

Aus dem
Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl Bakteriologie
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. J. Heesemann

**Untersuchung der humoralen Immunantwort auf virulenzassoziierte Proteine
extraintestinal pathogener *Escherichia coli***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sebastian Loos

aus
Siegen

Jahr
2008

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Sören Schubert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Josef Briegel
Priv. Doz. Dr. med. Michael Kabesch

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 12. 2008

Die Erstbeschreibung von *Escherichia coli* durch Theodor Escherich:



Deckglaspräparat des *Bacterium coli commune* (ab 1919: *Escherichia coli*),
Färbung mit Anilinwassergentianaviolett, Vergrößerung 840fach,
In: T. Escherich, Die Darmbakterien des Säuglings und ihre Beziehung zur
Physiologie der Verdauung, Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart, 1886

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungen.....	4
Einheiten	6
1 Einleitung	7
1.1 <i>E. coli</i> als Krankheitserreger.....	7
1.2 Pathogenitätsfaktoren von ExPEC.....	8
1.3 Pathogen-Wirts-Interaktion bei Harnwegsinfektionen	12
1.4 Relevanz und Strategien einer ExPEC-Immunisierung.....	13
1.5 Ziel der Arbeit.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Geräte.....	17
2.2 Nährmedien.....	18
2.3 Antibiotika und Chemikalien.....	19
2.4 Puffer und Lösungen.....	20
2.5 Enzyme	22
2.6 Primer.....	23
2.7 Bakterienstämme und Plasmide.....	24
2.8 Rekombinante Proteine.....	24
2.9 Antikörper	25
2.10 <i>E. coli</i> -Isolate	25
2.11 Kreuzadsorbierte Seren.....	25
2.12 Mikrobiologische Methoden.....	26
2.12.1 Kultivierung von Bakterien	26
2.12.2 Keimzahlbestimmung von Bakterienkulturen	27
2.12.3 Lagerung	27
2.13 Molekularbiologische Methoden	27
2.13.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
2.13.2 Analytische Agarose-Gelelektrophorese	28

Inhaltsverzeichnis

2.13.3	Präparative Agarose-Gelelektrophorese.....	29
2.13.4	TOPO TA-Klonierung.....	29
2.13.5	Plasmidisolierung.....	31
2.13.6	Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen	31
2.13.7	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	32
2.13.8	Ligation von DNA.....	32
2.13.9	Vorbereitung und Transformation von Bakterien	33
2.13.10	DNA-Sequenzierung	33
2.14	Proteinmethoden.....	34
2.14.1	Proteinexpression in Bakterien.....	34
2.14.2	Nickel-Affinitätschromatographie	35
2.14.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	36
2.14.4	Coomassie-Färbung.....	37
2.14.5	MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	37
2.14.6	Immunoblot	37
2.14.7	Ponceau-Färbung.....	40
2.15	Tierexperimentelle Arbeiten	40
2.15.1	Vorbereitung der Infektionsdosis	40
2.15.2	Intraperitoneale Infektion.....	40
2.15.3	Gewinnung von Mausseren.....	41
2.16	Behördliche Genehmigungen	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Daten zu <i>E. coli</i> -Isolaten und Seren	42
3.2	Nachweis ExPEC-assoziiierter Gene bei <i>E. coli</i> -Isolaten	43
3.3	Rekombinante Herstellung von ChuA	45
3.3.1	Klonierung von <i>chuA</i>	45
3.3.2	Konstruktion des Expressionsvektors pASK-IBA33plus <i>chuA</i>	47
3.3.3	Expression und Aufreinigung von ChuA	51
3.4	Untersuchung der Immunantwort beim Menschen	53
3.5	Untersuchung der Immunantwort bei der Maus.....	58
4	Diskussion	61

5 Zusammenfassung	70
Literaturverzeichnis	72
Danksagung	82
Lebenslauf.....	83

Abkürzungen

AHT	Anhydrotetrazyklin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
BK	Blutkultur
BSA	Rinderserumalbumin
<i>chuA</i> , ChuA	<i>E. coli heme utilization</i> , Häminrezeptor
Cam	Chloramphenicol
CNF 1	<i>cytotoxic necrotising factor 1</i>
DAF	<i>decay accelerating factor</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxytyrosintriphosphat
EAEC	enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
EPEC	Enteropathogene <i>Escherichia coli</i>
ETEC	enterotoxische <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	extraintestinal pathogene <i>Escherichia coli</i>
FimH	Untereinheit von Typ 1 Fimbrien
<i>fyuA</i> , FyuA	<i>ferric yersiniabactin uptake</i> , Yersiniabaktinrezeptor
Gal	Galaktosid
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HUS	hämolytisch urämisches Syndrom
HWI	Harnwegsinfektion
Ig	Immunglobulin
<i>iha</i> , Iha	<i>IrgA (iron regulated gene A) homologue adhesin</i>
IL	Interleukin
IPEC	intestinal pathogene <i>Escherichia coli</i>
<i>ireA</i> , IreA	<i>iron responsive element</i>
<i>iroN</i> , IroN	Salmochelinsrezeptor
<i>irp1</i> , <i>irp2</i>	<i>iron repressible protein</i>

<i>iutA/IutA</i>	<i>iron uptake transport</i> , Aerobaktinrezeptor
Kan	Kanamycin
KBE	koloniebildende Einheit
KU	Katheterurin
LB	<i>lysogeny broth</i> / Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI-TOF	<i>Matrixassisted Laser Desorption/Ionisation- Time of Flight</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MSU	Mittelstrahlurin
NBD	Nutrient Broth 2,2'-Dipyridyl
NMEC	neugeborenenmeningitis-assoziierte <i>Escherichia coli</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte
OMP	<i>outer membrane protein</i> , Außenmambbranprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PapG	Untereinheit von P Fimbrien
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , mit Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribnukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOC	<i>super optimal catabolite repression</i>
SPEC	sepsis-assoziierte <i>Escherichia coli</i>
TAE	Tris-Acetat EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS-T	<i>tris buffered saline</i> , mit Tris gepufferte Salzlösung plus Tween 20
TEMED	N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin
TLR 4	<i>toll-like receptor 4</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ÜN	über Nacht
UPEC	uropathogene <i>Escherichia coli</i>
<i>usp/Usp</i>	<i>uropathogen specific protein</i>
UV	ultraviolett

Einheiten

°C	Grad Celsius
bp	Basenpaare
Da	Dalton
F	Farad
g	Gramm
G	Gauge
h	Stunde
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
m	Meter
M	Molarität
min	Minute
mol	Mol
pH	pH-Wert
s	Sekunde
U	<i>Unit</i> , Einheit
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Ω	Ohm

Präfixe:

k	kilo-
c	centi-
m	milli-
μ	micro-
p	pico-
n	nano-

1 Einleitung

1.1 *E. coli* als Krankheitserreger

In der Taxonomie von Bakterien wird die Spezies *Escherichia coli* der Familie der *Enterobacteriaceae* und der Gattung *Escherichia* zugeordnet. Es handelt sich um ein gramnegatives Stäbchen, das durch β -Galaktosidase zur Laktosespaltung befähigt ist. Eine Einteilung in Serovare ist anhand der O-, K- und H-Antigene möglich. Die O-Antigene sind Seitenketten der Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Membran, bei den K-Antigenen handelt es sich um Kapselpolysaccharide und die aus Protein bestehenden Flagellen bilden die H-Antigene. Durch Kombination der Antigene lassen sich über tausend Serovare (Serotypen) identifizieren.

Grundsätzlich kann bei *E. coli* zwischen apathogenen Kommensalen im Darm des Menschen und pathogenen *E. coli* unterschieden werden. Anhand der unterschiedlichen klinischen Manifestation der Infektionen werden extraintestinal pathogene (ExPEC) von intestinal pathogenen *E. coli* (IPEC) abgegrenzt.

Darmpathogene *E. coli* werden eingeteilt in die Pathotypen EHEC, ETEC, EIEC, EPEC und EAEC. Allen intestinal pathogenen *E. coli* ist gemein, dass die Infektion über die orale Aufnahme kontaminierter Speisen oder kontaminierten Wassers verursacht wird. Für die Pathogenität spielen Adhäsine und Toxine eine wichtige Rolle. Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) produzieren Shiga-Toxine (Toxine der Spezies *Shigella*, Synonym: Verotoxine) und führen zu einer hämorrhagischen Kolitis. Es kann sich ein hämolytisch urämisches Syndrom (HUS) mit Thrombozytopenie, Hämolyse und Nierenversagen entwickeln. Hingegen treten bei einer Infektion mit enterotoxischen *E. coli* (ETEC) durch die gebildeten hitzestabilen (ST) und hitzlabilen Toxine (LT) wässrige Durchfälle auf. ETEC sind der Hauptverursacher des in der angloamerikanischen Literatur als *traveler's diarrhea* bezeichneten Krankheitsbildes. Enteroinvasive *E. coli* (EIEC) rufen entsprechend ihrer Ähnlichkeit zu Shigellen ein der bakteriellen Ruhr ähnliches Krankheitsbild hervor. Enteropathogene *E. coli* (EPEC) sind der typische Erreger der Säuglingsdiarrhö. Auch enteroaggregative *E. coli* (EAEC) führen v. a. bei Säuglingen und Kleinkindern zu Durchfallerkrankungen. Beide besitzen hohe epidemiologische Relevanz in Entwicklungs- und Schwellenländern.

Bei den Infektionen durch ExPEC handelt es sich zum größten Teil um Harnwegsinfektionen (HWI). Weitere häufige extraintestinale Infektionen sind Pneumonien, Wundinfektionen, Peritonitis und die Neugeborenenmeningitis (Russo & Johnson, 2003). ExPEC werden zudem häufig als Ursache septischer Krankheitsbilder identifiziert, die oft von einem primären Harnwegsinfekt ausgehen. Anhand der hervorgerufenen Infektion können ExPEC in Pathotypen wie uropathogene *Escherichia*

coli (UPEC), neugeborenenmeningitis-assoziierte *E. coli* (NMEC) und sepsis-assoziierte *E. coli* (*sepsis-associated pathogenic E. coli*, SPEC) unterteilt werden.

ExPEC bzw. UPEC sind die häufigsten Erreger von Harnwegsinfektionen überhaupt. Dabei stammen die Erreger meist aus der Normalflora des Darmes, den sie, ohne pathogen zu sein, kolonisieren können und ascendieren in die primär sterilen Harnwege. Die typischen Symptome wie z. B. Dysurie und Pollakisurie sowie der Nachweis einer Keimzahl $\geq 10^5$ KBE/ml im Urin erlauben die Diagnose einer Cystitis (Faro & Fenner, 1998). Eine Pyelonephritis äußert sich als schweres Krankheitsbild in der Regel durch Flankenschmerz, Fieber, Übelkeit und Erbrechen.

Prädisponierend für eine Harnwegsinfektion können auf der Seite des Wirts eine Immunsuppression oder eine anatomische und/oder funktionelle Harnabflussstörung sein. Ebenso kann ein Blasenkatheter eine Infektion stark begünstigen. In diesen Fällen spricht man auch von einer komplizierten Harnwegsinfektion.

Generell besteht bei Frauen durch die mögliche Kolonisation des Scheidenvorhofs und die dort mündende kürzere Urethra ein erhöhtes Risiko einen Harnwegsinfekt zu erleiden (Williams & Schaeffer, 2004). Besonders häufig betroffen sind junge Frauen mit höherer sexueller Aktivität sowie Frauen nach der Menopause. Etwa die Hälfte aller Frauen bekommen bis zu ihrem 30. Lebensjahr mindestens einen Harnwegsinfekt (Foxman *et al.*, 2000). Danach treten nach Schätzungen bei 20-30 % dieser Frauen weitere HWI auf. Die Zahl unkomplizierter Cystitiden wird in den USA auf sieben Millionen und weltweit 150 Millionen Fälle pro Jahr geschätzt (Russo & Johnson, 2003). Dadurch entstehen allein in den USA Kosten von über einer Milliarde Dollar pro Jahr (Foxman, 2002). Zusammen mit den weiteren durch ExPEC ausgelösten Krankheitsbildern wie Pneumonie, Peritonitis, Wundinfektionen und Sepsis bedeutet dies neben einer erheblichen Morbidität und Mortalität geschätzte Kosten von über vier Milliarden US-Dollar pro Jahr in den USA durch diese Gruppe von Bakterien (Russo & Johnson, 2003).

1.2 Pathogenitätsfaktoren von ExPEC

Die Pathogenität eines bakteriellen Erregers, d. h. die Möglichkeit eine Infektion mit entsprechenden Symptomen und Krankheitszeichen auszulösen, ist häufig gebunden an spezifische Pathogenitätsfaktoren. Wichtige Determinanten für die Infektion mit ExPEC sind die unter diesen Stämmen vorhandenen Pathogenitätsfaktoren wie Adhäsine, Toxine, Eisenaufnahmesysteme und teilweise Kapsel- bzw. Membranbestandteile (Johnson, 1991; Oelschlaeger *et al.*, 2002).

Bei ExPEC sind eine ganze Reihe dieser Faktoren identifiziert worden. Sie unterstreichen die genetischen und phänotypischen Unterschiede zu darmpathogenen *E. coli* (Johnson & Russo, 2002). Die Verteilung der einzelnen Faktoren unter ExPEC ist sehr heterogen und einzelne Faktoren lassen sich auch bei apathogenen *E. coli* nachweisen. Darüber hinaus ist eine exakte Zuordnung von Pathogenitätsfaktoren zu

bestimmten anatomischen Lokalisationen der extraintestinalen Infektion wie z. B. Harnwege oder Meningen bisher nicht möglich, was die Abgrenzung einzelner Pathotypen unter ExPEC wie UPEC und NMEC etc. eher willkürlich erscheinen lässt. Einen Überblick über die Pathogenitätsfaktoren von ExPEC bietet Abbildung 1.1.

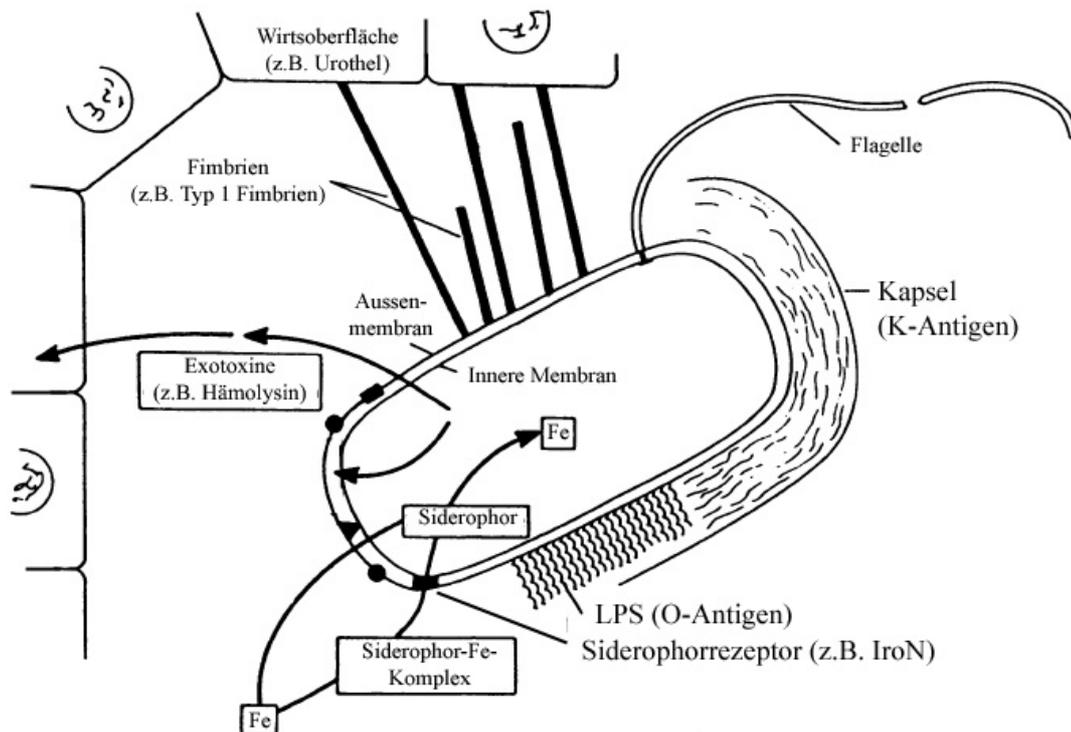


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der Pathogenitätsfaktoren von extraintestinal pathogenen *E. coli* (modifiziert aus Johnson, 1991)

Den ersten Schritt der Infektion stellt die Adhärenz des Bakteriums an die Wirtsoberfläche dar. Zur Anheftung verfügen ExPEC über nichtfimbriale Adhäsine und Fimbrien. Die wichtigsten Vertreter sind Typ 1 (Synonym: Typ 1 Pili) und P Fimbrien. Daneben gibt es Dr, S und F1C Fimbrien. Typ 1 Fimbrien sind zu über 90% sowohl unter apathogenen als auch pathogenen *E. coli* verbreitet (Johnson, 1991; Schlager *et al.*, 2003). Für die Auslösung von Harnwegsinfekten spielen sie eine wichtige Rolle (Struve & Krogfelt, 1999). Die an der Spitze von Typ 1 Fimbrien lokalisierte Untereinheit FimH vermittelt die Bindung an Trimannosereste von Glykoproteinen. Beispiele für solche Glykoproteine sind im Zusammenhang mit Harnwegsinfektionen die Proteine Uroplakin Ia und Ib von Urothelzellen (Mulvey, 2002). P Fimbrien werden bei 30-50% der Cystitis-Isolate und bei 70-90% der Pyelonephritis-Isolate nachgewiesen (Johnson & Russo, 2005). P Fimbrien wird v. a. eine Bedeutung bei der Kolonisierung des oberen Harntraktes zugeschrieben (Wullt *et al.*, 2000). Bindungsstelle der Untereinheit PapG von P Fimbrien sind die Gal- α (1-4)-Gal-Ketten von

Glykosphingolipiden des Nierenbeckenepithels (Mulvey, 2002). Zu den nichtfimbrierten Adhäsinen zählen die Afa Adhäsine der Dr Familie (Goluszko *et al.*, 2001). Für sie wird eine Interaktion mit dem Protein *decay accelerating factor* (DAF) beschrieben, das auf Epithelien vorkommt.

Neben Adhärenz haben sich für Fimbrien weitere Funktionen nachweisen lassen. Typ 1 und P Fimbrien führen u. a. über den *toll-like receptor 4* (TLR4) zu einer direkten Aktivierung von Entzündungsprozessen (Mulvey *et al.*, 1998; Frendeus *et al.*, 2001). Darüber hinaus spielen Typ 1 Fimbrien bei Bildung von Biofilmen eine Rolle (Schembri & Klemm, 2001) und dienen als Invasine (Mulvey *et al.*, 2000). Invasine erlauben dem Bakterium in eine Wirtszelle einzudringen. Dieser Mechanismus bildet die Grundlage eines neuen Konzeptes, das *E. coli* nicht mehr als obligat extrazelluläres Bakterium sieht. Durch die Invasion von Epithelzellen gelingt es *E. coli* sich der Wirtsantwort zu entziehen, in der Zelle zu persistieren und dadurch möglicherweise Ursache für Rezidive von Harnwegsinfektionen zu sein (Mulvey, 2002).

Zu den von ExPEC abgegebenen Toxinen (Exotoxine) gehören das α -Hämolysin und der *cytotoxic necrotising factor 1* (CNF 1). α -Hämolysin bildet Poren in der Zellmembran und führt so zur Zellyse (Bhakdi *et al.*, 1996). Bei Lyse von Erythrozyten führt es so im Zusammenspiel mit Siderophoren (s. u.) zu einer Erhöhung des zur Verfügung stehenden Eisens. CNF 1 ist ein Toxin, das über die Aktivierung von Rho-GTPasen in die Regulierung des Aktin-Zytoskeletts, der DNA-Transkription, der Zellproliferation und der Apoptose eingreift sowie proinflammatorische Effekte hat (Falzano *et al.*, 2003; Hoffmann & Schmidt, 2004).

Als *uropathogen specific protein* (Usp) wird ein neuer mit ExPEC assoziierter Faktor bezeichnet. Ein Beitrag zur Virulenz im Harnwegsinfektionsmodell der Maus konnte von Yamamoto *et al.* gezeigt werden (Yamamoto *et al.*, 2001), jedoch ist die genauere Aktivität bisher weitgehend unbekannt. Offensichtlich handelt es sich aber um ein nach extrazellulär abgegebenes Protein (Kurazono *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2001).

Auch den Bestandteilen der bakteriellen Oberfläche von *E. coli* werden verschiedene Bedeutungen für die Pathogenität zugeschrieben. Die Kapsel verhindert die Komplementaktivierung und trägt damit zur erschwerten Phagozytose und zur Serumresistenz, d. h. zur Verhinderung der Bildung eines *membrane attack complex* (MAC), bei (Horwitz & Silverstein, 1980; Suerbaum *et al.*, 1994). Auch für die O-Antigene ist eine Beeinflussung der Serumresistenz wahrscheinlich. Als klassisches Endotoxin setzt das Lipopolysaccharid (LPS) durch eine Bindung an *toll-like receptor 4* (TLR 4) eine proinflammatorische Signalkaskade in Gang und führt so zu einer Entzündungsreaktion, die lokal die Ausbreitung einer Infektion durch Gewebsschädigung sowie einen systemischen Endotoxinschock hervorrufen kann (Beutler, 2000). Das K1- Antigen wird v. a. bei ExPEC-Stämmen gefunden, die Auslöser der Neugeborenenmeningitis sind (Xie *et al.*, 2004).

Im menschlichen Organismus und bei Prokaryonten wird Eisen z. B. für die Cytochrome der Atmungskette und wichtige Enzyme wie Katalasen, Peroxidasen und Nitrogenasen als Kofaktor benötigt. Sowohl bei Prokaryonten als auch bei höheren Lebewesen haben sich komplexe Mechanismen zur Eisenaufnahme und –verstoffwechselung entwickelt, da zweiwertiges Eisen (Fe^{2+}) rasch zu dreiwertigem Eisen (Fe^{3+}) oxidiert wird und aus diesem wiederum unter physiologischen Bedingungen (wässrige Lösung, neutraler pH-Wert, aerob) schwerlösliches Eisenhydroxid ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) entsteht. Zwischen pathogenen Bakterien und dem Wirtsorganismus entsteht so eine Konkurrenzsituation, die die Versorgung mit Eisen zu einem wichtigen Schritt bei der Kolonisierung und Etablierung einer Infektion macht. Ein wesentlicher Teil des Eisens (70 %) im menschlichen Körper ist Bestandteil von Hämoglobin. Das Eisen in Myoglobin und Enzymen (12 %), an Ferritin gebundenes Speichereisen (18 %) und im Blut durch Bindung an Transferrin transportiertes Fe^{3+} (0,1 %) macht demgegenüber den weitaus geringeren Anteil aus. Im menschlichen Organismus kann zudem Laktoferrin als direkter Gegenspieler in der Versorgung des Bakteriums mit Eisen angesehen werden. Laktoferrin ist ein in Serum, Muttermilch und Speichel vorkommendes Protein, das u. a. bei der Degranulation von neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird (Schaible & Kaufmann, 2004). Insgesamt führt diese Situation dazu, dass freies Eisen im Wirtsorganismus in Konzentrationen im Bereich von 10^{-18} mol/l vorliegt (Bullen *et al.*, 2005). Dies liegt deutlich unter der für das Wachstum von *E. coli* optimalen Konzentration. Um in diesem Milieu den Bedarf an Eisen zu sichern, verfügen ExPEC über mehrere Eisenaufnahmesysteme. So produzieren die Bakterien beispielsweise Eisenchelatoren (sog. Siderophore). Siderophore sind niedermolekulare hochaffine Chelatoren, die Eisen aus den Trägerproteinen des Wirtes herauslösen und freies Eisen binden. Die Siderophore mit gebundenem dreiwertigem Eisen (Fe^{3+}) werden dann über Rezeptoren in der äußeren Bakterienmembran und Transportproteine nach intrazellulär aufgenommen (Braun, 2003). Die wichtigsten unter ExPEC weit verbreiteten Siderophorsysteme sind das Aerobaktinsystem, das Salmochelinsystem und das Yersiniabaktinsystem, die nach dem entsprechenden Siderophor benannt sind und spezifische Siderophorrezeptoren einschließen (s. Tabelle 1.1). Siderophore können im Wirtsorganismus wiederum durch Albumin gebunden werden. Neben der häufigen Verbreitung dieser Eisenaufnahmesysteme unter ExPEC konnte in verschiedenen Untersuchungen der Einfluss auf die Pathogenität von ExPEC gezeigt werden (Torres *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 2002; Negre *et al.*, 2004).

Tabelle 1.1 Siderophorsysteme

Siderophorsystem	Rezeptor
Aerobaktinsystem	IutA
Salmochelinsystem	FyuA
Yersiniabaktinsystem	Iron

Neben der Siderophor-vermittelten Eisenaufnahme ist die Aufnahme von an Citrat gebundenem Eisen und von Transferrin möglich. Auch Hämin, das durch die rasche Oxidation freien Häms entsteht, kann direkt über den unter ExPEC sehr weit verbreiteten Häminrezeptor ChuA in die Bakterienzelle aufgenommen werden (Torres & Payne, 1997; Nagy *et al.*, 2001). Als homologe Proteine der Außenmembranproteine von Eisenaufnahmesystemen wurden außerdem die Proteine IreA und Iha bei ExPEC identifiziert (Russo *et al.*, 2001; Kanamaru *et al.*, 2003). Da Eisenaufnahmesysteme sowohl bei pathogenen als auch in geringerer Zahl bei kommensalen *E. coli* nachgewiesen werden können (s. Tabelle 4.1, S. 63), entspricht ihre Rolle nicht dem klassischen Verständnis von Pathogenitätsfaktoren. Vielmehr scheint der Vorteil in einer besseren Adaptation an bestimmte Umgebungsbedingungen zu liegen. Deshalb werden Eisenaufnahmesysteme gelegentlich auch als „Fitnessfaktoren“ bezeichnet.

Im Allgemeinen können die genannten Pathogenitätsfaktoren auf Plasmiden oder chromosomal kodiert sein (Groisman & Ochman, 1996). Insgesamt besteht dabei bei ExPEC eine erhebliche Variabilität des Genoms. Es hat sich gezeigt, dass die pathogenitätsassoziierten Gene bei ExPEC häufig in vom Kerngenom getrennten Gen-Gruppen (*cluster*) liegen. Dies spricht dafür, dass es unter ExPEC zu einer allmählichen Akkumulation von Pathogenitätsfaktoren gekommen ist. Bei bestimmten Gen-Gruppen lassen sich dabei strukturelle Charakteristika finden, die auf die Möglichkeit zum horizontalen Gentransfer hindeuten und die zur Definition der Pathogenitätsinsel (*pathogenicity island*) als DNA-Strukturelement geführt haben (Hacker *et al.*, 1990). Solche Pathogenitätsinseln tragen Pathogenitätsgene und zeichnen sich durch einen hohen GC-Gehalt aus. Sie besitzen darüber hinaus Gene für Integrasen und Transposasen sowie Insertionselemente. Am Anfang und am Ende werden sie von Sequenzwiederholungen (*direct repeats*, DR) begrenzt und sind mit tRNA-Genen assoziiert (Hacker *et al.*, 1997; Hochhut *et al.*, 2005). Eine Reihe dieser Pathogenitätsinseln konnten, wie auch bei anderen *Enterobacteriaceae*, bei ExPEC nachgewiesen werden. Häufige dort kodierte Pathogenitätsfaktoren sind α -Hämolyisin, Adhäsine und Faktoren im Zusammenhang mit Serumresistenz und Eisenaufnahme. Modellorganismen für die Untersuchung von Pathogenitätsinseln sind die UPEC-Stämme 536, J96 und CFT073 (Schmidt & Hensel, 2004). Interessanterweise werden sehr ähnliche Pathogenitätsinseln bei unterschiedlichen *Enterobacteriaceae* gefunden. So konnte die zuerst bei Yersinien nachgewiesene *High Pathogenicity Island* (HPI), eine Insel, die u. a. für die Gene *fyuA*, *irp1* und *irp2* des Yersiniabaktinsystems kodiert, bei *E. coli* nachgewiesen werden (Schubert *et al.*, 1998; Schubert *et al.*, 2000). Die HPI ist hochgradig mit ExPEC assoziiert und an der Virulenz beteiligt (Schubert *et al.*, 2002).

