenmischer inkubiert. Proteine, welche denaturiert über Cobalt-Agarose aufgereinigt werden sollten (PapC-long), wurden unmittelbar in 10 ml ÄB-Puffer aufgenommen. Nicht-lösliche Zellbestandteile wurden durch einen letzten Zentrifugationsschritt abgetrennt. Die Proteinlösung wurde bis zur Rückfaltung bzw. der Affinitätschromatographie an Cobalt-Agarose bei -80°C gelagert. Die Rückfaltung aller anderen IBs erfolgte durch 2-3tägige Dialyse gegen bzw. "*rapid-dilution*" in RF-Puffer. Das in Gua-Puffer gelöste Protein wurde hierbei jeweils gegen das 200fache Volumen dialysiert. Nicht-lösliche Proteine wurden dann abzentrifugiert (4°C, 12.000 g, 15min) und der lösliche Überstand ü. N. entweder gegen SAC-Puffer oder PBS dialysiert (400-500faches Volumen), um das rückgefaltete Protein einer Streptavidin-Affinitätschromatographie (2.4.2.1) bzw. einer Gelfiltration (2.4.2.3) unterziehen zu können. Wurde das Protein durch "*rapid-dilution*" rückgefaltet, wurden die in Gua-Puffer gelösten IBs tröpfchenweise im Zeitraum von 30 min in RF-Puffer pipetiert (1ml auf 100 ml RF-Buffer). Die Rückfaltung fand bei 4°C unter permanentem Rühren (300 rpm) statt. Nach 24 h wurde erneut 1 ml IBs langsam zugefügt und der Ansatz für weitere 12-24 h unter ständigem Rühren bei 4°C belassen, bevor das Proteingemisch gegen SAC-Puffer aufkonzentriert und einer Streptavidin-Affinitätschromatographie (2.4.2.1) unterzogen werden konnte.

2.4.2 Chromatographische Verfahren

2.4.2.1 Streptavidin-Affinitätschromatographie

Die Isolierung rekombinanter Proteine aus der periplasmatischen Zellfraktion einer *E. coli*-Kultur in Form von Fusionsproteinen mit dem *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel (Schmidt, 1996; Skerra & Schmidt, 2000) erfolgte mit Hilfe der Streptavidin-Affinitätschromatographie.

Periplasma- bzw. Zytosolfractionen wurden ü. N. bei 4°C gegen das etwa 1.000fache Volumen an SAC-Puffer dialysiert und vor dem Auftrag auf die Chromatographie-Säule zur Entfernung von Proteinaggregaten sterilfiltriert (0,45 µm). Eine Gravity Flow Strep-Tactin® MacroPrep® Säule (5ml Säulenvolumen, Polymethylacrylatmatrix) mit einer Biotin Bindekapazität von >300 nmol/ml wurde bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie anhand der Absorption bei 280 nm (A_{280}) mit SAC-Puffer gespült. In Abhängigkeit der erwarteten Ausbeuten an rekombinantem Protein wurde ein 30 ml Protein-Dialysat auf 1–3 Auftragszyklen verteilt. Nach Auftrag der Proteinfraction wurde die Säule anschließend mit SAC-Puffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats annähernd den Basis-Ausgangswert erreicht hatte. Das über das Strep-Tactin gebundene rekombinante Protein wurde mit einer 5 mM Lösung an D-Desthiobiotin in SAC-Puffer eluiert, bei stark hydrophoben Proteinen wie TcpB wurde die Salzkonzentration des SAC Puffers von 150 mM auf bis zu 500 mM erhöht, um hierdurch Proteinverluste durch starke hydrophobe Wechselwirkungen des rekombinanten Proteines zu unterbinden. Zur Regenerierung der Säule wurde diese zunächst mit 2 CV SAC-Puffer gespült und das gebundene D-Desthiobiotin anschließend durch einen Waschschrift mit 4 CV 2 mM HABA in SAC-Puffer bis zur intensiven Orangefärbung des Säulenmaterials kompetitiv verdrängt. Die Lagerung der Säulen erfolgte bei 4°C in 2mM HABA. Für weitere Analysen wurde HABA durch Spülen mit SAC-Puffer bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie von der Säule entfernt. Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten, wurden durch SDS-PAGE ermittelt und vereinigt. Für die weitere Aufreinigung mittels Größenausschlusschromatographie wurden volumenintensive Fraktionen in einem geeigneten Millipore Amicon® Ultra Konzentratoren aufkonzentriert und simultan in PBS umgepuffert. Im Anschluss wurden durch einen Zentrifugationsschritt (15 min, 4°C, 13.000 rpm) eventuell beim Aufkonzentrieren entstandene Aggregate abgetrennt. Die Proteinfractionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.2.2 Affinitätschromatographie an HisPur™ Cobalt-Agarose

Zur Aufreinigung 6xHis-getaggtter Proteine wurden Polystyren Säulen mit 2-5 ml 6% gecrosslinkten Agarose Beads beladen, auf welchen ein vierzähliger Co^{2+} -Chelator immobilisiert vorlag. Die Säule wurde mit 2 CV ÄB-Puffer gewaschen. Hierauf wurden 2 CV des Proteinextraktes geladen, welches ü.N. gegen ÄB-Puffer dialysiert wurde. Im Anschluss wurde die Säule mit 4 CV ÄB-Puffer gewaschen werden. HIS-getaggtte Proteine, deren tag

durch die Co^{2+} -Ionen komplexiert wurde, konnten dann mit 3-4 CV Elutionspuffer kompetitiv von der Säule ausgewaschen und fraktioniert gesammelt werden. Das Eluat wurde dann wie in Kap. 2.4.1 beschrieben einer Rückfaltung unterzogen. Zur Regeneration der Säule, wurde diese mit 10 CV MES-Puffer sowie 10 CV ddH₂O gewaschen und anschließend in 20% Ethanol bei 4°C gelagert.

2.4.2.3 Analytische Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration)

Die Größenausschlusschromatographie ermöglicht die Trennung von Proteinen gemäß ihrer Größe und Form. Die verwendeten Säulenmatrizes bestehen aus kleinen Kügelchen eines unlöslichen, aber stark hydratisierten Polymers mit Poren definierter Größe. Kleine Moleküle können in diese Kügelchen eindringen, große nicht. Folglich verteilen sich kleine Moleküle sowohl in der wässrigen Lösung innerhalb der Kügelchen als auch in den Zwischenräumen, wohingegen große Moleküle auf das wässrige Medium zwischen den Kügelchen beschränkt bleiben. Somit passieren große Moleküle die Säule schneller und eluieren folglich früher als kleine, da ihnen ein kleineres Volumen zugänglich ist. Die im Folgenden verwendeten Chromatographie-Puffer wurden sterilfiltriert und durch Anlegen eines Vakuums für 30 min entgast. Die Chromatographie sowie die Absorptionsmessung wurde an einem Äkta™ Purifier System durchgeführt. Mit Hilfe der analytischen Gelfiltration können Molmasse bzw. Assoziationsgrad eines nativen Proteins bestimmt werden. Für Moleküle gleichartiger Form gilt, dass das Elutionsvolumen indirekt proportional zum Logarithmus der Molmasse ist. Durch Kalibrierung einer Säule mit globulären Standardproteinen kann die Molmasse eines ebenfalls globulären Proteins bestimmt werden. Für die Untersuchung und Reinigung der einzelnen Proteine wurde die analytische Gelfiltrationssäule Superdex 75 HR 10/300 verwendet, die gemäß ihrer Polymermatrix einen optimalen Auflösungsbereich von 3 bis 75 kDa bietet. Das Säulengesamtvolumen V_c beträgt 24 ml. Das Totvolumen V_0 wurde mit Hilfe eines Eichlaufes mit Blue Dextran initial auf 7,05 ml ermittelt. Die Säule wurde zunächst bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit 2 CV Laufpuffer (PBS, alternativ mit 150-500 mM NaCl) äquilibriert. Danach wurde sie mit min. drei der folgenden Standardproteinen zur Erstellung einer Eichgerade kalibriert: BSA (66 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Myoglobin (17,6 kDa) und Lysozym (14,6 kDa). Für jedes Eichprotein wurde das Elutionsvolumen V_R bestimmt und nach Gleichung (1) der Verteilungskoeffizient K_{av} berechnet. Durch Auftragung des K_{av} -Wertes gegen den Logarithmus der Molmasse des

entsprechenden Eichproteins wurde eine Eichgerade erstellt, mit welcher die apparenten Molmassen der unterschiedlichen zu analysierenden Proteine errechnet werden konnten.

$$K_{av} = \frac{V_R - V_0}{V_c - V_0} \quad \text{Gleichung 1}$$

Zur Reinigung der rekombinanten, vorab affinitätschromatographisch gereinigten Proteine, wurde eine Flussrate von 0,19-0,25 ml/min gewählt und Fraktionen von 0,5-1,5ml gesammelt, welche anschließend durch Coomassie oder Silberfärbung auf ihren Reinheitsgrad hin untersucht wurden. Nach Äquilibrierung mit 1 CV Wasser konnte die Säule dann in 20% Ethanol bei 4°C gelagert werden.

2.4.2.4 Entsalzung von Proteinlösungen an PD-10 Säulen

Zum Entsalzen kleiner Volumina wurden PD-10-Fertigsäulen (Betthöhe 5 cm, Ø 1,5 cm) der Firmen Pharmacia oder Pierce eingesetzt. Der Trennbereich des Sephadex G-25 Materials lag zwischen 1.000 und 5.000 Da, sodass niedermolekulare Substanzen wie etwa Salze und Cofaktoren zurückgehalten wurden, während Proteine mit dem Ausschlussvolumen eluiert wurden. Die Äquilibrierung der Säule erfolgte mit 30 ml des jeweiligen Puffers. 2,5 ml Probe wurden auf die Säule aufgetragen und abgewartet, bis sie vollständig in das Gelbett eingelaufen waren. Anschließend wurde mit 3,5 ml des jeweiligen Puffers das entsalzte Protein eluiert. Kleinere Proteinproben (0,5–1,0 ml) wurden ebenso bis zum Einziehen in das Gelbett appliziert, um dann mit Puffer das Volumen auf 2,5 ml zu ergänzen. Anschließend konnte mit 2,0 bzw. 3,0 ml Puffer eluiert werden. Die Entsalzung wurde bei gereinigten Proteinfractionen angewandt, sofern diese für Zellkulturexperimente benötigt wurden, um durch den zusätzlichen Reinigungsschritt noch weitere aus der Expression in *E. coli* verbleibende Endotoxine abzutrennen.

2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese - native Gelelektrophorese

Die Analyse der Proteinproduktion sowie der nachfolgenden Reinigung erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) unter Verwendung des Puffersystems von Fling & Gregerson (1986). Die elektrophoretische Mobilität der durch Anlagerung von SDS-Molekülen negativ geladenen Proteine wird durch den Molekularsiebeffekt des Polyacrylamid-Gels bestimmt und verhält sich annähernd umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molmasse des Proteins. Im Rahmen der

vorliegenden Arbeit wurden vorwiegend 12,5%ige oder 15%ige SDS-Polyacrylamidtrenngelle verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte in der Regel in Trenngelen mit einer Größe von 8 x 5,5 cm bei einer Dicke von 0,75 mm. Die Trenngelmischung mit einem Gesamtvolumen von 5 ml bestand aus 1,25 ml 4x Lower-Tris und einem der gewünschten Prozentigkeit des Gels entsprechendem Anteil einer 30%igen (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung. Zur Herstellung von 15%igen Gelen wurden pro Trenngel 2,5 ml Acrylamid-Stammlösung verwendet. Mit Wasser wurde zum Endvolumen von 5 ml aufgefüllt. Nach Beginn der Polymerisation durch Zugabe von 1,3 µl TEMED und 25 µl 10% (w/v) APS wurden 3,6 ml bis 4 ml der Trenngelmischung zwischen die abgedichteten Glasplatten pipettiert und mit 1 ml Isopropanol überschichtet, um Luftzutritt zu vermeiden. Nach erfolgter Polymerisation des Trenngels (ca. 30-45 min) wurde das Isopropanol abgegossen und Reste mit einem Filterpapier entfernt. Für die Herstellung der 5%igen Sammelgelmischung wurden 0,5 ml Acrylamid-Stammlösung und 0,75 ml 4x Upper-Tris mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 3 ml vermischt. Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch Zugabe von 1,5 µl TEMED und 18 µl 10% (w/v) APS initiiert. Die Lösung wurde auf das erstarrte Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen und ein Taschenformer eingesetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde das Gel in eine vertikale Elektrophoresekammer gespannt, die mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt wurde. Zur Probenvorbereitung wurden jeweils 20 µl Proteinlösung mit 5 µl 5x Auftragspuffer versetzt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Proteinmarker und Proben, bei denen geringere Volumina aufgetragen werden sollten, wurden mit ddH₂O ebenfalls auf ein Volumen von 20 µl eingestellt, mit Auftragspuffer versehen und hitzedenaturiert. In die Probenaschen des vollständig polymerisierten Gels wurden dann je 20 µl Proteinlösung pipettiert und die Elektrophorese unter Verwendung von Fling & Gregerson-Laufpuffer mit Obergrenzen von 120 V und 30 mA in Gang gesetzt. Nach ca. 2 h hatte der Bromphenolblau-Marker die untere Gelkante erreicht. Daraufhin wurde das Trenngel entnommen und für 20 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Die Proteinbanden wurden anschließend durch Schwenken in Entfärbelösung sichtbar gemacht und das Gel bis zur Trockenkonservierung in Aufbewahrungslösung bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Alternativ wurde das Gel einer Silberfärbung (2.4.4) oder einer Western-Blot Analyse (2.5.1) unterzogen. Für die native Gelelektrophorese wurden Puffer- und Auftragslösungen vergleichbar zum SDS-PAGE jedoch strikt ohne SDS verwandt. Nebst dem denaturierenden SDS wurde auch auf das reduzierende DTT im Auftragspuffer verzichtet. Alle weiteren Schritte der Elektrophorese sowie der sich anschließenden Western-Blot-Analyse erfolgte wie für den SDS-PAGE beschrieben.

2.4.4 Silberfärbung von Proteinen

Zur Visualisierung besonders niedrig konzentrierter Proteinfractionen oder von Verunreinigungen wurde die im Vergleich zur Coomassie-Färbung (Sensitivität $\sim 0,5 \mu\text{g}$ Protein) deutlich sensitivere Silberfärbung gewählt. Mit Hilfe dieser Färbemethoden können auch noch Proteinmengen von bis zu $\sim 5 \text{ ng}$ sichtbar gemacht werden. Hierzu wurde das Trenngel unmittelbar nach der Gelelektrophorese für 30 min in frischer Fixierungslösung geschwenkt. Anschließend erfolgten drei 5-minütige Waschschrte mit einer 50%igen Ethanol-Lösung. Hierauf konnte das Gel für 1 min in 40 ml einer 1x Vorbehandlungslösung ($200 \mu\text{g/ml Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) geschwenkt werden, bevor die 20-minütige Färbung in 40 ml einer frischen Silbernitratlösung (2 mg/ml in 40 ml bidestilliertem Wasser, 1% v/v 40% Formaldehyd) begann. Anschließend wurde das Gel mehrmals in bidestilliertem Wasser gewaschen, um überschüssiges Silber auszuwaschen. Das Gel konnte dann mit 40 ml der frisch hergestellten Entwicklerlösung (30 mg/ml Na_2CO_3 , 1:100 (v/v) $200 \mu\text{g/ml Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,5% (v/v) 40% Formaldehyd) versehen werden. Sobald die gewünschte Bandenintensität erreicht war, wurde die Reaktion durch die Zugabe von Stammlösung im Überschuss gestoppt. Zur Lagerung bis zur Trockenkonservierung wurde das Gel wieder in bidestilliertes Wasser überführt und im Dunklen bei RT gelagert.

2.4.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Konzentration gereinigter und dialysierter Proteinlösungen wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm unter Berücksichtigung der Eigenabsorption des entsprechenden Puffers mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes ermittelt,

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \text{Gleichung 2}$$

wobei A die Absorption bei 280 nm, ε den molaren Extinktionskoeffizienten [$\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$], c die Konzentration [mol/l] und d die Schichtdicke der Küvette [cm] bezeichnet. Die dazu notwendigen molaren kalkulatorischen Extinktionskoeffizienten wurden für alle Proteine mit Hilfe des Programmes ExPASy ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) errechnet. Sie sind als Summe der Absorptionsbeiträge der aromatischen Aminosäuren einer vollständig entfalteten Peptidkette definiert (Gill & von Hippel, 1989).

2.4.6 Konzentrierung von Proteinen

Für verschiedene Experimente war es notwendig, Lösungen mit hohen Proteinkonzentrationen zur Verfügung zu haben. Dazu wurde das Protein zunächst dreimal gegen den gewünschten Puffer dialysiert und die Lösung mittels einer Konzentratoreinheit (4 ml oder 15 ml) mit einer geeigneten Ausschlussgröße durch Zentrifugation (4°C, 3.000 g) auf ein der jeweiligen Konzentration entsprechendes Volumen eingengt. Die Proteinlösung wurde dann in ein geeignetes Reaktionsgefäß überführt, eventuell aggregiert vorliegendes Protein durch einen Zentrifugationsschritt (Eppendorf-Zentrifuge, 4°C, 20 min, 14.000 rpm) präzipitiert und der Überstand abgenommen. Die Konzentration einer 1:10 verdünnten Probe der Lösung wurde dann durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Ebenso wurde der Proteingehalt des Filtrats untersucht. Durch präparative SAC erhaltene Proteine lagen in großen Volumina (20-50 ml) vor und wurde daher mit Hilfe eines 15 ml Konzentrators auf 5–10 mg/ml konzentriert. War die erwünschte Proteinkonzentration eingestellt, wurde die Lösung sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4.7 Trichloressigsäure-Fällung von Proteinen

Um auch besonders niedrig konzentrierte Proteine durch Coomassiefärbung bzw. Western-Blot sichtbar zu machen, wurde vor dem Gelauftrag für die SDS-PAGE Gelelektrophorese eine Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Hierfür wurde die Proteinlösung mit exakt demselben Volumen einer 20% TCA Lösung versetzt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das gefällte Protein in einem Zentrifugationsschritt (4°C, 15 min, 14.000 rpm) präzipitiert und der Überstand abgenommen. Nach Zugabe von 300 µl Aceton p.a. wurde erneut für 5 min zentrifugiert (4°C, 14.000 rpm), wobei auf exakt die gleiche Ausrichtung des Reaktionsgefäßes wie im ersten Schritt geachtet wurde. Im Anschluss wurde erneut der Überstand entfernt und das Protein in 20 µl PBS sowie 10-100 µl 5x SDS Auftragspuffer aufgenommen. Sofern das Protein nicht unmittelbar gelelektrophoretisch analysiert wurde, erfolgte die Lagerung bei -20°C.

2.4.8 Protein Sequenzierung – Edman-Abbau

TIR-TcpC wurden nach der Aufreinigung Tris-Glyzin-frei auf PVDF Membran geblottet und zur Bestimmung der N-terminalen Peptidsequenz versandt. Die Analyse mittels Edman-

Abbau wurde von der SeqLab GmbH in Göttingen durchgeführt. Der N-Terminus dieser Variante wurde während der Expression in *E. coli* nicht modifiziert.

2.4.9 Pull-Down Assays an Streptavidin Agarose / Strep-Tactin Macrorep Beads

Zum direkten Nachweis der Wechselwirkung rekombinanter *Strep*-tag II Fusionsproteine (= "Bait Proteine") mit Kandidatenproteinen aus zellulären Extrakten (= "Prey Proteine") wurden Pull-Down Assays an Streptavidin Agarose bzw. Strep-Tactin Macrorep Beads (Methylacrylat als inerte Matrix) durchgeführt. Diese Säulenmaterialien zeigten im Gegensatz zu Sepharose-Beads keine oder stark reduzierte unspezifische Bindung der hydrophoben TIR-Domänen, welche in den Assays analysiert wurden. Es wurden der Biotinylated Protein Interaction Kit der Firma Pierce mit sowie Macrorep Beads der Firma IBA verwandt.

70-80 µl der Streptavidin Beads wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze vorsichtig resuspendiert und auf filterbesetzte Säulen geladen. Alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 1.250 g (1-2 min) in einer Eppendorf-Zentrifuge durchgeführt. Zunächst erfolgten drei Waschschrte mit Binding Buffer (25 mM Tris/HCl, pH 7,2, 150 mM NaCl). Anschließend wurden die gewaschenen Beads in der nun verschlossenen Säule mit 50-100 µg rekombinatem, *Strep*-tag II tragendem Protein (in PBS) beladen. Das Minimalvolumen an Bait Protein Lösung betrug stets 100 µl, um sicherzustellen, das die Beads stets flüssigkeitsbedeckt waren. Als Kontrolle wurden Säulen nur mit PBS Puffer beladen, um diese später für die Analyse unspezifischer Bindung des Prey Proteines an das Säulenmaterial zur Verfügung zu haben. Nach 1,5 h Inkubation auf einer rotierenden Plattform (4°C) wurde nicht gebundenes Protein eluiert und das Eluat zur weiteren Analyse durch SDS-PAGE bei -20°C aufbewahrt. Sofern der Durchlauf hohe Mengen an rekombinatem Protein aufwies, wurde die Prozedur in SAC-Puffer (pH 8,0-8,8) wiederholt, da dies die optimalen Bedingungen für die Bindung der Streptavidin-gekoppelten Beads mit dem tag der rekombinanten Proteine bot. Hierauf wurden die Beads 2 x mit 250µl Biotin Blockierungsreagens (5 min, RT) versehen. Es folgten erneut drei Waschschrte mit Binding Buffer, bevor die Säulen wieder verschlossen und mit 300-500 µl der zu analysierenden HEK293T-, BMM- bzw RAW Zelllysate in PBS (500 µg-100 mg Totalprotein, ggf. in PBS mit Protease-Inhibitor) beladen werden konnten.

Diese HEK293T-Lysate wurden 24-48 h nach Transfektion gewonnen und nach mehreren Waschschrten mit PBS in 1 ml (pro 10⁶ Zellen) NP40-Puffer aufgenommen, welcher für

gewöhnlich 0,125% (w/v) N-Octyl α -D Glucopyranosid enthielt. Die Zellen wurden dann mechanisch auf Eis in einem Glasdouncer homogenisiert und im Anschluss sonifiziert (3 Pulsraten, 10 sec, 50% Intensität). Die Lysate wurden hierauf bei -80°C gelagert und vor Benutzung ü. N. bei 4°C gegen das 100-200fache Volumen an PBS dialysiert, um störende Detergentien abzutrennen.

Zur weiteren Optimierung wurden auch Interaktionsversuche mit $10\ \mu\text{l}$ RPMI bzw. Protease-Inhibitoren (1:100) angesetzt, wodurch während der Interaktion zwischen Protein und Lysatproteinen Kofaktoren angeboten und die eventuelle proteolytische Aktivität von HEK-Zellproteasen sowie die des Bait Proteines im Falle von TcpB unterbunden werden sollte. Nach 1-stündiger Inkubation bei 4°C und 30 min bei RT (rotierende Plattform) wurden nicht gebundene Proteine eluiert. Die nachfolgenden drei Waschschrte wurden mit PBS oder TBS zur Betrachtung schwacher Interaktionen bzw. mit Acetat-Puffer (0,025-0,5 M NaCl, pH 5,0) durchgeführt, womit auch starke Protein-Protein Wechselwirkungen sichtbar gemacht werden konnten, die selbst bei hohen Salzkonzentrationen beständig sind. Proben der Waschelutionsfraktionen wurden bei -20°C zur weiteren Analyse via SDS-PAGE aufbewahrt, um bei zu hohen Verlusten ggf. eine Optimierung der Waschschrte vornehmen zu können. Nun konnte die Elution der Prey Proteine stattfinden, die nach wie vor direkt an das auf dem Säulenmaterial immobilisierte *Strep*-tag II Bait Protein gebunden waren. Dies erfolgte in zwei konsekutiven Schritten mit je $250\ \mu\text{l}$ Elution Buffer (pH 2,8). Vor der Elution wurde in alle Eppendorf Gefäße $20\ \mu\text{l}$ einer 1-2 M Tris/HCl pH 8,0 Lösung vorgelegt, welche den sauren pH unmittelbar abpuffern sollte um die Analyt-Proteine zu schonen. Diese Eluate wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert, um spezifische Interaktionspartner zu definieren. Zuletzt wurden die in der Säule verbleibenden Beads in 5x Lämmli-*DTT* Auftragsbuffer gelöst, um noch gebundene Proteine ebenfalls visualisieren zu können.

2.4.10 Aufreinigung von myc- oder flag-gelabelten Proteinen und *in vitro* Verdau

Alle in dieser Arbeit verwandten myc- oder flag-gelabelten Proteine wurden von Susanne Dürr durch Transfektion in HEK293T Zellen gewonnen. Die Zellen wurden nach 48h auf Eis durch Resuspendierung mit eiskaltem PBS geerntet, mehrmals gewaschen und im Anschluss in NP40-Puffer ($500\ \mu\text{l}$ /Pellet) aufgeschlossen. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Lysate zweimal zentrifugiert ($13.000\ \text{rpm}$, 4°C , 15 min) und der Überstand jeweils in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden je 50 - $100\ \mu\text{l}$ Agarose-Beads (myc-

bzw. flag-Antikörper gekoppelt), welche zuvor in NP-40 Puffer äquilibriert wurden, vorsichtig zu den jeweiligen Proben gegeben und die Ansätze ü.N. bei 4°C auf einem Mixing Rotor durchmischt. Am folgenden Tag wurden die Beads mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze vorsichtig resuspendiert und wie bei Pull-Down-Assays auf filterbesetzte Säulen geladen um nicht-gebundene zelluläre Proteine zunächst durch Zentrifugation abzutrennen. Dieser und alle nachfolgenden Zentrifugationsschritte wurden bei 1.250g (1-2 min) in einer Eppendorf-Zentrifuge durchgeführt. Nach drei Waschschritten mit PBS bzw. TBS erfolgte die Elution rekombinanter myc- bzw. flag-gelabelter Proteine durch zwei konsekutiven Elutionsschritte mit je 250 µl Elution Buffer (pH 2,8). Vor der Elution wurde in alle Eppendorf Gefäße 20 µl einer 1-2 M Tris/HCl pH 8,0 Lösung vorgelegt, welche den sauren pH unmittelbar abpuffern sollte um die erhaltenen Proteine zu schonen. Diese Eluate wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert und Fraktionen mit den gewünschten aufgereinigten Proteinen für *in vitro* Versuche verwandt.

Zur Durchführung eines *in vitro* Verdau wurden die durch Transfektion gewonnenen Proteine mittels Western-Blot Analyse und Coomassie-Färbung auf Menge und Reinheit hin überprüft. Im Anschluss wurden die jeweiligen Proteine wenn nötig auf eine Konzentration von 0,8-1 mg/ml eingestellt. Hierauf wurden je 20-50 µg des jeweiligen Proteines in unterschiedlichen Kombinationen in PBS mit je 50 µg rekombinatem TcpB zusammengeführt. Zusätzlich enthielt jeder Ansatz 10 µl RPMI, um Kofaktoren für enzymatische Reaktionen anzubieten. Nebst den Proteinkombinationen wurden auch die Einzelkomponenten stets in einem eigenen Reaktionsgefäß im Verdau als Kontrolle mitgeführt. Alle Ansätze wurden auf das gleiche Volumen eingestellt und im Anschluss für 1 h bei 37°C (300 rpm) inkubiert. Die Proben konnten dann unmittelbar mit Lämmli-DTT (5x) versetzt und mittels Western-Blot und Coomassie-Färbung auf Spaltprodukte der Ausgangsproteine hin untersucht werden.

2.4.11 Caspase-Assay

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Caspase-1 wurden infizierte bzw. stimulierte Zellen am Endpunkt des Experimentes zunächst mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend für 5 min trypsiniert. Nach Zentrifugation (7.500 rpm, 5 min, RT, ebenso bei allen weiteren Schritten) wurde das Pellet erneut mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Dieser Schritt zur Entfernung verbleibender Spuren an Trypsin wurden noch zwei weitere Male wiederholt. Im Anschluss wurde das Pellet mit NP-40 Lyse Puffer ohne Protease-

Inhibitoren aufgeschlossen (100 μ l pro 10^6 Zellen) und 10 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden dann gevortext und sofort zentrifugiert (13.000 rpm, 4°C, 5 min). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, auf Eis aufbewahrt und die Aktivität der Caspase-1 möglichst ohne Verzögerung gemessen. Für den Caspase-Assay selbst wurden in eine 96-well Fluoreszenzmikrotiterplatte zunächst 90 μ l MDB-Puffer mit frisch zugefügtem Caspase-1 Substrat (YVAD-AMC) vorgelegt. Dann konnten je 10 μ l der Proben zugefügt werden, was jeweils in Triplikaten erfolgte, um Messungenauigkeiten vorzubeugen. Stets wurde auch eine Wasserkontrolle, eine Puffer-Blank Kontrolle sowie eine Kontrolle des nicht-belegten Plattenhintergrundes in die Belegung miteinbezogen. Die Platte wurde dann 1 h bei 37°C im Dunklen inkubiert, um den Endpunkt der Substratumsetzung abzuwarten. Anschließend wurde die Fluoreszenz (Anregung 485 nm, Emission 538 nm) vermessen und die erhaltenen Werte auf denjenigen der jeweiligen Mock-Kontrolle (= 1) normalisiert.

2.4.12 Protease-Assay

Zur Bestimmung der proteolytischen Aktivität aufgereinigter Proteine, wurde der "Protease Fluorescent Detection Kit" der Firma Sigma eingesetzt. Alle Proteine lagen in einer Konzentration von 5-100 μ g in PBS vor. Eventuelle Rückstände von Protease-Inhibitoren wurden durch die Entsalzung an PD-10 Säulen entfernt (vgl. 2.4.2.4). Der Assay wurde exakt nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei die Proteine stets 2 h mit dem FITC-gelabeltem Substrat inkubiert wurden. Trypsin (PAA, Zellkultur-Reinheit) diente als Kontrollprotein, sodass anhand einer Verdünnungsreihe dieser Serin-Protease auch eine Standard-Eichkurve der Trypsin-Protease-Aktivität (s. Sigma-Protokoll) erstellt werden konnte. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt in einer schwarzen 96-well Platte (Anregungswellenlänge: 485 nm, Emissionswellenlänge: 535 nm). Die erhaltenen Werte wurden auf den Wert der ddH₂O-Probe (= 1) normalisiert.

2.5 Immunchemische Methoden – Western Blotting

2.5.1 Western Blotting

Für den immunchemischen Nachweis eines Proteins in einem Proteingemisch wurde die Methode des *Semidry Western Blotting* verwendet. Das Proteingemisch wird dabei zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend durch Elektrotransfer auf eine Membran

übertragen und das gewünschte Protein in einem immunochemischen Verfahren selektiv durch spezifische Antikörper markiert und hierauf visualisiert.

Die SDS-PAGE wurde wie in Abschnitt 2.4.3 beschrieben durchgeführt und das Trenngel kurz in Semidry Transferpuffer geschwenkt. Der Elektrotransfer erfolgte für ein immunochemisches Nachweisverfahren auf eine Nitrozellulose- bzw. für die N-terminale Proteinsequenzierung auf eine Immobilon-P-Membran. Für den Elektrotransfer wurden zwei Blatt Whatman-Filterpapier mit Transferpuffer getränkt und möglichst ohne Einschluss von Luftblasen auf die Edelstahl-Kathodenplatte der Elektroblotapparatur gelegt. Darauf wurden die mit Transferpuffer benetzte Membran gefolgt vom Trenngel platziert und hierauf weitere zwei Blatt Puffer-getränktes Whatman-Filterpapier gestapelt. Nach Aufsetzen der Graphit-Anodenplatte wurde dann für 1,3 -2 h eine konstante Stromstärke von 25 mA (ca. 1 mA/cm²) angelegt. Die Nitrozellulose-Membran wurde nach dem Elektrotransfer für 15 min in 20 ml PBS/T 0,1% Tween bzw. TBS/T 0,05% Tween geschwenkt.

Zur selektiven Anfärbung der rekombinanten Proteine die das *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel trugen, wurde die Membran im Anschluss mit Biotin Blocking Buffer (1:1.000 in PBS/T) inkubiert, bevor für eine Stunde ein Strep-Tactin-HRP Antikörper (1:10.000-1:50.000) zugefügt werden konnte. Im Anschluss erfolgten zwei 5-10-minütige Waschschrte mit PBS/T, dann zwei Schritte mit PBS. In den meisten Fällen wurde jedoch eine Färbung durch zweistufige Antikörperbindung erreicht. Hierzu wurde die Membran zunächst für zwei Stunden (RT) oder ü.N. (4°C) in TBS/T 5% Milchpulver geblockt. Danach wurde der Erstantikörper in TBS/T 5% Milch (5% BSA im Falle des Caspase-1 p10 Antikörpers bzw. bei TcpC-Antiseren PBS/T (murin) bzw. TBS/T 5% Goat Serum (rabbit) zusammen mit der Membran inkubiert (1,5 h bei RT oder ü.N bei 4°C). Nach mehreren Waschschrten mit TBS/T wurde ein geeigneter Sekundäantikörper (HRP-Konjugat) für 1 h mit der Membran koinkubiert (Konzentration: 1:5.000-1:7.000, in TBS/T, 5% Milch). Zuletzt wurden nicht gebundene Antikörper sowie Milchbestandteile durch mehrere Waschschrte (TBS/T, dann TBS) entfernt.

Die Visualisierung der Proteinbanden auf der Membran erfolgten durch die Zugabe des HRP-chemolumineszenten Agens Western Lightning™ (PerkinElmer). Die Membran wurde in einer lichtgeschützten Kammer platziert sodass Röntgenfilme bis zum Erreichen der gewünschten Bandenintensität in Dunkelheit belichtet und anschließend entwickelt werden konnten.

2.5.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - ELISA

Zur Bestimmung von Zytokinkonzentrationen in Zellkulturüberständen kamen ausschliesslich DuoSet ELISA-Kits der Firma R&D Systems zum Einsatz. Der Assay wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei die zu analysierenden Proben direkt aufgetragen oder bis zu 10fach verdünnt wurden. Als Substratlösung diente TMB Substrat (BD OptEIA™). Nach abstoppen der chromogenen Reaktion wurde die optische Dichte der Proben sowie einer Standardverdünnungsreihe in einem TECAN-Reader eingelesen (Anregung: 450 nm, Emission: 570 nm). Die Werte wurden anhand der Standardkurve quantifiziert und mit Hilfe des Programms SigmaPlot graphisch dargestellt.

2.6 Infektions- Stimations- und Wachstumsassays, Zellkultur

2.6.1 Gewinnung primärer Knochenmarkszellen

Aus Vorläuferzellen des roten Knochenmarkes, welches bei Mäusen sowohl aus Ober- und Unterschenkelknochen als auch aus Ober- und Unterarmknochen gewonnen werden kann, wurden unter Zugabe von Wachstumsfaktoren primäre Makrophagen bzw. dendritische Zellen (DCs) differenziert. Mäuse im Alter von 10-16 Wochen, die unter Pathogen-freien Bedingungen im Tierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München gehalten wurden, wurden durch Genickbruch getötet und mit Ethanol (70%) desinfiziert, bevor die Arm- und Beinknochen abpräpariert wurden. Erst unter sterilen Bedingungen wurden die Knochen eröffnet und das Knochenmark durch mehrmaliges Spülen (DMEM für Makrophagen, RPMI für DCs) in eine Einzelzellsuspension überführt. Nach Zentrifugation (RT, 1.200 rpm, 5 min) erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch Zugabe von 1,5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer / Maus (5 min, RT). Nach einem Wasch- und Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in Medium aufgenommen (DMEM oder RPMI mit 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, 0.1% 2-Mercaptoethanol), welchem zuvor je 10% (v/v) M-CSF (Makrophagen) bzw. 10% GM-CSF (DCs) zugesetzt worden waren. Die Zellen wurden ü. N. bei 37°C im Inkubator in unbeschichteten Platten kultiviert, bevor am Folgetag die nicht-adhärenten Zellen zu je $\sim 5 \times 10^6$ Zellen / 10 cm Platte (beschichtet bei Makrophagen) ausgesät wurden (10ml Endvolumen). Nach drei Tagen und bei Makrophagen ggf. zusätzlich nach fünf Tagen wurden die Zellen abermals mit 10 ml Medium (+ 10%

Wachstumsfaktor) gefüttert. Makrophagen wurden am sechsten Tag nach Entnahme mit Accutase (1:4 verdünnt in PBS) von den Platten gelöst, gewaschen und gezählt und für Experimente am Tag sieben ausgesät. DCs wurden am Tag sechs oder sieben durch mehrmaliges Resuspendieren mit RPMI von den Platten gespült, gewaschen und unmittelbar in der gewünschten Konzentration für Versuche eingesetzt.

2.6.2 Infektion mit uropathogenen *E. colis* und Restimulationsexperimente

Knochenmarkszellen, RAW264.7 Makrophagen oder HCV29 Zellen wurden zur Infektion in 6-well Platten in einer Anzahl zwischen $1,5 \times 10^6$ und $2,0 \times 10^6$ /well in DMEM (primäre Makrophagen) oder RPMI-1640 (5% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, sowie mit 0,1% 2-Mercaptoethanol) ausgesät. Zur physikalischen Separierung der Zellen von im Anschluss zur Infektion eingesetzten UPECs wurden in speziellen Fällen Transwell-Platten mit einem cut-off von $0,4 \mu\text{m}$ verwandt. Unmittelbar vor Durchführung des Experimentes wurden die Zellen gewaschen und in Infektionsmedium aufgenommen. Dieses enthielt nur 1-5% FCS, um die Oponisierung der Bakterien zu minimieren. Im Falle der HCV29 Zelllinie wurde der pH des Mediums in Spezialfällen auf 5,8-6,4 angesäuert. Alle Bakterienstämme wurden ü.N. als Vorkultur bei 30°C (180 rpm) bzw. 37°C (90 rpm) in entsprechenden Antibiotika angezogen. Sollten Stämme, die induzierbare Plasmide tragen für die Infektion eingesetzt werden, wurde am folgenden Morgen eine 1 ml Kultur mit entsprechenden Antibiotika mit den Erregern 1:50 angeimpft und bis zum Erreichen einer $\text{OD}_{600} = 0,5$ bei 30°C geschüttelt. Hierauf erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von $200 \mu\text{g/l}$ aTc. Die Temperatur wurde dann auf 25°C abgesenkt und während 2,5 h konstant für eine optimale Proteinexpression belassen. Hierauf wurde für alle Stämme die Erregerzahl eingestellt. Als Richtlinie für die OD Einstellung für CFT073 und seinen KO Varianten galt die Annahme: $\text{OD}_{600} = 1 \approx 8 \times 10^8$ Zellen/ml. Die Zellen konnten dann mit MOIs von üblicherweise 0,001-1 mit den entsprechenden Erregern für 3–5,5 h infiziert werden. Falls nötig, wurde während der Infektion aTc im Ansatz belassen. Stets wurden parallel zum Beginn des Experimentes Kontrollverdünnungen ausplattiert, welche rechnerisch je 100 Erreger enthalten sollten. Sofern die Kolonienanzahl am folgenden Tag um mehr als 10% von diesem Wert abwich, wurde das Experiment nicht weiter ausgewertet. Um die Sekretion von TcpC zu unterbinden, wurde ggf. zu Beginn des Experimentes 26-52 μM Phenylalanin-Arginin- β -Naphthylamid (gelöst in ddH₂O) zugegeben. Um das inhibitorische Potential sekretierten TcpCs zu

bestimmen, wurden Zellkulturüberstände (üblicherweise 2 ml) am Ende des Experimentes bei -20°C aufbewahrt. Im Anschluss wurden diese Überstände zum einen filtriert ($0,4\ \mu\text{m}$ Filter), wodurch ausgeschlossen werden sollte, dass sich noch restliche Bakterienbestandteile im Medium befinden. Darüber hinaus wurden Proteinkomponenten in den Überständen teils hitzeinaktiviert (10 min, 95°C), bevor mit jeweils 0,5-1 ml erneut $2,0 \times 10^6$ RAW267.4 Zellen stimuliert wurden. Sollte im Anschluss die intrazelluläre Erregerlast bestimmt werden, wurde der Zellkultur-Überstand vorsichtig abgenommen und die Zellen für 10-15 min auf Eis mit einer Gentamicinlösung ($50\ \mu\text{g/ml}$ in PBS) behandelt. Nach drei Waschschritten mit PBS wurde das verbleibende Zell-Bakterienpellet in PBS aufgenommen und Verdünnungsserien ausplattiert. Zusätzlich wurde der mehrfach verdünnte Überstand sowie nicht Gentamicin-behandelte Kontrollen auf LB-Agar ausgestrichen, um die Gesamterregerlast bestimmen zu können. Nach Inkubation bei 37°C ü.N. wurde die Kolonienzahl ermittelt und graphisch ausgewertet. Alternativ wurde das Pellet – auch unabhängig vom vorangehenden Gentamicinschritt – für Caspase-Assays oder für Western-Blot Analysen in NP40- oder RIPA-Puffer aufgenommen, um zelluläre oder bakterielle Protein nachweisen zu können.

2.6.3 Stimulierungsassays: TLR-Stimulation, Inflammasom-Aktivierung und Induktion der TcpC Produktion in CFT073

Sollten Zellen in Gegenwart von TIR-TcpC mit TLR-Liganden oder Inflammasom-Aktivatoren stimuliert werden, wurden am Vortag $1,5 \times 10^6$ bis $2,0 \times 10^6$ /well in DMEM oder RPMI (10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, 0.1% 2-Mercaptoethanol) ausgesät. Nach einem Mediumwechsel (Medium wie am Vortag oder serumfreies Opti-MEM-Medium) konnten die Zellen mit frisch eingestelltem, möglichst Endotoxin-freiem Protein stimuliert werden. Die TLR-Liganden wurden entweder zeitgleich zur Proteinstimulation, oder 2 h nach Vorinkubation mit Protein nach drei Waschschritten mit PBS zugefügt und das Experiment für weitere drei Stunden fortgeführt. Anschließend wurden die Zellen nach Abnahme der Überstände 10 min mit Trypsin behandelt ($12,5\ \text{mg}/500\ \mu\text{l}$), um an der Oberfläche gebundenes TIR-TcpC zu verdauen. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Zellen mit RIPA-Puffer aufgeschlossen ($100\ \mu\text{l}/1 \times 10^6$ Zellen) und die Lysate für WestenBlot Analysen eingesetzt. Für Experimente, bei denen die Aufnahme von TIR-TcpC in die Wirtszelle inhibiert werden sollte, wurde 30 min vor der Stimulation mit rekombinantem Protein 10 mM Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) zu den Zellen gegeben. Bei der Stimulation des

Inflammasoms erfolgt die Zugabe stimulierender Agenzien (Protein oder reinstes LPS und ATP) zeitgleich. Hierbei wurde jedoch eine kürzere Kinetik gewählt und das Experiment im Zeitraum von 15 min bis 3 h gestoppt. Hierzu wurden, wie bei TLR-Stimulationsversuchen, zunächst die Überstände für ELISA-Experiment oder zur TCA-Fällung mit anschließender Western-Blot Analyse abgenommen und die Zellen dann in geeignetem Lyse-Puffer aufgeschlossen, um Caspase-Assays oder Western-Blot Versuche anzuschließen. Zur Induktion der TcpC Expression wurden alle benötigten Stämme nach einer ü.N. Vorkultur bei 30°C angezüchtet, bis sie eine optische Dichte $OD_{600} = 0,5$ erreichten. 2×10^6 bzw. alternativ 1×10^7 Bakterien wurden dann in RPMI Medium inokuliert, welches alternativ auf pH 5,0 angesäuert wurde oder mit am Vortag ausgesäten RAW264.7 Makrophagen (2.0×10^6 /well in RPMI 10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, 0.1% 2-Mercaptoethanol, Antibiotika und FCS vor Infektion durch mehrere Waschschriffe entfernt) koinkubiert. Die Stimulierung der TcpC-Expression erfolgte dann im Zellkultur-Brutschrank für 4,5-5 h. Die Gesamtbakterienlast wurde am Ende des Experimentes mittels Messung der optischen Dichte (OD_{600}) für alle Ansätze photometrisch ermittelt und die Überstände anschließend mittels TCA-Fällung (vgl. 2.4.7) 50fach aufkonzentriert, wobei Wachstumsunterschiede hierbei ggf. ausgeglichen wurden. Die verbleibenden eukaryontischen Zellen konnten in NP-40-Puffer ($50 \mu\text{l}/1,0 \times 10^6$ Zellen) lysiert und anschließend wie die Überstände mittels Western-Blot analysiert werden.

