

Aus dem Institut für Immunologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Stefan Bauer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Untersuchungen zur Induktion von Adhäsion
bei *Escherichia coli* und *Salmonella Typhimurium*
durch murines SPLUNC1 und LPLUNC1**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt
von

Torben Meyer
aus Oldenburg (Oldb)

Marburg, 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 10.04.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Herr Prof. Dr. H. Schäfer

Referent: Herr Prof. Dr. M. Schnare

Korreferent: Herr Prof. Dr. U. Steinhoff

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	iii
Abkürzungsverzeichnis.....	vi
1. Einleitung.....	1
1.1 Antimikrobielle Proteine.....	1
1.2 Lipidtransferproteine.....	2
1.3 SPLUNC1.....	3
1.4 LPLUNC1.....	5
1.5 Bakterielle Adhäsion und Biofilmbildung.....	5
1.6 Typ 1 Pili.....	7
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	10
2. Material.....	12
2.1 Geräte.....	12
2.2 Glas- und Plastikmaterial.....	13
2.3 Chemikalien & Reagenzien.....	14
2.4 Kits und sonstige Materialien.....	16
2.5 Puffer und Lösungen.....	17
2.6 Nährmedien.....	18
2.7 Enzyme und Größenstandards.....	19
2.8 Primer.....	20
2.9 Plasmide.....	21
2.10 Rekombinante Proteine.....	21
2.11 Antikörper.....	22
2.12 Bakterien.....	22
2.13 Zelllinien.....	23
2.14 Tiere.....	24
2.15 Software.....	24
3. Methoden.....	25
3.1 Zellkultur.....	25
3.1.1 Insekten-Zellkultur.....	25
3.1.2 Hybridoma-Zellkultur.....	26

3.2 Arbeiten mit Bakterien.....	29
3.2.1 Adhäsionstests.....	29
3.2.2 Transposon-Zufallsmutagenese in <i>S. Typhimurium</i>	31
3.2.3 Transformation von Bakterien.....	31
3.2.4 Gezielte Gen-Deletion in Bakterien.....	33
3.3 Proteinaufreinigung und -analyse.....	36
3.3.1 Aufreinigung von rekombinantem mSPLUNC1 aus D.Mel.2-Zellen.....	36
3.3.2 Proteinauftrennung durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung....	37
3.3.3 Western Blot.....	37
3.3.4 Indirekter mSPLUNC1-ELISA.....	38
3.3.5 mSPLUNC1-Sandwich-ELISA.....	39
3.4 Molekularbiologische Methoden.....	40
3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und PCR-Aufreinigung.....	40
3.4.2 Auftrennung von DNA und Gel-Extraktion.....	41
3.4.3 Restriktionsanalyse und Dephosphorylierung.....	41
3.4.4 Ligation.....	42
3.4.5 Extraktion von Plasmid-DNA.....	42
3.5 Immunisierung von Ratten und Kaninchen.....	43
3.6 Statistische Auswertung.....	44
4. Ergebnisse.....	45
Teil 1: mSPLUNC1 und mLPLUNC1 als Modulatoren bakterieller Adhäsion.....	45
4.1 PLUNC-Proteine können Adhäsion gramnegativer Bakterien sowohl induzieren als auch inhibieren.....	45
4.2 mSPLUNC1 und mLPLUNC1 induzieren Typ 1 Pili-vermittelte Adhäsion von UPEC CFT073.....	47
4.3 Die PLUNC-induzierte Adhäsion ist unabhängig von Protein-Neusynthese	51
4.4 Induktion der Adhäsion von <i>S. Typhimurium</i> -Zufallsmutanten durch PLUNC-Proteine.....	52
4.5 PLUNC-induzierte Adhäsion ist abhängig von ArcB und YjjY, nicht aber von ArcA.....	55
4.6 Freies LPS inhibiert die von mLPLUNC1-induzierte Adhäsion von <i>E. coli</i>	57

4.7 Die Adhäsion induzierende Domäne von mSPLUNC1 ist C-terminal lokalisiert.....	58
Teil 2: Erzeugung und Charakterisierung eines monoklonalen α -mSPLUNC1- Antikörpers.....	61
4.8 Erzeugung eines monoklonalen α -mSPLUNC1-Antikörpers.....	61
4.9 α -mSPLUNC1 mAk 8-A3.3.3 erkennt ein N-terminales Epitop von mSPLUNC1.....	63
4.10 Entwicklung eines Sandwich-ELISAs zur Detektion von mSPLUNC1.....	65
5. Diskussion.....	68
5.1 mSPLUNC1 und mLPLUNC1 können Adhäsion von gramnegativen Bakterien sowohl induzieren als auch inhibieren.....	68
5.2 PLUNC-Proteine induzieren keine Synthese von Typ 1 Pilus- Untereinheiten.....	69
5.3 PLUNC-induzierte Adhäsion in <i>S. Typhimurium</i> Transposon- Zufallsmutanten.....	70
5.4 Verlust des ArcAB-Zweikomponentensystems verhindert PLUNC- induzierte Adhäsion.....	71
5.5 Inhibition PLUNC-induzierter Adhäsion durch freies LPS.....	73
5.6 Eingrenzung der Adhäsion-induzierenden Domäne von mSPLUNC1.....	75
5.7 Biologische Bedeutung PLUNC-induzierter Adhäsion.....	76
5.8 Erzeugung und Charakterisierung von α -mSPLUNC1-Antikörpern.....	78
Zusammenfassung.....	80
Summary.....	81
Anhang.....	82
Literaturverzeichnis.....	83
Abbildungsverzeichnis.....	97
Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	98
Danksagung.....	99

Abkürzungsverzeichnis

AMP	antimikrobielles Protein / Peptid
AP	Alkalische Phosphatase
Arc	<i>anoxic redox control</i>
BAM	<i>β-barrel assembly machinery</i>
bp	Basenpaare
BPI	<i>bactericidal/permeability increasing protein</i>
BPIF	<i>BPI fold-containing</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cam	Chloramphenicol
CCL24	Chemokin Eotaxin-2
CD14	<i>cluster of differentiation 14</i>
CETP	<i>cholesteryl ester transfer protein</i>
CF	<i>cystic fibrosis</i> (Mukoviszidose)
ΔH	hitzeinaktiviert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ECP	<i>Escherichia coli common pilus</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ENaC	<i>epithelial Na channel</i>
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
<i>fimS</i>	<i>fim-Switch</i>
HFM	Hybridoma-Fusionsmedium
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSM	Hybridoma Standardmedium
i.p.	intraperitoneal
IBC	<i>intracellular bacterial community</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

LB	<i>lysogeny broth</i>
LBP	<i>LPS binding protein</i>
LPLUNC1	<i>long PLUNC 1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LT	<i>Lipid transfer</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MMP	Methyl α -D-Mannopyranosid
MP	Milchpulver
N-Terminus	Amino-Terminus
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
Nte	<i>N-terminal extension</i> -Peptid
OD	Optische Dichte
Omp	<i>outer membrane protein</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PLTP	<i>phospholipid transfer protein</i>
PLUNC	<i>palate, lung and nasal epithelium clone</i>
POX	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SD	<i>standard deviation</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SFM	serumfreies Hybridoma-Medium
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SPLUNC1	<i>short PLUNC 1</i>
SPLUNC1 vL	<i>short PLUNC 1 volle Länge</i>
SPLUNC1 Δ N60	<i>short PLUNC 1 N-terminal um 60 Aminosäuren verkürzt</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TBS	<i>TRIS buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	<i>Toll-like receptor</i>

tRNA	Transfer-RNA
UPEC	uropathogene <i>Escherichia coli</i>
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
WT	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Antimikrobielle Proteine

Antimikrobielle Peptide und Proteine (AMPs) spielen als Bestandteil des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen (Übersichtsartikel: Wiesner und Vilcinskas 2010). Viele AMPs besitzen eine positive Nettoladung, wodurch sie in der Lage sind, die oft negativ geladenen Oberflächenstrukturen von Mikroorganismen, z.B. Lipopolysaccharid (LPS), zu binden. Dabei kommt es zur Zerstörung der Zellwand (Übersichtsartikel: Brogden 2005). Neben einer solchen direkten antimikrobiellen Wirkung besitzen AMPs häufig weitere Funktionen, die zur Abwehr von Krankheitserregern beitragen können, wie z.B. immunmodulatorische Eigenschaften (Übersichtsartikel: Wiesner und Vilcinskas 2010).

AMPs werden überall dort gebildet, wo Gewebe in Kontakt mit Bakterien und anderen Mikroorganismen stehen. Dies sind u.a. die Epithelien des Verdauungstrakts, der Harn- und Atemwege sowie der Haut. Aber auch Zellen des Blutes, wie z.B. neutrophile Granulozyten, produzieren AMPs. (Übersichtsartikel: Wiesner und Vilcinskas 2010).

Typische eukaryotische AMPs bestehen aus 12 – 50 Aminosäuren, doch auch größere Proteine können eine antimikrobielle Funktion besitzen. Ein Beispiel hierfür ist das ca. 55 kDa große *bactericidal/permeability increasing protein* (BPI).

BPI wurde erstmals aus den Granula polymorphonukleärer Leukozyten von Kaninchen isoliert (Weiss et al. 1975, Elsbach et al. 1979). Neben seiner antimikrobiellen Wirkung hat BPI weitere Funktionen, die sich den Domänen des Proteins zuordnen lassen (Übersichtsartikel: Balakrishnan et al. 2013). So neutralisiert BPI über seinen N-Terminus LPS und kann die Opsonisierung von Bakterien vermitteln (Ooi et al. 1991). Außerdem ist BPI in geringen Konzentrationen in der Lage, das Wachstum von Endothelzellen und dadurch die Angiogenese zu inhibieren (van der Schaft et al. 2000). Dies geschieht über eine Bindung von BPI an den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) auf den Endothelzellen (Yamagata et al. 2006). Der C-Terminus von BPI vermittelt als Opsonin dagegen die Interaktion zwischen Bakterien und Phagozyten (Iovine et al. 1997).

1.2 Lipidtransferproteine

BPI gehört zur LT (*lipid transfer*)/LBP (*LPS-binding protein*)-Proteinfamilie. Die Mitglieder dieser Familie zeigen eine ähnliche Anordnung ihrer Exons, weshalb angenommen wird, dass die LT/LBP-Proteine durch Genduplikation entstanden sind (Bingle und Craven 2002, Kirschning et al. 1997).

Neben BPI sind das namensgebende LBP und die *palate, lung and nasal epithelium clone* (PLUNC)-Proteine wichtige LT/LBP-Proteine mit einer Funktion im Rahmen der Immunabwehr (Bingle et al. 2004). Weitere Mitglieder sind die Lipidtransporter *cholesteryl ester transfer protein* (CETP) und *phospholipid transfer protein* (PLTP).

Charakteristisches Merkmal der LT/LBP-Proteine ist ihre Fähigkeit, verschiedene Lipidstrukturen zu binden. So sind BPI und LBP in der Lage, LPS zu binden, wobei ihre Wirkung jedoch antagonistisch ist. LBP löst LPS-Monomere aus Aggregaten und macht sie dem LPS-Rezeptor CD14 zugänglich, während BPI eine Immunstimulation durch LPS inhibiert (Tobias et al. 1997). Die Wirkung von LBP ist also proinflammatorisch, die von BPI antiinflammatorisch.

Die PLUNC-Proteine bilden den größten Teil der LT-Proteinfamilie und werden in *long* PLUNC- (LPLUNC, ca. 450 Aminosäuren) und *short* PLUNC- (SPLUNC, ca. 250 Aminosäuren) Proteine unterteilt (Bingle et al. 2004). Die LPLUNC-Proteine sind in ihrer Tertiärstruktur homolog zu BPI, die SPLUNC-Proteine zum N-Terminus von BPI (Bingle und Craven 2002, Bingle et al 2004). Bislang konnten 11 Gene im Menschen und 14 Gene in der Maus identifiziert werden, die für PLUNC-Proteine kodieren (Bingle et al. 2011). SPLUNC1 und LPLUNC1 gehören zu den bislang am besten untersuchten PLUNC-Proteinen und stehen auch im Fokus der vorliegenden Arbeit, da sie die einzigen Vertreter dieser Familie sind, die in den oberen Atemwegen (Trachea und Bronchien) exprimiert werden.

In 2011 wurde eine alternative Benennung für die PLUNC-Proteine vorgeschlagen, die seitdem in der Literatur teilweise verwendet wird. Die PLUNC-Proteine werden demnach als *BPI fold-containing* (BPIF)-Proteine bezeichnet. SPLUNC- und LPLUNC-Proteine werden durch die angefügten Buchstaben A und B unterschieden. Nach diesem System trägt SPLUNC1 die Bezeichnung BPIFA1, LPLUNC1 wird als BPIFB1

bezeichnet (Bingle et al. 2011). Für die vorliegende Arbeit werden die herkömmlichen Namen beibehalten.

1.3 SPLUNC1

SPLUNC1 ist ein ca. 25 kDa großes Protein, das bei Mensch und Maus von den Epithelzellen des Respirationstraktes exprimiert wird, vor allem in der Lunge und der Trachea (Bingle und Bingle 2000, Weston et al. 1999). Studien an Chinchillas zeigen darüber hinaus eine Expression von SPLUNC1 im Mittelohr und der Eustachischen Röhre (McGillivary und Bakaletz 2010). Es existieren verschiedene Isoformen von SPLUNC1, die durch posttranslationale Modifikation oder Spaltung des Proteins entstehen (Campos et al. 2004, Ghafouri et al. 2004).

Es wird angenommen, dass SPLUNC1 genau wie BPI und LBP in der Lage ist, LPS zu binden, jedoch konnten nicht alle durchgeführten Untersuchungen eine solche Interaktion zeigen (Campos et al. 2004, Ghafouri et al. 2004, Sayeed et al. 2013, Ning et al. 2014).

Bisherige Studien deuten auf eine Rolle von SPLUNC1 bei verschiedenen Infektionen und Erkrankungen der Atemwege hin (Übersichtsartikel: Britto und Cohn 2014). So weisen Patienten mit einer Chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) im Sputum erhöhte SPLUNC1-Level auf und auch die Atemwegsepithelien von Patienten mit Zystischer Fibrose (CF, *cystic fibrosis*) exprimieren verstärkt SPLUNC1 (Di et al. 2003, Roxo-Rosa et al. 2006, Bingle et al. 2007).

SPLUNC1-defiziente Mäuse zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen der Lunge mit *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma pneumoniae*, nicht typisierbaren *Haemophilus influenzae* (NTHI) und *Klebsiella pneumoniae* (Gally et al. 2011, Liu et al. 2013a, Liu et al. 2013b, Jiang et al. 2013). Die Lungen transgener Mäuse, die SPLUNC1 in den Atemwegen überexprimieren, weisen dagegen bei einer Infektion mit *P. aeruginosa* oder *M. pneumoniae* geringere Bakterienlasten sowie eine reduzierte Einwanderung neutrophiler Granulozyten auf (Gally et al. 2011, Lukinskiene et al. 2011).

Inkubation von humanen Atemwegsepithelzellen, die mit *M. pneumoniae* infiziert

wurden, mit dem Th2-Zytokin Interleukin (IL)-13 führt zu einer Inhibition der SPLUNC1-Expression und einer höheren Anzahl an Mycoplasmen im Überstand der Zellen (Chu et al. 2007). Ebenfalls an der Regulation von SPLUNC1 in den Atemwegen beteiligt ist Nogo-B, eine Isoform des im endoplasmatischen Retikulum exprimierten Reticulon-Proteins 4 (RTN4 bzw. Nogo, Übersichtsartikel: Oertle und Schwab 2003, Teng und Tang 2008). Lungen von Nogo-A/B-defizienten Mäusen zeigen eine verstärkte Inflammation, die mit einem erhöhten Level der Th2-Zytokine IL-13, IL-4 und IL-5 einhergeht und daher als Asthma-ähnlich beschrieben wurde (Wright et al. 2010). Die SPLUNC1-Expression ist in diesen Tieren stark reduziert, während Mäuse, die Nogo-B transgen im Lungenepithel exprimieren, erhöhte SPLUNC1-Level aufweisen (Wright et al. 2010). Darüber hinaus führt eine Überexpression von SPLUNC1 im Lungenepithel von Nogo-A/B-defizienten Mäusen zu einer Normalisierung des Asthma-ähnlichen Phänotyps (Wright et al. 2010).

Nogo-B ist demnach ein positiver Regulator von SPLUNC1, während SPLUNC1 selbst inhibierend auf die Expression von IL-13, IL-4 und IL-5 wirkt. IL-13 wiederum inhibiert die SPLUNC1-Expression, so dass es zu einem negativen Regelkreis kommt. Ein niedriger SPLUNC1-Spiegel könnte so zu einer Verschlimmerung von entzündlichen Erkrankungen der Atemwege, z.B. Asthma, führen. Dafür spricht auch, dass in einem murinen Asthma-Modell in den Lungen SPLUNC1-defizienter Tiere eine erhöhte Konzentration des von eosinophilen Granulozyten gebildeten Chemokins Eotaxin-2 (CCL24) festgestellt wurde (Thaikootathil et al. 2012).

Neben der Abwehr von Mikroorganismen und der Immunregulation besitzt SPLUNC1 auch eine Funktion beim Transport von Ionen und Mucus in der Lunge (Übersichtsartikel: Tarran und Redinbo 2014). SPLUNC1 wirkt dabei als Negativregulator des epithelialen Natriumkanals ENaC, indem es dessen Aktivierung durch Serin-Proteasen verhindert (Garcia-Caballero et al. 2009). Diese Eigenschaft von SPLUNC1 scheint nicht nur in der Lunge, sondern auch in der Eustachischen Röhre dazu beizutragen, die Konsistenz des Mucus aufrechtzuerhalten. Untersuchungen mit siRNA in Chinchillas haben gezeigt, dass SPLUNC1 auch in diesem Organ wichtig für den Abtransport von Mucus ist (McGillivray und Bakaletz 2010).

Gleichzeitig besitzt SPLUNC1 Surfactant-Aktivität, ist also in der Lage, die

Oberflächenspannung von Flüssigkeiten, wie z.B. Atemwegssekret, herabzusetzen (Gakhar et al. 2010, McGillivray und Bakaletz 2010). Eine solche Wirkung konnte bereits für das im Schweiß und Speichel von Pferden vorkommende und ebenfalls zu den LT/LBP-Proteinen zählende Latherin gezeigt werden (McDonald et al. 2009).

SPLUNC1 wirkt außerdem inhibierend auf bakterielle Biofilme, wie Untersuchungen an *P. aeruginosa* und *K. pneumoniae* zeigen (Gakhar et al. 2010, Liu et al. 2013b). Dabei ist der molekulare Wirkmechanismus noch unklar. Analysen von Biosurfactants, die von Bakterien produziert werden (z.B. Rhamnolipide), haben jedoch gezeigt, dass diese Substanzen durch ihren amphipathischen Charakter das Potenzial haben, Zell-Zell- sowie Zell-Oberflächen-Interaktionen zu beeinflussen und so bakterielle Adhäsion und Biofilmbildung zu inhibieren (Übersichtsartikel: Neu 1996, Nickzad und Déziel 2014).

1.4 LPLUNC1

LPLUNC1 wird im Gegensatz zu SPLUNC1 nicht von Epithelzellen, sondern von Becherzellen und kleinen Drüsen der oberen Atemwege und der Mundhöhle exprimiert (Bingle et al. 2010). Deutlich erhöhte LPLUNC1-Konzentrationen finden sich in den Lungen von CF-Patienten (Bingle et al. 2012). Darüber hinaus konnte LPLUNC1 auch im Darm von Cholera-Patienten nachgewiesen werden, wo es offenbar die LPS-induzierte TLR4-Signalwirkung inhibiert (Shin et al. 2011). Weitere Untersuchungen zur Wirkung und Regulation von LPLUNC1 in bakteriellen oder viralen Infektionen fehlen bisher.

LPLUNC1 scheint jedoch eine Funktion in bestimmten Tumoren zu besitzen. So ist es in der Lage, das durch IL-6 induzierte Wachstum von nasopharyngealen Karzinomen zu inhibieren, indem es die Aktivierung von STAT3 blockiert (Liao et al. 2014).

1.5 Bakterielle Adhäsion und Biofilmbildung

Im Verlauf einer Infektion ist die Adhäsion von Bakterien nicht nur Voraussetzung für die Invasion von Zellen und Geweben, sondern kann sowohl auf biotischen als auch abiotischen Oberflächen zur Bildung von Biofilmen führen. Bakterielle Biofilme sind

definiert als eine sessile Gemeinschaft von Bakterien, die irreversibel an Oberflächen oder aneinander adhären und in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS, z.B. Zellulose) eingebettet sind (Übersichtsartikel: Stoodley et al. 2002, Soto 2014). Bis zu 80 % aller mikrobiellen Infektionen des Menschen werden mit Biofilmen assoziiert (Römling und Balsalobre 2012). Darüber hinaus besitzen Bakterien in Biofilmen gegenüber planktonisch wachsenden Bakterien eine erhöhte Resistenz gegen verschiedene antimikrobielle Substanzen, was eine Therapie dieser Infektionen erschwert. Dies wird durch verschiedene Mechanismen erreicht, wie z.B. eine begrenzte Diffusionsrate der Antibiotika durch die Matrix des Biofilms, die Expression von Efflux-Pumpen durch die Bakterien oder durch die Anwesenheit metabolisch inaktiver Bakterien, so genannter Persister-Zellen (Übersichtsartikel: Lewis 2008, van Acker et al. 2014). Die Bildung von Biofilmen verschafft Bakterien also einen Vorteil bei der Besiedlung des menschlichen Körpers.

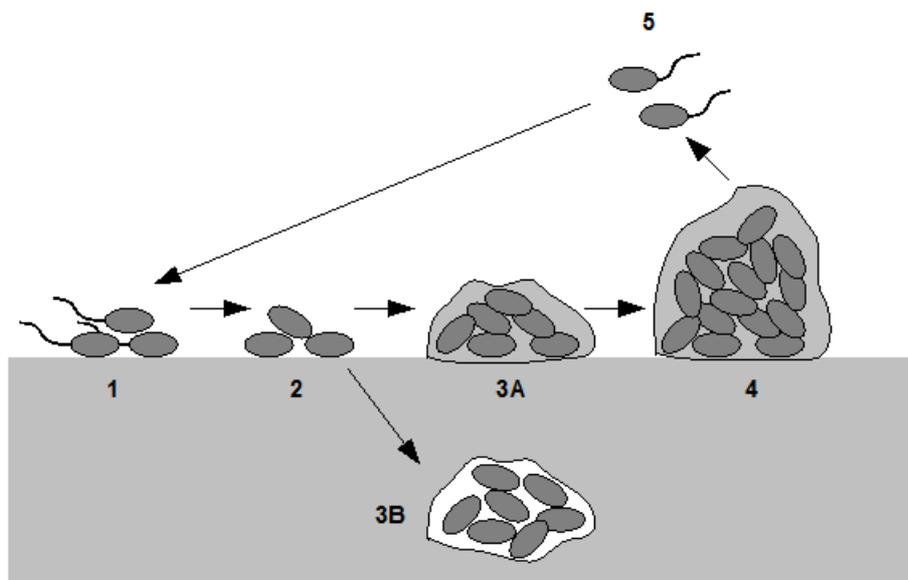


Abb. 1-1: Entwicklungsstadien von bakteriellen Biofilmen

1: Reversible Anheftung der Bakterien an ihr Substrat. **2:** Im Anschluss erfolgt eine irreversible, durch Adhäsine vermittelte Adhäsion. **3A:** Es werden EPS ausgeschieden und der Biofilm beginnt sich auszubilden. **3B:** Alternativ kann es auch zu einer Invasion der Zellen mit anschließender Bildung von intrazellulären, Biofilm-ähnlichen Strukturen kommen. **4:** Während der Reifung des Biofilms entsteht eine dreidimensionale Struktur. **5:** Einzelne Bakterien können sich aus einem reifen Biofilm herauslösen und wieder in planktonisches Wachstum übergehen.

Die Ausbildung von Biofilmen erfolgt in fünf Stufen, die in Abb. 1-1 schematisch dargestellt sind. Zunächst kommt es zu einer reversiblen Anheftung der Bakterien an eine Oberfläche. Anschließend vermitteln verschiedene Adhäsine eine irreversible Adhäsion, bevor es zur Ausscheidung von EPS kommt. Während ihrer Reifung entwickeln Biofilme dann eine komplexe dreidimensionale Struktur. Aus einem reifen Biofilm können sich dann Bakterien herauslösen und wieder in eine planktonische Wachstumsform übergehen (Übersichtsartikel: Stoodley et al. 2002, Soto 2014).

Neben Biofilmen auf Oberflächen können Biofilm-ähnliche Strukturen auch innerhalb von Zellen entstehen (Abb. 1-1). So dringen uropathogene *Escherichia coli* (UPEC) in die oberflächlichen Zellen des Blasenepithels ein und formen dort so genannte *intracellular bacterial communities* (IBC, Anderson et al. 2003). Bei durch UPECs verursachten Harnwegsinfektionen stellen Typ 1 Pili einen wichtigen Virulenzfaktor dar, der an der Adhäsion an das Blasenepithel, an der Invasion der Epithelzellen und an der Bildung von IBCs beteiligt ist (Connell et al. 1996, Martinez et al. 2000, Wright et al. 2007).

1.6 Typ 1 Pili

Typ 1 Pili bzw. Typ 1 Fimbrien sind Mannose-sensitive Pili, die durch das *fim*-Operon kodiert werden (Übersichtsartikel: Schwan 2011). Während sowohl Salmonellen als auch *E. coli* solche Pili ausbilden und ihr Aufbau weitgehend konserviert ist, sind die *fim*-Operons von *E. coli* und *S. Typhimurium* nicht homolog, sondern unabhängig voneinander entstanden (Boyd und Hartl 1999, Nuccio und Bäumlner 2007). Im Folgenden wird das sieben Strukturgene umfassende *fim*-Operon von *E. coli* genauer beschrieben (Abb. 1-3).

Das erste Gen des Operons, *fimA*, kodiert für die Hauptstrukturkomponente der Typ 1 Pili, die den Pilus bildet (Klemm 1984, Abb. 1-2). Das nachfolgende Gen *fimI* ist zwar für die Ausbildung von Typ 1 Pili essenziell, die Funktion seines Genprodukts jedoch bislang unbekannt (Rossolini et al. 1993, Valenski et al. 2003). FimC und FimD sind die beiden zentralen Proteine bei der Assemblierung der Typ 1 Pili. FimC ist ein periplasmatisches Chaperon, das den Transport der Pilus-Untereinheiten zum Usher

FimD vermittelt (Jones et al 1993, Abb. 1-2). FimD ist in der äußeren Membran verankert. Durch die von FimD gebildete Membranpore hindurch werden die Pilus-Untereinheiten auf der Bakterienoberfläche assembliert. Gleichzeitig wird der Pilus mit Hilfe von FimD in der Membran befestigt (Klemm und Christiansen 1990). Die Spitze der Typ 1 Pili wird durch FimF, FimG und FimH gebildet (Abb. 1-2). FimH ist das eigentliche Adhäsion der Pili, das die Bindung an mannosehaltige Zuckerstrukturen auf Zellen vermittelt (Hanson und Brinton 1988, Krogfeld et al. 1990). FimF und FimG verbinden FimH mit dem Schaft und haben einen Einfluss auf die Länge des Pilus (Klemm und Christiansen 1987, Russell und Orndorff 1992, Jones et al. 1995).

