

**Bakterielle Toll/interleukin-1 Rezeptor Domäne beinhaltende Proteine  
und deren Einfluss auf das angeborene Immunsystem**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Krämer, Thomas Daniel  
aus Mainz

Gießen 2015

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie unter Leitung von  
Prof. Dr. Trinad Chakraborty  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. T. Chakraborty

Gutachter: Prof. Dr. H. Hackstein

Tag der Disputation: 05.04.2016

In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

## **Inhaltsverzeichnis**

1.	Einleitung .....	1
1.1	<i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> und <i>L. mesenteroides</i> .....	1
1.2	TLRs .....	3
1.2.1	Struktur und Lokalisation von TLRs .....	6
1.2.2	Signaltransduktion der TLRs .....	6
1.2.3	TIR Domäne .....	7
1.3	TLR-Adapter .....	8
1.3.1	MyD88 .....	9
1.3.2	Mal .....	10
1.3.3	TRIF .....	11
1.3.4	TRAM .....	11
1.4	IL-6, TNF- $\alpha$ und Typ I Interferone .....	12
1.5	TLR-Signal Inhibitoren .....	13
1.5.1	Endogene TLR-Signal-Inhibitoren .....	13
1.5.2	Exogene TLR Signal Inhibitoren bakteriellen Ursprungs .....	14
1.6	Fragestellung der Doktorarbeit .....	17
2.	Materialien und Methoden .....	18
2.1	Ausstattung und Materialien .....	18
2.1.1	Geräte .....	18
2.1.2	Verbrauchsmaterial .....	19
2.1.3	Chemikalien und andere Reagenzien .....	19
2.1.4	Nährmedien .....	21
2.1.5	Enzyme .....	21
2.1.6	Lösungen und Puffer .....	22
2.1.7	Kits .....	23
2.1.8	Software .....	24
2.2	Biologisches Material .....	24
2.2.1	Bakterienstämme .....	24
2.2.2	Zelllinien .....	24
2.3	Molekularbiologische Methoden .....	25
2.3.1	Die Polymerase-Ketten-Reaktion .....	25

2.3.2	Aufreinigung von DNA-Molekülen .....	27
2.3.3	Präparation von Plasmid-DNA.....	28
2.3.4	Spaltung mit Restriktionsenzymen.....	29
2.3.5	Ligase-Reaktion .....	29
2.3.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten .....	30
2.3.7	Spektralfotometrische Quantifizierung von DNA.....	30
2.3.8	DNA-Sequenzierung .....	30
2.3.9	Klonierungen.....	31
2.4	Bakteriologische Methoden.....	37
2.4.1	Bakterienanzucht.....	37
2.4.2	Präparation chromosomaler DNA grampositiver und gramnegativer Bakterien .....	38
2.4.3	Bakterientransformation.....	39
2.4.4	Anlegen von stabilisierten Glycerin Kulturen ( <i>STABS</i> ).....	40
2.5	Zellkulturarbeiten und Methoden .....	40
2.5.1	Zelllinien .....	40
2.5.2	Dual-Luciferase <sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega).....	41
2.5.3	Zytokin-Messung mit dem Bio-Plex Pro <sup>™</sup> .....	43
2.6	Proteinarbeiten.....	44
2.6.1	<i>in silico</i> Analysen .....	44
2.6.2	Proteinbiochemische Methoden .....	46
2.7	Screening .....	49
2.7.1	Screening <i>E. coli</i> .....	49
2.7.2	Screening <i>E. faecalis</i> .....	50
2.7.3	Antibiotika-Resistenzbestimmung .....	50
2.8	Statistische Methoden.....	52
3.	Ergebnisse .....	53
3.1	Screening .....	53
3.1.1	Screening <i>E. coli</i> .....	53
3.1.2	Screening <i>E. faecalis</i> .....	56
3.2	Genetische Analysen .....	60
3.2.1	Genetische Analyse von TcpC .....	60
3.2.2	Genetische Analyse TcpF.....	60

3.3	<i>In silico</i> Analyse .....	65
3.3.1	Proteindomänen Homologie.....	65
3.3.2	Strukturanalyse von TcpF .....	68
3.3.3	Strukturanalyse von TcpC.....	69
3.3.4	Strukturanalyse von TcpM.....	71
3.4	Funktionelle Analysen.....	72
3.4.1	TcpC, TcpF und TcpM abhängige NFκB-Signalunterdrückung.....	72
3.4.2	IL-6 und TNF-alpha Sekretion in Abhängigkeit von TcpC/M/F.....	77
3.5	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine .....	78
4.	Diskussion .....	82
5.	Zusammenfassung (deutsch).....	97
6.	Zusammenfassung (englisch).....	98
7.	Abkürzungsverzeichnis .....	99
8.	Darstellungsverzeichnis .....	103
8.1	Abbildungen .....	103
8.2	Tabellen .....	104
9.	Literaturverzeichnis.....	106
10.	Anhang .....	116
10.1	Buchstabencode der Aminosäuren.....	116
10.2	Primer.....	116
11.	Publikationsverzeichnis.....	120
12.	Erklärung zur Dissertation .....	121
13.	Danksagung.....	122

## 1. Einleitung

Thema dieser Arbeit sind bakterielle *Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain containing-proteins* (Tcps). Es handelt sich dabei um eine neue Klasse putativer bakterieller Virulenzfaktoren, die erstmalig für das Pyelonephritisisolat *Escherichia coli* CFT073 beschrieben wurde. Das Tcp von *E. coli* CFT073 (TcpC) enthält eine zur TIR Domäne von Toll-like Rezeptoren (TLRs) homologe Struktur. Durch TcpC ist das Pathogen in der Lage, direkt in die durch TLRs organisierte Immunantwort einzugreifen. Das Pathogen schwächt auf diese Weise die angeborene Immunabwehr und steigert seine Virulenz [1]. In dieser Arbeit werden Aufbau, genetische Variabilität und Funktion der Tcps von *E. coli* (TcpC), *Enterococcus faecalis* Symbioflor 1 (TcpF) und *Leuconostoc mesenteroides* (TcpM) untersucht.

### 1.1 *E. coli*, *E. faecalis* und *L. mesenteroides*

*E. coli* ist ein gramnegatives, sporenloses, peritrich begeißeltes und deshalb bewegliches Stäbchen. Es wurde erstmals 1885 von Theodor Escherich beschrieben. *E. coli* findet sich regelmäßig im Darm von Warmblütern und fungiert daher als klassischer Fäkalindikator. *E. coli* kann sowohl zu extraintestinalen Infektionen sowie zu intestinalen Infektionen führen. Intestinale Infektionen gehen mit zum Teil schwerer Diarrhö einher. Man unterscheidet Enteropathogene (EPEC), Enterotoxinbildende (ETEC), Enteroinvasive (EIEC) und Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) [2]. Häufige extraintestinale Infektionen sind Harnwegsinfekte (HWIs) wie Zystitis und Pyelonephritis. Es handelt sich vorwiegend um Schmierinfektionen aus der Analregion mit Kontamination des Ostium urethrae. Die Uropathogenen *E. coli* (UPEC) besitzen P-Fimbrien, mit denen sie sich spezifisch an das Epithel der harnableitenden Wege haften. Besteht ein enger Kontakt können Hämolysine das Urothel schädigen, wodurch eine Invasion der Bakterien vorbereitet wird. *E. coli* ist Auslöser für 70-90% der geschätzten 150 Millionen jährlich diagnostizierten *Community-acquired* HWIs und für ca. 40% der nosokomial erworbenen HWIs [3]. Der UPEC Stamm *E. coli* CFT073 wurde 1989 im *University of Maryland Hospital* als Verursacher einer Pyelonephritis isoliert und zeichnet sich durch eine hohe Hämolysine bedingte Zytotoxizität aus [4]. Das Genom von *E. coli* CFT073 ist vollständig sequenziert [5] und grenzt sich von nicht pathogenen *E. coli* durch *pathogenicity islands* (PAI), DNA-Bausteine, die für Virulenzfaktoren kodieren, ab [6].

*E. faecalis* sind grampositive, Katalase-negative, nicht Sporen bildende, fakultativ anaerobe Bakterien, die Bestandteil der natürlichen Darmflora von Mensch und Tier sind. Sie liegen einzeln oder in Ketten vor. Enterokokken sind bei einem pH-Wert von 4,5-10 und hohen NaCl Konzentrationen überlebensfähig. Sie zählen zur Familie der *Enterococcaceae* und können Bacteriocine bilden [7]. Früher ging man davon aus, dass Enterokokken keinerlei humanpathogenes Potential besitzen. Heute weiß man jedoch, dass Enterokokken verschiedene Erkrankungen verursachen können. *E. faecalis* und *Enterococcus faecium* sind die dabei am häufigsten isolierten *Enterococcus* Arten. Enterokokken Infektionen wurden als Auslöser von HWIs, Hepatobiliärer Sepsis, Endokarditis, chirurgischen Wundinfektionen, Bakteriämie und neonataler Sepsis beschrieben [8]. Innerhalb der letzten zehn Jahre sind Enterokokken zum zweithäufigsten Verursacher von Wundinfektionen und HWIs sowie zum dritthäufigsten Verursacher von Bakteriämien avanciert [9]. Insbesondere bei nosokomialen Infektionen nehmen Enterokokken an Bedeutung zu. In den USA gehen schätzungsweise 12% aller nosokomialen Infektionen auf Enterokokken zurück [10]. Gleichzeitig gewinnt die Entwicklung von Antibiotikaresistenzen zunehmend an Bedeutung. Seit 1972 findet das Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin klinische Verwendung. 15 Jahre später wurden erstmals Vancomycin resistente Enterokokken (VRE) beschrieben. Die *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS) dokumentierte in den Vereinigten Staaten zwischen 1989 und 1993 einen Anstieg von VRE von 0,3% auf dann 7,9% [11]. Für die Ausbreitung von Antibiotika Resistenzen kommt erschwerend hinzu, dass Enterokokken durch horizontalen Gentransfer in der Lage sind, die Vancomycin Resistenz an andere Bakterienarten weiterzugeben [10]. Neben ihrer Bedeutung in der Medizin als Krankheitserreger werden Enterokokken auch als Starterkulturen in der Lebensmittelindustrie und als probiotische Kulturen eingesetzt. Dieser vermeintliche Gegensatz von pathogener und probiotischer Wirkung erklärt sich durch Variabilität im Genom von Enterokokken. Beim genetischen Vergleich des probiotischen Stammes *E. faecalis* Symbioflor 1 mit dem klinischen Isolat *E. faecalis* V583 [12] konnte neben weitestgehender Syntenie ein genetischer Verlust beim probiotischen Stamm dokumentiert werden. Das deletierte genetische Material beinhaltet Sequenzen von beschriebenen Virulenzfaktoren: Zytolysin, Enterokokken Oberflächenprotein, Gelatinase, Hyaluronidase und das Bacteriocin AS-48 [13]. Der Stamm *E. faecalis* Symbioflor 1 wird von dem Unternehmen Symbiopharm (Herborn) vertrieben und wird bei der Behandlung von chronischen Sinusitiden



und Bronchitiden eingesetzt [14]. Dieser attenuierte Stamm wurde im Rahmen der hier veröffentlichten Studie verwendet [15].

*L. mesenteroides* sind grampositive Bakterien aus der Gattung *Lactobacillus*. Sie sind Katalase-negative, fakultativ anaerobe, nicht Sporen bildende und unbewegliche Organismen. Sie treten als einzelne Kokken, Diplokokken oder auch in kurzen Ketten auf. *L. mesenteroides* ist in der natürlichen Umwelt weit verbreitet und findet in der Lebensmittelindustrie als Starterkultur für Milchprodukte breite Verwendung. Durch Milchsäuregärung kommt es zu einer Reduktion des pH-Wertes. Dieser saure pH-Wert verhindert das Wachstum schädlicher Bakterien, die um die vorhandenen Zucker konkurrieren [16]. Außerdem ist *L. mesenteroides* in der Lage, Bacteriocine zu bilden [17]. 1985 wurden erstmalig *Leuconostoc spp.* aus Blutkulturen isoliert und als humanpathogen beschrieben [18]. Später konnten *Leuconostoc spp.* in Einzelfällen bei Bakteriämie [19], Meningitis [20], Brustabszess [21], Peritonitis [22], Abdominalabszess [23] und nosokomialen HWIs [24] isoliert werden.

## 1.2 TLRs

TLRs nehmen eine zentrale Rolle bei der Organisation des angeborenen Immunsystems ein. Es handelt sich um evolutionär bedingt konservierte Rezeptoren, die sich auf Immunzellen sowie nicht-Immunzellen finden [25]. TLRs zählen zur Familie der *pattern-recognition-receptors* (PRRs). Deren Aufgabe ist es, Pathogene anhand von Pathogenspezifischen Molekülen zu detektieren. Man spricht von *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Dazu zählen bakterielle und virale PAMPs sowie PAMPs von Pilzen und Protozoen. Im humanen und murinen Bereich sind derzeit insgesamt 13 TLRs bekannt. TLR1 bis TLR9 sind gleichermaßen in Mensch und Maus existent, wohingegen TLR10 nur für den Menschen und TLR11 bis TLR13 nur für die Maus beschrieben wurden [26]. Eine Aufstellung von TLRs und entsprechenden PAMPs findet sich in Tabelle 1-1. Neben exogenen Liganden können auch endogene Liganden TLRs aktivieren. Hierzu zählen *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), die bei Verlust der Zellintegrität im Rahmen von Infektion oder Ischämie freigesetzt werden können [27]. TLR3 wird beispielsweise durch endogene mRNA aktiviert. Auf diese Weise wird eine inflammatorische Reaktion auch bei Zelluntergangsprozessen wie

-EINLEITUNG-

TLR	Vorkommen	Lokalisation	Natürliche Liganden	Korezeptoren	Adapter	Transkriptionsfaktor
<b>TLR1</b>	Mensch, Maus	Plasmamembran (Zelloberfläche)	Triacyl-Lipopeptide (Bakterien und Mykobakterien)	Heterodimer mit TLR2	Mal, MyD88	NFκB
<b>TLR2</b>	Mensch, Maus	Plasmamembran (Zelloberfläche)	Di- und Triacyl-Lipopeptide (Bakterien und Mykobakterien)	TLR1, TLR6, CD36, RP105, TLR10	Mal, MyD88	NFκB
<b>TLR3</b>	Mensch, Maus	Endosom	ssRNA virus (West-Nil-Virus (WNV)), dsRNA virus (Reovirus), Respiratorischer Synzytial- Virus (RSV)		TRIF	NFκB, IRF3,7
<b>TLR4</b>	Mensch, Maus	Plasmamembran (Zelloberfläche)	LPS (gramnegative Bakterien), Mannan ( <i>Candida</i> ), Glycoinosi- tolphospholipide ( <i>Trypanoso-</i> <i>ma</i> ), Capsidproteine (RSV)	MD2, CD14, LBP, RP105	Mal, MyD88, TRAM, TRIF	NFκB, IRF3,7
<b>TLR5</b>	Mensch, Maus	Plasmamembran (Zelloberfläche)	Flagellin (Flagellen tragende Bakterien)		MyD88	NFκB
<b>TLR6</b>	Mensch, Maus	Plasmamembran (Zelloberfläche)	Diacyl-Lipopeptide (Myko- plasmen), LTA (Streptokok- kus), Zymosan ( <i>Saccharomy-</i> <i>ces</i> )	Heterodimer mit TLR2	Mal, MyD88	NFκB
<b>TLR7</b>	Mensch, Maus	Endosom	ssRNA Viren ( <i>Vesicular Stoma-</i> <i>titis Virus</i> (VSV), Influenzavi- rus)		MyD88	NFκB, IRF7
<b>TLR8</b>	Mensch, Maus	Endosom	ssRNA von RNA Viren		MyD88	NFκB, IRF7
<b>TLR9</b>	Mensch, Maus	Endosom	dsDNA Viren (Herpes simplex Virus (HSV)), CpG Motive von Bakterien und Viren, Hemozoin		MyD88	NFκB, IRF7

TLR	Vorkommen	Lokalisation	Natürliche Liganden	Korezeptoren	Adapter	Transkriptionsfaktor
			(Plasmodium)			
<b>TLR10</b>	Mensch	Plasmamembran (B-Zellen)	Triacyl-Lipopetide	Heterodimer mit TLR2	MyD88	?
<b>TLR11</b>	Maus	Plasmamembran	Uropathogene Bakterien, Profilin-ähnliches Protein ( <i>Toxoplasma gondii</i> )	?	?	?
<b>TLR12</b>	Maus	Plasmamembran	( <i>Toxoplasma gondii</i> )	?	?	?
<b>TLR13</b>	Maus	Endosom	Bakterielle RNA	?	?	?

**Tabelle 1-1: TLR Zusammenfassung** [25], [26], [30]–[37]

Die Tabelle zeigt die für Mensch und Maus bekannten TLRs (TLR1 bis TLR13) mit ihren Eigenschaften bezüglich Lokalisation und Signaltransduktion. Die TLR-Signaltransduktionswege unterscheiden sich durch ein unterschiedliches Spektrum an natürlichen Liganden, den an der Ligandenbindung involvierten Rezeptoren (TLRs, Korezeptoren), den Adaptermolekülen (MyD88, Mal, TRAM und TRIF) und den in der Folge aktivierten Transkriptionsfaktoren (NFκB, IRF3, IRF7).

der Zellnekrose hervorgerufen [34]. Nach Antigenkontakt induzieren TLRs inflammatorisch wirksame Zytokine. Chemokine rekrutieren Immunzellen durch Chemotaxis zum Inflammationsfokus. TLRs sind demnach für die Initiierung der inflammatorischen Reaktion verantwortlich. Zudem wirken sie modifizierend auf das adaptive Immunsystem in Form von B- und T-Zellen ein [35].

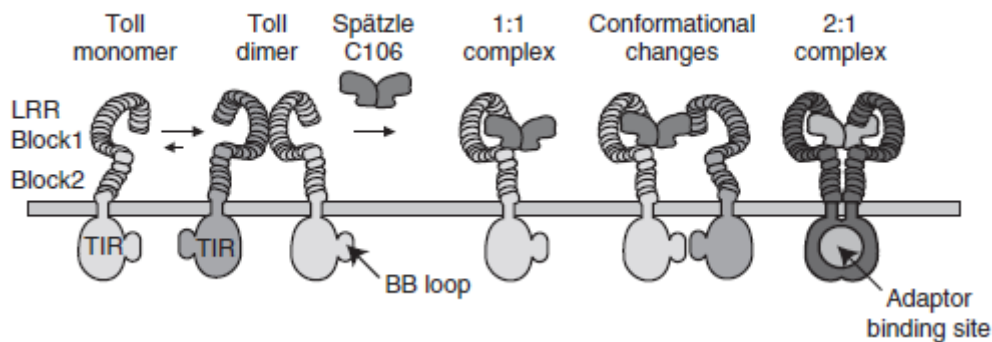
### 1.2.1 Struktur und Lokalisation von TLRs

TLRs sind glykosylierte Typ1 Transmembranproteine. Der extrazellulär befindliche N-Terminus ist durch sich wiederholende Leucin-reiche Regionen gekennzeichnet, sogenannte *leucine-rich repeats* (LRRs). Es liegen zwischen 16 bis 28 LRRs vor, die jeweils aus 20-30 Aminosäuren mit dem Motiv LxxLxLxxN aufgebaut sind. Die LRRs sind stark, aber nicht durchgehend glykosyliert. Man vermutet heute an den nicht glykosylierten Stellen der LRRs den Interaktionsbereich für die Liganden. Der extrazelluläre Teil von TLRs wird als Ektodomäne und der intrazelluläre Teil als Endodomäne bezeichnet. Der intrazelluläre befindliche C-Terminus enthält die TIR Domäne. Sie ist Ausgangspunkt des Signaltransduktionsweges, der zur Transkription inflammatorischer Gene führt [25], [28]–[31]. TLRs finden sich in unterschiedlichen Zellkompartimenten. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR11 liegen als Transmembranproteine in der Zellmembran, wohingegen TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 in der Membran von Zellorganellen wie dem Endolysosom oder dem Endoplasmatischen Retikulum zu finden sind [25], [36].

### 1.2.2 Signaltransduktion der TLRs

Die Signaltransduktion an TLRs beginnt mit der Erkennung eines Liganden. Bei der Bindung des Liganden kommt es zur Homo- oder Heterodimerisierung zweier TLRs. Für TLR3 konnte die Bildung eines Homodimers nachgewiesen werden [37]. TLR2 bildet mit TLR1 oder TLR6 einen Heterodimer [38]. Anhand des *Toll* Proteins von *Drosophila melanogaster* konnte der Ligandenbindungsmechanismus und die anschließende Signalinitiierung beschrieben werden. Sofern die Ektodomäne von Toll nicht an einen Liganden gebunden ist, liegt sie als Monomer oder als instabiles Dimer bei einer Gleichgewichtskonstante um 2 $\mu$ M zu Gunsten des Dimers vor [39]. Mit Bindung an den *Toll* Liganden *Spätzle* wird die *Toll* Dimerisierung gelöst und es bildet sich ein 1:1

Komplex zwischen *Spätzle* und der Ektodomäne. Bei der Rekrutierung eines zweiten Rezeptormoleküls zeigt sich ein negativer kooperativer Effekt, der auf Konformationsänderungen des Rezeptors schließen lässt [40]. Die beiden Rezeptormoleküle können durch die Konformationsänderungen nun ein stabiles Dimer bilden. Es entsteht ein 2:1 Komplex. Die Dimerisierung erstreckt sich dabei über Ekto- und Endodomäne. Die Konformationsänderungen ermöglichen es den TIR Domänen in Wechselwirkung zu treten und einen TIR-TIR Komplex auszubilden, der sich durch veränderte Oberflächeneigenschaften auszeichnet (Abbildung 1-1). Als Folge entsteht ein Angriffspunkt für die TLR Adapter. Der TIR-TIR Komplex bildet somit die Schnittstelle zwischen extrazellulärer Ligandenbindung und nachgeschalteter Signalkaskade [41].



**Abbildung 1-1: Ligandenbindungsmechanismus und Signalinitiierung von Toll** [41]

### 1.2.3 TIR Domäne

Bisher wurden 25 humane Proteine identifiziert, die eine TIR Domäne enthalten. Sie lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe bilden die Typ I Transmembranrezeptoren. Dazu zählen die TLRs und die Familie der Interleukin-1 Rezeptoren (IL-1R). Die zweite Gruppe bilden die TLR Adapter: Mal (*MyD88 Adapter-like*), MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), SARM (*sterile  $\alpha$ - and armadillo-motif-containing protein*), TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) und TRIF (*TIR-domain-containing adaptor inducing IFN- $\beta$* ). Proteine, die TIR Domänen enthalten, finden sich auch in Bakterien, Viren und Pflanzen, wo sie Entwicklungsprozesse und die Infektabwehr organisieren. Man geht heute davon aus, dass es sich bei der TIR Domäne um eine generelle Protein-Protein Interaktionsplattform handelt, die sich im Laufe der Evolution beim Menschen auf die Organisation der Immunantwort spezialisiert hat

[42]. Bisher wurde die Molekülstruktur der TIR Domänen von TLR1 und TLR2 beschrieben. Die TIR Domänen sind zwischen 135 und 160 Aminosäuren lang und bestehen aus 5 parallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern, die von 5  $\alpha$ -Helices ummantelt werden. Die Aminosäuresequenzen der TIR Domänen weisen Varianten auf. Sie sind lediglich zu 20-30% identisch in [43]. In drei Bereichen (Box1, Box2, Box3) konnte jedoch ein hoher Konservierungsgrad beobachtet werden. Box1 enthält die Signatursequenz (F/YDAF-Y) aller TLRs. Innerhalb der Box 2 (G-LC-RD-PG) findet sich die BB-Peptidkettenschleife (*BB-Loop*). Die Bezeichnung BB beschreibt die Lage des *BB-Loops* in Bezug zu den umgebenden Sekundärstrukturbestandteilen.  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter werden in alphabetischer Reihenfolge bezeichnet. Die erste  $\alpha$ -Helix ist  $\alpha A$  und die zweite  $\alpha$ -Helix ist  $\alpha B$  usw. Entsprechendes gilt für die  $\beta$ -Faltblätter. Die *Loops* werden entsprechend ihrer Lage zwischen  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern bezeichnet. Der *BB-Loop* liegt zwischen der 2.  $\alpha$ -Helix und dem 2.  $\beta$ -Faltblatt. Für den *BB-Loop* konnte nachgewiesen werden, dass er essentiell für die TLR4 Signaltransduktion ist. Innerhalb des *BB-Loops* gibt es ein konserviertes Prolin. Bei einer Punktmutation im TLR4-Gen, bei der das Prolin durch Histidin ersetzt ist, verlor der TLR4 die Fähigkeit, eine Antwort auf Lipopolysaccharid (LPS) auszulösen [44]. In Box 3 (FW) befinden sich Aminosäuren, die für die Signaltransduktion notwendig sind. Ein weiterer *Loop*, der für die Signaltransduktion ausschlaggebend ist, ist der *DD-Loop*. Es wurde nachgewiesen, dass die Heterodimerisierung zwischen TLR1 und TLR2 auf der Interaktion des *DD-Loops* von TLR2 und des *BB-Loops* von TLR1 beruht [45]. Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass die Wechselwirkung zwischen *BB-* und *DD-Loop* Grundlage für die Bildung des TIR-TIR Komplexes ist. Der TIR-TIR Komplex bildet den Angriffspunkt für die Interaktion mit den TLR-Adaptermolekülen [46].

### 1.3 TLR-Adapter

Insgesamt gibt es vier TLR-Adaptermoleküle mit positivem regulatorischem Effekt für die TLR-Signalkaskade: MyD88, Mal, TRIF und TRAM. Wobei Mal auch als TIRAP, TRIF auch als TICAM-1 und TRAM auch als TICAM-2 bezeichnet werden (Tabelle 1-2). TIR-TIR Komplexe der TLRs sind entweder in der Lage MyD88 oder TRIF zu rekrutieren. Daher lassen sich die Signaltransduktionswege in MyD88- oder TRIF-abhängig unterteilen. TRAM und Mal fungieren als Kopplungsglied zwischen TIR-TIR

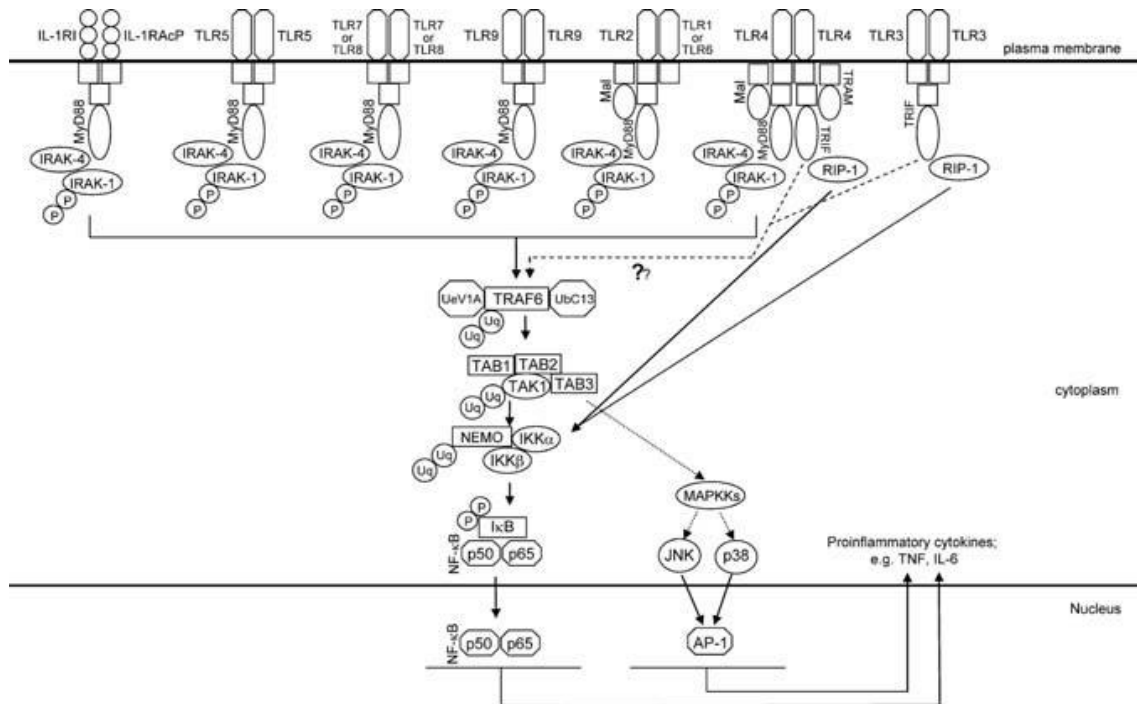
Komplex und TLR-Adapter. TRAM und Mal werden daher als Brückenadapter bezeichnet [46].

Bezeichnung	Äquivalent	Typ	Signalweg
MyD88		Adapter	TLR1-2,TLR4-9
Mal	TIRAP	Brückenadapter	TLR1-2,TLR4,TLR6
TRIF	TICAM-1	Adapter	TLR3-4
TRAM	TICAM-2	Brückenadapter	TLR4

**Tabelle 1-2: TLR Adapter**

### 1.3.1 MyD88

MyD88 ist durch eine N-terminale *death domain* (DD) und eine C-terminale TIR Domäne charakterisiert, die über eine *intermediate domain* (ID) verbunden sind. Ähnlich wie bei der Interaktion des Heterodimers von TLR1 und TLR2 resultiert die Interaktion von TLR2 und MyD88 aus der Wechselwirkung des DD-Loops von MyD88 und des BB-Loops von TLR2 [47]. Bei der MyD88 abhängigen Signalkaskade (Abbildung 1-2) kommt es zur Rekrutierung diverser intrazellulärer Proteine an dessen Ende die Aktivierung des *inhibitor of NFκB* (IκB) *kinases* (IKK) Komplexes steht. Der IKK Komplex setzt sich aus der regulatorischen Untereinheit *NFκB essential modulator* (NEMO) und den zwei katalytischen Untereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  zusammen [48]. Der aktivierte IKK Komplex phosphoryliert IκB. IκB liegt an das NFκB Dimer gebunden im Zytoplasma vor, was als IκB-Komplex bezeichnet wird. Die Phosphorylierung führt zur Dissoziation von NFκB und zum proteosomalen Abbau von IκB [49]. NFκB, das aus den Untereinheiten p50 und p65 besteht, wird im Zytoplasma freigesetzt. p50 ist für die Bildung des Dimers und die Anlagerung an IκB verantwortlich. Über p65 erfolgt die Wirkung als Transkriptionsfaktor im Zellkern. Vom Zytoplasma wird NFκB in den Nucleus transloziert. Dort bindet NFκB an NFκB spezifische Gensequenzen und leitet deren Transkription ein, wodurch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-6 (IL-6) oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gebildet werden [46], [49]. Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der neben NFκB aktiviert werden kann ist *activator protein-1* (AP-1). Die Aktivierung erfolgt über den MAP-Kinase-Weg. Wie auch NFκB spielt AP-1 bei der Induktion von inflammatorisch wirksamen Genen eine zentrale Rolle [46].



**Abbildung 1-2: TLR Signaltransduktionswege führen zur Aktivierung von NFκB und AP-1 [46]**

### 1.3.2 Mal

Mal ist der Brückenadapter innerhalb des MyD88 abhängigen Signaltransduktionsweges und spielt bei der Signalkaskade von TLR1, TLR2, TLR4 und TLR6 eine zentrale Rolle. Die Funktionsweise von Mal wurde erstmals für TLR4 beschrieben. Die TIR Domänen von TLR4 und MyD88 treten nicht in direkten Kontakt, sondern interagieren indirekt über Mal. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die elektrische Oberflächenladung der TIR Domänen von TLR4 und MyD88 größtenteils negativ ist. Die Oberflächenladung der TIR Domäne von Mal ist hingegen größtenteils positiv. In Folge dessen kann Mal die sich sonst abstoßenden TIR Domänen von TLR4 und MyD88 über seine eigene TIR Domäne zusammenfügen [47]. Im Gegensatz zu MyD88 besitzt Mal keine DD-Domäne aber eine Bindungsdomäne für Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>). PIP<sub>2</sub> ist eine Strukturkomponente der Plasmamembran. Über diese Domäne kann Mal mit PIP<sub>2</sub> interagieren und die Rekrutierung von MyD88 an die Plasmamembran erleichtern [50], [51].



### 1.3.3 TRIF

Die TLR3 Signalübertragung erfolgt einzig mit TRIF, wohingegen sie an TLR4 sowohl MyD88 als auch TRIF abhängig erfolgt (Abbildung 1-3). TRIF bildet einen Rezeptor Komplex, der aus der TRAF-family-member-associated NFκB activator (TANK)-binding kinase 1 (TBK1), dem IKKε und IRF3 besteht [52]. Innerhalb dieses Komplexes kommt es zur Phosphorylierung von IRF3 durch TBK1 und IKKε. IRF3 wird somit aktiviert, transloziert in den Zellkern und induziert an IFN-stimulated response elements (ISREs) die Transkription von IFNα und IFNβ [53]. Entsprechend zu IRF3 kommt es auch zur Aktivierung von IRF7 und IRF5. Anders als bei IRF3 und IRF7 führt die Aktivierung von IRF5 zur Induktion von IL-6, IL-12 und TNFα [46], [54].

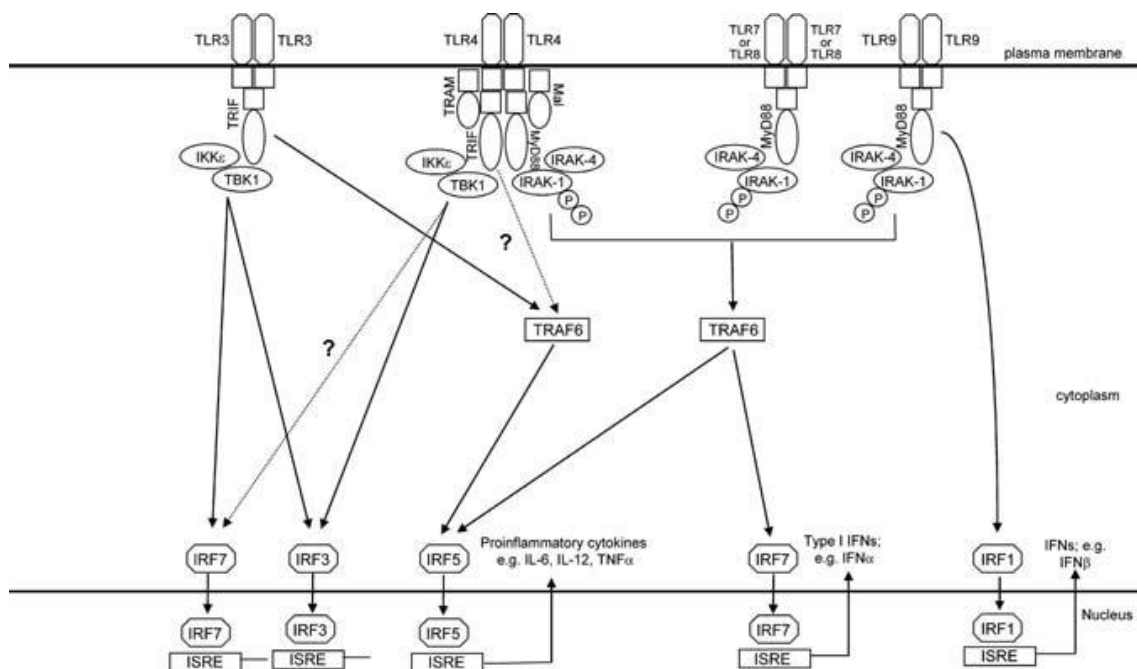


Abbildung 1-3: TLR Signaltransduktionswege führen zur Aktivierung von IRFs [46]

### 1.3.4 TRAM

TRAM ist der Brückenadapter im TRIF abhängigen Signaltransduktionsweg. TRAM nimmt jedoch nicht an der Rekrutierung von TRIF durch TLR3, sondern nur durch TLR4 teil. TLR3 interagiert direkt mit TRIF. TLR4 interagiert indirekt über TRAM mit TRIF. TRAM unterscheidet sich somit von den anderen TLR Adaptern und Brückenadaptern, die alle ein größeres Interaktionsspektrum besitzen [52], [55]. Wie im Fall von Mal kann TRAM eine Verbindung zur Plasmamembran herstellen. Dies erfolgt jedoch

nicht über eine PIP2 Bindungsdomäne, sondern über N-Myristoylierung von TRAM. Dabei handelt es sich um eine co- oder posttranslationale Modifikation, bei der der Fettsäurerest Myristat an ein N-terminales Glycin angehängt wird. Über die Myristoylierung kann TRAM mit der Plasmamembran kommunizieren und stellt somit den Kontakt für TRIF zu dem sich in der Zellmembran befindlichen TLR4 Komplex her [56].

#### **1.4 IL-6, TNF- $\alpha$ und Typ I Interferone**

Am Ende der Signaltransduktion der TLRs steht die Transkription proinflammatorischer Gene wie IL-6, TNF- $\alpha$  und Typ I Interferonen. Alle drei lösen eine inflammatorische Reaktion aus und modulieren die Immunantwort (siehe Abbildung 1-2, Abbildung 1-3). IL-6 zählt zur Familie der Interleukine. Interleukine wirken auf die Organisation der Immunantwort und spielen insbesondere beim Übergang der unspezifischen zur spezifischen Immunreaktion eine entscheidende Rolle. IL-6 entfaltet seine Wirkung über einen Membran-gebundenen Rezeptor (IL-6R) und einen löslichen Rezeptor (sIL-6R). Der IL-6R findet sich unter anderem auf Hepatozyten, Endothel- und B-Zellen [57]. In der Leber induziert IL-6 die Produktion von weiteren Akut-Phase-Proteinen. Der Komplex aus IL6 und sIL-6R wird durch das in der Zellmembran ubiquitär vorkommende Glykoprotein gp130 aufgenommen (*IL-6-trans-signaling*). Über die Bindung an sIL-6R entfaltet IL-6 seine Wirkung in einem größeren Zellspektrum [58]. In der akuten Phase der Entzündungsreaktion kommt es zur Infiltration von neutrophilen Granulozyten. Neutrophile Granulozyten bekämpfen Pathogene durch Phagozytose und sterben rasch ab. In der nächsten Phase der Entzündungsreaktion werden die neutrophilen Granulozyten durch Lymphozyten und Monozyten verdrängt. Diese Veränderung kennzeichnet den Wechsel von angeborener zu adaptiver Immunantwort. Mit dem erhöhten Aufkommen an neutrophilen Granulozyten steigt die Konzentration von sIL-6R durch das Abschilfern des Membran-gebundenen Rezeptors. Dies führt zu *IL-6-trans-signaling* im umliegenden Gewebe, wodurch T-Lymphozyten angelockt werden. IL-6 wirkt auf T-Lymphozyten antiapoptotisch, proliferativ sowie polarisierend und löst bei Monozyten die Differenzierung zu Makrophagen aus [59]. Zudem fördert IL-6 die Reifung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen [60] und induziert als endogenes Pyrogen eine zentrale Temperatursollwerterhöhung mit Fieber [57].

TNF- $\alpha$  ist ein multifunktionaler Signalstoff, der hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet wird. Wesentliche Aufgabe von TNF- $\alpha$  ist die Organisation der Immunantwort.

Seine Wirkung entfaltet TNF- $\alpha$  über die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2. Die Effekte von TNF- $\alpha$  sind denen von IL-6 ähnlich. TNF- $\alpha$  wirkt proliferativ auf T-Lymphozyten, stimuliert Phagozytose bei Makrophagen und induziert Akut-Phase-Proteine sowie Fieber [61].

Zu den Typ I Interferonen zählen IFN $\alpha$ , IFN $\beta$  und IFN $\omega$ . Ihre Wirkung lösen sie über den IFN $\alpha$  Rezeptor (IFAR) aus, der zur Aktivierung von IRFs führt. Typ I Interferone zeichnen sich durch eine antitumorale und antivirale Wirkung aus. Interferone können zum einen die Proteinsynthese der Wirtszelle inhibieren, wodurch die Replikationsgrundlage für das Virus genommen wird. Zum anderen lösen Interferone Apoptose in mit Viren infizierten Zellen aus. Ein weiterer Wirkmechanismus besteht in der Hochregulation von MHC I (*major histocompatibility complex*) und MHC II Molekülen sowie der Aktivierung von Immunproteasomen. Über MHC Moleküle werden Peptidfragmente exponiert, die zuvor im Immunproteasom gespalten wurden. Anhand der Interaktion von T-Zell-Rezeptor und Antigenpräsentation durch die MHC Moleküle erfolgt bei körperfremden Peptidfragmenten die Aktivierung der T-Zellen. CD8 positive T-Zellen erkennen MHC I gebundene Fremdpartikel und können daraufhin die Apoptose der Zelle einleiten. CD4 positive T-Zellen erkennen MHC II gebundene Fremdpartikel und rekrutieren weitere Immunzellen. Mit dem Wissen um das antivirale Potential von Interferonen, ist es nicht verwunderlich, dass TLRs, die virale DNA, RNA oder Hüllproteine erkennen, Interferone induzieren (siehe Tabelle 1-1) Interferone werden daher auch zur Therapie viraler Erkrankungen eingesetzt [62], [63].

## 1.5 TLR-Signal Inhibitoren

### 1.5.1 Endogene TLR-Signal-Inhibitoren

Die TLR Signaltransduktion unterliegt auf Ebene der Adapter und Brückenadapter dem Einfluss von Inhibitoren. Zu den endogenen Inhibitoren zählt MyD88s. Bei MyD88s handelt es sich um eine Splicevariante von MyD88. Die Splicevariante ist im Vergleich zu MyD88 kürzer und enthält keine ID Domäne. MyD88s wirkt als Sackgassenmolekül, das den MyD88 abhängigen Signaltransduktionsweg inhibiert. Ein anderer bekannter TLR Signal Inhibitor ist das *sterile  $\alpha$ - and armadillo-motif-containing protein* (SARM). SARM enthält zwei *sterile  $\alpha$  motifs* (SAMs) und eine TIR Domäne. SARM ist in der Lage mit TRIF zu interagieren und verhindert damit die Aktivierung von IRFs und

NFκB. Ob SARM direkt mit TRIF interagiert oder die Verbindung von TRIF mit einem anderen Inhibitor vereinfacht, ist Gegenstand aktueller Diskussion [42], [46]. Weitere endogene TLR Signal Inhibitoren sowie deren Inhibitionsmechanismus sind in Tabelle 1-3 aufgeführt.