2.6.4 Wachstumsassays mit uropathogen und apathogen *E. coli* Stämmen

Um das Wachstumsverhalten uropathogener *E. coli* Stämme in Anwesenheit von murinem IL-1 β zu analysieren, wurden je 1×10^5 Bakterien in 6-well Platten mit 2 ml RPMI (0 oder 5% FCS) ausgesät. Zur Kontrolle wurden die Stämme *E. coli* CFT073, CFT073 *tcpC::kan* und BL21-Codon Plus®-RIL eingesetzt. Die einzelnen Stämme wurden mit aufsteigenden Mengen mIL-1 β (Sigma oder Eigenproduktion) bzw. IL-1ra (480-RM, Sigma) stimuliert und unter Zellkulturbedingungen für 3 h inkubiert. Alle 20-30 min wurden die Kulturgefäße leicht geschwenkt. Am Ende des Experimentes wurde die Bakterienlösung gut resuspendiert und eine Verdünnungsserie auf LB-Agar ausplattiert, um nach Inkubation bei 37°C am Folgetag die Kolonienzahl bestimmen zu können. Bereits zu Beginn des Experimentes wurden für jeden Stamm Kontrollverdünnungen ausplattiert, welche rechnerisch je 100 Bakterien enthalten sollten. Sofern die Kolonienanzahl am folgenden Tag um mehr als 10% von diesem Wert abwich, wurde das Experiment nicht weiter ausgewertet.

2.7 Konfokalmikroskopie - Lebendzell Tetracystein-tag Detektion mittels der TC-FlAsH™ Technologie

Um die Sekretion von TcpC in Echtzeit beobachten zu können, wurden TcpC-Varianten hergestellt, welche ein C-terminales Tetracysteine- (TC) - auch FlAsH-tag genannt - tragen. Dieses tag, bestehend aus den zentralen Aminosäuren Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys, bindet mit je zwei seiner Thiolat-Anionen der Cystein-Reste an die Arsen Moleküle des zellpermeablen Farbstoffs FlAsH-EDT₂ ("*Fluorescein arsenical hairpin binder*" komplexiert mit (1,2-Ethandithiol)₂), wodurch dieser FITC-abgeleitete Farbstoff in einen fluoreszierenden Zustand gebracht wird und somit die Produktion TC-tag markierter Proteine in Anwesenheit von FlAsH-EDT₂ *in vitro* live analysiert werden kann. Für fluoreszenzmikroskopische Experimente wurden *E. coli* CFT073 *tcpC::kan* (KO) sowie CFT073 *tcpC::kan* pACYC184-TcpC-FlAsH (pFlAsH-TcpC, medium copy) oder CFT073 *tcpC::kan* pASK-IBA3-FlAsH (pFlAsH-TcpC hc) ü.N. bei 30°C in LB-Medium mit geeigneten Antibiotika angezüchtet (stets 200 rpm). Die Bakterien wurden am folgenden Tag in 1 ml LB Medium mit entsprechender Antibiose bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ = 0,5 bei 25°C angezüchtet und dann weitere 1,5-2,5 h bei 30°C weiterkultiviert, wobei für Versuche mit pFlAsH-TcpC hc 200 ng/ml aTc zum Medium zugefügt wurden. Hierauf konnten die Zellen alternativ mit dem Membranfarbstoff PKH26 rot angefärbt werden, wofür je 2x10⁸ Zellen in 500 µl Färbepuffer aufgenommen wurden und dann tropfenweise in 500 µl Färbelösung (480 µl Färbepuffer + 20 µl Farbstoff) pipetiert wurden. Nach kurzer Durchmischung wurden die Zellen 3 min bei RT in der Färbelösung belassen und anschließend in 15 ml RPMI (5% FCS) überführt, zentrifugiert (1200 rpm, 5 min, RT), 3x mit PBS gewaschen und in 100-1.000 µl Opti-MEM aufgenommen. Parallel hierzu wurden 5 x 10⁴ RAW264.7 Makrophagen (je 1x10⁴ pro well in einem ibidi-Slide, ggf. mit Transwellfiltereinsatz, Porengröße 0,4 µm) 3x mit 2,3-Dimercapto-1-Propanol Waschpuffer (BAL) (250 µM in Opti-MEM) gewaschen und anschließend in 200 µl Opti-MEM, welches den FlAsH-EDT₂ Farbstoff (2,5-4 µM) enthielt aufgenommen. Alternativ wurden zusätzlich 50 µM BAL bzw. 52 µM Phenylalanin-Arginin-β-Naphtylamid zugefügt, bevor die Zellen mit MOIs von 1-10 mit den jeweiligen *E. coli* Stämmen infiziert wurden. Im Falle von pFlAsH-TcpC wurden dem Medium zudem 200 ng/ml aTc zugefügt, um die Expression von FlAsH-TcpC hc weiterhin konstant zu induzieren. Möglichst unmittelbar ab Farbstoffzugabe / Infektion wurde die Fluoreszenzentwicklung kontinuierlich über einen Zeitraum von bis zu 2 h an einem Leica SP5 Konfokalmikroskop

verfolgt. Ab 60 min wurde neuer Farbstoff (2,5 μM) zugefügt, um die Verluste durch Photobleaching auszugleichen. Die Anregungswellenlänge für den FLAsH-Farbstoff lag bei 508 nm, die Emissionsmaximum bei 528 nm. PKH26 Fluoreszenz wurde bei 551 nm angeregt und die Emission bei 567 nm beobachtet.

2.8 Computerprogramme und Datenbanken

Sequenz- und Strukturdaten von Genen und Proteinen wurden durch die Verwendung der im *world wide web* zugänglichen Datenbanken NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sowie der Protein Data Bank™ (<http://www.rcsb.org/pdb/>) erhalten. Zur Analyse von DNA-, RNA- und Proteinsequenzen (für die Vorhersage von pI, MW, Exkunktionskoeffizient, Topologie) sowie zur Planung von Oligodesoxynukleotiden für die ortsgerichtete Mutagenese und die PCR wurden die Programme Vector NTI (Invitrogen) RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) sowie diverse ExPASy Programmpakete genutzt (s. <http://expasy.org/>). Hypothetische Tertiärstrukturen wurden mit Hilfe des Programmes HMMSTR/Rosetta kalkuliert (<http://www.bioinfo.rpi.edu/~bystrc/hmmstr/server.php>). Die Visualisierung von dreidimensionalen Proteinstrukturen wurde mit Hilfe des Programmes PyMOL™ Molecular Graphics System, Version 0.99 durchgeführt (Warren L. DeLano, „The PyMol Molecular Graphics System“. DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA. <http://www.pymol.org>). Alternativ wurde der Swiss-PdbViewer Version 3.7 (Guex & Peitsch, 1997) verwandt. Gen- und Proteinalignments bekannter Kandidaten wurden mit Hilfe des Programmes ClustalW 2.0 erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>). Alignments gegen ganze Datenbankeinträge wurden mit Hilfe der Programme *blastn*, *blastp* und *genomic BLAST* (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) bzw. InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) erstellt. Die graphische Auswertung von Daten aus ELISA Experimenten sowie von Caspase-Assays oder Wachstumsexperimenten erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaPlot 10.0 (Systat Software, Inc., Abelbeck). Graphiken aus der Konfokalmikroskopie am Leica SP5 Mikroskop wurden mit Hilfe des herstellereigenen Programmes Leica LAS AF Lite visualisiert. Gele aus der SDS-PAGE Analyse wurden mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.) Version 8.0.1 unter Windows XP digitalisiert und das erhaltene Bild hinsichtlich seiner Helligkeit und des Kontrastes optimiert. Die Anordnung und Beschriftung von Graphen erfolgte mit Hilfe des Programmes Adobe Photoshop CS2 (Adobe Systems Inc.).

3 Ergebnisse

3.1 Expression essentieller rekombinanter Proteine in *E. coli*

Um die Eigenschaften bakterieller TIR-Proteine *in vitro* ohne den Einfluss weiterer Erregervirulenzfaktoren bzw. Endotoxine untersuchen zu können, wurden TcpB sowie diverse Varianten von TcpC in prokaryontische Expressionsvektoren kloniert, die resultierenden Plasmide in *E. coli* als rekombinante Proteine exprimiert, die dann in mehreren chromatographischen Schritten aufgereinigt wurden.

Die Plasmidkonstruktion erfolgte wie unter Punkt 2.2 beschrieben unter Verwendung der unter 2.1.3.2 aufgelisteten Oligodesoxynukleotide. Als Expressionsplasmide wurden die Vektoren pASK-IBA2, IBA3+, IBA5+ sowie IBA45+ genutzt, welche alle über ein *Strep*-tag II Affinitätsanhängsel von 10 Aminosäuren (AS) verfügen, welches die gezielte affinitätschromatographische Reinigung des jeweiligen Genproduktes erlaubt. Das tag ist im Falle von IBA2 und IBA3+ C-terminal, bei IBA5+ sowie IBA45+ N-terminal lokalisiert. IBA45+ verfügt zudem über ein C-terminales 6x Histidin-tag. Die Expression wird bei diesem Vektorsystem durch das *tetA*-Promotor/Operator-System ($tet^{p/o}$) kontrolliert, welches eine feinregulierbare Alternative zum *lac*-Promotor/Operator darstellt (Skerra, 1994). Die Abkopplung des *tet*-Repressorgens (*tetR*) vom $tet^{p/o}$ führt zur konstitutiven Expression von *tetR* unter der Kontrolle des *bla*-Promotors, was wiederum die Repression von *tetA* unter physiologischen Bedingungen erlaubt. Die reversible Induktion der Genexpression erfolgt durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (aTc). Als Selektionsmarker tragen die verwendeten Vektoren ein β -Lactamase kodierendes Strukturgen (*bla*), welches Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin vermittelt. Im Falle von IBA2 befindet sich zusätzlich unmittelbar vor der *multiple cloning site* eine OmpA-Signalsequenz, die die Sekretion des Expressionsproduktes in das bakterielle Periplasma vermittelt und anschließend abgespalten wird.

Als Expressionsstämme wurde *E. coli* JM83 für die periplasmatische Expression gewählt. Alle anderen Proteine wurden im *E. coli* Stamm BL21-Codon Plus®-RIL produziert. Dieser verfügt über ein tRNA-Plasmid, welches zusätzliche Kopien der *argU*, *ileY* und *leuW* tRNA Gene trägt. Die kodierten tRNAs erkennen die Arg-Codons AGA und AGG, das Ile-Codon

AUA sowie das Leu-Codon CUA. Hierdurch konnten neben dem im *Codon Usage E. coli*-untypischen Gen *tcp*, welches eine Vielzahl an seltenen Arg, Leu und Ile Resten enthält, weitere heterologe rekombinante Varianten effizient translatiert werden. Als Ausgangsmaterial für die Klonierungen diente im Falle von TcpC genomische DNA von CFT073, TcpB wurde aus dem Plasmid pCMV-TcpB-flag als Volllängenprotein (AS 1-250) umklontiert, welches von Susanne Dürr zur Verfügung gestellt wurde.

Das Volllängen TcpC (307 AS) zeigte ein hohes Maß an Zytotoxizität sowie die Tendenz zur (Auto)proteolyse bereits während der Expression, v.a. in BL21 Stämmen. Auch unter konsequentem Protease-inhibitorschutz während der Aufreinigung nach periplasmatischer Expression in JM83 konnten nur geringe Mengen an reinem TcpC (< 0,06 mg/l Kultur) gewonnen werden (Daten nicht abgebildet). Daher wurden die folgenden Varianten konstruiert und exprimiert: Das C-terminale TIR-TcpC (AS 170-307), welches die hydrophobe TIR-Domäne beginnend mit dem Box1 Motiv (s. Abbildung 3) sowie das stark basische C-terminale Fragment umfasst. Zudem wurde der auf Grund der Transmembranregion und des freien Cysteins an Position 12 schwer lösliche N-Terminus (AS 1-169) separat als Delta-TcpC exprimiert und sowohl die erhaltene Monomer- wie auch die Dimerfraktion aufgereinigt. Durch ortsgerichtete Mutagenese (s. Kapitel 2.2.9.3) wurde das Serin an Position 176 des Volllängenproteines zu Alanin ausgetauscht (TCC→GCC), um zu prüfen ob es sich bei dieser AS um ein katalytisch aktives Serin im Zentrum der katalytischen Triade einer Serin-Protease handelt. Dieses TcpC(S176A) konnte im Gegensatz zum Wildtyp TcpC wieder in hinreichender Menge für funktionelle Studien produziert und gereinigt werden. Weiterführende Mutagenese Studien an TcpC konzentrierten sich auf den basischen C-Terminus. Einerseits wurden hier sequentiell durch ortsgerichtete Mutagenese AS-Substitutionen eingeführt, welche den pI von 10,67 des C-terminalen Fragmentes (AS295-307) reduzieren. Hierdurch wurde die Variante TIR-TcpC(R297I/R305M/R307I) – kurz TIR 5.3 generiert, welche ein N-terminales *Strep*-tag II trägt. Darüber hinaus wurde eine TIR-TcpC Deletionsmutante erstellt, welcher der gesamte C-Terminus (AS 293-307) fehlt, das *Strep*-tag im Gegensatz zur Variante TIR-TcpC 5.3 jedoch C-terminal trägt. Diese Variante wurde als TIR-TcpC(Δ 293-307) oder kurz TIR-tat bezeichnet. Um über die Funktion der TIR-Domäne hinaus Aufschluss über die zentrale Region von TcpC zu gewinnen, wurde aufbauend auf TIR-TcpC eine N-terminal elongierte Version konstruiert (AS 116-307). Das resultierende Konstrukt wurde TIR-TcpC elongated benannt.

Des Weiteren wurde das CFT073 Usher-Protein PapC (vgl. Kap. 1.2) als kurze (AS 35-377) und lange (AS 77-748) Variante konstruiert, welche entsprechend als PapC-short und PapC-long bezeichnet wurden. Die Klonierung erfolgte basierend auf dem Genlocus c3590. Das Pap-Operon und hiermit auch PapC liegen im Genom von CFT073 redundant vor. Die zweite PapC Kopie findet sich am Locus c5186 und zeigt >98% Sequenzhomologie zum gewählten Variante. PapC bildet einen großen oligomeren Kanal in der äußeren Membran des Bakteriums, der es gestattet, die extrazellulären Struktur-Komponenten des Pap-Pilus effizient nach aussen zu schleusen (Thanassi *et al.*, 1998). Beide generierten Varianten enthalten je u.a. den ersten oberflächenexponierten Loop des nativen PapC-Proteines, dessen Eigenschaften funktionell v.a. im Hinblick auf die Bindungsfähigkeit von IL-1 β im Weiteren analysiert wurden.

Bei CpxP (Genlocus c4865) handelt es sich um ein CFT073 Protein, welches Bestandteil des Cpx Regulons ist. Das CpxA/CpxR Zwei-Komponenten System ist ein wichtiges Signaltransduktionsmodul in *E. coli* (Raivio & Silhavy, 1997) welches auf diverse Stresssignale reagieren kann. *CpxP* ist das am stärksten als Antwort auf alle Cpx-Signale hin induzierte Gen im Cpx-Regulon (DiGiuseppe & Silhavy, 2003). Eine seiner Aufgaben als periplasmatisches Adapterprotein liegt wohl in der Bindung von missgefalteten Proteinen des Pap-Pilus, deren proteolytische Degradation durch DegP in Anwesenheit von CpxP erleichtert wird (Isaac *et al.*, 2005).

Murines IL-1 β (mIL-1 β) wurde aus der cDNA von LPS-stimulierten RAW264.7 Makrophagen gewonnen (vgl. Kap. 2.2.4 und 2.2.5). Nach Aufreinigung wurde der Endotoxin-Gehalt des Proteines bestimmt und nahezu Endotoxin-freie Chargen für Stimulationsexperimente verwandt. Als funktionelle Kontrolle wurden 2×10^6 RAW264.7 Makrophagen/well für 3 h mit 10 bzw. 100 ng an gereinigtem IL-1 β stimuliert und im Überstand die Menge an sekretiertem TNF bestimmt.

EGFP ("*enhanced green fluorescent protein*") schliesslich wurde als Kontrollprotein für Stimulationsexperimente mit TIR-TcpC als C-terminales *Strep*-tag II Fusionsprotein exprimiert und gereinigt. Als Ausgangsplasmid diente der eukaryontische Expressionsvektor pEGFP-N1, welcher dankenderweise von Susanne Dürr zur Verfügung gestellt wurde. Das EGFP stellt im Vergleich zum GFP eine Rotshift-Mutante dar (Phe64Leu, Ser65Thr), welches intensivere Fluoreszenz als das wildtypische GFP zeigt.

<i>Protein</i>	<i>Aminosäuren</i>	<i>Molekulargewicht [kDa]</i> <i>Inkl. tag</i>	<i>Extinktionskoeffizient</i> ϵ_{280} [$\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$] <i>Nicht-reduzierend</i>	<i>Expressionsstrategie / Vektor</i>	<i>Ausbeute / l Kulturvolumen;</i> <i>Induktionszeit</i>
TIR-TcpC	170-307	17,7	35.410	Zytoplasmatisch / IBA3+	0,18 mg; 2,5-2,75 h
Delta-TcpC	1-169	21,2	43.890	Periplasmatisch / IBA2; IB / IBA3+	0,11 mg; 2,75 h
TcpC(S176A) (basierend auf TcpC)	1-307	37,6	73.800	Zytoplasmatisch / IBA3+; periplasmatisch / IBA2	0,09 mg; 2,5 h
TIR-TcpC (Δ 293-307) = TIR-tat	170-292	15,8	33.920	Zytoplasmatisch / IBA3+	0,23 mg; 2,75 h
TIR-TcpC elongated	116-307	24,2	45.380	Zytoplasmatisch / IBA3+	0,15 mg, 2,5 h
TcpB	1-250	29,2	23.950	Zytoplasmatisch / IBA3+	0,23 mg; 3 h
PapC-short	35-377	39,7	71.850	Zytoplasmatisch sowie IB / IBA3+	0,15 mg, 3,5 h
PapC-long	77-748 V701M Spontane Mutation	76,6	146.110	IB / IBA45+	0,2 mg; 3 h (nur Cobalt-Affinitätschromatographie)
mIL-1 β	1-147	18,0	18.450	Zytoplasmatisch / IBA3+	0,58 mg ; 2,75 h
EGFP	1-244	28,7	28.880	Zytoplasmatisch / IBA3+	0,37 mg; 3 h
CpxP	1-167	20,3	17.990	Periplasmatisch / IBA2	0,25 mg; 2,75 h
TIR-TcpC (R297I/ R305M/ R307I)	170-307	17,7	35.410	Zytoplasmatisch / IBA5+	0,21 mg; 2,75 h

Tabelle 3: Rekombinante Proteine – eine Übersicht. Tabellarische Auflistung aller rekombinanten Proteine, welche in dieser Arbeit exprimiert, gereinigt und analysiert wurden. Die Angabe des Molekulargewichtes umfasst die Länge des tags. Ausbeuten wurden nach abschließender Aufreinigung bestimmt und stellen gemittelte Werte über drei Expressionen dar, die Induktionszeit bezeichnet die optimale Dauer der Induktion mit Anhydrotetracyclin. Die gewählte Expressionsstrategie in Abhängigkeit des Expressionsvektor sind für alle Proteine angegeben (IB = Inclusion body). Die Aminosäureanzahl gibt an, welche AS des ursprünglichen Proteines kloniert und exprimiert wurden. TIR-TcpC(R297I/R305M/R307I) wird im Folgenden TIR 5.3 genannt.

Alle im Rahmen dieser Arbeit generierten und exprimierten Konstrukte sind unter Angabe des resultierenden rekombinanten Proteines in Tabelle 3 zusammenfassend aufgelistet. Neben den biophysikalischen Eigenschaften und der Expressionsstrategie und -dauer ist auch die Ausbeute nach Aufreinigung angegeben. Die Expression aller Konstrukte erfolgte wie unter Punkt 2.3 beschrieben. Alle Proteine mit Ausnahme der PapC-Varianten konnten in hinreichender Menge als lösliche Proteine aus dem bakteriellen Zytoplasma- bzw. Periplasmafraktion gewonnen werden. Da die lösliche Fraktion von Delta-TcpC nur einen Bruchteil der Gesamtexpression ausmachte, wurde auch diese Variante wie die PapC-Proteine wenn große Mengen benötigt wurden als Inclusion body aufgereinigt und wie in Kap. 2.4.1 beschrieben rückgefaltet. Alle Varianten wurden im ersten chromatographischen Reinigungsschritt einer Streptavidin-Affinitätschromatographie unterzogen (s. Kap. 2.4.2.1), lediglich PapC-long wurde mittels seines 6xHIS-tags durch Affinitätschromatographie an Co^{2+} -Agarose aufgereinigt (vgl. Punkt 2.4.2.2). Hierauf wurden die Proteine (mit Ausnahme von PapC-long) in einem weiteren Schritt mittels Grössenausschlusschromatographie einer weiteren Reinigung unterzogen (s. Kap. 2.4.2.3). Dieser Schritt genügte meist, um kontaminierende Proteinkomponenten abzutrennen und wurde ggf. unter Veränderung der Flussrate sowie der Salzkonzentration wiederholt und die Reinheit mittels Coomassie-Färbung bzw. Silberfärbung eines 15%igen SDS-Geles analysiert. Abschließend wurden Proteine, welche für Zellkultur-Experimente eingesetzt wurden über eine PD-10 Säule entsalzt. Hierdurch wurden noch weitere Endotoxine, die im Zuge der Expression in *E. coli* in der Proteinpräparation enthalten waren, entfernt. Eine Übersicht aller aufgereinigten für funktionelle Studien wichtigen Proteine findet sich in Abbildung 6.

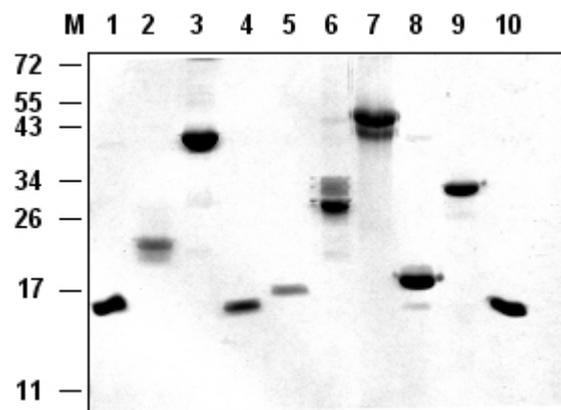


Abbildung 6: SDS-PAGE Analyse (15%) mit anschließender Coomassie-Färbung zum Vergleich der reinen im Rahmen dieser Arbeit für funktionelle Analysen eingesetzten Proteine. (M) Marker [kDa], (1) TIR-TcpC, (2) Delta-TcpC, (3) TcpC(S176A), (4) TIR-TcpC(Δ 293-307) = TIR-tat, (5) TIR-TcpC elongated, (6) TcpB, (7) PapC-short, (8) mIL-1 β , (9) EGFP, (10) TIR-TcpC(R297I/R305M/R307I) = TIR 5.3.

3.2 TcpC und TcpB beeinflussen gezielt den TLR-Signalweg und interagieren mit MyD88

3.2.1 Die Infektion mit TcpC und TcpB positiven Stämmen führt zur Modulation der Zytokinsekretion sowie zur verstärkten intrazellulären Erregerpräsenz

Zur Analyse des Einflusses des Proteines TcpC (307 AS, 36,4 kDa) während der Infektion mit CFT073 stand für diese Arbeit eine chromosomale *tcpC*-Deletionsmutante zur Verfügung. Dieser modifizierte CFT073 Stamm, von nun an bezeichnet als *tcpC::kan* (oder kurz KO), wurde am Max von Pettenkofer-Institut der LMU München von Andreas Wieser generiert und für funktionelle Studien zur Verfügung gestellt. Der Genlocus des *tcpC*-Genes, c2398, wurde hierfür durch ein Kanamycin- (Kan) Resistenzgen substituiert. Dies geschah durch eine PCR unter Verwendung eines Kanamycin-Donorplasmides (pKD4), sowie Elektroporation des erhaltenen Produktes in CFT073, welcher bereits vorab mit einem hitzesensitiven λ Red Rekombinase Vektors (pKD46) transformiert worden war. Da das PCR-Produkt neben dem Resistenzgen aus pKD4 am 5' und 3'-Terminus auch je 55 bp-lange Homologieregionen zum c2398 Gen besitzt, kam es durch die Induktion der λ Red Rekombinase zur homologen Rekombination und den Austausch des *tcpC*-Gens durch eine Kan-Kassette (Datsenko & Wanner, 2000).

Des Weiteren wurde basierend auf dem Plasmid pACYC184 (p15 *ori*, cm-Resistenz) ein Vektor konstruiert, welcher das komplette TcpC-Operon inkl. des endogenen Promotors sowie der Strukturgene c2397 und c2398 trägt. Das aus genomischer CFT073-DNA amplifizierte Operon enthielt zudem C-terminal ein m45 adenovirales tag. Die Klonierung in pACYC184 erfolgt unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Sall*I. Das resultierende Plasmid wurde als pTcpC bezeichnet und in kompetente *tcpC::kan* transformiert (s. Kap. 2.2.2). Der resultierende komplementierte Stamm wurde als *tcpC::kan* + pTcpC (kurz: KO+pTcpC) bezeichnet. Um TcpB für Funktionsexperimente einsetzen zu können, wurde das heterologe Gen aus *B. melitensis* auf dem induzierbaren Plasmid pASK-IBA3+TcpB in *tcpC::kan* transformiert. Der resultierende Stamm wurde *tcpC::kan* + piTcpB (kurz: KO+iTcpB) benannt.

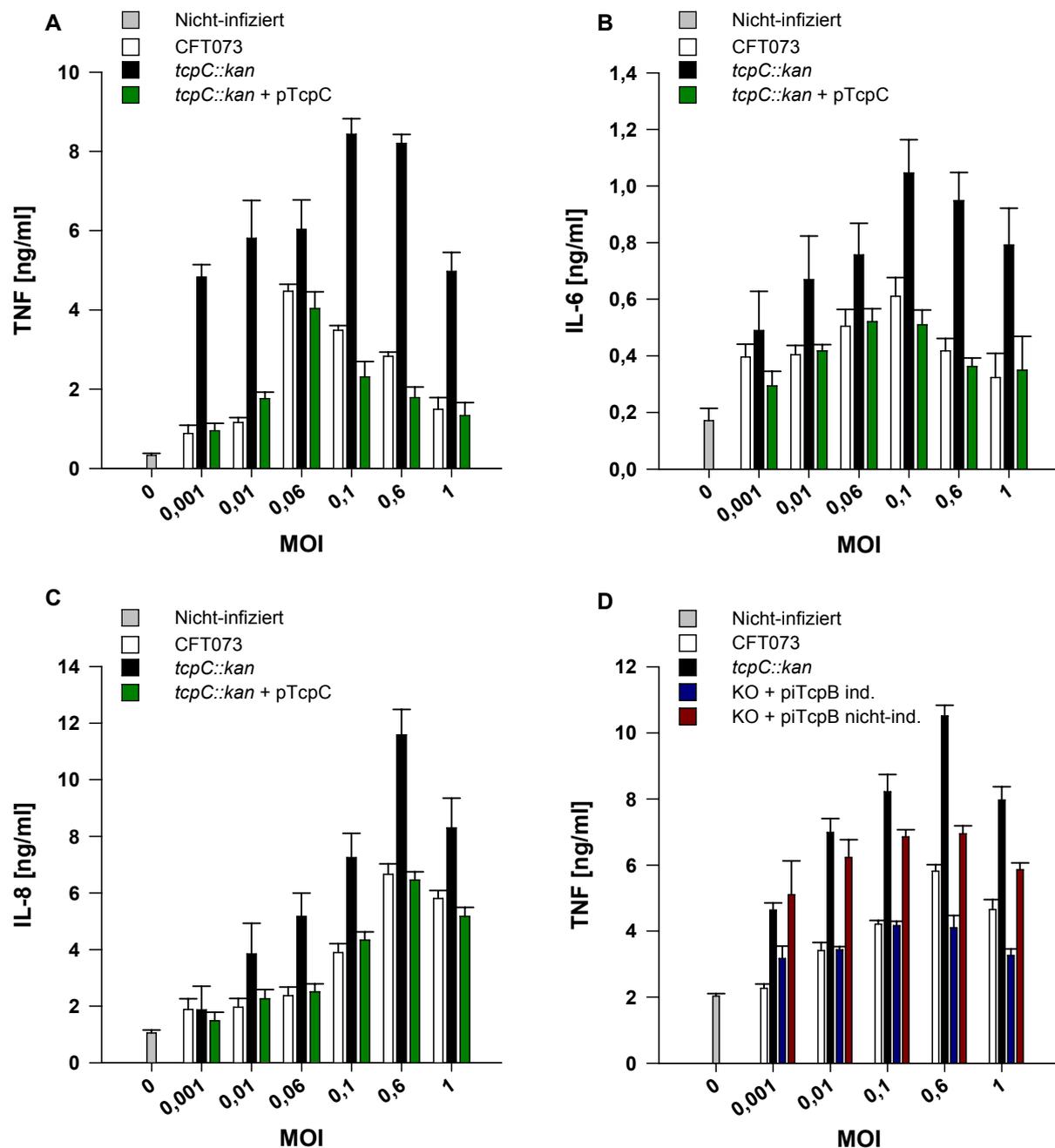


Abbildung 7: TcpC sowie TcpB reduzieren die Zytokinsekretion der Wirtszelle. Sowohl die TNF Sekretion von RAW Zellen (A) als auch die IL-6 (B) sowie IL-8 (C) Sekretion humaner HCV29 Zellen ist nach Infektion mit CFT073 als auch mit der TcpC-komplementierten Mutante *tcpC::kan* + pTpcC im Vergleich zur Infektion mit *tcpC::kan* erniedrigt. Ebenso vermindert sich die TNF-Antwort von RAWs durch die 2,5 h vor Infektion induzierte Expression von TcpB im CFT073 KO-Stamm + pTpcB im Vergleich zum nicht-induzierten Kontrollstamm, wobei auch hier CFT073 und *tcpC::kan* als Kontrollen fungierten (D). Die Zytokinsekretion der je 2×10^6 Zellen wurde je 5 h nach Infektion mit der angegebenen MOI des jeweiligen Erregers bestimmt. Alle Fehlerbalken wurden für je drei individuelle Kulturen eines Experimentes kalkuliert.

Zunächst dienten murine RAW264.7 Makrophagen (RAWs) und die humane Uroepithelzelllinie HCV29 als Zielobjekt, um Effekte auf das angeborene Immunsystem während der Infektion mit TcpC-exprimierenden Stämmen zu analysieren (vgl. Kap. 2.6.2).

Wie aus Abbildung 7 hervorgeht, induziert der *tcpC::kan* Stamm stets eine höhere Zytokinantwort als der CFT073 Wildtyp (wt). Dies bezieht sich sowohl auf die TNF Sekretion von RAWs (Abb. 7A) als auch die IL-6 (Abb. 7B) und IL-8 (Abb. 7C) Freisetzung durch HCV29 Zellen. Die KO-Komplementante *tcpC::kan* + pTcpC verhält sich jeweils wie der wt und reduziert die Menge an sekretiertem Zytokin.

Analog zu dieser Beobachtung ist auch die TcpB-Komplementante des CFT-KO-Stammes dazu befähigt, die TNF Sekretion in RAWs zu reduzieren (Abb. 7D). In primären murinen Zellen (BMMs und DCs) war ebenso eine TcpC-abhängige Reduktion der Zytokine TNF, IL-6, IL8 und IL12p40 zu beobachten (Daten nicht abgebildet).

Darüber hinaus führt TcpC zur erhöhten intrazellulären Präsenz des Erregers. So finden sich am Ende der Infektion stets mehr CFT073 und TcpC-komplementierte Bakterien in der Wirtszelle als *tcpC::kan*, was sowohl für RAWs als auch HCV29 Zellen gilt (s. Abb. 8A, B). Die absolute Zahl der intrazellulären Keime war im Falle der RAW Makrophagen stärker ausgeprägt, was wohl auf das hohe Phagozytosepotential dieses Zelltyps zurückzuführen ist. Die Gesamterregerlast nach 5 h war unter diesen experimentellen Bedingungen hingegen für alle drei Erregertypen unabhängig von TcpC vergleichbar (s. Abb. 8C, D).

Eine Sonderrolle unter den vermessenen TLR-regulierten Zytokinen nimmt IL-1 β ein, worauf in Kapitel 3.6 detailliert eingegangen wird. Während in RAWs das Zytokin meist kaum nachweisbar war, lässt sich IL-1 β in HCV29 Urothelzellen im pg-Bereich nachweisen. Jedoch führen die TcpC-exprimierenden Stämme CFT073 sowie *tcpC::kan* + pTcpC im Vergleich zur *tcpC::kan*-Infektion nicht zur Suppression sondern sogar zur verstärkten Prozessierung und Freisetzung von IL-1 β (s. Abbildung 9).

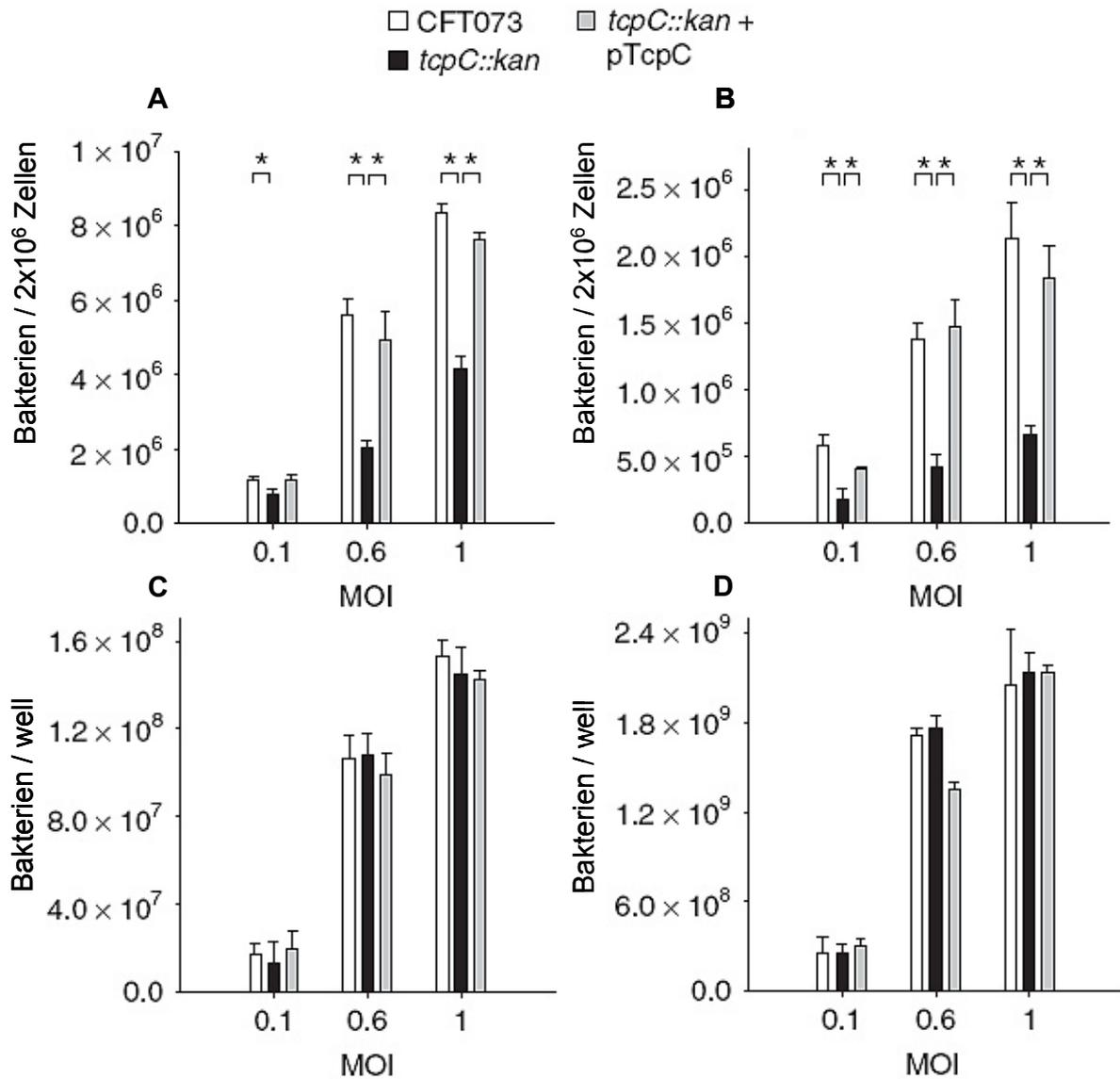


Abbildung 8: Vergleich der intrazellulären und der Gesamterregerlast in Abhängigkeit von TcpC. (A) zeigt die intrazelluläre bakterielle Last in RAWs und (B) in HCV29 Zellen je 5 h nach Infektion mit den angeführten MOIs des genannten Erregers. Extrazelluläre Bakterien wurden vorab mit Gentamicin abgetötet und ausgewaschen. * $P < 0,05$ ANOVA on ranks (Varianz berechnet von T. Miethke (Cirl *et al.*, 2008)). Die Gesamterregerlast je well wurde parallel dazu für RAWs (C) und HCV29 Zellen (D) nach 5 h bestimmt. Alle Fehlerbalken wurden für drei unabhängige Experimente kalkuliert.

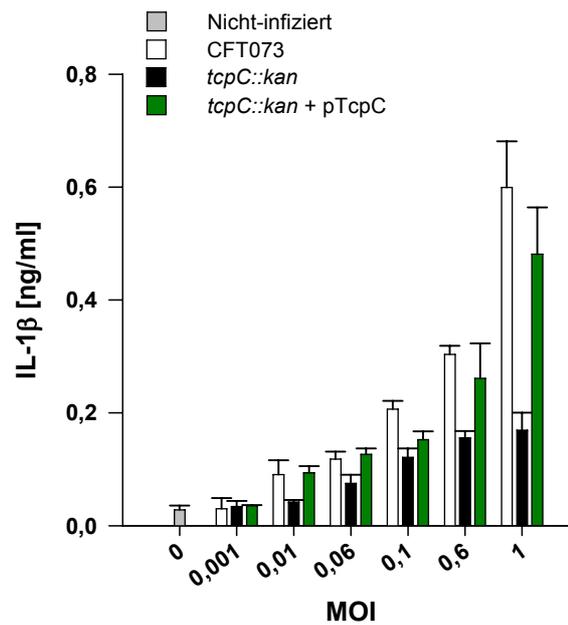


Abbildung 9: IL-1 β Sekretion von HCV29 Zellen (2×10^6 /well) nach 5 h der Infektion mit den genannten Erregern. Die Fehlerbalken wurden für drei individuelle Experimente kalkuliert.

3.2.2 TcpC und TcpB interagieren direkt mit dem Adapterprotein MyD88

sStudien von Susanne Dürr innerhalb der Arbeitsgruppe von Prof. Miethke an TcpC sowie TcpB konnten zeigen, dass beide Proteine in NF- κ B Reporterassays effektiv die TLR-4-abhängige NF- κ B-Aktivierung als Antwort auf LPS, nicht aber TNF-induzierte Wege unterbinden. Zudem konnten beide Tcps die TLR-2 medierte NF- κ B-Antwort auf die Stimulation mit dem potenten Agonisten HSP60 aus *Chlamydomphila pneumoniae* hin supprimieren (Costa *et al.*, 2002; Cirl *et al.*, 2008). Für TcpB wurde des Weiteren in Koexpressionsstudien gezeigt, dass es die Aktivierung von NF- κ B in Anwesenheit der zytoplasmatischen Adaptern IRAK1, IRAK4 und MyD88 zu unterbinden vermag, jedoch keinerlei Einfluss auf die poly(I:C)-induzierte, TLR3-abhängige und vom Adapter Trif-medierte Signaltransduktion zum INF- β Promotor besitzt.

Da dieser inhibitorische Phänotyp der Tcps die Involvierung des Adapters MyD88 nahelegt, wurden Knochenmarksmakrophagen (BMMs) von wt und MyD88-defizienten ($^{-/-}$) Mäusen mit CFT073 sowie *tcpC::kan* infiziert und im Anschluss die TNF Sekretion gemessen. Wie aus Abbildung 10 hervorgeht, zeigt CFT073 lediglich in wt BMMs eine Reduktion der TNF Sekretion verglichen mit dem TcpC-KO-Stamm. In MyD88 $^{-/-}$ Zellen ist der inhibitorische Effekt nicht mehr zu beobachten. Die induzierte Zytokinsekretion gleicht der von *tcpC::kan*.

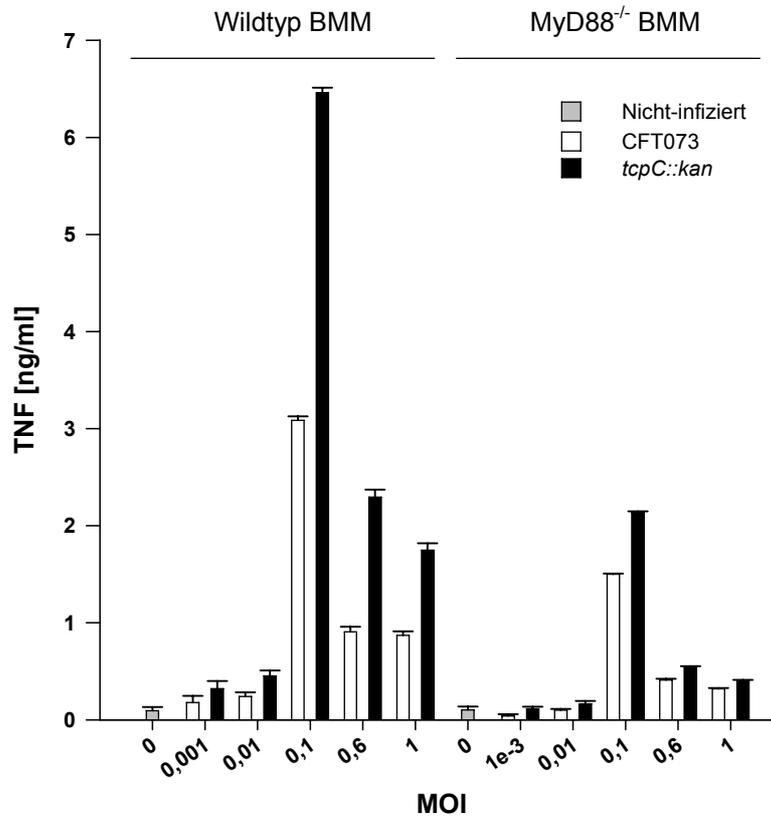


Abbildung 10: Infektion von wt und MyD88^{-/-} BMMs mit CFT073 und *tcpC::kan*. Die TNF Sekretion wurde 5 h im Anschluss an die Zugabe der angegebenen MOI des jeweiligen Erregers bestimmt. Die Fehlerbalken wurden für die Ergebnisse dreier unabhängiger Kulturen berechnet.

