

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
der Medizinischen Fakultät Mannheim  
(Direktor: Prof. Dr. med Thomas Miethke)

Regulation des Virulenzfaktors  
Toll/IL-1 receptor domain-containing protein C  
des uropathogenen *Escherichia coli* Stammes CFT073

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der  
Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität  
zu  
Heidelberg

vorgelegt von  
Julia Ittensohn

aus  
Mannheim  
2021

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd  
Referent: Prof. Dr. med. Thomas Miethke

Meiner Familie

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

**Ittensohn, J.**, Hemberger, J., Griffiths, H., Keller, M., Albrecht, S., and Miethke, T. (2021). Regulation of Expression of the TIR-Containing Protein C Gene of the Uropathogenic *Escherichia coli* Strain CFT073. *Pathogens* *10*, 549.

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	1
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>3</b>
1.1 Harnwegsinfektionen.....	3
1.2 Uropathogene <i>Escherichia coli</i> (UPEC).....	4
1.3 Resistenzmechanismen des Wirtes.....	6
1.4 Toll-like Rezeptoren (TLRs).....	6
1.5 Bakterielle TIR-Domänen .....	8
1.6 Bisherige Forschung am TIR-containing protein C (TcpC).....	11
1.7 Anpassung der Bakterien an den Urogenitaltrakt.....	14
1.8 Ziele der Arbeit.....	16
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>17</b>
2.1 Material.....	17
2.1.1 Geräte.....	17
2.1.2 Sonstige Materialien .....	17
2.1.3 Chemikalien .....	18
2.1.4 Software und Computerprogramme.....	19
2.1.5 Enzyme und Kits.....	19
2.1.6 Standards für DNA- und Proteingele.....	20
2.1.7 Oligonukleotide (Primer) .....	20
2.1.8 Puffer und Lösungen.....	20
2.1.9 Biologische Materialien .....	22
2.2 Methoden .....	24
2.2.1 Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i> Stämmen .....	24
2.2.2 Transformation von Plasmiden in CFT073 durch Elektroporation.....	24
2.2.3 Etablieren eines Minimalmediums für CFT073 .....	25
2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie der TcpC-eYFP Konstrukte .....	27
2.2.5 FACScan .....	27
2.2.6 Auswirkung unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die TcpC Induktion .....	28
2.2.7 Quorum-sensing Versuch .....	30
2.2.8 Kultivierung der Suspensionszelllinie THP-1 .....	30
2.2.9 THP-1 - <i>E. coli</i> Interaktionsversuch.....	31

2.2.10 Pulldown Promotor-bindender Proteine mithilfe Streptavidin-gekoppelter Magnetic Beads .....	31
2.2.11 Statistische Auswertung.....	35
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>36</b>
3.1 Auswirkung unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die TcpC Expression.....	36
3.1.1 Etablieren eines M9 Minimalmedium .....	36
3.1.2 Identifikation des TcpC Promotors.....	37
3.1.3 Expression von TcpC hängt sowohl von der Nährstoffquelle als auch vom pH-Wert ab.....	38
3.1.4 Glucose induziert die TcpC Expression .....	41
3.1.5 Eisen hat eine reziproke Beziehung zur TcpC Induktion.....	44
3.1.6 Stickstoff hat keine Auswirkung auf die TcpC Induktion.....	47
3.1.7 Kaliumwirkung auf TcpC Induktion ist ambivalent.....	49
3.1.8 <i>E. coli</i> produziert keinen löslichen Faktor, welcher TcpC induziert .....	51
3.1.9 Humane Makrophagen produzieren keinen löslichen Faktor, welcher TcpC induziert.....	53
3.2 Fluoreszenzmikroskopie der TcpC-eYFP Konstrukte .....	54
3.3 Identifizierung Promotor-bindender Proteine an das <i>tcpC</i> Gen .....	63
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>66</b>
4.1 Wirkung spezieller Umgebungsfaktoren auf die TcpC Expression .....	66
4.2 Expression und Lokalisation der TcpC-eYFP Konstrukte in <i>E.coli</i> .....	70
4.3 Identifizierung Promotor-bindender Proteine des <i>tcpC</i> Gens .....	72
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>77</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>79</b>
<b>7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>87</b>
<b>8 TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>89</b>
<b>9 LEBENS LAUF .....</b>	<b>90</b>
<b>10 DANKSAGUNG.....</b>	<b>91</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
AhTet	Anhydrotetracyclin
Amp	Ampicillin
AP-1	Activator protein-1
ASB	Asymptomatische Bakteriurie
ASC	Apoptosis associated speck-like protein
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
Bzw.	beziehungsweise
CbpA	DNA-binding protein A
CbpB	Curved DNA-binding protein B
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CRP	cAMP receptor protein
CytR	Cytidine Regulator
d.h.	das heißt
DANN	Desoxyribonukleinsäure
Dps	DNA-binding protein from starved cells
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N', N'-tetraacetat
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
ExPEC	Extraintestinale <i>E. coli</i>
eYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	Fötales Kälberserum
Fe <sup>3+</sup>	Dreiwertige Eisenionen
FeSO <sub>4</sub>	Eisensulfatheptahydrat
GFP	Green Fluorescent Protein
H	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HK	Histidinkinase
H-NS	Histone-like nucleoid structuring protein
HTH	Helix-turn-helix
HU	Heat-unstable nucleoid protein
HWI	Harnwegsinfekt
IBC	Intracellular bacterial community
IciA	Inhibitor of chromosome initiation A
IFNs	Interferone
IHF	Integration host factor
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptor
IL-6/ IL-8	Interleukin-6 / Interleukin-8

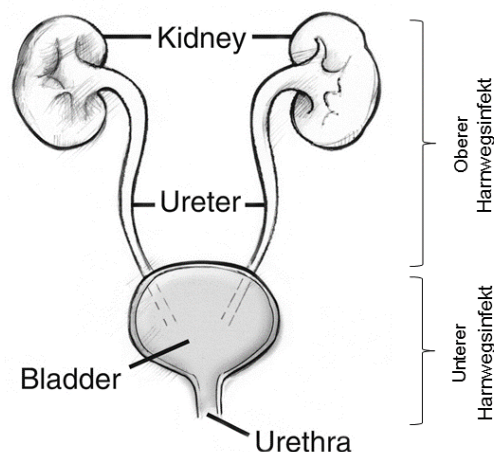
IPTG	Isopropyl-13-D-thiogalactopyranosid
IRF3	Interferon regulatory factor 3
K <sup>+</sup>	Kaliumion
Kann	Kanamycin
KCl	Kaliumchlorid
LB	Lysogeny Broth
LPS	Lipopolysaccharid
MB	Magnetic Beads
MIP-2	Macrophage inflammatory protein-2
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NLRP3	NACHT leucin-rich-repeat-PYD-protein 3
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain-proteins
NS	Nicotinsäure
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600nm
ORF	Open reading frame
PAbetaN	Phenylalanin-arginin-beta-naphtylamid
PAMPs	Pathogen- associated molecular patterns
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
<i>PlacZ</i>	LacZ Promotor
PMA	Phorbol 12-Myristat-13-Acetat
PRR	Pattern recognition receptors
<i>PtcpC</i>	TcpC Promotor
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
RPM	Rounds per minute
RR	Response regulator
RT	Raumtemperatur
s.o.	Siehe oben
s.u.	Siehe unten
StpA	Supressor oft td phenotype A
TcpC	Toll/IL-1 receptor-containing protein C
TCS	Two-component systems
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor Domäne
TIRAP/MAL	TIR-associated protein/MyD88-Adaptor-like
TlpA	TIR-like protein A
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing protein-inducing IFN-β
ÜNK	Übernachtkultur
UPEC	Uropathogene <i>E. coli</i>
Vgl.	Vergleich
WT	Wildtyp



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Harnwegsinfektionen

Infektionen des Harnwegtraktes, bestehend aus den paarig angelegten Nieren, den Harnleitern, der Harnblase und der Harnröhre, stellen in der Medizin eine sehr häufig vergebene Diagnose dar. So wird fast die Hälfte aller Frauen (40-50%) in ihrem Leben mindestens einmal eine Infektion des Urogenitaltraktes erleiden (Foxman, 2002). Die hohe Inzidenz der Harnwegsinfekte (HWI) resultiert in hohen Gesundheitskosten. 1995 führten Harnwegsinfekte in den USA zu rund 7 Millionen ärztlichen Konsultationen und verursachten 1,6 Milliarden Dollar Gesundheitskosten. 2010 waren es bereits geschätzte 2,3 Milliarden Dollar Gesundheitskosten allein in den USA (Foxman, 2010). Man unterscheidet den oberen vom unteren HWI und den unkomplizierten vom komplizierten HWI. Ein unkomplizierter Harnwegsinfekt beinhaltet das Fehlen von relevanten funktionellen oder anatomischen Anomalien, relevanten Nierenfunktionsstörungen oder relevanten Begleiterkrankungen, welche eine Harnwegsinfektion bzw. gravierende Komplikationen begünstigen. Eine Infektion des unteren Harnwegtraktes (Zystitis) wird angenommen, wenn sich die akuten Symptome nur auf den unteren Harntrakt beziehen und z.B. Schmerzen beim Wasserlassen (Algurie), imperativer Harndrang, häufiges Wasserlassen (Pollakisurie) und Schmerzen oberhalb der Symphyse (knorpeliger Anteil des Schambeins) auftreten. Eine Infektion des oberen Harnwegtraktes, eine sogenannte Nierenbeckenentzündung (Pyelonephritis), sollte in Erwägung gezogen werden, wenn sich zusätzlich zu den oben genannten Symptomen auch Flankenschmerzen, ein klopfschmerzhaftes Nierenlager und/oder Fieber ( $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) bemerkbar machen (vgl. Abb. 1).



**Abbildung 1: Darstellung der ableitenden Harnwege mit entsprechenden Infektionsregionen.**

(Verändert übernommen aus (Moblely, 2016), Fig.1; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Diese zwei klinisch symptomatischen Erscheinungsformen werden wiederum von einer asymptomatischen Bakteriurie unterschieden. Hierbei können Bakterien im Urin nachgewiesen werden, es liegen jedoch keine Symptome vor. Falls mehr als 2 symptomatische Episoden innerhalb von 6 Monaten, oder mehr als 3 Episoden

innerhalb von 12 Monaten auftreten, spricht man auch von rezidivierenden Harnwegsinfekten (AWMF, 2017).

Die am häufigsten bei einem HWI vorzufindenden Pathogene sind *Escherichia coli* Stämme. Bei ambulant erworbenen HWI stellen diese bis zu 77 % der ursächlichen Keime dar. Andere HWI verursachende Erreger wie *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus saprophyticus* sind nur in jeweils weniger als 5 % der Fälle die Ursache (Sheerin, 2011).

Frauen sind empfänglicher für eine HWI, da sie eine deutlich kürzere Harnröhre besitzen und diese in enger räumlicher Beziehung zu Vagina und Rektum ist. Somit können die Bakterien schneller die Blase erreichen und diese kolonisieren, bevor sie vom Urin ausgewaschen werden. Urogenitale Manipulationen, wie Sexualverkehr oder medizinische Interventionen, erleichtern das Verschleppen von Keimen. So liegt bei Frauen im Alter von 15-29 Jahren die höchste Prävalenz der symptomatischen Harnwegsinfektionen mit bis zu 20 % vor. Anatomische oder funktionelle Abnormalitäten, genetische Prädisposition und Verhalten steigert die Wahrscheinlichkeit einer Exposition gegenüber uropathogenen Erregern. Ebenso haben spezifische Gruppen ein erhöhtes Risiko einen Harnwegsinfekt zu erleiden. Darunter fallen Kinder, Schwangere, Alte, Patienten mit Blasenkathetern, Patienten mit Diabetes und Patienten mit Multipler Sklerose oder immundefizienten Erkrankungen (Foxman, 2002).

Die Behandlung von Harnwegsinfektionen sieht sich zunehmend mit dem Auftreten von Antibiotikaresistenzen konfrontiert. Deshalb muss nach neuen Wirkansätzen für Medikamente geforscht werden. Dazu muss die Interaktion zwischen Pathogen und Wirt besser verstanden werden. Dadurch tritt das Hemmen bestimmter bakterieller Virulenzfaktoren in den Vordergrund (Waldhuber et al., 2016b). Diese Virulenzfaktoren und das Repertoire des menschlichen Immunsystems bestimmen, inwiefern sich die Infektion der Harnwege als asymptomatische Bakteriurie oder aber als lebensbedrohliche Pyelonephritis präsentiert (Yadav et al., 2010).

## 1.2 Uropathogene *Escherichia coli* (UPEC)

*Escherichia coli* sind gramnegative, stäbchenförmige Bakterien aus der Gruppe der *Enterobacterales*. Aus klinischer Sicht gibt es für den Menschen harmlose Kommensale, welche natürlicher Bestandteil der Gastrointestinalflora sind. Auf der anderen Seite gibt es pathogene intestinale und pathogene extraintestinale *E. coli* Stämme (ExPEC) (Croxen et al., 2013). Pathogene intestinale Keime wie EPEC (enteropathogene *E. coli*), EHEC (enterohämorrhagische *E. coli*) und ETEC (enterotoxische *E. coli*) können bei Aufnahme schwere Diarrhoen mit Möglichkeit einer Kolitis und eventueller Sepsis auslösen. ExPEC können auch innerhalb des Gastrointestinaltraktes vorkommen, lösen aber bei Besiedlung von anderen Organen mitunter schwere Komplikationen, wie z.B. Wundinfekte, Meningitiden, oder Pneumonien aus. Auch uropathogene *E. coli* (UPECs) gehören zu den ExPEC und sind verantwortlich für Infektionen der harnableitenden Wege.

UPECs sind hierbei der Hauptverursacher für bakterielle Harnwegsinfektionen. UPECs verursachen ca. 80 % der aufsteigenden Harnwegsinfektionen bei ansonsten gesunden Frauen (Foxman et al., 2000). Ebenso wurden bei ca. 80-90 % der Fälle mit ambulant erworbenem HWI ein extraintestinaler uropathogener *E. coli* Stamm gefunden. Bei nosokomialen HWI war das bei 40 % der Fälle. (Foxman et al., 2000; Zhang and Foxman, 2003).

Zuerst besteht eine Kontamination der Umgebung der Harnröhre (Urethra) mit Faeces und die Bakterien steigen in die Blase auf und verursachen dort eine Zystitis. Manche Infektionen des unteren Harnwegtraktes ascendieren weiter in die Nieren und rufen dort eine akute Pyelonephritis hervor. Diese führt unbehandelt zu Bakteriämie und Sepsis. Folglich durchwandert *E. coli* während der Etablierung der Infektion unterschiedlichste Umgebungsbedingungen, was unterschiedliche Genexpression und das Vorhandensein spezifischer Virulenzfaktoren je nach Umgebung erforderlich macht (Mobley, 2016). Darunter fallen Adhäsionsmoleküle, sogenannte Fimbrien, Toxine, Mobilitätsstrukturen (Flagellen), Bildung einer Kapsel und spezielle Akquirierungssysteme, welche z.B. essentielles Eisen im Wirt verfügbar machen. Je höher die Bakterien im Harntrakt wandern können, desto mehr Virulenzgene besitzen diese. So konnten bei 70 % der *E. coli* Stämme, welche von Pyelonephritispatienten isoliert wurden, bestimmte Fimbrien namens „AuF“ (Another UPEC fimbria) nachgewiesen werden. Bei den *E. coli* Kontrollstämmen aus Faeces wurde diese Fimbrie jedoch nur zu 20 % nachgewiesen. Fimbrien dienen der Adhäsion an Epithelzellen und damit der Etablierung einer effizienten Kolonisierung des Harnwegtraktes (Spurbeck et al., 2012; Spurbeck et al., 2011). UPECs exprimieren mehrere Klassen von fimbrienassoziierten Adhäsionen, die durch spezifische Bindung an Glykosphingolipidrezeptoren zur Anheftung ans Urothel führen. Nahezu alle *E. coli* Stämme, auch apathogene, tragen Typ-I-Fimbrien, die vom *fim*-Gencluster kodiert werden. P-Fimbrien werden vom *pap*-Gencluster kodiert. Diese korrelieren mit einer gesteigerten Virulenz des Keimes, was sich in der Schwere der von diesen Stämmen ausgelösten Entzündungsreaktionen und Krankheitsbilder zeigt (Leffler and Svanborg-Eden, 1981; Wullt et al., 2001; Wullt et al., 2003). *Pap* + Stämme persistieren länger in der intestinalen Flora und verbreiten sich effizienter im Urogenitaltrakt als *pap* - Stämme (Plos et al., 1995).

Auf der Grundlage von genomischer Information wird *E. coli* in sechs unterschiedliche phylogenetische Gruppen, benannt als A, B1, B2, C, D und E, eingeteilt. Diese Untergruppen beinhalten saprophytische/kommensale (Gruppe A) und pathogene (vor allem Gruppe B2 und D) Stämme. Die pathogenen Stämme werden als Resultat langer Evolutionszeit betrachtet, denn pathogene *E. coli* Formen können Erbgut enthalten, das sich bis zu 20 % von den symbiontischen Formen unterscheidet. Dies beruht wohl auf dem Vorkommen von genomischen Schlüsselregionen, welche eine Reihe von Virulenzgenen für Merkmale wie z.B. Adhärenz/Kolonisation, Invasion, Mobilität und Sekretion von Toxinen beherbergen. Vorangetrieben durch Selektionsdruck wurden diese Pathogenitätsinseln vor allem über horizontalen Gentransfer verbreitet (Touchon et al., 2009). Sie sorgen dafür, dass sich Bakterien ihrer spezifischen Umgebung optimal anpassen können.

CFT073 stellt einen Stamm der uropathogenen *E. coli* dar. Dieser wurde ursprünglich aus dem Blut und Urin einer Frau mit akuter Pyelonephritis im Krankenhaus der Universität von Maryland isoliert (Mobley et al., 1990). Das Genom von CFT073 wurde mit dem Laborstamm *E. coli* MG1655 und dem enterohämorrhagischen *E. coli* EDL933 verglichen (Welch et al., 2002). Das CFT073 Genom liegt komplett sequenziert vor und enthält 590,209 bp mehr als das Genom von MG1655. Im Vergleich zum Laborstamm MG1655 liegen bei CFT073 247 spezifische DNA Fragmente, welche länger als 50 bp sind, mehr vor. Einige von diesen Abschnitten stellen Pathogenitätsinseln dar. Sie codieren für verschiedenste Virulenzfaktoren wie z.B. Fimbrien, sekretierte Autotransporter und Exotoxine. Auch das TIR-containing protein C (TcpC) liegt auf einer dieser Pathogenitätsinseln, genauer der *serU* Pathogenitätsinsel. TcpC enthaltende Stämme häufen sich in der phylogenetischen Gruppe B2 (Schubert et al., 2010).

### 1.3 Resistenzmechanismen des Wirtes

Im Verlauf einer Harnwegsinfektion müssen die Erreger im Urogenitaltrakt verschiedene ökologische Nischen durchwandern und sich in jeder Nische den Abwehrmechanismen des Wirtes mit eigenen Virulenzfaktoren entgegensetzen, um so eine Infektion dauerhaft etablieren zu können.

Die Harnwege sind prinzipiell eine sterile Umgebung. Mehrmals am Tag kommt es zur unidirektionalen Entleerung der Blase, welche die Blase von diversen Pathogenen, welche nicht oder schwach an die Blasenoberfläche gebunden sind, reinigen kann. Urin selbst stellt aufgrund seines niedrigen pHs und seiner hohen Osmolarität eine für Bakterien ungünstige Umgebung dar. Das Epithel des Harntraktes, auch Urothel genannt, besteht aus 3-4 Zellschichten. Darunter trennt die Basalmembran das Epithel von der Lamina propria und den glatten Muskelzellen der Harnblasenwand ab. Die oberflächlichsten Zellen werden auch Umbrella cells genannt. Diese Oberflächenzellschicht hat unter normalen Umständen eine sehr geringe Teilungsrate. Sobald jedoch die Präsenz von adhärenenten Bakterien bemerkt wird, leiten diese Zellen die Apoptose ein und blättern ab. Die abgeschilferten Zellen und Pathogene werden anschließend mit dem Urinfluss ausgeschwemmt. Dieser Mechanismus der Exfoliation stellt somit eine Verteidigungsstrategie dar (Aronson et al., 1988; Orikasa and Hinman, 1977). Des Weiteren exprimieren Epithelzellen Toll-like Rezeptoren (TLR), welche Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) erkennen (Sheerin, 2011). Daraufhin werden proinflammatorische Zytokine und Chemokine, wie IL-6 und IL-8 freigesetzt, welche die angeborene Immunabwehr starten und zur Infiltration des Gewebes mit Leukozyten führen. Hierunter fallen vor allem Neutrophile, welche mit Komplement befallene Bakterien direkt zerstören. Zudem synthetisiert das Epithel antibakterielle Peptide, sogenannte Defensine und Cathelicidine. Die Sekretion von P-Blutgruppenantigenen und Tamm-Horsfall Protein (Uromodulin) beeinflusst direkt die bakterielle Adhäsion an das Urothel (Mulvey et al., 2000).

### 1.4 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Die Immunabwehr des Menschen lässt sich in das angeborene und adaptive Immunsystem einteilen. Die angeborene Immunabwehr stellt die erste Verteidigungslinie gegen pathogene Mikroben dar und eine direkte Immunantwort wird eingeleitet. Diese wird hauptsächlich durch Phagozyten, wie Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen, vertreten. Diese Zellen können wirtseigene von fremden Molekülen mithilfe von Pattern recognition receptors (PRRs) unterscheiden. Diese PRRs können PAMPs, einzigartige und konservierte Komponenten von Mikroben, erkennen. TLR gehören zu diesen und führen nach Aktivierung zur Rekrutierung des adaptiven Immunsystems (Akira and Takeda, 2004; Patterson and Werling, 2013). Der TLR-Signalweg löst eine proinflammatorische Antwort durch Sekretion von Zytokinen aus. Darunter fallen der Tumornekrosefaktor (TNF), Typ 1 und Typ 2 Interferone (IFNs), und weitere Chemokine, die für die Rekrutierung von Immunabwehrzellen zum infizierten Gewebe sorgen.

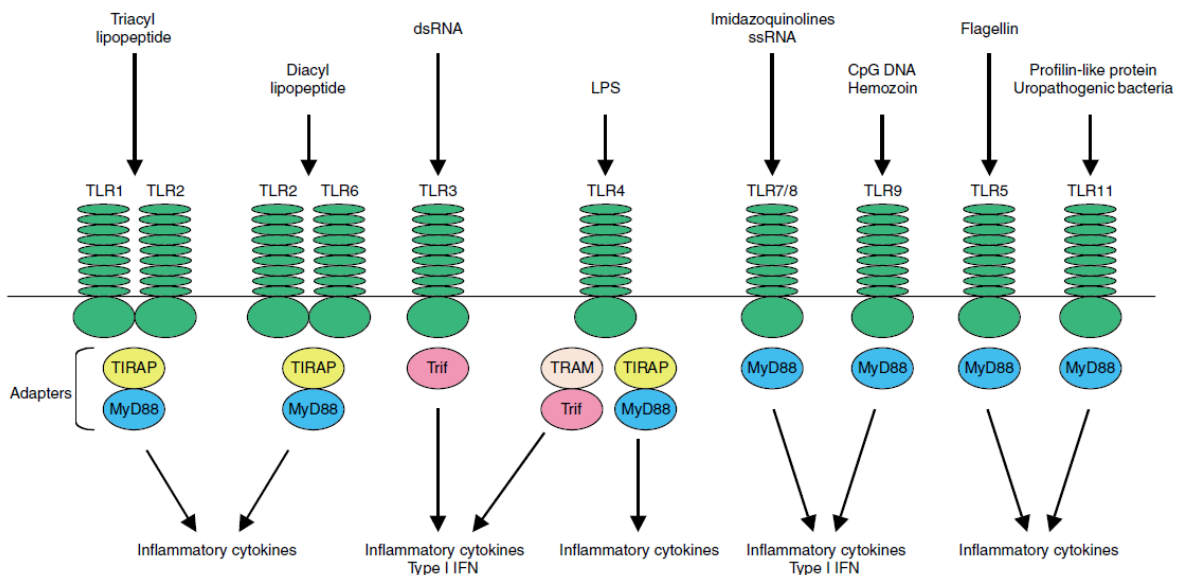
Ursprünglich wurden die TLR bei Untersuchungen mit *Drosophila* bekannt, bei denen es um die unterschiedliche Wirkung der Immunantwort gegenüber einer Pilzinfektion bei verschiedenen *Drosophila* Knockout-Mutanten ging (Lemaitre et al., 1996). Mittlerweile sind 10 verschiedene humane TLR bekannt (Broz and Monack, 2013).

Jeder dieser TLR bindet spezifische PAMPs, z.B. Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglycan, Flagellen, doppelstränge bakterielle RNA und viele mehr (vgl. Abb.2). TLR sind Transmembranproteine und bestehen aus einem intrazellulären, einem transmembranären und einem extrazellulären Teil. Der zytosolische Teil wird als „Toll/IL-1 Rezeptor Domäne“ (TIR) bezeichnet, da er Ähnlichkeiten zum Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) aufweist. Der extrazelluläre Anteil besteht aus Leucin-reichen Sequenzen, welche die PAMPs erkennen und binden.

Nachdem ein TLR an sein spezifisches Ziel, z.B. TLR4 an LPS, gebunden hat, reagiert die zytosolische TIR-Domäne am C-Terminus mit unterschiedlichen Adaptormolekülen. Solche oft ebenfalls TIR-Domänen enthaltende Adaptermoleküle sind Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88), TIR-associated protein oder MyD88-Adaptor-like (TIRAP/MAL), TIR-domain-containing protein-inducing IFN- $\beta$  (TRIF) und TRIF-related adaptor molecule (TRAM) (O'Neill and Bowie, 2007). Die Rekrutierung TIR-Domänen enthaltender Adapter löst die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- $\kappa$ B), Interferon regulatory factor 3 (IRF3) und Activator protein-1 (AP-1) und daraus resultierend die Produktion von Zytokinen aus (Akira and Takeda, 2004).

Dass die TIR-Domäne von TLR essentiell für den TLR-Signalweg ist, wurde bemerkt, als eine TIR Punktmutation dazu führte, dass LPS von C3H/HeJ Mäusen nicht mehr erkannt wurde (Poltorak et al., 1998).

Das TIR-Domänen enthaltende Adaptorprotein MyD88 interagiert mit allen TLR außer mit TLR3. Damit wird es zu einem essentiellen Adaptormolekül im TLR-Signalweg. Die wichtige Bedeutung von MyD88 wurde klar, als Mäuse mit defizientem MyD88 nicht mehr auf einen LPS Stimulus oder einen IL-1/IL-18 Stimulus reagierten (Adachi et al., 1998; Kawai et al., 1999). TIRAP kommuniziert mit TLR2 und TLR4. Auch TRIF reagiert MyD88 unabhängig mit TLR3 und TLR4. Ebenso leitet TRAM den MyD88 unabhängigen TLR4-Signalweg ein (vgl. Abb.2) (Kawai and Akira, 2006).



**Abbildung 2: TLR getriggerte Immunantwort. Darstellung der TLR mit entsprechendem Stimulus und intrazellulären Adaptormolekülen. TLR4 kann Myd88 abhängig, aber auch unabhängig über TRAM und TRIF aktiviert werden. TLR3 ist komplett Myd88 unabhängig.**

(Übernommen aus (Kawai and Akira, 2006), Fig. 1; mit der Erlaubnis von Springer Nature, Cell Death & Differentiation, Copyright (2006)).

UPEC Infektionen verursachen Entzündungen über den TLR4-Signalweg. Macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2), welches dem humanen IL-8 ähnelt, sowie polymorphnukleare Leukozyten waren im Urin der Wildtyp-Mäuse während der Harnwegsinfektion erhöht, aber bei TLR4-defizienten Mäusen verringert. Ähnliche Ergebnisse wurden bei MyD88-defizienten Mäusen gesehen. Somit ist die Entzündungsreaktion durch UPECs vom TLR4/MyD88-Signalweg abhängig. (Yadav et al., 2010). TLR4 aktiviert hierbei NF- $\kappa$ B MyD88 abhängig aber auch MyD88 unabhängig über das Adaptorprotein TRIF (vgl. Abb. 3) (Alaidarous et al., 2014; Snyder et al., 2013; Ve et al., 2015).

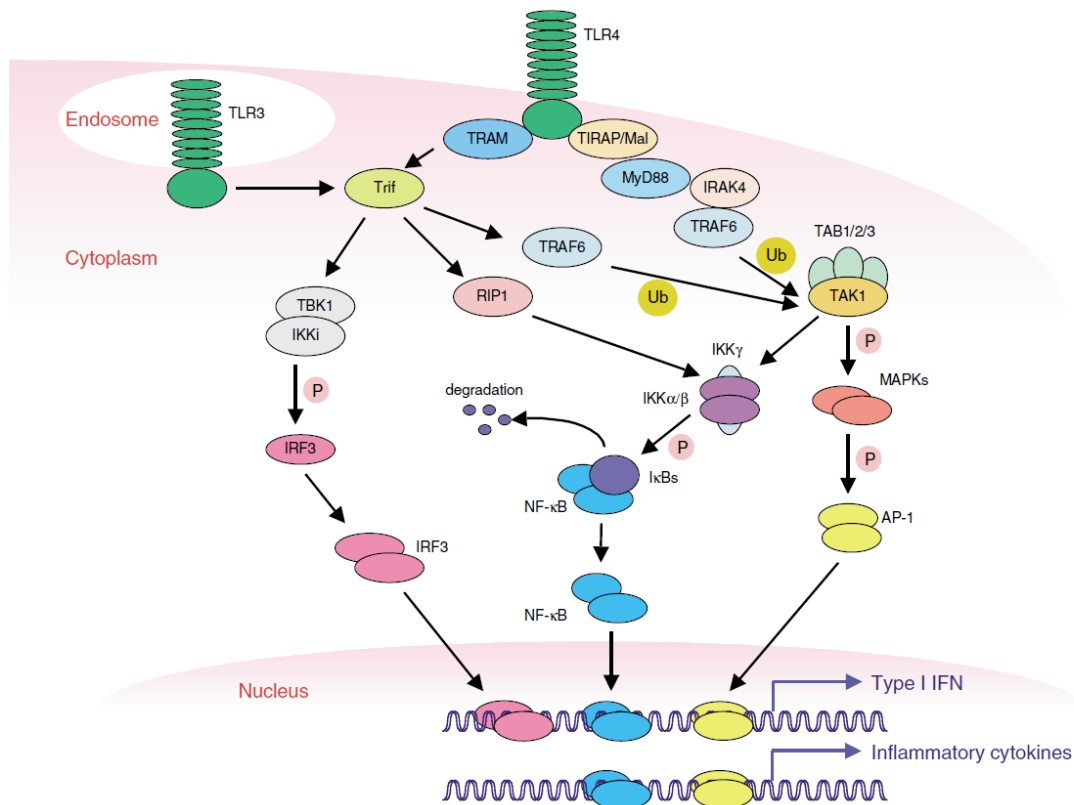


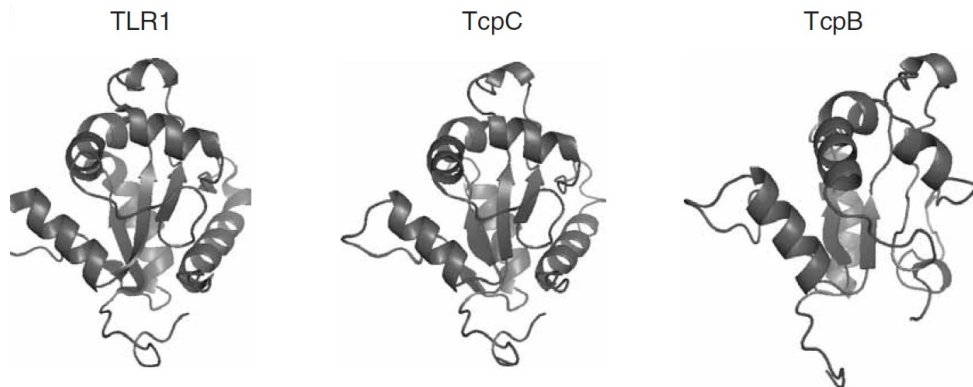
Abbildung 3: Darstellung des durch TLR4 und TLR3 aktivierten Signalweges. TLR4 kann nach Bindung von LPS über TIRAP und MyD88 oder über TRAM und TRIF aktiviert werden und führt letzten Endes zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3, NF- $\kappa$ B und AP-1. Diese fördern die Bildung von Typ-1 Interferonen und weiteren proinflammatorischen Zytokinen.

(Übernommen aus (Kawai and Akira, 2006), Fig. 2; mit der Erlaubnis von Springer Nature, Cell Death & Differentiation, Copyright (2006))

### 1.5 Bakterielle TIR-Domänen

Newman et al. entdeckten 2006 erstmals ein TIR-Domänen enthaltendes Protein in *Salmonella enterica serovar Enteritidis*. Dieses als TIR-like protein A (TlpA) bezeichnete Protein unterdrückte das menschliche Immunsystem, indem die NF- $\kappa$ B Aktivierung behindert wurde und damit das bakterielle Überleben in humanen THP-1 Makrophagen erleichtert wurde (Newman et al., 2006).

Auch auf dem Genom des Bakteriums *Brucella melitensis* und dem uropathogenen *E. coli* Stamm CFT073 wurde jeweils ein Gen gefunden, das für ein TIR-homologes Protein unbekannter Funktion codiert (Cirl et al., 2008). Die Proteine wurden entsprechend TIR-containing protein B (TcpB) und TIR-containing protein C (TcpC) genannt. Die *in silico* Analyse der Tertiärstruktur ergab große Ähnlichkeit zu der TIR-Domäne des humanen TLR1 (vgl. Abb.4). Eine Untersuchung der Aminosäuresequenzen von TcpB und TcpC ergaben, dass die jeweiligen TIR-Domänen am C-terminalen Ende des Proteins liegen. Die N-terminale Seite von TcpC enthält eine putative Transmembrandomäne.



**Abbildung 4: Vergleich der Tertiärstruktur der TIR-Domäne von TLR1 und der vorhergesagten TIR-Domänen von TcpC und TcpB.**

(Übernommen aus (Cirl et al., 2008), Fig. 1; mit der Erlaubnis von Springer Nature, Nature Medicine; Copyright (2008))

Die Aminosäuresequenz der bakteriellen TIR-Domänen unterscheidet sich deutlich von den eukaryotischen TIR-Domänen. Allerdings bleibt die Funktion der TIR-Domäne, welche Interaktionen mit anderen Proteinen zulässt, bestehen. So reagiert z.B. TLR1 als auch TcpC mit der TIR-Domäne des Adaptorproteins MyD88. Die Tertiärstruktur weist eine spezielle Anordnung von  $\beta$ -Faltblättern und  $\alpha$ -Helices auf, die denen eukaryotischer TIR-Domänen ähneln (Cirl and Miethke, 2010).

Wie in Tabelle 1 ersichtlich wurden in zahlreichen weiteren Spezies TIR-Domain-containing proteins (Tcps) entdeckt. Bei einigen Tcps wurde bestätigt, dass sie als Virulenzfaktor agieren, indem sie das Immunsystem des Wirtes negativ beeinflussen. Es wurden allerdings auch Tcps bei nicht pathogenen Keimen, wie z.B. das PdTip des *Paracoccus denitrificans*, charakterisiert. TlpA, TcpC und TcpB unterdrücken die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, welcher in der transkriptionellen Kontrolle vieler Zytokine eine Rolle spielt (Spear et al., 2009).

**Tabelle 1: Funktion und eukaryotische Interaktionspartner von bakteriellen Tcps**

(übernommen aus (Waldhuber et al., 2016b), Table 1; <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Bacterial TIR Protein	Organism	TIR Protein Function in vitro	TIR Protein Function in vivo	Protein Interaction with	Protein Structure	References
TcpC	Escherichia coli CFT073	suppresses NF-κB activation, promotes bacterial survival in RAW264.7 macrophages	promotes virulence in UTI mouse model (bacterial burden, kidney disease)	MyD88, TLR4	not known	Cirl et al., 2008 [7]; Yadav et al., 2010 [18]; Snyder et al., 2013 [19]
TcpB (Btp1/BtpA)	Brucella sp.	suppresses NF-κB activation, inhibition of dendritic cell maturation	promotes virulence during early stages of infection in mice (systemic spread)	MyD88, TIRAP, TLR4, Microtubule	PDB IDs: 4C7M, 4LZP, 4LQC	Cirl et al., 2008 [7]; Salcedo et al., 2008 [8]; Radhakrishnan et al., 2009 [15]; Kaplan-Türköz et al., 2013 [20]; Snyder et al., 2014 [21]; Alaidarous et al., 2014 [16];
BtpB	Brucella sp.	suppresses TLR2, TLR4, TLR5, TLR9 mediated activation of NF-κB	promotes virulence in mice (survival)	not known	not known	Salcedo et al., 2013 [22];
TlpA	Salmonella enterica serovar Enteritidis	suppresses NF-κB activation, promotes bacterial survival in human THP1 macrophages	promotes virulence in mice (bacterial survival, burden and lethality)	not known	not known	Newman et al., 2006 [6];
TcpYI	Yersinia pseudotuberculosis	promotes bacterial survival in murine macrophages	promotes virulence in mouse model of peritonitis (survival inside the spleen)	not known	not known	Nörenberg et al., 2013 [11];
YpTIR	Yersinia pestis	suppresses NF-κB activation	no role in virulence	MyD88	not known	Rana et al., 2011 [10];
TcpF	Enterococcus faecalis	suppresses NF-κB activation	promotes virulence in mice (bacterial burden)	MyD88	not known	Kraemer et al., 2014 [23]; Zou et al., 2014 [9];
TirS	Staphylococcus aureus MSSA476	suppresses NF-κB and MAP-kinase activation	Promotes virulence in mice (organ co-lonization)	not known	not known	Askarian et al., 2014 [13];
PdTlp	Paracoccus denitrificans	not known	not known	MyD88, TLR4	PDB ID: 3H16	Low et al., 2007 [5]; Chan et al., 2009 [24];



## 1.6 Bisherige Forschung am TIR-containing protein C (TcpC)

TcpC ist ein Virulenzfaktor des uropathogenen *Escherichia coli* Stammes CFT073 (Cirl et al., 2008). Bei der Untersuchung von Isolaten aus dem Urin mittels PCR von Individuen mit zum einen schwerer Pyelonephritis, akuter Zystitis oder aber harmloser asymptomatischer Bakteriurie kam man zu dem Ergebnis, dass TcpC bei 40 % der Pyelonephritis Patienten, bei 21 % der Zystitis Patienten, bei 16 % der Patienten mit asymptomatischer Bakteriurie und bei 8 % der Kontrollen (Fäkalflora von Individuen ohne Harnwegsinfektion) vorhanden war. Dieses Ergebnis suggeriert, dass das Auftreten von TcpC mit der Virulenz des uropathogenen Stammes zusammenhängt (Cirl et al., 2008).