<b>Inhibitor</b>	<b>Mechanismus</b>
<b>IRAK-M</b>	verhindert die Dissoziation von IRAK-1/IRAK-4 von MyD88
<b>IRF4</b>	assoziiert mit MyD88 und verhindert dadurch dessen Interaktion mit IRF5
<b>MyD88s</b>	verhindert die Rekrutierung von IRAK-4
<b>NS3/4A</b>	Serinprotease die TRIF spaltet und so zum Abbau von TRIF führt, TLR3 induzierte IRF3 und NFκB Aktivierung wird inhibiert
<b>PIASy</b>	Interaktion mit TRIF
<b>RIP3</b>	assoziiert mit RIP1 und verhindert dadurch die Interaktion von TRIF und RIP1
<b>SARM</b>	Interaktion mit TRIF
<b>SHP-2</b>	bindet an TBK1 und inhibiert TRIF abhängige Signaltransduktion
<b>SIKE</b>	verhindert die Interaktion von TBK1 und IKKε mit TRIF und IRF3
<b>SOCS1</b>	beteiligt am Abbau von Mal
<b>ST2</b>	beteiligt an der Ablösung von Mal und Myd88
<b>TGF-β</b>	führt zu Ubiquitinierung und proteosomalen Abbau von MyD88
<b>TRAF1</b>	TRIF löst die Spaltung von TRAF1 aus, ein Spaltungsfragment wirkt inhibitorisch auf TRIF
<b>TRAF4</b>	beteiligt an der Ablösung von TRIF und TRAF6

**Tabelle 1-3: Endogene TLR Signal Inhibitoren [46]**

### **1.5.2 Exogene TLR Signal Inhibitoren bakteriellen Ursprungs**

Pathogene, die die beschriebenen Wirkungen von IL-6, TNF-α und Typ I Interferonen unterbinden können, besitzen einen Selektionsvorteil. Die TIR Domäne als zentrale Schnittstelle zwischen Pathogen-Detektion und Initiierung der Signalkaskade stellt da-

bei einem erfolgsversprechenden Interventionspunkt dar. Die Intervention wird durch Tcps der Pathogene ermöglicht. Der Mechanismus lässt sich als *Mimikry auf molekularer Ebene* [64] beschreiben. Die körperfremden Tcps der Pathogene ahmen durch ihre homologe TIR Domäne körpereigene Tcps (TLRs, TLR Adapter) nach. Die körpereigenen Tcps sind nicht in der Lage zwischen körperfremder und körpereigener TIR Domäne zu unterscheiden. Anders als die körpereigenen Tcps ermöglichen die körperfremden Tcps jedoch keine anschließenden Wechselwirkungen innerhalb der TLR Signalkaskade oder leiten den Abbau körpereigener Tcps ein. Tcps von Pathogenen fungieren daher innerhalb der Signalkaskade als Sackgassenmoleküle. Als Konsequenz kommt die Signalkaskade zum Erliegen und IL-6, TNF- $\alpha$  sowie Typ I Interferone können nicht verstärkt gebildet werden.

Bezeichnung	Bakterium	Mechanismus
<b>TlpA</b>	<i>Salmonella enterica</i>	unbekannt
<b>PdTLP</b>	<i>Paracoccus denitrificans</i>	kompetitive Bindung an MyD88 und TLR4
<b>TcpC</b>	<i>Escherichia coli</i>	kompetitive Bindung an MyD88
<b>TcpB (Btp1)</b>	<i>Brucella melitensis</i>	Bindung an MAL mit nachfolgendem Abbau von MAL
<b>YpTdp</b>	<i>Yersinia pestis</i>	kompetitive Bindung an MyD88
<b>TirS</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	unbekannt

**Tabelle 1-4: Bakterielle Tcps**

Ausgehend von einer *in silico* Genomanalyse wurde 2006 erstmalig ein bakterielles Protein beschrieben, das eine zur TIR Domäne von TLRs und TLR Adaptern homologe Struktur enthält. Bei dem Protein handelt es sich um *TIR-like protein A* (TlpA) von *Salmonella enterica*. Sequenzvergleiche zwischen TlpA, MyD88, Mal und TLR4 ergaben eine zu 28% identische Sequenz und einen hohen Konservierungsgrad in den Boxen 1 und 2. Für TlpA konnte eine Reduktion des TLR4 und MyD88 abhängigen NF $\kappa$ B Signals nachgewiesen werden [65]. Im darauffolgenden Jahr wurde eine Arbeit über das Tcp von *Paracoccus denitrificans* veröffentlicht (PdTLP). Es konnte gezeigt werden, dass PdTLP die TIR Domänen von TLR4 und MyD88 bindet und dadurch die NF $\kappa$ B Aktivierung supprimiert. Zudem ist PdTLP das derzeit einzige bakterielle Tcp, dessen Tertiärstruktur vollständig bekannt ist [66], [67].

In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2008 [1] wurden die Tcps des Uropathogenen *E. coli* Stammes CFT073 (TcpC) und *B. melitensis* (TcpB) als neuartige Klasse von bakteriellen Virulenzfaktoren beschrieben. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass beide Tcps die TLR2 und TLR4 abhängige Aktivierung von NFκB verringern und die Bildung der Zytokine IL-6 und TNF-α herabsetzen. Zudem unterstützt TcpC das intrazelluläre Überleben von *E. coli* in Immunzellen. *In vivo* Experimente mit dem *E. coli* Stamm CFT073 und seiner TcpC Deletionsmutante (CFT073ΔTcpC) erbrachten schwerwiegendere Gewebsdestruktionen im murinen Nierengewebe beim Wildtyp als bei CFT073ΔTcpC. In einer epidemiologischen Untersuchung von HWIs bei Kindern zeigte sich, dass TcpC mit der Schwere der Infektion assoziiert ist [1]. Später wurde gezeigt, dass TcpC seinen immunmodulierenden Effekt über direkte Bindung an MyD88 generiert [68]. TcpC wird von *E. coli* vermutlich über ein Typ I Sekretionssystem sezerniert und von der Wirtszelle passiv aufgenommen. Mittels TcpC ist *E. coli* CFT073 in der Lage, noch vor dem ersten Kontakt zwischen Bakterium und Gewebszelle die TLR abhängige Immunantwort im umliegenden Gewebe zu unterdrücken [1], [68]–[70].

Untersuchungen zu Struktur und Funktionsweise von TcpB haben gezeigt, dass TcpB Eigenschaften des TLR Adapters Mal imitiert. Die Aminosäuresequenzen von TcpB und Mal sind zu 20% identisch und zu 53% aus kompatiblen Aminosäuren aufgebaut. Wie Mal besitzt auch TcpB eine Bindungsdomäne für PIP, mit der eine örtliche Beziehung zu den TLR Rezeptor Komplexen an der Plasmamembran hergestellt werden kann. TcpB ist in der Lage, die durch Mal induzierte NFκB Aktivierung zu unterdrücken. Es wurde zunächst spekuliert, dass der immunmodulierende Effekt von TcpB auf einer Interaktion von MyD88 beruht [71]. Untersuchungen zeigten jedoch, dass TcpB nicht mit MyD88, sondern mit Mal selbst interagiert und dessen Abbau, womöglich durch indirekte Ubiquitinierung, stimuliert [67], [72].

Bei YpTdp handelt es sich um das Tcp von *Yersinia pestis*. Es wurde gezeigt, dass YpTdp die NFκB Aktivierung inhibiert und in der Lage ist, MyD88 zu binden [73]. Es ist bemerkenswert, dass die C-terminale TIR Domäne alleine keinen solchen Effekt zeigt, sondern das vollständige Protein für die Funktion benötigt wird. Die Funktion, die die N-terminale nicht-TIR Domäne von YpTdp erfüllt, bleibt derzeit jedoch unklar. *In vivo* Infektionsversuche mit *Y. pestis* und der YpTdp Deletionsmutante erbrachten keine Hinweise für eine Abschwächung der Virulenz bei der Deletionsmutante [73], [67].

Den ersten Beitrag zu diesem Thema für ein grampositives Bakterium beschreibt das Tcp von *Staphylococcus aureus* (TirS). Für TirS konnte gezeigt werden, dass es die

MyD88 und Mal abhängige NFκB-Aktivierung inhibiert. Inkubation von TLR2 transfizierten HEK293 Zellen mit dem Wildtyp Stamm *S. aureus* MSSA476, der Deletionsmutante oder der Komplementante erbrachten eine erhöhte NFκB-Aktivität bei der Deletionsmutante, wobei der Effekt bei physischer Trennung von Bakterien und HEK293 Zellen persistierte. Im systemischen Maus-Infektionsmodell konnte nach Bakteriämie eine erhöhte Akkumulation des Wildtyps gegenüber der Deletionsmutante in Niere, Milz, Gehirn und Leber festgestellt werden, sodass TirS für *S. aureus* als Virulenzfaktor fungiert [74].

## 1.6 Fragestellung der Doktorarbeit

Anhand des *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) konnten im Genom von *E. faecalis* Symbioflor 1 und *L. mesenteroides* zwei bisher nicht beschriebene Gene, die für Proteine mit TIR Domänen kodieren, identifiziert werden. In Anlehnung an die bereits bekannten bakteriellen Tcps wurden sie als TcpF (*E. faecalis*) und TcpM (*L. mesenteroides*) bezeichnet. Die bisher bekannten Tcps stammen vorwiegend von gramnegativen Bakterien (*S. enterica*, *P. denitrificans*, *E. coli*, *B. melitensis* und *Y. pestis*). Neben TirS von *S. aureus* zählen TcpF und TcpM zu den bisher einzigen Tcp Vertretern von grampositiven Bakterien. In dieser Arbeit wurden TcpC, TcpF und TcpM auf ihre genetische Variabilität, Struktur und Funktion untersucht und verglichen. Dazu wurden mehr als 200 HWI Isolate anhand von PCR auf die Anwesenheit von TcpC und TcpF untersucht und die Tcp positiven Isolate sequenziert. Zusätzlich wurden die Antibiotikaresistenzen der HWI Isolate und bei Vorliegen von Mischinfektionen die Infektionspartner bestimmt sowie die Häufigkeit der Tcps bei HWI Isolaten mit der von Kommensalen verglichen. Die Unterdrückung des NFκB-Signals und die Produktion von IL-6/ TNF-α in Abhängigkeit von TcpC, TcpF und TcpM wurden *in vitro* bestimmt, um die Fähigkeit zur TLR Signalsuppression zu untersuchen. Strukturmodelle der Tcps wurden anhand von *in silico* Analysen generiert und ermöglichen Rückschlüsse auf die Funktionsweise der bakteriellen Tcp.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Ausstattung und Materialien

#### 2.1.1 Geräte

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Agfa Curix 60</b>	Agfa, Mortsel, BEL
<b>Biofuge pico</b>	Heraeus, Hanau
<b>Bio-Plex® 200</b>	Bio-Rad, München
<b>Consort E802 Powersupply</b>	Consort, Turnhout, BEL
<b>Gel-Doc™ XR+ System</b>	Bio-Rad, München
<b>Geneamp PCR 2400 System</b>	Perkin Elmer, Waltham USA
<b>Lmax Luminometer</b>	Molecular Devices, Sunnyvale USA
<b>Megafuge 1.0</b>	Heraeus, Hanau
<b>MicroPulser™ Elektroporator</b>	Bio-Rad, München
<b>MTS4 Schüttler</b>	IKA, Staufen
<b>Multiblot Transfergerät</b>	Micro-Bio-Tec Brand, Gießen
<b>Nanodrop 1000</b>	Thermo Fisher, Waltham, USA
<b>SDS-PAGE Gelkammer</b>	Bio-Rad, München
<b>Steri-Cult 200 Inkubator</b>	Heraeus, Hanau
<b>Sterikult 200 CO<sub>2</sub>-Inkubator</b>	Heraeus, Hanau
<b>Thermomixer Comfort</b>	Eppendorf, Hamburg
<b>Vakuumpumpe</b>	Vacuubrandt GmbH, Wertheim
<b>Vortex Genie 2</b>	Scientific Industries, Bohemia USA
<b>Zentrifuge 5804 R</b>	Eppendorf, Hamburg

**Tabelle 2-1: Geräte**



### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
1,5ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Amersham Hypercassette	GE, Chalfont St. Giles, GB
Amersham Hyperfilm ECL	GE, Chalfont St. Giles, GB
Amicon® Ultra-15, 10kDA	Millipore, Merck, Darmstadt
<i>BBL™ Sensi-Disc™ Susceptibility Test Discs</i>	BD, Heidelberg
Immobilon®-P Transfer Membran	Millipore, Merck, Darmstadt
Kryoröhrchen 1,2ml	Corning, Corning USA
MicroPulser™ Elektroporationsküvette 0,1cm	Bio-Rad, München
Polpropylen Zellkulturschalen	Greiner, Frickenhausen

**Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterial**

### 2.1.3 Chemikalien und andere Reagenzien

Name	Hersteller
1Kb Plus DNA Ladder	Invitrogen, Carlsbad USA
6-Aminohexansäure	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin (Amp)	Roth, Karlsruhe
Anhydrotetrazyklin (AHT)	IBA, Göttingen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Bromphenolblau (BPB)	Merck, Darmstadt
CaCl	Roth, Karlsruhe
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	Invitrogen, Carlsbad USA

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Dimethylsulfoxid (DMSO)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Ethanol (EtOH)</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg
<b>Ethidiumbromid</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg
<b>Ethylendiamintetraacetat (EDTA)</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg
<i>Fetal Bovine Serum (FKS)</i>	PAA Laboratories, GE Healthcare, Little Chalfont GB
<b>Glycerin</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg
<b>Isopropanol</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg
<b>Kanamycin (Kan)</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg
<b>Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000</b>	Invitrogen, Carlsbad USA
<b>Methanol</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Invitrogen, Carlsbad USA
<b>NaCl</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg
<b>NaOH</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg
<b>Natriumacetat</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS)</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg
<b>Pam<sub>3</sub>Cys-SKKKK</b>	EMC microcollections GmbH, Tübingen
<b>Penicillin-Streptomycin 100x</b>	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
<b>Pierce ECL Western Blotting Substrat</b>	Thermo Fischer, Waltham USA
<b>Polyacrylamid (PAA)</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg
<b>Tetramethylethylendiamin (TEMED)</b>	Bio-Rad, München
<b>Tris-Acetate</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg
<b>Tris-HCL</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg
<b>Tween20</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg

Name	Hersteller
<b>β-Mercapto-Ethanol</b>	Sigma-Aldrich, Hamburg

**Tabelle 2-3: Chemikalien und andere Reagenzien**

#### 2.1.4 Nährmedien

Name	Hersteller
<b><i>Brain Heart Infusion (BHI)-Medium</i></b>	BD, Heidelberg
<b><i>Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)</i></b>	Gibco, Thermo Fisher, Waltham USA
<b>Luria-Bertani (LB)-Medium</b>	Gibco, Darmstadt
<b><i>Tryptic-Soy-Broth (TSB)-Medium</i></b>	BD, Heidelberg

**Tabelle 2-4: Nährmedien**

#### 2.1.5 Enzyme

Name	Hersteller
<b>DNase I</b>	IBA, Göttingen
<b><i>Expand High Fidelity PCR System</i></b>	Roche, Basel
<b>Lysozym</b>	Merck, Darmstadt
<b>Lysozym IBA-Lyse</b>	IBA, Göttingen
<b>Restriktionsendonucleasen: <i>Eco3II, BamHI, XhoI, Nhe, PstI</i></b>	Fermentas, Amherst USA
<b>RNase</b>	IBA, Göttingen
<b><i>Strep-Tactin Horseradish Peroxidase (HRP) conjugate</i></b>	IBA, Göttingen
<b><i>Taq DNA-Polymerase</i></b>	Invitrogen, Carlsbad USA
<b>Trypsin-EDTA 0,5% (10x)</b>	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham USA

**Tabelle 2-5: Enzyme**

### 2.1.6 Lösungen und Puffer

Name	Zusammensetzung	Hersteller
<b>10x PCR Puffer</b>	200mM Tris-HCl (pH 8,4), 500mM KCl	Invitrogen, Carlsbad USA
<b>10x PCR Puffer</b>	20mM Tris-HCl, pH 7,5, 100mM KCl <sub>2</sub> , 1mM DTT, 0,1mM EDTA, 0,5% Tween 20 (v/v), 0,5% Nonidet P40 (v/v), 50% Glycerol (v/v)	Roche, Basel
<b>5x SDS-PAGE Ladepuffer</b>	1ml Tris 0,5M pH6,8, 1,6ml SDS 10%, 0,4ml β-Mercapto-Ethanol, 1,6ml Glycerol, 2ml Bromphenolblau 0,5%, 1,4ml dH <sub>2</sub> O	Selbstständig angefertigt
<b>Blot I Puffer</b>	1,817g TRIS, 10% Methanol, 0,5l dH <sub>2</sub> O	Selbstständig angefertigt
<b>Blot II Puffer</b>	1,514g TRIS, 10% Methanol, 0,5l dH <sub>2</sub> O	Selbstständig angefertigt
<b>Blot III Puffer</b>	2,264g 6-Amino-Hexansäure, 10% Methanol, 0,5l dH <sub>2</sub> O	Selbstständig angefertigt
<i>FastDigest Green Buffer</i>		Fermentas (Amherst, USA)
<b>Ladepuffer Gel-elektrophorese</b>	50% v/v Glycerin; 50mM EDTA; 0,005 % w/v Bromphenolblau	Selbstständig angefertigt
<b>Lösung I</b>	25mM Tris-HCl, pH 8,0, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase	Selbstständig angefertigt
<b>Lösung II</b>	200mM NaOH, 1% SDS	Selbstständig angefertigt
<b>Lösung III</b>	3M Natriumacetat, pH 4,8	Selbstständig angefertigt
<i>PBS-Blocking Buffer</i>	PBS, 3% BSA, 0,5% v/v Tween20	Selbstständig angefertigt
<i>PBS-Buffer</i>	4mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 16mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 114mM NaCl, pH 7,4	Selbstständig angefertigt
<i>PBS-Tween Buffer</i>	PBS, 0,1% v/v Tween20	Selbstständig angefertigt

Name	Zusammensetzung	Hersteller
<b>Puffer B</b>	1mM EDTA, Tween 20, Avidin	IBA, Göttingen
<b>Puffer E</b>	100mM TRIS-Cl pH 8,0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 2,5mM Dethiobiotin	IBA, Göttingen
<b>Puffer R</b>	100mM TRIS-Cl pH 8,0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM 2-(4'-hydroxybenzeneazo)benzoic acid (HABA)	IBA, Göttingen
<b>Puffer W</b>	100mM TRIS-Cl pH 8,0, 150mM NaCl, 1mM EDTA	IBA, Göttingen
<b>SDS-PAGE Laufpuffer</b>	30,25g Tris, 144,12g Glycin, 10g SDS, 10l dH <sub>2</sub> O	Selbstständig angefertigt
<b>T4 Ligase Reaction Buffer</b>	50mM Tris-HCl, pH 7,5; 10mM MgCl <sub>2</sub> ; 1mM ATP; 10mM DTT	NEB, Frankfurt am Main

**Tabelle 2-6: Lösungen und Puffer**

### 2.1.7 Kits

Name	Hersteller
<b>Bio-Plex Pro™ Assay</b>	Bio-Rad, München
<b>Bradford Protein Assay</b>	Thermo Fisher, Waltham, USA
<b>Dual-Luciferase® Reporter Assay</b>	Promega, Madison, USA
<b>Gentra Puregene Kit</b>	Qiagen, Hilden
<b>Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Kit</b>	Thermo Fisher, Waltham, USA
<b>Plasmid Midi Kit</b>	Qiagen, Hilden
<b>QIAquick PCR Purification Kit</b>	Qiagen, Hilden
<b>Quantikine mTNFα ELISA</b>	R&D Systems, Minneapolis, USA

**Tabelle 2-7: Kits**

### 2.1.8 Software

Name	Hersteller
<b>Bio-Plex™ Manager 3.0</b>	Bio-Rad, München
<i>Clone Manager 5</i>	Sci-Ed-Software, Morrisville USA
<b>Microsoft Office 2013</b>	Microsoft, Redmond, USA
<b>Pymol</b>	DeLano Scientific, USA
<i>SeqManII™</i>	DNASStar, Madison USA
<b>SOFTmax® Pro</b>	Molecular Devices (Sunnyvale USA)

**Tabelle 2-8: Software**

## 2.2 Biologisches Material

### 2.2.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Herkunft
<i>E. coli</i> BL21-Gold	Invitrogen, Carlsbad USA
<i>E. coli</i> CFT 073	Prof. Dr. U. Dobrindt, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, JMU Würzburg
<i>E. coli</i> TOP10	Invitrogen, Carlsbad USA
<i>E. faecalis</i> Symbioflor 1	Prof. Dr. E. Domann, Institut für Medizinische Mikrobiologie, JLU Gießen
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ Nr: 20343)

**Tabelle 2-9: Bakterienstämme**

### 2.2.2 Zelllinien

Name	Herkunft
<b>HEK293</b>	Dr. S. Tchatalbachev, Institut für Medizinische Mikrobiologie, JLU Gießen
<b>RAW264.7</b>	Dr. S. Tchatalbachev, Institut für Medizinische Mikrobiologie, JLU Gießen

**Tabelle 2-10: Zelllinien**

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1 Die Polymerase-Ketten-Reaktion

Für die PCR Reaktionen wurden die *Taq* DNA-Polymerase oder das *Expand High Fidelity PCR System* verwendet. Für die genomische PCR wurde, aufgrund der niedrigeren Fehlerrate gegenüber der *Taq* DNA-Polymerase, das *Expand High Fidelity PCR Systems* benutzt. Für alle weiteren PCRs wurde die *Taq* DNA-Polymerase verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug 50µl. Die Endkonzentration der Primer betrug 10pmol/µl, MgCl<sub>2</sub> 2mM und der dNTPs 200µmol/l. Die Primer sind in Tabelle 10-1 aufgelistet. Als *thermal cycler* wurde die Geneamp PCR 2400 verwendet.

#### 2.3.1.1 Bedingungen genomische PCR (gPCR)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	5min	
Denaturierung	94°C	30sec	10
Hybridisierung	52°C	30sec	
Elongation	68°C	65sec	
Denaturierung	94°C	30sec	20
Hybridisierung	64°C	30sec	
Elongation	68°C	65sec	
Finale Verlängerung	72°C	3min	
<i>Hold</i>	12°C	∞	

**Tabelle 2-11: Bedingungen gPCR**

Primer: Die für die Klonierungen verwendeten Primer finden sich in Tabelle 2-18. DNA-Polymerase: *Expand High Fidelity PCR Systems*.

#### 2.3.1.2 Bedingungen Plasmid PCR (pPCR)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	10min	
Denaturierung	94°C	20sec	30

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Hybridisierung	55°C	30sec	
Elongation	72°C	70sec	
Finale Verlängerung	72°C	3min	
<i>Hold</i>	12°C	∞	

**Tabelle 2-12: Bedingungen pPCR**

Primer: pASKfor, pASKrev. DNA-Polymerase: *Taq* DNA-Polymerase.

### 2.3.1.3 Bedingungen Screening PCR *E. coli*

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	10min	
Denaturierung	94°C	20sec	30
Hybridisierung	55°C	30sec	
Elongation	72°C	60sec	
Finale Verlängerung	72°C	3min	
<i>Hold</i>	12°C	∞	

**Tabelle 2-13: Bedingungen Screening PCR *E. coli***

Primer: UPECseq1, UPECseq3. DNA-Polymerase: *Taq* DNA-Polymerase.

### 2.3.1.4 Bedingungen Screening PCR *E. faecalis*

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	10min	
Denaturierung	94°C	20sec	30
Hybridisierung	55°C	30sec	
Elongation	72°C	60sec	
Finale Verlängerung	72°C	3min	
<i>Hold</i>	12°C	∞	

**Tabelle 2-14: Bedingungen Screening PCR *E. faecalis***

Primer: E.f.seq1, E.f.seq2. DNA-Polymerase: *Taq* DNA-Polymerase.



### 2.3.1.5 Bedingungen TcpC Sequenzierungs-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	10min	
Denaturierung	94°C	20sec	30
Hybridisierung	55°C	30sec	
Elongation	72°C	90sec	
Finale Verlängerung	72°C	3min	
<i>Hold</i>	12°C	∞	

**Tabelle 2-15: Bedingungen TcpC Sequenzierungs-PCR**

Primer: UPECseq6 und UPECseq7. DNA-Polymerase: *Taq* DNA-Polymerase. Die Primer liegen jeweils 120bp außerhalb des TcpC Gens, sodass auch die flankierenden Regionen amplifiziert wurden. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 1219bp.

### 2.3.1.6 Bedingungen TcpF Sequenzierungs-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	10min	
Denaturierung	94°C	20sec	30
Hybridisierung	52°C	30sec	
Elongation	72°C	90sec	
Finale Verlängerung	72°C	3min	
<i>Hold</i>	12°C	∞	

**Tabelle 2-16: Bedingungen TcpF Sequenzierungs-PCR**

Primer E.f.seq3 und E.f.seq5. DNA-Polymerase: *Taq* DNA-Polymerase. Die Primer liegen jeweils 150bp außerhalb des TcpF Gens, sodass auch die flankierenden Regionen amplifiziert wurden. Das PCR-Produkt hat eine Länge von 1206bp.

## 2.3.2 Aufreinigung von DNA-Molekülen

### 2.3.2.1 Alkoholfällung

Diese Methode wurde durchgeführt, um die Konzentration einer DNA-Lösung zu verändern oder störende anorganische Ionen zu beseitigen. Hierfür wurde 1/10 Volumen

3M Natriumacetat (pH 5,4) und 3 Volumina 96% Ethanol zur DNA-Probe gegeben und bei 4°C für 20min und 16060xg zentrifugiert. Um Reste des eingesetzten Natriumacetats zu beseitigen, wurde die sedimentierte DNA mit 70%-igem Ethanol gewaschen, unter identischen Bedingungen erneut zentrifugiert, an der Luft getrocknet und abschließend in DNase freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **2.3.2.2 Aufreinigung von amplifizierten DNA-Molekülen**

Die Aufreinigung von PCR-Produkten DNA-Amplifikaten erfolgte mit dem *QIAquick PCR-Purification-Kit* gemäß den Herstellerangaben. Hierfür wurde der PCR-Reaktionsansatz mit dem fünffachen Volumen PBI-Puffer versetzt, auf die QIAquick-Säule gegeben und für 1min bei 10.000xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die auf der Säule gebundene DNA mit 0,75ml PE-Puffer gewaschen (1min, 10.000xg, Raumtemperatur). Abschließend wurde die DNA in 50µl EB-Puffer eluiert (1min, 10.000xg, Raumtemperatur) und deren Konzentration spektralfotometrisch bestimmt (2.3.7).

### **2.3.3 Präparation von Plasmid-DNA**

#### **2.3.3.1 Präparation von Plasmid-DNA nach der Minilysatmethode**

1,5ml einer Bakterienübernachtskultur wurde für 5min, 6000xg und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 100µl gekühlter Lösung I (25mM Tris-HCl, pH 8,0, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase) resuspendiert und anschließend 5min auf Eis inkubiert. Dann wurden 200µl Lösung II (200mM NaOH, 1% SDS) hinzugegeben. Hier kommt es zu einer alkalischen Lyse der Bakterienzellen und Denaturierung der DNA. Nach anschließender Inkubation für 5min auf Eis wurden dem Ansatz 150µl Lösung III (3M Natriumacetat, pH 4,8) hinzugefügt und für weitere 5min auf Eis inkubiert. Bei diesem Schritt renaturieren die zirkulären Plasmid-DNA-Moleküle, während die genomische DNA zum größten Teil denaturiert im Sediment bleibt. Durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 16060xg wurden die Zelltrümmer, die genomische DNA und die meisten denaturierten Proteine abzentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die Plasmid-DNA befindet, wurde in ein zweites Eppendorf-Gefäß dekantiert und mit 1 ml 96%-igem EtOH versetzt. Nach einer Inkubation für 15min bei Raumtemperatur wurde erneut zentrifugiert (15min, 16060xg). Die sedimentierte Plasmid-DNA wurde mit kaltem 70%-igem EtOH

gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Abschließend wurde das trockene Sediment in 50µl DNase freiem Wasser aufgenommen.

### **2.3.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA mittels Qiagen Midipräparation**

Die Isolierung wurde gemäß den Angaben des Herstellerprotokolls durchgeführt. 25 bis 100ml Bakterienkulturen wurden bei 4°C für 5min und 6000xg abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 4ml gekühlter Lösung P1 suspendiert. Danach wurden 4ml Lösung P2 zugegeben und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 4ml Lösung P3 und 15min Inkubation auf Eis wurden Lösung P1 und P2 neutralisiert. Die anschließende 30-minütige Zentrifugation bei 10000rpm (4°C) entfernte die Zelltrümmer und die chromosomale DNA. Der Überstand wurde über eine zuvor bereits mit 4ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen 100-Säule gegeben. Die Plasmid-DNA bindet aufgrund ihrer negativen Ladung an das Säulenmaterial, die ungebundenen RNA- und Proteinrückstände wurden durch zweimaliges Waschen der Säule mit 10ml QC-Waschpuffer entfernt. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wurden durch Zugabe von 5ml Elutionspuffer QF eluiert. Das Eluat wurde mit 0,7 Volumina Isopropanol versetzt. Es erfolgte die Präzipitation der Plasmid-DNA, die nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 10000rpm sedimentierte. Das Sediment wurde mit 5ml 70%-igem EtOH gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde das Sediment in 200µl DNase freiem Wasser aufgenommen.

### **2.3.4 Spaltung mit Restriktionsenzymen**

Die Reaktionsbedingungen für die Restriktionsendonucleasen Eco31I, BamHI, XhoI und NheI wurden dem Herstellerprotokoll entnommen. Für die Klonierungen (Tabelle 2-18) wurden 2-5µg der DNA-Fragmente für 6 Stunden bei 37°C in *FastDigest Green Buffer* unter Zugabe von 10U Restriktionsenzym in 200µl Endvolumen verdaut. Die DNA Fragmente wurden anschließend mit dem *QIAquick PCR-Purification-Kit* (2.3.2.2) aufgereinigt.

### **2.3.5 Ligase-Reaktion**

100-200ng der vorverdauten Fragment-DNA wurden gemäß dem NEB-Herstellerprotokoll mit 200-600ng Vektor-DNA, in T4 *Ligase Reaction Buffer* (50mM

Tris-HCl, pH 7,5; 10mM MgCl<sub>2</sub>; 1mM ATP; 10mM DTT (NEB)) und 1U T4-Ligase (NEB) in 30µl Endvolumen für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ligation wurde anschließend in der Agarosegelelektrophorese (2.3.6) überprüft.

### **2.3.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Die Restriktionsfragmente, PCR-Produkte und Ligationsreaktionen wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Es wurde 0,8% Agarose in 1x TAE (40mM Tris-Acetat (pH 7,8 bis 8), 1mM EDTA) eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen Ladebuffer (50% v/v Glycerin; 50mM EDTA; 0,005 % w/v Bromphenolblau) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte horizontal bei einer konstanten Spannung von 80-140V (Consort E802 *Powersupply*) in 1x TAE als Laufpuffer. Die Gele wurden für 5min in einem Ethidiumbromid (EB)-Tauchbad (2,4mg/l H<sub>2</sub>O) gefärbt und anschließend in 1x TAE für 5min entfärbt. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht (254nm) mit dem Gel-Doc<sup>TM</sup> XR+ System fotografiert. Zur Größenabschätzung wurde der DNA-Marker 1Kb Plus DNA *Ladder* verwendet.

### **2.3.7 Spektralfotometrische Quantifizierung von DNA**

Die gelösten DNA Proben wurden spektralfotometrisch mithilfe des Nanodrop quantifiziert und auf ihre Reinheit überprüft. Der A<sub>260</sub> /A<sub>280</sub> Wert spricht für die Reinheit der DNA Isolierung. Reine DNA hat einen A<sub>260</sub> /A<sub>280</sub> Wert von 1.

### **2.3.8 DNA-Sequenzierung**

Die PCR-Amplifikate von TcpC sowie TcpF wurden auf mögliche Punktmutationen und auf genetische Stabilität überprüft. Die Sequenzierungen wurden extern von der Firma AGOWA *genomics*, Berlin (<http://www.agowa.de/>) vorgenommen. Die Sequenzierungsergebnisse wurde entsprechend mit der TcpC Sequenz von *E. coli* CFT073 oder *E. faecalis* Symbioflor 1 mithilfe der Software *SeqManII*<sup>TM</sup> verglichen. Die Sequenzierung für *E. coli* Isolate erfolgte mit den Primern der Sequenzierungs-PCR (UPECseq6, UPECseq7). Für die Sequenzierung der *E. faecalis* Isolate wurden die Primer E.f.seq3 und E.f.seq5 (Tabelle 10-1) verwendet.

### 2.3.9 Klonierungen

Je nach Anforderungsprofil wurden die Tc<sup>r</sup>-Sequenzen in eukaryotische oder prokaryotische Expressionsplasmide kloniert.

Als Grundgerüst für die eukaryotischen Expressionsplasmide wurden die *pCMV-Tag Epitope Tagging Mammalian Expression Vectors* (Stratagene) verwendet. Die Konstrukte enthalten einen N-terminalen *FLAG-tag (DYKDDDDK)*, der die Expressionskontrolle durch Antikörper ermöglicht. Aufgrund des Zytomegalievirus (CMV)-Promoters wird das Klonierungsprodukt konstitutiv exprimiert. Als positive Kontrolle für den CMV-Promoter dient ein von der Firma Stratagene mitgeliefertes bereits kloniertes Konstrukt, welches das *Firefly*-Luciferase-Gen-beinhaltet.

Als Grundgerüst für die prokaryotischen Expressionsplasmide wurden pASK-IBA5plus und pASK-IBA3plus verwendet. Die Vektoren enthalten ein Ampicillin-Resistenz-Gen, das Selektionsschritte ermöglicht. C-terminal (pASK-IBA3plus) bzw. N-terminal (pASK-IBA5plus) befindet sich ein *Strep-tag II (MASWSHPQFEK)*, mit dem das rekombinante Protein detektiert und aufgereinigt werden kann. Die Expression steht unter der Kontrolle eines *tet (Tetrazyklin)*-Promoters, der unabhängig vom genetischen Hintergrund von *E. coli* arbeitet. Die Expression wird durch Zugabe von 200µg/l AHT induziert.

Die Plasmide pRK5, pElamLu, phRL-TK, hTLR2 und pGFP wurden dankenswerterweise von Dr. S. Tchatalbachev zur Verfügung gestellt. Tabelle 2-17 präsentiert die Ausgangsvektoren für die Klonierungen und die Vektoren, die erworben oder zur Verfügung gestellt wurden.

Plasmidname	Verwendung und relevante Eigenschaften	Herkunft
<b>hTLR2</b>	kodiert für den humanen TLR2-Rezeptor, Dual-Luciferase <sup>®</sup> Reporter Assay	Dr. S. Tchatalbachev, Institut für Medizinische Mikrobiologie, JLU Gießen
<b>pASK-IBA3plus</b>	Klonierungen, Überexpression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen, Stimulationsversuche	IBA, Göttingen
<b>pASK-IBA5plus</b>	Klonierungen, Überexpression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen, Stimulationsversuche	IBA, Göttingen

<b>pAzurin</b>	kodiert für Azurin (15kDa) von <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , Grundvektor = pASK-IBA2 (IBA), positive Kontrolle bei der Aufreinigung rekombinanter Proteine	IBA, Göttingen
<b>pCMV-FLAG2B</b>	Klonierungen, Dual-Luciferase <sup>®</sup> Reporter Assay	Stratagene <sup>®</sup> , La Jolla USA
<b>pElamLu</b>	kodiert für die Luciferase von <i>Renilla reniformis</i> , experimentelles Reporter-gen für Dual-Luciferase <sup>®</sup> Reporter Assay	Dr. S. Tchatalbachev, Institut für Medizinische Mikrobiologie, JLU Gießen
<b>pGFP</b>	kodiert für GFP, Grundvektor = pASK-IBA3plus (IBA), negative Kontrolle für Folgeexperimente mit aufgereinigten Proteinen	Dr. S. Tchatalbachev, Institut für Medizinische Mikrobiologie, JLU Gießen
<b>phRL-TK</b>	kodiert für die Luciferase von <i>Photinus pyralis</i> , Kontrollreportergen für Dual-Luciferase <sup>®</sup> Reporter Assay	Dr. S. Tchatalbachev, Institut für Medizinische Mikrobiologie, JLU Gießen
<b>pRK5</b>	DNA-Mengenausgleich für Dual-Luciferase <sup>®</sup> Reporter Assay	Dr. S. Tchatalbachev, Institut für Medizinische Mikrobiologie, JLU Gießen

**Tabelle 2-17: Verwendete Vektoren**

In der Tabelle 2-18 sind sämtliche Klonierungen, die in dieser Arbeit vorgenommen wurden, aufgeführt.

-MATERIALIEN UND METHODEN-

Konstrukt	Matrize	Primer gPCR	Amplifikat	bp gPCR	Ausgangs-Plasmid	Restriktase	bp pPCR	Primer pPCR	kDa
pSty1	L.m.	TIR9/12	TcpM	1023	pASK-IBA5plus	Eco31I	1214	pASKfor/rev	39,4
pSty2	L.m.	TIR9/10	N-terminale HTH Domäne von TcpM	432	pASK-IBA5plus	Eco31I	623	pASKfor/rev	15,8
pSty3	L.m.	TIR11/12	C-terminale TIR Domäne von TcpM	630	pASK-IBA5plus	Eco31I	821	pASKfor/rev	23
pSty4	<i>E. faecalis</i> Symbioflor 1	TK4/5	TcpF	867	pASK-IBA5plus	Eco31I	1058	pASKfor/rev	30,3
pSty5	L.m.	TIR8/14	C-terminale TIR Domäne von TcpM	620	pASK-IBA3plus	Eco31I	855	pASKfor/rev	23
pSty6	L.m.	TIR7/8	TcpM	1013	pASK-IBA3plus	Eco31I	1191	pASKfor/rev	39,4
pSty7	<i>E. faecalis</i> Symbioflor 1	TK6/7	TcpF	857	pASK-IBA3plus	Eco31I	1035	pASKfor/rev	30,3
pSty8	L.m.	TK12/14	N-terminale HTH Domäne von TcpM	426	pCMV-FLAG-2B	BamHI/XhoI	953	CMVEout/SVPA-Sout	
pSty9	L.m.	TK13/15	C-terminale TIR Domäne von TcpM	615	pCMV-FLAG-2B	BamHI/XhoI	1142	CMVEout/SVPA-Sout	
pSty10	<i>E. faecalis</i> Symbioflor 1	TK9/10	TcpF	855	pCMV-FLAG-2B	BamHI/XhoI	1382	CMVEout/SVPA-Sout	
pSty11	L.m.	TK12/13	TcpM	1008	pCMV-FLAG-2B	BamHI/XhoI	1535	CMVEout/SVPA-Sout	
pSty12	L.m.	TIR7/13	N-terminale HTH Domäne von TcpM	413	pASK-IBA3plus	Eco31I	609	pASKfor/rev	15,8
pSty13	<i>E. coli</i> CFT073	pTcpC-Flag For/Rev	TcpC (Startcodon GTG)	945	pCMV-FLAG-2B	BamHI/XhoI	1472	CMVEout/SVPA-Sout	
pSty14	<i>E. coli</i> CFT073	pTcpC-Flag ForS/Rev	TcpC (Startcodon ATG)	918	pCMV-FLAG-2B	BamHI/XhoI	1445	CMVEout/SVPA-Sout	

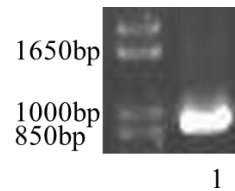
Konstrukt	Matrize	Primer gPCR	Amplifikat	bp gPCR	Ausgangs-Plasmid	Restriktase	bp pPCR	Primer pPCR	kDa
pSty15	<i>E. coli</i> CFT073	TIR5/6	TcpC (Startcodon GTG)	953	pASK-IBA3plus	Eco31I	1131	pASKfor/rev	35
pSty16	<i>E. coli</i> CFT073	TIR15/16	TcpC (Startcodon ATG)	899	pASK-IBA5plus	Eco31I	1090	pASKfor/rev	33
pTepM1	L.m.	TK12/13	TcpM	1008	pEFGP-C2	NheI,XhoI	1360	CMVEout/SVPA-Sout	
pTepM2	L.m.	TK12/14	N-terminale HTH Domäne von TcpM	426	pEFGP-C2	NheI,XhoI	778	CMVEout/SVPA-Sout	
pTepM3	L.m.	TK13/15	C-terminale TIR Domäne von TcpM	615	pEFGP-C2	NheI,XhoI	967	CMVEout/SVPA-Sout	
pTepF	<i>E. faecalis</i> Symbioflor 1	TK9/10	TcpF	855	pEFGP-C2	NheI,XhoI	1207	CMVEout/SVPA-Sout	
pTepC1	<i>E. coli</i> CFT073	pTepC-Flag For/Rev	TcpC (Startcodon GTG)	945	pEFGP-C2	NheI,XhoI	1297	CMVEout/SVPA-Sout	
pTepC2	<i>E. coli</i> CFT073	pTepC-Flag ForS/Rev	TcpC (Startcodon ATG)	918	pEFGP-C2	NheI,XhoI	1270	CMVEout/SVPA-Sout	

**Tabelle 2-18: Klonierungen**

In der ersten Spalte findet sich der Name des Konstrukts. In Spalte 2 sind die Keime (L.m.: *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*) aufgeführt, deren genomische DNA als Matrize für die PCR verwendet wurden (gPCR). Die drei folgenden Spalten enthalten Informationen über die bei den PCR-Reaktionen verwendeten Primer (Tabelle 10-1), den Bereich der genomischen DNA, der amplifiziert wurde, und die zu erwartende Länge des Fragments bei der gPCR. Die verwendeten Grundvektoren sind in der nächsten Spalte aufgelistet. In der Spalte: Restriktase sind die Restriktionsenzyme aufgelistet, mit denen das PCR-Amplifikat und der Grundvektor verdaut wurden. Nach Ligation und Transformation wurden die Transformanten per PCR (pPCR) überprüft, ob sie das PCR Amplifikat (*insert*) tragen. Die zu erwartenden Längen bei positiven Klonen sind in Spalte 8 und die bei der pPCR verwendeten Primer in Spalte 9 aufgelistet. Die letzte Spalte gibt das erwartete Molekulargewicht der Expressionsprodukte in Kilodalton (kDa) an.



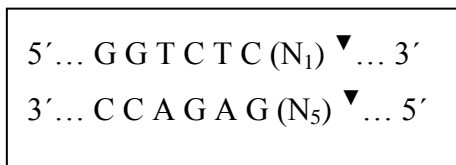
Anhand des Konstrukts pSty4 werden exemplarisch die Stufen der Klonierung dargestellt. Entsprechend erfolgte die Herstellung der übrigen Konstrukte. Zunächst wurde die Insertionssequenz für pSty4 durch PCR aus genomischer DNA von *E. faecalis* Symbioflor 1 (*gPCR* s. 2.3.1.1) amplifiziert (Abbildung 2-1).



**Abbildung 2-1: pSty4 gPCR**

1: Amplifikat von genomischer DNA von *E. faecalis* Symbioflor 1. Marker: 1Kb Plus DNA Ladder.