Analog hierzu zeigen Infektionsexperimente unter Einbeziehung der Komplementante *tcpC::kan* + pTpcC, dass die TpcC exprimierenden Stämme - CFT073 sowie die Komplementante - nur in wt BMMs (Abb. 11A), nicht jedoch in MyD88^{-/-} Zellen (Abb. 11B) verstärkt intrazellulär präsent sind.

MyD88 scheint daher ein Schlüsselmolekül für die Interaktion und Subversion der innaten Immunantwort durch TpcC darzustellen. Durch die Beeinflussung dieses zentralen Adapters ist es TpcC theoretisch möglich, nahezu alle TLR-medierte Signale zu modulieren, da mit Ausnahme von TLR3 alle bis dato charakterisierten TLRs MyD88 (neben anderen) als Adapter nutzen (vgl. Tabelle 1).

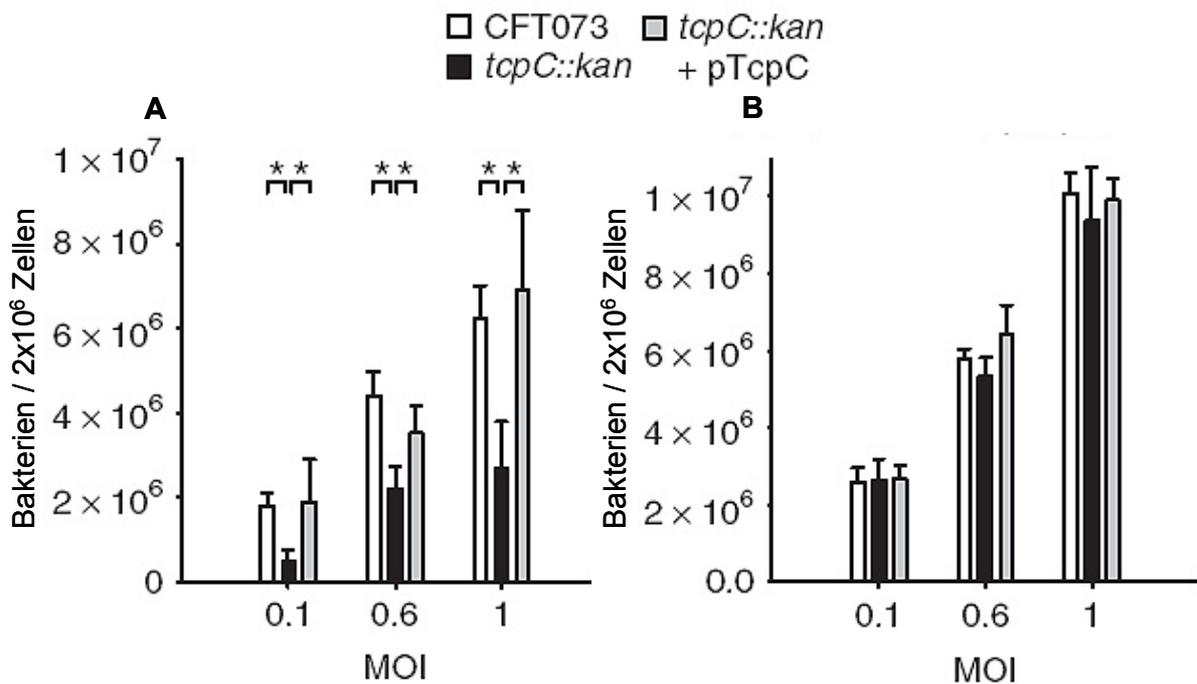


Abbildung 11: Intrazelluläre Erregerlast nach Infektion von Wildtyp (A) und MyD88^{-/-} Mäusen (B). BMMs wurden mit den angegebenen MOIs CFT073, *tcpC::kan* bzw. *tcpC::kan* + pTpcC für 5 h infiziert und die intrazelluläre Erregerlast nach Abtötung der extrazellulären Bakterien durch Gentamicin bestimmt. Die abgebildeten Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichung dreier unabhängige Experimente. *P < 0,05 ANOVA on ranks (Varianz berechnet von T. Miethke (Cirl *et al.*, 2008)).

Um festzustellen, ob Tcps durch direkte oder indirekte Interaktion mit MyD88 dessen Adapterfunktion im TLR-Signaltransduktionsgeschehen beeinflussen, wurden rekombinantes TIR-TcpC bzw. TcpB als "Bait Proteine" in Pull-Down Assays eingesetzt (s. Kap. 2.4.9). Um die unspezifische Bindung der hydrophoben TIR-Domänen der Tcps sowie der Kandidatenproteine zu minimieren, wurde nicht Sepharose sondern Agarose bzw. Methylacrylat als Säulenmaterial gewählt. Lysate von HEK293T Zellen (ggf. transfiziert mit MyD88-myc) sowie RAW264.7 Makrophagen wurden für die Suche nach Interaktionspartnern der Tcps hergestellt.

Da MyD88 nach Aktivierung an membranständige TLR-Komplexe rekrutiert wird, wurden die zu analysierenden NP40-Lysate mechanisch in einem Dounce-Homogenisator unter Zugabe von N-Octyl α -D Glucopyranosid aufgeschlossen, sonifiziert und gegen PBS dialysiert. Hierdurch sollten alle relevanten TIR-Proteine inkl. der TLRs solubilisiert werden, ohne für Interaktionsstudien störende Detergenzien einzubringen.

Wie aus Abb. 12A hervorgeht, interagiert TIR-TcpC spezifisch sowohl mit transfiziertem (hMyD88-myc, 33,2 kDa), als auch endogenem humanem MyD88 aus HEK293T Zellen. Es handelt sich hierbei um eine starke Interaktion, da auch Waschschrte mit Hochsalzpuffer die Ausbeute an MyD88 im Vergleich zu niedrigeren Salzkonzentrationen im Waschpuffer nicht reduzieren.

TcpB ist wie auch TIR-TcpC zur Bindung von endogenem und transfiziertem MyD88 befähigt (s. Abb. 12B). Jedoch war es hierfür notwendig, dem Pull-Down Ansatz während der Interaktion mit einem HEK- bzw. BMM Lysat Protease-Inhibitoren zuzusetzen. Zudem scheint diese Bindung im Vergleich zu der zwischen TIR-TcpC und MyD88 schwächer oder auf Grund der intrinsischen proteolytischen Funktion von TcpB (s. Kap. 3.5) schwerer nachzuweisen zu sein, da der Nachweis von MyD88 mittels Western-Blot oder durch ein Coomassie-Gel nur unter Einsatz von Niedrigsalzpuffern während der Waschschrte gelang. Nichtsdestotrotz konnte durch Coomassie-Färbung als Nachweismethoden selbst endogenes MyD88 als Bindungspartner detektiert werden, jedoch nur in stark konzentrierten BMM Lysaten (s. Abb. 12B unten). Mit RAW Makrophagen als vergleichbar konzentriertem Ausgangslysat gelang der MyD88 Nachweis nicht.

Daher wurde TIR-TcpC verwandt, um endogenes MyD88 aus RAWs als Bindungspartner nachzuweisen (s. Abb. 12C). Dies gelang nur, nachdem die Makrophagen vorab für 15-60 min durch Infektion mit *tcpC::kan* vorstimuliert wurden, was die Produktion von MyD88 im Ausgangslysat deutlich induzierte. Die Vorstimulation mit CFT073 erbrachte keine signifikant erhöhten MyD88-Levels (Daten nicht abgebildet). Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass der MyD88-Promotor eine IL-6 responsive Sequenz enthält (Janssens & Beyaert, 2002) und die IL-6 Produktion in der Anwesenheit von TcpC im Wildtyp-Stamm bereits in der frühen Phase der Infektion effizient unterdrückt wird.

Wie diese Interaktionsstudien demonstrieren, sind beide Tcps dazu befähigt, mit MyD88 ein Schlüsselmolekül der innate Immunantwort zu binden und auf dieser Ebene inhibitorisch auf das TLR-Geschehen einzuwirken. Für weitere Komponenten des TLR-Signalweges wie IRAK1, IRAK4, Trif sowie die intrazelluläre Domäne des TLR2 konnte jedoch unter Variation der Pull-Down Bedingungen stets keine Bindung an TIR-TcpC nachgewiesen werden (Cirl *et al.*, 2008).

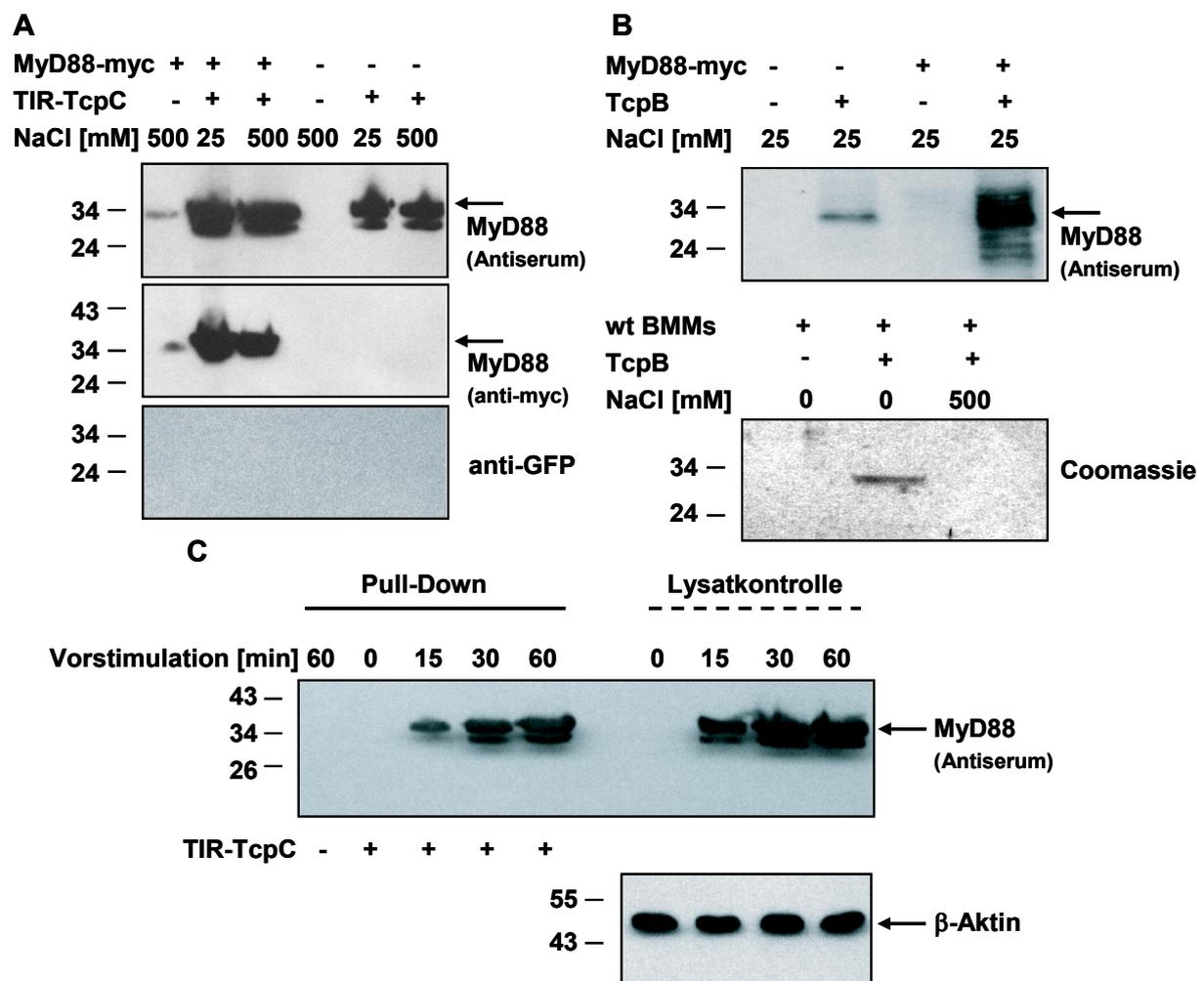


Abbildung 12: TcpC und TcpB interagieren mit MyD88. (A, B) Aus HEK293T Zellen, welche mit myc-gelabeltem humanem MyD88 (33,2 kDa) transfiziert wurden (+) oder nativ vorlagen (-) wurden Lysate für Pull-Down Assays generiert. Auch aus BMMs wurde ein konzentriertes Lysat gewonnen (Abb. B unten) wie in Kap. 2.4.9 beschrieben. *Strep*-tag II markiertes TIR-TcpC (A, 100 μ g) oder TcpB (B, 80 μ g) wurden auf Agarose-Beads immobilisiert (+), nicht-beladene Beads (-) dienen als Spezifitätskontrolle. Nach einer 1,5-stündigen Interaktionsphase auf den Beads (1 h 4°C, 30 min 25°C, 1:100 mit Protease-Inhibitor versetzt in (B)) mit je ~5 mg Totalprotein der jeweiligen Lysate (20 mg in Abb. B unten) wurde nicht gebundenes Protein eluiert und das Säulenmaterial dreimal mit TBS (NaCl = 0) bzw. Acetat-Puffer mit 0,025 oder 0,5 M NaCl gewaschen. Hierauf erfolgte die saure Elution noch gebundener Proteine und die Western-Blot bzw. SDS-PAGE Analyse mit anschließender Coomassie-Färbung. Die Western-Blot Analyse unter Verwendung von goat-anti-GFP in (A) diente als Isotypkontrolle für das goat-anti-MyD88 Antiserum. (C) RAW264.7 Makrophagen wurden für den angegebenen Zeitraum mit *tcpC::kan* (MOI: 0,1) vorstimuliert und dienten dann konzentriert als Ausgangslysat (~100 mg Totalprotein/Säule) für einen Pull-Down Assay mit TIR-TcpC wie für (A, B) beschrieben (Waschpuffer: Acetat-Puffer mit 0,1 M NaCl). Nach saurer Elution erfolgte die Analyse mittels Western-Blot auf endogenes MyD88 (Antiserum), ein anti- β -Aktin Western-Blot diente als Ladekontrolle für die eingesetzten RAW-Lysate vor dem Pull-Down. Alle Proteinmarkerangaben in kDa.

3.3 TcpC agiert als induzierbarer sekretierter Virulenzfaktor – Inhibition der Sekretion durch PA β N

Die rekombinanten Expressionsversuche mit TcpC zeigten, dass es für alle eingesetzten Laborstämme bereits in geringen Mengen zytotoxisch wirkt. Daher wurden Versuche durchgeführt, um zu überprüfen, unter welchen Bedingungen TcpC von CFT073 exprimiert wird. CFT073 verfügt nicht über ausreichend Gene zur Synthese eines funktionell aktiven Typ III Sekretionssystemes, ebenso ist die Synthese eines klassischen Typ IV Sekretionsapparates wohl nicht möglich (Welch *et al.*, 2002). TcpC selbst besitzt gemäß *in silico* Analysen keine sec-Leadersequenz, welche die Sekretion des Proteines ins Periplasma des Bakteriums medieren könnte. Daher war es auch von Interesse, mögliche Sekretionswege des Proteines zu bestimmen. Für den Western-Blot Nachweis von TcpC wurde für diese und folgende Experimente ein polyklonales Antiserum (rabbit) eingesetzt, welches gegen zwei Epitope in der TIR-Domäne von TcpC gerichtet ist (vgl. 2.1.4). In der Tat wird TcpC von CFT073 in LB-Medium nur in geringen Mengen spontan exprimiert (Daten nicht abgebildet). Induktionsexperimente unter Zellkulturbedingungen (s. 2.6.3) zeigten jedoch auch eine spontane Basallevelexpression welche unter sauren Bedingungen (pH 5,0) sowie in Anwesenheit von RAW Makrophagen noch deutlich erhöht war (s. Abb. 13A). Die Ausbeute lag vollstimuliert bei etwa 500 ng - 5 μ g TcpC/l, was jedoch auf Grund verbleibenden FCS im Überstand sowie weiterer CFT073 Virulenzfaktoren lediglich durch Western-Blot Analyse im Vergleich zu einer Standardkurve mit rekombinantem TIR-TcpC abgeschätzt werden konnte (Daten nicht abgebildet). Die TcpC induzierenden Faktoren entsprechen den natürlichen Stressbedingungen denen der Erreger auch im sauren Milieu des Urins bzw. in der späteren Phase der Infektion nach Invasion ins Urothel ausgesetzt ist. Die exakten regulatorischen Mechanismen, welche zur erhöhten TcpC-Expression führen, gilt es jedoch separat zu definieren. In den Gesamtzelllysaten fand sich TcpC als Volllängeprotein (36,4 kDa), was für alle anderen Makrophagen und DC-Lysate zutraf. In der intrazellulären Fraktion von HCV29 Zellen fand sich jedoch bei hohen Erregerlasten und langen Infektionszeiten (ab 5 h) eine kleinere Bande, welche der TIR-Domäne von TcpC (~17 kDa) entsprechen würde (s. Abb. 13B). Dies ist ev. auf einen Zelltyp-abhängigen Spaltmechanismus zurückzuführen, welcher nur in der Urothelzelle ausgeprägt ist und auch bei der Überexpression von TcpC in *E. coli* JM83 und BL21 (vgl. Kap. 3.1) zu beobachten war. Unabhängig vom Zelltyp findet sich TcpC im Zellkulturüberstand nach Infektion als mit der apparenten Größe eines Dimers, wie die

Western-Blot Analyse nativer Gele demonstriert (Abb. 13C). Da in den Überständen das zytoplasmatische Chaperon DnaK nicht detektiert werden konnte, ist diese Bande nicht das Resultat bakterieller Lyse (Abb. 13D). Der oligomere Zustand von TcpC scheint daher zunächst unmittelbar nach Sekretion in den teils stark angesäuerten Zellkulturüberständen *in vitro* die stabilste Form des Moleküls ausserhalb des Bakteriums zu sein.

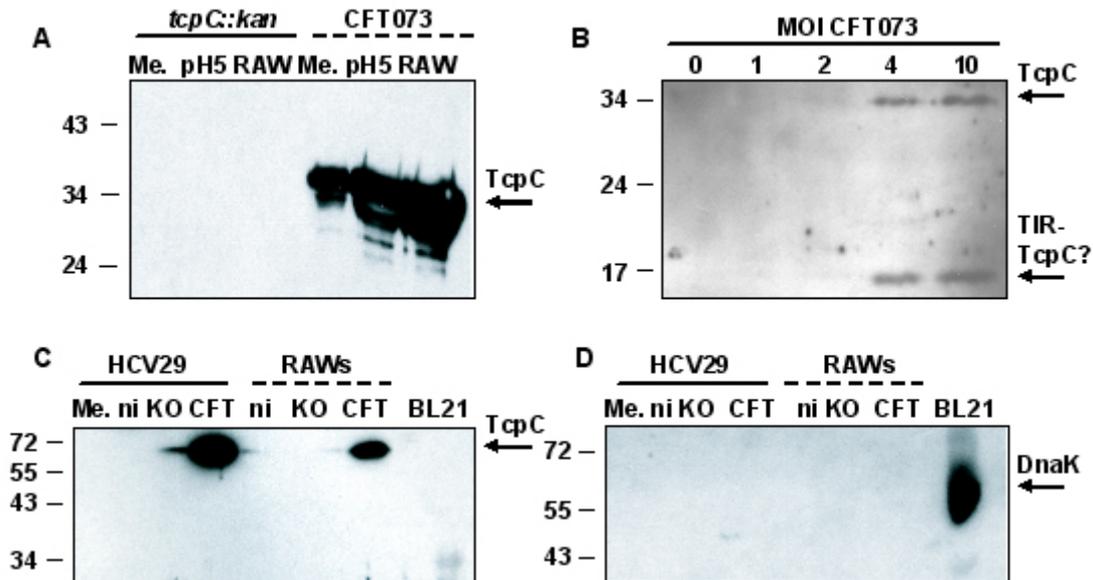


Abbildung 13: TcpC wird induzierbar als Volllängenprotein exprimiert. (A) TcpC wird nach 5 h unter Zellkulturbedingungen spontan (Me. = Medium) produziert. Das Expressionsniveau wird durch Ansäuerung auf pH 5,0 bzw. nach Kokultur mit RAW264.7 Makrophagen noch erhöht. Als Negativkontrolle diente *tcpC::kan*. Initial wurden je 2×10^6 Makrophagen bzw. Bakterien verwendet. (B) Infektion von HCV29 Zellen (3×10^5 /well) mit aufsteigenden MOIs von CFT073. Nach 5 h findet sich in der intrazellulären Fraktion nebst dem Volllängenprotein auch eine kleinere Bande, etwa in Höhe der TIR-Domäne. (C) HCV29 Zellen sowie RAW Makrophagen wurden für 5 h mit *tcpC::kan* (KO) und CFT073 (MOI = 1) infiziert (ni = Überstände nicht-infizierter Kontrollen). Die Überstände wurden 50fach aufkonzentriert und nach TCA-Fällung auf ein nicht-reduzierendes natives Gel aufgetragen und anschließend mittels Western-Blot analysiert. Ein Gesamtzelllysat von *E. coli* BL21 Codon Plus RIL diente als Kontrolle. (D) Der Western-Blot aus 13A wurde zusätzlich auf die Anwesenheit von DnaK hin analysiert. Alle Proteinmarkerangaben in kDa.

Um der Frage nach der Proteinsekretion von TcpC weiter nachzugehen, wurden RAW Zellen mit den filtrierte bzw. teils hitzeinaktivierten Überständen aus einem vorhergehenden Infektionsexperiment restimuliert (vgl. Kap. 2.6.2). Die filtrierte Überstände zeigten vergleichbare Wirkung wie die Infektion mit den Erregern (Abb. 14A): Von CFT073 Infektion stammende Überstände induzierten eine geringere TNF Sekretion als diejenigen von *tcpC::kan*, was auf eine sekretierte Komponente hindeutet, welche diese Unterschiede verursacht. Wurden die Überstände vor der Restimulation zusätzlich hitzeinaktiviert und damit

proteinerge Komponenten größtenteils denaturiert, so konnte die TNF-Produktion der Zelle durch von CFT073 abstammende Überstände nicht mehr reduziert werden (Abb. 14B). Dies deutet darauf hin, dass TcpC nach Sekretion unabhängig vom Erreger das TLR-Signaling beeinflussen kann.

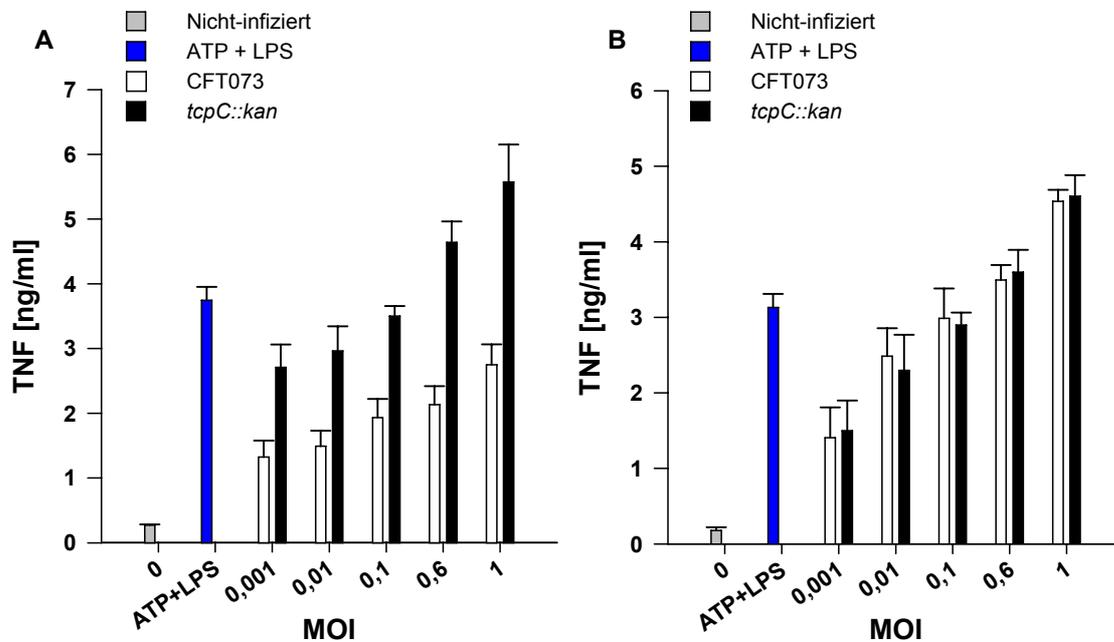


Abbildung 14: Stimulation von RAW267.4 Zellen mit filtrierten und hitzeinaktivierten Infektionsexperiment-überständen. 2×10^6 Zellen/well wurden mit je $500 \mu\text{l}$ filtrierten ($0,4 \mu\text{m}$ Filter, (A)) bzw. $500 \mu\text{l}$ filtrierten und hitzeinaktivierten Überständen aus einem vorangehenden Infektionsexperiment restimuliert. Für das Initial-experiment, auf welches sich die X-Achsen Beschriftung bezieht, wurden 2×10^6 Zellen für 4,5 h mit der angegebenen MOI des jeweiligen Erregers infiziert, ATP (1 mM) und LPS (200 ng) dienen dann während der 5-stündigen Restimulation als Positivkontrolle für nicht abgebildete IL-1 β ELISAs. Die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung der Ergebnisse dreier individueller Kulturen eines Experimentes.

Um die Sekretion von TcpC im Infektionskontext zu bestätigen, wurden RAW Makrophagen im Transwellssystem kultiviert, wobei die Erreger physikalisch von der Wirtszelle getrennt werden. Auch unter diesen Bedingungen induzierten die TcpC-exprimierenden Stämme CFT073 und *tcpC::kan* + pTcpC eine erniedrigte TNF Sekretion nach Infektion von RAW Makrophagen im Vergleich zu mit *tcpC::kan* inkubierten Stämmen (Abb. 15A). Im Makrophagenkompartiment wurden niemals lebende Bakterien aufgefunden. Daher ist das beobachtete Phänomen erneut auf die Sekretion eines Proteines, nicht aber auf ein PAMP-Effekt zurückzuführen, da etwa Endotoxin von allen Erregern gleichermaßen freigesetzt würde.

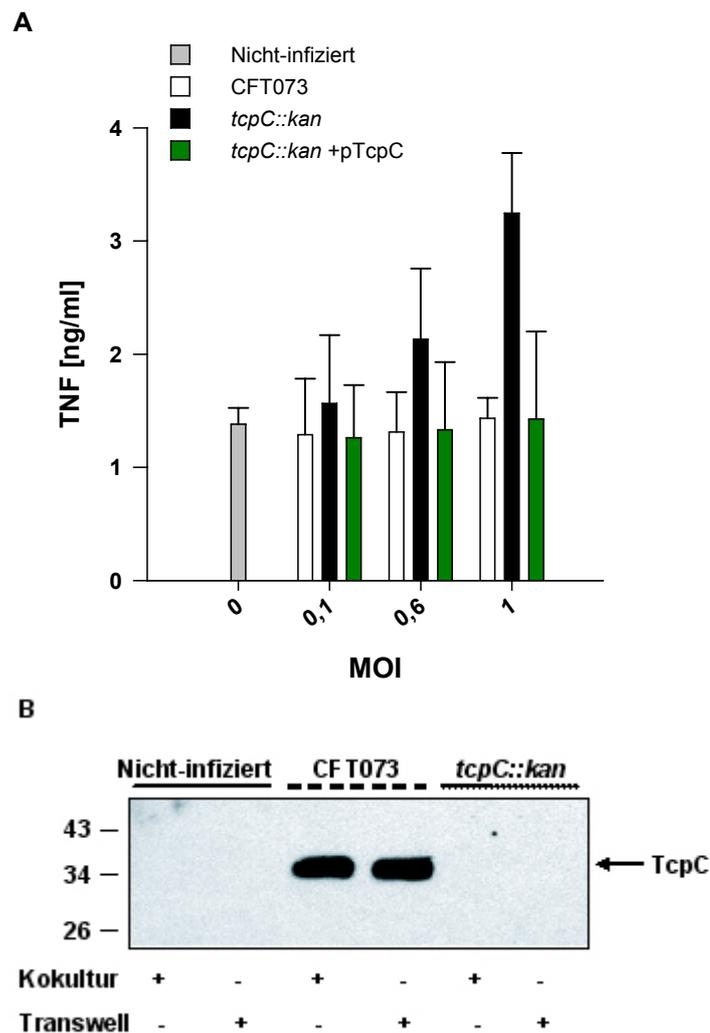


Abbildung 15: TcpC Sekretion im Transwellsystem. (A) TNF Sekretion von 2×10^6 RAWs 3 h nach Koinkubation mit den angegebenen MOIs der genannten Erreger im Transwellsystem (0,4 μm Porengröße). Die Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung der Ergebnisse dreier individueller Kulturen innerhalb desselben Experimentes. (B) Western-Blot Visualisierung von intrazellulärem TcpC (Antiserum, rabbit) nach 5-stündiger Infektion von 2×10^6 RAWs in Ko- bzw. Transwellkultur. Die MOI betrug für CFT073 und *tcpC::kan* jeweils 1. Proteinmarkerangabe in kDa.

Wie die obigen Experimente darlegen, fungiert TcpC als sekretierter Virulenzfaktor. Es wurden daher geprüft, ob der Efflux-Pump Inhibitor L-Phenylalanin-L-Arginin- β -Naphthylamid (PA β N) (Pannek *et al.*, 2006) potentiell einen therapeutischen Effekt während der Infektion mit CFT073 erfüllen kann. Wie aus Abbildung 16A hervorgeht, führt die Zugabe von 52 μM PA β N während der Infektion von RAW Makrophagen nahezu zur Neutralisation des TNF-supprimierenden Effekts von TcpC. Dies erklärt sich wohl daher, dass der Efflux-Pump Inhibitor die Sekretion von TcpC unterbindet, wie aus Abbildung 16B ersichtlich wird.

PA β N stellt somit einen nicht auf Antibiotika basierenden Ansatz zur Blockierung des Virulenzproteins TcpC dar. Zudem deuten die Experimente darauf hin, dass TcpC ev. über einen TolC-abhängig Typ I Sekretionsweg aus der Bakterienzelle geschleust werden könnte. Das AcrAB-TolC System spielt bei vielen nosokomialen Erregern eine entscheidende Rolle bei der Erlangung multipler Antibiotika-Resistenzen (Pradel & Pages, 2002). Die Frage nach dem exakten Sekretionsmechanismus des Protein es kann dennoch durch diese Experimente nicht abschließend geklärt werden.

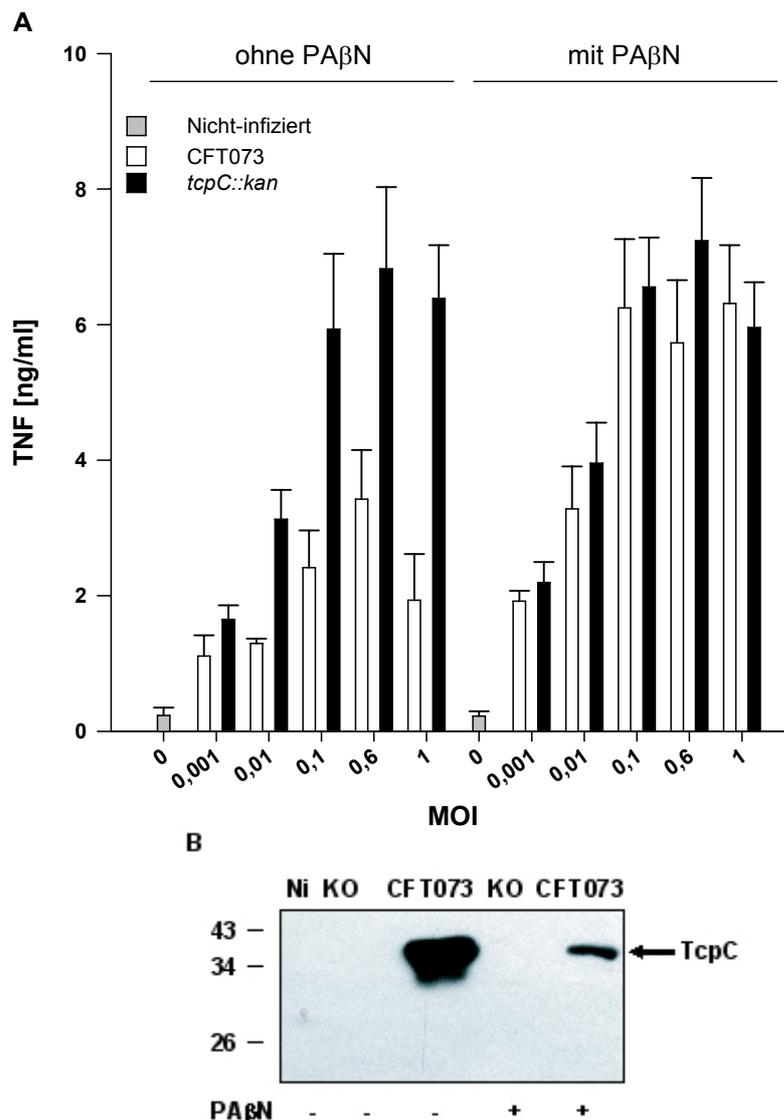


Abbildung 16: PA β N reduziert die Sekretion von TcpC und dadurch dessen TNF-Suppressionseigenschaften. (A) RAWs (2×10^6 /well) wurden in An- oder Abwesenheit von PA β N (52 μ M) mit den angegebenen MOIs von CFT073 und *tcpC::kan* für 5 h infiziert und anschließend TNF im Überstand nachgewiesen. Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichung der Ergebnisse dreier individueller Kulturen eines Experimentes. (B) 2×10^6 RAWs/well wurden mit CFT073 und *tcpC::kan* für 5 h infiziert (Ni = nicht-infizierte Kontrolle, MOI = 1). Im 10fach konzentrierten Überstand wurde im Anschluss TcpC mittels Western-Blot nachgewiesen. Proteinmarkerangabe in kDa.

3.4 Aufnahme von TcpC in die Wirtszelle

Zur Visualisierung der Sekretion von TcpC und dessen Aufnahme in die Wirtszelle, wurde durch ortsgerichtete Mutagenese (vgl. Kap. 2.2.9.2) eine C-terminal Tetracystein-FlAsH-getaggte Variante des Volllängenproteines basierend auf dem Plasmid pTcpC generiert. Dieses pFlAsH-TcpC bezeichnete medium-copy Konstrukt wurde noch in den *tet*-induzierbaren Vektor pASK-IBA3+ umkloniert (s. 2.2.10) und somit die high-copy Variante pFlAsH-TcpC hc erhalten. Mit beiden Vektoren konnte im Anschluss *tcpC::kan* komplementiert werden um die resultierende Stämme für die konfokale Mikroskopie einzusetzen. Wie in Kap. 2.7 detailliert beschrieben, erlaubt das FlAsH-tag die Markierung eines gelabelten Proteines mit dem arsenhaltigen FITC-Farbstoff FlAsH-EDT₂, da dieses zellpermeable Molekül an die Thiolat-Anionen der Cystein-Reste des tags (CCPGCC) zu binden vermag.

Gemäß den Erläuterungen in Kap. 2.7, wurden RAW264.7 Makrophagen entweder mit *tcpC::kan* pFlAsH-TcpC in Transwellkammern, bzw. rot gefärbten *tcpC::kan* pFlAsH-TcpC hc als Kokultur infiziert. Wie aus Abb. 17A hervorgeht, kumuliert sich TcpC nach 90 min der Transwellkultur im Makrophagen, wohingegen beim *tcpC::kan* Stamm keine Fluoreszenzentwicklung zu beobachten ist (Abb 17B). Beobachtet man dieses Geschehen mit dem high-copy Konstrukt, so erkennt man bereits nach 10 min der Kokultur von *tcpC::kan* pFlAsH-TcpC hc mit den Makrophagen erste Sekretionsereignisse des Proteines aus dem Bakterium (Abb. 17C). Nach weiteren 80 min befindet sich nahezu das gesamte Protein innerhalb der Wirtszelle (Abb. 17D). Die Infektion mit *tcpC::kan*, welche kein vergleichbares Fluoreszenzsignal lieferte (Abb. 17E), diente als Kontrolle der Spezifität des Farbstoffes.

Zusammengefasst zeigen diese Versuche, dass TcpC ohne direkten Kontakt des Erregers zu seiner Wirtszelle (s. Transwellsystem) innerhalb kurzer Zeit in das Zytosol des Makrophagen gelangen kann. Mangels eines funktionellen Typ III bzw. Typ IV Sekretionssystemes ist dies entscheidend für die Funktion des Virulenzfaktors. Das direkte Anhaften an die Zielzelle mag die gerichtete Aufnahme *in vivo* noch beschleunigen, *in vitro* ist dieses *Attachment* jedoch nicht essentiell für die Translokation des Proteines ins Zytosol der infizierten Zelle (vgl. hierzu Abb. 15B).

TcpC verfügt daher wohl über ein intrinsisches auf AS-Ebene kodiertes Signal, welches seine Aufnahme in die Wirtszelle dirigiert.

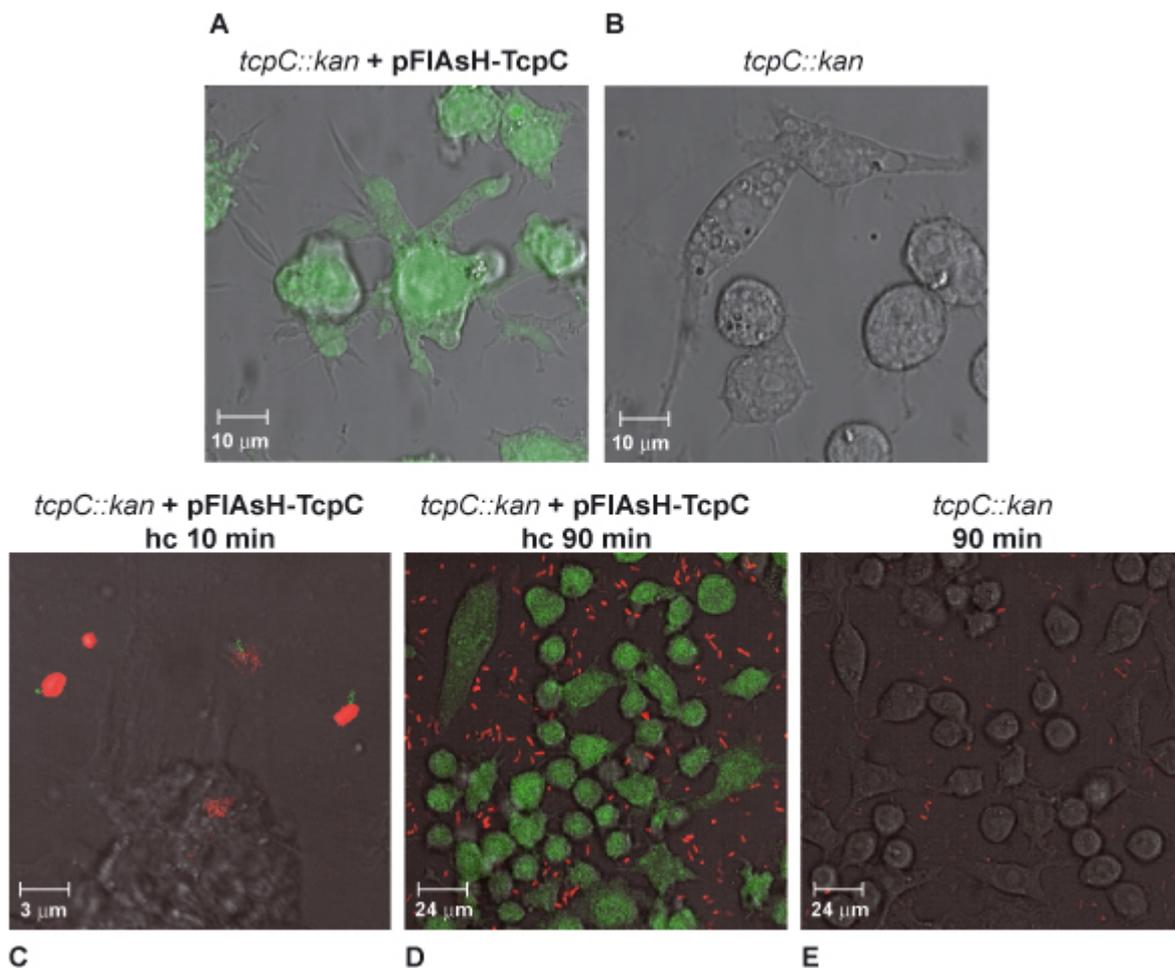


Abbildung 17: Sekretion und Aufnahme in die Wirtszelle von FIASH-gelabeltem TcpC. (A, B) 5×10^4 RAW Makrophagen/well wurden in Transwellkammern (Porengröße $0,4 \mu\text{m}$) in Opti-MEM kultiviert und zeitgleich mit der Zugabe von FITC-FIASH-EDT₂ Farbstoff ($2,5 \mu\text{M}$) mit einer MOI von 5 der Stämme *tcpC::kan* pFIAsH-TcpC (A) bzw. *tcpC::kan* (B) infiziert. Vorab wurden die Zellen dreimal mit BAL-Puffer ($250 \mu\text{M}$) gewaschen. Die Akkumulation von TcpC in den Makrophagen wurde 90 min nach Infektion konfokalmikroskopisch bestimmt. (C-E) RAW Zellen (5×10^4) wurden mit einer MOI von 5 des mit PKH26 rot gefärbten Erregers *tcpC::kan* infiziert, welcher in (C+D) das high-copy FIASH-TcpC Plasmid trägt. Unmittelbar zum Zeitpunkt der Infektion wurde der FIASH-Farbstoff ($4 \mu\text{M}$) zu den vorab zweimal mit BAL-Puffer gewaschenen Zellen zugefügt und die Expression des Proteinies mit aTc ($50 \text{ ng}/200\mu\text{l}$) induziert (in C-E). Die Sekretion von TcpC (C) wurde 10 min nach Infektion analysiert, die Aufnahme in die Wirtszelle (D+E) nach 90 min.

3.4.1 TLR-Stimulation mit rekombinantem TIR-TcpC

Nachdem Infektionsversuche im Transwellssystem und konfokalmikroskopische Experimente zeigten, dass sekretiertes TcpC die Zellmembran der Wirtszelle effizient überwinden kann, galt es zu prüfen, ob auch rekombinantes TIR-TcpC losgelöst vom Erregerkontext hierzu befähigt ist und ebenso die TLR-Antwort der Zelle zu beeinflussen vermag.

Zu diesem Zwecke wurden RAW264.7 Makrophagen mit den folgenden TLR-Agonisten stimuliert: Pam3CSK4 (TLR1/2), poly(I:C) (TLR3), reinstes LPS (TLR4), Flagellin (TLR5) sowie CpG 1826 (TLR9). Simultan hierzu wurde TIR-TcpC zutitriert und die TNF Sekretion 3 h nach Stimulation bestimmt.

Aus Abbildung 18A geht hervor, dass das Protein *per se* fähig ist, alle MyD88-vermittelten TLR-Signalwege zu supprimieren. Die TLR3-abhängige, Trif-mediierte Antwort induziert durch den Liganden poly(I:C) hingegen wurde nicht durch TIR-TcpC beeinflusst. Rekombinantes EGFP, identisch exprimiert und aufgereinigt wie TIR-TcpC, diente als Kontrollprotein, um unspezifische Effekte auszuschließen, welche eventuell durch kontaminierende Moleküle aus der Produktion in *E. coli* hervorgerufen werden könnten. EGFP zeigte jedoch keinerlei Einfluss auf die Endotoxin-induzierte TNF Sekretion der Makrophagen (s. Abb. 18B) – weder stimulierender noch supprimierender Natur - sodass davon ausgegangen wurde, dass die Proteine nahezu LPS-frei und ohne sonstige Kontaminationen vorlagen.

Bis zum Ende der 3-stündigen Stimulation kumuliert sich TIR-TcpC ebenso wie vom Erreger sekretiertes TcpC (vgl. Kap. 3.3) im Zytosol der Wirtszelle (s. Abb. 18C). Der für die Aufnahme entscheidende Teil des Proteines muss also im C-terminalen Teil des Proteines lokalisiert sein, welcher sowohl in der rekombinanten Variante als auch dem Volllängenprotein vorhanden ist.