1.3 Pathogen-Wirts-Interaktion bei Harnwegsinfektionen

Durch ihr Repertoire von Pathogenitätsfaktoren gelingt es ExPEC in den Harnwegen zu adherieren, sich auszubreiten und sich vor der Immunabwehr des Wirtsorganismus zu

schützen. Im Wirtsorganismus wiederum werden Mechanismen der angeborenen sowie konsekutiv der erworbenen Immunität in Gang gesetzt.

Mit ihren Fimbrien heften sich die Bakterien über spezifische Bindungsstellen an die Urothelzellen an (Mulvey, 2002). Im Urin vorhandene Proteine wie das Tamm-Horsfall-Protein, Defensine und das Komplementsystem stellen in dieser Phase die ersten Abwehrschritte dar. Das Tamm-Horsfall-Protein bindet dabei u. a. an Typ 1 Fimbrien (Pak *et al.*, 2001) und ist darüber hinaus ein proinflammatorisches Signalmolekül (Saemann *et al.*, 2005). Durch die aktive Exfoliation betroffener Urothelzellen werden adherente Bakterien mit dem Harn ausgeschwemmt (Mulvey *et al.*, 1998). Kommt es zu Bindung von LPS und Fimbrienproteinen an TLR4 von Urothelzellen und Leukozyten, initiiert dies eine Signalkaskade, die zur Produktion von Zytokinen wie Interleukin 6 (IL6), Interleukin 8 (IL8), Tumornekrosefaktor (TNF) und γ -Interferon (IFN γ) führt (Freundes *et al.*, 2001; Hedlund *et al.*, 2001; Fischer *et al.*, 2005). Dadurch wird die Einwanderung von phagozytierenden Zellen der angeborenen Immunabwehr wie polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und Makrophagen bewirkt (Godaly *et al.*, 2001). Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Aktivierung der erworbenen Immunität (Uehling *et al.*, 1999). Im Urin finden sich nun Immunglobuline (Ig), v. a. sekretorisches IgA, aber auch IgM und IgG (Nicolle *et al.*, 1988; Salit *et al.*, 1988). Als quantitativ wichtigstes Immunglobulin im Urin wird dabei IgA angesehen (Deo & Vaidya, 2004). Sekretorisches IgA (sIgA), das gegen Fimbrienantigene gerichtet ist, kann dabei offenbar bereits die initiale Adhärenz von Bakterien verhindern (Kucheria *et al.*, 2005). So nimmt bei Primaten die Dauer einer Zystitis mit höheren Serum- und Urinkonzentrationen von Immunglobulinen, die gegen *E. coli* gerichtet sind, ab (Hopkins & Uehling, 1995).

1.4 Relevanz und Strategien einer ExPEC-Immunsierung

Aufgrund der hohen sozioökonomischen Bedeutung von Harnwegsinfektionen gibt es schon länger bestehende Bestrebungen eine Impfung gegen ExPEC zu entwickeln. Die in den letzten Jahren zunehmenden Antibiotikaresistenzen unter *E. coli* bieten hierfür ein zusätzliches Argument. Die Behandlung unkomplizierter Harnwegsinfekte wird durch Resistenzen gegen die bisherigen Standardantibiota wie Trimethoprim-Sulfmethoxazol oder Flurochinolone erschwert (Brown *et al.*, 2002; Mehnert-Kay, 2005; Zhanel *et al.*, 2005). Unter einigen Isolaten, besonders von nosokomialen Infektionen, finden sich außerdem ESBL-Produzenten (*extended-spectrum β -lactamase*). Sie sind gegen ein breites Spektrum von Antibiotika aus der Gruppe der β -Laktame unempfindlich (Woodford *et al.*, 2004).

Da es sich bei *E. coli* trotz der Fähigkeit zur Epithelinvasion weitgehend um einen extrazellulären Erreger handelt, ist insbesondere die Bildung protektiver Antikörper als Ziel einer Vakzinierung von Interesse. Sie sorgen einerseits durch Opsonisierung für die erleichterte Phagozytose der Bakterien und stören vermutlich andererseits die Funktion von an der bakteriellen Oberfläche lokalisierten Pathogenitätsfaktoren. Deshalb gelten

besonders dortige Strukturen wie Polysaccharide, Fimbrien und Außenmembranproteine (*outer membrane proteins*, OMP) als potentielle Zielantigene einer Immunisierung.

Es hat sich generell gezeigt, dass eine systemische Immunantwort, d. h. der Nachweis von Antikörpern im Serum, nicht unbedingt mit einer mukosalen Immunantwort und insbesondere der dortigen Bildung von IgA einhergeht (Neutra & Kozlowski, 2006). Umgekehrt lassen sich aber meist bei Nachweis einer lokalen mukosalen Immunantwort auch Serumantikörper nachweisen. Ein Einfluss des Applikationsweges, z. B. parenteral versus oral oder intravaginal, wird bei der Entwicklung einer Impfung gegen ExPEC zu berücksichtigen sein (Langermann, 1996).

Die ersten Versuche an Tieren, bei denen analog zu den bekannten Impfungen gegen *Haemophilus influenzae* Serotyp B (Hib), Pneumokokken und Meningokokken aktive und passive Immunisierungen gegen Kapselpolysaccharide und O-Antigene von ExPEC eingesetzt wurden, zeigten protektive Effekte (Kaijser & Ahlstedt, 1977; Kaijser *et al.*, 1978). Aufgrund der hohen Antigenvariabilität von K- und O-Antigenen unter *E. coli* war dieser Ansatz für ein breites Erregerspektrum jedoch auf Dauer nicht Erfolg versprechend (Russo & Johnson, 2006).

Wegen ihrer wichtigen Rolle in der Pathogenese und der weiten Verbreitung von Fimbrien wurden dann Immunisierungsversuche mit Fimbrienantigenen unternommen. Hiermit konnte im Pyelonephritis-Modell der Maus ein Effekt auf die Kolonisierung des Harntraktes bei Immunisierung mit aufgereinigten P Fimbrien oder mit synthetischen Untereinheiten erzielt werden (Schmidt *et al.*, 1988; Pecha *et al.*, 1989). Bei Primaten wurde durch Impfung mit P Fimbrien oder mit den Untereinheiten PapDG die Häufigkeit der Entstehung einer Pyelonephritis vermindert (Roberts *et al.*, 1984; Roberts *et al.*, 2004). Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine parenterale Immunisierung mit rekombinantem FimH, der Untereinheit von Typ 1 Fimbrien, und dem zugehörigen periplasmatischen Chaperon FimC einen Schutz gegen Cystitis bei Mäusen und Affen erzeugte (Langermann *et al.*, 1997; Langermann *et al.*, 2000). Welchen Schutz eine solche Immunisierung gegen die Pyelonephritis und andere extraintestinale Infektionen durch ExPEC bietet, ist bisher unklar. Mit S und F1C Fimbrien, die auch weit unter ExPEC verbreitet sind, wurden bisher keine Versuche durchgeführt.

Zu den OMP zählen u.a. die bei ExPEC häufig vorkommenden und pathogenitätsrelevanten Rezeptoren von Eisenaufnahmesystemen. Durch die parenterale Immunisierung von Mäusen mit dem rekombinanten Außenmembranrezeptor Iron konnte ein Schutz gegen renale Infektionen im Modell der aufsteigenden Harnwegsinfektion erreicht werden (Russo *et al.*, 2003). In einer aktuellen Arbeit trat im Peritonitismodell der Maus durch Immunisierungen mit rekombinantem FyuA und Iron eine signifikant verminderte Letalität auf (Durant *et al.*, 2007). Weitere Eisenaufnahmerezeptoren wie IreA und Iha wurden bisher nicht als mögliche Zielstrukturen untersucht.

Von Interesse ist auch der Einsatz ganzer Bakterienzellen zur Immunisierung, da so das Immunsystem mit einer Reihe von Antigenen konfrontiert wird und diese zudem nicht durch rekombinante Herstellung und Aufreinigung in ihrer Konformation verändert sind. Hierbei werden abgetötete Stämme uropathogener *E. coli* teilweise in Mischungen mit anderen uropathogenen Erregern verwendet. In mehreren klinischen Studien konnte dabei bei Frauen nach oraler oder intravaginaler Applikation zumindest bei bereits bestehendem HWI die Dauer bis zu einem Rezidiv verlängert werden (Russo & Johnson, 2006). Ein neuer Ansatz bei der Verwendung von ganzen Zellen zur Immunisierung ist der Einsatz von Stämmen, die durch genetische Veränderung kapsel- und O-Antigen-defizient sind. Hierdurch lässt sich in der Maus eine verstärkte humorale Immunantwort gegenüber den übrigen Bestandteilen der Zelloberfläche erzielen, da diese offensichtlich durch die fehlenden Kapselbestandteile dem Immunsystem gegenüber vermehrt exponiert sind (Russo *et al.*, 2007).

Aber auch Antigene, die nicht an der Oberfläche der Bakterien liegen, könnten sich als Zielstrukturen eignen. So führte die Immunisierung mit aufgereinigtem α -Hämolysin im Pyelonephritis-Model der Maus zu einer reduzierten renalen Schädigung (O'Hanley *et al.*, 1991).

Bei der Identifizierung potentieller Antigene für Immunisierungen werden in Zukunft neue Methoden einen anderen und breiteren Zugang ermöglichen. Zum einen wurde die *reverse vaccinology* etabliert, bei der aus Genomdaten von pathogenen im Vergleich zu apathogenen Erregern *in silico* Kandidatengene ermittelt werden und hinsichtlich der Eigenschaften des kodierten Proteins, z. B. ob es sich um Außenmembranprotein handelt, untersucht werden. Dieser für andere pathogenen Spezies wie z. B. Meningokokken bereits erfolgreich verfolgte Ansatz (Giuliani *et al.*, 2006) konnte auch für ExPEC erste Ergebnisse liefern und führte neben der Bestätigung von bereits bekannten Faktoren wie FyuA und IroN zu neuen, unbekanntem immunogenen Proteinen (Durant *et al.*, 2007). Daneben gewinnen Methoden der Immunproteomik an Bedeutung, bei denen infizierte Individuen im Immunoblot auf Antikörperreaktionen gegen Erregerproteine getestet werden. Dafür wird das Proteom des Erregers meist einer 2D-Gelelektrophorese unterzogen, um die einzelnen Proteine zu separieren und immunogene Proteine einer massenspektrometrischen Analyse zugänglich zu machen. Für ExPEC konnte so eine Immunantwort auf die Eisenaufnahmerezeptoren ChuA, IroN, IreA, Iha und IutA in der Maus nach einem Langzeitharnwegsinfekt gezeigt werden (Hagan & Mobley, 2007).

Insgesamt ist aufgrund der großen genetischen Diversität unter ExPEC und der damit sehr unterschiedlichen Häufigkeit der besprochenen Faktoren davon auszugehen, dass die Immunisierung mit einem einzelnen Faktor keinen breiten Schutz gegen Infektionen mit ExPEC bietet. Es wird also nötig sein, Zielstrukturen für Immunisierungen gegen ExPEC zu definieren und diese in einem Impfstoff zu kombinieren.

1.5 Ziel der Arbeit

Bei extraintestinal pathogenen *E. coli* sind eine Reihe spezifischer Pathogenitätsfaktoren bekannt. Mehrere dieser Faktoren wie z.B. Fimbrien, O- und K-Antigene wurden als Antigene in Immunisierungsversuchen gegen ExPEC eingesetzt. Eine weitere wichtige Gruppe von potentiellen Zielstrukturen stellen die Außenmembranproteine von ExPEC dar. Hierunter sind besonders Eisenaufnahmerezeptoren von Interesse. Sie sind Bestandteil der unter ExPEC weit verbreiteten und mit der Pathogenität assoziierten Eisenaufnahmesysteme. Bisherige Immunisierungen mit den Siderophorrezeptoren IroN und FyuA zeigten im Tierversuch erste positive Resultate.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob bei Patienten, die eine Infektion mit *E. coli* haben, eine humorale Immunantwort auf solche Eisenaufnahmerezeptoren gefunden werden kann. Ein positives Ergebnis könnte als weiterer Hinweis darauf gewertet werden, dass sich Eisenaufnahmerezeptoren tatsächlich als potentielle Zielstrukturen einer Immunisierung eignen und sich ggf. eine protektive Antikörperantwort induzieren lässt.

Dazu sollten im Immunoblot Antikörper gegen diese ExPEC-assoziierten Proteine in Seren von Patienten mit einer *E. coli*-Infektion nachgewiesen werden. Ausgewählt wurden der Häminrezeptor ChuA sowie die Siderophorrezeptoren IroN und FyuA. Zusätzlich sollte das von ExPEC mit bisher unklarer Funktion nach extrazellulär abgegebene Protein Usp untersucht werden. In einem weiteren Versuch sollten zum Vergleich Seren aus dem Mausinfektionsmodell analog zu den humanen Seren untersucht werden. Mögliche Einflussfaktoren auf die Induzierung einer Antikörperantwort sollten dadurch kontrolliert werden. Im Wesentlichen sollte dabei die Intensität der Infektion bei der Maus (Harnwegsinfektion versus Peritonitis) Beachtung finden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Tabelle 2.1 Geräte

Geräteart:	Bezeichnung:	Hersteller/Vertrieb
Molekularbiologische Methoden		
DNA/Protein-Software	Lasergene 5.08	DNASTAR, Madison, USA
DNA-Elektrophorese-kammern	Horizontalkammern	PEQLAB, Erlangen
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II und Pulse Controller II	BioRad, München
Elektroporationsküvetten	Gene Pulser Cuvette	Bio-Rad, München
PCR-Cycler	GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosciences, Foster-City, USA
Speedvac	DNA-Speedvac 110 Savant	Global Medical Instrumentation, Ramsey, USA
Proteinmethoden		
Protein-Elektrophorese-Kammern	Mini Protean	Bio-Rad, München
Elektroblot-Apparatur	Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Allgemein		
Analysewaagen	Grobwaage: KERN 440-33N	Kern & Sohn, Albstadt
	Feinwaage: Type 1801	Sartorius, Göttingen
Brutschränke für Bakterien	Heraeus T12	Heraeus, Hanau
	Heraeus T20	
Bunsenbrenner	FireBoy plus	Integra Biosciences, Wallisellen
Heizplatte	IKA-RCT basic	IKA-Werke, Staufen
Heizblock	Unitek HB-130	Miyachi Unitek. Monrovia, USA
Tischinkubator	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	pH3000	Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten, Weilheim
Röntgenfilm-Entwickler	FPM-100A	Fuji Photo Film, Tokio, Japan
Schüttelinkubatoren	Certomat BS-1	Vitaris, Baar
	Certomat R mit Certomat H	
	CMV-Rom (Drehrad)	Fröbel Labortechnik, Lindau
Spannungsquelle	PowerPac	Bio-Rad, München

2 Material und Methoden

Spektralphotometer	Ultrospec 3100	Amersham Biosciences, Cambridge, UK
Tischinkubator	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator	TFX-20.M	Vilber Lourmat, La Vellee, Frankreich
Video Printer	UP-895 CE	Sony, Tokio, Japan
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifugen	Super T21, Rotor: ST-H750	Thermo Electron Corporation, Waltham, USA
	5417C, Rotor: FA 45-30-11	Eppendorf, Hamburg
	5417R, Rotor: FA 45-30-11	
	5810R, Rotor: FA 45-30-11	

2.2 Nährmedien

Trypton, Hefeextrakt und Nutrient Broth wurden von Becton-Dickinson (Heidelberg) bezogen. Die Sterilisation der Nährmedien erfolgt durch Autoklavieren (121 °C, 1 bar, 20 min).

LB-Medium:

1 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
0,5 % NaCl
pH 7,4 - 7,6

Festmedium durch Hinzufügen von Agar
15 g/l

SOC-Medium:

2 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glucose
pH 7,0

NBD-Medium:

0,8 % Nutrient Broth
0,5 % NaCl
200 µM 2,2'-Dipyridyl
pH 7,4-7,6

MacConkey-Platten (Becton-Dickinson, Heidelberg)

Blutagarplatten (Becton-Dickinson, Heidelberg)

2.3 Antibiotika und Chemikalien

Tabelle 2.2 Antibiotika

Antibiotikum (Hersteller)	Abkürzung	Konzentration in Medien
Ampicillin (Roth, Karlsruhe)	Amp	100 µg/ml
Kanamycin (Serva, Heidelberg)	Kan	50 µg/ml
Chloramphenicol (Roth, Karlsruhe)	Cam	30 µg/ml

Tabelle 2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agarose	Invitrogen, NV Leek, Niederlande
Anhydrotetrazyklin (AHT)	Invitrogen, NV Leek, Niederlande
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rinderserumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Coomassie Brilliant Blue	Biomol, Hamburg
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Serva, Heidelberg
Essigsäure	E.Merck, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml EtBr)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerol	ICN Biomedicals, Ohio , USA
Glycin	Biomol, Hamburg
Methanol	E.Merck, Darmstadt
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biomol, Hamburg
N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	E.Merck, Darmstadt
Tris-Acetat	ICN Biomedicals, Ohio , USA
Tris-HCL	ICN Biomedicals, Ohio , USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β-Mercaptoethanol	E.Merck, Darmstadt

2.4 Puffer und Lösungen

Molekularbiologische Methoden

Screening-PCR:	PCR-Puffer:	10 mM Tris HCl, pH 9.0
	Incubation Mix T.Pol ohne Mg ²⁺ (Invitrogen, Paisley, UK)	50 mM KCl 0,1 % TritonX100 0.2 mg/ml BSA
	Mg ²⁺ -Lösung (Invitrogen, Paisley, UK)	25 mM MgCl ₂
	dNTP (Invitrogen, Paisley, UK)	jedes dNTP 10 mM
Klonierungs PCR:	PCR-Puffer:	
	LA PCR Buffer II ohne Mg ²⁺ (Takara, Shiga, Japan)	
	Mg ²⁺ -Lösung (Takara, Shiga, Japan)	25 mM MgCl ₂
	dNTP (Invitrogen, Paisley, UK)	jedes dNTP 10 mM
Analytische und präperative Gelelektrophorese:	Laufpuffer: TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA
	5x Probenpuffer	50% Glycerol 0,05 % Bromphenolblau 200 mM EDTA, pH 8,0
	Größenstandard (1 kb): Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)	
	Größenstandard (100 bp): Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)	
Restriktionsverdau:	Restriktionsendonukleasepuffer: REact® 2 (Invitrogen, Paisley, UK)	50 mM Tris-HCL pH 8,0 10 mM MgCl ₂ 50 mM NaCl

Ligation:	5xLigationspuffer für T4-Ligase (Invitrogen, Paisley, UK)	250 mM Tris-HCL pH 7,6 50mM MgCl ₂ 5 mM ATP 5mM DTT 25% Polyethylenglycol
<u>Proteinmethoden</u>		
Gelelektrophorese:	Laufpuffer nach Laemmli	60 mM Tris-HCl, pH 8,3 0,1 % SDS 192 mM Glycin
	5x Probenpuffer	600 mM Tris-HCl pH 6,8 10 % SDS 20 % Glycerol 5 % β-Mercaptoethanol 0,05 % Bromphenolblau
	Größenstandard: PageRuler™ Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)	
	Protogel (National Diagnostics, Atlanta, USA)	30 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylamid
Coomassie-Färbung:	Coomassie-Lösung	50 % Methanol 10 % Essigsäure 40 % Wasser 0,2 % Coomassie Brilliant Blue
Ni- Affinitäts- chromatographie:	Lysepuffer (Puffer B)	1 mM Tris-HCL 6 M Harnstoff 1 mM NaH ₂ PO ₄ pH 8,0
	Waschpuffer (Puffer C)	wie Puffer B, pH 6,3
	Elutionspuffer (Puffer E)	wie Puffer B, pH 4,5
Immunoblot:	Größenstandard: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot)	

2 Material und Methoden

	Western-Transfer-Puffer	25 mM Tris, pH 8,3 192 mM Glycin 20 % Methanol
	TBS-T	20 mM Tris, pH 7,5 137 mM NaCl 0,05 % Tween 20
	Chemiluminiszenzsubstrat: SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate (Pierce, Rockford, USA)	A) SuperSignal® West Pico Luminol/Enhancer Solution B) SuperSignal® West Pico Stable Peroxide Solution (A und B 1:1 mischen)
Ponceau-Färbung:	Ponceau-Lösung	0,1 % Ponceau S 5 % Essigsäure

Allgemein

PBS	3,2 mM Na ₂ HPO ₂ 1,5 mM KH ₂ HPO ₄ pH 7,4 140 mM NaCl 2,7 mM KCl
-----	---

2.5 Enzyme

Tabelle 2.4 Enzyme

Enzym	Bezeichnung	Hersteller
DNA-Polymerase	<i>Taq</i> -Polymerase	Invitrogen, Paisley, UK
	LA- <i>Taq</i> -Polymerase (Polymerase mit 3'→5'- Exonukleaseaktivität (<i>proofreading</i>))	Takara, Shiga, Japan
Restriktions- endonuklease	<i>Pst</i> I (Schnittstelle: CTGCAG)	Invitrogen, Paisley, UK
	<i>Sac</i> I (Schnittstelle: GAGCTC)	Invitrogen, Paisley, UK
	<i>Sst</i> I (Schnittstelle: GAGCTC)	Invitrogen, Paisley, UK
Ligase	T4-DNA-Ligase	Invitrogen, Paisley, UK

2.6 Primer

Hergestellt wurden die Primer, wenn nicht anders angegeben, von Metabion (Martinsried) und in der Konzentration von 100 pmol/μl geliefert. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C. Für den Gebrauch werden Verdünnungen auf 20 pmol/μl hergestellt.

Tabelle 2.5 Primer

Gen	Bezeichnung	Sequenz	Produkt
für Gennachweis			
<i>chuA</i>	chuA-892.for	5'-GGGAGTTCAGGCGAGTATCGT-3'	345 bp
	chuA-1216.rev	5'-CAGCCAGTTGGTCGGGTTGAT-3'	
<i>fyuA</i>	fyuA.1080.for	5'-CTACGACATGCCGACAATGCC-3'	629 bp
	fyuA.1709.rev	5'-TGCTTCCCGCGCCATAACGTG-3'	
<i>iha</i>	iha-irgA-262.for	5'-CTGTACAGCGCTCAGTGACGA-3'	529 bp
	iha-irgA-770.rev	5'-AGGCGGTGTGACCACGGGATA-3'	
<i>ireA</i>	ireA-102.for	5'-TGTTACTGCCTCCGGGTTTAC-3'	418 bp
	ireA-499.rev	5'-CCCAAGTCCAAGTACGCCATC-3'	
<i>iroN</i>	iroD.for	5'-CTGATTGACGGGATTGGTT-3'	900 bp
	iroE.rev	5'-GCATTGACGCCTTTATCTTTC-3'	
<i>irp2</i>	irp2.3141.for	5'-CTCCGCAGAACAGGTAGCCGA-3'	600 bp
	irp2.3749.rev	5'-GCCAGATAATGTCCGCCGAGT-3'	
<i>iutA</i>	iutA-324.for	5'-CAGCAGCCAGAGCCGAACCAA-3'	392 bp
	iutA-695.rev	5'-CATCGCCGTTACCGTCAAACC-3'	
<i>tir</i>	tir.52.for	5'-GGCAACAATATGTATAATATCCT-3'	380 bp
	tir.438.rev	5'-GCCCAGTCTATTTCTGCTAAAGA-3'	
<i>usp</i>	usp-285.for	5'-GGGTGAAGGTACGCCGTATGA-3'	555 bp
	usp-819.rev	5'-ATAAACTGCGCCAATAAACT-3'	
für Klonierung (Schnittstellen für Restriktionsenzyme unterstrichen)			
<i>chuA</i>	F1- <i>chuA</i> .Sst.for	5'-ATCAGAGCTCTTGGTTGGCTTTGGCTGTTTCTGCC-3'	
	R- <i>chuA</i> .Pst.rev	5'-AAACTGCAGCCATTGATAACTCACGAAAATTTT-3'	
für Sequenzierungen (bezogen von Invitrogen, Paisley, UK und IBA, Göttingen)			
	T3	5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'	
	T7	5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'	
	IBA.for	5'-GAGTATTTTACCACTCCCT-3'	
	IBA.rev	5'-CGCAGTAGCGGTAACG-3'	

2.7 Bakterienstämme und Plasmide

Tabelle 2.6 Bakterienstämme und Plasmide

Stamm/Plasmid	Eigenschaften/Genotyp	Herkunft/Referenz
Stamm		
<i>E. coli</i> DH5 α	Laborstamm F ⁻ Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen, Paisley, UK
<i>E. coli</i> CFT073	Pyelonephritiserreger	(Mobley <i>et al.</i> , 1990)
<i>E. coli</i> TOP10	Laborstamm F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS mcrBC</i>) Φ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^r) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Paisley, UK
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	Laborstamm F ⁻ <i>ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>dcm gal</i> (DE3) pLysS(Cam ^r)	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> M15 pREP4	Laborstamm pREP4 (Kan ^r)	Qiagen, Hilden
<i>E. coli</i> J96	Pyelonephritiserreger	(Hull <i>et al.</i> , 1981)
Plasmid		
pCR [®] 4-TOPO [®]	Amp ^r , Kan ^r , Vektor für TOPO TA-Klonierung	Invitrogen, Paisley, UK
pCR4-TOPO <i>chuA</i>	Amp ^r , Kan ^r , PCR-Produkt von <i>chuA</i> über TA-Klonierung in pCR [®] 4-TOPO [®]	diese Arbeit
pASK-IBA33plus	Amp ^r , Expressionsvektor mit (6x)His-tag	IBA, Göttingen
pASK-IBA33plus <i>chuA</i>	Amp ^r , <i>chuA</i> mit <i>Sst</i> I und <i>Pst</i> I aus pCR4-TOPO <i>chuA</i> in <i>Sst</i> I und <i>Pst</i> I Schnittstelle von pASK-IBA33plus ligiert	diese Arbeit
pQE-30	Amp ^r , Expressionsvektor mit (6x)His-tag	Qiagen, Hilden

2.8 Rekombinante Proteine

Die Proteine wurden rekombinant hergestellt, um im Immunoblot spezifische Antikörper in humanen Seren gegen diese Proteine nachzuweisen. Hierzu werden die entsprechenden Gene der Proteine in Vektoren kloniert und das Protein exprimiert. Alle verwendeten Vektoren kodieren zusätzlich für einen Aminosäurerest aus sechs Histidinen, der bei der Expression des Proteins an dieses angehängt wird. So entsteht ein Fusionsprotein, das über dieses (6x)His-tag in einer Nickel-

Affinitätschromatographie aus dem Zelllysat der exprimierenden Bakterien aufgereinigt werden kann. Die Lösungen enthalten etwa 2,0 mg/ml Protein.