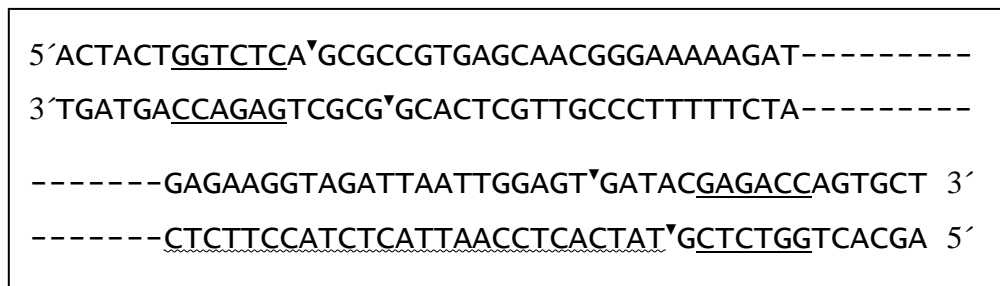
Das amplifizierte Insert und der Ausgangsvektor pASK-IBA5plus wurden mit der Restriktase Eco31I verdaut. Die Spaltungsstelle sowie die von Eco31I erkannte Sequenz sind in Abbildung 2-2 dargestellt. Der Verdau mit Eco31I liefert 5'-Überhänge.



**Abbildung 2-2 Erkennungssequenz und Spaltungsstelle von Eco31I**

Nx: Anzahl unspezifischer Nukleotide bis zur Spaltstelle;  $\blacktriangledown$ : Spaltstelle.

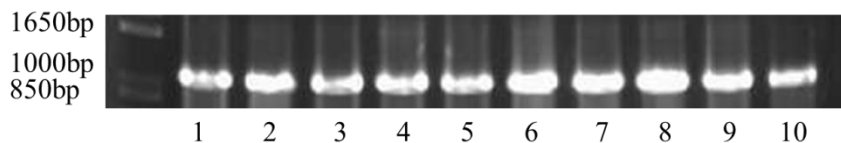
Die Primer wurden so konzipiert, dass am 3'-Ende die zur Matrize homologe Sequenz und innerhalb des 5'-Endes die Erkennungssequenz von Eco31I liegt. Die 5'-Überhänge (GCGC, TATC) des Inserts wurden so gestaltet, dass sie komplementär zu den 5'-Überhängen des Spaltprodukts (ATAG, CGCG) des Ausgangsvektors sind (Abbildung 2-3). Eco31I spaltet pASK-5plus zweimal innerhalb der MCS (*Multiple Cloning Site*). Auf diese Weise wurde verhindert, dass der leere Vektor während der Ligation zurückligiert. Das *insert* lag nach Ligation C-terminal vom *Strep-tag*<sup>®</sup> (IBA). Dabei wurde die Sequenz des TcpF von der des *Strep-tag*<sup>®</sup> durch 6bp (*linker*) getrennt.



**Abbildung 2-3: Insert für pSty4 mit Eco31I Schnittstellen**

G: Erkennungssequenz für Eco31I; G: Primeranteil mit Homologie zur Matrize; ▼: Spaltstelle.

Chemisch-kompetente *E. coli* Top 10-Zellen (s. 2.4.3.1) wurden mit dem Ligationsprodukt transformiert. Die Transformanten wurden auf Ampicillin-haltigen LB Platten kultiviert. Durch PCR (pPCR s. 2.3.1.2) wurde überprüft, ob die Transformanten einen leeren Vektor oder einen Vektor plus *insert* tragen. Liegt ein leerer Vektor vor, wurde eine Länge von 351bp erwartet. Der Vektor plus *insert* ergibt eine Amplifikatlänge von 1058bp. Die 10 getesteten Kolonien in Abbildung 2-4 tragen demnach das *insert*.

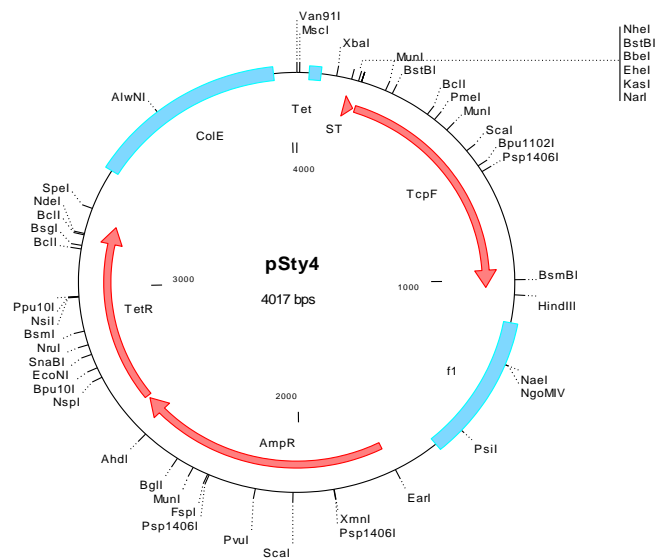


**Abbildung 2-4: pSty4 pPCR**

*E. coli* TOP10 Klone transformiert mit pSty4 wurden mit PCR auf die Anwesenheit des *TcpF inserts* untersucht. 1-10: Klon 1-10. Marker: 1Kb Plus DNA Ladder.

Um die Ausbeute positiver Transformanten zu erhöhen, kann es nützlich sein das Ligationsprodukt mit Restriktasen zu verdauen, deren Erkennungssequenz innerhalb der MCS-Sequenz lokalisiert ist. Auf diese Weise wird nur der leere Vektor verdaut und die Ausbeute für Transformanten mit Vektor plus *insert* erhöht. Bei pSty4 wurde der Ligationsansatz zusätzlich mit XhoI und PstI verdaut. Die positiv getesteten Klone wurden anschließend sequenziert (2.3.8), um mögliche Punktmutationen auszuschließen. Das Sequenzierungsergebnis wurde dabei an die zuvor mit *Clone Manager 5* (Sci-Ed-Software) erstellte Sequenz von pSty4 angelegt und verglichen. Für den Klon, der frei

von Punktmutationen war, wurde eine Midipräparation (2.3.3.2) durchgeführt. Abbildung 2-5 zeigt den schematischen Aufbau des Konstrukts pSty4.



**Abbildung 2-5: pSty4 Konstrukt**

ST: *Strep-tag*<sup>®</sup>; TcpF: TIR-domain containing protein of *E. faecalis* Symbioflor 1; f1: f1 origin of replication, AmpR: Ampicillin-Resistenz Gen, TetR: Tetrazyklin-Resistenz Gen; ColE: E1 Coli origin of replication; Tet: Tetrazyklin-Promoter.

## 2.4 Bakteriologische Methoden

### 2.4.1 Bakterienanzucht

#### 2.4.1.1 Nährmedium für *E. coli*

Sowohl als Flüssig- wie auch als Festmedium auf Agar-Platten (1,5%) diene Luria-Bertani (LB) Medium (10g NaCl, 10g Casein-Hydrolysat, 5g Hefeextrakt (Gibco), 1000 ml destilliertes Wasser). Wenn nötig, wurde das Medium mit 100ug/ml Ampicillin oder 50µg/ml Kanamycin versetzt.

#### 2.4.1.2 Nährmedium für *E. faecalis* und *L. mesenteroides*

Sowohl als Flüssig- wie auch als Festmedium auf Agar-Platten (1,5%) diene Brain-Heart-Infusion (BHI)-Medium (37g BHI Bacto™, 1000ml destilliertes Wasser).

#### 2.4.2 Präparation chromosomaler DNA grampositiver und gramnegativer Bakterien

Die chromosomale DNA wurde aus *E. coli* CFT073, *E. faecalis* Symbioflor 1 und *L. mesenteroides* präpariert. Die isolierte chromosomale DNA diene als Matrize für die Klonierungen und als positive Kontrolle bei den Screening-PCRs der Urinisolate (2.7.1 und 2.7.2). Die Präparation wurde mit dem Genra Puregene Kit und gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. 0,5ml Bakterien aus einer Bakterienkultur  $OD_{600} > 3$  wurden in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß durch 1-minütiges Zentrifugieren bei 10000xg (Zentrifuge 5804R) pelletiert. Das Bakterien-Pellet wurde mit 0,5ml einer 0,85% [w/v] (200mM) NaCl-Lösung resuspendiert und gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 1min bei 10000xg wurde das Pellet in 100µl *Lösung1* (10mM TRIS HCl, 50mg/ml Lysozym, pH 7,5) resuspendiert und die Suspension im Anschluss für 30min bei 37°C und 750rpm auf dem Thermomixer inkubiert. Während dieses Schrittes erfolgt der Abbau der Zellwand durch das Lysozym. Bei gramnegativen Bakterien entfiel dieser Schritt. Anschließend wurden die Bakterien 5min bei 5000xg abzentrifugiert, in 300µl *Cell Lysis Puffer* aufgenommen und resuspendiert. Dann wurden 1,5µl *RNAse I Lösung* zu dem Lysat hinzugegeben und für 15min bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, 100µl *Precipitation Solution* hinzugegeben und für 20sec gemischt (Vortex Genie 2). Nach 30min Inkubation auf Eis wurde die Probe bei 13000xg für 3min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 300µl Isopropanol gefällt (2min bei 10000xg). Im Anschluss wurde das Pellet mit 500µl 70% [v/v] Ethanol gewaschen. Die DNA wurde luftgetrocknet und über Nacht in 100µl *Hydratation Solution* aufgelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

### 2.4.3 Bakterientransformation

#### 2.4.3.1 Klassische CaCl<sub>2</sub>-Methode

Aus einer Übernachtskultur wurden 100 ml LB-Medium 1:100 angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,2 bis 0,3 inkubiert. Danach wurden die Zellen für 5min bei 4°C und 6000xg abzentrifugiert (*Megafuge* 1.0R). Das Bakteriensediment wurde in 20ml einer eiskalten 0,1M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und für 1h auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s.o.) wurden die Zellen in 1ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden innerhalb von 48h verwendet oder eingefroren.

Für eine Transformation wurden 50µl kompetente Zellen zu der zu transformierenden DNA in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Auf eine 15-minütige Inkubation auf Eis folgte ein 5-minütiger Temperaturschock bei 37°C (Thermomixer). Die 15-minütige Inkubation auf Eis wurde nochmals wiederholt. Anschließend wurden die Bakterien in 400µl LB-Medium aufgenommen und für 30min (LB + Ampicillin)- bzw. 45min (LB + Kanamycin) bei 37°C und 350rpm im Thermomixer geschüttelt. In diesem Schritt erfolgte die Etablierung des Plasmids. Anschließend wurde der Ansatz auf Antibiotika-haltigen Agar-Platten zur Selektion der transformierten *E. coli*-Zellen für 12-16h im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

#### 2.4.3.2 Elektroporation

##### Präparation von elektrokompetenten Zellen

1ml einer Übernachtskultur wurde in 50ml LB-Medium überimpft. Bei einer OD<sub>600</sub>= 0,5 wurden die Bakterien bei 6000xg, 8min und bei 4°C zentrifugiert (*Megafuge* 1.0R). Das Bakterienpellet wurde in 50ml kaltem 10% Glycerin resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 6000xg, 8min und 4°C. Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Abschließend wurde das Bakterienpellet in 500µl eiskaltem 10% Glycerin resuspendiert und in 50µl Portionen verteilt. Bei -80°C sind die Zellen bis zu 3 Monate verwendbar.

##### Elektroporation –Ablauf

Die Plasmid-DNA wurde auf 20-30ng/µl verdünnt, 2µl der Verdünnung auf ein 50µl Aliquot elektrokompetenter Zellen gegeben und das Zell-DNA-Gemisch in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation (MicroPulser<sup>TM</sup>) erfolgte

durch einen Spannungsimpuls von 1,6kV und 25 $\mu$ F bei einem Widerstand von 200 $\Omega$ . Nach der Elektroporation wurden die Transformanten mit 50 $\mu$ l LB-Medium aus der Küvette herausgewaschen und für 1h bei 37°C, 350rpm inkubiert. Die Transformanten wurden auf Antibiotika-haltigen LB-Agar Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 2.4.4 Anlegen von stabilisierten Glycerin Kulturen (STABS)

Die Bakterienklone wurden zur langfristigen Aufbewahrung in einer Glycerinlösung bei -70°C tiefgefroren. Hierzu wurde 1ml einer Übernachtskultur des gewünschten Klons mit 0,2 ml sterilem Glycerin versetzt.

### 2.5 Zellkulturarbeiten und Methoden

#### 2.5.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

- **HEK293** (*Human Embryonic Kidney*)-Zellen. Es handelt sich um eine Zelllinie, die ein Transformationsprodukt aus einer menschlichen embryonalen Nierenzelle mit DNA-Teilen des humanen Adenovirus Typ 5 ist [75].
- **RAW264.7** (*Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line*). Die Zellen wurden aus Aszites einer männlichen Maus gewonnen, der zuvor das Absolon Leukämie Virus (A-MuLV) intraperitoneal injiziert wurde [76].

Die Zellen wurden bei 37°C in ca. 96% Luftfeuchtigkeit und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% (Steri-Cult 200 Inkubator) gezüchtet. Für die Züchtung der Zellen wurden Zellkulturschalen aus Polypropylen der Firma Greiner mit einem Durchmesser von 3,5cm, 6cm und 10cm benutzt.

#### Nährmedium:

- DMEM (*Dulbecco Eagle's minimal essential medium*, mit 8mM L-Glutamin)
- 10% FKS, 30min bei 56°C inaktiviert
- 1% 100x PEN/STREP Antibiotika-Gemisch

Die konfluent als *Monolayer* gewachsenen Zellen müssen regelmäßig ausgedünnt werden. Dazu wurden die Zellen erst mit 10ml *Phosphate Buffered Saline* (PBS) [140mM

NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,4)] gewaschen, um abgestorbene Zellen und FKS-Reste zu entfernen. Durch Inkubation (für HEK293 1min) bei 37°C mit einer Trypsin/EDTA-haltigen [0,05% (w/v) Trypsin, 0,02% (w/w) EDTA] PBS-Lösung (Gibco) wurden die Zellen von der Petrischale abgelöst. RAW264.7 Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in 10ml frischem Medium aufgenommen und im Verhältnis von 1:8 auf neue Petrischalen verteilt. Dieses Prozedere wurde 2-3x/ Woche wiederholt.

Für dauerhaftes Aufbewahren von Zelllinien müssen die Zellen eingefroren aufbewahrt werden. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1200-1400rpm wurden die Zellen in Einfriermedium (DMEM-Medium +10% FKS +10% DMSO resuspendiert (1ml Medium pro 6cm Schale oder 3,5x10<sup>6</sup> Zellen), in 1ml Aliquots in Kryoröhrchen aufgeteilt und bei -70°C eingefroren. Die eingefrorenen Zellen wurden bei 37°C aufgetaut und der Inhalt eines Kryoröhrchens auf eine 6cm Schale mit 3ml DMEM-Medium + 10% FKS verteilt. Nach 6 bis 12h erfolgte ein Mediumwechsel, um das DMSO, das neben seiner Funktion als Gefrierschutzmittel auch zytotoxische Eigenschaften hat, zu entfernen.

### **2.5.2 Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega)**

Beim Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System wurde die eukaryotische Zelle mit zwei Plasmidkonstrukten transfiziert. Das eine Plasmid (*pElamLu*) enthält das *experimentelle Reportergen*, das für die Luciferase von *Renilla reniformis* kodiert und abhängig von einem NFκB-sensitiven Promotor exprimiert wird. Anhand der Luciferase Aktivität können so Rückschlüsse auf die NFκB Aktivität gezogen werden. Das zweite Plasmid (*phRL-TK*) enthält das *Kontrollreportergen*, das für die Luciferase von *Photinus pyralis* kodiert. Im Gegensatz zum experimentellen Reportergen erfolgt die Expression des Kontrollreportergens konsekutiv. Indem man die Ergebnisse des experimentellen Reportergens relativ zu denen des Kontrollreportergens betrachtet (*Relative Luminescence Unit* (RLU)), werden Differenzen aufgrund unterschiedlicher Transfektionseffizienz oder Überlebensraten der Zellen minimiert. In dieser Arbeit wurde die Transfektion von HEK293- Zellen mit Lipofectamin<sup>™</sup> 2000 durchgeführt. Eigene Optimierungsversuche zeigten die höchste Transfektionseffizienz bei einem Lipofectamin<sup>™</sup> 2000/ DNA Verhältnis von 0,3.

#### **Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay Ablauf:**

$1,1 \times 10^6$  HEK293-Zellen wurden pro well in einer 12-well Platte in DMEM/10% FKS/1% PEN/STREP ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei mindestens 90% Konfluenz wurden die Zellen mit 1ml PBS und anschließend mit DMEM gewaschen. Für einen Transfektionsansatz wurden 2,2µg DNA und 7µl Lipofectamin<sup>TM</sup> Reagenz gelöst in einem Gesamtvolumen von 250µl DMEM zu den Zellen pipettiert. Die 2,2µg DNA setzten sich aus den Plasmiden *hTLR2*, *pRK5*, *pElamLu*, und *phRL-TK* zusammen. Außerdem wurden entweder *pTcpF*, *pTcpC1*, *pTcpC2*, *pTcpM1*, *pTcpM2* oder *pTcpM3* hinzugegeben. Bei *hTLR2* wurde mit 50ng oder 25ng DNA gearbeitet. *pTcpF*, *pTcpC1*, *pTcpC2*, *pTcpM1*, *pTcpM2* oder *pTcpM3* wurden, wie unter 3.4.1 beschrieben, bezogen auf *hTLR2* in den entsprechenden Verhältnissen hinzugegeben. *pElamLu* (550ng) und *phRL-TK* (50ng) waren in jedem Versuchsansatz konstant. *pRK5* wurde verwendet um quantitative DNA Unterschiede der Transfektionsansätze (Gesamtmenge DNA 2,2µg) auszugleichen. Die Transfektionsansätze wurden für 20min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend auf die Zellen gegeben und die Zellen für 6h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 1min bei 37°C mit 200µl Trypsin-EDTA behandelt und mit 200µl DMEM/10% FKS abgelöscht. Die wells wurden dann mit 1ml DMEM/2% FKS aufgefüllt, zu 100 µl/well Portionen auf 96-well Platten verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Aktivierung von TLR2 wurden die Zellen mit Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> in einer Endkonzentration von 0,5µM für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, 20µl 1x PLB (*Passive Lysis Buffer*) pro well pipettiert und für 30min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Luciferase Substrate wurden entsprechend der Herstellerangaben des Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assays vorbereitet. Die Messung erfolgte direkt in der 96er-well Platte am Luminometer. Die Injektionsmenge für *LARII* (*Luciferase Assay Reagent II*) und *Stop&Glo*<sup>®</sup> Reagent wurde auf 100µl eingestellt. Die Messperiode der beiden Enzymaktivitäten betrug 10sec und setzte 2sec nach Injektion des Substrates ein. Die Messung der Proben erfolgte in Triplikaten. In jedem Versuch existieren zwei identische Versuchsansätze, von denen nur einer mit Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> aktiviert wurde. Der nicht mit Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub> aktivierte Ansatz diente als negative Kontrolle (PAM3-). Der Versuchsansatz, der lediglich *pRK5*, *pElamLu* und *phRL-TK* (TLR2-) enthält, zeigt die zelleigene, TLR2-unabhängige NFκB-Antwort. Der Versuchsansatz, der lediglich *pRK5*, *hTLR2*, *pElamLu* und *phRL-TK* enthält, zeigt die TLR2-abhängige NFκB-Antwort in Abwesenheit von Tcp Proteinen (TLR2 25/50) und wurde als Ausgangswert für die statistische Analyse



mittels *student's t-test* verwendet. Die gewonnenen Rohdaten wurden mithilfe der SOFTmax<sup>®</sup>Pro Software ausgelesen und mit Microsoft Excel ausgewertet.

### 2.5.3 Zytokin-Messung mit dem Bio-Plex Pro<sup>™</sup>

Mit Hilfe von Bio-Plex Pro<sup>™</sup> lassen sich Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren aus Serum und Zellkulturüberständen messen. Das Verfahren ähnelt dem eines *capture sandwich immunoassay*. Es werden ein Identifikationsantikörper und ein Detektionsantikörper verwendet. Ersterer ist spezifisch gegen ein Epitop eines bestimmten Zytokins gerichtet und ist an eine mikrokleine Plastikugel (*Bead*) gekoppelt. Der *Bead* enthält einen Farbstoff, der bei Anregung durch Licht eines Lasers, in einem für den Farbstoff spezifischen Wellenlängenspektrum fluoresziert. Anhand des Wellenlängenspektrums wird die Identifizierung des zu messenden Zytokins ermöglicht. Der Detektionsantikörper bindet ebenfalls spezifisch an das gewünschte Zytokin, allerdings an einem anderem Epitop als der Identifikationsantikörper. Durch Bestimmung des Fluoreszenz Signals und Vergleich mit einem Zytokin-Standard (Bio-Rad) erfolgt die Quantifizierung der zu messenden Zytokine.

#### Bio-Plex Pro<sup>™</sup> Ablauf

In dieser Arbeit wurden die Überstände von stimulierten RAW264.7 Makrophagen auf die Produktion von IL-6 und TNF- $\alpha$  untersucht. Hierzu wurden RAW264.7 Makrophagen mit  $2 \times 10^6$ /well auf einer 6-well Platte in DMEM/ 10%FKS ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die *E. coli* BL21 Transformanten (BL21+pSty1, BL21+pSty2, BL21+pSty3 und BL21+pSty7) wurden in LB plus Ampicillin bei 37°C bis zu einer  $OD_{600} = 0,5$  kultiviert und anschließend für 2h mit 2 $\mu$ g/ml AHT induziert. Die Transformanten wurden dann mit einem  $moi=0,1$  für 6h gelöst in DMEM/ 2%FKS auf die Makrophagen gegeben. Nach 6h Stunden Infektion wurden die Überstände abgenommen und für 10min bei 16060xg, 4°C zentrifugiert. Die gewonnenen Überstände wurden eingefroren und am Folgetag für die Bio-Plex-Messung auf Eis aufgetaut. Die Durchführung des Assay erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Kurz zusammengefasst wurden die wells der 96er-Well-Platte mit je 100 $\mu$ l *Assay Buffer* angefeuchtet und mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Die 1x *Beads* wurden 30sec. gevortext und zu 50 $\mu$ l/well pipettiert. Die Platte wurde anschließend zweimal mit 100 $\mu$ l *Wash Buffer*/well gewaschen. Die Versuchsproben und Standards wurden gevortext und bei Raumtempe-

ratur zu je 50µl/well pipettiert. Die Platte wurde mit Alufolie lichtdicht umschlossen und erst 30sec bei 1100rpm und dann für 30min bei 300rpm geschüttelt. Nach 30min Inkubationszeit wurde die Platte dreimal mit je 100µl *Wash Buffer* gewaschen und je 25µl 1x Detektionsantikörper pro well pipettiert. Die Platte wurde mit Alufolie lichtdicht umschlossen und erst 30sec bei 1100rpm und dann für 30min bei 300rpm geschüttelt. Die Platte wurde mit je 100µl *Wash Buffer* dreimal gewaschen. Dann wurden je 50µl der 1x *Streptavidin/Phycoerythrin* Lösung pipettiert und die Platte mit Alufolie lichtdicht umschlossen und erst 30sec bei 1100rpm und dann für 10min bei 300rpm geschüttelt. Die Platte wurde dreimal mit je 100µl *Wash Buffer* gewaschen. Pro well wurden 125µl *Assay Buffer* pipettiert und die Platte für 30sec bei 1100rpm geschüttelt. Die Proben wurden am Bio-Plex 200 gemessen und die Daten mit der Bio-Plex<sup>TM</sup> Manager 3.0 Software ausgewertet.

## 2.6 Proteinarbeiten

### 2.6.1 *in silico* Analysen

#### 2.6.1.1 Alignment

Unter *Alignment* versteht man den Abgleich zweier oder mehrerer Sequenzen, um funktionelle oder evolutionäre Verwandtschaften nachzuweisen. In dieser Arbeit wurden *Alignments* ausschließlich automatisiert mittels *Clustal Omega* [77] erstellt.

#### 2.6.1.2 CDD (*Conserved Domain Database*) und CDART (*Conserved Domain Architecture Retrieval Tool*)

Bei der *Conserved Domain Database* (CDD) handelt es sich um eine Sammlung bekannter Proteindomänen, auf die über die Server basierte Plattform des *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) zugegriffen werden kann (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Mittels Suchanfrage wird über multiple *Alignments* ein Domänenabgleich zwischen einer Protein Eingabesequenz (*Query*-Sequenz) und der CDD durchgeführt. Potentielle konservierte Domänen der Eingabesequenz werden so erkannt. Ein Indikator für die Zuverlässigkeit eines Treffers ist der *Expect Value* (*E-value*), der die Wahrscheinlichkeit für einen falsch positiven

Treffer widerspiegelt [78], [79]. Das CDART (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>) ermöglicht dem Benutzer die Verbreitung der zu untersuchenden Proteindomäne in unterschiedlichen Lebewesen zu analysieren und anhand der Biosystematik zu strukturierten [80].

### 2.6.1.3 Vorhersage und Superposition von Proteinstrukturen

Struktur und Aufbau eines Proteins sind für dessen Funktion von entscheidender Bedeutung. Aufgrund des hohen strukturellen Konservierungsgrades innerhalb einer Proteindomäne können bekannte Proteindomänen für die Strukturvorhersage homologer Proteindomänen verwendet werden. Die so berechneten Strukturen stellen nicht die definitive Struktur dar, dienen aber als Annäherung an die definitive Struktur und können Hinweise auf das Interaktionspotential des Proteins liefern. Für die Vorhersage der Tertiärstrukturen von TcpC-TIR, TcpF-TIR und TcpM-TIR wurde *HHpred* (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>) [81] verwendet, dessen Zuverlässigkeit erfolgreich geprüft wurde [82]. Es handelt es sich um einen automatischen *Protein Modelling Server*, der die Eingabesequenz nach homologen Proteindomänen durchsucht, deren Tertiärstruktur bereits bekannt ist. Die homologen Proteindomänen dienen als Leitstruktur für die Berechnung der Tertiärstruktur des zu untersuchenden Proteins. Die als Leitstruktur verwendeten Proteindomänen können automatisch nach einer auf Homologie basierten Rangliste oder manuell ausgewählt werden. In dieser Arbeit erfolgte die Auswahl für die Berechnung von TcpC-TIR, TcpM-TIR und TcpF-TIR automatisch. Anhand von Superpositionen können Proteindomänen in 3D verglichen werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Superpositionen wurden anhand von *TM-Align* (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-align/>) generiert [83]. Der TM-Score (0-1) drückt die Gleichartigkeit der superponierten Strukturen aus. Werte  $<0,2$  deuten auf eine nicht signifikante und Werte  $>0,5$  deuten auf eine signifikante Gleichartigkeit hin. Die Strukturinformationen wurden im pdb - (*protein data bank*) Format gespeichert und mithilfe des frei erhältlichen 3D-Grafikprogramms PyMOL (<http://www.pymol.org/>) dargestellt. Die Strukturinformationen bereits publizierter TIR Domänen wurden von der *protein data bank* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) bezogen.

## 2.6.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.6.2.1 Western Blot [84]

Der erste Schritt beim Western Blot besteht in der analytischen Auftrennung eines Proteingemisches anhand von SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese). Anschließend erfolgt das Übertragen (*Blotting*) der Proteine von einem Gel auf eine Trägermembran. Auf der Trägermembran wird das gebundene Protein durch Enzymreaktionen sichtbar gemacht.

#### SDS-PAGE

Sammelgel (Tabelle 2-19) und Trenngel (Tabelle 2-20) wurden gemäß den unten aufgeführten Angaben hergestellt.

H <sub>2</sub> O	TRIS 0,5M pH6,8	PAA 30%	SDS 10%	TEMED	APS10%
1,8ml	0,84ml	0,64ml	33,4µl	1,2µl	33,4µl

**Tabelle 2-19: Sammelgel Polyacrylamid (PAA) 5,7%.**  
Natriumdodecylsulfat (SDS) Tetramethylethyldiamin (TEMED), Ammoniumperoxidsulfat (APS).

H <sub>2</sub> O	TRIS 0,5M pH6,8	PAA 30%	SDS 10%	TEMED	APS10%
2,25ml	1,67ml	2,65ml	66,7µl	3,3µl	50µl

**Tabelle 2-20: Trenngel PAA 12%**

Zunächst wurde die Glaskammer mit dem Trenngel und anschließend mit dem Sammelgel befüllt. Die Proben wurden mit 5x Ladepuffer versetzt, für 10min bei 95°C gekocht und anschließend in die Geltaschen geladen. Innenraum und Außenräume der Gelkammer (Bio-Rad) wurden mit Laufpuffer gefüllt. An die Gelkammer wurde eine Spannung von 125V (Consort E802 Powersupply) angelegt bis die Proteinbanden die Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel erreichten. Die Spannung wurde dann auf 150V erhöht.

#### Blotting

6 Blottingfilterpapiere (2mm) wurden in Blot I Puffer getränkt und auf die Anode des Multiblotgeräts gelegt. 3 Blottingpapiere wurden in Blot II Puffer getränkt, auf die anderen 6 Blottingpapiere gelegt und die Luftblasen entfernt. Die Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Immobilon<sup>®</sup>-P) wurde für 15sec in einem Methanolbad angefeuchtet und danach von beiden Seiten in Blot II Puffer gewaschen und auf die Blottingpapie-

re gelegt. 6 Blottingpapiere wurden in Blot III Puffer getränkt und auf das Gel gelegt. Abschließend wurde die obere Kathode mit Blot III Puffer angefeuchtet und die geschlossene Blotkammer mit einem Gewicht beschwert. Der Blottingvorgang lief 90min bei der mA-Zahl, die der Fläche der Membran in  $\text{cm}^2$  entsprach.

### ***Strep-tag*<sup>®</sup> Detektion**

Die Membran wurde in 20 ml *PBS-Blocking Buffer* (PBS, 3% BSA, 0,5% v/v Tween20) für 1h bei Raumtemperatur auf einem Taumler inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3x mit 20ml *PBS-Tween Buffer* (PBS, 0,1% v/v Tween20) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden auf die Membran 10ml *PBS-Tween Buffer* gegeben. Endogene biotinylierte Proteine wurden durch Zugabe von 10 $\mu\text{l}$  Avidin haltigem *Biotin Blocking Buffer* (IBA) (1:1000, 10min) geblockt. Anschließend wurden 10 $\mu\text{l}$  (1:1000) *Strep-Tactin Horseradish Peroxidase (HRP) conjugate* (IBA) hinzugegeben und für 60min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe (1min bei Raumtemperatur schütteln) mit *PBS-Tween Buffer*, dann zwei Waschschriffe in *PBS-Buffer*. Pierce ECL Western Blotting Substrat wurde als Substrat für das *Strep-Tactin HRP Conjugate* verwendet (300 $\mu\text{l}$ /Membran). Die Belichtungszeiten in der Amersham Hypercassette betragen 1-5min. Als Film wurde Amersham Hyperfilm ECL verwendet. Die Entwicklung erfolgte automatisch mit der Entwicklungsmaschine Agfa Curix 60.

### **2.6.2.2 Aufreinigung von *Strep-tag*<sup>®</sup> Fusionsproteinen**

In dieser Arbeit wurden die mit einem *Strep-tag*<sup>®</sup> fusionierten Proteine anhand einer *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Matrix (IBA) unter physiologischen Bedingungen aufgereinigt, um die Funktionalität der Proteine zu erhalten.

#### **Ablauf:**

#### **Kultivierung und Expression**

Die *E. coli* TOP10 Transformanten wurden von einer Übernachtskultur 1:50 in vorgewärmtes LB Medium + Ampicillin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) überimpft. Die Kulturen wurden bis zu einer  $\text{OD}_{600} = 1,5$  kultiviert, um die Ausbeute der Proteine zu erhöhen. Für Azurin, GFP und TcpC-TIR erwiesen sich eine Expressionstemperatur von 37°C, Expressionsdauer von 2h und eine AHT Konzentration von 200ng/ml als optimale Expressionsbedingungen. Für TcpF war eine Absenkung der Temperatur auf 25°C und der Dauer auf 0,5h notwendig, um das Protein optimal zu exprimieren. Nach der Expression wurden

die Kulturen bei 6000xg und 4°C für 15min zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets eingefroren.

### **Lyse**

Die Bakterien wurden schonend mit Lysozym (IBA-Lyse) lysiert. Dazu wurden die Pellets in 2ml Puffer B (1mM EDTA, Tween 20, Avidin)/100ml Kultur resuspendiert und für 1h auf Eis inkubiert. Es wurden 4µl DNase I/2ml Puffer B sowie RNase (Endkonzentration 10µg/ml) hinzugegeben und für 1h auf Eis inkubiert, um die Viskosität zu senken. Das Lysat wurde dann mit 16060xg bei 4°C für 15min zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und zur Aufreinigung verwendet. Die unterschiedlichen Lysate (totales Protein, unlösliches Protein und lösliches Protein) wurden mittels Western Blot untersucht (Abbildung 3-26). Hierzu wurden 10µl des Lysats, 90µl Puffer B und 25µl von 5x SDS-PAGE Puffer zur Analyse des totalen Proteins vorbereitet. Für die Analyse des unlöslichen Anteils des Proteins wurden 10µl des Lysats zentrifugiert, der Überstand entnommen und 100µl Puffer B sowie 25µl von 5x SDS-PAGE Puffer hinzugegeben. Für die Analyse des löslichen Anteils des Proteins wurde ein Ansatz mit 10µl des Überstands, 90µl Puffer B und 25µl von 5x SDS-PAGE Puffer vorbereitet.

### **Aufreinigung**

Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bei 4° durchgeführt. Die 1ml *Strep-Tactin*® Säule wurde in einer Vorrichtung fixiert und der Lagerungspuffer abgelassen. Es folgte die Equilibrierung mit 2ml Puffer W (100mM TRIS-Cl pH 8,0, 150mM NaCl, 1mM EDTA). Das Zelllysate wurde bei 16060xg für 5min zentrifugiert und auf die Säule aufgetragen. Die Durchflussfraktion (FT) wurde zur späteren Western Blot Analyse gesammelt. Anschließend wurde die Säule mit je 1ml Puffer W 5x gewaschen und die Waschfraktionen (W1-W5) aufgefangen. Für die Elution des gebundenen Proteins wurden 6x je 0,5ml des Puffers E (100mM TRIS-Cl pH 8,0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 2,5mM Dethiobiotin) aufgetragen und die einzelnen Elutionsfraktionen (E1-E6) aufgefangen. Zur Regeneration der Säule wurden 3x je 5ml des Puffers R (100mM TRIS-Cl pH 8,0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM HABA) aufgetragen. Der überschüssige Puffer R wurde abgelassen und durch 2ml Puffer W ersetzt. Die Säule wurde bei 4°C für eine erneute Aufreinigung gelagert. Jedes rekombinante Protein wurde über eine individuelle Säule aufgereinigt. Die Waschfraktionen und Elutionsfraktionen wurden im Western Blot und zusätzlich mit einer SDS-PAGE und Coomassie-Färbung auf ihre Reinheit überprüft. Die aufgereinigten rekombinanten Proteine wurden durch Zentrifugation (1h

bei 4°C und 5000xg) mit Amicon® Ultra-15-Filtern konzentriert (60x). Der Retentions-Cut-off lag bei 10kDa. Die Zentrifugation wurde insgesamt 6-mal wiederholt und das filtrierte Volumen durch PBS ersetzt. Abschließend erfolgte eine Protein Konzentrationsbestimmung mit dem Bradford Protein Assay.

### **2.6.2.3 Bradford Protein Assay [85]**

Beim Bradford Protein Assay handelt sich um eine photometrische Methode zur Quantifizierung von Proteinen. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe (0,05mg/ml bis 0,6mg/ml) des BSA-Standards gelöst in PBS vorbereitet. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und im Verhältnis 1:2,5, 1:5, 1:10 und 1:20 mit PBS verdünnt. Je 10 µl/well von Standard und Probe wurden in eine 96-well Platte pipettiert, 200µl der Bradford Reagenz hinzugegeben und für 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgte am Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 595nm in Duplikaten.

## **2.7 Screening**

### **2.7.1 Screening *E. coli***

Im Zeitraum vom 18.8.2008 bis 25.11.2008 wurden 100 aus Patientenurin isolierte *E. coli*, die eine Konzentration von  $10^5$  Keime/ml Urin überschritten (Infekt-relevante Keimzahl) [86], auf die Anwesenheit der TcpC-Gensequenz, Mischinfektionen und Antibiotikaresistenzen getestet (3.1.1). Die *E. coli* HWI Isolate wurden mit PCR auf die Anwesenheit des TcpC-Gens überprüft. Als Primer dienten UPECseq1 und UPECseq3. Die Primer binden innerhalb der Sequenz für TcpC. Liegt das Gen im zu überprüfenden *E. coli* Isolat vor, war in der Gelelektrophorese eine Bande von 879bp zu sehen. Lag das Gen nicht vor, war keine Bande zu sehen. Ein PCR-Ansatz, bei dem die DNA von *E. coli* CTF073 als Matrize diente, wurde als positive Kontrolle mitgeführt. Ein DNA freier PCR Ansatz diente als negative Kontrolle. Die bei Mischinfektionen isolierten Infektionspartner zeigten Keimzahlen  $<10^5$  Keime/ml Urin. Alle Keime stammten von unterschiedlichen Patienten. Die Antibiotika-Resistenzbestimmung erfolgte wie unter 2.7.3 beschrieben.

### 2.7.2 Screening *E. faecalis*

Im Zeitraum vom 13.11.2008 bis 17.03.2009 (125 Tage) wurden insgesamt 68 aus Patientenurin isolierte *E. faecalis* Keime, die eine Konzentration von  $10^5$  Keime/ml Urin über- und 42 aus Patientenurin isolierte *E. faecalis* Keime, die die Konzentration unterschritten, auf die Anwesenheit der TcpF-Gensequenz, Mischinfektionen und Antibiotikaresistenzen getestet (3.1.2). Die *E. faecalis* Urinisolate (n=110) wurden mit PCR auf die Anwesenheit der TcpF-Gensequenz überprüft. Als Primer dienten E.f.seq1 und E.f.seq2. Die Primer binden innerhalb der TcpF-Sequenz. Lag das Gen im zu überprüfenden *E. faecalis* Isolat vor, war in der Gelelektrophorese eine Bande von 844bp zu sehen. Lag das Gen nicht vor, war keine Bande zu sehen. Ein PCR-Ansatz enthielt keine DNA-Matrize und diente als negative Kontrolle. Ein PCR-Ansatz, der als Matrize die DNA von *E. faecalis* Symbioflor 1 beinhaltete, diente als positive Kontrolle. Die bei Mischinfektionen isolierten Infektionspartner zeigten Keimzahlen  $<10^5$  Keime/ml Urin und es wurden nur Proben berücksichtigt, die für *E. faecalis* den Grenzwert von  $10^5$  Keime/ml Urin überschritten. Die Bestimmung der Antibiotikaresistenzen erfolgte wie unter 2.7.3 beschrieben. Alle Keime wurden von unterschiedlichen Patienten isoliert.

### 2.7.3 Antibiotika-Resistenzbestimmung

Die Antibiotika-Resistenzen wurden für die in Tabelle 2-21 aufgeführten Antibiotika im Agardiffusionsverfahren bestimmt und nach den CLSI-Kriterien (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) bewertet.

Antibiotikum	µg	resistent	moderat sensitiv	sensitiv
<b>Ampicillin</b>	10	≤13	14-17	>17
<b>Ampicillin/Sulbactam</b>	10/10	≤11	12-14	>15
<b>Cefazolin</b>	30	≤14	15-17	>18
<b>Cefepim</b>	30	≤14	15-17	≥18
<b>Cefotaxim</b>	30	≤14	15-22	≥23
<b>Cefpodoxim</b>	10	≤17	18-20	≥21
<b>Ceftazidim</b>	30	≤14	15-17	≥18
<b>Ceftriaxon</b>	30	≤13	14-20	≥21



Antibiotikum	µg	resistent	moderat sensitiv	sensitiv
<b>Cefuroxim</b>	30	≤14	15-17	≥18
<b>Ciprofloxacin</b>	5	≤15	16-20	≥21
<b>Erythromycin</b>	15	≤13	14-22	≥23
<b>Fosfomycin</b>	100	≤12	13-15	≥16
<b>Gentamicin</b>	10	≤12	13-14	≥15
<b>Imipenem</b>	10	≤13	14-15	≥16
<b>Levofloxacin</b>	5	≤13	14-16	≥17
<b>Meropenem</b>	10	≤13	14-15	≥16
<b>Moxifloxacin</b>	5	≤15	16-18	≥19
<b>Piperacillin/ Tazobactam</b>	100/10	≤17	18-20	≥21
<b>Sulfamethoxazol/ Trimethoprim</b>	1,25/3,75	≤10	11-15	≥16
<b>Tetracyclin</b>	30	≤14	15-18	≥19

**Tabelle 2-21:** *BBL™ Sensi-Disc™ Susceptibility Test Discs (BD)*

Die erste Spalte zeigt den Inhaltsstoff der *Test-Disc* und die folgende Spalte die dazugehörige Menge in µg. In den darauffolgenden Spalten finden sich die Weiten (mm) der Hemmhöfe, anhand derer die Einstufung in resistent, moderat sensitiv und sensitiv erfolgte.

Dazu wurde mit einer sterilen Öse von der jeweils bewachsenen Platte eine Kolonie (etwa  $10^8$  Bakterien) abgenommen, in ein Reagenzglas mit TSB-Medium (BD) überführt und für 15min bei 37°C inkubiert. Mit einem sterilen Glasstab wurden dann vier Müller-Hinton-Platten (BD) gleichmäßig mit beimpftem TSB-Nährmedium plattiert und die wirkstoffgetränkten Plättchen (*BBL™ Sensi-Disc™ Susceptibility Test Discs*, BD) mittels Stempel aufgebracht. Die Platten wurden bei 37°C je nach Generationszeit der Mikroorganismen ein bis drei Tage inkubiert und dann der Durchmesser des Hemmhofes (Tabelle 2-21) abgelesen und nach CLSI-Kriterien ausgewertet. Die Untersuchungen wurden dankenswerterweise unter Aufsicht von Prof. Dr. E. Domann in der Routinediagnostik der Medizinischen Mikrobiologie Gießen des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH durchgeführt.

## 2.8 Statistische Methoden

Zur Überprüfung der Häufigkeitsverteilung von TcpF unter *E. faecalis* Isolaten unterschiedlichen Ursprungs wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet.

Für die Fragestellung, ob sich zwei Stichproben in ihren Mittelwerten signifikant voneinander unterscheiden, wurde der Zweistichproben t-Test ohne die Annahme für eine gleiche Varianz der zu untersuchenden Stichproben verwendet. Die Berechnungen erfolgten anhand der Software Excel.