Anhand eines Mausmodells wurde der *in vivo* Effekt von TcpC mit dem Vergleich eines CFT073 Wildtyps und einer Knockout-Mutante *tcpC::kan* ( $\Delta$ TcpC) erfasst. Der Wildtyp-Stamm erreichte eine deutlich höhere bakterielle Last und verursachte größeren Gewebeschaden im Modell. Nierenabszesse wurden nur bei Infektion der Mäuse mit dem Wildtyp beobachtet, nicht jedoch bei Infektion des Urogenitaltraktes mit dem Knockout-Stamm.

Außerdem ergaben der Wildtyp und die komplementierte Mutante *tcpC::kan + pTcpC* nach 5 h Infektionszeit der murinen Makrophagenzelllinie RAW264.7 bzw. der Uroepithelzelllinie HCV29 eine höhere intrazelluläre bakterielle Zelldichte als die Knockout-Mutante  $\Delta$ *tcpC::kan*. Die totale bakterielle Zellzahl wurde jedoch nicht beeinflusst. Somit erleichtert TcpC das intrazelluläre Überleben von *E. coli* CFT073.

TcpC kann die Freisetzung von Zytokinen verhindern. So wurde ersichtlich, dass die Infektion von Säugerzelllinien mit  $\Delta$ *tcpC::kan* im Vergleich zum Wildtyp oder der komplementierten Mutante *tcpC::kan + pTcpC* deutlich höhere TNF und IL-6 Level, produziert von Makrophagen und Epithelzellen, ergab.

In einem anderen Versuch von Yadav et al. wurde die humane Nierenepithelzelllinie A-498 mit  $\Delta$ *tcpC::kan* und dem Wildtyp CFT073 stimuliert und das Level der Zytokine gemessen (Yadav et al., 2010). Der Knockout-Stamm erreichte im Vergleich zum Wildtyp signifikant höhere Level an MyD88 abhängigen proinflammatorischen Zytokinen (IL6, IL8, TNF- $\alpha$ ). Ebenso wurden beim Knockout-Stamm höhere Level an neutrophilen Chemokinen erreicht.

TLR4 ist während einer Harnwegsinfektion ein wichtiges Stellglied im Erkennen der Pathogene (vgl. 1.4). TcpC bindet TLR4 sowie das Adaptormolekül MyD88. Damit wird die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B verhindert (Cirl et al., 2008). Zusätzlich wird vermutet, dass auch der MyD88 unabhängige Signalweg durch des Adaptormoleküls TRIF von TIR-TcpC beeinflusst wird (Yadav et al., 2010).

TcpC wird von den Bakterien sezerniert und von den Wirtszellen aufgenommen (Cirl et al., 2008). Ein Effluxpumpeninhibitor Phenylalanin-arginin-beta-naphtylamid (PAbetaN) kann die Sekretion verhindern und das Zytokinlevel der Wirtszellen bleibt konstant. So ergibt sich die Vermutung, dass Bakterien bereits ohne Mucosakontakt die Verteidigungsmechanismen des Wirtes beeinträchtigen können.

Soweit bekannt agiert TcpC als potenter Inhibitor von zwei PRR Systemen und unterwandert damit die Reaktion des angeborenen Immunsystems. Zum einen wird wie bereits oben beschrieben die TLR-vermittelte extrazelluläre Erkennung von Pathogenen verhindert. Zum anderen behindert TcpC die Wirkweise von intrazellulär wirksamen Inflammasomen. Während einer Harnwegsinfektion bilden UPECs Intracellular bacterial communities (IBCs) über Typ 1 Fimbrien im Zytosol des Blasenepithels (Wright et al., 2007). IBCs und andere intrazelluläre Pathogene werden vermutlich nicht durch das TLR System erkannt, da diese entweder auf der

Zellmembran oder auf endosomaler Membran sitzen. Deshalb ist intrazellulär die Familie der Nucleotide-binding oligomerization domain-proteins (NOD) für die Erkennung zuständig. Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor 3 (NLRP3) ist ein Mitglied der NOD Familie und wird durch Exposition mit speziellen Reizen aktiviert. Diese umfassen ein Spektrum, welche ganze Pathogene, wie z.B. *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, aber auch PAMPs und Damage-associated molecular patterns (DAMPs), wie z.B. extrazelluläres ATP und Hyaluronsäure, beinhaltet (Schroder and Tschopp, 2010). Es werden drei molekulare Wege der Aktivierung diskutiert (vgl. Abb.5):

Zum einen bindet extrazelluläres ATP, welches bei Zellschäden freigesetzt wird, an einen P2X7-ATP abhängigen Ionenkanal und triggert damit einen K<sup>+</sup>-Efflux, wodurch der Pannexin-1 Kanal geöffnet wird und extrazelluläre NLRP3 Agonisten, wie PAMPs und DAMPs, letztendlich in das Zytosol gelangen (Schroder and Tschopp, 2010). Ein anderer Weg beinhaltet die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Invasion mit Pathogenen, welche das Inflammasom aktivieren. Der letzte Weg beschreibt die phagozytische Aufnahme von Partikeln, wie z.B. Silikon, Asbest und Amyloid-β, welche die Lysosomen schädigen und somit ins Zytosol gelangen und das Inflammasom aktivieren können. Das aktive NLRP3 rekrutiert das Adaptorprotein Apoptosis associated speck-like protein (ASC). Daraufhin wird Caspase-1 autokatalytisch aktiviert. Aktive Caspase-1 teilt wiederum IL-1β in seine biologisch aktive Form. Caspase-1 und reifes IL-1β werden daraufhin sezerniert.

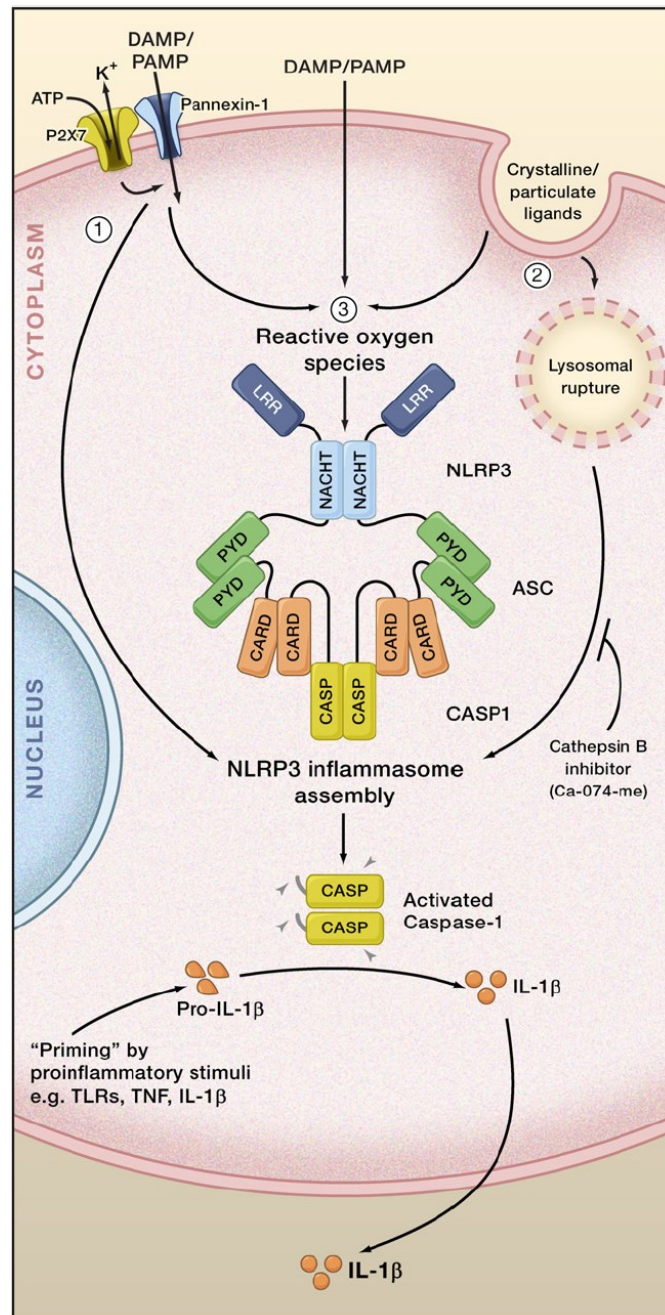


Abbildung 5: Darstellung der drei Aktivierungswege des NLRP3-Inflammasoms und anschließenden Aktivierung von IL-1β.

(Übernommen aus (Schroder and Tschopp, 2010), Fig. 3; mit der Erlaubnis von Elsevier License; The Cell; Copyright (2010))

Das NLRP3-Inflammasom bemerkt CFT073 und TcpC wiederum unterdrückt dessen Aktivität. TcpC bindet über die TIR-Domäne direkt an NLRP3 und Caspase-1, nicht jedoch an ASC. Folglich kann NLRP3 Caspase-1 nicht proteolytisch aktivieren. Infolgedessen reduziert TcpC die IL-1β Sekretion der angeborenen Immunzellen während einer Infektion mit UPEC. Die Wirtszellen bleiben derweil intakt. Die Reduktion von IL-1β ist von Vorteil für die Ausbreitung der Infektion. So ist die bakterielle Zellzahl bei IL-1β-defizienten Mäusen nach einer Infektion mit UPEC in den Harnblasen zwei- bis dreimal höher als bei Wildtyp Mäusen (Waldhuber et al., 2016a).

TcpC kann die Freisetzung von IL-1 $\beta$  von CFT073 infizierten Makrophagen, dendritischen Zellen und Epithelzellen unterdrücken.

Zusammenfassend betrachtet stellt TcpC einen Mechanismus von uropathogenen *E. coli* dar, welcher das angeborene Immunsystem durch systematische Unterdrückung der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen unterwandert und somit eine antiinflammatorische Wirkung hat.

Tatsächlich wurde die rekombinante TIR-Domäne von TcpC erfolgreich dazu genutzt, Mäuse mit Autoimmunarthritis zu behandeln. Die rekombinante TIR-Domäne konnte Krankheitssymptome durch Verhinderung der Entwicklung von Th17 T-Zellen lindern (Pasi et al., 2016).

## 1.7 Anpassung der Bakterien an den Urogenitaltrakt

Im Vergleich zum Gastrointestinaltrakt, ist der Urogenitaltrakt stickstoff- und eisenarm, hat ein mittleres Sauerstofflevel, größere Osmolarität und ein reduziertes luminales Nährstoffangebot (Snyder et al., 2004). Falls ein Erreger also vom Gastrointestinaltrakt in den Urogenitaltrakt gelangt, liegen veränderte extrazelluläre Bedingungen vor. Bestimmte Stimuli wie veränderter pH-Wert, Osmolarität, antimikrobielle Peptide, sowie reaktive Sauerstoffprodukte (ROS) können von Bakterien als Stressoren erkannt werden und bewirken eine Veränderung der Genexpression, damit die Bakterien sich an die Umweltbedingungen adaptieren können. *E. coli* besitzt zwei Mechanismen um Stressoren zu erkennen und die Genexpression entsprechend der Bedingungen umzugestalten. Zum einen gibt es die sogenannten Two-component systems (TCS) und zum anderen die Sigma ( $\sigma$ )-Faktoren:

TCSs bestehen aus einer Histidinkinase (HK), welche ein Umweltsignal registriert und einem Response regulator (RR), welcher die zelluläre Antwort einleitet. So wird die Expression bestimmter Zielgene zur Erhöhung der bakteriellen Virulenz gesteigert (Freeman et al., 2013). TCSs wie CpxA/CpxR, BarA/UvrY und KguS/KguR sind nachweislich an der Pathogenität von CFT073 beteiligt (Cai et al., 2013; Debnath et al., 2013; Palaniyandi et al., 2012). Auch die TCSs PhoQ/PhoP und KdpD/KdpE sind bei CFT073 vorhanden und erhöhen dessen Pathogenität. PhoQ erkennt ein antibakterielles Peptid und KdpD registriert Kaliumionen (Freeman et al., 2013; Groisman and Mouslim, 2006). Letzteres ist besonders interessant, da die Freisetzung von Kaliumionen als einer der drei Hauptmechanismen zur NLRP3-Inflammasom Aktivierung beschrieben wird (vgl. 1.6). Falls UPEC Bakterien die extrazelluläre Erhöhung von Kalium als Aktivierung des angeborenen Immunsystems via NLRP3-Inflammasom erkennen, könnten diese den humanen Verteidigungsmechanismen früh entgegenwirken.

Neben der Erkennung der Umwelt durch TCSs, gibt es sogenannte Sigma ( $\sigma$ )-Faktoren, die auf Stress reagieren können. Sie sind Untereinheiten einer RNA-Polymerase und initiieren die Einleitung der Transkription, indem sie den speziellen Promotor erkennen und binden. Response regulators der TCSs binden upstream der Promotoren der Open reading frames (ORF), die sie regulieren und initiieren die Transkription, indem sie mit der Sigma-gebundenen RNA-Polymerase interagieren (Marles-Wright and Lewis, 2007). In *E. coli* wurden sieben  $\sigma$ -Faktoren gefunden. Davon ist einer ein konstitutiv exprimierter Housekeepingfaktor ( $\sigma^{70}$ ) und die sechs anderen haben alternative Funktionen.  $\sigma^s$ , der für die Regulierung des *rpoS* Gens verantwortlich ist, startet die Einleitung einer generellen Stressantwort, sobald das Bakterium feindliche Umgebungsbedingungen registriert.  $\sigma^l$  und  $\sigma^N$  registrieren

Einschränkungen im Eisen- ( $\sigma^I$ ) und Stickstofflevel ( $\sigma^N$ ) und leiten entsprechende Adaptionsvorgänge ein (Landini et al., 2014).

Eisen ist wichtig für das bakterielle Wachstum und im Urogenitaltrakt limitiert vorhanden. Deshalb haben UPECs Mechanismen entwickelt, um an Eisen zu gelangen. Zum einen produzieren sie  $Fe^{3+}$  - chelatierende Siderophore. Das sind sekretierte Proteine wie Enterobactin, Salmochelin und Yersiniabactin, die mit wirtseigenen eisenbindenden Proteinen wie Transferrin und Lactoferrin konkurrieren. Zum anderen produzieren sie spezielle Exotoxine, wie Hämolyisin, um Erythrozyten zu zerstören, Hämoglobin freizusetzen und mittels membranständigen Hämoglobinrezeptoren aufzunehmen und Eisen intrazellulär freizusetzen (Subashchandrabose and Mobley, 2015a).

Auch Stickstoff stellt im Urogenitaltrakt ein limitiertes Element dar. Dieses ist zwar reichlich im Urin in Form von Urea enthalten, kann jedoch von *E. coli* nicht abgebaut werden, da diesen die Ureaseenzyme zur Hydrolyse von Urea zu Ammoniak und  $CO_2$  fehlen. *E. coli* versucht deshalb, seinen Stickstoffmetabolismus durch Import und Synthese von Glutamin aufrecht zu erhalten (Snyder et al., 2004).

Der Harnwegtrakt ist für Bakterien gleichzusetzen mit osmolarem Stress. Deshalb produzieren sie Osmoprotektoren wie Prolin und Glycin-Betain (Snyder et al., 2004). Normaler humaner Urin ist leicht azid mit pH-Werten zwischen 6,0 und 7,5. Je nach Stoffwechsellage kann dieser im Tagesverlauf aber auch Werte zwischen 4,5 und 8,0 annehmen. PH-Werte von Urin mit 8,5 oder 9,0 indizieren hingegen das Vorliegen von Urea-splittende Organismen, wie *Proteus*, *Klebsiella* oder *Ureaplasma urealyticum*. Je nach Säure-Base-Haushalt des Körpers und eventuell bereits bestehender asymptomatischer Bakteriurie kann der pH-Wert auf den UPEC in der Blase treffen somit variieren. Durchbrechen UPEC die Endothelschranken und gelangen ins Blut, treffen sie für gewöhnlich pH-Werte zwischen 7,35-7,45 an (Bono and Reygaert, 2018).

Nicht nur die Virulenzfaktoren eines Erregers sind für die Etablierung einer Infektion notwendig, auch sein Metabolismus muss sich auf vorliegende Nährstoffe adaptieren können. In *E. coli* gibt es die Stoffwechselwege Glycolyse, Gluconeogenese, Zitratzyklus, Pentosephosphatzyklus und den Entner-Duodoroff Weg. Alteri et al. infizierten Mäuse mit speziellen *E. coli* Knockout-Stämmen, die defizient in je einem metabolischen Weg waren, und bestimmten die bakterielle Last nach 48 h. Zu sehen war, dass Defekte im Zitratzyklus oder in der Gluconeogenese die Fitness der Bakterien beeinträchtigte. Die jeweiligen Knockout-Mutanten der Stoffwechselwege Glycolyse, Pentosephosphatweg und Entner-Duodoroff Weg kolonisierten den Harnwegtrakt der murinen Modelle genauso gut wie der Wildtypstamm, was zur Schlussfolgerung führt, dass diese Wege während einer HWI entbehrlich sind. Der Knockout von Peptidtransportern führte hingegen zu reduzierter Fitness. Somit wurde offenbart, dass die Aufnahme von Peptiden im Urin als Hauptnahrungsquelle für Bakterien dient. Diese werden in Aminosäuren und danach in Oxalacetate umgewandelt, welche letzten Endes in den Zitratzyklus eingeschleust werden. Der Zitratzyklus liefert energiereiche Verbindungen für die Atmungskette und wichtige Metabolite für die Gluconeogenese. Eigen hergestellte Glucose wird für die Produktion von housekeeping Merkmalen, wie z.B. das Petidoglykangerüst, benötigt. Somit benötigen Bakterien keine Zufuhr exogener Glucose. Glucose ist im menschlichen Urogenitaltrakt, mit Ausnahme von diabetischen Stoffwechsellagen, nicht regelhaft vorliegend (Alteri et al., 2015; Alteri et al., 2009). Können Bakterien jedoch in das Nierenbecken oder die Blutbahn eindringen und eine Bakteriämie auslösen, kommen sie unweigerlich mit Glucose in Kontakt und können auf den Stoffwechselweg der Glycolyse zurückgreifen.

## 1.8 Ziele der Arbeit

TcpC ist ein Virulenzprotein des uropathogenen *E. coli* Stammes CFT073, welches die angeborene Immunabwehr des Wirtes schwächen kann. Die Expression von TcpC durch UPECs im Rahmen eines Harnwegsinfektes ist mit dem Erreichen einer höheren bakteriellen Last, als auch der höheren Wahrscheinlichkeit eines komplizierten Harnwegsinfektes (z.B. Abszessbildung und/oder Pyelonephritis) assoziiert (Cirl et al., 2008). Welche Stimuli hierbei den Erreger zur gesteigerten Proteinbiosynthese von TcpC anregen, ist bislang unerforscht.

Ziel dieser Arbeit ist es, Bedingungen des Harnwegtraktes zu charakterisieren, welche zur Induktion von TcpC beitragen können. Insbesondere Faktoren wie variierender pH-Wert und Nährstoffquellen, das Vorliegen von bestimmten Ionen oder die Situation in einer Kokultur mit humanen Makrophagen sollen untersucht werden. Ebenso soll die Lokalisation des TcpC Promotors identifiziert werden. Beide Fragestellungen werden mithilfe von GFP-Reporterstämmen und der Auswertung der Fluoreszenzstärke mittels Durchflusszytometrie untersucht. Sofern der TcpC Promotor charakterisiert ist, sollen potentielle Transkriptionsfaktoren mithilfe eines magnetischen Pulldowns und anschließender massenspektromischer Untersuchung identifiziert werden. Die damit gewonnenen Ergebnisse sollen erste Erkenntnisse über den Signalweg liefern, welcher die Expression von TcpC bedingt. Zusätzlich soll die genaue Lokalisation des Virulenzfaktors innerhalb einer Bakterienzelle, als auch die Frequenz des Auftretens innerhalb einer Kolonie, mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

OD600 DiluPhotometer	IMPLEN
Biorad Model 200/2.0 Electrophoresis Power Supply	Bio Rad
Brutschrank	WTB Binder
Brutschrank HERACELL 150i CO <sub>2</sub> Incubator	Thermo Scientific
Chemocam ECL	Intas
Diskmischer RS RD5	Phoenix Instruments
Elektroporator Multiporator	Eppendorf
Flow Cytometer	BD Biosciences
Gefriertruhe -80 °C	Colora
Geldoc	Intas
Kamera Orca-flash.4.OLT	HAMAMATSU
Kühlschrank -20 °C	Liebherr
Magnetrührer IKAMAG RCT	IKA Labortechnik
Mikroskop CK2	Olympus
Mikroskop DMRB	Leica
Mikrowelle	Sharp
Mikrozentrifuge 22R	Hettich Zentrifugen
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio Rad
Multilab 540 Mehrparameter Messgerät	WTW
Nanophotometer P330	IMPLEN
PerfectBlue™ Gelsystem Mini S	Peqlab Biotechnologies
Pharmacia LKB Multidrive XL	Pharmacia
Plattformschüttler Polymax 2040	Heidolph
Präzisionswaagen Extend	Sartorius
Schüttelinkubator 3032	GFL
Schüttler Swip	Edmund Bühler
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus Instruments
Sonifier B-12 Cell Disrupter	Branson Sonic Power
TECAN Spark 10M	Company
Thermocycler Tpersonal	TECAN
Thermoshaker TS100	Biometra
Tischzentrifuge 5415D	KISKER
Vortexer REAX 2000	Eppendorf
Wasserbad	Heidolph
Zentrifuge Rotina 35R	GFL
Schüttelinkubator MaxQ 8000	Hettich Zentrifugen
	ThermoFisher Scientific

#### 2.1.2 Sonstige Materialien

24 Well Platte Nunclon Delta Surface	Thermo Scientific
BD Discardit II 10/20 ml Spritzen	Becton and Dickinson
CRYO.S	Greiner Bio-One

Deckgläser	Marienfeld	Laboratory
EASY-Rack und MIDI-Rack	Glassware	
Electroporation cuvettes	A. Hartenstein	
Eppendorfgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Peqlab	
Eppiständer Combi-Rack	Eppendorf	
FACS Küvetten	NeoLab	
Kulturröhrchen, AR-Glas	Falcon	
Halb-Mikro-Küvette	neoLab	
Küvettenständer Probenboxen KP45	Sarstedt	
Magnetic Particle Separator	A. Hartenstein	
Mechanischer Zähler	Boehringer Mannheim	
Nalgene Syringe Filter 0,2 µm SFCA	IVO	
Neubauer Zählkammer	Thermo Scientific	
Parafilm	Brand	
PCR 8er-Streifen	Pechiney Plastic Packaging	
Petrischalen Nunc	NeoLab	
pH Papier pH Fix 4.5-10.0	Thermo Scientific	
Pierce Streptavidin Magnetic Beads	Roth	
Pipetboy acu 2	Thermo Scientific	
Pipette 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Integra Biosciences	
Pipettenspitzen Multiuniversal	Greiner Bio-One	
Pipettenspitzen Ultratip	Roth	
Polypropylenröhrchen (15 ml, 20 ml)	Greiner Bio-One	
Polystyrene Tubes Two-Position Vent Stopper (14 ml)	Greiner	
Precision Wipes	Greiner	
Stickstoff	KIMTECH	
SuperFrost Plus Objektträger	Broser	
Transferpipette S	Menzel-Gläser	
Transwelleinsätze Thin Certs- 24 Well, 0,4 µm	Brand	
Zellkulturflaschen CELLSTAR	Greiner Bio-One	
	Greiner Bio-One	

### 2.1.3 Chemikalien

Agarose	Invitrogen
Aluminiumsulfathydrat	Honeywell Fluka
Ammoniumchlorid	Merck
Ampicillin Sodium Salt	Applichem
Anhydrotetracyclin	TOKU-E
Bacto Tryptone, Pancreatic Digest of Casein	BD Chemicals
Bradford Reagent	Sigma
Bromphenolblau	Roth
BSA Albumin Fraktion V 98 %	Roth
Calciumchlorid	Sigma
cOmplete Mini – protease inhibitor cocktail tablets	Roche
Coomassie Brilliant Blue G250	Applichem
D(+)- Glucose Monohydrat	Applichem
di-Natriumhydrogenphosphat	Applichem
DL-Dithiothreitol	Sigma Aldrich
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma



EDTA	Sigma
Eisen(II)-sulfat Heptahydrat	Roth
Ethanol absolut reinst	Labochem International
Ethidiumbromid	Roth
FACS Flow	BD Biosciences
FACS Rinse	BD Biosciences
FCS	Gibco
Glycerin	Roth
H <sub>2</sub> O	Millipore Q
HEPES	Roth
IPTG	Applchem
Isopropanol	Applchem
Kaliumchlorid	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin Selective Supplement	Oxoid Ltd.
Lachssperma DNA	Applchem
LB Agar (Lennox)	Roth
LB Medium (Lennox)	Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Sigma
Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat	Serva
Natriumhypochlorid	Sigma Aldrich
Natronlauge	Merck
Nicotinsäure	Roth
Ortho-Phosphorsäure	Fluka
Paraformaldehyd	Roth
PMA	Promocell
RPMI 1640 Medium	Sigma
Salzsäure	Merck
SDS ultrapure	Applchem
Sucrose	Sigma
Thiamin-Hydrochlorid	Roth
Tris ultrapure	Applchem
Trypan Blue Solution 0,4 %	Gibco

#### 2.1.4 Software und Computerprogramme

Flow Jo	FlowJo LLC
Graph Pad Prism	Graph Pad Software
Image J	Open source program (Schneider et al., 2012)
Cell Quest Pro	BD Biosciences
Microsoft Excel	Microsoft Corporation

#### 2.1.5 Enzyme und Kits

Dream Taq Green PCR Master Mix (2x)	Thermo Scientific
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Kit	New England Biolabs

Lysozym  
Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up Kit

Fluka  
Machery-Nagel

### 2.1.6 Standards für DNA- und Proteingele

Gene Ruler 100 bp DNA Ladder  
Pager Ruler Plus prestained protein ladder

Thermo Scientific  
Thermo Scientific

### 2.1.7 Oligonukleotide (Primer)

Alle Oligonukleotide wurden als Standard DNA Oligos (Scale: 0,025 µmol, Format: Dry) von Sigma bezogen.

Primer JI1_tcpC 5'UTR_Biotin_fw	5' [Btn]GCAGGAGTCTATGGTAACG 3'
Primer JI2_tcpC 5'UTR_rev	5' CATATGCTATCACATTTTGAG 3'
Primer JI3_lacZ 5'UTR_fw	5' CATAGTCATAGCTGTATCCTGTG 3'
Primer JI4_lacZ 5'UTR_Biotin_rev	5' [Btn]AGAAAAACCACCCTTCCG 3'

Entsprechender Locus der DNA Sequenzen auf dem Genom von CFT073:

- Primer JI1 und JI2 (*Pc2398*)  
Bp 2.202.536 – 2.202.775
- Primer JI3 und JI4 (*PLacZ*)  
Bp 451.990- 452.229

### 2.1.8 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Millipore Q destilliertem Wasser hergestellt. Die Puffer „THES Buffer“, „BS Buffer (5x)“, „B/W Buffer (2x)“, „TE Buffer“ und „BS/THES Buffer“ wurden entsprechend der Angaben von Jutras et al. (Jutras et al., 2012) hergestellt.

#### Antibiotika-Stammlösungen (1000x)

Ampicillin (Amp)	100 mg/ml	In H <sub>2</sub> O
Kanamycin (Kan)	25 mg/ml	In H <sub>2</sub> O

#### Induktor-Stammlösungen

Anhydrotetracyclin	500 µg/ml	Ethanol
IPTG	0,1 M	In H <sub>2</sub> O

#### Gel Loading Dye Purple (6x)

New England Biolabs

#### TAE Puffer (1x)

40 mM	Trisbase
20 mM	Acetat
1 mM	EDTA

THES Buffer (1x)

50 mM	Tris HCl pH 7.5
10 mM	EDTA
20 %	Sucrose (w/v)
140 mM	NaCl

BS Buffer (5x)

50 mM	HEPES
25 mM	CaCl <sub>2</sub>
250 mM	KCl
60 %	Glycerol

BS/THES Binding and Washing Buffer

44.3 % THES Buffer  
 20.0 % 5x BS Buffer  
 35.7 % Nuclease Free Water

Endgültige Konzentration aller Komponenten im BS/THES Binding and Washing Buffer:

22 mM	Tris HCl pH 7.5
4.4 mM	EDTA
8.9 %	Sucrose (w/v)
62 mM	NaCl
10 mM	HEPES
5 mM	CaCl <sub>2</sub>
50 mM	KCl
12 %	Glycerol

Hinzugefügt wurde zusätzlich pro 10 ml Puffer eine Tablette cOmplete Mini Protease Inhibitoren Cocktail Mix.

Abschließend wurde alles mit einem 0,2 µm Filter sterilfiltriert.

B/W Buffer (2x)

10 mM	Tris HCl pH 7.5
1 mM	EDTA
2 M	NaCl

TE Buffer (1x)

10 mM	Tris HCl pH 8.0
1 mM	EDTA

### M9 Salz (5x)

33,9 g/l	di-Natriumhydrogenphosphat
15 g/l	Kaliumdihydrogenphosphat
2,5 g/l	Natriumchlorid
5 g/l	Ammoniumchlorid

Die Einstellung des pH Wertes des M9 Salzes diente zur Einstellung des pH-Wertes des gesamten M9 Minimalmediums. Der uneingestellte pH-Wert des M9 Salzes (5x) beträgt 6,8.

Als Varianten des M9 Salz (5x) wird unter 2.2.6 für die Herstellung von kaliumfreiem M9 Salz Kaliumdihydrogenphosphat durch Natriumdihydrogenphosphat ersetzt. Die Konzentration von 15 g/l wird beibehalten.

### 2.1.9 Biologische Materialien

#### Zelllinie

THP-1 (Human Acute Monocytic Leukemia cell line) Firma: Cell line Service GmbH

#### Bakterienstämme

Alle CFT073 Bakterienstämme wurden von Dr. rer. nat. Neumann-Pfeifer zur Verfügung gestellt. CFT073  $p_{AMP}$ , CFT073  $p(tcpC\ 127-924):eYFP_{AMP}$  und CFT073  $p_c(tcpC\ 1-924):eYFP_{AMP}$  wurden in Rahmen dieser Arbeit mittels Transformation des Plasmids durch Elektroporation (s. 2.2.2) in CFT073 hergestellt.

Tabelle 2: Auflistung und Information zu allen in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämmen

Bezeichnung	Konstrukt	Beschreibung	Vektor	Resistenz
CFT073 p <i>Pc2397</i> ; <i>gfpmut2</i> <sub>KAN</sub>	<i>Pc2397</i> Locus des Promotors: Bp 2.200.564 – 2.201.209	Auf dem Plasmid reportet der Promotor von <i>c2397</i> die Aktivität seines Gens mittels <i>gfpmut2</i>	pUA66 (Zaslaver et al., 2006)	Kanamycin
CFT073 p <i>Pc2398</i> ; <i>gfpmut2</i> <sub>KAN</sub>	<i>Pc2398</i> Locus des Promotors: Bp 2.202.536 – 2.202.775	Auf dem Plasmid reportet der Promotor von <i>c2398</i> die Aktivität seines Gens mittels <i>gfpmut2</i>	pUA66	Kanamycin
CFT073 p( <i>Pc2397-Pc2398</i> ); <i>gfpmut2</i> <sub>KAN</sub>	<i>Pc2397-Pc2398</i> Locus des Promotors: Bp 2.200.564 - 2.202.775	Auf dem Plasmid wird die Aktivität des Gens <i>c2398</i> durch den gemeinsamen Abschnitt von <i>Pc2397-Pc2398</i> reportet	pUA66	Kanamycin
CFT073 $\Delta$ <i>tcpC</i> :: <i>gfpmut2</i>	-	Auf dem Genom wurde <i>tcpC</i> durch <i>gfpmut2</i> ersetzt	-	-
CFT073 p( <i>tcpC</i> 1-150): <i>eYFP</i> <sub>AMP</sub>	<i>tcpC</i> -Fragment (bp 1-150)- <i>eYFP</i>	Auf dem Plasmid ist der Abschnitt von <i>TcpC</i> bp 1-150 an <i>eYFP</i> gekoppelt	pDK112 (Kumar and Sourjik, 2012)	Ampicillin
CFT073 p( <i>tcpC</i> 1-924): <i>eYFP</i> <sub>AMP</sub>	<i>tcpC</i> (bp 1-924)- <i>eYFP</i>	Auf dem Plasmid ist Volllänge <i>TcpC</i> an <i>eYFP</i> gekoppelt	pDK112	Ampicillin
CFT073 p( <i>tcpC</i> 1-507): <i>eYFP</i> <sub>AMP</sub>	<i>tcpC</i> -Fragment (bp 1-507)- <i>eYFP</i>	Auf dem Plasmid ist der Abschnitt von <i>TcpC</i> bp 1-507 an <i>eYFP</i> gekoppelt	pDK112	Ampicillin
CFT073 p( <i>tcpC</i> 508-924): <i>eYFP</i> <sub>AMP</sub>	<i>tcpC</i> -Fragment (bp 508-924)- <i>eYFP</i>	Auf dem Plasmid ist der Abschnitt von <i>TcpC</i> bp 508-924 an <i>eYFP</i> gekoppelt	pDK112	Ampicillin
CFT073 p( <i>tcpC</i> 127-924): <i>eYFP</i> <sub>AMP</sub>	<i>tcpC</i> -Fragment (bp 127-924)- <i>eYFP</i>	Auf dem Plasmid ist der Abschnitt von <i>TcpC</i> bp 127-924 an <i>eYFP</i> gekoppelt	pDK112	Ampicillin
CFT073 p( <i>tcpC</i> 127-507): <i>eYFP</i> <sub>AMP</sub>	<i>tcpC</i> -Fragment (bp 127-507)- <i>eYFP</i>	Auf dem Plasmid ist der Abschnitt von <i>TcpC</i> bp 127-507 an <i>eYFP</i> gekoppelt	pDK112	Ampicillin
CFT073 p <sub>c</sub> ( <i>tcpC</i> 1-924): <i>eYFP</i> <sub>AMP</sub>	<i>tcpC</i> (bp 1-924)- <i>eYFP</i>	Auf dem Plasmid ist Volllänge <i>TcpC</i> an <i>eYFP</i> gekoppelt. Das Plasmid ist non-leaky (close „c“).	pASK-IBA3+ (IBA GmbH Göttingen)	Ampicillin
CFT073 p <sub>AMP</sub>	Kein Konstrukt	Leeres Plasmid mit Ampicillinresistenz	pTrc99A (Amann et al., 1988)	Ampicillin
CFT073 WT	-	Wildtyp CFT073	-	-

## 2.2 Methoden

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

Einzelkolonien von *E. coli* wurden durch Ausstreichen der Bakterien auf LB-Agarplatten und Inkubation über Nacht bei 34 °C erhalten. Die Selektion auf spezifische Plasmide erfolgte durch Zusatz der entsprechenden Antibiotika zum Nährmedium. Die Platten mit den Bakterienkolonien wurden mit Parafilm verschlossen bei 4 °C aufbewahrt und maximal 4 Wochen zum Animpfen von Kulturen verwendet. Sofern einmal ein Kryostock aus einer Kolonie hergestellt wurde, wurde dieser für alle zukünftigen Experimente benutzt und die Platte wurde verworfen. Flüssigkulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit M9 Minimalmedium (s. Tab. 3) unter Zusatz geeigneter Antibiotika angesetzt. Verwendete Volumina waren 3-5 ml in 14 ml Plastik- oder Glasröhrchen. Die Inkubation der Kulturen erfolgte bei 37 °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  $OD_{600}$  DiluPhotometers (IMPLEN) bestimmt. Bei optischen Dichten größer als 1 wurden geeignete Verdünnungen der Bakteriensuspension im Medium hergestellt und deren  $OD_{600}$  anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Der Nullabgleich erfolgte mit dem jeweils verwendeten Medium.

Zur dauerhaften Konservierung von *E. coli* - Stämmen wurde 0,75 ml einer stationären Übernachtskultur pelletiert und in LB/10 % Glycerin (v/v) aufgenommen. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Kryostocks bei -80 °C aufbewahrt.

### 2.2.2 Transformation von Plasmiden in CFT073 durch Elektroporation

Elektrokompetente CFT073 Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und die Elektroporationsküvette auf Eis vorgekühlt. 100 µl der Bakterien und 0,1 - 0,3 µl einer Plasmid-Miniprep wurden gemischt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend in die saubere, vorgekühlte Küvette überführt. Unmittelbar vor der Elektroporation wurde die Küvette gut abgetrocknet und in den Schlitten gestellt, bevor die Bakteriensuspension für 5 ms einem Stromstoß von 1700 V (Multiporator, Eppendorf) ausgesetzt wurde. Direkt nach der Elektroporation wurden 100 µl LB Medium hinzugegeben und die ca. 200 µl aus der Küvette aufgenommen. 2-3 Tropfen davon wurden auf einer mit Antibiotikum versehenen LB Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 34 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie der Agarplatte gepickt, welche in LB Medium im Schüttler über Nacht herangezogen wurde. Diese ÜNK wurde anschließend als Kryostock konserviert.