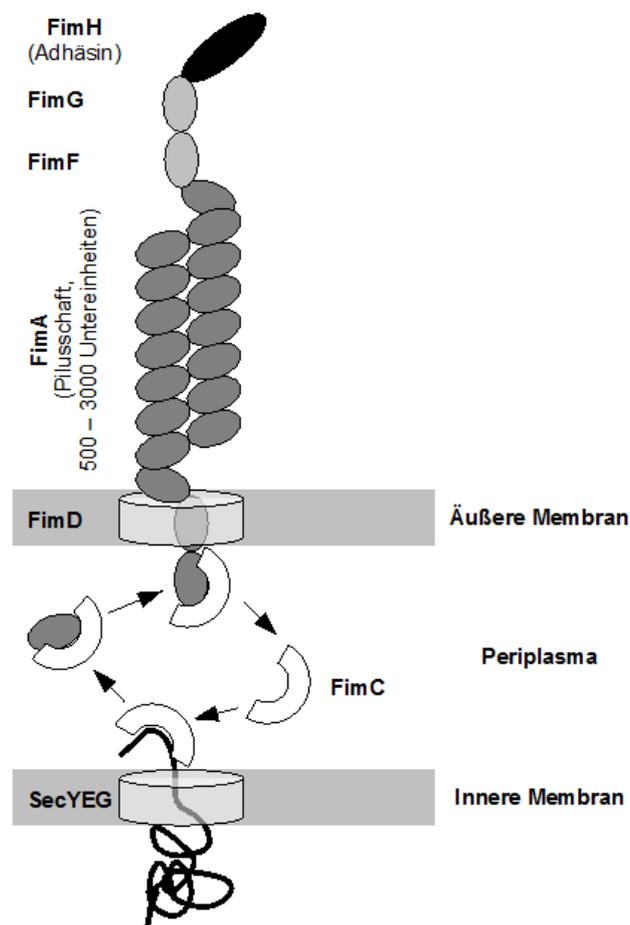


Abb. 1-2: Aufbau von Typ 1 Pili

Die Pilus-Untereinheiten gelangen über den SecYEG-Transporter in der inneren Membran ins Periplasma, wo sie vom Chaperon FimC zum Usher FimD transportiert werden. Der Pilus-Schaft ist aus 500 – 3000 Untereinheiten des Hauptstrukturproteins FimA aufgebaut. FimF und FimG verbinden den Schaft mit dem Adhäsionspartikel FimH, das die Adhäsion an Mannose-Strukturen auf der Oberfläche von Zellen vermittelt.

Die Assemblierung der Typ 1 Pili geschieht über den so genannten Chaperon-Usher-Mechanismus (Übersichtsartikel: Geibel und Waksman 2011, Lillington et al. 2014). Dabei gelangen die Pilus-Untereinheiten über den SecYEG-Transporter ins Periplasma, wo sie vom Chaperon FimC gebunden und zum Usher FimD transportiert werden (Abb. 1-2). Die Pilus-Untereinheiten besitzen eine unvollständige Immunglobulin (Ig)-ähnliche Faltung aus sechs β -Strängen, während der siebte β -Strang fehlt (Choudhury et al. 1999, Sauer et al. 1999). Dies führt dazu, dass sie sich in Abwesenheit eines Chaperons wie FimC nicht korrekt falten können (Barnhart et al. 2000, Vetsch et al. 2004). Gleichzeitig besitzen alle Untereinheiten, mit Ausnahme von FimH, ein *N-terminal extension*-Peptid (Nte), das nicht Teil der Ig-ähnlichen Faltung ist (Sauer et al. 1999). Bei der Assemblierung des Pilus am Usher wird der fehlende β -Strang der vorausgehenden Untereinheit zunächst durch das Chaperon, dann durch das Nte der nachfolgende Untereinheit zur Verfügung gestellt (Sauer et al. 2002). Dadurch wird das Chaperon wieder freigesetzt und kann eine neue Untereinheit binden. Die nachfolgenden Untereinheiten drücken die vorausgehenden Untereinheiten durch den Usher, wodurch der Pilus an Länge gewinnt. Diese Art der Assemblierung der Untereinheiten am Usher wird als Donor-Strang-Komplementierung beschrieben.

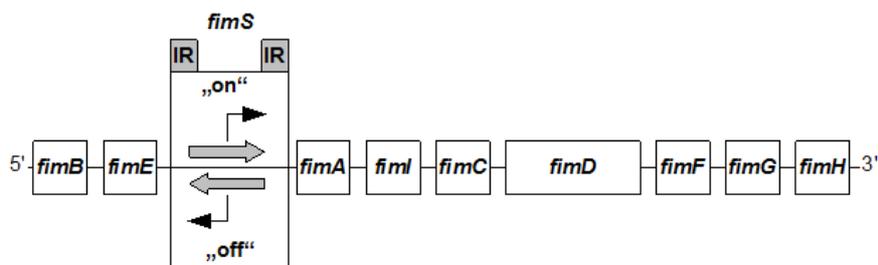


Abb. 1-3: Aufbau des *fim*-Operons von *E. coli*

Die sieben Strukturgene des Operons (*fimA* bis *fimH*) stehen unter Kontrolle eines Promotors, der auf einem invertierbaren Element (*fimS*) lokalisiert ist. Der Promotor wird von zwei *inverted repeats* (IR) flankiert. Über die IRs sind die Rekombinasen FimB und FimE in der Lage, die Orientierung des *fim*-Promotors zu ändern und so die Expression der Strukturgene zu regulieren.

Die Regulation des *fim*-Operons in *E. coli* wird über ein invertierbares 314 bp großes DNA-Element, den so genannten *fim-Switch* (*fimS*) vermittelt, der sich unmittelbar 5' von *fimA* befindet und den Promotor des Operons enthält (Abraham et al. 1985, Spears

et al. 1986, Abb. 1-3). Flankiert wird der Promotor von zwei 9 bp langen *inverted repeats* (IRs), über die die Richtung von *fimS* und damit des *fim*-Promotors geändert werden kann. Die Bakterien befinden sich also entweder in einer „AN“-Phase, in der der Promotor in Richtung des *fim*-Operons zeigt und Pilus-Untereinheiten exprimiert werden oder in einer „AUS“-Phase, in der die Expression aufgrund des falsch orientierten Promotors unterbunden ist (Abb. 1-3). Dieser Vorgang wird als Phasen-Variation bezeichnet (Abraham et al. 1985, Spears et al. 1986). Die Inversion von *fimS* wird durch die beiden Rekombinasen FimB und FimE vermittelt, die 5' vom *fim*-Operon kodiert sind (Klemm 1986, Abb. 1-3). Während FimB die Inversion in beide Richtungen durchführen kann, vermittelt FimE einen Wechsel von der „AN“- zur „AUS“-Phase (McClain et al. 1993, Gally et al. 1996, Kulasekara und Blomfield 1999).

Die Regulation von Typ 1 Pili durch ein invertierbares DNA-Element findet sich nicht nur in *E. coli*, sondern z.B. auch in *K. pneumoniae* (Struve et al. 2008). In *S. Typhimurium* erfolgt die Regulation der Typ 1 Pili dagegen über die Transkriptionsfaktoren FimZ, FimY und FimW (Yeh et al. 1995, Tinker und Clegg 2000, Tinker et al. 2001, Saini et al. 2009). Diese drei Gene enthalten mehrere Kopien der seltenen Arginin-Kodons AGA und AGG (Tinker und Clegg 2001). Das Gen *fimU* (*argU*) kodiert für eine tRNA, die diese Kodons erkennt und dadurch ebenfalls an der Regulation der Typ 1 Pili-Expression in *S. Typhimurium* beteiligt ist (Swenson et al. 1994). Studien zur Expression von *fimU* in Salmonellen wurden bisher nicht durchgeführt. Das *E. coli*-Homolog *argU*, welches von seiner genetischen Organisation her vermutlich ähnlich reguliert ist wie *fimU*, wird jedoch *in vivo* nur in geringen Mengen exprimiert. Gleichzeitig ist aber die Expression von *argU* im Gegensatz zu anderen tRNAs unabhängig von der Wachstumsrate der Bakterien (Saxena und Walker 1992). Eine daraus resultierende Akkumulation von *fimU* tRNA in der stationären Phase könnte im Zusammenhang mit der Aktivierung der Typ 1 Pilus-Expression bei *S. Typhimurium* in dieser Wachstumsphase stehen.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit basiert auf meiner vorausgehenden Masterarbeit, in der gezeigt wurde, dass murines SPLUNC1 (mSPLUNC1) in einem *S. Typhimurium*-Stamm und in

zwei UPEC-Isolaten Adhäsion induziert und dass diese Adhäsion auf Typ 1 Pili beruht (Torben Meyer 2011: Masterarbeit). Hier wurde der Effekt von mSPLUNC1 und mLPLUNC1 auf die Adhäsion verschiedener gramnegativer Bakterien untersucht. Die durch die PLUNC-Proteine induzierten adhäsiven Strukturen in *E. coli* wurden durch biochemische und genetische Analysen identifiziert.

Zur Aufklärung des Mechanismus der PLUNC-induzierten Adhäsion wurde eine Sammlung von *S. Typhimurium*-Zufallsmutanten auf den Verlust dieses Phänotyps hin untersucht. Es wurden verschiedene Mutanten identifiziert, die in Bezug auf ihren Adhäsions-Phänotyp genauer charakterisiert wurden. Weiterhin wurde mLPLUNC1 auf seine Fähigkeit, LPS zu binden, getestet und es wurde ein Versuch unternommen, die Adhäsion-induzierende Domäne von mSPLUNC1 durch Verkürzung des Proteins einzugrenzen.

In einem zweiten Teil der Arbeit wurde eine Ratten-Hybridoma-Zelllinie zur Produktion eines monoklonalen α -mSPLUNC1-Antikörpers erzeugt. Der Antikörper wurde aus den Zellkulturüberständen aufgereinigt und charakterisiert. Gleichzeitig wurde ein polyklonales Kaninchen α -mSPLUNC1-Antiserum generiert. Die beiden Antikörper wurden zur Etablierung eines mSPLUNC1 Sandwich-ELISA verwendet.

2. Material

2.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Agarosegelkammer	OWL, Weilheim, DE
Bakterieninkubator: Innova 4200	New Brunswick Scientific, Edison, US
Brutschränke:	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
HERACELL 240 (Säugerzellen)	
Heraeus B 5050 E (Bakterien, 30 °C)	
Heraeus CO ₂ -AUTO-ZERO (Insektenzellen, kein CO ₂)	
Heraeus CO ₂ -AUTO-ZERO (Säugerzellen)	
Heraeus Cytoperm 8080 (Bakterien, 37 °C)	
Dokumentationssysteme für Agarosegele ChemiDoc XRS+	MWG Biotech, Ebersberg, DE Bio-Rad Laboratories, München, DE
Elektroporationsgerät: GenePulser Xcell	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Entwicklermaschine: Optimax 2010	PROTEC, Oberstenfeld, DE
Gelkammersystem für SDS-PAGE	PEQLAB, Erlangen, DE
Heizblock: TS-100 Thermoshaker	PEQLAB, Erlangen, DE
Mehrkanalpipetten (50 µl, 300 µl)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Metallsiebe (feinmaschig, zur Zellisolierung)	AG Schnare, Marburg, DE
Mikroliterpipetten (Einkanal, 10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, DE PEQLAB, Erlangen, DE
Mikroskope:	
471202-9901 (invers)	Carl Zeiss, Jena, DE
Axiovert 200M	Carl Zeiss, Jena, DE
Multipette	Eppendorf, Hamburg, DE
NanoDrop-1000	PEQLAB, Erlangen, DE
PCR-Maschine: C1000TM Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, München, DE
Peristaltikpumpe Pharmacia LKB P-1	GE Healthcare, München, DE
pH-Meter: pH 523	WTW, Weilheim, DE
Photometer:	
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, DE

E Max (Plattenphotometer)	Molecular Devices, Sunnyvale, US
FLUOstar Omega (Plattenphotometer)	BMG LABTECH, Offenburg, DE
Pipettierhilfe: PIPETBOY comfort	INTEGRA Biosciences, Fernwald, DE
Sterilwerkbänke:	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
2F 120-II GS (Bakterien)	
HERASafe KS (Zellkultur)	
Stromgeber:	
EC 105	E-C Apparatus Corp., Madison, US
Standard Power Pack P25	Biometra, Göttingen, DE
UV-Tisch	Fröbel Labortechnik, Lindau, DE
Vortexer: REAX 2000	Heidolph, Schwabach, DE
Waagen:	
R160 P-*D1	Sartorius, Göttingen, DE
Mettler P1000	Mettler-Toledo, Gießen, DE
Western Tank-Blot System (Novex)	Life Technologies, Darmstadt, DE
Zentrifugen:	
GS-15R (für Mikrotiterplatten)	Beckmann Coulter, Krefeld, DE
Heraeus Minifuge T	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Heraeus Multifuge 1S-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Rotanta/RPC	Hettich Lab Technology, Tuttlingen, DE

2.2 Glas- und Plastikmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Amicon Ultra Centrifugal Filters (3 kDa, 10 kDa)	Merck Millipore, Schwalbach, DE
Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Einfrierröhrchen (1,6 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Einwegspritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)	B. Braun, Melsungen, DE
Elektroporationsküvetten (1 mm)	Bio-Rad Laboratories, München, DE
ELISA-Platten (Maxisorp NUNC)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Erlenmeyerkolben, Plastik (100 ml)	VITLAB, Grossostheim, DE
Filtereinheit: Millipore Stericup® (0,22 µm)	Merck Millipore, Schwalbach, DE
Glaswaren (Flaschen, Bechergläser, Kolben)	Merck, Darmstadt, DE Schott, Mainz, DE
Impfösen	VWR International, Darmstadt, DE
Kanülen (Microlance 24G)	BD Bioscience, Heidelberg, DE

Kulturröhrchen (14 ml, Rundboden, PP)	Corning, Corning, US
Neubauer-Zählkammer	W. Schreck, Hofheim, DE
Objektträger mit Kulturkammern	BD Bioscience, Heidelberg, DE
Petrischalen (94 x 16 mm, für Agarplatten)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen (10 µl, 10 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen, gestopft (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	PEQLAB, Erlangen, DE
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Reaktionsgefäße, silikonisiert (0,6 ml)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Semi-Micro-Küvetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Skalpelle	B. Braun, Melsungen, DE
Spatel, L-Form	VWR International, Darmstadt, DE
Zellkultuplatten, F-Boden (6 well)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkultuplatten, F-Boden (96 well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE Sarstedt, Nümbrecht, DE
Zellkulturschalen (2 cm x 14,5 cm)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE
Zellsieb, Nylon (70 µm)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
Zentrifugenröhrchen, Plastik (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DE

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid/Bis (30 %)	SERVA, Heidelberg, DE
Agarose	PEQLAB, Erlangen, DE
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe, DE
L (+)-Arabinose	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Bromphenolblau	SERVA, Heidelberg, DE
Chloramphenicol	Carl Roth, Karlsruhe, DE

CpG 1668 (DNA-Oligonukleotid)	TIB MOLBIO, Berlin, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Eosin G	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Essigsäure (100 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethanol (≥ 95,5 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
FBS (Fötale Rinderserum)	Life Technologies, Darmstadt, DE
Formaldehydlösung säurefrei (≥ 37 %)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
D(+)-Galaktose	Carl Roth, Karlsruhe, DE
α-D-Glukose Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
L-Glutamine (200 mM), für Zellkultur	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe, DE
HAT-Supplement (50x, Biochrom®)	Merck Millipore, Schwalbach, DE
Hefeextrakt	Carl Roth, Karlsruhe, DE
HT-Supplement (50x, Biochrom®)	Merck Millipore, Schwalbach, DE
Hybridoma Cloning Supplement	PAA, Pasching, AU
Hygromycin B Lösung (50 mg/ml)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Imidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat	Merck Millipore, Schwalbach, DE
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck, Darmstadt, DE
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kristallviolett	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Kupfer(II)-sulfat (Cu ₂ SO ₄), wasserfrei	Merck, Darmstadt, DE
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Lipofectamine® 2000 Transfektionsreagenz	Life Technologies, Darmstadt, DE

Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, DE
D(+)-Mannose	Carl Roth, Karlsruhe, DE
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, DE
2-Mercaptoethanol (50 mM), für Zellkultur	Life Technologies, Darmstadt, DE
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Methyl α -D-Mannopyranosid (MMP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O)	Merck, Darmstadt, DE
Natriumpyruvat (100 mM), für Zellkultur	PAA, Pasching, AU
Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml), für Zellkultur	PAN Biotech, Aidenbach, DE
<i>ortho</i> -Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck, Darmstadt, DE
Polyethylenglykol (PEG) 4000	Carl Roth, Karlsruhe, DE
SDS Pellets	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
TMB Super Sensitive One Component HRP Microwell Substrat	SurModics IVD, Eden Prairie, US
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe, DE
TRIS-hydrochlorid (TRIS HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trypsin-EDTA (0,05 %), Phenolrot	Life Technologies, Darmstadt, DE
Trypton	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Wasser:	
vollentsalztes Wasser (VE-H ₂ O)	BMFZ, Universität Marburg, DE
Ultra Pure Wasser	Biochrom, Berlin, DE
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE

2.4 Kits und sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US

GeneJet PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
GeneJet Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, US
HiTrap Chelating HP-Säulen	GE Healthcare, München, DE
HiTrap Protein G HP-Säulen	GE Healthcare, München, DE
PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit	Life Technologies, Darmstadt, DE
PVDF-Membran: Immobilon P	Merck Millipore, Schwalbach, DE
Rat monoclonal antibody isotyping test	AbD serotec, Düsseldorf, DE
Röntgen-Filme	CEA, Dresden, DE
Whatman-Papier	Macherey-Nagel, Düren, DE

2.5 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung / Hersteller
30 mM Imidazol-Puffer	30 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 25 mM NaH ₂ PO ₄ , sterilfiltriert
5 mM EDTA-Puffer	5 mM EDTA, 500 mM NaCl, 25 mM NaH ₂ PO ₄ , sterilfiltriert
50 mM Imidazol-Puffer	50 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 25 mM NaH ₂ PO ₄ , sterilfiltriert
ACK-Lysepuffer	8 g NH ₄ Cl, 1g KHCO ₃ , 37,2 mg EDTA ad 1 l H ₂ O; sterilfiltriert
Kristallviolettlösung (1 %)	1 g Kristallviolett ad 100 ml H ₂ O
PageBlue Protein Staining Solution	Kolloidale Coomassie G-250 Färbelösung (Thermo Fisher Scientific, Waltham, US)
PBS (steril)	DPBS ohne Kalzium & Magnesium (PAN Biotech, Aidenbach, DE)
PBS, 10x	2 g KCl, 2 g KH ₂ PO ₄ , 80 g NaCl, 11,5 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O ad 1 l H ₂ O, pH 7
PEG 4000-Puffer	42 % PEG 4000, 15 % DMSO in Hybridomamedium (serumfrei)
Probenpuffer für DNA-Gele	A) 0,25 % Bromphenolblau, 50 % Glycerol in H ₂ O B) 0,25 % Xylencyanol, 50 % Glycerol in H ₂ O
SDS-PAGE Laufpuffer	3,03 g TRIS, 14,41 g Glycin ad 900 ml H ₂ O + 100 ml 10 % SDS
SDS-PAGE Probenpuffer (6x Laemmli)	0,375 M TRIS HCl, 12 % SDS, 12,5 % Mercaptoethanol, 50 % Glycerol, 0,012 % Bromphenolblau

SDS-PAGE Sammelgelpuffer	12 g TRIS ad 192 ml H ₂ O, pH 6,8 + 8 ml 10 % SDS
SDS-PAGE Trenngelpuffer	72,8 g TRIS ad 392 ml H ₂ O, pH 8,8 + 8 ml 10 % SDS
TAE, 50x	242 g TRIS, 54,8 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA ad 1 l H ₂ O, pH 8,3
TBS, 10x	292,7 g NaCl, 4,24 g TRIS, 26 g TRIS HCl, pH 7,5
TBST	1x TBS + 0,05 % Tween 20
Western Blot Transferpuffer	3,786 g TRIS, 18,016 g Glycin ad 800 ml H ₂ O + 200 ml Methanol

2.6 Nährmedien

Bezeichnung	Basismedium & Zusammensetzung	Verwendung
2x YT-Medium	16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl ad 1 l H ₂ O, pH 7; autoklaviert	Bakterien
HAT-Medium	Hybridoma-Standardmedium (siehe unten) + 1x HAT	Zellkultur (Hybridomazellen)
HT-Medium	Hybridoma-Standardmedium (siehe unten) + 1x HT	Zellkultur (Hybridomazellen)
Hybridoma-Fusionsmedium (HFM)	Hybridoma-Standardmedium (siehe unten) + 5 % Hybridoma Cloning Supplement + 1x HAT	Zellkultur (Hybridomazellen)
Hybridoma-Standardmedium (HSM)	DMEM (PAN Biotech, Aidenbach, DE) + 20 % FBS ΔH + 2 mM L-Glutamin + 1 mM Natriumpyruvat + 100 U/ml Penicillin + 0,1 mg/ml Streptomycin + 0,25 mM 2-Mercaptoethanol	Zellkultur (Myeloma- & Hybridomazellen)
Insect-Xpress	Insect-Xpress (Lonza, Basel, CH) ohne Zusätze	Zellkultur (Insekten)
LB-Agar	LB-Agar (Carl Roth, Karlsruhe, DE) 35 g/l in H ₂ O, autoklaviert	Bakterien
LB-Medium	LB-Medium (Carl Roth, Karlsruhe, DE) 20 g/l in H ₂ O, autoklaviert	Bakterien

Opti-MEM	Opti-MEM® I (1x) (Life Technologies, Darmstadt, DE) + 5 % FBS ΔH + 100 U/ml Penicillin + 0,1 mg/ml Streptomycin	Zellkultur (Milzzellen, Ratte)
Panserin 401	Panserin 401 (PAN Biotech, Aidenbach, DE) + 100 U/ml Penicillin + 0,1 mg/ml Streptomycin	Zellkultur (Hybridomazellen)
Serumfreies Hybridomamedium (SFM)	DMEM (PAN Biotech, Aidenbach, DE) + 2 mM L-Glutamin + 1 mM Natriumpyruvat + 100 U/ml Penicillin + 0,1 mg/ml Streptomycin + 0,25 mM 2-Mercaptoethanol	Zellkultur (Myeloma- & Hybridomazellen)
SOC-Medium	20 g Tyrpton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 250 mM KCl ad 990 ml H ₂ O, pH 7; autoklaviert und abgekühlt + 10 ml 1 M MgCl ₂ ; sterilfiltriert + 20 ml 1 M Glukose; sterilfiltriert	Anzuchtmedium für Bakterien
Spodopan	Spodopan (PAN Biotech, Aidenbach, DE) ohne Zusätze	Zellkultur (Insekten)

2.7 Enzyme und Größenstandards

Alle Enzyme und Größenstandards für die molekularbiologischen Methoden waren von Thermo Fisher Scientific, Waltham, US:

dNTP Mix (je 10 mM)

DreamTaq DNA Polymerase

Fast AP (Alkalische Phosphatase)

GeneRuler 1 kb DNA Ladder

GeneRuler 100 bp DNA Ladder

High Fidelity PCR Enzyme Mix

KpnI

PageRuler Prestained Protein Ladder

T4 DNA Ligase

XhoI

2.8 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von biomers.net (Ulm, DE) synthetisiert, mit Ausnahme von K1-Red-Del (metabion international, Martinsried, DE). Bei Primern, die zur Erzeugung von Deletionskassetten genutzt wurden, sind die Homologiebereiche in Großbuchstaben dargestellt.

Bezeichnung	Sequenz	Annealing
CFT073_dsbA_Del_for	5'-TTG CAA TTA ACA CCT ATG TAT TAA TCG GAG AGA GTA GAT Cgt gta ggc tgg agc tgc ttc-3'	55 °C
CFT073_dsbA_Del_rev	5'-GCC CGT GAA TAT TCA CGG GCT TTA TGT AAT TTA CAT TGA Aca tat gaa tat cct cct tag-3'	55 °C
CFT073_dsbA_Del-Check_for	5'-cgg gtt gaa agc ggc att cct g-3'	50 °C
CFT073_dsbA_Del-Check_rev	5'-agc agg acg cat tat cag aat g-3'	50 °C
CFT073_fimA_Del_for	5'-ACT GTG CAG TGT TGG CAG TCA AAC TCG TTG ACA AAA CAA Agt gta ggc tgg agc tgc ttc-3'	55 °C
CFT073_fimA_Del_rev	5'-GGC ATC CCT GCC CGT AAT GAC GTC CCT GAA CCT AGG TAG Gca tat gaa tat cct cct tag-3'	55 °C
CFT073_fimA_Del-Check_for	5'-ttc gcc ata ctg tgc gtt ata c-3'	50 °C
CFT073_fimA_Del-Check_rev	5'-tcc att tat ttc egg cca gag c-3'	50 °C
CFT073_surA_Del_for	5'-CCA CGT AAT CCG CAG TGC GGT TAA TTG AAA TGG AAA AAG Tgt gta ggc tgg agc tgc ttc-3'	55 °C
CFT073_surA_Del_rev	5'-AAC ACG TTG GGT TTT AAC CAT TAG TTG CTC AGG ATT TTA cat atg aat atc ctc ctt ag-3'	55 °C
CFT073_surA_Del-Check_for	5'-gtc tgg ata acg tag cga cca g-3'	50 °C
CFT073_surA_Del-Check_rev	5'-gac aat taa gtc egg gcc aat c-3'	50 °C
K1-Red-Del	5'-cag tca tag ccg aat agc ct-3'	50 °C
MSPLUNC-14R	5'-gat gcc tcg agt ttg atg aca aac tgt ag-3'	55 °C
MSPLUNC1-50F	5'-tca ggc tcg agc aca aga cca agt tct ag-3'	55 °C
MSPLUNC1-52F	5'-gca ggg tac caa tca gct tgc tca atg gag-3'	55 °C
MSPLUNC1-53R	5'-agc aac tcg agt ttc agg ctg cca ggg gag-3'	55 °C
MSPLUNC1-N60	5'-ttt ggt acc aag ccc agc act gcc ttc aaa tcc-3'	55 °C

2.9 Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
mSPLUNC1 C-C-term.	Amp ^R ; Hyg ^R ; Expression der C-terminalen Hälfte des mSPLUNC C-Terminus in D.Mel.2-Zellen	diese Arbeit
mSPLUNC1 C-N-term.	Amp ^R ; Hyg ^R ; Expression der N-terminalen Hälfte des mSPLUNC C-Terminus in D.Mel.2-Zellen	diese Arbeit
mSPLUNC1 ΔN60	Amp ^R ; Hyg ^R ; Expression von mSPLUNC1 ΔN60 in D.Mel.2-Zellen	diese Arbeit
pACYC184	Cam ^R ; Tet ^R ; Klonierungsvektor; Leervektorkontrolle für pPKL115	Chang und Cohen 1978
pCP20	Amp ^R ; Cam ^R ; FLP-Rekombinase; Temperatur sensitives Replikon	Cherepanov und Wackernagel 1995
pKD4	Amp ^R ; Kan ^R flankiert von FRT-Sequenzen; Matrize für die λ-Red-Deletionskassette	Datsenko und Wanner 2000
pKD46	Amp ^R ; λ-Red Gene unter pBAD-Promotor; Temperatur sensitives Replikon	Datsenko und Wanner 2000
pMT-BiP + pCoHygro	Amp ^R ; Hyg ^R ; Expressionsplasmid für Insektenzellen	Dr. Dr. Olaf Pinkenburg, Universität Marburg
pPKL115	Cam ^R ; fim-Operon von <i>E. coli</i> K12 mit Stopp-Codon in fimH	Pallesen et al. 1995

2.10 Rekombinante Proteine

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
mLPLUNC1-V5-His	Murines LPLUNC1 mit C-terminalem V5-6x His-Tag exprimiert in D.Mel.2-Zellen	AG Schnare, Universität Marburg
mSPLUNC1-Flag	Murines SPLUNC1 mit N-terminalem Flag-Tag exprimiert in HEK293T-Zellen	AG Schnare, Universität Marburg
mSPLUNC1-V5-His	Murines SPLUNC1 mit C-terminalem V5-6x His-Tag exprimiert in D.Mel.2-Zellen	diese Arbeit
mSPLUNC1-V5-His C-term.	Muriner mSPLUNC1 C-Terminus mit C-terminalem V5-6x His-Tag exprimiert in D.Mel.2-Zellen	diese Arbeit
mSPLUNC1-V5-His ΔN60	Murines mSPLUNC1, N-terminal um 60 Aminosäuren verkürzt mit C-terminalem V5-6x His-Tag exprimiert in D.Mel.2-Zellen	diese Arbeit

2.11 Antikörper

Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
α -HisTag mAk	100 ng/ml (Western Blot)	Merck Millipore, Schwalbach, DE
α -Kaninchen IgG POX	160 ng/ml (ELISA) 80 ng/ml (Western Blot)	Dianova, Hamburg, DE
α -Maus IgG POX	80 ng/ml (Western Blot)	Dianova, Hamburg, DE
α -mSPLUNC1 mAk 8-A3.3.3	2 μ g/ml (ELISA) 1-5 μ g/ml (Western Blot)	diese Arbeit
α -mSPLUNC1, polyklonal	10 μ g/ml (ELISA)	diese Arbeit
α -Ratte IgG POX	160 ng/ml (ELISA) 80 ng/ml (Western Blot)	Dianova, Hamburg, DE