Vergleichbare Ergebnisse zur gleichzeitigen Stimulation erbrachte die Vorstimulation mit TIR-TcpC (2,5 h) gefolgt von der Zugabe der TLR-Liganden (Daten nicht abgebildet). TIR-TcpC transloziert *in vitro* folglich selbst bei gleichzeitiger Zugabe derart effektiv, dass es dazu befähigt ist, die schnell ausgelöste TLR-Signalkaskade zu supprimieren. Die Beeinflussung des TLR-Weges verläuft folglich erregerunabhängig.

Während einer Infektion mit CFT073 kann durch die zügige Sekretion des Proteines daher die äußerst schnell durch Erreger-LPS ausgelöste TLR4-Signalkette effizient unterbunden werden, wodurch die Immunantwort auf das Bakterium moderater verläuft. Hierdurch kann etwa die erhöhte intrazelluläre Erregeranzahl (s. Kap. 3.2.1) TcpC-positiver Stämme erklärt werden.

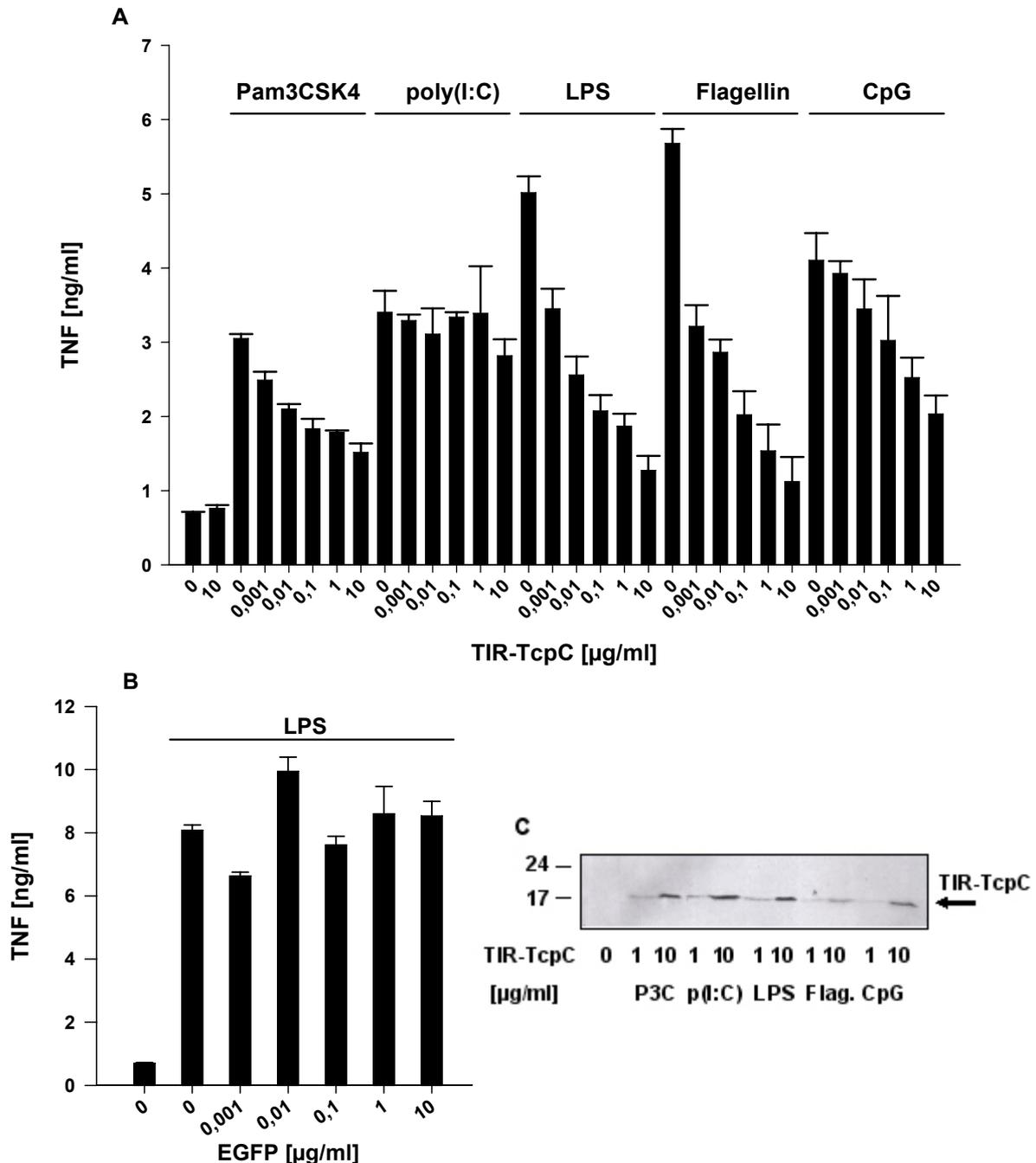


Abbildung 18: Rekombinantes TIR-TcpC wird von der Wirtszelle aufgenommen und reduziert deren TLR-stimulierte TNF Sekretion. (A) Je 1×10^6 RAW Makrophagen wurden mit Pam3CSK4 (1 µg/ml), poly(I:C) (2,5 µg/ml), reinstem LPS (100 ng/ml), Flagellin (1 µg/ml) sowie CpG 1826 (2 µM) simultan mit der angegebenen Menge an TIR-TcpC stimuliert. Die TNF Sekretion wurde nach 3 h der Kostimulation analysiert. (B) Zur Kontrolle unspezifischer Effekte wurden RAWs (2×10^6 /well) mit reinstem LPS (100 ng/ml) sowie zeitgleich mit rekombinantem EGFP stimuliert, welches exakt wie TIR-TcpC hergestellt wurde. TNF-Levelns wurden 5 h nach Stimulationsbeginn ermittelt. Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung der Ergebnisse dreier individueller Kulturen eines Experimentes. (C) Nach der Stimulationsphase wurden die Zellen aus (A) 10 min trypsinisiert, gewaschen und mit RIPA-Puffer lysiert (P3C = Pam3CSK4). Intrazelluläres TIR-TcpC wurde durch Western-Blot Analyse (anti-Strep-Tactin) visualisiert. Markerangabe in kDa.

3.4.2 Inhibition der Aufnahme von TIR-TcpC durch Methyl- β -Cyclodextrin

Für unterschiedliche Pathogene wie *Shigella flexneri* oder bakterielle Virulenzfaktoren wie das Cholera-Toxin ist beschrieben, dass sie gezielt mit den cholesterinreichen Lipid-Rafts der Wirtszelle interagieren können (Lafont & van der Goot, 2005). Zur Überprüfung, ob dieser Weg auch einen Aufnahmemechanismus von TIR-TcpC darstellen könnte, wurde der Einfluss des Cholesterin-depletierenden Agens Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) auf die Internalisierung von TIR-TcpC analysiert. Wie aus Abb. 19A hervorgeht, führt die Vorinkubation von BMMs mit M β CD dazu, dass TIR-TcpC den durch LPS-ausgelösten TLR4-Stimulus nicht mehr effizient zu unterbinden vermag. Dies ist darauf zurückzuführen, dass M β CD die zelluläre Aufnahme von TIR-TcpC reduziert, wie in Abb. 19B gezeigt. Ein Großteil des Proteines findet sich nach Ende der Stimulation im Überstand und steht somit nicht intrazellulär zur Blockierung von MyD88 zur Verfügung. Cholesterin- oder glykosphingolipidreiche Rafts stellen daher eine mögliche Zielstruktur für die Insertion und anschließende zelluläre Aufnahme von TIR-TcpC dar.

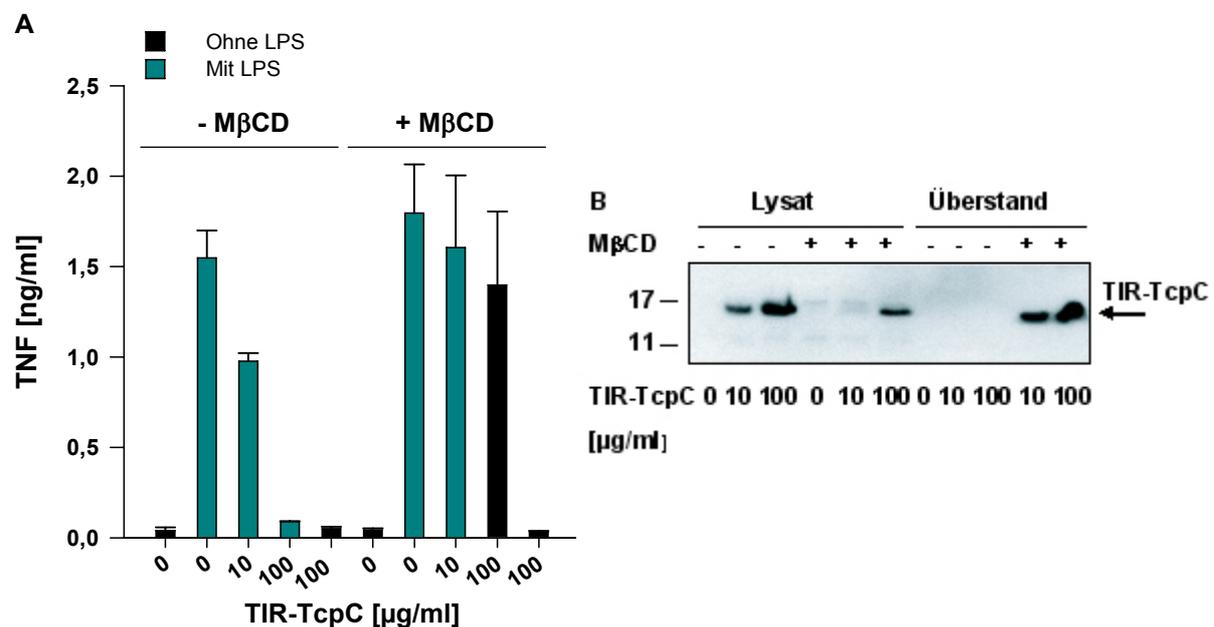


Abbildung 19: M β CD reduziert die Aufnahme sowie die inhibitorische Wirkung von TIR-TcpC. (A) Wildtyp BMMs (2×10^6 /well) wurden 30 min mit M β CD vorinkubiert, bevor sie mit reinstem LPS (*E. coli*, 100 ng/ml) sowie der angegebenen Menge an TIR-TcpC für 2,5 h stimuliert wurden. Im Anschluss erfolgte die TNF-Quantifizierung mittels ELISA. (B) Am Ende der Stimulation (s. A), wurde ein Teil des Kulturüberstandes 20fach aufkonzentriert und zusammen mit den Zelllysaten (nach Vorinkubation mit Trypsin und mehreren Waschschritten) einer Western-Blot Analyse auf rekombinantes *strep*-getaggtetes TIR-TcpC unterzogen. Die Standardabweichung bezieht sich auf die Ergebnisse dreier individueller Kulturen eines Experimentes. Markerangabe in kDa.

3.4.3 Der basische C-Terminus von TcpC ist entscheidend für dessen spontane Aufnahme

Wie bereits in Kap. 1.3.3 angesprochen, verfügt TcpC im Gegensatz zu TcpB über einen äußerst basischen C-Terminus, der die AS 293-307 umfasst (KEIARELAEIAYRRR, pI~10). Bzgl. dieser Sequenz besitzt TcpC deutliche Homologie zu Zell-penetrierenden Peptiden und Proteinen, etwa zu dem HIV Protein Tat. 1988 wurde unabhängig von zwei Gruppen erstmals beschrieben, dass dieses Transaktivatorprotein des HI-Virus innerhalb kurzer Zeit die Wirtszellmembran überwinden kann (Frankel & Pabo, 1988; Loewenstein & Green, 1988). Dies beruht einzig auf einer hydrophilen 11 AS umfassenden Arginin-reichen Sequenz des Proteines (YGRKKRRQRRR, pI~12,31). Vershen mit dieser Minimalsequenz überwinden heterologe Proteine *in vitro* selbst die Lipiddoppelschicht schwer transduzierbarer Zellen wie die von Osteoklasten und Knochenmarkszellen (Becker-Hapak *et al.*, 2001).

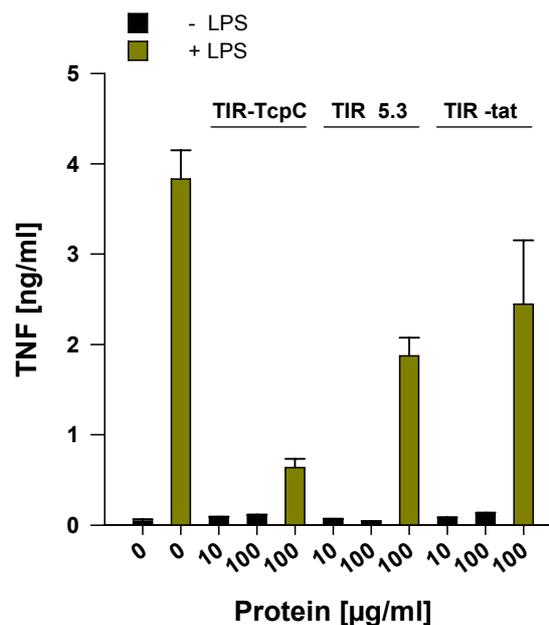


Abbildung 20: Der C-Terminus von TcpC ist entscheidend für dessen TLR-inhibitorischen Phänotyp. BMMs (2×10^6 /well) wurden in Opti-MEM für 3 h mit der angegebenen Menge an TIR-TcpC bzw. den C-terminalen Mutanten TIR 5.3 und TIR-tat in Anwesenheit oder Abwesenheit von hochreinem LPS (200 ng/ml) stimuliert. Im Anschluss wurde die TNF-Freisetzung mittels ELISA bestimmt. Die Standardabweichung bezieht sich auf die Ergebnisse dreier individueller Kulturen eines Experimentes.

Basierend auf diesem Wissen, wurden zwei C-terminale Varianten von TIR-TcpC generiert, um deren Funktionalität im Vergleich zum Wildtyp Protein zu bestimmen:

TIR-TcpC(R297I/R305M/R307I) = TIR 5.3 bzw. TIR-TcpC(Δ 293-307) = TIR-tat (s. 2.2.9.2, 2.2.9.3 und 3.1). Erste Versuche mit diesen Proteinen zeigen deren eingeschränkte Fähigkeit im Vergleich zu TIR-TcpC, die TNF Sekretion von BMMs nach LPS-Stimulus zu reduzieren (s. Abbildung 20).

Eine Erklärung hierfür mag die verminderte Aufnahmekapazität der Mutanten darstellen, wie für TIR 5.3 in Abb. 21A zu sehen ist. BMMs internalisieren die Variante schlechter als das TIR-TcpC Konstrukt. Jedoch scheint es sich hierbei um ein Zelltyp-abhängiges Phänomen zu handeln, da sich in GM-CSF-DCs die Aufnahmerate von Wildtyp und Mutante kaum unterscheidet (s. Abb. 21B)

Die HIV Tat ähnliche Sequenz im C-terminalen Bereich von TcpC stellt möglicherweise eine entscheidende Zielstruktur für dessen Aufnahme in die Wirtszelle dar. Um eindeutige Aussagen zur exakten Funktion der Arginin-Domäne im Zusammenhang mit dem Aufnahme-mechanismus treffen zu können, bedarf es jedoch noch weiterer detaillierter Versuche.

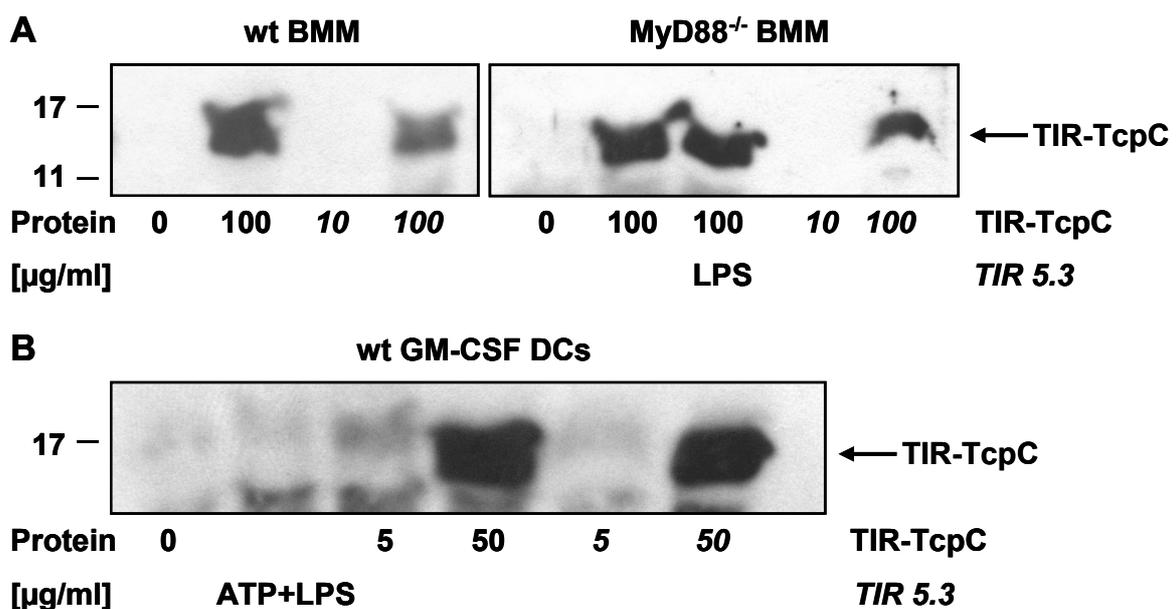


Abbildung 21: Aufnahme der TIR-TcpC Mutante TIR 5.3 in BMMs und DCs. (A) BMMs von wt und MyD88^{-/-} Mäusen (je 2 x 10⁶/well) wurden wie in Abb. 20 beschrieben für 3 h mit der genannten Menge der jeweiligen TIR-TcpC Variante (Angaben für TIR 5.3 kursiv) sowie ggf. LPS (200 ng/ml) stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen intensiv trypsiniert, gewaschen und in Lämmli-Puffer (+DTT, 100 µl/1 x 10⁶ Zellen) lysiert. Durch Western-Blot Analyse wurde die intrazellulär lokalisierten rekombinanten Proteine nachgewiesen. (B) GM-CSF-DCs von Wildtyp Mäusen (2 x 10⁶/well) wurden in Opti-MEM mit der angegebenen Menge an TIR-TcpC bzw. den C-terminalen Mutante TIR 5.3 koinkubiert. Die Stimulation mit LPS (100 ng/ml) und ATP (2,5 mM) diente als Positivkontrolle für nicht abgebildete ELISA-Experimente. Die Zellen wurden nach 3 h wie in (A) aufgeschlossen und die Lysate einer Western-Blot Analyse unterzogen. Alle Markerangaben in kDa.

3.5 Proteolytische Aktivität von TcpB und TcpC

3.5.1 Proteolytische Aktivität und Phänotyp von TcpC-Varianten sowie TcpB

Durch die Arbeit mit rekombinantem TcpC war bereits dessen Instabilität aufgefallen, welche stets zu schlechten Ausbeuten an reinem Protein führte (s. Kap. 3.1). Zudem war bekannt, dass TcpC sich während der Infektion bestimmter Zelltypen wie HCV29 Zellen womöglich selbst spaltet (vgl. Abb. 13B). Daher wurde anhand reinem TcpBs und reiner TcpC-Varianten geprüft, ob diese *in vitro* proteolytische Aktivität zeigen. Hierzu wurde wie in Kap. 2.4.12 beschrieben ein Protease-Assay durchgeführt. Wie aus Abb. 22A hervorgeht, zeigen TIR-TcpC und die Monomerfraktion von Delta-TcpC nur geringe proteolytische Aktivität. Die per Gelfiltration separierte Dimerfraktion von Delta-TcpC sowie die Kombination der N- und C-terminalen TcpC-Fragmente führt jedoch zu erhöhter Spaltung des Substratproteines Casein. Vollängen TcpB erwies sich als deutlich proteolytisch aktiv, wobei diese Aktivität durch die Zugabe von Breitband Protease-Inhibitor für Serin-, Aspartat-, Cystein und Metalloprotease supprimiert werden kann. Da niemals ausreichend TcpC für umfangreiche funktionelle Studien gereinigt werden konnte, wurde an Position 176 eine Ser→Ala Mutation eingeführt (s. Kap. 2.2.9.3). Diese AS liegt im Box 1 Motiv des Proteines und wurde gewählt, da sich in der Nachbarschaft auch Aspartat, Histidin und Glycin Seitenketten befinden und das Serin somit das katalytische Zentrum einer Serin-Protease darstellen könnte. Diese Mutante lies sich besser produzieren als TcpC und zeigte keinerlei proteolytische Aktivität (vgl. Abb. 22A). Um den Effekt dieser Mutante auch im Infektionskontext zu analysieren, wurde die Variante in pTcpC umklontiert (vgl. 2.2.10), sodass nach Transformation der Stamm *tcpC::kan* + pTcpC(S176A) generiert werden konnte. Wurden Wildtyp BMMs mit diesem Erreger in Kokultur infiziert, zeigte sich ein erhöhtes TNF Sekretionsniveau wie auch nach Infektion mit *tcpC::kan* im Vergleich zur CFT073-induzierten TNF-Freisetzung (s. Abb. 22B). Dies war auch wiederholbar im Transwellsystem (Daten nicht abgebildet). Die Menge an intrazellulär lokalisiertem TcpC(S176A) war in unterschiedlichen Zelltypen sowie nach Inkubation in Transwellkammern vergleichbar mit der Menge an TcpC, wie in Abb. 22C für die Infektion von RAW Makrophagen demonstriert ist. Der Phänotyp der Mutante kann also nicht auf die Expressionsrate zurückgeführt werden. Ob der TNF-reduzierende Effekt von funktionellem TcpC jedoch durch dessen proteolytische Aktivität innerhalb der Wirtszelle gefördert wird oder wichtig für die autoproteolytische Prozessierung des Proteines ist, wie bleibt ungeklärt.

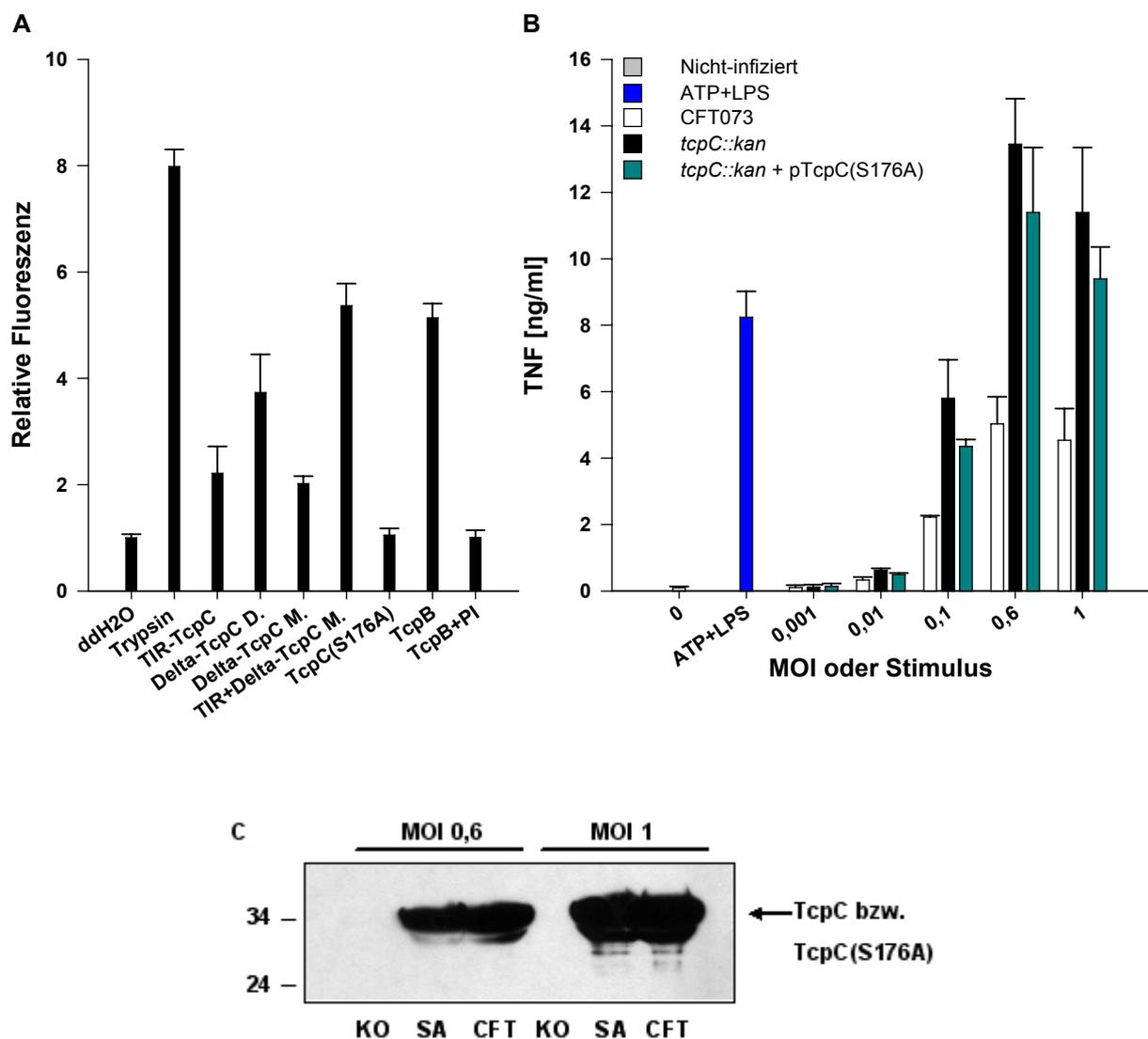


Abbildung 22: TcpC und TcpB, nicht jedoch TcpC(S176A) zeigen proteolytische Aktivität. (A) Die genannten reinen rekombinanten Proteine (je 10 μ g bzw. je 5 μ g im Ansatz TIR-TcpC + Delta-TcpC) wurden im Protease-Assay (Sigma) für 2 h mit FITC-markiertem Casein-Substrat inkubiert. Nach TCA-Fällung der Ansätze und protokollgemäßer Aufarbeitung der Proben wurde die Fluoreszenz an einem Twinkle LB 970 gemessen (485 \rightarrow 535). Die Signale wurden auf den Wert der ddH₂O-Probe (= 1) normalisiert. D. = Dimer, M. = Monomer, PI = TcpB wurde vor dem Experiment Protease-Inhibitor (1:50) zugesetzt. (B) Wildtyp BMMs ($1,5 \times 10^6$ /well) wurden mit der genannten MOI des jeweiligen Erregers für 4,5 h infiziert. ATP (5 mM) und LPS (200ng) dienen als Positivkontrolle. Hierauf wurde die TNF-Konzentration im Überstand durch ELISA-Messung ermittelt. (C) Intrazelluläre Akkumulation von TcpC bzw. TcpC(S176A) nach 5-stündiger Infektion von RAW Makrophagen (2×10^6 /well) mit der angegebenen MOI des jeweiligen Erregers. KO = *tcpC::kan*, SA = *tcpC::kan* + pTcpC(S176A), CFT = CFT073. Alle Standardabweichungen beziehen sich auf die Ergebnisse dreier individueller Kulturen eines Experimentes. Markerangabe in kDa.

3.5.2 *In vitro* Verdau von IRAK-1, IRAK-4 und MyD88 mit TcpB

Durch Transfektionsexperimente seitens Susanne Dürr innerhalb der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass die Anwesenheit von TcpB die Menge von kotransfiziertem IRAK-1 und MyD88, nicht aber von IRAK-4 beeinflusst. Um im zellfreien System analysieren zu können, ob TcpB direkt als Protease für ein intrazelluläres TLR-Adaptermolekül fungiert, wurden durch Transfektion gewonnenes humanes IRAK-1-flag (77,7 kDa), IRAK-4-flag (51,5 kDa) und MyD88-myc (33,2 kDa) wie unter Punkt 2.4.10 beschrieben affinitätschromatographisch aufgereinigt und in unterschiedlichen Kombinationen mit hochreinem TcpB koinkubiert.

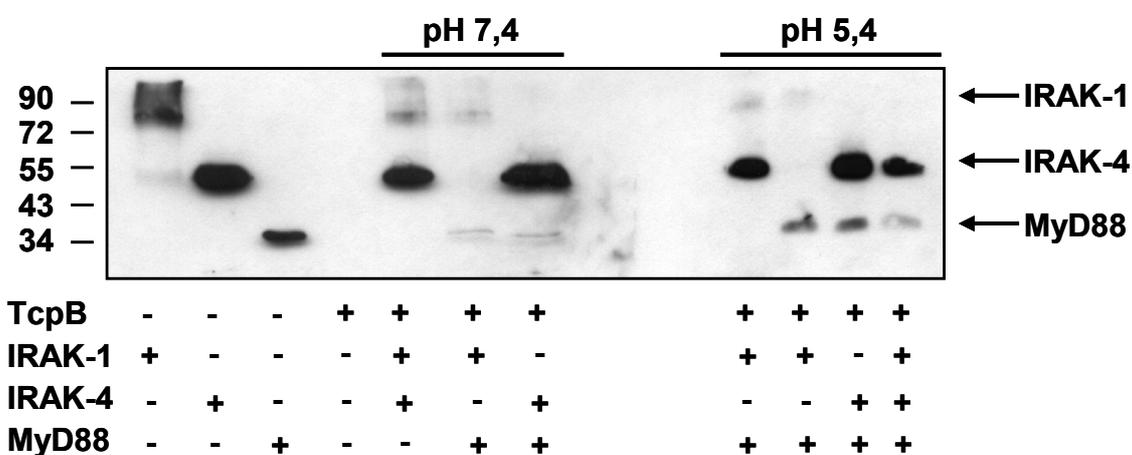


Abbildung 23: *In vitro* Verdau von IRAK-1, IRAK-4 und MyD88 mit TcpB. IRAK-1-flag (= 1, je 35 µg), IRAK-4-flag (= 4, je 50 µg) sowie MyD88-myc (= M, je 20 µg) wurden durch Transfektion gewonnen und affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Proteine wurden einzeln oder in Kombinationen in PBS (+10 µl RPMI) mit oder ohne TcpB (50 µg) bei 37°C (300 rpm) im gleichen Endvolumen für 1 h koinkubiert. Die einzelnen Ansätze wurden dann mit Lämmli-DTT versehen und mittels Western-Blot Analyse (anti-myc, anti-flag) visualisiert. TcpB ist als *strep*-gelabeltes Protein nicht sichtbar. Proteinmarkerangabe in kDa.

Abbildung 23 zeigt, dass die nach Ende der Inkubation vorhandene Menge an IRAK-1 und MyD88 in Anwesenheit von TcpB reduziert ist. Es wurden jedoch weder durch Western-Blot Analyse noch durch Coomassie-Färbung Abbaubanden der Proteine detektiert, da bereits die Visualisierung von nicht-prozessiertem IRAK-1 und MyD88 nahe am Detektionslimit lag. Es gilt daher mit erhöhter Proteinmenge zu überprüfen, ob TcpB in der Tat direkt IRAK-1 oder MyD88 degradieren kann und ob hierfür Anwesenheit mehrerer TLR-Adapter gleichzeitig erforderlich ist. Wünschenswert wäre ebenfalls ein höherer Reinheitsgrad der eukaryontischen Proteine, die im Vergleich zu TcpB lediglich affinitätschromatographisch aufgereinigt wurden, weshalb eine Kontamination durch nicht Coomassie-visualisierbare HEK-Proteinen nicht ausgeschlossen werden kann.

Des Weiteren müssten Protease-tot Varianten von TcpB konstruiert werden. Als Kandidaten für die Mutagenese kommen analog zur Variante TcpC(S176A) zwei Serine im Box1 Motiv von TcpB in Frage, Serin 124 und Serin 127, welche nach *in silico* Betrachtung Kandidaten für das katalytische Zentrum einer Serin-Protease sein könnten. Näher mit der Thematik befasste sich die in der Arbeitsgruppe von Prof. Miethke erstellte Masterarbeit von Andreas Minsinger.

3.6 TcpC induziert die IL-1 β Sekretion durch Aktivierung des Inflammasoms, was das Wachstum von CFT073 fördert

3.6.1 IL-1 β als Effektormolekül des Inflammasoms

Interleukin-1 β (IL-1 β) ist ein potentes proinflammatorisches Zytokin, welches sowohl eine wichtige Rolle als Effektormolekül für das angeborene wie auch das adaptive Immunsystem spielt, darüber hinaus aber auch zur Entstehung von Entzündungsreaktionen, Fieber und septischem Schock beiträgt (Dinarello, 1996). TLR- und andere proinflammatorische Stimuli induzieren die transkriptionelle Aktivierung des IL-1 β Promotors. Im Zytosol aktivierter Makrophagen und Monozyten kommt es dann zur Synthese und Spaltung des inaktiven pro-IL-1 β (Dinarello, 2006). Intensive Studien der letzten Jahre zeigen, dass die für die pro-IL-1 β Spaltung benötigte Cystein-Protease Caspase-1 durch Assemblierung des Inflammasoms, eines großen Multiproteinkomplexes, aktiviert wird (Martinon *et al.*, 2002), wie in Kap. 1.1.2.2 detailliert beschrieben ist. Die folgenden Abschnitte befassen sich mit der Rolle der Tcps am Prozess der Caspase-1 Aktivierung sowie IL-1 β Freisetzung.

3.6.1.1 TcpC induziert die Sekretion von IL-1 β

Nebst den proinflammatorischen Zytokinen TNF, IL-6, IL-8, IL12p40 wurden nach Infektionsexperimenten mit CFT073 auch der IL-1 β Gehalt der Überstände analysiert. Interessanterweise schien sich hier der in Kap. 3.2 beschriebene Phänotyp umzukehren: Alle TcpC exprimierenden Stämme zeigten eine erhöhte IL-1 β Induktion in der Wirtszelle im Vergleich zu *tcpC::kan*, wie in Abbildung 24 für HCV29 Zellen (A) und Wildtyp BMMs (B) gezeigt ist. Als besonders effiziente Produzenten von IL-1 β erwiesen sich darüber hinaus GM-CSF-DCs. Bei HCV29 Zellen war die Sekretion im pH Bereich zwischen pH 5,0 und 6,0 am

stärksten ausgeprägt, was dem saueren Milieu des Urins entspricht. RAWs hingegen konnten nur bei hohen Erreger MOIs zur Sekretion von IL-1 β stimuliert werden, was auf die ASC-Defizienz dieser Zelllinie zurückzuführen sein mag (Pelegrin *et al.*, 2008). Stets war die IL-1 β Sekretion für alle Zelltypen jedoch in Anwesenheit von TcpC stärker ausgeprägt. Nach etwa 3-5 h erreicht das IL-1 β Niveau ein Maximum und fällt danach wieder ab (Daten nicht abgebildet), was sich dadurch erklärt, dass mit Einsetzen des TLR-inhibitorischen Effekts von TcpC kein pro-IL-1 β mehr produziert werden kann, da dessen Promotor u.a. NF- κ B abhängig ist (Cogswell *et al.*, 1994).

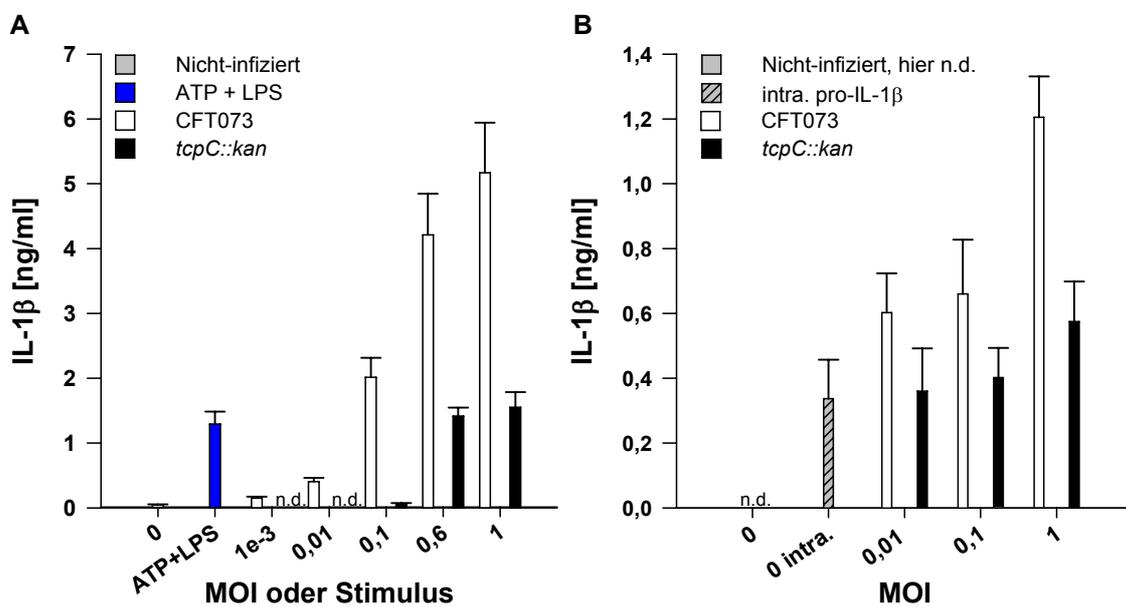


Abbildung 24: TcpC induziert die Sekretion von IL-1 β . 2×10^6 HCV29 Zellen/well (A) wurden für 4 h mit der angegebenen MOI des jeweiligen Erregers infiziert oder alternativ mit ATP (5mM) und LPS (100 ng) stimuliert (pH = 6,9). N.d. = Nicht determinierbar gemäß der Standard-ELISA-Kurve. (B) Wildtyp BMMs (2×10^6 /well) wurden für 4 h mit der angegebenen MOI des jeweiligen Stammes infiziert und im Anschluss wie auch in (A) die IL-1 β Konzentration im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Intra. bezeichnet die Menge an intrazellulärem (pro)-IL-1 β , welches in einem nicht-infizierten Lysat bestimmt wurde (Verdünnung 1:10). Alle angegebenen Standardabweichungen beziehen sich auf die Ergebnisse dreier individueller Kulturen eines Experimentes.

Ein ähnliches Phänomen der IL-1 β Induktion bei gleichzeitiger Reduktion der Sekretion anderer proinflammatorischer Zytokine ist für TlpA aus *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis beschrieben (Newman *et al.*, 2006). TlpA führt sowohl im Infektionskontext als auch als ektopisch exprimiertes Protein zur Prozessierung von pro-IL-1 β und Sekretion maturaen IL-1 β , allerdings nach Transfektion nur in der Anwesenheit von Caspase-1. Es ist jedoch nicht beschrieben, worauf dieser Effekt molekular zurückgeführt werden kann.

3.6.1.2 Die *TcpC*-induzierte Caspase-1 Aktivierung und IL-1 β Sekretion ist unabhängig von MyD88, jedoch ASC abhängig

Analog zur Untersuchung der MyD88-Abhängigkeit des immunsuppressiven Effekts von *TcpC* wurde analysiert, ob die IL-1 β Sekretionszunahme vom TLR-Adapter MyD88 beeinflusst wird. Wie aus Abbildung 25 hervorgeht, ist dies jedoch nicht der Fall. In MyD88-defizienten Zellen induziert CFT073 ebenfalls mehr IL-1 β Freisetzung als *tcpC::kan*. Der KO-Stamm führt in MyD88^{-/-} BMMs zu einer stärker ausgeprägte Zytokinantwort, was man anhand der höheren intrazellulären Erregermenge und Gesamtlast in den MyD88-defizienten Makrophagen (vgl. Kap.3.2.2) erklären kann. Da wt sowie MyD88^{-/-} Zellen über ein gewisses Basallevel an präformiertem pro-IL-1 β verfügen, ist die Sekretion von IL-1 β v.a. in der frühen Phase der Infektion zu beobachten, da durch die TLR-Inhibition seitens *TcpCs* (s. Kap. 3.2) die u.a. von NF- κ B abhängige Transkription des Zytokins verringert wird (Cogswell *et al.*, 1994). Bei MyD88 BMMs fand sich intrazellulär interessanterweise eine höhere Konzentration an (pro)-IL-1 β im Vergleich zu wt Makrophagen.

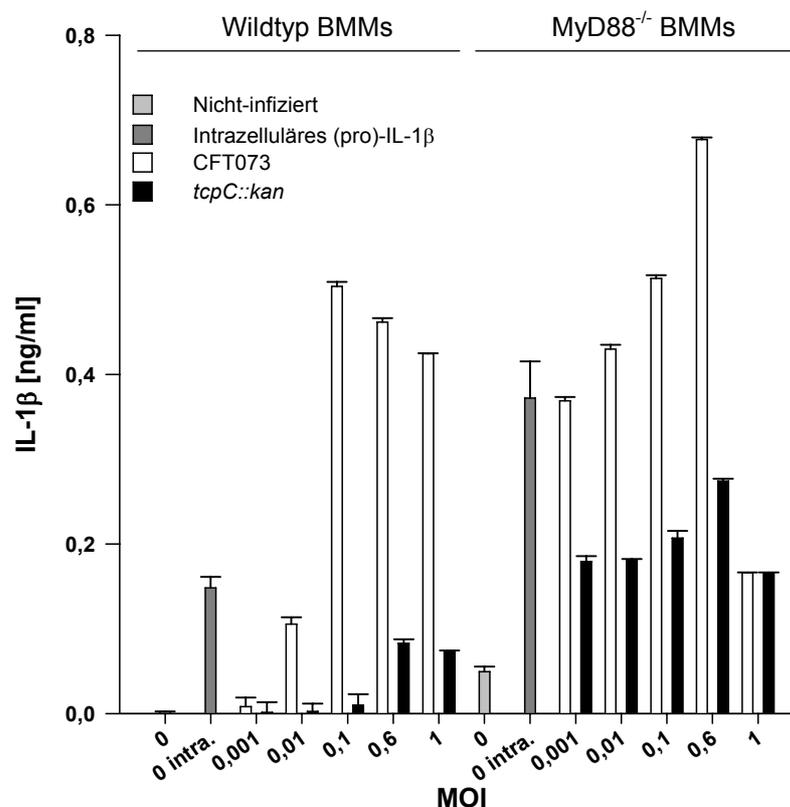


Abbildung 25: Die *TcpC*-induzierte IL-1 β Sekretion ist MyD88-unabhängig. Je 2×10^6 Wildtyp und MyD88^{-/-} BMMs wurden mit der angegebenen MOI des jeweiligen Erregers für 5,5 h infiziert. Es wurden sekretiertes IL-1 β sowie intrazelluläres (pro)-IL-1 β mittels ELISA-Messung bestimmt (Verdünnung 1:10). Die Standardabweichung bezieht sich auf die Ergebnisse dreier unabhängiger Kulturen eines Experimentes.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das Inflammasom als zentrale Plattform für die Caspase-1 Aktivierung sowie die IL-1 β Prozessierung und Sekretion als Interaktionsziel für TcpCs im Zusammenhang mit dem beobachteten IL-1 β Phänotyp in Betracht gezogen. Daher wurden Knochenmarkszellen von ASC-defizienten Mäusen für vergleichende Infektionsexperimente mit CFT073 und *tcpC::kan* herangezogen, um die Rolle dieses essentiellen Inflammasom-Adapterproteines näher zu bestimmen (s. Kap. 1.1.2.2). ATP und LPS Stimulation diente in diesen Experimenten als Positivkontrolle, da durch die Agenzien 2 Signale zur Inflammasom-aktivierung zur Verfügung gestellt werden (s. Abb. 1). Abbildung 26A zeigt, dass ASC eine entscheidende Rolle für die TcpC-induzierte IL-1 β Freisetzung in GM-CSF-DCs spielt, da in ASC-defizienten Zellen keine Sekretion des Zytokins im Gegensatz zu Wildtyp DCs zu beobachten ist. Dies gilt ebenfalls für BMMs von ASC^{-/-} Mäusen (s. Abb. 35, Kap. 4.3). Der TNF-reduzierende, MyD88-abhängige Effekt ist jedoch in Wildtyp und ASC^{-/-} Zellen vergleichbar und daher ASC-unabhängig (Abb. 26B).