### 2.2.3 Etablieren eines Minimalmediums für CFT073

Es wurde eine 5 ml Kultur des Stammes CFT073<sub>pAMP</sub> in LB Medium mit Ampicillin ( $c=100 \mu\text{g/ml}$ ) über Nacht im Inkubator angezogen. Am nächsten Morgen wurde die ÜNK dreimal mit PBS gewaschen und im selben Volumen H<sub>2</sub>O wieder aufgenommen. Es wurden jeweils 5 ml der verschiedenen in Tabelle 3 aufgelisteten und nummerierten Minimalmedien hergestellt. Die einzelnen Komponenten müssen hierbei immer direkt vor dem Animpfen des jeweiligen Mediums aus sterilfiltrierten Stocklösungen zusammengeführt werden.

Je 2 ml der jeweiligen Medien wurden als Tageskultur mit 40  $\mu\text{l}$  der gewaschenen ÜNK in ein Plastikröhrchen angeimpft und für 4 h bei 37 °C und 200 RPM im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden 100  $\mu\text{l}$  der Kultur entnommen und mit 900  $\mu\text{l}$  des gleichen Mediums vermischt, um die optische Dichte bei 600 nm im linearen Messbereich des Photometers zu bestimmen. Der Nullabgleich des Photometers erfolgte gegen das entsprechende unbeimpfte Medium.

Die Tageskulturen wurden zurück in den Schüttelinkubator gestellt, um am nächsten Morgen erneut die OD<sub>600</sub> zu bestimmen.

Die Durchführung erfolgte in Triplikaten.

Tabelle 3: Darstellung der Zusammensetzung der getesteten M9 Minimalmediumbedingungen

Komponente	Konzentration	Stocklösung	M9	M9 Glucose	M9 <sub>Glucose- Thiamin</sub>	M9 <sub>Glucose-NS</sub>	M9 <sub>Glucose-Thiamin-NS</sub>	M9 <sub>Trypton</sub>	M9 <sub>Trypton- Thiamin-NS</sub>	M9 <sub>Trypton- Glucose-Thiamin-NS</sub>
<b>M9 Salz (5x)</b>	1x	5x	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	1 mM	100 mM	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	0,1 mM	10 mM	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>Ampicillin</b>	100 µg/ml	100 mg/ml	x	x	x	x	x	x	x	x
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>			x	x	x	X	x	x	x	x
<b>Glucose</b>	0,4 %	20 %		x	x	x	x			x
<b>Thiamin</b>	10 µg/ml	1 mg/ml			x		x		x	x
<b>Nicotinsäure (NS)</b>	0,0025 %	0,25 %				x	x		x	x
<b>Tryptone</b>	0,2 %	4 %						x	x	x



## 2.2.4 Fluoreszenzmikroskopie der TcpC-eYFP Konstrukte

In einem ersten Versuch erfolgte die Bestimmung der Lokalisation von TcpC Deletionskonstrukten mittels verschiedener Reporterstämme. Dazu wurden die Stämme CFT073 p(*tcpC 1-150*):eYFP<sub>AMP</sub>, CFT073 p(*tcpC 1-924*):eYFP<sub>AMP</sub>, CFT073 p(*tcpC 1-507*):eYFP<sub>AMP</sub>, CFT073 p(*tcpC 508-924*):eYFP<sub>AMP</sub>, CFT073 p(*tcpC 127-924*):eYFP<sub>AMP</sub>, CFT073 p(*tcpC 127-507*):eYFP<sub>AMP</sub>, CFT073 p<sub>c</sub>(*tcpC 1-924*):eYFP<sub>AMP</sub>, sowie der Kontrollstamm CFT073 p<sub>AMP</sub> (vgl. Tab. 2) in M9<sup>Glucose-Thiamin-NS</sup> Medium mit Ampicillin über Nacht bei 37 °C und 200 RPM im Schüttelinkubator herangezüchtet. Am nächsten Tag wurden 30 µl der ÜNK in je 3 ml frisches Medium, welches zusätzlich 20 µM Isopropyl-13-D-thiogalactopyranosid (IPTG) bzw. für Stamm CFT073 p<sub>c</sub>(*tcpC 1-924*):eYFP<sub>AMP</sub> 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin (AhTet) als Induktor enthielt, überimpft und 4 h im Schüttelinkubator wachsen gelassen. Anschließend wurden von jeder Probe je 250-750 µl Bakterien entnommen und mit 1 % PFA/PBS für 30 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die entstandenen Bakterienpellets in 200 µl PBS aufgenommen. Zum Immobilisieren der Bakterien wurden jeweils 10 µl eines Stammes auf ein Agarosepad (1 % Agarose in PBS), welches auf einen Objektträger platziert wurde, aufgetragen und kurz trocknen gelassen. Anschließend wurde das Agarosepad mit einem mit Fettfüßchen versehenen Deckgläschen abgedeckt und mikroskopiert. Die Tageskulturen wurden über Nacht im Schüttelinkubator weiter inkubiert und am nächsten Tag nach oben beschriebem Schema für die Mikroskopie vorbereitet. Die Fluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einem Leica Leitz DMR Mikroskop mit einer Orca flash 4.0 LT Kamera von Hamamatsu. Von zwei verschiedenen Ausschnitten einer Probe wurde jeweils ein Durchlichtbild sowie ein Fluoreszenzbild mit 100 ms bzw. 500 ms Belichtungszeit aufgenommen. Angeregt wurde die Fluoreszenz des eYFP durch Licht der Wellenlänge von 524 nm.

Ein weiterer Versuch diente der Analyse der kinetischen Expressionsstärke von TcpC-Volllänge. Dazu wurde der Stamm CFT073 p<sub>c</sub>(*tcpC 1-924*):eYFP<sub>AMP</sub> über Nacht in LB Medium und Ampicillin bei 200 RPM und 37 °C angezüchtet. Am nächsten Tag erfolgte das Animpfen einer frischen 5 ml Tageskultur. Diese wurde bis zum Erreichen der OD<sub>600</sub> im Schüttler inkubiert. Bevor die Induktion mit 0,2 µg/ml AhTet erfolgte, wurden 250 µl entnommen. Diese dienten als Kontrolle zum Zeitpunkt t = 0 min. Anschließend wurden nach 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 50 min, 60 min, 90 min, 120 min, 240 min und nach Inkubation über Nacht je 250 µl der Tageskultur entnommen und wie oben beschrieben für die Mikroskopie vorbereitet.

Die Durchführung dieser Experimente erfolgte zweimal. Die generierten Bilder wurden mit dem Programm Image J Version 1.5 (Schneider et al., 2012) bearbeitet und analysiert.

## 2.2.5 FACScan

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode mit der verschiedene optische Eigenschaften von Zellen gleichzeitig quantifiziert werden können. Zum einen kann ihre relative Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC), zum anderen ihre Granularität bestimmt werden (Seitwärtsstreulicht, SSC). Die Granularität der Zellen gibt dabei Aufschluss über deren interne Komplexität. Weiterhin können spezifische Fluoreszenzen und

deren Intensitäten gemessen werden. Die zu messenden Zellen werden dabei in die Trägerflüssigkeit FACS Flow aufgenommen. Der entstehende Probenstrom wird von einem Hüllstrom aus isotonischer Lösung (FACS Flow) umflossen und dadurch stabilisiert. Der Abstand der einzelnen Zellen wird daraufhin perlschnurartig vergrößert, sodass die Zellen den Laserstrahl einzeln passieren.

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten am FACScan von BD Biosciences. Zur FACS-Steuerung, Datenerhebung und Speicherung diente CellQuest Pro (Becton Dickinson, Sunnyvale, CA, USA). Nach reichlichem Spülen des Systems mit Flow wurden bei einer Flussrate von ca. 1000 Ereignissen/sec 100.000 Ereignisse aufgenommen.

Die bakteriellen Proben (250-500 µl) wurden hierzu mit 1 % PFA/PBS für mindestens 15 min fixiert und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie in starker Verdünnung mit PBS in die FACS-Küvetten gegeben.

Mittels der Software FlowJo wurden die Daten evaluiert und die mittlere Fluoreszenzintensität bestimmt.

Die Messwerte wurden mit den Computerprogrammen Microsoft Excel und Graph Pad Prism ausgewertet.

## 2.2.6 Auswirkung unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die TcpC Induktion

### pH-Wert

Zuerst wurde die 5x M9-Salzlösung als Pufferkomponente des M9 Minimalmediums mittels NaOH bzw. HCl auf die pH-Werte 5, 6, 7 und 8 titriert. Die transkriptionellen Reporterstämme CFT073 pPc2397;*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073 pPc2398;*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073 p(Pc2397-Pc2398);*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073  $\Delta$ *tcpC::gfpmut2* und der nicht fluoreszente Stamm CFT073 p<sub>DAMP</sub> wurden in dem M9<sub>Glucose-Thiamin-NS</sub> Medium und M9<sub>Trypton</sub> Medium (vgl. Tab. 2 und Tab.3) mit den pH-Werten 5, 6, 7, und 8 aufgenommen. Die so entstandenen 3 ml Kulturen wurden mit den entsprechenden Antibiotika 1:1000 versetzt (25 µg/ml Kanamycin bzw. 100 µg/ml Ampicillin).

Die Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 200 RPM und 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt und der pH-Wert erneut ermittelt. Die Bakterien wurden dann mit 1 % PFA-Lösung fixiert und nach einmaligem Waschen mit PBS in geeigneter Verdünnung in PBS aufgenommen, um mit dem FACScan die mittlere Fluoreszenzstärke zu messen. Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt.

### Kalium

Es wurden Kulturen der Stämme CFT073 pPc2397;*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073 pPc2398;*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073 p(Pc2397-Pc2398);*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073  $\Delta$ *tcpC::gfpmut2* in M9<sub>Glucose-Thiamin-NS</sub> Medium mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht im Schüttelinkubator angezchtet. Die Übernachtskulturen wurden am folgenden Tag drei Mal mit kaliumfreiem M9<sub>Glucose-Thiamin-NS</sub> Medium (s. 2.1.8) gewaschen. Es wurden je 500 µl pelletiert. Jedes Pellet wurde in 1,5 ml frisches kaliumfreies Medium aufgenommen. Die Tageskulturen wurden 2 h bei 37 °C und 200 RPM inkubiert, damit sich die Bakterien an das neue kaliumfreie Medium adaptieren können. Nun wurde für den Stamm CFT073 pPc2398;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> eine Kaliumverdünnungsreihe hergestellt. D.h. zu den 1,5 ml Tageskulturen wurden unterschiedliche Mischungen aus KCl (Stock 20 mM) und ddH<sub>2</sub>O hinzugefügt, sodass

jede Kultur nach Addition 3 ml Volumen enthält (s. Tab. 4). Für die anderen Reporterstämme wurden nur 0 mM und 10 mM KCl Tageskulturen erstellt.

Tabelle 4: Verdünnungsreihe KCL bzw. NH<sub>4</sub>Cl

Endkonzentration KCl bzw. NH <sub>4</sub> Cl	0 mM	0,01 mM	0,1 mM	1 mM	10 mM
KCl bzw. NH <sub>4</sub> Cl (20 mM)	-	1,5 µl	15 µl	150 µl	1500 µl
ddH <sub>2</sub> O	1500 µl	1498,5 µl	1485 µl	1350 µl	-

Die entstandenen Kulturen wurden erneut in den Schüttelinkubator gestellt. Nach 3 h und nach 24 h wurden Proben daraus gewonnen und für die FACScan-Analyse (vgl. 2.2.5) vorbereitet. Die OD<sub>600</sub> wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt.

### Stickstoff

Es wurden Kulturen der Stämme CFT073 p*Pc2397*;*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073 p*Pc2398*;*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073 p(*Pc2397-Pc2398*);*gfpmut2*<sub>KAN</sub> und CFT073  $\Delta$ *tcpC*::*gfpmut2* in M9<sup>Glucose-Thiamin-NS</sup> Medium angeimpft und über Nacht im Schüttelinkubator angezüchtet. Diese wurden am folgenden Tag drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend in 500 µl große Bakterienpellets aufgeteilt, welche von 1,5 ml neuem Medium aufgenommen wurden. Die Tageskulturen enthalten 5x M9-Salz, ohne NH<sub>4</sub>Cl und sind auf pH-Wert 7 titriert. Die Tageskulturen wurden 2 h bei 37 °C und 200 RPM inkubiert, damit sich die Bakterien an das neue stickstofffreie Medium adaptieren können. Anschließend wurden 1,5 ml Volumina zu jeder Kultur hinzugefügt, sodass sich Stickstoffkonzentrationen zwischen 0 mM und 10 mM ergeben. Die zu jeder Kultur hinzugefügten 1500 µl setzen sich aus Mischungen von ddH<sub>2</sub>O und NH<sub>4</sub>Cl zusammen (vgl. Tab. 4).

Diese Kulturen wurden daraufhin weiter inkubiert. Nach 3 h und nach 24 h wurden Proben daraus gewonnen und wie in 2.2.5 beschrieben FACS Proben generiert. Die OD<sub>600</sub> wurde zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Der Versuch wurde drei Mal durchgeführt.

### Urin

Frisch gewonnener Mittelstrahlurin wurde mit 0,2 µm Filtern sterilfiltriert und anschließend jeweils 3 ml mit den Stämmen CFT073 p*Pc2397*;*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073 p*Pc2398*;*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073 p(*Pc2397-Pc2398*);*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073  $\Delta$ *tcpC*::*gfpmut2* und CFT073 p<sub>AAMP</sub> infiziert. Der pH-Wert wurde beim Animpfen und nach Schüttelinkubation über Nacht bestimmt. Am nächsten Tag wurden wie in 2.2.5 beschrieben Proben fürs FACS generiert.

### Glucose

Die Bakterienstämme CFT073 p*Pc2397*;*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073 p*Pc2398*;*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073 p(*Pc2397-Pc2398*);*gfpmut2*<sub>KAN</sub> und CFT073  $\Delta$ *tcpC*::*gfpmut2* wurden in je 10 ml M9<sup>Glucose-Thiamin-NS</sup> Medium über Nacht im Schüttler bei 37 °C und 200 RPM inkubiert. Am nächsten Tag wurden die ÜNK dreimal mit PBS gewaschen. Die aus 1000 µl entstandenen Bakterienpellets wurden zu neuen Tageskulturen gegeben.

Diese bestehen aus je 2820 µl M9 Minimalmedium ohne Glucose. Anschließend wurden die Kulturen 2 h im Schüttelinkubator an das neue nährstofffreie Medium gewöhnt. Daraufhin wurden zu jeder Tageskultur 180 µl Volumen, bestehend aus einer 1 M Glucosestocklösung und unterschiedlich viel ddH<sub>2</sub>O zugegeben, sodass Glucose-Endkonzentrationen mit jeweils 0 mM, 3 mM, 6 mM, 10 mM, 30 mM und 60 mM vorlagen. Von diesen Kulturen wurden nach 3 h und nach Kultivierung über Nacht Proben für die Analyse mit dem FACScan generiert. Die optischen Dichten wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt.

### Eisen

Der Reporterstamm CFT073 p*Pc2398*;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> wurde in einer 5 ml Übernachtskultur in M9<sub>Glucose-Thiamin-NS</sub> angezüchtet. Die 3 ml Tageskulturen, welche 0 mM, 0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM oder 10 mM Eisensulfatheptahydrat enthielten, wurden mit 100 µl der ÜNK angeimpft und für 3 h im Schüttelinkubator bei 37 °C und 200 RPM angezogen. Danach wurden wie in 2.2.5 beschrieben Proben fürs FACS generiert.

In einem nächsten Versuch wurden die Stämme CFT073 p*Pc2397*;*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073 p*Pc2398*;*gfpmut2*<sub>KAN</sub>, CFT073 p(*Pc2397-Pc2398*);*gfpmut2*<sub>KAN</sub> und CFT073  $\Delta$ *tcpC*::*gfpmut2* in je 10 ml M9<sub>Glucose-Thiamin-NS</sub> Medium über Nacht bei 37 °C, 200 RPM herangezogen und dann dreimal mit PBS gewaschen. Die aus 400 µl entstandenen Bakterienpellets wurden in 1500 µl frischem Eisensulfatheptahydrat-freiem Medium aufgenommen und für 2 h im Schüttelinkubator an das neue Medium adaptiert. Anschließend wurden jeweils 1500 µl Volumen bestehend aus Eisensulfatheptahydrat/ddH<sub>2</sub>O addiert, woraus Tageskulturen mit Eisensulfatheptahydrat-Endkonzentrationen von 0 mM, 0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM oder 10 mM resultierten. Aus den so entstandenen Tageskulturen wurden nach 3 h und nach 24 h Proben für die Fluoreszenzmessung im FACScan generiert. Die optischen Dichten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

### 2.2.7 Quorum-sensing Versuch

Der CFT073 WT wurde in zwei Übernachtskulturen (M9<sub>Glucose-Thiamin-NS</sub> Medium und M9<sub>Trypton</sub> Medium) herangezogen. Anschließend wurden die Übernachtskulturen zentrifugiert, der Überstand mit 0,2 µm Filtern sterilfiltriert und dann in unterschiedlichen Verhältnissen mit frischem Medium gemischt, sodass der Anteil des Überstandmediums 100 %, 67 %, 50 %, 34 % und 0 % betrug. In diesen Medien wurden die Stämme CFT073 p*Pc2398*;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> und CFT073 p(*Pc2397-Pc2398*);*gfpmut2*<sub>KAN</sub> als Tageskultur im Schüttler angezüchtet. Nach 3 h wurden 300 µl der Bakterien mit 1 % PFA/PBS fixiert, einmalig mit PBS gewaschen und in 200 µl PBS aufgenommen. Danach wurde die Fluoreszenzstärke mittels FACS bestimmt.

### 2.2.8 Kultivierung der Suspensionszelllinie THP-1

Alle Zellkulturarbeiten wurden an Sterilbänken durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Falls nicht anders beschrieben, wurden die Zellen im Wasserbad aufgetaut und sofort

mit vorgewärmtem RPMI-1640 versetzt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit RPMI gewaschen und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche mit RPMI/10 % FCS ohne Antibiotikum gegeben.

Wechsel des Mediums oder Waschschriffe erfolgten durch Überführung der Zellsuspension in ein geeignetes Falcon-Röhrchen und Sedimentation der Zellen für 10 min bei 80 x g und anschließende Resuspension in neuem Medium. Nach 3-4 Wochen wurde die Zellkultur verworfen.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte durch die Benutzung der Neubauer Zählkammer. Hierzu wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Tryptan Blue gemischt und 10 µl davon in eine Neubauer Zählkammer überführt. Die Formel zum Berechnen der Zellzahl pro ml ist:

$$\frac{\text{Zählzahl} \times 10.000 (\text{Neubauer} - \text{Faktor}) \times 2 (\text{Verdünnungsfaktor})}{4 (\text{Anzahl der Felder})}$$

### 2.2.9 THP-1 -*E. coli* Interaktionsversuch

In 24-Well Platten wurden 0, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> und 2 x 10<sup>6</sup> THP-1 Monozyten in 1 ml RPMI Medium mit 10 % FCS ausgesät. Um eine Differenzierung zu M0-Makrophagen herbeizuführen, wurden die Monozyten 3 Tage lang mit 200 ng/ml PMA behandelt. Am dritten Tag wurden die Zellen, die im Rahmen der Differenzierung adhären werden, dreimal mit reinem RPMI gewaschen und weitere 24 h in 1 ml RPMI im Brutschrank inkubiert.

Gleichzeitig wurde eine ÜNK des Reporterstammes CFT073 pPc2398;gfpmut2<sub>KAN</sub> in RPMI mit Kanamycin angezogen. Am Folgetag wurden die Bakterien zweimal mit RPMI gewaschen und die optische Dichte auf OD<sub>600</sub> = 1 eingestellt. 400 µl dieser Bakteriensuspensionen wurden in eingesetzte Transwells, welche eine Co-Kultivierung vom Makrophagen und Bakterien unter räumlicher Trennung ermöglichen, gegeben. Dies entspricht einer ungefähren Anzahl von 3,2 x 10<sup>8</sup> Bakterien, wenn man für OD<sub>600</sub> = 1 eine Bakteriendichte von ca. 8 x 10<sup>8</sup> Bakterien/ml annimmt.

Die Transwellplatte wurde im Brutschrank für 4 h inkubiert. Danach wurden 200 µl der Bakterien entnommen und mit 1 % PFA/BPS für 30 min fixiert. Anschließend wurden die Proben einmalig mit 500 µl PBS gewaschen und in 200 µl PBS aufgenommen. 45 µl der so entstandenen Bakterienlösungen wurden zu jeweils 1 ml PBS in FACS Küvetten gegeben und die mittlere Fluoreszenzintensität mit dem FACScan bestimmt. Die Transwellplatte wurde nach der ersten Entnahme der Bakterien über Nacht im Brutschrank weiter inkubiert. Am nächsten Tag wurden erneut 200 µl der Bakterien für die Bestimmung der Fluoreszenzintensität im FACScan vorbereitet.

### 2.2.10 Pulldown Promotor-bindender Proteine mithilfe Streptavidin-gekoppelter Magnetic Beads

Um promotorenspezifisch bindende Proteine des Bakteriums CFT073 aufzuspüren, wurden mittels PCR zwei biotinylierte DNA-Stränge hergestellt. Zum einen das als Kontrolle dienende 240 bp lange Stück des LacZ-Promotors (PlacZ; Bp 451.990-452.229) und zum anderen das gleichlange DNA Stück, welches die Promotorregion des *tcpC*-Gens (Pc2398; Bp 2.202.536 – 2.202.775) des Stammes

CFT073 *pPc2398;gfpmut2<sub>KAN</sub>* beinhaltet. Anschließend wurde eine 100 ml Kultur (M9<sub>Glucose</sub>-Thiamin-NS, pH7) des Stammes CFT073 WT lysiert (s. unten) und das Zelllysate mit der an die magnetischen Beads gekoppelten DNA inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 1 h wurden die Beads gewaschen und die Proben auf Eis an die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Findeisen und Dipl. Ing. Costina zur weiteren massenspektrometrischen Untersuchung weitergegeben.

Die Arbeit der Gruppe Jutras et al. diente als Vorlage zur Erstellung des folgenden Protokolls (Jutras et al., 2012).

### Herstellung der biotinylierten DNA-Fragmente

Zur Herstellung eines fehlerfreien biotinylierten DNA-Templates wurde zu Beginn des Versuchs eine PCR mit der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (NEB) in einem 50 µl Ansatz wie folgt durchgeführt:

10 µl	5x HF-Buffer
8 µl	1,25 mM dNTPs
0,25 µl	forward-Primer (5'-biotinyliert)
0,25 µl	reverse-Primer
0,1 µl	Template DNA ( <i>pPc2398</i> für die <i>tcpC</i> PCR oder 1 Klon einer CFT073 WT Kultur für die <i>lacZ</i> PCR)
0,3 µl	Phusion Polymerase
31,2 µl	ddH <sub>2</sub> O

Die Annealing-Temperatur für das Fragment mit dem *tcpC*-Promotor (*Pc2398*) betrug 55,4 °C und die für das mit dem *lacZ*-Promotor (*P<sub>lacZ</sub>*) 58,4 °C. Das PCR-Programm mit der Phusion Polymerase erfolgte nach folgendem Schema:

1.	98 °C	1 min	
2.	98 °C	10 s	Denaturierung
3.	55,4 °C bzw. 58,4 °C	20 s	Primer Anlagerung
4.	72 °C	10 s	Elongation
5.	72 °C	5 min	
6.	16 °C	Pause	

Die Schritte 2-4 wurden 25-35 mal wiederholt.

Das PCR-Produkt wurde nach Mischen mit 6x Gelladepuffer auf ein 1 % Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen. Ein 100 bp Marker (Thermo Scientific) wurde als Größenstandard aufgetragen. Das Gel wurde nach der Gelelektrophorese mit der Geldoc dargestellt und die Banden spezifischer Größe ausgeschnitten. Anschließend wurde eine DNA Extraktion aus dem Agarosegel mit dem Kit von Machery-Nagel nach Herstellerangabe durchgeführt. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde mit dem Nanodrop bestimmt und diente im Folgenden als Template für Amplifikationen in großem Maßstab mit der Taq Polymerase nach folgendem Ansatz:

50 µl	Dream Taq Green Mix (Thermo Scientific)
50 µl	ddH <sub>2</sub> O (nukleasefrei)
0,5 µl	forward-Primer (5'-biotinyliert) (c = 100 µM)
0,5 µl	reverse Primer (c = 100 µM)

0,5 µl      Template DNA (DNA-Fragmente aus PCR mit Phusion-Polymerase)

Für einen Versuchsdurchlauf wurden von jedem DNA-Fragment 24 PCR Ansätze mit je 100 µl benötigt. Als Annealing Temperaturen für die Promotorfragmente wurde 41,8 °C (*Pc2398*) und 48,2 °C (*PlacZ*) verwendet.

1. 95 °C	30 s	
2. 95 °C	30 s	Denaturierung
3. 41,8 °C oder 48,2 °C	30 s	Primer Anlagerung
4. 72 °C	20 s	Elongation
5. 72 °C	5 min	
6. 16 °C	Pause	

Die Schritte 2-4 wurden 25 mal wiederholt.

Zumeist wurden 24 x 100 µl TAQ PCR Ansätze durchgeführt. Die entstandene DNA wurde auf fünf 1,5 ml Eppendorfgefäße mit den Volumina 4 x 500 µl und 1 x 400 µl aufgeteilt.

### Ethanol-fällung

Anschließend erfolgte die Ethanol-fällung der DNA zur Reinigung der PCR Produkte. Hierzu wurden zunächst je 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat Lösung zu den einzelnen Eppendorfgefäßen (s. oben) zugegeben und danach 1 Volumen eisgekühltes Isopropanol hinzugefügt. Die Proben wurden gevortext und mindestens 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurden die Proben bei 0 °C, 12.000 g für 20 min in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert. Die DNA-Pellets wurden mit 70 %-igem Ethanol bedeckt und die Proben bei 4 °C, 12.000 g für 5 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde dekantiert und das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, bevor es in ¼ des Ursprungsvolumens (hier 125 µl bzw. 100 µl) mittels ddH<sub>2</sub>O aufgenommen wurde. Die Proben wurden anschließend zu je 300 µl Promotor-DNA zusammengeführt.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem Nanodrop und betrug je Probe ca. 180 ng/µl – 200 ng/µl.

Zur Kontrolle der PCR und Ethanol-fällung wurden 2 µl der DNA Proben mit 0,4 µl eines 6x Ladepuffers auf ein 1 %-iges Ethidiumbromidgel aufgetragen und die Größe des DNA Produktes mit der Geldoc (Intas) angeschaut.

### Herstellen eines Bakterienlysats

Eine 100 ml CFT073 WT Kultur in M9<sup>Glucose-Thiamin-NS</sup> mit pH 7 wurde in einem 500 ml Erlenmeyerkolben über Nacht im Schüttler bei 37 °C und 200 RPM inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Bakterienkultur zentrifugiert, pelletiert und bei -80 °C für maximal 6 Monate eingefroren.

Am Tag der Durchführung des Pulldowns wurde das Pellet auf Eis aufgetaut und in 5 ml BS/THES Puffer resuspendiert. (BS/THES Puffer Prämix: 13,3 ml THES + 6 ml 5xBS + 10,7 ml H<sub>2</sub>O + 3 Tabletten Complete mini Protease Inhibitor + 60 µg/ml Lysozym). Die Bakterienlösung wurde in flüssigem Stickstoff für 30 s eingefroren und anschließend im Wasserbad wieder vollständig aufgetaut. Dieser Vorgang wurde 5 mal wiederholt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf Eis sonifiziert.

Hierzu wurden auf Stufe 5 für jeweils 20 s mit einer Amplitude von 10-40 % die bakteriellen Zellmembranen aufgebrochen und die Probe im Anschluss für mindestens 1 min auf Eis gekühlt. Dieser Vorgang wurde 5 mal wiederholt. Die Proben wurden bei 4 °C, 8000 g für 10 min zentrifugiert und der Protein enthaltende Überstand mit einem 0,45 µm Filter sterilfiltriert. Das bakterielle Zelllysate wurde durchgehend auf Eis gelagert.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford Assay nach Herstellerangabe. Diese sollte für den Pulldownversuch mindestens 250 µg/ml betragen und lag in der Regel bei ca. 10 mg/ml.

### Vorbereiten der Streptavidin Magnetic Beads

Die Magnetic Beads (MB) wurden zwecks Homogenisierung gevortext und im Anschluss für die Proben *PlacZ* und *Pc2398* je 200 µl in 1,5 ml Tubes überführt.

Die Tubes wurden an den Magneten gesteckt und die Konservierungslösung verworfen. Nach Herausnahme aus dem Magneten wurden die MB mit 1000 µl 3x B/W Puffer gewaschen. Beim Resuspendieren wurde darauf geachtet, keine Luftblasen zu erzeugen. Das Abnehmen des Puffers erfolgte am Magneten. Dieser Waschschritt wurde dreimal wiederholt.

### Immobilisieren der DNA an die Magnetic Beads

Nach Entfernen des 2x B/W Puffers wurden die Proben in 290 µl 2x B/W Puffer aufgenommen. Zu jeder Probe wurden die entsprechenden 300 µl biotinylierte Promotoren DNA (*PlacZ* bzw. *Pc2398*) hinzugegeben. Durch die Zugabe wird die Konzentration 2x B/W Puffer auf 1x reduziert, sodass eine NaCl Konzentration vorliegt, bei der die Biotin-Streptavidin Bindung optimal erfolgen kann. Die Proben wurden 30 min bei Raumtemperatur auf einer vertikal rotierenden Plattform inkubiert. Danach wurden die MB zweimal mit 1000 µl TE gewaschen, um die NaCl Konzentration zu reduzieren und ungebundene DNA zu entfernen.

### DNA- Proteinbindung

Die Proben wurden einmal mit 500 µl BS/THES + 10 µg/ml Lachssperma-DNA gewaschen. Diese dient zum Blocken von unspezifischen Bindungsstellen der MB. Anschließend wurden die Beads in ein 15 ml Falcon überführt. 1200 µl Bakterienlysate mit einer durchschnittlichen Konzentration von 10 mg/ml und 4800 µl BS/THES Puffer wurden zu jeder Probe hinzugefügt. Das DNA/Proteingemisch durfte 1 h bei Raumtemperatur auf einer vertikal rotierenden Plattform inkubieren. Die MB wurden bei 4000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die MB am Magneten zweimal mit 500 µl BS/THES Puffer gewaschen. Die Proben wurden entweder direkt auf Eis zur massenspektrometrischen Untersuchung weitergeleitet oder bis zur weiteren Verwertung auf -20 °C aufbewahrt.

### Massenspektrometrie

Mit dem Pulldown beider Proben wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine mittels Trypsin auf dem Gel verdaut, extrahiert und mittels LC-MS/MS (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung) analysiert. Die Analyse der Proteine erfolgte mit dem Abgleich der allgemeinen *E. coli* Uniprot Datenbank und der speziellen *E. coli*\_CFT073 Uniprot Datenbank.



Die massenspektrometrische Untersuchung der Proben erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med Findeisen und Dipl. Ing. Costina (Institut für Klinische Chemie).

#### 2.2.11 Statistische Auswertung

Statistische Analysen und Graphiken wurden mit der Software Graph Pad Prism durchgeführt. Je nach Anzahl der Variablen wurden die Mittelwerte der Proben mit einer ein-faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) in Kombination mit einem post-hoc Verfahren nach Tukey durchgeführt. Es wurden T-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Nullhypothese wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  abgelehnt.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Auswirkung unterschiedlicher Wachstumsbedingungen auf die TcpC Expression

UPECs können im Urogenitaltrakt mit unterschiedlichsten Umgebungsbedingungen konfrontiert werden. Sie nehmen die Veränderung der extrazellulären Umgebung über spezielle Erkennungssysteme wie TCSs und  $\sigma$ -Faktoren wahr (vgl. Abschnitt 1.7). Entsprechend des jeweiligen Stimulus wird die Genexpression des Pathogens durch Beteiligung der aktivierten TCSs oder Sigmafaktoren verändert. Bisher gibt es nur wenige bekannte Stimuli des Virulenzfaktors TcpC. Cirl et al. beschrieben bislang nur, dass das Expressionsniveau von TcpC durch Ansäuerung des RPMI Mediums auf pH-Wert 5 und Ko-Kultur mit RAW264.7 Makrophagen erhöht wird (Cirl et al., 2008).

##### 3.1.1 Etablieren eines M9 Minimalmedium

Um eventuell weitere für den Harnwegtrakt spezifische Stimuli zu erkennen, wurde zu Beginn der Arbeit nach einem Minimalmedium gesucht, welches möglichst wenige Komponenten enthält, das Wachstum von *E. coli* jedoch nicht verhindert. Ein 5x M9 Salz liegt dem M9 Minimalmedium als Puffer zugrunde und kann entsprechend den pH-Wert des gesamten Mediums einstellen. Außerdem steht den Bakterien nur eine Nährstoffquelle, Glucose oder Trypton, zur Verfügung. Trypton ist ein Peptid-Aminosäuren-Gemisch und wird durch den pankreatischen Verdau des Milchproteins Casein hergestellt. Aus einer LB-Übernachtskultur mit dem Stamm CFT073  $p_{AMP}$  (vgl. 2.1.9) wurden nach dreifachem Waschen frische Tageskulturen in den jeweiligen M9 Minimalmedien (vgl. 2.2.3) hergestellt, 1:50 angeimpft und zunächst 4 h und anschließend 24 h im Schüttelinkubator herangezüchtet. Nach beiden Zeitpunkten wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt:

Wie in Tabelle 5 ersichtlich, wachsen die Bakterien mit Trypton als einziger Nahrungsquelle in den Medien M9<sub>Trypton</sub> und M9<sub>Trypton-Thiamin-NS</sub> ähnlich gut. Da das Medium M9<sub>Trypton</sub> weniger Komponenten als das Vergleichsmedium beinhaltet, wurde dieses für folgende Experimente gewählt.

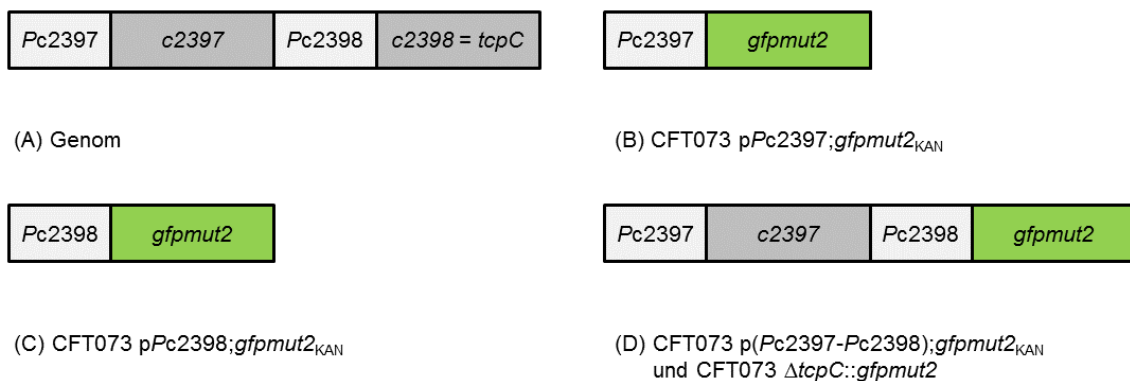
Als M9 Minimalmedium mit Nährstoff Glucose wurde das Medium M9<sub>Glucose-Thiamin-NS</sub> bestimmt. Die bakteriellen Kulturen im Medium M9<sub>Glucose</sub> sind in anderen Versuchen nicht zuverlässig angewachsen. Ob nun Thiamin oder Nicotinsäure (M9<sub>Glucose-Thiamin</sub> bzw. M9<sub>Glucose-NS</sub>) für effizienteres Wachstum verantwortlich sind, ist nicht ersichtlich, weshalb man sich für das Zusetzen beider Vitamine entschieden hat.

**Tabelle 5: OD<sub>600</sub> Werte der verschiedenen M9 Minimalmedium Bedingungen nach 4 h und 24 h. Angezeigte Werte sind Mittelwerte dreier unabhängiger Versuche. Die danach für folgende Versuche gewählte Bedingungen sind M9<sub>Glucose-Thiamin-NS</sub> und M9<sub>Trypton</sub>.**

OD <sub>600</sub>	M9 <sub>Glucose</sub>	M9 <sub>Glucose-Thiamin</sub>	M9 <sub>Glucose-NS</sub>	M9 <sub>Glucose-Thiamin-NS</sub>	M9 <sub>Trypton</sub>	M9 <sub>Trypton-Thiamin-NS</sub>	M9 <sub>Trypton-Glucose-Thiamin-NS</sub>
4 h	0,17	0,20	0,27	0,27	0,53	0,50	2,70
24 h	2,87	3,0	2,87	2,83	0,80	0,60	3,70

### 3.1.2 Identifikation des TcpC Promotors

Das *tcpC* Gen liegt auf einer *serU* Pathogenitätsinsel (*c2392-c2416*), assoziiert mit einem weiteren Strukturgen des Operons. Bakterielle Operone sind Funktionseinheiten der DNA, bestehend aus Promotor, Operator und mehreren Strukturgenen. Dieses weitere Strukturgen ist *c2397*, welches direkt vor *c2398*, dem *tcpC* Gen, liegt. Welcher nicht codierende DNA-Abschnitt als Promotor für *c2398* fungiert, ist bislang unerforscht. Folglich wurden 3 verschiedene Green Fluorescent Protein (GFP) Reporterstämme erstellt. Jeder dieser in Abb. 6 präsentierten Reporterstämme zeigt die Aktivität einer anderen putativen Promotorregion von *tcpC* an. Zusätzlich zu diesen TcpC-GFP Plasmidkonstrukten wurde der Knockout Stamm CFT073  $\Delta tcpC::gfpmut2$  erstellt, welcher auf chromosomaler Ebene anstelle von *tcpC* *gfpmut2* besitzt. Somit liegt im Vergleich zu den anderen Stämmen nur eine Kopie des TcpC-GFP Konstrukts auf chromosomaler Ebene vor.