Tabelle 2.7 Rekombinante Proteine

Protein	Charakterisierung	Herkunft
ChuA	Klonierung in pASK-IBA33plus und Transformation in <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	diese Arbeit
FyuA	Klonierung in pASK-IBA33plus und Transformation in <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLysS	AG Schubert
IroN	Klonierung in pQE-30 und Transformation in <i>E. coli</i> M15 pREP4	AG Schubert
Usp	Klonierung in pQE-30 und Transformation in <i>E. coli</i> M15 pREP4	AG Schubert

2.9 Antikörper

Tabelle 2.8 Antikörper

Bezeichnung	Herkunft (Hersteller)	Verdünnung im Immunoblot
Anti-Human-IgG-AK	Kaninchen (Sigma, Nr. A-8792)	1:20.000
Anti-Maus-IgG-AK	Ziege (Sigma, Nr. A-4416)	1:10.000
Anti-Kaninchen-IgG-AK	Ziege (Sigma, Nr. A-0545)	1:80.000
Anti-FyuA-Antiserum	Kaninchen (AG Schubert)	1:10.000
Anti-IroN-Antiserum	Kaninchen (AG Schubert)	1:20.000

2.10 *E. coli*-Isolate

Die *E. coli*-Isolate stammen von Patienten der Kliniken Großhadern und Innenstadt der Universität München. Sie wurden im Rahmen der bakteriologischen Routinediagnostik des Max von Pettenkofer-Instituts von April bis Oktober 2005 isoliert. Die Stämme wurden im eigenen Labor zum Erhalt von Einzelkolonien nochmals auf MacConkey-Platten, einem Selektivnährboden für gramnegative Bakterien, ausgestrichen und über Nacht (ÜN) bei 37 °C bebrütet. Für die PCR-Untersuchungen wurden gekochte Zellen der einzelnen Isolate hergestellt. Dazu wird eine Bakterienkolonie in 500 µl Aqua dest. resuspendiert und die Suspension für 10 min bei 100 °C gekocht. Anschließend werden die gekochten Zellen bei -20 °C gelagert.

2.11 Kreuzadsorbierte Seren

Aus der Routinediagnostik der Serologie und der Virologie des Max von Pettenkofer-Instituts stammen die dort gelagerten überzähligen Serumproben der Patienten, bei

denen *E. coli* isoliert wurde (s. 2.10) und die damit wahrscheinlich eine entsprechende Infektion hatten. Zu jedem Patienten sollten zwei Proben gesammelt werden, wobei das erste Serum (Serum 1) um den Tag des *E. coli*-Nachweises, also wahrscheinlich nah am Infektionsbeginn, abgenommen worden sein sollte und das zweite Serum (Serum 2) mindestens zwei Wochen später.

Zum Vergleich wurden die Seren von vier gesunden Freiwilligen aus dem Max von Pettenkofer-Institut eingesetzt. Es handelt sich um eine Frau und drei Männer zwischen 26 und 29 Jahren. Aufgrund von Anamnese, Geschlecht und Alter ist bei ihnen davon auszugehen, dass bisher keine Harnwegsinfekte oder andere Infektionen mit *E. coli* vorlagen.

Ein bekanntes Problem bei Immunoblot-Untersuchungen (s. 2.14.6) ist das unspezifische Binden von Antikörpern an die Proteine auf der Nitrozellulosemembran. Um die Wahrscheinlichkeit von unspezifischen Reaktionen von Serumantikörpern mit den rekombinanten Proteinen oder mit Proteinen des Expressionsstammes, die trotz Aufreinigung zu einem geringen Anteil im Proteingemisch vorliegen, zu reduzieren, wurden die Seren mit dem totalen Zellysate eines apathogenen *E. coli*-Laborstammes inkubiert, der die im Immunoblot untersuchten Proteine nicht exprimiert.

Es wird je eine Kultur der apathogenen *E. coli*-Laborstämme DH5 α , BL21(DE3) pLysS pASK-IBA33plus und M15 pREP4 pQE-30 in Nutrient Broth Dipyrindyl (NBD)-Medium über drei Tage bei 37 °C bebrütet. Das 2,2'-Dipyrindyl komplexiert Eisen und es kommt zu einer vermehrten Expression von für die Eisenaufnahme verantwortlichen Proteinen der Außenmembran. Nach Aliquotierung auf jeweils 500 μ l werden die Zellen bei 14.000 UpM für 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets werden bei -20 °C aufbewahrt. Für den weiteren Einsatz werden die Pellets für 10 min bei 100 °C erhitzt. Mit 1000 μ l TBS-T werden 100 μ l humanes Serum im Verhältnis 1:10 verdünnt. Für die Kreuzadsorption wird 1 ml davon auf ein gekochtes Pellet gegeben. Der Ansatz wird dann für 45 min bei RT im Tischinkubator geschüttelt und dann bei 4300 UpM für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird noch einmal auf ein neues Pellet gegeben und die Prozedur wiederholt. Zum Schluss wird der Überstand aliquotiert und die kreuzadsorbierten Seren werden bei -20 °C gelagert.

2.12 Mikrobiologische Methoden

2.12.1 Kultivierung von Bakterien

Für die Kultivierung in Flüssigmedien wird das entsprechende Medium ggf. mit Zusatz ein oder mehrerer Antibiotika unter Wahrung der Sterilität in ein Glasgefäß gegeben, das eine ausreichende Belüftung zulässt. Mit einer flüssigen Vorkultur oder mit einer Kolonie wird das Medium beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bebrütet.

LB-Agarplatten werden ggf. mit Zusatz entsprechender Antibiotika gegossen. Die Beimpfung erfolgt durch den klassischen Dreiösenausstrich oder durch Ausplattieren

von 100-200 µl einer flüssigen Bakterienkultur unter Verwendung einer abgeflamten Glasöse und eines Drehtisches, auf dem die Agarplatte platziert wird. Blutagarplatten und MacConkey-Platten werden mit dem Dreiösenausstrich beimpft. Die Platten werden ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.12.2 Keimzahlbestimmung von Bakterienkulturen

Die Keimzahl einer Flüssigkultur wird mit Hilfe der Optischen Dichte (OD) abgeschätzt und so das Wachstum von Bakterienkulturen kontrolliert. Die OD entspricht dabei der in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmten Absorption eines Aliquots der Kultur gegen das reine Medium als Leerwert. Die OD in der exponentiellen Wachstumsphase liegt im Bereich von 0,2 bis 0,7. Dies entspricht ca. $1-2,5 \times 10^8$ KBE/ml.

2.12.3 Lagerung

Auf Agarplatten lassen sich Bakterienstämme bei 4 °C ca. 4-6 Wochen lagern. Zur längerfristigen Lagerung wird eine Flüssigkultur abzentrifugiert und das Pellet mit einer 20 %igen Glycerollösung resuspendiert. Die Bakterien können so bei -80 °C aufbewahrt und bei Bedarf neu angezüchtet werden.

2.13 Molekularbiologische Methoden

2.13.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifizierung ausgewählter DNA-Abschnitte, um diese nachzuweisen oder die Kopien einer weitem Verwendung (z. B. Klonierung) zugänglich zu machen. Dazu werden zwei Oligonukleotide (*primer*) gewählt, deren Sequenz komplementär zu einer Sequenz am 3'-Ende von Strang und Gegenstrang der gewünschten Matrize ist. Nach Trennen des Doppelstranges bei 95°C legen sich die Primer bei einer sequenzabhängigen Temperatur an ihre komplementären DNA-Abschnitte an (*annealing*) und dienen einer thermostabilen DNA-Polymerase als Startpunkte für die Synthese eines neuen Gegenstranges vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende. Die so entstandenen neuen Doppelstränge werden wieder getrennt und dienen als Matrize für eine weitere Gegenstrangsynthese. Durch 25 bis 35 Wiederholungen dieses Schrittes wird eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes erreicht.

Zum einen wurde eine *Screening*-PCR durchgeführt, die dem Nachweis bestimmter DNA-Abschnitte dient. Ein 25 µl-Reaktionsansatz enthält:

- 2,5µl 10 x PCR-Puffer
- 4 µl 25 mM Mg²⁺-Lösung (Endkonzentration 4 mM MgCl₂)
- 1 µl 10 mM dNTPs (Endkonz. je 0,4 mM dATP, dCTP,dGTP,dTTP)
- je 0,5 µl 20 µM Primer (Endkonz. 0.4 µM)
- 1 µl Template-DNA (gekochte Zellen, s. 2.10)

2 Material und Methoden

0,2 µl *Taq*-Polymerase (5 U/µl, Endkonz. 0.04 U/µl)
Aqua dest. ad 25 µl

Nach einem einmaligen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 10 min beginnt die Amplifikation der DNA-Abschnitte. Sie wird in 30 Zyklen der folgenden drei Inkubationsschritte im PCR-Cycler Gene Amp PCR System 9700 durchgeführt: 1) Denaturierung der DNA bei 95 °C für 30 s, 2) Bindung der Primer bei der jeweiligen spezifischen Temperatur von 50-62°C für 45 s, 3) DNA-Polymerisierung entsprechend der erwarteten Fragmentgröße für 1-2 min bei 72 °C. Die PCR-Produkte werden anschließend elektrophoretisch in einem 1-2 %igem Agarosegel aufgetrennt und so der Analyse zugänglich (s. 2.13.2).

Zum anderen wurde eine PCR mit dem Ziel der Klonierung der erhaltenen DNA-Abschnitte durchgeführt. Hier werden Primer eingesetzt, deren Sequenz neben einem komplementär zur gewünschten DNA gewählten Teil am 5'-Ende um weitere Basen verlängert sind, die einen spezifischen Angriffspunkt (Schnittstelle) für eine Restriktionsendonuklease darstellen. Kommt es nun wie oben beschrieben zur Anlagerung des Primers an die DNA und zur Synthese eines neuen Stranges, so wird dieser um die Schnittstellensequenz verlängert, so dass ein Fusionsstrang entsteht. Ein 25 µl-Reaktionsansatz enthält:

2,5 µl 10 x PCR-Puffer
4 µl 25 mM Mg²⁺-Lösung (Endkonzentration 4 mM MgCl₂)
2,5 µl 4 mM dNTPs (Endkonz. je 0,4 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
je 0,5 µl 20 µM Primer (Endkonz. 0.4 µM)
1 µl Template-DNA (chromosomale DNA des *E. coli*-Stammes CFT073)
0,2 µl LA-*Taq*-Polymerase (5 U/µl, Endkonz. 0.04 U/µl)
Aqua dest. ad 25 µl

Die einzelnen Schritte entsprechen denen der oben beschriebenen PCR. Für die Denaturierung wird eine Temperatur von 95 °C für 30 s gewählt. Die Anlagerung der Polymerase erfolgt bei 60 °C für 30 s. Die Amplifikation findet bei 72 °C für 2,5 min statt, da größere DNA-Abschnitte zu erwarten sind. Insgesamt werden 30 Zyklen durchlaufen. Danach werden die DNA-Abschnitte über eine Gelelektrophorese und die folgende Isolation aus dem Gel aufgereinigt (s. 2.13.3).

2.13.2 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

In der Gelelektrophorese lassen sich DNA-Abschnitte nach ihrem Molekulargewicht analysieren. Entsprechend ihrer Basenzahl wandern sie dabei unterschiedlich schnell durch das Gel und können am Ende unter UV-Transillumination betrachtet und mit einem Größenstandard verglichen werden. Sichtbar wird die DNA bei der UV-Transillumination durch die Zugabe von Ethidiumbromid, das mit der DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert.

Agarose wird dazu mit einem Anteil von 1-2 % je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente in TAE-Puffer aufgekocht. Nach Abkühlen und vor dem Gießen in die

horizontale Gelkammer werden 0,2 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Nach Verfestigung des Gels werden je 5-10 µl einer Probe mit 1/5 Volumen Probenpuffer versetzt und dann in eine Vertiefung am Rande des Gels pipettiert, die durch Einsatz eines Kammes beim Gießen entsteht. Als Laufpuffer dient TAE. An das Gel wird eine Gleichspannung von 80-100 V angelegt. Nachdem die DNA über das Gel gewandert ist, zeigt sich diese bei Betrachtung des Gels unter UV-Licht als Bande. Die Größe des DNA-Abschnittes in Basenpaaren (bp) kann nun anhand des Größenstandards abgeschätzt werden.

2.13.3 Präparative Agarose-Gelelektrophorese

Hierbei werden DNA-Fragmente nach PCR-Amplifikation oder Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen durch Gelelektrophorese getrennt und aus der Gelmatrix extrahiert. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgt mit dem DNA-Aufreinigungs-Kit der Firma Mo Bio Laboratories (s. Tabelle 2.9). Dabei bindet die DNA unter hohen Salzkonzentrationen und einem pH <7,5 an eine Silikatmatrix, über die dann Agarose, Puffer etc. ausgewaschen werden.

Es wird der gesamte DNA-haltige Ansatz auf das Agarosegel aufgetragen. Das Vorgehen gleicht dem bei der analytischen Gelelektrophorese. Die Fragmente können so wieder unter UV-Licht betrachtet werden und der entsprechende Anteil des Gels wird mit dem Skalpell ausgeschnitten. Das Agarosegelstück mit der darin enthaltenen DNA wird zur Extraktion in seinem dreifachen Volumen (ca. 300 µl) NaClO₄-Lösung bei 55 °C aufgelöst. Die Probe wird auf die Silikatmatrix in einem Röhrchen aufgetragen. Während des Zentrifugierens (10.000 UpM für 30 s) bindet die DNA an die Matrix und Salze, Enzyme, Agarose etc. passieren diese. Der Schritt wird mit der aufgefangenen Fraktion wiederholt, um die Ausbeute zu erhöhen. Danach wird die Matrix zweimal mit einer Ethanol-Lösung gewaschen. Es folgen zwei Trockenzentrifugationen. Anschließend wird die DNA mit 20-50 µl des hierzu bestimmten Puffers oder mit Wasser eluiert.

Tabelle 2.9 Kit zur DNA-Aufreinigung

Bezeichnung (Hersteller)	Komponente	Inhalt
UltraClean™ GelSpin™ DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories, Solana Beach, USA)	GelBind Buffer	NaClO ₄ -Lösung
	GelWash	Tris/Ethanol-Lösung
	Elution Buffer	10 mM Tris pH 8,0
	Spin Filter Units	Silikatmatrix-Röhrchen

2.13.4 TOPO TA-Klonierung

Die Bezeichnung TOPO TA-Klonierung leitet sich aus dem Prinzip eines von der Firma Invitrogen vertriebenen Kits (s. Tabelle 2.10) ab. Dabei werden mittels PCR gewonnene DNA-Fragmente in das linearisierte Plasmid pCR[®]4-TOPO[®] integriert. Die

2 Material und Methoden

Sequenzierung des PCR-Produktes und weitere Klonierungsarbeiten werden dadurch erleichtert.

Bei der PCR hängt die DNA-Polymerase bei jedem Syntheseende eines Stranges unspezifisch ein Desoxyadenosin (A) am 3'-Ende an. Das linearisierte Plasmid pCR[®]4-TOPO[®] trägt an seinen 3'-Enden neben einem Desoxythymidin (T) die daran kovalent gebundene Topoisomerase I des Vaccinia Virus. Diese Phosphodiesterbindung kann bei Basenpaarung zwischen A und T vom 5'-Hydroxylrest des PCR-Produktes angegriffen werden. Die Topoisomerase löst sich und das PCR-Produkt ist in den Vektor integriert (s. Abbildung 2.1).

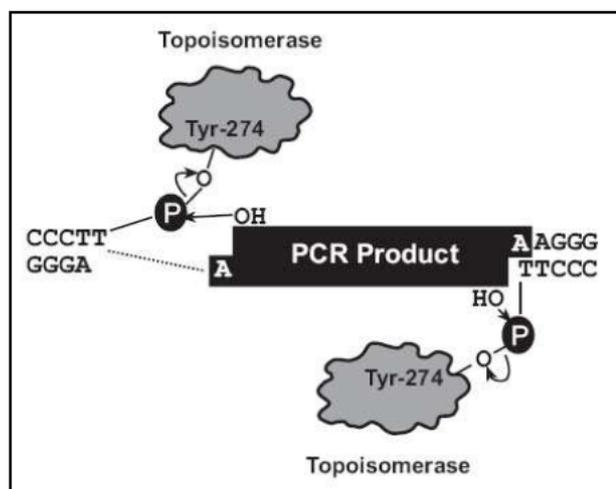


Abbildung 2.1 Ausschnitt des Klonierungsvektors pCR[®]4-TOPO[®] (aus TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing Handbuch, Version H, Invitrogen, Paisley, UK)

Für eine Klonierung wird folgender Ansatz gewählt:

- 0,5 µl Salzlösung
- 2 µl Lösung des PCR-Produktes
- 0,5 µl Lösung des Vektors

Der Ansatz wird 5 min bei 23 °C inkubiert. Im Anschluss werden die Plasmide in den elektrokompetenten *E. coli*-Stamm Top10 transformiert. Dazu werden 100 µl der kompetenten Zellen mit 2 µl des Ansatzes vermischt. Danach wird die Transformation wie unter 2.13.9 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 2.10 Kit zur TOPO TA-Klonierung

Bezeichnung (Hersteller)	Komponente	Spezifizierung
TOPO TA Cloning [®] Kit for Sequencing (Invitrogen, Paisley, UK)	Salzlösung	1,2 M NaCl, 0,006 M MgCl ₂
	Lösung des Vektors pCR [®] 4-TOPO [®]	10 ng/µl Plasmid-DNA in Puffer
	T3-Primer	s. Tabelle 2.5
	T7-Primer	s. Tabelle 2.5

2.13.5 Plasmidisolierung

Um damit weitere Klonierungsarbeiten durchführen zu können, muss das entsprechende Plasmid (pCR[®]4-TOPO[®] oder Expressionsvektor) aus den plasmidtragenden Bakterienklonen isoliert werden. Dabei werden die Bakterien mit NaOH und SDS alkalisch lysiert und Proteine sowie die gesamte DNA denaturiert. Bei Zugabe von Kaliumacetatpuffer präzipitieren die chromosomale DNA und die übrigen bakteriellen Bestandteile unter dem hohen Salzgehalt. Nach Abzentrifugieren bleibt lediglich die Plasmid-DNA im Überstand. Sie wird dann über eine Silikatmatrix aufgefangen, gereinigt und eluiert.

Es wird eine 15 ml ÜN-Kultur des plasmidtragenden Bakterienstammes in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angelegt. Am Morgen wird diese Kultur bei 4300 UpM für 15 min abzentrifugiert. Zur Isolierung wird ein Kit der Firma Qiagen (s. Tabelle 2.11) verwendet. Das Pellet wird zum Aufschluss der bakteriellen Zellwand in je 500 µl Puffer P1 und P2 resuspendiert. Nach Zugabe von 700 µl Puffer N3 kommt es zur Präzipitation. Nun erfolgt die Zentrifugation mit 13000 UpM für 10 min. Der Überstand wird auf die Säule mit der Silikatmatrix gegeben und zentrifugiert. Es werden zwei Waschschrte mit den Puffern PB und PE durchgeführt, gefolgt von einer Trockenzentrifugation. Mit 50 µl Wasser wird die Plasmid-DNA aus der Säule eluiert.

Tabelle 2.11 Kit zur Plasmidisolierung

Bezeichnung (Hersteller)	Komponente	Verwendung/Inhalt
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)	QIAprep Spin Columns	Silikatmatrix-Röhrchen
	Puffer P1	EDTA, RNase
	Puffer P2	SDS, NaOH
	Puffer N3	Kaliumacetat
	Puffer PB	Waschpuffer
	Puffer PE	Waschpuffer

2.13.6 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Restriktionsendonukleasen (RE) können einen DNA-Doppelstrang an für sie spezifischen Nukleotidsequenzen (Erkennungssequenzen) schneiden. Diese sog. RE-Schnittstellen sind im Allgemeinen 4-8 bp lang. Befinden sich solche Schnittstellen auf einem Plasmid kann dieses so geschnitten werden, dass ein bestimmter DNA-Abschnitt herausgeschnitten wird. Umgekehrt kann das Plasmid durch Schneiden auch linearisiert werden damit ein entsprechendes DNA-Fragment eingefügt werden kann. Dies geschieht dann in einer Ligationsreaktion (s. 2.13.8).

2 Material und Methoden

Folgender Ansatz wird für einen Restriktionsverdau gewählt:

- 6 μl Puffer REact[®] 2
- 10 μl Plasmid-Lösung aus Plasmidisolierung
- 1 μl Enzym *Sst*I (10 U/ μl)
- 1 μl Enzym *Pst*I (10 U/ μl)
- 42 μl Aqua dest.

Die Auswahl des Puffers richtet sich nach den für das jeweilige Enzym angegebenen Empfehlungen des Herstellers. Da die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme *Sst*I und *Pst*I mit dem gleichen Puffer einsetzbar sind, ist ein gemeinsamer Ansatz möglich. Der Ansatz wird 1 h bei 37 °C im Tischinkubator inkubiert. Danach folgt zur Aufreinigung eine präparative Gelelektrophorese (s. 2.13.3), deren Produkte zur Ligation (s. 2.13.8) eingesetzt werden.

2.13.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die richtige Menge an DNA-Lösung zu wählen, die bei der Ligation eingesetzt werden soll, muss vorher die Konzentration der DNA bestimmt werden. Hierzu kann eine Gelelektrophorese eines Aliquots der entsprechenden DNA-Lösung durchgeführt werden. Dabei ist die Intensität der Bande unter UV-Transillumination mit der Menge an DNA in etwa proportional. Vergleicht man die Intensität mit der entsprechenden Bande des mitgeführten 100 bp- bzw. 1 kb-Größenstandards, der eine definierte DNA-Konzentration aufweist, so lässt sich die DNA-Konzentration abschätzen.

Zur Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese s. 2.13.2.

2.13.8 Ligation von DNA

Nachdem ein Plasmid und ein DNA-Fragment mit Restriktionsendonuklasen geschnitten sind (s. 2.13.6), kann bei geeigneter Auswahl der Schnittstellen das DNA-Fragment (*insert*) durch eine Ligase in das Plasmid integriert werden. Durch diesen als Ligation bezeichneten Vorgang entsteht ein neues Plasmid, das durch Transformation in ein Bakterium gebracht werden kann.

Beim Ansatz der Ligation ist darauf zu achten, dass das molare Verhältnis von DNA-Fragment zu Plasmid unter Berücksichtigung der vorher ermittelten Konzentrationen (s. 2.13.7) im Bereich von etwa 3:1 liegt, um die Ausbeute des Vorgangs zu erhöhen. Das Gesamtvolumen des Ansatzes beträgt 10 μl und setzt sich wie folgt zusammen:

- 2 μl 5x Puffer für T4-Ligase
- 1 μl T4-Ligase (1 U/ μl)
- berechnetes Volumen Plasmid-Lösung
- berechnetes Volumen Insert-Lösung
- Aqua dest. ad 10 μl

Die Reaktion erfolgt über 48 h bei 4 °C im Kühlschrank.

2.13.9 Vorbereitung und Transformation von Bakterien

Als Transformation wird die Aufnahme von freier DNA durch ein Bakterium bezeichnet. Bei der freien DNA handelt es sich in dieser Arbeit um ein Plasmid, in das ein DNA-Fragment integriert wird. Da dieses DNA-Fragment einem Gen entspricht, wird dessen Expression bei geeigneter Auswahl des Plasmids (s. 2.14.1) in der Bakterienzelle möglich. Die Transformation kann z. B. durch Elektroporation herbeigeführt werden. Bei der Elektroporation wird kurzzeitig ein starkes elektrisches Feld, in dem sich ein Gemisch aus Bakterienzellen und Plasmiden befindet, erzeugt. Es wird angenommen, dass durch das elektrische Feld Poren in der Bakterienwand entstehen, durch die das Plasmid in das Bakterium gelangt. Um die Bakterien in einem solchen elektrischen Feld platzieren zu können, müssen sie vorher in mehreren Waschschritten von Salzen und Ionen gereinigt werden, die sonst einen Lichtbogen verursachen können. Oft werden die gewaschenen Zellen auch als „elektrokompetente Zellen“ bezeichnet, obwohl es sich nicht um eine Kompetenz zur Aufnahme fremder DNA im engeren Sinne handelt.

Eine neue 500 ml Kultur wird mit 10 ml aus einer 50 ml ÜN-Kultur angeimpft. Bei 37 °C wächst sie bis zu einer OD bei 600 nm von ca. 0,5. Im Weiteren werden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Nach Zentrifugieren der Kultur bei 4300 UpM für 30 min bei 4 °C wird das Pellet durch Resuspendieren und erneutes Zentrifugieren für 15 min gewaschen. Viermal erfolgen diese Waschschriffe mit gekühltem Wasser und abschließend einmal mit einer 10 %igen Glycerollösung. Anschließend werden die Zellen in 10 %iger Glycerollösung aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die zu transformierenden elektrokompeteten Zellen werden behutsam auf Eis aufgetaut. Davon werden 100 µl zusammen mit 2 µl des Ligationsansatzes gemischt und in eine spezielle Küvette gebracht, die in das Elektroporationsgerät gesetzt wird. Es erfolgt die Elektroporation (Einstellungen: U= 1,8 kV, R= 200 Ω, C= 25 µF, Zeitkonstante 3,5-5 ms). Danach werden die elektroporierten Zellen mit Hilfe von 500 µl vorgewärmtem SOC-Medium aus der Küvette aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß überführt, das dann für 1 h bei 37 °C im Tischinkubator geschüttelt wird. Anschließend werden die Bakterien auf entsprechend dem Resistenzgen des Plasmids antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C ÜN bebrütet. So können die erfolgreich transformierten Bakterien selektioniert werden.

2.13.10 DNA-Sequenzierung

Die genaue Basenabfolge von DNA-Abschnitten, z.B. von Plasmiden, kann durch Sequenzierung ermittelt werden. Eine der am weitesten verbreiteten Methoden hierfür ist die modifizierte Kettenabbruchmethode nach Sanger. Dabei werden neben entsprechenden Primern Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) und fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTP), denen die 3'-Hydroxygruppe fehlt, als Substrat eingesetzt. Die DNA-Polymerase kann nach Einbau von ddNTP die entstandene Kette nicht verlängern, so dass es zu basenspezifischen

Abbruchprodukten kommt. Diese können bei der Auftrennung in einer Kapillarelektrophorese über die Fluoreszenz mit einem Laser detektiert werden und daraus die entsprechende Sequenz erstellt werden.

Durchgeführt wurden die Sequenzierungen nach dieser Methode von der Firma Agowa (Berlin). In ein Reaktionsgefäß müssen dazu neben 10 µl einer Lösung des aufgereinigten Plasmids (DNA-Konz. ca. 80 ng/µl) je 4µl der entsprechenden Primerlösung (Konz. 5 pmol/µl) gegeben werden. Die Ergebnisse werden mit Hilfe der Lasergene-Software (Version 5.08) ausgewertet.