Parallel zur Zytokinmessung wurde die relative Caspase-1 Aktivierung in DCs (Abb. 26C) sowie BMMs (Abb. 26D) von Wildtyp und ASC^{-/-} Zellen bestimmt. Im Einklang mit der verstärkten IL-1 β Sekretion nach Infektion mit CFT073 im Vergleich zu *tcpC::kan* findet man für CFT073 infizierte Zellen eine erhöhte Aktivierung der Caspase-1, wobei auch der TcpC-KO vermutlich aufgrund diverser Inflammasom stimulierender PAMPs und sekretierten Virulenzfaktoren wie Sat (s. Kap. 1.2) Caspase-1 zu aktivieren vermag. Diese Stimulation war jedoch erneut ASC-abhängig und konnte in ASC-defizienten DCs und BMMs nicht beobachtet werden. Mittels Western-Blot wurde zusätzlich die Präsenz des aktivierten Caspase-Fragmentes p10 im konzentrierten Überstand der DC-Kulturen geprüft (s. Abb. 26E, vgl. Kap. 1.1.2.2).

Hier zeigt sich erneut die ASC-Abhängigkeit der Caspase-1 Aktivierung, da das sekretierte p10 Fragment lediglich in Überständen von Wildtyp DCs für hohe MOIs an CFT073 bzw. *tcpC::kan*, nicht jedoch in Überständen von ASC^{-/-} Zellen beobachtet werden konnte.

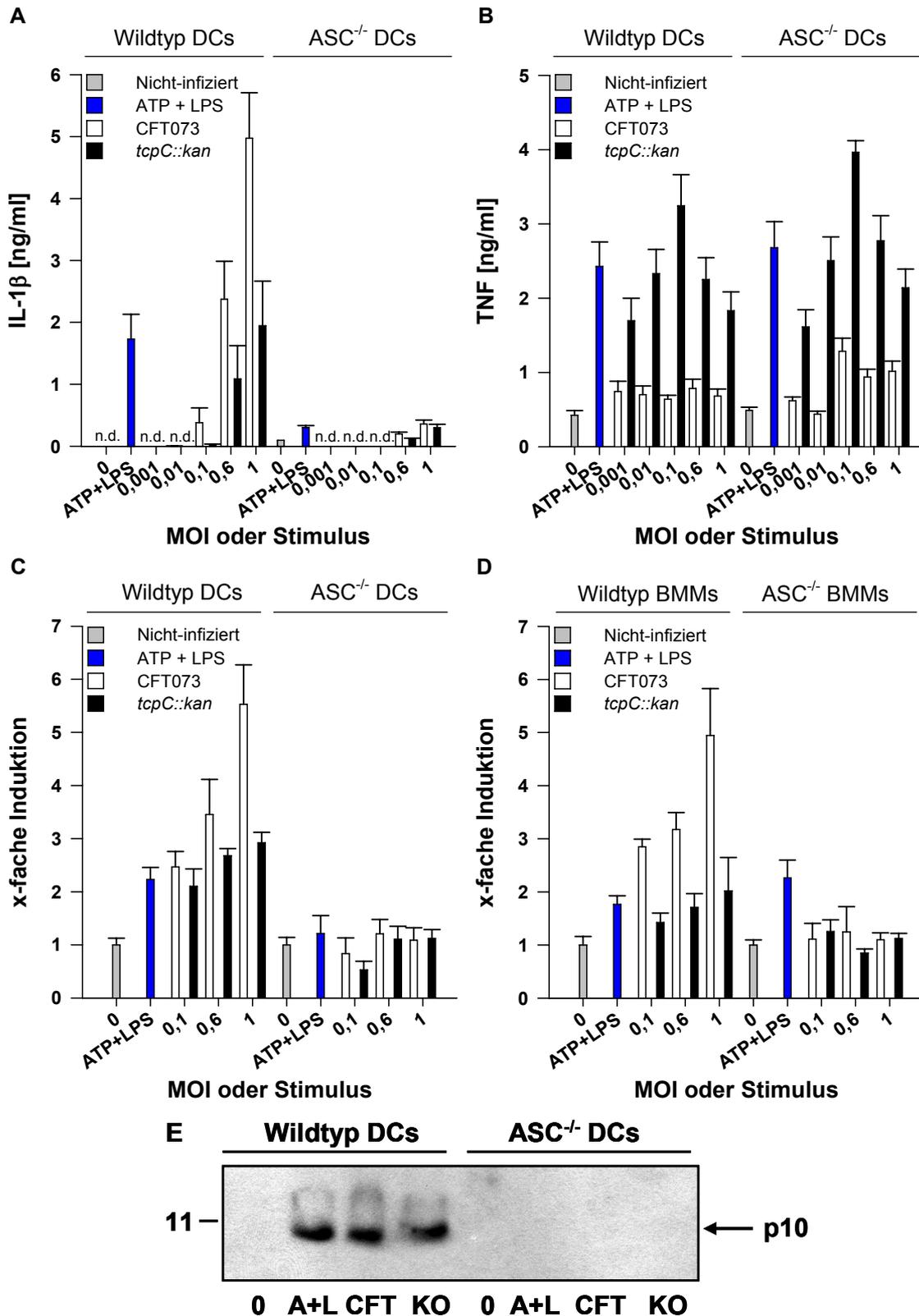


Abbildung 26: TpcC induziert ASC-abhängig Caspase-1 Aktivierung und IL-1 β Sekretion. IL-1 β (A) bzw. TNF Sekretion (B) von je 2×10^6 GM-CSF DCs nach 3,5 h der Stimulation (3,5 mM ATP, 100 ng LPS) bzw. Infektion mit der angegebenen MOI des jeweiligen Erregers. Relative Caspase-1 Aktivierung in 2×10^6 GM-CSF DCs (C) bzw. BMMs (D). Stimulation bzw. Infektion wie in (A,B).

Zu **Abbildung 26**: Die Standardabweichungen beziehen sich auf je drei individuelle Kulturen. (E) 2×10^6 GM-CSF DCs (in Opti-MEM) wurden mit CFT073 bzw. dem TcpC-KO für 3 h infiziert (MOI = 1) bzw. stimuliert (A = ATP 2,5 mM, L = LPS 200ng). 20fach konzentrierte Überstände wurden mittels Western-Blot auf die Präsenz von Caspase-1 p10 hin analysiert. Markerangabe in kDa.

TcpC verfügt über ein N-terminales singuläres Cystein (AS 12), welches vermutlich eine wichtige Rolle für die Oligomerisierung und Stabilität des Proteines spielt (Daten nicht abgebildet). Darüber hinaus sollte überprüft werden, ob dieser Rest Einfluss auf die Sekretion und Aufnahme des Proteines und somit auf den IL-1 β induzierenden Phänotyp hat. Zu diesem Zwecke wurde die Mutante Cys12 \rightarrow Ser konstruiert (s. 2.2.9.3) und nach Umklonierung in das pTcpC-Plasmid (vgl. Kap. 2.2.10) und Transformation des Produktes in den TcpC-KO Erreger der Stamm *tcpC::kan* + pTcpC(C12S) erhalten. Mit dieser Mutante wurden sowohl in Kokultur als auch im Transwellssystem Knochenmarksmakrophagen und DCs sowie RAW Makrophagen vergleichend mit CFT073 Wildtyp, *tcpC::kan* oder *tcpC::kan* + pTcpC(S176A) infiziert. Die Variante verhielt sich bzgl. der Reduktion der TNF Sekretion exakt wie der Wildtyp (Daten nicht abgebildet). Die Induktion der IL-1 β Freisetzung lag allerdings unter dem Niveau des Wildtyperregers (s. Abb. 35, Kap. 4.4). Die Proteinmenge an TcpC(C12S) im Überstand war wie aus Abbildung 27 hervorgeht identisch zu der von TcpC. Lediglich in der Lysatfraktion fand sich weniger TcpC(C12S). Das ausserhalb der TIR-Domäne lokalisierte Cys12 beeinflusst folglich in den untersuchten Zelltypen *in vitro* nicht den immunsuppressiven Phänotyp von TcpC. Es mag jedoch dessen Dimerisierung und Aufnahme in die Wirtszelle und damit einhergehend die IL-1 β Induktion unterstützen, was durch exakte Quantifizierung der Sekretions- und Aufnahmerate durch native Gelelektrophorese analysiert werden könnte.

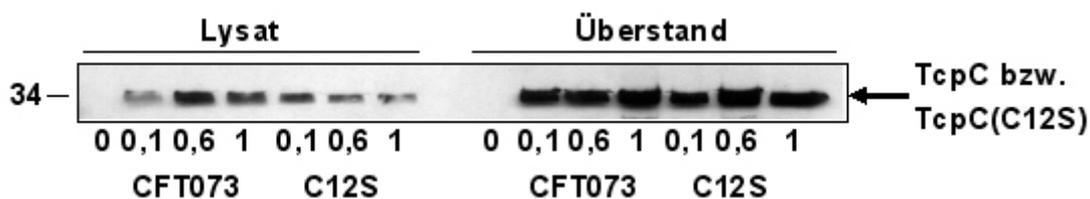


Abbildung 27: Sekretion und Aufnahme von TcpC(C12S). Wildtyp BMMs (2×10^6 /well) wurden für 5 h mit der angegebenen MOI des jeweiligen Erregers infiziert (C12S = *tcpC::kan* + pTcpC(C12S)) und die Expression von TcpC bzw. TcpC(C12S) in der Lysatfraktion (NP40-Lysat, 1/10 geladen) sowie im Überstand der Kultur (10fach konzentriert) mittels Western-Blot nach SDS-PAGE analysiert.

3.6.1.3 TIR-TcpC und TIR-TcpC elongated alleine induzieren Caspase-1 Aktivierung und die Freisetzung von IL-1 β

Nachdem TIR-TcpC alleine dazu befähigt ist, die TNF Sekretion der Wirtszelle nach Stimulation zu reduzieren (s. Kap. 3.4.1), sollte überprüft werden, ob die IL-1 β Sekretion ebenso allein in Anwesenheit der bakteriellen TIR-Domäne induziert wird. Vergleichend zu TIR-TcpC wurde die N-terminal elongierte Variante TIR-TcpC elongated (AS 116-307) für diese Studien eingesetzt.

Diese TcpC-Variante enthält vor der TIR-Domäne noch eine weitere hydrophobe Region welche geringfügige Ähnlichkeit zur Zytotoxizität vermittelnden, Caspase-1 aktivierenden Region in IpaB, einem Virulenzfaktor von *Shigella flexneri* aufweist (Guichon *et al.*, 2001).

TIR-TcpC und verstärkt noch TIR-TcpC elongated vermitteln als exogener Stimulus die Sekretion von IL-1 β in Wildtyp BMMS, wie in Abb. 28A gezeigt. Dies ist unabhängig vom Erregerkontext, daher aber abhängig von der Gabe von LPS als TLR-stimulierendem Agens. TIR-TcpC elongated ist dabei wie auch TIR-TcpC in der Lage, die durch LPS stimulierte TLR4-medierte TNF Sekretion der Makrophagen zu erniedrigen, d.h. Aufnahme und Funktion der TIR-Domäne sind auch in der Mutante voll ausgeprägt (s. Abb. 28B).

Die Caspase-1 Aktivierung, die der IL-1 β Sekretion vorangeht ist nach Stimulation mit TIR-TcpC elongated noch deutlicher ausgeprägt als für TIR-TcpC, wie aus Abb. 28C hervorgeht. Da beide Varianten über die identische HIV Tat-ähnliche C-terminale Struktur verfügen (vgl. Kap. 3.4.3) gilt es noch zu überprüfen, ob die IL-1 β -Freisetzung ein Phänomen ist, welches mit der Proteinaufnahme einhergeht, oder ob die IpaB ähnliche Sequenz TcpCs entscheidend für dessen Inflammasom-aktivierendes Potential ist.

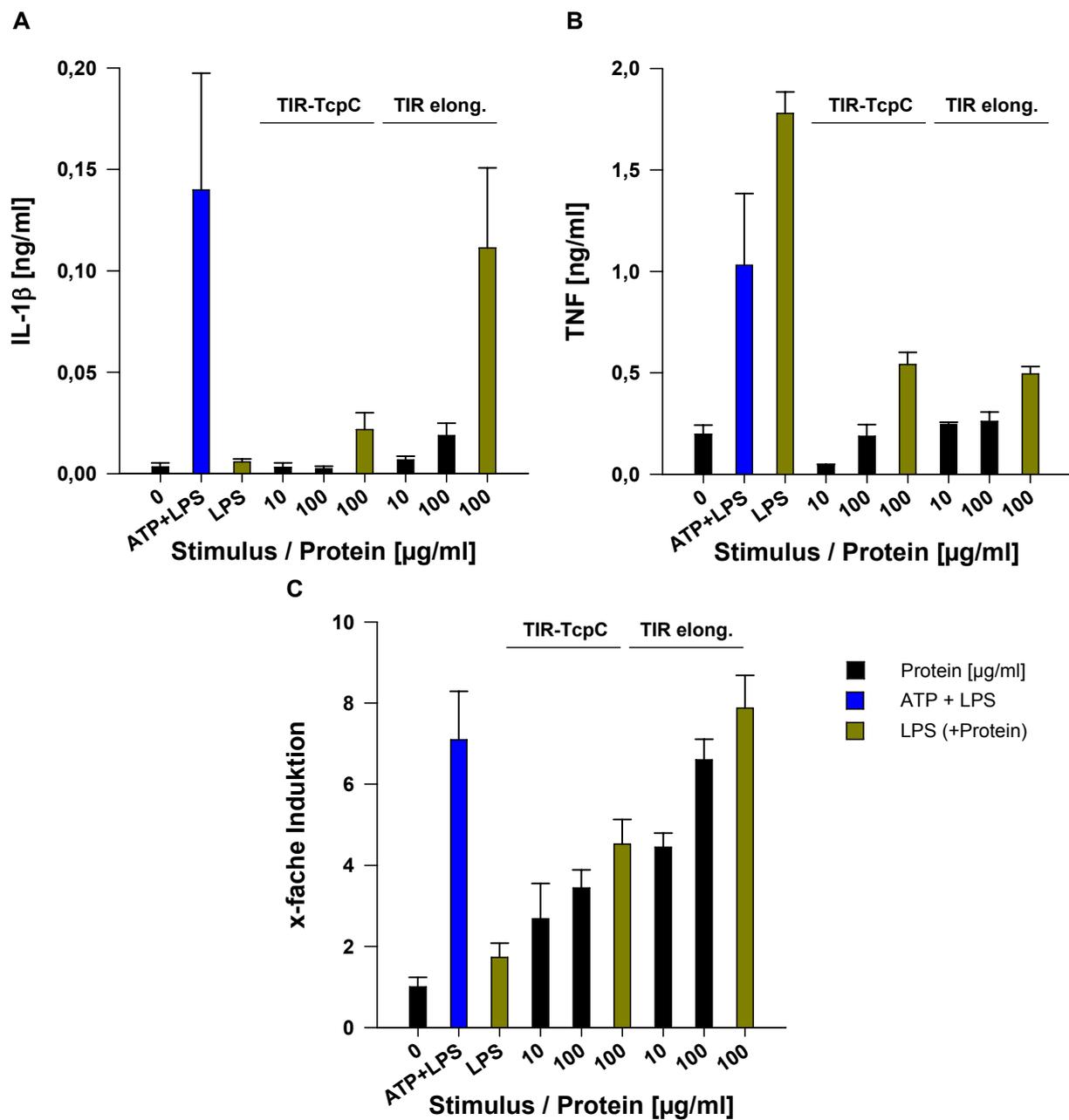


Abbildung 28: TIR-TcpC und verstärkt TIR-TcpC elongated aktivieren Caspase-1 und führen zu erhöhter IL-1 β Sekretion. (A, B) Je 2×10^6 Wildtyp BMMs wurden für 3,5 h mit der angegebenen Konzentration an TIR-TcpC bzw. TIR-TcpC elongated (TIR elong.) sowie alternativ mit ATP (3,5 mM) und hochreinem LPS (200 ng) stimuliert. Im Anschluss wurden sekretiertes IL-1 β (A) bzw. TNF (B) im Überstand mittels ELISA bestimmt. (C) Zusätzlich wurde in den NP-40 Lysaten der Zellen aus (A, B) die relative Caspase-1 Aktivierung am Ende der Stimulation gemessen. Alle Standardabweichungen beziehen sich auf die Ergebnisse dreier individueller Kulturen eines Experimentes.

3.6.1.4 Interaktionsstudien mit *TcpC*-Varianten und intrazellulären Inflammasom-Komponenten

Um die ASC-Abhängigkeit der durch *TcpC* induzierten Caspase-1 Aktivierung sowie der IL-1 β Freisetzung auf molekularer Ebene zu verstehen, wurden Pull-Down Assays mit den "Bait Proteinen" TIR-*TcpC*, delta-*TcpC* sowie *TcpC*(S176A) durchgeführt. Hierdurch sollte konkreter bestimmt werden, welcher Teil des Proteines für den Inflammasom-aktivierenden Phänotyp verantwortlich ist. Als Kandidatenproteine fungierten neben humanem ASC-flag (21,6) humanes NALP3-myc inkl. LRR-Sequenz (118 kDa), Nod1-myc (107,7 kDa), myc-IPAF (116,2 kDa) sowie Caspase-1, alternativ als C-terminal flag-gelabelte Variante (45,2 kDa) bzw. N- oder C-terminal myc-markiert (~ 47 kDa). Diese Proteine wurden als HEK293T-Zelllysate von Susanne Dürr zur Verfügung gestellt und wie unter Punkt 2.4.9 beschrieben für die Interaktionsstudien aufbereitet. Während verschiedene Variationen der Pull-Down Bedingungen sowie der "Bait Proteine" keinerlei Interaktion zwischen *TcpC* und IPAF, Nod1 (beide nicht abgebildet) oder NALP3 (s. Abb. 29A) zeigte, konnte zur Wechselwirkung zwischen ASC und *TcpC* keine Aussage getroffen werden, da der Inflammasom-Adapter unter allen gewählten Puffer- und Salzkonzentrationen unspezifisch sowohl an Agarose- als auch Methylacrylatsäulenmaterial band (s. Abb. 29A). Interaktionsversuche zwischen Delta-*TcpC* sowie *TcpC*(S176A) nicht aber TIR-*TcpC* mit Caspase-1-flag ergaben zunächst eine Bande in Höhe von etwa 26 kDa (s. Abb. 29B). Die Bande wurde nur bei niedrigen Salzkonzentrationen im Waschpuffer und nach vorheriger Dialyse restlicher Protease-Inhibitoren erhalten. Zunächst wurde spekuliert, dass es sich hierbei um ein Spaltprodukt der Caspase handeln könnte, welches durch Auto-Aktivierung in Anwesenheit der N-terminalen *TcpC*-Domäne entsteht. Da jedoch Kontrollversuche mit C- sowie N-terminal gelabelter myc-Caspase-1 als Kandidatenprotein nicht zum gleichen Resultat führten (s. Abb. 29C), wurde auch Caspase-1 als direkter Interaktionspartner für die getesteten *TcpC*-Varianten ausgeschlossen.

Weiterführend gilt es daher zu prüfen, ob *TcpCs* unter modifizierten Bedingungen ggf. in Anwesenheit mehrerer "Scaffold" Proteine an eine zytoplasmatische Inflammasom-Komponente binden. Zudem gilt es noch die membranständigen purineren Rezeptoren vom P2X₇-Subtyp sowie den assoziierten Halbkanal Pannexin (Pelegriin & Surprenant, 2006) als Interaktionspartner in Betracht zu ziehen. Beide Moleküle sind essentiell für die Bereitstellung des zweiten Inflammasom-induzierenden Signales sind und könnten einen Angriffspunkt für *TcpC* darstellen.

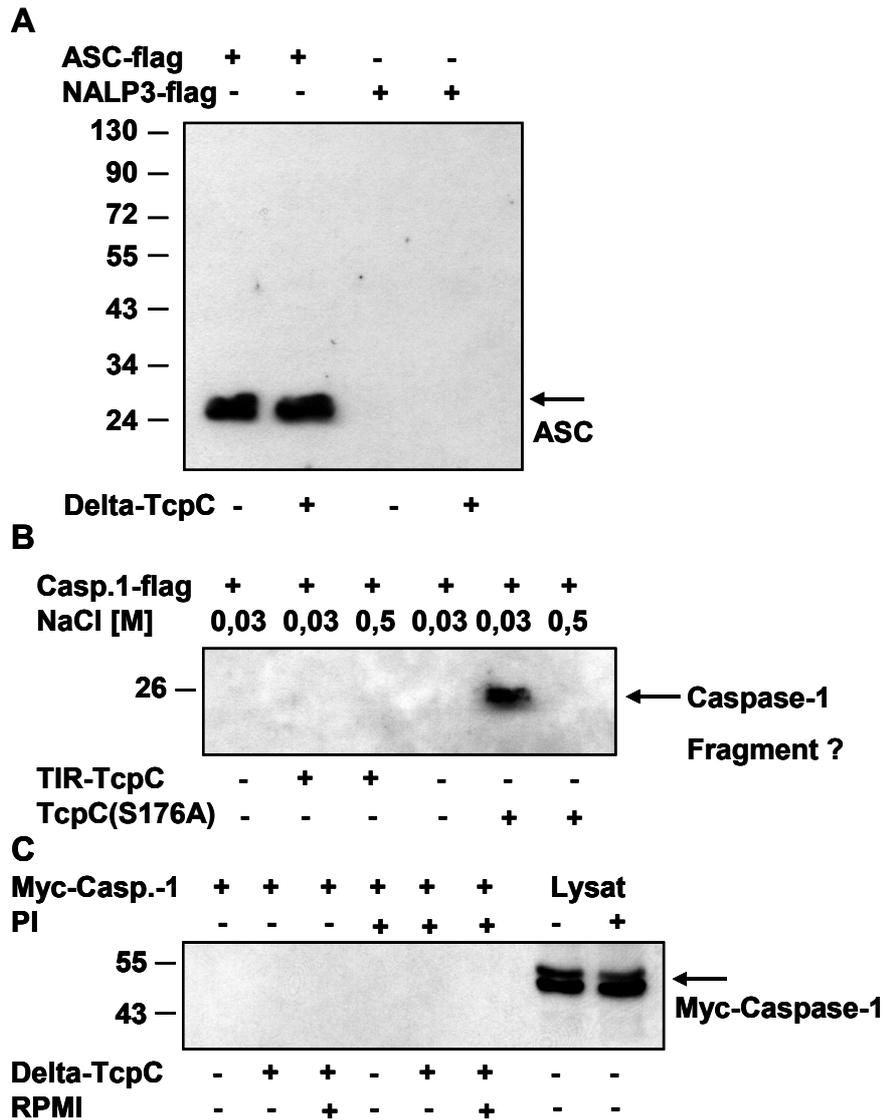


Abbildung 29: TcpC-Varianten binden spezifisch weder ASC, NALP3 noch Caspase-1. (A) Aus HEK293T Zellen, transfiziert mit humanem ASC-flag (21,6 kDa) oder NALP3-myc (118 kDa), wurden Lysate für Pull-Down Assays hergestellt. Je 80 µg *Strep*-tag II markiertes Delta-TcpC wurden auf Agarose-Beads immobilisiert (+), nicht-beladene Beads (-) dienen als Spezifitätskontrolle. Nach 1,5-stündiger Interaktion (1 h 4°C, 30 min 25°C) mit je 1,5 mg Totallysat wurde nicht gebundenes Protein eluiert und die Beads dreimal mit Acetat-Puffer (0,3 M NaCl) gewaschen. Hierauf erfolgten saure Elution und die Western-Blot Analyse (mouse anti-flag und anti-myc). (B) Pull-Down wie unter (A) beschrieben. Als Kandidatenlysate dienten zuvor mit Caspase-1-flag (= Casp.1-flag, 45,2 kDa) transfizierte HEK293T Zellen (je 1,5 mg Totallysat). Als "Bait Proteine" fungierten je 80 µg TIR-TcpC bzw. TcpC(S176A). Für die Waschschrte wurde Acetat-Puffer mit 0,03 bzw. 0,5 M NaCl verwendet (Western-Blot Nachweis durch mouse anti-flag Antikörper). (C) Hier diente ein myc-Caspase-1 (= myc-Casp.1, ~ 47 kDa) transfiziertes HEK293T Lysat als Ausgangsmaterial für einen Pull-Down mit 80 µg Delta-TcpC. Die Durchführung erfolgte wie unter (A) beschrieben, jedoch wurden während der Inkubation mit je 3 mg Lysat alternativ 10 µl RPMI zugefügt (+). Des Weiteren enthielten einige Ansätze (+) Protease-Inhibitoren (= PI, 1:50). Die Waschschrte wurden hier mit TBS durchgeführt (Western-Blot: mouse anti-myc Antikörper). Als Positivkontrolle dienten myc-Caspase-1 Lysate (+/- PI). Alle Markerangaben in kDa.

3.6.2 IL-1 β als möglicher Wachstumsfaktor für pathogene *E. coli*

Die durch TcpC induzierte Caspase-1 Aktivierung und IL-1 β Freisetzung mag auf den ersten Blick paradox erscheinen, da der Erreger hierdurch das Immunsystem durch die IL-1 β -medierte Mobilisierung von Neutrophilen und Leukozyten auf den Infektionsherd hinweist. Dies steht im Gegensatz zur TIR-Domänen abhängigen TLR-Suppression durch TcpC, welche allerdings gewährleistet, dass pro-IL-1 β lediglich in der frühen Phase der Infektion produziert werden kann. Es sollte daher untersucht werden, ob CFT073 eventuell unmittelbar selbst von der Zytokinsekretion der Wirtszelle profitieren kann.

Bereits 1991 war beschrieben worden, dass humanes IL-1 β , jedoch nicht TNF oder IL-4, das Wachstum pathogener *E. coli* Erreger fördert, wohingegen avirulente Stämme nicht durch das Zytokin beeinflusst wurden (Porat *et al.*, 1991). Dieser Wachstumseffekt konnte durch die Zugabe des IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) aufgehoben werden. Im Folgenden wurde daher analysiert, inwiefern auch CFT073 durch die Zugabe des Zytokins und dessen Antagonisten im Infektionskontext und in reiner Bakterienkultur beeinflusst wird.

Sofern RAW264.7 Makrophagen in Anwesenheit von 2 μ g/ml IL-1ra (murin) mit CFT073 und *tcpC::kan* infiziert wurden, konnte eine leichte Abnahme der Gesamterregerlast für beide Stämme und eine deutlicher ausgeprägtere Erniedrigung der intrazellulären Erregermenge im Falle des IL-1 β induzierenden CFT073 Stammes festgestellt werden (s. Abbildung 30). Vor dem Hintergrund, dass RAWs eher geringe Mengen an IL-1 β im höheren pg-Bereich sekretieren, genügt die gewählte Konzentration an IL-1ra, um einen deutlichen Überschuss anzubieten.

Um einen IL-1-abhängigen, jedoch nicht TcpC-induzierten initialen Wachstumseffekt zu quantifizieren, erschien es jedoch sinnvoller, eine Zielzelle wie DCs mit höherem IL-1 Sekretionspotential zu wählen bzw. das Zytokin in definierten Mengen zu substituieren, da hiermit zudem der Effekt auf den schwächer IL-1 β induzierenden Stamm *tcpC::kan* analysiert werden kann.

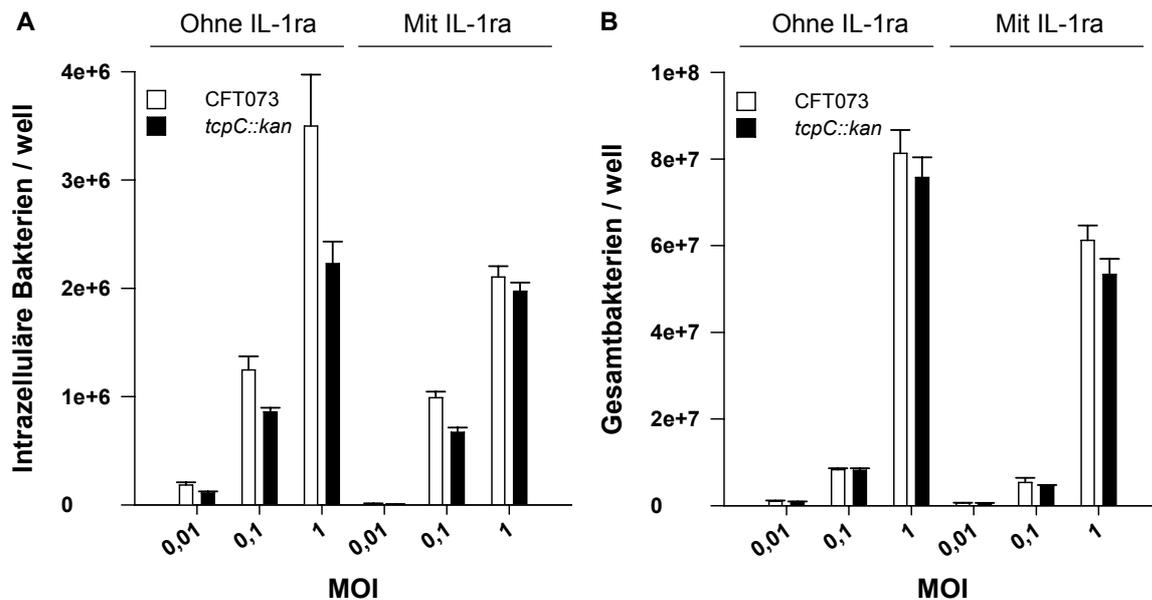


Abbildung 30: IL-1ra reduziert die intra- und extrazelluläre Bakterienlast. 1×10^6 RAW Makrophagen (RPMI, 5% FCS) wurden mit der angegebenen MOI an CFT073 bzw. *tcpC::kan* für 5 h in Anwesenheit oder Abwesenheit von IL-1ra (2 $\mu\text{g/ml}$) infiziert. Anschließend wurden die extrazellulären mit Gentamicin abgetötet und die intrazelluläre Bakterienlast nach mehreren Waschschrritten durch Plattierung in seriellen Verdünnungsreihen bestimmt (A). (B) Alternative wurde jeweils für separate wells die Gesamtbakterienlast ermittelt. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die Standardabweichung dreier individueller Kulturen eines Experimentes.

Zunächst wurde ein möglicher IL-1 β -induzierter Wachstumseffekt in reiner Bakterienkultur untersucht. Wie in Abb. 31A gezeigt, wurden daher CFT073, der TcpC-KO sowie BL21 Codon Plus RIL als avirulenter Kontrollstamm in Anwesenheit von murinem IL-1 β , IL-1ra oder antagonistisch mit beiden Zytokinen unter Zellkulturbedingungen angezogen. Die IL-1 β Konzentration (225 $\mu\text{g/ml}$) wurde hierbei so gewählt, dass sie derjenigen in CFT073 infizierten BMM-Überständen ähnelte. Unter diesen Bedingungen wachsen die zur Adhärenz tendierenden UPEC Stämme generell besser als BL21. IL-1 β führt darüber hinaus allerdings zu einer eindeutigen Erhöhung des Wachstumspotentials beider UPEC Stämme, wohingegen keine Beeinflussung des Wachstums von BL21 beobachtet werden konnte. IL-1ra alleine führte ebenfalls zu einer leichten Zunahme des Pathogenwachstums, v.a. aber ist der Rezeptorantagonist im Überschuss dazu befähigt, das IL-1 β -induzierte Bakterienwachstum zu minimieren. Diese Beobachtungen bestätigten sich in umfangreicheren Titrationsstudien. Wie aus Abb. 31B hervorgeht, reagiert nur der pathogene Stamm CFT073 auf steigende Konzentrationen an IL-1 β mit erhöhtem Wachstum, nicht jedoch der BL21 Kontrollstamm. Auch IL-1ra alleine appliziert scheint bis zu einer gewissen Sättigungskonzentration wachstumsfördernde Wirkung auf den Erreger zu nehmen. Bereits in niedrigen

Konzentrationen führt der Antagonist allerdings zur Erniedrigung des IL-1 β -medierten Wachstumsphänomens und vermag im Überschuss den Effekt ganz aufzuheben.

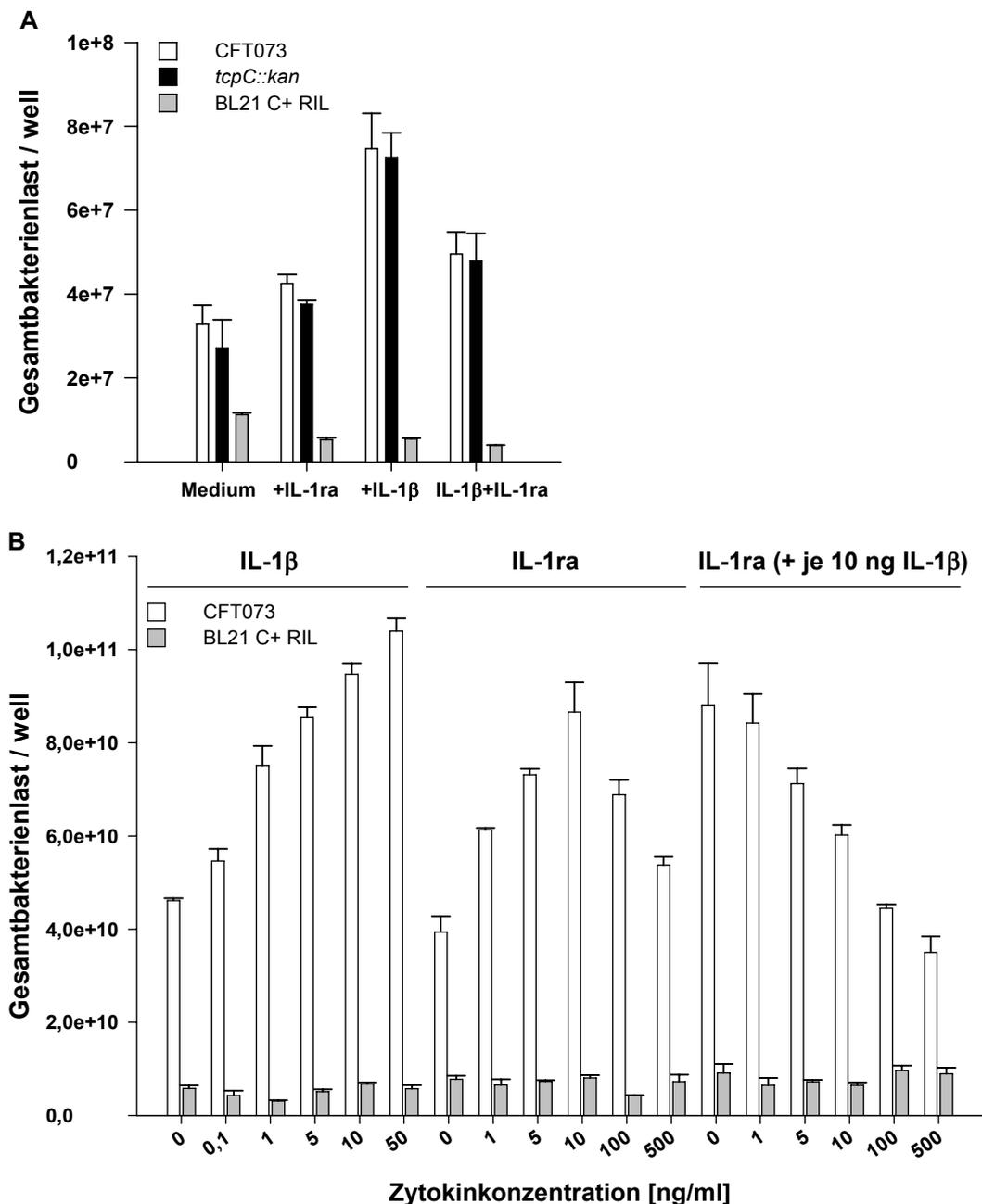


Abbildung 31: IL-1 β fördert das Wachstum von CFT073, was durch IL-1ra antagonisiert werden kann. (A) Initial je 1.000 Bakterien wurden in RPMI (zusatzfrei) unter Zellkulturbedingungen in Anwesenheit von IL-1 β (225 pg/ml) und/oder IL-1ra (1,5 μ g/ml) unter gelegentlichem Schütteln für 4 h inkubiert und hierauf die Gesamterregerlast durch Plattierung quantifiziert. (B) Initial 1×10^5 der aufgeführten Bakterien wurden in RPMI (zusatzfrei) für 4 h im Brutschrank angezogen und gelegentlich geschüttelt. Zusätzlich enthielten die Ansätze entweder IL-1 β , IL-1ra oder konstant 10 ng/ml IL-1 β sowie eine titrierte Dosis IL-1ra. Am Ende der Inkubationsphase wurde die Gesamterregerlast durch Plattierung bestimmt. BL21 C+ RIL = *E. coli* BL21 Codon Plus RIL. Die Standardabweichungen beziehen sich jeweils auf die Ergebnisse dreier individueller Kulturen eines Experimentes.

Diese Daten verdeutlichen, dass eukaryontisches IL-1 β dazu befähigt ist, das Wachstum des UPEC Stammes CFT073 zu fördern. Eine spezifische Induktion der Zytokinsekretion durch TcpC scheint daher aus Erregersicht nicht abwegig, sondern unterstützt die eigene Replikation. Die im Rahmen dieser Arbeit vorwiegend analysierten Zelllinien – RAW264.7 Makrophagen, BMMs und HCV29 Zellen – sind unter normalen Bedingungen eher schlechte IL-1 Produzenten, weshalb für die meisten Infektionsexperimente kein Unterschied der Gesamterregerlast zwischen CFT073 und *tcpC::kan* festgestellt werden konnte (vgl. Abbildung 8). Es gilt daher weiterführend zu analysieren, ob und ab welcher Zytokin-konzentration der IL-1 abhängige, TcpC-induzierte Effekt *in vitro* und besonders *in vivo* die Virulenz des Erregers signifikant beeinflusst. Des Weiteren gilt es zu bestimmen, welchen globalen transkriptionellen Effekt IL-1 β auf CFT073 und andere IL-1 responsive *E. coli* Stämme ausübt, um dadurch den wachstumsstimulierende Signalweg auf Seiten des Bakteriums verstehen zu können.

3.6.3 Das CFT073 Usherprotein PapC bindet murines IL-1 β

Nachdem gezeigt werden konnte, dass TcpC zur Induktion der IL-1 β Freisetzung führt und das Zytokin darüber hinaus quasi-parakrin das Wachstum des Pathogens CFT073 fördert, galt es, einen möglichen IL-1-ähnlichen Rezeptor in der Membran von *E. coli* CFT073 zu definieren, welcher zur IL-1 β Bindung befähigt ist und das Signal in die prokaryontische Zelle weiterzuleiten vermag. Es fand sich lediglich eine Literaturstelle, welche die spezifische Interaktion eines bakteriellen Adhäsins mit humanem IL-1 β thematisiert: Für das "Capsule antigen F1 assembly" (Caf1A), ein Anker-Protein in der äußeren Membran von *Yersinia pestis* ist beschrieben, dass es spezifisch humanes IL-1 β bindet (Zav'yalov *et al.*, 1995). Das Usherprotein ist Teil des F1-Pilus, dessen Assemblierung es bewerkstelligt.

Da das *fl* Operon der Yersinie strukturell in vielen Aspekten dem *pap* Operon von CFT073 ähnelt, wurde *in silico* mittels *genomic BLAST* nach Kandidatenproteinen recherchiert, welche im CFT073-Genom strukturelle Ähnlichkeit zu Caf1A zeigen. Als signifikant zu Caf1A ähnliche Proteine konnten hierdurch die CFT073 Usherproteine PapC, F1C und FimD identifiziert werden, welche in unterschiedlichen Pilus-Typen jeweils die Rolle der Assemblierungs-plattform in der äußeren Membran erfüllen (s. Kap. 1.2).

Hiervon wurde PapC (Locus = c3590, nicht c5186) als Modellprotein gewählt, da es als Teil des Pap-Pilus zu den gerade für UPECs charakteristischen Virulenz-assoziierten Adhäsinen zählt (Lane & Mobley, 2007).

PapC	MMRGMKDRIPFAVNNITCVILLSLFCNAASAVEFNTDVLDAADKKNIDFTRFSEAGYVLP	60
1ITB B	-----	
PapC	GQYLVDIVNGQSISPASLQISFVEPQSSGDKAEKKLPQACLTSDMVRLMGLTAESLDKV	120
1ITB B	-----LEADCKEKEREKIIILVSSANEIDVRPCPLNPNEHKGT	37
	:*... : ** : : . . . * * *	
PapC	VYWHGQCADFHGLPGVDIRPDTGAGVLRINMPQAWLEYS DATWLPSPRWDDGIPGLMLD	180
1ITB B	-----DDSKTPVSTEQASRIHQHKEKLWFVPAKVED-----	73
	:*:. . . . * . . . : . . . : : * : * : * : *	
PapC	YNLNGTVSRNYQGGDSHQFSYNGTVGGNLGPWRLRADYQGSQEQSRYNGEKTNNRFTWS	240
1ITB B	-----SGHYCYVVRNSSYCLR-IKISAKFVENEPNLCYNAQAIFKQKLPVA	118
	. . * * : : * : : : * : : : : : : .	
PapC	RFYLFRAIPRWANLTLGENNINSDIFRSWSYTGASLESDDRMLPPRLRGYAPQITGIAE	300
1ITB B	-----GDGGLVCPYMEFFKNENNEL-----PKLQWYKDKCP----	149
	* : : . . . : * * : * : * .	
PapC	TNARVVVSQQGRVLYDSMVPAGPFSIQDLSSVRGRLDVEVIEQNGRKKTFQVDTASVPY	360
1ITB B	-----LLLDNIHFSG-----VKDRLIVMNVAEKHR-----	174
	: * * : : * * : * * * : : * *	
PapC	LTRPGQVRYKLVSGRSRGYGHETEGPVFATGEASWGLSNQWSLYGGAVLAGDYNALAAGA	420
1ITB B	-----GNYTCHAS--	182
	* : * . . * :	
PapC	GWDLGVPGLTSLADITQSVARIEGERTFQGKSWRLSYSKRFDNADADITFAGYRFSERNYM	480
1ITB B	-----YTYLGKQYPITR-----VIEFITLEENKPTRP	209
	* : * : : : : * *	
PapC	TMEQYLNARYRNDYSSREKEMYTVTLNKNVADWNTSFLNQYSRQTYWDIRKTDYYTVSVN	540
1ITB B	VIVSPANETMEVDLGSQIQLICNVTG-----QLSDIAYWKWN-----	246
	. : . * . * . * : : : * * * * * : * : .	
PapC	RYFNVFGLQGVAVGLSASRSKYLGRDNDSAYLRISVPLGTGTASYSGSMSNDRYVMAGY	600
1ITB B	-----GSVIDEDEDVVLG--	258
	* : * : : : . .	
PapC	TDMFNDGLDSYSLNAGLNSGGGLTSQRQINAYYSHRSPLANLSANIASLQKGYTSFGVSA	660
1ITB B	-----EDYYSVENPANKRRSTLITVLN-----	280
	: * * * . . * : : : : : :	
PapC	SGGATITGKGAALHAGGMSGGTRLLVDTDGVGGVPVDGGQVVTNRWGTGVVTDISSYYRN	720
1ITB B	-----ISEIESRFYK	290
	: : * . * : : :	
PapC	TTSVDLKRPLPDDVEATRVSVESALTEGAIGYRKFSVLKGRKRFAILRLADGSQPPFGASV	780
1ITB B	HPFTCFAKNTHGIDAAYIQLIYPVT-----	315
	. . : : . . : * : : : *	
PapC	TSEKRELGMVADEGLAWLSGVPGETLSVNWGKIQCQVNVPETAISDQQLLPCTPQK	840
1ITB B	-----	
	Site A Bindestelle im sIL-1R sowie Site B Bindestelle	

Abbildung 32: Alignment zwischen PapC und dem löslichen humanen IL-1R (pdb: 1ITB, Kette B). Die fortlaufende AS-Position ist für beide Proteine aufgeführt. In grün sind zur Site A Bindestelle des sIL-1R gehörige AS hervorgehoben, die an der Bindung von IL-1 α , IL-1 β sowie IL-1ra beteiligt sind. Rot markiert sind AS, welche die Site B bilden, welche nur IL-1 α und IL-1 β komplexiert (Vigers *et al.*, 1997). Die unterstrichene PapC-Sequenz (AS 35-377) wurde für die Expression als rekombinantes Protein gewählt. Identische AS in beiden Proteinen sind mit einem Stern, biophysikalische nahe verwandte durch einen Doppelpunkt und ähnliche mit einem Punkt markiert.