2.12 Bakterien

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
536	uropathogener <i>E. coli</i> 536	Prof. Dr. Ulrich Dobrindt, Universitäts- klinikum Münster
CFT073	uropathogener <i>E. coli</i> CFT073	Institut für med. Mikrobiologie, Universität Gießen
CFT073 $\Delta dsbA$	Deletion von <i>dsbA</i> in <i>E. coli</i> CFT073	diese Arbeit
CFT073 $\Delta fimA$	Deletion von <i>fimA</i> in <i>E. coli</i> CFT073	diese Arbeit
CFT073 $\Delta fimA$ + p(<i>fimA</i>)	<i>E. coli</i> CFT073 $\Delta fimA$, komplementiert mit Plasmid pPKL115	diese Arbeit
CFT073 $\Delta fimA$ + pACYC184	<i>E. coli</i> CFT073 $\Delta fimA$ mit Leervektor pACYC184	diese Arbeit
CFT073 $\Delta surA$	Deletion von <i>surA</i> in <i>E. coli</i> CFT073	diese Arbeit
ESCO-001 – 006	<i>E. coli</i> -Isolate aus humanen Atemwegen	Dr. Dmitri Cherkasov, Mikrobiologische Diagnostik, Universität Marburg

KLPN-001 – 011	<i>K. pneumoniae</i> -Isolate aus humanen Atemwegen	Dr. Dmitri Cherkasov, Mikrobiologische Diagnostik, Universität Marburg
PSAE-001 – 007	<i>P. aeruginosa</i> -Isolate aus humanen Atemwegen	Dr. Dmitri Cherkasov, Mikrobiologische Diagnostik, Universität Marburg
<i>S. Typhimurium</i> Wildtyp (WT)	<i>S. Typhimurium</i> NCTC 12023	AG Schnare, Universität Marburg
<i>S. Typhimurium</i> $\Delta arcA$	Deletion von <i>arcA</i> in <i>S. Typhimurium</i> NCTC 12023	Dr. Roman Gerlach, RKI-Außenstelle Wernigerode
<i>S. Typhimurium</i> $\Delta arcB$	Deletion von <i>arcB</i> in <i>S. Typhimurium</i> NCTC 12023	Dr. Roman Gerlach, RKI-Außenstelle Wernigerode
<i>S. Typhimurium</i> $\Delta arcB$ + p(<i>arcB</i>)	<i>S. Typhimurium</i> NCTC 12023 $\Delta arcB$ komplementiert mit <i>arcB</i> in pWSK29	Dr. Roman Gerlach, RKI-Außenstelle Wernigerode
<i>S. Typhimurium</i> $\Delta arcB$ + pWSK29	<i>S. Typhimurium</i> NCTC 12023 $\Delta arcB$ mit Leervektor pWSK29	Dr. Roman Gerlach, RKI-Außenstelle Wernigerode
<i>S. Typhimurium</i> $\Delta yjyY$	Deletion von <i>yjyY</i> in <i>S. Typhimurium</i> NCTC 12023	Dr. Roman Gerlach, RKI-Außenstelle Wernigerode
SEMA-001 – 003	<i>S. marcescens</i> -Isolate aus humanen Atemwegen	Dr. Dmitri Cherkasov, Mikrobiologische Diagnostik, Universität Marburg
UPEC-001 – 012	Uropathogene <i>E. coli</i> -Isolate aus humanem Urin	AG Schnare, Universität Marburg
Zufallsmutagenese-Sammlung <i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Typhimurium</i> NCTC 12023-Isolate mit zufälliger Insertion eines EZ-Tn5-Transposon	Dr. Roman Gerlach, RKI-Außenstelle Wernigerode

2.13 Zelllinien

Bezeichnung

8-A3.3.3

Beschreibung

Hybridoma-Zelllinie zur Erzeugung von monoklonalem α -mSPLUNC1 Antikörper

D.Mel.2	<i>Drosophila melanogaster</i> Schneider 2 Zellen, adaptiert an proteinfreies Medium
D.Mel.2 mSPLUNC1-V5-His	Expression von rekombinanten mSPLUNC1-V5-His
D.Mel.2 mSPLUNC1-V5-His C-C-term.	Expression von mSPLUNC1-V5-His C-C-Terminus
D.Mel.2 mSPLUNC1-V5-His C-N-term.	Expression von mSPLUNC1-V5-His C-N-Terminus
D.Mel.2 mSPLUNC1-V5-His C-term.	Expression von rekombinanten mSPLUNC1-V5-His C-Terminus
D.Mel.2 mSPLUNC1-V5-His Δ N60	Expression von N-terminal um 60 Aminosäuren verkürzten mSPLUNC1-V5-His
Y3-Ag 1.2.3	Myeloma-Zelllinie für die Fusion mit Rattenmilzzellen

2.14 Tiere

Bezeichnung	Herkunft
Kaninchen	Tierhaltung BMFZ Uni-Marburg
Ratten (Lou/MWslHsd)	Tierhaltung BMFZ Uni-Marburg

2.15 Software

Bezeichnung	Beschreibung
AxioVision	Carl Zeiss, Jena, DE
Graph Pad Prism 4.01	Graph Pad Software, San Diego, US
Omega Data Analysis	BMG LABTECH, Offenburg, DE
Soft Max Pro	Molecular Devices, Sunnyvale, US

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Insekten-Zellkultur

Kultivierung von D.Mel.2-Zellen

D.Mel.2 (Schneider 2) ist eine Insektenzelllinie, die aus *Drosophila melanogaster* Embryonen isoliert wurde (Schneider 1972). Die hier verwendeten Zellen sind an Wachstum in proteinfreiem Medium adaptiert. Es kamen zwei verschiedene proteinfreie Medien zum Einsatz: Insect-Xpress und Spodopan. Die Haltung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen bei 28 °C in einem Brutschrank ohne CO₂-Zufuhr.

Bei der Durchführung dieser Arbeit wurden auch D.Mel.2-Zellen verwendet, die über eine Hygromycin B-Resistenzkassette stabil mit verschiedenen mSPLUNC1-Varianten transfiziert sind. Diese Zelllinien wurden unter Dauerselektion mit 250 µg/ml Hygromycin B gehalten.

Zum Ernten der in Suspension wachsenden Zellen wurden diese aus der Kulturflasche in ein 50 ml-Röhrchen überführt und bei 100 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Für die weitere Haltung wurde 1 ml der Zellsuspension zu 24 ml frischem Medium in eine neue Zellkulturflasche gegeben und die Zellen anschließend bebrütet.

Transfektion von D.Mel.2-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden D.Mel.2-Zelllinien erzeugt, die stabil mit verkürzten SPLUNC1-Varianten transfiziert sind. Hierzu wurden zunächst D.Mel.2-Zellen geerntet und auf $2,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden dann in eine 6-well Zellkulturplatte mit 2 ml/well ausgesät und über Nacht bei 28 °C inkubiert.

Die Transfektion erfolgte am Folgetag mit Lipofectamine® 2000 Transfektionsreagenz (Fa. Life Technologies). Es wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 4 µg der zu transfizierenden DNA mit 125 µl Medium gemischt. In einem anderen Reaktionsgefäß

wurden 10 µl des Transfektionsreagenz ebenfalls mit 125 µl Medium gemischt. Die beiden Ansätze wurden vereinigt, für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend auf die Zellen gegeben.

Nach 48 h Inkubation wurde mit der Selektion begonnen. Hierzu wurden 250 µg/ml Hygromycin B zu den Zellen gegeben. Nach drei Wochen Selektion waren die stabil transfizierten Zelllinien etabliert.

Generierung von Kulturüberstand zur Gewinnung von rekombinantem Protein

Das in dieser Arbeit verwendete mSPLUNC1-V5-His sowie die verkürzten mSPLUNC1-V5-His Varianten wurden rekombinant in D.Mel.2-Zellen exprimiert. Die Expression erfolgte unter Kontrolle eines Methallothionin-Promotors und einem Exportsignal für Insektenzellen.

Zur Generierung von Überständen wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in Zellkulturschalen (15 cm Durchmesser, 40 ml/Schale) ausgesät. Am Folgetag (Tag 0) wurde die Proteinexpression mit 0,5 mM Cu_2SO_4 induziert. Die Überstände wurden an Tag 5 geerntet und zum Entfernen der Zellen zweimal für 7 min bei 100 x g abzentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände sterilfiltriert (0,2 µm) und bis zur Aufreinigung der Proteine bei 4 °C gelagert.

3.1.2 Hybridoma-Zellkultur

Kultivierung von Y3-Ag 1.2.3-Zellen

Die Myeloma-Zelllinie Y3-Ag 1.2.3 wurde aus B-Lymphoblasten von *Rattus norvegicus* generiert (ATCC CRL-1631). Die Zellen sind HAT-sensitiv und dienen als Fusionszelllinie für die Generierung von monoklonalen Antikörpern aus der Ratte (Galfre et al. 1979). Gehalten wurden die Zellen in Zellkulturaschen mit Hybridoma-Standardmedium (HSM) bei 37 °C und 9 % CO_2 .

Zum Ernten der Zellen wurden diese vorsichtig mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst und in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 200 x g für 5 min pelletiert und anschließend in 10 ml frischem Medium aufgenommen.

2 ml dieser Zellsuspension wurden zu 23 ml Medium in eine neue Zellkulturflasche gegeben und anschließend zur Kultivierung bebrütet.

Zell-Zellfusion zur Erzeugung einer Hybridoma-Zelllinie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Hybridoma-Zelllinie erzeugt, die einen monoklonalen α -mSPLUNC1-Antikörper produziert. Hierzu wurden Y3-Ag 1.2.3 Myelomazellen mit Milzzellen von Lou/MWslHsd-Ratten fusioniert, die mit rekombinantem mSPLUNC1-V5-His (aus D.Mel.2-Zellen) immunisiert wurden.

Zunächst wurden die Zellen aus einer Rattenmilz isoliert. Hierzu wurde die Milz unter Opti-MEM-Medium mit dem Stempel einer Einwegspritze durch ein feinmaschiges Metallsieb gerieben. Die entstandene Zellsuspension wurde in ein 50 ml-Röhrchen überführt und bei 200 x g und 4 °C für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zum Entfernen der Erythrozyten in 10 ml ACK-Lysepuffer (8 g NH₄Cl, 1g KHCO₃, 37,2 mg EDTA ad 1 l H₂O) resuspendiert. Die Lyse wurde nach 5 min Inkubation bei RT durch Zugabe von 40 ml Opti-MEM gestoppt. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die Zellen in Opti-MEM resuspendiert und durch ein 70 μ m Nylon-Zellsieb in ein neues 50 ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen in einem Gemisch aus Opti-MEM mit 40 % hitzeinaktiviertem (Δ H) FBS und 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für die Fusion wurden die Milzzellen aufgetaut, in 20 ml Hybridoma-Standardmedium (HSM) aufgenommen und für 8 min bei 100 x g pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml HSM resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt. Die Zellen der Fusionszelllinie (Y3-Ag 1.2.3) wurden geerntet und ebenfalls gezählt.

Milz- und Myelomazellen wurden dreimal mit serumfreiem Hybridomamedium (SFM) gewaschen und anschließend im Verhältnis 1:1 in einem 50 ml-Röhrchen gemischt. Das Zellgemisch wurde für 8 min bei 100 x g zentrifugiert, dann wurde das Pellet mit dem Überstand für 1 h auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig und nahezu vollständig abgenommen und das Pellet gelockert.

Im Zeitraum von 1 min wurde unter ständigem Drehen des Röhrchens 1 ml PEG 4000-Lösung (42 % PEG 4000, 15 % DMSO in serumfreiem Hybridomamedium,

vorgewärmt auf 37 °C) auf das Pellet getropft. Innerhalb der folgenden 7 min wurden 5 ml vorgewärmtes SFM (37 °C) ebenfalls unter ständigem Drehen hinzuge tropft. In weiteren 7 min wurden dann nochmals 40 ml SFM (37 °C) zugegeben. Anschließend wurde der Fusionsansatz für 10 min bei 70 x g und RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde dann vorsichtig abgenommen und das Pellet gelockert. Anschließend wurde das Pellet in 100 ml Hybridoma-Fusionsmedium (HFM) aufgenommen und auf zwei 50 ml-Röhrchen aufgeteilt. Der Fusionsansatz wurde dann mit 100 µl/well in 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät. Die Platten wurden bei 37 °C und 9 % CO₂ inkubiert.

Drei Tage später wurden 100 µl/well HAT-Medium zu den Ansätzen gegeben. Die Zellen wurden acht Tage weiter inkubiert, anschließend wurde das Medium durch HT-Medium ausgetauscht und mit dem Screening der Klone begonnen. Bis zur Etablierung monoklonaler Zelllinien wurden die Hybridoma-Zellen weiter in HT-Medium gehalten.

Subklonierung von Hybridoma-Zellen

Zur Etablierung einer monoklonalen Hybridoma-Zelllinie wurden positiv auf die Produktion von α -mSPLUNC1-Antikörpern getestete Hybridoma-Zellen zweimal subkloniert.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen in 48-well-Zellkulturplatten bis zur deutlichen Verfärbung des HT-Mediums angezogen. 200 µl der Zellen wurden dann zu 6 ml frischem HT-Medium gegeben. Diese Zellsuspension wurde zweimal im Verhältnis 1:3 mit Medium verdünnt. Jede der drei Verdünnungen wurde in einer 96-well-Zellkulturplatte ausgesät (32 wells pro Verdünnung). Nach Heranwachsen der Klone wurden diese erneut auf die Produktion α -mSPLUNC1-Antikörpern getestet.

Kultivierung der Hybridoma-Zelllinie 8-A3.3.3

Die in dieser Arbeit zur Produktion von monoklonalen α -mSPLUNC1-Antikörpern etablierte Hybridoma-Zelllinie 8-A3.3.3 wurde in Zellkultuflaschen mit Hybridoma-Standardmedium (HSM) bei 37 °C und 7 % CO₂ gehalten. Zur Generierung von Zellkulturüberstand für die Antikörperaufreinigung wurden die Zellen im serumfreien

Medium Panserin 401 (PAN Biotech) gehalten.

Zum Ernten wurden die überwiegend in Suspension wachsenden Zellen in ein 50 ml-Röhrchen überführt und bei 200 x g für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml frischem Medium aufgenommen. 2 ml dieser Zellsuspension wurden zu 23 ml Medium in eine neue Zellkulturflasche gegeben und anschließend im Brutschrank kultiviert.

3.2 Arbeiten mit Bakterien

3.2.1 Adhäsionstests

Kristallviolett-Adhäsionstest

Zur Quantifizierung bakterieller Adhäsion *in vitro* wurde die Adhäsion von Bakterien an Mikrotiterplatten durch Färbung mit Kristallviolett sichtbar gemacht und photometrisch ausgewertet.

Zur Anzucht der Bakterien wurden 7 ml LB-Medium mit einer Kolonie inokuliert. Die Anzucht erfolgte für 18 h in einem 14 ml-Kulturröhrchen mit fest verschlossenem Deckel. Die Inkubationsbedingungen waren abhängig von der verwendeten Bakterienspezies (Tabelle 3-1). Vor Verwendung der Bakterien wurde die optische Dichte der Kultur bei 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Für die Experimente dieser Arbeit wurden die Bakterien mit einer OD_{600} von 0,8 – 1,2 eingesetzt. Bei Bedarf wurden verschiedene Ausgangskulturen auf eine einheitliche OD_{600} eingestellt.

Tabelle 3-1: Inkubationsbedingungen der Ausgangskulturen des Kristallviolett-Adhäsionstests

Spezies	Temperatur	Bewegung
<i>Enterobacter cloacae</i>	30 °C	schüttelnd
<i>Escherichia coli</i>	37 °C	statisch
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	37 °C	schüttelnd
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37 °C	schüttelnd
<i>Salmonella Typhimurium</i>	37 °C	schüttelnd
<i>Serratia marcescens</i>	37 °C	schüttelnd

Die zu testenden Proteine, Inhibitoren und andere Zusatzstoffe wurden in doppelter

Konzentration in LB-Medium angesetzt und mit 100 µl/well in 96-well-Flachboden-Mikrotiterplatten vorgelegt. Anschließend wurden 100 µl/well der Bakteriensuspension zugegeben. In einigen Versuchen erfolgte eine Vorinkubation der Bakterien mit einem Antibiotikum für 30 min bei Raumtemperatur.

Die Inkubation des Adhäsionstests erfolgte bei 37 bzw. bei 30 °C, in Abhängigkeit von der Bakterienspezies. Die Inkubationsdauer war dabei vom Experiment abhängig, betrug jedoch in der Regel 3 h. Zur Kontrolle des Wachstums wurde vor und nach der Inkubation die OD₆₀₀ im Plattenphotometer bestimmt.

Nach der Inkubation wurden die Überstände abgenommen und die Vertiefungen dreimal mit 250 µl/well PBS gewaschen. Die Mikrotiterplatte wurde dann bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss erfolgte die Färbung mit 200 µl/well 1 % Kristallviolett für 5 min. Die überschüssige Farbe wurde abgenommen und die Vertiefungen dreimal mit 250 µl/well VE-H₂O gewaschen. Anschließend wurde das in den adhäsiven Strukturen zurückgebliebene Kristallviolett mit 200 µl/well 95,5 % Ethanol für 20 min auf einem Schüttler herausgelöst. Zur Auswertung wurde am Plattenphotometer die Absorption bei 590 nm gemessen.

Mikroskopische Untersuchung bakterieller Adhäsion

Für die lichtmikroskopische Darstellung bakterieller Adhäsion wurden die Bakterien und Proteine wie zuvor beschrieben angesetzt (siehe Kristallviolett-Adhäsionstest). Anstatt in einer 96-well Mikrotiterplatte wurden die Ansätze auf einem 8-Kammer-Objektträger für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension abgenommen und die Kammern dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien mit 200 µl/Kammer 4 % Formaldehyd in PBS für 10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dem Fixieren wurde zweimal mit PBS und einmal mit H₂O gewaschen, dann wurden die Kammern entfernt und die Präparate in Moviol eingebettet. Die Auswertung erfolgte an einem Axiovert 200M-Mikroskop der Firma Zeiss im Durchlichtkanal.

3.2.2 Transposon-Zufallsmutagenese in *S. Typhimurium*

Für die vorliegende Arbeit wurde eine *S. Typhimurium* Transposon-Zufallsmutagenese-Bank auf Mutanten getestet, bei denen die Anwesenheit von PLUNC-Proteinen nicht länger Adhäsion induziert. Die Mutanten wurden von Dr. Roman Gerlach (Robert Koch-Institut, Außenstelle Wernigerode) erzeugt und zur Verfügung gestellt. Das verwendete Transposon trägt eine Kanamycinresistenz.

Die Mutanten wurden auf LB-Agarplatten mit 25 µg/ml Kanamycin vereinzelt und im Kristallviolett-Adhäsionstest getestet. Um eine größere Anzahl von Klonen analysieren zu können, wurde der Adhäsionstest auf ein Gesamtvolumen von 100 µl/Ansatz herunterskaliert und in 384-well Mikrotiterplatten durchgeführt. Ansonsten wurde der Adhäsionstest wie zuvor beschrieben durchgeführt (3.2.1). Die Inkubationszeit der Ansätze betrug 24 h.

Klone ohne PLUNC-induzierte Adhäsion wurden zur Bestätigung des Phänotyps in einem regulären Kristallviolett-Adhäsionstest (3.2.1) analysiert.

3.2.3 Transformation von Bakterien

Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde diese in chemisch kompetente *E. coli* des Stamms DH5- α transformiert. Die kompetenten Bakterien waren bereits im Institut vorhanden und mussten nicht erzeugt werden.

Die bei - 80 °C gelagerten kompetenten Bakterien wurden auf Eis aufgetaut. Die DNA wurde zu 25 µl (Retransformation) bzw. 50 µl (Ligationsansatz) Bakterien pipettiert und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42 °C und dann eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min.

Die Bakterien wurden anschließend in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und für 50 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Erzeugung elektrokompenter Bakterien und Elektroporation

Die im Rahmen dieser Arbeit erzeugten gentechnisch veränderten uropathogenen *E. coli* (UPEC) wurden durch Elektroporation mit Fremd-DNA transformiert. Hierzu mussten sie zunächst in einen elektrokompenten Zustand versetzt werden.

Zu diesem Zweck wurde eine Bakterienkolonie in 3 ml 2x YT-Medium inokuliert. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am Folgetag wurden 100 µl der über Nacht-Kultur zu 50 ml frischem 2x YT-Medium in einen 100 ml-Kolben pipettiert. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 – 0,6 bei 37 °C angeschüttelt, anschließend in ein 50 ml-Röhrchen überführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden dann für 10 min bei 4 °C und 2700 x g pelletiert. Das Pellet wurde daraufhin in 40 ml eiskaltem Wasser (Ultra Pure H₂O) mit 10 % Glycerin resuspendiert, erneut für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Dieser Waschschrift mit 10 % Glycerin wurde dreimal durchgeführt.

Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 250 µl Wasser mit 10 % Glycerin resuspendiert und als 50 µl Fraktionen auf vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Die elektrokompenten Bakterien wurden dann direkt für eine Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei - 80 °C gelagert.

Für die Transformation wurde bis zu 1 µg DNA mit 50 µl elektrokompenter Bakterien gemischt, für 2 min auf Eis inkubiert und dann in eine Elektroporationsküvette mit 1 mm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation erfolgte im GenePulser Xcell der Firma BioRad nach folgenden Spezifikationen:

Spannung	1800 V
Elektrische Kapazität	25 µF
Widerstand	200 Ω
Elektrodenabstand der Küvette	1 mm

Der Transformationsansatz wurde im Anschluss in 1 ml vorgewärmtem SOC-Medium (37 °C) aufgenommen und für 50 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.4 Gezielte Gen-Deletion in Bakterien

Es wurden gezielte Gen-Deletionen in den UPEC-Isolaten 536 und CFT073 mittels λ -Red-Rekombination durchgeführt (Datsenko und Wanner 2000). Bei diesem Verfahren wird das Zielgen durch ein Antibiotika-Resistenzgen ersetzt, das von FRT-Sequenzen flankiert ist. Dies ermöglicht eine spätere Entfernung der Antibiotikaresistenz durch die Flp-Rekombinase.

Das Plasmid pKD46, welches für die Red-Rekombinasegene kodiert, wurde mittels Elektroporation in elektrokompetente UPECs transformiert. Da dieses Plasmid einen temperatursensitiven Replikationsursprung besitzt, wurden die transformierten Bakterien bei 30 °C kultiviert.

Erzeugung der Deletionskassetten

Für die Deletionen wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Kanamycin-Resistenzkassetten mit Überhängen erzeugt, die homolog zu den genomischen Bereichen sind, die das zu deletierende Gen flankieren. Verwendet wurde hierfür der High Fidelity PCR Enzyme Mix der Firma Thermo Scientific.

PCR-Ansatz:

10x High Fidelity PCR Puffer mit 15 mM MgCl	15 μ l
10 mM dNTPs	3 μ l
10 μ M Vorwärtsprimer	4,5 μ l
10 μ M Rückwärtsprimer	4,5 μ l
10 ng/ μ l DNA-Matrize (Plasmid pKD4)	3 μ l
High Fidelity PCR Enzyme Mix (5 U/ μ l)	1,5 μ l
Nuklease freies Wasser	118,5 μ l
	150 μ l
	aufgeteilt auf 3x 50 μ l

Die PCR wurde in einem C1000™ Thermal Cycler der Firma BioRad durchgeführt. Die erwartete Fragmentgröße lag für alle in dieser Arbeit erzeugten Deletionskassetten bei ca. 1500 bp.

PCR-Programm:

3 min	94 °C	35 Zyklen
30 s	94 °C	
40 s	55 °C	
2 min	72 °C	
10 min	72 °C	
unendlich	4 °C	

Die PCR-Ansätze wurden im Anschluss über Gelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Agarosegel extrahiert (3.4.1).

Transformation der Deletionskassetten

Für die Transformation der Resistenzkassette wurden zunächst elektrokompente CFT073+pKD46 erzeugt. Das zuvor beschriebene Protokoll wurde hierfür leicht abgeändert: Die Anzucht der Bakterien erfolgte zum Erhalt des pKD46-Plasmids bei 30 °C und unter 100 µg/ml Ampicillin. Weiterhin wurden der Kultur 20 mM Arabinose zugesetzt, um die Expression der Red-Rekombinase zu induzieren.

Die Resistenzkassette wurde über Elektroporation, wie unter 3.2.3 beschrieben, in die kompetenten CFT073+pKD46 transformiert. Die Inkubation der Bakterien in SOC-Medium nach der Elektroporation wurde auf 1,5 h ausgedehnt. Die weitere Kultivierung erfolgte dann bei 37 °C auf LB-Agar mit 50 µg/ml Kanamycin.

Angewachsene Kolonien wurden zweimal über Nacht bei 44 °C inkubiert, um den Verlust des temperatursensitiven Plasmids pKD46 sicherzustellen.

PCR-Screening der Deletionsmutanten

Die korrekte Lokalisation der Deletionskassette wurde mittels einer Kolonie-PCR überprüft. Dazu wurde die DreamTaq DNA Polymerase der Firma Thermo Scientific verwendet.

Die PCR wurde mit zwei verschiedenen Primer-Kombinationen durchgeführt. Der Vorwärtsprimer wurde so gewählt, dass er ca. 500 bp vor Beginn der Deletion bindet.

Als Rückwärtsprimer wurde entweder ein universeller Primer (K1-Red-Del) verwendet, welcher in der Resistenzkassette bindet oder ein Primer, dessen Bindungsstelle direkt hinter der Deletion liegt.

PCR-Ansatz:

10x DreamTaq Puffer mit 20 mM MgCl	2,5 μ l
10 mM dNTPs	0,5 μ l
10 μ M Vorwärtsprimer	0,5 μ l
10 μ M Rückwärtsprimer	0,5 μ l
Bakterien (über Nacht Kultur)	2 μ l
DreamTaq DNA Polymerase (5 U/ μ l)	0,25 μ l
Nuklease freies Wasser	18,75 μ l
	25 μ l

Die PCR wurde in einem C1000TM Thermal Cycler der Firma BioRad durchgeführt. Die erwartete Fragmentgröße im Fall einer korrekten Lokalisation der Deletionskassette betrug bei Verwendung des K1-Rückwärtsprimers ca. 1000 bp. Wurde ein genspezifischer Rückwärtsprimer verwendet, entsprach die erwartete Fragmentgröße ca. 2000 bp.

PCR-Programm:

3 min	94 °C	40 Zyklen
30 s	94 °C	
40 s	50 °C	
1-2 min	72 °C	
10 min	72 °C	
unendlich	4 °C	

Entfernung der Resistenzkassette

Zur Entfernung der Resistenzkassette wurde das für Flp-Rekombinase kodierende Plasmid pCP20 mittels Elektroporation in die elektrokompente Deletionsmutante transformiert. Die Kultivierung der entstandenen Bakterien erfolgte bei 30 °C, da pCP20 über einen temperatursensitiven Replikationsursprung verfügt.

Angewachsene Kolonien wurden auf den Verlust der Kanamycinresistenz getestet,

indem sie zunächst in LB-Medium ohne Kanamycin angezogen wurden. Ein kleiner Teil dieser Kultur wurde dann in Medium mit 50 µg/ml Kanamycin überführt und über Nacht inkubiert.

Kanamycin sensitive Kolonien wurden zweimal über Nacht bei 44 °C inkubiert, um das Plasmid pCP20 wieder zu entfernen.

3.3 Proteinaufreinigung und -analyse

3.3.1 Aufreinigung von rekombinantem mSPLUNC1 aus D.Mel.2-Zellen

Zur Aufreinigung von rekombinantem mSPLUNC1-His bzw. der verkürzten mSPLUNC1-His-Varianten aus D.Mel.2-Kulturüberständen (vgl. 3.1.1) wurden HiTrap™ Chelating HP-Säulen verwendet. Der 6x His-Tag der rekombinanten Proteine bildet einen Komplex mit den zur Induktion der Proteinexpression verwendeten Cu²⁺-Ionen, welche an die Matrix der Säule binden.

Die Beladung der Säule erfolgte über eine Peristaltikpumpe bei 4 °C. Alle verwendeten Lösungen sowie die Zellkulturüberstände wurden vorgekühlt.