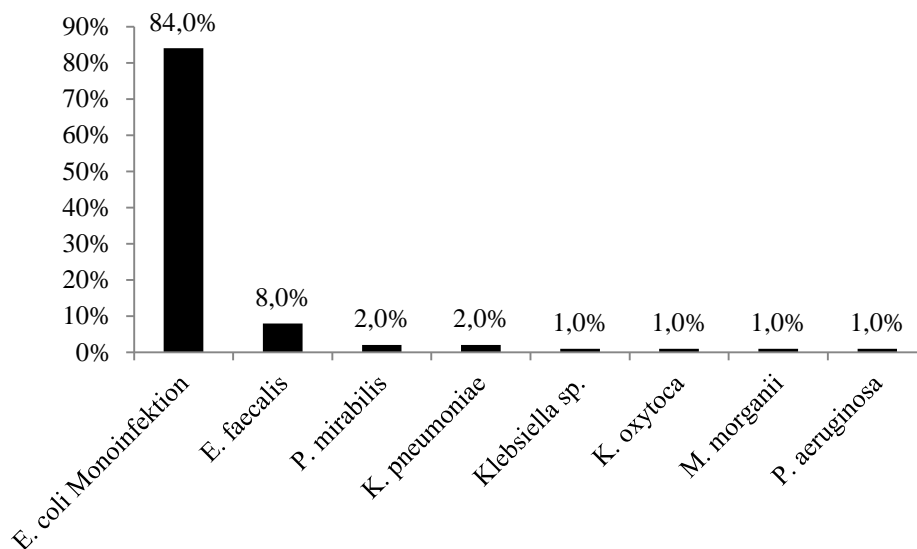
Die Signifikanz wurde mit Hilfe von Sternen dargestellt:  $0.01 < p \leq 0.05^*$ ;  $0.001 < p \leq 0.01^{**}$ ;  $p \leq 0.001^{***}$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Screening

##### 3.1.1 Screening *E. coli*

Insgesamt ergaben sich für den betrachteten Zeitraum von 100 Tagen durchschnittlich 1,0 durch *E. coli* hervorgerufene HWIs pro Tag. In 84% der Fälle handelte es sich bei HWI mit *E. coli* um Einzelinfektionen. In 16 der 100 Urinproben lag eine Mischinfektion vor. Die Infektionspartner zeigten dabei Keimzahlen  $<10^5$ /ml, wohingegen die Keimzahl von *E. coli* oberhalb des Grenzwertes von  $10^5$ /ml lag. Häufigster Infektionspartner von *E. coli* war mit 8% *E. faecalis*. Neben *E. faecalis* wurden *Proteus mirabilis* (2%), *Klebsiella pneumoniae* (2%), *Klebsiella sp.* (1%), *Klebsiella oxytoca* (1%), *Morganella morganii* (1%) und *Pseudomonas aeruginosa* (1%) als Infektionspartner identifiziert. Alle Keime mit Ausnahme von *P. aeruginosa* haben den menschlichen Darmtrakt als natürliches Habitat (Abbildung 3-1).

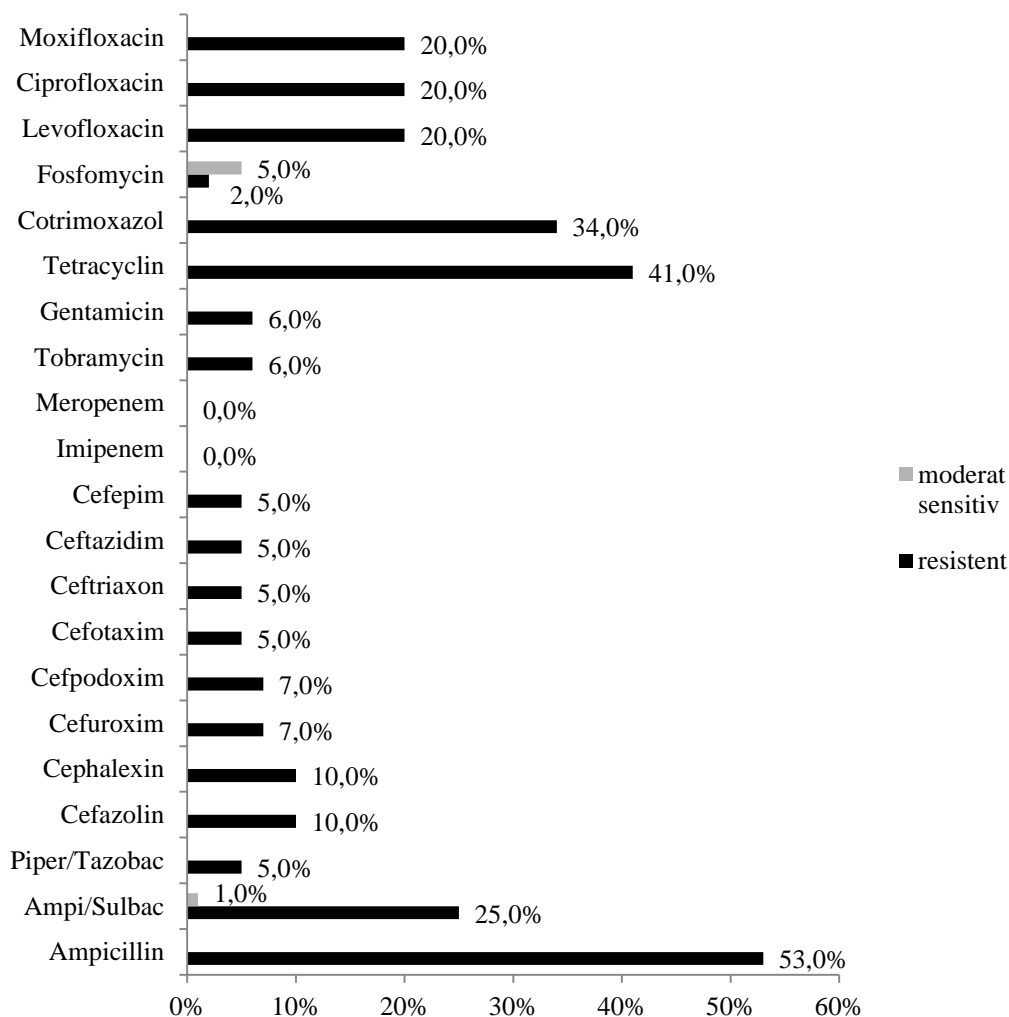


**Abbildung 3-1: Mischinfektionen bei HWI mit *E. coli***

100 HWI Urinproben mit *E. coli*  $>10^5$ cfu/ml von unterschiedlichen Patienten stammend wurden auf Mischinfektionen untersucht. Infektionspartner von *E. coli* zeigten Keimzahlen  $<10^5$ cfu/ml.

Anschließend wurden die *E. coli* HWI Isolate auf spezifische Antibiotika-Resistenzen untersucht. Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme zählen zu den  $\beta$ -Laktamantibiotika. Sie inhibieren die Zellwandsynthese. Sulbactam und Tazobactam

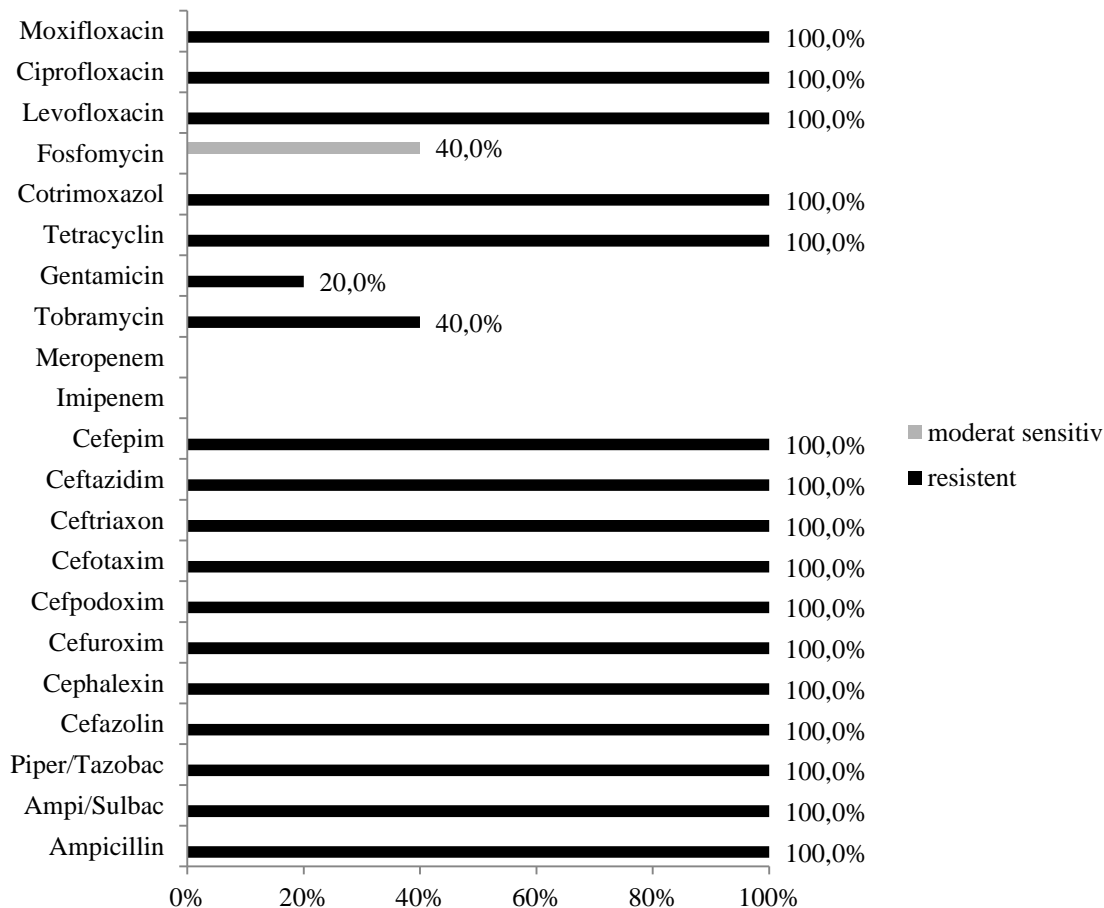
sind  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren, die in Verbindung mit  $\beta$ -Laktamantibiotika verabreicht werden. Die Tetracykline wirken über die Blockierung der Anlagerung der tRNA an das Ribosom. Es kommt zu einer Inhibierung der bakteriellen Proteinsynthese. Gentamicin und Tobramycin zählen zu den Aminoglykosiden, die die Proteinsynthese durch Bindung an der 30S Untereinheit des Ribosoms hemmen. Cotrimoxazol ist ein Kombinationspräparat aus Sulfamethoxazol und Trimethoprim, das die Folsäuresynthese hemmt. Die Fluorchinolone Levofloxacin, Ciprofloxacin und Moxifloxacin entfalten ihre Wirkung durch Hemmung der Topoisomerase II [87].



**Abbildung 3-2: Resistenzlage von *E. coli* bei HWI**

100 *E. coli* HWI Isolate mit  $\text{cfu} > 10^5/\text{ml}$  von unterschiedlichen Patienten wurden anhand des Agardiffusionstests auf Antibiotikaresistenzen untersucht. Die Untersuchung wurde standardmäßig in der mikrobiologischen Routinediagnostik des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (UKGM) durchgeführt. Ampicillin, Sulbactam, Piperacillin, Tazobactam

Jeweils mehr als 25% der Keime waren resistent gegen Ampicillin, Ampicillin/ Sulbactam, Tetrazyklin und Cotrimoxazol. Die häufigste Resistenz lag mit 53 % gegen Ampicillin vor. Keines der *E. coli* Isolate zeigte eine Resistenz gegen die Carbapeneme Imipenem und Meropenem (Abbildung 3-2). Bei 5 der *E. coli* Isolate zeigte sich eine besondere Resistenzlage mit positivem Nachweis für ESBL (Erweitertes-Spektrum-Betalaktamasen) (Abbildung 3-3). Die ESBL-bildenden *E. coli* sind definitionsgemäß resistent gegen Penicilline und Cephalosporine. Zusätzlich waren die hier getesteten Isolate alle resistent gegen die Fluorchinolone Moxi-, Cipro- und Levofloxacin sowie gegen Cotrimoxazol und Tetrazyklin. Für Fosfomycin zeigte sich in 40% der ESBL Isolate nur eine moderate Sensitivität, wohingegen alle ESBL-positiven Isolate sensitiv für Imipenem und Meropenem waren. Für die Aminoglykoside Gentamicin und Tobramycin ließ sich eine Resistenz in einem bzw. zwei Fällen feststellen.

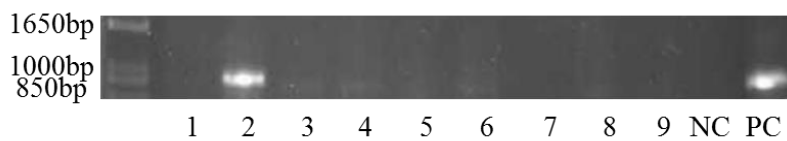


**Abbildung 3-3 Resistenzlage von *E. coli* mit ESBL bei HWI**

Die Abbildung zeigt die Antibiotikaresistenzen der 5 *E. coli* HWI Isolate mit  $CFU > 10^5/ml$  und einem positiven Nachweis für ESBL. Die Untersuchung wurde standardmäßig in der mikrobiologischen Routi-

nediagnostik des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (UKGM) durchgeführt. Ampicillin, Sulbac: Sulbactam, Piper: Piperacillin, Tazobac: Tazobactam

Alle 100 *E. coli* HWI Isolate wurden mit PCR auf das Vorhandensein der TcpC Gensequenz überprüft. Insgesamt waren 20 der getesteten *E. coli* TcpC positiv (20%). Abbildung 3-4 zeigt exemplarisch das Screening PCR Ergebnis für die *E. coli* Isolate#61-69. *E. coli*#62 wurde als TcpC positiv gewertet.



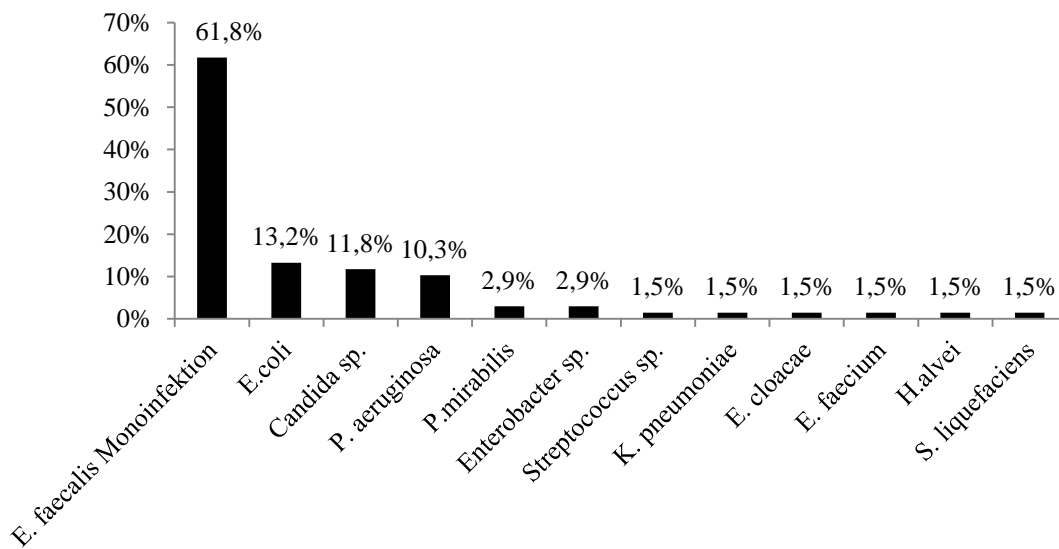
**Abbildung 3-4: Screening PCR *E. coli***

Die *E. coli* HWI Isolate wurden mit der Screening PCR *E. coli* auf die Anwesenheit des TcpC-Gens untersucht. 1: *E. coli*#61, 2: *E. coli*#62, 3: *E. coli*#63, 4: *E. coli*#64, 5: *E. coli*#65, 6: *E. coli*#66, 7: *E. coli*#67, 8: *E. coli*#68, 9: *E. coli*#69. NC: Negative Kontrolle ohne DNA, PC: Positive Kontrolle mit DNA von *E. coli* CFT073. Größenstandard: 1 Kb Plus DNA Ladder.

### 3.1.2 Screening *E. faecalis*

In dem betrachteten Zeitraum von 125 Tagen ergaben sich durchschnittlich 0,54 durch *E. faecalis* hervorgerufene HWIs pro Tag (n=68, cfu>10<sup>5</sup>/ml). *E. faecalis* wurde durchschnittlich bei 0,88 Patienten/d nachgewiesen (n=110, cfu>10<sup>5</sup>/ml und cfu<10<sup>5</sup>/ml).

In 61,8% der Fälle handelte es sich bei HWI mit *E. faecalis* um Einzelinfektionen. Häufigster Infektionspartner von *E. faecalis* ist mit 13,2 % *E. coli*. Neben *E. coli* zählen *Candida sp.* (11,8%) und *P. aeruginosa* (10,3%) zu den häufigsten Infektionspartnern. Außerdem konnten *P. mirabilis* (2,9%), *Enterobacter sp.* (2,9%) sowie *Streptococcus sp.*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus cloacae*, *Enterococcus faecium*, *Hafnia alvei* und *Serratia liquefaciens* in jeweils 1,5% identifiziert werden. Alle Keime mit Ausnahme von *P. aeruginosa* und *Streptococcus sp.* kommen in der menschlichen Darmflora vor (Abbildung 3-5).

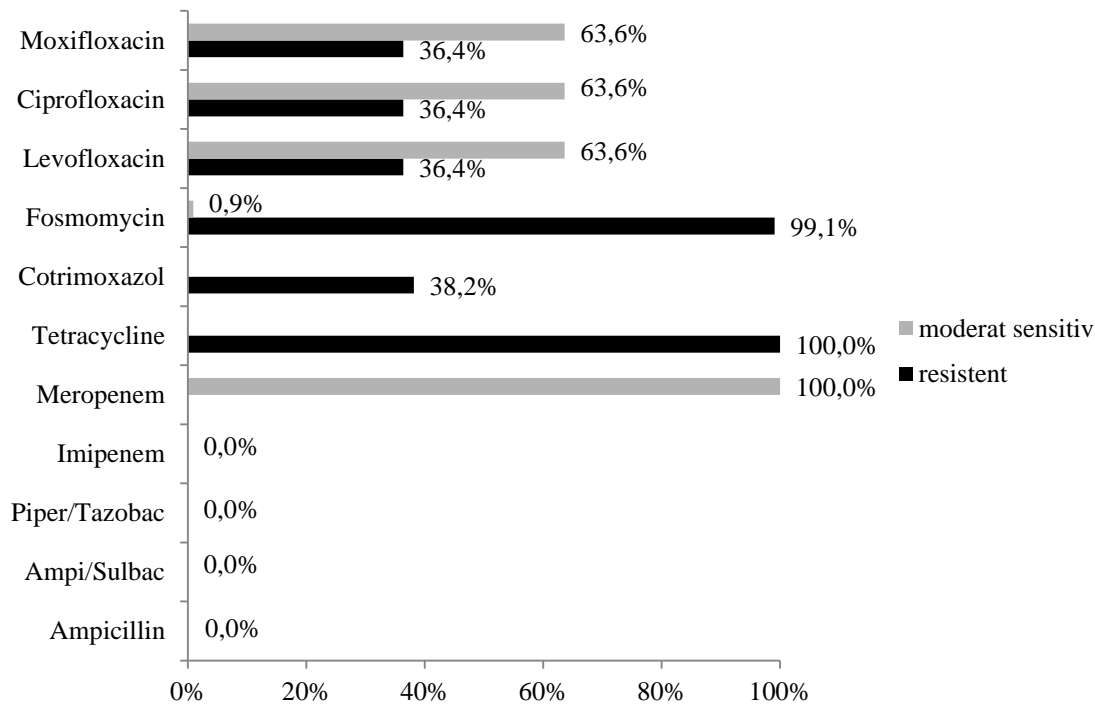


**Abbildung 3-5: Mischinfektionen bei HWI mit *E. faecalis***

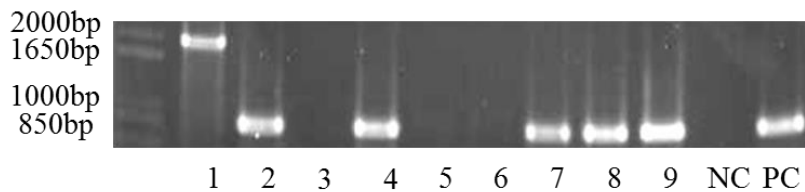
68 HWI Urinproben mit *E. faecalis* > 10<sup>5</sup>cfu/ml von unterschiedlichen Patienten stammend wurden auf Mischinfektionen untersucht. Infektionspartner von *E. faecalis* zeigten Keimzahlen <10<sup>5</sup>cfu/ml.

Die 110 aus Patientenurin isolierten *E. faecalis* Isolate wurden auf Antibiotikaresistenzen untersucht. Die eingesetzten Antibiotika wurden unter 3.1.1 bereits beschrieben. Sämtliche *E. faecalis* Isolate waren sensibel für Ampicillin, Ampicillin/Sulbac, Piperacillin/Tazobac und das Carbapenem Imipenem. Für Meropenem fand sich aufgrund der bekannt eingeschränkten Wirkungen gegenüber grampositiven Bakterien bei allen Isolaten nur eine moderate Sensitivität. Resistenzen lagen zu je mindestens 99% gegen Tetracycline und Fosfomycin vor. Keines der Isolate zeigte eine volle Sensitivität gegenüber den getesteten Fluorchinolonen Gegen Cotrimoxazol sind 38,2% der Keime resistent (Abbildung 3-6).

Alle 110 *E. faecalis* Urinisolate wurden mit PCR auf die Anwesenheit der TcpF-Gensequenz überprüft. In der exemplarisch abgebildeten Aufnahme der Gelelektrophorese (Abbildung 3-7) sind die Proben 2, 4 und 7 bis 9 TcpF positiv. Die Probe 1 (*E. faecalis*#11) hat eine Länge von ca. 1900bp. Die Ursache für die unerwartete Länge des Amplifikats konnte mithilfe der Sequenzierung geklärt werden und wird weiter unten besprochen.



**Abbildung 3-6: Resistenzlage aller aus Patientenurin isolierten *E. faecalis* Stämme**  
 110 *E. faecalis* Urinisolate mit cfu>10<sup>5</sup>/ml und cfu<10<sup>5</sup>/ml von unterschiedlichen Patienten wurden anhand des Agardiffusionstests auf Antibiotikaresistenzen untersucht. Auf die Darstellung der Cephalosporine und Aminoglykoside wurde bei bekannter intrinsischer Resistenz von Enterkokken verzichtet.

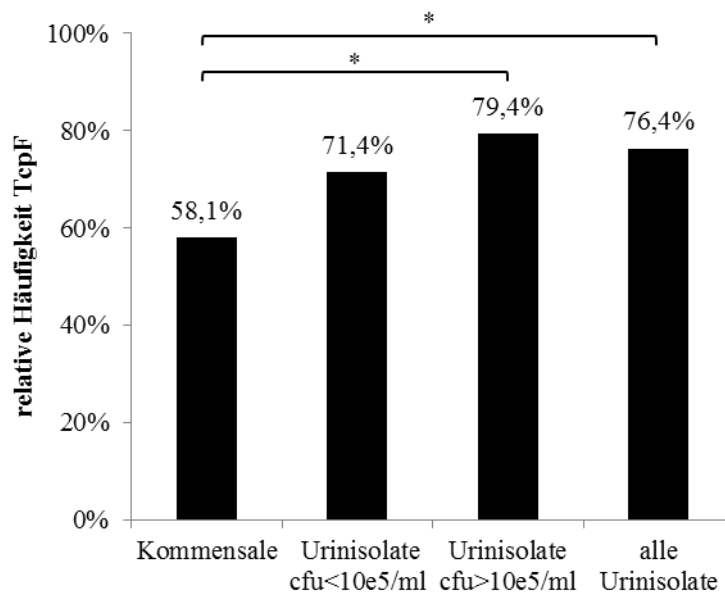


**Abbildung 3-7: Screening PCR *E. faecalis***

Die *E. faecalis* Urinisolate wurden mit der Screening PCR *E. faecalis* auf die Anwesenheit der TcpF-Sequenz überprüft. 1: *E. faecalis*#11, 2: *E. faecalis*#12, 3: *E. faecalis*#13, 4: *E. faecalis*#14, 5: *E. faecalis*#15, 6: *E. faecalis*#16, 7: *E. faecalis*#17, 8: *E. faecalis*#18, 9: *E. faecalis*#19. *E. faecalis*#11 zeigt eine unerwartete Länge von ca. 1900bp. *E. faecalis*#12, #14, #17, #18, #19 sind TcpF positiv. NC: Negative Kontrolle ohne DNA, PC: Positive Kontrolle mit DNA von *E. faecalis* Symbioflor. Marker: 1Kb Plus DNA Ladder.



Bei 84 von 110 Urinisolaten (76,4%) konnte die TcpF-Gensequenz nachgewiesen werden. Betrachtet man die Isolate unter dem Gesichtspunkt  $\text{cfu} > 10^5/\text{ml}$  ( $n=68$ ) und  $\text{cfu} < 10^5/\text{ml}$  ( $n=42$ ) zeigen sich 79,4% der Isolate mit  $\text{cfu} > 10^5/\text{ml}$  und 71,4% der Isolate mit  $\text{cfu} < 10^5/\text{ml}$  TcpF positiv. Es wurden 31 *E. faecalis* Stuhlisolate (Kommensale) von unterschiedlichen Individuen ohne HWI mit dem gleichen PCR-Verfahren, das für die *E. faecalis* Urinisolate verwendet wurde, auf TcpF untersucht, um den Einfluss von TcpF auf die Kolonisierung des Harnwegs zu untersuchen. Dabei wurden 18 Stuhlisolate TcpF positiv getestet (58,1%). Der statistische Vergleich von *E. faecalis* Kommensalen und allen Urinisolaten zeigte, dass der Anteil an TcpF positiven *E. faecalis* isoliert aus Urin signifikant höher ist als bei Kommensalen ( $p=0,044$ , Chi-Quadrat-Test). Vergleicht man den Anteil von TcpF positiven Isolaten unter Kommensalen und *E. faecalis* Urinisolaten mit  $\text{cfu} > 10^5/\text{ml}$  so zeigte sich auch hier ein signifikantes Ergebnis ( $p=0,028$ , Chi-Quadrat-Test). Keine signifikanten Unterschiede bestanden zwischen Kommensalen und *E. faecalis* Urinisolaten mit  $\text{cfu} < 10^5/\text{ml}$  sowie Urinisolaten mit  $\text{cfu} < 10^5/\text{ml}$  und  $\text{cfu} > 10^5/\text{ml}$  (Abbildung 3-8).



**Abbildung 3-8: TcpF positive *E. faecalis* Isolate**

*E. faecalis* Urin- und Stuhlisolate wurden mit PCR auf die Anwesenheit der TcpF-Sequenz überprüft und auf Abhängigkeit zwischen TcpF und den Ursprung der *E. faecalis* Isolate untersucht.  $n(\text{Kommensale})=31$ ,  $n(\text{Urinisolate} < 10^5 \text{cfu/ml})=42$ ,  $n(\text{Urinisolate} > 10^5 \text{cfu/ml})=68$ ,  $n(\text{alle Urinisolate})=110$ . \*:  $p < 0,05$  (Chi-Quadrat-Test).

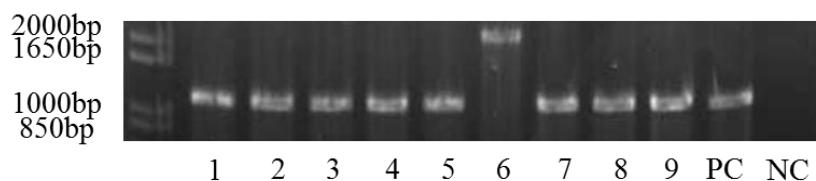
## 3.2 Genetische Analysen

### 3.2.1 Genetische Analyse von TcpC

Die TcpC positiven *E. coli* Isolate wurden zwecks genetischer Analyse und Beurteilung der genetischen Stabilität des TcpC Gens sequenziert. Dazu wurde das TcpC Gen zunächst amplifiziert. Alle der 20 TcpC positiven *E. coli*-Isolate wurden sequenziert und mit der TcpC Sequenz von *E. coli* CFT073 verglichen. 19 Isolate zeigten keine Veränderungen im Vergleich zu *E. coli* CFT073. Ein Isolat zeigte zwei Punktmutationen. In Position 385 lag ein Basenaustausch von Guanin zu Adenin vor, der zum Aminosäureaustausch von Alanin zu Valin führte. Bei der zweiten Punktmutation kam es in Position 482 zum Austausch von Cytosin zu Thymin. Es handelte sich jedoch um eine synonyme Punktmutation. Die kodierte Aminosäure blieb Phenylalanin.

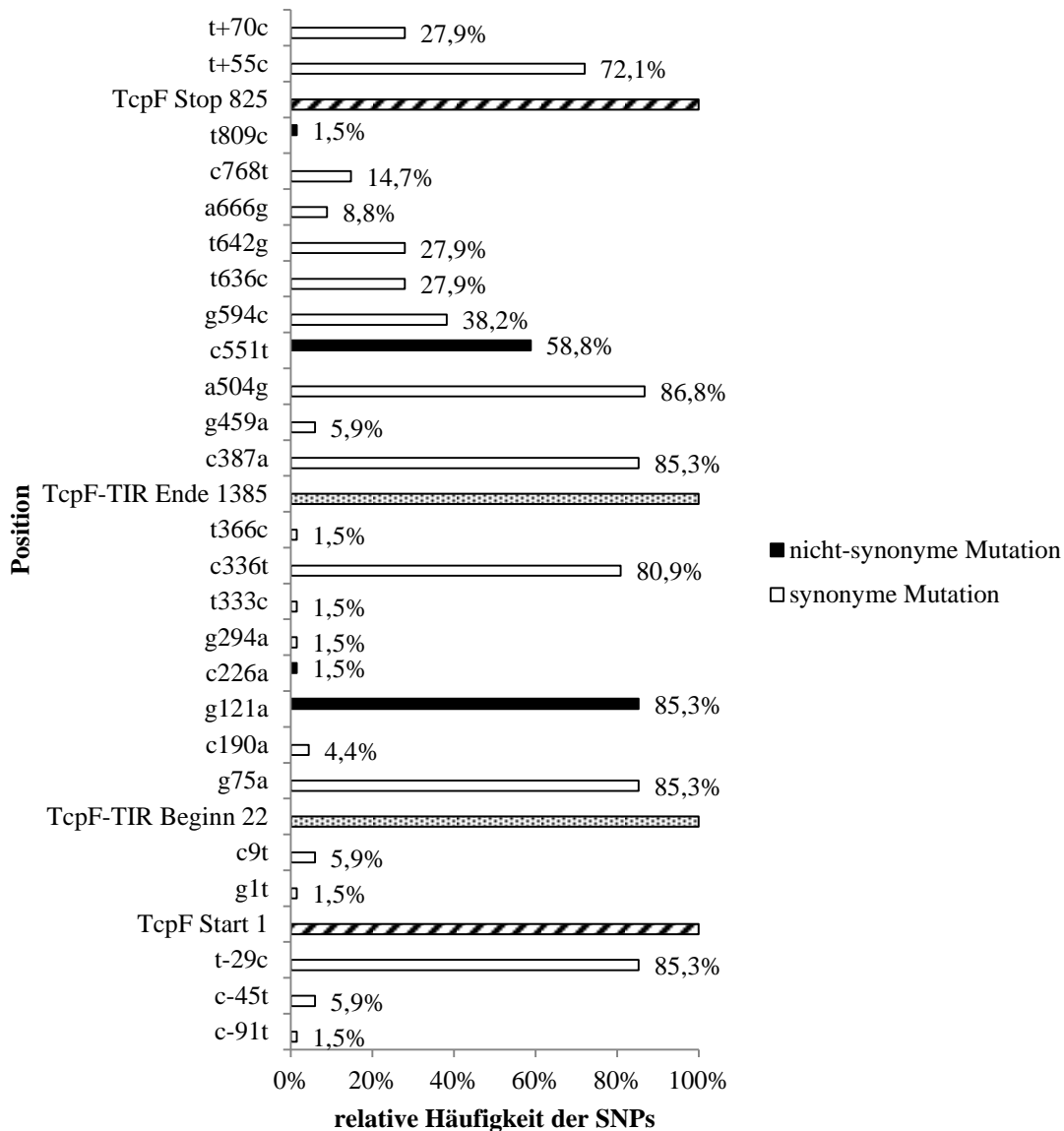
### 3.2.2 Genetische Analyse TcpF

Die TcpF positiven *E. faecalis* Isolate wurden zwecks genetischer Analyse und Beurteilung der genetischen Stabilität des TcpF Gens sequenziert. Dazu wurde das TcpF Gen zunächst amplifiziert. Probe 6 (*E. faecalis* #11) zeigte wie schon zuvor in der Screening PCR ein Amplifikat von unerwarteter Größe (ca.2100bp) (siehe Abbildung 3-9). Neben dem Isolat *E. faecalis* #11 fand sich auch für das Isolat *E. faecalis* #53 in der Sequenzierungs-PCR ein Amplifikat unerwarteter Größe (ca.2000bp, Daten nicht gezeigt), wohingegen die Screening PCR für Isolat #53 mit einer Amplifikatlänge von ca. 850bp unauffällig blieb.



**Abbildung 3-9: TcpF Sequenzierungs-PCR**

Für die Sequenzierung der TcpF positiven Urinisolate wurde das jeweilige TcpF Gen zunächst durch PCR amplifiziert. 1: *E. faecalis* #2, 2: *E. faecalis* #4, 3: *E. faecalis* #5, 4: *E. faecalis* #8, 5: *E. faecalis* #9, 6: *E. faecalis* #11, 7: *E. faecalis* #12, 8: *E. faecalis* #14, 9: *E. faecalis* #17. *E. faecalis*#11 zeigt eine unerwartet große Amplifikatlänge (ca.2100bp). NC: Negative Kontrolle ohne DNA, PC: Positive Kontrolle mit DNA von *E. faecalis* Symbioflor 1. Marker: 1Kb Plus DNA Ladder.



**Abbildung 3-10: Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) von TcpF**

Die TcpF Sequenzen der *E. faecalis* Urinisolat wurden mit der TcpF Sequenz von *E. faecalis* Symbioflor 1 verglichen. Hohe Werte zeigen eine geringe - und niedrige Werte eine hohe Übereinstimmung mit dem TcpF Gen von *E. faecalis* Symbioflor 1.  $n_{\text{(total)}}=68$  ( $n_{(>10^5 \text{ cfu/ml})}=46$ ,  $n_{(<10^5 \text{ cfu/ml})}=22$ )

Alle der 68 TcpF positiven *E. faecalis* Isolate wurden sequenziert. Dabei stammen 46 Stämme von Urinproben mit einer Keimzahl von  $>10^5/\text{ml}$  und 22 Stämme von Urinproben mit einer Keimzahl von  $<10^5/\text{ml}$ . Abbildung 3-10 zeigt die relativen Häufigkeiten von Punktmutationen (SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*) der Isolatsequenzen im Vergleich zu TcpF von *E. faecalis* Symbioflor 1. Start- und Stopcodon von TcpF (1-825) sowie Beginn und Ende der TIR Domäne (22-385) wurden gekennzeichnet. Neben

insgesamt 16 Punktmutationen mit synonymem Aminosäureaustausch gab es innerhalb des TcpF Gens 4 Punktmutationen, die zu einem nicht-synonymen Aminosäureaustausch führten. Die Punktmutation G121A lag in 58 von insgesamt 68 Fällen (85,3%) vor, lag innerhalb der TIR Domäne und führte zum Austausch von Alanin zu Threonin. Die Punktmutation C226G lag ebenfalls innerhalb der TIR Domäne, ließ sich nur in einem Fall (1,5%) beobachten und führte zum Austausch von Glutamin zu Lysin. Die Punktmutationen C551T und T809C lagen außerhalb der TIR Domäne und traten zu 58,8% und 1,5% auf. C551T führte zum Austausch von Threonin zu Isoleucin und T809C zum Austausch von Leucin zu Serin.

Die 68 Sequenzierungen ließen sich insgesamt in 16 TcpF Genvarianten (TcpF-A bis P) unterteilen. Die TcpF Genvariante A (TcpF-A) entsprach der TcpF Sequenz von *E. faecalis* Symbioflor 1. Zu den häufigsten Genvarianten unter den insgesamt 68 sequenzierten TcpF Genen zählten die Variante TcpF-J (27,9%), -M (16,2%) und -A (13,2%) (Tabelle 3-1). Die TcpF Sequenz des Stammes *E. faecalis* V583 (TcpF-V583, [88]) entsprach der TcpF Genvariante TcpF-G. Mit Ausnahme von TcpF-A fanden sich in allen weiteren Varianten in Position 121 die Mutation Guanin zu Adenin, die zum Aminosäureaustausch von Alanin zu Threonin führte.

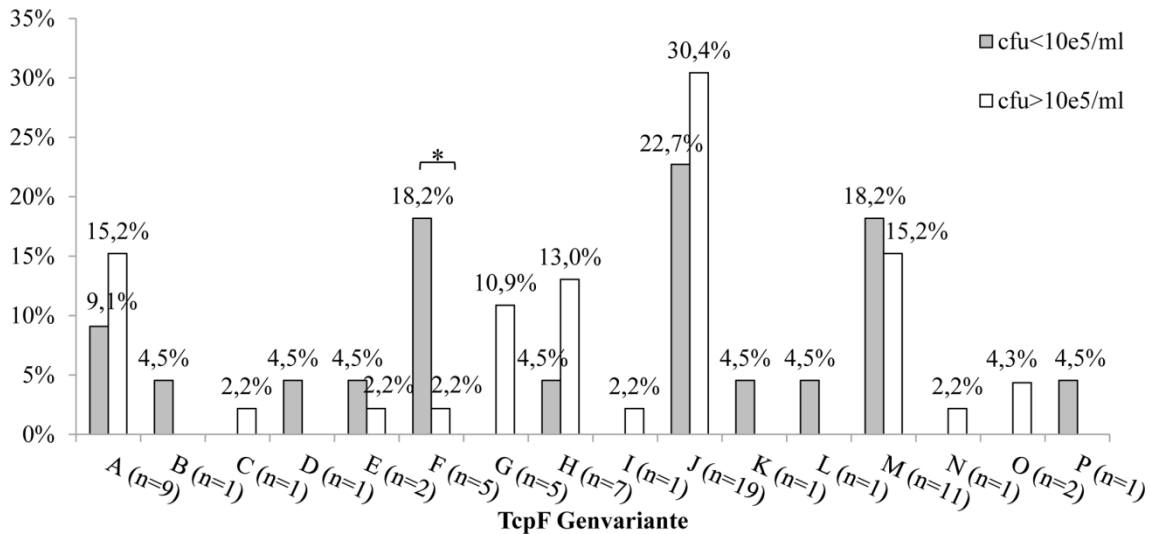
<b>Genvariante</b>	<b>Mutationen</b>	<b>Häufigkeit</b>
<b>TcpF-A</b>	keine	13,2%
<b>TcpF-B</b>	<b>G121A</b> , A504G,	1,5%
<b>TcpF-C</b>	G75A, <b>G121A</b> , A387A, A504G, G594C	1,5%
<b>TcpF-D</b>	G75A, <b>G121A</b> , C387A, A504G, <b>C551T</b> , G594C	1,5%
<b>TcpF-E</b>	G75A, <b>G121A</b> ., C336T, C387A, A504G, <b>C551T</b>	2,9%
<b>TcpF-F</b>	G75A, <b>G121A</b> , C336T, C387A, A504G, A666G, C768T	7,4%
<b>TcpF-G</b> <b>TcpF-V583</b>	G75A, <b>G121A</b> , C336T, C387A, A504G, <b>C551T</b> , G594C	7,4%
<b>TcpF-H</b>	G75A, <b>G121A</b> ., C336T, C387A, A504G, T636C, T642G	10,3%
<b>TcpF-I</b>	G75A, <b>G121A</b> , C387A, A504G, <b>C551T</b> , T636C, T642G	1,5%
<b>TcpF-J</b>	G75A, <b>G121A</b> ., C336T, C387A, A504G, <b>C551T</b> , G594C	27,9%
<b>TcpF-K</b>	C9T, G75A, <b>G121A</b> , C336T, C387A, G459A, A504G,	1,5%

Genvariante	Mutationen	Häufigkeit
	C768T	
<b>TcpF-L</b>	C9T, G75A, <b>G121A</b> , C190A, C336T, C387A, G459A, A504G	1,5%
<b>TcpF-M</b>	G75A, <b>G121A</b> , C336T, C387A, A504G, <b>C551T</b> , T636C, T642G	16,2%
<b>TcpF-N</b>	G75A, <b>G121A</b> , C336T, C387A, A504G, A666G, C768T, <b>T809C</b>	1,5%
<b>TcpF-O</b>	C9T, G75A, <b>G121A</b> , C190A, C336T, C387A, G459A, A504G, C768T	2,9%
<b>TcpF-P</b>	G75A, <b>G121A</b> , <b>C226A</b> , G294A, T333C, C336T, T366C, C387A, A504G, C551T, C768T	1,5%

**Tabelle 3-1: TcpF Genvarianten**

Die Tabelle zeigt die 16 unterschiedlichen TcpF Genvarianten (TcpF-A bis P) der 68 TcpF positiven *E. faecalis* Urinisolate. Die Genvariante A stimmt mit dem TcpF Gen von *E. faecalis* Symbioflor 1 überein. Die TcpF Genvariante G (TcpF-G) entspricht der publizierten TcpF Sequenz des *E. faecalis* Stammes V-583 (TcpF-V583, [88]). Die nicht-synonymen Punktmutationen (**G121A**, **C226A**, **C551T**, **T809C**) wurden hervorgehoben. Die dritte Spalte zeigt die relativen Häufigkeiten der Genvarianten in Bezug auf die insgesamt 68 TcpF Gensequenzen.

Anhand des Chi-Quadrat-Test wurde untersucht, ob ein signifikanter Unterschied zwischen *E. faecalis* Urinisolaten mit einer cfu oberhalb oder unterhalb des Grenzwertes von  $10^5$ /ml und einer der oben beschriebenen Genvarianten besteht (Abbildung 3-11). Mit Ausnahme der Genvariante F (TcpF-F,  $p=0,018$ ) konnten diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Neben der nicht-synonymen Mutation G121A lagen in der Variante TcpF-F keine weiteren nicht-synonymen Mutationen vor. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass die Stückzahl einzelner Genvarianten, TcpF-F eingeschlossen, sehr gering ist ( $n \leq 5$ ) und der statistische Test daher nur begrenzt aussagekräftig ist.

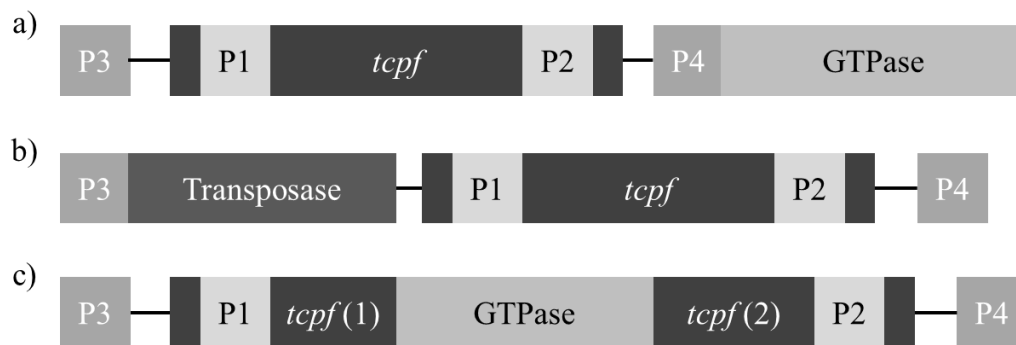


**Abbildung 3-11: Verteilung der TcpF Genvarianten unter *E. faecalis* Urinisolaten mit cfu < 10<sup>5</sup>/ml und cfu > 10<sup>5</sup>/ml.**

Die relativen Häufigkeiten der 16 Genvarianten (A-P) wurden bezogen auf die Gesamtheit der Isolate mit cfu < 10<sup>5</sup>/ml (n=22) oder cfu > 10<sup>5</sup>/ml (n=46) dargestellt. Ein statistisch signifikantes Ergebnis zeigte sich für die Genvariante F (p=0,018, Chi-Quadrat-Test).