Neben der Ähnlichkeit zu Caf1A wurde die Sequenzhomologie zwischen PapC und dem löslichen humanen IL-1 Rezeptor (sIL-1R) analysiert, da für dieses Protein eine funktionell interessante Kristallstruktur im Komplex mit IL-1 β vorliegt (pdb-Eintrag 1ITB, Kette B). Für den sIL-1R sind zwei Regionen charakterisiert, die IL-1 β binden können, die sog. Site A sowie die Site B (s. Abbildung 32), wobei erstere zudem IL-1 α und den IL-1ra zu komplexieren vermag, Site B neben IL-1 β nur IL-1 α (Vigers *et al.*, 1997). Site A des sIL-1R zeigt über weite Bereiche deutliche Homologie zu PapC.

Für die weitere Analyse wurde daher eine PapC-Variante – PapC-short - konstruiert, die die AS 35-377 und damit das vollständige Site A Motiv des sIL-1R umfasst (vgl. 3.1). Pull-Down Analysen mit der rekombinanten PapC-short-Variante ergaben, dass das Protein dazu in der Lage ist, spezifisch murines IL-1 β zu binden (s. Abbildung 33). Diese Interaktion konnte für niedrige Salzkonzentrationen im pH-Bereich von 5,2-8,2 bestätigt werden. Selbst bei hohen Salzkonzentrationen im Waschpuffer war nach wie vor eine spezifische wenn auch schwächere IL-1 β Bande detektierbar, die basale unspezifische Bindung des Zytokins an das Säulenmaterial (vgl. Abb. 33) war unter diesen Bedingungen nicht mehr vorhanden (Daten nicht gezeigt). Als Spezifitätskontrolle wurde anstelle von PapC rekombinantes EGFP eingesetzt, welches keine IL-1 β Bindung zeigte (Daten nicht abgebildet).

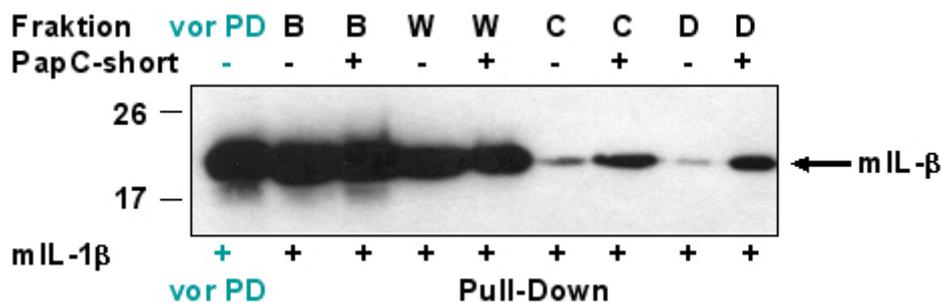


Abbildung 33: PapC-short bindet murines IL-1 β . Für Pull-Down (= PD) Analysen wurden je 80 μ g PapC-short-strep an Streptavidin-Agarose (+) gekoppelt (1,5 h, 4°C). Nach Blockierung der freien Bindestellen wurden den Ansätzen jeweils 750 ng murines IL-1 β (R&D Systems, in PBS, 17 kDa, apparent ~ 20kDa) zugefügt. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei RT. Nach Auswaschen nicht gebundenen IL-1 β (B) sowie drei Waschschritten mit TBS (low salt, W = erster Waschschriff) erfolgte die spezifische saure Elution (C, D) des an PapC gebundenen Zytokins. Für die Visualisierung der Banden mittels Western-Blot wurden der Detection Antikörper des IL-1 β ELISA Kits (R&D Systems, 1:1000) sowie ein anti-goat Antikörper (1:5000) eingesetzt.

Nachdem die Bindekapazität für IL-1 β der Site A-homologen Region in PapC demonstriert werden konnte, sollte überprüft werden, ob diese in Anwesenheit der Site B-ähnlichen Sequenz noch verstärkt werden kann. Zu diesem Zwecke wurde die Variante PapC-long (AS 77-748) kloniert, jedoch nur partiell affinitätschromatographisch mittels Co²⁺-Agarose aufgereinigt (s. Kap. 2.4.2.2) und daher noch nicht in Pull-Down Studien eingesetzt.

Ausgehend von PapC als membranständigem Bindeprotein für IL-1 β gilt es weiterführend, den exakten prokaryontischen Signalweg aufzuklären, welcher es CFT073 erlaubt, auf den extrazellulären Zytokinstimulus mit verstärktem Wachstum zu reagieren.

4 Diskussion

4.1 Tcps – ein neuer Typus von Virulenzfaktoren mit inhibitorischem Effekt auf das TLR-Signaltransduktionsgeschehen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Pathogen-exprimierten Proteine TcpC ("*TIR domain containing protein C*") des UPEC-Stammes CFT073 als auch TcpB aus *B. melitensis* dazu befähigt sind, MyD88-abhängige TLR-Signalweg zu beeinflussen und als Konsequenz das intrazelluläre Überleben eines Tcp-positiven *E. coli* Stammes zu verbessern. Zur Analyse des Tcp-Phänotyps wurden der Wildtypstamm CFT073 im Vergleich zu einer chromosomalen KO-Mutante für das *tcpC*-Gen (Genlocus c2398) – *tcpC::kan* – sowie TcpC und TcpB Komplementanten eingesetzt. Die durchgeführten *in vitro* Versuche demonstrieren die Fähigkeit der TIR-homologen Proteine, die Induktion der Sekretion aller gemessenen proinflammatorischen Zytokine in unterschiedlichen Zelllinien (murin und human) sowie in primären Knochenmarkszellen murinen Ursprungs zu reduzieren (s. Kap. 3.2.1). Eine Ausnahme stellt IL-1 β dar, worauf in Kapitel 4.3 gesondert eingegangen wird. Einhergehend mit der reduzierten Zytokinproduktion der Zelle, fanden sich erhöhte intrazelluläre Erregermengen, sofern diese TcpC oder TcpB exprimierten. Als kritischer Parameter für alle aufgeführten *in vitro* Infektionsexperimente erwies sich die initiale MOI der Erreger. Da CFT073 nebst TcpC über eine Vielzahl potenter Virulenzfaktoren wie Fimbrien, Siderophore, sekretierte Toxine und Kapselproteine verfügt (vgl. Kap. 1.2), konnte der TcpC-abhängige Phänotyp als Vergleich zwischen TcpC-KO und Wildtyp nur beobachtet werden, sofern die eingesetzte Erregermengen nicht mehr als 10 % von der errechneten MOI voneinander abwichen. Bereits wenn 15-20 % mehr an CFT073 relativ zu *tcpC::kan* für die Infektion eingesetzt wurden, waren die Unterschiede der durch die Infektion induzierten Zytokinsekretion zwischen den Stämmen deutlich geringer.

Sowohl für TIR-TcpC als auch für TcpB konnte eine direkte Interaktion mit endogenem wie auch heterolog überexprimiertem humanem MyD88 als zytoplasmatischem TLR-Adapterprotein nachgewiesen werden (vgl. Kap. 3.2.2). Pull-Down Experimente zwischen den Tcps und humanem Trif als weiterem TLR-Adapter, und auch mit IRAK1 oder IRAK4 blieben hingegen unter sämtlichen Bedingungen ergebnislos. Dies bestätigt die Ergebnisse der

NF- κ B Reporterassays (durchgeführt von Susanne Dürr), welche aufzeigen, dass die TLR2 und TLR4-abhängige, MyD88-vermittelte NF- κ B Aktivierung der Wirtszelle unterdrückt wird, nicht jedoch die auf TLR3-basierende, Trif medierte Aktivierung des INF- β Promotors.

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass TcpC und TcpB ihr inhibitorisches Potential im Zytosol der Wirtszelle durch gezielte TIR-TIR-Interaktion mit dem Adapter MyD88 entfalten. Hierdurch kommt es wohl zur kompetitiven Verdrängung der *downstream* Adapter IRAK4 und IRAK1 und dadurch zur Unterbrechung des TLR-Signalweges. Es gilt weiterführend zu überprüfen, ob Tcps eventuell direkt an membran-ständige TLR-TIR Domänen binden und dadurch das Signaltransduktionsgeschehen bereits einen Schritt eher beeinflussen können. Für die TIR-Domäne von TLR2 konnte eine Interaktion zu TIR-TcpC jedoch exemplarisch nicht bestätigt werden (Cirl *et al.*, 2008). Zudem wurde gezeigt, dass die Variante *tcpC::kan* + pTcpC(S176A) nicht mehr in der Lage ist, ihr TLR-suppressives Potential zu entfalten (s. Abbildung 22), wobei bis dato nicht geklärt ist, ob dies auf eine konformationelle Änderung der TIR-Domäne oder den Verlust der proteolytischen Aktivität des Proteines zurückzuführen ist. Geprüft werden sollte zudem die mögliche Inhibition des IL-1 Rezeptor Signalgeschehens, weil dieser Rezeptor ebenso wie die TLRs über ein intrazelluläres TIR-Modul verfügt und ebenfalls MyD88 als Adapterprotein nutzt.

Die Bindung an eine extrazelluläre TLR-LRR-Domäne erscheint zumindest für TcpB als unwahrscheinlich, da sich die Brucelle durch diverse Virulenzmechanismen perfekt an das Überleben als fakultativ intrazelluläres Pathogen anpassen kann und TcpB wohl ausschließlich innerhalb der Wirtszelle produziert wird. Der Erreger verfügt im Gegensatz zu CFT073 über ein voll ausgeprägtes Typ IV Sekretionssystem, welches auf dem *virB* Operon lokalisiert ist. Dieses Operon beeinflusst zudem die intrazelluläre Persistenz des Erregers (Delrue *et al.*, 2001), könnte aber auch an der Sekretion von TcpB beteiligt sein. Das LPS der Brucelle ist zudem deutlich weniger immunstimulatorisch als LPS von *E. coli* Spezies. Dies beruht auf der Lipid A Einheit des Moleküls, welches über längere Acyl-Ketten der Fettsäureresten verfügt (C18-C19, C28), die als Diaminoglucose-Ester vorliegen und die Komplement vermittelte Lyse des Bakteriums verhindern (Lapaque *et al.*, 2005). Weiterhin produziert der Erreger zyklisches 1,2 β -Glukan. Mit Hilfe dieses Moleküls umgeht der Erreger die Phagosom-Lysosom Fusion und erhöht dadurch seine intrazelluläre Persistenz (Arellano-Reynoso *et al.*, 2005). Mit TcpB steht dem hochvirulenten Erreger noch ein weiterer Faktor zur Verfügung, um die Erkennung durch das Immunsystem gezielt zu

umgehen. Anders als *B. melitensis* ist *E. coli* CFT073 kein klassischer intrazellulärer Erreger und verfügt zudem über hochstimulatorisches Endotoxin. Umso essentieller ist daher der TLR-supprimierende Effekt von TcpC, welches bereits von extrazellulären Erregern sekretiert wird und innerhalb kurzer Zeit in die Wirtszelle transloziert (s. Kap. 3.3, 3.4, 4.2) um hierdurch die Bedingungen für die intrazelluläre Präsenz von CFT073 deutlich zu verbessern.

TcpC spielt *in vivo* im Maus HWI Modell darüber hinaus eine entscheidende Rolle für die Pathogenese der akuten Pyelonephritis. Wie Daten aus der Arbeitsgruppe von Catharina Svanborg and der Universität von Lund demonstrieren, findet sich CFT073 im Vergleich zu *tcpC::kan* über den Zeitraum von einer Woche nach Infektion in deutlich höheren Mengen im Urin sowie intrazellulär in der Niere (Cirl *et al.*, 2008). Die intrazelluläre Erregerlast in der Niere ist ebenfalls für *tcpC::kan* + pTcpC erhöht, wobei dieser Unterschied nur innerhalb der ersten Tage nach Infektion beobachtet werden konnte, da die Persistenz des komplementierten TcpC-Plasmides nur über diesen kurzen Zeitraum ohne Antibiotikadruck gewährt werden kann. Morphologisch zeigten die CFT073-infizierten C57BL/6 Mäuse ausgeprägte Nierenabszesse. Zudem wurden signifikant mehr neutrophile Granulozyten rekrutiert, beides konnte für *tcpC::kan*-infizierte Tiere nicht beobachtet werden.

Epidemiologisch bedeutsam scheinen *tcpC*-positive UPEC Stämme überdies auch für die Manifestation des humanen HWI zu sein, wie aus Abbildung 34 hervorgeht. Hier wurden zunächst *E. coli* Stämme aus dem Urin von Patienten mit asymptomatischer Bakteriurie (ABU), Cystitis oder akuter Pyelonephritis isoliert. Als Kontrolle dienten Darmkommensale (FI = Fäkalisolate). In der Tat korreliert die Prävalenz des *tcpC*-Genes mit der Schwere der Erkrankung. Während sich *tcpC*-homologe Sequenzen in 40% der Isolate bei Patienten mit akuter Nierenbeckenentzündung fanden, lag die Zahl für die Cystitis Erreger nur bei 21%. Im Falle der ABU fand sich das Gen nur bei 16% der Isolate. Kommensale waren nur zu 8% positiv für das Gen. TcpC scheint daher von klinischer Relevanz zu sein, was Prognose und Verlauf des akuten HWI betrifft, womit die Rolle des Proteines als neuartiger UPEC Virulenzfaktor bestärkt wird. Das *tcpC* Gen könnte daher als spezifischer diagnostischer Marker bei schweren Harnwegsinfektionen dienen.

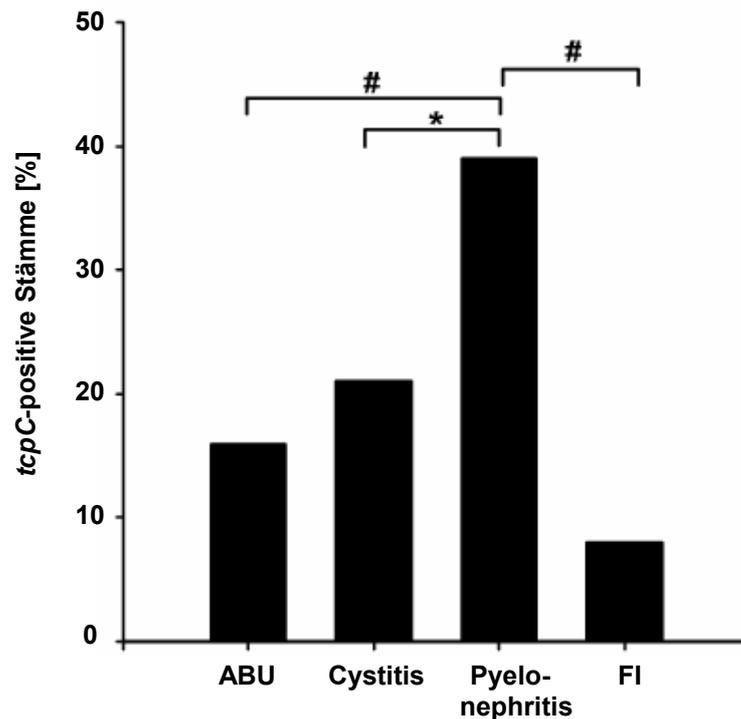


Abbildung 34: Hochvirulente UPEC Isolate tragen ein *tcpC*-Gen. *E. coli* Isolate aus dem Urin von Kindern mit asymptomatischer Bakteriurie (ABU, n = 77), akuter Cystitis (n = 58) sowie akuter Pyelonephritis (n = 101) wurden mittels PCR auf die Präsenz eines *tcpC*-homologen Gens untersucht. Fäkalisolate (n = 39) dienten als Kontrollgruppe. *P = 0,016 und #P = 0,001 (Exakter Test nach Fisher).

Die mukosale TLR4-abhängige Antwort auf CFT073 ist nicht auf lösliche Faktoren wie TcpC sondern hauptsächlich auf sein Repertoire an Oberflächenantigenen zurückzuführen. Gerade Pap- sowie Typ-I Fimbrien fungieren als wichtige TLR-Korezeptoren in CD14-negativen, nur schwach LPS-responsiven Urothelien (Frendeus *et al.*, 2001; Frendéus *et al.*, 2001; Hedlund *et al.*, 2001; Samuelsson *et al.*, 2004), die es dem Immunsystem erlauben, gezielt zwischen nicht-fimbrierten Kommensalen und pathogenen Spezies zu diskriminieren. TcpC wiederum supprimiert den MyD88-abhängigen Weg der adhäsionsvermittelten TLR4-Aktivierung und erleichtert somit den Übergang zum intrazellulären Eintritt des Erregers.

Bis dato nicht überprüft wurde die Rolle von TLR11 in der Erkennung von CFT073. Dieser TLR wird in der Maus in DCs, Makrophagen sowie Leber-, Nieren und Blasenepithelzellen exprimiert und ist spezialisiert auf die Detektion und Abwehr von UPECs (Zhang *et al.*, 2004; Svanborg *et al.*, 2006). Als Ligand für diesen membranständigen, MyD88 als Adapter nutzenden Rezeptor ist Profilin des Parasiten *Toxoplasma gondii* beschrieben (Yarovinsky *et al.*, 2005). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass CFT073 diesen TLR zu aktivieren vermag, der konkrete Agonist ist jedoch nicht bekannt. Für das Rattenmodell konnte gezeigt werden, wie

UPECs trotz TLR4 sowie TLR11 Stimulation in testikulären Zellen aktiv die MyD88-abhängige Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-6 aber auch IL-1 α unterdrücken können (Bhushan *et al.*, 2008). Wahrscheinlich ist, dass bei *tcpC*-positiven Stämmen wie CFT073 das TIR-Homolog wohl in der Lage ist, den alleinigen MyD88-abhängigen TLR11-Signalweg zu blockieren.

Wie bereits in Kap. 1.3.2 angesprochen, weisen *in silico* Sequenzanalysen auf eine Vielzahl meist noch hypothetischer TIR-enthaltender Proteine in ausnahmslos allen phylogenetischen Taxa hin. Gerade in der Domäne der Bakterien finden sich diverse Vertreter, wobei alle funktionell näher charakterisierten Tcps pathogenen oder wie A46R und A52R (Bowie *et al.*, 2000) viralen Ursprungs sind. Selbst wenn sich die Analyse bakterieller Tcps erst im Anfangsstadium befindet, so weisen alle bis dato publizierten Studien darauf hin, dass bakterielle TIR-Analoga unterschiedlicher Erregertypen stets an der Manipulation des Immunsystems der Wirtszelle beteiligt sind. Dies gilt sowohl für TlpA, ein Tcp aus *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis (Newman *et al.*, 2006), welches mit dem TLR- sowie IL-1 Rezeptor Signaltransduktionsgeschehen interferiert als auch PdTLP aus *Paracoccus denitrificans* (Low *et al.*, 2007), da dieses Protein *in vitro* in der Lage ist, sowohl die TLR4- als auch die MyD88-TIR-Domäne zu binden. Neben den TcpB-Studien innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe wurde mit Btp1 ("*Brucella* TIR-containing protein") ein zu TcpB homologes Tcp aus *Brucella abortus* beschrieben (Salcedo *et al.*, 2008). Dieses von der Brucelle wohl ins Zytosol sekretierte Protein moduliert gezielt den murinen TLR2-Signalweg in DCs und attenuiert somit die zytokinabhängige Maturierung der Wirtszelle.

Des Weiteren war bereits zu Beginn dieser Arbeit als Grundlage aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe bekannt, dass auch das Genom von *Brucella suis* sowie das des Gram-positiven Stammes *Staphylococcus aureus* MSSA476 Tcps beherbergen. Das Gen aus MSSA476 wurde bereits kloniert und das Protein – genannt TcpS - exprimiert (Daten nicht abgebildet). Sollte sich auch für dieses Protein ein ähnlicher TLR-inhibitorischer Phänotyp wie für TcpC und TcpB bestätigen, so gilt es als umso wahrscheinlicher, dass Tcps eine neuartige Familie bakterieller Virulenzfaktoren repräsentieren, welche gezielt die Wirts-Immunantwort zu blockieren vermögen.

4.2 Sequenzspezifische und strukturelle Charakteristika von TcpC als Basis für Sekretion und Aufnahme

Durch eine Reihe von Experimenten konnte demonstriert werden, dass TcpC von CFT073 sekretiert wird, mechanistisch ist allerdings noch unklar, welchen Sekretionsweg der Erreger hierzu nutzt. Einerseits wurden zur Analyse Zellkulturüberstände infizierter Kulturen mittels Western-Blot auf die Präsenz des TIR-Proteines hin untersucht, welches nach nativer Gelelektrophorese im multimeren Zustand vorlag (s. Abbildung 13). Diese Befunde wurden funktionell bestätigt, indem gezeigt wurde, wie CFT073 während der Infektion im Transwellsystem ebenso in der Lage ist, TcpC ins Kompartiment der Wirtszelle zu sekretieren und nach Aufnahme den Tcp-spezifischen TLR-inhibitorischen Phänotyp zu offenbaren (vgl. Abbildung 15). Dieser Protein-medierte Phänotyp blieb auch erhalten, wenn filtrierte Überstände, welche nach CFT073 Infektion gewonnen wurden, zur Restimulation von RAW-Makrophagen verwendet wurden (s. Abbildung 14A). Nach Hitzeinaktivierung zeigte sich jedoch kein TNF-reduzierenden Effekt mehr. Denaturierte TcpC-enthaltende Proben verhielten sich dann analog zu *tcpC::kan* Überständen (s. Abbildung 14B).

CFT073 verfügt laut Sequenzierung des vollständigen Genoms über kein funktionsfähiges Typ III oder Typ IV Sekretionssystem, wodurch TcpC aus dem Bakterium geschleust werden könnte (Welch *et al.*, 2002). Betrachtet man direkt die Primärstruktur von TcpC (s. Abbildung 3) so findet sich keine klassische N-terminale *sec*-Leadersequenz, die für die Typ II Sekretion des Proteines in Frage käme. Auffällig an der Aminosäuresequenz ist zudem die verhältnismäßig hohe Anzahl an Argininen im Bereich des C-Terminus. Daher wurde geprüft, ob TcpC die Anforderungen für einen "*Twin arginine translocation*-" (Tat-) Export erfüllt. Der Tat Transporter stellt ein ungewöhnliches Proteintranslokationssystem dar, welches sich in der Membran vieler Bakterien – wie *E. coli* – aber auch im Membransystem pflanzlicher Organellen findet (Berks *et al.*, 2000). Genomisch bedarf es hierfür der Gene *tatA*, *B*, *C* und alternativ *E*. Die kodierten Proteine sind Bestandteil eines ringförmigen Translokase-Komplexes in der inneren Membran von *E. coli* (Sargent *et al.*, 2001), welcher auch von CFT073 gebildet werden kann. Auf Proteinseite bedarf es zudem einer N-terminalen Signalsequenz vom Typ S/T-R-R-x-F-L-K, welche Substratproteine an das Translokon dirigiert. Selbst wenn TcpC Versatzstücke dieser Sequenz aufweist, reicht dies jedoch nicht, um einen Tat-Export zu bewerkstelligen.

Unwahrscheinlich erscheint auch ein Typ V Sekretionsmechanismus (Henderson *et al.*, 2004), wie es von der sekretierten CFT073 Protease Sat genutzt wird. Erstens bedarf auch dieser Weg zunächst der sec-Leader abhängigen Typ II Sekretion ins Periplasma. Zweitens liegen derart sekretierte Proteine hierbei als pro-Form vor. Ein Teil des Proteines formt eine die äußere Membran durchspannende Pore, durch welche der Effektorpart ausgeschleust werden kann. Selbst wenn dieser Mechanismus unabhängig von membranständigen Hilfskomponenten ist, erfüllt die N-terminale Delta-TcpC Domäne nicht die Anforderungen, um eine β -Barrel Pore in der äußeren Membran zu formen.

Mit Hilfe des Efflux-Pump Inhibitors PA β N (Pannek *et al.*, 2006) konnte die Sekretion von TcpC eindeutig vermindert und dadurch die TLR-Signalblockade aufgehoben werden (vgl. Abbildung 16). Man weiss, dass dieser Efflux-Mechanismus einer dreiteiligen, die innere und äußere Membran durchspannenden Export Maschinerie bedarf: Dies sind „ATP binding cassette“ Transporter der inneren Membran, ein periplasmatisches Adapterprotein sowie ein TolC-ähnliches Protein in der äußeren Membran, welches zudem ein wichtiger Bestandteil des bakteriellen Typ I Proteinsekretionsweges ist (Andersen *et al.*, 2000; Henderson *et al.*, 2004). Über alle diese Komponenten verfügt CFT073. Der Typ I Transport über beide biologische Membranen bedarf zudem einer C-terminalen Signalsequenz. Diese ist u.a. für das Hämolyisin A aus *E. coli* gut charakterisiert (Koronakis *et al.*, 1989). Nebst einer hydrophoben Sequenz reich an Serinen und Threoninen umfasst sie eine Box mit geladenen AS sowie eine amphiphile α -Helix. Der C-Terminus von TcpC würde diesen Anforderungen *in silico* genügen. Die endständigen 60 AS enthalten diverse potentiell hydroxylierbare Serin und Threonin-Reste. Geladene AS sind ebenfalls überrepräsentiert. Die Struktur des C-Terminus ist zwar unbekannt, in einer *ab initio* Kalkulation erscheint diese jedoch stark ungeordnet (s. Abbildung 5) und kann anhand der AS-Sequenz eine helikale Sekundärstruktur einnehmen.

Zusammenfassend deuten diese proteinkodierten Eigenschaften von TcpC sowie die Funktionsexperimente mit PA β N darauf hin, dass es sich bei dem Virulenzfaktor um ein TolC-abhängig sekretiertes Protein handeln könnte, wobei dies molekular noch klar bewiesen werden muss.

TcpC wird vom Erreger also zunächst ins Kulturmedium sezerniert und nicht wie bei Typ III Sekretionsapparaten unmittelbar ins Zytosol des Wirtes geschleust. Auch die anschließende

Aufnahme des Proteines aus dem Überstand konnte experimentell belegt werden. Bereits die im Rahmen der Sekretion aufgeführten Transwell-Experimente zeigten eindeutig das Potential von TcpC unabhängig vom Erreger ins Zytosol der physikalisch separierten Wirtszelle zu gelangen (vgl. etwa Abb. 15B). Darüber hinaus wurde für Lebendzell-Konfokalmikroskopie eine C-terminal Tetracystein-FlAsH-getaggte Variante des medium-copy Plasmides pTcpC sowie der high-copy Vektor pFlAsH-TcpC hc generiert (s. Kap. 3.4). Hierdurch konnte die Sekretion neu synthetisiertes TcpC-FlAsH sowie dessen Verbleib in Anwesenheit des Farbstoffes FlAsH-EDT₂ beobachtet werden, da das zellpermeable FlAsH-Reagens durch die Bindung an die Thiolat-Anionen des FlAsH-tags (CCPGCC) eine fluoreszierende Konformation einnimmt. Sowohl für im Transwellssystem als auch für die Kokultur zwischen RAW-Makrophagen und *tcpC::kan* pFlAsH-TcpC bzw. *tcpC::kan* pFlAsH-TcpC hc konnte beobachtet werden, wie sich das Protein bereits 10 min nach Infektion in der Wirtszelle zu kumulieren beginnt. Für für *tcpC::kan* infizierte Zellen wurde keine Fluoreszenzentwicklung festgestellt. In der Kokultur wurden auch singuläre Sekretionsereignisse festgehalten, jedoch war dies wohl auf Grund der Proteinkonzentration nur für *tcpC::kan* pFlAsH-TcpC hc feststellbar. Erkennbar war auch, dass es sich um keine gerichtete Sekretion etwa durch einen flagellaren Sekretionsapparat handelt. Das Protein war zunächst vielmehr diffus im Medium verteilt und translozierte dann in die Makrophagen.

Um die Erregerunabhängigkeit der TcpC-Aufnahme und Virulenz zu belegen, wurden RAW264.7 Makrophagen rein mit rekombinantem TIR-TcpC sowie diversen TLR-Agonisten stimuliert und die TNF Sekretion der Wirtszelle als funktioneller Indikator betrachtet (vgl. Kap.3.4.1). Hiermit konnte demonstriert werden, dass das Protein alleine in der Lage ist, alle geprüften MyD88-abhängigen TLRs dosisabhängig in ihrer Signalfunktion zu beeinträchtigen, allerdings nicht in das Transduktionsgeschehen von TLR3 einzugreifen vermag, da dieser Rezeptor ausschließlich Trif als Adapterprotein nutzt. Zugleich kumulierte sich das Protein im Zytosol der Makrophagen. Diese Phänomene waren sowohl durch Vorstimulation mit TIR-TcpC wie auch bei simultaner Applikation mit den TLR-Liganden zu beobachten. Hierdurch konnte einerseits ausgeschlossen werden, dass das Resultat auf Kreuztoleranz gegenüber verbleibenden Endotoxinen aus der *E. coli* Produktion zurückzuführen ist. Unter dem Phänomen der Kreuztoleranz versteht man die Entwicklung physiologischer Toleranz gegenüber strukturell ähnlich aufgebauten Wirkstoffen. In diesem Falle könnte verbleibendes LPS aus der rekombinanten Produktion von TIR-TcpC die Wirkung der applizierten Endotoxine verringern, was jedoch nicht der Fall war.

Andererseits verdeutlicht die simultane Stimulation, wie schnell das Protein ins Zytosol gelangen muss, da es erst dort seinen inhibitorischen Effekt ausspielen kann, wohingegen die eingesetzten TLR-Liganden mit Ausnahme von CpG 1826 bereits an der Zelloberfläche erkannt werden.

Zum besseren Verständnis der spontanen Aufnahme von TcpC und TIR-TcpC wurde überprüft, ob das Cholesterin-depletierende zyklische Oligosaccharidderivat Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) dazu befähigt ist, die Internalisierung der Tcps zu inhibieren. Über M β CD ist bekannt, dass es besser als das nicht methylierte β CD lipophile Moleküle in seiner hydrophoben Kernregion sequestriert (Klein *et al.*, 1995). Zudem ist beschrieben, dass M β CD spezifisch sowohl den Clathrin- als auch Caveolae-abhängigen Aufnahmeweg von Biomolekülen wie Transferrin inhibiert, bis zu einer Konzentration von 10 mM jedoch nicht zytotoxisch wirkt oder weitere Endozytosevorgänge beeinträchtigt (Rodal *et al.*, 1999). Mit M β CD vorinkubierte BMMs zeigten nach Stimulation mit LPS und TIR-TcpC im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls eine deutlich verringerte Reduktion der TNF Sekretion, da sich TIR-TcpC im Vergleich zur Stimulation ohne M β CD v.a. im Überstand ansammelt und nicht mehr effizient internalisiert werden kann (vgl. Abbildung 19). Dies stellt einen Hinweis auf einen rezeptorunabhängigen Aufnahmeweg von TcpC dar, entweder über Clathrin-besetzte endozytische Vesikel verlaufen könnte. Ob ein Caveolae-/Glycolipid Raft-abhängiger Mechanismus der TcpC-Internalisierung in Frage kommt, welcher ebenso sensitiv auf die Depletion von M β CD reagiert, muss durch spezifische Inhibitoren dieses Endozytoseweges wie Dynamin noch überprüft werden (Nabi & Le, 2003).

Ein weiterer wichtiger Hinweis zur Aufklärung des Aufnahmephänomens von TcpC könnte in der Sequenz seines extrem basischen C-Terminus zu finden sein (AS 293-107; KEIARELAEIAYRRR, pI~10). Dieser ähnelt stark einer Arginin-reichen Sequenz des HIV Proteines Tat (YGRKKRRQRRR, pI~12,31), welches Clathrin- und teilweise Heparansulfat Rezeptor-abhängig, jedoch Caveolin-unabhängig die Wirtszellmembran zu überwinden vermag (Richard *et al.*, 2005). Es wurden daher die TIR-TcpC Varianten TIR-TcpC(R297I/R305M/R307I) = TIR 5.3 bzw. TIR-TcpC(Δ 293-307) = TIR-tat (s. 2.2.9.2, 2.2.9.3 und 3.1) konstruiert, um deren Stimulationseigenschaften im Vergleich zu TIR-TcpC zu analysieren. Wie in Kap. 3.4.3 dargelegt ist, zeigen diese C-terminalen Varianten anders als TIR-TcpC eine verminderte Internalisierungsrate und damit einhergehend eine eingeschränkte Reduktion der LPS-induzierten TNF Sekretion in BMMs. Interessanterweise ist dieser

Phänotyp jedoch Zelltyp-abhängig, da in GM-CSF-DCs kaum Unterschiede zwischen TIR-TcpC und TIR 5.3 bzgl. deren Aufnahme festzustellen waren. Ein Grund hierfür mag in der deutlich höhere Pinozytose-Rate von DCs im Vergleich zu Makrophagen liegen, was bedeuten würde, dass die TIR-Tcps auch auf diesem Clathrin-unabhängigen Weg internalisiert werden können.

Um aus der Analogie zu HIV Tat noch mehr über die Aufnahme von TcpC zu lernen, erscheint es zusammenfassend daher als sinnvoll, einerseits gezielt rezeptorunabhängige Mechanismen wie den Clathrin- und Caveolin-Weg sowie pinozytische Ereignisse während der TcpC-Stimulation zu inhibieren. Andererseits könnte ebenso ein funktioneller Beweis erbracht werden, indem überprüft wird, ob die C-terminale Tat-vergleichbare Sequenz von TcpC als tag hinreichend ist, andere Moleküle ins Zytosol der Wirtszelle zu schleusen. Tat sowie andere Polyarginin-tags werden bereits gezielt dazu eingesetzt, nicht-zellpermeable Proteine wie etwa bovine Ribonuklease A als Fusionsprotein über die Zellmembranbarriere zu befördern (Becker-Hapak *et al.*, 2001; Fuchs & Raines, 2005). Des Weiteren ist ein Verfahren zur chemischen Kopplung der Tat-Sequenz an Oligonukleotide beschrieben (Steven & Graham, 2008). Beide dieser Techniken würden weitere Belege dafür liefern, inwiefern die TcpC-"Tat"-Region als autonome Domäne die Aufnahme in die Wirtszelle bewerkstelligen und somit das Internalisierungsphänomen erklären kann.

Da Details der Frage nach Sekretion, Aufnahme aber auch Funktion der MyD88-Bindung von TcpC eng im Zusammenhang mit dessen strukturellen Eigenschaften stehen, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Tsan Xiao und Dr. Greg Snyder am Laboratory of Immunology (Structural Immunobiology) des National Institute of Allergy and Infectious Diseases in Bethesda (USA) eine Kooperation begonnen, um die Kristallstruktur von TIR-TcpC bzw. einem Ko-Kristall aus TIR-TcpC und MyD88 aufzuklären. Hierdurch sollen schwerpunktmäßig konkrete Informationen zur Bindung bzw. Inhibition des Adaptermoleküls MyD88 gewonnen werden. Aufschlussreiche Daten werden darüber hinaus auch bzgl. eventueller Kofaktorbindestellen im TcpC-Molekül erwartet, die für seine TLR-modulatorische Funktion entscheidend sein können. Nicht zuletzt ergeben sich aus dem konkreten Faltungsmuster des Proteines wohl auch Erkenntnisse dazu, welche Funktion die C-terminale Region von TIR-TcpC bei der Sekretion und Aufnahme spielt.

4.3 Die TcpC induzierte IL-1 β Sekretion im Kontext der Inflammasomaktivierung

Seit seiner ersten Beschreibung im Jahr 2002 (Martinon *et al.*, 2002) gilt der Multiproteinkomplex des Inflammasoms als zentrale zytoplasmatische Plattform zur Erkennung diverser Pathogen-, und Umweltschadstoffe sowie endogener Signalmoleküle. Nach dem Aktivierungsschritt reguliert das Inflammasom die Caspase-1/-5 (im murinen System Caspase-1/-11) mediierte inflammatorische Antwort der Zelle als Folge der pro-IL-1 β , pro-IL-18 sowie pro-IL33 Spaltung und Sekretion. Es existieren diverse Formen dieser Assemblierungs-Plattform, wobei das Inflammasom stets ein NLR-Protein als Sensor Komponente, ein Adaptermolekül sowie als Hauptmolekül eine Caspase in zu aktivierender Zymogenform enthält (Ogura *et al.*, 2006; Mariathasan & Monack, 2007). Das Inflammasom ist essentiell für die Zelle, um die strikt kontrollierte und limitierte Prozessierung und Sekretion des Zytokins IL-1 β zu gewährleisten, welches als Effektormolekül diverser innater und adaptiver Immunantworten schwerwiegende lokale sowie systemische Entzündungsreaktionen hervorrufen kann (Dinarello, 1996).

Eine Implikation des Inflammasoms für diese Arbeit ergab sich dadurch, dass TcpC sowie TIR-TcpC dazu befähigt sind, Caspase-1 zu aktivieren und die Sekretion von IL-1 β zu induzieren (s. Kap. 3.6), womit IL-1 β das einzige gemessene proinflammatorische Zytokin darstellt, dessen Freisetzung trotz der NF- κ B Abhängigkeit seines Promotors (Cogswell *et al.*, 1994) durch das bakterielle TIR-Protein erhöht wurde. Dieses Phänomen ist daher nur in der frühen Phase einer Infektion bzw. Stimulation bis zum Einsetzen der MyD88-vermittelten TLR-Inhibition zu beobachten. Durch vergleichende Infektionsstudien mit CFT073 sowie *tcpC::kan* konnte gezeigt werden, dass die durch den Wildtypstamm induzierte IL-1 β Sekretion im Gegensatz zur TNF, IL-6 oder IL-8 Freisetzung MyD88-unabhängig, jedoch eindeutig TcpC-abhängig ist (vgl. Abbildung 25). Gerade für diese Infektionsexperimente erwies sich die initiale MOI der Erreger als kritisch, da bereits geringfügig höhere Mengen des KO-Stammes und damit pathogenspezifischer porenformender Toxine wie Sat, dem PAMP LPS oder des Peptidoglykan Abbauprodukts Muramyldipeptid (Martinon *et al.*, 2004) zur effizienten Inflammasomaktivierung führen und somit die TcpC-Abhängigkeit nicht herausgearbeitet werden kann.

Die Wege, welche vom exogenen "danger signal" bzw. endogenen Stimulus etwa durch Harnsäurekristalle (Martinon *et al.*, 2006) zur Caspase-1 Aktivierung führen, sind immens komplex, besonders auf Grund der hohen Anzahl an NLR-Proteinen, welche als zytoplasmatische Sensoren fungieren. Ein zentrales Adaptermolekül, in dessen Rekrutierung viele Inflammasomaktivierungsprozesse konvergieren ist ASC (s. Kap.1.1.2.2). ASC kann sowohl nach Stimulation diverser NALP-Signalwege (etwa NALP1, NALP1b, NALP3, NALP5), durch Interaktion mit dem Adapter IPAF aber auch direkt durch Öffnung des ionotropen ATP Rezeptors vom Typ P2X7 in den Inflammasomkomplex rekrutiert werden (s. Abbildung 1) und die Caspase-1 Prozessierung koordinieren (Ogura *et al.*, 2006). Daher wurden Knochenmarkszellen von ASC-defizienten Mäusen in vergleichenden Infektionsexperimenten mit CFT073 und *tcpC::kan* näher analysiert. Während in Wildtyp GM-CSF DCs die Infektion mit CFT073 erneut zur höheren IL-1 β Levels führte als die mit *tcpC::kan*, zeigten ASC^{-/-} DCs für beide Erreger keinerlei Induktion des Zytokines (s. Abb. 26A), wohingegen die TNF-Sekretion in Wildtyp wie ASC^{-/-} Zellen ein vergleichbares Niveau erreichte und als Konsequenz der MyD88-Abhängigkeit stets weniger durch CFT073 induziert wurde (Abb. 26B). Diese Beobachtung gilt ebenso für die Infektion von Wildtyp sowie ASC^{-/-} BMMs (s. Abbildung 35, präliminäre Daten). In diesem Kontext wurden auch die CFT073 Varianten *tcpC::kan* + pTpcC(C12S) (s. Kap. 3.6.1.2) sowie *tcpC::kan* + pTpcC(S176A) (vgl. Kap. 3.5.1) bzgl. ihres IL-1 stimulatorischen Potentials untersucht. Während das in Sekretion und Aufnahme stark dem Wildtyp vergleichbare Protein TpcC(C12S) in geringerem Ausmaß als TpcC dazu in der Lage ist, die IL-1 β Freisetzung in BMMs zu induzieren, ähnelt der Phänotyp der Protease-tot Variante TpcC(S176A) eher *tcpC::kan* sowohl im Bezug auf die fehlende TLR-Suppression als auch was die geringere Inflammasomaktivierung anbelangt: Beide induzierten in BMMs kaum die Freisetzung von IL-1 β . TpcC wie auch TpcC(C12S) agieren jedoch nur in Anwesenheit von ASC IL-1 β stimulatorisch. Diese ASC-Abhängigkeit gilt auch für die als Positivkontrolle dienende Stimulation mit ATP und LPS, welche nachweislich über die Aktivierung des NALP3/ASC-Inflammasoms verläuft (Mariathasan *et al.*, 2006). Zusätzlich zur IL-1 Freisetzung wurde sowohl für DCs als auch BMMs die Caspase-1 Aktivierung gemessen. Diese war auch durch *tcpC::kan* in Wildtyp-Zellen stark ausgeprägt, allerdings nicht so prominent wie nach Infektion mit CFT073. Auch hier zeigte sich erneut die Abhängigkeit der Inflammasom-Stimulation sowohl von TpcC als auch von ASC, da Caspase-1 in ASC-defizienten DCs und BMMs nicht mehr effizient prozessiert werden konnte (vgl. Abb. 26C und Abb. 26D). Die

ASC-abhängige Caspase-1 Prozessierung wurde zusätzlich durch Western-Blot Analyse ermittelt (s. Abbildung 26E). Das sekretierte p10 Fragment der aktivierten und gespaltenen Caspase-1 war nur in Überständen von Wildtyp DCs für hohe MOIs an CFT073 bzw. *tcpC::kan*, nicht jedoch in Überständen von ASC^{-/-} Zellen nachweisbar.