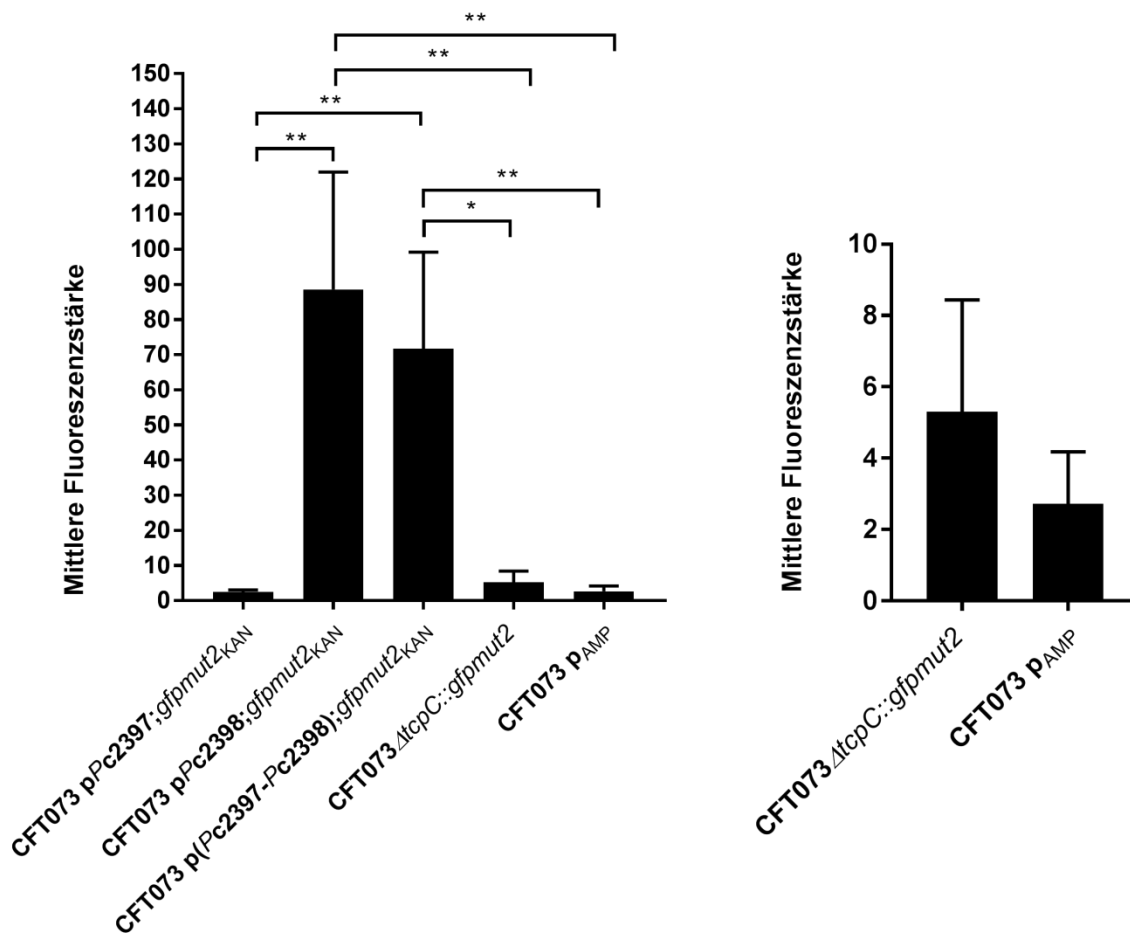


**Abbildung 6: Darstellung der verschiedenen TcpC-GFP Reporterkonstrukte.**

(A) Genomische Information (B) GFP-Reporterstamm CFT073 pPc2397;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> (C) GFP-Reporterstamm CFT073 pPc2398;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> (D) GFP-Reporterstamm CFT073 p(Pc2397-Pc2398);*gfpmut2*<sub>KAN</sub>. Die gleiche Information enthält der Knockout Stamm CFT073  $\Delta tcpC::gfpmut2$   
 P = Promotor.

Um zu analysieren welcher DNA Abschnitt die Regulation der Proteinbiosynthese von TcpC übernimmt, wurden die genannten 4 Stämme zusammen mit dem nicht fluoreszierenden Kontrollstamm CFT073 p<sub>AMP</sub> im für CFT073 natürlichsten Medium inkubiert. Dieses stellt sterilfiltrierter menschlicher Mittelstrahlurin mit dem pH-Wert von 5,5-6 dar. Die jeweiligen Stämme wurden darin über Nacht inkubiert und am nächsten Tag nach Fixieren der Bakterien mit 1 % PFA die mittlere Fluoreszenzstärke mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Wie in Abb. 7 ersichtlich, fluoreszieren die Stämme CFT073 pPc2398;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> und CFT073 p(Pc2397-Pc2398);*gfpmut2*<sub>KAN</sub> im Vergleich zu CFT073 pPc2397;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> signifikant stärker. Folglich kann der DNA-Abschnitt vor *c2397* unter diesen Bedingungen als Promotor ausgeschlossen werden. Es wird damit angenommen, dass der knapp 240 bp lange DNA Abschnitt direkt vor *c2398* den Promotor darstellt. Die genomische Knockoutmutante CFT073  $\Delta tcpC::gfpmut2$  leuchtet tendentiell stärker als der Kontrollstamm CFT073 p<sub>AMP</sub>. Beim Vergleich von CFT073 pPc2398;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> und CFT073 p(Pc2397-Pc2398);*gfpmut2*<sub>KAN</sub> mit der Kontrolle ist prinzipiell ersichtlich, dass TcpC in menschlichem Urin induziert wird. Das Wachstum der Bakterien im Urin

machte den pH-Wert im Mittel um 0,5 pH-Punkte basischer. Dieser lag zuvor bei pH-Wert 5,5 und nach ÜNK bei 6.



**Abbildung 7:** Mittlere Fluoreszenzstärke der GFP-Reporterstämmen sowie des Kontrollstammes CFT073 p<sub>AMP</sub> nach Übernachtkultur in humanem Urin. Die Bakterienstämme CFT073 pPc2398;gfpmut2<sub>KAN</sub> und CFT073 p(Pc2397-Pc2398);gfpmut2<sub>KAN</sub> haben ein deutlich stärkeres Signal als die anderen Konstrukte. In Vergrößerung sind die beiden Stämme CFT073  $\Delta$ tcpC::gfpmut2 und CFT073 p<sub>AMP</sub> dargestellt. Hier ist deutlicher zu erkennen, dass die Knockoutmutante tendenziell stärker leuchtet als der Kontrollstamm. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Die statistische Analyse erfolgte mittels ein-faktoriellem ANOVA und post-hoc Tukeytest (\* p < 0,05; \*\*p < 0,01).

### 3.1.3 Expression von TcpC hängt sowohl von der Nährstoffquelle als auch vom pH-Wert ab

Bakterien ernähren sich im Falle einer Zystitis hauptsächlich von den im Urin enthaltenen Aminosäuren (vgl. 1.7). Diese Nährstoffquelle soll in den Versuchen durch Trypton repräsentiert werden. Im Falle einer diabetischen Stoffwechsellaage oder einer Bakteriämie können Bakterien auch mit der Kohlenstoffquelle Glucose in Kontakt kommen. Der Urin ist täglichen pH-Wert Schwankungen, abhängig von der Stoffwechsellaage des Wirtes oder eventuellen Ko-Infektionen, unterworfen.

Die bereits im vorherigen Abschnitt präsentierten Reporterstämmen wurden in M9 Minimalmedium mit den pH-Werten 5, 6, 7, 8 und der Nährstoffquelle Glucose oder Trypton (M9<sub>Glucose</sub>-Thiamin-NS oder M9<sub>Trypton</sub>) in Übernachtkulturen herangezüchtet und

am nächsten Tag für die Messung der mittleren Fluoreszenzstärke im FACS bearbeitet. Die Werte der mittleren Fluoreszenzstärke wurden auf den jeweiligen Wert des Kontrollstamms CFT073  $p_{AMP}$  genormt und deshalb in Prozent angegeben. Zusätzlich wurden die pH-Werte und  $OD_{600}$  eines Bakterienstammes nach Übernachtskultur repräsentativ für alle bestimmt.

Im ersten Versuch wurden alle Stämme in  $M9_{Trypton}$  Medium herangezüchtet. In Abbildung 8(A) sieht man die Abhängigkeit der GFP-Fluoreszenz des Stammes CFT073  $pPc2397;gfpmut2_{KAN}$  vom pH-Wert. Unschwer erkennbar, gibt es hier keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen pH-Werten. Ähnlich verhält es sich mit den anderen Reporterstämmen (Abb. 8(B-D)). Die Stämme CFT073  $pPc2398;gfpmut2_{KAN}$  und CFT073  $p(Pc2397-Pc2398);gfpmut2_{KAN}$  weisen absolut gesehen deutlich höhere mittlere Fluoreszenzstärken auf, womit die im vorherigen Abschnitt aufgestellte These, dass die jeweiligen Plasmidkonstrukte die genregulatorische DNA Sequenz von *c2398* enthält, unterstützt wird. Der pH-Wert hat bei Vorliegen der Nahrungsquelle „Aminosäuren“ keinen Einfluss auf die *TcpC*-Expression. Diese ist für jeden Stamm bei allen pH-Werten gleichbleibend.

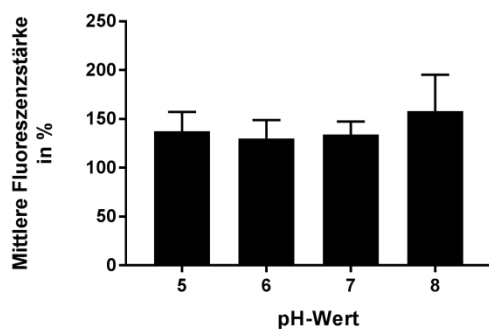
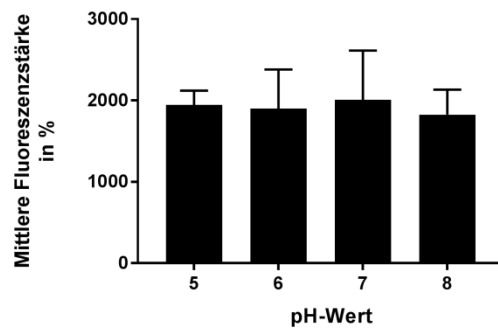
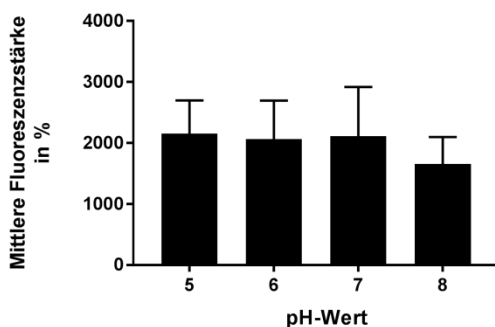
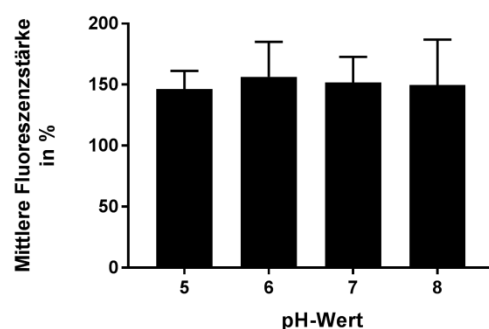
(A) CFT073  $pPc2397;gfpmut2_{KAN}$ (B) CFT073  $pPc2398;gfpmut2_{KAN}$ (C) CFT073  $p(Pc2397-Pc2398);gfpmut2_{KAN}$ (D) CFT073  $\Delta tcpC::gfpmut2$ 

Abbildung 8: pH-Wert Abhängigkeit der GFP-Reporterstämmen bei Nährstoffquelle Trypton.

Alle Diagramme zeigen die mittlere Fluoreszenzstärke der GFP-Reporterstämmen, welche auf den Wert der jeweiligen Kontrolle genormt ist, in Abhängigkeit des pH-Wertes bei zugrunde liegender Trypton-Nahrungsquelle an. (A) Der *E. coli* Stamm CFT073  $pPc2397;gfpmut2_{KAN}$  induziert *gfpmut2* bei allen pH-Werten ähnlich stark. (B) Der *E. coli* Stamm CFT073  $pPc2398;gfpmut2_{KAN}$  induziert *gfpmut2* bei allen pH-Werten ähnlich stark. Auffallend sind, im Vergleich zu (A) oder (D) die absolut gesehen deutlich höheren mittleren Fluoreszenzstärken. (C) Der Stamm CFT073  $p(Pc2397-Pc2398);gfpmut2_{KAN}$  zeigt ebenfalls keine Abhängigkeit der GFP-Fluoreszenz vom pH-Wert an. (D) Auch die genomische Knockoutvariante CFT073  $\Delta tcpC::gfpmut2$  weist keine Beziehung zwischen Induktion von *gfpmut2* und pH-Wert auf. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Statistische Analyse erfolgte mit OneWay ANOVA.

Im nächsten Versuch wurde die Nährstoffquelle durch Glucose ersetzt (M9<sub>Glucose</sub>-Thiamin-NS). Hier zeigten sich, wie in Abb. 9 ersichtlich, signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen pH-Wert Bedingungen. Eindrücklich sichtbar ist, dass bei allen Stämmen ein signifikanter Unterschied zwischen den Fluoreszenzleveln bei pH-Wert 5 und pH-Wert 7 vorliegt. Neutrale oder basische pH-Werte induzieren folglich die Proteinbiosynthese von TpcC unter glucosehaltigen Bedingungen deutlich stärker als azide pH-Werte.

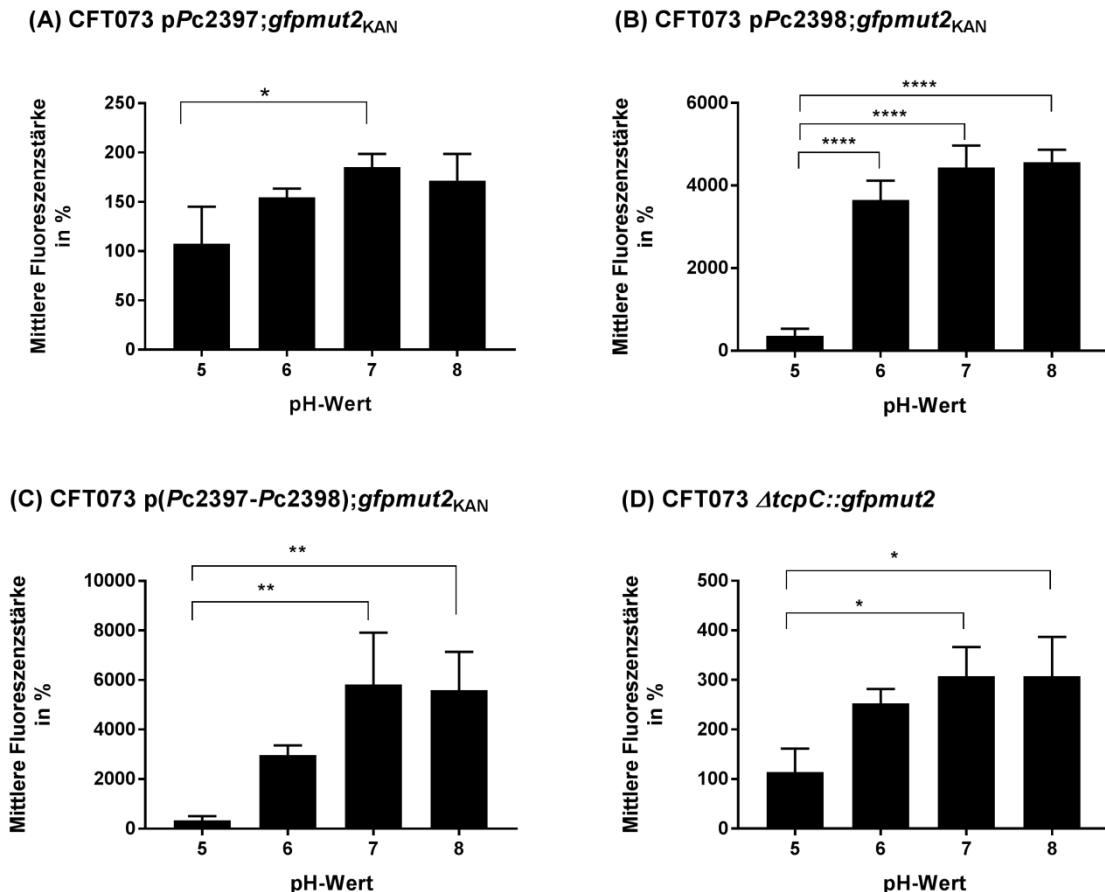


Abbildung 9: pH-Wert Abhängigkeit der GFP-Reporterstämme bei Nährstoffquelle Glucose.

Alle Diagramme zeigen die mittlere Fluoreszenzstärke der GFP-Reporterstämme, welche auf den Wert der jeweiligen Kontrolle genormt ist, in Abhängigkeit des pH-Wertes bei zugrunde liegender Glucose-Nahrungsquelle an. (A) Der *E. coli* Stamm CFT073 pPc2397:gfpmut2<sub>KAN</sub> induziert *gfpmut2* bei pH-Wert 7 stärker als bei pH 5. (B) Der *E. coli* Stamm CFT073 pPc2398:gfpmut2<sub>KAN</sub> induziert *gfpmut2* bei pH-Werten 6,7,8 signifikant stärker als bei pH 5. (C) CFT073 p(Pc2397-Pc2398):gfpmut2<sub>KAN</sub> zeigt ebenfalls, dass pH 7 und pH 8 einen stärkeren positiven Einfluss auf die Expression von *gfpmut2* haben, als bei azidem pH-Wert. (D) Selbst die genomische Knockoutvariante CFT073 ΔtcpC::gfpmut2 zeigt, dass GFP bei pH 7 und pH 8 stärker induziert wird, als bei saurem pH-Wert. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Statistische Analyse erfolgte mittels ein-faktoriellem ANOVA und post-hoc Tukeytest (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001).

Aufgrund der verschiedenen Umgebungsbedingungen sind die Bakterien, wie in Tab. 6 präsentiert, unterschiedlich gewachsen und haben nach ÜNK den pH-Wert der Medien verändert. Minimalmedien mit Trypton, wurden nach ÜNK basischer und glucosehaltige Minimalmedien wurden nach ÜNK azider. Dies ist durch die unterschiedlichen Abbauprodukte des von der Nährstoffquelle abhängigen Stoffwechsels bedingt. Auch die optische Dichte der Kulturen variiert in glucosehaltigem Medium je nach pH-Wert. Je neutraler/basischer das Medium, umso größer ist das Wachstum der Kulturen.

**Tabelle 6: pH-Werte und OD<sub>600</sub> Wert nach ÜNK bei M9 Minimalmedium mit Glucose oder Trypton als Nährstoffquelle**

Tryptonbedingung					Glucosebedingung				
pH vorher	5	6	7	8	pH vorher	5	6	7	8
pH nachher	5,5	7	7,5	8,5	pH nachher	4	5	6,5	7
OD <sub>600</sub>	1,06	1,1	1,2	1,1	OD <sub>600</sub>	0,4	1,2	2,1	2,2

### 3.1.4 Glucose induziert die TcpC Expression

Wie bereits im vorherigen Abschnitt berichtet, hat das Kohlenhydrat Glucose einen Effekt auf die Induktion der Reporterstämme. Um dies genauer zu analysieren, wurde der bislang effektivste Reporterstamm CFT073 *pPc2398:gfp<sub>mut2</sub><sub>KAN</sub>* mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen im pH-stabilen M9 Minimalmedium inkubiert (pH 7). Die anderen Stämme wurden jeweils nur in der niedrigsten und höchsten Glucosekonzentration herangezüchtet. Die Bakterien einer glucosehaltigen Übernachtskultur wurden zu frischen Tageskulturen ohne Nährstoffquelle gegeben. Diese wurden zwei Stunden auf das nährstofffreie Medium adaptiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Glucose und Proben zur Bestimmung der Fluoreszenzintensität wurden nach 3 h und nach 24 h genommen. Ebenso wurde erneut die optische Dichte der Kulturen analysiert.

Nach 3 h Inkubationszeit der Tageskultur lässt sich eine klare Abhängigkeit der mittleren Fluoreszenzintensität von der Glucosekonzentration erkennen (vgl. Abb. 10(A)). Je mehr Glucose vorliegt, desto stärker ist das Signal des Reporterstammes. Nach 24 h Inkubation ist diese Abhängigkeit nicht mehr so klar erkennbar. Trotzdem sind weiterhin signifikante Unterschiede zwischen 0 mM Glucose und 3 mM, 6 mM und 30 mM Glucose erkennbar.

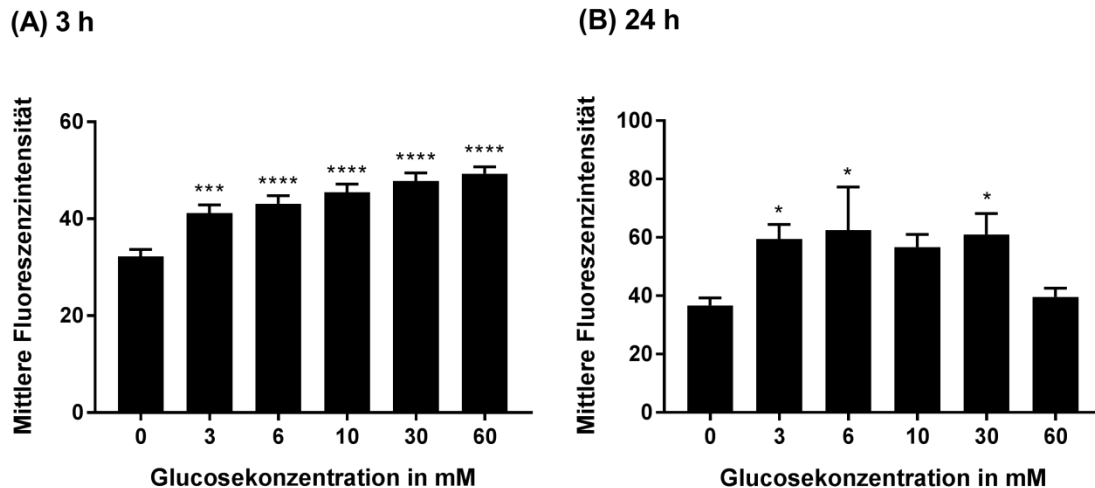


Abbildung 10: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des Reporterstammes CFT073 pPc2398;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> von der Glucose-Konzentration.

(A) Die mittlere Fluoreszenzintensität nach 3 h Inkubationszeit steigt mit zunehmender Glucose-Konzentration an. (B) Nach 24 h ist erkennbar, dass es signifikante Unterschiede zwischen 0 mM Glucose und 3 mM, 6 mM und 30 mM Glucose gibt. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Statistische Analyse erfolgte mittels ein-faktoriellem ANOVA und post-hoc Tukeytest (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Auch bei den anderen Stämmen ist nach 3 h Inkubationszeit klar erkennbar, dass die Signalstärke der GFP-Reporterstämme glucoseabhängig ist (vgl. Abb. 11). Nach 24 h schwächt sich dieser Effekt ab und ist nur noch beim Reporterstamm CFT073 pPc2397;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> zu erkennen. Glucose induziert folglich die GFP Expression und im übertragenden Sinn die TcpC Produktion, was insbesondere nach 3 h Inkubationszeit zu erkennen ist. Der Nährstoff Glucose fördert zugleich stark das Wachstum der Bakteriensuspension. Je mehr Glucose im Medium vorhanden war, desto höher war die optische Dichte nach 24 h (Daten nicht abgebildet).



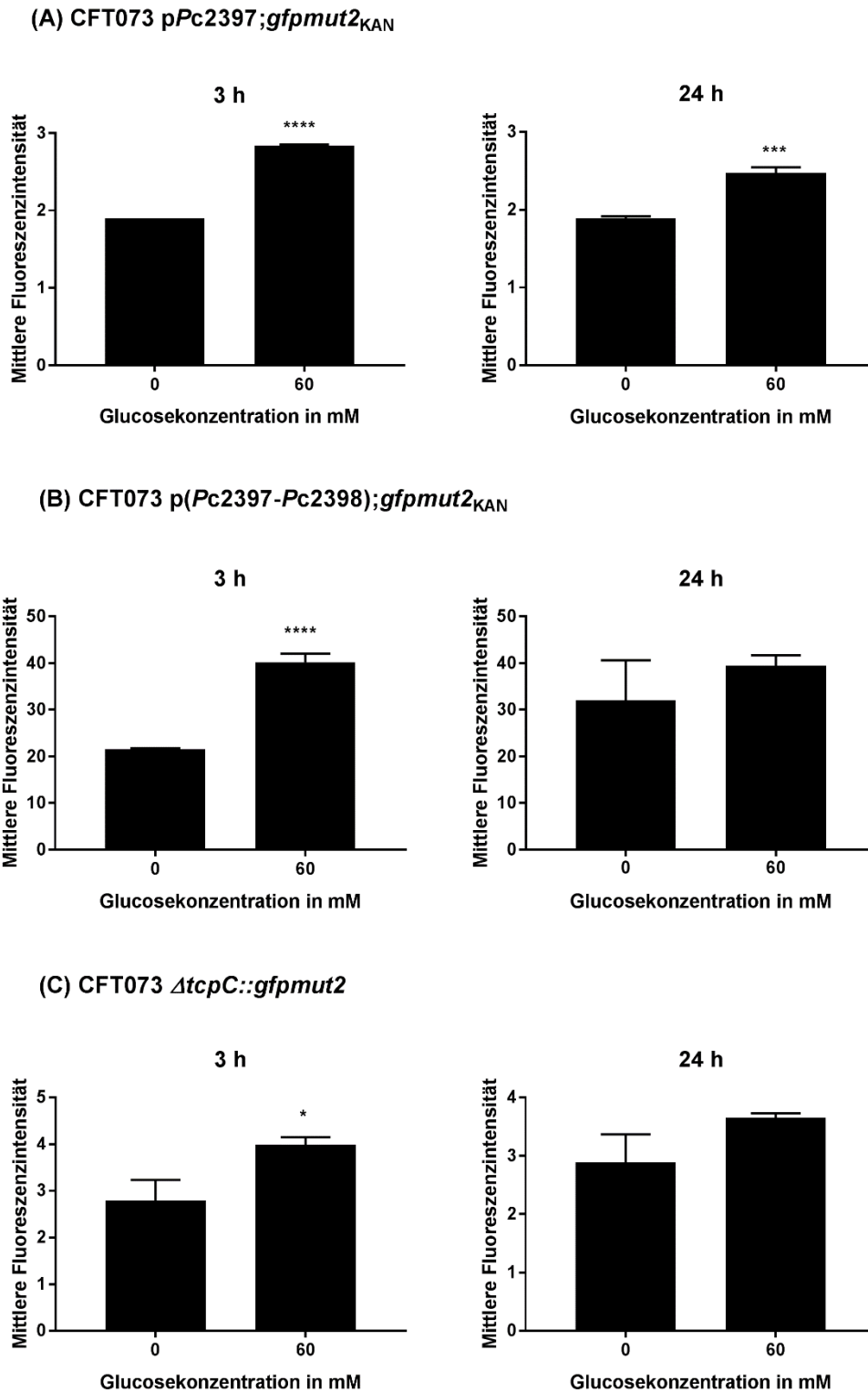


Abbildung 11: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der restlichen Reporterstämme von der minimalen und maximal verwendeten Glucosekonzentration.

(A) Der Stamm CFT073 p*Pc2397*;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> zeigt sowohl nach 3 h als auch nach 24 h, dass GFP stärker exprimiert wird, wenn Glucose vorliegt. (B) Der Stamm CFT073 p(*Pc2397*-*Pc2398*);*gfpmut2*<sub>KAN</sub> zeigt dies nur nach 3 h, nach 24 h ist dieser Effekt nicht mehr sichtbar. (C) Ebenso verhält es sich mit dem Knockoutstamm CFT073  $\Delta$ *tcpC*::*gfpmut2*. Statistische Analyse erfolgte mittels ein-faktoriellem ANOVA und post-hoc Tukeytest (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001; \*\*\*\**p* < 0,0001).

### 3.1.5 Eisen hat eine reziproke Beziehung zur TcpC Induktion

Pathogene sind obligat auf Eisen angewiesen, weshalb sie im eisenlimitierten Urogenitaltrakt zahlreiche Mechanismen erworben haben, um dieses Metall dem Wirt zu entziehen (vgl.1.7). Das Fehlen oder Vorliegen von Eisen im Bakterium könnte folglich ein spezifischer Stimulus für die Produktion von TcpC sein.

Um dies zu untersuchen, wurden in einem ersten Versuch Bakterien des Reporterstammes CFT073 *pPc2398;gfpmut2<sub>KAN</sub>* einer M9<sub>Glucose</sub>-Thiamin-NS Übernachtkultur in frische Tageskulturen, versetzt mit unterschiedlichen Eisensulfatkonzentrationen, überführt und direkt im Anschluss für 3 h inkubiert. Danach erfolgte die Bestimmung der Signalstärke im FACS und Messung der optischen Dichte.

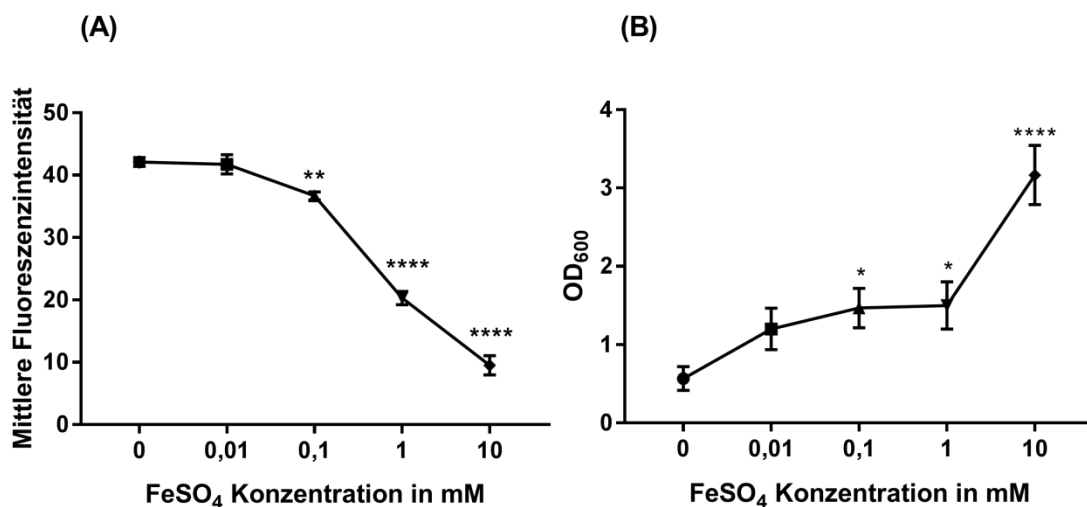


Abbildung 12: Signalstärke und OD<sub>600</sub> des Reporterstammes CFT073 *pPc2398;gfpmut2<sub>KAN</sub>* ohne vorherige Adaptation auf frisches Medium bei Vorliegen von FeSO<sub>4</sub>.

(A) Je mehr FeSO<sub>4</sub> vorliegt, desto schwächer ist das GFP-Reportersignal. (B) Je mehr FeSO<sub>4</sub> vorliegt, desto stärker ist das Wachstum der Bakterienkultur. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Statistische Analyse erfolgte mittels ein-faktoriellem ANOVA und post-hoc Tukeytest (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001).

Abbildung 12(A) zeigt die Beziehung zwischen der mittleren Fluoreszenzstärke und den unterschiedlichen Eisensulfatkonzentrationen von 0 mM-10 mM in den Tageskulturen. Erkennbar ist eine gegenläufige Beziehung. Je höher die Eisenkonzentration in der Tageskultur war, desto geringer war das GFP-Signal. Gleichzeitig hat jedoch das Wachstum der Bakterienkultur stark mit dem Vorliegen von höheren FeSO<sub>4</sub>-Konzentrationen korreliert (B). Aufgrund der in Abschnitt 3.1.4 gewonnenen Erkenntnis, dass Glucose einen Effekt auf die GFP-Signalstärke hat, wurde der Versuch mit ein paar Änderungen wiederholt. Zum einen durften die Bakterien nach Überführen in frische Tageskulturen 2 h auf das frische Medium adaptieren. Hiermit soll der Effekt der frisch zugeführten Glucose eliminiert werden. Zum anderen wurden Proben fürs FACS nach 3 h und nach 24 h generiert, um den Kurzzeit- und den Langzeiteffekt unterschiedlicher Eisenkonzentrationen zu bestimmen.

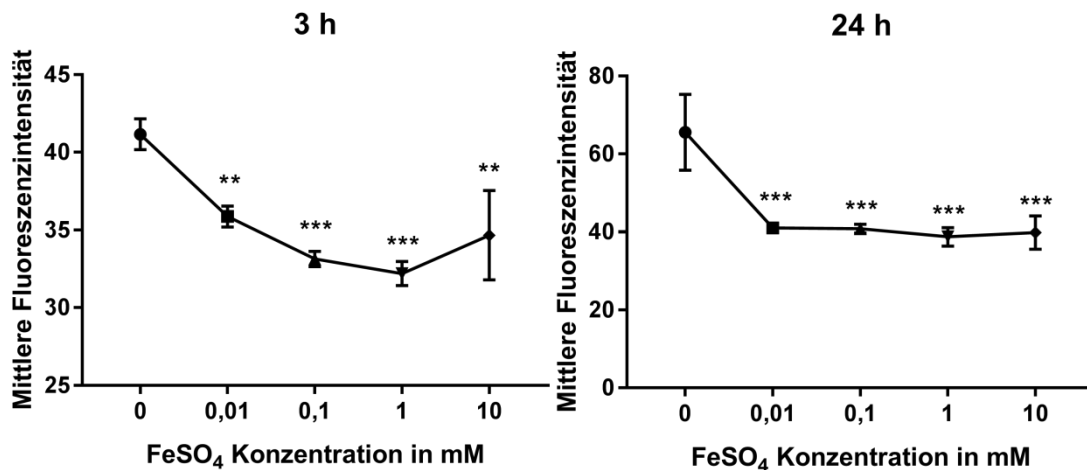


Abbildung 13: Mittlere Fluoreszenzintensität des Reporterstammes CFT073 pPc2398;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> mit vorheriger Adaptation nach 3 h und 24 h. Das Vorliegen von Eisen beeinflusst die Entwicklung der Fluoreszenzintensität negativ, sowohl auf kurze Sicht (3 h) als auch auf lange Sicht (24 h). Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Statistische Analyse der Triplikate mittels ein-faktoriellem ANOVA und post-hoc Tukeytest (\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Auch nach vorheriger Adaptation auf frisches Minimalmedium geht aus Abbildung 13 hervor, dass höhere FeSO<sub>4</sub>-Konzentrationen eine Abschwächung der mittleren Fluoreszenzstärke ergeben. Nach 24 h hat sich dieser Effekt insofern abgeschwächt, dass nur noch zwischen „kein Eisen“ und „Eisen vorhanden“ unterschieden werden kann. Um die eventuelle Aktivierung von anderen Promotorregionen nicht zu verpassen, wurde derselbe Versuch mit den anderen Reporterstämmen wiederholt. Allerdings wurde hierbei nur die minimale und maximale FeSO<sub>4</sub>-Konzentration benutzt. Bei den Reporterstämmen CFT073 p(*Pc2397-Pc2398*);*gfpmut2*<sub>KAN</sub> und CFT073  $\Delta$ *tcpC*::*gfpmut2* zeigte sich, dass das Vorhandensein von 10 mM FeSO<sub>4</sub> nach 3 h und nach 24 h zu einer geringeren mittleren Fluoreszenzintensität führt (vgl. Abb.14). Der Reporterstamm CFT073 pPc2397;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> weist diese Beziehung nur nach 24 h auf. Erneut war erkennbar, dass die optische Dichte bei den Tageskulturen mit 10 mM Eisensulfat nach 24 h bis zu viermal höher ist.