Bei zwei *E. faecalis* Urinisolaten ergab die PCR eine unerwartet hohe Amplifikatlänge, die den Verdacht auf eine Insertion genetischen Materials innerhalb der Primerpaarsequenzen der Screening und/oder Sequenzierungs-PCR aufbrachte. Der Verdacht konnte mithilfe der Sequenzierungsergebnisse bestätigt werden. Der strukturelle Aufbau, der zu erwartenden Sequenz (*E. faecalis* Symbioflor 1) ist in Abbildung 3-12 dargestellt. Für Urinisolat *E. faecalis*#53 ergab die Screening-PCR die erwartete Amplifikatlänge von 844bp. Die Sequenzierungs-PCR lieferte eine Amplifikatlänge von ca. 2000bp, wohingegen eine Länge von 1206bp erwartet wurde. Die Insertion liegt demnach zwischen den Primersequenzen von Screening- und Sequenzierungs-PCR. Die Sequenzierung zeigte am 5'-Ende des Fragments eine unbekannte Sequenz, auf welche die Sequenz des TcpF folgt. Der Abgleich der unbekannt Sequenz mit BLAST erbrachte, dass die Sequenz im Genom von *E. faecalis* Symbioflor 1 für eine Transposase kodiert (GenBank: HF558530.1, Gen ID: EFS1\_1430) (Abbildung 3-12b). Für Urinisolat *E. faecalis*#11 lieferten sowohl die Screening-PCR als auch die Sequenzierungs-PCR Amplifikate unerwarteter Größe. Das amplifizierte Fragment in der Screening-PCR hatte eine Länge von ca. 1900bp (Abbildung 3-7) und in der Sequenzierungs-PCR eine Länge von ca. 2100bp (Abbildung 3-9). Die Insertion hat demnach zwischen den Primersequenzen der Screening-PCR stattgefunden. Die Sequenzierung ergab, dass das TcpF Gen vollstän-

dig, aber durch einen unbekanntem Sequenzabschnitt geteilt, vorlag. Der Vergleich des unbekanntem Sequenzabschnitts mit dem Genom von *E. faecalis* Symbioflor 1 brachte hervor, dass die gesuchte Sequenz für eine Deoxyguanosintriphosphat Triphosphohydrolase (GTPase) kodiert (GenBank: HF558530.1, Gen ID: EFS1\_1682) (Abbildung 3-12c). Das GTPase-Gen liegt benachbart (17bp *upstream*) zum *TcpF*-Gen im Genom von *E. faecalis* Symbioflor 1 (GenBank: HF558530.1, Gen ID: EFS1\_1683) (Abbildung 3-12a).



**Abbildung 3-12: Schematische Darstellung des *TcpF* Genlocus für die *E. faecalis* Stämme Symbioflor 1, #53 und #11.**

a) *E. faecalis* Symbioflor 1 (P3-P4:1206bp)

b) Urinisolat *E. faecalis*#53 (P3-P4: ca. 2000bp)

c) Urinisolat *E. faecalis*#11 (P3-P4: ca. 2100bp)

P1/P2: Primer Positionen für die Screening-PCR (E.f.seq1 und E.f.seq2), P3/4: Primer Positionen für die Sequenzierungs-PCR (E.f.seq3 und E.f.seq5).

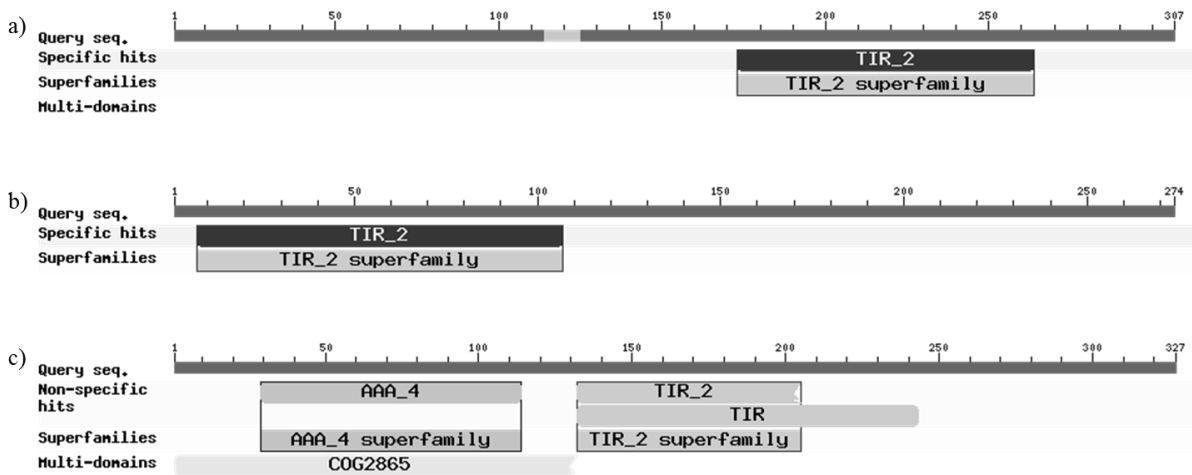
### 3.3 *In silico* Analyse

#### 3.3.1 Proteindomänen Homologie

Mittels des CDART (*Conserved Domain Architecture Retrieval Tool*) [80] konnten ausgehend von der Aminosäuresequenz von *TcpC* in der Gattung *Enterococcus* und *Leuconostoc* Gene identifiziert werden, die eine zur TIR Domäne von *TcpC* homologe Domäne besitzen. *Tcps* konnten in den Arten *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. casseliflavus* und *E. pallens* sowie *L. mesenteroides* und *L. pseudomesenteroides* nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden jedoch ausschließlich die *Tcp* von *E. faecalis* Symbioflor 1 (*TcpF*) und *L. mesenteroides* (*TcpM*) weiter untersucht.

Zwecks Bestätigung der CDART Ergebnisse wurden die Sequenzen von *TcpC*, *TcpF* und *TcpM* separat anhand der CDD (*Conserved Domain Database*) [78] untersucht. Zur

Abgrenzung gegenüber TIR Domänen eukaryoten Ursprungs, die als *TIR* klassifiziert wurden, wurden bakterielle TIR Domänen der Superfamilie *TIR\_2* zugerechnet. Im Fall von TcpC wurde eine bakterielle TIR Domäne am C-Terminus (Abbildung 3-13a) und im Fall von TcpF am N-Terminus (Abbildung 3-13b) bestätigt. Die TIR Domäne von TcpM liegt zentral und erreicht im Vergleich zu den bakteriellen TIR Domänen von TcpC und TcpF einen geringeren *E-value* ( $2,58^{-4}$ ). Zudem wurden am N-Terminus zwei weitere Domänen mit ähnlich niedrigen *E-values* (AAA\_4=  $6,54^{-3}$ , COG2865=  $3,16^{-4}$ ) detektiert (Abbildung 3-13c). Bei AAA\_4 handelte es sich um eine Domäne mit putativer ATP-Bindungsfunktion und bei COG2865 um eine Multi-Domäne, die sich aus einer HTH (Helix-Turn-Helix) –Domäne mit Transkriptionsregulatorfunktion [89] und einer Domäne unbekannter Funktion zusammensetzt.



**Abbildung 3-13: Conserved Domain Database Analyse [78]**

a) Query Sequenz: TcpC, AS173-264: TIR\_2 ( $E\text{-value} = 1,48^{-14}$ )

b) Query Sequenz: TcpF, TIR\_2  $E\text{-value} = 4,58^{-17}$

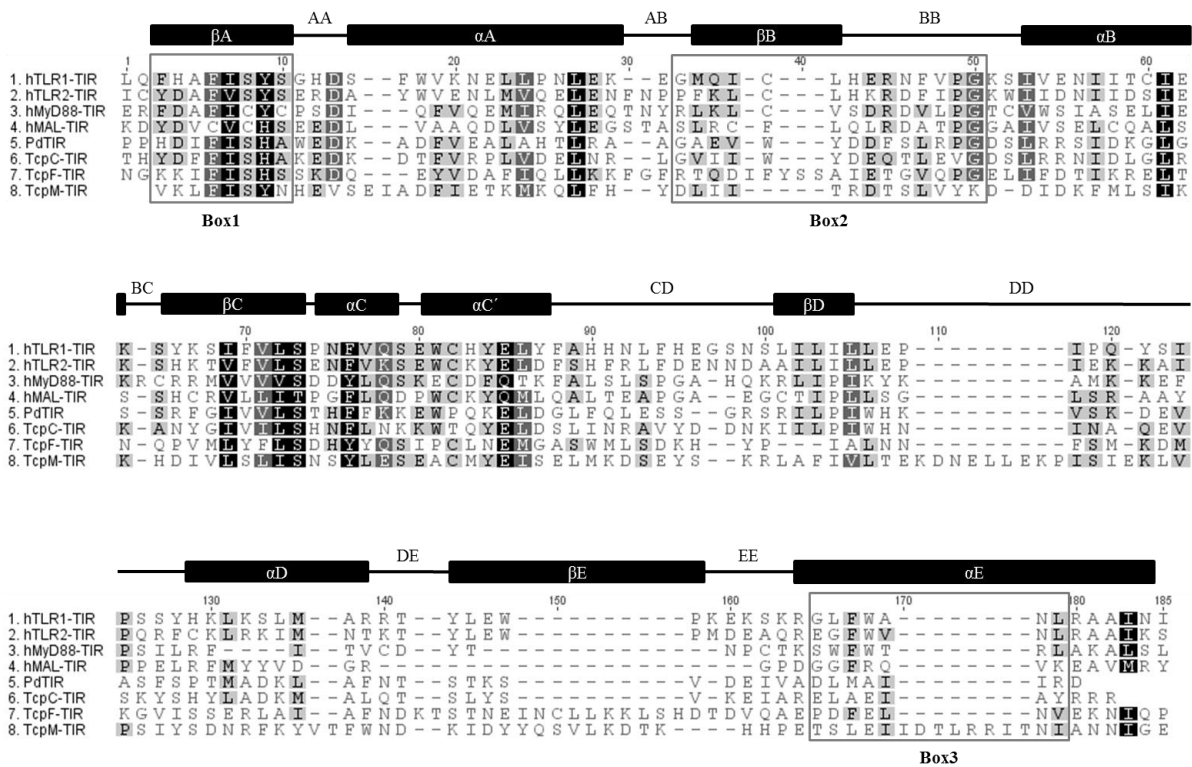
c) Query Sequenz: TcpM, AAA\_4  $E\text{-value} = 6,54^{-3}$ , TIR\_2  $E\text{-value} = 2,58^{-4}$ , COG2865  $E\text{-value} = 3,16^{-4}$

Erklärungen: TIR\_2: bakterielle TIR Domäne, TIR: eukaryote TIR Domäne, AAA\_4: Domäne mit putativer ATP-Bindungsfunktion, COG2865: Multidomäne bestehend aus HTH-Domäne und Domäne unbekannter Funktion.

Das multiple Aminosäuresequenzalignment der TIR Domänen der bakteriellen Tcp (TIR Domäne des Tcp von *P. denitrificans* (Pd-TIR), TcpC-TIR, TcpF-TIR, TcpM-TIR) und der humanen Tcp, die u.a. in den TLR2 Signalweg involviert sind, (TLR1-TIR, TLR2-TIR, MyD88-TIR und MAL-TIR [25]) erlaubte es, Bereiche hoher und niedriger Übereinstimmung zu unterscheiden (Abbildung 3-14). Hohe Übereinstimmung



mung fanden sich im Bereich der Box1 (AS3-10), die das erste  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ A) bildet, und dem Bereich AS69-86, der das dritte  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ C) und die dritte  $\alpha$ -Helix ( $\alpha$ C) bildet. Einzelne Aminosäurereste mit äußerst hoher Übereinstimmung fanden sich in Position 27 (Leucin) und in Position 61 (Leucin/Isoleucin). Aufgrund seiner herausragenden Rolle bei der Signaltransduktion ist der Bereich zwischen  $\beta$ B und  $\alpha$ B (BB-Loop) [68], [90]–[92] von besonderem Interesse. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu den anderen TIR Domänen im Fall von TcpF-TIR eine Insertion vorlag. Der für die TLR2 Signaltransduktion entscheidende Prolin-Rest (AS59) war jedoch vorhanden [45]. Insgesamt lag am Ende des BB-Loops (Prolin 49, Glycin 50) mit Ausnahme von TcpM unter den TIR-Domänen eine hohe Übereinstimmung vor. Der Bereich von CD-Loop bis  $\alpha$ E war von geringer Übereinstimmung gekennzeichnet und auch die Box 3 wies nur einen geringen Grad an Übereinstimmung auf.



**Abbildung 3-14: Multiples Aminosäuresequenzalignment**

In der obersten Zeile findet sich die Sekundärstruktur von hTLR1-TIR (RSCB *protein data bank*: 1FYV [43]). Die Hintergrundfärbung kennzeichnet den Grad an Sequenzübereinstimmung: ● 100%, ● 80-99%, ● 79-60%. Die Rechtecke umrahmen die bekannten konservierten Bereiche der humanen Tcp (Box1, Box2 und Box3). Das *Alignment* wurde mit *Clustal Omega* [77] generiert.

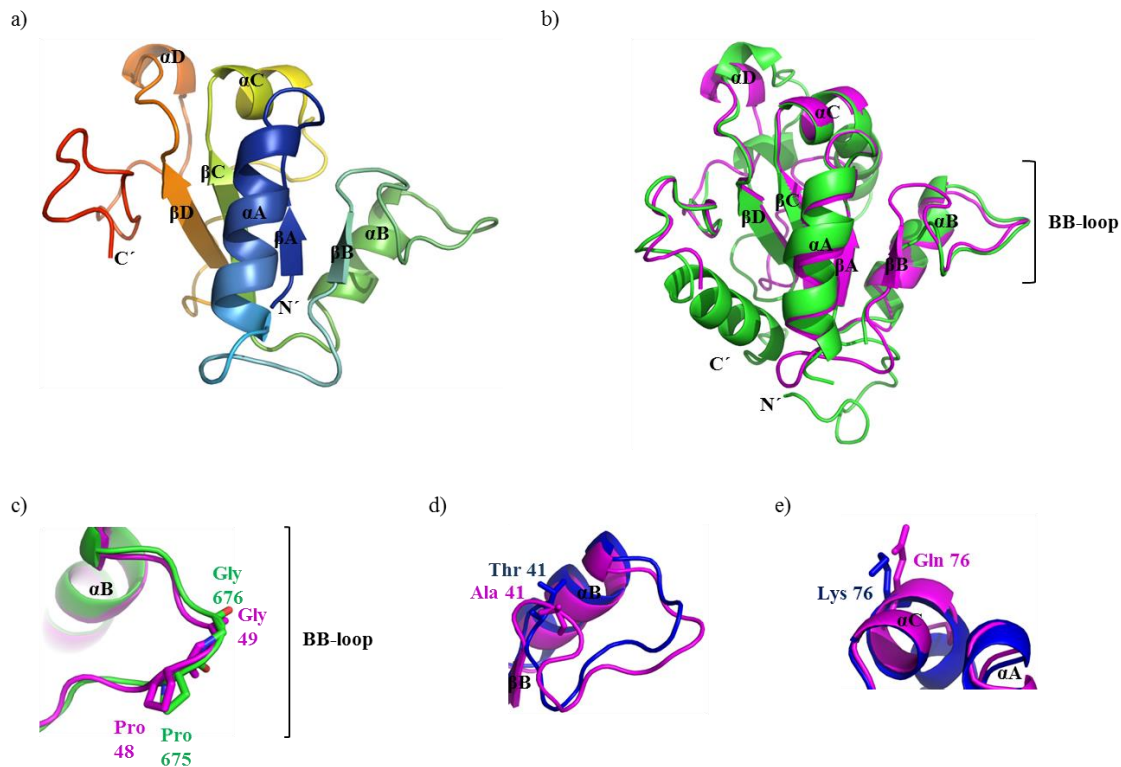
### 3.3.2 Strukturanalyse von TcpF

1	VSNG	KKIFIS HS	SKDQEYVD	AFIQLLKKFG	FRTQDIFYSS	AIETGVQPGE
51	LIFDTIKREL	TNPVMLYFL	SDHYYSIPIC	LNEMGASWML	SDKHYPIALN	
101	NFSMKDMKGV	ISSERLAIAP	NDKTSTNEIN	CLLKKLSHDT	DVQAEPDFEL	
151	NVEKNIQPFQ	NKLTQLIRQA	SYLKPDEKGY	FETTLSTHRP	YVGTAKGVYD	
201	CFKLPSLIEP	KSLGLDTLSE	DESHWLFFFL	TWGTFFQEGEK	VRFKLLKKDKA	
251	YNNREFSDIG	KCKNIYVSYL	EKVE			

Abbildung 3-15: Primärstruktur von TcpF

XXX: TIR Domäne; **XXX**: Box1; **XXX**: Box2; **X**: variable Aminosäure (A41T, Q76K, T183I und L270S), **XXX**: potentielle PIP2 Bindungsdomäne.

TcpF besteht aus 274 Aminosäuren. Die laut *CDD* wahrscheinliche TIR Domäne erstreckt sich von Aminosäure 7 bis 107 und stellt ca. 36% der Proteinstruktur. Die TIR Domäne liegt N-terminal. Die im Screening beobachteten Punktmutationen mit nachfolgendem Aminosäureaustausch befanden sich an Aminosäure 41 (A41T), 76 (Q76K), 183 (T183I) und 270 (L270S). Der Aminosäurerestaustausch A41T lag innerhalb der TIR Domäne und innerhalb der Box 2. Der Austausch Q76K lag innerhalb der TIR Domäne aber außerhalb der Boxen 1 und 2. T183I und L270S lagen beide außerhalb der TIR Domäne. Eine potentielle Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) Bindungsdomäne [71] fand sich N-terminal (Abbildung 3-15). Auf Basis bekannter und zu TcpF-TIR homologer Proteinstrukturen konnte eine *in silico* Vorhersage der Tertiärstruktur von TcpF-TIR mittels *HHpred* [81] getroffen werden (Abbildung 3-16a). Die prädiktive Tertiärstruktur der TIR Domäne von TcpF ist kugelförmig. Zentral befinden sich vier parallel angeordnete  $\beta$ -Faltblätter ( $\beta$ A- $\beta$ D), die von vier  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ A- $\alpha$ D) ummantelt werden. Die Nomenklatur der Strukturen erfolgte analog zur Nomenklatur von Xu et al., 2000 [43] und wurde in der Einleitung bereits besprochen. Anhand von Superpositionen lassen sich strukturelle Gemeinsamkeiten zwischen TIR Domänen unterschiedlichen Ursprungs darstellen. Bemerkenswerterweise zeigten die Tertiärstrukturen von humanem TLR1-TIR und TcpF-TIR starke Übereinstimmungen (Abbildung 3-16b). Insbesondere das Zentrum, gebildet durch die parallel angeordneten  $\beta$ -Faltblätter, die  $\alpha$ A- und  $\alpha$ B-Helix (Abbildung 3-16b) sowie der *BB-Loop* zeigten eine nahezu identische Anordnung (Abbildung 3-16c). Die Mutation A41T führte zu strukturellen Veränderungen am Beginn des *BB-loops* (Abbildung 3-16d), wohingegen die Mutation Q76K keine strukturellen Auswirkungen auf die TIR Domäne von TcpF hatte (Abbildung 3-16e).



**Abbildung 3-16: Tertiärstruktur und Superposition von TcpF-TIR (7-128)**

- TcpF-TIR (7-128). Der Verlauf der Spektralfarben von blau nach rot entspricht der sequentiellen Abfolge der Sekundärstruktur.
- Superposition von hTLR1-TIR (grün) und TcpF-TIR (magenta), TM-Score: 0,78 [83]
- Detailaufnahme des BB-Loops aus Abbildung 3-16b. hTLR1-TIR (grün) und TcpF-TIR (magenta).
- Superposition der TcpF-TIR Varianten in Position 41. Position 41: Alanin (magenta), Position 41: Threonin (blau).
- Superposition der TcpF-TIR Varianten in Position 76. Position 76: Glutamin (magenta), Position 76: Lysin (blau)

Die Positionsangaben beziehen sich auf die jeweilige Aminosäuresequenz von hTLR1 oder TcpF. Die hTLR1-TIR (1FYV) Struktur wurde von der *protein data bank* bezogen. Die Superposition wurde mittels *TM-Align* [83] generiert.

### 3.3.3 Strukturanalyse von TcpC

TcpC besteht aus 307 Aminosäuren. Die TIR Domäne erstreckt sich von Aminosäure 173 bis 264 und stellt ca. 30% der Proteinstruktur. Die TIR Domäne liegt C-terminal. Die im Screening beobachtete Punktmutation mit nachfolgendem Aminosäureaustausch

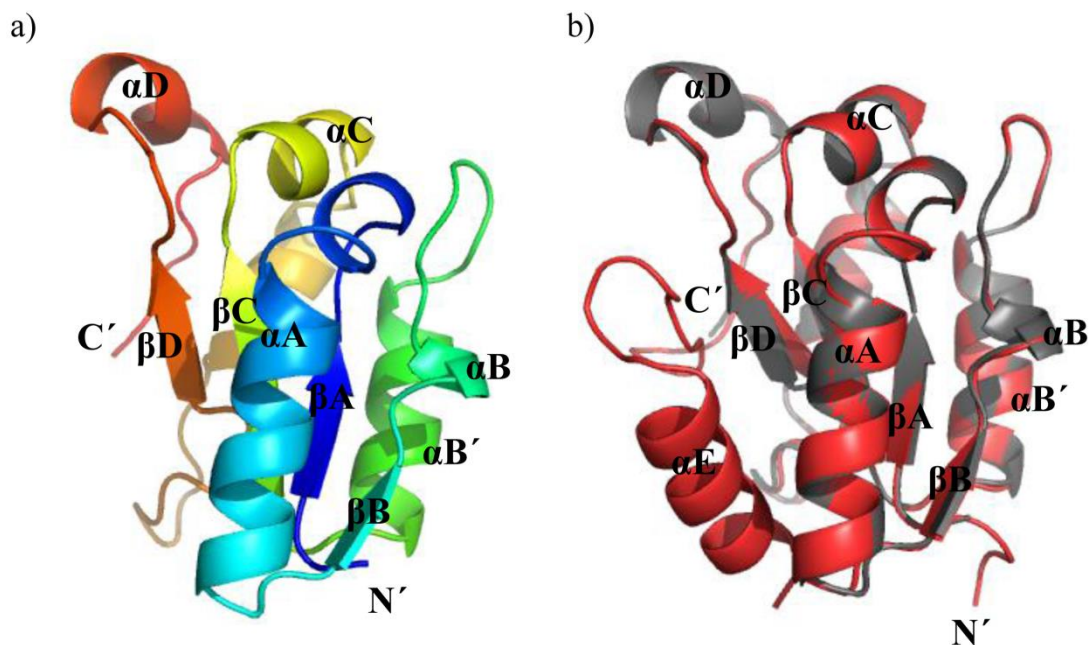
```

1  VIAYENIEFF ICLVNVLGNN MYNILFFIFL SIAIPFLLFL AWKQHLKTKE
51  IRSYLLKEGY NIIFNDEGNS YLAFNISNAT FRAGNLTSND YFQASISYIH
101 DYRWWEKVE AKKINNIFII YISNIDFPSQ KLFYRNKSL AEIDWAKLQA
151 IFHQPYEIQN DVMQDNNNTH YDFFISHAKE DKDTFVRPLV DELNRLGVTI
201 WYDEQTLVVG DSLRRNIDLG LRKANYGIVI LSHNFLNKKW TQYELDSLIN
251 RAVYDDNKII LPIWHNINAQ EVSKYSHYLA DKMALQTSLY SVKEIARELA
301 EIAYRRR
    
```

**Abbildung 3-17: Primärstruktur von TcpC**

XXX: TIR Domäne; XXXX: Box1; XXXX: Box2; X: variable Aminosäure (A41V)

von Alanin zu Valin befand sich in Position 41. Die Mutation lag N-terminal und außerhalb der TIR Domäne (Abbildung 3-17). TcpC-TIR war kugelförmig und bestand zentral aus vier parallel ausgerichteten  $\beta$ -Faltblättern ( $\beta$ A- $\beta$ D), die von vier  $\alpha$ -Helices ( $\alpha$ A- $\alpha$ D) ummantelt wurden (Abbildung 3-18a). In der Superposition von TcpC-TIR mit PdTIR [64] zeigte sich, dass die beiden TIR Domänen nahezu identisch aufgebaut sind (Abbildung 3-18b).



**Abbildung 3-18: Tertiärstruktur und Superposition von TcpC-TIR (171-280)**

- Tertiärstruktur von TcpC-TIR (171-280). Der Verlauf der Spektralfarben von blau nach rot entspricht der sequentiellen Abfolge der Sekundärstruktur.
- Superposition von TcpC-TIR (grau) und PdTIR (rot), TM-Score: 0,98 [83].

Die PdTIR (3H16) Struktur [64] wurde von der *protein data bank* bezogen. Die Superposition wurde mit *TM-Align* generiert [83].

### 3.3.4 Strukturanalyse von TcpM

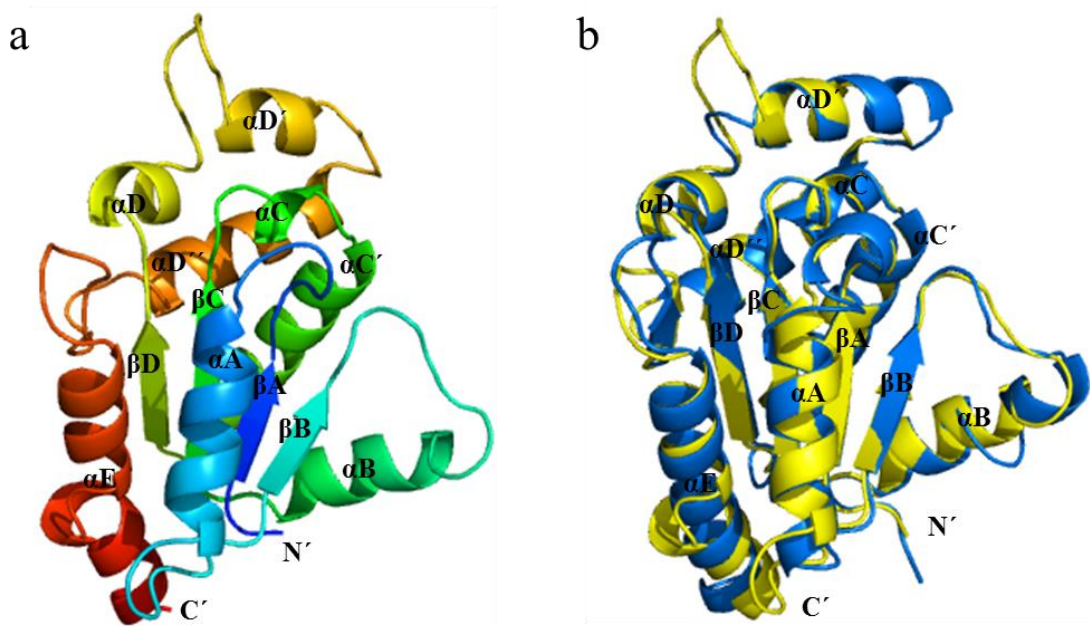
Das TcpM besteht aus 327 Aminosäuren. Die vermutliche TIR Domäne erstreckt sich von Aminosäure 132 bis 205 und stellt ca. 22% der Proteinstruktur. Die TIR Domäne liegt C-terminal. N-terminal befinden sich die Multidomäne COG2865 sowie die AAA\_4 Domäne (Abbildung 3-19).

```
1  MNESISDILM TNQRGNVRYV FPGENTETLA KMIATLANTK MGGKILLGFQ
51  DRGNIECKG FSFPLPKREE IVDFLDGFAG FEIFDASYK QRIAVINPPP
101 SFEKIAFSKN KFYKFDSNYT NELSEKKPVK LEISYNHEVS EIADFIETKM
151 KQLFHYD LITRDTSLVYKD DIDKFMLSIK KHDIVLSLIS NSYLESEACM
201 YEISELMKDS EYSKRLAFIV LTEKDNELLE KPISIEKLV SIYSDNRFKY
251 VTFWNDKIDY YQSVLKDTKH HPETSLEIID TLRRITNIAN NIGEFVSMNL
301 KTMGKSLFDM IDDDFSDIAN MIKKYVD
```

**Abbildung 3-19: Primärstruktur von TcpM**

XXX: TIR Domäne (132-205), **XXX**: Box 1, **XXX**: Box 2, XXX: COG2865 Domäne (1-132), XXX: AAA\_4 Domäne

Die Tertiärstrukturvorhersage für TcpM-TIR ergab, wie auch schon bei TcpF-TIR und TcpC-TIR beobachtet, einen kugelförmigen Aufbau, in dessen Zentrum sich vier parallel angeordnete  $\beta$ -Faltblätter befanden, die wiederum von  $\alpha$ -Helices ummantelt wurden (Abbildung 3-20a). Erstaunlicherweise zeigten sich die stärksten strukturellen Gemeinsamkeiten zwischen TcpM-TIR und L6-TIR (Abbildung 3-20b). Dabei handelte es sich um die TIR Domäne des immunmodulierenden Proteins L6 der Pflanze *Linum usitatissimum* (Gemeiner Lein) [93].



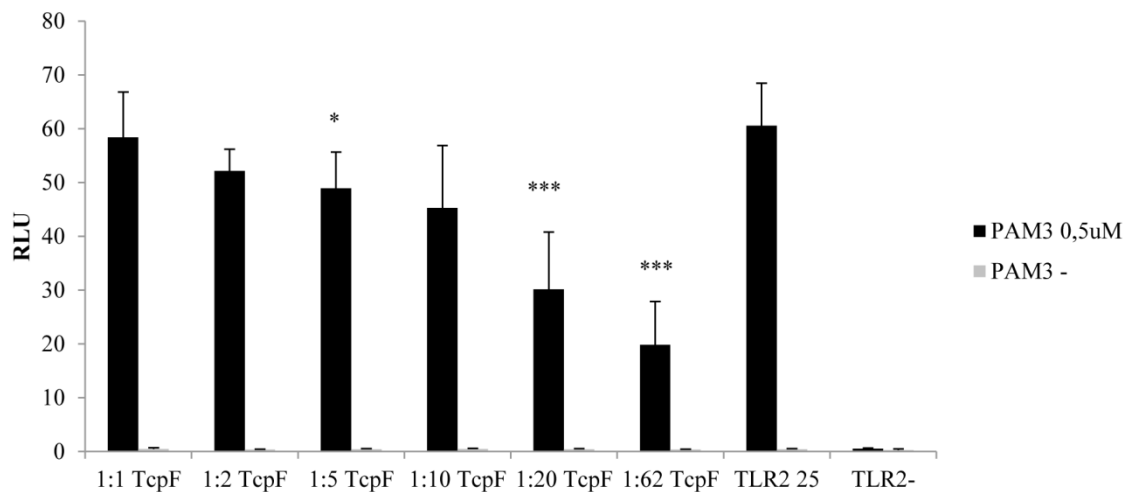
**Abbildung 3-20: Tertiärstruktur und Superposition von TcpM-TIR (115-305)**

- a) Tertiärstruktur von TcpM-TIR 115-305. Der Verlauf der Spektralfarben von blau nach rot entspricht der sequentiellen Abfolge der Sekundärstruktur.
- b) Superposition von TcpM-TIR (gelb) und L6-TIR (blau), TM-Score: 0,89 [83]  
Die L6-TIR (3OZI) [93] Struktur wurde von der *protein data bank* bezogen. Die Superposition wurde mit *TM-Align* generiert [83].

### 3.4 Funktionelle Analysen

#### 3.4.1 TcpC, TcpF und TcpM abhängige NFκB-Signalunterdrückung

Um den Einfluss von TcpC, TcpF und TcpM auf die TLR Signalkaskade zu untersuchen, wurde mithilfe des Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay Systems die TLR2-getriggerte NFκB-Aktivierung nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>Cys-SKKKK bei gleichzeitiger Expression von TcpF, TcpC und TcpM bestimmt.

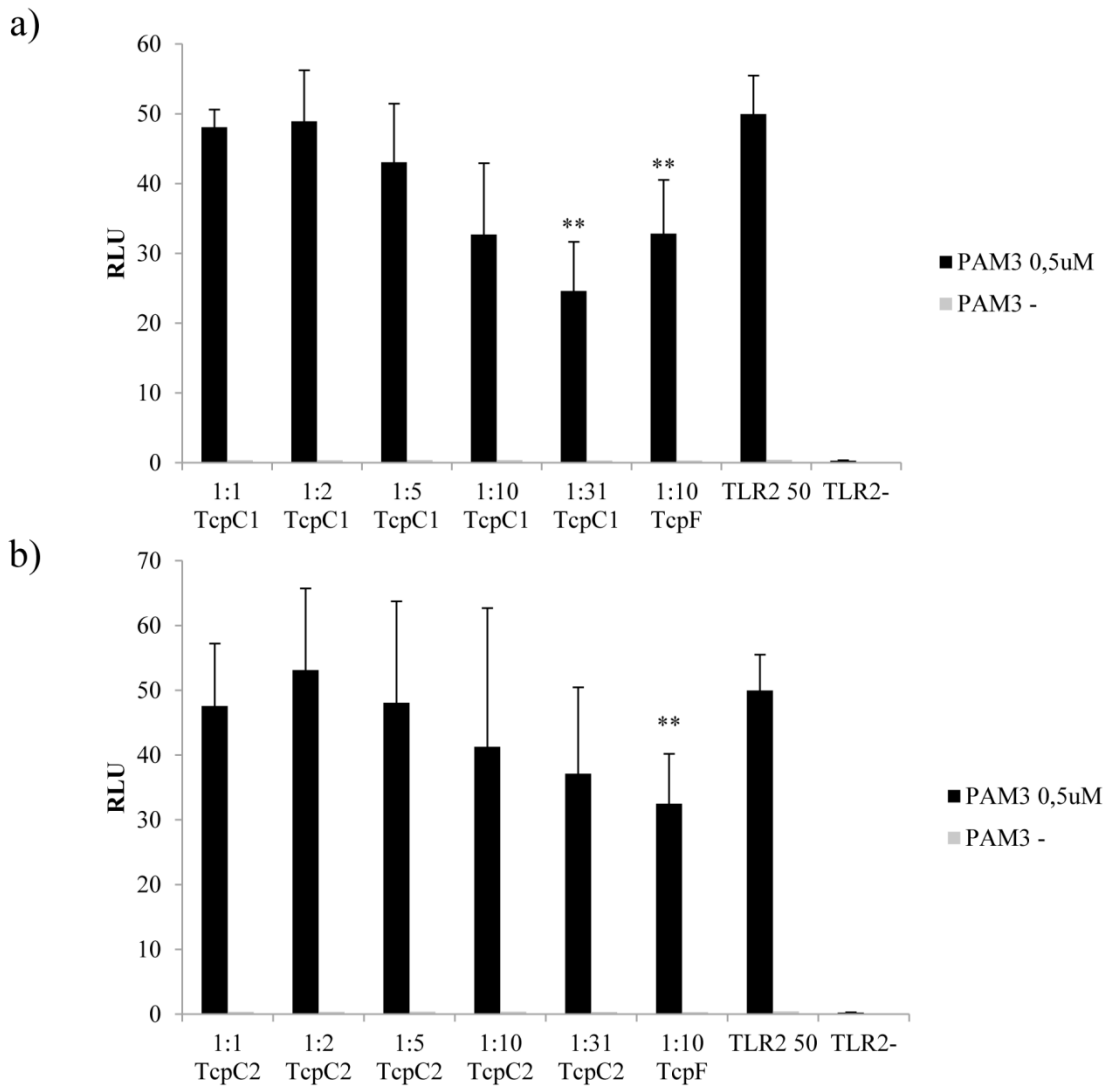


**Abbildung 3-21: NFκB Signalaktivierung in Abhängigkeit von TcpF**

HEK293-Zellen wurden mit hTLR2 und beiden Luciferase Reporter-  
genen transfiziert. TcpF wurde in den angegebenen Verhältnissen  
(hTLR2:TcpF 1:1 bis 1:62) hinzugegeben. Das Signal wurde mit  
Pam<sub>3</sub>Cys-SKKKK (PAM3) (0,5μM) für 16h aktiviert und anschlie-  
ßend im Luminometer bestimmt. Nicht aktivierte Versuchsansätze  
dienten als negative Kontrolle (PAM3-). Der Ansatz TLR 25 zeigt die  
TLR2-abhängige NFκB-Antwort in Abwesenheit von TcpF. Der Ver-  
suchsansatz, der nur mit den Luciferase Reporter-  
genen transfiziert wurde, zeigt die zelleigene, TLR2-unabhängige NFκB-Antwort  
(TLR2-). Die Grafik zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen  
von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzni-  
veaus bezogen auf den Ausgangswert (TLR 25) wurden mithilfe des  
*student's t-test* bestimmt (\*:  $p \leq 0,05$ , \*\*\*:  $p \leq 0,001$ ). RLU: Relative  
Lumineszenz Einheit.

Abbildung 3-21 zeigt die Ergebnisse der TcpF-abhängigen NFκB Signalaktivierung.  
Bei zunehmender Menge an TcpF ließ sich eine zunehmende Suppression der NFκB  
Signalaktivierung feststellen. Eine signifikante Suppression des NFκB Signals fand sich  
ab einem TLR2/TcpF Verhältnis von 1:5 ( $p \leq 0,05$ ). Die maximale Suppression zeigte  
sich bei einem Verhältnis von 1:62. Hier wurde das Signal um 63,2% von 60,6 RLU auf  
19,9 RLU reduziert ( $p \leq 0,001$ ). Bei einem TLR2/TcpF Verhältnis von 1:10 fand sich  
eine Signalreduktion um 25,2% von 60,6 RLU auf 45,3 RLU, die jedoch aufgrund eines  
nur aus drei Einzelwerten bestehenden Mittelwertes und einer verhältnismäßig großen  
Standardabweichung ohne statistische Signifikanz blieb. Der Versuchsansatz  
TLR2/TcpF 1:10 wurde in den Experimenten mit TcpC und TcpM mitgeführt, um die  
Ergebnisse zu vergleichen.





**Abbildung 3-22: NFκB Signalaktivierung in Abhängigkeit von TcpC**

a) NFκB Signalaktivierung in Abhängigkeit von TcpC1

b) NFκB Signalaktivierung in Abhängigkeit von TcpC2

HEK293-Zellen wurden mit hTLR2 und beiden Luciferase Reporter-  
genen transfiziert. TcpC1 oder TcpC2 wurde in den angegebenen  
Verhältnissen (hTLR2:TcpC1/2 1:1 bis 1:31) hinzugegeben. Zum  
Vergleich wurde ein Ansatz mit TcpF im Verhältnis 1:10 mitgeführt.  
Das Signal wurde mit Pam<sub>3</sub>Cys-SK<sub>4</sub>KKK (0,5μM) für 16h aktiviert  
und anschließend im Luminometer bestimmt. Der Ansatz TLR 50  
zeigt die TLR2-abhängige NFκB-Antwort in Abwesenheit von TcpC.  
Der Versuchsansatz, der nur mit den Luciferase Reporter-  
genen transfiziert wurde, zeigt die zelleigene, TLR2-unabhängige NFκB-Antwort  
(TLR2-). Die Grafik zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen  
von mindestens drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz-  
niveaus bezogen auf den Ausgangswert (TLR2 50) wurden mithilfe des  
*student's t-test* bestimmt (\*: p≤0,05, \*\*: p≤0,01). RLU: Relative Lu-  
minescenz Einheit.

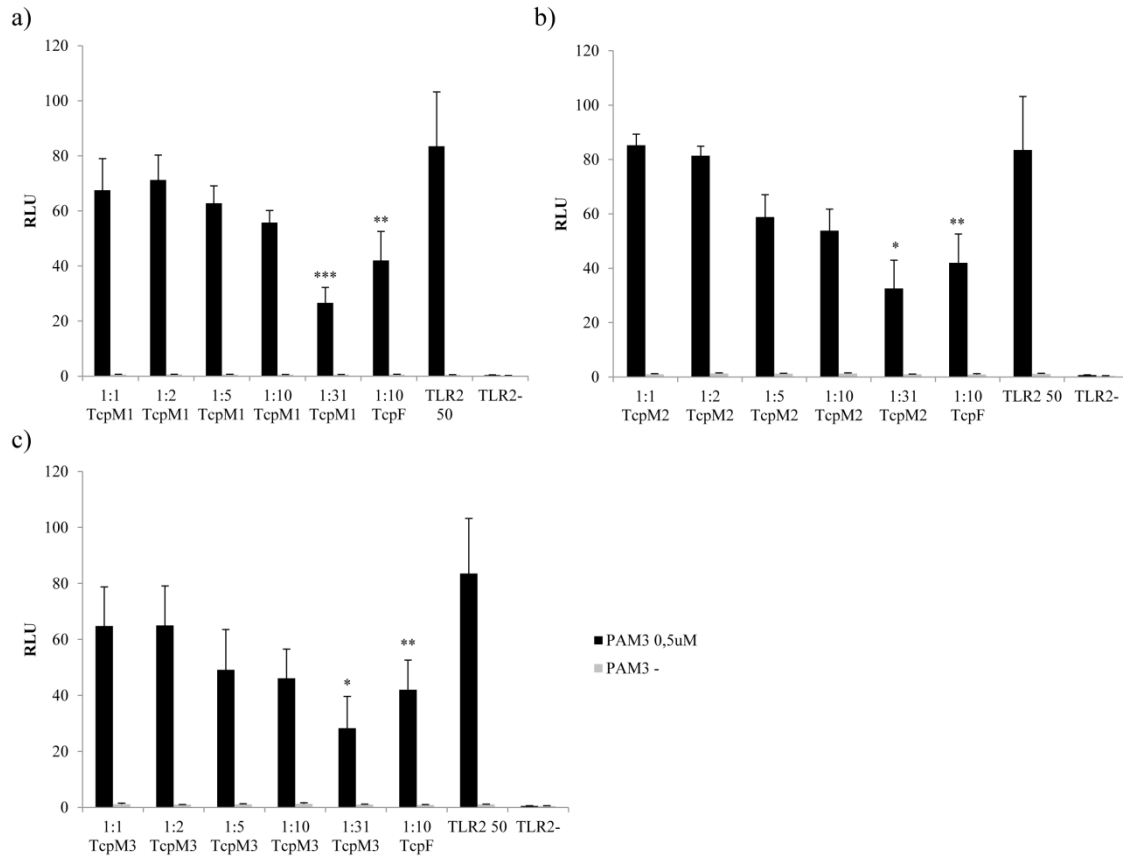


Abbildung 3-22 zeigt die Ergebnisse der TcpC abhängigen NFκB Signalaktivierung. TcpC1 (Abbildung 3-22a) und TcpC2 (Abbildung 3-22b) unterscheiden sich bezüglich des Startcodons. TcpC1 ist um 27bp länger als TcpC2 und beginnt mit dem Startcodon GTG. TcpC2 beginnt mit dem Startcodon ATG (Tabelle 2-18). Es fand sich eine positive Korrelation zwischen der Menge an pTcpC1/2 und der Suppression der NFκB Signalaktivierung. Ein statistisch signifikantes Ergebnis fand sich für die Versuchsansätze mit einem TLR2/TcpC1 Verhältnis von 1:31 ( $p \leq 0,01$ ) und einem TLR2/TcpF Verhältnis von 1:10 ( $p \leq 0,01$ ). Für den Versuchsansatz TLR2/TcpF 1:10 fand sich eine Signalreduktion um 35% von 50 RLU auf 32,5 RLU ( $p < 0,01$ ). Im Vergleich dazu findet sich bei einem TLR2/TcpC1 Verhältnis von 1:10 eine vergleichbare Signalreduktion um 34,5% von 50 RLU auf 32,7 RLU, wobei dieses Ergebnis aufgrund der geringeren Anzahl der Einzelwerte (TcpC1 1:10,  $n=4$ ) gegenüber dem Versuchsansatz TcpF 1:10 ( $n=8$ ) ohne statistische Signifikanz blieb. Für TcpC2 fand sich bei einem TLR2/TcpC2 Verhältnis von 1:10 lediglich eine Signalreduktion um 17,4% von 50 RLU auf 41,3 RLU bei jedoch deutlich größerer Standardabweichung.