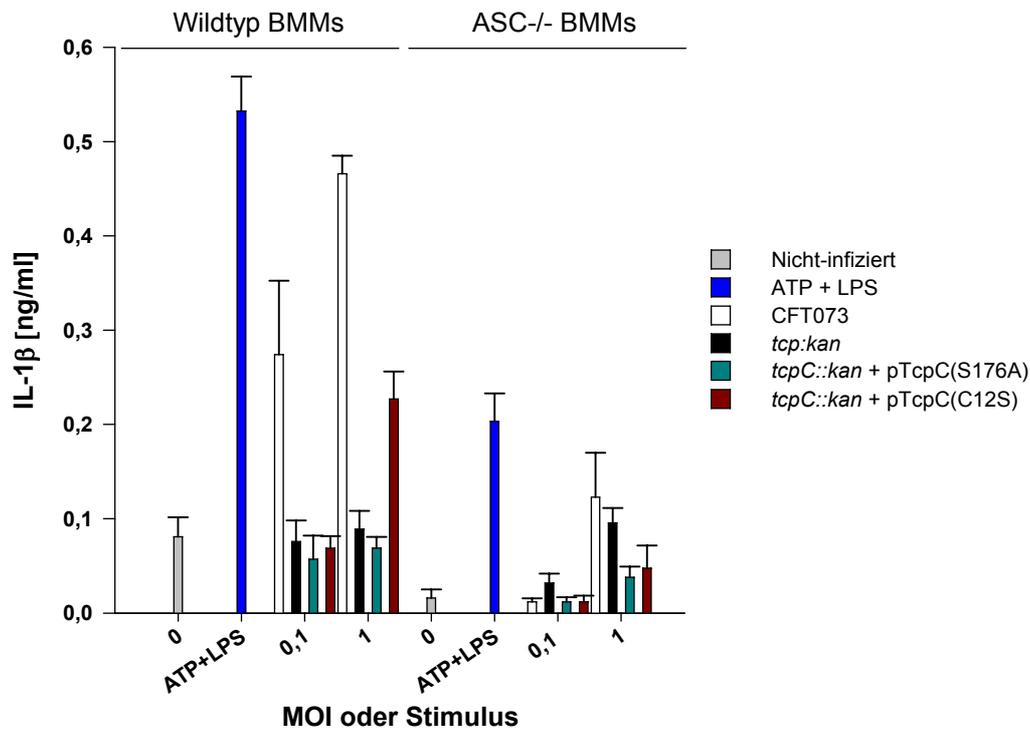


Abbildung 35: CFT073 sowie *tcpC::kan* + pTcpC(C12S) induzieren ASC-abhängig die IL-1 β Sekretion. 2×10^6 Wildtyp bzw. ASC^{-/-} BMMs/well wurden für 5 h mit der angegebenen MOI des jeweiligen Erregers infiziert. ATP (5 mM) sowie LPS (100 ng) dienten als Positivkontrolle. Am Ende des Experimentes wurde die IL-1 β Sekretion mittels ELISA quantifiziert.

Die durch diese Daten belegte ASC-Abhängigkeit der TcpC-induzierten Inflammasomaktivierung liefern eine Erklärung, warum die IL-1 β Menge nach Infektion von RAW264.7 Makrophagen mit CFT073-Varianten meist nicht determiniert werden konnten, bzw. die Unterschiede zwischen TcpC-KO und Wildtyp geringer ausfielen (Daten nicht gezeigt): Dieser Zelllinie fehlt ASC als Adaptermolekül (Pelegrin *et al.*, 2008). Nichtsdestotrotz weist die beobachtete Basallevelesektion von IL-1 β in RAW-Zellen darauf hin, dass TcpC bzw. andere Virulenzfaktoren von CFT073 noch einen weiteren, ASC-unabhängigen Inflammasom-Weg initialisieren könnten.

Losgelöst vom Erreger und dessen Virulenzfaktoren sind allerdings auch TIR-TcpC und TIR-TcpC elongated alleine dazu befähigt, Caspase-1 zu aktivieren und Zellen zur IL-1 β Sekretion

zu stimulieren (s. Kap. 3.6.1.3). Dies ist auch für TlpA, das Tcp aus *Salmonella typhi* beschrieben (Newman *et al.*, 2006). Ob diese Inflammasomaktivierung ebenfalls ASC-abhängig erfolgt, wurde noch nicht überprüft. In dieser Arbeit wurde zudem eine N-terminal elongierte Version von TIR-TcpC (AS 116-307) konstruiert, da die hydrophobe vor der TIR-Domäne lokalisierte Region geringfügige Homologie zur Caspase-1 induzierenden Region in IpaB, einem Virulenzfaktor von *Shigella flexneri* aufweist (Guichon *et al.*, 2001). In der Tat zeigte dieses Protein einen verstärkten Inflammasom-stimulatorische Effekt im Vergleich zu TIR-TcpC (vgl. Abbildung 28), worauf dies konkret zurückzuführen ist, konnte jedoch nicht geklärt werden. TcpB zeigte sich in Proteinstimulationsassays deutlich weniger potent in der Aktivierung von Caspase-1 sowie der Induktion der IL-1 β Sekretion als die TcpC-Varianten. Die spontane Aufnahme von TcpC mag daher an dessen aktivierendem Effekt unmittelbar beteiligt sein. Sollte der Internalisierungsmechanismus, wie in Kap. 4.2 diskutiert, Clathrin oder Caveolin-abhängig erfolgen, genügt eventuell eine hohe Eintrittsrate des in hoher Konzentration applizierten Proteines, um durch die hervorgerufenen Plasmamembran-perturbationen einen unspezifischen P2X₇-Rezeptor-unabhängigen Kalium-Efflux hervorzurufen, wodurch das NALP3-Inflammasom stimuliert würde (Mariathasan & Monack, 2007), analog wie dies für den Mechanismus der *S. typhi* und *S. flexneri* induzierte Caspase-1 Aktivierung allein durch Injektion von Effektorproteinen mittels ihres Typ III Sekretionsapparates vermutet wird (Roy *et al.*, 2004).

Zum näheren Verständnis des IL-1 induzierenden Phänotyps von TcpC wurde erneut mittels Pull-Down Assays versucht, einen konkreten Interaktionspartners im Bereich des im Zytoplasma lokalisierten Inflammasomkomplexes zu definieren (s. Kap. 3.6.1.4). Hierbei kamen die *strep*-gelabelten TcpC-Varianten Delta- und TIR-TcpC sowie TcpC(S176A) als "Bait Proteine" zum Einsatz. Wegen der eindeutigen ASC-Abhängigkeit der Inflammasomaktivierung durch CFT073, wurde mehrfach versucht, die Interaktion zwischen Delta- sowie TIR-TcpC mit diesem essentiellen Adaprotmolekül nachzuweisen. Keine der gewählten Puffer-, Salz- und Inkubationsbedingungen ebenso wenig wie der Wechsel des inerten Gelbettes von Agarose zu Methylacrylat konnte die unspezifische Bindung von ASC an das Säulenmaterial verhindern, weshalb keine konkrete Aussage zur Interaktion der Proteine getroffen werden konnte (vgl. Abb. 29A).

Da ASC jedoch ein vielversprechendes Kandidatenprotein darstellt, mag es für diesen Fall von Vorteil sein, ASC als Fangprotein an flag-Agarose zu immobilisieren und stimulierte CFT073 Bakterien als Kandidatenlysat zu verwenden, um die unspezifische Interaktion zu unterbinden und eine direkte Bindung schlussendlich ausschließen oder bestätigen zu können. Resultatlos verliefen auch Studien mit Nod1, IPAF und NALP3 als "Prey Protein". Diese Experimente wurden nur je zweimal wiederholt, weshalb auch hier die Bedingungen noch modifiziert werden müssen. Es zeigte sich jedoch in keinem der Fälle ein Hinweis auf eine direkte Interaktion mit diesen Komponenten des Inflammasoms. Als nächster Kandidat wurde Caspase-1 als möglicher Bindungspartner analysiert. Für die Virulenzfaktoren SipB (Guichon *et al.*, 2001) sowie dem Invasin IpaB (Hersh *et al.*, 1999) wurde eine direkte Interaktion mit dieser wichtigen Inflammasom-Effektorcaspase nachgewiesen.

Interessanterweise lieferten Pull-Downs mit Caspase-1-flag (45,2 kDa) initial wiederholt eine Western-Blot detektierbare Bande bei etwa 26 kDa (s. Abb. 29B). Diese war nur in Anwesenheit der Delta-Domäne (Delta-TcpC) oder TcpC(S176A) als Interaktionspartner, unter Verwendung von Niedrigsalzpuffern und nach Entfernung restlicher Protease-Inhibitoren aus dem HEK293-Lysat zu beobachten, weshalb das Protein zunächst als mögliches durch Tcp-Bindung induziertes autoproteolytisches Spaltprodukt der Caspase-1 interpretiert wurde. Allerdings konnten identische Pull-Down Versuche mit C- sowie N-terminal gelabelter myc-Caspase-1 als Kandidatenprotein diese Resultate nicht bestätigen. Für den Nachweis der *in vitro* Caspase-1 Bindung ist es ggf. von Nöten, während des Pull-Downs neben des TcpCs und dem Caspase-1 Lysat noch weitere Gerüstproteine und stimulierende Agenzien anzubieten. Die zweistufige Aktivierung des rekonstituierten NALP1-Inflammasoms durch Muramyldipeptid und ATP/Mg²⁺ konnte etwa *in vitro* am besten bei der Wahl eines molaren 1:1 Verhältnisses von NALP1 zu pro-Caspase-1 nachgewiesen werden (Faustin *et al.*, 2007), was unter Einbindung eines TcpCs in vergleichbaren Ansätzen ausgetestet werden könnte. Hierbei sollte auch TIR-TcpC elongated in die Pull-Down Versuche integriert werden, weil es sich als besserer Inflammasom-Stimulus erwiesen hat (s. Kap. 3.6.1.3). Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob die proteolytische Aktivität von TcpC und v.a. TcpB (s. Kap. 3.5) für Pull-Down Experimente in Betracht gezogen werden muss und gewisse Interaktionen folglich nur in Anwesenheit von Protease-Inhibitor durchgeführt werden können. In Anbetracht der Vielzahl an NLRs, die als Komponente in einem Inflammasom-Komplex partizipieren können, erschienen die Versuche sich auf ASC bzw. Caspase-1 als Interaktionspartner zu konzentrieren anfänglich als zielführender.

Nichtsdestotrotz sollte gerade das Potential von NALP1, einem Bestandteil des Caspase-1 Inflammasoms, als Sensor- und daher eventuelles Bindeprotein von TcpC untersucht werden.

Analog zur Analyse von IpaB (Guichon *et al.*, 2001) könnten auch detaillierte Mutagenesestudien an TcpC vorgenommen werden, um dadurch Klarheit zu gewinnen, welche Domäne möglicherweise an der Bindung bzw. Stimulation eines Inflammasom-Proteines beteiligt ist.

Selbst wenn Studien mit ASC-defizienten Mäusen auf eine Involvierung dieses Adapters hinweisen, darf auch nicht ausser Acht gelassen werden, dass eine direkte Interaktion mit TcpC bereits "upstream" erfolgen könnte. Der durch *Legionella pneumophila* induzierte Inflammasomweg läuft gemäß initialer Studien nach Typ IV Injektion von Flagellin als Effektor über Naip5, das wiederum über NBD-NBD Interaktion IPAF als Adapter zu binden und hierdurch die Caspase-1 Aktivierung zu induzieren vermag (Zamboni *et al.*, 2006). Im weiteren Verlauf könnte die PYD-PYD-Domänen Interaktion nach direkter Flagellinerkennung durch IPAF die Rekrutierung von ASC bewirken, welches ebenfalls über eine PYD-Domäne verfügt (Franchi *et al.*, 2006; Miao *et al.*, 2006). Es wird zwar noch kontrovers diskutiert, ob Naip5 in der Tat für die Caspase-1 Aktivierung oder vielmehr für die Restriktion der intrazellulären Legionallavermehrung durch Phagosomenmaturierung verantwortlich ist (Fortier *et al.*, 2007). Der postulierte Mechanismus würde im Falle von TcpC jedoch eine ASC-Abhängigkeit ohne direkte Interaktion mit dem Inflammasom-Adapter erklären, jedoch müsste, wie bereits angesprochen, eine potentielle Interaktion mit IPAF erneut überprüft werden.

Einer genauen Analyse in Interaktionsstudien sollten darüber hinaus neben den zytoplasmatischen auch die membranständigen Inflammasom-Komponenten Pannexin-1 sowie der purinerge P2X₇-Rezeptor unterzogen werden. Der Halbkanal Pannexin-1 bildet durch seine Assoziation mit P2X₇ eine große Pore in der Zellmembran aus (Pelegriin & Surprenant, 2006). Pannexin-1 ist nicht nur für die ATP-induzierte Caspase-1 Aktivierung verantwortlich, sondern vermittelt zudem TLR-unabhängig die NALP3-Inflammasom-Stimulation durch bakterielle PAMPs wie LPS, synthetisches Lipid A oder Pam3CSK4 nach kurzem ATP-Puls (Kanneganti, 2007). Der TLR5-Agonist Flagellin erwies sich als PAMP hingegen als nicht-stimulatorisch für diese Rezeptoren. Gerade im Kontext des noch unklaren Aufnahmemechanismus von TcpC sowie der Tatsache, dass TIR-TcpC als alleiniger Stimulus in der Lage ist, das Inflammasom zu aktivieren, stellen diese Membrankomponenten

interessante mögliche Partner für Protein-Protein Interaktionsexperimente und damit als Schlüssel für ein besseres Verständnis des IL-1 Phänotyps dar.

4.4 IL-1 β als Wachstumsfaktor für CFT073: Bindungs- und Signaltransduktionsstudien sowie Einfluss auf die Virulenz des Erregers

Die TcpC-induzierte immunstimulatorische Aktivierung des Inflammasoms mit der Konsequenz der IL-1 β Freisetzung in der frühen Phase einer Infektion mit CFT073 bzw. nach der Stimulation mit TIR-TcpC warf die Frage auf, inwiefern das proinflammatorische Zytokin einen direkten Nutzen für den Erreger haben könnte. Ein Paradoxon der IL-1 β Induktion ergibt sich dadurch, dass CFT073 sowie andere UPEC Stämme evolutionär diverse Strategien verfolgen, um sich gezielt der Immunantwort im Laufe eines HWIs zu entziehen. Einerseits geschieht dies im Falle von CFT073 durch die TcpC-vermittelte TLR-Subversion, welche die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 unterdrückt (vgl. Kap. 3.2.1.) und hierdurch die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten als wichtige Effektorzellen zur Abwehr von Infektionen im Harnwegstrakt aktiv verhindert (Svanborg *et al.*, 2006). Des Weiteren ist das *rfa/rfb* Operon, welches an der LPS Biosynthese des UPEC Stammes UTI89 beteiligt ist essentiell für die Reduktion der IL-6 Sekretion in Urothelzellkulturen (Hunstad *et al.*, 2005). Auch das bei UPEC generell favorisierte glatte-LPS welches durch die Ligation eines spezifischen O-Antigens an die membranständige Lipid-A Endotoxin-Einheit gekoppelt vorliegt, trägt essentiell zur Reduktion der Zytokinsekretion der infizierten Zelle bei (Billips *et al.*, 2008). IL-1 β hingegen wirkt stimulierend auf die Rekrutierung von Neutrophilen und führt zur Aktivierung von Makrophagen (Rogers *et al.*, 1994). Das Zytokin wird *in vitro* nicht von allen Zellen exprimiert. So reagieren sowohl J82, eine Blasenepithelzelllinie sowie Nierenepithelzellen vom Typ A-498 auf Stimulation mit *E. coli* nicht mit der Sekretion von IL-1 β (Agace *et al.*, 1993). Die in dieser Arbeit eingesetzte humane Urothelzelllinie HCV29 jedoch exprimiert und sekretiert - besonders im sauren Milieu - IL-1 β nach vorheriger Stimulation (s. etwa Abbildung 24A). *In vivo* sind v.a. Monozyten und DCs des peripheren Blutes als signifikante IL-1 β Produzenten zu erwähnen.

Humanes IL-1 β kann jedoch interessanterweise auf der Erregerseite im Gegensatz zu anderen Zytokinen wie TNF oder IL-4 als Wachstumsfaktor für pathogene Stämme von *E. coli* wirken (Porat *et al.*, 1991). Es wurde daher überprüft, ob dieser Effekt auch für CFT073 zu

beobachten ist. In der Tat reagierten CFT073 sowie der mit Ausnahme von *tcpC* genetische identische Stamm *tcpC::kan*, nicht aber der Laborstamm BL21 Codon Plus RIL bereits deutlich auf die Zugabe von 225 pg/ml an murinem IL-1 β (s. Abbildung 31A). Diese Konzentration wurde gewählt, da sie der in Zellkulturen nachweisbaren Menge des Zytokins entspricht. Dieser Wachstumseffekt konnte durch die Zugabe eines Überschusses an murinem IL-1ra in isolierter Bakterienkultur neutralisiert werden (s. Abbildung 31A, B). Im Infektionskontext in der Anwesenheit von RAW264.7 Makrophagen führte die Zugabe von IL1ra zur Absenkung der extra- sowie der intrazellulär detektierbaren Erregermenge (vgl. Abbildung 30). Da RAWs jedoch nur geringe Mengen an wachstumsstimulierendem IL-1 β sekretieren, lagen die beobachteten Unterschiede nur im linearen Bereich. Weiterführende Experimente von Susanne Dürr beschäftigten sich mit der Titration des Zytokins auf reine Bakterienkulturen. In hohen Dosen (5-10 μ g/ml) zeigte CFT073 sogar exponentielle Wachstumsunterschiede im Vergleich zu nicht mit IL-1 β inkubierten Bakterien. Am stärksten ausgeprägt war die induzierte Wachstumszunahme, sofern stationäre Übernachtkulturen direkt in Zellkulturgefäße überführt und mit IL-1 β koinkubiert wurden. Nicht synchronisierte Vorkulturen reagierten deutlich schlechter auf das Zytokin. Wichtige Informationen zum Verständnis der Zytokinresponsivität könnte die Überprüfung der Expressionslevels möglicher oberflächenexponierter IL-1 β Bindemoleküle wie PapC (s.u.) in dieser Wachstumsphase sowie zu unterschiedlichen Zeiten der Koinkubation liefern. Da das pap-Operon unter Kontrolle des cAMP Rezeptor Proteines steht (Baga *et al.*, 1985), sollte zur Gewährleistung der vollen Induktion auch ein Glucose-freies Medium gewählt werden. Es gilt ausserdem zu bedenken, dass die hohen IL-1 β Konzentrationen, die in Anlehnung an Experimente von Porat *et al.* gewählt wurden, weit über den Levels liegen, welche *in vivo* nach Infektion erreicht werden können. Bei Patienten mit normaler Nierenfunktion liegt etwa die durchschnittliche IL-1 β Plasmakonzentration zum Zeitpunkt der Diagnose einer Sepsis bei $63,8 \pm 4$ pg/ml, 24 h später bei $118,1 \pm 3$ pg/ml. Hiervon werden lediglich $1,2 \pm 0,6$ % über den Harn ausgeschieden (Graziani *et al.*, 2006). *In vitro* Experimente mit IL-1 β Konzentrationen im hohen pg-Bereich reflektieren daher wohl am ehesten die realen Bedingungen auch während eines akuten HWIs. Aufbauend auf den Beobachtungen zu CFT073 belegen Daten von Susanne Dürr zudem, dass weitere UPEC Klinikisolate, welche durch PCR-Diagnostik positiv auf ein *TcpC*-homologes Gen getestet wurden ebenso mit verstärktem Wachstum auf IL-1 β Exposition reagieren. Es gilt daher im Folgenden zu

überprüfen, ob das Zytokin bei allen Erregern eines schweren HWIs zu verstärktem Wachstum führt und v.a., ob dieser Effekt durch die Gabe von IL-1ra im Hinblick auf die therapeutische Anwendung neutralisiert werden kann. Ähnlich wie für CFT073 und *tcpC::kan* wird zwar ein TcpC-unabhängiger IL-1 Wachstumseffekt erwartet, durch die Teps verfügen die entsprechenden Erreger jedoch über einen aktiven Induktor der Zytokinproduktion, was die parakrine Wirkung erhöht. Überprüft werden sollte zudem, welche transkriptionellen Veränderungen IL-1 β auf Erregerseite hervorruft. Besonders die Regulation essentieller metabolischer Gene sowie der UPEC-spezifischen Virulenzfaktoren sollte hierbei im Mittelpunkt stehen, um das Wachstumsphänomen sowie eine mögliche Korrelation mit erhöhter Virulenz der Erreger herausarbeiten zu können.

Bakterien verfügen über eine Reihe von Sensor- und Signaltransduktionsmechanismen, welche es ihnen ermöglichen, eine Vielzahl an extra- sowie intrazellulären Stoffen zu erkennen und somit schnell auf sich ändernde Umweltbedingungen zu reagieren und durch Transkriptionsregulation ihre metabolischen Abläufe an die aktuelle Situation anzupassen. Dies geschieht zumeist über Zwei-Komponenten, bei Gram-positiven Keimen auch durch Drei-Komponenten Systeme (Li *et al.*, 2007). In Gram-negativen Bakterien besteht das Zwei-Komponenten System im einfachsten Fall aus einer Sensor-Histidinkinase, meist verankert in äußerer oder innerer Zellmembran, oder wie im Falle des Chemotaxis Sensors CheA lokalisiert im Zytoplasma (Wadhams & Armitage, 2004). Diese Kinase überträgt eine Phosphatgruppe an einen sog. Response-Regulator, welcher nach Aspartat-Phosphorylierung durch die Kinase Veränderungen der Genexpression und Proteinfunktion hervorruft. Kein charakterisiertes Zwei-Komponenten System wurde bis jetzt jedoch als Detektor eines eukaryontischen Zytokins beschrieben. Mit Caf1A, einem Anker-Protein in der äußeren Membran von *Yersinia pestis* ist jedoch ein Adhäsionsmolekül beschrieben, welches humanes IL-1 β zu binden vermag (Zav'yalov *et al.*, 1995). Es ist Bestandteil des F1-Pilus mit der Funktion, dessen Assemblierung als Usherprotein zu koordinieren. Es liegt allerdings keine weiterführende Literatur vor, die auf ein Signaltransduktionsgeschehen nach IL-1 Bindung eingehen würde. Dennoch diene Caf1A als Referenzmolekül für die Recherche homologer Proteine in *E. coli* CFT073, die als Kandidaten für Bindung und Signalweiterleitung nach IL-1 β Kontakt in Frage kommen. In der Tat fanden sich mittels *genomic BLAST* Suche drei Kandidatenproteine mit signifikanter Homologie zu Caf1A im CFT073-Proteom: FimD (34% Sequenzidentität), F1C (31% Identität) sowie PapC (21% Identität). Als UPEC-

spezifisches Virulenzprotein wurde v.a. PapC (Genlocus: c3590), die Usherkomponente des Pap-Pilus, funktionell näher charakterisiert (vgl. Kap. 1.2, 3.6.3). Das Protein zeigt als weiteres wichtiges Charakteristikum Ähnlichkeit zur Site A sowie Site B Bindestelle des sIL-1R (vgl. Abbildung 32). Erstere bindet neben IL-1 β IL-1 α und den IL-1ra, zweitere nur IL-1 α und IL-1 β (Vigers *et al.*, 1997). Mit PapC-short (AS 35-377) wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Variante als C-terminales *Strep*-tag II Fusionsprotein konstruiert, die das Site A-homologe Motiv des sIL-1R vollständig enthält. PapC durchzieht die äußere Membran des Bakteriums wie viele weitere *outer membrane proteins* in Form eines β -Barrels, sodass nur definierte Loop-Regionen im extrazellulären Bereich für die Bindung von IL-1 β in Frage kommen (Thanassi *et al.*, 1998). Eine Topologievorhersage für die Variante PapC-short des Usherproteines ergab, dass viele der Site A-homologen Regionen in der gewählten Domäne extrazellulär lokalisiert sind und somit theoretische Bindungselemente für IL-1 β darstellen. Diese Annahme wurde durch die Aufklärung der Kristallstruktur des Detergens-solubilisierten Vollängen PapC im Nachhinein bestätigt (Remaut *et al.*, 2008). Wie aus Abbildung 33 hervorgeht, ist PapC-short in der Lage, in Pull-Down Experimenten spezifisch mit murinem IL-1 β über den physiologisch relevanten pH-Bereich von 5,2-8,2 zu interagieren. In Stimulationsassays wurde durch Susanne Dürr zudem demonstriert, dass rekombinantes PapC-short die wachstumsfördernde Funktion von IL-1 β auf CFT073 zu neutralisieren vermag. Hierzu wurde ein 5-100facher Überschuss an PapC angeboten, wobei dosisabhängige Inhibitionsraten von 20-90% des IL-1 β -Effekts erzielt werden konnten. Eine weitere Variante, PapC-long (AS 77-748), die zusätzlich über das Site B-vergleichbare Motiv des sIL-1R und damit eine weitere IL-1 β Interaktionsstelle verfügen könnte, wurde wegen zu niedriger Ausbeute und Reinheit noch nicht auf deren Interaktionspotential mit dem Zytokin getestet. Neben der Überprüfung der Bindungseigenschaften der PapC-long-Variante wäre es im Folgenden zudem von Interesse, mittels Oberflächen-Plasmon-Resonanz Spektroskopie die exakte Affinität der PapC-Proteine für IL-1 β zu bestimmen. Da sowohl PapC-short als auch PapC-long auch ein potentiell IL-1 α bindendes Motiv enthalten, könnte auch dieses Zytokin für Bindungsstudien und im Folgenden auch für Wachstumsassays mit diversen UPECs zum Einsatz kommen, sollte sich auch hierfür eine Interaktion demonstrieren lassen. Da fimbrielle Adhäsionsproteine generell ein breites Bindungsspektrum aufweisen, sollten zudem weitere Zytokine als Negativkontrolle in die Interaktionsstudien eingeführt werden, um die Spezifität der IL-1 β Bindung zu bestätigen. Zur Analyse der generellen Fähigkeit der

IL-1 β -Bindung durch bakterielle Usher Proteine, gilt es, auch FimD und F1C ähnlichen Interaktionsstudien zu unterziehen. Ebenso könnten weitere Caf1A-ähnliche Usher- und Membranproteine anderer Pathogene exemplarisch untersucht werden. Zu nennen wären etwa ein potentielles Fimbrien-Usher Protein (Genlocus: STM0301) aus *Salmonella typhimurium* LT2, welches gemäß *in silico* Analysen 42% Sequenzidentität zu Caf1A aufweist.

Nach dem Nachweis der IL-1 β Bindung durch PapC lautete eine weiterführende Fragestellung, ob und ggf. wie das Bakterium dieses extrazelluläre Gefahrensignal seitens einer eukaryontischen Zelle verarbeiten und hierdurch transkriptionelle Änderungen hervorrufen kann, welche CFT073 die effiziente Adaption im Laufe der Besiedelung des Harnwegtraktes ermöglichen. Der Pap-Pilus als Adhäsionsorganell und Prototyp des Chaperon-Usher Fimbrientyps uropathogener Stämme (Thanassi & Hultgren, 2000) verfügt als extrazelluläres Strukturprotein *per se* über keine Feedback-Kopplung zur Signalweiterleitung ins Zellinnere. Allerdings ist für das Zwei-Komponenten System CpxA/CpxR eine Rolle als Sensor- und Signaldomäne für fehlgefaltete periplasmatische Pilusaggregate uropathogener Stämme beschrieben (Jones *et al.*, 1997). In Laborstämmen von *E. coli* fungiert CpxA als Sensor-Histidinkinase der inneren Membran, welche missgefaltete Pilusuntereinheiten erkennt und auf eine Vielzahl externer Signale wie alkalischen pH, Interaktion mit hydrophoben Oberflächen, Detergenzien, EDTA oder Kupferexposition reagieren kann (Wolfe *et al.*, 2008). Als Antwort hierauf, kommt es zur Autophosphorylierung von CpxA, das seine Phosphatgruppe auf CpxR, den korrespondierenden zytoplasmatischen Response-Regulator überträgt, sodass CpxR im Anschluss als Transkriptionsfaktor multiple Prozesse wie Adhärenz, Biofilmbildung, Motilität und Chemotaxis, aber auch die Biogenese von Typ III Sekretionssystemen sowie Typ IV Pili pathogener Stämme wie *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium oder von EPECs beeinflussen kann (Suntharalingam *et al.*, 2003; Duguay & Silhavy, 2004; Nevesinjac & Raivio, 2005). Der Cpx-Signalweg bedarf zur vollen Funktionsfähigkeit darüber hinaus alternativ zweier upstream-lokalisierter Proteine: NlpE, einem Lipoprotein der äußeren Membran sowie CpxP, einem periplasmatischen Chaperon. Während NlpE CpxA als Adhäsionssensor bei der Anheftung an hydrophobe Oberflächen aktiviert (Otto & Silhavy, 2002), fungiert CpxP als genereller Stressindikator, welcher u.a. missgefaltete Proteine des Pap-Pilus erkennt und diese in Kontakt zur periplasmatischen Protease DegP bringt (Jones *et al.*, 1997; Isaac *et al.*, 2005). DegP degradiert die "*off-pathway*" Pilus-Proteine, welche andernfalls toxische, fehlgefaltete

Aggregate bilden würden, wobei wohl auch CpxP selbst mit diesen durch DegP abgebaut wird (Isaac *et al.*, 2005). CpxP ist das nach Stimulierung des CpxA/CpxR-Signalweges am stärksten induzierte Protein des Cpx-Regulons, wobei zu den Induktoren fehlgefaltetes PapE und PapG zählen (DiGiuseppe & Silhavy, 2003).

Mit dem Cpx-Signaltransduktionsweg ist daher nicht nur ein globales Regelsystem für *E. coli*, sondern zudem ein Weg beschrieben ist, welcher direkt Expression und Regulation von Virulenzfaktoren pathogener Spezies beeinflussen kann (Beier & Gross, 2006; Macritchie *et al.*, 2008). So ist eine Aktivierung des CpxA/CpxR-Weges essentiell für die Ausbildung von Typ IV Bundle-forming Pili in EPECs (Nevesinjac & Raivio, 2005). Für die Arbeit mit CFT073 als UPEC-Stamm wurde das für die Homöostase der Pap-Pilus Synthese essentielle Protein CpxP als Kandidatenprotein ausgewählt, um eine mögliche Interaktion mit dem IL-1 β -Bindeprotein PapC nachzuweisen. Hierzu wurde CpxP aus CFT073 (Genlocus: c4865) als rekombinantes Protein exprimiert und aufgereinigt (s. Kap. 3.1). Dieses soll im Folgenden für Bindungsstudien mit rekombinantem bzw. natürlichem PapC aus CFT073 eingesetzt werden. Auf Grund der Verankerung von PapC in der äußeren bakteriellen Membran ist die Interaktion der periplasmatischen Domänen mit CpxP theoretisch möglich. CpxP könnte etwa auf eine durch IL-1-Bindung hervorgerufene Konformationsänderung des Pilus-Proteins hin rekrutiert werden und somit eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen. Alternativ mag die IL-1 β Interaktion den oligomeren PapC-Kanal in der Membran derart verengen, dass keine weiteren extrazellulären Pilus-Bestandteile wie PapG mehr ausgeschleust werden können. Deren Akkumulation würde dann indirekt zur Aktivierung von CpxP führen, jedoch ohne nachweisbare Wechselwirkung mit PapC.

Basierend auf experimentellen Daten zu PapC und Literaturhinweisen zur möglichen Funktion von CpxP wurden von Andreas Wieser am Max von Pettenkofer-Institut der LMU ein chromosomaler PapC- sowie einen CpxP-KO Stamm des Erregers CFT073 generiert (*papC::kan* bzw. *cpxP::kan*, Locus 4865), um den Einfluss des Usherproteines sowie des Chaperons des CpxA/CpxR Zwei-Komponenten System im Rahmen einer Infektion *in vitro* und *in vivo* analysieren zu können (vgl. Kap. 4.4). In ersten Experimenten von Susanne Dürr zeigte sich ein deutlich erniedrigtes Wachstumzuwachs des *papC::kan* Stammes als Antwort auf IL-1 β Exposition im Vergleich zu CFT073 oder *tcpC::kan*. Es blieb jedoch eine Restreaktivität erhalten, was auf weitere IL-1 Interaktionspartner wie FimD oder F1C zurückgeführt werden mag. Zudem besitzt CFT073 über zwei vollständige Pap-Operon-

Strukturen in seinem Genom, wobei nur eine PapC Kopie im Zug der KO-Generierung eliminiert wurde. Die andere PapC-Komponente (Genlocus c3590 bzw. c5186) könnte daher als funktionelle Komplementante fungieren. Der *cpxP::kan* Stamm erwies sich in initialen Experimenten als nicht mehr responsiv für IL-1 β , wobei dieser Phänotyp noch hinreichend bestätigt werden muss, bevor hieraus Schlussfolgerungen auf CpxP als mögliche Sensorkomponente für den extrazellulären Zytokinstimulus gezogen werden. Für alle Wachstumsassays mit CFT073 sowie den KO-Varianten gilt es generell noch zu überprüfen, welchen Einfluss Medium, Temperatur und Synchronität der Vorkulturen auf den beobachteten IL-1 Phänotyp ausüben. Als wichtige Kontrolle müsste hierbei zudem die Expressionsrate der interessierenden Zielproteine (TcpC, PapC, CpxP) mittels Antikörpernachweis unter unterschiedlichen Kulturbedingungen getestet werden, um eindeutige Rückschlüsse auf den Effekt der jeweiligen Komponente ziehen zu können.

Schlussendlich sollte das Wissen um die durch TcpC-induzierte IL-1 β Freisetzung auch als Anstoss gesehen werden, *in vitro* sowie *in vivo* Experimente zur TLR-Inhibition auf der Ebene von MyD88 neu zu bedenken, da in gewissen Zelltypen oder Organen deutlich höhere Mengen des proinflammatorischen Zytokins erreicht werden können als in den in dieser Arbeit oftmals verwandten RAW267.4 Makrophagen, wodurch sich nicht nur die intrazelluläre sondern auch die Gesamterregerlast (vgl. Kap. 3.2) deutlich zu Gunsten des IL-1 β induzierenden CFT073 Wildtyp-Stammes im Vergleich zu *tcpC::kan* verschiebt.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde am Beispiel der bakteriellen TIR-Proteine TcpC des UPEC Stammes CFT073 sowie in Einzelaspekten auch für TcpB des Erregers *Brucella melitensis* exemplarisch deren inhibitorisches Potential auf das Toll-like Rezeptor (TLR)-Signaltransduktionsgeschehen erarbeitet. Das TLR-System mit seinen membranständigen sowie endosomal lokalisierten Molekülen zählt zu den wichtigsten Vertretern der "Pattern-recognition" Rezeptoren des angeborenen Immunsystems und bildet daher durch die Erkennung extrazellulärer sowie intrazellulärer PAMPs eine wichtige Barriere für invasive Erreger. Es konnte gezeigt werden, dass TcpC und TcpB positive CFT073 Stämme die MyD88-abhängige TLR-mediierte Zytokinsekretion infizierter muriner Makrophagen und DCs sowie humaner Uroepithelzellen im Vergleich zum TcpC KO Stamm *tcpC::kan* signifikant reduzieren. Ferner erhöht die Expression der TIR-Proteine zugleich die intrazelluläre Präsenz der Erreger. Anhand von Pull-Down Assays mit rekombinantem *Streptag* II markiertem TIR-TcpC sowie TcpB als "Bait Proteine" wurde eine direkte Interaktion mit MyD88, dem zentralen intrazellulären Adaptermolekül aller bis dato charakterisierten TLRs mit Ausnahme von TLR3 demonstriert, wodurch ein direktes Zielmolekül für den inhibitorischen Phänotyp der bakteriellen Proteine definiert wurde.

TcpC agiert als sekretierter Virulenzfaktor, dessen Basalelevelexpression durch saures Milieu, aber auch durch Koinkubation mit Makrophagen verstärkt werden kann. Die Applikation des Efflux-Pump Inhibitors L-Phenylalanin-L-Arginin- β -Naphthylamid (PA β N) (Pannek *et al.*, 2006) konnte sowohl die Sekretion von TcpC als auch die dadurch initiierte TLR-Signalblockade aufheben. Da die inhibierte Efflux-Maschinerie analog zum bakteriellen Typ I Proteinsekretionswege u.a aus einem TolC-ähnlichen Protein besteht, stellt dieser Weg in Abwesenheit eines funktionellen Typ III und Typ IV Sekretionssystemes für CFT073 eine mögliche TcpC Exportstrategie dar. Im Anschluss an die Sekretion transloziert TcpC zügig und erregerunabhängig in die Wirtszelle. Exogen appliziertes rekombinantes TIR-TcpC alleine genügt zudem, um die Stimulation aller MyD88-abhängigen TLRs, nicht jedoch die Trif-mediierte TLR3-Antwort dosisabhängig zu supprimieren. Das Cholesterin-depletierende Molekül Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) ist dazu befähigt, die Aufnahme von TIR-TcpC und hiermit den TLR-inhibierenden Phänotyp des Proteines aufzuheben, was für einen

rezeptorunabhängigen Aufnahmeweg von TcpC, entweder über Clathrin-besetzte endozytische oder Caveolae-/Glycolipid Rafts sprechen würde. TcpC selbst verfügt über einen stark basisches C-terminales Fragment (AS 293-307), dessen Mutation gegen neutrale AS bzw. Deletion die verminderte Aufnahme in BMMs zur Folge hat. Durch seine Ähnlichkeit zu einer vergleichbaren Sequenz des HIV Tat Proteines, welches alleine dessen Zellpenetration bewirkt, stellt der TcpC-C-Terminus eine potentielle Struktur für die proteinkodierte Aufnahme dar.

TcpC sowie TcpB zeigen proteolytische Aktivität, welche im Falle von TcpC durch die Mutation S176A aufgehoben werden kann, wodurch TcpC(S176A) das Potential zur TLR-Inhibition verliert. Inwiefern die proteolytische Aktivität jedoch bei Autoprocessing, Aufnahme oder TLR-Modulation eine Rolle spielt, gilt es noch zu klären.

Die Sekretion von IL-1 β , welches über einen NF- κ B Promotor verfügt und daher auch TLR-abhängig reguliert wird, wurde als einziges Zytokin in Anwesenheit von TcpC, aber auch durch die rekombinanten Proteine TIR-TcpC und verstärkt noch durch die N-terminal verlängerten Variante TIR-TcpC elongated induziert. Die Prozessierung durch Caspase-1 sowie die Freisetzung dieses potenten proinflammatorischen Mediators wird durch das Inflammasom kontrolliert. Die IL-1 β Sekretion erwies sich als MyD88-unabhängig, jedoch abhängig vom Inflammasom-Adapterprotein ASC. Eine direkte Interaktion der Tcps mit ASC oder anderen Komponenten des Inflammasoms konnte allerdings bis dato nicht demonstriert werden. Interessanterweise nutzt CFT073 das eukaryontische Zytokin IL-1 β als Wachstumsfaktor. Dieser stimulierende Effekt kann durch die Zugabe murinen IL-1 Rezeptorantagonisten neutralisiert werden und war nur für pathogenen Stämme von *E. coli* (CFT073 und *tcpC::kan*) zu beobachten, nicht jedoch für avirulente K12-Abkömmlinge wie BL21. Als möglicher Bindungspartner für IL-1 β an der Oberfläche von CFT073 wurde durch Interaktionsstudien PapC definiert. Dieses Usherprotein ist eine wesentliche Komponente des Pap-Pilus, eines zur Virulenz beitragenden Adhäsionkomplexes uropathogener Stämme. Gewisse PapC Domänen zeigen Sequenzhomologie zur IL-1-Bindestelle des löslichen humanen IL-1 Rezeptors, wodurch eine funktionelle Homologie zur Bindung des Zytokines bestehen könnte. Wie jedoch das durch Interaktion mit IL-1 β ausgelöste Signal in der bakteriellen Zelle weitergeleitet wird und zu erhöhtem Wachstum führt, muss noch geklärt werden.