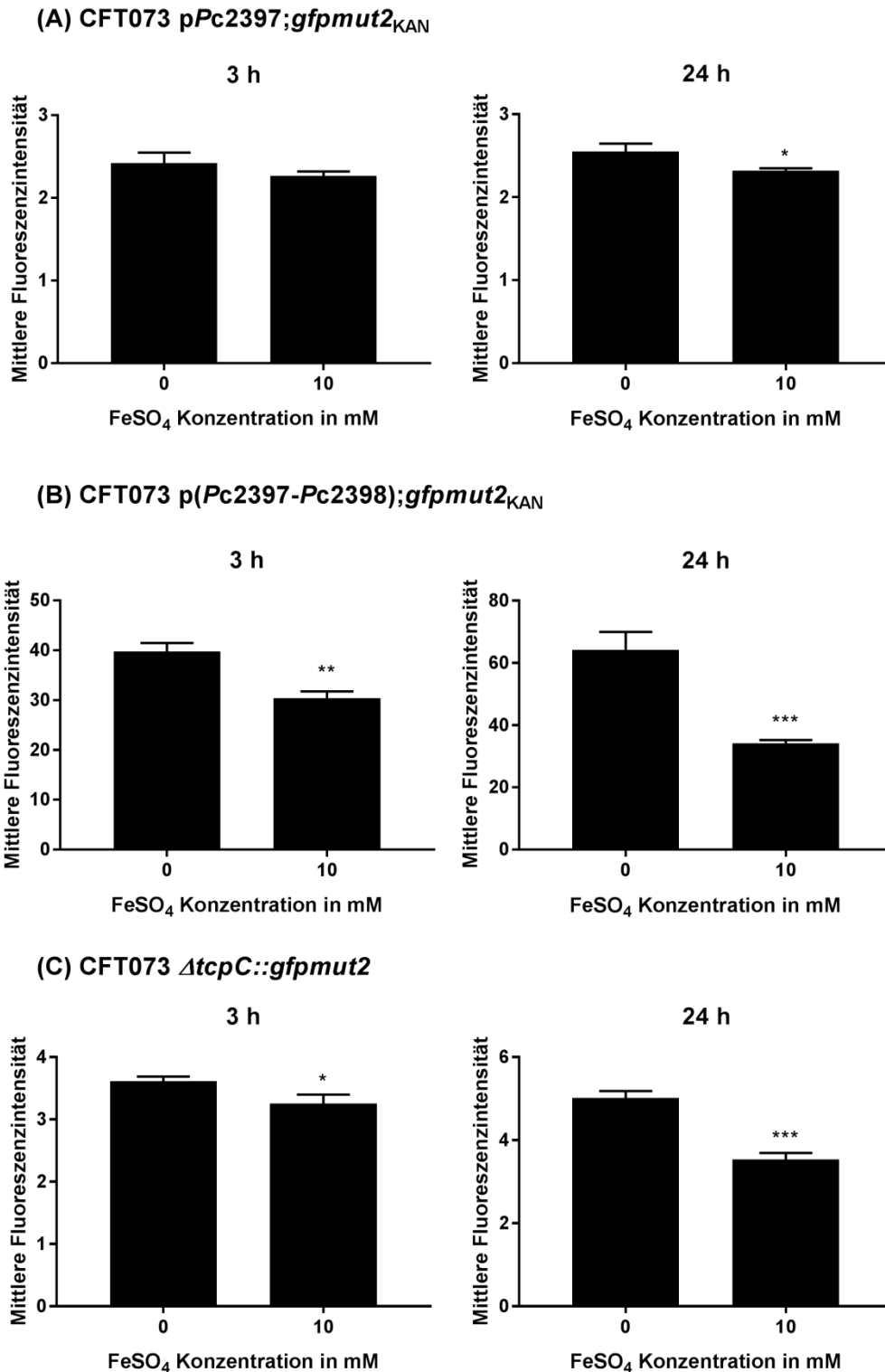


Abbildung 14: Mittlere Fluoreszenzintensität der restlichen Reporterstämme nach 3 h und 24 h bei minimaler und maximaler FeSO<sub>4</sub> Konzentration.

(A) Der Reporterstamm CFT073 pPc2397;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> weist nach 24 h bei Vorliegen von 10 mM Eisensulfat ein geringeres Signal auf, als beim Fehlen von Eisensulfat. (B) Der Stamm CFT073 p(Pc2397-Pc2398);*gfpmut2*<sub>KAN</sub> zeigt nach 3 h und nach 24 h die gleiche reziproke Beziehung. (C) Ebenso zeigt der GFP-Knockoutstamm CFT073  $\Delta$ *tcpC*::*gfpmut2* beim Vorliegen von 10 mM Eisensulfat eine niedrigere mittlere Fluoreszenzintensität. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Statistische Analyse erfolgte mittels ein-faktoriellem ANOVA und post-hoc Tukeytest (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001).

### 3.1.6 Stickstoff hat keine Auswirkung auf die TcpC Induktion

Ebenso wie Eisen stellt Stickstoff im Urogenitaltrakt ein limitiertes Element dar. Denn *E. coli* besitzen keine Urease, um den reichlich im Urogenitaltrakt vorliegenden Harnstoff zu verwerten. Bakterien brauchen Stickstoff jedoch für ihren Stoffwechsel. Falls extrazellulär kein Stickstoff in einer verwertbaren Form vorliegt, generieren UPECs ihren Stickstoffbedarf über die Aminosäure Glutamin. Es stellt sich die Frage, ob UPEC-Bakterien, welche vom Gastrointestinaltrakt eingeschleppt wurden, die Veränderung des Stickstoffangebots bemerken und daraufhin parallel zur veränderten Stoffwechselsituation auch vermehrt TcpC zur Unterdrückung des Immunsystems produzieren. Dazu wurde der gleiche Versuchsaufbau wie in Abschnitt 3.1.5 mit titriertem Ammoniumchlorid in den Konzentrationen von 0 -10 mM durchgeführt. Wie in Abbildung 15 präsentiert wird, liegt keine Abhängigkeit des GFP-Reportersignals von der Ammoniumchloridkonzentration sowohl nach 3 h als auch nach 24 h vor. Das gleiche Ergebnis zeigte sich bei den anderen Reporterstämmen (vgl. Abb. 16). Hierzu wurde erneut nur die minimale und maximale Ammoniumchloridkonzentration von 0 mM und 10 mM benutzt. Die einzige auffällige Bedingung liegt beim Reporterstamm CFT073 p(*Pc2397-Pc2398*);*gfpmut2*<sub>KAN</sub> vor. Es zeigt sich, dass bei einer Konzentration von 10 mM NH<sub>4</sub>Cl signifikant weniger GFP produziert wird. Insgesamt fiel auf, dass die optische Dichte ab der Konzentration von 10 mM sprunghaft auf die bis zu dreifachen Werte anstieg.

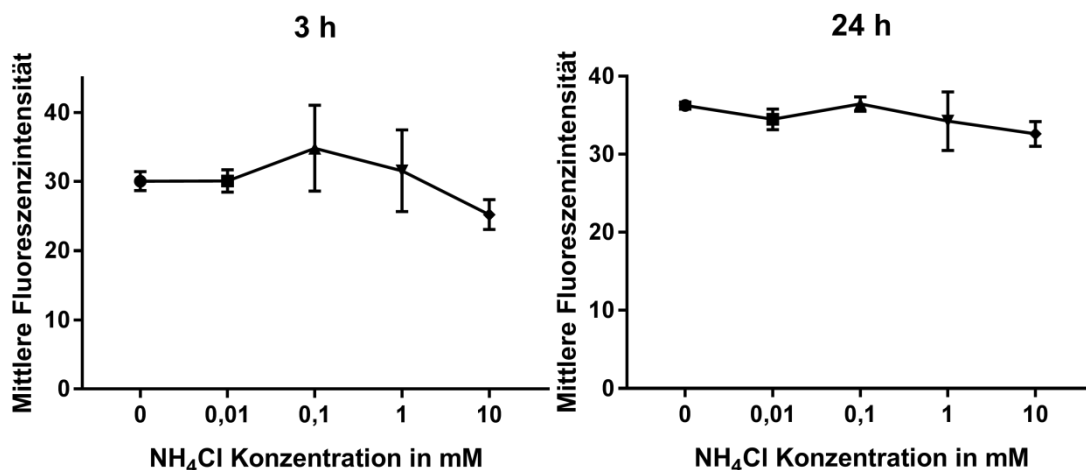
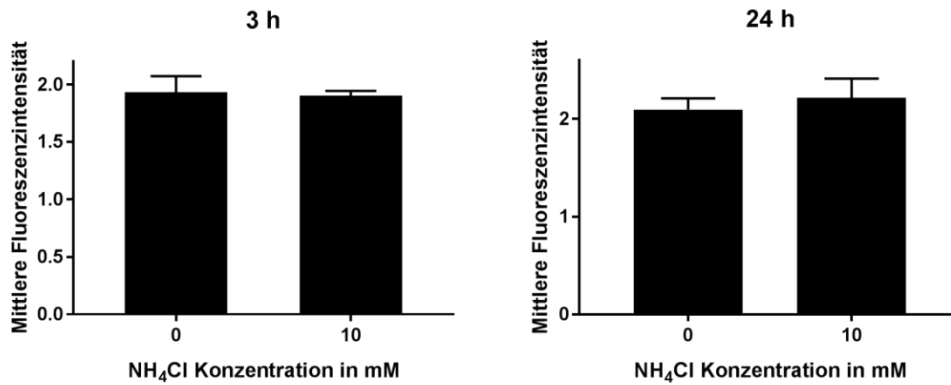
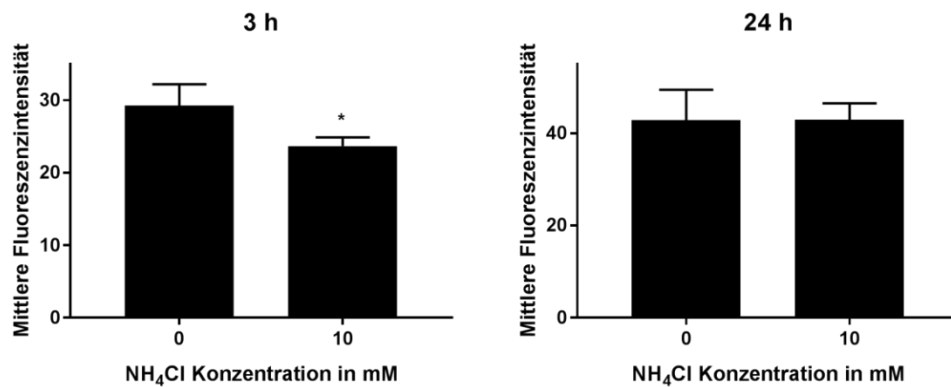


Abbildung 15: Abhängigkeit der mittleren Fluoreszenzintensität des Reporterstammes CFT073 p*Pc2398*; *gfpmut2*<sub>KAN</sub> von der Ammoniumchloridkonzentration. Sowohl nach 3 h als auch nach 24 h ist kein Unterschied der Signalstärke in Bezug zur NH<sub>4</sub>Cl Konzentration erkennbar. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Statistische Analyse erfolgte mittels ein-faktoriellem ANOVA und post-hoc Tukeytest.

(A) CFT073 p*Pc2397*;gfp*mut2*<sub>KAN</sub>



(B) CFT073 p(*Pc2397-Pc2398*);gfp*mut2*<sub>KAN</sub>



(C) CFT073  $\Delta$ *tcpC*::gfp*mut2*

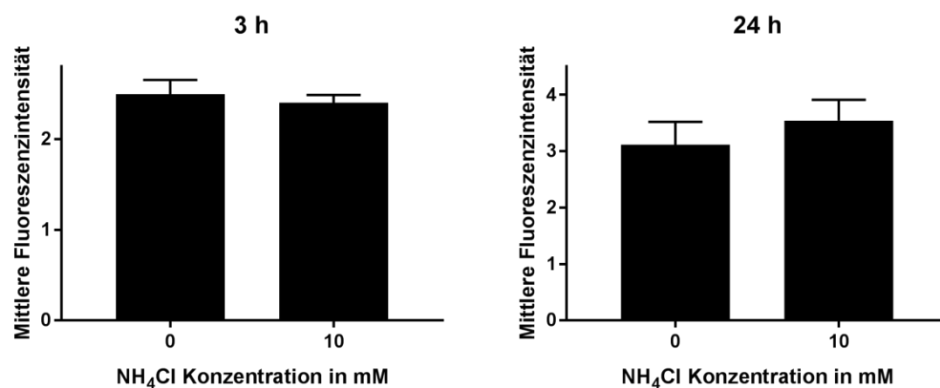


Abbildung 16: Abhängigkeit der mittleren Signalintensität der restlichen Reporterstämme von der Ammoniumchloridkonzentration.

(A) Der Reporterstamm CFT073 p*Pc2397*;gfp*mut2*<sub>KAN</sub> zeigt keine Veränderung beim Fehlen oder Vorliegen von Ammoniumchlorid, weder nach 3 h noch nach 24 h. (B) Der Reporterstamm CFT073 p(*Pc2397-Pc2398*);gfp*mut2*<sub>KAN</sub> zeigt nach 3 h eine Verringerung der mittleren Fluoreszenzintensität bei Vorliegen von 10 mM NH<sub>4</sub>Cl. (C) Auch das chromosomale GFP-Reporterkonstrukt CFT073  $\Delta$ *tcpC*::gfp*mut2* zeigt keine Abhängigkeit zwischen der Ammoniumchloridkonzentration und der Signalstärke. Repräsentatives Ergebnis dreier unabhängiger Versuche. Statistische Analyse erfolgte mit ein-faktoriellem ANOVA und post-hoc Tukeytest (\*p < 0,05).

### 3.1.7 Kaliumwirkung auf TcpC Induktion ist ambivalent

Der Efflux von Kaliumionen stellt einer der drei Hauptaktivationsmechanismen des NLRP3-Inflammasoms dar (vgl. 1.6). Durch Inflammasomaktivierung wird die angeborene Immunabwehr bei Infektion verstärkt. Sollte es den Bakterien möglich sein, diesen frühzeitigen extrazellulären Kaliumefflux zu bemerken, könnten sie diesem gegensteuern, indem sie TcpC zur Abschwächung der Immunabwehr bilden. Deshalb wurde nach dem gleichen Prinzip wie in Abschnitt 3.1.5 und 3.1.6 die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität aller Reporterstämme von der Kaliumkonzentration im Medium gemessen. Wie in Abb.17 dargelegt, gibt es beim Reporterstamm CFT073 *pPc2398;gfpmut2<sub>KAN</sub>* nach 3 h keine Beziehung zwischen Fluoreszenzsignal und Kaliumchloridkonzentration. Nach 24 h ist hingegen ein Unterschied zwischen 0 mM und 0,1 mM bzw. 1 mM KCl sichtbar, aber nicht mehr bei 10 mM KCl.

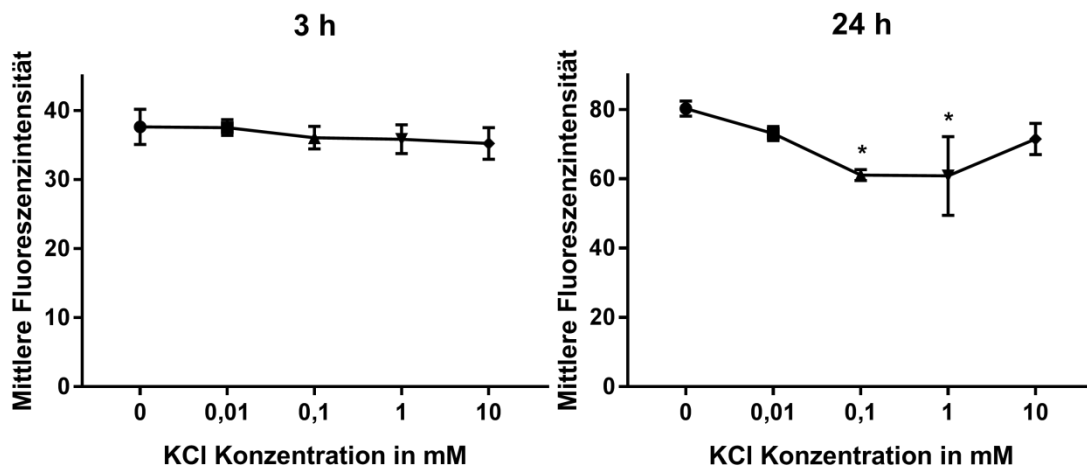


Abbildung 17: Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals des Reporterstammes CFT073 *pPc2398;gfpmut2<sub>KAN</sub>* von der KCl Konzentration nach 3 h und 24 h. Nach 3 h ist kein Effekt zwischen den einzelnen KCl Konzentrationen zu erkennen. Nach 24 h hingegen gibt es einen Unterschied zwischen 0 mM und 0,1 mM bzw. 1 mM KCl. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Statistische Analyse erfolgte mit ein-faktoriellem ANOVA und post-hoc Tukeytest (\* $p < 0,05$ ).

Die anderen Reporterstämme präsentieren sich ebenfalls uneinheitlich (vgl. Abb. 18). Der Reporterstamm CFT073 *pPc2397;gfpmut2<sub>KAN</sub>* weist nach 3 h bei 10 mM KCl ein stärkeres GFP-Signal auf und bei 24 h ist kein Unterschied erkennbar. Die zwei anderen Reporterstämme CFT073 *p(Pc2397-Pc2398);gfpmut2<sub>KAN</sub>* und CFT073 *ΔtcpC::gfpmut2* zeigen beide nach 24 h ein verringertes Fluoreszenzsignal bei Vorliegen von 10 mM KCl. Je mehr Kalium im Medium vorlag, desto besser war das Wachstum der Bakterien.

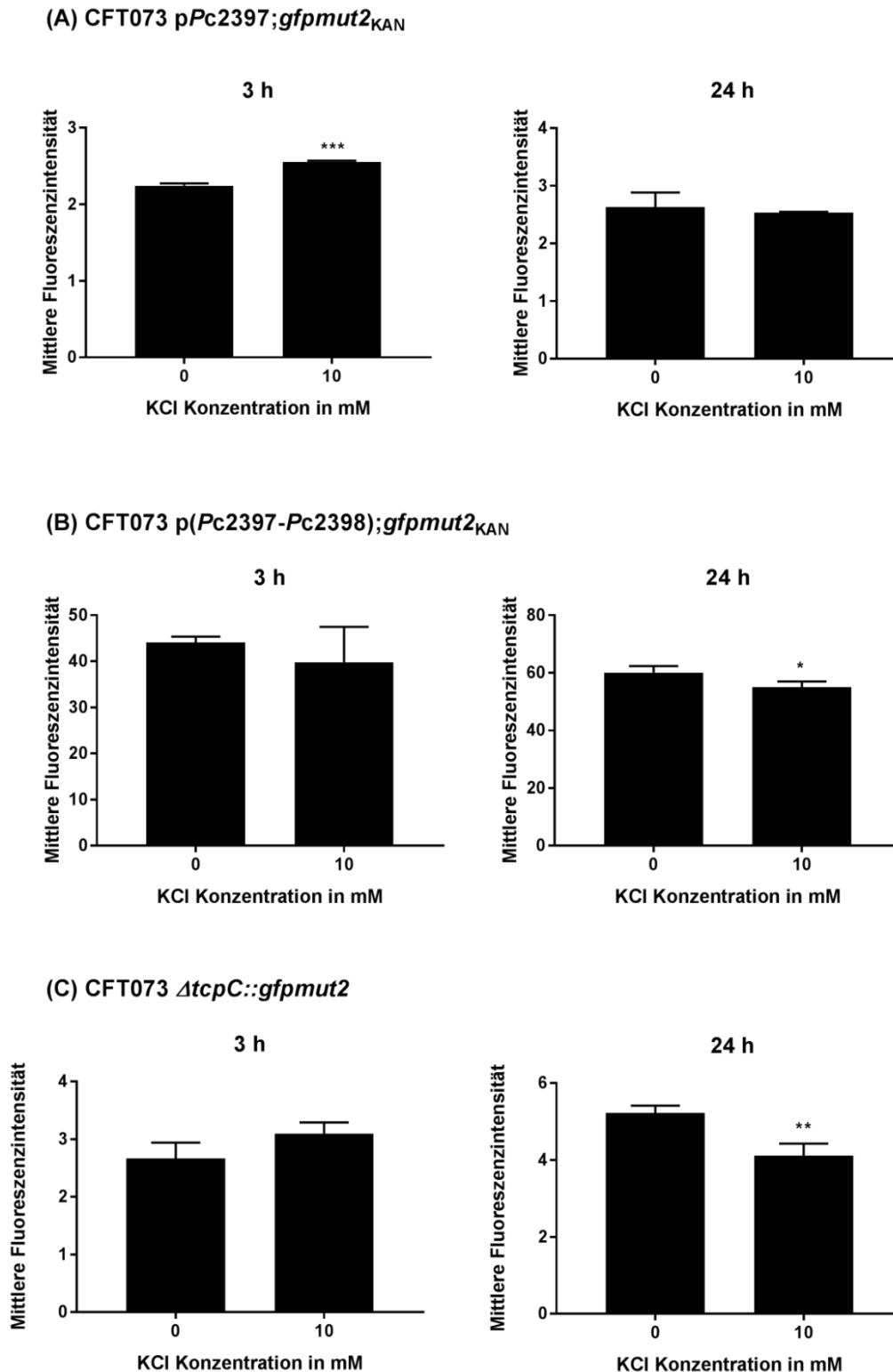


Abbildung 18: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der restlichen Reporterstämme von der Kaliumchloridkonzentration nach 3 h und 24 h. (A) Der Reporterstamm CFT073 p*Pc2397*;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> weist nach 3 h in der Tageskultur, welche 10 mM KCl enthält, eine stärkere mittlere Fluoreszenzintensität auf. Nach 24 h liegt dieser Effekt nicht mehr vor. (B) Der Reporterstamm CFT073 p(*Pc2397*-*Pc2398*);*gfpmut2*<sub>KAN</sub> zeigt nur nach 24 h einen Unterschied. Diesmal wird das Fluoreszenzsignal durch Vorliegen von 10 mM KCl verringert. (C) Der genomische Knockout-Reporterstamm zeigt das gleiche Ergebnis wie der zuvor genannte Reporterstamm. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Statistische Analyse mittels ein-faktoriellem ANOVA und post-hoc Tukeytest (\**p* < 0,05; \*\**p* < 0,01; \*\*\**p* < 0,001; \*\*\*\**p* < 0,0001).



### 3.1.8 *E. coli* produziert keinen löslichen Faktor, welcher TcpC induziert

Beim Erörtern des Ergebnisses von 3.1.3. kam die Frage auf, ob die Dichte der Kulturen mit der Expressionsstärke von GFP zusammenhängt. Dort zeigte sich, dass die mittlere Fluoreszenzstärke bei basischen pH-Werten in glucosehaltigem Medium größer ist, als bei azideren pH-Werten. Zugleich stieg jedoch auch die optische Dichte der Kulturen mit dem pH-Wert an.

Falls dem so sei, könnten entweder direkte Kontakte mit anderen Bakterien die TcpC Produktion stimulieren oder aber ein löslicher Faktor, welcher eigens von *E. coli* sezerniert wird, löst die verstärkte Genexpression von TcpC aus.

Der CFT073 Wildtypstamm wurde in M9<sup>Glucose-Thiamin-NS</sup> Medium und M9<sup>Trypton</sup> Medium über Nacht herangezüchtet. Das Überstandmedium dieser Kulturen wurde am nächsten Tag durch Zentrifugation gewonnen. In diesem sollte laut Theorie ein löslicher TcpC induzierender Faktor vorhanden sein. Neue Tageskulturen mit den Reporterstämmen CFT073 p*Pc2398*;gfp*mut2*<sub>KAN</sub> und CFT073 p(*Pc2397-Pc2398*);gfp*mut2*<sub>KAN</sub> wurden durch Mischen mit unterschiedlichen Anteilen zwischen frischem Medium und Überstandmedium erstellt. Die Tageskulturen durften 3 h im Schüttelinkubator wachsen. Danach wurden sie für die Durchflusszytometrie vorbereitet.

In Abbildung 19 wird somit offenbart, dass die gemessene Aktivität der Reporterkonstrukte unabhängig vom Anteil des Überstandmedium ist.

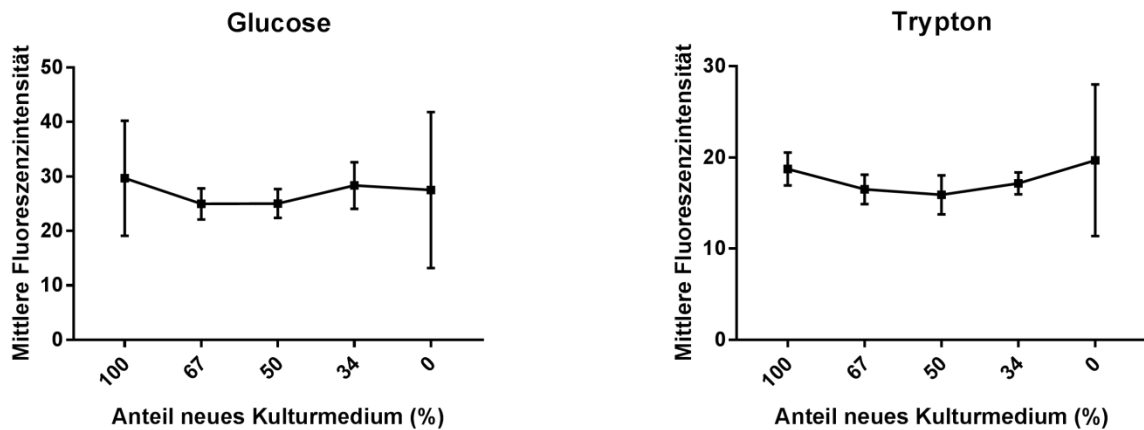
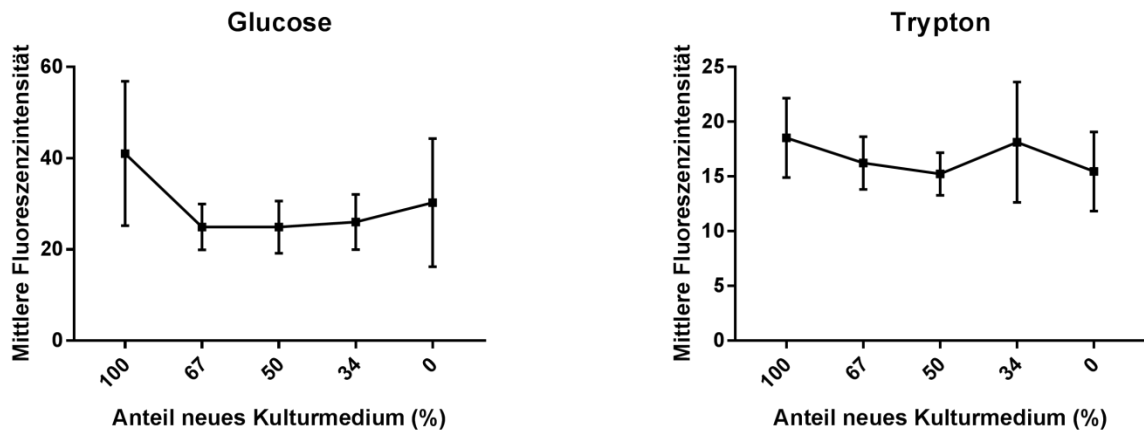
(A) CFT073 pPc2398;*gfpmut2*<sub>KAN</sub>(B) CFT073 p(*Pc2397-Pc2398*);*gfpmut2*<sub>KAN</sub>

Abbildung 19: Fluoreszenzintensität der Reporterstämme CFT073 pPc2398;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> und CFT073 p(*Pc2397-Pc2398*);*gfpmut2*<sub>KAN</sub> unter Glucose oder Tryptonbedingungen zusammen mit unterschiedlichen Verhältnissen von Überstandmedium und neuem Medium. (A) Der Reporterstamm CFT073 pPc2398;*gfpmut2*<sub>KAN</sub> weist weder in glucosehaltigem Medium noch in tryptonhaltigem Medium eine Abhängigkeit vom Überstandmedium auf. (B) Das gleiche Ergebnis liegt beim Reporterstamm CFT073 p(*Pc2397-Pc2398*);*gfpmut2*<sub>KAN</sub> vor. Repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Statistische Analyse mittels ein-faktoriellem ANOVA und post-hoc Tukeytest.

### 3.1.9 Humane Makrophagen produzieren keinen löslichen Faktor, welcher TcpC induziert

Cirl et al. entdeckten, dass die Ko-Inkubation von CFT073 mit murinen RAW264.7 Makrophagen in einem Transwellssystem nach 5 h die TcpC Produktion steigert. Sie wiesen dies mit einem polyklonalen Antiserum aus dem Kaninchen nach (Cirl et al., 2008). Da die Umgebungsbedingungen einer Infektion des Menschen untersucht werden sollen, wurde ein ähnlicher Versuch mit der humanen Monozyten Zelllinie (THP-1) und der modellartigen Detektion von TcpC durch einen GFP-Reporterstamm durchgeführt.

Hierzu wurde ein Transwellssystem benutzt, welches aus zwei Kammern besteht. In der unteren Kammer wurden THP-1 Zellzahlen in der Spannweite von 0 –  $2 \times 10^6$  eingesetzt. Diese wurden 3 Tage lang mit 200 ng/ml PMA behandelt, was die Differenzierung der Monozyten zu M0-Makrophagen auslöst. Nach Waschen der Zellen mit RPMI wurde in die obere Kammer der Reporterstamm CFT073 *pPc2398;gfpmut2<sub>KAN</sub>* eingesetzt. Dieser wurde ebenfalls in RPMI herangezüchtet und mittels der optischen Dichte in jedes Transwell eine ähnliche Anzahl an Bakterien eingesetzt. Die Probenentnahme zur Messung der mittleren Fluoreszenzstärke im FACS erfolgte nach 4 h und nach 24 h Koinkubation.

Es war keine Auswirkung der THP-1-Makrophagen auf die Fluoreszenzstärke des Reporterstammes sichtbar (vgl. Abb. 20). Weder nach 4 h, noch nach 24 h zeigte sich eine zellzahlabhängige Tendenz.

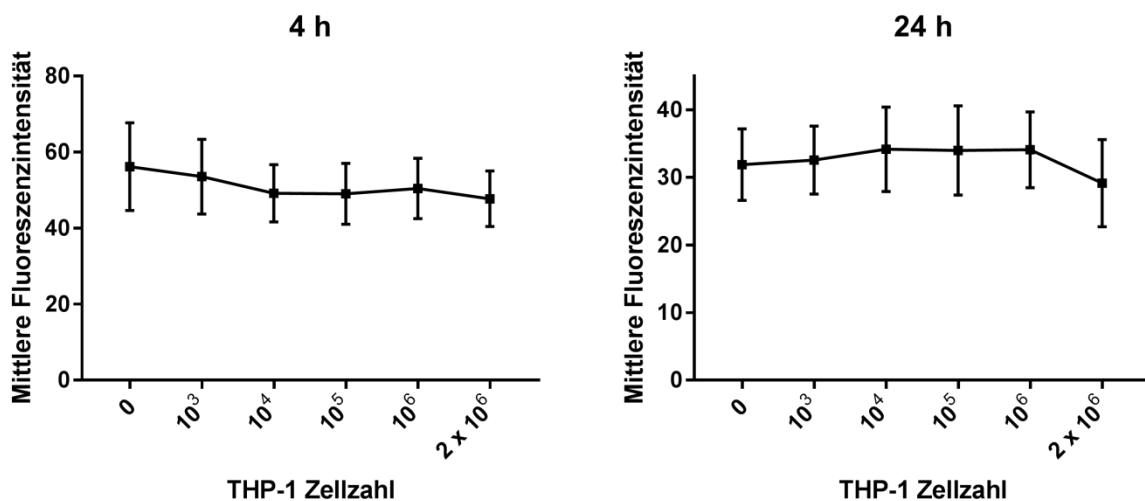
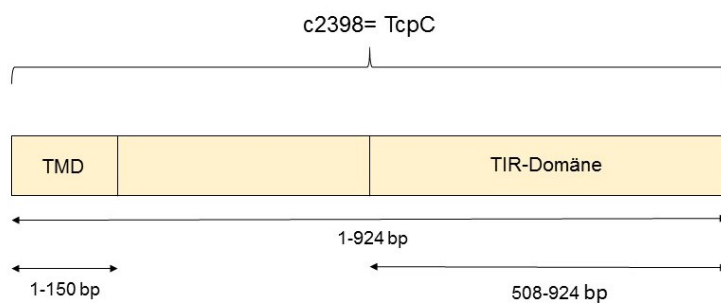


Abbildung 20: Abhängigkeit der Fluoreszenzstärke des Reporterstammes CFT073 *pPc2398;gfpmut2<sub>KAN</sub>* von der THP-1 Zellzahl nach 4 h und nach 24 h. Sowohl nach 4 h als auch nach 24 h ist keine Änderung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Makrophagenzellzahl zu erkennen. Statistische Analyse der Triplikatwerte mittels ein-faktoriellem ANOVA und post-hoc Tukeytest.

### 3.2 Fluoreszenzmikroskopie der TcpC-eYFP Konstrukte

Es ist bereits bekannt, dass das Protein TcpC am N-terminalen Ende eine putative Transmembrandomäne aufweist und am C-terminalen Ende die TIR-Domäne liegt. Die genaue Lokalisation des Proteins im Bakterium selbst ist bislang nicht bekannt. Um dies genauer zu erforschen, wurden eYFP-Reporterstämme (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) hergestellt, welche Plasmide mit unterschiedlichen TcpC-Fragmentlängen enthalten. Die genauen Konstrukte und die Kurzbeschreibung der verwendeten Stämme ist in Tabelle 7 und Abb. 21 übersichtlich dargestellt. Alle Stämme, bis auf CFT073  $p_c(tcpC\ 1-924):eYFP_{AMP}$ , sind mit einem „leaky“ Plasmid ausgestattet. Das heißt das Protein wird auch ohne Induktion in geringem Ausmaß exprimiert, kann aber durch Induktion deutlich verstärkt werden. Die Proteine eines „non-leaky“ (bzw. close „c“) Plasmid werden nur nach vorheriger Induktion abgelesen.



**Abbildung 21:** Schematische Darstellung des TcpC Gens und Einteilung der Abschnitte, welche für spezifische Domänen codieren. TMD= Transmembrandomäne

Die aufgelisteten Stämme, sowie der nicht fluoreszente Kontrollstamm CFT073  $p_{AMP}$  wurden in  $M9_{Glucose-Thiamin-NS}$  Medium über Nacht herangezüchtet und am nächsten Tag in frische Tageskulturen überimpft. Diese wurden zusätzlich mit je  $20\ \mu M$  IPTG zur Induktion der Plasmide versetzt. Da der Stamm CFT073  $p_c(tcpC\ 1-924):eYFP_{AMP}$  ein anderes Plasmid enthält, benötigte er  $0,2\ \mu g/ml$  AhTet als Induktor. Proben zur Fixierung und Vorbereitung für das Mikroskopieren wurden nach je 4 h und 24 h entnommen. Von zwei verschiedenen Ausschnitten einer Probe wurde jeweils ein Durchlichtbild sowie ein Fluoreszenzbild mit 100 ms bzw. 500 ms Belichtungszeit aufgenommen. Bei der späteren Bearbeitung der Bilder mit ImageJ wurde von jeder Probe ein Übersichtsbild ausgewählt und eine vergrößerte Aufnahme, auf dem die Lokalisation in den Bakterien zu erkennen ist.

Tabelle 7: Darstellung der TcpC-eYFP Reporterstämme

Bezeichnung des Stammes	Beschreibung	Plasmidart
CFT073 p( <i>tcpC</i> 1-150):eYFP <sub>AMP</sub>	Transmembrandomäne	Leaky pDK112
CFT073 p( <i>tcpC</i> 1-924):eYFP <sub>AMP</sub>	Volllänge TcpC	Leaky pDK112
CFT073 p( <i>tcpC</i> 1-507):eYFP <sub>AMP</sub>	Anfang - TIR-Domäne	Leaky pDK112
CFT073 p( <i>tcpC</i> 508-924):eYFP <sub>AMP</sub>	TIR-Domäne	Leaky pDK112
CFT073 p( <i>tcpC</i> 127-924):eYFP <sub>AMP</sub>	Volllänge ohne Transmembrandomäne	Leaky pDK112
CFT073 p( <i>tcpC</i> 127-507):eYFP <sub>AMP</sub>	Ende Transmembrandomäne- Anfang TIR-Domäne	Leaky pDK112
CFT073 p <sub>c</sub> ( <i>tcpC</i> 1-924):eYFP <sub>AMP</sub>	Volllänge TcpC	Non-leaky= close "c" pASK-IBA3+

In Abbildung 22 sind die Übersichtsaufnahmen aller Reporterstämme nach 4 h Induktionszeit zu erkennen. Die Kontrolle CFT073 p<sub>AMP</sub> wird als nicht fluoreszierend definiert. Die Stämme CFT073 p(*tcpC* 1-150):eYFP<sub>AMP</sub>, CFT073 p(*tcpC* 1-924):eYFP<sub>AMP</sub> und CFT073 p(*tcpC* 127-924):eYFP<sub>AMP</sub> geben insgesamt ein fast ebenso schwaches Signal ab. Stärker leuchten hingegen CFT073 p(*tcpC* 1-507):eYFP<sub>AMP</sub> und CFT073 p(*tcpC* 508-924):eYFP<sub>AMP</sub>, CFT073 p(*tcpC* 127-507):eYFP<sub>AMP</sub> und CFT073 p<sub>c</sub>(*tcpC* 1-924):eYFP<sub>AMP</sub>. Diese haben in zahlreichen Bakterien ein Fluoreszenzsignal. Man erkennt außerdem, dass bei den Stämmen CFT073 p(*tcpC* 1-924):eYFP<sub>AMP</sub>, CFT073 p(*tcpC* 508-924):eYFP<sub>AMP</sub> und CFT073 p(*tcpC* 127-924):eYFP<sub>AMP</sub> teils verformte, abnormal lange Bakterien vorliegen. Bei dem Stamm CFT073 p(*tcpC* 1-150):eYFP<sub>AMP</sub> sind diese ebenfalls, aber bei einem deutlich geringeren Anteil, zu erkennen.