Abbildung 3-23 zeigt die Ergebnisse der TcpM abhängigen NFκB Signalaktivierung. Auch für die drei TcpM Varianten fand sich eine positive Korrelation zwischen der Menge an pTcpM1/2/3 und der Suppression der NFκB Signalaktivierung. pTcpM1 kodiert für das vollständige TcpM, wohingegen pTcpM2 nur für die N-terminale HTH und pTcpM3 nur für die C-terminale TIR Domäne kodieren. Bei einem Verhältnis von 1:10 von TLR2/TcpM1 und TLR2/TcpM2 kam es zu einer vergleichbaren Suppression des Signals. Für TcpM1 fand sich eine Suppression um 33,2% von 83,5 RLU auf 55,8 RLU ( $p \leq 0,001$ ) und für TcpM2 um 35,5% auf 53,8 RLU ( $p \leq 0,05$ ). TcpM3 zeigte den stärksten suppressiven Effekt unter den TcpM Varianten. Bei einem TLR2/TcpM3 Verhältnis von 1:10 zeigte sich eine Suppression um 44,8% auf 46,1 RLU ( $p \leq 0,05$ ). Ein statistisch signifikanter Unterschied fand sich zwischen den TcpM Varianten TcpM1, TcpM2 und TcpM3 für keinen der Versuchsansätze. Der aus Gründen der Vergleichbarkeit mitgeführte TcpF Ansatz zeigte bei einem TLR2/TcpF Verhältnis von 1:10 eine Suppression des NFκB-Signals um 49,7% auf 22 RLU ( $p \leq 0,01$ ). Die große Spannweite der Ergebnisse für die TcpF-abhängige Suppression (25,2% bis 49,7%) ist am ehesten im Rahmen der Versuchsvariabilität und den unterschiedlichen Versuchsansätzen mit TLR2 25 (Abbildung 3-21) und TLR 50 (Abbildung 3-22/23) zu erklären.

Die oben dargestellten Ergebnisse ließen sich für TcpF, TcpC1/C2 und TcpM1/M2/M3 auch unter variablen Versuchsbedingungen mit TLR 12,5ng, TLR 25ng, TLR 50ng und

unterschiedlichen Stimulationszeiträumen (6h, 16h) reproduzieren (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3-23: NFκB Signalaktivierung in Abhängigkeit von TcpM**

a) NFκB Signalaktivierung in Abhängigkeit von TcpM1

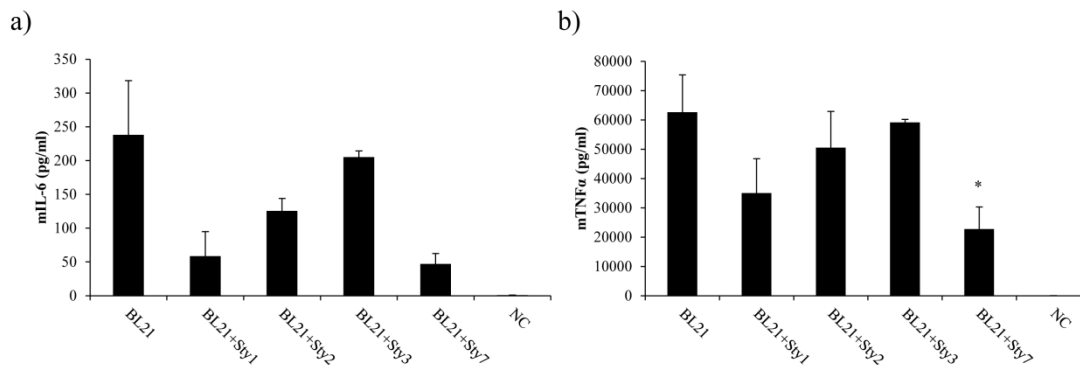
b) NFκB Signalaktivierung in Abhängigkeit von TcpM2

c) NFκB Signalaktivierung in Abhängigkeit von TcpM3

HEK293-Zellen wurden mit den Plasmiden *hTLR2* (50ng), *pRK5*, *pElamLuc* (550ng) und *phRL-TK* (50ng) transfiziert. *pTcpM1*, *pTcpM2* oder *pTcpM3* wurden, bezogen auf *hTLR2*, in den angegebenen Verhältnissen (1:1 bis 1:31) hinzugegeben. Zum Vergleich wurde ein Ansatz mit *pTcpF* im Verhältnis 1:10 mitgeführt. Das Signal wurde mit Pam<sub>3</sub> (0,5μM) für 16h aktiviert und anschließend im Luminometer bestimmt. Nicht aktivierte Versuchsansätze dienten als negative Kontrolle (Pam<sub>3</sub>-). Der Versuchsansatz mit lediglich *pRK5*, *pElamLuc* und *phRL-TK* zeigte die zelleigene, TLR2 unabhängige NFκB-Antwort (TLR2-). Die Grafik zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Experimenten mit Triplicaten. Die Signifikanzniveaus bezogen auf den Ausgangswert (TLR2-) wurden mithilfe des *student's t-test* bestimmt (\*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*p<0,001). RLU: Relative Lumineszenz Einheit.

### 3.4.2 IL-6 und TNF-alpha Sekretion in Abhängigkeit von TcpC/M/F

Im Stimulationsversuch wurden *E. coli* BL21 Transformanten auf RAW264.7 Makrophagen gegeben und durch Stimulation von u.a. TLR2 und TLR4 durch bakterielle Membranbestandteile eine Zytokinantwort ausgelöst. (Abbildung 3-24). Die Zytokinantwort wurde in Form von IL-6 und TNF $\alpha$  in Abhängigkeit der Expressionsprodukte (TcpM = BL21+pSty1, TcpM-HTH = BL21+pSty2, TcpM-TIR = BL21+pSty3 und TcpF = BL21+pSty7) untersucht. Mit Ausnahme von TcpF fand sich keine statistisch relevante Reduktion der Zytokinantwort für die untersuchten Tcps. Bezüglich TcpF fand sich bei TNF $\alpha$  eine signifikante Reduktion ( $p=0,03$ , *student's t-test*) auf ca. ein Drittel des Ausgangswertes (BL21). Für IL-6 fand sich auch für TcpF kein signifikantes Ergebnis.

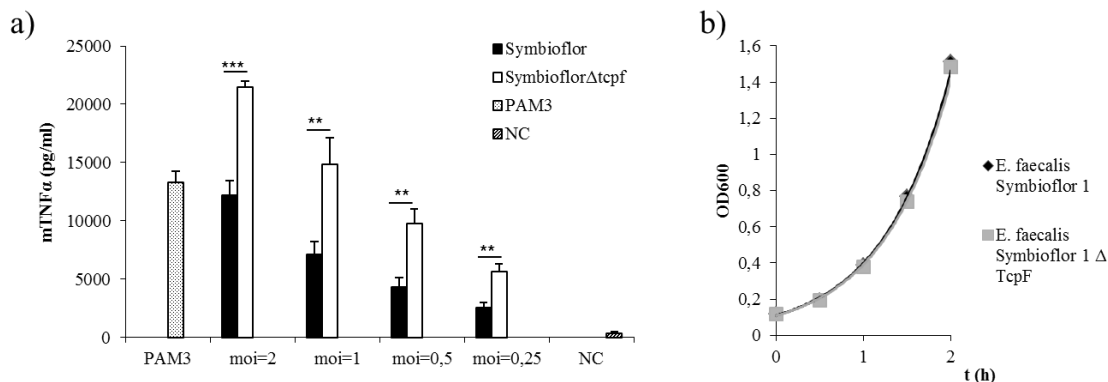


**Abbildung 3-24: Zytokinantwort in Abhängigkeit von TcpM, TcpM-HTH, TcpM-TIR und TcpF**

RAW264.7 Makrophagen wurden mit dem *E. coli* Stamm BL21 oder den BL21 Transformanten BL21+pSty1 (TcpM), BL21+pSty2 (TcpM-HTH), BL21+pSty3 (TcpM-TIR) und BL21+pSty7 (TcpF) stimuliert ( $moi=0,1$ ). Nach 6h wurden im Überstand die Zytokinkonzentrationen für mIL-6 (a) und mTNF $\alpha$  (b) mit dem Bio-Plex Pro<sup>TM</sup> Assay bestimmt. Die Messung erfolgte in Duplikaten. Die Grafik zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzniveaus bezogen auf den Ausgangswert (BL21) wurden mithilfe des *student's t-test* bestimmt (\*:  $p<0,05$ ). NC: RAW264.7 Makrophagen, die nicht stimuliert wurden, dienten als negative Kontrolle.

RAW264.7 Makrophagen wurden außerdem mit einer isogenen TcpF Deletionsmutante des Stammes *E. faecalis* Symbioflor 1 stimuliert. Die Deletionsmutante wurde in vollem Umfang von Herrn Dr. S. Tchatalbachev erstellt und dankenswerterweise für die Infektionsversuche zur Verfügung gestellt. Die TcpF Deletion führte zu einer signifikanten Elevation der TNF $\alpha$  Antwort (Abbildung 3-25a). Ein unterschiedliches Wachstumsver-

halten zwischen Wildtyp und Deletionsmutante konnte ausgeschlossen werden (Abbildung 3-25b).



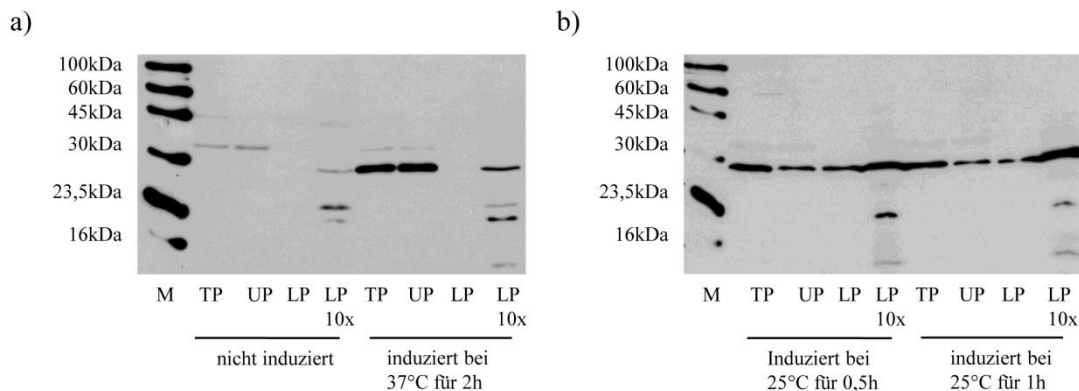
**Abbildung 3-25: Stimulation von RAW264.7 Makrophagen mit *E. faecalis* Symbioflor 1 und *E. faecalis* Symbioflor 1 ΔtcpF**

- a) RAW264.7 Makrophagen wurden für 6h mit *E. faecalis* Symbioflor 1 und seiner isogenen TcpF Deletionsmutante (SymbioflorΔtcpf) mit mois von 2 bis 0,25 infiziert und die mTNFα Konzentration im Überstand mittels ELISA (Quantikine) bestimmt. Der synthetische TLR2 Ligand PAM3 fungiert als positive und der nicht infizierte Ansatz als negative Kontrolle (NC). Die Grafik zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten. *student's t-test*: \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .
- b) *E. faecalis* Symbioflor 1 und die Deletionsmutante *E. faecalis* Symbioflor 1ΔtcpF wurden von einer Übernachtskultur 1:25 in BHI Medium überimpft und bei 37°C und 130rpm inkubiert. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 600nm über 2h bestimmt.

### 3.5 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine

Als Vorarbeit für anschließende Experimente in Form von Stimulationsversuchen mit synthetischen TLR Liganden und RAW264.7 Makrophagen sowie dem intrazellulären Nachweis nach Zugabe der Tcp in den Zellüberstand wurden die Proteine TcpF, TcpC-TIR und GFP (Negativkontrolle) rekombinant hergestellt und aufgereinigt. Die entsprechenden Plasmide wurden dazu in den *E. coli* Stamm TOP 10 transformiert und die Expression mit AHT induziert. Anschließend wurden die rekombinanten Proteine über ein Säulenverfahren aufgereinigt und durch Zentrifugation mit Ultrafiltrationsmembranen konzentriert. Dabei stellte sich insbesondere die Expression von TcpF als schwierig dar, weil das rekombinante TcpF unter Überexpression vorwiegend in unlöslicher Form vor-

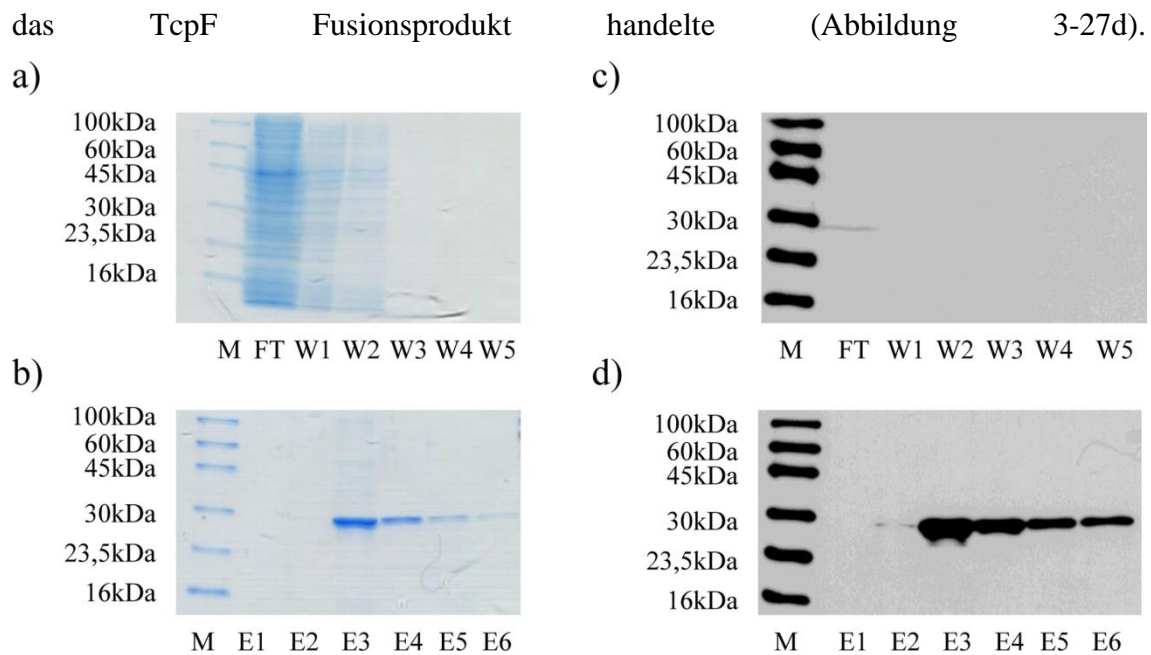
lag (Abbildung 3-26a). Modulation der Expressionstemperatur und –dauer sowie Konzentrationsminderungen des Induktors bieten sinnvolle Vorgehensweisen zur Vermeidung von Proteinaggregaten [94]. Für eine höchstmögliche Ausbeute an löslichem TcpF zeigten sich eine Expressionstemperatur von 25°C, eine Expressionsdauer von 0,5h und eine AHT Konzentration von 200ng/ml als vorteilhaft (Abbildung 3-26b).



**Abbildung 3-26: TcpF Expression in *E. coli* Top10 unter variablen Expressionsbedingungen**

Der mit pSty4 transformierte *E. coli* TOP10 Stamm wurde bei 37°C in LB-Medium + Ampicillin bis zu einer  $OD_{600}=0,5$  kultiviert. Anschließend wurde die Expression mit AHT (200ng/ml) für 2h bei 37°C (a) oder für 0,5h/1h bei 25°C (b) induziert. Der nicht induzierte Transformant diente als negative Kontrolle. Totale Protein Ansätze (TP) stammen vom ungetrennten Lysat, unlösliches Protein vom Pellet (UP) und lösliches Protein (LP) vom Überstand. Die Detektion erfolgte mit dem Streptavidin-HRP Konjugat. M: *Strep-tag*<sup>®</sup> Protein Ladder.

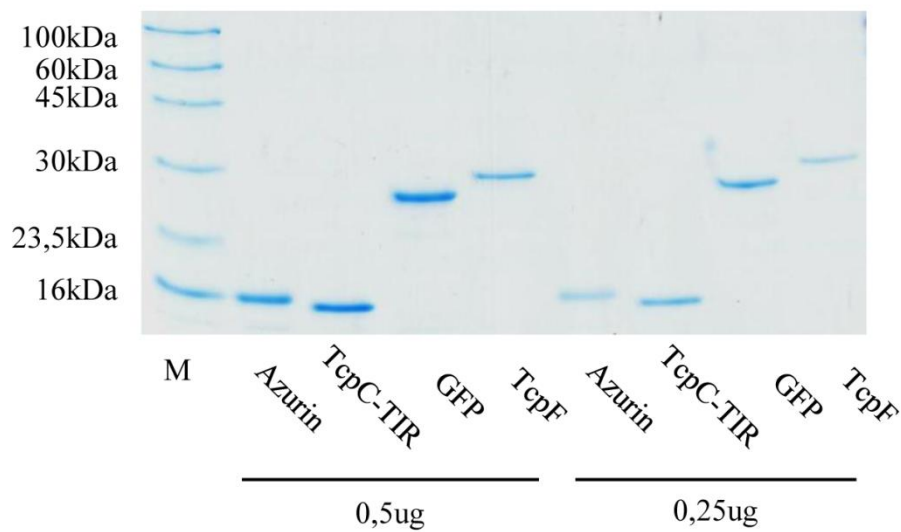
Nachdem die Expressionsbedingungen für TcpF optimiert wurden, wurde TcpF wie auch die übrigen rekombinanten Proteine über ein Säulenverfahren aufgereinigt. Exemplarisch wird hier das Aufreinigungsergebnis von TcpF dargestellt (Abbildung 3-27). Die endogenen, nicht mit einem *Strep-tag*<sup>®</sup> versehenen *E. coli* Proteine wurden nicht von der Säulenmatrix gebunden und dadurch im *flow through* sowie den Waschfraktionen eins und zwei entfernt (Abbildung 3-27a). Das Fusionsprodukt aus *Strep-tag*<sup>®</sup> und TcpF wurde von der Säulenmatrix gebunden und eluiert in den Elutionsfraktionen zwei bis sechs (Abbildung 3-27b). Durch das Detektionsverfahren mit dem *Strep-Tactin Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate* konnte bestätigt werden, dass durch die Waschvorgänge keine signifikanten Mengen an Fusionsprodukten verloren wurden (Abbildung 3-27c) und es sich bei dem in der Coomassie-Färbung eluiertem Protein, um



**Abbildung 3-27: Säulenaufreinigung von TcpF**

Das Fusionsprodukt aus *Strep-tag*<sup>®</sup> und TcpF wurde anhand der *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Matrix isoliert. Hierzu wurde der Transformant *E coli*+pSty7 bis zu einer  $OD_{600}=1,5$  kultiviert, die Expression mit AHT (200ng/ml) bei 25°C für 0,5h induziert und anschließend das Bakterienpellet lysiert und auf die *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Säulen gegeben. Die Abbildungen a) und b) zeigen die unterschiedlichen Wasch- (W1-5) und Elutionsfraktionen (E1-6) in einer Coomassie-Färbung. Die Abbildungen c) und d) zeigen die entsprechenden Ansätze unter Detektion mit dem Streptavidin-HRP Konjugat. Der *flow through* (FT) steht für das über die Säule gelaufene Lysat. M: *Strep-tag*<sup>®</sup> Protein Ladder.

In Abbildung 3-28 finden sich sämtliche der in dieser Arbeit aufgereinigten rekombinanten Proteine. Das Plasmid pASK-IBA2 kodiert für das Protein Azurin (15kDa). Es diente bei der Säulenaufreinigung mit *Strep-Tactin*<sup>®</sup> als positive Kontrolle. Bei TcpC-TIR handelte es sich um die TIR Domäne von TcpC, die analog zu [1] erstellt wurde. Das grün fluoreszierende Protein (GFP) war in den geplanten Proteinexperimenten als negative Kontrolle vorgesehen und erwies sich durch seine fluoreszierenden Eigenschaften bei der Konzentrierung der Proteine anhand der Ultrafiltrationsmembranen als hilfreich.



**Abbildung 3-28: Coomassie Färbung der in *E. coli* TOP10 rekombinant hergestellten und aufgereinigten Proteine Azurin, TcpC-TIR, GFP und TcpF.**

Die Fusionsprodukte aus *Strep-tag*<sup>®</sup> und Azurin, TcpC-TIR, GFP und TcpF wurden anhand der *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Matrix isoliert. Hierzu wurden die Transformanten bis zu einer  $OD_{600}=1,5$  kultiviert. Die Expression von Azurin, TcpC-TIR und GFP wurde mit AHT (200ng/ml) bei 37°C für 2h und bei TcpF mit AHT (200ng/ml) bei 25°C für 0,5h induziert. Anschließend wurden die Bakterienpellets lysiert und auf die *Strep-Tactin*<sup>®</sup> Säulen gegeben. Die Abbildung zeigt die aufgereinigten Proteine in den absoluten Mengen 0,5µg und 0,25µg in einer Coomassie Färbung. M: *Strep-tag*<sup>®</sup> Protein Ladder.

#### 4. Diskussion

Normalerweise stellt Urin eine sterile Flüssigkeit dar. Der Harntrakt ist jedoch anfällig für bakterielle Kolonisierung, da Urin ein hohes Nährstoffangebot für bakterielles Wachstum bietet. Aufgrund der Nähe von Gastrointestinaltrakt und Harntrakt stellen Kommensale der eigenen Darmflora die häufigste Kontaminationsquelle dar [95]. *E. coli* und *E. faecalis* nehmen eine zentrale Stellung als Erreger von HWIs ein. UPEC sind die häufigsten Erreger für ambulant erworbene HWIs und verantwortlich für 70-90% der geschätzten 150 Millionen HWIs pro Jahr weltweit [96]. Zudem sind UPEC Auslöser für 40% aller nosokomial erworbenen HWIs [3], [97]. Enterokokken galten für den Menschen lange Zeit als ungefährlich. In den letzten 10 Jahren haben sich Enterokokken jedoch zum dritthäufigsten Auslöser von Bakteriämien und zum zweithäufigsten Auslöser von chirurgischen Wundinfektionen und nosokomialen HWIs entwickelt [7], [98]. Unter Enterokokken ist *E. faecalis* die am häufigsten auftretende Art, die mit Infektionen assoziiert ist [10]. In dieser Arbeit wurden *E. coli* und *E. faecalis* Isolate, die aus Urin von Patienten mit HWI gewonnen wurden auf multibakterielle Infektionen, Antibiotikaresistenzen und die Anwesenheit von TcpC bzw. TcpF untersucht. Den Erwartungen entsprechend waren *E. coli* bedingte HWIs (1,0/Tag) häufiger als *E. faecalis* bedingte HWIs (0,54/Tag). Bei multibakteriellen Infektionen ist *E. coli* häufigster Infektionspartner von *E. faecalis* und vice versa, was deren Bedeutung für HWIs untermauert. Für auf Intensivstationen erworbene HWI konnte gezeigt werden, dass es sich bei HWIs in über 90% der Fälle um monobakterielle Infektionen handelt [99]. Ähnliche Beobachtungen konnten wir für HWIs durch *E. coli* feststellen. In 85% lag ein monobakterieller HWI durch *E. coli* vor. Bei HWIs durch *E. faecalis* wurden dagegen nur zu 62% monobakterielle Infektionen beobachtet. Sämtliche aus Patientenurin isolierte Bakterien mit Ausnahme von *P. aeruginosa* sind Bestandteil der natürlichen Darmflora. Gemäß den Erwartungen stellt die Darmflora somit das Haupterregerreservoir für Kontaminationen des Harnweges dar.

Generell sind Frauen durch die anatomische Nähe von Harn- und Gastrointestinaltrakt anfälliger für HWIs als Männer. Die im Durchschnitt 15cm lange Harnröhre des Mannes bildet im Gegensatz zur durchschnittlich 5cm langen Harnröhre der Frau eine effektive Barriere gegenüber aufsteigenden Keimen [100]. In diesem Zusammenhang lässt sich der höhere Anteil an weiblichen Patienten bei HWI durch *E. coli* (65%) und *E. faecalis* (55%) erklären.



Bakterielle Krankheitserreger wie *E. coli* und *E. faecalis* wurden nach Einführung von antibiotischer Therapie zunehmend unempfindlicher gegenüber Antibiotika, sodass die durch sie ausgelösten Krankheiten zunehmend schwieriger zu therapieren sind. Im Abstand von zwei Jahren wird auf Initiative des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V. (PEG) und der Universitätsklinik Freiburg ein Bericht zur Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der deutschen Human- und Veterinärmedizin erstellt. Dabei bezieht sich die Arbeitsgruppe unter anderem auf Daten der PEG für den Zeitraum 1995 bis 2010. Bisher sind drei Berichte erschienen, zuletzt GERMAP 2012 [101]. Anhand dessen können Risiken bestehender und potenzieller Resistenzentwicklungen bewertet und Empfehlungen für die Behandlung mit Antibiotika entwickelt werden. In dem Zeitraum zwischen 1995 und 2010 stieg der Anteil von *E. coli* Stämmen mit Resistenz gegenüber Ampicillin an Isolaten aus dem stationären Bereich von 35,8% auf 58,4%. Ebenso nahm die Resistenzhäufigkeit gegenüber Cotrimoxazol zunächst stetig zu (von 22,7% im Jahr 1995 auf 34,4% im Jahr 2007), während jedoch nach 2007 ein geringfügiger Rückgang resistenter Stämme (33%) zu beobachten war. Die Resistenzhäufigkeit gegenüber der Kombination Piperacillin/Tazobactam stieg im Beobachtungszeitraum von 1,4% auf 7,5% und die Resistenzhäufigkeit gegenüber Gentamicin von 6,1% auf 11,2%. Bezüglich des Fluorchinolons Ciprofloxacin fand sich seit 1995 ein Anstieg um mehr als 25-Punkten von 5,5% auf 32,1% in 2010. Der Anteil der Stämme mit ESBL-Phänotyp zeigt eine kontinuierliche Zunahme von 1% 1995 auf 17,4% 2010. Zeitgleich war ein Anstieg der Resistenz gegenüber Cefuroxim und Cefotaxim von < 5% auf 22,5% bzw. < 1% auf 17,4% zu beobachten. Demgegenüber zeigten die Carbapeneme unverändert hohe Empfindlichkeitsraten von über 99% [101].

Die in dieser Arbeit beobachteten Prävalenzen für Resistenzen von *E. coli* sind weitestgehend vergleichbar. 53% der getesteten *E. coli* HWI Isolate zeigten eine Resistenz gegen Ampicillin (PEG 2010: 58,4%) und 34% zeigten eine Resistenz gegen Cotrimoxazol (PEG 2010: 33%). Für Piperacillin/Tazobactam fand sich eine Resistenz in 5% der Fälle (PEG 2010: 7,5%). Wesentlich geringere Resistenzraten fanden sich in dieser Arbeit für die Antibiotika Ciprofloxacin (20%; PEG 2010: 32,1%), Gentamicin (6%; PEG 2010: 11,2%) und die Cephalosporine Cefuroxim (7%; PEG 2010: 22,5%) und Cefotaxim (5%; PEG 2010: 17,4%). Dies spiegelt sich auch in der Menge der ESBL positiven *E. coli* Isolate wieder. Wohingegen laut PEG 2010 17,4% ESBL positive *E. coli* beschrieben wurden, zeigte sich in dieser Arbeit lediglich ein Anteil von 5%. Eine

gute Wirksamkeit besteht gegenüber Carbapenemen und Fosfomycin. Wie in dieser Arbeit so fanden sich auch laut PEG für den Zeitraum von 1995 bis 2010 keine relevanten Resistenzen gegen Meronem. Das eigentliche Gefahrenpotential, das von resistenten Stämmen ausgeht, spiegelt sich jedoch nicht in der Resistenz gegen ein einzelnes Antibiotikum, sondern in der Mehrfachresistenz eines Stammes wieder. Die Auswertung der Resistenzmuster von fünf ausgewählten Antibiotika (Ampicillin, Cefuroxim, Ciprofloxacin, Cotrimoxazol, Gentamicin) zeigt, dass der Anteil der Stämme mit einer Resistenz gegen alle fünf Antibiotika laut PEG von 0,4% 1995 auf 5,3% 2010 zugenommen hat. In dieser Arbeit fand sich kein Stamm der gegen alle der fünf Antibiotika resistent ist. Der Anteil der multiresistenten Stämme vom Typ 3MRGN (multiresistente gramnegative Erreger) gemäß der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) -Definition [102] erhöhte sich nach Angaben der PEG von 0,5% im Jahr 1995 auf 14,4% im Jahr 2010, wohingegen in dieser Arbeit lediglich 5% der Stämme definitionsgemäß als Typ 3MRGN eingestuft wurden. Ein Typ 4MRGN fand sich weder in der Erhebung der PEG noch in dieser Arbeit. Generell gilt jedoch zu berücksichtigen, dass es sich bei den Vergleichsdaten aus GERMAP 2012 um Durchschnittswerte für Gesamtdeutschland handelt und es deutliche regionale Unterschiede gibt, die stark vom regionalen Antibiotikaverbrauch und der Verordnung unterschiedlicher Antibiotikaklassen abhängen. So zeigte sich für 2011 eine Schwankungsbreite in der Verordnungsdichte von 10,6 in Sachsen bis 17,3 *defined daily dose* (DDD)/1.000 Versicherte am Tag in Nordrhein-Westfalen. Hessen rangiert im Vergleich der Bundesländer mit 14,5 DDD/1000 auf Position 5 [103].

Sämtliche in dieser Arbeit getesteten *E. faecalis* Isolate waren sensitiv für Ampicillin, Piperacillin und Imipenem. 38,2% der Isolate sind resistent gegen Cotrimoxazol. Die Fluorchinolone Moxifloxacin, Ciprofloxacin und Levofloxacin sind jeweils zu 36,4% resistent und zu 63,6% moderat sensitiv. Prinzipiell schreibt man Ciprofloxacin eine bessere Wirkung gegenüber gramnegativen und Moxifloxacin sowie Levofloxacin eine bessere Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien zu [87]. Das identische Ergebnis für die Fluorchinolone könnte darin begründet sein, dass die Ergebnisse der Routinediagnostik einer Therapieempfehlung für die betreuenden Ärzte entsprechen und seitens der Mikrobiologie durch die Beurteilung „moderat sensibel“ generell von einem Fluorchinolone-Gebrauch bei HWI mit *E. faecalis* abgeraten wird. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind größtenteils deckungsgleich mit den Daten der PEG dargestellt im GERMAP 2012 [101]. Für Ampicillin und Imipenem findet sich bei *E. faecalis* 2010 Resistenzra-

ten < 3% und für Moxifloxacin und Ciprofloxacin Resistenzraten um 35%. Lediglich die in dieser Arbeit festgestellte Cotrimoxazol Resistenz von 38,2% übertrifft den laut PEG 2010 erhobenen Wert von ca. 18% deutlich. Die übrigen getesteten Antibiotika zeigen aufgrund intrinsischer Resistenzen weitestgehend keinen oder nur einen moderaten antibiotischen Effekt. Die hohen Resistenzraten der *E. faecalis* Isolate liegen zum einen in den zahlreichen intrinsischen Resistenzen gegen  $\beta$ -Lactam Antibiotika, Cephalosporine und Aminoglykoside begründet. Eine intrinsische Resistenz gegen Ampicillin und Piperacillin liegt jedoch nur bei niedrigen Konzentrationen vor. Die minimale inhibitorische Konzentration (MIC) liegt bei 1-8 $\mu$ g/ml. Zum anderen sind Enterokokken in der Lage durch Mutation oder Gentransfer Resistenzen gegen sämtliche verfügbaren Antibiotika auszubilden [104]. Da der Gentransfer auch horizontal und somit Art übergreifend erfolgen kann [105], stellen die beobachteten Koinfektionen (ca. 1/3 bei HWIs durch *E. faecalis*) für die Resistenzentwicklung eine besondere Problematik dar.

Die tendenziell zunehmenden Antibiotikaresistenzen bei *E. coli* wie auch *E. faecalis* verdeutlichen die Notwendigkeit für einen differenzierten Umgang mit Antibiotika bei HWIs. Für den leitliniengerechten Gebrauch von Antibiotika bei Harnwegsinfektionen gelten die Berücksichtigung der Patientengruppe sowie die Unterteilung in komplizierte und unkomplizierte Harnwegsinfektionen. Ein HWI wird als unkompliziert eingestuft, wenn im Harntrakt keine relevanten funktionellen oder anatomischen Abflussbehinderungen, keine relevanten Nierenfunktionsstörungen und keine relevanten Begleiterkrankungen vorliegen, die eine Harnwegsinfektion bzw. gravierende Komplikationen begünstigen. Die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF)- Leitlinie für HWIs bei Erwachsenen [106] empfiehlt bei Vorliegen eines unkomplizierten HWI und einer ansonsten gesunden, nicht schwangeren Frau die empirische Gabe von Fosfomycin oder Nitrofurantoin als Mittel der ersten Wahl. Ein Erregernachweis einschließlich Antibiogramm ist unter diesen Umständen nicht notwendig. Die Grundlage für diese Leitlinienempfehlung lässt sich anhand der in dieser Arbeit festgestellten hohen Rate an *E. coli* bedingten HWIs und der niedrigen Resistenzrate gegenüber Fosfomycin (2%) nachvollziehen. Bei allen anderen symptomatischen Patienten mit klinischem Verdacht auf HWI sowie asymptomatischen Patienten mit Leukozyturie, Hämaturie oder positivem Nitrit-Test besteht eine Indikation zur Urinkultur einschließlich Erstellung eines Antibiogramms. Die dargestellte Resistenzentwicklung zeigt, dass insbesondere bei hospitalisierten Patienten eine Antibiogramm

basierte Therapie notwendig ist, um der Entwicklung und Verbreitung weiterer Resistenzen vorzubeugen.

Angesichts der anatomischen Nähe von Harntrakt und Gastrointestinaltrakt mit seiner Darmflora und der Gegebenheit, dass Urin ein reiches Nährangebot für bakterielles Wachstum bietet, erscheint es verwunderlich, dass HWIs nicht häufiger auftreten. Zum einen stellt der Urinfluss eine wirksame Barriere für ascendierende Keime dar. Zum anderen verfügt der Harntrakt über TLR getriggerte Abwehrmechanismen [107]. Im Harntrakt konnten auf Urothelzellen, ortsständigen Makrophagen und dendritischen Zellen bisher TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 und TLR9 nachgewiesen werden. TLR4 kommt bei der immunologischen Abwehr von HWIs eine besondere Rolle zu. Die TLR4 Asp(299)Gly Mutation geht mit einem erhöhten Risiko für HWIs bei Kindern einher [108]. Des Weiteren steigt für Frauen mit TLR 1, 4 und 5 Polymorphismen das Risiko einen HWI zu erleiden [109], [110]. Es verwundert daher nicht, dass uropathogene Keime Anpassungsmöglichkeiten entwickelt haben, die eine Überwindung dieser Abwehrmechanismen und somit die Kolonisierung des Harntraktes ermöglichen. Für uropathogene *E. coli* sind Fimbrien vom Typ 1 und deren Adhäsin FimH typisch. Anhand dessen wird eine Adhäsion an das Urothel und Widerstand gegen den Urinfluss ermöglicht [111], [112]. Eine Modulation der TLR getriggerten Abwehrmechanismen im Harntrakt durch ein *TIR domain containing protein* (TcpC) des uropathogenen Stammes *E. coli* CFT073 konnte erstmalig von Cirl et al. 2008 gezeigt werden. Sie berichteten, dass der klinische Schweregrad von HWIs mit dem Auftreten von TcpC bei *E. coli* positiv verknüpft ist. 40% der bei Pyelonephritis isolierten *E. coli* trugen das TcpC Gen. Im Gegensatz dazu wurde das TcpC Gen jedoch nur bei 21% der Zystitis Isolate und nur bei 8% der Kommensalen gefunden [1]. In dieser Arbeit wurden TcpC Gen positive *E. coli* HWI Isolate in 20% der Fälle nachgewiesen. Die Ergebnisse decken sich mit den Daten einer vergleichbaren Studie aus Slowenien [113]. Das TcpC Gen wurde dort bei 21% der 110 *E. coli* HWI Isolate und lediglich bei 8% der 90 getesteten Kommensale beobachtet. Die Ergebnisse verdeutlichen den Zusammenhang zwischen dem Auftreten von TcpC und HWI sowie dem klinischen Schweregrad des HWI.

In Bezug auf *E. faecalis* ließen sich für die Häufigkeit von TcpF wesentlich höhere Werte feststellen als für TcpC. Unter sämtlichen *E. faecalis* Urinisolaten konnte das TcpF Gen in 76,4% der Fälle nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu fanden sich unter *E. faecalis* Kommensalen nur 58% der Isolate TcpF positiv. Betrachtet man die Urinisolate in Abhängigkeit ihrer cfu, so ist das TcpF Gen bei *E. faecalis* HWI Isolaten

mit einer Keimzahl  $> 10^5/\text{ml}$  (79,4%) häufiger als bei Isolaten mit einer Keimzahl  $< 10^5/\text{ml}$  (71,4%). Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass TcpF ähnlich wie TcpC einen selektiven Vorteil für die Kolonisierung des Harntraktes durch *E. faecalis* darstellt. Um diese Hypothese zu überprüfen könnte man sich eines *in vivo* Maus Infektionsmodells bedienen, bei dem Mäuse anhand eines transurethralen Katheters mit dem *E. faecalis* Stamm Symbioflor1 oder der TcpF Deletionsmutante infiziert werden und im Verlauf die Bakterienbelastung im Urin bestimmt wird [114]. Gemäß der Hypothese sollte im Ansatz des Wildtyp Stammes eine höhere Bakterienlast als bei der TcpF Deletionsmutante zu beobachten sein.

Bei der Untersuchung der *E. coli* Isolate war auffällig, dass TcpC positive Isolate (60%) deutlich häufiger  $\beta$ -Hämolyse zeigten als TcpC negative Isolate (20%). In der zuvor bereits erwähnten slowenischen Studie [113], wurden neben dem TcpC Gen (*tcpC*) noch weitere Virulenzfaktoren wie das Hämolysin Gen (*hlyA*) mittels PCR untersucht. Unter den *tcpC* positiven Isolaten waren 78% *hlyA* positiv. Unter den *tcpC* negativen Isolaten waren dagegen nur 11% *hlyA* positiv [113]. Das TcpC Gen befindet sich innerhalb einer Pathogenitätsinsel (PAI VII), die sich direkt an den tRNA Locus *serU downstream* anschließt [1]. Innerhalb der PAI VII finden sich jedoch keine Hämolysin Gene. Die Funktion der enthaltenen Gene ist derzeit weitestgehend unbekannt. Im Genom von UPEC 536 und UPEC CFT073 liegen zahlreiche Hämolysin Gene vor, die sich allerdings in den PAI I-III befinden [3]. Das gemeinsame Auftreten unterschiedlicher PAIs beim Pathogen könnte demnach der Ursprung für diese Beobachtung sein.

Unter den in dieser Arbeit untersuchten 20 TcpC positiven *E. coli* Isolate brachte die genetische Analyse des TcpC Gens lediglich eine synonyme und eine nicht-synonyme Punktmutation mit nachfolgendem Aminosäureaustausch hervor. Beide Punktmutationen liegen außerhalb der TIR Domäne. Im Gegensatz dazu lieferte die genetische Analyse des TcpF Gens eine stärkere Variabilität. In der 825bp langen Gensequenz konnten insgesamt 20 Punktmutationen nachgewiesen werden, wovon vier zu einem Aminosäureaustausch führten. Zwei der Punktmutationen mit nachfolgendem Aminosäureaustausch lagen innerhalb der TIR Domäne, wobei die Punktmutation C226G nur einmal nachgewiesen werden konnte. Unter den 68 Sequenzierungen konnte zwischen 16 TcpF Genvarianten unterschieden werden. Die Sequenz des TcpF von *E. faecalis* Symbioflor 1 entspricht der Variante TcpF-A. Im Anschluss an die Veröffentlichung der Ergebnisse für TcpF von *E. faecalis* Symbioflor 1 im Juli 2014 [15] wurde im November 2014 eine Arbeit für das TcpF von *E. faecalis* V583, im Folgenden TcpF-V583 genannt, veröf-

fentlicht [88]. TcpF-V583 unterscheidet sich von TcpF-A durch folgende Mutationen: G75A, G122A, C337T, C388A, A505G, C552T, G595C, und entspricht somit der TcpF Variante TcpF-G. Zu den häufigsten Varianten unter den HWI Isolaten zählten TcpF-J (27,9%), -A (13,2%) und -H(10,3), die zusammen in über 50% der Fälle gefunden wurden. Untersucht man die Genvarianten bezüglich des Auftretens unter den Isolaten mit  $cfu < 10^5/ml$  und  $cfu > 10^5/ml$  zeigte sich nur für die Genvariante TcpF-F ein signifikantes Ergebnis ( $p = 0,018$ ) zu Gunsten der Isolate mit  $cfu < 10^5/ml$ . In TcpF-F findet sich lediglich eine nicht-synonyme Mutation (G121A) und stimmt demnach mit sechs weiteren der beobachteten Genvarianten (Tcp-B, -C, -H, -K, -L, -O) bezüglich der Aminosäuresequenz überein. In Anbetracht des niedrigen p-Wertes und der Tatsache, dass sich für die oben genannten identischen TcpF Varianten kein signifikantes Ergebnis zeigte, ist die beobachtete Signifikanz am ehesten der niedrigen Probenzahl und des verwendeten statistischen Test geschuldet. Im Gegensatz zu TcpC zeigte TcpF einen moderaten Genpolymorphismus, der sich jedoch nur geringfügig auf die Aminosäuresequenz des TcpF auswirkte. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TcpF und TcpC konservierte Aminosäuresequenzen besitzen. Der hohe Grad an Konservierung spricht für eine besondere Bedeutung von TcpF und TcpC für die *E. faecalis* und *E. coli* HWI Isolate.

