



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

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

Autor: Julia Ittensohn
Institut / Klinik: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Doktorvater: Prof. Dr. T. Miethke

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 NLRP3-Inflammasoms unterwandert. TLR-4 und das Adaptermolekül MyD88 werden inhibiert, wodurch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ 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.