Die Säule wurde zunächst mit 5 ml (entspricht fünf Säulenvolumen) PBS gewaschen, dann wurde der sterilfiltrierte Überstand bei 4 °C mit Hilfe einer Peristaltikpumpe über die Säule gepumpt. Im Anschluss wurde nochmals mit 5 ml PBS und dann mit einem 30 mM-Imidazolpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine aus der Säule auszuspülen. Die Elution von mSPLUNC1-His erfolgte mit einem 50 mM-Imidazolpuffer, bevor mit einem 5 mM EDTA-Puffer die Cu²⁺-Ionen und eventuell verbliebene Proteine von der Säule gewaschen wurden. Von allen Wasch- und Elutionspuffern wurden, je nach Volumen des Überstands, 5 – 10 ml eingesetzt. Es wurden 1 ml Fraktionen gesammelt.

Zur Regeneration der Säule wurde diese mit 5 ml PBS und dann mit 5 ml 20 % Ethanol gewaschen. Die Lagerung der Säule erfolgte unter 20 % Ethanol bei 4 °C.

Die gesammelten Fraktionen wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Brillant-Blau-Färbung auf ihre Reinheit überprüft. Ein spezifischer Nachweis des aufgereinigten Proteins erfolgte über Western Blot mit einem gegen den 6x His-Tag gerichteten Antikörper.

Elutionsfraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt und über Amicon® Ultra Zentrifugenfilter (Porengröße 10 kDa) ankonzentriert und in PBS umgepuffert. Die Konzentration der Proteine wurde am Nanodrop-1000 durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. Anschließend erfolgte die Lagerung der Proteine in silikonisierten 0,6 ml Reaktionsgefäßen bei -80 °C.

3.3.2 Proteinauftrennung durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Die Größenauftrennung von Proteinen in dieser Arbeit erfolgte mittels eindimensionaler Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Es wurden 12 und 15 %ige Gele verwendet. Die Zusammensetzung der Gele ist im Folgenden tabellarisch dargestellt (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gele (Angaben jeweils für ein Gel)

Trenngel 12 %	Trenngel 15 %	Sammelgel
1600 µl H ₂ O	1100 µl H ₂ O	1400 µl H ₂ O
1350 µl SDS-Trenngelpuffer	1350 µl SDS-Trenngelpuffer	270 µl SDS-Sammelgelpuffer
2000 µl 30 % Acrylamid/Bis	2500 µl 30 % Acrylamid/Bis	330 µl 30 % Acrylamid/Bis
25 µl 20 % APS	25 µl 20 % APS	10 µl 20 % APS
3 µl TEMED	3 µl TEMED	3 µl TEMED

Vor dem Laden auf das Gel wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer (6x Laemmli) versetzt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Die Auftrennung erfolgte im Sammelgel bei ca. 80 V, im Trenngel bei 120 V.

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde die Gele entweder mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt oder es wurde ein Western Blot durchgeführt. Für die Coomassie-Färbung wurde eine kolloidale Färbelösung (PageBlue, Thermo Scientific) verwendet. Gefärbt wurde über Nacht bei RT, anschließend wurde für mehrere Stunden mit Wasser entfärbt.

3.3.3 Western Blot

Western Blots wurden in einem Tank-Blot-System durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine PVDF-Membran für 10 min in Methanol aktiviert. Gleichzeitig wurde das SDS-Gel nach der PAGE für 10 min in Transferpuffer inkubiert, um das überschüssige SDS auszuwaschen.

Für den Zusammenbau des Blots wurden alle Komponenten in Transferpuffer getränkt. Der Aufbau des Blots war wie folgt: (Kathode) – drei Schwämme – Whatman-Papier – Gel – PVDF-Membran – Whatman-Papier – 5 Schwämme – (Anode). Geblottet wurde für 1 – 1,5 h bei ca. 20 V und 150 mA.

Nach dem Blotten wurde die Membran für 1 h mit 5 % Milchpulver (MP) in TBST inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper über Nacht bei 4 °C. Alle Antikörperverdünnungen wurden in 1 % MP/TBST angesetzt.

Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper abgenommen und die Membran wurde dreimal mit TBST gewaschen, bevor sie für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Peroxidase (POX)-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert wurde. Überschüssiger Zweitantikörper wurde zweimal mit TBST und dann einmal mit TBS von der Membran gewaschen. Die Membran wurde darauf für 5 min mit einem chemoluminiszierenden Substrat (Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate, Merck Millipore) inkubiert. Anschließend erfolgte die Entwicklung des Western Blots entweder mit einem Röntgenfilm oder über ein digitales Dokumentationssystem (ChemiDoc XRS+, Bio-Rad).

3.3.4 Indirekter mSPLUNC1-ELISA

Ein indirekter mSPLUNC1-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) wurde verwendet, um Hybridoma-Zellen auf die Expression von α -mSPLUNC1-Antikörpern zu testen.

Rekombinantes mSPLUNC1-Flag wurde in einer Konzentration von 1 μ g/ml in PBS (50 μ l/well) über Nacht bei 4 °C an eine 96-well ELISA-Platte (Maxisorp NUNC, Thermo Scientific) gekoppelt. Am Folgetag wurde die Platte ausgeschlagen und für 1 h bei Raumtemperatur mit 200 μ l/well PBS + 10 % FBS geblockt. Nach dem Blocken wurde die Platte erneut ausgeschlagen und für 1 h mit 100 μ l/well Zellkulturüberstand inkubiert. Der ELISA wurde dann dreimal mit PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen, bevor 50 μ l/well an Peroxidase gekoppelter α -Ratten IgG-Antikörper (160 ng/ml in PBS + 10 % FBS) hinzugegeben wurde. Die Inkubation mit dem Detektionsantikörper erfolgte erneut für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen der Platte wurden

dann 50 µl/well Peroxidasesubstrat (TMB Super Sensitive One Component HRP Microwell Substrate, SurModics IVD) zugegeben. Die Farbentwicklung wurde mit 25 µl/well 1 M Phosphorsäure abgestoppt, sobald eine deutliche Blaufärbung der Proben erkennbar war. Die Auswertung des ELISAs erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm am Plattenphotometer (E max Precision Microplate Reader, Molecular Devices).

3.3.5 mSPLUNC1-Sandwich-ELISA

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Sandwich-ELISA zum Nachweis von murinem SPLUNC1 entwickelt.

Die Beschichtung der 96-well ELISA-Platten (Maxisorp NUNC, Thermo Scientific) erfolgte über Nacht bei 4 °C mit 50 µl/well des monoklonalen α -mSPLUNC1-Antikörpers 8-A3.3.3.3 in PBS mit einer Konzentration von 2 µg/ml. Am Folgetag wurde die Platte dreimal mit 0,05 % Tween 20 in PBS gewaschen und anschließend für 2,5 h bei RT mit 100 µl/well 1 % BSA in PBS geblockt. Nach erneutem Waschen wurden 50 µl/well Probe bzw. Standard auf die Platte gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Als Standard diente rekombinantes mSPLUNC1-Flag in einem Konzentrationsbereich von 20 bis 0,3125 ng/ml. Die Verdünnung des Standards sowie der im Folgenden für die Detektion der Proben verwendeten Antikörper erfolgte in PBS mit 1 % BSA.

Nach der Inkubation mit den Proben wurde die Platte erneut gewaschen und dann mit 10 µg/ml polyklonalem Kaninchen- α -mSPLUNC1-Antiserum inkubiert (50 µl/well, 2 h, RT). Nach erneutem Waschen erfolgte dann ein zweiter Detektionsschritt mit 160 ng/ml eines an Peroxidase gekoppelten α -Kaninchen IgG-Antikörpers für 1 h bei RT (50 µl/well). Im Anschluss wurde erneut gewaschen bevor 50 µl/well Peroxidasesubstrat (siehe 3.3.4) zugegeben wurden. Die Farbentwicklung wurde mit 25 µl/well 1 M Phosphorsäure abgestoppt, sobald eine deutliche Blaufärbung der Proben erkennbar war. Die Auswertung des ELISAs erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm am Plattenphotometer (siehe 3.3.4).

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und PCR-Aufreinigung

PCR-Fragmente, die in dieser Arbeit für Klonierungen zur Herstellung von Expressionsvektoren der rekombinanten Proteine genutzt wurden, wurden mit dem High Fidelity PCR Enzyme Mix der Firma Thermo Scientific erzeugt. Die Spezifikationen der PCR sind im Folgenden aufgeführt. Die Durchführung der PCR zur Erzeugung von Deletionsmutanten wurde bereits unter 3.2.4 beschrieben.

PCR-Ansatz:

10x High Fidelity PCR Puffer mit 15 mM MgCl	5 μ l
10 mM dNTPs	1 μ l
10 μ M Vorwärtsprimer	1,5 μ l
10 μ M Rückwärtsprimer	1,5 μ l
10 ng/ μ l DNA-Matrize	1 μ l
High Fidelity PCR Enzyme Mix (5 U/ μ l)	0,5 μ l
Nuklease freies Wasser	39,5 μ l
	50 μ l

Die PCR wurde in einem C1000™ Thermal Cycler der Firma BioRad durchgeführt.

PCR-Programm:

3 min	94 °C	35 Zyklen
30 s	94 °C	
40 s	Abhängig vom Primer	
1 min / kb	72 °C	
10 min	72 °C	
unendlich	4 °C	

Zur Aufreinigung von PCR-Ansätzen wurde das Gene Jet PCR Purification Kit der Firma Thermo Scientific genutzt. Der 50 μ l PCR-Ansatz wurde nach der PCR mit 50 μ l Bindepuffer gemischt und auf die Reinigungssäule gegeben. Die Säule wurde für 1 min in einem Auffanggefäß bei 13000 x g zentrifugiert, dann wurde die Säule einmal mit 100 μ l Bindepuffer gewaschen. Danach wurden 700 μ l Waschpuffer auf die Säule

gegeben. Nach einer Inkubation von 2 min wurden die Säulen zweimal zentrifugiert (13000 x g, 1 min), um den Waschpuffer vollständig aus der Säule zu entfernen. Auf die trockene Säule wurden 20 µl Elutionspuffer gegeben. Nach einer Inkubation von 1 min bei RT wurde in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert.

3.4.2 Auftrennung von DNA und Gel-Extraktion

Zur Auftrennung von DNA (PCR-Fragmente und Plasmid-DNA) wurden in dieser Arbeit 1 %ige und 1,2 %ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer angesetzt und in Gelkammern gegossen. Die Proben wurden je nach Volumen vor dem Auftragen mit 2-5 µl Probenpuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte im elektrischen Feld bei maximal 100 Volt.

Nachdem eine ausreichende Auftrennung der DNA erreicht war, wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad für ca. 15 min gefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und führt so zu einer Anfärbung, die in einem Dokumentationsgerät mit Kamera ausgewertet wurde.

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem Gene Jet Gel Extraction Kit der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Hierzu wurden die gewünschten DNA-Banden am UV-Tisch mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Für 100 mg Gel wurden 100 µl Bindepuffer zugegeben, dann wurde das Gel für 10 min bei 53 °C im Heizblock schüttelnd aufgelöst. Im Anschluss wurde kurz anzentrifugiert, dann wurde der Überstand auf eine Reinigungssäule pipettiert. Die folgende Prozedur der DNA-Aufreinigung ist identisch zur PCR-Aufreinigung mit dem PCR Purification Kit (siehe 3.4.1).

3.4.3 Restriktionsanalyse und Dephosphorylierung

Um für die Klonierung kompatible DNA-Überhänge zu generieren, wurde die DNA mit Restriktionsenzymen behandelt. Dazu wurden die gewünschten Mengen an Plasmid-DNA (Vektor) oder PCR-Fragmenten (Insert) mit Restriktionsenzymen (je 0,5 – 3 µl) und 2 µl eines passenden Puffers in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 1 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Bei Klonierungen wurde der Vektor im Anschluss an den Restriktionsverdau für 1 h bei 37 °C mit 4 µl FastAP (Alkalische Phosphatase, Firma Thermo Scientific) inkubiert. Hierdurch werden die Phosphatenden abgebaut, was eine Religation des Vektors verhindert. Die FastAP wurde durch 25 min Inkubation bei 75 °C inaktiviert. Die Lagerung der geschnittenen DNA erfolgte bei -20 °C.

3.4.4 Ligation

Über eine Ligation wurden die kompatiblen Überhänge des Vektors und des Inserts miteinander verknüpft. Für die Ligation wurde zunächst die DNA-Menge der zu ligierenden Fragmente über ein Präligationsgel bestimmt. Die zu ligierenden Fragmente wurden dann im Verhältnis 1:2 und 1:5 (Vektor : Insert) gemischt. Anschließend wurden 2 µl Ligasepuffer und 1,5 µl T4-Ligase (1 U/µl) zugesetzt. Das Gesamtvolumen eines Ligationsansatzes betrug 20 µl. Die Ligation erfolgte 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht im Eisbad. Bis zu maximal 4 µl eines Ligationsansatzes wurden in 50 µl chemisch kompetente *E. coli* transformiert (siehe 3.2.2).

3.4.5 Extraktion von Plasmid-DNA

Plasmid-Mini-Präparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im kleinen Maßstab wurde das GeneJet Plasmid Miniprep Kit der Firma Thermo Scientific verwendet.

2 ml einer 3 ml über Nacht-Kultur wurden in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und bei 3000 x g für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde in 250 µl Resuspensionspuffer aufgenommen und dann mit 250 µl Lysepuffer versetzt. Durch Invertieren wurde der Ansatz durchmischt, anschließend wurden 350 µl Neutralisationspuffer hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde wieder mehrmals invertiert, darauf wurde für 10 min bei 12000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Reinigungssäule gegeben, die in einem Auffanggefäß für 1 min bei 12000 x g zentrifugiert wurde. Im Anschluss wurde die Säule zweimal mit 500 µl Waschpuffer wie zuvor zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und es wurden 40 µl

Elutionspuffer oder H₂O auf die Säule gegeben. Der Ansatz wurde für 2 min bei RT inkubiert und danach für 2 min bei 12000 x g eluiert.

Durch Messung am Nanodrop-1000 wurde die Konzentration der aufgereinigten DNA bestimmt. Über Mini-Präparation gereinigte Plasmid-DNA wurde in dieser Arbeit für Restriktionsanalysen und Sequenzierungen eingesetzt.

Plasmid-Midi-Präparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* im größeren Maßstab wurde das PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit der Firma Life Technologies verwendet.

50 ml über Nacht-Kultur wurden bei 2700 x g für 10 min pelletiert. Das Pellet wurde in 4 ml Resuspensionspuffer aufgenommen und dann mit 4 ml Lysepuffer versetzt. Durch Invertieren wurde der Ansatz durchmischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde dann durch Zugabe von 4 ml Präzipitationspuffer gestoppt. Der Ansatz wurde durchmischt und dann für 30 min bei 2700 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Reinigungssäule gegeben, die zuvor mit 10 ml Equilibrierungspuffer equilibriert wurde. Die Säule wurde nach dem Durchlaufen des Überstands zweimal mit je 10 ml Waschpuffer gewaschen, anschließend wurde die DNA mit 5 ml Elutionspuffer in ein 50 ml-Röhrchen eluiert. Zur Präzipitation der DNA wurden 3,5 ml Isopropanol zugesetzt und der Ansatz für 1 h bei 4 °C und 4000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 3 ml 70 % Ethanol gewaschen (10 min, 4 °C, 4000 x g) und anschließend in 100 µl H₂O aufgenommen. Durch Messung am Nanodrop-1000 wurde die Konzentration der aufgereinigten DNA bestimmt. Zur Überprüfung der Reinheit wurde die DNA in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

3.5 Immunisierung von Ratten und Kaninchen

Für die Produktion der in der vorliegenden Arbeit erzeugten Antikörper wurden Ratten und Kaninchen mit rekombinantem mSPLUNC1-His immunisiert. Diese tierexperimentellen Arbeiten wurden vom Regierungspräsidium Gießen unter folgenden Aktenzeichen genehmigt:

- Kaninchen: V 54 – 19 c 20 15 c MR 20/8 Nr. A 52/2011

- Ratten: V54 – 19 c 20 15 (1) MR 20/8 Nr. A 8/2011

Die Immunisierungen und Blutentnahmen sowie das Töten der Tiere wurden von Herrn Schemken, Leiter der tierexperimentellen Abteilung des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg, durchgeführt.

Die Immunisierung erfolgte mit rekombinantem mSPLUNC1-His aus Insektenzellen und dem DNA-Oligonukleotid CpG 1668 als Adjuvanz nach folgendem Schema:

Die Kaninchen wurden im Abstand von je vier Wochen dreimal mit 50 µg/ml mSPLUNC1-His subkutan (s.c.) immunisiert. Die finale Immunisierung erfolgte zwei Tage vor der terminalen Serumentnahme mit 20 µg/ml mSPLUNC1-His ohne Adjuvanz intravenös (i.v.).

Die Ratten wurden ebenfalls im Abstand von je vier Wochen dreimal mit 50 µg/ml mSPLUNC1-His subkutan (s.c.) immunisiert. Die finale Immunisierung erfolgte zwei Tage vor der Entnahme der Milzen mit 50 µg/ml mSPLUNC1-His ohne Adjuvanz intraperitoneal (i.p.).

3.6 Statistische Auswertung

Für die statistischen Auswertungen in dieser Arbeit wurde das Programm Graph Pad Prism 4.01 verwendet (Graph Pad Software). Es wurden Mittelwerte gebildet und die zugehörige Standardabweichung (SD) berechnet. Anschließend wurden ungepaarte, zweiseitige Student's-*t*-Tests durchgeführt. Die p-Werte wurden wie folgt gewählt: $p > 0,05$ nicht signifikant (ns), $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

4. Ergebnisse

Teil 1:

mSPLUNC1 und mLPLUNC1 als Modulatoren bakterieller Adhäsion

4.1 PLUNC-Proteine können Adhäsion gramnegativer Bakterien sowohl induzieren als auch inhibieren

Im Rahmen meiner vorausgehenden Masterarbeit wurde gezeigt, dass murines SPLUNC1 (mSPLUNC1) in einem *Salmonella* Typhimurium-Stamm (NCTC 12023) sowie in zwei Isolaten uropathogener *Escherichia coli* (UPEC) Adhäsion induziert (Torben Meyer 2011: Masterarbeit). Andere Studien beschreiben dagegen eine inhibitorische Wirkung von SPLUNC1 auf die Adhäsion von *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* (Liu et al. 2013a, Liu et al. 2013b).

Für die vorliegende Arbeit wurde daher zunächst der Effekt von rekombinantem mSPLUNC1 und mLPLUNC1 auf die Adhäsion verschiedener gramnegativer Bakterien in einem *in vitro* Kristallviolett-Adhäsionsassay untersucht.

Da PLUNC-Proteine überwiegend im Respirationstrakt exprimiert werden, wurden für diese Untersuchungen klinische Isolate aus den Atemwegen von Patienten verwendet. Die Isolate wurden von der diagnostischen Abteilung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Philipps-Universität Marburg zur Verfügung gestellt. Weiterhin wurden zusätzliche UPEC-Isolate und als Positivkontrolle das bereits zuvor getestete Salmonellenisolat NCTC 12023 untersucht (Tabelle 4-1).

Die Induktion der Adhäsion bei *E. coli* durch mLPLUNC1 und mSPLUNC1 ist, mit einer Ausnahme, bei allen untersuchten Isolaten zu beobachten (Tabelle 4-1). Dabei spielt es keine Rolle, ob die Isolate aus den Atemwegen oder den Harnwegen stammen. Stammspezifische Unterschiede zeigen sich jedoch bei der Stärke der induzierten Adhäsion.

Keinen Einfluss hatte die Anwesenheit von mSPLUNC1 oder mLPLUNC1 dagegen auf die sieben im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *P. aeruginosa*-Isolate (Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1: Einfluss von mSPLUNC1 und mLPLUNC1 auf die Adhäsion gramnegativer Bakterien

*: Ein Teil der *E. coli* Isolate wurde nicht ausschließlich im Rahmen der vorliegenden Arbeit sondern gemeinsam mit Tina Bormann, 2012 (Bachelorarbeit, AG Schnare) untersucht.

	Anzahl der Isolate	Adhäsion unter Kontrollbedingungen	Einfluss von mSPLUNC1 und mLPLUNC1 auf die Adhäsion		
			Induktion	Inhibition	kein Effekt
<i>Escherichia coli</i> *	6	6	6	-	-
<i>Escherichia coli</i> (uropathogen)	14	6	13	-	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11	10	2	8	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7	7	-	-	7
<i>Salmonella</i> Typhimurium (Stamm NCTC 12023)	1	-	1	-	-
<i>Serratia marcescens</i>	3	3	-	3	-

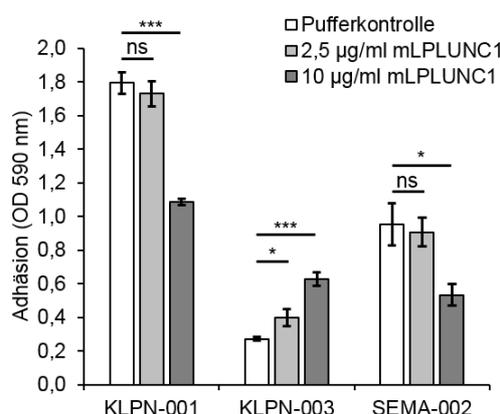


Abb. 4-1: Einfluss von mLPLUNC1 auf die Adhäsion von *K. pneumoniae* und *S. marcescens*

Die *K. pneumoniae*-Isolate KLPN-001 und KLPN-003 sowie das *S. marcescens*-Isolat SEMA-002 wurden für 18 h in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 1,1 – 1,3 (*S. marcescens*) bzw. 1,3 – 1,5 (*K. pneumoniae*) angezogen und in einer 96er Mikrotiterplatte im Verhältnis 1:1 mit 2,5 µg/ml (hellgraue Balken) oder 10 µg/ml (dunkelgraue Balken) mLPLUNC1-His gemischt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit PBS (Pufferkontrolle, weiße Balken). Die Platte wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde entfernt und die adhärenenten Strukturen mit 1 % Kristallviolett angefärbt. Das gebundene Kristallviolett wurde in 100 % Ethanol gelöst. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte durch Messung der OD bei 590 nm. Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung (SD). Statistische Auswertung durch ungepaarten Student's-t-Test: $p > 0,05$ nicht signifikant (ns), $p < 0,05$ *, $p < 0,001$ ***.

S. marcescens und die Mehrzahl der getesteten *K. pneumoniae*-Isolate zeigen eine reduzierte Adhäsion in Gegenwart von mSPLUNC1 und mLPLUNC1 (Tabelle 4-1). Bei zwei *K. pneumoniae*-Stämmen ist jedoch eine Induktion der Adhäsion zu beobachten. Diese Stämme unterscheiden sich von den übrigen *Klebsiella*-Isolaten dadurch, dass sie unter Kontrollbedingungen keine bzw. nur eine sehr schwache Adhäsion an die Plastikoberfläche der Mikrotiterplatten zeigen (Abb. 4-1).

Während für die Induktion der Adhäsion in *K. pneumoniae* KLPN-003 eine mLPLUNC1-Konzentration von 2,5 µg/ml ausreichend ist, zeigt sich eine signifikante Inhibition der Adhäsion von Isolat KLPN-001 erst bei einer Konzentration von 10 µg/ml (Abb. 4-1).

4.2 mSPLUNC1 und mLPLUNC1 induzieren Typ 1 Pili-vermittelte Adhäsion von UPEC CFT073

In dieser Arbeit wurde die Induktion der Adhäsion bei *E. coli* genauer untersucht. Da die Adhäsionsmechanismen von *E. coli* besonders im Kontext von Harnwegsinfektionen gut verstanden sind, wurde als Modellorganismus für die folgenden Untersuchungen der UPEC-Stamm CFT073 verwendet. Das Genom von CFT073 ist vollständig sequenziert, was genetische Manipulationen in diesem Stamm ermöglicht (Welch et al. 2002).

UPEC CFT073 zeigt unter Kontrollbedingungen eine geringe Adhäsion. Sowohl mSPLUNC1 als auch mLPLUNC1 verstärken die Adhäsion in Abhängigkeit von ihrer Konzentration (Abb. 4-2A). 10 µg/ml der Proteine führen zur maximalen Induktion, höhere Konzentrationen verstärken den beobachteten Effekt nicht mehr. Bis zu einer Proteinkonzentration von 0,3125 µg/ml lässt sich noch eine Induktion der Adhäsion beobachten (Abb. 4-2A).

Um zu untersuchen, ob sich bei der im *in vitro* Kristallviolett-Adhäsionsassay beobachteten Induktion adhäsiver Strukturen tatsächlich die Anzahl der adhärierenden Bakterien erhöht, wurden Adhäsionsassays auf Objektträgern durchgeführt und mikroskopisch analysiert. Diese Untersuchungen zeigen eine deutlich erhöhte Anzahl adhärrender Bakterien in Ansätzen, die mit mLPLUNC1 inkubiert wurden (Abb. 4-2B). Untersuchungen mit mSPLUNC1 zeigen ein identisches Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

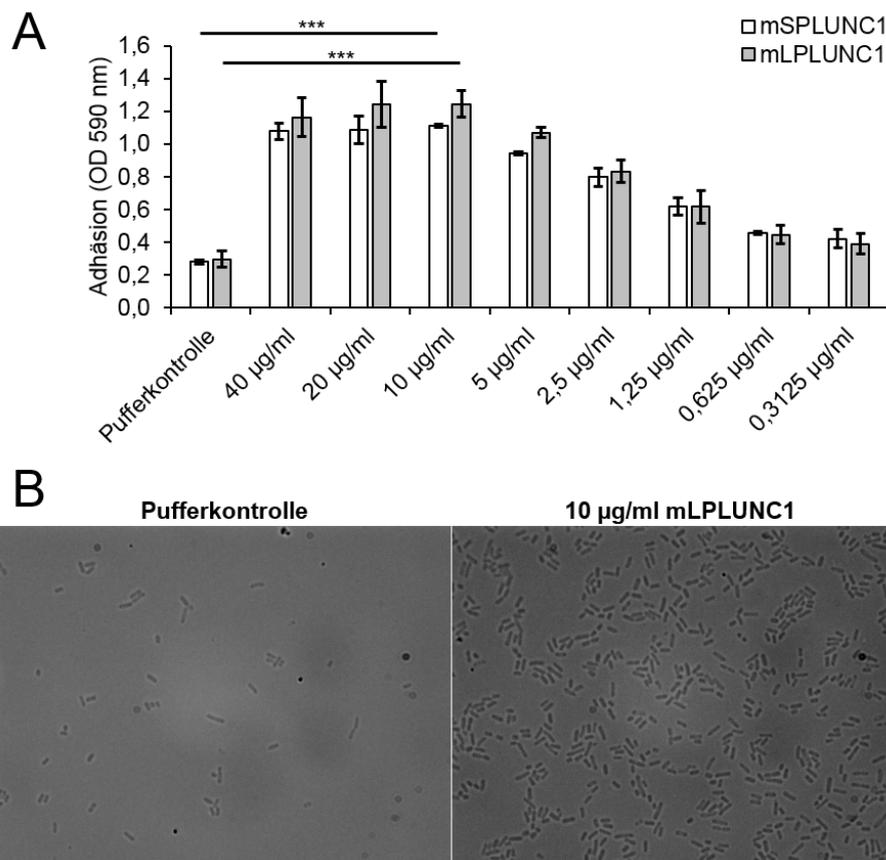


Abb. 4-2: mSPLUNC1 und mLPLUNC1 induzieren Adhäsion von UPEC CFT073

A: *E. coli* des Stamms CFT073 wurden für 18 h in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 1,3 angezogen und in einer 96er Mikrotiterplatte im Verhältnis 1:1 mit verschiedenen Konzentrationen mLPLUNC1-His (graue Balken) oder mSPLUNC1-His (weiße Balken) gemischt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit PBS (Pufferkontrolle). Die Platte wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde entfernt und die adhären Strukturen mit 1 % Kristallviolett angefärbt. Das gebundene Kristallviolett wurde in 100 % Ethanol gelöst. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte durch Messung der OD bei 590 nm. Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung (SD). Statistische Auswertung durch ungepaarten Student's-*t*-Test: $p < 0,001$ ***.

B: *E. coli* des Stamms CFT073 wurden für 18h in LB-Medium angezogen und auf einem Objektträger im Verhältnis 1:1 mit 10 µg/ml mLPLUNC1-His gemischt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit PBS (Pufferkontrolle). Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension entfernt und die adhären Strukturen mit 4 % Formaldehyd fixiert. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Axiovert 200M (Carl Zeiss, Jena) im Durchlichtkanal bei einer Vergrößerung von 1000 erstellt.