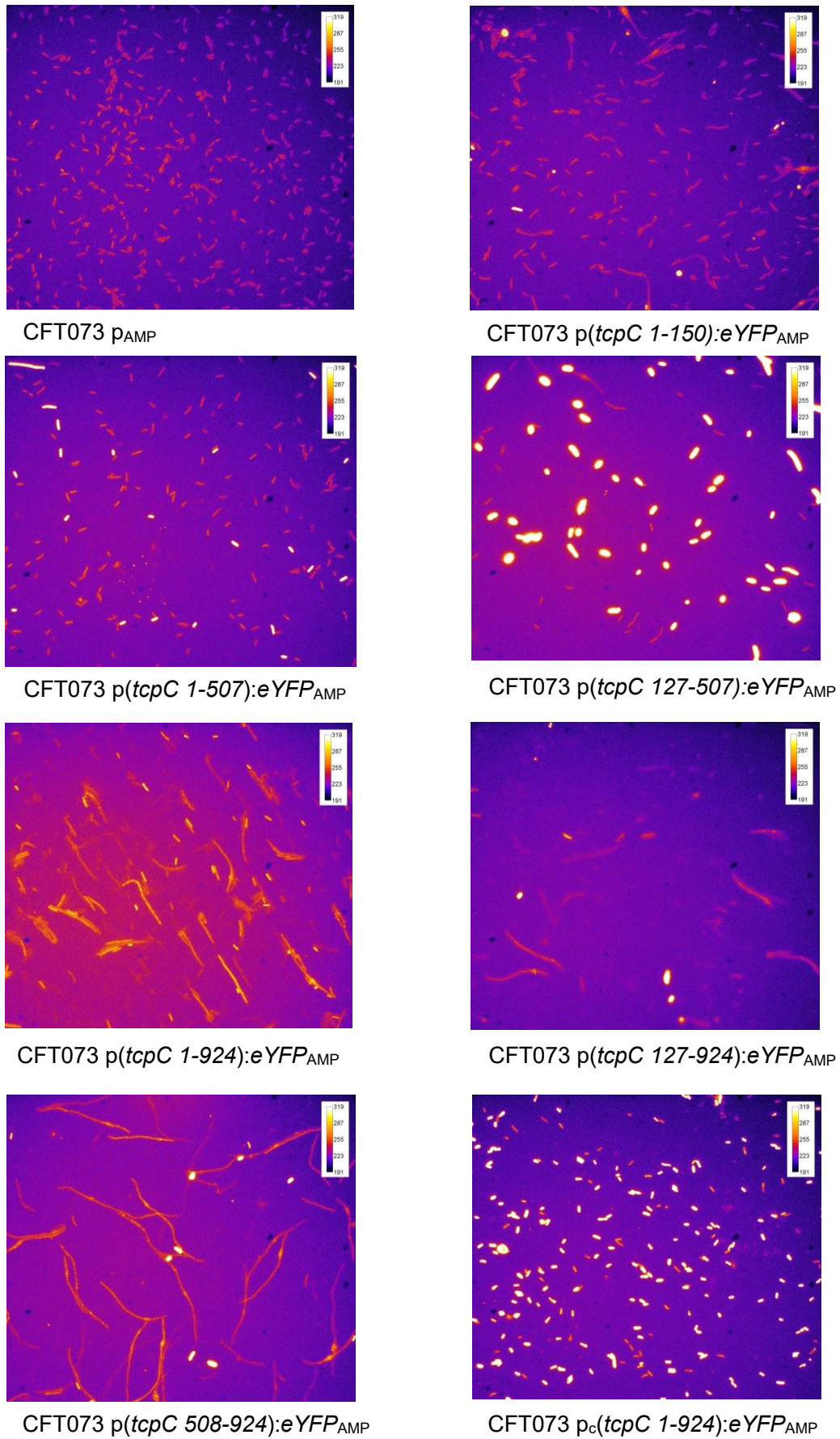
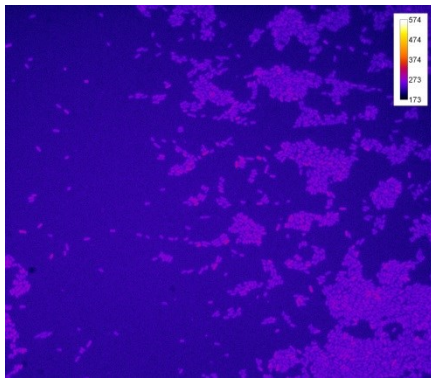
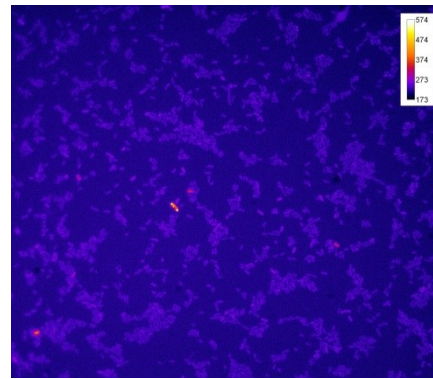


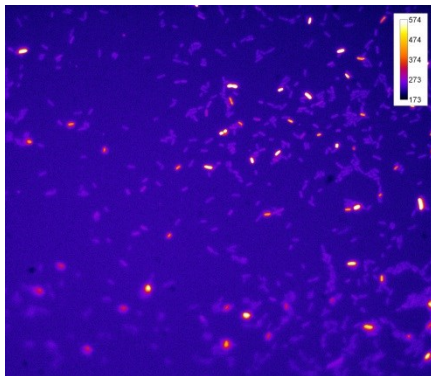
Abbildung 22: Übersichtsaufnahmen der Reporterstäme nach 4 h Induktionszeit. Aufgenommen mit Leica Mikroskop DMRB, Kamera Orca-flash.4.OLT HAMAMATSU und Objektiv PL APO 63x/1,32 OIL.



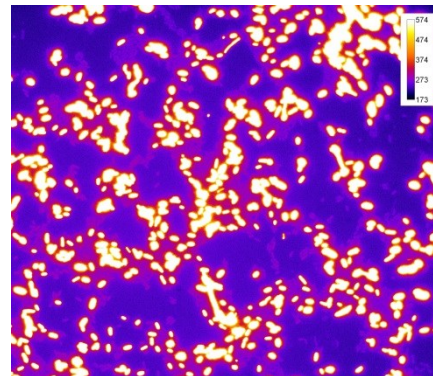
CFT073 pAMP



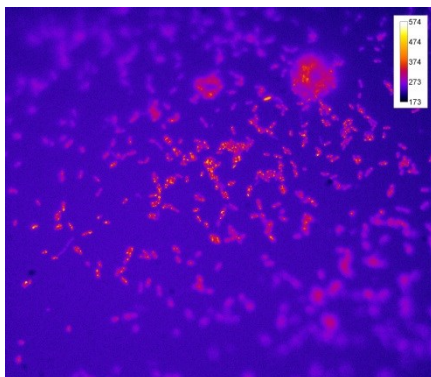
CFT073 p(*tcpC* 1-150):eYFP<sub>AMP</sub>



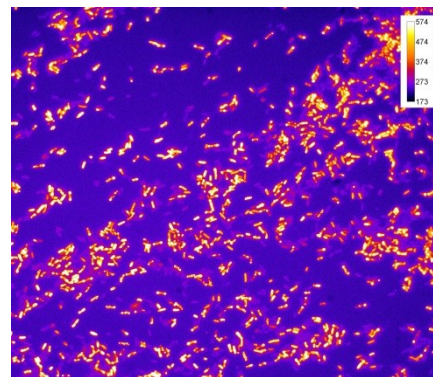
CFT073 p(*tcpC* 1-507):eYFP<sub>AMP</sub>



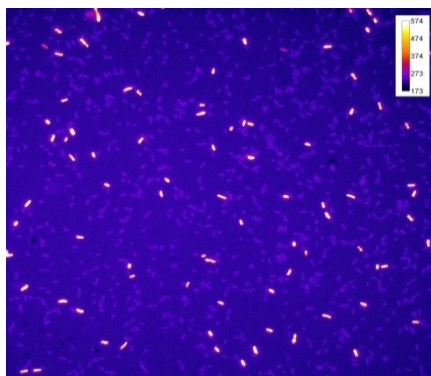
CFT073 p(*tcpC* 127-507):eYFP<sub>AMP</sub>



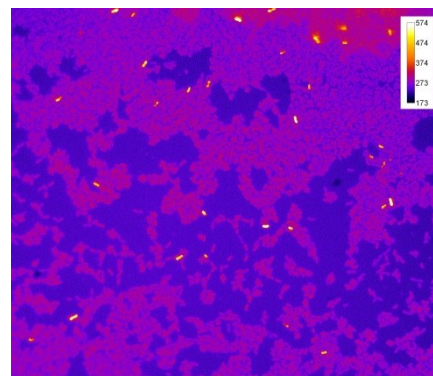
CFT073 p(*tcpC* 1-924):eYFP<sub>AMP</sub>



CFT073 p(*tcpC* 127-924):eYFP<sub>AMP</sub>



CFT073 p(*tcpC* 508-924):eYFP<sub>AMP</sub>

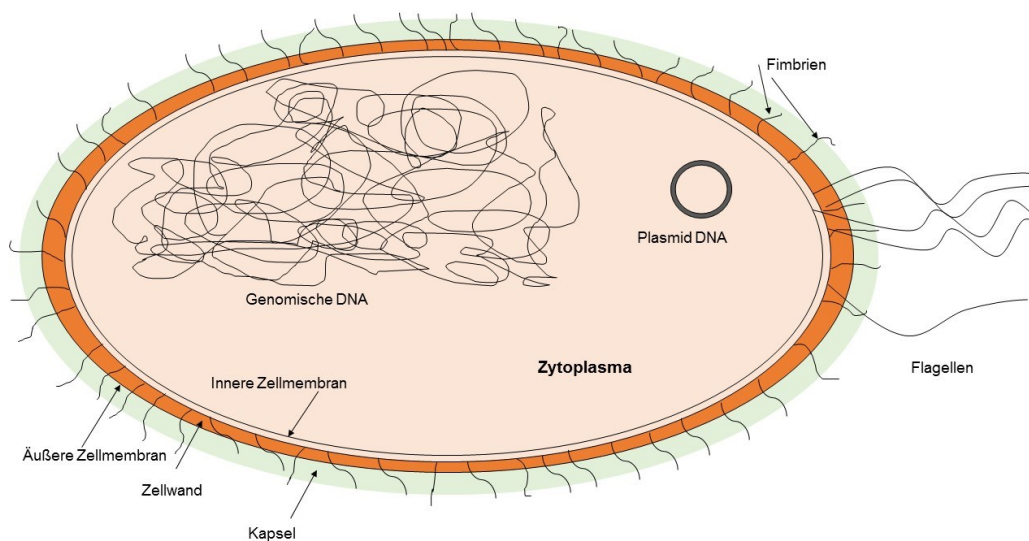


CFT073 p<sub>c</sub>(*tcpC* 1-924):eYFP<sub>AMP</sub>

Abbildung 23: Übersichtsaufnahme der Reporterstämme nach 24 h Induktionszeit. Aufgenommen mit Leica Mikroskop DMRB, Kamera Orca-flash.4.OLT HAMAMATSU und Objektiv PL APO 63x/1,32 OIL.

Abbildung 23 präsentiert ein ähnliches Bild nach 24 h Inkubationszeit. Jedoch geben einige Reporterstämme wie z.B. CFT073 p(*tcpC* 127-924):*eYFP*<sub>AMP</sub> und CFT073 p(*tcpC* 127-507):*eYFP*<sub>AMP</sub> im Vergleich mit den Stämmen CFT073 p(*tcpC* 1-507):*eYFP*<sub>AMP</sub> und CFT073 p(*tcpC* 1-924):*eYFP*<sub>AMP</sub> ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal ab. Letztere enthalten die ersten 127bp. Schwächer wurde hingegen CFT073 p<sub>c</sub>(*tcpC* 1-924):*eYFP*<sub>AMP</sub>. Verformte Bakterien sind nicht mehr zu erkennen.

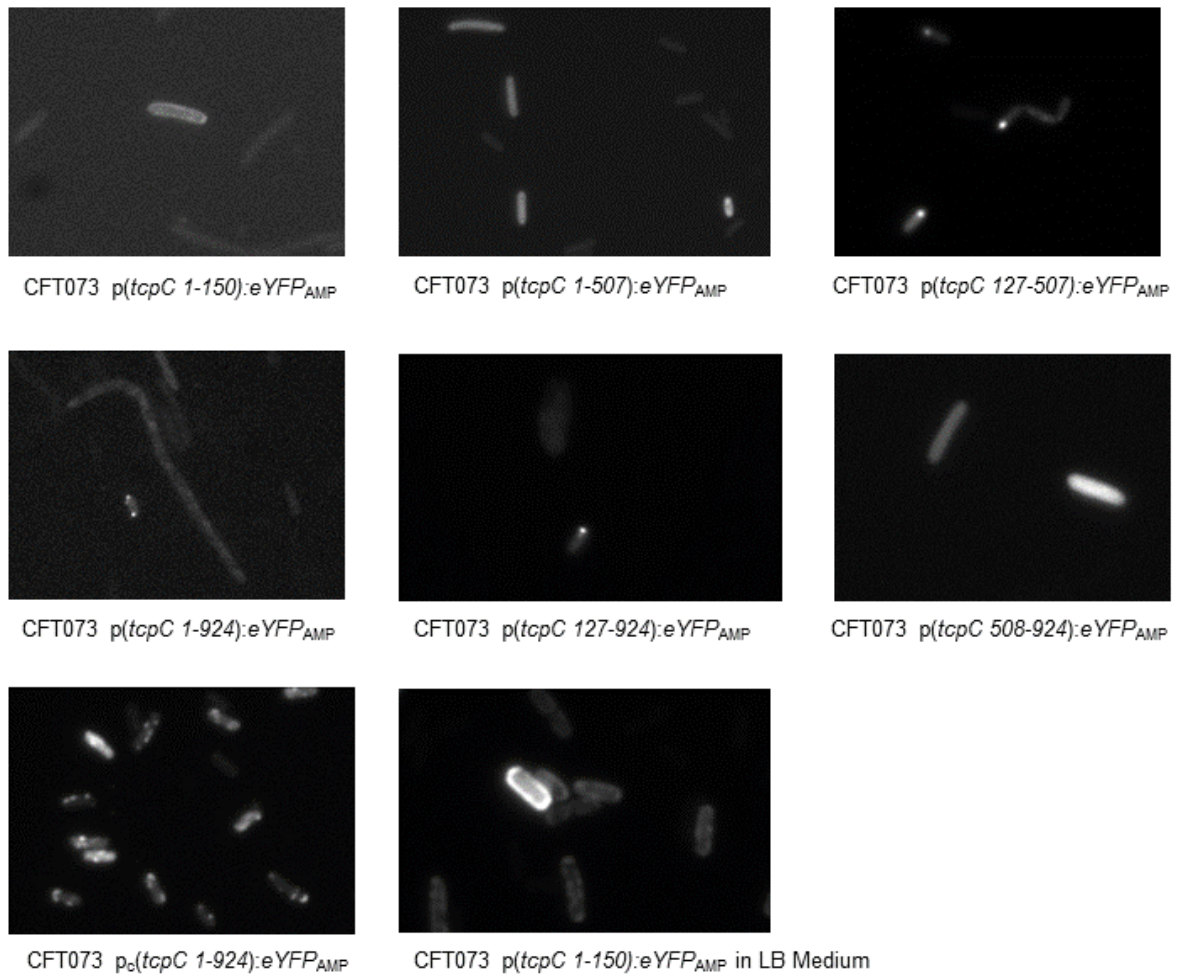
Wie bereits beschrieben, sollte auch die Lokalisation der TpcC-eYFP Konstrukte innerhalb des Bakteriums untersucht werden. Der grobe Aufbau eines *E. coli* Bakteriums ist in Abb. 24 zur besseren Vorstellung dargestellt.



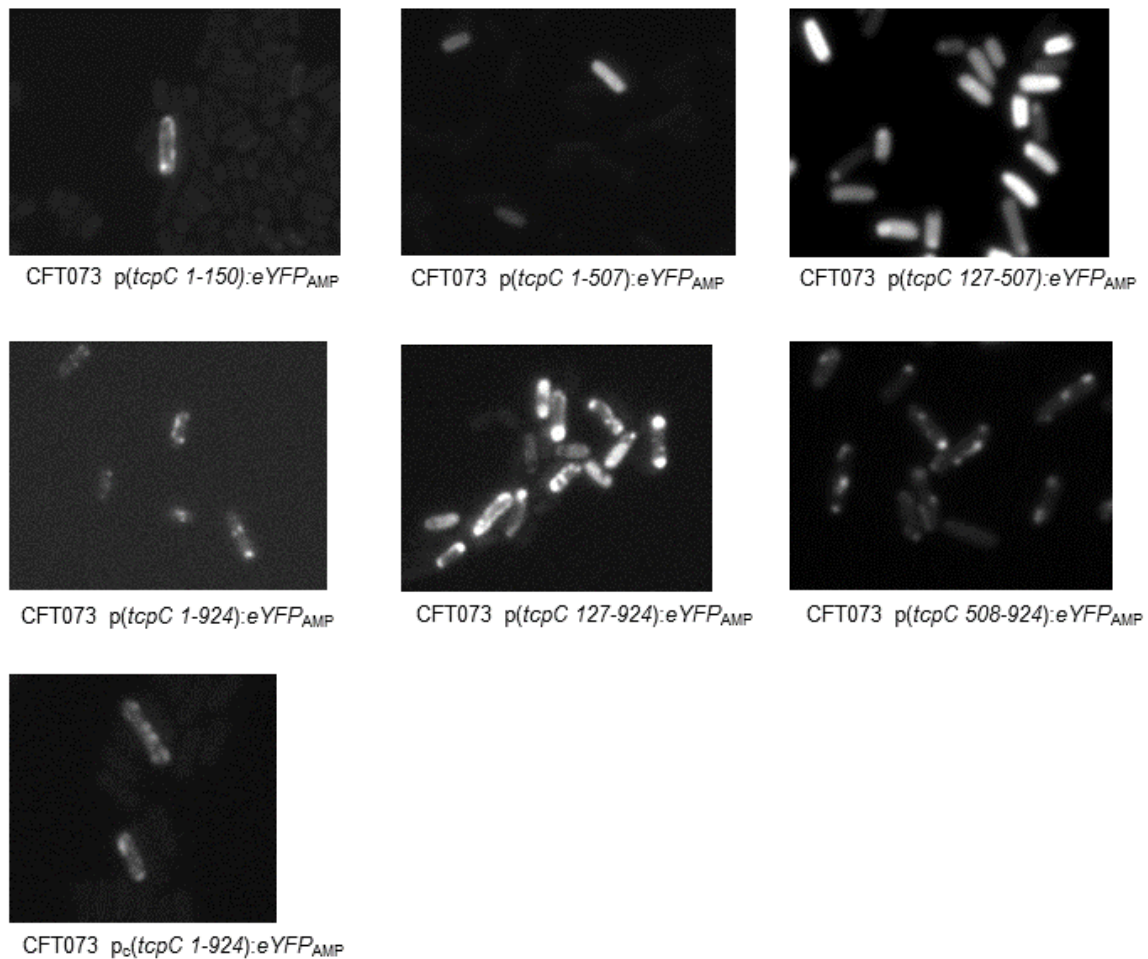
**Abbildung 24: Schematischer Aufbau des *E. coli* Bakteriums**

Die genaue Lokalisation der TpcC-eYFP-Konstrukte lässt sich in Abbildung 25 nach 4 h und in Abbildung 26 nach 24 h ablesen. CFT073 p(*tcpC* 1-150):*eYFP*<sub>AMP</sub> weist das Fluoreszenzsignal dauerhaft in der Bakterienmembran auf. Besonders gut ist dieses Phänomen in LB Medium erkennbar (Abb. 25 rechts unten). Die Stämme CFT073 p(*tcpC* 1-924):*eYFP*<sub>AMP</sub> und CFT073 p<sub>c</sub>(*tcpC* 1-924):*eYFP*<sub>AMP</sub>, welche die gesamte Länge des TpcC Proteins enthalten, leuchten nach 4 h, sowie nach 24 h multifokal. CFT073 p(*tcpC* 1-507):*eYFP*<sub>AMP</sub> leuchtet gleichbleibend stark im gesamten Zytoplasma. Der Stamm CFT073 p(*tcpC* 508-924):*eYFP*<sub>AMP</sub> welcher die TIR-Domäne enthält, weist zuerst ein zytoplastisches und nach 24 h ein multilokulares Verteilungsmuster auf. CFT073 p(*tcpC* 127-924):*eYFP*<sub>AMP</sub> zeigt zuerst vereinzelt an den Zellpolen leuchtende Aggregate und später in fast jedem Bakterium vorwiegend an den Zellpolen fokales Leuchten, aber auch diffus über das Bakterium verteilte Fluoreszenzsignale. Das stärkste Leuchten beim Stamm CFT073 p(*tcpC* 127-507):*eYFP*<sub>AMP</sub> liegt zu beiden Zeitpunkten ebenfalls an den Zellpolen, wobei nach 24 h ebenfalls starkes Fluoreszieren im Zytoplasma erkennbar ist. Insgesamt fällt auf, dass die Bakterien die TpcC-eYFP Konstrukte nicht homogen exprimieren. Nicht jedes Bakterium fluoresziert und das Verteilungsmuster der Fluoreszenzsignale in den Bakterien des gleichen Stammes kann stark variieren (vgl. Abb. 26 Stamm CFT073 p(*tcpC* 127-924):*eYFP*<sub>AMP</sub>).





**Abbildung 25: Detailaufnahmen von einzelnen Bakterien der verschiedenen Stämme: Lokalisation der TcpC-eYFP-Fragmente der Reporterstäme nach 4 h. Der Stamm CFT073  $p(tcpC\ 1-150):eYFP_{AMP}$  leuchtet in der Membran (Bild links oben in M9 Medium; rechts unten in LB Medium). CFT073  $p(tcpC\ 1-924):eYFP_{AMP}$ , sowie CFT073  $p_c(tcpC\ 1-924):eYFP_{AMP}$  leuchten multifokal und CFT073  $p(tcpC\ 1-507):eYFP_{AMP}$  und CFT073  $p(tcpC\ 508-924):eYFP_{AMP}$  weisen im Zytosol ein einheitliches Signal auf. CFT073  $p(tcpC\ 127-924):eYFP_{AMP}$  und CFT073  $p(tcpC\ 127-507):eYFP_{AMP}$  besitzen an den Zellpolen leuchtende Aggregate. Aufgenommen mit Leica Mikroskop DMRB, Kamera Orca-flash.4.OLT HAMAMATSU und Objektiv PL APO 63x/1,32 OIL.**

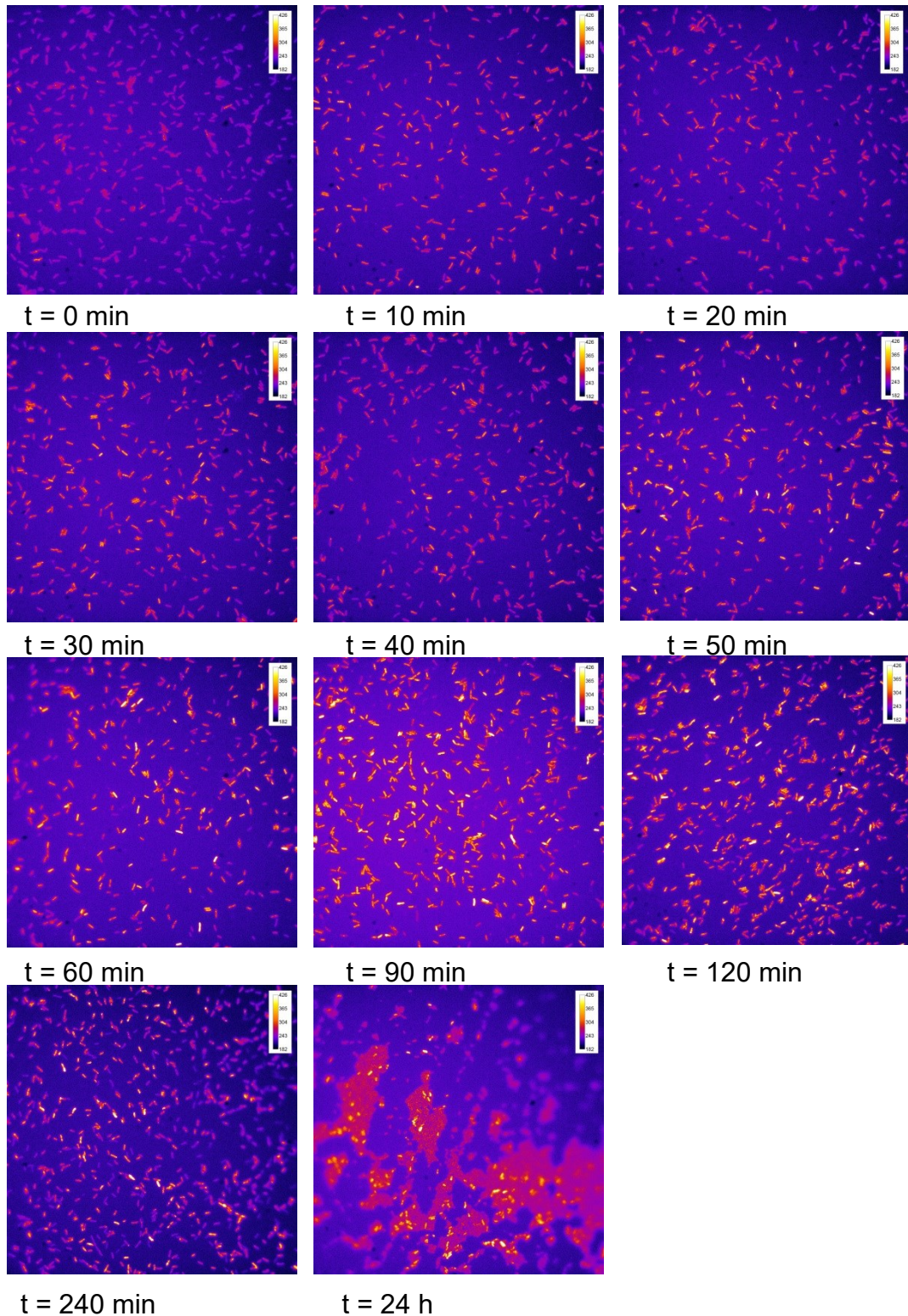


**Abbildung 26:** Lokalisation der TcpC-eYFP-Fragmente der Reporterstämme nach 24 h. CFT073 *p(tcpC 1-150):eYFP<sub>AMP</sub>* leuchtet in der Zellmembran. CFT073 *p(tcpC 1-924):eYFP<sub>AMP</sub>*, CFT073 *p(tcpC 508-924):eYFP<sub>AMP</sub>* und CFT073 *p<sub>c</sub>(tcpC 1-924):eYFP<sub>AMP</sub>* leuchten multifokal. CFT073 *p(tcpC 1-507):eYFP<sub>AMP</sub>* leuchtet einheitlich im Zytosol. CFT073 *p(tcpC 127-924):eYFP<sub>AMP</sub>* und CFT073 *p(tcpC 127-507):eYFP<sub>AMP</sub>* zeigen deutlich Fluoreszenzaggregate an den Zellpolen. CFT073 *p(tcpC 127-507):eYFP<sub>AMP</sub>* zeigt jedoch auch zytosolisches Leuchten. Aufgenommen mit Leica Mikroskop DMRB, Kamera Orca-flash.4.OLT HAMAMATSU und Objektiv PL APO 63x/1,32 OIL.

Wie bereits beschrieben, besitzen alle Stämme bis auf CFT073 *p<sub>c</sub>(tcpC 1-924):eYFP<sub>AMP</sub>* das gleiche Plasmid. Dieses ist bekannterweise ein „leaky“ Plasmid (Sommer, 2011). Das heißt, das Protein wird auch ohne Induktion in geringem Ausmaß exprimiert, kann aber durch Induktion deutlich verstärkt werden. Volllänge-TcpC-eYFP liegt in den Stämmen CFT073 *p(tcpC 1-924):eYFP<sub>AMP</sub>* und CFT073 *p<sub>c</sub>(tcpC 1-924):eYFP<sub>AMP</sub>* vor. Bei den Übersichtsaufnahmen beider Stämme fällt auf, dass CFT073 *p(tcpC 1-924):eYFP<sub>AMP</sub>* insgesamt ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal besitzt. Da somit die Vermutung nahe liegt, dass hier bereits eine Negativselektion auf Volllänge-TcpC stattgefunden hat, wurde der Stamm CFT073 *p<sub>c</sub>(tcpC 1-924):eYFP<sub>AMP</sub>* mit einem dichten Plasmid konstruiert und in einem weiteren Versuch intensiv untersucht.

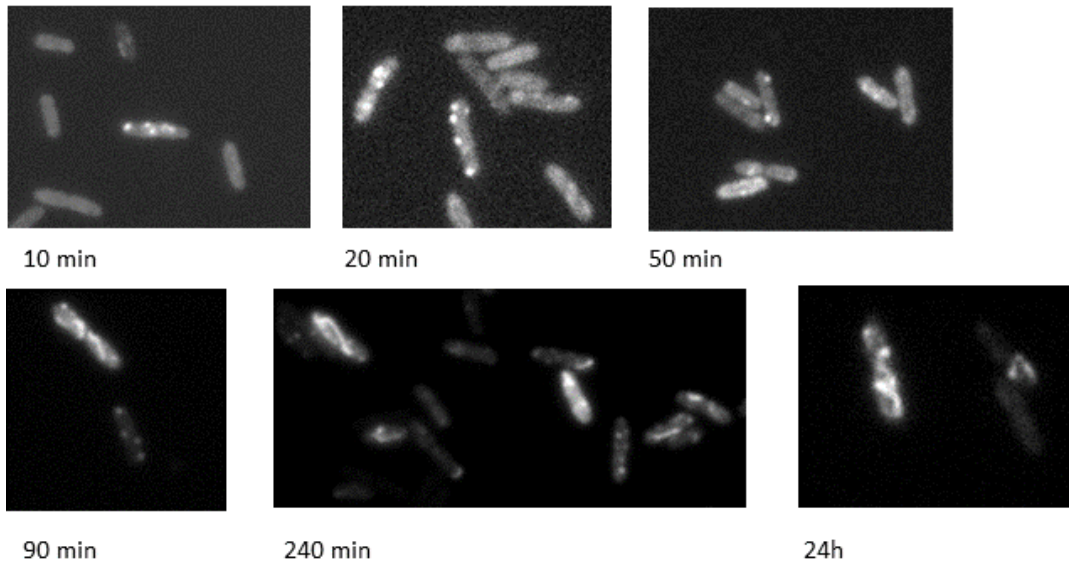
Hierzu wurden Bakterien einer LB Übernachtskultur in eine frische Tageskultur überführt, welche bis zum Erreichen der OD<sub>600</sub> = 0,5 herangezüchtet wurde. Anschließend wurde diese Tageskultur mit 0,2 µg/ml AhTet induziert. Es wurden jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten Bakterienproben entnommen und unter dem Mikroskop visualisiert. Beim Betrachten der Abbildung 27 wird ersichtlich, dass es

einen Fluoreszenzanstieg ab 50 min gibt, der sich langsam steigert. Nach 24 h fällt auf, dass zahlreiche Bakterien nicht mehr leuchten und nur noch ein geringer Teil fluoresziert.



**Abbildung 27: Fluoreszenzverteilung des TcpC-Volllänge Reporterstammes CFT073  $p_c(tcpC\ 1-924):eYFP_{AMP}$  zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion mit AhTet. Aufgenommen mit Leica Mikroskop DMRB, Kamera Orca-flash.4.OLT HAMAMATSU und Objektiv PL APO 63x/1,32 OIL.**

Bei genauerer Betrachtung der Lokalisation des TcpC-eYFP Konstrukts fiel auf, dass im Zeitraum von 10-90 min die Verteilung der Fluoreszenz an mehreren Foci zufällig verteilt war (vgl. Abb. 28). Nach 90 min erschienen zusätzlich intrazelluläre filamentöse Strukturen, die spiralartiges Aussehen aufweisen.



**Abbildung 28:** Lokalisation der Fluoreszenzsignale von CFT073  $p_c(tcpC\ 1-924):eYFP_{AMP}$ . Im Zeitraum von 10-90 min nach Induktion ist ein multifokales Auftreten der Fluoreszenz zu erkennen. Ab 90 min treten zusätzlich filamentöse Strukturen auf. Aufgenommen mit Leica Mikroskop DMRB, Kamera Orca-flash.4.OLT HAMAMATSU und Objektiv PL APO 63x/1,32 OIL.

### 3.3 Identifizierung Promotor-bindender Proteine an das *tcpC* Gen

Wie in Abschnitt 3.1.2 durch die Promotor-GFP-Reporterstämme herausgefunden wurde, befindet sich der *TcpC*-Promotor vor allem direkt vor *c2398* (*tcpC* Gen). Bislang gibt es noch keine gesicherte Erkenntnis darüber, über welchen Signalweg die Transkription von *TcpC* aktiviert wird und welche Proteine darin involviert sind. Deshalb wurde das als „*TcpC*-Promotor“ (*Pc2398*) betitelte DNA Stück des Reporterstammes CFT073 *pPc2398;gfpmut2<sub>KAN</sub>* auf DNA-bindende Proteine untersucht. Prinzipiell gibt es in Prokaryoten zwei große Klassen von DNA-bindenden Proteinen. Zum einen gibt es die Gruppe von Proteinen, welche an der Strukturierung der DNA beteiligt ist, reichlich in der Zelle vorliegt und oft unspezifisch bindet. Darunter fallen z.B. histone-like nucleoid structuring protein (H-NS), heat-unstable nucleoid protein (HU), integration host factor (IHF), DNA-binding protein from starved cells (Dps) und suppressor of *td* mutant phenotype A (*StpA*). Zum anderen gibt es DNA-regulierende Proteine, welche mithilfe von speziellen Bindungsmotiven spezifisch an den zu regulierenden DNA Abschnitt binden und damit Transkription, DNA Replikation und DNA Rekombination beeinflussen (Keatch et al., 2005). Diese Gruppe beinhaltet z.B. Proteine wie DNA-binding protein A (*CbpA*), curved DNA-binding protein B (*CbpB*) und inhibitor of chromosome initiation A (*IciA*).

Für diesen Versuch wurde der *TcpC*-Promotor mittels PCR vervielfältigt und am 5'-Ende biotinyliert. Die DNA wurde daraufhin an Streptavidin-gekoppelte magnetische Beads gebunden. Anschließend wurde das bakterielle Lysat des CFT073 Wildtyps auf die mit DNA beladenen magnetischen Beads gegeben (vgl. 2.2.10). Als Kontrolle diente das gleichlange Promotorstück vom *lacZ* Gen. Die Identifikation der an die Promotorregionen gebundenen Proteine erfolgte mittels LC-MS/MS Massenspektrometrie durch Herrn Dipl. Ing. Costina (Institut für Klinische Chemie UMM). Die gefundenen Peptidsequenzen wurden mit der *E. coli* CFT073 Datenbank verglichen. Die Proteine, welche sowohl beim *LacZ* Promotor als auch beim *TcpC* Promotor gefunden wurden, wurden nicht weiter betrachtet.

In Tabelle 8 sind alle Proteine aufgelistet, welche in mindestens 2 Versuchen vorkamen und ausschließlich beim *TcpC*-Promotor nachzuweisen waren. „Accession“ bezieht sich immer auf die Bezeichnung des Proteins in der Uniprot Datenbank. Das Kürzel **tr|** vor der Accession eines Proteins ist ein Hinweis darauf, dass das Protein noch nicht als solches sequenziert wurde, sondern nur eine publizierte cDNA in die entsprechende Aminosäuresequenz umgeschrieben wurde. Die „Coverage“ eines Proteins gibt den Anteil aller Aminosäuren eines Proteins an, welche in der Probe als Peptid identifiziert wurden. Je höher die Anzahl der identifizierten Peptide, die zu einem Protein gehören, ist, desto sicherer ist die Identifikation des Proteins. Liegen mindestens 2 spezifische Peptide vor, gilt das Protein in der Regel als identifiziert (Cottrell, 2011; Searle, 2010). Je höher der „Score“ ist, desto wahrscheinlicher ist die Übereinstimmung der experimentell vorliegenden Daten mit den Daten bzgl. des Proteins aus der Datenbank.

Durch das Vergleichen der DNA bindenden Proteine mit der *LacZ* Kontrolle, wurden unspezifisch an DNA bindende Proteine größtenteils rausgefiltert. Die in der Tabelle präsentierten Proteine lassen sich einteilen in ribosomale Untereinheiten, Stoffwechsellenzyme, Proteine noch unbekannter Funktion und transkriptionsregulierende Proteine:

Die großen ribosomalen Untereinheiten 50S L7/L12 und L9 sowie die kleine ribosomale Untereinheit 30S S10 binden an den DNA-Abschnitt. Die große Untereinheit 50S L9 ist mit mehr als zwei spezifischen Peptiden als eindeutig identifiziert zu betrachten. Zu den Stoffwechsellzymen zählen Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase, Cytosol aminopeptidase, lucD protein, Branched-chain-amino-acid aminotransferase und 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase. Bei allen bis auf Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase wurden mehr als 2 spezifische Peptide identifiziert. Die genaue Funktion der Enzyme ist unter Abschnitt 4.3 erläutert. Es wurden auch drei Proteine vorgefunden, deren Funktion und Vorkommen in *E. coli* bis heute noch nicht vollständig erforscht ist. Dazu zählen Uncharacterized protein YheO, Uncharacterized protein, R4-like protein. Das Protein YheO gilt als nicht eindeutig identifiziert, da es in keinem Versuch zwei oder mehr spezifische Peptide aufwies. Zu den bekannten Transkriptionsregulierenden Proteinen zählen in absteigender Reihenfolge des Scores geordnet: DNA-binding protein StpA, DNA-binding protein H-NS, Putative transcriptional regulator, Transcriptional regulator MraZ und HTH-type transcriptional repressor CytR. Jedes Protein wurde durch mehr als zwei spezifische Peptide identifiziert.