6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP-1	Aktivator Protein 1
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
ÄB-Puffer	Äquilibrierungs / Bindungspuffer
AS	Aminosäure
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>
aTc	Anhydrotetracyclin
ATF-2	Aktivierender Transkriptionsfaktor 2
BAL	2,3-Dimercapto-1-Propanol
BMM	Knochenmarksmakrophage (<i>bone marrow-derived macrophage</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Rinder-Serumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
JNK	c-JUN N-terminale Kinase
Caf1A	<i>Capsule antigen F1 assembly</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CARD	<i>Caspase-recruiting domain</i>
CATERPILLER	<i>CARD, transcription enhancer, R (purine)-binding, pyrin, lots of leucine repeats</i>
Cm	Chloramphenicol
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
DC	Dendritische Zelle
DD	<i>Death domain</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang (<i>double-strand</i>) RNA

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ϵ_x	Extinktionskoeffizient bei x nm
ExPECs	Extraintestinale pathogene <i>E. coli</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FlAsH-EDT ₂	<i>Fluorescein arsenical hairpin binder</i> komplexiert mit (1,2-Ethandithiol) ₂
g	Erdbeschleunigung
GF	Gelfiltration
GM-CSF	Makrophagen/ Granulozyten koloniestimulierender Faktor, auch CSF-2
h	Humanen Ursprungs
HABA	2'-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
hc	<i>high-copy</i>
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HWI	Harnwegsinfekt
(k)Da	(Kilo)-Dalton (atomare Masseneinheit)
IB	Inclusion body
I κ B	Inhibitor von κ B
IKK	Inhibitor der κ B Kinase
IL	Interleukin
IL-1ra	IL-1 Rezeptorantagonist
INF	Interferon
IPAF	<i>ICE-protease activating factor</i>
iPLA ₂	Calcium-unabhängige Phospholipase A2
IPS-1	<i>Interferon promoter stimulator-1</i>
IRAK	<i>IL-1 receptor-associated kinase</i>

IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
JNK	c-JUN N-terminale Kinase
Kan	Kanamycin
KO	Knock-out (hier KO Stamm für ein spezifisches Gen des <i>E. coli</i> Stammes CFT073)
KO+iTepB	CFT073 <i>tcpC::kan</i> komplementiert mit pASK-IBA3+ / TepB
KO+pTepC	CFT073 <i>tcpC::kan</i> komplementiert mit pACYC184 TepC Operon
KO+pTepC(C12S)	CFT073 <i>tcpC::kan</i> komplementiert mit pACYC184 TepC (C12S)
KO+pTepC(S176A)	CFT073 <i>tcpC::kan</i> komplementiert mit pACYC184 TepC (S176A)
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucin-rich repeat</i>
LTA	Lipoteichonsäure
m	Murinen Ursprungs
MAL	MyD88 <i>adaptor-like</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase Kinase
M-CSF	Makrophagen-spezifischer koloniestimulierender Faktor, auch CSF-1
M β CD	Methyl- β -Cyclodextrin
Mda5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
M _R	Molekülmasse
MW	<i>Mean residue weight</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NALP	<i>NACHT-, LRR and pyrin-domain containing protein</i>
NAIP	<i>Neuronal apoptosis inhibitor protein</i>

NBD	<i>Nucleotide-binding domain</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor κB</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NLR	NOD-like Rezeptor
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ODN	Oligodesoxynukleotid
ORF	<i>Open reading frame</i>
<i>Ori</i>	<i>Origin of replication</i>
Pam3CSK4	(S)-[2,3-Bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-Cys- (S)-Ser-(S)-Lys ₄ -OH
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PAβN	L-Phenylalanin-L-Arginin-β-Naphtylamid
Pap	Pyelonephritis-assoziiertes Pilus
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
poly(I:C)	Polyinosine-polycytidylsäure
PRR	" <i>Pattern-recognition</i> " Rezeptor
PYD	<i>Pyrin domain</i>
RAW	RAW267.4 Makrophage
RF	Rückfaltung
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RIP	<i>Receptor interacting protein</i>
RNAse A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur

SAC	Streptavidin-Affinitätschromatographie
SaTLP	<i>Staphylococcus aureus TIR-like protein</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIGIRR	<i>Single immunoglobulin IL-1-receptor related protein</i>
sIL-1R	<i>Soluble IL-1 receptor</i>
siRNA	<i>Short interfering RNA</i>
ssDNA	Einzelstrang (<i>single-strand</i>) DNA
ssRNA	Einzelstrang (<i>single-strand</i>) RNA
TAB1	<i>TAK1-binding protein 1</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor-β-activated kinase 1</i>
TBK-1	<i>TANK-binding kinase-1</i>
Tat Export	<i>Twin arginine translocation</i> Export
TcpB	<i>TIR domain containing protein B</i>
TcpC	<i>TIR domain containing protein C</i>
T _H 2	<i>T helper 2</i>
TIR	Toll-/Interleukin-1 Rezeptor Domäne
TIRAP	<i>TIR-domain containing adaptor protein</i>
TlpA	<i>TIR-like protein A</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TOLLIP	<i>Toll-interacting protein</i>
TRAF6	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6</i>
TRAM	<i>Trif-related adaptor molecule</i>
Trif	<i>TIR-domain containing adaptor inducing INFβ</i>
tRNA	transfer Ribonukleinsäure
ü. N.	über Nacht
UPEC	Uropathogener <i>Escherichia coli</i>
U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
v/v	Volumen pro Volumen
Wt	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen

7 Literaturverzeichnis

- Agace, W., Hedges, S., Andersson, U., Andersson, J., Ceska, M. & Svanborg, C.** (1993): "Selective cytokine production by epithelial cells following exposure to *Escherichia coli*." Infect. Immun. 61 (2), 602-609.
- Akira, S. & Sato, S.** (2003): "Toll-like receptors and their signaling mechanisms." Scand. J. Infect. Dis. 35 (9), 555-562.
- Andersen, C., Hughes, C. & Koronakis, V.** (2000): "Channel vision. Export and efflux through bacterial channel-tunnels." EMBO Rep 1 (4), 313-318.
- Arellano-Reynoso, B., Lapaque, N., Salcedo, S., Briones, G., Ciocchini, A. E., Ugalde, R., Moreno, E., Moriyon, I. & Gorvel, J. P.** (2005): "Cyclic beta-1,2-glucan is a *Brucella* virulence factor required for intracellular survival." Nat. Immunol. 6 (6), 618-625.
- Athman, R. & Philpott, D.** (2004): "Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins." Curr. Opin. Microbiol. 7 (1), 25-32.
- Baga, M., Goransson, M., Normark, S. & Uhlin, B. E.** (1985): "Transcriptional activation of a pap pilus virulence operon from uropathogenic *Escherichia coli*." Embo J. 4 (13B), 3887-3893.
- Bean, M. A., Pees, H., Fogh, J.E. Grabstald, H. & Oettgen, H.F.** (1974): "Cytotoxicity of lymphocytes from patients with cancer of the urinary bladder: detection by a 3-H-proline microcytotoxicity test." Int J Cancer. 14 (3), 186-194.
- Becker-Hapak, M., McAllister, S. S. & Dowdy, S. F.** (2001): "TAT-Mediated Protein Transduction into Mammalian Cells." Methods 24 (3), 247-256.
- Beier, D. & Gross, R.** (2006): "Regulation of bacterial virulence by two-component systems." Curr. Opin. Microbiol. 9 (2), 143-152.
- Berks, B. C., Sargent, F. & Palmer, T.** (2000): "The Tat protein export pathway." Mol. Microbiol. 35 (2), 260-274.
- Bhushan, S., Tchatalbachev, S., Klug, J., Fijak, M., Pineau, C., Chakraborty, T. & Meinhardt, A.** (2008): "Uropathogenic *Escherichia coli* block MyD88-dependent and activate MyD88-independent signaling pathways in rat testicular cells." J. Immunol. 180 (8), 5537-5547.
- Billips, B. K., Schaeffer, A. J. & Klumpp, D. J.** (2008): "Molecular basis of uropathogenic *Escherichia coli* evasion of the innate immune response in the bladder." Infect. Immun. 76 (9), 3891-3900.
- Birnboim, H. C. & Doly, J.** (1979): "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Research 7 (6), 1513-1523.
- Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J. A., Smith, G. L., Dower, S. K. & O'Neill, L. A.** (2000): "A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97 (18), 10162-10167.
- Brint, E. K., Xu, D., Liu, H., Dunne, A., McKenzie, A. N., O'Neill, L. A. & Liew, F. Y.** (2004): "ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance." Nat. Immunol. 5 (4), 373-379.
- Burns, K., Janssens, S., Brissoni, B., Olivos, N., Beyaert, R. & Tschopp, J.** (2003): "Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively

- spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4." *J. Exp. Med.* **197** (2), 263-268.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T. & Goeddel, D. V.** (1996): "TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1." *Nature* **383** (6599), 443-446.
- Carty, M., Goodbody, R., Schroder, M., Stack, J., Moynagh, P. N. & Bowie, A. G.** (2006): "The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling." *Nat. Immunol.* **7** (10), 1074-1081.
- Chen, Z. J.** (2005): "Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway." *Nat. Cell. Biol.* **7** (8), 758-765.
- Chen, Z. J., Bhoj, V. & Seth, R. B.** (2006): "Ubiquitin, TAK1 and IKK: is there a connection?" *Cell Death Differ.* **13** (5), 687-692.
- Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S., Fischer, H., Stappert, D., Wantia, N., Rodriguez, N., Wagner, H., Svanborg, C. & Miethke, T.** (2008): "Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins." *Nat. Med.* **14** (4), 399-406.
- Cogswell, J. P., Godlevski, M. M., Wisely, G. B., Clay, W. C., Leesnitzer, L. M., Ways, J. P. & Gray, J. G.** (1994): "NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site." *J. Immunol.* **153** (2), 712-723.
- Cohen, S. N., Chang, A.C.Y. & Hsu, L.** (1988): "A rapid and convenient method for the preparing and storage of competent bacterial cells." *Nucleic Acids Res.* **16** (8), 3580.
- Connell, I., Agace, W., Klemm, P., Schembri, M., Marild, S. & Svanborg, C.** (1996): "Type 1 fimbrial expression enhances Escherichia coli virulence for the urinary tract." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **93** (18), 9827-9832.
- Costa, C. P., Kirschning, C. J., Busch, D., Durr, S., Jennen, L., Heinzmann, U., Prebeck, S., Wagner, H. & Miethke, T.** (2002): "Role of chlamydial heat shock protein 60 in the stimulation of innate immune cells by Chlamydia pneumoniae." *Eur J Immunol* **32** (9), 2460-2470.
- Creagh, E. M. & O'Neill, L. A.** (2006): "TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity." *Trends Immunol.* **27** (8), 352-357.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L.** (2000): "One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97** (12), 6640-6645.
- Davis, C. N., Mann, E., Behrens, M. M., Gaidarova, S., Rebek, M., Rebek, J., Jr. & Bartfai, T.** (2006): "MyD88-dependent and -independent signaling by IL-1 in neurons probed by bifunctional Toll/IL-1 receptor domain/BB-loop mimetics." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103** (8), 2953-2958.
- Delrue, R. M., Martinez-Lorenzo, M., Lestrade, P., Danese, I., Bielarz, V., Mertens, P., De Bolle, X., Tibor, A., Gorvel, J. P. & Letesson, J. J.** (2001): "Identification of Brucella spp. genes involved in intracellular trafficking." *Cell. Microbiol.* **3** (7), 487-497.
- DiGiuseppe, P. A. & Silhavy, T. J.** (2003): "Signal detection and target gene induction by the CpxRA two-component system." *J. Bacteriol.* **185** (8), 2432-2440.
- Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T. L., Oswald-Richter, K., Kasproicz, D. J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., Ziegler, S., Unutmaz, D. & Pulendran, B.** (2006): "Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance." *J. Clin. Invest.* **116** (4), 916-928.
- Dinarello, C. A.** (1996): "Biologic basis for interleukin-1 in disease." *Blood* **87** (6), 2095-2147.

- Dinarelo, C. A.** (2006): "Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process." *Am. J. Clin. Nutr.* 83 (2), 447S-455S.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. & Hacker, J.** (2004): "Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms." *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (5), 414-424.
- Duguay, A. R. & Silhavy, T. J.** (2004): "Quality control in the bacterial periplasm." *Biochim. Biophys. Acta* 1694 (1-3), 121-134.
- Faustin, B., Lartigue, L., Bruey, J. M., Luciano, F., Sergienko, E., Bailly-Maitre, B., Volkmann, N., Hanein, D., Rouiller, I. & Reed, J. C.** (2007): "Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation." *Mol. Cell* 25 (5), 713-724.
- Feldmann, F., Sorsa, L. J., Hildinger, K. & Schubert, S.** (2007): "The salmochelin siderophore receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in vitro." *Infect. Immun.* 75 (6), 3183-3187.
- Fischer, H., Yamamoto, M., Akira, S., Beutler, B. & Svanborg, C.** (2006): "Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection." *Eur. J. Immunol.* 36 (2), 267-277.
- Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M. & Golenbock, D. T.** (2003): "LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF." *J. Exp. Med.* 198 (7), 1043-1055.
- Fluit, A. C., Schmitz, F. J. & Verhoef, J.** (2001): "Frequency of isolation of pathogens from bloodstream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients." *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 20 (3), 188-191.
- Fortier, A., de Chastellier, C., Balor, S. & Gros, P.** (2007): "Birce/Naip5 rapidly antagonizes modulation of phagosome maturation by *Legionella pneumophila*." *Cell. Microbiol.* 9 (4), 910-923.
- Franchi, L., Amer, A., Body-Malapel, M., Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Jagirdar, R., Inohara, N., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E. P. & Nunez, G.** (2006): "Cytosolic flagellin requires Ipaf for activation of caspase-1 and interleukin 1beta in salmonella-infected macrophages." *Nat. Immunol.* 7 (6), 576-582.
- Franchi, L., McDonald, C., Kanneganti, T. D., Amer, A. & Nunez, G.** (2006): "Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors: intracellular pattern recognition molecules for pathogen detection and host defense." *J. Immunol.* 177 (6), 3507-3513.
- Frankel, A. D. & Pabo, C. O.** (1988): "Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus." *Cell* 6 (55), 1189-1193.
- Freundus, B., Wachtler, C., Hedlund, M., Fischer, H., Samuelsson, P., Svensson, M. & Svanborg, C.** (2001): "*Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation." *Mol. Microbiol.* 40 (1), 37-51.
- Fréndéus, B., Wachtler, C., Hedlund, M., Fischer, H., Samuelsson, P., Svensson, M. & Svanborg, C.** (2001): "P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation." *Molecular Microbiology* 40 (1), 37-51.
- Fuchs, S. M. & Raines, R. T.** (2005): "Polyarginine as a multifunctional fusion tag." *Protein Sci.* 14 (6), 1538-1544.
- Gautam, J. K., Ashish, Comeau, L. D., Krueger, J. K. & Smith, M. F., Jr.** (2006): "Structural and functional evidence for the role of the TLR2 DD loop in TLR1/TLR2 heterodimerization and signaling." *J. Biol. Chem.* 281 (40), 30132-30142.

- Geisselsoder, J. W., F. & Yuckenberg, P.** (1987): "Efficient site-directed *in vitro* mutagenesis." Biotechniques *5*, 786-791.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H.** (1989): "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." Anal. Biochem *182*, 319-326.
- Goosney, D. L., Knoechel, D. G. & Finlay, B. B.** (1999): "Enteropathogenic E. coli, Salmonella, and Shigella: masters of host cell cytoskeletal exploitation." Emerg. Infect. Dis. *5* (2), 216-223.
- Gorvel, J. P. & Moreno, E.** (2002): "Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication." Vet. Microbiol. *90* (1-4), 281-297.
- Graziani, G., Bordone, G., Bellato, V., Finazzi, S., Angelini, C. & Badalamenti, S.** (2006): "Role of the kidney in plasma cytokine removal in sepsis syndrome: a pilot study." J. Nephrol. *19* (2), 176-182.
- Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schäfer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., Förster, I. & Ruland, J.** (2006): "Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity." Nature *442* (7103), 651-656.
- Guex, N. & Peitsch, M. C.** (1997): "SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling." Electrophoresis *18* (15), 2714-2723.
- Guichon, A., Hersh, D., Smith, M. R. & Zychlinsky, A.** (2001): "Structure-function analysis of the Shigella virulence factor IpaB." J. Bacteriol. *183* (4), 1269-1276.
- Guyer, D. M., Henderson, I. R., Nataro, J. P. & Mobley, H. L.** (2000): "Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic Escherichia coli." Mol. Microbiol. *38* (1), 53-66.
- Harte, M. T., Haga, I. R., Maloney, G., Gray, P., Reading, P. C., Bartlett, N. W., Smith, G. L., Bowie, A. & O'Neill, L. A.** (2003): "The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense." J. Exp. Med. *197* (3), 343-351.
- Harton, J. A., Linhoff, M. W., Zhang, J. & Ting, J. P.** (2002): "Cutting edge: CATERPILLER: a large family of mammalian genes containing CARD, pyrin, nucleotide-binding, and leucine-rich repeat domains." J Immunol *169* (8), 4088-4093.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L. & Anderson, K. V.** (1988): "The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein." Cell *52* (2), 269-279.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M. & Aderem, A.** (2001): "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5." *410* (6832), 1099-1103.
- Hayden, M. S. & Ghosh, S.** (2004): "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev. *18* (18), 2195-2224.
- Hedlund, M., Frendeus, B., Wachtler, C., Hang, L., Fischer, H. & Svanborg, C.** (2001): "Type 1 fimbriae deliver an LPS- and TLR4-dependent activation signal to CD14-negative cells." Mol. Microbiol. *39* (3), 542-552.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. & Bauer, S.** (2004): "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." Science *303* (5663), 1526-1529.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. & Akira, S.** (2002): "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway." Nat. Immunol. *3* (2), 196-200.

- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. & Ala'Aldeen, D.** (2004): "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **68** (4), 692-744.
- Hersh, D., Monack, D. M., Smith, M. R., Ghorri, N., Falkow, S. & Zychlinsky, A.** (1999): "The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **96** (5), 2396-2401.
- Hilbi, H., Moss, J. E., Hersh, D., Chen, Y., Arondel, J., Banerjee, S., Flavell, R. A., Yuan, J., Sansonetti, P. J. & Zychlinsky, A.** (1998): "Shigella-induced apoptosis is dependent on caspase-1 which binds to IpaB." J. Biol. Chem. **273** (49), 32895-32900.
- Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H., Wanderer, A. A. & Kolodner, R. D.** (2001): "Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome." Nat. Genet. **29** (3), 301-305.
- Hogquist, K. A., Nett, M. A., Unanue, E. R. & Chaplin, D. D.** (1991): "Interleukin 1 is processed and released during apoptosis." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **88** (19), 8485-8489.
- Hopkins, P. A. & Sriskandan, S.** (2005): "Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond." Clin. Exp. Immunol. **140** (3), 395-407.
- Horng, T., Barton, G. M., Flavell, R. A. & Medzhitov, R.** (2002): "The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors." Nature **420** (6913), 329-333.
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougères, A., Endres, S. & Hartmann, G.** (2005): "Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7." Nat. Med. **11** (3), 263-270.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. & Akira, S.** (1999): "Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product." J. Immunol. **162** (7), 3749-3752.
- Hunstad, D. A., Justice, S. S., Hung, C. S., Lauer, S. R. & Hultgren, S. J.** (2005): "Suppression of bladder epithelial cytokine responses by uropathogenic Escherichia coli." Infect. Immun. **73** (7), 3999-4006.
- Inohara, N., Chamillard, M., McDonald, C. & Nunez, G.** (2005): "NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease." Annu. Rev. Biochem. **74**, 355-383.
- Isaac, D. D., Pinkner, J. S., Hultgren, S. J. & Silhavy, T. J.** (2005): "The extracytoplasmic adaptor protein CpxP is degraded with substrate by DegP." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **102** (49), 17775-17779.
- Iwami, K. I., Matsuguchi, T., Masuda, A., Kikuchi, T., Musikachoen, T. & Yoshikai, Y.** (2000): "Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling." J. Immunol. **165** (12), 6682-6686.
- Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R.** (2002): "Innate immune recognition." Annu. Rev. Immunol. **20** (1), 197-216.
- Janssens, S. & Beyaert, R.** (2002): "A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling." Trends Biochem. Sci. **27** (9), 474-482.
- Janssens, S. & Beyaert, R.** (2003): "Role of Toll-like receptors in pathogen recognition." Clin. Microbiol. Rev. **16** (4), 637-646.
- Johnson, J. R. & Russo, T. A.** (2002): "Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: "the other bad E coli"." J. Lab. Clin. Med. **139** (3), 155-162.

- Jones, C. H., Danese, P. N., Pinkner, J. S., Silhavy, T. J. & Hultgren, S. J.** (1997): "The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems." *Embo J.* **16** (21), 6394-6406.
- Källenius, G., Svenson, S. B., Möllby, R., Cedergren, B., Hultberg, H. & Winberg, J.** (1981): "Structure of carbohydrate part of receptor on human uroepithelial cells for pyelonephritogenic *Escherichia coli*." *Lancet* **2** (8247), 604-606.
- Kang, D. C., Gopalkrishnan, R. V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A. M. & Fisher, P. B.** (2002): "mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99** (2), 637-642.
- Kanneganti, T. D., Lamkanfi, M., Kim, J.K., Chen, G., Park, J.H., Franchi, L., Vandenabeele, P. & Nunez, G.** (2007): "Pannexin-1-Mediated Recognition of Bacterial Molecules Activates the Cryopyrin Inflammasome Independent of Toll-like Receptor Signaling." *Immunity* **26**, 433-443.
- Kanneganti, T. D., Ozoren, N., Body-Malapel, M., Amer, A., Park, J. H., Franchi, L., Whitfield, J., Barchet, W., Colonna, M., Vandenabeele, P., Bertin, J., Coyle, A., Grant, E. P., Akira, S. & Nunez, G.** (2006): "Bacterial RNA and small antiviral compounds activate caspase-1 through cryopyrin/Nalp3." *Nature* **440** (7081), 233-236.
- Kawagoe, T., Sato, S., Matsushita, K., Kato, H., Matsui, K., Kumagai, Y., Saitoh, T., Kawai, T., Takeuchi, O. & Akira, S.** (2008): "Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2." *Nat. Immunol.* **9** (6), 684-691.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S.** (1999): "Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin." *Immunity* **11** (1), 115-122.
- Kawai, T. & Akira, S.** (2006): "TLR signaling." *Cell Death Differ.* **13** (5), 816-825.
- Kawai, T. & Akira, S.** (2007): "Signaling to NF- κ B by Toll-like receptors." *Trends Mol. Med.* **13** (11), 460-469.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K. J., Takeuchi, O. & Akira, S.** (2005): "IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction." *Nat Immunol* **6** (10), 981-988.
- Kawai, T., Takeuchi, O., Fujita, T., Inoue, J., Muhlradt, P. F., Sato, S., Hoshino, K. & Akira, S.** (2001): "Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes." *J. Immunol.* **167** (10), 5887-5894.
- Klein, U., Gimpl, G. & Fahrenholz, F.** (1995): "Alteration of the myometrial plasma membrane cholesterol content with beta-cyclodextrin modulates the binding affinity of the oxytocin receptor." *Biochemistry* **34** (42), 13784-13793.
- Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R. & Flavell, R. A.** (2002): "IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling." *Cell* **110** (2), 191-202.
- Koronakis, V., Koronakis, E. & Hughes, C.** (1989): "Isolation and analysis of the C-terminal signal directing export of *Escherichia coli* hemolysin protein across both bacterial membranes." *Embo J.* **8** (2), 595-605.
- Kuehn, M. J., Heuser, J., Normark, S. & Hultgren, S. J.** (1992): "P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips." *Nature* **356** (6366), 252-255.
- Kunkel, T. A., Roberts, J.D. & Zakour, R.A.** (1987): "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection." *Methods Enzymol.* **154**, 367-382.

- Lafont, F. & van der Goot, F. G.** (2005): "Bacterial invasion via lipid rafts." Cell. Microbiol. 7 (5), 613-620.
- Lane, M. C. & Mobley, H. L.** (2007): "Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic Escherichia coli (UPEC) in the mammalian kidney." Kidney Int. 72 (1), 19-25.
- Lapaque, N., Moriyon, I., Moreno, E. & Gorvel, J. P.** (2005): "Brucella lipopolysaccharide acts as a virulence factor." Curr. Opin. Microbiol. 8 (1), 60-66.
- LeBouder, E., Rey-Nores, J. E., Rushmere, N. K., Grigorov, M., Lawn, S. D., Affolter, M., Griffin, G. E., Ferrara, P., Schiffrin, E. J., Morgan, B. P. & Labeta, M. O.** (2003): "Soluble forms of Toll-like receptor (TLR)2 capable of modulating TLR2 signaling are present in human plasma and breast milk." J. Immunol. 171 (12), 6680-6689.
- Leffler, H. & Svanborg-Edén, C.** (1981): "Glycolipid receptors for uropathogenic Escherichia coli on human erythrocytes and uroepithelial cells." Infect. Immun. 34 (3), 920-929.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M. & Hoffmann, J. A.** (1996): "The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette spätzle/Toll/cactus Controls the Potent Antifungal Response in Drosophila Adults." Cell 86 (6), 973-983.
- Li, C., Zienkiewicz, J. & Hawiger, J.** (2005): "Interactive sites in the MyD88 Toll/interleukin (IL) 1 receptor domain responsible for coupling to the IL1beta signaling pathway." J. Biol. Chem. 280 (28), 26152-26159.
- Li, M., Lai, Y., Villaruz, A. E., Cha, D. J., Sturdevant, D. E. & Otto, M.** (2007): "Gram-positive three-component antimicrobial peptide-sensing system." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 104 (22), 9469-9474.
- Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K. & O'Neill, L. A.** (2005): "Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses." Nat. Rev. Immunol. 5 (6), 446-458.
- Loewenstein, P. M. & Green, M.** (1988): "Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein." Cell 55 (6), 1179-1188.
- Loiarro, M., Sette, C., Gallo, G., Ciacci, A., Fanto, N., Mastroianni, D., Carminati, P. & Ruggiero, V.** (2005): "Peptide-mediated interference of TIR domain dimerization in MyD88 inhibits interleukin-1-dependent activation of NF- κ B." J. Biol. Chem. 280 (16), 15809-15814.
- Low, L. Y., Mukasa, T., Reed, J. C. & Pascual, J.** (2007): "Characterization of a TIR-like protein from Paracoccus denitrificans." Biochem. Biophys. Res. Commun. 356 (2), 481-486.
- Macritchie, D. M., Ward, J. D., Nevesinjac, A. Z. & Raivio, T. L.** (2008): "Activation of the Cpx envelope stress response down-regulates expression of several locus of enterocyte effacement-encoded genes in enteropathogenic Escherichia coli." Infect. Immun. 76 (4), 1465-1475.
- Mahillon, J. & Chandler, M.** (1998): "Insertion sequences." Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62 (3), 725-774.
- Manges, A. R., Johnson, J. R., Foxman, B., O'Bryan, T. T., Fullerton, K. E. & Riley, L. W.** (2001): "Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant Escherichia coli clonal group." N. Engl. J. Med. 345 (14), 1007-1013.
- Mariathasan, S. & Monack, D. M.** (2007): "Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation." 7 (1), 31-40.

- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M. & Dixit, V. M.** (2006): "Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP." *Nature* 440 (7081), 228-232.
- Martinon, F., Agostini, L., Meylan, E. & Tschopp, J.** (2004): "Identification of bacterial muramyl dipeptide as activator of the NALP3/cryopyrin inflammasome." *Curr. Biol.* 14 (21), 1929-1934.
- Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J.** (2002): "The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta." *Mol. Cell* 10 (2), 417-426.
- Martinon, F., Petrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. & Tschopp, J.** (2006): "Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome." *Nature* 440 (7081), 237-241.
- Masumoto, J., Taniguchi, S., Ayukawa, K., Sarvotham, H., Kishino, T., Niikawa, N., Hidaka, E., Katsuyama, T., Higuchi, T. & Sagara, J.** (1999): "ASC, a novel 22-kDa protein, aggregates during apoptosis of human promyelocytic leukemia HL-60 cells." *J. Biol. Chem.* 274 (48), 33835-33838.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A., Jr.** (1997): "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." *Nature* 388 (6840), 394-397.
- Meylan, E., Burns, K., Hofmann, K., Blancheteau, V., Martinon, F., Kelliher, M. & Tschopp, J.** (2004): "RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation." *Nat. Immunol.* 5 (5), 503-507.
- Miao, E. A., Alpujch-Aranda, C. M., Dors, M., Clark, A. E., Bader, M. W., Miller, S. I. & Aderem, A.** (2006): "Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf." *Nat. Immunol.* 7 (6), 569-575.
- Miller, L. K.** (1999): "An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs." *Trends Cell Biol.* 9 (8), 323-328.
- Mobley, H. L., Green, D. M., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., Chippendale, G. R., Lockatell, C. V., Jones, B. D. & Warren, J. W.** (1990): "Pyelonephritogenic Escherichia coli and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains." *Infect. Immun.* 58 (5), 1281-1289.
- Molofsky, A. B., Byrne, B. G., Whitfield, N. N., Madigan, C. A., Fuse, E. T., Tateda, K. & Swanson, M. S.** (2006): "Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts Legionella pneumophila infection." *J. Exp. Med.* 203 (4), 1093-1104.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P. & Dixit, V. M.** (1997): "IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling." *Science* 278 (5343), 1612-1615.
- Nabi, I. R. & Le, P. U.** (2003): "Caveolae/raft-dependent endocytosis." *J. Cell. Biol.* 161 (4), 673-677.
- Nevesinjac, A. Z. & Raivio, T. L.** (2005): "The Cpx envelope stress response affects expression of the type IV bundle-forming pili of enteropathogenic Escherichia coli." *J. Bacteriol.* 187 (2), 672-686.
- Newman, R. M., Salunkhe, P., Godzik, A. & Reed, J. C.** (2006): "Identification and characterization of a novel bacterial virulence factor that shares homology with mammalian Toll/interleukin-1 receptor family proteins." *Infect. Immun.* 74 (1), 594-601.
- Nyman, T., Stenmark, P., Flodin, S., Johansson, I., Hammarstrom, M. & Nordlund, P.** (2008): "The crystal structure of the human toll-like receptor 10 cytoplasmic domain reveals a putative signaling dimer." *J. Biol. Chem.* 283 (18), 11861-11865.

- O'Neill, L. A., Fitzgerald, K. A. & Bowie, A. G.** (2003): "The Toll-IL-1 receptor adaptor family grows to five members." Trends Immunol. 24 (6), 286-290.
- Ogden, C. A., deCathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V. A. & Henson, P. M.** (2001): "C1q and Mannose Binding Lectin Engagement of Cell Surface Calreticulin and CD91 Initiates Macropinocytosis and Uptake of Apoptotic Cells." J. Exp. Med. 194 (6), 781-796.
- Ogura, Y., Sutterwala, F. S. & Flavell, R. A.** (2006): "The inflammasome: first line of the immune response to cell stress." Cell 126 (4), 659-662.
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T. & Seya, T.** (2003): "TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction." Nat. Immunol. 4 (2), 161-167.
- Otto, K. & Silhavy, T. J.** (2002): "Surface sensing and adhesion of Escherichia coli controlled by the Cpx-signaling pathway." Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 99 (4), 2287-2292.
- Padovan, E., Landmann, R. M. & De Libero, G.** (2007): "How pattern recognition receptor triggering influences T cell responses: a new look into the system." Trends Immunol. 28 (7), 308-314.
- Pannek, S., Higgins, P. G., Steinke, P., Jonas, D., Akova, M., Bohnert, J. A., Seifert, H. & Kern, W. V.** (2006): "Multidrug efflux inhibition in Acinetobacter baumannii: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine-beta-naphthylamide." J. Antimicrob. Chemother. 57 (5), 970-974.
- Pelegri, P., Barroso-Gutierrez, C. & Surprenant, A.** (2008): "P2X7 Receptor Differentially Couples to Distinct Release Pathways for IL-1 β in Mouse Macrophage." J. Immunol. 180 (11), 7147-7157.
- Pelegri, P. & Surprenant, A.** (2006): "Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor." EMBO J. 25 (21), 5071-5082.
- Pere, A., Leinonen, M., Vaisanen-Rhen, V., Rhen, M. & Korhonen, T. K.** (1985): "Occurrence of type-1C fimbriae on Escherichia coli strains isolated from human extraintestinal infections." J. Gen. Microbiol. 131 (7), 1705-1711.
- Perregaux, D. & Gabel, C. A.** (1994): "Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity." J. Biol. Chem. 269 (21), 15195-15203.
- Poltorak, A., Merlin, T., Nielsen, P. J., Sandra, O., Smirnova, I., Schupp, I., Boehm, T., Galanos, C. & Freudenberg, M. A.** (2001): "A point mutation in the IL-12R beta 2 gene underlies the IL-12 unresponsiveness of Lps-defective C57BL/10ScCr mice." J Immunol 167 (4), 2106-2111.
- Porat, R., Clark, B. D., Wolff, S. M. & Dinarello, C. A.** (1991): "Enhancement of growth of virulent strains of Escherichia coli by interleukin-1." Science 254 (5030), 430-432.
- Pradel, E. & Pages, J. M.** (2002): "The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen Enterobacter aerogenes." Antimicrob. Agents Chemother. 46 (8), 2640-2643.
- Raivio, T. L. & Silhavy, T. J.** (1997): "Transduction of envelope stress in Escherichia coli by the Cpx two-component system." J. Bacteriol. 179 (24), 7724-7733.
- Remaut, H., Tang, C., Henderson, N. S., Pinkner, J. S., Wang, T., Hultgren, S. J., Thanassi, D. G., Waksman, G. & Li, H.** (2008): "Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway." Cell 133 (4), 640-652.

- Ren, T., Zamboni, D. S., Roy, C. R., Dietrich, W. F. & Vance, R. E.** (2006): "Flagellin-deficient Legionella mutants evade caspase-1- and Naip5-mediated macrophage immunity." *PLoS Pathog.* 2 (3), e18.
- Richard, J. P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B. & Chernomordik, L. V.** (2005): "Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors." *J. Biol. Chem.* 280 (15), 15300-15306.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. & Bazan, J. F.** (1998): "A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95 (2), 588-593.
- Rodal, S. K., Skretting, G., Garred, O., Vilhardt, F., van Deurs, B. & Sandvig, K.** (1999): "Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles." *Mol. Biol. Cell* 10 (4), 961-974.
- Rodriguez, N., Wantia, N., Fend, F., Durr, S., Wagner, H. & Miethke, T.** (2006): "Differential involvement of TLR2 and TLR4 in host survival during pulmonary infection with Chlamydia pneumoniae." *Eur. J. Immunol.* 36 (5), 1145-1155.
- Rogers, H. W., Tripp, C. S., Schreiber, R. D. & Unanue, E. R.** (1994): "Endogenous IL-1 is required for neutrophil recruitment and macrophage activation during murine listeriosis." *J. Immunol.* 153 (5), 2093-2101.
- Roy, D., Liston, D. R., Idone, V. J., Di, A., Nelson, D. J., Pujol, C., Bliska, J. B., Chakrabarti, S. & Andrews, N. W.** (2004): "A process for controlling intracellular bacterial infections induced by membrane injury." *Science* 304 (5676), 1515-1518.
- Russo, T. A. & Johnson, J. R.** (2000): "Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC." *J. Infect. Dis.* 181 (5), 1753-1754.
- Saiki, R. K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A.** (1988): "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239 (4839), 487-491.
- Salcedo, S. P., Marchesini, M. I., Lelouard, H., Fugier, E., Jolly, G., Balor, S., Muller, A., Lapaque, N., Demaria, O., Alexopoulou, L., Comerci, D. J., Ugalde, R. A., Pierre, P. & Gorvel, J. P.** (2008): "Brucella control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1." *PLoS Pathog.* 4 (2), e21.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T.** (1989): "Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition." *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, New York.
- Samuelsson, P., Hang, L., Wullt, B., Irjala, H. & Svanborg, C.** (2004): "Toll-like receptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa." *Infect. Immun.* 72 (6), 3179-3186.
- Sargent, F., Gohlke, U., De Leeuw, E., Stanley, N. R., Palmer, T., Saibil, H. R. & Berks, B. C.** (2001): "Purified components of the Escherichia coli Tat protein transport system form a double-layered ring structure." *Eur. J. Biochem.* 268 (12), 3361-3367.
- Sato, S., Sanjo, H., Takeda, K., Ninomiya-Tsuji, J., Yamamoto, M., Kawai, T., Matsumoto, K., Takeuchi, O. & Akira, S.** (2005): "Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses." *Nat. Immunol.* 6 (11), 1087-1095.
- Schmidt, T. G. M., Koepke, J. Frank, R. & Skerra, A.** (1996): "Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin." *J. Mol. Biol.* 255, 753-766.

- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman, D. M., Bazan, J. F. & Kastelein, R. A. (2005): "IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines." *Immunity* 23 (5), 479-490.
- Shaulian, E. & Karin, M. (2002): "AP-1 as a regulator of cell life and death." *Nat. Cell Biol.* 4 (5), E131-136.
- Skerra, A. (1994): "Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*." *Gene* 151 (1-2), 131-135.
- Skerra, A. & Schmidt, T. G. M. (2000): "Use of the *Strep*-tag and streptavidin for recombinant protein purification and detection." *Methods Enzymol.* 326, 271-304.
- Snyder, J. A., Haugen, B. J., Buckles, E. L., Lockett, C. V., Johnson, D. E., Donnenberg, M. S., Welch, R. A. & Mobley, H. L. (2004): "Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection." *Infect. Immun.* 72 (11), 6373-6381.
- Stack, J., Haga, I. R., Schroder, M., Bartlett, N. W., Maloney, G., Reading, P. C., Fitzgerald, K. A., Smith, G. L. & Bowie, A. G. (2005): "Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence." *J. Exp. Med.* 201 (6), 1007-1018.
- Stamm, W. E. & Norrby, S. R. (2001): "Urinary tract infections: disease panorama and challenges." *J. Infect. Dis.* 183 (Suppl. 1), S1-4.
- Steven, V. & Graham, D. (2008): "Oligonucleotide conjugation to a cell-penetrating (TAT) peptide by Diels-Alder cycloaddition." *Org. Biomol. Chem.* 6 (20), 3781-3787.
- Stock, J. B., Stock, A. M. & Mottonen, J. M. (1990): "Signal transduction in bacteria." *Nature* 344 (6265), 395-400.
- Struelens, M. J., Denis, O. & Rodriguez-Villalobos, H. (2004): "Microbiology of nosocomial infections: progress and challenges." *Microbes Infect.* 6 (11), 1043-1048.
- Suntharalingam, P., Spencer, H., Gallant, C. V. & Martin, N. L. (2003): "Salmonella enterica serovar typhimurium rdoA is growth phase regulated and involved in relaying Cpx-induced signals." *J. Bacteriol.* 185 (2), 432-443.
- Sutterwala, F. S., Ogura, Y. & Flavell, R. A. (2007): "The inflammasome in pathogen recognition and inflammation." *J. Leukoc. Biol.* 82 (2), 259-264.
- Sutterwala, F. S., Ogura, Y., Szczepanik, M., Lara-Tejero, M., Lichtenberger, G. S., Grant, E. P., Bertin, J., Coyle, A. J., Galan, J. E., Askenase, P. W. & Flavell, R. A. (2006): "Critical role for NALP3/CIAS1/Cryopyrin in innate and adaptive immunity through its regulation of caspase-1." *Immunity* 24 (3), 317-327.
- Svanborg, C., Bergsten, G., Fischer, H., Godaly, G., Gustafsson, M., Karpman, D., Lundstedt, A. C., Ragnarsdottir, B., Svensson, M. & Wullt, B. (2006): "Uropathogenic *Escherichia coli* as a model of host-parasite interaction." *Curr. Opin. Microbiol.* 9 (1), 33-39.
- Takeda, K. & Akira, S. (2004): "TLR signaling pathways." *Semin. Immunol.* 16 (1), 3-9.
- Takeuchi, O., Hoshino, K. & Akira, S. (2000): "Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection." *J. Immunol.* 165 (10), 5392-5396.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K. & Akira, S. (1999): "Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components." *Immunity* 11 (4), 443-451.

- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K. & Akira, S.** (2001): "Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6." *Int. Immunol.* **13** (7), 933-940.
- Thanassi, D. G. & Hultgren, S. J.** (2000): "Assembly of complex organelles: pilus biogenesis in gram-negative bacteria as a model system." *Methods* **20** (1), 111-126.
- Thanassi, D. G., Saulino, E. T., Lombardo, M. J., Roth, R., Heuser, J. & Hultgren, S. J.** (1998): "The PapC usher forms an oligomeric channel: implications for pilus biogenesis across the outer membrane." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95** (6), 3146-3151.
- Ting, J. P., Kastner, D. L. & Hoffman, H. M.** (2006): "CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders." *Nat. Rev. Immunol.* **6** (3), 183-195.
- Torres, D., Barrier, M., Bihl, F., Quesniaux, V. J., Maillet, I., Akira, S., Ryffel, B. & Erard, F.** (2004): "Toll-like receptor 2 is required for optimal control of *Listeria monocytogenes* infection." *Infect. Immun.* **72** (4), 2131-2139.
- Vabulas, R. M., Wagner, H. & Schild, H.** (2002): "Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors." *Curr Top Microbiol Immunol* **270**, 169-184.
- Valle, J., Da Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P. & Ghigo, J. M.** (2006): "Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103** (33), 12558-12563.
- Viera, J. & Messing, J.** (1987): "Production of single-stranded plasmid DNA." *Methods Enzymol.* **153**, 3-11.
- Vigers, G. P., Anderson, L. J., Caffes, P. & Brandhuber, B. J.** (1997): "Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta." *Nature* **386** (6621), 190-194.
- Wadhams, G. H. & Armitage, J. P.** (2004): "Making sense of it all: bacterial chemotaxis." *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5** (12), 1024-1037.
- Wald, D., Qin, J., Zhao, Z., Qian, Y., Naramura, M., Tian, L., Towne, J., Sims, J. E., Stark, G. R. & Li, X.** (2003): "SIGIRR, a negative regulator of Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling." *Nat. Immunol.* **4** (9), 920-927.
- Walev, I., Klein, J., Husmann, M., Valeva, A., Strauch, S., Wirtz, H., Weichel, O. & Bhakdi, S.** (2000): "Potassium regulates IL-1 beta processing via calcium-independent phospholipase A2." *J. Immunol.* **164** (10), 5120-5124.
- Walev, I., Reske, K., Palmer, M., Valeva, A. & Bhakdi, S.** (1995): "Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes." *Embo J.* **14** (8), 1607-1614.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J. & Chen, Z. J.** (2001): "TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK." *Nature* **412** (6844), 346-351.
- Wang, Q., Dziarski, R., Kirschning, C. J., Muzio, M. & Gupta, D.** (2001): "Micrococci and peptidoglycan activate TLR2-->MyD88-->IRAK-->TRAF-->NIK-->IKK-->NF-kappaB signal transduction pathway that induces transcription of interleukin-8." *Infect. Immun.* **69** (4), 2270-2276.
- Welch, R. A.** (2001): "RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology." *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **257**, 85-111.
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S. R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., Perna, N. T., Mobley, H. L., Donnenberg, M. S. & Blattner, F. R.** (2002): "Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99** (26), 17020-17024.

- Wolfe, A. J., Parikh, N., Lima, B. P. & Zemaitaitis, B.** (2008): "Signal integration by the two-component signal transduction response regulator CpxR." *J. Bacteriol.* **190** (7), 2314-2322.
- Xie, Y., Kim, K. J. & Kim, K. S.** (2004): "Current concepts on Escherichia coli K1 translocation of the blood-brain barrier." *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **42** (3), 271-279.
- Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L. & Tong, L.** (2000): "Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains." *Nature* **408** (6808), 111-115.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. & Akira, S.** (2003): "Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway." *Science* **301** (5633), 640-643.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., Hoshino, K., Takeuchi, O., Kobayashi, M., Fujita, T., Takeda, K. & Akira, S.** (2002): "Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4." *Nature* **420** (6913), 324-329.
- Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S. & Sher, A.** (2005): "TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein." *Science* **308** (5728), 1626-1629.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y. M., Gale, M., Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A. & Fujita, T.** (2005): "Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity." *J Immunol* **175** (5), 2851-2858.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. & Fujita, T.** (2004): "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." *Nat. Immunol.* **5** (7), 730-737.
- Zamboni, D. S., Kobayashi, K. S., Kohlsdorf, T., Ogura, Y., Long, E. M., Vance, R. E., Kuida, K., Mariathasan, S., Dixit, V. M., Flavell, R. A., Dietrich, W. F. & Roy, C. R.** (2006): "The Bir1e cytosolic pattern-recognition receptor contributes to the detection and control of Legionella pneumophila infection." *Nat. Immunol.* **7** (3), 318-325.
- Zav'yalov, V. P., Chernovskaya, T. V., Navolotskaya, E. V., Karlyshev, A. V., MacIntyre, S., Vasiliev, A. M. & Abramov, V. M.** (1995): "Specific high affinity binding of human interleukin 1 beta by Caf1A usher protein of Yersinia pestis." *FEBS Lett.* **371** (1), 65-68.
- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A. & Ghosh, S.** (2004): "A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria." *Science* **303** (5663), 1522-1526.
- Zhang, G. & Ghosh, S.** (2002): "Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip." *J. Biol. Chem.* **277** (9), 7059-7065.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Thomas Miethke dafür bedanken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe absolut selbstständig mein Themengebiet unter Bereitstellung aller nötigen Mittel bearbeiten konnte. Zudem vielen Dank dafür, dass ich jederzeit Rat, Hinweise, und auch motivierenden Worte erhalten habe und immer Zeit für wertvolle Diskussionen war.

Prof. Wagner gilt mein besonderer Dank, da ich an seinem Institut ein exzellentes Forschungsklima vorfand, wodurch die intensive Zusammenarbeit und der Informationsaustausch mit anderen Arbeitsgruppen möglich war. Meinem Erstprüfer, Prof. Scherer, gilt mein Dank dafür, mich trotz allen Mehraufwandes als externen Doktoranden zu betreuen.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Miethke aussprechen. Vor allem Susi Dürr möchte ich für Ihre wertvollen praktischen Tipps und Versuche, Ihre Geduld aber auch ihr unermüdliches Bemühen um ein gutes Arbeitsklima und Ihren Einsatz für funktionierende Software und Laborgeräte (inkl. Kaffeemaschine und Grill) danken. Vielen Dank auch an Tanja Ertl für die vielen gemeinsam durchfrorenen Stunden im Kühlraum sowie nebst der Hilfe bei diversen Versuchen für die vielen aufmunternden Worte. Dr. Nina Wantia und Dr. Nuria Rodriguez gilt mein Dank für Ihre wertvollen Hinweise, die Bereitstellung von Mäusen und die notwendige Hilfe bei Mausversuchen. Darüber hinaus werde ich die vielen lustigen "schalala" Laborstunden mit den beiden nie vergessen und an jedem Geburtstag Angst davor haben, nach spanischer Manier die Ohren gezupft zu bekommen. Vielen Dank auch an die Mitglieder der Arbeitsgruppe Wagner, namentlich Ingeborg Brosch, Monika Wagner, Hendrikje Drexler, Dr. Antje Heit, Dr. Frank Schmitz und Dr. Tobias Haas sowie Georg Peschel, Susanne Bierl und Andreas Minsinger, dank derer unser Labor ein angenehmer Arbeitsplatz wurde. Nicht vergessen möchte ich allen anderen Arbeitsgruppen, deren Türen bei Problemen stets offen standen.

Andreas Wieser und Dr. Sören Schubert am Max von Pettenkofer-Institut der LMU sage ich Dank für deren experimentelle Unterstützung und v.a. die vielen zielführenden Diskussionen und Beratungen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und bei meiner Familie für Ihre unermüdliche Unterstützung bedanken. Ein besonderes Dankeschön gilt meinem Mann und meinem großen Sohnmann, da die zwei mich wochenends oft selten gesehen, sie jedoch meine Arbeit durch Ihre permanente Unterstützung und Ihre Umsicht erst möglich gemacht haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

Modulation der TLR- und Inflammasom-Signaltransduktion durch bakterielle TIR-Proteine am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene unter Betreuung und Anleitung von Prof. Thomas Miethke und Prof. Siegfried Scherer ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 5 (Promotionsordnung) angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Christine Cirl

München, 27.01.2009