Im Folgenden wurde untersucht, welche adhäsiven Strukturen durch mSPLUNC1 und mLPLUNC1 in CFT073 induziert werden. In Salmonellen basiert die PLUNC-induzierte Adhäsion auf Typ 1 Pili, was sie auch in *E. coli* als wahrscheinliche

Zielstrukturen der PLUNC-Proteine erscheinen lässt (Torben Meyer 2011: Masterarbeit).

Das Adhäsion der Typ 1 Pili, FimH, bindet Mannosestrukturen auf zellulären Oberflächen, weshalb sich Typ 1 Pili-vermittelte Adhäsion durch Mannose spezifisch inhibieren lässt (Ofek et al. 1977). In der vorliegenden Arbeit wurden daher UPEC des Stamms CFT073 mit mLPLUNC1 und verschiedenen Konzentrationen des Mannosederivats Methyl α -D-Mannopyranosid (MMP) inkubiert. Das Derivat wurde verwendet, um eine Metabolisierung des Zuckers durch die Bakterien zu verhindern. Mannose könnte zu einer Verfälschung des Ergebnisses aufgrund eines Einflusses auf das bakterielle Wachstum führen. Mannose und Galaktose wurden als Kontrollen für die Spezifität der Inhibition verwendet.

MMP inhibiert die Induktion der Adhäsion durch mLPLUNC1 bei einer Konzentration von 2 % vollständig. Eine Inhibition von etwa 60 % ist bereits bei 0,2 % MMP zu beobachten (Abb. 4-3A). Mannose zeigt bei einer Konzentration von 2 % eine Inhibition der PLUNC-induzierten Adhäsion von etwa 75 %, während Galaktose keinen inhibitorischen Effekt auf die Adhäsion von CFT073 hat (Abb. 4-3A).

Das *E. coli* Atemwegsisolat ESCO-001 sowie das *K. pneumoniae*-Isolat KLPN-003 zeigen in Anwesenheit von Mannose bzw. MMP ebenfalls eine verringerte Induktion von Adhäsion durch SPLUNC1 und LPLUNC1 (Daten nicht gezeigt).

Neben der biochemischen Inhibition von Typ 1 Pili durch die Zugabe von Mannose bzw. MMP sollte auch auf genetischer Ebene gezeigt werden, dass die PLUNC-induzierte Adhäsion durch Typ 1 Pili vermittelt wird. Zu diesem Zweck wurde das *fimA*-Gen, das für die Hauptstrukturkomponente der Typ 1 Pili kodiert, in UPEC CFT073 durch das λ -Red-Rekombinase-System deletiert.

Die *fimA*-Deletionsmutante zeigt im Gegensatz zum Wildtyp keine verstärkte Adhäsion in Gegenwart von mLPLUNC1 oder mSPLUNC1 (Abb. 4-3B). Zur Wiederherstellung des ursprünglichen Phänotyps wurde ein, für das *fim*-Operon von *E. coli* kodierendes, Plasmid in die Deletionsmutante eingebracht (Δ *fimA* + p(*fim*)). In diesen Bakterien können sowohl mLPLUNC1 als auch mSPLUNC1 wieder Adhäsion induzieren, allerdings in deutlich geringerem Umfang als im Wildtyp (Abb. 4-3B).

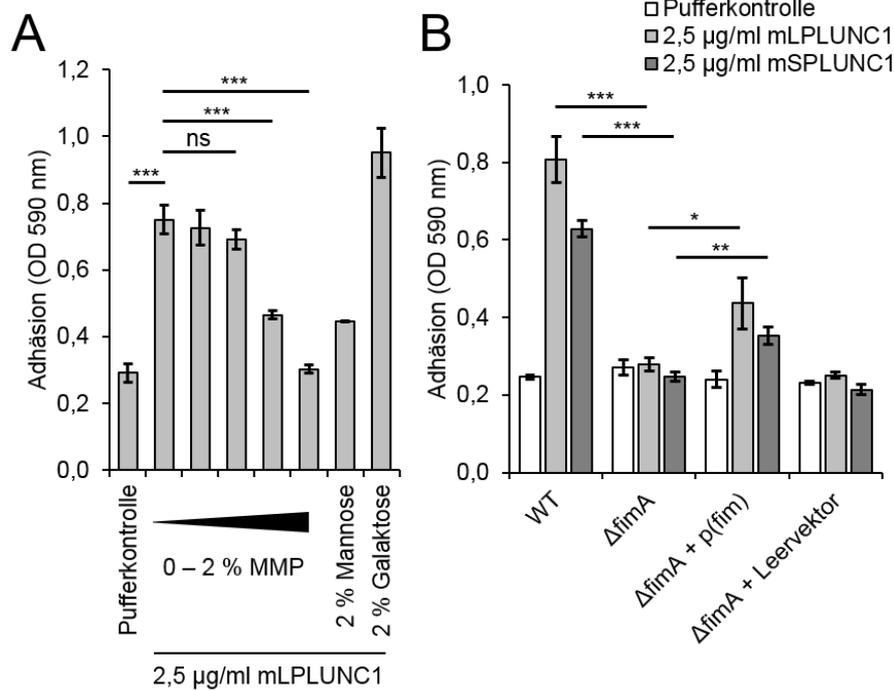


Abb. 4-3: mSPLUNC1 und mLPLUNC1 induzieren Adhäsion über Typ 1 Pili in UPEC CFT073

E. coli des Stamms CFT073 wurden für 18 h in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 0,8 – 1 angezogen und in einer 96er Mikrotiterplatte im Verhältnis 1:1 mit 2,5 µg/ml mLPLUNC1-His oder mSPLUNC1-His gemischt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit PBS (Pufferkontrolle). Die Platte wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde entfernt und die adhärenen Strukturen mit 1 % Kristallviolett angefärbt. Das gebundene Kristallviolett wurde in 100 % Ethanol gelöst. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte durch Messung der OD bei 590 nm. Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung (SD). Statistische Auswertung durch ungepaarten Student's-*t*-Test: $p > 0,05$ nicht signifikant (ns), $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

A: CFT073 wurde mit 2,5 µg/ml mLPLUNC1-His sowie verschiedenen Konzentrationen des Mannosederivats MMP (0 %; 0,002 %; 0,02 %; 0,2 %; 2 %) inkubiert. Als Kontrollen dienten 2 % Mannose und 2 % Galaktose.

B: CFT073 Wildtyp (WT), CFT073 $\Delta fimA$ ($\Delta fimA$) sowie CFT073 $\Delta fimA$ mit dem für das *fim*-Operon kodierenden Plasmid pPKL115 ($\Delta fimA + p(fim)$) bzw. einem Leervektor ($\Delta fimA +$ Leervektor) wurden mit 2,5 µg/ml mLPLUNC1-His (hellgraue Balken), 2,5 µg/ml mSPLUNC1-His (dunkelgraue Balken) bzw. der Pufferkontrolle (weiße Balken) inkubiert.

Zusammengenommen zeigen die vorliegenden Daten, dass die durch PLUNC-Proteine induzierte Adhäsion in *E. coli*, wie auch in Salmonellen durch Typ 1 Pili vermittelt wird.

Eine mögliche Ursache für diese vermehrte Adhäsion über Typ 1 Pili nach Kontakt mit

mSPLUNC1 oder mLPLUNC1 wäre eine Induktion der Synthese von Pilus-Untereinheiten in den Bakterien. Dies wurde im Folgenden durch Inhibitions-experimente genauer untersucht.

4.3 Die PLUNC-induzierte Adhäsion ist unabhängig von Protein-Neusynthese

Zur Überprüfung der Hypothese, dass PLUNC-Proteine in *E. coli* die Synthese von Pilus-Untereinheiten induzieren, wurden UPEC vom Stamm CFT073 für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen des Antibiotikums Chloramphenicol (Cam) inkubiert und anschließend in einem Kristallviolett-Adhäsionsassay mit mLPLUNC1 eingesetzt. Chloramphenicol ist ein bakteriostatisches Antibiotikum, welches durch Hemmung der Peptidyltransferaseaktivität die Synthese von Proteinen inhibiert (MacBeth und Lee 1993).

mLPLUNC1 induziert Adhäsion in CFT073, die mit 50 oder 100 µg/ml Cam behandelt wurden (Abb. 4-4A). Bei 100 µg/ml Cam ist der Effekt von mLPLUNC1 geringfügig schwächer als bei 50 µg/ml Cam. Ein Kontrollexperiment zeigt, dass beide Cam-Konzentrationen das Wachstum von CFT073 vollständig inhibieren (Abb. 4-4B).

In Experimenten in denen statt Cam andere, die Proteinsynthese inhibierende, Antibiotika (Tetracyclin und Streptomycin) eingesetzt wurden, war mLPLUNC1 ebenfalls in der Lage, Adhäsion von CFT073 zu induzieren (Daten nicht gezeigt). Dies weist darauf hin, dass PLUNC-induzierte Adhäsion nicht auf einer *de novo* Synthese von Pilus-Untereinheiten beruht.

Um molekulare Mechanismen zu identifizieren, die die Wirkung von mSPLUNC1 und mLPLUNC1 auf die Adhäsion der Bakterien über Typ 1 Pili erklären, wurde eine Transposon-basierte Zufallsmutagenesesammlung von *S. Typhimurium* im Adhäsionsassay ausgetestet.

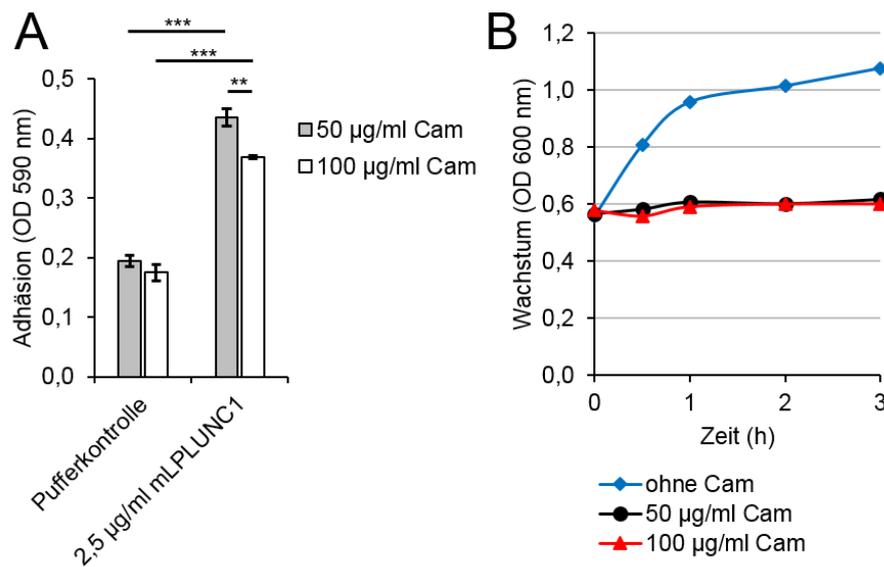


Abb. 4-4: Inkubation mit Chloramphenicol verhindert die PLUNC-induzierte Adhäsion von CFT073 nicht

A: *E. coli* des Stamms CFT073 wurden für 18 h in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 1,0 angezogen. Die Bakterien wurden für 30 min bei Raumtemperatur mit 50 µg/ml (graue Balken) bzw. 100 µg/ml (weiße Balken) Chloramphenicol (Cam) vorinkubiert und anschließend in einer 96er Mikrotiterplatte im Verhältnis 1:1 mit 2,5 µg/ml mLPLUNC1-His gemischt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit PBS (Pufferkontrolle). Die Platte wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde entfernt und die adhären Strukturen mit 1 % Kristallviolett angefärbt. Das gebundene Kristallviolett wurde in 100 % Ethanol gelöst. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte durch Messung der OD bei 590 nm. Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung (SD). Statistische Auswertung durch ungepaarten Student's-*t*-Test: $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

B: Zur Kontrolle des Wachstums wurden *E. coli* des Stamms CFT073 für 18 h in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 1,0 angezogen. Die Bakterien wurden dann für 30 min bei Raumtemperatur mit 50 µg/ml (schwarze Kreise) bzw. 100 µg/ml (rote Dreiecke) Cam bzw. ohne Antibiotikum (blaue Rauten) vorinkubiert. Die Ansätze wurden dann im Verhältnis 1:1 mit LB-Medium ohne Antibiotikum gemischt und statisch bei 37 °C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3h) wurde das Bakterienwachstum durch Messung der OD bei 600 nm bestimmt.

4.4 Induktion der Adhäsion von *S. Typhimurium*-Zufallsmutanten durch PLUNC-Proteine

Zur Identifikation von bakteriellen Proteinen, die an der durch PLUNC-Proteine induzierten Adhäsion von *E. coli* und *S. Typhimurium* beteiligt sind, wurde eine Sammlung von *S. Typhimurium* Zufallsmutanten analysiert. Die Mutanten wurden durch zufällige Insertion eines EZ-Tn5-Transposons mit einem Kanamycin-

Resistenzgen in das Genom von *S. Typhimurium* NCTC 12023 erzeugt. Diese Bakteriensammlung sollte Mutanten für jedes bakterielle Gen enthalten und ermöglicht dadurch eine unvoreingenommene Suche nach entsprechenden Genprodukten, die an der PLUNC-induzierten Induktion der Adhäsion von *S. Typhimurium* beteiligt sind.

Die Erzeugung der Mutagenesesammlung und die Bestimmung der Lokalisation der Transposons durch PCR wurde von einem Kooperationspartner am Robert Koch Institut durchgeführt (Dr. Roman Gerlach, unveröffentlichte Daten).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 3552 Klone der Mutagenese-Sammlung im *in vitro* Kristallviolett-Adhäsionsassay auf ihre Fähigkeit untersucht, auf die Präsenz von mLPLUNC1 oder mSPLUNC1 mit Adhäsion zu reagieren. Für Klone, bei denen durch die PLUNC-Proteine keine oder eine Vergleich zum WT deutlich verringerte Adhäsion induziert wird, wurde die Lokalisation des Transposons ermittelt.

Tabelle 4-2: Analyse einer *S. Typhimurium* Transposon-Zufallsmutagenesesammlung auf Induktion von Adhäsion durch mSPLUNC1 und mLPLUNC1

Bezeichnung des Klons	Insertion in Gen	PLUNC-induzierte Adhäsion im Vergleich zu <i>S. Typhimurium</i> Wildtyp
A) hoch interessante Klone		
03-E4	<i>surA</i>	stark reduziert
13-B10	<i>arcB</i>	leicht reduziert
16-A6	<i>arcA</i>	keine PLUNC-induzierte Adhäsion
16-H9	<i>dsbA</i>	keine PLUNC-induzierte Adhäsion
18-C2	<i>fimA</i>	keine PLUNC-induzierte Adhäsion
26-D4	<i>bamB</i>	stark reduziert
B) weniger interessante Klone		
02-A5	<i>icdA</i>	stark reduziert
09-C3	<i>infB</i>	leicht reduziert
12-A9	<i>polA</i>	stark reduziert
22-D6	<i>miaA</i>	stark reduziert
24-C4	<i>lipB</i>	stark reduziert
34-A5	<i>rfaI</i>	stark reduziert
36-E11	<i>hscA</i>	stark reduziert

Es wurden 13 Klone mit einer verringerten PLUNC-induzierten Adhäsion identifiziert (Tabelle 4-2). Diese Klone wurden in hochinteressante und weniger interessante Kandidaten unterteilt. Als weniger interessant wurden dabei Klone eingestuft, deren Mutation vermutlich die Teilung oder essentielle Stoffwechselleistungen der Bakterien negativ beeinflussen. Es wurde angenommen, dass in diesen Klonen der beobachtete Phänotyp nicht spezifisch für Typ 1 Pili-vermittelte Adhäsion ist.

Von den sechs als hoch interessant eingestuften Klonen tragen vier Mutationen in Genen, deren Funktion in der Ausbildung von Typ 1 Pili bekannt ist. Dies ist zum einen *fimA*, das für die Hauptstrukturkomponente der Typ 1 Pili kodiert und zum anderen *surA*, *dsbA* und *bamB* (Tabelle 4-2). Diese Gene kodieren für Proteine, die die korrekte Faltung bzw. Assemblierung von Proteinen im periplasmatischen Raum oder der äußeren Zellmembran unterstützen.

Um diese Ergebnisse auf *E. coli* zu übertragen, wurden mit dem λ -Red-Rekombinase-System im UPEC CFT073 *surA* und *dsbA* gezielt deletiert. Beide Mutanten zeigen keine Induktion von Adhäsion in Gegenwart von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ oder 10 $\mu\text{g/ml}$ mSPLUNC1 (Abb. 4-5). Die *dsbA*-Mutante zeigt außerdem einen Verlust der geringen Adhäsion unter Kontrollbedingungen. Bei der *surA*-Mutante ist diese geringe Ausgangsadhäsion noch vorhanden, wird aber in Anwesenheit von 10 $\mu\text{g/ml}$ mSPLUNC1 reduziert (Abb. 4-5).

Zwei weitere der als hoch interessant eingestuften Klone haben eine Transposoninsertion in *arcA* bzw. in *arcB* (Tabelle 4-2). Diese beiden Proteine bilden ein Zweikomponentensystem, wobei *arcB* für die Sensor-Histidinkinase und *arcA* für den Transkriptionsregulator kodiert. Während es im *arcA*-defizienten Klon durch mLPLUNC1 oder mSPLUNC1 zu keiner Induktion von Adhäsion mehr kommt, ist diese beim *arcB*-defizienten Klon nur leicht reduziert (Tabelle 4-2).

Das ArcAB-Zweikomponentensystem, ein globaler Genexpressionsregulator unter anaeroben Konditionen, wurde bisher nicht mit Typ 1 Pili in Verbindung gebracht (Übersichtsartikel: Malpica et al. 2006). Um den Einfluss dieser beiden Proteine auf die PLUNC-induzierte Adhäsion genauer zu untersuchen, wurden Bakterien analysiert, in denen die Gene für *arcA* oder *arcB* vollständig deletiert wurden.

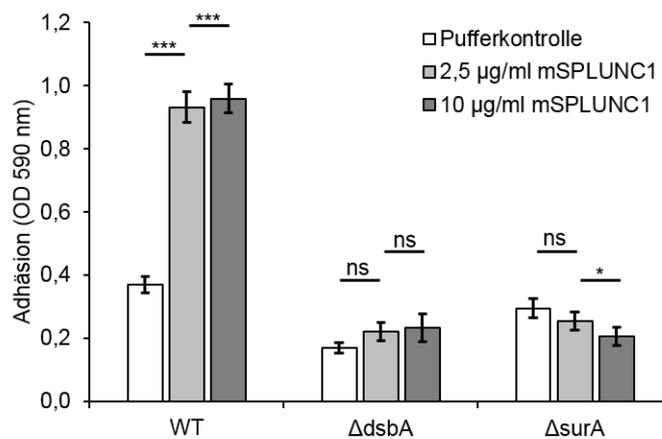


Abb. 4-5: mSPLUNC1 induziert keine Adhäsion in *dsbA*- oder *surA*-defizienten CFT073-Mutanten

E. coli des Stamms CFT073 (WT) sowie CFT073-Deletionsmutanten für *dsbA* ($\Delta dsbA$) bzw. *surA* ($\Delta surA$) wurden für 18 h in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 0,7 angezogen und in einer 96er Mikrotiterplatte im Verhältnis 1:1 mit 2,5 µg/ml (hellgraue Balken) oder 10 µg/ml (dunkelgraue Balken) mSPLUNC1-His gemischt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit PBS (Pufferkontrolle). Die Platte wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde entfernt und die adhärenen Strukturen mit 1 % Kristallviolett angefärbt. Das gebundene Kristallviolett wurde in 100 % Ethanol gelöst. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte durch Messung der OD bei 590 nm. Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung (SD). Statistische Auswertung durch ungepaarten Student's-*t*-Test: $p > 0,05$ nicht signifikant (ns), $p < 0,05$ *, $p < 0,001$ ***.

4.5 PLUNC-induzierte Adhäsion ist abhängig von ArcB und YjjY, nicht aber von ArcA

Bei den untersuchten *S. Typhimurium*-Mutanten ist ein EZ-Tn5-Transposon zufällig ins Genom integriert. Daher sind die Gene, in die die Insertion stattfindet, nicht unbedingt komplett neutralisiert. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit Salmonellen untersucht, bei denen *arcA* bzw. *arcB* mittels homologer Rekombination vollständig deletiert wurden.

Im Gegensatz zur *arcB*-Transposonmutante zeigt die *arcB*-Deletionsmutante ($\Delta arcB$) keinerlei Induktion von Adhäsion in Anwesenheit von mLPLUNC1 oder mSPLUNC1. Durch Komplementation der $\Delta arcB$ -Mutante mit einem für *arcB* kodierenden Plasmid (*p(arcB)*) lässt sich der Wildtyp-Phänotyp nahezu vollständig wiederherstellen (Abb. 4-6A).

Die Deletion von *arcA* ($\Delta arcA$) führt nicht zu einer, im Vergleich zum Wildtyp,

verringerten PLUNC-induzierten Adhäsion (Abb. 4-6B). Dies steht im Gegensatz zu der *arcA*-Transposonmutante, die in Gegenwart von mSPLUNC1 oder mLPLUNC1 keine Induktion von Adhäsion zeigt (Tabelle 4-2).

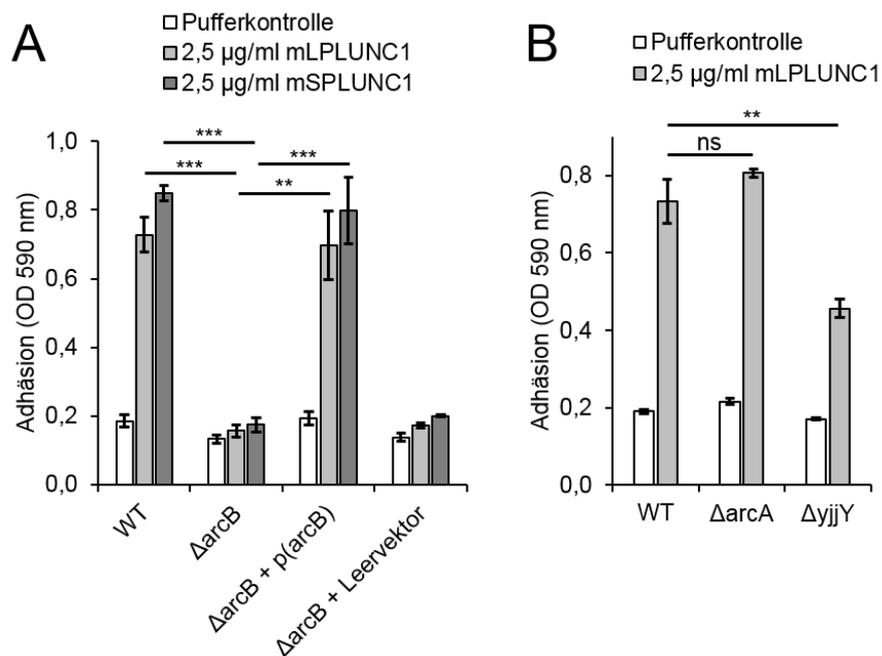


Abb. 4-6: PLUNC-induzierte Adhäsion in *S. Typhimurium arcA*-, *arcB*- und *yjjY*-Deletionsmutanten

Verschiedene Stämme von *S. Typhimurium* wurden für 18 h in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 0,7 – 1,0 angezogen und in einer 96er Mikrotiterplatte im Verhältnis 1:1 mit 2,5 µg/ml mLPLUNC1-His (hellgraue Balken) oder mSPLUNC1-His (dunkelgraue Balken) gemischt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit PBS (Pufferkontrolle, weiße Balken). Die Platte wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde entfernt und die adhärennten Strukturen mit 1 % Kristallviolett angefärbt. Das gebundene Kristallviolett wurde in 100 % Ethanol gelöst. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 590 nm. Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung (SD). Statistische Auswertung durch ungepaarten Student's-*t*-Test: $p > 0,05$ nicht signifikant (ns), $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

A: *S. Typhimurium* Wildtyp (WT), *S. Typhimurium* $\Delta arcB$ ($\Delta arcB$), *S. Typhimurium* $\Delta arcB$ mit einem für *arcB* kodierenden Plasmid ($\Delta arcB + p(arcB)$) bzw. einem Leervektor ($\Delta arcB + \text{Leervektor}$).

B: *S. Typhimurium* Wildtyp (WT), *S. Typhimurium* $\Delta arcA$ ($\Delta arcA$) und *S. Typhimurium* $\Delta yjjY$ ($\Delta yjjY$).

Betrachtet man die genomische Umgebung des ArcAB-Zweikomponentensystems, so findet sich in der Promotorregion von *arcA* einen 140 bp großer, als *yjyY* bezeichneter Lokus, der für ein nicht charakterisiertes Protein kodiert. Eine *S. Typhimurium yjyY*-Deletionsmutante ($\Delta yjyY$) zeigt im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant reduzierte Induktion der Adhäsion durch mLPLUNC1 (Abb. 4-6B).

Weitere Untersuchungen zur Bedeutung des ArcAB-Zweikomponentensystems für die durch Typ 1 Pili-vermittelte Adhäsion von *S. Typhimurium* und *E. coli* sowie eine Charakterisierung des hypothetischen Proteins YjyY war aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

4.6 Freies LPS inhibiert die von mLPLUNC1-induzierte Adhäsion von *E. coli*

PLUNC-Proteine gehören zur gleichen Proteinsuperfamilie wie die LPS-bindenden Proteinen BPI und LBP (Übersichtsartikel: Weiss 2003). Dies legt nahe, dass PLUNC-Proteine ebenfalls in der Lage sind, LPS zu binden. Eine Interaktion zwischen PLUNC-Proteinen und dem LPS in der Zellwand von *E. coli* oder *S. Typhimurium* könnte der Auslöser für die Induktion der Adhäsion über Typ 1 Pili sein. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob exogen zugegebenes LPS die PLUNC-induzierte Adhäsion von *E. coli* inhibieren kann.

Im Kristallviolett-Adhäsionsassay wurden *E. coli* vom Stamm CFT073 mit 2,5 µg/ml mLPLUNC1 und freiem LPS in verschiedenen Konzentrationen im Kristallviolett-Adhäsionsassay inkubiert. 12,5 µg/ml LPS reduzieren die mLPLUNC1-induzierte Adhäsion um ca. 25 %, bei einer LPS-Konzentration von 200 µg/ml LPS ist nur noch eine im Vergleich zur Kontrolle ohne mLPLUNC1 (LPS-Kontrolle) minimal erhöhte Adhäsion zu beobachten (Abb. 4-7).

Diese Daten zeigen, dass mLPLUNC1 wahrscheinlich die Eigenschaft besitzt, LPS zu binden und dass die Bindung an freies LPS die Induktion von Adhäsion durch mLPLUNC1 inhibiert. Dabei hat die Herkunft des eingesetzten LPS keinen Einfluss. In Versuchen, bei denen LPS von *E. coli*, *S. Typhimurium* und *P. aeruginosa* verglichen wurde, konnte keine unterschiedlich starke Inhibition der mLPLUNC1-induzierten Adhäsion beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

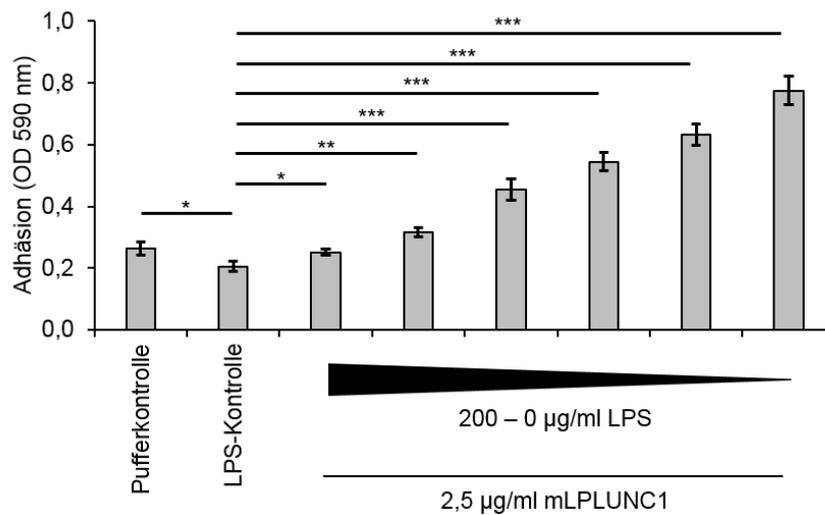


Abb. 4-7: LPS inhibiert die mLPLUNC1-induzierte Adhäsion von CFT073

E. coli des Stamms CFT073 wurden für 18 h in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 1,2 – 1,3 angezogen und in einer 96er Mikrotiterplatte im Verhältnis 1:1 mit 2,5 µg/ml mLPLUNC1-His sowie verschiedenen Konzentrationen *E. coli* LPS (200 µg/ml, 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 0 µg/ml) gemischt. Als Kontrollen dienten ein Ansatz mit PBS ohne LPS (Pufferkontrolle) und ein Ansatz mit 200 µg/ml LPS ohne Protein (LPS-Kontrolle). Die Platte wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde entfernt und die adhären Strukturen mit 1 % Kristallviolett angefärbt. Das gebundene Kristallviolett wurde in 100 % Ethanol gelöst. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte durch Messung der OD bei 590 nm. Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung (SD). Statistische Auswertung durch ungepaarten Student's-*t*-Test: $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

4.7 Die Adhäsion induzierende Domäne von mSPLUNC1 ist C-terminal lokalisiert

Zur weiteren Charakterisierung der PLUNC-Proteine wurde in dieser Arbeit versucht, die für die Induktion von Adhäsion verantwortliche Domäne der PLUNC-Proteine zu identifizieren. Zu diesem Zweck sollten verkürzte Varianten des mSPLUNC1 rekombinant in Insektenzellen hergestellt und im Kristallviolett-Adhäsionsassay auf ihre Fähigkeit, Adhäsion von *E. coli* zu induzieren, untersucht werden.