2.14 Proteinmethoden

2.14.1 Proteinexpression in Bakterien

Um ein Protein für weitere Untersuchungen zu gewinnen, ist es notwendig dieses Protein in größeren Mengen in Bakterien zu exprimieren. Dazu muß die kodierende DNA mit Hilfe eines Vektors in ein Bakterium gebracht werden. Als Vektor dient ein auch als Expressionsvektor bezeichnetes Plasmid, das u. a. über eine Antibiotikaresistenz und eine Promotorregion verfügt. Über eine *multiple cloning site* (MCS) kann ein Gen hinter dem Promotor, d. h. in 3'-Richtung, eingefügt werden. Außerdem ist ein *origin of replication* (*ori*) über den die Replikation des Vektors stattfindet notwendiger Bestandteil damit dieser an die Tochterzellen weitergegeben werden kann. Mit einem solchen Vektor transformierte Bakterien können über die Antibiotikaresistenz selektioniert und das entsprechende Gen durch Induktion über den Promotor exprimiert werden. In dieser Arbeit findet der Expressionsvektor pASK-IBA33plus Verwendung (s. Abbildung 3.6, S. 48). Dieser Vektor trägt eine Ampicillinresistenz sowie den tet-Promotor, der über Tetrazyklin oder Anhydrotetrazyklin (AHT) in nicht antibiotisch wirksamer Dosis induzierbar ist. Unmittelbar nach bzw. in 3'-Richtung stromabwärts der MCS ist eine Sequenz eingefügt, die direkt aufeinander folgend sechsmal für Histidin kodiert. Dadurch entsteht ein Fusionsprotein des eigentlichen Proteins mit einem carboxyterminalen Hexahistidylrest ((6x) His-tag). Das His-tag kann spezifisch an zweiwertige Ionen, z. B. Nickel (Ni^{2+}), binden. Über eine Affinitätschromatographie lässt sich so das gewünschte Protein aufreinigen.

Eine Kultur in LB-Medium der mit dem Vektor pASK-IBA33plus transformierten Zellen wird bei 37 °C ÜN bebrütet. Mit einem Aliquot werden 10-50 ml einer neuen Kultur im Verhältnis 1:20 angeimpft. Die Kulturen enthalten den entsprechenden Antibiotikazusatz. Das Wachstum der neu angesetzten Kultur erfolgt bis zu einer OD bei 600 nm von 0,5. Nach Entnahme von 2 ml als nichtinduzierte Kontrollprobe werden zur Induktion 200 ng/ml AHT zugegeben und die Kultur für ca. weitere 3 h bei 37 °C geschüttelt. Danach wird die Kultur bei 4300 UpM für 15 min abzentrifugiert. Wenn nötig, wird das Pellet bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

2.14.2 Nickel-Affinitätschromatographie

Ziel ist es, das in Bakterien überexprimierte Protein (s. 2.14.1) durch Aufschluss der Zellen freizusetzen und von den übrigen Zellbestandteilen zu trennen. Um dies zu erleichtern, kann das Ziel-Gen in einen entsprechenden Expressionsvektor inkloniert werden, der nach Transformation die Expression eines Fusionsproteins mit amino- oder carboxyterminalem His-tag erlaubt (s. 2.14.1). Wird das His-tag tragende Protein nun auf eine Säule gegeben, die eine Matrix mit Ni^{2+} -Ionen enthält, kann das Protein dort binden, von übrigem Zelldebris gereinigt und eluiert werden. Verwendet werden hierfür die Ni-NTA Spin Columns der Firma Qiagen (Hilden). Die Matrix dieser Säulen besteht aus an Sepharose, ein Agarosederivat, gebundener Nitrilotriessigsäure (*nitrilotriacetic acid*, NTA), die mit den Nickelionen einen Chelatkomplex bildet (s. Abbildung 2.2.). Das Protokoll folgt den Empfehlungen des Qiagen Ni-NTA Spin Handbook (Auflage 02/2003) für die denaturierende Aufreinigung von Proteinen. Die Zellyse und die Denaturierung der Proteine erfolgt dabei durch den Zusatz von Harnstoff zu den Puffern. Durch Erniedrigung des pH kann die Säule gewaschen und schließlich das aufgereinigte Protein eluiert werden.

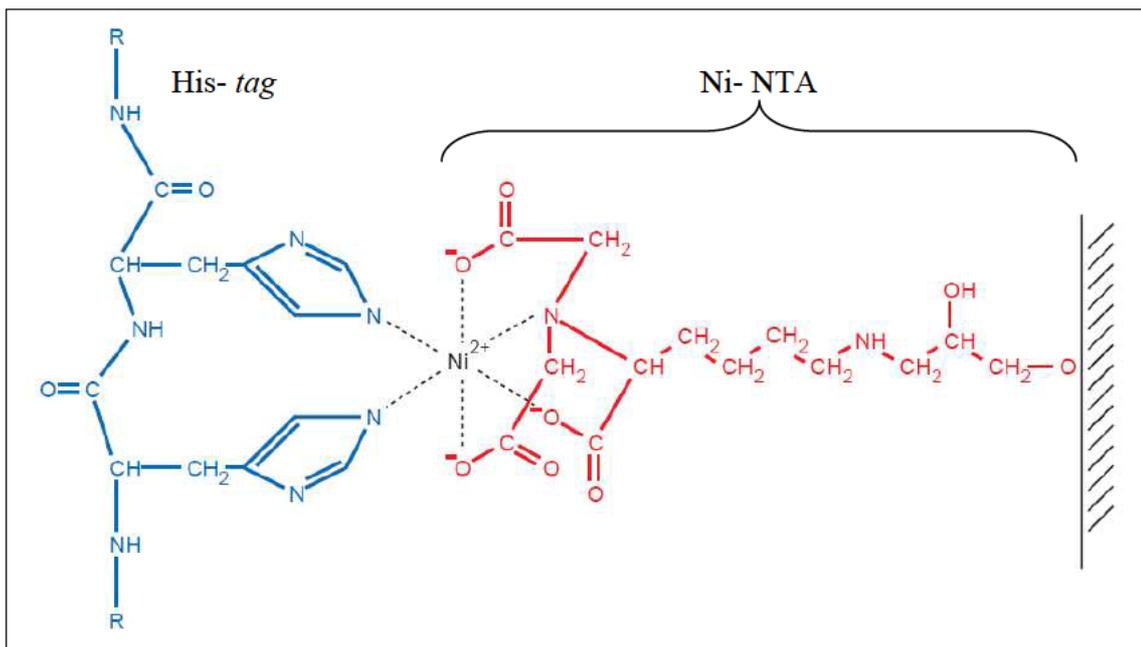


Abbildung 2.2 Interaktion zwischen dem (6x)His-tag und der Nickel-NTA-Matrix (modifiziert aus The QIAexpressionist, 5. Auflage, Qiagen, Hilden)

Die Zellen einer 10 ml- 50 ml Kultur werden pelletiert und in 600 μl Lysepuffer (pH 8,0) für 1 h bei RT lysiert. Der Zelldebris wird bei 10.000 UpM für 30 min abzenrifugiert. Mit 600 μl des Überstandes wird nun die mit Lysepuffer equilibrierte nickelhaltige Matrix in einer Säule beladen und wie in den folgenden Schritten bei 2000 UpM für 2 min zentrifugiert. Die Säule wird jetzt zweimal mit 600 μl Waschpuffer (pH

6,3) befüllt und zentrifugiert. Abschließend wird zweimal mit 200 µl Puffer (pH 4,5) eluiert. Bei den einzelnen Schritten werden immer Proben der aufgefangenen Fraktionen zur späteren Kontrolle gewonnen.

2.14.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) macht die Analyse von Proteinen oder Proteingemischen anhand ihres Molekulargewichtes möglich. Hierzu werden die Proteine in einem Probenpuffer aus SDS und β -Mercaptoethanol chemisch und thermisch denaturiert. Das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) führt dabei durch Anlagerung an die Proteine zu einer relativ zum Molekulargewicht zunehmenden negativen Ladung der Proteine. β -Mercaptoethanol löst durch Reduktion ggf. bestehende Disulfidbrücken. Die Eigenladung des Proteins wird nun insgesamt vernachlässigbar klein, so dass bei Anlegen eines elektrischen Feldes die Laufgeschwindigkeit neben den Geleigenschaften v. a. vom Molekulargewicht des Proteins abhängt. Eine so vorbehandelte Probe wird auf ein Polyacrylamidgel gegeben. Dieses setzt sich aus einem Sammelgel und einem Trenngel zusammen. Das Sammelgel mit einer Endkonzentration von 4 % Acrylamid wird unter Verwendung von Tris-HCl-Puffer (pH 6,8) und das Trenngel mit 10% Acrylamid und Tris-HCl-Puffer (pH 8,8) angesetzt. Als Katalysatoren der Polymerisierung dienen Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin (TEMED). Durch diese Zusammensetzung und den Einsatz eines Tris-Glycin-Puffers als Laufpuffer im Sinne eines diskontinuierlichen Puffersystems werden die Proteine zuerst im Sammelgel konzentriert und dann bei ihrem Lauf durch das Trenngel entsprechend dem Molekulargewicht getrennt. Die Interpretation des Gels wird so durch deutlichere Banden erleichtert.

In eine vertikale Kammer zwischen zwei Glasplatten wird zuerst das Trenngel und darauf das Sammelgel gegossen. In das Sammelgel werden durch Verwendung eines Plastikammes Taschen für die Proben eingepreßt. Folgende Ansätze werden für die Gele verwendet:

<u>Trenngel (Endkonz.: 10 % Acrylamid):</u>	<u>Sammelgel (Endkonz.: 4 % Acrylamid):</u>
3,1 ml Wasser	2,2 ml Wasser
1,9 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	94 µl 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
2,5 ml Protogel*	630 µl Protogel*
50 µl APS	25 µl APS
5 µl TEMED	5 µl TEMED

* Protogel ist eine gebrauchsfertige 30 %ige Acrylamidlösung

Eine Probe wird wie folgt vorbereitet: 10 µl der Proteinlösung werden mit 2 µl Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Danach kühlt die Probe auf Eis

ab und wird dann in eine Tasche des Gels, das sich in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer befindet, pipettiert. Es wird eine Spannung von 200 V angelegt. Als Größenstandard dient eine mitlaufende definierte Proteinlösung. Anhand des Bromphenolblaus im Probenpuffer lässt sich das Fortschreiten der Elektrophorese beurteilen. Um die Proteine sichtbar zu machen wird das Gel anschließend nach Coomassie gefärbt (s. 2.14.4).

2.14.4 Coomassie-Färbung

Die Darstellung der Proteinbanden auf einem Polyacrylamidgel gelingt mittels einer Anfärbung mit Coomassie-Lösung. Dazu wird das komplette Gel für 30 min unter leichtem Schwenken in die Lösung gelegt. Bei der folgenden Entfärbung des Gels mit Wasser bleiben die blauen Proteinbanden erhalten und können im Vergleich zum mitgeführten Marker beurteilt werden.

2.14.5 MALDI-TOF Massenspektrometrie

Die Identität eines rekombinant hergestellten und aufgereinigten Proteins kann in der MALDI (*Matrixassisted Laser Desorption/Ionisation*)- TOF (*Time of Flight*) Massenspektrometrie überprüft werden. Bei diesem Verfahren wird das Protein mit einer Protease (z. B. Trypsin) in Peptide gespalten, die dann massenspektrometrisch untersucht werden. Das erhaltene Peptidmuster wird mit einer Datenbank verglichen und das wahrscheinliche Protein ermittelt.

Das zu untersuchende Proteingemisch wird einer Gelelektrophorese unterzogen und die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die weiteren Analysen wurden durch das Zentrallabor für Proteinanalytik (ZfP) des Adolf Budenandt- Instituts der Universität München durchgeführt.

2.14.6 Immunoblot

Mit dem Immunoblot bzw. Westernblot kann eine spezifische Bindung von Antikörpern an ein Protein sichtbar gemacht werden. Auf der einen Seite ist so der Nachweis eines Proteins mittels spezifischer mono- oder polyklonaler Antikörper möglich. Umgekehrt können aber auch z. B. Seren auf Antikörper gegen ein bekanntes Protein untersucht werden. Dazu werden die Proteine, die sich nach einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese im Gel befinden, wiederum durch Anlegen einer Spannung auf eine Nitrozellulose-Membran gebracht (Blot i. e. S.). Die Primäantikörper, die danach auf die Membran gegeben werden, binden an ihren entsprechenden Epitopen. Die Visualisierung und damit der Nachweis der am Protein gebundenen Antikörper erfolgt durch Einsatz von gegen diese Primäantikörper gerichteten Sekundäantikörpern, die mit einem Enzym konjugiert sind. Dieses Enzym katalysiert eine Chemilumineszenzreaktion, die auf einem Röntgenfilm dokumentiert werden kann. Ein bei der Gelelektrophorese und beim Blot mitgeführter vorgefärbter Größenstandard lässt die Größenordnung der Proteine mit gebundenen Antikörpern zu.

2 Material und Methoden

Die mittels Nickelsäulenchromatographie gereinigten Proteine liegen in einer Konzentration von 2 mg/ml vor. Es werden 70 µl einer Verdünnung von 1:16 (4 µl Proteinlösung plus 64 µl Laufpuffer) einer Proteinlösung zusammen mit 14 µl 5x Probenpuffer auf ein Polyacrylamidgel (s. 2.14.3) gegeben. Das Sammelgel wird hierzu statt mit einzelnen Taschen mit einer durchgehenden Tasche von ca. 7 cm Breite und einer einzelnen Tasche für den Größenstandard gegossen. Die Elektrophorese erfolgt für 50 min mit einer Spannung von 200 V. Die Proteine liegen danach in einer durchgehenden Linie im Gel. Mit dem Größenstandard aus bereits gefärbten Proteinen kann die SDS-PAGE und der folgende Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran kontrolliert werden sowie am Ende die Zuordnung der Antikörperreaktion zu einer bestimmten Proteingröße stattfinden. Nach Abtrennen des Trenngels wird das Sammelgel mit den anderen Materialien wie in Abbildung 2.3 gezeigt aufgeschichtet und in die vertikale mit Western-Transfer-Puffer gefüllte Blotkammer eingesetzt.

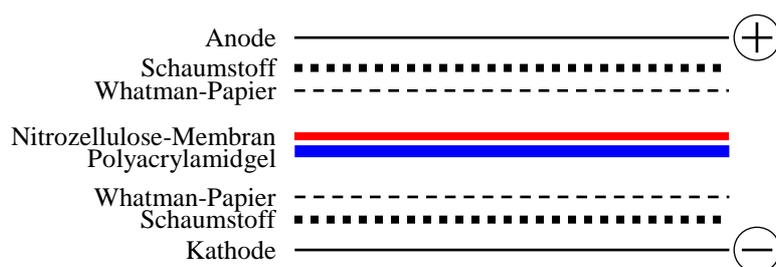


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung der Schichtung in der Blotkammer

Es sollten sich zwischen den einzelnen Schichten keine Luftblasen sammeln. Die nachfolgende Übertragung der Proteine und des Größenstandards auf die Nitrozellulose-Membran erfolgt mit einer Spannung von 90 V für 60 min. Um ein unspezifisches Binden der Antikörper an der Membran zu verhindern, werden im Anschluß freie Bindungsstellen der Membran für eine Stunde in einem Bad aus 10 ml TBS-T mit 5 % Milchpulver abgesättigt. Danach wird die Membran 3 x für 10 min unter leichtem Schütteln mit TBS-T gewaschen. In dieser Arbeit dienten die in Seren enthaltenen Antikörper als Primäantikörper. Die Inkubation der Membran mit Patientenserum erfolgt in einer speziellen Kammer aus Plexiglas, um gleichzeitig mehrere Proben testen zu können (s. Abbildung 2.4). Die Seren werden dazu in einer Verdünnung mit TBS-T/5% Milchpulver von 1:50 bis 1:100 eingesetzt. Antiserum vom Kaninchen als Kontrolle mit 1:10.000 bis 1:20.000. Jede Vertiefung der Kammer wird mit ca. 150 µl des verdünnten Serums beschickt. Die Inkubationszeit beträgt 1,5 h.

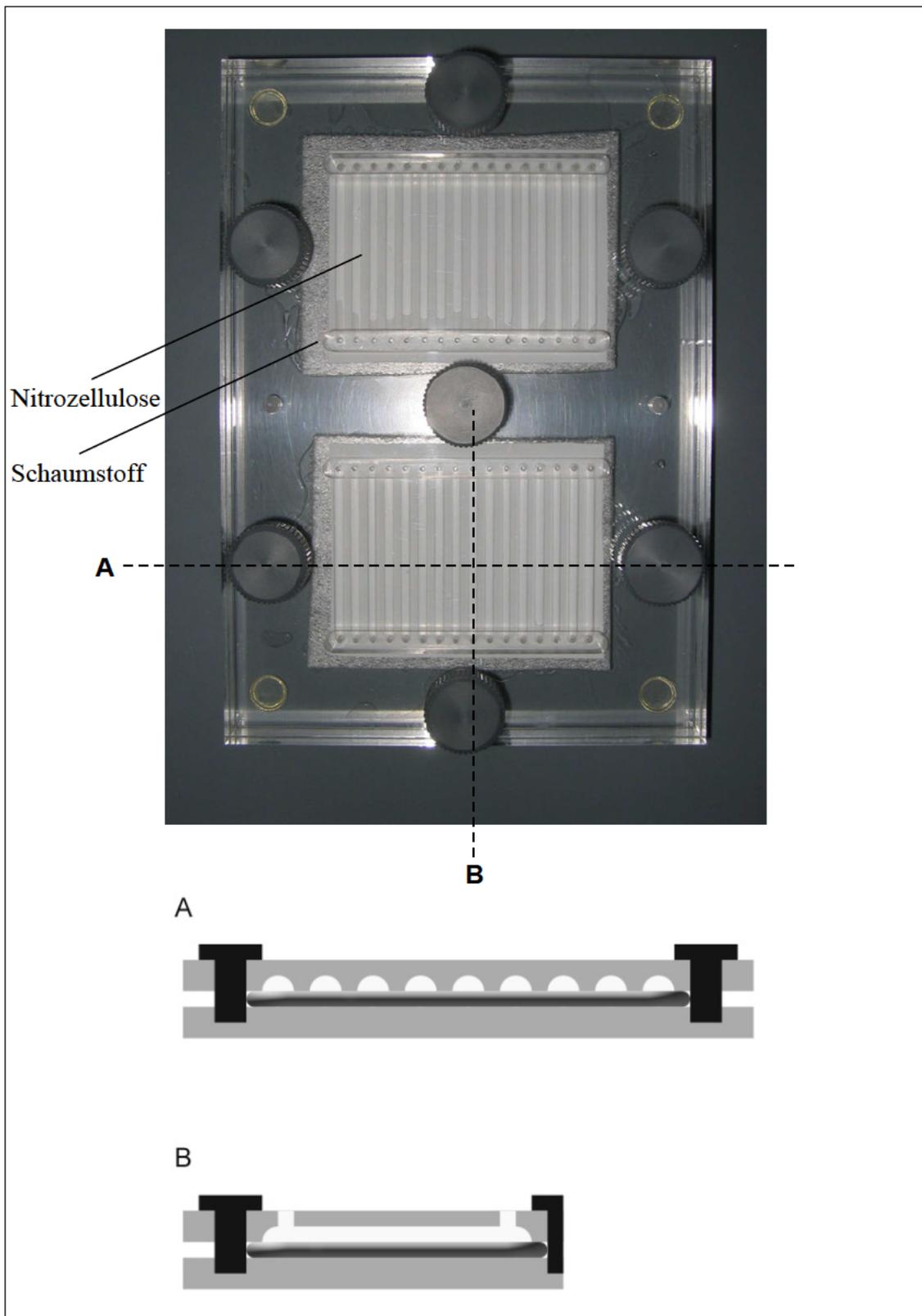


Abbildung 2.4 Photographie der Blotkammer in der Aufsicht sowie schematische Darstellung von **A** Quer- und **B** Längsschnitt

Danach werden die Proben vorsichtig abgezogen und die Membran aus der Kammer entfernt. Insgesamt ist darauf zu achten, dass es zu keinem Übertritt von Serum in eine benachbarte Kammer kommt. Sollen verschiedene Sekundärantikörper eingesetzt werden, kann die Membran nun entsprechend auseinander geschnitten werden, um jeden Teil der Membran mit dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubieren zu können. Wieder wird die Membran 3 x für 10 min unter leichtem Schütteln mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit den Sekundärantikörpern in der Verdünnung 1:10.000 bis 1:80.000 in TBS-T/5% Milchpulver erfolgt für 1,5 h unter sachtem Schwenken. Es folgen noch einmal fünf Waschstschritte mit TBS-T für 10 min. Zur Detektion der mit *horseradish peroxidase* (HRP) konjugierten Sekundärantikörper wird Chemilumineszenzsubstrat auf die Membran gegeben und für 5 min inkubiert. Jetzt wird die Substratlösung abgegossen und in einer lichtundurchlässigen Expositionskammer ein durch eine transparente Folie geschützter Röntgenfilm auf die Membran gelegt. Durch die Chemilumineszenz in den Bereichen von Antikörperbindungen auf der Membran werden entsprechende Bereiche des Filmes belichtet und durch die anschließende Entwicklung des Films als schwarze Banden sichtbar. Die Belichtungszeit beträgt zwischen 30 s und 10 min.

2.14.7 Ponceau-Färbung

Mit Ponceau-Lösung lassen sich Proteine auf einer Nitrozellulosemembran reversibel anfärben. Dadurch kann der Erfolg des Proteintransfers im Immunoblot überprüft werden.

Die Membran wurde 1 min in Ponceau-Lösung gebadet. Die Proteine sind nun rot angefärbt. Eine Proteinbande kann ggf. mit einem Bleistiftstrich am Rand der Membran markiert werden. Mit Wasser wird die Membran über einige Minuten wieder entfärbt.

2.15 Tierexperimentelle Arbeiten

2.15.1 Vorbereitung der Infektionsdosis

Es wird eine Kultur des Bakterienstammes in LB-Medium ÜN bei 37 °C bebrütet. Mit einem Aliquot von 500 µl dieser Kultur werden dann 10 ml LB-Medium angeimpft. Die Kultur wächst bei 37 °C bis zu einer OD bei 600 nm von 0,2. Dies entspricht nach den Erkenntnissen aus einer Vielzahl von Vorversuchen in der AG Schubert einer Bakterienzahl im Bereich von 10^8 KBE/ml. Nach Abzentrifugieren (5.000 UpM für 5 min) von 1 ml der Kultur wird das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen und die Bakterien für die intraperitoneale Infektion eingesetzt.

2.15.2 Intraperitoneale Infektion

Einer Balb/C-Maus werden 0,1 ml (10^7 KBE) (s. 2.15.1) des Bakterienstammes intraperitoneal appliziert. Der Zugang unter Verwendung einer 1 ml Spritze und einer

Nadel der Größe 23 G befindet sich knapp oberhalb des Genitals links. Die Maus wird dabei in Rücken- und Kopftieflage gehalten. Der Einstichwinkel beträgt ca. 45° in Richtung nach medial und proximal. Die Gefahr einer Verletzung von soliden Organen oder einer Perforation des Darmes kann so minimiert werden.

2.15.3 Gewinnung von Mausseren

Das Versuchstier wird durch Einleiten von Kohlendioxid in die Box getötet. Nach Eröffnen des Bauchraumes wird unter Sicht die Vena cava inferior punktiert und etwa 1 ml Blut gewonnen. Nach vollständiger Gerinnung des Blutes (Dauer ca. 30 min bei RT) wird der Blutkuchen bei 2500 UpM für 10 min abzentrifugiert und das Serum gewonnen.

2.16 Behördliche Genehmigungen

Die Tierversuche dieser Arbeit wurden im Rahmen des Tierversuchsvorhabens 209.1/211/2531-107/03 durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

Ebenso wurde der in Bezug auf die molekularbiologischen Arbeiten getellte Antrag nach Gentechnikgesetz (840-8763.14.144/1028) genehmigt.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels Immunoblot Seren von Patienten mit einer *E.coli*-Infektion auf Antikörper gegen ExPEC-assoziierte Proteine zu untersuchen. Im ersten Teil der Arbeit wurden hierzu *E.coli*-Isolate von Patienten gesammelt und mittels PCR hinsichtlich vorhandener ExPEC-assoziiierter Gene charakterisiert. Zusätzlich wurden Seren der entsprechenden Patienten aquiriert. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Seren im Immunoblot auf Antikörper gegen die rekombinant hergestellten ExPEC-Proteine FyuA, Iron, Usp und ChuA getestet. Der Häminrezeptor ChuA wurde dafür in dieser Arbeit als rekombinantes Protein hergestellt. Im Anschluss folgten Untersuchungen der Antikörperantwort bei der Maus nach Harnwegsinfektion und nach Peritonitis.

3.1 Daten zu *E. coli*-Isolaten und Seren

In der mikrobiologischen Routinediagnostik des Max von Pettenkofer-Instituts wurden *E. coli*-Isolate von Patienten der Kliniken Innenstadt und Großhadern der Universität München gesammelt. Aus der Serologie und der Virologie des Max von Pettenkofer-Instituts wurden, soweit vorhanden, überzählige Serumproben der entsprechenden Patienten aus der Routinediagnostik bezogen. Zu jedem Isolat sollten mindestens zwei Patientenproben vorliegen, wobei das erste Serum (Serum 1) am oder um den Tag des *E. coli*-Nachweises abgenommen sein sollte und das zweite Serum (Serum 2) mindestens zwei Wochen nach Isolierung. Durch diese gezielte Sammlung sollte erreicht werden, dass das erste Serum zu Beginn der Infektion abgenommen wurde und sich ggf. im Verlauf eine Antikörperreaktion im zweiten Serum nachweisen lässt. Insgesamt konnten auf diese Weise 23 Isolate mit entsprechendem Serumpaar für die Untersuchung gewonnen werden.

Neben Alter und Geschlecht der Patienten wurde die Herkunft des Isolates erfasst sowie der Abnahmetag des Serums (s. Tabelle 3.1). Der Tag der Isolierung eines *E. coli*-Stammes wurde als Tag 0 definiert. Alter und Geschlecht haben Bedeutung hinsichtlich des bei Frauen generell erhöhten und mit dem Alter weiter zunehmenden Risikos eine Harnwegsinfektion zu erleiden. Es könnten sich deshalb bereits im Serum 1 Antikörper gegen *E. coli*-Proteine nachweisen lassen. Ebenso ist bei systemischen Infektionen, wenn z. B. der *E. coli*-Stamm aus einer Blutkultur stammt, eher mit Serumantikörpern zu rechnen. Im Allgemeinen bedeutet die Isolierung von *E. coli* aus dem Blut auch, dass ein septisches Krankheitsbild vorliegt. Die Möglichkeit der Kontamination ist besonders beim Nachweis von *E. coli* im Mittelstrahlurin bei einer Frau zu bedenken.