Bei der genetischen Analyse von TcpF konnten wir in zwei Fällen die Insertion genetischen Materials feststellen. Im Fall von *E. faecalis*#53 kam es durch Transposition zur Veränderung der benachbarten Sequenz. Bei der Transposition handelt es sich um einen Mutationsmechanismus, bei dem ein Transposon (*jumping gene*) seine Position im Genom ändert. Ein Transposon wird von Wiederholungssequenzen (*repeats*) umgeben, die von einer Transposase, für die das Transposon selbst kodiert, erkannt werden. Die Transposase verfügt über Nukleotidyltransferasefähigkeit und verändert über einen *cut and paste* Mechanismus die Position des Transposons [115]. Die Mobilität des Transposons führt zu biologisch genetischer Vielfalt und beschleunigt damit Evolution [116]. Im Fall von *E. faecalis*#11 kam es zur Insertion des benachbarten GTPase Gens in das TcpF Gen. Die Insertion kam möglicherweise durch eine Inversion zustande, bei der das GTPase Gen Teil der Schleife war und über Doppelstrangbrüche in das TcpF Gen eingefügt wurde [117]. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen bezüglich der Arbeit des TcpF von *E. faecalis* V583, bei der für vier unterschiedliche *E. faecalis* Stämme (*E. faecalis* 99, D6, OG1RF und T3) rekombinante Events im TcpF Genlocus beobachtet wurden [88]. Für das *S. enterica* Tcp-Homolog TlpA konnte gezeigt werden, dass es in einem Areal mit hoher Rekombinationsrate lokalisiert ist und benachbarte

Gene von Bakteriophagen stammen [65]. Im Gegensatz zu TcpC sprechen sowohl die zwei massiven genetischen Veränderung als auch die hohe Anzahl an Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) für fortschreitende Selektion und eine noch nicht lange zurückliegende Akquisition des TcpF Gens in das Genom von *E. faecalis*.

Die Tertiärstruktur-Analyse von TcpC, TcpF und TcpM brachte Übereinstimmungen hervor. Die TIR Domänen bildeten eine kugelförmige Struktur. Im Zentrum fanden sich parallel verknüpfte  $\beta$ -Faltblätter, die von  $\alpha$ -Helices ummantelt wurden. Die TIR Domäne des *Linum usitatissimum* Proteins L6 [93], die TIR Domäne von TLR1 [43], sowie die TIR Domäne von *Paracoccus denitrificans* [64] waren analog aufgebaut. Während die Berechnung der Tertiärstrukturen der TIR Domänen von TcpC und TcpF anhand von PdTIR und hTLR1 erfolgte, diente für die Berechnung der TIR Domänen von TcpM aufgrund hoher struktureller Übereinstimmung das pflanzliche L6-TIR als Vorlage. Dies ist insofern erklärlich, da *L. mesenteroides* in der Natur auf Früchten und Gemüse weit verbreitet ist. Möglicherweise kam es im Laufe der Entwicklung zu einer Anpassung der bakteriellen TIR Domänen an die TIR Domänen, die sie in ihrer natürlichen Umgebung vorfanden. TcpM könnte für *L. mesenteroides* basierend auf der Imitation von pflanzlichen TIR Domänen bei der Auseinandersetzung mit den pflanzlichen Resistenz Proteinen wie L6 [93] einen Selektionsvorteil bilden.

Bei Untersuchungen der TIR Domänen von humanen TLR konnten drei hochkonservierte Bereiche (Box1-3) nachgewiesen werden [43]. Die Boxen 1 und 2 wurden durch *Alignment* in TcpF, TcpC und TcpM positioniert. Box1 stellt in allen drei Fällen den Bereich mit dem höchsten Konservierungsgrad dar und bildet das erste  $\beta$ -Faltblatt ( $\beta$ A) der TIR Domänen. TcpC und TcpF zeigten im Bereich von Box2 eine prominente Schleife, die aus der kugelförmigen Grundstruktur herausragt und damit Interaktion ermöglicht. Es wurde beschrieben, dass diese Schleife (*BB-Loop*) an der Homodimerisierung von TLR10 [92] und an der Interaktion zwischen den TIR Domänen von MyD88 und TLR2 [43] sowie TLR1 und TLR2 [45] beteiligt ist. Die Aminosäure Prolin spielte dabei eine entscheidende Rolle. C3H/HeJ Mäuse mit der Mutation P721H im *BB-Loop* von TLR4 reagierten vermindert auf LPS. [118]. Die Mutation P681H im *BB-Loop* von TLR2 führte zum Verlust der Signaltransduktion durch Hefe und grampositive Bakterien. Die Mutation P681H führte zu keinen auffälligen strukturellen Veränderungen. Die Interaktion der TIR Domänen von MyD88 und TLR2 wurde jedoch unterbrochen [43]. TcpF zeigte dieses hochkonservierte und für die Signaltransduktion relevante Prolin (Pro48, Abbildung 3-16c) ebenfalls.

Der *BB-Loop* von TLR1-TIR sowie der *DD-Loop* von TLR2-TIR bilden die strukturelle Schnittstelle für die Bildung des TLR1/TLR2 Heterodimers. Mittels Mutationsanalyse konnte gezeigt werden, dass auf der Seite des *BB-Loops* Glycin 676 für eine erfolgreiche Signaltransduktion notwendig ist [45]. Die Superposition von TcpF-TIR und TLR1-TIR erbrachte, dass insbesondere im Bereich des *BB-Loops* eine hohe Übereinstimmung zwischen den beiden Strukturen zu beobachten ist und der für die Signaltransduktion entscheidende Glycin Rest (Gly49) vorhanden ist (Abbildung 3-16c). Die Ergebnisse zeigen, dass TcpF-TIR die strukturellen Eigenschaften von TLR1-TIR imitiert und dadurch eine Interaktion mit TLR2-TIR, MyD88-TIR, Mal-TIR [119] ermöglichen könnte.

Bei der genetischen Analyse des TcpF Gens unter HWI Isolaten zeigte sich in 85% der Fälle der Aminosäureaustausch A41T und in 1,5% der Fälle der Aminosäureaustausch Q76K. Die Mutation Q76K blieb ohne strukturelle Konsequenz für TcpF-TIR. Die Mutation A41T führte zu strukturellen Veränderungen am Beginn des *BB-Loops*. Die Grundstruktur der TIR Domäne blieb jedoch erhalten. Aufgrund seiner gut exponierten Hydroxylgruppe bietet Threonin die Möglichkeit zur Phosphorylierung und somit die Möglichkeit regulatorisch auf das Protein einzuwirken. Die Häufigkeit (85%) und der funktionelle Vorteil sprechen dafür, dass es sich bei der Substitution A41T im TcpF eher um den Regelfall als um eine Mutationsvariante handelt. Bestimmung der Zytokinantwort bei Infektionsversuchen mit dem Wildtypstamm *E. faecalis* Symbioflor 1 und der Mutationsvariante *E. faecalis* A41T könnten Aufschlüsse darüber geben, ob der durch die Mutation A41T strukturell veränderte Bereich des *BB-Loops* zu einer Beeinträchtigung des negativen immunmodulatorischen Effekts führt und den möglichen Interaktionsbereich zwischen TcpF-TIR und der endogenen Ziel-TIR Domäne eingrenzen. Allerdings handelt es sich hierbei nicht um eine isogene Mutationsvariante, sodass das Ergebnis dieses Experiments nur bedingt aussagekräftig wäre. Daher wäre es sinnvoll die genomische Sequenz des Stammes *E. faecalis* A41T als Matrize für die Konstruktion eines Plasmids für den Dual Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay zu verwenden und die Effekte von TcpF und TcpF A41T auf die NFκB Aktivierung zu untersuchen.

Im Fall von TcpC-TIR konnte eine hohe strukturelle Übereinstimmung mit PdTIR beobachtet werden (Abbildung 3-18). Für PdTIR wurde gezeigt, dass es direkt mit den TIR Domänen von MyD88 und TLR4 interagiert [66]. Deckungsgleich mit der in dieser Arbeit beobachteten strukturellen Übereinstimmung zwischen PdTIR und TcpC, konnte auch für TcpC-TIR eine direkte Interaktion mit MyD88 und TLR4 [68] gezeigt werden.



Der DD-Loop sowie der BB-Loop stellen auf Seite von TcpC-TIR die in die Interaktion involvierten Bereiche dar [68].

Es lässt sich zusammenfassen, dass die TIR Domänen von Pflanzen, Säugetieren und Bakterien eine gemeinsame Grundstruktur besitzen: Die TIR Domäne ist durch einen kugelförmige Struktur gekennzeichnet, in deren Zentrum sich parallel angeordnete  $\beta$ -Faltblätter befinden, die von  $\alpha$ -Helices ummantelt werden. Bakterielle TIR Domänen zeigen Charakteristika der TIR Domänen, die sie in ihrem natürlichen Habitat antreffen. TcpF und TcpC zeigen als Proteine von Kommensalen strukturelle Ähnlichkeit mit humanen TIR Domänen, wohingegen TcpM als Protein eines Keimes, der auf Pflanzen zu finden ist, strukturelle Ähnlichkeit mit L6-TIR der Pflanze *Linum usitatissimum* zeigt.

Funktionell konnte für TcpC, TcpF und TcpM festgestellt werden, dass sie das TLR2 abhängige NF $\kappa$ B Signal dosisabhängig supprimieren. Für TcpC1 und TcpC2 konnten vergleichbare Ergebnisse beobachtet werden. Die Wahl des Startcodons spielt somit für die Suppressionsfähigkeit von TcpC in Bezug auf das NF $\kappa$ B Signal keine Rolle. Das Suppressionspotential von TcpC kann durch seine direkte Interaktion mit MyD88 erklärt werden [1], [68]. Aus den Ergebnissen für TcpM ging hervor, dass sowohl die HTH Domäne (TcpM2) als auch die TIR Domäne (TcpM3) Suppressionsfähigkeit besitzen. Bei der HTH Domäne handelt es sich um eine DNA Bindungsdomäne. Sie besteht aus zwei  $\alpha$ -Helices und einem  $\beta$ -Faltblatt. Die C-terminale  $\alpha$ -Helix bindet an die Erkennungssequenz der DNA, während sie von der N-terminalen  $\alpha$ -Helix an der DNA stabilisiert wird [89]. Demnach lässt sich der Suppressionseffekt der HTH Domäne möglicherweise auf eine Blockierung der NF $\kappa$ B abhängigen Gentranskription durch die HTH Domäne zurückführen. Folgt man der Theorie, dass bakterielle Tcp ihren modulierenden Effekt auf den TLR Signaltransduktionsweg über molekulare Mimikry erreichen [64], kommen für den TLR2 abhängigen Signalweg folgende Tcp als Interaktionspartner in Frage: TLR1, TLR2, TLR6, MyD88 und Mal [29]. Für TcpM-TIR konnten bisher keine strukturellen Hinweise auf einen möglichen Interaktionspartner gefunden werden. Im Fall von TcpF-TIR ist aufgrund der oben geschilderten strukturellen Übereinstimmung mit TLR1-TIR eine Interaktion mit TLR2-TIR, Mal-TIR oder MyD88-TIR denkbar [119]. An dieser Stelle muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den berechneten Tertiärstrukturen nicht um die definitive Struktur der Proteine handelt, sondern nur um eine auf Homologie basierte Strukturvorhersage. Interaktionen unter den Tcps müssen daher beispielsweise durch *pull-down* Verfahren bestätigt werden. Hierzu wurden die Proteine TcpF und TcpC-TIR für anschließende Experimente

rekombinant hergestellt und aufgereinigt. Zou et al. konnten zeigen, dass TcpF-V583 mit MyD88 direkt interagiert [88]. Die Interaktion mit MyD88 erfolgt im Bereich des BB-*Loops*, was durch Deletion der Aminosäurereste 35 bis 39 (DIFYS) innerhalb des BB-*Loops* erfolgreich gezeigt werden konnte. Eine mögliche Interaktion zwischen TcpF-V583 und TLR1-TIR, TLR2-TIR oder Mal-TIR wurde nicht untersucht [88]. Da sich TcpF und TcpF-V583 lediglich in der Mutation A41T unterscheiden ist auch für TcpF eine Interaktion mit MyD88-TIR prinzipiell denkbar, muss aber noch im *pull-down* Verfahren verifiziert werden. Zur Bestätigung der Hypothese ist ein Stimulationsversuch denkbar, bei dem RAW264.7 Makrophagen in Anwesenheit des aufgereinigten TcpF und unterschiedlichen TLR Liganden wie Pam<sub>3</sub>Cys-SKKKK für TLR2, Poly(I:C) (*Polyinosine-polycytidylic acid*) für TLR3, LPS (Lipopolysaccharid) für TLR4 und Flagellin für TLR5 inkubiert werden und die Zytokinantwort in Form von TNF- $\alpha$  untersucht wird. Den Ergebnissen folgend, dass TcpF mit MyD88 interagiert wäre nur in den MyD88 abhängigen Signalkaskaden, in diesem Fall für TLR2, TLR4 und TLR5, eine Suppression der TNF- $\alpha$  Konzentration zu erwarten. Als negative Kontrolle könnte das aufgereinigte GFP fungieren.

Die Kolokalisation von TcpF-TIR und TLR2-TIR an der Plasmamembran könnte durch eine mögliche PIP2 Bindungsdomäne unterstützt werden. PIP2 ist ein Bestandteil der Plasmamembran und wird durch die PIP2 Bindungsdomäne des Brückenadapters Mal gebunden. Es wurde berichtet, dass TcpB die Eigenschaften von Mal nachahmt. Wie Mal besitzt TcpB eine PIP2 Bindungsdomäne mit dem Aminosäuremotiv: KKRxxxxKK [71]. In der Sequenz von TcpF existiert ein ähnliches Motiv (KVRFKLKK), das zur Rekrutierung von TcpF-TIR zur Plasmamembran beitragen könnte. Für TcpF-V583 konnte *in vitro* gezeigt werden, dass es Phosphatidylinositol-3-Phosphat, Phosphatidylinositol-4-Phosphat, Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphat, Phosphatidylinositol-3,5-Bisphosphat, Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat und Phosphatidylinositol 3,4,5-Trisphosphat bindet [88]. Um die Notwendigkeit dieser PIP2-Bindungsdomäne für den immunmodulatorischen Effekt von TcpF zu untersuchen, wäre ein Konstrukt für den Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay denkbar, das lediglich TcpF-TIR und nicht die PIP2-Bindungsdomäne enthält. Der Hypothese folgend, dass die PIP2-Bindungsdomäne eine Lokalisation von TcpF an der Plasmamembran fördert, sollte unter Detektion mit einem fluoreszierenden Anti-*Flag* Antikörper ein unterschiedliches Verteilungsmuster von TcpF und TcpF-TIR in der Zelle und eine geringer ausgeprägte Reduktion der NF $\kappa$ B-Antwort zu beobachten sein.

Die Zytokin Messungen ergaben, dass TcpF und TcpM in der Lage sind die Produktion von IL-6 und TNF- $\alpha$  infizierten Makrophagen zu supprimieren, wobei TcpF das stärkere inhibitorische Potential besitzt (Abbildung 3-24). Jede TcpM-Variante hat für sich das Potential die IL-6 und TNF- $\alpha$  Konzentration zu senken. Das Potential nimmt jedoch vom gesamten Protein (TcpM1) über die HTH Domäne (TcpM2) bis zur TIR Domäne (TcpM3) ab. Es zeigt sich, dass beide Domänen unabhängige Suppressionspotentiale besitzen. Beide Domänen in ein Protein vereint, zeigen eine synergistische Suppression. Mit Hilfe der Deletionsmutante *E. faecalis* Symbioflor 1  $\Delta$ tcpF konnte nachgewiesen werden, dass bei Deletion des TcpF Gens die TNF- $\alpha$  Sekretion bei Infektion von RAW264.7 Makrophagen signifikant höher ist als beim Wildtyp *E. faecalis* Symbioflor 1 (Abbildung 3-25). Durch eine Wiederholung des Experiments unter dem Einsatz von *transwells*® (Corning), bei dem Bakterien und Makrophagen durch eine Mikromembran physisch voneinander getrennt inkubiert werden, kann die Frage beantwortet werden, ob ein direkter Kontakt zwischen Makrophage und Bakterium für den Suppressionseffekt nötig ist. Fügt man die Ergebnisse der Zytokin Messung und der NF $\kappa$ B-Signalbestimmung zusammen, lässt sich festhalten, dass TcpC, TcpF und TcpM in der Lage sind, durch eine verminderte Freisetzung von NF $\kappa$ B die Zytokin Produktion zu reduzieren. Die Rekrutierung von Immunzellen kann auf diese Weise reduziert werden, was sich positiv auf die Ausbreitung und das Überleben der Bakterien auswirkt.

Die bakteriellen Tcps müssen, um ihren immunmodulatorischen Effekt auszuüben, in Kontakt mit den intrazellulären endogenen TIR Domänen treten können. Dazu ist es notwendig, dass die bakteriellen Tcp in die Zelle und in das Zytoplasma gelangen. Für TcpC konnte gezeigt werden, dass es über ein Typ1-Sekretionssystem sezerniert und anhand von Cholesterin reichen Membrananteilen, sogenannten *lipid rafts*, in die Wirtszelle aufgenommen wird [1]. Bezüglich TcpF konnte keine typische Signalsequenz für den Sekretions-Signalweg detektiert werden. Ein Antikörper gegen TcpF befindet sich gegenwärtig in der Herstellung. Anhand dessen könnte TcpF, wenn es sezerniert wird, im Überstand der Bakterienkultur von *E. faecalis* Symbioflor 1 nachgewiesen beziehungsweise im Überstand von *E. faecalis* Symbioflor 1 $\Delta$ tcpF nicht nachgewiesen werden. *In vitro* Inkubationsexperimente mit dem aufgereinigten TcpF-V583 und RAW 264.7 Makrophagen konnten zeigen, dass TcpF-V583 in der Lage ist in die Zelle einzudringen [88]. Der Mechanismus bleibt im Gegensatz zu TcpC [1] weiterhin unklar.

Trotz des pathogenen Potentials handelt es sich bei Enterokokken weitestgehend um avirulente Bakterien, die als Kommensale Bestandteil der Darmflora sind und Verwen-

derung als Probiotika finden [120], [121]. Da sich das Darmepithel in konstantem Kontakt zur körpereigenen Darmflora befindet, stellt die Reduktion der NF $\kappa$ B Aktivierung durch TLR Signal Inhibition einen wesentlichen Faktor zur Erhaltung der Homöostase im Gastrointestinaltrakt dar. Endogene TLR Signal Inhibitoren wie PPAR $\gamma$ , A20, NOD2, IRAK-M, SIGIRR und Tollip liefern daher einen entscheidenden Beitrag zur Erhaltung der Homöostase im Gastrointestinaltrakt [122]. Überschießende Aktivierung des TLR Signaltransduktionsweges führt zu schädlichen Entzündungsreaktionen, die zur Entstehung entzündlicher Darmerkrankungen [123] und Kolonkarzinomen [124] beitragen. Interessanterweise besitzt der bei Colitis ulcerosa zur Remissionseinleitung eingesetzte *E. coli* Stamm Nissle das TcpC Gen und es konnte gezeigt werden, dass TcpC sich positiv auf die Barrierefunktion des Epithels auswirkt. Unter dem Einfluss von TcpC kommt es zur Phosphorylierung der Protein Kinase C-zeta (PKC $\zeta$ ) und der *extracellular-signal-regulated* Kinase 1/2 (ERK1/2), was wiederum eine Hochregulierung des *Zonula occludens* Proteins Claudin-14 bedingt. Dadurch kommt es zum Verschluss der parazellulären Räume und die Permeabilität des Epithels wird herabgesetzt [125]. Es bestehen Hinweise, dass PKC Isoformen und insbesondere PKC $\zeta$  für den Signaltransduktionsweg von TLR2 und TLR4 von Bedeutung sind [109], [126], [127]. PKC $\zeta$  stellt somit eine gemeinsame Schnittstelle des TLR und des ERK1/2 Signalweges dar und kann vermutlich die unterschiedlichen Effekte von TcpC erklären. Der genaue Mechanismus bleibt jedoch gegenwärtig unklar. Aufgrund der Fähigkeit von TcpC und TcpF, die NF $\kappa$ B Aktivierung zu unterdrücken, scheinen sie bei Infektionen des Harnwegs die bakterielle Kolonisierung und Überleben zu fördern. Als Kommensale im Gastrointestinaltrakt leisten sie möglicherweise einen exogenen Beitrag zur Erhaltung gastrointestinaler Homöostase durch Unterdrückung schädlicher Entzündungsreaktionen sowie Stabilisierung der Barrierefunktion.

Da Tcps die Bildung von NF $\kappa$ B und Zytokinen unterdrücken, entfalten sie eine antiinflammatorische Wirkung, die sie pharmakologisch/medizinisch äußerst interessant macht. Das klonierte und aufgereinigte Protein könnte sowohl bei nicht-infektiös inflammatorischen Erkrankungen als auch bei infektiös inflammatorischen Erkrankungen Verwendung finden. Bei der Rheumatoiden Arthritis beispielsweise handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung unklarer Ätiologie, die auf dem Boden einer chronisch-destruierenden Synovialitis zu einer fortschreitenden Gelenkzerstörung führen kann. Bei genetisch disponierten Personen wird durch einen unbekanntem Triggermechanismus eine Autoimmunreaktion mit entzündlicher Infiltration der Gelenk-

schleimhaut (Synovialis) induziert. Im Zentrum der immunologischen Reaktion steht die Interaktion von Lymphozyten und Monozyten mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und TNF- $\alpha$  [128]. Daher finden rekombinant hergestellte anti-TNF $\alpha$  Antikörper wie Etanercept (Enbrel<sup>®</sup>) als *biological disease-modifying antirheumatic drug* (bDMARD) erfolgreiche Verwendung in der Therapie der Rheumatoiden Arthritis [129]. Bakterielle Tcps stellen durch ihre antiinflammatorische Wirkungsweise eine Therapieoption dar, um die Entzündungsreaktion in den Gelenken zu unterdrücken. Bei einer systemischen Applikation wäre jedoch mit einer unspezifischen Immunsuppression und einer Infektanfälligkeit insbesondere der Harnwege sowie möglichen Infektreaktivierungen zu rechnen. Aufgrund dessen ist vor Therapiebeginn mit bDMARD eine Tuberkulose Diagnostik indiziert. Eine ähnliche Vorgehensweise wäre für die therapeutische Anwendung rekombinanter Tcps vorstellbar. Eine prophylaktische Gabe von Nitrofurantoin unter Tcp Therapie könnte gerade bei Risikopatienten mit rekurrierenden HWIs eine protektive Alternative darstellen [130]. Denkbar wäre auch eine lokale Anwendung als intraartikuläre Applikation in die betroffenen Gelenke, was jedoch bei einer langfristigen Therapie mit einem erhöhten punktionsbedingtem Infektionsrisiko einherginge.

Bei der Sepsis handelt es sich um ein *Systemic Inflammatory Response Syndrom* (SIRS) ausgelöst durch eine Infektion. Es kommt zu einer komplexen systemischen Entzündungsreaktion, die häufig mit Störungen der Vitalfunktion bis hin zum Multiorganversagen einhergeht [131]. Die Therapie schwerer septischer Verläufe ist derzeit weitestgehend auf antibiotische, chirurgische sowie symptomatische Verfahren beschränkt [132]. Aufgrund von hoher Morbidität und Mortalität ist die Weiterentwicklung der Therapieoptionen jedoch dringend notwendig [133]. Heute ist bekannt, dass die TLR Signalkaskade eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Sepsis einnimmt [134]. Für MyD88 defiziente Mäuse konnte gezeigt werden, dass sie bei polymikrobieller Sepsis weniger anfällig sind, eine Sepsis zu entwickeln als der Wildtyp [135]. Zudem wurde berichtet, dass sich Polymorphismen im humanen Mal Allel protektiv auf die Entstehung eines septischen Schocks auswirken [136]. Vor dem Hintergrund, dass es sich bei SIRS um einen hyperinflammatorischen Prozess handelt und die Adaptermoleküle MyD88 und Mal proregulatorisch darauf einwirken, wäre eine Modulation der MyD88 Funktion durch Tcp ein denkbarer therapeutischer Interventionspunkt. Durch direkte Interaktion von TcpC und TcpF mit MyD88 könnte der proinflammatorische Circulus

Vitiosus unterbrochen werden und eine Bekämpfung der Hyperinflammation am Ursprung der Pathogenese, der TLR Signalkaskade, ermöglicht werden.

Zusammenfassend ermöglichen Tcps Bakterien über *molekulare Mimikry* eine auf TIR Domänen Interaktion aufgebaute Infektabwehr zu modulieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass TcpF und TcpM zu der wachsenden Familie von bakteriellen Tcps gehören. In Zukunft könnten Tcps durch ihre antiinflammatorische Wirkung bei infektiösen wie auch nicht-infektiösen inflammatorischen Erkrankungen therapeutisch von Nutzen sein.

## 5. Zusammenfassung (deutsch)

Thema dieser Arbeit sind Aufbau, genetische Variabilität und Funktion der bakteriellen *Toll/intertleukin-1 receptor (TIR) domain containing-proteins (Tcps)* von *E. coli* (TcpC), *E. faecalis* Symbioflor 1 (TcpF) und *L. mesenteroides* (TcpM).

Anhand von *in silico* Analysen mit TIR Domänen BLAST von NCBI konnten in den Genomen von *E. faecalis* Symbioflor 1 und *L. mesenteroides* zwei zuvor nicht charakterisierte Gene identifiziert werden. In Anlehnung an die bereits bekannten bakteriellen Tcps wurden sie als TcpF und TcpM bezeichnet. TcpF und TcpC zeigen als Produkte von Kommensalen strukturelle Ähnlichkeit mit humanem TIR Domänen, während TcpM-TIR als Produkt eines Keimes, der in der natürlichen Umgebung auf Pflanzen zu finden ist, strukturelle Ähnlichkeit mit L6-TIR Protein der Pflanze *Linum usitatissimum* zeigt. Insgesamt wurden 110 HWI *E. faecalis* Isolate und 31 Kommensale auf TcpF untersucht und der TcpF Locus von 68 HWI Isolaten sequenziert. TcpF ist häufiger bei HWI Isolaten (79%) als bei Kommensalen (58%) und ist mit hohen Keimzahlen assoziiert. Ein hoher Grad an SNPs sowie zwei beobachtete Mutationsereignisse durch Transposition und Inversion sprechen für fortschreitende Selektion sowie eine neuerliche Akquisition des TcpF Gens von *E. faecalis*. Demgegenüber zeigt die Sequenz von 20 *E. coli* HWI Isolaten lediglich in zwei Positionen einen SNP. Die Stimulation von RAW264.7 Makrophagen mit *E. coli* BL21 unter Expression von TcpC, TcpF oder TcpM zeigt eine Reduktion der IL-6 und TNF- $\alpha$  Antwort. Umgekehrt führt die Deletion des TcpF Gens in *E. faecalis* Symbioflor 1 zu einer Elevation der TNF $\alpha$  Antwort. Der Einfluss der bakteriellen Tcps auf den TLR Signalweg wurde in transient mit NF $\kappa$ B, hTLR2 und Tcp transfizierten HEK293 Zellen untersucht. TcpC, TcpF und TcpM supprimieren konzentrationsabhängig die NF $\kappa$ B Produktion. TcpF-TIR zeigt im BB-Loop einen hohen Grad an struktureller Übereinstimmung mit TLR1-TIR, sodass eine Interaktion von TcpF-TIR mit endogenen TLR1-TIR bindenden TIR Domänen wahrscheinlich ist.

Bei TcpF und TcpM handelt es sich um neue grampositive Mitglieder der Familie bakterieller Tcps. Tcps ermöglichen Bakterien über *molekulare Mimikry* eine auf TIR Domänen Interaktion aufgebaute Infektabwehr zu modulieren. Aufgrund ihres antiinflammatorischen Potentials könnten bakterielle Tcps in Zukunft für die Therapie infektiöser wie auch nicht-infektiöser inflammatorischer Erkrankungen therapeutisch von Nutzen sein.

## 6. Zusammenfassung (englisch)

Subject of this work is the structure, genetic stability and function of the bacterial Tcps of *E. coli* (TcpC), *E. faecalis* Symbioflor 1 (TcpF) und *L. mesenteroides* (TcpM).

Based on Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain structure homology we detected two previously uncharacterized genes encoding for TIR domain containing proteins in the genome of *Enterococcus faecalis* and *Leuconostoc mesenteroides*. These genes were named TcpF and TcpM, in accordance with the previously described TcpC. TcpF and TcpC as proteins of commensals show structural similarity to human TIR domains, whereas TcpM as a protein of bacteria, whose natural habitat are plants, shows structural similarity to the plant TIR domain of L6 encoded by *Linum usitatissimum*.

110 UTI *E. faecalis* and 31 *E. faecalis* stool isolates were analyzed for the presence of TcpF. We found that TcpF is more frequent in UTI isolates (79%) than in stool isolates (58%) and that TcpF is associated with higher bacterial counts during infection. In order to analyze the genetic stability of TcpF and TcpC, we sequenced the Tcp gene locus of 68 UTI *E. faecalis* isolates and 20 UTI *E. coli* isolates. Both locus rearrangements by inversion and transposition and more frequent single nucleotide polymorphisms in the TcpF gene compared to TcpC support the hypothesis that selection is ongoing and that the sequence was acquired recently in the genome of *E. faecalis*. Stimulation of RAW264.7 macrophages with *E. coli* BL21 expressing TcpC, TcpF and TcpM led to suppression of IL-6 and TNF- $\alpha$  production, whereas the TcpF deletion mutant *E. faecalis* Symbioflor 1 produced an elevated TNF- $\alpha$  response upon infection compared to the isogenic wild-type strain. The impact of TcpC, TcpF and TcpM on TLR2 signaling was analyzed in transiently transfected HEK293 cells by monitoring the effect on the TLR2-dependent NF $\kappa$ B activation. All three bacterial Tcps suppress TLR2-dependent NF $\kappa$ B activation. The superposition of TcpF-TIR and TLR1-TIR reveals considerable similarity between those two structures. In particular, strong similarity was observed at the BB-loop, which has been reported to be part of the TLR1-TIR and TLR2-TIR interaction.

Taking together TcpF and TcpM are new Gram-positive members of bacterial Tcps. Via its TIR domain bacterial Tcp are able to modulate host immune responses by molecular mimicry. Due to Tcps' ability to negatively modulate NF $\kappa$ B activation new therapeutic strategies concerning infectious and non-infectious inflammatory diseases may be developed.



## 7. Abkürzungsverzeichnis

AHT	Anhydrotetrazyklin
AMP	Ampicillin
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintri-phosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
bDMARD	<i>biological disease-modifying antirheumatic drug</i>
BHI-Medium	<i>Brain Heart Infusion-Medium</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CDART	<i>Conserved Domain Architecture Retrieval Tool</i>
CDD	<i>Conserved Domain Database</i>
CFU	<i>Colony forming units</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMV	Zytomegalievirus
DAMPs	<i>Damage associated molecular patterns</i>
DD	<i>Death Domain</i>
DDD	<i>Defined daily dose</i>
DMEM	<i>Dulbecco Eagle's minimal essential medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EB	Ethidiumbromid
EHEC	Enterohämorrhagischer <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasiver <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogener <i>E. coli</i>
ERK1/2	<i>extracellular-signal-regulated Kinase 1/2</i>
ESBL	Erweitertes Spektrum an $\beta$ -Laktamasen
ETEC	Enterotoxinbildender <i>E.coli</i>
EtOH	Ethanol
FKS	<i>Fetal bovine serum</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
gPCR	Genomische PCR
GTPase	Deoxyguanosintri-phosphat Triphosphohydrolase
HABA	<i>2-(4'-hydroxy-benzeneazo)benzoic acid</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HeLa	Henrietta Lacks
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>

## -ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS-

---

HSV	Herpes-Simplex-Virus
HTH	<i>Helix-Turn-Helix</i>
HWI	Harnwegsinfekt
ID	<i>Intermediate Domain</i>
IFAR	IFN $\alpha$ Rezeptor
IFN $\alpha$	Interferon $\alpha$
IfSG	Infektionsschutzgesetz
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of NF<math>\kappa</math>B</i>
IKK	<i>inhibitor of NF<math>\kappa</math>B kinases</i>
IL12	Interleukin 12
IL-1R	Interleukin-1 Rezeptoren
IL6	Interleukin 6
IL-6R	Membran-gebundener IL-6 Rezeptor
IRAK	<i>Interleukin-1 receptor associated kinase</i>
IRF	<i>interferone-related factors</i>
ISREs	<i>IFN-stimulated response elements</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
Kan	Kanamycin
L6-TIR	TIR Domäne von L6
LARII	<i>Luciferase Assay Reagent II</i>
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth-Medium</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine rich repeats</i>
Mal	<i>MyD88 Adapter-like</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIC	minimale inhibitorische Konzentration
Moi	<i>multiplicity of infection</i>
MRGN	multiresistente gramnegative Erreger
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
MyD88s	Splicevariante von <i>Myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCCLS	<i>National Committee for Clinical and Laboratory Standards</i>
NEB	<i>New England Biolabs</i>
NEMO	<i>NF<math>\kappa</math>B essential modulator</i>
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance</i>
NOD2	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2</i>
OD	Optische Dichte

-ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS-

---

PAA	Polyacrylamid
PAI	<i>Pathogenicity associated islands</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PdTIR	TIR Domäne des Tcp von <i>P. denitrificans</i>
PdTLP	Tcp von <i>Paracoccus denitrificans</i>
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V.
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKC $\zeta$	Proteinkinase C-zeta
Poly (I:C)	<i>Polyinosine-polycytidylic acid</i>
PPAR $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren $\gamma$
pPCR	Plasmid PCR
PRR	<i>Pathogen recognition receptors</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RLU	<i>Relative Luminescence Unit</i>
RSCB	<i>Research Collaboratory of structural Bioinformatics</i>
RSV	Respiratorische Synzytial-Virus
SAMs	<i>sterile <math>\alpha</math> motifs</i>
SARM	<i>sterile <math>\alpha</math>- and armadillo-motif-containing protein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIGIRR	<i>Single Ig IL-1-related receptor</i>
sIL-6R	löslichen Rezeptor IL-6R
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrom</i>
SNP	<i>single-nucleotide polymorphism</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TAK	<i>transforming growth factor (TGF)-<math>\beta</math>-activated kinase</i>
TBK	<i>TRAF-family-member-associated NF<math>\kappa</math>B activator (TANK)-binding kinase</i>
Tcp	<i>TIR domain containing protein</i>
TcpB	<i>TIR domain containing protein of Brucella melitensis</i>
TcpC	<i>TIR domain containing protein of E. coli</i>
TcpC-TIR	<i>TIR domain of TcpC</i>
TcpF	<i>TIR domain containing protein of E. faecalis Symbioflor 1</i>
TcpF-TIR	<i>TIR domain of TcpF</i>
TcpF-V583	<i>TIR domain containing protein of E. faecalis V583</i>
TcpM-TIR	<i>TIR domain of TcpM</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin

## -ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS-

---

TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TICAM	<i>TIR domain-containing adapter molecule</i>
TIR	<i>Toll/interleukin-1 receptor</i>
TIRAP	<i>Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein</i>
TirS	<i>Tcp von S. aureus</i>
TlpA	<i>TIR-like protein A von S. enterica</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
TOLLIP	<i>Toll interacting protein</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adaptor inducing IFN-<math>\beta</math></i>
TRIS	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i>
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
UKGM	<i>Universitätsklinikum Gießen und Marburg</i>
UPEC	<i>Uropathogener E. coli</i>
UTI	<i>Urinary tract infection</i>
VRE	<i>Vancomycin resistenter Enterokokkus</i>
VSV	<i>Vesicular Stomatitis-Virus</i>
WNV	<i>West-Nil-Virus</i>
YpTdp	<i>Tcp of Yersinia pestis</i>

## 8. Darstellungsverzeichnis

### 8.1 Abbildungen

Abbildung 1-1:	Ligandenbindungsmechanismus und Signalinitiierung von <i>Toll</i> [41].	7
Abbildung 1-2:	TLR Signaltransduktionswege führen zur Aktivierung von NFκB und AP-1 [46] .....	10
Abbildung 1-3:	TLR Signaltransduktionswege führen zur Aktivierung von IRFs [46] . .....	11
Abbildung 2-1:	pSty4 gPCR.....	35
Abbildung 2-2:	Erkennungssequenz und Spaltungsstelle von Eco31I.....	35
Abbildung 2-3:	Insert für pSty4 mit Eco31I Schnittstellen.....	36
Abbildung 2-4:	pSty4 pPCR.....	36
Abbildung 2-5:	pSty4 Konstrukt .....	37
Abbildung 3-1:	Mischinfektionen bei HWI mit <i>E. coli</i> .....	53
Abbildung 3-2:	Resistenzlage von <i>E. coli</i> bei HWI .....	54
Abbildung 3-3:	Resistenzlage von <i>E. coli</i> mit ESBL bei HWI .....	55
Abbildung 3-4:	Screening PCR <i>E. coli</i> .....	56
Abbildung 3-5:	Mischinfektionen bei HWI mit <i>E. faecalis</i> .....	57
Abbildung 3-6:	Resistenzlage aller aus Patientenurin isolierten <i>E. faecalis</i> Stämme.	58
Abbildung 3-7:	Screening PCR <i>E. faecalis</i> .....	58
Abbildung 3-8:	TcpF positive <i>E. faecalis</i> Isolate .....	59
Abbildung 3-9:	TcpF Sequenzierungs-PCR .....	60
Abbildung 3-10:	Einzelnukeotid-Polymorphismus (SNP) von TcpF.....	61
Abbildung 3-11:	Verteilung der TcpF Genvarianten unter <i>E. faecalis</i> Urinisolaten mit cfu<10 <sup>5</sup> /ml und cfu>10 <sup>5</sup> /ml. ....	64
Abbildung 3-12:	Schematische Darstellung des TcpF Genlocus für die <i>E. faecalis</i> Stämme Symbioflor 1, #53 und #11. ....	65
Abbildung 3-13:	<i>Conserved Domain Database</i> Analyse [78] .....	66
Abbildung 3-14:	Multiples Aminosäuresequenzalignment.....	67
Abbildung 3-15:	Primärstruktur von TcpF.....	68
Abbildung 3-16:	Tertiärstruktur und Superposition von TcpF-TIR (7-128).....	69
Abbildung 3-17:	Primärstruktur von TcpC .....	70
Abbildung 3-18:	Tertiärstruktur und Superposition von TcpC-TIR (171-280) .....	70

Abbildung 3-19: Primärstruktur von TcpM .....	71
Abbildung 3-20: Tertiärstruktur und Superposition von TcpM-TIR (115-305).....	72
Abbildung 3-21: NFκB Signalaktivierung in Abhängigkeit von TcpF .....	73
Abbildung 3-22: NFκB Signalaktivierung in Abhängigkeit von TcpC.....	74
Abbildung 3-23: NFκB Signalaktivierung in Abhängigkeit von TcpM.....	76
Abbildung 3-24: Zytokinantwort in Abhängigkeit von TcpM, TcpM-HTH, TcpM-TIR und TcpF .....	77
Abbildung 3-25: Stimulation von RAW264.7 Makrophagen mit <i>E. faecalis</i> Symbioflor 1 und <i>E. faecalis</i> Symbioflor 1 ΔtcpF.....	78
Abbildung 3-26: TcpF Expression in <i>E. coli</i> Top10 unter variablen Expressionsbedingungen.....	79
Abbildung 3-27: Säulenaufreinigung von TcpF.....	80
Abbildung 3-28: Coomassie Färbung der in <i>E. coli</i> TOP10 rekombinant hergestellten und aufgereinigten Proteine Azurin, TcpC-TIR, GFP und TcpF.....	81
Abbildung 10-1: Buchstabencode der Aminosäuren.....	116

## 8.2 Tabellen

Tabelle 1-1: TLR Zusammenfassung [25], [26], [30]–[37] .....	4
Tabelle 1-2: TLR Adapter .....	9
Tabelle 1-3: Endogene TLR Signal Inhibitoren [46] .....	14
Tabelle 1-4: Bakterielle Tcps .....	15
Tabelle 2-1: Geräte .....	18
Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterial .....	19
Tabelle 2-3: Chemikalien und andere Reagenzien.....	21
Tabelle 2-4: Nährmedien.....	21
Tabelle 2-5: Enzyme .....	21
Tabelle 2-6: Lösungen und Puffer.....	23
Tabelle 2-7: Kits.....	23
Tabelle 2-8: Software .....	24
Tabelle 2-9: Bakterienstämme.....	24
Tabelle 2-10: Zelllinien .....	24
Tabelle 2-11: Bedingungen gPCR.....	25
Tabelle 2-12: Bedingungen pPCR.....	26

-DARSTELLUNGSVERZEICHNIS-

---

Tabelle 2-13:	Bedingungen Screening PCR <i>E. coli</i> .....	26
Tabelle 2-14:	Bedingungen Screening PCR <i>E. faecalis</i> .....	26
Tabelle 2-15:	Bedingungen TcpC Sequenzierungs-PCR .....	27
Tabelle 2-16:	Bedingungen TcpF Sequenzierungs-PCR.....	27
Tabelle 2-17:	Verwendete Vektoren .....	32
Tabelle 2-18:	Klonierungen.....	34
Tabelle 2-19:	Sammelgel Polyacrylamid (PAA) 5,7%. .....	46
Tabelle 2-20:	Trenngel PAA 12% .....	46
Tabelle 2-21:	<i>BBL<sup>TM</sup> Sensi-Disc<sup>TM</sup> Susceptibility Test Discs (BD)</i> .....	51
Tabelle 3-1:	TcpF Genvarianten.....	63
Tabelle 10-1:	Primertabelle .....	119

## 9. Literaturverzeichnis

- [1] C. Cirl, A. Wieser, M. Yadav, S. Duerr, S. Schubert, H. Fischer, D. Stappert, N. Wantia, N. Rodriguez, H. Wagner, C. Svanborg, and T. Miethke, "Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins," *Nat. Med.*, vol. 14, no. 4, pp. 399–406, Apr. 2008.
- [2] H. Hof and R. Dörries, *Medizinische Mikrobiologie*, 5th ed. 2014.
- [3] E. Brzuszkiewicz, H. Brüggemann, H. Liesegang, M. Emmerth, T. Olschläger, G. Nagy, K. Albermann, C. Wagner, C. Buchrieser, L. Emody, G. Gottschalk, J. Hacker, and U. Dobrindt, "How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 34, pp. 12879–84, Aug. 2006.
- [4] H. L. Mobley, D. M. Green, A. L. Trifillis, D. E. Johnson, G. R. Chippendale, C. V Lockatell, B. D. Jones, and J. W. Warren, "Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains.," *Infect. Immun.*, vol. 58, no. 5, pp. 1281–9, May 1990.
- [5] R. A. Welch, V. Burland, G. Plunkett, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S.-R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. T. Mobley, M. S. Donnenberg, and F. R. Blattner, "Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 26, pp. 17020–4, Dec. 2002.
- [6] D. M. Guyer, J.-S. Kao, and H. L. T. Mobley, "Genomic Analysis of a Pathogenicity Island in Uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: Distribution of Homologous Sequences among Isolates from Patients with Pyelonephritis, Cystitis, and Catheter-Associated Bacteriuria and from Fecal Samples," *Infect. Immun.*, vol. 66, no. 9, pp. 4411–4417, Sep. 1998.
- [7] K. Fisher and C. Phillips, "The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*." *Microbiology*, vol. 155, no. Pt 6, pp. 1749–57, Jun. 2009.
- [8] C. H. Poh, H. M. L. Oh, and a L. Tan, "Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital.," *J. Infect.*, vol. 52, no. 5, pp. 383–6, May 2006.
- [9] M. de Fátima Silva Lopes, T. Ribeiro, M. Abrantes, J. J. Figueiredo Marques, R. Tenreiro, and M. T. B. Crespo, "Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci.," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 103, no. 2, pp. 191–8, Aug. 2005.
- [10] G. Giraffa, "Enterococci from foods.," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 26, no. 2, pp. 163–71, Jun. 2002.
- [11] G. Metan, P. Zarakolu, and S. Unal, "Rapid detection of antibacterial resistance in emerging Gram-positive cocci.," *J. Hosp. Infect.*, vol. 61, no. 2, pp. 93–9, Oct. 2005.
- [12] D. F. Sahm, J. Kissinger, M. S. Gilmore, P. R. Murray, R. Mulder, J. Solliday, and B. Clarke, "In vitro susceptibility studies of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*." *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 33, no. 9, pp. 1588–91, Sep. 1989.
- [13] E. Domann, T. Hain, R. Ghai, A. Billion, C. Kuenne, K. Zimmermann, and T. Chakraborty, "Comparative genomic analysis for the presence of potential



- enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbioflor 1.," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 297, no. 7–8, pp. 533–9, Nov. 2007.
- [14] W. Habermann, K. Zimmermann, H. Skarabis, R. Kunze, and V. Rusch, "[Reduction of acute recurrence in patients with chronic recurrent hypertrophic sinusitis by treatment with a bacterial immunostimulant (*Enterococcus faecalis* Bacteriae of human origin).," *Arzneimittelforschung.*, vol. 52, no. 8, pp. 622–7, Jan. 2002.
- [15] T. D. Kraemer, O. D. Quintanar Haro, E. Domann, T. Chakraborty, and S. Tchatalbachev, "The TIR Domain Containing Locus of *Enterococcus faecalis* Is Predominant among Urinary Tract Infection Isolates and Downregulates Host Inflammatory Response.," *Int. J. Microbiol.*, vol. 2014, p. 918143, Jan. 2014.
- [16] G. Fuchs and H. G. Schlegel, *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, 2007.
- [17] A. T. de Paula, A. B. Jeronymo-Ceneviva, L. F. Silva, S. D. Todorov, B. D. G. de M. Franco, Y. Choiset, T. Haertlé, J.-M. Chobert, X. Dousset, and A. L. B. Penna, "Leuconostoc mesenteroides SJRP55: A Bacteriocinogenic Strain Isolated from Brazilian Water Buffalo Mozzarella Cheese.," *Probiotics Antimicrob. Proteins*, vol. 6, no. 3–4, pp. 186–97, Dec. 2014.
- [18] a Buu-Hoï, C. Branger, and J. F. Acar, "Vancomycin-resistant streptococci or *Leuconostoc* sp.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 28, no. 3, pp. 458–60, Sep. 1985.
- [19] C. Barreau and G. Wagener, "Characterization of *Leuconostoc lactis* strains from human sources.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 28, no. 8, pp. 1728–33, Aug. 1990.
- [20] I. R. Friedland, M. Snipelisky, and M. Khoosal, "Meningitis in a neonate caused by *Leuconostoc* sp.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 28, no. 9, pp. 2125–6, Sep. 1990.
- [21] H. Barry, M. T. Clancy, A. Brady, and N. O'Higgins, "Isolation of a *Leuconostoc* species from a retroareolar breast abscess.," *J. Infect.*, vol. 27, no. 2, pp. 208–10, Sep. 1993.
- [22] K. S. Templin, T. Crook, T. Riley, C. Whitener, and R. C. Aber, "Spontaneous bacterial peritonitis and bacteremia due to *Leuconostoc* species in a patient with end-stage liver disease: a case report.," *J. Infect.*, vol. 43, no. 2, pp. 155–7, Aug. 2001.
- [23] M. Montejo, C. Grande, A. Valdivieso, M. Testillano, J. Minguillan, K. Aguirrebengoa, and J. Ortiz de Urbina, "Abdominal abscess due to *leuconostoc* species in a liver transplant recipient.," *J. Infect.*, vol. 41, no. 2, pp. 197–8, Sep. 2000.
- [24] E. A. Cappelli, R. R. Barros, T. C. F. Camello, L. M. Teixeira, and V. L. C. Merquior, "Leuconostoc pseudomesenteroides as a Cause of Nosocomial Urinary Tract Infections," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, no. 12, pp. 4124–4126, Dec. 1999.
- [25] H. Kumar, T. Kawai, and S. Akira, "Toll-like receptors and innate immunity.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 388, no. 4, pp. 621–5, Oct. 2009.
- [26] T. Kawai and S. Akira, "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors.," *Nat. Immunol.*, vol. 11, no. 5, pp. 373–84, May 2010.
- [27] K. H. G. Mills, "TLR-dependent T cell activation in autoimmunity.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, no. 12, pp. 807–22, Dec. 2011.
- [28] C. a Janeway and R. Medzhitov, "Innate immune recognition.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 20, no. 2, pp. 197–216, Jan. 2002.
- [29] H. Kumar, T. Kawai, and S. Akira, "Pathogen recognition by the innate immune system.," *Int. Rev. Immunol.*, vol. 30, no. 1, pp. 16–34, Feb. 2011.