In anderen Studien wurde am N-Terminus von SPLUNC1 eine Domäne identifiziert, die den epithelialen Natriumkanal ENaC inhibiert (Hobbs et al. 2013). Aus diesem Grund wurde zunächst eine mSPLUNC1-Variante erzeugt, die N-terminal um 60 Aminosäuren verkürzt ist ($\Delta N60$). Dem Protein in voller Länge (vL) fehlen dagegen N-terminal 14 Aminosäuren, was dem internen Exportsignal entspricht. Eine schematische Darstellung

aller für diese Arbeit relevanten mSPLUNC1-His-Varianten findet sich im Anhang der Arbeit.

Im Kristallviolett-Adhäsionsassay zeigt mSPLUNC1 Δ N60 eine Induktion der Adhäsion von *E. coli* in ähnlicher Stärke wie mSPLUNC1 vL (Daten nicht gezeigt).

Im weiteren Verlauf wurde eine mSPLUNC1-His-Variante getestet, die N-terminal um 50 % verkürzt ist (mSPLUNC1 C-Terminus). Die N-terminale Hälfte von mSPLUNC1 ließ sich dagegen nicht in Insektenzellen exprimieren (Simon Peter 2014: Bachelorarbeit).

mSPLUNC1 C-Terminus ist in der Lage, Adhäsion von UPEC CFT073 zu induzieren (Abb. 4-8). Im Vergleich zu einer äquimolaren Menge mSPLUNC1 vL ist die durch mSPLUNC1 C-Terminus induzierte Adhäsion jedoch in einem Konzentrationsbereich von 50 – 400 nM signifikant reduziert. Bei einer Konzentration von 800 nM lässt sich zwischen mSPLUNC1 vL und C-Terminus kein Unterschied in der Stärke der induzierten Adhäsion feststellen (Abb. 4-8).

Diesem Ergebnis nach zu schließen, ist die für die Induktion von bakterieller Adhäsion verantwortliche Domäne von mSPLUNC1 in der C-terminalen Hälfte des Proteins lokalisiert.

Für eine weitere Eingrenzung wurden zwei weitere mSPLUNC1-His Expressionskonstrukte erzeugt, die jeweils eine Hälfte von mSPLUNC1 C-Terminus umfassen (CN-Terminus und CC-Terminus). Eine Produktion dieser Proteine war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. mSPLUNC1 CC-Terminus wird von den Insektenzellen nicht exprimiert. mSPLUNC1 CN-Terminus wird dagegen exprimiert, jedoch nicht wie vorgesehen von den Insektenzellen sezerniert (Daten nicht gezeigt). Eine genaue Eingrenzung der Adhäsion-induzierenden Domäne von mSPLUNC1 war daher nicht möglich.

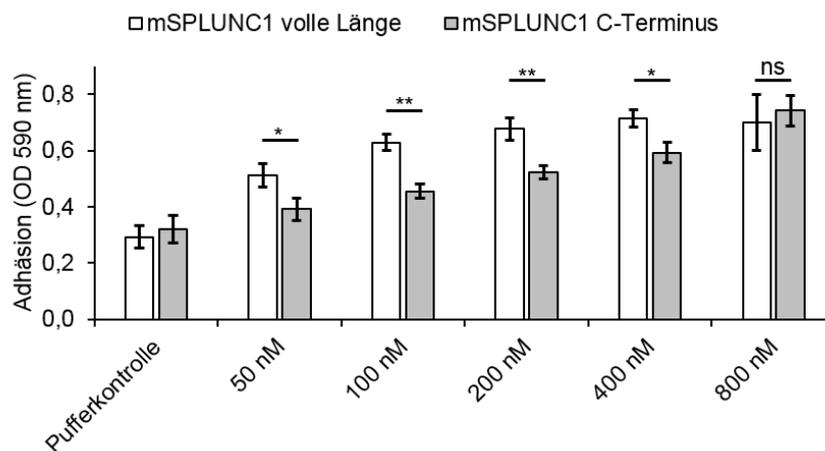


Abb. 4-8: Induktion der Adhäsion bei UPEC CFT073 durch den C-Terminus von mSPLUNC1

E. coli des Stamms CFT073 wurden für 18 h in LB- Medium bis zu einer optischen Dichte (OD) bei 600 nm von 1,0 angezogen und in einer 96er Mikrotiterplatte im Verhältnis 1:1 mit verschiedenen Konzentrationen (50, 100, 200, 400 und 800 nM) mSPLUNC1-His volle Länge (weiße Balken, 1 M = 31420 g/L) oder mSPLUNC1-His C-Terminus (graue Balken, 1 M = 18290 g/L) gemischt. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit PBS (Pufferkontrolle). Die Platte wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde entfernt und die adhärenen Strukturen mit 1 % Kristallviolett angefärbt. Das gebundene Kristallviolett wurde in 100 % Ethanol gelöst. Die Quantifizierung der Adhäsion erfolgte durch Messung der OD bei 590 nm. Angegeben ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichung (SD). Statistische Auswertung durch ungepaarten Student's-*t*-Test: $p > 0,05$ nicht signifikant (ns), $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **.

Teil 2:**Erzeugung und Charakterisierung eines monoklonalen α -mSPLUNC1-Antikörpers****4.8 Erzeugung eines monoklonalen α -mSPLUNC1-Antikörpers**

Zum Nachweis von murinem SPLUNC1 auf Proteinebene wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Ratten-Hybridomazelllinie generiert, die einen gegen SPLUNC1 gerichteten monoklonalen Antikörper (mAk) produziert.

Zu diesem Zweck wurden Lou/MWslHsd-Ratten dreimal mit je 50 μ g rekombinantem mSPLUNC1 aus Insektenzellen und dem DNA-Oligonukleotid CpG 1668 als Adjuvanz immunisiert. Mit der Immunisierung wurde bereits in der vorliegenden Arbeit vorausgehenden Masterarbeit begonnen (Torben Meyer 2011). Der α -mSPLUNC1-Antikörpertiter im Blut der Ratten wurde regelmäßig mittels eines indirekten mSPLUNC1-ELISAs getestet. Nach drei Immunisierungen wurden die Ratten nochmals mit mSPLUNC1 ohne Adjuvanz immunisiert. Zwei Tage später wurden die Tiere getötet und die Milzen entnommen.

Die isolierten Milzzellen eines Tieres wurden mit Ratten-Myelomazellen der Linie Y3-Ag 1.2.3 fusioniert und in zehn 96 well-Zellkulturplatten ausgesät. Die Überstände der heranwachsenden Zellen wurden im indirekten mSPLUNC1-ELISA auf die Produktion von α -mSPLUNC1 Antikörper getestet (Abb. 4-9). Dabei wurde als Antigen ein rekombinantes mSPLUNC1-Protein verwendet, welches in einem anderen Expressionssystem hergestellt wurde (mSPLUNC1-Flag aus HEK 293T-Zellen), als das zur Immunisierung verwendete mSPLUNC1-His. Dadurch werden nur Antikörper detektiert, die spezifisch gegen mSPLUNC1 gerichtet sind. Insgesamt wurden zehn Klone mit deutlicher Reaktivität gegen mSPLUNC1 identifiziert (Abb. 4-9).

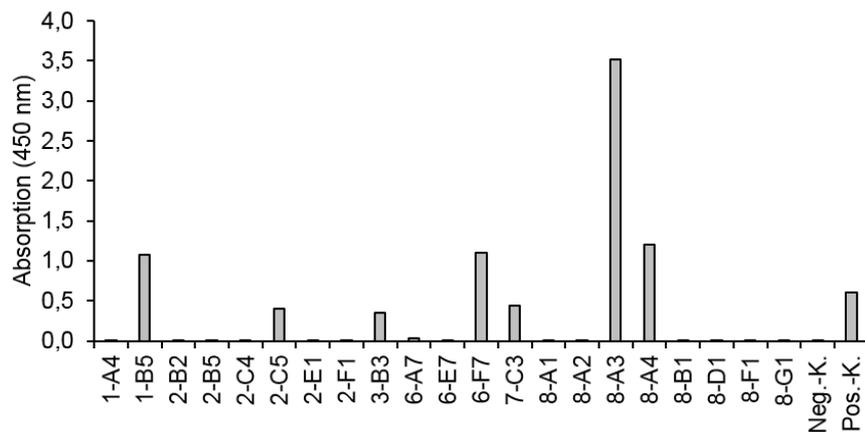


Abb. 4-9: Screening von Hybridoma-Klonen auf Produktion von α -mSPLUNC1-Antikörpern

Der Überstand von Hybridoma-Zellen wurde in einem indirekten ELISA auf α -mSPLUNC1 Antikörper getestet. Hierzu wurde 1 μ g/ml rekombinantes mSPLUNC1-Flag aus HEK 293T-Zellen an 96er Mikrotiterplatten gekoppelt. Die Platten wurden geblockt und mit unverdünntem Kulturüberstand inkubiert. Die Detektion der Antikörperbindung erfolgte über einen gegen Ratten-IgG gerichteten, Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper und anschließend dem Farbumschlag eines Peroxidasesubstrates. Ausgewertet wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 450 nm. Gezeigt ist eine Auswahl aus 960 getesteten wells. Auf der x-Achse sind die Namen der analysierten Hybridoma-Klone angegeben. Als Negativkontrolle (Neg.-K.) diente das Kulturmedium, als Positivkontrolle (Pos.-K.) Serum der für die Fusion verwendeten Ratte (Verdünnung 1:1000). Die Proben wurden in Einfachbestimmung gemessen.

Die positiven Klone wurden zweimal subkloniert, um die Etablierung monoklonaler Zelllinien sicherzustellen. Der Subklon 8-A3.3.3 zeigte die stärkste Reaktivität gegen mSPLUNC1 im ELISA und wurde daher für die weiteren Analysen ausgewählt (Daten nicht gezeigt).

Zur Produktion des α -mSPLUNC1 mAk wurden die 8-A3.3.3-Zellen an das serumfreie Medium Panserin 401 adaptiert. Der Hybridoma-Kulturüberstand konnte dann über eine Protein G-Säule in hoher Reinheit aufgereinigt werden (Abb. 4-10A).

Zur Bestimmung des Isotyps des von Klon 8-A3.3.3 produzierten Antikörpers wurde ein Teststreifen der Firma AbD serotec verwendet. Es handelt sich um einen IgG2c-Immunglobulin mit leichter kappa Kette (Abb. 4-10B).

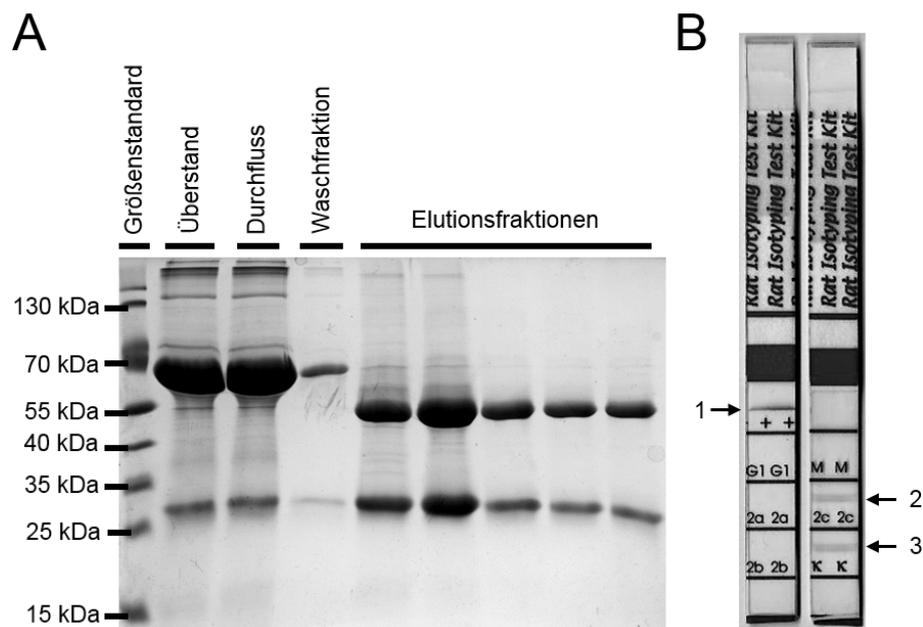


Abb. 4-10: Aufreinigung und Isotypisierung von α -mSPLUNC1 mAk (Klon 8-A3.3.3)

A: SDS-PAGE (12 %-Gel) mit anschließender kolloidaler Coomassie-Färbung zur Kontrolle der Reinheit des über eine Protein G-Säule aufgereinigten α -mSPLUNC1 mAk. Aufgetragen wurden 10 μ l Größensstandard sowie je 30 μ l des Überstands, des Durchflusses, der Waschfraktion und der fünf Elutionsfraktionen. Bande bei ca. 55 kDa: schwere Kette, Bande bei ca. 30 kDa: leichte Kette.

B: Bestimmung des Isotyps von α -mSPLUNC1 mAk (Klon 8-A3.3.3). Verwendet wurde ein Teststreifen der Firma AbD serotec nach Angaben des Herstellers. **1:** Positiv-Kontrollbande. **2:** Bande für Isotyp IgG2c. **3:** Bande für leichte kappa Kette.

4.9 α -mSPLUNC1 mAk 8-A3.3.3 erkennt ein N-terminales Epitop von mSPLUNC1

Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden verschiedene verkürzte Varianten des murinen SPLUNC1-His rekombinant in Insektenzellen exprimiert. Mit Hilfe dieser Proteine sollte die Bindedomäne des erzeugten α -mSPLUNC1 mAk eingegrenzt werden. Zu diesem Zweck wurde der Antikörper im Western Blot auf Reaktivität gegen mSPLUNC1 in voller Länge (vL), den mSPLUNC1 C-Terminus (C) und eine N-terminal um 60 Aminosäuren verkürzte Variante (Δ N60) getestet. mSPLUNC1 vL wird durch den monoklonalen Antikörper detektiert, nicht aber mSPLUNC1 C-Terminus und mSPLUNC1 Δ N60 (Abb. 4-11A). Der als Kontrolle eingesetzte α -His-Tag-Antikörper erkennt dagegen alle drei mSPLUNC1-Varianten.

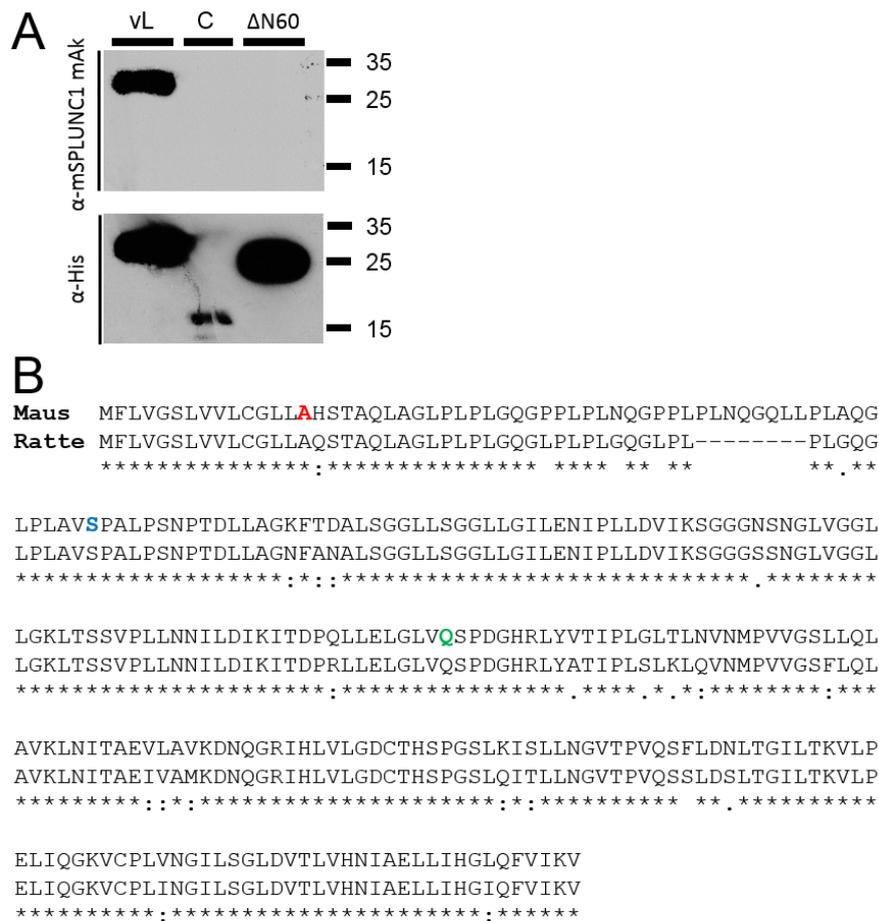


Abb. 4-11: Eingrenzung der Bindedomäne von α -mSPLUNC1 mAk (Klon 8-A3.3.3)

A: SDS-PAGE (15 %-Gel) mit anschließendem Western Blot. Es wurden je 100 ng rekombinantes Protein geladen: mSPLUNC1-His volle Länge (vL), mSPLUNC1-His C-Terminus (C) und mSPLUNC1-His Δ N60 (Δ N60). Der immunhistochemische Nachweis der Proteine erfolgte durch den α -mSPLUNC1 mAk 8-A3.3.3 (α -mSPLUNC1 mAk) bzw. einen α -His-Tag mAk (α -His) und einem entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundäntikörper. Die Signalentwicklung erfolgte durch Chemilumineszenz und die Detektion über einen Röntgenfilm (Entwicklermaschine: Optimax 2010, Protec).

B: Vergleich der SPLUNC1-Sequenzen von Maus und Ratte durch Clustal Omega (Fa. EMBL-EBI). Rot markiert ist jeweils die erste Aminosäure der rekombinanten mSPLUNC1-His Varianten volle Länge (rot), Δ N60 (blau) und C-Terminus (grün).

Dieses Ergebnis grenzt die Bindedomäne des α -mSPLUNC1 mAk 8-A3.3.3 auf einen 46 Aminosäuren umfassende Sequenz zwischen der jeweils ersten Aminosäure des volle Länge Proteins und der Δ N60-Variante ein. Ein Vergleich der Proteinsequenzen von SPLUNC1 in Maus und Ratte zeigt, dass das murine SPLUNC1 in diesem Bereich eine kurze Sequenz aus acht Aminosäuren aufweist, die dem SPLUNC1 der Ratte fehlt (Abb.

4-11B). Ansonsten zeigt der SPLUNC1 N-Terminus eine hohe Übereinstimmung zwischen Maus und Ratte. Dies lässt darauf schließen, dass das Epitop oder ein Teil des Epitops des α -mSPLUNC1 mAk 8-A3.3.3 im Bereich dieser acht Aminosäuren lokalisiert ist.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit sollte ein Sandwich-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) zur Detektion von murinem SPLUNC1 etabliert werden. Der α -mSPLUNC1 mAk 8-A3.3.3 wurde dabei als Beschichtungsantikörper verwendet.

4.10 Entwicklung eines Sandwich-ELISAs zur Detektion von mSPLUNC1

Für die Etablierung eines mSPLUNC1-ELISAs wurde zunächst in einem Kaninchen ein polyklonales α -mSPLUNC1-Antiserum erzeugt. Hierzu wurde ein Kaninchen dreimal im Abstand von vier Wochen subcutan mit je 50 μ g rekombinantem mSPLUNC1-His aus D.Mel.2-Zellen und dem DNA-Oligonukleotid CpG 1668 als Adjuvanz immunisiert. Zwei Tage vor der terminalen Serumentnahme erfolgte eine intravenöse Immunisierung mit 20 μ g mSPLUNC1-His ohne Adjuvanz.

Das Kaninchenserum wurde, wie zuvor für die Überstände von Hybridoma-Zellen beschrieben (siehe 4.8), in einem indirekten mSPLUNC1-ELISA auf die Produktion von α -mSPLUNC1 Antikörper getestet. Die Aufreinigung des Antiserums erfolgte in hoher Reinheit über eine Protein G-Säule (Daten nicht gezeigt).

Bei der Etablierung des ELISAs wurden die Konzentrationen und Inkubationszeiten der einzelnen, in Tabelle 4-3 aufgeführten, Komponenten variiert. Weiterhin wurden verschiedene Beschichtungspuffer getestet. Der hier dargestellte ELISA entspricht der besten Kombination, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurde und die als Ausgangspunkt für eine weitere Optimierung des ELISAs dienen kann (Tabelle 4-3, Abb. 4-12).

Als Referenzprotein für die Standardreihe des ELISAs wurde rekombinantes mSPLUNC1-Flag aus HEK 293T-Zellen in einer 1:1-Verdünnungsreihe von

20000 pg/ml bis 312,5 pg/ml verwendet (Abb. 4-12AB). Bis zu einer Konzentration von 312,5 pg/ml ist das Protein nachweisbar. Die logarithmisch dargestellte Standardkurve verläuft bis zu einer Konzentration von 500 pg/ml linear (Abb. 4-12A). Darunter liegende Konzentrationen werden nicht mehr genau angegeben.

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Sandwich-ELISA zum Nachweis von murinem SPLUNC1 ermöglicht demnach einen zuverlässigen Nachweis des Proteins bis zu einer Konzentration von 500 pg/ml.

Tabelle 4-3: Aufbau des mSPLUNC1-Sandwich-ELISAs

Bis zur Zugabe des Peroxidasesubstrats wurde zwischen den einzelnen Schritten die ELISA-Platte je dreimal mit PBS + 0,05 % Tween 20 gewaschen. Die Inkubationsschritte erfolgten sofern nicht anders angegeben bei Raumtemperatur.

Komponente	Konzentration / Puffer	Inkubation
<i>Beschichtungsantikörper:</i> Ratte α -mSPLUNC1 mAk 8-A3.3.3	2 μ g/ml in PBS, 50 μ l/well	4 °C, über Nacht
<i>Blockpuffer:</i> PBS + 1 % BSA	100 μ l/well	2,5 h
<i>Proben (Standardreihe):</i> mSPLUNC1-Flag	1:2 Verdünnungsreihe (20 – 0,3125 ng/ml), 50 μ l/well	2 h
<i>Detektionsantikörper 1:</i> Kaninchen α -mSPLUNC1, polyklonal	10 μ g/ml, 50 μ l/well	2 h
<i>Detektionsantikörper 2:</i> α -Kaninchen IgG, Peroxidase gekoppelt	160 ng/ml, 50 μ l/well	1 h
Peroxidasesubstrat	50 μ l/well	variabel
Phosphorsäure	1 M, 25 μ l/well	---

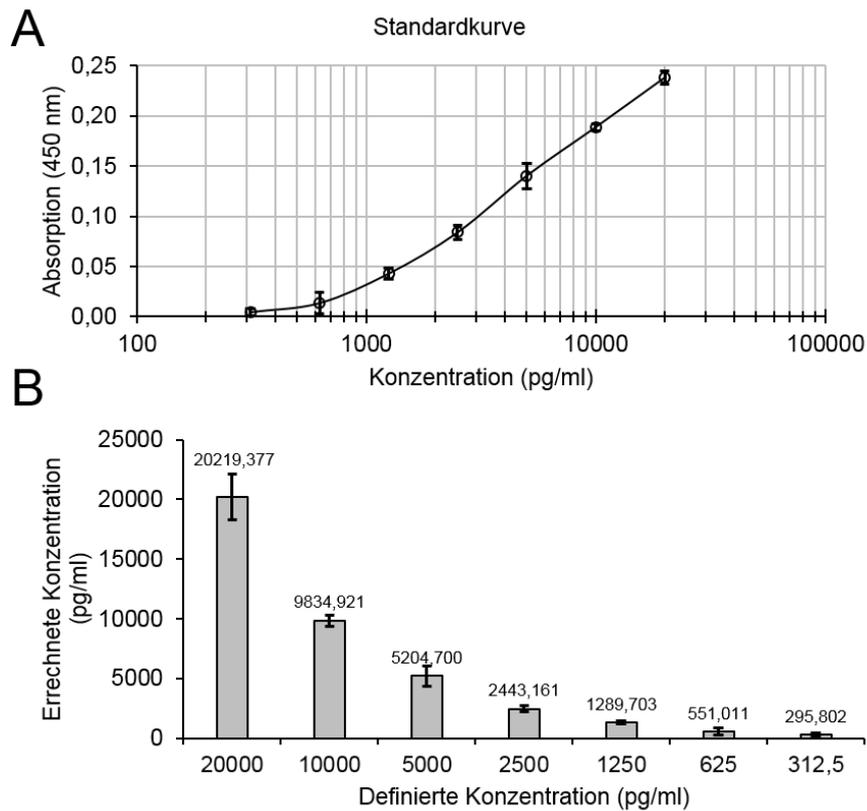


Abb. 4-12: Etablierung eines ELISAs zum Nachweis von mSPLUNC1

Eine ELISA-Platte (96 well) wurde über Nacht bei 4°C mit 2 µg/ml α-mSPLUNC1 mAk 8-A3.3.3 beschichtet (50 µl/well). Die Platte wurde für 2,5 h bei Raumtemperatur (RT) mit PBS + 1 % BSA geblockt. Als Proben wurden 50 µl/well rekombinantes mSPLUNC1-Flag in einer 1:2-Verdünnungsreihe von 20.000 pg/ml bis 312,5 pg/ml für 2 h bei RT in der Platte inkubiert (Dreifachbestimmung). Die Detektion der Proben erfolgte zunächst mit 10 µg/ml polyklonalem Kaninchen α-mSPLUNC1-Antiserum (50 µl/well, 2 h, RT). Anschließend wurde für 1 h bei RT mit 50 µl/well eines Peroxidase-gekoppeltem α-Kaninchen IgG-Antikörpers (160 ng/ml) inkubiert. Die Entwicklung des ELISAs erfolgte durch Farbentwicklung eines Peroxidasesubstrats (50 µl/well). Die Farbreaktion wurde mit 25 µl/well 1 M Phosphorsäure abgestoppt und anschließend durch photometrische Messung bei 450 nm ausgewertet.

A: Standardkurve des ELISAs mit logarithmisch skaliertem x-Achse. Gezeigt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung mit Standardabweichung (SD).

B: Aus der Standardkurve errechnete Konzentrationen der Proben im Verhältnis zu den definierten Konzentrationen. Gezeigt sind die Mittelwerte der Dreifachbestimmung mit Standardabweichung (SD).

5. Diskussion

5.1 mSPLUNC1 und mLPLUNC1 können Adhäsion von gramnegativen Bakterien sowohl induzieren als auch inhibieren

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine differentielle Wirkung von murinem SPLUNC1 und LPLUNC1 auf die Adhäsion verschiedener gramnegativer Bakterien. Zum einen induzieren diese Proteine Adhäsion bei *E. coli* und zwei der untersuchten *K. pneumoniae*-Isolate, zum anderen inhibieren sie die Adhäsion der übrigen *K. pneumoniae*-Isolate und *S. marcescens* (Tabelle 4-1, Abb. 4-1). In meiner vorausgehenden Masterarbeit wurde bereits eine Induktion der Adhäsion von *S. Typhimurium* durch mSPLUNC1 gezeigt und eine parallel zu der vorliegenden Arbeit in der AG Schnare durchgeführte Studie zeigte, dass es auch bei *Enterobacter cloacae* zu einer PLUNC-induzierten Adhäsion kommt (Torben Meyer 2011: Masterarbeit, Tina Bormann 2012: Bachelorarbeit).