Tabelle 3.1 *E. coli*-Isolate und Seren

E. coli-Isolat-Nr.	Patientenalter und -geschlecht	Herkunft des Isolates	Abnahme Serum 1 am Tag	Abnahme Serum 2 am Tag
3	85 a, w.	BK	0	14
4	26 a, w.	MSU	0	110
10	79 a, w.	BK	1	28
12	62 a, w.	MSU	8	82
19	68 a, w.	KU	4	34
22	71 a, w.	KU	9	25
41	65 a, w.	MSU	1	90
50	63 a, w.	BK	-14	70
53	63 a, m.	BK	-20	14
54	71 a, w.	KU	-50	16
57	73 a, m.	BK	-3	38
60	53 a, m.	BK	2	28
61	53 a, m.	BK	-11	15
66	27 a, w.	KU	2	16
68	66 a, m.	MSU	1	25
72	68 a, w.	BK	10	22
73	60 a, w.	BK	2	20
75	61 a, w.	BK	8	20
76	37 a, m.	BK	8	82
78	35 a, m.	MSU	-7	12
101	63 a, m.	BK	12	24
102	29 a, m.	KU	-4	15
123	39 a, w.	BK	3	60

a: Jahre, w.: weiblich, m.: männlich

BK: Blutkultur, KU: Katheterurin, MSU: Mittelstrahlurin

3.2 Nachweis ExPEC-assoziiierter Gene bei *E. coli*-Isolaten

Um die Isolate weiter zu charakterisieren, wurden sie mittels PCR auf ExPEC-assoziierte Gene untersucht. Es handelte sich im Einzelnen um Gene des Yersiniabaktin-Siderophorsystems (*fyuA*, *irp2*), des Salmochelinrezeptors (*iroN*), des Aerobaktinsystems (*iutA*), des Häminrezeptors (*chuA*) sowie die Gene *ireA* und *iha*, die ebenso mit der bakteriellen Eisenaufnahme in Verbindung gebracht werden. Dagegen kodiert *usp* für einen von UPEC an die Umgebung abgegebenen Faktor, der bisher in seiner Funktion nicht näher untersucht ist. Durch das PCR-Screening konnte zum einen geklärt werden, ob die Isolate zur Gruppe der typischen ExPEC gehören, zum anderen, ob eine Antikörperreaktion bei den Patienten zu erwarten ist, da der Genotyp den Rückschluss auf den Phänotyp und damit die Expression des Proteins durch den entsprechenden Stamm zulässt.

Die PCR wurde wie in 2.13.1 beschrieben mit den entsprechenden Primern (s. Tabelle 2.5) durchgeführt. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle dienten der klassische UPEC-Stamm CFT073 und der apathogene *E. coli*-Laborstamm DH5 α (s. Abbildung 3.1).

3 Ergebnisse

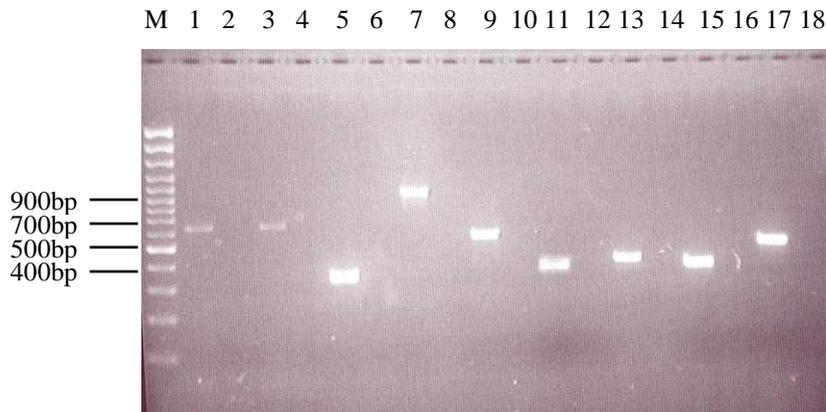


Abbildung 3.1 Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten zur exemplarischen Darstellung von positivem und negativem Gen-Nachweis in den *E. coli*-Stämmen CFT073 (jeweils die linke Spur) und DH5 α (jeweils die rechte Spur), M: 100bp Marker, 1 und 2: *fyuA* (Produktgröße 629bp), 3 und 4: *irp2* (Produktgröße 600bp), 5 und 6: *chuA* (Produktgröße 345bp), 7 und 8: *iroN* (Produktgröße 900bp), 9 und 10: *usp* (Produktgröße 555bp), 11 und 12: *tir* (Produktgröße 380bp), 13 und 14: *ireA* (Produktgröße 418bp), 15 und 16: *iut* (Produktgröße 392bp), 17 und 18: *iha* (Produktgröße 529bp)

In Tabelle 3.2 finden sich die einzelnen Isolate mit dem Ergebnis für die untersuchten Gene und der prozentuale Anteil der auf ein Gen positiven Isolate.

Tabelle 3.2 Nachweis von ExPEC-assoziierten Genen bei *E. coli*-Isolaten

E. coli-Isolat Nr.	<i>chuA</i>	<i>fyuA</i>	<i>irp2</i>	<i>iroN</i>	<i>usp</i>	<i>ireA</i>	<i>iha</i>	<i>iutA</i>
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	-	+	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-
19	+	-	-	-	-	+	+	+
22	-	+	+	-	-	-	-	+
41	-	-	-	-	-	-	+	+
50	-	-	-	-	-	-	-	-
53	+	+	+	-	-	-	+	+
54	-	-	-	-	-	-	-	-
57	+	+	+	+	-	-	-	-
60	+	+	+	-	-	-	+	+
61	-	-	-	+	-	-	-	+
66	+	+	+	-	+	-	+	+
68	+	+	+	-	+	-	+	+
72	+	+	+	-	-	-	+	+
73	+	+	+	-	-	-	+	+
75	-	-	-	-	-	-	-	+
76	+	+	+	-	-	-	+	+
78	+	+	+	-	-	-	-	+
101	+	+	+	+	-	-	+	+
102	-	-	-	-	-	-	-	-
123	-	-	-	+	-	-	-	+
Positive Isolate	52%	52%	52%	17%	13%	4%	43%	70%

3.3 Rekombinante Herstellung von ChuA

Im Folgenden sollte der Häminrezeptor ChuA rekombinant hergestellt werden, um die Testung von Patientenseren auf Antikörper gegen dieses Protein im Immunoblot zu ermöglichen. Hierzu wurde das *chuA*-Gen mittels PCR amplifiziert und zur Vereinfachung der weiteren Klonierungsarbeiten in den Vektor pCR[®]4-TOPO[®] gebracht. Aus diesem Vektor erfolgte die Subklonierung von *chuA* in den Expressionsvektor pASK-IBA33plus. Durch diese Klonierung wurde die Expression des ChuA-Proteins möglich, das zur erleichterten Aufreinigung ein His-tag besitzt.

Im Rahmen von Vorarbeiten in der AG Schubert ist es bereits gelungen, den Salmochelinrezeptor (IroN), den Yersiniabaktinrezeptor (FyuA) und das Protein Usp nach dem gleichen Prinzip rekombinant herzustellen.

3.3.1 Klonierung von *chuA*

Zuerst wurden *chuA* entsprechende DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert (s. 2.13.1). Als Matrize diente dabei chromosomale DNA des *E. coli*-Stammes CFT073. Die Primer F1-*chuA*.Sst.for und R-*chuA*.Pst.rev sorgten dafür, dass das PCR-Produkt an des Enden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Sst*I und *Pst*I aufwies (s. Abbildung 3.2). Durch die DNA-Polymerase wird zudem unspezifisch an die entstehenden 1963 bp großen DNA-Fragmente ein Desoxyadenosin am 3'-Ende angehängt. Dadurch konnte im nächsten Schritt die TOPO TA-Klonierung der PCR-Produkte durchgeführt werden (s. 2.13.4). Dafür wurden sie wie in 2.13.3 beschrieben über eine präparative Gelelektrophorese aufgereinigt.

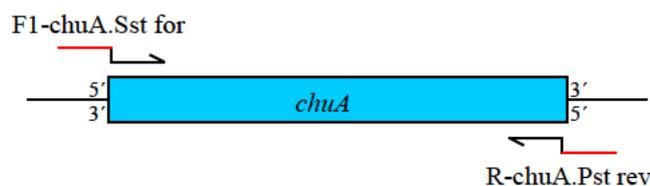


Abbildung 3.2 Schematische Darstellung der Anlagerung der verwendeten Primer an *chuA*, die Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme sind rot markiert

Zur TOPO TA-Klonierung wurde der linearisierte Vektor mit den DNA-Fragmenten zusammengebracht und entsprechend inkubiert, um den Einbau des PCR-Produktes in den Vektor zu ermöglichen (s. 2.13.8). Es erfolgte die Transformation in elektrokompente Zellen (s. 2.13.9) des *E. coli*-Stammes TOP10. Die Bakterien wurden dann auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C ÜN bebrütet. Dabei konnten die Klone erfolgreich transformierter Zellen über die auf dem Plasmid

pCR4-TOPO*chuA* (5920 bp) kodierte Antibiotikaresistenzen gegen Ampicillin und Kanamycin selektioniert werden (s. Abbildung 3.3).

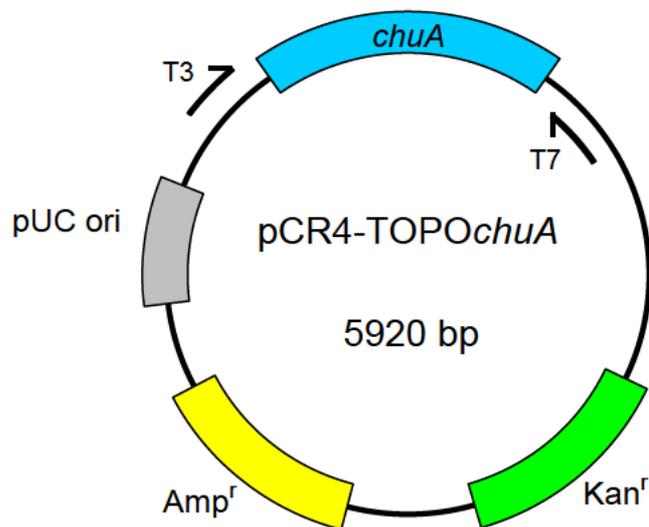


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung des Vektors pCR4-TOPO*chuA*: neben den Resistenzgenen sind die Positionen der Sequenzierungsprimer T3 und T7 eingezeichnet

Einige Klone wurden nun in antibiotikahaltigem Medium angezüchtet und die Plasmide entsprechend 2.13.5 isoliert. Der das PCR-Produkt enthaltende Abschnitt von pCR4-TOPO*chuA* wurde bei einem dieser Klone sequenziert (s. 2.13.10). Hierzu dienten die Primer T3 und T7. Die korrekte Sequenz des PCR-Produktes konnte bestätigt werden (s. Abbildung 3.4). Dieses Plasmid wurde für die folgende Subklonierung von *chuA* in den Expressionsvektor pASK-IBA33plus verwendet.

```

pCR4-TOPO-----
aatcgcccttatcaGAGCTCttggttggctttggctgtttctgcccaccttgccaacgtttgccttttgctac
tgaaacatgaccggttacggcaacggggaatgcacgtagttccttcgaagcgcctatgatggtcagcgtt
atcgacacttccgctcctgaaaatcaaactgctacttcagccactgatttgctgcgtcatggtcctggaa
ttactcttgatggtaccggacgaaccaacggtcaggatgtaaatatgcgtggctatgatcatcgccggcgt
gctgggtcttgcgatgggtgttcgccagggaaacggataccggacacctgaatggcacttttctcgatccg
gcgctgatcaagcgtgttgagattgttcgcggaccttcagcattactgtatggcagtgccgcgctgggtg
gagtgatctcctacgatacggtcgatgcaaaagatttattgcaggaaggacaaagcagtggttttctggtg
ctttggtaactggcggcacgggggaccatagcctgggattaggcgcgagcgcgcttggggcgaactgaaaat
ctggatggattgtggcctggccagtcgcgatcgggggtgatttacgccagagcaatggtgaaaccgcgc
cgaatgacgagtcatttaataacatgctggcgaaggacactggcaaatgattcagcccagctctctgag
cggtttagtgcgttactacaacaacgcgcgctgaacccaaaaatccgcagaccgttgaagcttctgat
agcagcaaccgcgatggctcgatcgttcaacaattcaacgcgatgcgcagcttcttataaaactXXXXXXXXX
ccgctatgacagttatcgcggttagcagcgcaggctacaaagatggtgatgccgacaaatggtcactctcgt
gccccgatgactatcaaccgaccaactggctgatgttatttggtcatatgctcaggcattccgcgccc
cgacgatgggcgaaatgtataacgattctaaacacttctcgattggctcgttctataccaactattgggt
gccaaaccgaaacttacgtccggaaactaacgaaactcaggagtacggttttgggctgcgttttgatgac
ctgatgttgcctaatgatgctctggaatttaaagccagctactttgataccaaaagcgaagattatctct
ccacgaccgctcgatttcgcggcggcgacaactatgtcgtataacgtcccgaacgccaaaatctggggctg
ggatgtgatgacgaaatataccactgatctgttttagccttgatgtggcctataaccgtaccgcggcaaa
gacaccgataccggggaatatactccagcattaaccgggataccggtaccagtaacctgaatattccga
tcgctcacagcggcttctctgttgggtgggtcggtagctttgccgatcgctcaacacatatacgcagcag
ctacagcaaaacactggctatgggtgtgaatgatttctacgtcagttatcaagggcagcaggcgcctcaa
ggcatgaccactactcgtgattggggcaacgccttcgataaaagagtactggtcgccgcaaggcatcccac
aggatggtcgtaacggaaaaatttctcgtgagttatcaatggCTGCAGtttagggcga-----
-----pCR4-TOPO

```

Abbildung 3.4 Sequenz des Vektors pCR4-TOPO $_{chuA}$: die Nukleotidsequenz des Vektors (*backbone*) ist gelb markiert, die Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind fett hervorgehoben, die unterstrichenen Abschnitte entsprechen den Sequenzen der für die Klonierungs-PCR eingesetzten Primer, in der Mitte von *chuA* befindet sich ein durch mehrere X symbolisierter nicht sequenzierter Abschnitt von 358bp

3.3.2 Konstruktion des Expressionsvektors pASK-IBA33plus $_{chuA}$

Aus dem isolierten Plasmid pCR4-TOPO $_{chuA}$ wurde *chuA* mittels der über die Primer eingebauten Schnittstellen mit den Restriktionsenzymen *SstI* und *PstI* herausgeschnitten (s. 2.13.6). In gleicher Weise wurde der Expressionsvektor pASK-IBA33plus (3250bp) im Bereich der *multiple cloning site* (MCS) aufgetrennt. Der Restriktionsverdau konnte in einem Ansatz mit beiden Enzymen durchgeführt werden, da bei beiden der Puffer REact[®]2 verwendet werden kann. Es folgte die Aufreinigung von ausgeschnittenem *chuA* und geschnittenem Expressionsvektor über eine Gelelektrophorese und die Isolierung der DNA aus dem Agarosegel über eine Silikatmatrix wie in 2.13.3 beschrieben (s. Abbildung 3.5). Danach wurde die DNA-Konzentration der entsprechenden Eluate bestimmt (s. 2.13.7).

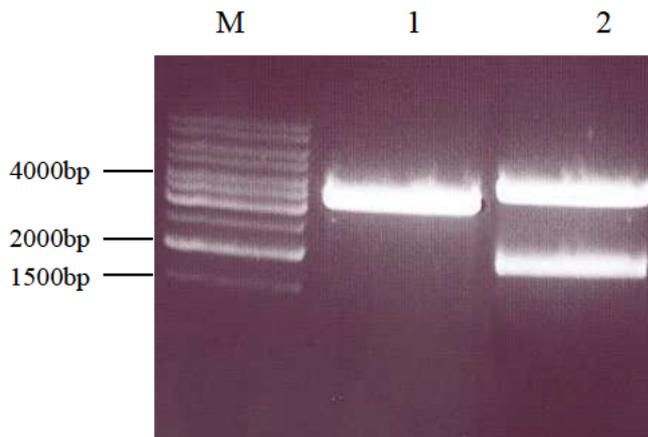


Abbildung 3.5 Agarosegelelektrophorese der Vektoren pASK-IBA33plus und pCR4-TOPO*chuA* nach Restriktionsverdau mit *Pst*I und *Sst*I, M: 1kb Marker, 1: pASK-IBA33plus (3223 bp), 2: pCR4-TOPO (3976 bp) und *chuA* (1944 bp)

Zur Ligation (s. 2.13.8) wurden der Vektor pASK-IBA33plus und das Insert *chuA* im molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt und mit der T4-Ligase inkubiert. Ein Ansatz, der nur den Vektor ohne Zugabe des *inserts* enthielt, diente der Kontrolle der Effizienz der Ligationsreaktion.

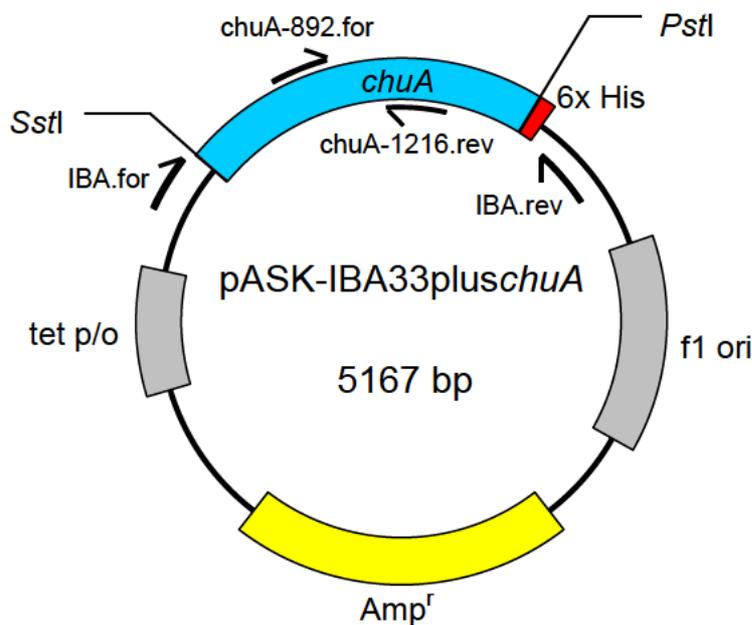


Abbildung 3.6 Schematische Darstellung des Vektors pASK-IBA33plus*chuA*: Das Gen *chuA* wurde über die Schnittstellen (*Pst*I/*Sst*I) in Ableserichtung hinter den induzierbaren tet-Promotor des Vektors pASK-IBA33plus kloniert, in 3'-Richtung hinter *chuA* findet sich die Sequenz für sechs Histidine ((6x)His-tag), über die eingezeichneten Primer kann der gesamte Bereich des *inserts* sequenziert werden

Der Ligationsansatz wurde mit kompetenten Zellen des *E.coli*-Stammes BL21(DE3) pLysS vermischt und die Elektroporation durchgeführt (s. 2.13.9). Durch das bei der Elektroporation kurzzeitig erzeugte starke elektrische Feld entstehen vermutlich Poren in der Bakterienwand, durch die das Plasmid in das Bakterium gelangt. Die transformierten Zellen wurden ausplattiert und bei 37°C ÜN auf ampicillin- und chloramphenicolhaltigen Agarplatten bebrütet. Erfolgreich transformierte Zellen wiesen dabei die zusätzliche Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin auf. Das mit einer Chloramphenicolresistenz versehene Plasmid pLysS kodiert für das T7-Lysozym. Durch dieses Lysozym wird die T7-RNA- Polymerase von *E. coli* BL21(DE3) gehemmt und damit vor der Induktion die Expression des klonierten Gens reprimiert. Zudem wird durch das Lysozym später, wenn die induzierten Zellen eingefroren und wieder aufgetaut werden, die Zellyse und damit die Aufreinigung des rekombinanten Proteins erleichtert. Die Resistenz gegen Ampicillin war ein erster Hinweis auf die erfolgreiche Ligation und Transformation des Plasmids pASK-IBA33plus*chuA* (s. Abbildung 3.6). Fünf der erhaltenen Klone wurden erneut ÜN in Kultur gebracht, abzentrifugiert und danach bei -80°C gelagert. Ein Aliquot jeder Kultur diente zur Kontrolle der Klone mit der PCR. Die analog zu der für die Patientenisolate durchgeführte PCR (s. 3.2) wies *chuA* in den Klonen nach (s. Abbildung 3.7).

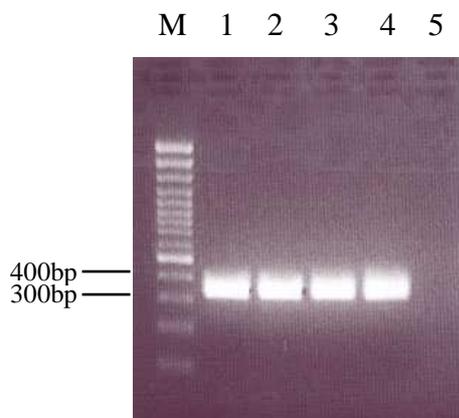


Abbildung 3.7 Agarosegelelektrophorese von PCR-Produkten zum Nachweis von *chuA* (Produktgröße 345bp) in *E. coli* BL21(DE3) pLysS pASK-IBA33plus*chuA*, M: 100bp Marker, 1-3: Klone 3-5, 4: Positivkontrolle *E. coli* CFT073, 5: Negativkontrolle *E. coli* DH5 α

Mit einem weiteren Aliquot wurden Expressionskulturen von kleinem Volumen angesetzt, um die Proteinexpression und damit die erfolgreiche Konstruktion des Expressionsvektors zu kontrollieren. Hierzu wurde parallel je Klon eine Kultur von 5 ml mit 250 μ l aus der ÜN-Kultur angeimpft. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C bis zu einer OD bei 600 nm von 0,5. Nach Abnahme von 2 ml einer nichtinduzierten Kontrollprobe erfolgte die Induktion durch Zugabe von 0,6 μ g Anhydrotetrazyklin (AHT) in die verbleibenden 3 ml jeder Kultur. Diese wurden für 3 h weiter bebrütet. Jeweils 2 ml der induzierten Kultur und die entsprechende nichtinduzierte Kontrolle wurden dann für 10

3 Ergebnisse

min bei 14.000 UpM abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 30 μ l Laemmli-Puffer aufgenommen. 5 μ l dieser Lösung wurden nach Zusatz von 1 μ l des SDS-Probenpuffers für 10 min bei 100 °C gekocht. In der mit den Proben durchgeführten SDS-PAGE (s. 2.14.3) zeigte sich bei den ausgewählten Klonen die Überexpression eines Proteins im Bereich von 70 kDa (s. Abbildung 3.8).

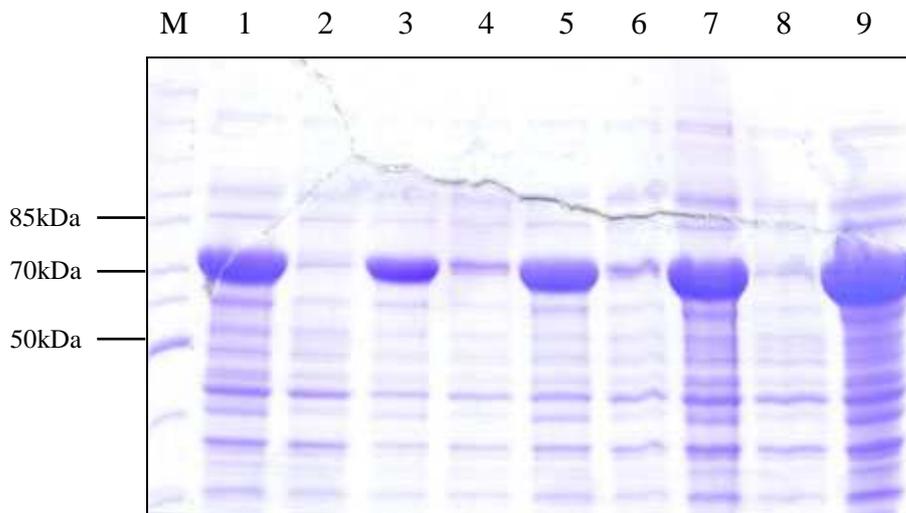


Abbildung 3.8 SDS-PAGE der Zellysate von *E.coli* BL21(DE3) pLysS pASK-IBA33plus*chuA* nach und vor Induktion mit AHT, M: Marker, 1: Klon 1 induziert, 2: Klon 1 nicht induziert, 3: Klon 2 induziert, 4: Klon 2 nicht induziert, 5: Klon 3 induziert, 6: Klon 3 nicht induziert, 7: Klon 4 induziert, 8: Klon 4 nicht induziert, 9: Klon 5 induziert

Zudem wurde bei einem Klon, nach Isolierung des Plasmids, der für das Protein kodierende Abschnitt von pASK-IBA33plus*chuA* in zwei Ansätzen über die Primerpaare IBA.for und *chuA*-1216.rev sowie *chuA*-892.for und IBA.rev überlappend komplett sequenziert (s. 2.13.10) (s. Abbildung 3.6). Die korrekte DNA-Sequenz für *chuA* konnte auf diese Weise bestätigt werden (s. Abbildung 3.9).

```

pASK-IBA33plus-----
gcaattgcGAGCTCttggttggtttggctggtttctgccaccttgccaacggttgcttttgcactgaaac
catgaccggttacggcaacggggaatgcacgtagttccttcgaagcgctatgatggtcagcggttatcgac
acttccgctcctgaaaatcaaactgctacttcagccactgatttgctgcgatcatgttcttgggaattactc
ttgatggtagcggacgaaccaacgggcaggatgtaaatatgcgtggctatgatcatcgcgcgctgctggg
tcttgatgtaggtggttcgccaggggaacgggataccggacacctgaatggcactttctcgatccggcgctg
atcaagcgtgttgagattggttcgaggaccttcagcattactgtatggcagtgggcgctggggtggagtga
tctcctacgatacggtcgatgcaaaagatttattgcaggaaggacaaaagcagtggttttctggtctttgg
tactggcgccacgggggaccatagcctgggattaggcgcgagcgctttggcggaactgaaaatctggat
ggatattgtggcctggtccagtcgcatcggggtgatttacgccagagcaatggtgaaaccgcgccgaatg
acgagtcattaataacatgctggcgaaagggacctggcaaatgattcagcccagtcctcgagcgggtt
agtgcgttactacaacaacgacgcgctgaacccaaaaatccgcagaccggtgaagcttctgatagcagc
aacccgatggtcgatcgttcaacaattcaacgcgatgcgagctttcttataaactcgccccgagggtg
acgactgggttaaatgcagatgcaaaaatttactggtcggaagtcggtatgaatgcgcaaaacacggggag
ttcaggcgagtatcgtgaacagataacaaaaggagcaaggctggagaaccggtccactctatctgcccac
agtttcgcttctcacttactgacatatggcggtgagatattatcgctcaggaacaacatccgggtggcgca
cgacgggcttcccgaagcaaaaatcgatttttagctctgggtgggtacaagatgagatcaccttacgcga
tctgcccattaccctgcttggcggaaccgctatgacagttatcgcggtagcagcgacggctacaaagat
gttgatgcccgaatggtcatctcgctgccccgacgatggggcaaatgtataacgattctaaacacttctcgat
ggtcgttctataccaactattgggtgccaaccggaacttacgtccggaaactaacgaaactcaggag
tacggttttgggctcggttttgatgacctgatggtgtccaatgatgctctggaatttaaagccagctact
ttgataccaagcgaaagattatctccacgacctgatttcgcccggcgacaactatgctgataaa
cgtcccgaacgccaaaatctggggctgggatgtgatgacgaaatatacactgatctggttagccttgatg
tggcctataaccgtaccgcggcaaaagacaccgataaccggggaatatactccagcattaaccgggatac
cgttaccagtaccctgaatattccgatcgctcacagcggttctctggtgggtgggtcggtacgtttgcc
gatcgctcaacacatatcagcagcagctacagcaaaacacctggctatgggtggaatgatttctacgtca
gttatcaagggcagcaggcgtcaaaggcatgaccactactctggtattgggcaacgccttcgataaaga
gtactggtcgcccgaaggcatcccacaggatggctgtaacggaaaaatcttctgtagttatcaatggCTG
CAGggggaccatgggtctcagcgttagaggatcgCATCACCATCACCATCACTaataagcttgacctgtga
-----pASK-IBA33plus

```

Abbildung 3.9 Sequenz des Vektors pASK.IBA33plus*chuA*: die Nukleotidsequenz des Vektors (*backbone*) ist gelb markiert, die Schnittstellen der Restriktionsenzyme über die das insert eingefügt wurde sind fett hervorgehoben, der unterstrichene kursive Abschnitt kodiert für das (6x) His-*tag*

3.3.3 Expression und Aufreinigung von ChuA

Für die Expression (s. 2.14.1) des rekombinanten Proteins ChuA wurde eine 25 ml Kultur mit 1,5 ml einer ÜN-Kultur von *E. coli* BL21 pLysS pASK-IBA33plus*chuA* angeimpft. Dem LB-Medium wurden jeweils Ampicillin und Chloramphenicol zugesetzt. Nach Wachstum bei 37 °C bis zu einer OD bei 600 nm von 0,5 wurde eine nichtinduzierte Probe von 5 ml abgenommen. Die übrigen 20 ml wurden mit 4 µg AHT induziert und für weitere 3 h bebrütet. Danach wurde die Kultur bei 4300 UpM für 20 min abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren.