**Tabelle 8: Darstellung der TcpC-Promotor bindenden Proteine. Die Werte „Coverage“, „Score“ und „Peptides“ sind für jedes Protein angegeben. Die Anzahl der Zeilen pro Protein entspricht der Anzahl der Versuche, in denen das Protein identifiziert wurde.**

Description	Accession	Score (-10lgP)	Coverage (%)	Peptides	Unique Peptides	Avg. Mass
DNA-binding protein StpA	tr A0A0H2VCA0 A0A0H2VCA0_ECOL6	211,11	40	5	5	15360
		138,62	24	2	2	15360
Cytosol aminopeptidase	P68766 AMPA_ECOL6	199,08	16	7	7	54880
		121,75	8	3	3	54880
DNA-binding protein H-NS	P0ACF9 HNS_ECOL6	177,18	31	6	6	15540
		117,92	22	2	2	15540
5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	Q8FBM1 METE_ECOL6	156,12	7	5	5	84691
		43,01	3	2	2	84691
R4-like protein	tr Q8VR68 Q8VR68_ECOLX	139,22	18	6	5	42719
		104,41	6	2	2	42719
Uncharacterized protein	tr A0A0H2V7N7 A0A0H2V7N7_ECOL6	139,2	12	3	3	34655
		75,95	7	2	2	34655
Putative transcriptional regulator	tr A0A0H2VDP8 A0A0H2VDP8_ECOL6	128,29	10	5	5	41118
		118,72	10	3	3	41118
		59,19	3	1	1	41118
Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta	P0A837 SUCC_ECOL6	115,18	8	2	2	41393
		68,76	4	1	1	41393
50S ribosomal protein L9	P0A7R2 RL9_ECOL6	109,27	25	3	3	15769
		44,09	15	2	2	15769
Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	tr A0A0H2VBQ5 A0A0H2VBQ5_ECOL6	84,47	3	1	1	55207
		69,18	2	1	1	55207
IucD protein	tr A0A0H2VC61 A0A0H2VC61_ECOL6	77,64	7	2	2	50897
		34,3	3	1	1	50897
30S ribosomal protein S10	P0A7R6 RS10_ECOL6	74,76	15	1	1	11736
		39,49	15	1	1	11736
Branched-chain-amino-acid aminotransferase	P0AB81 ILVE_ECOL6	69,8	7	2	2	34094
		60,31	7	2	2	34094
Uncharacterized protein YheO	P64625 YHEO_ECOL6	68,62	5	1	1	26821
		28,1	5	1	1	26821
Transcriptional regulator MraZ	P65434 MRAZ_ECOL6	67,52	11	2	2	17360
		20,53	5	1	1	17360
HTH-type transcriptional repressor CytR	P0ACN8 CYTR_ECOL6	54,26	3	1	1	37820
		53,16	5	2	2	37820
50S ribosomal protein L7/L12	P0A7K3 RL7_ECOL6	28,78	10	1	1	12295
		26,44	10	1	1	12295

## 4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde mit Hilfe von uropathogenen *E. coli* GFP-Reporterstämmen gezeigt, dass bestimmte Faktoren die Genexpression von TcpC unterschiedlich beeinflussen können. Nach eigenen Erkenntnissen steigert das Vorliegen von Glucose und der neutrale pH-Wert 7 die TcpC Synthese. Deshalb wurden unter diesen Bedingungen DNA-bindende Protein identifiziert, welche an die ermittelte Promotorsequenz binden. Außerdem wurde das *tcpC* Gen in Fragmente aufgeteilt und mittels TcpC-eYFP Konstrukten die Lokalisation in der Bakterienzelle, als auch die Frequenz der eYFP-Signale innerhalb einer Kolonie bestimmt.

### 4.1 Wirkung spezieller Umgebungsfaktoren auf die TcpC Expression

Bakterien finden sich in tierischen oder menschlichen Organismen in unterschiedlichen Nischen wieder. Um eine persistierende Infektion unter wechselnden Bedingungen etablieren zu können, muss die Genexpression verändert werden. Insbesondere die Virulenzfaktoren helfen den Pathogenen zu überleben. Je nach Pathogen kann die Gesamtanzahl der Virulenzgene (sogenanntes Virulom) zwischen wenigen 100 und mehreren 1000 schwanken (Thomas and Wigneshweraraj, 2014). Die Expression des Viruloms hängt in den meisten Fällen vom gleichzeitigen Erkennen mehrerer Umgebungsstimuli (z.B. Temperatur, Verfügbarkeit essentieller Metalle, pH-Wert, Sauerstofflevel, Osmolarität) ab. In manchen Fällen wird die transkriptionelle Aktivität eines Virulenzgens bzw. Virulenzoperons durch nur ein einziges Umgebungssignal verändert (z.B. im Fall des Eisenregulators *Fur*, wessen Aktivität ausschließlich durch die Präsenz von Eisen reguliert wird (s.u.)).

Im Fall des Virulenzgens TcpC entdeckten wir die Aktivierung der Genexpression durch das gleichzeitige Vorliegen von neutralen bis basischen pH-Werten und dem Nährstoff Glucose. Glucose konnte auch bei gleichbleibendem neutralen pH-Wert die TcpC Expression konzentrationsabhängig stimulieren. Bei Austausch der Nahrungsquelle durch Trypton (Caseinverdau) hat sich hingegen keine Abhängigkeit der Expressionsstärke vom pH-Wert gezeigt (vgl. 3.1.2, 3.1.3).

Im Urin eines gesunden Menschen liegt jedoch im Normalfall nur eine sehr geringe Menge Glucose vor (1-15mg/dl) (Fine, 1965). Auch Alteri et al. haben herausgefunden, dass die natürliche Karbonquelle der uropathogenen *E. coli* im Urogenitaltrakt durch Aminosäuren und Peptide repräsentiert wird und in der Regel keine exogen vorliegende Glucose zum Wachstum benötigt wird (Alteri et al., 2009). Somit stellt der Versuchansatz mit Trypton als Nahrungsquelle für den gesunden Urogenitaltrakt das realistischere Modell dar. Hier gab es eine konstant niedrige, pH-Wert unabhängige Induktion von TcpC. Dies könnte daran liegen, dass das Bakterium mit der Aufnahme von Peptiden und Umwandlung derer zur Einspeisung in den Zitratzyklus und eventueller Gluconeogenese zur Herstellung von z.B. Peptidoglykanen bereits genug Energie verbraucht. Der Metabolismus ist vielmehr mit der Produktion von housekeeping Genen zur Aufrechterhaltung des Grundumsatzes beschäftigt. Bedingungen, unter welchen UPECs mit höheren Konzentrationen an Glucose in Kontakt kommen, sind beim Vorliegen einer diabetischen Stoffwechsellage des Wirtes oder beim Eintreten in die Blutbahn und Auslösen einer Bakteriämie z.B. im Rahmen einer Pyelonephritis gegeben. Bekannterweise haben Patienten mit Diabetes mellitus



Typ 2 ein höheres Risiko für Harnwegsinfektionen (Nitzan et al., 2015). Auch für Komplikationen wie Urosepsis, Pyelonephritis, Abszesse und emphysematöse Zystitis sind Diabetespatienten anfälliger. Eine griechische Studie von 2009 fand heraus, dass unter einer Gruppe von älteren hospitalisierten Patienten mit akuter Pyelonephritis, 30 % der Patienten mit Diabetes eine Bakteriämie hatten, wohingegen nur 11 % der Patienten ohne Diabetes unter einer Bakteriämie litten (Kofteridis et al., 2009). Ebenfalls bekannt und auch in unseren Versuchen erneut bestätigt ist, dass Glucose das Wachstum der Bakterienkolonie steigert. Somit könnte man auch die These aufstellen, dass die Dichte des Wachstums die TcpC Produktion steigert und nicht der Nährstoff Glucose selbst. Die optische Dichte als auch die mittlere Fluoreszenzstärke aller Reporterstämme unter Trypton Bedingungen war nämlich pH-Wert unabhängig gleichbleibend ähnlich. Der pH-Wert humanen Urins ist im Normalfall leicht azid mit pH-Werten zwischen 6 und 7,5. Je nach Stoffwechsellage ist die normale Spannweite 4,5- 8. Bestimmte Pathogene wie *Proteus*, *Klebsiella* und *Ureaplasma urealyticum* können durch den Abbau von Harnstoff den Urin stark alkalisieren (Bono and Reygaert, 2018). Der pH-Wert des Blutes beim Gesunden liegt zwischen 7,35 und 7,45 und der Nüchternblutzucker zwischen 60-110 mg/dl (entspricht 3,3-6,1 mmol/l). Sobald die Nierenschwelle für Glucose unter diabetischer Konstitution erreicht ist (180 mg/dl bzw. 10 mmol/l), sind die Rücktransporter im Tubulussystem überlastet und Glucose gelangt in den Urin. Obgleich des eindeutigen Wachstumseffekts von Glucose auf Bakterienkolonien wurde unter Applikation des Medikaments Natrium-Glucose-Cotransporter 2 Inhibitor (SGLT2) keine erhöhte Rate an HWI bemerkt (Liu et al., 2017). Dieses Medikament steigert die Ausscheidung von Glucose über den Urin. Trotzdem wurden im Urin diabetischer Patienten mit ASB im Vergleich zum nichtdiabetischen ASB Patienten niedrigere Werte für Interleukin 6 und Interleukin 8 gefunden, was für eine Art der Immunmodulation spricht (Geerlings et al., 2000). Ob dies nun durch das prinzipiell veränderte Immunsystem des Diabetespatienten oder aber durch immunmodulierende Virulenzfaktoren wie TcpC, welcher durch das Vorliegen von Glucose verstärkt exprimiert wird, bedingt ist, kann nach derzeitigem Wissensstand nicht eindeutig festgelegt werden.

Alternativ betrachtet, könnte die Genexpression von TcpC Nährstoff- bzw. Energieunabhängig erfolgen und je nach Bedrohungslage der Umgebung als Überlebensstrategie eingesetzt werden. Folglich wurden verschiedene markante Stimuli des Urogenitaltraktes getestet:

Es wurde bemerkt, dass das Vorliegen von Eisen die TcpC Expression konzentrationsabhängig erniedrigt. Sofern die Bakterien der Tageskulturen nach der Übernachtskultur bereits knapp an Nährstoffen waren und direkt in frische Medien mit Glucose und unterschiedlichen Eisensulfatheptahydratkonzentrationen überführt wurden, war die hemmende Wirkung des Eisens auf die TcpC Induktion deutlicher zu erkennen als bei vorheriger Adaptation auf frisches nährstoffhaltiges Medium und anschließende Zugabe unterschiedlicher Eisenmengen. Es wurde auch registriert, dass das Wachstum der Kulturen mit steigender Eisenkonzentration zunimmt (3.1.5). Eisen liegt beim Menschen im Urogenitaltrakt limitiert vor, ist allerdings für Bakterien ein essentieller Kofaktor für viele Stoffwechsellzyme, welcher bei der DNA-Biosynthese, Genregulation oder dem Zitratzyklus benötigt wird und deshalb das Wachstum und die Proliferation der Bakterien fördert. Der Eisenhaushalt von *E. coli* wird vor allem durch den Global ferric uptake regulator (Fur) und iron-responsive small regulatory non-coding RNAs (RyhB) reguliert (Masse and Gottesman, 2002; Masse et al., 2005). Neuste Studien demonstrieren, dass diese eisenhaushaltregulierenden

Proteine auch die Expression anderer Virulenzgene beeinflussen können, welche für die Produktion von Toxinen, Motilität, Stressresistenz, Biofilmbildung verantwortlich sind (Porcheron and Dozois, 2015). Unter eisenreichen Bedingungen agiert  $Fe^{2+}$ -*Fur* als negativer Regulator von *rhyB* und einigen anderen Zielgenen des Eisenaquisitionssystems, indem es sequenzspezifisch an deren Promotorregionen bindet und die Transkription verhindert. Hypothetisch betrachtet könnte  $Fe^{2+}$ -*Fur* also unter eisenreichen Bedingungen die Expression von *TcpC* inhibieren und bei Dissoziation des Eisens von *Fur* unter eisenlimitierten Bedingungen die *TcpC*-Expression nicht mehr supprimieren. Eine Vermutung wäre, dass UPECs den Urogenitaltrakt am fehlenden Eisen erkennen und *TcpC* synthetisieren, um ihrerseits nicht vom Wirt erkannt zu werden und die Populationsgröße zu sichern. Porcheron et al. zeigten bereits, dass die Knockout-Mutanten  $\Delta fur$ -*rhyB* und  $\Delta rhyB$  des Stammes CFT073 eine signifikant geringere Blasenkolonisation im murinen Modell CBA/J erreichten als der Wildtypstamm (Porcheron et al., 2014). Durch den Knockout von *rhyB* wurde unter anderem ein vermindertes Level an Siderophoren, bakterielle Eisentransportproteine (vgl. 1.7), festgestellt. Es gilt in weiteren Versuchen zu untersuchen, ob der Knockout von *fur* und/oder *rhyB* auch Auswirkungen auf die Proteinbiosynthese von *TcpC* und damit der Virulenz von UPECs hat.

Neben Eisen stellt auch Stickstoff im Urogenitaltrakt ein limitiertes Element dar. Dieser liegt zwar in Form von Harnstoff mit hoher Konzentration vor, kann jedoch von *E. coli* aufgrund mangelnder Urease-Aktivität nicht verwertet werden. Es wurde festgestellt, dass der Stickstoffmangel von den Bakterien registriert wird und Gene wie *glnA* und *glnPQ* hochreguliert werden. Diese codieren für eine Glutaminsynthetase und einen Glutaminimporter. Folglich wird der Stickstoffbedarf über Import und Synthese von Glutamin gedeckt (Snyder et al., 2004; Subashchandrabose and Mobley, 2015b). Ebenso wie bei der Eisenhaushaltsregulation könnte es auch in diesem Regulationskreis ein *Fur*-ähnliches Enzym geben, welches die Expression weiterer Virulenzgene beeinflusst. In den durchgeführten Versuchen wurde jedoch die *TcpC*-GFP Intensitätsstärke durch das Vorliegen von unterschiedlichen Stickstoffkonzentrationen bei fast allen Reporterstämmen nicht beeinflusst (vgl. 3.1.6). Fraglich ist allerdings, ob mit der Zugabe von Ammoniumchlorid die richtige Substanz und geeignete Konzentrationen gewählt wurden, um repräsentativ den Glutamingehalt des Urins darzustellen. Besser wäre es, die Aminosäure Glutamin in direkter Form hinzuzugeben und die Konzentrationen wie oben durchgeführt ebenfalls zu titrieren. Im menschlichen Organismus beträgt der Glutamingehalt im Urin 20-76 mmol pro mol Kreatinin (LaborBerlin, 2018). Alternativ könnte es sein, dass die Bakterien eben den für sie nicht zu verwertenden hohen Ureagehalt erkennen und daraufhin ihre Genexpression umstellen. Der Plasmaspiegel von Harnstoff beträgt 17-48 mg/dl, wohingegen pro Tag 24-35 g Harnstoff über den Urin ausgeschieden werden (LaborBerlin, 2019). In einer Urinstichprobe könnten somit 9-30 g/l enthalten sein, was der ca. hundertfachen Konzentration des Plasmas entspricht und somit ein adäquates Erkennungsmerkmal des Urogenitaltraktes darstellen könnte.

Das Ion Kalium stellt im Urogenitaltrakt zwar kein limitiertes Element dar, spielt jedoch in der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms eine entscheidende Rolle. Sofern extrazelluläres ATP, welches bei Zellschädigung frei wird, von der Zelle registriert wird, erfolgt ein  $K^+$ -Efflux und das Inflammasom sorgt letzten Endes für die Freisetzung von aktiver Caspase-1 und IL-1 $\beta$ , welche die angeborene Immunantwort vorantreiben (Schroder and Tschopp, 2010). Sollten UPECs in der Lage sein, den Kaliumefflux zu registrieren, könnten sie daraufhin die Produktion von *TcpC* steigern, um der

beginnenden Verteidigung des Wirtes entgegenzuwirken. Das Ergebnis der Versuche bzgl. Kaliumtitration ist nicht leicht zu interpretieren (vgl. 3.1.7). 3 h nach Inkubation der Reporterstämmen mit unterschiedlichen Kaliumchloridkonzentrationen (0-10 mM) zeigte sich nur beim Reporterstamm CFT073 p*Pc2397*;gfp*mut2*<sub>KAN</sub> eine Steigerung der Fluoreszenzintensität bei 10 mM KCl. Nach 24 h hingegen zeigten sich bei den Reporterstämmen CFT073 p*Pc2398*;gfp*mut2*<sub>KAN</sub>, CFT073 p(*Pc2397-Pc2398*);gfp*mut2*<sub>KAN</sub> und CFT073  $\Delta$ *tcpC*::gfp*mut2* eine verminderte TcpC-GFP Fluoreszenzintensität beim Vorliegen von höheren KCl Konzentrationen im Vergleich zu fehlendem Kalium. Somit kann die Hypothese, dass UPECs einen extrazellulären Kaliumanstieg bemerken, weder bestätigt noch widerlegt werden. Eine Optimierung des Versuchs könnte durch die Verwendung höherer Kaliumchloridkonzentrationen (bis zu 150 mmol/l) erfolgen. Dies entspricht der physiologischen intrazellulären K<sup>+</sup>-Konzentration.

Beim Überprüfen des Effekts von Glucose auf die Reporterstämmen wurde festgestellt, dass die GFP-TcpC Fluoreszenzintensität mit dem Wachstum der Kulturen zunimmt (vgl. 3.1.4). Bakterien sind während der Bildung eines Biofilms dazu in der Lage untereinander zu kommunizieren. Dies geschieht mittels kleiner diffusibler Signalmoleküle, auch Autoinducer genannt, welche auf einem basalen Level produziert und mit Zunahme der optischen Dichte einer Kultur vermehrt freigesetzt werden. Da die Genexpression der Autoinducer von der zellulären Dichte abhängt, wird dieses Phänomen „Quorum-sensing“ genannt (Antunes et al., 2010). Autoinducer können Membranen passieren und aktivieren oder supprimieren intrazelluläre Rezeptoren, sobald sie eine kritische Schwelle überschritten haben. Die Zielrezeptoren wiederum regulieren die Expression entsprechender Zielgene, worunter auch Virulenzgene für z.B. Toxine oder Motilität fallen. Die Hypothese, dass Autoinducerpeptide bei steigendem Wachstum der Kultur die TcpC Expression der umgebenden Bakterien verstärken, konnte nicht belegt werden (vgl. 3.1.8). Das Überstandmedium einer Übernachtskultur wurde zu frischen Medien in unterschiedlichen Verhältnissen addiert. In diesen Mischmedien wurden die Reporterstämmen inkubiert. Falls Autoinducerpeptide eine Rolle bei der Induktion der TcpC Expression spielen, müsste die Fluoreszenzintensität mit größer werdendem Anteil des Überstandmediums zunehmen. Diese blieb jedoch bei allen Mischverhältnissen ähnlich hoch. Zum einen kann es sein, dass Quorum-sensing bei der Aktivierung von TcpC keine Rolle spielt, zum anderen könnten die Versuchsbedingungen weiter variiert werden. Der Einsatz von Transwellssystemen, welche zwei Bakterienkulturen räumlich voneinander trennen, jedoch die Diffusion löslicher Stoffe zulässt, würde ein besseres Modell darstellen. Außerdem ist fraglich, ob Bakterien, welche zum Zeitpunkt der Entnahme des Überstandmediums nach Übernachtskultur bereits in der stationären Wachstumsphase sind, überhaupt noch Autoinducerpeptide produzieren. Diesbezüglich müsste auch ein Zeitpunkt in der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien gewählt werden. Um einen Effekt der frisch zugegebenen Glucose auf die Fluoreszenzintensität auszuschließen, wurde der Versuch ebenfalls mit tryptonhaltigem Minimalmedium durchgeführt.

Nicht nur Bakterien kommunizieren miteinander. Auch Zellen des Immunsystems können UPECs Reize geben, die Genexpression zu verändern. So entdeckten Cirl et al., dass die Koinkubation von CFT073 mit murinen RAW264.7 Makrophagen die Expression von TcpC verstärkt (Cirl et al., 2008). Ob dies bei zu Makrophagen differenzierten humanen THP-1 Zellen ebenfalls der Fall ist und ob dieser Effekt titrationsabhängig ist, wurde mittels eines Transwellversuchs untersucht. In diesem wurde der Reporterstamm CFT073 p*Pc2398*;gfp*mut2*<sub>KAN</sub> zu humanen Makrophagen

unterschiedlicher Dichte gegeben. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit der Makrophagenzell-dichte (vgl. 3.1.8). Somit liegt kein löslicher Faktor vor, welcher die Bakterien zur Produktion von TcpC anregt. Cirl et al. wiesen die Produktion von TcpC mittels eines Antikörpers und Westernblotanalyse nach, nachdem Bakterien mit der festen Anzahl von  $2 \times 10^6$  Makrophagen koinkubiert wurden. Hierbei wurde eine stärkere TcpC Expression beim Vorliegen der Makrophagen im Vergleich zum Fehlen von Immunzellen festgestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hingegen die Methodik der Messung der Fluoreszenzintensität der Reporterstämme benutzt. Somit sollte zur besseren Abklärung dieses Ergebnisses in einem weiteren Versuch ein polyklonaler Anti-TcpC-Antikörper die Wirkung der humanen THP-1 Zelllinie auf die TcpC Expression testen.

#### 4.2 Expression und Lokalisation der TcpC-eYFP Konstrukte in *E. coli*

Bei der *in silico* Untersuchung des Virulenzproteins TcpC wurde bereits entdeckt, dass N-terminal eine Transmembrandomäne und C-terminal die TIR-Domäne vorliegt (Cirl et al., 2008). Zur Bestätigung dieser Analyse wurden TcpC-eYFP Reporterkonstrukte erstellt und mittels Fluoreszenzmikroskopie die Expressionsstärke und Lokalisation dieser Konstrukte veranschaulicht. Die Konstrukte beinhalten unterschiedliche Abschnitte des TcpC Gens (vgl. 3.2). Von jedem dieser Reporterstämme wurden Übersichtsaufnahmen und genaue Lokalisationsaufnahmen nach 4 und 24 h erstellt. Zu erkennen war prinzipiell, dass die verschiedenen Reporterstämme unterschiedliche Fluoreszenzstärken aufweisen und auch die Verteilung der fluoreszierenden Bakterien in einer Kultur inhomogen ist. Das Vorliegen der N-terminalen Transmembrandomäne kann mithilfe des Stammes CFT073 p(*tcpC* 1-150):eYFP<sub>AMP</sub> bestätigt werden. Der Stamm ist im Vergleich zu den Stämmen, die andere TcpC-Teilstücke exprimieren, sehr wenig fluoreszent. Die Fluoreszenzsignale, die gut zu erkennen sind, befinden sich eindeutig in der Membran. Der Reporterstamm CFT073 p(*tcpC* 508-924):eYFP<sub>AMP</sub>, welcher laut *in silico* Analyse die TIR-Domäne enthält, präsentierte sich mit multifokalem Leuchten in zahlreichen Bakterien. Auffällig waren die zum Zeitpunkt 4 h nach Induktion auftretenden anormal langen Bakterien. Diese lagen ebenfalls bei den Stämmen CFT073 p(*tcpC* 1-924):eYFP<sub>AMP</sub>, CFT073 p(*tcpC* 127-924):eYFP<sub>AMP</sub> und CFT073 p(*tcpC* 1-150):eYFP<sub>AMP</sub> in abgeschwächter Form vor. Diese Filamentierung der einzelnen Bakterienzelle wurde bereits bei dem uropathogenen Stamm UTI89 während Blaseninfektionen von C3H/HeN Mäusen beschrieben (Justice et al., 2004). Die normale Länge von ca. 4  $\mu\text{m}$  wurde in bestimmten Stadien der Infektion auf im Durchschnitt 22  $\mu\text{m}$ , maximal 70  $\mu\text{m}$ , erweitert. Das Wachstum der Zelle schreitet voran, die Zellteilung jedoch wird inhibiert, sodass verlängerte Bakterien mit einer Vielzahl von chromosomalen Kopien entstehen. Auslöser der Filamentierung ist eine Reaktion auf Umgebungsstress wie z.B. Bestandteile des angeborenen Immunsystems des Wirtes,  $\beta$ -Laktam Antibiotika oder Quorum-sensing (Justice et al., 2008; Wehrens et al., 2018). Die Inhibition der Zellteilung ist ein multifaktorieller Prozess, in welchem das SOS System und dessen Sula Zellteilungsinhibitor eine wichtige Rolle spielt. Die über Sula vermittelte Teilungsinhibition verhindert vorübergehend die Zellteilung mit dem Ziel DNA-Schäden zu reparieren. Desweiteren können die langen filamentösen Bakterien von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten erschwert phagozytiert werden. Somit dient der filamentöse Status als temporärer Schutz vor Phagozytose durch das angeborene Immunsystem (Justice et al., 2004). Die filamentösen Bakterien entlassen normal große Tochterzellen, welche die umliegenden superfiziellen

Blasenepithelzellen erneut invadieren können, um dort intrazelluläre Bakterienkolonien zu errichten. Interessanterweise wurden bei TLR-4 defizienten Mäusen keinerlei filamentierte Bakterien beobachtet. Die Filamentierung der Bakterien könnte somit eine Stressreaktion nach Kontakt mit dem angeborenen Immunsystem darstellen, um unter anderem der Phagozytose zu entgehen und die Überlebenschancen im Blasenepithel zu erhöhen. (Justice et al., 2004; Justice et al., 2006).

Die in unseren Versuchen identifizierten filamentierten Bakterien wiesen mit Ausnahme von CFT073 p(*tcpC 1-150*):*eYFP*<sub>AMP</sub> alle die TIR-Domäne auf. Am eindrücklichsten ist die Filamentierung bei dem die reine TIR-Domäne enthaltenden Stamm CFT073 p(*tcpC 508-924*):*eYFP*<sub>AMP</sub>. Der Prozess der Teilungsinhibition ist als multifaktorieller Prozess mit multiplen Stimulatoren, welche in der Regel Stressoren darstellen, beschrieben worden. Zu überlegen ist, ob die Induktion und massenhafte Produktion der TcpC-eYFP Konstrukte, insbesondere in Kombination mit der Biosynthese von TIR, ein Stressor für die Bakterienzellen darstellt. Ein weiterer möglicher Stressor stellen  $\beta$ -Laktamantiotika dar. Ampicillin wurde bei allen Reporterstämmen hinzugegeben. Jedoch wies nicht jeder Stamm filamentierte Bakterienzellen auf. Folglich tritt dessen Rolle als Stimulator der Filamentierung in den Hintergrund. Nach 24 h wurden keine filamentierten Bakterien mehr gesichtet. Wahrscheinlich ist, dass die filamentierten Bakterien nach dieser Zeit Tochterzellen mit normalem Teilungsapparat und funktionsfähiger DNA, aufgrund nachlassender Konzentration der Stimuli, entlassen haben und daraufhin selbst zugrunde gegangen sind. Ein in weiteren Versuchen abzuklärender Aspekt ist die Tatsache, dass der Volllänge Stamm CFT073 p(*tcpC 1-924*):*eYFP*<sub>AMP</sub> Filamentierung aufweist, sein Korrelat mit non-leaky Plasmid CFT073 p<sub>c</sub>(*tcpC 1-924*):*eYFP*<sub>AMP</sub> jedoch nicht. Dies könnte durch andere Eigenschaften des Stammes, wie z.B. eine langsamere Expressionsrate des Plasmids, eine andere Plasmidmenge, oder eine andere Induktionsstärke, bedingt sein.

CFT073 p(*tcpC 127-507*):*eYFP*<sub>AMP</sub> besitzt zu allen Zeitpunkten das ausgeprägteste Fluoreszenzsignal. Das Leuchten auf Zellebene stellt sich vor allem durch Bildung von Aggregaten an den Zellpolen dar. Nach 24 h ist auch einheitliches zytosolisches Fluoreszieren zu erkennen. Ähnlich präsentiert sich der Reporterstamm CFT073 p(*tcpC 127-924*):*eYFP*<sub>AMP</sub>. Auch dieser weist auf Zellebene große fluoreszierende Aggregate an den Zellpolen auf und besitzt nach 24 h Induktionszeit in den meisten Bakterien ein starkes Fluoreszenzsignal. Beide Stämme beinhalten das TcpC Stück zwischen Ende der Transmembrandomäne und Anfang der TIR-Domäne (bp 127-507). Unklar ist, ob der TcpC-Abschnitt für diese Lokalisation verantwortlich ist, oder ob hier eine Aggregation des eYFP-TcpC Konstrukts aufgrund der Größe (eYFP = 26,4 kDa) oder bestimmter räumlicher Konformationsstörungen vorliegt. Es ist bereits bekannt, dass fluorochrom-getaggte Proteine innerhalb von Bakterien zur Oligomerisation neigen (Chudakov et al., 2010). Jedenfalls ist auffällig, dass die Fluoreszenzlokalisierung des Stammes CFT073 p(*tcpC 1-507*):*eYFP*<sub>AMP</sub>, welcher das gleiche Zwischendomänenstück plus die Transmembrandomäne enthält, keine Aggregate aufweist. Hier wird nur zytosolisches Leuchten bemerkt. Folglich verhindert das Addieren der Transmembrandomäne die Ausbildung deutlicher Aggregate an den Zellpolen. Ebenfalls fällt beim Vergleich der Fluoreszenzintensität der Stämme CFT073 p(*tcpC 127-507*):*eYFP*<sub>AMP</sub> und CFT073 p(*tcpC 127-924*):*eYFP*<sub>AMP</sub> mit ihren jeweiligen Korrelaten mit Transmembrandomäne auf, dass letztere nach 24 h Inkubationszeit ein deutlich schwächeres Fluoreszenzsignal aufweisen (vgl. Abb. 23). Bislang ist unbekannt auf welche Weise TcpC von Bakterien sezerniert wird. Eventuell ist dies der Hinweis darauf, dass TcpC-eYFP Proteine, welche die

Transmembrandomäne enthalten, in den Extrazellulärraum geschleust werden können und deshalb das Intensitätssignal in der Bakterienzelle deutlich geringer ist.

Die Volllänge des TcpC-Proteins wird durch die Stämme CFT073 p(*tcpC* 1-924):*eYFP*<sub>AMP</sub> (leaky Plasmid) und CFT073 p<sub>c</sub>(*tcpC* 1-924):*eYFP*<sub>AMP</sub> (non-leaky Plasmid) präsentiert. Diese zeigen in Bakterien nach 4 h und 24 h Induktion ein multifokales Leuchten. In den Übersichtsaufnahmen wiesen meist weniger als 50 % ein Fluoreszenzsignal auf, welches nach 24 h noch schwächer wurde. Somit hat es den Anschein, als sei es auch hier für die Bakterien schwer, das TcpC-eYFP Konstrukt zu exprimieren.

In einem weiteren Versuch wurde der Stamm CFT073 p<sub>c</sub>(*tcpC* 1-924):*eYFP*<sub>AMP</sub> in bestimmten Zeitabschnitten nach Induktion betrachtet. Dieser Stamm enthält ein dichtes Plasmid und exprimiert ausschließlich, nachdem induziert wurde. 50 Minuten nach Induktion erfolgte die Zunahme der allgemeinen Fluoreszenz mit dem Höhepunkt des Signals bei 90 Minuten. Nach 24 h leuchteten nur noch vereinzelt Bakterien. Auf zellulärer Ebene war im Zeitraum zwischen 10 und 90 Minuten nach Induktion nur multifokales Leuchten zu erkennen. Nach 90 Minuten bildeten sich intrazellulär filamentöse, spiralähnliche Strukturen aus. Es ist möglich, dass die Ausbildung dieser filamentähnlichen Strukturen die normale Struktur und Stoffwechsel des Bakteriums so beeinträchtigt, dass deshalb auf das TcpC-eYFP Konstrukt negativ selektiert wird. Das würde erklären, wieso sich die Fluoreszenz nach 24 h nur noch bei vereinzelt Bakterien nachweisen lässt.

Prinzipiell muss in Betracht gezogen werden, dass diese Methode der Proteindarstellung die wahre Situation verfälschen kann. Zum einen liegt durch das Einschleusen der Reporterplasmide in die Bakterienzelle eine stark erhöhte Expression des Gens vor. Dieses Expressionslevel kann von der natürlichen Physiologie stark abweichen. Zum anderen kann die Addition eines Fluorochroms an ein Peptid dessen Biochemie ändern. So kann die Bindung an Zielstrukturen, der Transport innerhalb der Zelle, Proteinfunktion und Lokalisation des Peptides beeinflusst werden. Bei zu hohem Expressionslevel eines eYFP Konstrukts kann dieses auch zytotoxisch wirken (Crivat and Taraska, 2012).

Außerdem mussten die uropathogenen Bakterien zur Untersuchung unter dem Mikroskop den S2 Bereich verlassen und wurden deshalb mithilfe von Paraformaldehyd fixiert und abgetötet. Es wurden folglich in keiner der Aufnahmen lebendige Bakterien betrachtet. Wäre die Betrachtung von lebendigen pathogenen Bakterien möglich, könnte man z.B. die Untersuchung des Stammes CFT073 p<sub>c</sub>(*tcpC* 1-924):*eYFP*<sub>AMP</sub> wiederholen und immer denselben Bildausschnitt zu unterschiedlichen Zeitpunkten wählen. Auch muss in Erwägung gezogen werden, die Zellkompartimente wie Zellmembran, Zytoplasma oder chromosomale DNA mit anderen Farbstoffen kenntlich zu machen, sodass die genaue Lokalisation der TcpC-Fragmente besser zu bewerten ist.

#### 4.3 Identifizierung Promotor-bindender Proteine des *tcpC* Gens

Wie bereits dargestellt, können verschiedene Umgebungsstimuli die Expression des TcpC Gens über vermutlich unterschiedliche Signalwege beeinflussen. Da bisher noch keine Information über einen Signalweg vorliegt, an dessen Endpunkt die Aktivierung oder Supprimierung von TcpC steht, wurde im Rahmen meiner Doktorarbeit eine Methode in unserem Labor etabliert, mit derer man Promotor-bindende Proteine auffinden kann und somit eventuell auf den Signalweg rückschließen kann (vgl. 2.2.10). Mittels magnetischer Streptavidin-gekoppelter Beads und gebundener biotinylierter DNA, welche die *tcpC* Promotorregion enthält, wurden aus einem

Wildtypspezifisch bindende Proteine identifiziert (vgl. 3.3). Um unspezifisch DNA-bindende Proteine auszusortieren, wurden alle Proteine, die auch an das unspezifische Kontroll-DNA Stück *lacZ* gebunden waren, von der weiteren Beobachtung ausgeschlossen. Um mögliche transkriptionsaktivierende Proteine zu identifizieren, wurden die Wildtyp Bakterien bei pH 7 und dem Nährstoff Glucose inkubiert. In unseren Versuchen zeigte sich hier die größte Fluoreszenzintensität (vgl. 3.1.3).

Die identifizierten Proteine lassen sich in 4 Gruppen einteilen: ribosomale Untereinheiten, Stoffwechsellzyme, Proteine noch unbekannter Funktion und bekannte transkriptionsregulierende Proteine.

Die großen ribosomalen Untereinheiten 50S L7/L12 und L9 sowie die kleine ribosomale Untereinheit 30S S10 wurden in jeweils zwei Versuchen gefunden. 50S L9 lag hierbei mit mehr als zwei spezifischen Peptiden vor und wurde damit eindeutig identifiziert. Dieses bindet im Organismus in der Regel an die 23S rRNA und initiiert als Komplex mit einer kleinen ribosomalen Untereinheit die Translation eines Gens. Aktuell gibt es keine schlüssige Erklärung für das Binden von ribosomalen Untereinheiten an das *TcpC* Genprodukt und das Phänomen ist in weiteren Experimenten zu klären.

Zu den Stoffwechsellzymen zählen Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase, Cytosol aminopeptidase, *lucD* protein, Branched-chain-amino-acid aminotransferase und 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase. Bei allen bis auf Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase wurden mehr als zwei spezifische Peptide identifiziert. Das Enzym Cytosol Aminopeptidase hat laut Literatur zwei unterschiedliche Funktionen. Zum einen prozessiert es intrazelluläre Proteine, indem es die Entfernung von N-terminalen Aminosäuren diverser Peptide katalysiert. Zum anderen sind seine DNA-bindenden Eigenschaften bereits in der transkriptionellen Regulierung des *carAB* Operons, welches für eine Carbamoylphosphatsynthetase codiert, und als Cofaktor im Rahmen des Kernproteinkomplexes Xer site-specific Rekombinationssystems bekannt. Letzteres initiiert die Monomerisierung von Plasmidmultimeren (Strater et al., 1999). 5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase katalysiert unter Vitamin B12 (Cobalamin)-restriktiver Umgebung den letzten Schritt der *de novo* Methionin Synthese, in dem eine Methylgruppe auf Homocystein zur Herstellung von Methionin übertragen wird. Auch Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta besitzt ausschließlich enzymatische Funktion im Zitratzyklus und bindet das Substrat Succinat. Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase ist an der Phosphorylierung und dem Transport zahlreicher Kohlenhydratsubstrate beteiligt. *lucD* protein ist am Lysinabbau und an der Biosynthese des Siderophors Aerobactin beteiligt. Branched-chain-amino-acid aminotransferase ist ein multifunktionales Enzym, welches an der Biosynthese von Leucin, Valin und Isoleucin beteiligt ist (UniProt, 2019). Aufgrund der oben genannten Aufgaben der gefundenen Stoffwechsellzyme lassen sich alle bis auf die zytosolische Aminopeptidase als potentielle transkriptionsregulierende Proteine von *TcpC* ausschließen, da eine DNA-bindende Funktion unbekannt bzw. äußerst unwahrscheinlich ist.

Zu drei der gefundenen Proteine gibt es bislang nur sehr wenig Information. Zum einen wurde das R4-like protein entdeckt, welches einen hohen Score aufweist. Allerdings ist die genaue Lokalisation auf dem Genom nicht bekannt. Zum anderen gibt es das Uncharacterized protein, welches nur als hypothetisches Protein des Gens *c0934*

gelistet ist. Die Funktion dieses Proteins ist nicht bekannt. Zuletzt band auch das durch weniger als zwei spezifische Peptide nicht eindeutig identifizierte Uncharacterized protein YheO an die TpcC Promotor DNA. Dieses wird als putativ DNA-bindender transkriptioneller Regulator des *tusBCD* Operons vermutet. TusBCD stellt einen Sulfattransferasekomplex dar. YheO beinhaltet zwei spezielle Motive. Zum einen ein Helix-turn-helix (HTH) Motiv, mit dem die Bindung an DNA erfolgt und zum anderen eine PAS Domäne (Per-Arnt-Sim), welche in vielen Signalmolekülen als Sensor funktioniert (Nakayashiki et al., 2013).

Die letzte Gruppe beinhaltet die bereits bekannten transkriptionsregulierenden Proteine DNA-binding protein StpA, DNA-binding protein H-NS, Putative transcriptional regulator, Transcriptional regulator MraZ und HTH-type transcriptional repressor CytR, welche alle durch mehr als zwei spezifische Peptide als eindeutig identifiziert gelten.