Die Induktion von Adhäsion durch die PLUNC-Proteine wird bei *E. coli*, *S. Typhimurium*, *E. cloacae* und *K. pneumoniae* durch Mannose bzw. dem Mannosederivat MMP unterbunden (Abb. 4-3A, Torben Meyer 2011: Masterarbeit, Sarah Thomas 2013: Masterarbeit). Mannose und MMP sind spezifische Inhibitoren des Typ 1 Pili-Adhäsins FimH (Ofek et al. 1977). Durch die gezielte Deletion des für die Hauptstrukturkomponente der Typ 1 Pili kodierenden Gens *fimA* in *E. coli*, *S. Typhimurium* und *E. cloacae* wurde bestätigt, dass die PLUNC induzierte Adhäsion durch Typ Pili vermittelt wird (Abb. 4-3B, Torben Meyer 2011: Masterarbeit, Sarah Thomas 2013: Masterarbeit).

Eine Deletion von *csgD* in *S. Typhimurium* und *E. coli* hat dagegen keinen Einfluss auf die Induktion von Adhäsion durch mSPLUNC1 und mLPLUNC1 (Torben Meyer 2011: Masterarbeit, Daten nicht gezeigt). PLUNC-Proteine induzieren demnach keine klassischen Biofilme auf Basis von Curli und Zellulose, für die eine CsgD-Aktivität notwendig ist (Übersichtsartikel: Gerstel und Römling 2003).

Die Inhibition von Adhäsion durch mSPLUNC1 und mLPLUNC1 bei *K. pneumoniae* und *S. marcescens* wird nicht durch Zugabe von Mannose beeinflusst (Daten nicht

gezeigt). Dies spricht dafür, dass es sich bei den inhibierten Strukturen nicht um Typ 1 Pili handelt, was in Folgestudien durch eine gezielte Deletion von *fimA* in *K. pneumoniae* oder *S. marcescens* bestätigt werden muss.

Neben den Mannose-sensitiven Typ 1 Pili sind auch die Mannose-resistenten Typ 3 bzw. MR/K Pili sowie ein Homolog des durch das *ecp*-Operon kodierten *E. coli common pilus* (ECP) in *K. pneumoniae*-Isolaten weit verbreitet (Alcántar-Curiel et al. 2013). Bei den durch mSPLUNC1 und mLPLUNC1 inhibierten adhäsiven Strukturen könnte es sich demnach also um MR/K oder ECP Pili handeln. MR/K-Pili finden sich auch in *S. marcescens* (Adegbola und Old 1982). Eine Identifizierung der inhibierten Strukturen war aus zeitlichen Gründen im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht mehr möglich.

5.2 PLUNC-Proteine induzieren keine Synthese von Typ 1 Pilus-Untereinheiten

Das *fim*-Operon kodiert für alle Strukturproteine der Typ 1 Pili. Nach der Translation werden die einzelnen Pilus-Untereinheiten über den allgemeinen sekretorischen Transportweg (Sec-Transporter) aus dem Zytoplasma ins Periplasma transportiert, wo sie über den Chaperon-Usher-Mechanismus assembliert werden (Übersichtsartikel: Lillington et al. 2014, siehe auch Abb. 1-2).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Neusynthese von Typ 1 Pilus-Untereinheiten nach Kontakt mit mLPLUNC1 keine Voraussetzung für die Induktion von Adhäsion bei UPEC CFT073 ist (Abb. 4-4A). Dies legt nahe, dass die PLUNC-Proteine entweder den Transport der Untereinheiten ins Periplasma oder die Assemblierung der Pili induzieren.

Neben einer Induktion der Ausbildung von Typ 1 Pili ist auch denkbar, dass mSPLUNC1 und mLPLUNC1 die adhäsive Eigenschaft bereits ausgebildeter Typ 1 Pili verstärken. Dafür spricht, dass erste Versuche zur Quantifizierung von Typ 1 Pili auf der Oberfläche von Salmonellen mittels Durchflusszytometrie keinen Einfluss der PLUNC-Proteine auf die Pilus-Anzahl erkennen lassen (Dr. R. Gerlach, unveröffentlichte Daten). Eine Aktivitätsänderung der Typ 1 Pili durch mSPLUNC1 bzw. mLPLUNC1 ist z.B. durch eine direkte Interaktion der Proteine mit den Pili denkbar. Es wurde beschrieben,

dass der Pilus-Schaft einen Einfluss auf die Bindungsspezifität des Adhäsins FimH hat (Madison et al. 1994). Eine Bindung von PLUNC-Proteinen an den aus FimA-Untereinheiten aufgebauten Pilus-Schaft könnte also eine stärkere Adhäsion über FimH vermitteln. Eine direkte Interaktion von mSPLUNC1 mit FimH konnte in Co-Immunpräzipitationsstudien nicht gezeigt werden (Prof. R. Glockshuber, unveröffentlichte Daten). Um eine direkte Interaktion der PLUNC-Proteinen mit den Typ 1 Pili sicher ausschließen oder bestätigen zu können, müssen weitere Interaktionsstudien, auch mit anderen Pilus-Untereinheiten wie der Hauptstrukturkomponente FimA oder dem Membrananker FimD, durchgeführt werden.

5.3 PLUNC-induzierte Adhäsion in *S. Typhimurium* Transposon-Zufallsmutanten

Basierend auf den vorliegenden Daten kommt es nach Kontakt von *E. coli*, *S. Typhimurium* und *E. cloacae* mit mSPLUNC1 oder mLPLUNC1 zu einer Adhäsion der Bakterien über Typ 1 Pili (Abb. 4-3, Torben Meyer 2011: Masterarbeit, Sarah Thomas 2013: Masterarbeit). Um bakterielle Gene zu identifizieren, die an diesem Prozess beteiligt sind, wurde eine Sammlung von *S. Typhimurium*-Zufallsmutanten bezüglich ihrer Fähigkeit analysiert, auf die Anwesenheit der PLUNC-Proteine mit Adhäsion zu reagieren.

Im Rahmen dieser Studie wurden mehrere Klone gefunden, bei denen durch SPLUNC1 oder LPLUNC1 keine Adhäsion mehr induziert wird (Tabelle 4-2). Drei der als hoch interessant eingestuften Klone tragen die Transposon-Insertion in *dsbA*, *surA* und *bamB*. Auch eine gezielte Deletion von *dsbA* und *surA* in CFT073 führte zum Verlust von PLUNC-induzierter Adhäsion (Abb. 4-5).

Von diesen drei Genen ist bekannt, dass sie eine Funktion im Rahmen der Ausbildung von Typ 1 Pili besitzen. Die Peptidyl-Prolyl-Isomerase SurA und BamB, ein Bestandteil des BAM (*β-barrel assembly machinery*)-Komplexes, spielen eine zentrale Rolle bei der korrekten Insertion des Typ 1 Pilus Ushers FimD in die äußere Membran (Palomino et al. 2011). DsbA ist ein Chaperon, das die Ausbildung von Disulfidbrücken in Proteinen nach dem Transport ins Periplasma vermittelt (Übersichtsartikel: Yu und Kroll 1999).

Neue Erkenntnisse über die Wirkung von mSPLUNC1 und mLPLUNC1 liefern diese

drei Mutanten nicht. Die Identifizierung von *dsbA*, *surA* und *bamB* bestätigt jedoch, genau wie die *fimA*-Mutante (Tabelle 4-2), dass das Screening von Zufallsmutanten im Kristallviolett-Adhäsionstest geeignet ist, um Gene zu identifizieren, die an der Adhäsion über Typ 1 Pili beteiligt sind.

Eine wesentliche Schwäche des verwendeten Verfahrens ist allerdings, dass sich nicht unterscheiden lässt, ob identifizierte Gene für die Expression von Typ 1 Pili wichtig sind oder für die PLUNC-induzierte Adhäsion. Typ 1 Pili unterliegen einer komplexen Regulation an der viele Proteine beteiligt sind (Übersichtsartikel: Schwan 2011). Da die Synthese von Pilus-Untereinheiten und damit Proteinbiosynthese im allgemeinen keine Voraussetzung für PLUNC-induzierte Adhäsion ist, stellen Gene, die die Expression der Untereinheiten regulieren, keine interessanten Kandidaten dar, wenn es um die Identifizierung von Zielgenen für mSPLUNC1 und mLPLUNC1 geht (siehe auch 5.2). Denn wie zuvor erläutert, wirken die PLUNC-Proteine nicht auf die Synthese der Proteinuntereinheiten der Typ 1 Pili, sondern führen entweder zur Assemblierung der Untereinheiten oder zu einer Aktivitätsänderung bereits präformierter Typ 1 Pili.

Für zukünftige Untersuchungen sollte man solche, in der Signalkette vor den PLUNC-Proteinen wirkenden, Faktoren im Screening ausschließen können. Eine Möglichkeit hierfür wäre, die Zufallsmutagenese in Bakterien durchzuführen, in denen die Expression der Pilus-Untereinheiten über einen Reporter (z.B. Luziferase) kontrollierbar ist. Damit könnte man Bakterien-Klone ausschließen, bei denen durch die Mutation die transkriptionelle Regulation der Pilus-Untereinheiten getroffen wurde (Verlust der Reporteraktivität). Man würde also auf Klone testen, die keine PLUNC-induzierte Adhäsion mehr zeigen, aber noch eine normale Expression der Typ 1 Pili-Untereinheiten aufweisen.

5.4 Verlust des ArcAB-Zweikomponentensystems verhindert PLUNC-induzierte Adhäsion

Zwei weitere Mutanten, bei denen durch die PLUNC-Proteine keine Adhäsion induziert wird, tragen eine Transposon-Insertion in den Genen *arcA* und *arcB* (Tabelle 4-2). Der Transkriptionsregulator ArcA und die Sensorkinase ArcB bilden das ArcAB (*Anoxic redox control*)-Zweikomponentensystem (Übersichtsartikel: Gunsalus und Park 1994).

Nach meinem Kenntnisstand wurde bislang keine Funktion des ArcAB-Systems bei der Ausbildung von Typ 1 Pili beschrieben.

Die vollständige Deletion von *arcB* in *S. Typhimurium* führt zu einer stärkeren Reduktion der Adhäsionsinduktion als in der Mutante mit der Transposon-Insertion in *arcB* (Tabelle 2, Abb. 4-6A). Dieser Unterschied wäre dadurch erklärbar, dass in der Transposon-Mutante entweder die Regulation der *arcB*-Expression gestört ist oder ein unvollständiges Protein produziert wird, das noch eine eingeschränkte Funktionalität besitzt. Beide Mutanten (Transposon-vermittelt und gezielte Deletion) zeigen jedoch deutlich, dass ArcB eine zentrale Komponente der PLUNC-induzierten Adhäsion bei *S. Typhimurium* darstellt.

Die untersuchte *S. Typhimurium* Δ *arcA*-Deletionsmutante zeigt dagegen ein unerwartetes Ergebnis. Im Vergleich zum Wildtyp ist die Stärke der PLUNC-induzierten Adhäsion nicht signifikant verändert, während es in der entsprechenden Zufallsmutante zu einem vollständigen Verlust der Adhäsionsinduktion kommt (Tabelle 2, Abb. 4-6B). In der Promotorregion von *arcA* finden sich Promotor und offener Leserahemn von *yjjY*, ein Gen, das in *S. Typhimurium* und *E. coli* für ein kleines hypothetisches Protein mit 46 Aminosäuren kodieren könnte (ECOCYC-Datenbank: G7954). Die Transposon-Insertion könnte also nicht nur die Expression von *arcA*, sondern auch die von *yjjY* verhindern. Dafür spricht, dass eine gezielte Deletion von *yjjY* in *S. Typhimurium* zu einer reduzierten Induktion von Adhäsion durch die PLUNC-Proteine führt (Abb. 4-6B).

YjjY könnte also an der Ausbildung von Typ 1 Pili oder der Induktion der Pili-Ausbildung durch mSPLUNC1 und mLPLUNC1 beteiligt sein. Bevor diese Hypothese weiter untersucht werden kann, ist jedoch eine Charakterisierung von *yjjY* und seines Genprodukts notwendig.

Es stellt sich weiterhin die Frage, weshalb der Verlust von ArcB, aber nicht der von ArcA die PLUNC-induzierte Adhäsion verhindert. Es muss angenommen werden, dass die Sensor kinase ArcB in diesem Kontext nicht ArcA sondern ein anderes Signalprotein phosphoryliert. In einer anderen Studie konnte bereits für *E. coli* gezeigt werden, dass ArcB unabhängig von ArcA das Adapterprotein RssB aktivieren kann (Mika und Hengge 2005). RssB vermittelt die Degradation des für die allgemeine Stressantwort

wichtigen Sigma-Faktors 38 (RpoS) durch die Protease ClpXP (Muffler et al. 1996, Pratt und Silhavy 1996). Ein Verlust von RssB führt bei *E. coli* zu einem erhöhten RpoS-Level und dadurch zu einer verbesserten Stressresistenz (Fontaine et al. 2008). Gleichzeitig ist RpoS ein negativer Regulator der *fimB*- und damit der Typ 1 Pili-Expression (Dove et al. 1997). Da *S. Typhimurium* kein *fimB*-Gen besitzt, müsste untersucht werden, ob RpoS auch in diesen Bakterien die Expression von Typ 1 Pili inhibiert.

5.5 Inhibition PLUNC-induzierter Adhäsion durch freies LPS

Die mit den PLUNCs verwandten LT/LBP-Proteine BPI und LBP sind in der Lage, die LipidA-Komponente von LPS zu binden (Schumann et al. 1990, Marra et al. 1992). Dies legt nahe, dass auch die PLUNC-Proteine einen Teil ihrer Wirkung durch Bindung von LPS entfalten könnten. Bisherige *in vitro* Studien in denen die Bindung von SPLUNC1 an LPS untersucht wurden, lieferten gegensätzliche Ergebnisse (Campos et al. 2004, Ghafouri et al. 2004, Sayeed et al. 2013, Ning et al. 2014). Für LPLUNC1 existieren Daten, die eine Neutralisation von LPS vermuten lassen (Shin et al. 2011, Liao et al. 2014). Die Aufklärung der Struktur von humanem SPLUNC1 führte darüber hinaus zu der Erkenntnis, dass die bei BPI geöffnete Lipid-Bindetasche bei SPLUNC1 geschlossen ist (Ning et al. 2014). Dies würde eine Bindung von LPS in diese Tasche verhindern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nun, dass die Zugabe von LPS die durch mLPLUNC1 induzierte Adhäsion von *E. coli* CFT073 inhibiert (Abb. 4-7). In Anbetracht der von Ning et al. 2014 veröffentlichten Daten wurden die entsprechenden Adhäsionstests auch mit mSPLUNC1 durchgeführt. Auch hier zeigt sich eine Inhibition der PLUNC-induzierten Adhäsion in Anwesenheit von freiem LPS (Daten nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass sowohl mSPLUNC1 als auch mLPLUNC1 LPS binden.

Eine mögliche Erklärung für den Widerspruch zwischen den hier erzielten Ergebnissen und den publizierten Daten wäre eine unterschiedliche Wirkung von murinem und humanem SPLUNC1. In der Studie von Ning et al. wurde rekombinantes humanes SPLUNC1 verwendet, während in dieser Arbeit rekombinantes murines SPLUNC1

eingesetzt wurde. Denkbar wäre auch, dass sich die Lipid-Bindetasche von SPLUNC1 nur unter bestimmten Konditionen öffnet, die in dieser Arbeit vorlagen (Ning et al. 2014).

Die Bindung von freiem LPS durch mSPLUNC1 und mLPLUNC1 legt nahe, dass diese Proteine auch LPS auf der Oberfläche gramnegativer Bakterien binden können. In einer Studie zur bakteriostatischen Aktivität von SPLUNC1 gegen *P. aeruginosa* konnte bereits eine Bindung von SPLUNC1 an die Bakterienoberfläche beobachtet werden (Sayeed et al. 2013).

Eine Interaktion zwischen mLPLUNC1 oder mSPLUNC1 und den Bakterien über den möglichen PLUNC-Rezeptor LPS könnte der Auslöser für die Induktion von Adhäsion über Typ 1 Pili sein. Eine Signalweiterleitung wäre z.B. über eine Stressantwort denkbar. Dass eine chemische oder genetische Veränderung von LPS zur Induktion einer Stressantwort über den alternativen Sigma-Faktor E (RpoE) führt, ist bekannt (Tam and Missiakas 2005). Eine Überexpression von RpoE reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen herauf, darunter auch *surA* und *bamB* (Rhodius et al. 2006). Diese Gene spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Typ 1 Pili und die Insertion eines Transposons in *surA* oder *bamB* führt zu einer starken Reduktion PLUNC-induzierter Adhäsion (Tabelle 4-2, siehe auch 5.3).

Darüber hinaus führt die Überexpression von RpoE zu einer deutlich verringerten Expression von *ompX* (Rhodius et al. 2006). OmpX ist ein konserviertes Protein, das sich in vielen gramnegativen Bakterien findet, darunter in *E. coli*, *S. Typhimurium*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae* und *S. marcescens* (NCBI). OmpX ist ein Teil der äußeren Membran und kommt in adhätierenden Bakterien deutlich weniger vor als in planktonisch wachsenden Bakterien (Otto et al. 2001). Eine Deletion von *ompX* führt bei einem Typ 1 Pili-exprimierenden *E. coli*-Stamm zu einer verstärkten Adhäsion, bei einem Stamm der keine Typ 1 Pili exprimiert dagegen zu einer verringerten Adhäsion (Otto und Hermansson 2004). Eine verringerte *ompX*-Expression in Folge einer durch Bindung von PLUNC-Proteinen an LPS ausgelösten Stressantwort über RpoE könnte den gleichen Effekt haben. Dies würde die Induktion von Adhäsion über Typ 1 Pili durch mSPLUNC1 und mLPLUNC1 erklären.

Auch die Inhibition von Adhäsion durch die PLUNC-Proteine bei *K. pneumoniae* und *S. marcescens* lässt sich mit diesem Modell erklären, falls es sich um Isolate handelt, die

unter den Konditionen der Adhäsionstests keine Typ 1 Pili ausbilden. Dies könnte dann in Abwesenheit von OmpX zu einer verringerten Adhäsion führen (Otto und Hermansson 2004).

In Folgestudien muss PLUNC-induzierte Adhäsion in OmpX-defizienten Bakterien untersucht werden. Falls das hier beschriebene Modell zutrifft, sollte in einer *ompX*-Deletionsmutante die Adhäsion nicht durch mSPLUNC1 oder mLPLUNC1 beeinflusst werden.

5.6 Eingrenzung der Adhäsion-induzierenden Domäne von mSPLUNC1

Für BPI ist bekannt, dass sich bestimmte Funktionen auf klar definierte Domänen des Proteins projizieren lassen (Übersichtsartikel: Balakrishnan et al. 2012). Darüber hinaus konnte die Funktion von SPLUNC1, den epithelialen Natriumkanal ENaC zu inhibieren, auf eine kurze Aminosäuresequenz eingegrenzt werden (Hobbs et al. 2013). Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Induktion von Adhäsion ebenfalls durch eine bestimmte Domäne von mSPLUNC1 vermittelt wird oder ob hierfür das Protein in voller Länge notwendig ist.

Die Daten zeigen eindeutig, dass die C-terminale Hälfte des mSPLUNC1-Proteins ausreichend ist, um Adhäsion bei *E. coli* CFT073 zu induzieren (Abb. 4-8, Anhang). Eine weitere Eingrenzung der Adhäsion-induzierenden Domäne war jedoch nicht möglich, da sich die entsprechend verkürzten Proteinvarianten nicht in dem verwendeten System exprimieren ließen. Für Folgestudien sollte daher versucht werden, über gezielte Punktmutationen in der C-terminalen Hälfte des volle Länge Proteins eine nicht länger Adhäsion-induzierende mSPLUNC1-Variante zu erzeugen.

Geht man davon aus, dass eine Adhäsion-induzierende Domäne zwischen den verschiedenen PLUNC-Proteinen weitgehend konserviert ist, sollte sie bei mLPLUNC1 in der N-terminalen Hälfte lokalisiert sein, da SPLUNC1 homolog zum N-Terminus von LPLUNC1 bzw. BPI ist (Bingle und Craven 2002, Bingle et al 2004). Ein Vergleich der Sequenzen von mSPLUNC1 und mLPLUNC1 verdeutlicht diese Homologie (Abb. 4-13). Die rot hervorgehobene Sequenz des für die Induktion von Adhäsion ausreichenden mSPLUNC1 C-Terminus zeigt die wahrscheinliche Lokalisation der Adhäsion-induzierenden Domäne von mLPLUNC1 (Abb. 5-1). Dies ist ein weiterer

Hinweis auf eine Bindung an LPS als Ursache für die PLUNC-induzierte Adhäsion, da die LPS-bindende Domäne von BPI ebenfalls N-terminal lokalisiert ist (Gazzano-Santoro et al. 1992).

```

mLPLUNC1 MAGPWIITLLCGLLGATLVQANV-----YPPAVLNLGPEVI-----
mSPLUNC1 MFLVGSLLVLCGLLAHSTAQLAGLPLPLGQGPPLPLNQGPPLPLNQGQLLP
      *      :.:*****. : .*      ** ** * :

-----QKHLTQALKDHDATAIILQELPLLRAMQDKSGSIPI
LAQGLPLAVSPALPSNPTDLLAGKFTDALSGGLLSGGLLGILENIPLLDVIKSGGNSNG
      . * : .* . . * : : : * * : : : . * . * :

L-DSF-----VHTVLRYYIWMKVTSANILQLDVQPSTYDQELVVRIPLDMVAGLNTPLI
LVGGLLGKLTSSVPLLNNILDIKITDPQLLELGLVQSPDGHRLYVTIPLGLTLNVNMPVV
      :*. * : :*:*. : :*: * : * :.* * *** :. :* * :

KTIVEFQMSTEVQALIRVERSKSGPAHLNLSDCSSNESTLRRLSLLHKLSFVVNSLAKNVM
GSLQLAVKLNITAEVLAVKDNQGRHVLVLDGCTHSPGSLKISLLNGVTPV-QSFLDNLIT
      : : : : * : . : : : * ** * . * : . : * : : * * : : * :

NLLVPALPQIVKNHLCFVIQQAFDDMYEDFLRLTTAPIALSFGALEFGLLSPAIQDSNIL
GILTKVLPELIQGVCPVNGILSGLDVTLVHNIAE---LLIHGLQFVIKV-----
      :* . * : : : : : : : : : : * . * : * :

LNLKAKLLDSQARVTNWFNNSATSLMETTPDRAPFSLTVRQDLVNAIVTTLVPKEELVIL
-----

LRFVIPDVARQLQMDIKEINAEAAANKLGPTQMLKIFTHSTPHIVLNEGSARAAQSVVLEV
-----

FPTNTDVRPFSLGIEASYEAQFFTEDNRLMLNFNNVSIERIKLMISDIKLFDPVVKDT
-----

LTKILEYTLNPNENGLRTPVPMMSKALGYEKAMWSVSKGALKLTPASS
-----

```

Abb. 5-1: Vergleich der Sequenzen von mLPLUNC1 und mSPLUNC1

Vergleich der Aminosäuresequenzen von mLPLUNC1 und mSPLUNC1 durch Clustal Omega (EMBL-EBI). Rot markiert ist die Sequenz der C-terminalen mSPLUNC1-Variante (mSPLUNC1 C-Terminus). Die blaue Markierung zeigt das hypothetische Bindungsmotiv des monoklonalen α -mSPLUNC1-Antikörpers.

5.7 Biologische Bedeutung PLUNC-induzierter Adhäsion

Die Ergebnisse dieser Arbeit werfen die Frage auf, welche biologische Funktion die Induktion von Adhäsion über Typ 1 Pili durch mLPLUNC1 und mSPLUNC1 bei *E. coli*, *S. Typhimurium* und *E. cloacae* hat. Adhäsive Strukturen sind oft wichtige

Virulenzfaktoren, z.B. bei Harnwegsinfektionen (Connell et al. 1996, Übersichtsartikel: Bien et al. 2012). So vermitteln die Typ 1 Pili von UPEC nicht nur die Adhäsion an Blasenepithelzellen und die Invasion dieser Zellen, sondern sind auch an der Bildung von *intracellular bacterial communities* (IBCs) beteiligt (Martinez et al. 2000, Wright et al. 2007). Bei diesen Strukturen handelt es sich um eine intrazelluläre, Biofilm-ähnliche Wachstumsform der UPEC, die z.B. mit chronischer Zystitis assoziiert ist (Anderson et al. 2003, Schwartz et al. 2011).

Diese Bedeutung der Typ 1 Pili für den Infektionsverlauf macht sie zu einem Ziel für die Entwicklung neuer Therapieansätze. Gegen Typ 1 Pili gerichtete Medikamente sind meist Inhibitoren der Pilus-Synthese, so genannte Pilicide oder FimH-Antagonisten (Übersichtsartikel: Aberg und Almqvist 2007, Touaibia und Roy 2007).

Eine verstärkte Adhäsion über Typ 1 Pili, wie sie durch mSPLUNC1 und mLPLUNC1 induziert wird, scheint also einen Vorteil für die Bakterien darzustellen. Die PLUNC-Proteine dagegen sind antimikrobielle Proteine, die zur Abwehr gramnegativer Bakterien beitragen (Chu et al. 2007, Zhou et al. 2008, McGillivray und Bakaletz 2010, Lukinskiene et al. 2011, Gally et al. 2011). Es wäre daher denkbar, dass einige Bakterien auf die Anwesenheit von mSPLUNC1 und mLPLUNC1 im Rahmen einer Stressantwort mit verstärkter Adhäsion reagieren, um sich der antimikrobiellen Wirkung zu entziehen. Damit würde die Wirkung eines möglichen antimikrobiellen Faktors zur Aktivierung eines Evasionsmechanismus der Bakterien führen.

Alternativ könnte eine verstärkte Ausbildung von Typ 1 Pili auf der Bakterienoberfläche auch eine proinflammatorische Wirkung haben. Das Ahäsin der Typ 1 Pili, FimH, ist ein ein Ligand für den Toll-like Rezeptor 4 (TLR 4), der unabhängig von MD-2 und CD14 eine Immunantwort über MyD88 stimuliert (Mossman et al. 2008). Eine Folge dieser Stimulation ist die Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen, Mian et al. 2010). Die PLUNC-Proteine könnten also durch eine Verstärkung des immunstimulatorischen Potenzials bestimmter Bakterien zu einer schnelleren Eradikation führen.

Zur Überprüfung dieser Hypothesen müssen die hier gewonnenen Erkenntnisse auf Zellkulturmodelle übertragen werden. Erste Adhäsionstests auf zellulären Oberflächen sowie Stimulationsexperimente mit humanen PMBCs zeigten bis jetzt leider keine klaren Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

5.8 Erzeugung und Charakterisierung von α -mSPLUNC1-Antikörpern

Zum besseren Verständnis der Wirkung und Regulation der PLUNC-Proteine benötigt man Antikörper, die einen Nachweis und möglicherweise auch eine Quantifizierung der Proteine erlauben. Deshalb wurde im Verlauf dieser Arbeit ein gegen murines SPLUNC1 gerichteter monoklonaler Antikörper generiert. Dieser aus Rattenhybridomazellen erzeugte α -mSPLUNC1-Antikörper 8-A3.3.3 erkennt ein Epitop im N-terminalen Bereich des Proteins (Abb. 4-11A). Ein Vergleich der SPLUNC1-Sequenzen von Maus (rekombinantes Protein) und Ratte (Wirt für die Immunisierung) in dem fraglichen Bereich über die Online-Plattform Clustal Omega (EMBL-EBI) zeigt, dass sich die Aminosäuresequenz PLNQGQLL nur im murinen Protein findet (Abb. 4-11B). Da sich ansonsten kaum Unterschiede zwischen den Sequenzen detektieren lassen, ist es sehr wahrscheinlich, dass das von 8-A3.3.3 erkannte Epitop in diesem acht Aminosäuren langen Bereich lokalisiert ist.