Wie in 2.14.2 beschrieben wurden die pelletierten Zellen nach dem Auftauen durch Resuspension in einem harnstoffhaltigen Puffer lysiert. Der als Detergenz wirkende Harnstoff trennt dabei Disulfidbrücken auf. Auch das rekombinante Protein wird dabei denaturiert. Dies war auch gewollt, da Außenmembranproteine wie ChuA in nativer Form oft per se eine geringe Löslichkeit besitzen und es darüber hinaus bei der

3 Ergebnisse

Expression des Proteins zur Bildung von Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) in den Bakterien kommen kann.

Das Zelllysate wurde auf eine Säule mit einer nickelhaltigen Matrix gegeben. Über das carboxyterminale His-tag kann das rekombinante Fusionsprotein ChuA binden und von übrigen Zellbestandteilen, insbesondere den Proteinen, gereinigt werden. Die Säule wurde zweimal gewaschen und schließlich eluiert. Dies geschieht durch den absinkenden pH-Wert der verwendeten Puffer (s. 2.14.2). Bei der Elution löst sich das Protein von der Matrix und liegt aufgereinigt vor. Bei allen Schritten wurden zur Kontrolle die entsprechenden Fraktionen aufgefangen und je eine 10 µl Probe mit 2 µl Probenpuffer versetzt und 10 min bei 100 °C inkubiert. Danach wurden die Proben in einer Gelelektrophorese (s. 2.14.3) analysiert (s. Abbildung 3.10). Hier zeigte sich, dass ein Protein im Bereich eines Molekulargewichts von 70 kDa isoliert werden konnte.

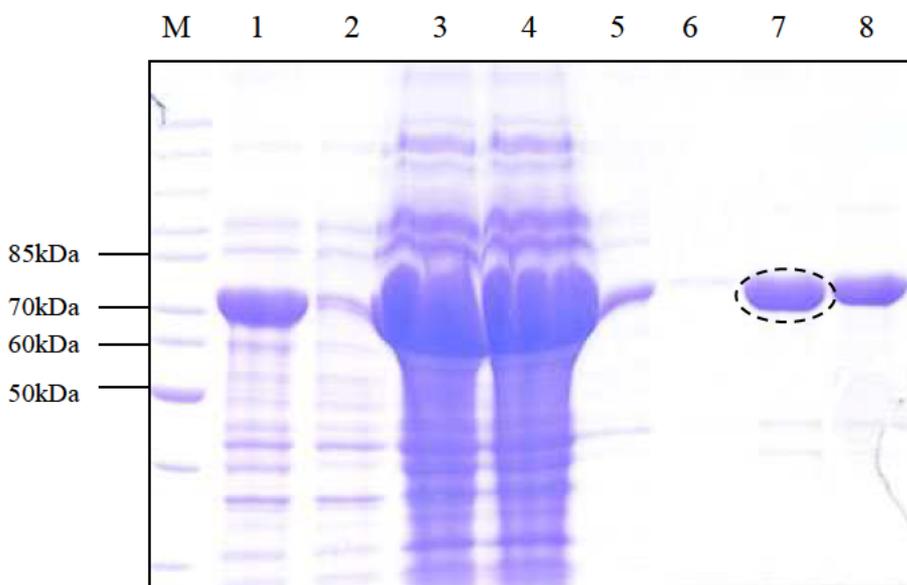


Abbildung 3.10 SDS-PAGE der aufgefangenen Fraktionen der Aufreinigung des rekombinanten Proteins ChuA (74 kDa) über Ni-Affinitätschromatographie, M: Marker, 1: Zelllysate aus einem Aliquot der Kultur von *E. coli* BL21(DE3) pLysS pASK-IBA33pluschuA nach Induktion, 2: Zelllysate aus einem Aliquot der Kultur von *E. coli* BL21(DE3) pLysS pASK-IBA33pluschuA vor Induktion, 3: Zelllysate aus der pelletierten Kultur von *E. coli* BL21(DE3) pLysS pASK-IBA33pluschuA nach Induktion, 4: Fraktion nach Beladen der Säule, 5: Fraktion nach dem 1. Waschen, 6: Fraktion nach dem 2. Waschen, 7: 1. eluierte Fraktion, 8: 2. eluierte Fraktion, die gestrichelte Linie markiert den Bereich des Gels der ausgeschnitten und zur massenspektrometrischen Untersuchung gegeben wurde

Die korrespondierende Bande zu ChuA wurde aus dem Proteingel mit einem Skalpell ausgeschnitten (s. Abbildung 3.10) und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (s. 2.14.5) im Zentrallabor für Proteinanalytik (ZfP) des Adolf Budenandt-Instituts der Universität München analysiert. Das dort durch den Trypsinverdau erzeugte und massenspektrometrisch untersuchte Peptidmuster ergab, dass es sich bei dem exprimierten Protein um den Hämirezeptor ChuA handelte.

Um ChuA in den folgenden Untersuchungen in größerem Maßstab einsetzen zu können wurde eine Kultur von 4 l in einem Fermenterlauf angesetzt und induziert. Die Aufreinigung wurde dann nach demselben Prinzip durch das Proteinlabor des Max von Pettenkofer-Instituts durchgeführt.

3.4 Untersuchung der Immunantwort beim Menschen

Die Untersuchung der Seren von Patienten mit einer *E. coli*-Infektion sollte mögliche Antikörper gegen ExPEC-assoziierte Proteine nachweisen. Die Methode der Wahl für eine solche Untersuchung ist der Immunoblot, da dieser gegenüber z. B. dem *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) eine deutlich höhere Spezifität aufweist. Die in dieser und in Vorarbeiten in der AG Schubert rekombinant hergestellten Proteine ChuA (74 kDa), FyuA (77 kDa), IroN (81 kDa) und Usp (40,5 kDa) dienten als Ziel-Antigene. Getestet wurden die zwei Serumproben von Patienten (s. 2.11), deren entsprechendes *E. coli*-Isolat in der PCR auf die Gene *chuA*, *fyuA*, *iroN* und/oder *usp* positiv war (s. 3.2), sowie die Seren vier gesunder Probanden (s. 2.11), die anamnestisch bisher keinen Harnwegsinfekt oder andere Infektionen, bei denen *E. coli* als Erreger in Frage kommt, vorzuweisen haben.

Nachdem mit jedem der rekombinanten Proteine eine SDS-PAGE durchgeführt wurde, befand sich das Protein im Idealfall auf einer durchgehenden Linie im Polyacrylamidgel (s. 2.14.6). Bei dem mitgeführten Größenstandard handelte es sich um eine definierte bereits vorgefärbten Proteinlösung. Beim folgenden Blot entsprechend 2.14.6 wurde das Protein und der Größenstandard auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Erfolg des Transfers der per se nicht sichtbaren Proteine konnte dabei durch den Transfer des vorgefärbten Standards und die reversible Anfärbung der Proteine auf der Membran mit Ponceau-Lösung (s. 2.14.7) kontrolliert werden.

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern, wurden die freien Bindungsstellen der Membran mit Milcheiweiß abgesättigt. Hierzu wurde sie im Puffer TBS-T mit 5% Milchpulver gebadet (s. 2.14.6).

Im weiteren Verlauf des Immunoblots wurde die Membran, auf der sich jetzt rekombinantes ChuA, FyuA, IroN oder Usp befindet, für 1,5 h mit den kreuzadsorbierten humanen Seren inkubiert (s. 2.11). Dazu wurden jeweils 150 µl des 1:50 oder 1:100 verdünnten Serums in die Vertiefung der Blotkammer (s. Abbildung 2.4) pipettiert. Die Verdünnung der Seren diente der Reduzierung unspezifischer Antikörperbindungen. Da die Seren durch die Kreuzadsorption bereits auf 1:10 verdünnt waren, wurden sie mit TBS-T/5% Milchpulver lediglich um den Faktor 5 oder 10 verdünnt, so dass dies einer Endverdünnung des ursprünglichen Serums von 1:50 oder 1:100 entsprach.

Aus Vorarbeiten in der AG Schubert waren zudem Antiseren von Kaninchen gegen die Proteine FyuA und IroN vorhanden. Die Kaninchen waren dazu parenteral mit den rekombinant hergestellten Proteinen immunisiert worden. Mit den Antiseren konnten in

den Immunoblots die entsprechenden Proteine identifiziert werden. Die gegen FyuA und gegen IroN gerichteten Kaninchenserum wurden in den Verdünnungen 1:10000 bzw. 1:20000 analog zu den humanen Seren eingesetzt.

Wenn bei den Immunoblots mit FyuA und IroN sowohl humane Seren als auch Kaninchenserum als Primärantikörper fungierten, so musste die Membran wegen der unterschiedlichen zu verwendenden Sekundärantikörper nach der Inkubation mit dem Primärantikörper mit einer Schere geteilt werden.

Die Membran wurde wiederum mehrmals mit TBS-T gewaschen und schließlich mit dem Sekundärantikörper gegen humanes IgG aus dem Kaninchen in der Verdünnung 1:20000 inkubiert. Die Detektion der Kaninchen-Antikörper gegen FyuA und IroN erfolgte mit einem Antikörper gegen Kaninchen-IgG aus der Ziege. Nach Inkubation für 1,5 h wurde die Membran nochmals ausgiebig gewaschen.

Das nach dem Waschen auf die Membran gegebene Chemilumineszenzsubstrat wurde durch die an die Sekundärantikörper konjugierte *horseradish peroxidase* (HRP) umgesetzt (s. 2.14.6). Ein für zwischen 30 s und 10 min auf die Membran aufgelegter Röntgenfilm wurde durch die Chemilumineszenz belichtet. An Proteine gebundene Antikörper stellten sich nach Entwicklung des Films als schwarze Banden dar.

In den ersten so durchgeführten Immunoblots zeigten sich noch eine Reihe unspezifischer Banden. Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um Kreuzreaktionen von humanen Serumantikörpern mit in der Lösung des rekombinanten Proteins auch nach der Aufreinigung vorhandenen weiteren bakteriellen Proteinen des jeweiligen *E. coli*-Laborstammes BL21(DE3) oder M15, der zur Expression des Proteins diente. Deshalb wurden die schon mit *E. coli* DH5 α kreuzadsorbierten Seren zusätzlich noch zweimal mit dem jeweiligen Expressionsstamm (mit Expressionsvektor ohne *insert*) des zu untersuchenden Proteins, d. h. *E. coli* M15 pREP pQE-30 oder *E. coli* BL21(DE3) pLysS pASK-IBA33plus, wie in 2.11 beschrieben kreuzadsorbiert.

Bei der Interpretation der beobachteten Antikörperreaktionen im Immunoblot war besonders folgender Aspekt zu berücksichtigen: Die Expression von FyuA und ChuA einerseits und Usp und IroN andererseits fand über Klonierung in die gleichen Vektoren und Transformation in die gleichen Stämme statt. Für FyuA und ChuA war dies *E. coli* BL21(DE3) pLysS mit Klonierung in pASK-IBA33plus und für IroN und Usp *E. coli* M15 pREP unter Verwendung des pQE-30 als Vektor. Bei allen Klonierungen wurden die Restriktionsenzyme *Pst*I und *Sst*I genutzt. Antikörperreaktionen, die in einem Immunoblot nachgewiesen werden konnten, waren somit wahrscheinlich spezifisch, wenn sie bei dem gleichen Serum im Blot des jeweils anderen Proteins nicht auftraten, da sich eine unspezifische Reaktion auf Proteine des Expressionsstammes auch hier hätte finden lassen müssen.

Ergebnisse für FyuA:

Der mit dem Yersiniabaktin-Rezeptorprotein FyuA (77 kDa) durchgeführte Immunoblot zeigte für keines der 22 Patientenseren eine als spezifisch einzuordnende Antikörperreaktion (s. Abbildung 3.11). Auch bei den Vergleichsprobanden ohne bisherige oder aktuelle *E. coli*-Infektion trat dementsprechend keine Antikörperreaktion auf. Die Kontrollreaktion mit Antiserum gegen FyuA aus dem Kaninchen war hingegen eindeutig positiv.

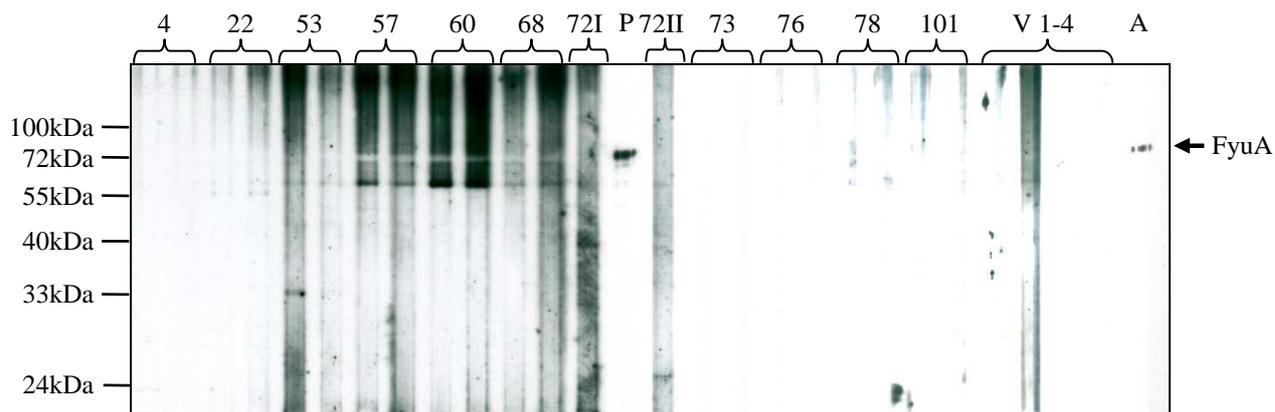


Abbildung 3.11 Immunoblot zum Nachweis von Antikörpern in Seren gegen FyuA (77 kDa) (Serumverdünnung 1:50), horizontale Beschriftung: Angabe der Patientennr. (Serum 1 auf der linken Spur, Serum 2 auf der rechten Spur, bei Patient 72 dazwischen der polyklonale AK), V 1-4: Vergleichsprobanden 1 bis 4, A: Antiserum gegen FyuA

Ergebnisse für ChuA:

Im Immunoblot mit dem Häminrezeptorprotein ChuA (s. Abbildung 3.12) zeigte sich dagegen bei zwei der 24 Seren eine Reaktion, wobei die Banden auf der Höhe des 74 kDa großen ChuA lagen. Es handelte sich um das Serum 2 der Patienten 57 und 73. Entsprechende Banden finden sich bei beiden Patienten im Immunoblot mit FyuA, das im gleichen Stamm exprimiert wurde, nicht, so dass eine unspezifische Reaktion mit Proteinen des Expressionstammes ausgeschlossen werden kann. Bei den Vergleichsprobanden waren wiederum keine Antikörper nachweisbar.

Es ist also unter der Infektion mit *E. coli* offensichtlich zu einer Antikörperbildung des Typs IgG gegen das ChuA-Protein gekommen. Gestützt wird dies durch einen fehlenden Nachweis entsprechender Banden im Immunoblot gegen FyuA und von Antikörpern bei den gesunden Probanden. Interessant war auch die Herkunft der beiden Seren: Beide stammen von Patienten, bei denen *E. coli* aus einer Blutkultur isoliert wurde.

3 Ergebnisse

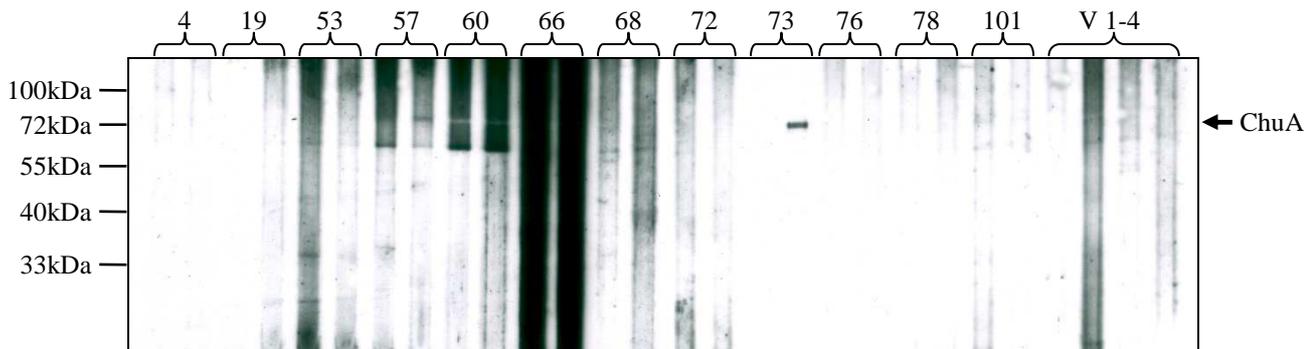


Abbildung 3.12 Immunoblot zum Nachweis von Antikörpern in Seren gegen ChuA (74 kDa) (Serumverdünnung 1:50), horizontale Beschriftung: Angabe der Patientennr. (Serum 1 auf der linken Spur, Serum 2 auf der rechten Spur), V 1-4: Vergleichsprobanden 1 bis 4

Ergebnisse für IroN:

Überraschend waren die Ergebnisse des Immunoblots für das Salmochelin-Rezeptorprotein IroN (81 kDa) (s. Abbildung 3.13). Hier konnten bei allen der untersuchten Patienten sowohl im Serum 1 als auch im Serum 2 IgG-Antikörper nachgewiesen werden. Ebenso waren bei den gesunden Probanden Antikörper nachzuweisen. Entsprechende Banden traten beim Blot gegen das Usp-Protein, das im gleichen Stamm exprimiert wurde, nicht auf. Auch die Kontrollreaktion mit dem Kaninchenserum war positiv. Der Nachweis mehrerer Banden im Immunoblot mit IroN ist vermutlich auf Degradationsprodukte von IroN zurückzuführen.

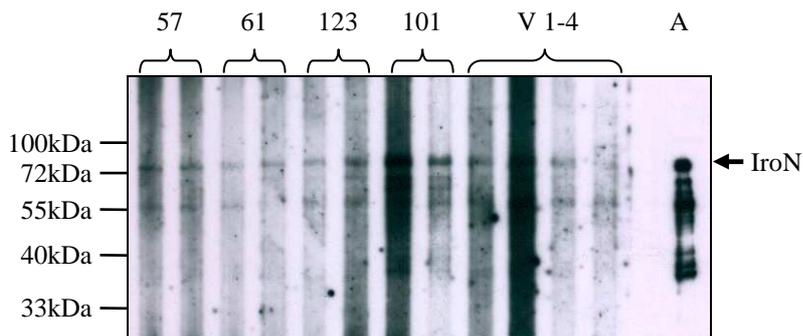


Abbildung 3.13 Immunoblot zum Nachweis von Antikörpern gegen IroN (81 kDa) (Serumverdünnung 1:100), horizontale Beschriftung: Angabe der Patientennr. (Serum 1 auf der linken Spur, Serum 2 auf der rechten Spur), V 1-4: Vergleichsprobanden 1 bis 4, A: Antiserum gegen IroN

Ergebnisse für Usp:

Im Blot für Usp (40,5 kDa) ließ sich wiederum weder bei den Patienten noch bei den Vergleichsprobanden ein Nachweis einer Antikörperreaktion führen (s. Abbildung 3.14). Interessant war dieses Ergebnis jedoch im Kontext mit den Beobachtungen im Immunoblot gegen IroN. Das dortige Ergebnis wird aufgrund der gleichen rekombinanten Herstellung von IroN und Usp somit unterstrichen.

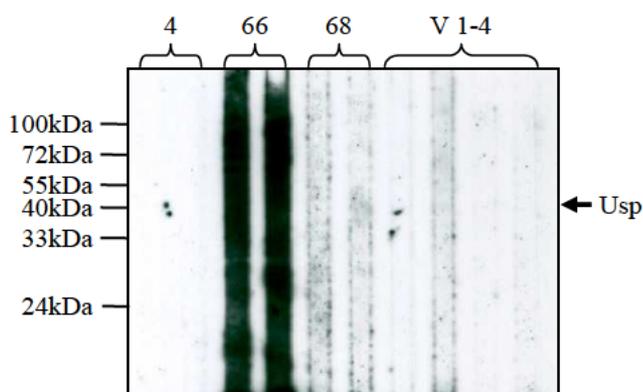


Abbildung 3.14 Immunoblot zum Nachweis von Antikörpern gegen Usp (40,5 kDa) (Serumverdünnung 1:100), horizontale Beschriftung: Angabe der Patientennr. (Serum 1 auf der linken Spur, Serum 2 auf der rechten Spur), V 1-4: Vergleichsprobanden 1 bis 4

Zusammenfassend bietet sich für den Nachweis von Antikörpern gegen die Proteine FyuA, ChuA, IroN und Usp ein heterogenes aber in sich konsistentes Bild. Tabelle 3.3 fasst die Ergebnisse kurz zusammen.

Tabelle 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse für den Antikörpernachweis beim Patienten

	FyuA	ChuA	IroN	Usp
Zahl der getesteten Patienten	12	12	4	3
davon IgG-Antikörpernachweis im Serum 1	0	0	4	0
davon IgG-Antikörpernachweis im Serum 2	0	2	4	0
Zahl der getesteten Vergleichsprobanden	4	4	4	4
davon IgG-Antikörpernachweis im Serum	0	0	4	0

3.5 Untersuchung der Immunantwort bei der Maus

Nachdem im Immunoblot mit Patientenseren relativ wenige positive Nachweise von Antikörpern erbracht werden konnten, sollte im Mausmodell untersucht werden, ob es unter einer Infektion zu einer messbaren Antikörperbildung gegen ExPEC-assoziierte Proteine kommt. Zudem sollten die kontrollierten Bedingungen des Mausinfektionsmodells genutzt werden, um die Ergebnisse beim Menschen zu überprüfen und zusätzliche Informationen zu den bisherigen Untersuchungen mit humanen Seren in Bezug auf die möglichen Einflussfaktoren der Antikörperantwort zu erhalten. Als wesentlich waren hier zum einen die Infektionsdauer und zum anderen die Intensität der Infektion zu vermuten. Den Untersuchungen wurde daher neben dem Harnwegsinfektionsmodell das Modell der intraperitonealen Infektion, die der in diesem Tiermodell nicht etablierten Urosepsis am nächsten kommt, zu Grunde gelegt.

Immunantwort nach Harnwegsinfektion:

Die Infektionsversuche für die Gewinnung der in dieser Arbeit verwendeten Seren wurden im Rahmen der Arbeit von K. Hildinger in der AG Schubert durchgeführt. Dabei wurden weibliche Balb/C-Mäuse in einem etablierten Harnwegsinfektionsmodell mit dem *E. coli*-Stamm NU14, einem HWI-Erreger, infiziert. *E. coli* NU14 weist die ExPEC-assoziierten Gene *fyuA*, *iroN* und *usp* auf. Die Infektion erfolgte an den Tagen 0, 10 und 21 intravesikal mit jeweils 10^8 KBE, um ein Persistieren der Infektion für eine ausreichende Zeit sicherzustellen. Am Tag der Infektion (Tag 0) und 28 Tage danach wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen und das Serum bei -20°C gelagert.

Die mit dem *E. coli*-Stamm DH5 α kreuzadsorbierten Mausseren (s. 2.11) wurden entsprechend den humanen Seren 1:100 verdünnt und der Immunoblot mit den Proteinen FyuA, ChuA und Usp wie für die humanen Seren beschrieben durchgeführt. Der gegen IgG der Maus gerichtete Sekundärantikörper wurde in der Verdünnung von 1:10.000 eingesetzt.

In den Seren von vier Mäusen nach Harnwegsinfektion konnten keine spezifischen Antikörper der Klasse IgG weder gegen die Proteine FyuA und Usp noch gegen IroN nachgewiesen werden. Abbildung 3.15 zeigt beispielhaft den negativen Immunoblot mit IroN. Die jeweiligen Kontrollreaktionen gegen IroN und FyuA mit den Kaninchenseren in den auch zuvor verwendeten Verdünnungen waren positiv.

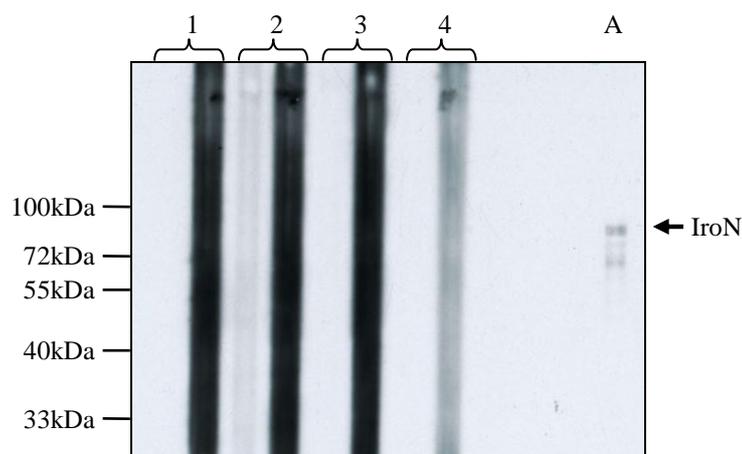


Abbildung 3.15 Immunoblot zum Nachweis von Antikörpern in Mausseren gegen IroN (81kDa) nach Harnwegsinfektion, 1-4: Mäuse 1-4, A: Antiserum gegen IroN

Immunantwort nach intraperitonealer Infektion:

Für diesen Versuch wurde der *E. coli*-Stamm J96 verwendet. Dieser Stamm ist ein bekannter Erreger von Harnwegsinfektionen und weist die Gene *fyuA*, *chuA*, *iroN* und *usp* auf. Nachdem eine 10 ml-Kultur des Stammes wie unter 2.15.1 beschrieben angezüchtet wurde und diese eine OD bei 600 nm von 0,2 erreicht hatte, wurde ein Aliquot der Kultur von 1 ml für die intraperitoneale Infektion vorbereitet (s. 2.15.1). Einer Balb/C-Maus wurde eine subletale Dosis von 0,1 ml (10^7 KBE) intraperitoneal appliziert (s. 2.15.2). Als Kontrolle diente eine Maus, die nicht infiziert wurde. Am 11. Tag nach der Infektion bekam die identische Maus die gleiche Keimzahl erneut intraperitoneal injiziert (*booster*). Das Serum von infizierter und nicht infizierter Maus wurde 21 Tage nach der ersten Infektion gewonnen (s. 2.15.3) und mit dem *E. coli*-Stamm DH5 α kreuzadsorbiert (s. 2.11). Die Mausseren wurden dann analog zu den humanen Seren zum Nachweis von Antikörpern gegen die Proteine FyuA, ChuA, IroN und Usp in den Verdünnungen 1:500 und 1:50 eingesetzt (s. 3.4). Als Sekundärantikörper diente wiederum der gegen IgG der Maus gerichteter Antikörper aus der Ziege.