StpA und H-NS verzeichnen mit die höchsten Scores und ähneln sich in zahlreichen Eigenschaften. Sie gehören beide zu den Nucleotid-assoziierten Molekülen, haben eine Rolle in der Strukturierung und Verpackung der DNA und in der Regulation von diversen Genen. StpA stellt ein Homolog von H-NS dar und ähnelt diesem in der Aminosäureabfolge zu 58% (Zhang and Belfort, 1992). Tatsächlich wird StpA von H-NS negativ reguliert und H-NS kann seine Funktion der Genregulation ohne StpA als molekularen Adaptor an der DNA nicht erfüllen. StpA weist nämlich eine bis zu sechsfach höherer Affinität zu DNA auf als H-NS. H-NS und StpA bilden in Erfüllung ihrer Funktion Heterodimere aus. Bindet solch ein Heterodimer z.B. an das *bgl* Operon, welches für Proteine zur Aufnahme und Verwertung von  $\beta$ -glucosidalen Zuckern codiert, wird die Ablesung der Strukturgene supprimiert (Free et al., 1998). StpA kann des Weiteren auch mit RNA interagieren, was zur Annahme führte, dass es auch in der Lage ist, DNA und RNA Prozesse zu koppeln und somit die Transkription und Translation zu koordinieren. StpA behindert zudem Nucleasen daran doppelsträngige DNA abzubauen, indem es mehrere DNA Helices über Brücken zusammenbindet und somit die chromosomale DNA kondensiert (Keatch et al., 2005). Auch H-NS alleine ist ein pleiotroper, in der Zelle reichlich vorkommender homodimerbildender negativer Regulator von diversen Genen, die einen AT-reichen DNA Abschnitt beinhalten. (Fang and Rimsky, 2008). H-NS ist bei der Veränderung der Genexpression aufgrund von diverser Umweltstimuli und Stressoren beteiligt und spielt damit eine Rolle in der Virulenz des Pathogens. So ist H-NS z.B. an der Biosynthese von Flagellen (Bertin et al., 1994), der Regulation von Strukturgenen der Typ 1 Fimbrien (Donato et al., 1997), der Säureresistenz (Shin et al., 2005), und der osmotischen Resistenz (Lucht et al., 1994) beteiligt. Aufgrund der bereits geschilderten Biologie von StpA und H-NS liegt die Vermutung nahe, dass diese an unserem TpcC-Promotor ein Heterodimer gebildet haben. Bislang wurden alle von StpA und H-NS regulierten Gene durch Bindung des Hetero- oder Homodimers negativ reguliert. Ob H-NS auch Gen-aktivierend agieren kann, ist bislang nicht bekannt. Interessanterweise kodiert die serU Pathogenitätsinsel für ein DNA-bindendes Protein H-NS auf dem Genlocus *c2411*. Das in diesem Pulldownversuch detektierte H-NS entspringt jedoch dem Genlocus *c1701*. Somit gilt es in weiteren Experimenten zu untersuchen, ob das auf der gleichen Pathogenitätsinsel liegende H-NS Protein ebenfalls *tcpC* reguliert.

Der Putative transcriptional regulator wurde als einziges Protein in allen drei Wiederholungen des Pulldowns gefunden. Das Protein besitzt zur Bindung von DNA zwar ein HTH-Motiv, zur genaueren Funktion bei UPECs ist bislang jedoch nichts bekannt. Allerdings gibt es bei dem für Vögel pathogenen extraintestinalen *E. coli* Stamm BEN2908 ein auf der Aminosäuresequenz basierendes zu 99% homologes



Protein namens *aec35* (Avian *Escherichia coli*) (Chouikha et al., 2006). Das Gen Cluster *aec-35 – aec-37* ist im Kohlenhydrattransport- und Metabolismus involviert. Das *Aec-35* Produkt ist homolog zu den transkriptionellen Regulatoren der *LacI*-Familie (Lactose inhibitor). D.h. es besitzt eine DNA-bindende Domäne und eine Zucker-bindende Domäne. Deletion dieses Clusters beeinflusst die Adaptierung auf sieben verschiedene Kohlenhydrate, darunter auch Glucose, schwächt die Wachstumsrate ab und reduziert die *in vivo* Virulenz des *E. coli* BEN2908. Die Proteine der *LacI* Familie wirken transkriptionssupprimierend auf die Proteine des Kohlenhydratmetabolismus ein. Daraus abgeleitet besteht die Möglichkeit, dass der Putative transcriptional regulator im Rahmen der Kohlenhydratverwertung der im Minimalmedium vorliegenden Glucose aktiviert wird und darüberhinaus auch den Promotor des Virulenzgens *TcpC* ansteuert.

Transcriptional regulator *MraZ* ist bekanntlich in der Kontrolle von ca. 100 Genen für Zellteilung und Zellwandsynthese in vorwiegend supprimierender Rolle aktiv (Eraso et al., 2014). Es reguliert die eigene Expression negativ und interagiert direkt durch Bindung an die DNA. Deshalb wird vermutet, dass *MraZ* auch außerhalb des *division cell wall (dcw)*- Clusters Gene regulieren kann.

HTH-type transcriptional repressor *CytR* gehört ebenfalls zu der *LacI*-Familie der transkriptionsregulierenden Proteine. *CytR* (Cytidine Regulator) beeinflusst Gene für den Transport und die Benutzung von Ribonucleosiden und Desoxyribonucleosiden. *CytR* selbst benötigt zur adäquaten DNA-Bindung den Aktivator CRP (cAMP receptor protein). Beide bilden daraufhin ein Dimer und haben supprimierende Wirkung. CRP alleine wirkt aktivierend auf Promotoren ein (Sernova and Gelfand, 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das einzige Protein, welches bei allen drei Versuchswiederholungen des Pulldowns und der anschließenden massenspektromischen Untersuchung gefunden wurde, der Putativ transcriptional regulator ist. Allerdings ist dessen genaue Funktion bei UPECs wie oben erwähnt, noch nicht erforscht und zudem wurde hier nur die cDNA gefunden und darausschlussfolgernd auf die entsprechende Aminosäuresequenz geschlossen (Kürzel **trj**). Deshalb gewinnen die wirklich vorgefundenen Proteine mit dem höchsten Score und der höchsten Coverage, obgleich sie nur bei zwei Versuchen identifiziert wurden, an Bedeutung. Darunter fallen das DNA-binding protein H-NS und die Cytosol Aminopeptidase. Das ebenfalls nur in Form von cDNA vorgefundene Protein DNA-binding protein *StpA* ist bekanntlich zur Bildung von Oligomeren befähigt und könnte hypothetisch betrachtet mit den zwei anderen Proteinen einen transkriptionsregulierenden Komplex bilden. Viele der oben beschriebenen Proteine sind in der Literatur als transkriptionssupprimierende Regulatoren beschrieben. Ob diese Regulationsproteine im Fall der Regulation von *TcpC* auch aktivierende Wirkung besitzen, muss mit weiteren Pulldowns näher untersucht werden.

Im oben erläuterten Pulldown wurden die Kulturbedingungen (pH7 und Glucose als Nährstoff) gewählt, welche die Expression von *TcpC* fördern. Ob z.B. *StpA* und H-NS auch in Kulturbedingungen (pH5 und Glucose als Nährstoff), welche die *TcpC* Expression nicht aktivieren, in noch höherer Konzentration und mit besserer Coverage/ Score vorliegen, oder gar gänzlich fehlen, bleibt ausstehend. Mit diesem Vergleich zweier unterschiedlicher Übernachtskulturen, könnte man erste Rückschlüsse auf die Funktion der DNA-bindenden Proteine schließen. Sollte man mehrere potentielle *TcpC*-regulierenden Proteine identifiziert haben, könnte man Knockout-Mutanten erstellen und erneut mittels *TcpC*-Reporterstämmen die *TcpC*-Promotoraktivität oder mit einem Anti-*TcpC*-Antikörper die Expressionsstärke bestimmen. Aufgrund der

Tatsache, dass manche DNA-bindende Proteine zur Ausübung ihrer Funktion gewisse Kofaktoren wie z.B.  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{3+}$  oder  $\text{Mn}^{2+}$  benötigen, ist es möglich, dass weitere TcpC-Promotor bindende Proteine nicht identifiziert wurden (Ma et al., 2011). Man sollte in Betracht ziehen, diese Kofaktoren zum Medium der Übernachtskultur zu addieren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

### Hintergrund:

Toll/IL1 receptor domain-containing protein C (TcpC) ist ein Virulenzfaktor des uropathogenen *Escherichia coli* Stammes CFT073, welcher das humane angeborene Immunsystem durch direkte Bindung an Signalmoleküle der Toll-like Rezeptor-Signalwege und des NACHT leucin-rich-repeat-PYD-protein 3-Inflammasoms (NLRP3) unterwandert. Toll-like Rezeptor 4 und das Adaptermolekül Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) werden inhibiert, wodurch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells (NF- $\kappa$ B) verhindert wird. Dies resultiert in einer verringerten Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und endet in verspäteter Abwehr gegen Pathogene in den harnableitenden Wegen. Die medizinische Bedeutung von TcpC wird dadurch klar, dass bei ca. 40 % der Patienten, welche unter einer Nierenbeckenentzündung litten, ein *Escherichia coli* Stamm gefunden wurde, welcher das *tcpC* Gen trägt. Bei den Kontrollen, welche durch fäkale *Escherichia coli* Stämme gesunder Individuen präsentiert wurden, war das nur bei 8 % der Fall.

### Zielsetzung:

Aufgrund der zunehmenden Resistenz der Pathogene gegenüber Antibiotika ist es notwendig neue therapeutische Wege gegen Harnwegsinfektionen zu finden. Da TcpC zur besonderen Schwere von Harnwegsinfektionen beiträgt, sollten in dieser Arbeit die Bedingungen, welche zu einer TcpC Expression führen, analysiert werden. Ein weiteres Ziel war die Identifizierung der Lokalisation des TcpC Promotors und daran bindende regulierende Transkriptionsfaktoren. Auch die TcpC Lokalisation und Expression im Bakterium sollte genauer definiert werden.

### Methodik:

Zur Analyse der Umweltbedingungen wurde die Induktion des TcpC-Promotors mithilfe von TcpC-GFP Reporterstämmen (green fluorescent protein) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Kulturen wurden zuvor in M9 Minimalmedium mit variierenden Bedingungen (pH-Wert, Nährstoff, Ionen, Kokulturen) gezüchtet. Die Identifizierung DNA-bindender Proteine an den TcpC-Promotor erfolgte mithilfe von magnetischen Streptavidin-gekoppelten Beads und anschließender massenspektrometrischen Untersuchung. Die Lokalisationsbestimmung der TcpC-eYFP Fragmente (enhanced yellow fluorescent protein) erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop.

### Ergebnis:

Der TcpC-Promotor wird durch den Nährstoff Glucose bei pH-Werten von 7 und 8 stärker induziert als bei pH-Wert 5 und 6. Austausch des Nährstoffes durch ein Aminosäurengemisch induziert den TcpC-Promotor nicht. Die Promotorinduktion korreliert direkt positiv mit der Glucosekonzentration. Das im Urogenitaltrakt limitierte Metall Eisen supprimiert mit steigender Konzentration den TcpC-Promotor. Das Vorliegen von ebenfalls im natürlichen Milieu limitierten Stickstoff hat jedoch keine Auswirkung auf den TcpC-Promotor. Die Wirkung von Kalium ist unklar. Die Proteine DNA-binding protein H-NS und Cytosol Aminopeptidase wurden als bestmögliche transkriptionsregulierende Kandidaten von TcpC ermittelt. Im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie konnte die N-terminale Transmembrandomäne von TcpC

erstmalig funktionell bestätigt werden. Die induzierte Expression von einigen TcpC-eYFP Konstrukten führte zu einer Teilungsdefizienz der Bakterien, welche am stärksten bei dem die TIR-Domäne enthaltenden Konstrukt zu erkennen war. Volllänge TcpC bildete 90 Minuten nach Induktion filamentöse intrazelluläre Strukturen aus.

Ausblick:

Diese Arbeit liefert erste Hinweise bezüglich der genomischen Regulation des Pathogenitätsfaktors TcpC und liefert daran potentiell beteiligte Transkriptionsfaktoren. Diese könnten in Zukunft gezielt inhibiert/aktiviert werden, um die Expression von TcpC zu verringern und damit eine Beeinflussung des menschlichen Immunsystems durch pathogene *Escherichia coli* zu verhindern. Dies könnte ein zukünftiger Ansatz sein, um das Auftreten von komplizierten, bereits Antibiotika-resistenten Harnwegsinfekten zu verringern.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Adachi, O., Kawai, T., Takeda, K., Matsumoto, M., Tsutsui, H., Sakagami, M., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity* 9, 143-150.

Akira, S., and Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.

Alaidarous, M., Ve, T., Casey, L.W., Valkov, E., Ericsson, D.J., Ullah, M.O., Schembri, M.A., Mansell, A., Sweet, M.J., and Kobe, B. (2014). Mechanism of bacterial interference with TLR4 signaling by *Brucella* Toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein TcpB. *J Biol Chem* 289, 654-668.

Alteri, C.J., Himpfl, S.D., and Mobley, H.L. (2015). Preferential use of central metabolism in vivo reveals a nutritional basis for polymicrobial infection. *PLoS Pathog* 11, e1004601.

Alteri, C.J., Smith, S.N., and Mobley, H.L. (2009). Fitness of *Escherichia coli* during urinary tract infection requires gluconeogenesis and the TCA cycle. *PLoS Pathog* 5, e1000448.

Amann, E., Ochs, B., and Abel, K.J. (1988). Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69, 301-315.

Antunes, L.C., Ferreira, R.B., Buckner, M.M., and Finlay, B.B. (2010). Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* 156, 2271-2282.

Aronson, M., Medalia, O., Amichay, D., and Nativ, O. (1988). Endotoxin-induced shedding of viable uroepithelial cells is an antimicrobial defense mechanism. *Infect Immun* 56, 1615-1617.

AWMF (2017): Leitlinienprogramm DGU, AWMF: Interdisziplinäre S3 Leitlinie: Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten. , Kurzversion 1.1.-2, 2017 AWMF Registernummer: 2043/2044. Online: [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/043-044](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-044), Stand: 03.08.2018.

Bertin, P., Terao, E., Lee, E.H., Lejeune, P., Colson, C., Danchin, A., and Collatz, E. (1994). The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176, 5537-5540.

Bono, M.J., and Reygaert, W.C. (2018). Urinary Tract Infection. In *StatPearls* (Treasure Island (FL)).

Broz, P., and Monack, D.M. (2013). Newly described pattern recognition receptors team up against intracellular pathogens. *Nat Rev Immunol* 13, 551-565.

Cai, W., Wannemuehler, Y., Dell'anna, G., Nicholson, B., Barbieri, N.L., Kariyawasam, S., Feng, Y., Logue, C.M., Nolan, L.K., and Li, G. (2013). A novel two-component signaling system facilitates uropathogenic *Escherichia coli*'s ability to exploit abundant host metabolites. *PLoS Pathog* 9, e1003428.

Chouikha, I., Germon, P., Bree, A., Gilot, P., Moulin-Schouleur, M., and Schouler, C. (2006). A *selC*-associated genomic island of the extraintestinal avian pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908 is involved in carbohydrate uptake and virulence. *J Bacteriol* 188, 977-987.

Chudakov, D.M., Matz, M.V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2010). Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol Rev* 90, 1103-1163.

Cirl, C., and Miethke, T. (2010). Microbial Toll/interleukin 1 receptor proteins: a new class of virulence factors. *Int J Med Microbiol* 300, 396-401.

Cirl, C., Wieser, A., Yadav, M., Duerr, S., Schubert, S., Fischer, H., Stappert, D., Wantia, N., Rodriguez, N., Wagner, H., *et al.* (2008). Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins. *Nat Med* 14, 399-406.

Cottrell, J.S. (2011). Protein identification using MS/MS data. *J Proteomics* 74, 1842-1851.

Crivat, G., and Taraska, J.W. (2012). Imaging proteins inside cells with fluorescent tags. *Trends Biotechnol* 30, 8-16.

Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., and Finlay, B.B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 26, 822-880.

Debnath, I., Norton, J.P., Barber, A.E., Ott, E.M., Dhakal, B.K., Kulesus, R.R., and Mulvey, M.A. (2013). The Cpx stress response system potentiates the fitness and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 81, 1450-1459.

Donato, G.M., Lelivelt, M.J., and Kawula, T.H. (1997). Promoter-specific repression of *fimB* expression by the *Escherichia coli* nucleoid-associated protein H-NS. *J Bacteriol* 179, 6618-6625.

Eraso, J.M., Markillie, L.M., Mitchell, H.D., Taylor, R.C., Orr, G., and Margolin, W. (2014). The highly conserved MraZ protein is a transcriptional regulator in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 196, 2053-2066.

Fang, F.C., and Rimsky, S. (2008). New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Curr Opin Microbiol* 11, 113-120.

Fine, J. (1965). Glucose Content of Normal Urine. *Br Med J* 1, 1209-1214.

Foxman, B. (2002). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med* 113 Suppl 1A, 5S-13S.

Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol* 7, 653-660.

Foxman, B., Barlow, R., D'Arcy, H., Gillespie, B., and Sobel, J.D. (2000). Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol* 10, 509-515.

Free, A., Williams, R.M., and Dorman, C.J. (1998). The StpA protein functions as a molecular adapter to mediate repression of the *bgl* operon by truncated H-NS in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180, 994-997.

Freeman, Z.N., Dorus, S., and Waterfield, N.R. (2013). The KdpD/KdpE two-component system: integrating K(+) homeostasis and virulence. *PLoS Pathog* 9, e1003201.

Geerlings, S.E., Brouwer, E.C., Van Kessel, K.C., Gaastra, W., Stolk, R.P., and Hoepelman, A.I. (2000). Cytokine secretion is impaired in women with diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 30, 995-1001.

Groisman, E.A., and Mouslim, C. (2006). Sensing by bacterial regulatory systems in host and non-host environments. *Nat Rev Microbiol* 4, 705-709.

Justice, S.S., Hung, C., Theriot, J.A., Fletcher, D.A., Anderson, G.G., Footer, M.J., and Hultgren, S.J. (2004). Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1333-1338.

Justice, S.S., Hunstad, D.A., Cegelski, L., and Hultgren, S.J. (2008). Morphological plasticity as a bacterial survival strategy. *Nat Rev Microbiol* 6, 162-168.

Justice, S.S., Hunstad, D.A., Seed, P.C., and Hultgren, S.J. (2006). Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19884-19889.

Jutras, B.L., Verma, A., and Stevenson, B. (2012). Identification of novel DNA-binding proteins using DNA-affinity chromatography/pull down. *Curr Protoc Microbiol Chapter 1, Unit1F 1*.

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 11, 115-122.

Kawai, T., and Akira, S. (2006). TLR signaling. *Cell Death Differ* 13, 816-825.

Keatch, S.A., Leonard, P.G., Ladbury, J.E., and Dryden, D.T. (2005). StpA protein from *Escherichia coli* condenses supercoiled DNA in preference to linear DNA and protects it from digestion by DNase I and EcoKI. *Nucleic Acids Res* 33, 6540-6546.

Kofteridis, D.P., Papadimitraki, E., Mantadakis, E., Maraki, S., Papadakis, J.A., Tzifa, G., and Samonis, G. (2009). Effect of diabetes mellitus on the clinical and microbiological features of hospitalized elderly patients with acute pyelonephritis. *J Am Geriatr Soc* 57, 2125-2128.

Kumar, M., and Sourjik, V. (2012). Physical map and dynamics of the chaperone network in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 84, 736-747.

LaborBerlin (2018): Stoffwechsel. Online: <http://www.laborberlin.com/leistungsverzeichnis.html?k=9&ue1=1162&u=5258&index>, Stand: 29.9.2018.

LaborBerlin (2019): Harnstoff. Online: <http://www.laborberlin.com/leistungsverzeichnis.html?k=1&ue1=56>, Stand: 21.06.2019.

Landini, P., Egli, T., Wolf, J., and Lacour, S. (2014). sigmaS, a major player in the response to environmental stresses in *Escherichia coli*: role, regulation and mechanisms of promoter recognition. *Environ Microbiol Rep* 6, 1-13.

Leffler, H., and Svanborg-Eden, C. (1981). Glycolipid receptors for uropathogenic *Escherichia coli* on human erythrocytes and uroepithelial cells. *Infect Immun* 34, 920-929.

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86, 973-983.

Liu, J., Li, L., Li, S., Jia, P., Deng, K., Chen, W., and Sun, X. (2017). Effects of SGLT2 inhibitors on UTIs and genital infections in type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* 7, 2824.

Lucht, J.M., Dersch, P., Kempf, B., and Bremer, E. (1994). Interactions of the nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS with the regulatory region of the osmotically controlled *proU* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 269, 6578-6578.

Ma, Z., Lee, J.W., and Helmann, J.D. (2011). Identification of altered function alleles that affect *Bacillus subtilis* PerR metal ion selectivity. *Nucleic Acids Res* 39, 5036-5044.

Marles-Wright, J., and Lewis, R.J. (2007). Stress responses of bacteria. *Curr Opin Struct Biol* 17, 755-760.

Masse, E., and Gottesman, S. (2002). A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4620-4625.

Masse, E., Vanderpool, C.K., and Gottesman, S. (2005). Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187, 6962-6971.

Mobley, H.L. (2016). Measuring *Escherichia coli* Gene Expression during Human Urinary Tract Infections. *Pathogens* 5.

Mobley, H.L., Green, D.M., Trifillis, A.L., Johnson, D.E., Chippendale, G.R., Lockett, C.V., Jones, B.D., and 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**, 1281-1289.

Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Martinez, J.J., and Hultgren, S.J. (2000). Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8829-8835.

Nakayashiki, T., Saito, N., Takeuchi, R., Kadokura, H., Nakahigashi, K., Wanner, B.L., and Mori, H. (2013). The tRNA thiolation pathway modulates the intracellular redox state in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **195**, 2039-2049.

Newman, R.M., Salunkhe, P., Godzik, A., and 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**, 594-601.

Nitzan, O., Elias, M., Chazan, B., and Saliba, W. (2015). Urinary tract infections in patients with type 2 diabetes mellitus: review of prevalence, diagnosis, and management. *Diabetes Metab Syndr Obes* **8**, 129-136.

O'Neill, L.A., and Bowie, A.G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* **7**, 353-364.

Orikasa, S., and Hinman, F., Jr. (1977). Reaction of the vesical wall to bacterial penetration: resistance to attachment, desquamation, and leukocytic activity. *Invest Urol* **15**, 185-193.

Palaniyandi, S., Mitra, A., Herren, C.D., Lockatell, C.V., Johnson, D.E., Zhu, X., and Mukhopadhyay, S. (2012). BarA-UvrY two-component system regulates virulence of uropathogenic *E. coli* CFT073. *PLoS One* **7**, e31348.

Pasi, S., Kant, R., and Surolia, A. (2016). Toll/Interleukin-1 Receptor Domain Derived from TcpC (TIR-TcpC) Ameliorates Experimental Autoimmune Arthritis by Down-modulating Th17 Cell Response. *J Biol Chem* **291**, 12358-12369.

Patterson, N.J., and Werling, D. (2013). To con protection: TIR-domain containing proteins (Tcp) and innate immune evasion. *Vet Immunol Immunopathol* **155**, 147-154.

Plos, K., Connell, H., Jodal, U., Marklund, B.I., Marild, S., Wettergren, B., and Svanborg, C. (1995). Intestinal carriage of P fimbriated *Escherichia coli* and the susceptibility to urinary tract infection in young children. *J Infect Dis* **171**, 625-631.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085-2088.

Porcheron, G., and Dozois, C.M. (2015). Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. *Vet Microbiol* **179**, 2-14.

Porcheron, G., Habib, R., Houle, S., Caza, M., Lepine, F., Daigle, F., Masse, E., and Dozois, C.M. (2014). The small RNA RyhB contributes to siderophore production and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 82, 5056-5068.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671-675.

Schroder, K., and Tschopp, J. (2010). The inflammasomes. *Cell* 140, 821-832.

Schubert, S., Norenberg, D., Clermont, O., Magistro, G., Wieser, A., Romann, E., Hoffmann, C., Weinert, K., and Denamur, E. (2010). Prevalence and phylogenetic history of the TcpC virulence determinant in *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* 300, 429-434.

Searle, B.C. (2010). Scaffold: a bioinformatic tool for validating MS/MS-based proteomic studies. *Proteomics* 10, 1265-1269.

Sernova, N.V., and Gelfand, M.S. (2012). Comparative genomics of CytR, an unusual member of the LacI family of transcription factors. *PLoS One* 7, e44194.

Sheerin, N.S. (2011). Urinary tract infection. *Medicine* 39, 384-389.

Shin, M., Song, M., Rhee, J.H., Hong, Y., Kim, Y.J., Seok, Y.J., Ha, K.S., Jung, S.H., and Choy, H.E. (2005). DNA looping-mediated repression by histone-like protein H-NS: specific requirement of Esigma70 as a cofactor for looping. *Genes Dev* 19, 2388-2398.

Snyder, G.A., Cirl, C., Jiang, J., Chen, K., Waldhuber, A., Smith, P., Rommler, F., Snyder, N., Fresquez, T., Durr, S., *et al.* (2013). Molecular mechanisms for the subversion of MyD88 signaling by TcpC from virulent uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 6985-6990.

Snyder, J.A., Haugen, B.J., Buckles, E.L., Lockett, C.V., Johnson, D.E., Donnenberg, M.S., Welch, R.A., and Mobley, H.L. (2004). Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun* 72, 6373-6381.

Sommer, E. (2011). In vivo study of the two-component signaling network in *Escherichia coli* (Ruperto Carola Universität Heidelberg).

Spear, A.M., Loman, N.J., Atkins, H.S., and Pallen, M.J. (2009). Microbial TIR domains: not necessarily agents of subversion? *Trends Microbiol* 17, 393-398.

Spurbeck, R.R., Dinh, P.C., Jr., Walk, S.T., Stapleton, A.E., Hooton, T.M., Nolan, L.K., Kim, K.S., Johnson, J.R., and Mobley, H.L. (2012). *Escherichia coli* isolates that carry *vat*, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. *Infect Immun* 80, 4115-4122.

Spurbeck, R.R., Stapleton, A.E., Johnson, J.R., Walk, S.T., Hooton, T.M., and Mobley, H.L. (2011). Fimbrial profiles predict virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strains: contribution of *ygi* and *yad* fimbriae. *Infect Immun* 79, 4753-4763.

Strater, N., Sherratt, D.J., and Colloms, S.D. (1999). X-ray structure of aminopeptidase A from *Escherichia coli* and a model for the nucleoprotein complex in Xer site-specific recombination. *EMBO J* 18, 4513-4522.

Subashchandrabose, S., and Mobley, H.L. (2015a). Back to the metal age: battle for metals at the host-pathogen interface during urinary tract infection. *Metallomics* 7, 935-942.

Subashchandrabose, S., and Mobley, H.L. (2015b). Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 3.

Thomas, M.S., and Wigneshweraraj, S. (2014). Regulation of virulence gene expression. *Virulence* 5, 832-834.

Touchon, M., Hoede, C., Tenaillon, O., Barbe, V., Baeriswyl, S., Bidet, P., Bingen, E., Bonacorsi, S., Bouchier, C., Bouvet, O., *et al.* (2009). Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* 5, e1000344.

UniProt, C. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 47, D506-D515.

Ve, T., Williams, S.J., and Kobe, B. (2015). Structure and function of Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein (TIR) domains. *Apoptosis* 20, 250-261.

Waldhuber, A., Puthia, M., Wieser, A., Cirl, C., Durr, S., Neumann-Pfeifer, S., Albrecht, S., Rommler, F., Muller, T., Zheng, Y., *et al.* (2016a). Uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 disrupts NLRP3 inflammasome activation. *J Clin Invest* 126, 2425-2436.

Waldhuber, A., Snyder, G.A., Rommler, F., Cirl, C., Muller, T., Xiao, T.S., Svanborg, C., and Miethke, T. (2016b). A Comparative Analysis of the Mechanism of Toll-Like Receptor-Disruption by TIR-Containing Protein C from Uropathogenic *Escherichia coli*. *Pathogens* 5.

Wehrens, M., Ershov, D., Rozendaal, R., Walker, N., Schultz, D., Kishony, R., Levin, P.A., and Tans, S.J. (2018). Size Laws and Division Ring Dynamics in Filamentous *Escherichia coli* cells. *Curr Biol* 28, 972-979 e975.

Welch, R.A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E.L., Liou, S.R., Boutin, A., Hackett, J., *et al.* (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 17020-17024.

Wright, K.J., Seed, P.C., and Hultgren, S.J. (2007). Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell Microbiol* 9, 2230-2241.

Wullt, B., Bergsten, G., Samuelsson, M., Gebretsadik, N., Hull, R., and Svanborg, C. (2001). The role of P fimbriae for colonization and host response induction in the human urinary tract. *J Infect Dis* 183 Suppl 1, S43-46.

Wullt, B., Bergsten, G., Samuelsson, M., and Svanborg, C. (2003). Der Einfluss von P-Fimbrien auf eine Leukozyturie und den Schwellenwert einer persistierenden Bakteriurie. *Der Urologe, Ausgabe A* 42, 233-237.

Yadav, M., Zhang, J., Fischer, H., Huang, W., Lutay, N., Cirl, C., Lum, J., Miethke, T., and Svanborg, C. (2010). Inhibition of TIR domain signaling by TcpC: MyD88-dependent and independent effects on *Escherichia coli* virulence. *PLoS Pathog* 6, e1001120.

Zaslaver, A., Bren, A., Ronen, M., Itzkovitz, S., Kikoin, I., Shavit, S., Liebermeister, W., Surette, M.G., and Alon, U. (2006). A comprehensive library of fluorescent transcriptional reporters for *Escherichia coli*. *Nat Methods* 3, 623-628.

Zhang, A., and Belfort, M. (1992). Nucleotide sequence of a newly-identified *Escherichia coli* gene, *stpA*, encoding an H-NS-like protein. *Nucleic Acids Res* 20, 6735.

Zhang, L., and Foxman, B. (2003). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* mediated urinary tract infections. *Front Biosci* 8, e235-244.

## 7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

	Seite
Abbildung 1: Darstellung der ableitenden Harnwege mit entsprechenden Infektionsregionen. ....	3
Abbildung 2: TLR getriggerte Immunantwort. Darstellung der TLR mit entsprechendem Stimulus und intrazellulären Adaptormolekülen .....	7
Abbildung 3: Darstellung des durch TLR4 und TLR3 aktivierten Signalweges.....	8
Abbildung 4: Vergleich der Tertiärstruktur der TIR-Domäne von TLR1 und der vorhergesagten TIR-Domänen von TcpC und TcpB .....	9
Abbildung 5: Darstellung der drei Aktivierungswege des NLRP3-Inflammasoms und anschließenden Aktivierung von IL-1 $\beta$ . ....	13
Abbildung 6: Darstellung der verschiedenen TcpC-GFP Reporterkonstrukte .....	37
Abbildung 7: Mittlere Fluoreszenzstärke der GFP-Reporterstämme sowie des Kontrollstammes CFT073 $p_{AMP}$ nach Übernachtskultur in humanem Urin.....	38
Abbildung 8: pH-Wert Abhängigkeit der GFP-Reporterstämme bei Nährstoffquelle Trypton. ....	39
Abbildung 9: pH-Wert Abhängigkeit der GFP-Reporterstämme bei Nährstoffquelle Glucose. ....	40
Abbildung 10: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität des Reporterstammes CFT073 $p_{Pc2398};gfpmut2_{KAN}$ von der Glucose-Konzentration .....	42
Abbildung 11: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der restlichen Reporterstämme von der minimalen und maximal verwendeten Glucosekonzentration.....	43
Abbildung 12: Signalstärke und OD <sub>600</sub> des Reporterstammes CFT073 $p_{Pc2398};gfpmut2_{KAN}$ ohne vorherige Adaptation auf frisches Medium bei Vorliegen von FeSO <sub>4</sub> .....	44
Abbildung 13: Mittlere Fluoreszenzintensität des Reporterstammes CFT073 $p_{Pc2398};gfpmut2_{KAN}$ mit vorheriger Adaptation nach 3 h und 24 h bei Vorliegen von FeSO <sub>4</sub> .....	45
Abbildung 14: Mittlere Fluoreszenzintensität der restlichen Reporterstämme nach 3 h und 24 h bei minimaler und maximaler FeSO <sub>4</sub> Konzentration .....	46
Abbildung 15: Abhängigkeit der mittleren Fluoreszenzintensität des Reporterstammes CFT073 $p_{Pc2398};gfpmut2_{KAN}$ von der Ammoniumchloridkonzentration. ....	47

Abbildung 16: Abhängigkeit der mittleren Signalintensität der restlichen Reporterstämme von der Ammoniumchloridkonzentration.....	48
Abbildung 17: Abhängigkeit des Fluoreszenzsignals des Reporterstammes CFT073 pPc2398;gfpmut2 <sub>KAN</sub> von der KCl Konzentration nach 3 h und 24 h .....	49
Abbildung 18: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität der restlichen Reporterstämme von der Kaliumchloridkonzentration nach 3 h und 24 h .....	50
Abbildung 19: Fluoreszenzintensität der Reporterstämme CFT073 pPc2398;gfpmut2 <sub>KAN</sub> und CFT073 p(Pc2397-Pc2398);gfpmut2 <sub>KAN</sub> unter Glucose oder Tryptonbedingungen zusammen mit unterschiedlichen Verhältnissen von Überstandmedium und neuem Medium .....	52
Abbildung 20: Abhängigkeit der Fluoreszenzstärke des Reporterstammes CFT073 pPc2398;gfpmut2 <sub>KAN</sub> von der THP-1 Zellzahl nach 4 h und nach 24 h.....	53
Abbildung 21: Schematische Darstellung des TcpC Gens und Einteilung der Abschnitte, welche für spezifische Domänen codieren .....	54
Abbildung 22: Übersichtsaufnahmen der Reporterstämme nach 4 h Induktionszeit .....	56
Abbildung 23: Übersichtsaufnahme der Reporterstämme nach 24 h Induktionszeit .....	57
Abbildung 24: Schematischer Aufbau des <i>E. coli</i> Bakteriums .....	58
Abbildung 25: Detailaufnahmen von einzelnen Bakterien der verschiedenen Stämme: Lokalisation der TcpC-eYFP-Fragmente der Reporterstämme nach 4 h .....	59
Abbildung 26: Lokalisation der TcpC-eYFP-Fragmente der Reporterstämme nach 24 h .....	60
Abbildung 27: Fluoreszenzverteilung des TcpC-Volllänge Reporterstammes CFT073 p <sub>c</sub> (tcpC 1-924):eYFP <sub>AMP</sub> zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Induktion mit AhTet.....	61
Abbildung 28: Lokalisation der Fluoreszenzsignale von CFT073 p <sub>c</sub> (tcpC 1-924):eYFP <sub>AMP</sub> .....	62

## 8 TABELLENVERZEICHNIS

	Seite
Tabelle 1: Funktion und eukaryotische Interaktionspartner von bakteriellen Tcps .....	10
Tabelle 2: Auflistung und Information zu allen in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämmen .....	23
Tabelle 3: Darstellung der Zusammensetzung der getesteten M9 Minimalmediumbedingungen.....	26
Tabelle 4: Verdünnungsreihe KCL bzw. NH <sub>4</sub> Cl.....	29
Tabelle 5: OD <sub>600</sub> Werte der verschiedenen M9 Minimalmedium Bedingungen nach 4 h und 24 h.....	36
Tabelle 6: pH-Werte und OD <sub>600</sub> Wert nach ÜNK bei M9 Minimalmedium mit Glucose oder Trypton als Nährstoffquelle .....	41
Tabelle 7: Darstellung der TcpC-eYFP Reporterstämme.....	55
Tabelle 8: Darstellung der TcpC-Promotor bindenden Proteine.....	65

## 9 LEBENS LAUF

### **Persönliche Daten**

---

Name	Julia Ittensohn
Geburtsdatum	13.09.1994
Geburtsort	Heidelberg
Nationalität	deutsch

### **Schulbildung**

---

09 / 2005 – 07 / 2013 Abitur am Gymnasium Walldorf

### **Studium**

---

09 / 2013 – 07/2020 Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

### **Berufsleben**

---

2020 - heute Ärztin in Weiterbildung am Universitätsklinikum Mannheim,  
Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde,  
Kopf- und Halschirurgie



## 10 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med Thomas Miethke für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation bei ihm zu verfassen. Ich danke ihm herzlich für die tatkräftige Unterstützung, die Betreuung und die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft.

Des Weiteren möchte ich meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Silke Neumann-Pfeifer danken, die mich als Neuling in die Techniken im Labor eingewiesen hat und mich bei der Umsetzung der Experimente geleitet, unterstützt und mir oft neue Denkansätze vermittelt hat.

Ohne die Hilfe des gesamten mikrobiologischen Teams und der guten Stimmung im Labor wäre meine wissenschaftliche Arbeit erheblich schwerer gewesen. Deshalb möchte ich den beiden medizinisch technischen Assistentinnen Maren Keller und Hannah Griffiths für das Beibringen der kleinen „Kniffs und Tricks“ und deren immerwährende gute Laune bedanken. Auch Dr. rer. nat. Claudia Dittner und Dr. rer. nat. Marion Kopcak möchte ich für ihren Beistand bei Fragen recht herzlich danken.

Insbesondere möchte ich mich bei Dr. rer. nat. Simone Albrecht für ihre Bereitschaft meine Dissertation sorgfältig und zügig Korrektur zu lesen mit großem Nachdruck bedanken. Ebenso war ich häufig auf schnelle Hilfe und Ratschläge im Labor angewiesen, wobei sie oft auch zu späten Zeiten meine erste Anlaufstelle darstellte. Auch für das Anlernen des Umgangs mit Zellkulturen danke ich ihr.

Bei Dipl. Ing. Victor Costina unter der Leitung von Prof. Dr. med. Findeisen des Instituts für Klinische Chemie möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und Diskussionen bzgl. der massenspektromischen Untersuchungen meiner Proben bedanken.

Der medizinischen Fakultät Mannheim möchte ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Promotionsstipendiums danken. So konnte ich mich voll und ganz auf die experimentelle Arbeit und Verfassung derer in Schriftform widmen.

Abschließend möchte ich mich für die Unterstützung meiner gesamten Familie bedanken. Meine Eltern Karl und Claudia haben mein Studium, sowie meine Doktorarbeit fortwährend gefördert und mit großer Anteilnahme und Interesse verfolgt.

Danke!