- [30] R. Medzhitov, "Recognition of microorganisms and activation of the immune response.," *Nature*, vol. 449, no. 7164, pp. 819–26, Oct. 2007.
- [31] B. A. Beutler, "Review article TLRs and innate immunity," vol. 113, no. 7, pp. 1399–1407, 2009.
- [32] U. Hasan, C. Chaffois, C. Gaillard, V. Saulnier, E. Merck, S. Tancredi, C. Guiet, F. Brière, J. Vlach, S. Lebecque, G. Trinchieri, and E. E. M. Bates, "Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88.," *J. Immunol.*, vol. 174, no. 5, pp. 2942–50, Mar. 2005.
- [33] Y. Guan, D. R. E. Ranoa, S. Jiang, S. K. Mutha, X. Li, J. Baudry, and R. I. Tapping, "Human TLRs 10 and 1 share common mechanisms of innate immune sensing but not signaling.," *J. Immunol.*, vol. 184, no. 9, pp. 5094–103, May 2010.
- [34] K. Karikó, H. Ni, J. Capodici, M. Lamphier, and D. Weissman, "mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 13, pp. 12542–50, Mar. 2004.
- [35] C. Pasare and R. Medzhitov, "Toll-like receptors and acquired immunity," *Semin. Immunol.*, vol. 16, no. 1, pp. 23–26, Feb. 2004.
- [36] Y.-M. Kim, M. M. Brinkmann, M.-E. Paquet, and H. L. Ploegh, "UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes.," *Nature*, vol. 452, no. 7184, pp. 234–8, Mar. 2008.
- [37] L. Liu, I. Botos, Y. Wang, J. N. Leonard, J. Shiloach, D. M. Segal, and D. R. Davies, "Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA.," *Science*, vol. 320, no. 5874, pp. 379–81, Apr. 2008.
- [38] M. S. Jin, S. E. Kim, J. Y. Heo, M. E. Lee, H. M. Kim, S.-G. Paik, H. Lee, and J.-O. Lee, "Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide.," *Cell*, vol. 130, no. 6, pp. 1071–82, Sep. 2007.
- [39] A. N. R. Weber, M. C. Moncrieffe, M. Gangloff, J.-L. Imler, and N. J. Gay, "Ligand-receptor and receptor-receptor interactions act in concert to activate signaling in the Drosophila toll pathway.," *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 24, pp. 22793–9, Jun. 2005.
- [40] N. J. Gay, M. Gangloff, and A. N. R. Weber, "Toll-like receptors as molecular switches.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 6, no. 9, pp. 693–8, Sep. 2006.
- [41] N. J. Gay and M. Gangloff, "Structure of toll-like receptors.," *Handb. Exp. Pharmacol.*, no. 183, pp. 181–200, Jan. 2008.
- [42] M. Carty, R. Goodbody, M. Schröder, J. Stack, P. N. Moynagh, and A. G. Bowie, "The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling.," *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 10, pp. 1074–81, Oct. 2006.
- [43] Y. Xu, X. Tao, B. Shen, T. Hornig, R. Medzhitov, J. L. Manley, and L. Tong, "Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains.," *Nature*, vol. 408, no. 6808, pp. 111–5, Nov. 2000.
- [44] a. Poltorak, "Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in Tlr4 Gene," *Science (80-. )*, vol. 282, no. 5396, pp. 2085–2088, Dec. 1998.
- [45] J. K. Gautam, Ashish, L. D. Comeau, J. K. Krueger, and M. F. Smith, "Structural and functional evidence for the role of the TLR2 DD loop in TLR1/TLR2 heterodimerization and signaling.," *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 40, pp. 30132–42, Oct. 2006.

- [46] C. Brikos and L. a J. O'Neill, "Signalling of toll-like receptors.," *Handb. Exp. Pharmacol.*, no. 183, pp. 21–50, Jan. 2008.
- [47] A. Dunne, M. Ejdeba, P. L. Ludidi, L. A. J. O. Neill, and N. J. Gay, "Structural Complementarity of Toll / Interleukin-1 Receptor Domains in Toll-like Receptors and the Adaptors Mal and MyD88 \*," vol. 278, no. 42, pp. 41443–41451, 2003.
- [48] S. Rottenberg, J. Schmuckli-Maurer, S. Grimm, V. T. Heussler, and D. A. E. Dobbelaere, "Characterization of the bovine IkappaB kinases (IKK)alpha and IKKbeta, the regulatory subunit NEMO and their substrate IkappaBalphabetalpha.," *Gene*, vol. 299, no. 1–2, pp. 293–300, Oct. 2002.
- [49] M. Karin and Y. Ben-Neriah, "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 18, pp. 621–63, Jan. 2000.
- [50] J. C. Kagan and R. Medzhitov, "Phosphoinositide-mediated adaptor recruitment controls Toll-like receptor signaling.," *Cell*, vol. 125, no. 5, pp. 943–55, Jun. 2006.
- [51] K. A. Fitzgerald and Z. J. Chen, "Sorting out Toll signals.," *Cell*, vol. 125, no. 5, pp. 834–6, Jun. 2006.
- [52] K. A. Fitzgerald, D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha, and D. T. Golenbock, "LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF.," *J. Exp. Med.*, vol. 198, no. 7, pp. 1043–55, Oct. 2003.
- [53] S. Sato, M. Sugiyama, M. Yamamoto, Y. Watanabe, T. Kawai, K. Takeda, and S. Akira, "Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like re.," *J. Immunol.*, vol. 171, no. 8, pp. 4304–10, Oct. 2003.
- [54] A. Takaoka, H. Yanai, S. Kondo, G. Duncan, H. Negishi, T. Mizutani, S.-I. Kano, K. Honda, Y. Ohba, T. W. Mak, and T. Taniguchi, "Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors.," *Nature*, vol. 434, no. 7030, pp. 243–9, Mar. 2005.
- [55] M. Yamamoto, S. Sato, H. Hemmi, S. Uematsu, K. Hoshino, T. Kaisho, O. Takeuchi, K. Takeda, and S. Akira, "TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway.," *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 11, pp. 1144–50, Nov. 2003.
- [56] D. C. Rowe, A. F. McGettrick, E. Latz, B. G. Monks, N. J. Gay, M. Yamamoto, S. Akira, L. A. O'Neill, K. A. Fitzgerald, and D. T. Golenbock, "The myristoylation of TRIF-related adaptor molecule is essential for Toll-like receptor 4 signal transduction.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 16, pp. 6299–304, Apr. 2006.
- [57] J. Van Snick, "Interleukin-6: an overview.," *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 8, pp. 253–78, Jan. 1990.
- [58] G. Kaplanski, V. Marin, F. Montero-Julian, A. Mantovani, and C. Farnarier, "IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation.," *Trends Immunol.*, vol. 24, no. 1, pp. 25–9, Jan. 2003.
- [59] S. a Jones, "Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6.," *J. Immunol.*, vol. 175, no. 6, pp. 3463–8, Sep. 2005.
- [60] T. Hirano, K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, and A. Iwamatsu, "Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin.," *Nature*, vol. 324, no. 6092, pp. 73–6, Jan. .

- [61] M. Croft, "The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases.," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 9, no. 4, pp. 271–85, Apr. 2009.
- [62] V. Fensterl and G. C. Sen, "Interferons and viral infections.," *Biofactors*, vol. 35, no. 1, pp. 14–20, 2009.
- [63] J. Content, "Mechanisms of induction and action of interferons.," *Verh. K. Acad. Geneesk. Belg.*, vol. 71, no. 1–2, pp. 51–71, Jan. 2009.
- [64] S. L. Chan, L. Y. Low, S. Hsu, S. Li, T. Liu, E. Santelli, G. Le Negrate, J. C. Reed, V. L. Woods, and J. Pascual, "Molecular mimicry in innate immunity: crystal structure of a bacterial TIR domain.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 32, pp. 21386–92, Aug. 2009.
- [65] R. M. Newman, P. Salunkhe, A. Godzik, and J. C. Reed, "Identification and Characterization of a Novel Bacterial Virulence Factor That Shares Homology with Mammalian Toll / Interleukin-1 Receptor Family Proteins," *Infect. Immun.*, vol. 74, no. 1, pp. 594–601, 2006.
- [66] L. Y. Low, T. Mukasa, J. C. Reed, and J. Pascual, "Characterization of a TIR-like protein from *Paracoccus denitrificans*.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 356, no. 2, pp. 481–6, May 2007.
- [67] R. R. Rana, M. Zhang, A. M. Spear, H. S. Atkins, and B. Byrne, "Bacterial TIR-containing proteins and host innate immune system evasion.," *Med. Microbiol. Immunol.*, vol. 202, no. 1, pp. 1–10, Mar. 2013.
- [68] G. A. Snyder, C. Cirl, J. Jiang, K. Chen, A. Waldhuber, P. Smith, F. Römmler, N. Snyder, T. Fresquez, S. Dürr, N. Tjandra, T. Miethke, and T. S. Xiao, "Molecular mechanisms for the subversion of MyD88 signaling by TcpC from virulent uropathogenic *Escherichia coli*.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 17, pp. 6985–90, Apr. 2013.
- [69] L. a J. O'Neill, "How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know.," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 18, no. 1, pp. 3–9, Feb. 2006.
- [70] L. A. J. O'Neill, "Bacteria fight back against Toll-like receptors.," *Nat. Med.*, vol. 14, no. 4, pp. 370–2, Apr. 2008.
- [71] G. K. Radhakrishnan, Q. Yu, J. S. Harms, and G. a Splitter, "Brucella TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP.," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 15, pp. 9892–8, Apr. 2009.
- [72] G. K. Radhakrishnan and G. a Splitter, "Biochemical and functional analysis of TIR domain containing protein from *Brucella melitensis*.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 397, no. 1, pp. 59–63, Jun. 2010.
- [73] A. M. Spear, R. R. Rana, D. C. Jenner, H. C. Flick-Smith, P. C. F. Oyston, P. Simpson, S. J. Matthews, B. Byrne, and H. S. Atkins, "A Toll/interleukin (IL)-1 receptor domain protein from *Yersinia pestis* interacts with mammalian IL-1/Toll-like receptor pathways but does not play a central role in the virulence of *Y. pestis* in a mouse model of bubonic plague.," *Microbiology*, vol. 158, no. Pt 6, pp. 1593–606, Jun. 2012.
- [74] F. Askarian, N. M. van Sorge, M. Sangvik, F. C. Beasley, J. R. Henriksen, J. U. E. Sollid, J. A. G. van Strijp, V. Nizet, and M. Johannessen, "A *Staphylococcus aureus* TIR Domain Protein Virulence Factor Blocks TLR2-Mediated NF-κB Signaling.," *J. Innate Immun.*, Jan. 2014.
- [75] F. L. Graham, J. Smiley, W. C. Russell, and R. Nairn, "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.," *J. Gen. Virol.*, vol. 36, no. 1, pp. 59–74, Jul. 1977.

- [76] Y. Kadoma, Y. Murakami, T. Ogiwara, M. Machino, I. Yokoe, and S. Fujisawa, "Radical-scavenging activity and cytotoxicity of p-methoxyphenol and p-cresol dimers.," *Molecules*, vol. 15, no. 3, pp. 1103–12, Mar. 2010.
- [77] F. Sievers, A. Wilm, D. Dineen, T. J. Gibson, K. Karplus, W. Li, R. Lopez, H. McWilliam, M. Remmert, J. Söding, J. D. Thompson, and D. G. Higgins, "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega.," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, p. 539, Jan. 2011.
- [78] A. Marchler-Bauer, C. Zheng, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, L. Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, D. I. Hurwitz, C. J. Lanczycki, F. Lu, S. Lu, G. H. Marchler, J. S. Song, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang, and S. H. Bryant, "CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 41, no. Database issue, pp. D348–52, Jan. 2013.
- [79] A. Marchler-Bauer, J. B. Anderson, F. Chitsaz, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, J. H. Fong, L. Y. Geer, R. C. Geer, N. R. Gonzales, M. Gwadz, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, F. Lu, S. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, J. S. Song, A. Tasneem, N. Thanki, R. A. Yamashita, D. Zhang, N. Zhang, and S. H. Bryant, "CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. Database issue, pp. D205–10, Jan. 2009.
- [80] L. Y. Geer, M. Domrachev, D. J. Lipman, and S. H. Bryant, "CDART: protein homology by domain architecture.," *Genome Res.*, vol. 12, no. 10, pp. 1619–23, Oct. 2002.
- [81] J. Söding, A. Biegert, and A. N. Lupas, "The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. Web Server issue, pp. W244–8, Jul. 2005.
- [82] V. Mariani, F. Kiefer, T. Schmidt, J. Haas, and T. Schwede, "Assessment of template based protein structure predictions in CASP9.," *Proteins*, vol. 79 Suppl 1, pp. 37–58, Jan. 2011.
- [83] Y. Zhang and J. Skolnick, "TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 33, no. 7, pp. 2302–9, Jan. 2005.
- [84] W. N. Burnette, "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.," *Anal. Biochem.*, vol. 112, no. 2, pp. 195–203, Apr. 1981.
- [85] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.," *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248–54, May 1976.
- [86] G. Schmiemann, E. Kniehl, K. Gebhardt, M. M. Matejczyk, and E. Hummers-Pradier, "The diagnosis of urinary tract infection: a systematic review.," *Dtsch. Arztebl. Int.*, vol. 107, no. 21, pp. 361–7, May 2010.
- [87] V. Wätzig and T. Herdegen, *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie - Thieme.de - Thieme Webshop*, 1st ed. Stuttgart, 2008.
- [88] J. Zou, A. S. Baghdayan, S. J. Payne, and N. Shankar, "A TIR domain protein from *E. faecalis* attenuates MyD88-mediated signaling and NF- $\kappa$ B activation.," *PLoS One*, vol. 9, no. 11, p. e112010, Jan. 2014.
- [89] L. Aravind, V. Anantharaman, S. Balaji, M. M. Babu, and L. M. Iyer, "The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond.," *FEMS Microbiol. Rev.*, vol. 29, no. 2, pp. 231–62, Apr. 2005.

- [90] E. Valkov, A. Stamp, F. Dimairo, D. Baker, B. Verstak, P. Roversi, S. Kellie, M. J. Sweet, A. Mansell, N. J. Gay, J. L. Martin, and B. Kobe, "Crystal structure of Toll-like receptor adaptor MAL/TIRAP reveals the molecular basis for signal transduction and disease protection.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 36, pp. 14879–84, Sep. 2011.
- [91] S. Basith, B. Manavalan, R. G. Govindaraj, and S. Choi, "In silico approach to inhibition of signaling pathways of Toll-like receptors 2 and 4 by ST2L.," *PLoS One*, vol. 6, no. 8, p. e23989, Jan. 2011.
- [92] T. Nyman, P. Stenmark, S. Flodin, I. Johansson, M. Hammarström, and P. Nordlund, "The crystal structure of the human toll-like receptor 10 cytoplasmic domain reveals a putative signaling dimer.," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 18, pp. 11861–5, May 2008.
- [93] M. Bernoux, T. Ve, S. Williams, C. Warren, D. Hatters, E. Valkov, X. Zhang, J. G. Ellis, B. Kobe, and P. N. Dodds, "Structural and functional analysis of a plant resistance protein TIR domain reveals interfaces for self-association, signaling, and autoregulation.," *Cell Host Microbe*, vol. 9, no. 3, pp. 200–11, Mar. 2011.
- [94] E. García-Fruitós, "Inclusion bodies: a new concept.," *Microb. Cell Fact.*, vol. 9, p. 80, Jan. 2010.
- [95] P. Heisig, "[Urinary tract infections and antibiotic resistance].," *Urologe. A*, vol. 49, no. 5, pp. 612–7, May 2010.
- [96] W. E. Stamm and S. R. Norrby, "Urinary tract infections: disease panorama and challenges.," *J. Infect. Dis.*, vol. 183 Suppl , pp. S1–4, Mar. 2001.
- [97] M. J. Struelens, O. Denis, and H. Rodriguez-Villalobos, "Microbiology of nosocomial infections: progress and challenges.," *Microbes Infect.*, vol. 6, no. 11, pp. 1043–8, Sep. 2004.
- [98] G. Klein, a Pack, and G. Reuter, "Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany.," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 64, no. 5, pp. 1825–30, May 1998.
- [99] S. M. Bagshaw and K. B. Laupland, "Epidemiology of intensive care unit-acquired urinary tract infections.," *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 19, no. 1, pp. 67–71, Feb. 2006.
- [100] A. Chung, M. Arianayagam, and P. Rashid, "Bacterial cystitis in women.," *Aust. Fam. Physician*, vol. 39, no. 5, pp. 295–8, May 2010.
- [101] B. für V. und Lebensmittelsicherheit, I. Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., and Freiburg., "GERMAP 2012 – Bericht über den Antibiotikaverbrauch und die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in der Human- und Veterinärmedizin in Deutschland.," Rheinbach, 2014.
- [102] "Hygiene measures for infection or colonization with multidrug-resistant gram-negative bacilli. Commission recommendation for hospital hygiene and infection prevention (KRINKO) at the Robert Koch Institute (RKI).," *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz*, vol. 55, no. 10, pp. 1311–54, Oct. 2012.
- [103] J. Augustin, S. Mangiapane, and W. Kern, "Antibiotika-Verordnungen im Jahr 2010 im regionalen Vergleich," 2010.
- [104] S. Sood, M. Malhotra, B. K. Das, and A. Kapil, "Enterococcal infections & antimicrobial resistance.," *Indian J. Med. Res.*, vol. 128, no. 2, pp. 111–21, Aug. 2008.
- [105] J. W. Chow, V. Kak, I. You, S. J. Kao, J. Petrin, D. B. Clewell, S. A. Lerner, G. H. Miller, and K. J. Shaw, "Aminoglycoside resistance genes aph(2<sup>''</sup>)-Ib and aac(6<sup>'</sup>)-Im detected together in strains of both *Escherichia coli* and *Enterococcus*

- faecium.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, no. 10, pp. 2691–4, Oct. 2001.
- [106] G. Schmiemann, U. Hoyme, E. Hummers-pradier, M. Kaase, E. Kniehl, I. Selbach, W. Vahlensiek, D. Watermann, C. Leitlinien, and D. A. Wissenschaftlicher, "Epidemiologie , Diagnostik , Therapie und Management unkomplizierter bakterieller ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten Kurzfassung ( K ) Vorbemerkung Definition unkomplizierter Harnwegsinfektionen Patientengruppen," 2010.
- [107] J. Song and S. N. Abraham, "TLR-mediated immune responses in the urinary tract.," *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 11, no. 1, pp. 66–73, Feb. 2008.
- [108] E. Karoly, A. Fekete, N. F. Banki, B. Szebeni, A. Vannay, A. J. Szabo, T. Tulassay, and G. S. Reusz, "Heat shock protein 72 (HSPA1B) gene polymorphism and Toll-like receptor (TLR) 4 mutation are associated with increased risk of urinary tract infection in children.," *Pediatr. Res.*, vol. 61, no. 3, pp. 371–4, Mar. 2007.
- [109] T. R. Hawn, D. Scholes, S. S. Li, H. Wang, Y. Yang, P. L. Roberts, A. E. Stapleton, M. Janer, A. Aderem, W. E. Stamm, L. P. Zhao, and T. M. Hooton, "Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract infections in adult women.," *PLoS One*, vol. 4, no. 6, p. e5990, Jan. 2009.
- [110] T. R. Hawn, D. Scholes, H. Wang, S. S. Li, A. E. Stapleton, M. Janer, A. Aderem, W. E. Stamm, L. P. Zhao, and T. M. Hooton, "Genetic variation of the human urinary tract innate immune response and asymptomatic bacteriuria in women.," *PLoS One*, vol. 4, no. 12, p. e8300, Jan. 2009.
- [111] S. N. Abraham, D. Sun, J. B. Dale, and E. H. Beachey, "Conservation of the D-mannose-adhesion protein among type 1 fimbriated members of the family Enterobacteriaceae.," *Nature*, vol. 336, no. 6200, pp. 682–4, Dec. 1988.
- [112] G. Zhou, W. J. Mo, P. Sebbel, G. Min, T. A. Neubert, R. Glockshuber, X. R. Wu, T. T. Sun, and X. P. Kong, "Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic Escherichia coli: evidence from in vitro FimH binding.," *J. Cell Sci.*, vol. 114, no. Pt 22, pp. 4095–103, Nov. 2001.
- [113] M. Starcic Erjavec, B. Jesenko, Z. Petkovsek, and D. Zgur-Bertok, "Prevalence and associations of tcpC, a gene encoding a Toll/interleukin-1 receptor domain-containing protein, among Escherichia coli urinary tract infection, skin and soft tissue infection, and commensal isolates.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 3, pp. 966–8, Mar. 2010.
- [114] L. Hagberg, I. Engberg, R. Freter, J. Lam, S. Olling, and C. Svanborg Edén, "Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic Escherichia coli of human origin.," *Infect. Immun.*, vol. 40, no. 1, pp. 273–83, Apr. 1983.
- [115] W. S. Reznikoff, "MicroReview Tn 5 as a model for understanding DNA transposition," *Mol. Microbiol.*, vol. 47, pp. 1199–1206, 2003.
- [116] R. K. Aziz, M. Breitbart, and R. a Edwards, "Transposases are the most abundant, most ubiquitous genes in nature.," *Nucleic Acids Res.*, vol. 38, no. 13, pp. 4207–17, Jul. 2010.
- [117] D. Hartl and E. Jones, *Genetics, Analysis of genes and genomes*, 7th ed. Jones and Bartlett Publishers, 2009.
- [118] S. T. Qureshi, L. Larivière, G. Leveque, S. Clermont, K. J. Moore, P. Gros, and D. Malo, "Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)," *J. Exp. Med.*, vol. 189, no. 4, pp. 615–25, Feb. 1999.

- [119] M. Nada, H. Ohnishi, H. Tochio, Z. Kato, T. Kimura, K. Kubota, T. Yamamoto, Y. O. Kamatari, N. Tsutsumi, M. Shirakawa, and N. Kondo, "Molecular analysis of the binding mode of Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain proteins during TLR2 signaling.," *Mol. Immunol.*, vol. 52, no. 3–4, pp. 108–16, Oct. 2012.
- [120] C. A. Arias and B. E. Murray, "The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 10, no. 4, pp. 266–78, Apr. 2012.
- [121] M. Fritzenwanker, C. Kuenne, A. Billion, T. Hain, K. Zimmermann, A. Goesmann, T. Chakraborty, and E. Domann, "Complete Genome Sequence of the Probiotic Enterococcus faecalis Symbioflor 1 Clone DSM 16431.," *Genome Announc.*, vol. 1, no. 1, Jan. 2013.
- [122] O. Shibolet and D. K. Podolsky, "TLRs in the Gut. IV. Negative regulation of Toll-like receptors and intestinal homeostasis: addition by subtraction.," *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, vol. 292, no. 6, pp. G1469–73, Jun. 2007.
- [123] D. Franchimont, "Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis," *Gut*, vol. 53, no. 7, pp. 987–992, Jul. 2004.
- [124] H. Clevers, "At the crossroads of inflammation and cancer.," *Cell*, vol. 118, no. 6, pp. 671–4, Sep. 2004.
- [125] N. A. Hering, J. F. Richter, A. Fromm, A. Wieser, S. Hartmann, D. Günzel, R. Bücker, M. Fromm, J. D. Schulzke, and H. Troeger, "TepC protein from E. coli Nissle improves epithelial barrier function involving PKC $\zeta$  and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells.," *Mucosal Immunol.*, Jul. 2013.
- [126] D. J. Loegering and M. R. Lennartz, "Protein kinase C and toll-like receptor signaling.," *Enzyme Res.*, vol. 2011, p. 537821, Jan. 2011.
- [127] C.-S. Yang, J.-S. Lee, C.-H. Song, G. M. Hur, S. J. Lee, S. Tanaka, S. Akira, T.-H. Paik, and E.-K. Jo, "Protein kinase C zeta plays an essential role for Mycobacterium tuberculosis-induced extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation in monocytes/macrophages via Toll-like receptor 2.," *Cell. Microbiol.*, vol. 9, no. 2, pp. 382–96, Feb. 2007.
- [128] G. Herold, *Innere Medizin*. Dr. med. Gerd Herold, 2009.
- [129] L. J. Scott, "Etanercept: A Review of Its Use in Autoimmune Inflammatory Diseases.," *Drugs*, Jul. 2014.
- [130] S. J. Eells, K. Bharadwa, J. A. McKinnell, and L. G. Miller, "Recurrent urinary tract infections among women: comparative effectiveness of 5 prevention and management strategies using a Markov chain Monte Carlo model.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 58, no. 2, pp. 147–60, Jan. 2014.
- [131] J. Cohen, "The immunopathogenesis of sepsis.," *Nature*, vol. 420, no. 6917, pp. 885–91, Jan. .
- [132] R. P. Dellinger, M. M. Levy, A. Rhodes, D. Annane, H. Gerlach, S. M. Opal, J. E. Sevransky, C. L. Sprung, I. S. Douglas, R. Jaeschke, T. M. Osborn, M. E. Nunnally, S. R. Townsend, K. Reinhart, R. M. Kleinpell, D. C. Angus, C. S. Deutschman, F. R. Machado, G. D. Rubenfeld, S. Webb, R. J. Beale, J.-L. Vincent, and R. Moreno, "Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012.," *Intensive Care Med.*, vol. 39, no. 2, pp. 165–228, Feb. 2013.
- [133] H. Weighardt and B. Holzmann, "Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis.," *Immunobiology*, vol. 212, no. 9–10, pp. 715–22, Jan. 2007.



- [134] J. Zhu and C. Mohan, "Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities.," *Mediators Inflamm.*, vol. 2010, p. 781235, Jan. 2010.
- [135] H. Weighardt, S. Kaiser-Moore, R. M. Vabulas, C. J. Kirschning, H. Wagner, and B. Holzmann, "Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 deficiency improves resistance against sepsis caused by polymicrobial infection.," *J. Immunol.*, vol. 169, no. 6, pp. 2823–7, Sep. 2002.
- [136] B. Ferwerda, S. Alonso, K. Banahan, M. B. B. McCall, E. J. Giamarellos-Bourboulis, B. P. Ramakers, M. Mouktaroudi, P. R. Fain, N. Izagirre, D. Syafruddin, T. Cristea, F. P. Mockenhaupt, M. Troye-Blomberg, O. Kumpf, B. Maiga, A. Dolo, O. Doumbo, S. Sundaresan, G. Bedu-Addo, R. van Crevel, L. Hamann, D.-Y. Oh, R. R. Schumann, L. a B. Joosten, C. de la Rúa, R. Sauerwein, J. P. H. Drenth, B.-J. Kullberg, A. J. a M. van der Ven, A. V Hill, P. Pickkers, J. W. M. van der Meer, L. a J. O'Neill, and M. G. Netea, "Functional and genetic evidence that the Mal/TIRAP allele variant 180L has been selected by providing protection against septic shock.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 25, pp. 10272–7, Jun. 2009.

## 10. Anhang

### 10.1 Buchstabencode der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstaben-Code	Einbuchstaben-Code	Ladung
Alanin	Ala	A	Neutral
Arginin	Arg	R	Positiv
Asparagin	Asn	N	Neutral
Asparaginsäure	Asp	D	Negativ
Cystein	Cys	C	Neutral
Glutamin	Gln	Q	Neutral
Glutaminsäure	Glu	E	Negativ
Glycin	Gly	G	Neutral
Histidin	His	H	Negativ
Isoleucin	Ile	I	Neutral
Leucin	Leu	L	Neutral
Lysin	Lys	K	Positiv
Methionin	Met	M	Neutral
Phenylalanin	Phe	F	Neutral
Prolin	Pro	P	Neutral
Serin	Ser	S	Neutral
Threonin	Thr	T	Neutral
Tryptophan	Trp	W	Neutral
Tyrosin	Tyr	Y	Neutral
Valin	Val	V	Neutral

Abbildung 10-1: Buchstabencode der Aminosäuren

### 10.2 Primer

Name	Sequenz (5' - 3')
CMVPEout	GGAGGTCTATATAAGCAGAG

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5' - 3')</b>
<b>E.f.11.1</b>	GGAGTGTAACCATAAATGACCT
<b>E.f.11.2</b>	GCGGTTTCGCTCACTACT
<b>E.f.56.1</b>	CCGTGAAATTATCGGCTT
<b>E.f.56.2</b>	CTCCTGGCTGTACACCTGT
<b>E.f.82.1</b>	CGCTCACTACTAATAACACCTT
<b>E.f.82.2</b>	CCAAACGCTCACTACTAATAACA
<b>E.f.seq.1</b>	GATGTTGAGTAGTGAGCAACG
<b>E.f.seq.2</b>	CTCCTCCAATTACTCTACCTTCTC
<b>E.f.seq.3</b>	CCGTACATCGCTCTATAATCAC
<b>E.f.seq.4</b>	CTTGTAACGTCTAAATGCATC
<b>E.f.seq.5</b>	GTCTAAATGCATCACTTTTAATTACTC
<b>LEUseq1</b>	ACAAACAGCGAATTGCAG
<b>pASK-for</b>	GAGTATTTTACCACTCCCT
<b>pASK-rev</b>	CGCAGTAGCGGTAAACG
<b>pTpcC-Flag-For</b>	ATCCGCGGATCCATAGCATATGAAAACATAGAATTT
<b>pTpcC-Flag-ForS</b>	ATCCGCGGATCCATATGCTTGGTGAATGTTTTGG
<b>pTpcC-Flag-Rev</b>	GCGAGTCTCGAGTTATCTTCTCCTGTATGCTATTTTCAGC
<b>SVPA-Sout</b>	TTGTAACCATTATAAGCTGC
<b>TIR seq.1</b>	GAGTGGAAGGAGGTTGAG
<b>TIR seq.2</b>	ATGCTATTCCAGCCAACTCTC
<b>TIR1</b>	GCGCCGGATCCATCTGTCTATCAC
<b>TIR10</b>	ACGACTGGTCTCATATCAGATAAATAATTTAACTGGCT
<b>TIR11</b>	ACTACTGGTCTCAGCGCCATCTCTTATAATCATGA
<b>TIR12</b>	ACGACTGGTCTCATATCATTACCTTTAATCAACATAT
<b>TIR13</b>	ACGACTGGTCTCAGCGCTGATAAATAATTTAACTGGCT
<b>TIR14</b>	ACTACTGGTCTCGAATGATCTCTTATAATCATGA

Name	Sequenz (5' - 3')
<b>TIR15</b>	ACTACTGGTCTCAGCGCCTATAATATCCTTTTCTTCATC
<b>TIR16</b>	ACGACTGGTCTCATATCACTTTATCTTCTCCTGTATGC
<b>TIR2</b>	TCGAGTGATAGACAGATGGATCCG
<b>TIR3</b>	GCATGGCGCCAATGAGAGTATCAGT
<b>TIR4</b>	CACTGGATCCTTAACTAACATATTTTTTGATCA
<b>TIR5</b>	ACTACTGGTCTCGAATGATAGCATATGAAAAC
<b>TIR6</b>	ACGACTGGTCTCAGCGCTTCTTCTCCTGTATGCTA
<b>TIR7</b>	ACTACTGGTCTCGAATGAATGAGAGTATCAGT
<b>TIR8</b>	ACGACTGGTCTCAGCGCTATCAACATATTTTTTGATC
<b>TIR9</b>	ACTACTGGTCTCAGCGCCAATGAGAGTATCAGT
<b>TK1- CFT073-1</b>	CATGGAATTTATACTGTCTATTGGTG
<b>TK10</b>	GCAGTACTCGAGCAATTACTCTACCTTCTC
<b>TK11</b>	ACCAGTGGATCCGTGAGCAACGGGAAAAAGT
<b>TK12</b>	GTGACTGGATCCAATGAGAGTATCAGTGAT
<b>TK13</b>	GCAGTACTCGAGCCTTTAATCAACATATTTTTTGATC
<b>TK14</b>	GCAGTACTCGAGTTAAGAGATAAATAATTTAACTG
<b>TK15</b>	GTGACTGGATCCATCTCTTATAATCATGAAGTA
<b>TK2- CFT073-2</b>	ACGTATACTAAACAATATGTGGAATGAG
<b>TK3- CFT073-3</b>	CCTACATCTGTTTATACTAAGCTAGGTC
<b>TK4</b>	ACTACTGGTCTCAGCGCCGTGAGCAACGGGAAAAAGAT
<b>TK5</b>	AGCACTGGTCTCGTATCACTCCAATTACTCTACCTTCTC
<b>TK6</b>	ACTACTGGTCTCGAATGGTGAGCAACGGGAAAAAGAT
<b>TK7</b>	AGCACTGGTCTCAGCGCTCTCTACCTTCTCTAAATAAGA
<b>TK8</b>	AGCACTGGTCTCAGCGCTCAATTGCTCTACCTTCTCT
<b>TK9</b>	ACCAGTGGATCCGTAGTGAGCAACGGGAA
<b>UPEC seq1</b>	GAATGTTTTGGGCAACAATATG
<b>UPEC seq2</b>	ACATAGGCTCAAAATGTGATAGC

Name	Sequenz (5' - 3')
UPEC seq3	TCTTCTCCTGTATGCTATTTTCAGC
UPECseq4	AACCAAACATCACAAGAAGC
UPECseq5	CATCTGTTTATACTAAGCTAGGTCTGT
UPECseq6	GTGGAAAACCTTCTATGCC
UPECseq7	GTGGTAGTTATCTATACCCTACATCTG

**Tabelle 10-1: Primertabelle**

**11. Publikationsverzeichnis**

T. D. Kraemer, O. D. Quintanar Haro, E. Domann, T. Chakraborty, and S. Tchatalbachev, "The TIR Domain Containing Locus of *Enterococcus faecalis* Is Predominant among Urinary Tract Infection Isolates and Downregulates Host Inflammatory Response.," *Int. J. Microbiol.*, vol. 2014, p. 918143, Jan. 2014.

S.-Y. Ko, A. Pegu, R. S. Rudicell, Z. Yang, M. G. Joyce, X. Chen, K. Wang, S. Bao, T. D. Kraemer, T. Rath, M. Zeng, S. D. Schmidt, J.-P. Todd, S. R. Penzak, K. O. Saunders, M. C. Nason, A. T. Haase, S. S. Rao, R. S. Blumberg, J. R. Mascola, and G. J. Nabel, "Enhanced neonatal Fc receptor function improves protection against primate SHIV infection.," *Nature*, vol. 514, no. 7524, pp. 642–5, Oct. 2014.

## 12. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachgehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### **13. Danksagung**

Mein erster Dank gilt selbstverständlich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Trinad Chakraborty für die Übertragung des äußerst anspruchsvollen und interessanten Projekts sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes einschließlich aller nötigen Mittel. In jeder Phase dieser Arbeit konnte ich stets auf seine professionelle und umfangreiche Unterstützung zählen. Insbesondere möchte ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen sowie die großzügige Freiheit während des gesamten Projektes bedanken. Ich konnte während des Forschungsprojektes eine Vielzahl an neuen Techniken und Methoden erlernen. Die Unterstützung von Herrn Chakraborty ging weit über das Forschungsprojekt hinaus, sodass ich mich durch seine großzügige Empfehlung erfolgreich für Stipendien und Forschungsaufenthalte im Ausland bewerben konnte. Seine große Expertise und Förderbereitschaft waren eine stetige Motivation für das Gelingen dieser Arbeit.

Einen ganz besonderen und herzlichen Dank möchte ich meinem Betreuer Dr. Svetlin Tchatalbachev aussprechen. Herr Tchatalbachev hat mich in ein weites Spektrum an molekularbiologischen Techniken und Verfahren eingeführt. Von Anfang bis Ende und über diese Doktorarbeit hinaus kamen mir sein großes Wissen und seine herausragenden Fähigkeiten zugute. Dabei konnte ich stets auf seine Unterstützung und seine Bereitschaft in vielen Gesprächen und Diskussionen Sachverhalte zu besprechen und zu erklären zählen. Ihm habe ich meine Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten zu verdanken. Ich habe in Herrn Tchatalbachev einen sehr sachkundigen wie auch warmherzigen Betreuer gefunden, der einen entscheidenden Teil für das Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Eugen Domann möchte ich für seine umgängliche und kompetente Kooperation danken. Er hat durch die Bereitstellung der HWI Isolate einen wertvollen Beitrag zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit geleistet.

Einen großen Dank möchte ich außerdem an meinen mexikanischen Kollegen Orlando Daniel Quintanar Haro richten, der mir bei den statistischen Analysen und der Proteinaufreinigung tatkräftig zur Seite stand. Es hat mir viel Freude bereitet mein während dieser Arbeit erlangtes Wissen zu teilen und ich hoffe, dass ich meine Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten weitergeben konnte.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meinen Kollegen Martin Leustik, Helena Pillich, und Maria Loose für ihre Anregungen und Hilfsbereitschaft bedanken. Besonderer Dank gilt Martin Leustik, der mich in die Arbeit mit Proteinen eingeführt hat.



Für die Mithilfe und Unterstützung bei der Plasmid- und Proteinaufreinigung möchte ich mich recht herzlich bei Juri Scharlenko bedanken.

Frau Dr. Katrin Gentil möchte ich meinen herzlichen Dank für die Korrekturen und die fokussierten Verbesserungsvorschläge aussprechen.

Für die großzügige finanzielle Unterstützung bedanke ich mich beim Deutschen Zentrum für Infektionsforschung.

Abschließend möchte ich der gesamten Abteilung der Medizinischen Mikrobiologie sowohl auf Seiten der Wissenschaft als auch auf Seiten der Diagnostik meinen Dank für eine ergebnisreiche und freudige Zusammenarbeit aussprechen.