Bei der infizierten Maus ließen sich 21 Tage nach Infektion Antikörper gegen IroN nachweisen (s. Abbildung 3.16). Demgegenüber zeigte das gesunde Tier keine Antikörperantwort. Wie bei den humanen Seren fiel die Kontrollreaktion mit Kaninchenserum gegen IroN positiv aus. Die Immunblots mit FyuA, ChuA und Usp zeigten keine entsprechenden Banden.

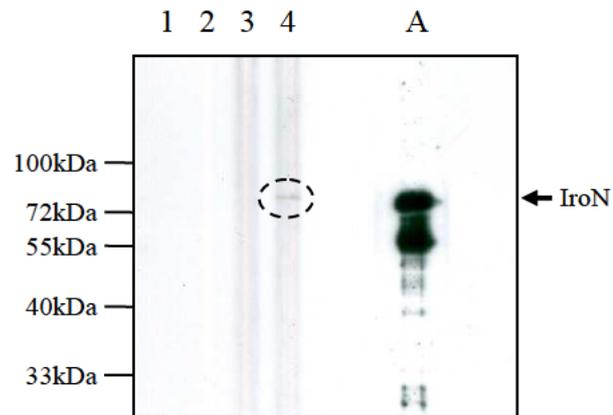


Abbildung 3.16 Immunoblot zum Nachweis von Antikörpern in Mausseren gegen IroN (81 kDa) nach intraperitonealer Infektion, 1: gesunde Maus, 2: infizierte Maus, 3: gesunde Maus, 4: infizierte Maus (Serumverdünnung 1:500 bei 1 und 2, 1:50 bei 3 und 4), A: Antiserum gegen IroN

4 Diskussion

Extraintestinal pathogene *Escherichia coli* (ExPEC) sind beim Menschen die häufigsten Erreger von Harnwegsinfektionen (HWI). Darüber hinaus sind sie in einer Vielzahl der Fälle Verursacher anderer Infektionen wie Pneumonie, Wundinfektion, Peritonitis, Sepsis oder Neugeborenenmeningitis. Daneben haben die den ExPEC genetisch sehr ähnlichen vogelpathogenen *E. coli* (*avian pathogenic E. coli*, APEC) als häufige Erreger einer Aerosakkulitis und der Coliseptikämie eine erhebliche veterinärmedizinische Bedeutung (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005). Wichtig für die erfolgreiche Etablierung einer Infektion durch ExPEC sind eine Reihe von Pathogenitätsfaktoren wie Adhäsine (z. B. Typ I-, S- und P-Fimbrien), Toxine, Eisenaufnahmesysteme und Kapselbestandteile (Johnson, 1991; Oelschlaeger *et al.*, 2002). Bei ExPEC-Isolaten sind im Gegensatz zu kommensalen *E. coli* (s. Tabelle 4.1) gleichzeitig mehrere verschiedene Eisenaufnahmesysteme nachweisbar, die *in vivo* parallel aktiv sind. Darüber hinaus konnte in mehreren Arbeiten in Maus- und Ratteninfektionsmodellen gezeigt werden, dass Eisenaufnahmesysteme bzw. die entsprechenden Siderophorrezeptoren FyuA, IroN, IutA und der Häminrezeptor ChuA für die Virulenz von ExPEC bei Harnwegsinfektionen und bei der Neugeborenenmeningitis von besonderer Bedeutung sind (Torres *et al.*, 2001; Russo *et al.*, 2002; Schubert *et al.*, 2002; Negre *et al.*, 2004). Die erhebliche ExPEC-assoziierte Morbidität und Mortalität mit den damit verbundenen sozioökonomischen Folgen sowie die Zunahme von Antibiotikaresistenzen gegen die Standardantibiotika (Brown *et al.*, 2002; Zhanel *et al.*, 2005) wie etwa das Auftreten von ESBL-Produzenten (*extended-spectrum β -lactamase*) unter *E. coli* verstärkten in den vergangenen Jahren das Interesse an präventiven Strategien gegen ExPEC-Infektionen. Eine vielversprechende Prävention ist die aktive Immunisierung gegen ExPEC.

Da es sich bei *E. coli* um einen extrazellulären Erreger handelt, ist die Bildung protektiver Antikörper ein wichtiges Ziel einer solchen Impfung. Zur Prävention von Infektionen der Harnwege ist es darüber hinaus wichtig, eine lokale mukosale Immunantwort mit der Produktion von sekretorischen Immunglobulin A (sIgA) zu induzieren. Es hat sich gezeigt, dass der Nachweis von Serumantikörpern des Typs IgG nicht direkt mit der mukosalen Immunantwort - also der Bildung von sIgA - korreliert (Neutra & Kozlowski, 2006). Dies bedeutet, dass der Applikationsweg, z. B. parenteral versus oral bzw. nasal, und die Wahl geeigneter Adjuvanzien von besonderer Bedeutung für die erfolgreiche Impfung gegen ExPEC sein wird (Langermann, 1996). Wichtiger aber noch erscheint die Auswahl geeigneter Zielstrukturen für einen solchen ExPEC-Impfstoff.

Eine selektive Immunisierung gegen ExPEC sollte sich idealerweise gegen einen oder mehrere pathogenitäts- / virulenzassoziierte Faktoren als Zielstrukturen richten, die:

- unter extraintestinal pathogenen *E. coli*. weit verbreitet sind und unter kommensalen *E. coli* nicht oder in niedriger Prävalenz anzutreffen sind,
- konservierte Zielstrukturen von hoher Immunogenität sind, d. h. vorzugsweise Proteine sind,
- an der bakteriellen Oberfläche bzw. in der Außenmembran (*outer membrane proteins*, OMP) lokalisiert und daher dem Immunsystem gegenüber exponiert sind. Durch die Bindung von Antikörpern kann es neben der Opsonierung möglicherweise auch zu einer Funktionseinschränkung der Zielstrukturen kommen.

Es ist zu vermuten, dass die bisherigen Immunisierungsversuche mit Fimbrienantigenen oder Kapselpolysacchariden nicht umfassend erfolgreich waren, da - im Gegensatz zu den o. g. Punkten - diese Strukturen auch unter apathogenen Kommensalen im Darm weit verbreitet sind und es so zu einer immunologischen Toleranz kommen könnte. Darüber hinaus weisen Kapselpolysaccharide von *E. coli* neben der generell schwächeren Immunogenität von Polysacchariden gegenüber Proteinen eine erhebliche Antigenvariabilität auf.

Von der Hypothese ausgehend, dass eine ExPEC-Infektion zur Bildung von Antikörpern gegen potentielle Zielstrukturen einer Vakzinierung führt, wurde in dieser Arbeit die humorale Immunantwort unter einer solchen Infektion auf ausgewählte Eisenaufnahmerezeptoren extraintestinal pathogener *E. coli* untersucht.

Hierzu wurde im ersten Teil der Arbeit eine Sammlung von *E. coli*-Patientenisolaten und der entsprechenden Patientenserum angelegt. Von jedem Patienten mit nachgewiesener *E. coli*-Infektion wurde eine Serumprobe vom Beginn der Infektion (Serum 1) und eine weitere aus dem Verlauf (Serum 2) für die Untersuchung der Antikörperantwort eingesetzt. Für eine spezifische Antikörperbildung, die durch die nachgewiesene *E. coli*-Infektion verursacht wurde, sollte ein negativer bzw. schwach positiver Antikörpernachweis in Serum 1 einem entsprechend hochpositivem Nachweis in Serum 2 gegenüber stehen. Zunächst wurden die Isolate mittels PCR hinsichtlich mehrerer ExPEC-assoziiierter Gene, u. a. *fyuA*, *chuA*, *iroN* und *usp*, charakterisiert. Im zweiten Teil wurden die Seren im Immunoblot gegen die rekombinanten Proteine FyuA, IroN, ChuA und Usp eingesetzt. Zum Vergleich wurden Seren aus dem Mausmodell der ExPEC-Infektion untersucht.

Die Isolate stammten überwiegend von weiblichen Patienten (14 Frauen, 9 Männer). Das Durchschnittsalter lag bei 57 Jahren. Von den 23 Patienten waren 15 älter als 60 Jahre. Beide Befunde stehen im Einklang mit dem bei Frauen generell erhöhten und mit dem bei beiden Geschlechtern im Alter weiter zunehmenden Risiko, eine *E. coli*- (Harnwegs-) Infektion zu erleiden. Insgesamt stammten 13 der 23 Isolate aus Blutkulturen. In diesen Fällen war von einem septischen Krankheitsbild auszugehen. Da

eine solche systemischen *E. coli*-Infektion mit einer humoralen Immunantwort des Wirtsorganismus verbunden ist, sollten bei den entsprechenden Patienten im Serum ExPEC-spezifische Antikörper nachweisbar sein. Insbesondere bei den weiblichen Patienten muss berücksichtigt werden, dass sich auch schon in der ersten Serumprobe eventuell Antikörper gegen ExPEC-assoziierte Proteine nachweisen lassen, da es möglicherweise in der Vergangenheit schon zu Harnwegsinfektionen und damit zur Bildung von Antikörpern gekommen ist.

In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Gene, die mit der Eisenaufnahme in Verbindung stehen bzw. für Eisenaufnahmerezeptoren kodieren, unter humanen ExPEC-Isolaten eine erhöhte Prävalenz besitzen. Die dortigen Ergebnisse ergaben für *chuA*, *fyuA*, *iroN*, *iha* und *iutA* unterschiedliche Häufigkeiten von um die 50 % bis über 90 % unter uropathogenen *E. coli* (s. Tabelle 4.1). Lediglich *ireA* wird bei nur 13-47 % der ExPEC nachgewiesen. Der PCR-Gennachweis war in 52% (*chuA*, *fyuA*), 17% (*iroN*), 4% (*ireA*), 43% (*iha*) und 70% (*iutA*) bei den hier untersuchten *E. coli*-Isolaten positiv und lag damit unter den in anderen Arbeiten beschriebenen Prävalenzen.

Tabelle 4.1 Prävalenz von Eisenaufnahmerezeptorgenen unter uropathogenen *E. coli* (UPEC)

Gen	Stuhlisolate (kommensale <i>E. coli</i>)	Cystitis- Isolate	Pyelonephritis-/ Urosepsis-isolate	Literatur
<i>chuA</i>	26-68 %	64 %	87 %	(Hoffmann <i>et al.</i> , 2001) (Duriez <i>et al.</i> , 2001) (Hagan & Mobley, 2007)
<i>fyuA</i>	67 %	69-87 %	87-94 %	(Johnson <i>et al.</i> , 2005b) (Johnson <i>et al.</i> , 2005a) (Johnson & Stell, 2000) (Moreno <i>et al.</i> , 2005) (Bingen-Bidois <i>et al.</i> , 2002)
<i>Iha</i>	17-34 %	24-41 %	39-57 %	(Johnson <i>et al.</i> , 2000) (Bauer <i>et al.</i> , 2002) (Johnson <i>et al.</i> , 2005b) (Johnson <i>et al.</i> , 2005a) (Kanamaru <i>et al.</i> , 2003)
<i>ireA</i>	0 %	13-26 %	47 %	(Johnson <i>et al.</i> , 2005a) (Russo <i>et al.</i> , 2001)
<i>iroN</i>	12-18 %	38-74 %	39-76 %	(Johnson & Stell, 2000) (Bauer <i>et al.</i> , 2002) (Johnson <i>et al.</i> , 2005a) (Kanamaru <i>et al.</i> , 2003)
<i>iutA</i>	17-26 %	29-35 %	63-80 %	(Johnson <i>et al.</i> , 2005b) (Johnson <i>et al.</i> , 2005a) (Bingen-Bidois <i>et al.</i> , 2002) (Moreno <i>et al.</i> , 2005) (Hagan & Mobley, 2007)

Im Gegensatz zu diesen Genen der Eisenaufnahme kodiert das bei 13% der Isolate nachgewiesene Gen *usp* für ein Protein unbekannter Funktion, das von *E. coli* sezerniert wird. Bauer *et al.* sowie Kanamaru *et al.* fanden *usp* bei 59-93% aller Cystitis- und Pyelonephritis-Isolate, hingegen wiesen nur 24-51% der kommensalen *E. coli* diese Gen auf. Diese Arbeiten deuten an, dass *usp* hochgradig ExPEC-assoziiert ist (Bauer *et al.*, 2002; Kanamaru *et al.*, 2003).

Ein Grund für die in dieser Arbeit beobachteten niedrigeren Prävalenzen von ExPEC-assoziierten Genen ist vermutlich die vergleichsweise geringe Anzahl untersuchter Isolate, die keinen repräsentativen Ausschnitt aus der Gruppe der ExPEC widerspiegelt. Besonders bei den Isolaten 3, 12, 50, 54 und 102, bei denen sich keines der untersuchten Gene in der PCR nachweisen ließ, handelt es sich vermutlich um kommensale oder schwach virulente *E. coli* und nicht um ExPEC-Isolate im engeren Sinne. Es ist bekannt, dass unter besonderen Umständen wie z. B. Blasenkatheterisierung (u. a. Isolate 54 und 102) oder Immunsuppression auch solche kommensale oder schwach virulente *E. coli*-Isolate Infektionen verursachen können. Insbesondere der negative Nachweis von *chuA* zeigt, dass es sich nicht um typische ExPEC handelt. Das Gen *chuA* ist ein Kennzeichen von *E. coli*-Isolaten der phylogenetischen Gruppen B2 und D, aus denen nahezu alle ExPEC hervorgehen. Intestinal pathogene und kommensale *E. coli* dominieren hingegen die phylogenetischen Gruppen A und B1 (Clermont *et al.*, 2000; Johnson & Russo, 2002).

Griffith *et al.* konnten bereits vor langem zeigen, dass das Serum gesunder erwachsener Probanden Antikörper gegen eisenregulierte Außenmembranproteine (*outer membrane proteins*, OMP) von *E. coli* aufweist (Griffiths *et al.*, 1985). Diese Antikörper fanden sich interessanterweise nicht bei Kindern. Gegen OMP gerichtete Antikörper der Klasse IgG konnten auch von Nicolle *et al.* bei Patienten mit einer *E. coli* Harnwegsinfektion nachgewiesen werden (Nicolle *et al.*, 1988). In einer tierexperimentellen Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Truthähnen die passive Immunisierung mit Kaninchenantiserum gegen eisenregulierte Außenmembranproteine das Ausmaß der Bakteriämie im Verlauf einer Coliseptikämie durch vogelpathogene *E. coli* reduzierte (Bolin & Jensen, 1987).

Im Laufe der Zeit gelang es, die Gruppe der OMP weiter zu differenzieren und einzelne Eisenaufnahmerezeptoren zu identifizieren, unter ihnen die Siderophorrezeptoren FyuA und IroN sowie der Häminrezeptor ChuA. In dieser Arbeit wurde bei Patienten und im Mausinfektionsmodell die Antikörperantwort gegen die rekombinanten Proteine FyuA, IroN, ChuA und Usp untersucht. Dazu konnte in dieser Arbeit erstmals der Häminrezeptor ChuA rekombinant exprimiert und aufgereinigt werden. Als Methode für den Nachweis von Antikörpern wurde der Immunoblot gewählt. Diese Methode besitzt im Vergleich zu dem *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) eine höhere Spezifität, da beim ELISA auch unspezifische Reaktionen als positiver Nachweis gewertet werden könnten. Derartige unspezifische Reaktionen können im Immunoblot durch die Darstellung der spezifischen Proteinbanden und Zuordnung derselben zu den

entsprechenden Proteingrößen erkannt bzw. ausgeschlossen werden. Um die Qualität des Immunoblots weiter zu steigern, wurden die Patientenserum durch die vorherige Kreuzadsorption mit einem apathogenen Stamm vorbehandelt. Darüber hinaus wurden die Gene *iroN* und *usp* einerseits sowie *fyuA* und *chuA* andererseits jeweils in den gleichen Vektor kloniert und im gleichen Bakterienstamm exprimiert. Durch den Vergleich der jeweiligen Immunoblots konnten so Antikörperreaktionen, die auf einer unspezifischen Bindung beruhen, erkannt werden.

Die Immunoblot-Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit erbrachten bei den Patienten keinen Nachweis von Antikörpern gegen den Yersiniabaktin-Siderophorrezeptor FyuA. Dies war überraschend, da der Einfluss des Yersiniabaktinsystems auf die Virulenz von ExPEC deutlich belegt ist (Schubert *et al.*, 2002). Auch konnten Durant *et al.* bei Immunisierungen von Mäusen mit rekombinantem FyuA im ExPEC-Peritonitismodell die Mortalität senken (Durant *et al.*, 2007). Ein möglicher Grund für eine fehlende Antikörperreaktion bei den Patienten könnte darin liegen, dass das Yersiniabaktinsystem gegenüber anderen Siderophorsystemen bei den ExPEC-Isolaten der Patienten *in vivo* in geringerem Maße exprimiert wurde. So ist bislang nicht genau bekannt, wann und in welchem Umfang die unterschiedlichen Siderophorsysteme durch ExPEC *in vivo* bei einer Infektion exprimiert werden. Snyder *et al.* zeigten mittels *microarray*-Untersuchungen des Transkriptoms des UPEC-Stammes CFT073, dass dieser bei der Cystitis in der Maus vermehrt *IroN* und *ChuA* exprimiert (Snyder *et al.*, 2004). Eine deutlich erhöhte Expression von Eisenaufnahmerezeptoren, u. a. von *IroN* und *ChuA*, wurde auch von Alteri & Mobley bei uropathogenen *E. coli*-Stämmen während des Wachstums unter eisenlimitierten Bedingungen im Urin im Vergleich zum relativ eisenhaltigen LB-Medium beobachtet (Alteri & Mobley, 2007). Alteri & Mobley führten ihre Untersuchungen sowohl auf der Ebene des Transkriptoms als auch des Proteoms mittels *real-time* PCR (RT-PCR) bzw. einer quantitativen Proteingelektrophorese durch. Neben der *IroN*- und *ChuA*-Expression *ex vivo* unter verschiedenen *in vivo*-ähnlichen Bedingungen (z. B. in Urin) konnte eine Arbeit von Hagan & Mobley die Antikörperbildung gegen diese beiden Proteine im Harnwegsinfektionsmodell der Maus zeigen (Hagan & Mobley, 2007). Interessanterweise kam es in der vorliegenden Arbeit bei zwei der 12 untersuchten Patienten unter der Infektion mit *E. coli* zur Bildung von Serumantikörpern vom Typ IgG gegen das Häminrezeptor-Protein *ChuA*. Keines der Seren der Kontrollprobanden wies dabei *ChuA*-spezifische Antikörper auf. Noch deutlicher fielen die Ergebnisse für *IroN* aus. Hier wiesen alle der untersuchten Patienten mit einer *E. coli*- Infektion Antikörper der Klasse IgG gegen *IroN* auf. Allerdings waren die Antikörper nicht nur im späteren Verlauf der Infektion (Serum 2), sondern bereits direkt zu Beginn (Serum 1) nachweisbar. Darüber hinaus konnten auch in den Seren der vier nicht erkrankten Kontrollpersonen entsprechende Antikörper nachgewiesen werden. Da diese Antikörperbildung vermutlich nicht auf einer vorangegangenen oder - bei den Patienten- auf der aktuellen Infektion mit *E. coli* beruhte, könnten diese positiven Nachweise auf einer Kreuzreaktion von in humanen

Seren vorkommenden Antikörpern beruhen. Es ist auch denkbar, dass es zur Expression von IroN durch extraintestinal pathogene *E. coli* kommt, die den Darm kolonisieren. Dies ist nicht unwahrscheinlich, da trotz der anaeroben Bedingungen im Darm in der Nähe der gut durchbluteten Darmwand eine sauerstoffreiche Umgebung besteht. So liegt Eisen im Darmlumen unter anaeroben Bedingungen überwiegend in Form freier und für *E. coli* gut verwertbarer Fe^{2+} -Ionen vor, während es an der Darmmukosa unter aeroben Bedingungen zur Bildung schwerlöslicher Fe^{3+} -Komplexe kommt, so dass die Verfügbarkeit freier Eisenionen vermutlich zur Darmwand hin abnimmt. Dort ist die Expression von Siderophor-Rezeptoren wahrscheinlich, die zur Induktion der humoralen Immunantwort gegen diese Proteine führen könnte. In wie weit dieses Ergebnis möglicherweise mit der Bildung protektiver Antikörper durch eine Immunisierung mit IroN in Einklang zu bringen ist, lässt sich nur sehr schwer beurteilen. Prinzipiell konnte jedoch in Arbeiten von Russo *et al.* die Bildung protektiver Antikörper gegen IroN im Mausmodell gezeigt werden (Russo *et al.*, 2003). In der Arbeit von Russo *et al.* wurden dabei Mäuse subkutan mit rekombinatem IroN immunisiert. Diese Immunisierung führte nicht nur zum Nachweis von IgG-Serumantikörpern gegen IroN im ELISA, sondern verminderte auch signifikant die Ausbreitung einer Harnwegsinfektion auf die Nieren. Gestützt wird die Eignung von IroN als Zielstruktur einer Vakzinierung durch die Ergebnisse von Durant *et al.* (Durant *et al.*, 2007). Dort senkte wie schon oben für FyuA erwähnt sowohl die aktive als auch die passive Immunisierung gegen rekombinantes IroN die Mortalität unter Mäusen, die intraperitoneal mit einem ExPEC-Stamm infiziert wurden.

Nachdem im Immunoblot mit den Patientenserum relativ wenige positive Antikörpernachweise erbracht werden konnten, wurden zum Vergleich Seren aus dem Mausinfektionsmodell analog zu den humanen Seren untersucht. Mögliche Einflussfaktoren auf die Induzierung einer Antikörperantwort wie etwa die Infektionsdauer, der Infektionsort und die Intensität der Infektion konnten so genau definiert werden. Neben dem Harnwegsinfektionsmodell wurde daher das Peritonitismodell verwendet.

Eine Harnwegsinfektion führte bei der Maus weder gegen IroN noch gegen FyuA zu nachweisbaren Antikörpern. Die Antikörperbildung auf ChuA wurde bei der Harnwegsinfektion nicht untersucht, da der für das Harnwegsinfektionsmodell verwendete ExPEC-Stamm NU14 den Häminrezeptor nicht aufweist. Entsprechende Anti-ChuA-Antikörper konnten allerdings auch nicht im ExPEC-Peritonitismodell der Maus nachgewiesen werden, bei dem der ChuA-tragende ExPEC-Stamm J96 zum Einsatz kam. Hingegen konnte durch die intraperitoneale Infektion der Maus mit dem ExPEC-Stamm J96 eine Antikörperbildung gegen IroN, nicht jedoch gegen FyuA hervorgerufen werden. Noch mehr als bei der Untersuchung der Patientenserum stellt sich die Frage, in wie weit die Expression der einzelnen Eisenaufnahmerezeptoren einen Einfluss auf die Antikörperantwort hat, da weitgehend unklar ist, in welchem Maße der Verlauf einer artifiziell zugefügten Infektion dem einer natürlichen Infektion entspricht.

Zusätzlich zu den besprochenen Eisenaufnahmerezeptoren wurde in dieser Arbeit die humorale Immunantwort auf das Protein Usp untersucht. Gegen dieses Protein konnten jedoch weder in den humanen noch in den murinen Seren Antikörper nachgewiesen werden. Bisher ist die genaue Funktion von Usp bei ExPEC nicht bekannt. Aufgrund von Homologien zu Bakteriozinen von *Pseudomonas aeruginosa* und *Photobacterium luminescens* könnte es sich bei Usp möglicherweise um ein Bakteriozin handeln (Parret & De, 2002; Sharma *et al.*, 2002). Obwohl Bakteriozine gegen Bakterien in der Umgebung gerichtet sind und nicht gegen den Wirtsorganismus, wird Usp offenbar auch während einer ExPEC-Infektion produziert und in die Umgebung der Bakterien abgegeben. Dabei lagert sich Usp vermutlich auch an die äußere Zellwand der Bakterien an, sodass eine erfolgreiche Immunisierung gegen Usp vermutlich auch einen Schutz gegen ExPEC hervorrufen könnte.

Neben der unterschiedlichen Expression der einzelnen Proteine könnten sowohl bei den Patienten als auch im Mausmodell die Dauer und die Intensität der ExPEC-Infektion die Bildung von Antikörpern beeinflusst haben. Generell wurde in allen Immunoblots auf Antikörper der Klasse IgG getestet. Da der Abnahmetag des zweiten Serums bei den Patienten mindestens 14 Tage nach der Isolierung des *E. coli*-Stammes lag, war zu diesem Zeitpunkt mit dem Auftreten dieser Antikörperklasse im Serum zu rechnen. Auch die Infektionsdauer bei der Maus war mit 28 Tagen bei der Harnwegsinfektion und mit 21 Tagen bei der Peritonitis so gewählt, dass es zu einer entsprechenden Antikörperantwort kommen sollte. Es ist jedoch möglich, dass insbesondere bei Harnwegsinfektionen mit einer längeren Latenz bis zum Auftreten von Antikörpern im Serum zu rechnen ist. In der kürzlich publizierten Arbeit von Hagan & Mobley konnten Antikörpern gegen ChuA und IroN nachgewiesen werden, indem die Harnwegsinfektion der Mäuse über 12 Wochen aufrecht erhalten wurde (Hagan & Mobley, 2007). Eine Erklärung für diese verlängerte Latenz ist möglicherweise, dass die lokale mukosale Immunantwort bei einer Harnwegsinfektion nur zum Teil mit einer systemischen Antikörperantwort, d. h. mit messbaren IgG-Spiegeln im Serum, einhergeht. Für die These, dass das Auftreten von Antikörpern im Serum daher auch von der Intensität der Infektion (systemische versus lokale Infektion) abhängt, sprechen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Bei beiden Patienten, die Antikörper gegen ChuA im Verlauf der Infektion bildeten, wurde *E. coli* in der Blutkultur isoliert. Ebenso fiel bei der Maus der Nachweis von Antikörpern gegen IroN bei der Peritonitis positiv aus, nicht jedoch bei der Harnwegsinfektion. Bei den Patienten könnten die Dauer und Intensität der Infektion, die zur Ausbildung einer entsprechenden Antikörperantwort führen, auch durch eine erfolgreiche Antibiotikatherapie begrenzt worden sein. Es fiel zudem auf, dass sowohl beim Menschen als auch bei der Maus Antikörper gegen IroN, aber nicht gegen FyuA nachgewiesen werden konnten. Dies könnte auch für eine unterschiedliche Immunogenität der beiden Proteine sprechen und somit die beobachteten Unterschiede der Antikörperantwort erklären.

Bei der Beurteilung der Immunoblot-Untersuchungen dieser Arbeit ist zu bedenken, dass das beschriebene Vorgehen zu einer erhöhten Spezifität der Immunoblots führte,

dadurch aber die Sensitivität etwas reduziert war. Dies kann eine methodisch bedingte Ursache für einen fehlenden Antikörpernachweis darstellen. So ist es denkbar, dass durch die Kreuzadsorption der Seren vor dem Immunoblot spezifische Antikörper aus den Seren entfernt wurden. Serumantikörper gegen die untersuchten Proteine könnten in diesem Fall mit einem anderen Protein des zur Kreuzadsorption eingesetzten Stammes reagiert haben. Die Kreuzadsorption war jedoch notwendig, weil hierdurch die Zahl unspezifischer Banden im Immunoblot deutlich reduziert werden konnte. Auch könnte es durch den Einsatz der rekombinanten und nach Aufreinigung denaturierten Proteine zum Verlust von in nativem Zustand vorhandenen Konformationsepitopen gekommen sein. Im Gegensatz zur zellulären Immunantwort, die auf der Erkennung bestimmter Peptidsequenzen beruht, werden von Antikörpern häufig Konformationsepitope erkannt, die durch die spezifische Faltung der Proteine entstehen. Nach Denaturierung der rekombinanten Proteine können entsprechende Antikörper dann jedoch nicht mehr an diese Epitope binden. Die Aufreinigung von Eisenaufnahmerezeptoren muss in der Regel jedoch denaturierend erfolgen, da diese als Außenmembranproteine nur eine geringe Löslichkeit aufweisen. Auch Russo *et al.* und Durant *et al.* verwendeten für ihre Immunisierungsversuche mit IroN und FyuA die denaturierend aufgereinigten Proteine (Russo *et al.*, 2003; Durant *et al.*, 2007). In diesem Zusammenhang muss auch darauf hingewiesen werden, dass die Kontrollreaktion in den Immunoblots für FyuA und IroN mit dem Kaninchenserum nicht mit der Reaktion von Patienten- oder Mäuseseren vergleichbar ist. Bei der Infektion kommt es zur Expression des nativ gefalteten Proteins gegen das ggf. Antikörper gebildet werden, während die Kaninchen mit dem rekombinanten Protein immunisiert wurden. Die Seren von Patienten und Mäusen sowie die Kaninchenserum wurden dann jedoch im Immunoblot gleichermaßen gegen das rekombinante denaturierte Protein eingesetzt.

Zusammenfassend betrachtet konnten in dieser Arbeit die unterschiedlichen Prävalenzen von virulenzassoziierten Faktoren unter ExPEC bestätigt werden und es ist erstmals gelungen, bei Patienten mit einer ExPEC-Infektion spezifische Antikörper gegen einzelne Eisenaufnahmerezeptor-Proteine von ExPEC nachzuweisen. Die insgesamt geringe Prävalenz von Antikörpern nach einer Infektion bzw. die Unterschiede in der humoralen Immunantwort gegen die einzelnen Eisenaufnahmerezeptoren sind vermutlich auf Unterschiede in der Expression und in der Immunogenität der Eisenaufnahmerezeptor-Proteine auf der einen Seite und auf die Dauer und Intensität der Infektion auf der anderen Seite zurückzuführen.

Grundsätzlich konnten die Ergebnisse dieser Arbeit die Eignung von Eisenaufnahmerezeptoren als potentielle Zielstrukturen eines Impfstoffes unterstreichen. Für die Entwicklung einer Vakzine gegen ExPEC bedeutet die heterogene Verteilung der einzelnen Eisenaufnahmesysteme unter ExPEC und die in dieser Arbeit aufgezeigten Unterschiede der humoralen Immunantwort jedoch, dass es wahrscheinlich nötig sein wird, einen polyvalenten Kombinationsimpfstoff (*subunit*-Vakzine) zu generieren, der eine Antikörperantwort auf mehrere Eisenaufnahmerezeptoren und andere Zielstrukturen wie Adhäsine und Toxine

hervorrufen. Ein alternativer auf dem gleichen Prinzip beruhender Ansatz bietet der Versuch der Immunisierung mit ganzen Zellen (Ganzkeimvakzine) (Russo *et al.*, 2007).

Es spricht vieles dafür, dass sich mit einem polyvalenten ExPEC-Impfstoff in Zukunft ein effektiver Schutz gegen ExPEC-Infektionen erreichen lassen wird. Diese Arbeit erbrachte den Nachweis einer humoralen Immunantwort auf virulenzassoziierte ExPEC-Proteine und lässt diese als mögliche Zielstrukturen eines ExPEC-Impfstoffes sinnvoll erscheinen.

5 Zusammenfassung

Extraintestinal pathogene *Escherichia coli* (ExPEC) sind die häufigsten Erreger von Harnwegsinfektionen beim Menschen. Darüber hinaus können sie eine Vielzahl weiterer Erkrankungen wie Pneumonie, Wundinfektion, Neugeborenenmeningitis oder Sepsis hervorrufen. Hierzu verfügen ExPEC über ein breites Repertoire von Pathogenitätsfaktoren wie Adhäsine, Toxine und Eisenaufnahmesysteme. Wesentlicher Bestandteil von Eisenaufnahmesystemen sind Rezeptoren in der bakteriellen Außenmembran, wie z. B. die Siderophorrezeptoren FyuA und IroN sowie der Häminrezeptor ChuA. Ihre Assoziation mit der Virulenz von ExPEC und die Lokalisation in der Außenmembran bzw. an der bakteriellen Oberfläche lassen Eisenaufnahmerezeptoren als geeignete Zielstrukturen eines Impfstoffes gegen ExPEC erscheinen.

Die vorliegende Arbeit erbrachte grundlegende Erkenntnisse hinsichtlich der Eignung von Eisenaufnahmerezeptoren als potentielle Zielstrukturen, indem Seren von Patienten mit einer *E. coli*-Infektion und Seren aus dem Mausinfektionsmodell im Immunoblot auf Antikörper gegen FyuA, ChuA und IroN untersucht wurden. Hierzu wurde eine Sammlung von *E. coli*-Patientenisolaten und der entsprechenden Patientenserum angelegt. Die Isolate wurden mittels PCR hinsichtlich mehrerer ExPEC-assoziiierter Gene, u. a. *fyuA*, *chuA*, *iroN* und *usp* charakterisiert. Im Immunoblot wurden dann die Seren auf Antikörper gegen die rekombinanten Proteine FyuA, IroN, ChuA und Usp getestet. Im Unterschied zu FyuA, ChuA und IroN handelt es sich bei dem zusätzlich untersuchten Usp um ein ExPEC-Protein mit bisher weitgehend unklarer Funktion.

Die unterschiedliche Prävalenz von ExPEC-assoziierten Faktoren unter den Patientenisolaten konnte bestätigt werden. Es gelang erstmals, bei Patienten spezifische Antikörper gegen Eisenaufnahmerezeptoren von ExPEC nachzuweisen. Für die hierzu durchgeführten Immunoblot-Untersuchungen konnte in dieser Arbeit erstmals der Häminrezeptor ChuA rekombinant exprimiert und aufgereinigt werden. Die humorale Immunantwort gegen die einzelnen Eisenaufnahmerezeptoren wies ein relativ heterogenes Bild auf. Während bei den Patienten einerseits Antikörper unter der Infektion gebildet wurden (ChuA), waren sie andererseits bei IroN offenbar schon vorher vorhanden oder konnten, wie für FyuA gezeigt, nicht nachgewiesen werden. Auch im Mausmodell der ExPEC-Peritonitis fanden sich nur Antikörper gegen IroN, die in einem entsprechenden Tiermodell der ExPEC-Harnwegsinfektion nicht darstellbar waren. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit ist es denkbar, dass die Bildung von Antikörpern gegen ExPEC-Außenmembranproteine zum einen von der Intensität und der Dauer der Infektion und zum anderen von Unterschieden in der Expression und in der Immunogenität der einzelnen Eisenaufnahmerezeptor-Proteine abhängig ist. Es ist jedoch nicht völlig auszuschließen, dass auch methodische Gründe

(z. B. bei der Durchführung des Immunoblots) die Antikörpernachweise negativ beeinflusst haben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten die Bedeutung von Eisenaufnahmerezeptoren als potentielle Zielstrukturen eines Impfstoffes bestätigen. Insbesondere die Rolle von IroN wurde durch die Beobachtungen unterstrichen. Die unterschiedliche Prävalenz der einzelnen Eisenaufnahmesysteme unter ExPEC und die Unterschiede der humoralen Immunantwort deuten jedoch darauf hin, dass es nötig sein wird, einen polyvalenten Kombinationsimpfstoff herzustellen, der gleichzeitig gegen mehrere Eisenaufnahmerezeptoren sowie weitere Zielstrukturen wie Adhäsine und Toxine Antikörperantworten erzeugt.

Literaturverzeichnis

Alteri, C.J., Mobley, H.L. 2007. Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. *Infect. Immun.* **75**: 2679-2688

Bauer, R.J., Zhang, L., Foxman, B., Siitonen, A., Jantunen, M.E., Saxen, H. and Marrs, C.F. 2002. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *iroN*(*E. coli*). *J. Infect. Dis.* **185**: 1521-1524

Beutler, B. 2000. Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 23-28

Bhakdi, S., Bayley, H., Valeva, A., Walev, I., Walker, B., Kehoe, M. and Palmer, M. 1996. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch. Microbiol.* **165**: 73-79

Bingen-Bidois, M., Clermont, O., Bonacorsi, S., Terki, M., Brahimi, N., Loukil, C., Barraud, D. and Bingen, E. 2002. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect. Immun.* **70**: 3216-3226

Bolin, C.A., Jensen, A.E. 1987. Passive immunization with antibodies against iron-regulated outer membrane proteins protects turkeys from *Escherichia coli* septicemia. *Infect. Immun.* **55**: 1239-1242

Braun, V. 2003. Iron uptake by *Escherichia coli*. *Front. Biosci.* **8**: 1409-1421

Brown, P.D., Freeman, A. and Foxman, B. 2002. Prevalence and predictors of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Michigan. *Clin. Infect. Dis.* **34**: 1061-1066

Bullen, J.J., Rogers, H.J., Spalding, P.B. and Ward, C.G. 2005. Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **43**: 325-330

Clermont, O., Bonacorsi, S. and Bingen, E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4555-4558

Deo, S.S., Vaidya, A.K. 2004. Elevated levels of secretory immunoglobulin A (sIgA) in urinary tract infections. *Indian J. Pediatr.* **71**: 37-40

Durant, L., Metais, A., Soulama-Mouze, C., Genevard, J.M., Nassif, X. and Escaich, S. 2007. Identification of candidates for a subunit vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **75**: 1916-1925

Duriez, P., Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., Chaventre, A., Elion, J., Picard, B. and Denamur, E. 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* **147**: 1671-1676

Falzano, L., Quaranta, M.G., Travaglione, S., Filippini, P., Fabbri, A., Viora, M., Donelli, G. and Fiorentini, C. 2003. Cytotoxic necrotizing factor 1 enhances reactive oxygen species-dependent transcription and secretion of proinflammatory cytokines in human uroepithelial cells. *Infect. Immun.* **71**: 4178-4181

Faro, S., Fenner, D.E. 1998. Urinary tract infections. *Clin. Obstet. Gynecol.* **41**: 744-754

Fischer, H., Yamamoto, M., Akira, S., Beutler, B. and Svanborg, C. 2005. Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: Fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *Eur. J. Immunol.* **36**: 267-277

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

Foxman, B., Gillespie, B., Koopman, J., Zhang, L., Palin, K., Tallman, P., Marsh, J.V., Spear, S., Sobel, J.D., Marty, M.J. and Marrs, C.F. 2000. Risk factors for second urinary tract infection among college women. *Am. J. Epidemiol.* **151**: 1194-1205

Freundus, B., Wachtler, C., Hedlund, M., Fischer, H., Samuelsson, P., Svensson, M. and Svanborg, C. 2001. *Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Mol. Microbiol.* **40**: 37-51

Giuliani, M.M., du-Bobie, J., Comanducci, M., Arico, B., Savino, S., Santini, L., Brunelli, B., Bambini, S., Biolchi, A., Capecchi, B., Cartocci, E., Ciucchi, L., Di, M.F., Ferlicca, F., Galli, B. et al. 2006. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**: 10834-10839

Godaly, G., Bergsten, G., Hang, L., Fischer, H., Frendeus, B., Lundstedt, A.C., Samuelsson, M., Samuelsson, P. and Svanborg, C. 2001. Neutrophil recruitment, chemokine receptors, and resistance to mucosal infection. *J. Leukoc. Biol.* **69**: 899-906

Goluszko, P., Niesel, D., Nowicki, B., Selvarangan, R., Nowicki, S., Hart, A., Pawelczyk, E., Das, M., Urvil, P. and Hasan, R. 2001. Dr operon-associated invasiveness of *Escherichia coli* from pregnant patients with pyelonephritis. *Infect. Immun.* **69**: 4678-4680

Griffiths, E., Stevenson, P., Thorpe, R. and Chart, H. 1985. Naturally occurring antibodies in human sera that react with the iron-regulated outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **47**: 808-813

Groisman, E.A., Ochman, H. 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* **87**: 791-794

Hacker, J., Bender, L., Ott, M., Wingender, J., Lund, B., Marre, R. and Goebel, W. 1990. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb. Pathog.* **8**: 213-225

Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I. and Tschäpe, H. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**: 1089-1097

Hagan, E.C., Mobley, H.L. 2007. Uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane antigens expressed during urinary tract infection. *Infect. Immun.* **75**: 3941-3949

Hedlund, M., Frendeus, B., Wachtler, C., Hang, L., Fischer, H. and Svanborg, C. 2001. Type 1 fimbriae deliver an LPS- and TLR4-dependent activation signal to CD14-negative cells. *Mol. Microbiol.* **39**: 542-552

Hochhut, B., Dobrindt, U. and Hacker, J. 2005. Pathogenicity islands and their role in bacterial virulence and survival. *Contrib. Microbiol.* **12**: 234-254

Hoffmann, C., Schmidt, G. 2004. CNF and DNT. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **152**: 49-63

Hoffmann, H., Hornef, M.W., Schubert, S. and Roggenkamp, A. 2001. Distribution of the outer membrane haem receptor protein ChuA in environmental and human isolates of *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 227-230

- Hopkins, W.J., Uehling, D.T.** 1995. Resolution time of *Escherichia coli* cystitis is correlated with levels of preinfection antibody to the infecting *Escherichia coli* strain. *Urology* **45**: 42-46
- Horwitz, M.A., Silverstein, S.C.** 1980. Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. *J. Clin. Invest.* **65**: 82-94
- Hull, R.A., Gill, R.E., Hsu, P., Minshew, B.H. and Falkow, S.** 1981. Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect. Immun.* **33**: 933-938
- Johnson, J.R.** 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev.* **4**: 80-128
- Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Gajewski, A., Soto, S., Horcajada, J.P., Jimenez de Anta, M.T. and Vila, J.** 2005a. Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J. Infect. Dis.* **191**: 46-50
- Johnson, J.R., Owens, K., Gajewski, A. and Kuskowski, M.A.** 2005b. Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 6064-6072
- Johnson, J.R., Russo, T.A.** 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". *J. Lab. Clin. Med.* **139**: 155-162
- Johnson, J.R., Russo, T.A.** 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* **295**: 383-404
- Johnson, J.R., Russo, T.A., Tarr, P.I., Carlino, U., Bilge, S.S., Vary, J.C., Jr. and Stell, A.L.** 2000. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN*(*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infect. Immun.* **68**: 3040-3047
- Johnson, J.R., Stell, A.L.** 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* **181**: 261-272
- Kaijser, B., Ahlstedt, S.** 1977. Protective capacity of antibodies against *Escherichia coli* and K antigens. *Infect. Immun.* **17**: 286-289

Kaijser, B., Larsson, P. and Olling, S. 1978. Protection against ascending *Escherichia coli* pyelonephritis in rats and significance of local immunity. *Infect. Immun.* **20**: 78-81

Kanamaru, S., Kurazono, H., Ishitoya, S., Terai, A., Habuchi, T., Nakano, M., Ogawa, O. and Yamamoto, S. 2003. Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors *iroN*, *iha*, *kpsMT*, *ompT* and *usp* in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. *J. Urol.* **170**: 2490-2493

Kucheria, R., Dasgupta, P., Sacks, S.H., Khan, M.S. and Sheerin, N.S. 2005. Urinary tract infections: new insights into a common problem. *Postgrad. Med. J.* **81**: 83-86

Kurazono, H., Yamamoto, S., Nakano, M., Nair, G.B., Terai, A., Chaicumpa, W. and Hayashi, H. 2000. Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic *Escherichia coli* possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. *Microb. Pathog.* **28**: 183-189

Langermann, S. 1996. New approaches to mucosal immunization. *Semin. Gastrointest. Dis.* **7**: 12-18

Langermann, S., Mollby, R., Burlein, J.E., Palaszynski, S.R., Auguste, C.G., DeFusco, A., Strouse, R., Schenerman, M.A., Hultgren, S.J., Pinkner, J.S., Winberg, J., Guldevall, L., Soderhall, M., Ishikawa, K., Normark, S. and Koenig, S. 2000. Vaccination with FimH adhesin protects cynomolgus monkeys from colonization and infection by uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **181**: 774-778

Langermann, S., Palaszynski, S., Barnhart, M., Auguste, G., Pinkner, J.S., Burlein, J., Barren, P., Koenig, S., Leath, S., Jones, C.H. and Hultgren, S.J. 1997. Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* **276**: 607-611

Mehnert-Kay, S.A. 2005. Diagnosis and management of uncomplicated urinary tract infections. *Am. Fam. Physician* **72**: 451-456

Mobley, H.L., Green, D.M., Trifillis, A.L., Johnson, D.E., Chippendale, G.R., Lockett, C.V., Jones, B.D. and Warren, J.W. 1990. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect. Immun.* **58**: 1281-1289

- Moreno, E., Planells, I., Prats, G., Planes, A.M., Moreno, G. and Andreu, A.** 2005. Comparative study of *Escherichia coli* virulence determinants in strains causing urinary tract bacteremia versus strains causing pyelonephritis and other sources of bacteremia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **53**: 93-99
- Mulvey, M.A.** 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* **4**: 257-271
- Mulvey, M.A., Lopez-Boado, Y.S., Wilson, C.L., Roth, R., Parks, W.C., Heuser, J. and Hultgren, S.J.** 1998. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **282**: 1494-1497
- Mulvey, M.A., Schilling, J.D., Martinez, J.J. and Hultgren, S.J.** 2000. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**: 8829-8835
- Nagy, G., Dobrindt, U., Kupfer, M., Emody, L., Karch, H. and Hacker, J.** 2001. Expression of hemin receptor molecule ChuA is influenced by RfaH in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect. Immun.* **69**: 1924-1928
- Negre, V.L., Bonacorsi, S., Schubert, S., Bidet, P., Nassif, X. and Bingen, E.** 2004. The siderophore receptor IroN, but not the high-pathogenicity island or the hemin receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis. *Infect. Immun.* **72**: 1216-1220
- Neutra, M.R., Kozlowski, P.A.** 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 148-158
- Nicolle, L.E., Ujack, E., Brunka, J. and Bryan, L.E.** 1988. Immunoblot analysis of serologic response to outer membrane proteins of *Escherichia coli* in elderly individuals with urinary tract infections. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 2087-2091
- O'Hanley, P., Lalonde, G. and Ji, G.** 1991. Alpha-hemolysin contributes to the pathogenicity of piliated digalactoside-binding *Escherichia coli* in the kidney: efficacy of an alpha-hemolysin vaccine in preventing renal injury in the BALB/c mouse model of pyelonephritis. *Infect. Immun.* **59**: 1153-1161
- Oelschlaeger, T.A., Dobrindt, U. and Hacker, J.** 2002. Virulence factors of uropathogens. *Curr. Opin. Urol.* **12**: 33-38
- Pak, J., Pu, Y., Zhang, Z.T., Hasty, D.L. and Wu, X.R.** 2001. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. *J. Biol. Chem.* **276**: 9924-9930

Parret, A.H., De, M.R. 2002. *Escherichia coli*'s uropathogenic-specific protein: a bacteriocin promoting infectivity? *Microbiology* **148**: 1604-1606

Pecha, B., Low, D. and O'Hanley, P. 1989. Gal-Gal pili vaccines prevent pyelonephritis by piliated *Escherichia coli* in a murine model. Single-component Gal-Gal pili vaccines prevent pyelonephritis by homologous and heterologous piliated *E. coli* strains. *J. Clin. Invest.* **83**: 2102-2108

Roberts, J.A., Hardaway, K., Kaack, B., Fussell, E.N. and Baskin, G. 1984. Prevention of pyelonephritis by immunization with P-fimbriae. *J. Urol.* **131**: 602-607

Roberts, J.A., Kaack, M.B., Baskin, G., Chapman, M.R., Hunstad, D.A., Pinkner, J.S. and Hultgren, S.J. 2004. Antibody responses and protection from pyelonephritis following vaccination with purified *Escherichia coli* PapDG protein. *J. Urol.* **171**: 1682-1685

Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Fakhr, M.K. and Nolan, L.K. 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* **151**: 2097-2110

Russo, T.A., Beanan, J.M., Olson, R., Genagon, S.A., Macdonald, U., Cope, J.J., Davidson, B.A., Johnston, B. and Johnson, J.R. 2007. A killed, genetically engineered derivative of a wild-type extraintestinal pathogenic *E. coli* strain is a vaccine candidate. *Vaccine* **25**: 3859-3870

Russo, T.A., Carlino, U.B. and Johnson, J.R. 2001. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **69**: 6209-6216

Russo, T.A., Johnson, J.R. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect.* **5**: 449-456

Russo, T.A., Johnson, J.R. 2006. Extraintestinal isolates of *Escherichia coli*: identification and prospects for vaccine development. *Expert. Rev. Vaccines.* **5**: 45-54

Russo, T.A., McFadden, C.D., Carlino-MacDonald, U.B., Beanan, J.M., Barnard, T.J. and Johnson, J.R. 2002. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **70**: 7156-7160

- Russo, T.A., McFadden, C.D., Carlino-MacDonald, U.B., Beanan, J.M., Olson, R. and Wilding, G.E.** 2003. The Siderophore receptor IroN of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a potential vaccine candidate. *Infect Immun.* **71**: 7164-7169
- Saemann, M.D., Weichhart, T., Horl, W.H. and Zlabinger, G.J.** 2005. Tamm-Horsfall protein: a multilayered defence molecule against urinary tract infection. *Eur. J Clin. Invest.* **35**: 227-235
- Salit, I.E., Hanley, J., Clubb, L. and Fanning, S.** 1988. The human antibody response to uropathogenic *Escherichia coli*: a review. *Can. J. Microbiol.* **34**: 312-318
- Schaible, U.E., Kaufmann, S.H.** 2004. Iron and microbial infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 946-953
- Schembri, M.A., Klemm, P.** 2001. Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel fimh variants and ramifications for virulence. *Infect. Immun.* **69**: 1322-1328
- Schlager, T.A., Whittam, T.S., Hendley, J.O., Bhang, J.L., Wobbe, C.L. and Stapleton, A.** 2003. Variation in frequency of the virulence-factor gene in *Escherichia coli* clones colonizing the stools and urinary tracts of healthy prepubertal girls. *J. Infect. Dis.* **188**: 1059-1064
- Schmidt, H., Hensel, M.** 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* **17**: 14-56
- Schmidt, M.A., O'Hanley, P., Lark, D. and Schoolnik, G.K.** 1988. Synthetic peptides corresponding to protective epitopes of *Escherichia coli* digalactoside-binding pilin prevent infection in a murine pyelonephritis model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **85**: 1247-1251
- Schubert, S., Cuenca, S., Fischer, D. and Heesemann, J.** 2000. High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. *J. Infect. Dis.* **182**: 1268-1271
- Schubert, S., Picard, B., Gouriou, S., Heesemann, J. and Denamur, E.** 2002. *Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Infect Immun.* **70**: 5335-5337
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E. and Heesemann, J.** 1998. Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect Immun.* **66**: 480-485

Sharma, S., Waterfield, N., Bowen, D., Rocheleau, T., Holland, L., James, R. and French-Constant, R. 2002. The lumicins: novel bacteriocins from *Photobacterium luminescens* with similarity to the uropathogenic-specific protein (USP) from uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **214**: 241-249

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

Struve, C., Krogfelt, K.A. 1999. In vivo detection of *Escherichia coli* type 1 fimbrial expression and phase variation during experimental urinary tract infection. *Microbiology* **145 (Pt 10)**: 2683-2690

Suerbaum, S., Friedrich, S., Leying, H. and Opferkuch, W. 1994. Expression of capsular polysaccharide determines serum resistance in *Escherichia coli* K92. *Zentralbl. Bakteriol.* **281**: 146-157

Torres, A.G., Payne, S.M. 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **23**: 825-833

Torres, A.G., Redford, P., Welch, R.A. and Payne, S.M. 2001. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect. Immun.* **69**: 6179-6185

Uehling, D.T., Johnson, D.B. and Hopkins, W.J. 1999. The urinary tract response to entry of pathogens. *World J. Urol.* **17**: 351-358

Williams, D.H., Schaeffer, A.J. 2004. Current concepts in urinary tract infections. *Minerva Urol. Nefrol.* **56**: 15-31

Woodford, N., Ward, M.E., Kaufmann, M.E., Turton, J., Fagan, E.J., James, D., Johnson, A.P., Pike, R., Warner, M., Cheasty, T., Pearson, A., Harry, S., Leach, J.B., Loughrey, A., Lowes, J.A., Warren, R.E. and Livermore, D.M. 2004. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**: 735-743

Wullt, B., Bergsten, G., Connell, H., Rollano, P., Gebretsadik, N., Hull, R. and Svanborg, C. 2000. P fimbriae enhance the early establishment of *Escherichia coli* in the human urinary tract. *Mol. Microbiol.* **38**: 456-464

Xie, Y., Kim, K.J. and Kim, K.S. 2004. Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **42**: 271-279

Yamamoto, S., Nakano, M., Terai, A., Yuri, K., Nakata, K., Nair, G.B., Kurazono, H. and Ogawa, O. 2001. The presence of the virulence island containing the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. *J. Urol.* **165**: 1347-1351

Zhanel, G.G., Hisanaga, T.L., Laing, N.M., DeCorby, M.R., Nichol, K.A., Palatnik, L.P., Johnson, J., Noreddin, A., Harding, G.K., Nicolle, L.E. and Hoban, D.J. 2005. Antibiotic resistance in outpatient urinary isolates: final results from the North American Urinary Tract Infection Collaborative Alliance (NAUTICA) 5. *Int. J. Antimicrob. Agents* **26**: 380-388

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2005 bis Juli 2008 am Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Universität München im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ der Medizinischen Fakultät erstellt und von Herrn Priv. Doz. Dr. med. Sören Schubert betreut.

Mein besonderer Dank gilt Sören Schubert für sein beständiges Interesse an dieser Arbeit, seine Unterstützung und seine stetige Diskussionsbereitschaft sowie für das entgegengebrachte Vertrauen und die Möglichkeit eigene Ideen umzusetzen.

Ich danke Herrn Professor Heesemann für Aufnahme in das Promotionsstudium „Molekulare Medizin“ und die damit verbundene Gelegenheit über den mikrobiologischen Tellerrand zu blicken.

Dank auch an meine Arbeitsgruppe für die Einarbeitung in die Arbeitstechniken, die gute Zusammenarbeit und die wertvollen Ratschläge. Im Einzelnen also Dank dafür an: Andreas, Friederike, Johanna, Kirsten H., Kirsten W. und Orsi.

Auch allen anderen Mitarbeitern des Max von Pettenkofer-Instituts möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft meinen Dank aussprechen.

Ich danke besonders Bettina und meinen Eltern für die fortwährende Unterstützung.