Ein weiterer Vergleich mit den SPLUNC1-Sequenzen von Chinchilla, Mensch, Schwein und Rind ergibt, dass die PLNQGQLL-Sequenz bei keinem dieser Tiere zu finden ist (Clustal Omega, Daten nicht gezeigt). Eine Kreuzreaktivität des monoklonalen α -mSPLUNC1 Antikörpers mit den SPLUNC1-Proteinen anderer Spezies ist daher unwahrscheinlich. Auch mLPLUNC1 besitzt die PLNQGQLL-Sequenz nicht, so dass es auch hier zu keiner Kreuzreaktion kommen sollte (Abb. 5-1, blau markierte Sequenz). Eine Testung dieser Vermutung steht noch aus.

Der α -mSPLUNC1-Antikörper 8-A3.3.3 erkennt nicht denaturiertes mSPLUNC1 bis zu einer Konzentration von 500 pg/ml im Sandwich-ELISA in Kombination mit einem polyklonalen Kaninchen α -mSPLUNC1-Antiserum als Detektionsantikörper (Abb. 4-12). 8-A3.3.3 zeigt auch Aktivität gegen denaturiertes Protein im Western Blot, diese ist jedoch deutlich geringer als die des polyklonalen Kaninchen α -mSPLUNC1-Antiserums (Daten nicht gezeigt). Ein Test des monoklonalen Antikörpers und des Antiserums im immunhistochemischen Nachweis von mSPLUNC1 in Präparaten für die Mikroskopie konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

Ein ELISA zum Nachweis von mSPLUNC1 ist mittlerweile auch kommerziell erhältlich. Der angegebene Detektionsbereich liegt bei 0,156 – 10 ng/ml. Auch ELISAs zum Nachweis von SPLUNC1 anderer Spezies sind kommerziell erhältlich (antikörper-online.de, Hersteller: USCN Life Science, Wuhan, CN). Publikationen, die diese Angabe bestätigen, konnten leider nicht gefunden werden.

Darüber hinaus ist ein direkter ELISA zum Nachweis von humanem SPLUNC1 publiziert (Chu et al. 2007). In verschiedenen Studien wurde mit diesem direkten ELISA die SPLUNC1-Konzentration in den Überständen humaner bronchialer Epithelzellen gemessen (Chu et al. 2007, Chu et al. 2010, Gross et al. 2010, Jiang et al. 2013). Die dabei gemessenen Konzentrationen liegen in einem Bereich von > 1µg/ml. Geht man davon aus, dass die SPLUNC1-Konzentrationen bei Mäusen ähnlich ist, sollte der hier beschriebene Sandwich-ELISA mit seiner Sensitivität bis 500 pg/ml ausreichend sein, um endogenes SPLUNC1 im murinem System nachzuweisen.

Das polyklonale Kaninchen α -mSPLUNC1-Antiserum wurde für die Anwendungen dieser Arbeit über eine Protein G-Säule aufgereinigt, es wurden also lediglich Proteine entfernt, die keine Immunglobuline sind. Demnach enthält das Serum nicht nur Antikörper gegen mSPLUNC1 sondern auch gegen den V5-His-Tag des zur Immunisierung der Kaninchen verwendeten rekombinanten Proteins sowie möglicherweise Antikörper gegen weitere Proteine. Durch eine weitere Aufreinigung, z.B. mittels Affinitätschromatographie, ließe sich die Spezifität des Antiserums und dadurch eventuell die Sensitivität des mSPLUNC1 Sandwich-ELISAs erhöhen.

Bei der Detektion von SPLUNC1 in murinen Proben mit 8-A3.3.3 muss in Betracht gezogen werden, dass *in vivo* möglicherweise prozessierte Formen von SPLUNC1 vorliegen. Solche verkürzten SPLUNC1-Varianten wurden bereits für humanes SPLUNC1 beschrieben (Ghafouri et al. 2004, Fornander et al. 2011). Fehlt in diesen Varianten die PLNQGQLL-Sequenz, werden sie von 8-A3.3.3 nicht erkannt. Diese möglichen SPLUNC1-Varianten könnten jedoch mit dem polyklonalen Antiserum nachgewiesen werden.

Zusammenfassung

Die überwiegend in den Atemwegen und im Nasenrachenraum exprimierten PLUNCs (*palate, lung and nasal epithelium clone*) gehören zur Familie der LT (*lipid transfer*)/LBP (*Lipopolysaccharide binding protein*)-Proteine und werden in *long* (L)- und *short* (S)-PLUNCs (LPLUNC bzw. SPLUNC) unterteilt (Bingle und Craven 2002, Bingle et al. 2004). SPLUNC1 und LPLUNC1 sind die beiden einzigen Mitglieder der PLUNC-Proteinfamilie, die in den oberen Atemwegen (Trachea und Bronchien) exprimiert sind (Bingle und Bingle 2000, Bingle et al. 2010). In dieser Arbeit wurde der Einfluss dieser beiden Proteine auf die Adhäsion verschiedener gramnegativer Bakterien untersucht. Hierzu wurden rekombinant in Insektenzellen exprimiertes murines SPLUNC1 und LPLUNC1 in einem Kristallviolett-Adhäsionstest eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass die getesteten PLUNC-Proteine bei den meisten *Klebsiella pneumoniae*-Isolaten sowie bei *Serratia marcescens* Adhäsion inhibieren. Bei *Salmonella* Typhimurium und *Escherichia coli* kommt es dagegen in Anwesenheit von mSPLUNC1 oder mLPLUNC1 zu einer Induktion von Adhäsion über Typ 1 Pili. Ein möglicher Rezeptor für die PLUNC-Proteine auf der Oberfläche der Bakterien ist LPS, da eine Zugabe von exogenem LPS im Adhäsionstest die Induktion von Adhäsion inhibiert. Weiterhin wurde durch Verwendung verkürzter Proteinvarianten gezeigt, dass die Adhäsion-induzierende Domäne von mSPLUNC1 am C-Terminus des Proteins lokalisiert ist.

Zur Identifikation von bakteriellen Genen, die an der Induktion von Adhäsion durch die PLUNC-Proteine beteiligt sind, wurde eine Sammlung von *S. Typhimurium*-Zufallsmutanten im Kristallviolett-Adhäsionstest analysiert. Die Ergebnisse dieses Screenings sprechen für eine wichtige Rolle der Sensorkinase ArcB bei der Ausbildung von Typ 1 Pili.

Um in zukünftigen Studien mSPLUNC1 auf Proteinebene zu detektieren und zu quantifizieren, wurden ein monoklonaler α -mSPLUNC1-Antikörper und ein polyklonales α -mSPLUNC1-Antiserum erzeugt. Auf Grundlage dieser beiden Antikörper wurde dann ein Sandwich-ELISA etabliert, der eine Quantifizierung von mSPLUNC1 bis zu einer Nachweisgrenze von 500 pg/ml ermöglicht.

Summary

The PLUNC (palate, lung and nasal epithelium clone)-proteins are primarily expressed in the airways and the nasopharynx. They belong to the LT (lipid transfer)/LBP (Lipopolysaccharide binding protein)-protein family and are subdivided into long (L)- and short (S)-PLUNCs (Bingle and Craven 2002, Bingle et al. 2004). SPLUNC1 and LPLUNC1 are the only members of the PLUNC-protein family which are expressed in the upper airways (trachea and bronchia, Bingle und Bingle 2000, Bingle et al. 2010). In this study the influence of these two proteins on the adhesion of different gram-negative bacteria was investigated. For this reason, recombinant murine SPLUNC1 and LPLUNC1 from insect cells was used in a crystal violet-adhesion assay.

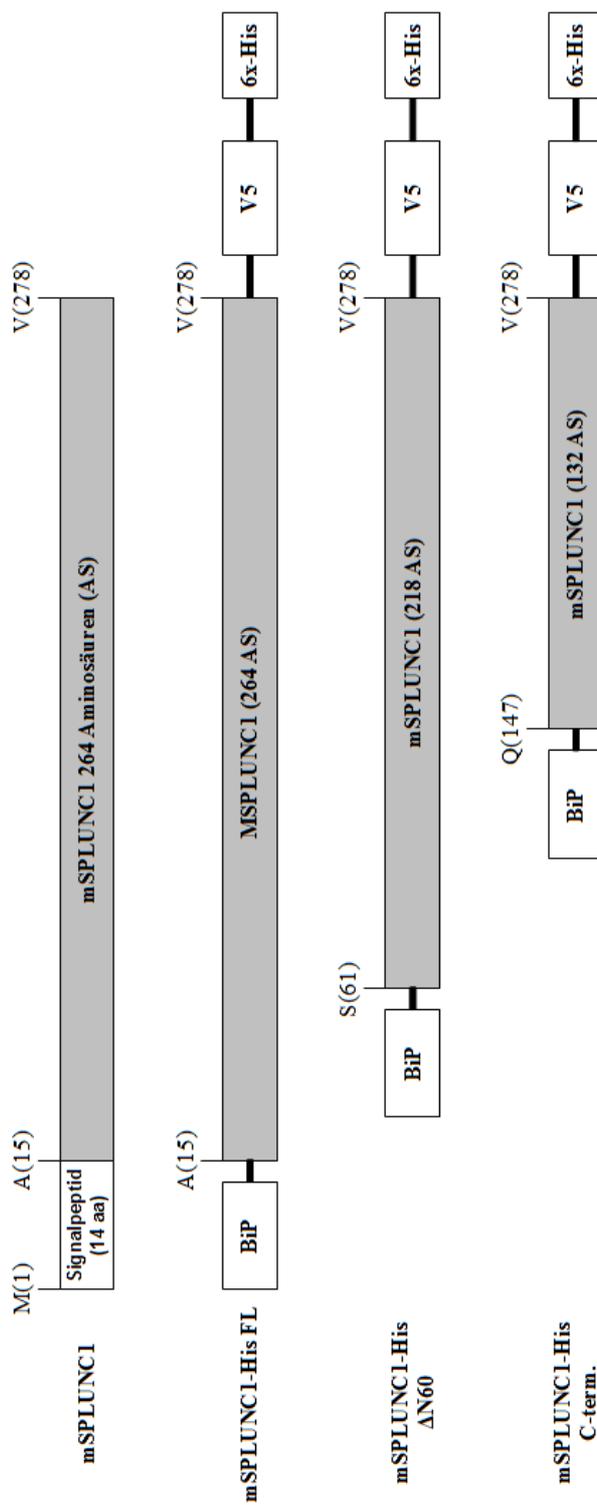
It was shown that the tested PLUNC-proteins inhibit adhesion of most *Klebsiella pneumoniae*-isolates and of *Serratia marcescens*. In *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli*, however, adhesion by type 1 pili was induced in the presence of mSPLUNC1 or mLPLUNC1. A possible receptor for PLUNC-proteins on the bacterial surface is LPS, as addition of exogenous LPS inhibits induction of adhesion in the adhesion assays. By the use of truncated variants of SPLUNC1 it was shown that the adhesion inducing domain is located at the protein's C-terminus.

To identify genes involved in the PLUNC-induced adhesion a collection of random *S. Typhimurium* mutants was analyzed in the context of a crystal violet-adhesion assay. The results of this screening indicate an important role of the sensor kinase ArcB in the formation of type 1 pili.

To detect and quantify mSPLUNC1 in following studies a monoclonal α -mSPLUNC1-antibody and a polyclonal α -mSPLUNC1-antiserum were generated. Based on these two antibodies a Sandwich-ELISA was established that allows quantification of mSPLUNC1 with a detection limit of 500 pg/ml.

Anhang

Übersicht über die in den Adhäsionsassays dieser Arbeit verwendeten rekombinanten mSPLUNC1-His-Varianten.



Literaturverzeichnis

- Aberg V, Almqvist F (2007):** Pilicides-small molecules targeting bacterial virulence. *Organic & biomolecular chemistry* 5 (12), 1827–1834.
- Abraham JM, Freitag CS, Clements JR, Eisenstein BI (1985):** An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (17), 5724–5727.
- Adegbola RA, Old DC (1982):** New fimbrial hemagglutinin in *Serratia* species. *Infection and immunity* 38 (1), 306–315.
- Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z, Gayosso-Vázquez C, Iovine NM, De la Cruz MA, Girón JA (2013):** Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence* 4 (2), 129–138.
- Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ (2003):** Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science (New York, N.Y.)* 301 (5629), 105–107.
- Balakrishnan A, Marathe SA, Joglekar M, Chakravorty D (2013):** Bactericidal/permeability increasing protein: a multifaceted protein with functions beyond LPS neutralization. *Innate immunity* 19 (4), 339–347.
- Barnhart MM, Pinkner JS, Soto GE, Sauer FG, Langermann S, Waksman G, Frieden C, Hultgren SJ (2000):** PapD-like chaperones provide the missing information for folding of pilin proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (14), 7709–7714.
- Bien J, Sokolova O, Bozko P (2012):** Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *International journal of nephrology* 2012, 681473.
- Bingle CD, Bingle L (2000):** Characterisation of the human plunc gene, a gene product with an upper airways and nasopharyngeal restricted expression pattern. *Biochimica et biophysica acta* 1493 (3), 363–367.

- Bingle CD, Craven CJ (2002):** PLUNC: a novel family of candidate host defence proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Human molecular genetics* 11 (8), 937–943.
- Bingle CD, LeClair EE, Havard S, Bingle L, Gillingham P, Craven CJ (2004):** Phylogenetic and evolutionary analysis of the PLUNC gene family. *Protein science : a publication of the Protein Society* 13 (2), 422–430.
- Bingle CD, Seal RL, Craven CJ (2011):** Systematic nomenclature for the PLUNC/PSP/BSP30/SMGB proteins as a subfamily of the BPI fold-containing superfamily. *Biochemical Society transactions* 39 (4), 977–983.
- Bingle CD, Wilson K, Lunn H, Barnes FA, High AS, Wallace WA, Rassl D, Campos MA, Ribeiro M, Bingle L (2010):** Human LPLUNC1 is a secreted product of goblet cells and minor glands of the respiratory and upper aerodigestive tracts. *Histochemistry and cell biology* 133 (5), 505–515.
- Bingle L, Barnes FA, Cross SS, Rassl D, Wallace WA, Campos MA, Bingle CD (2007):** Differential epithelial expression of the putative innate immune molecule SPLUNC1 in cystic fibrosis. *Respiratory research* 8, 79.
- Bingle L, Wilson K, Musa M, Araujo B, Rassl D, Wallace WA, LeClair EE, Mauad T, Zhou Z, Mall MA, Bingle CD (2012):** BPIFB1 (LPLUNC1) is upregulated in cystic fibrosis lung disease. *Histochemistry and cell biology* 138 (5), 749–758.
- Bormann T (2012):** Stabile Expression von rekombinantem murinem LBP und Untersuchungen zur antimikrobiellen Aktivität von mLBP und mLPLUNC1. Bachelorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Bormann T (2014):** Expression und Funktion von long palate, lung and nasal epithelium clone 1 (LPLUNC1). Masterarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Boyd EF, Hartl DL (1999):** Analysis of the type 1 pilin gene cluster fim in Salmonella: its distinct evolutionary histories in the 5' and 3' regions. *Journal of bacteriology* 181 (4), 1301–1308.
- Britto CJ, Cohn L (2014):** BPIFA1 (SPLUNC1) in Airway Host Protection and Respiratory Disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*.
- Brogden KA (2005):** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews. Microbiology* 3 (3), 238–250.

- Campos MA, Abreu AR, Nlend MC, Cobas MA, Conner GE, Whitney PL (2004):** Purification and characterization of PLUNC from human tracheobronchial secretions. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 30 (2), 184–192.
- Chang AC, Cohen SN (1978):** Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *Journal of bacteriology* 134 (3), 1141–1156.
- Cherepanov PP, Wackernagel W (1995):** Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158 (1), 9–14.
- Choudhury D, Thompson A, Stojanoff V, Langermann S, Pinkner J, Hultgren SJ, Knight SD (1999):** X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)* 285 (5430), 1061–1066.
- Chu HW, Gally F, Thaikootathil J, Janssen-Heininger YM, Wu Q, Zhang G, Reisdorph N, Case S, Minor M, Smith S, Di Jiang, Michels N, Simon G, Martin RJ (2010):** SPLUNC1 regulation in airway epithelial cells: role of Toll-like receptor 2 signaling. *Respiratory research* 11, 155.
- Chu HW, Thaikootathil J, Rino JG, Zhang G, Wu Q, Moss T, Refaeli Y, Bowler R, Wenzel SE, Chen Z, Zdunek J, Breed R, Young R, Allaire E, Martin RJ (2007):** Function and regulation of SPLUNC1 protein in *Mycoplasma* infection and allergic inflammation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (6), 3995–4002.
- Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Mårild S, Svanborg C (1996):** Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (18), 9827–9832.
- Datsenko KA, Wanner BL (2000):** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12), 6640–6645.
- Di Y, Harper R, Zhao Y, Pahlavan N, Finkbeiner W, Wu R (2003):** Molecular cloning and characterization of spurt, a human novel gene that is retinoic acid-

inducible and encodes a secretory protein specific in upper respiratory tracts. The Journal of biological chemistry 278 (2), 1165–1173.

Dove SL, Smith SG, Dorman CJ (1997): Control of Escherichia coli type 1 fimbrial gene expression in stationary phase: a negative role for RpoS. Molecular & general genetics : MGG 254 (1), 13–20.

Elsbach P, Weiss J, Franson RC, Beckerdite-Quagliata S, Schneider A, Harris L (1979): Separation and purification of a potent bactericidal/permeability-increasing protein and a closely associated phospholipase A2 from rabbit polymorphonuclear leukocytes. Observations on their relationship. The Journal of biological chemistry 254 (21), 11000–11009.

Fontaine F, Stewart EJ, Lindner AB, Taddei F (2008): Mutations in two global regulators lower individual mortality in Escherichia coli. Molecular microbiology 67 (1), 2–14.

Fornander L, Ghafouri B, Kihlström E, Akerlind B, Schön T, Tagesson C, Lindahl M (2011): Innate immunity proteins and a new truncated form of SPLUNC1 in nasopharyngeal aspirates from infants with respiratory syncytial virus infection. Proteomics. Clinical applications 5 (9-10), 513–522.

Gakhar L, Bartlett JA, Penterman J, Mizrahi D, Singh PK, Mallampalli RK, Ramaswamy S, McCray PB (2010): PLUNC is a novel airway surfactant protein with anti-biofilm activity. PloS one 5 (2), e9098.

Galfrè G, Milstein C, Wright B (1979): Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG. Nature 277 (5692), 131–133.

Gally DL, Leathart J, Blomfield IC (1996): Interaction of FimB and FimE with the fim switch that controls the phase variation of type 1 fimbriae in Escherichia coli K-12. Molecular microbiology 21 (4), 725–738.

Gally F, Di YP, Smith SK, Minor MN, Liu Y, Bratton DL, Frasch SC, Michels NM, Case SR, Chu HW (2011): SPLUNC1 promotes lung innate defense against Mycoplasma pneumoniae infection in mice. The American journal of pathology 178 (5), 2159–2167.

Garcia-Caballero A, Rasmussen JE, Gaillard E, Watson MJ, Olsen JC, Donaldson SH, Stutts MJ, Tarran R (2009): SPLUNC1 regulates airway surface liquid

volume by protecting ENaC from proteolytic cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (27), 11412–11417.

Gazzano-Santoro H, Parent JB, Grinna L, Horwitz A, Parsons T, Theofan G, Elsbach P, Weiss J, Conlon PJ (1992): High-affinity binding of the bactericidal/permeability-increasing protein and a recombinant amino-terminal fragment to the lipid A region of lipopolysaccharide. *Infection and immunity* 60 (11), 4754–4761.

Gerstel U, Römling U (2003): The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Research in microbiology* 154 (10), 659–667.

Ghafouri B, Kihlström E, Tagesson C, Lindahl M (2004): PLUNC in human nasal lavage fluid: multiple isoforms that bind to lipopolysaccharide. *Biochimica et biophysica acta* 1699 (1-2), 57–63.

Gross CA, Bowler RP, Green RM, Weinberger AR, Schnell C, Chu HW (2010): beta2-agonists promote host defense against bacterial infection in primary human bronchial epithelial cells. *BMC pulmonary medicine* 10, 30.

Gunsalus RP, Park SJ (1994): Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons. *Research in microbiology* 145 (5-6), 437–450.

Hanson MS, Brinton CC (1988): Identification and characterization of *E. coli* type-1 pilus tip adhesion protein. *Nature* 332 (6161), 265–268.

Hobbs CA, Blanchard MG, Alijevic O, Tan CD, Kellenberger S, Bencharit S, Cao R, Kesimer M, Walton WG, Henderson AG, Redinbo MR, Stutts MJ, Tarran R (2013): Identification of the SPLUNC1 ENaC-inhibitory domain yields novel strategies to treat sodium hyperabsorption in cystic fibrosis airway epithelial cultures. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 305 (12), L990-L1001.

Iovine NM, Elsbach P, Weiss J (1997): An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (20), 10973–10978.

- Jiang D, Wenzel SE, Wu Q, Bowler RP, Schnell C, Chu HW (2013):** Human neutrophil elastase degrades SPLUNC1 and impairs airway epithelial defense against bacteria. *PLoS one* 8 (5), e64689.
- Jones CH, Pinkner JS, Nicholes AV, Slonim LN, Abraham SN, Hultgren SJ (1993):** FimC is a periplasmic PapD-like chaperone that directs assembly of type 1 pili in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (18), 8397–8401.
- Jones CH, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Nicholes AV, Abraham SN, Hultgren SJ (1995):** FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (6), 2081–2085.
- Kirschning CJ, Au-Young J, Lamping N, Reuter D, Pfeil D, Seilhamer JJ, Schumann RR (1997):** Similar organization of the lipopolysaccharide-binding protein (LBP) and phospholipid transfer protein (PLTP) genes suggests a common gene family of lipid-binding proteins. *Genomics* 46 (3), 416–425.
- Klemm P (1984):** The fimA gene encoding the type-1 fimbrial subunit of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence and primary structure of the protein. *European journal of biochemistry / FEBS* 143 (2), 395–399.
- Klemm P (1986):** Two regulatory fim genes, fimB and fimE, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *The EMBO journal* 5 (6), 1389–1393.
- Klemm P, Christiansen G (1987):** Three fim genes required for the regulation of length and mediation of adhesion of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Molecular & general genetics* : MGG 208 (3), 439–445.
- Klemm P, Christiansen G (1990):** The fimD gene required for cell surface localization of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Molecular & general genetics* : MGG 220 (2), 334–338.
- Krogfelt KA, Bergmans H, Klemm P (1990):** Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infection and immunity* 58 (6), 1995–1998.

- Kulasekara HD, Blomfield IC (1999):** The molecular basis for the specificity of fimE in the phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli* K-12. *Molecular microbiology* 31 (4), 1171–1181.
- Lewis K (2008):** Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Current topics in microbiology and immunology* 322, 107–131.
- Liao Q, Zeng Z, Guo X, Li X, Wei F, Zhang W, Chen P, Liang F, Xiang B, Ma J, Wu M, Tang H, Deng M, Zeng X, Tang K, Xiong W, Li G (2014):** LPLUNC1 suppresses IL-6-induced nasopharyngeal carcinoma cell proliferation via inhibiting the Stat3 activation. *Oncogene* 33 (16), 2098–2109.
- Lillington J, Geibel S, Waksman G (2014):** Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili. *Biochimica et biophysica acta* 1840 (9), 2783–2793.
- Liu Y, Bartlett JA, Di ME, Bomberger JM, Chan YR, Gakhar L, Mallampalli RK, McCray PB, Di YP (2013b):** SPLUNC1/BPIFA1 contributes to pulmonary host defense against *Klebsiella pneumoniae* respiratory infection. *The American journal of pathology* 182 (5), 1519–1531.
- Liu Y, Di ME, Chu HW, Liu X, Wang L, Wenzel S, Di YP (2013a):** Increased susceptibility to pulmonary *Pseudomonas* infection in Splunc1 knockout mice. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 191 (8), 4259–4268.
- Lukinskiene L, Liu Y, Reynolds SD, Steele C, Stripp BR, Leikauf GD, Kolls JK, Di YP (2011):** Antimicrobial activity of PLUNC protects against *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 187 (1), 382–390.
- MacBeth KJ, Lee CA (1993):** Prolonged inhibition of bacterial protein synthesis abolishes *Salmonella* invasion. *Infection and immunity* 61 (4), 1544–1546.
- Madison B, Ofek I, Clegg S, Abraham SN (1994):** Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar-binding specificities of their FimH adhesins. *Infection and immunity* 62 (3), 843–848.
- Malpica R, Sandoval GR, Rodríguez C, Franco B, Georgellis D (2006):** Signaling by the arc two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxidants & redox signaling* 8 (5-6), 781–795.
- Marra MN, Wilde CG, Collins MS, Snable JL, Thornton MB, Scott RW (1992):** The role of bactericidal/permeability-increasing protein as a natural inhibitor of

- bacterial endotoxin. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 148 (2), 532–537.
- Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS, Hultgren SJ (2000):** Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO journal* 19 (12), 2803–2812.
- McClain MS, Blomfield IC, Eberhardt KJ, Eisenstein BI (1993):** Inversion-independent phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 175 (14), 4335–4344.
- McDonald RE, Fleming RI, Beeley JG, Bovell DL, Lu JR, Zhao X, Cooper A, Kennedy MW (2009):** Latherin: a surfactant protein of horse sweat and saliva. *PloS one* 4 (5), e5726.
- McGillivray G, Bakaletz LO (2010):** The multifunctional host defense peptide SPLUNC1 is critical for homeostasis of the mammalian upper airway. *PloS one* 5 (10), e13224.
- Meyer T (2011):** Studien zur Funktion von rekombinantem murinem SPLUNC1 und zur Expression von *SPLUNC1* im murinen Asthmamodell. Masterarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Mian MF, Lauzon NM, Andrews DW, Lichty BD, Ashkar AA (2010):** FimH can directly activate human and murine natural killer cells via TLR4. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (7), 1379–1388.
- Mika F, Hengge R (2005):** A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of sigmaS (RpoS) in *E. coli*. *Genes & development* 19 (22), 2770–2781.
- Mossman KL, Mian MF, Lauzon NM, Gyles CL, Lichty B, Mackenzie R, Gill N, Ashkar AA (2008):** Cutting edge: FimH adhesin of type 1 fimbriae is a novel TLR4 ligand. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 181 (10), 6702–6706.
- Muffler A, Fischer D, Altuvia S, Storz G, Hengge-Aronis R (1996):** The response regulator RssB controls stability of the sigma(S) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *The EMBO journal* 15 (6), 1333–1339.
- Neu TR (1996):** Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiological reviews* 60 (1), 151–166.

- Nickzad A, Déziel E (2014):** The involvement of rhamnolipids in microbial cell adhesion and biofilm development - an approach for control? *Letters in applied microbiology* 58 (5), 447–453.
- Ning F, Wang C, Berry KZ, Kandasamy P, Liu H, Murphy RC, Voelker DR, Nho CW, Pan C, Dai S, Niu L, Chu H, Zhang G (2014):** Structural characterization of the pulmonary innate immune protein SPLUNC1 and identification of lipid ligands. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (12), 5349–5360.
- Nuccio S, Bäumlér AJ (2007):** Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 71 (4), 551–575.
- Oertle T, Schwab ME (2003):** Nogo and its paRTNers. *Trends in cell biology* 13 (4), 187–194.
- Ofek I, Mirelman D, Sharon N (1977):** Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature* 265 (5595), 623–625.
- Ooi CE, Weiss J, Doerfler ME, Elsbach P (1991):** Endotoxin-neutralizing properties of the 25 kD N-terminal fragment and a newly isolated 30 kD C-terminal fragment of the 55-60 kD bactericidal/permeability-increasing protein of human neutrophils. *The Journal of experimental medicine* 174 (3), 649–655.
- Otto K, Norbeck J, Larsson T, Karlsson KA, Hermansson M (2001):** Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins. *Journal of bacteriology* 183 (8), 2445–2453.
- Otto K, Hermansson M (2004):** Inactivation of ompX causes increased interactions of type 1 fimbriated *Escherichia coli* with abiotic surfaces. *Journal of bacteriology* 186 (1), 226–234.
- Pallesen L, Poulsen LK, Christiansen G, Klemm P (1995):** Chimeric FimH adhesin of type 1 fimbriae: a bacterial surface display system for heterologous sequences. *Microbiology (Reading, England)* 141 (Pt 11), 2839–2848.
- Palomino C, Marín E, Fernández LÁ (2011):** The fimbrial usher FimD follows the SurA-BamB pathway for its assembly in the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 193 (19), 5222–5230.

- Peter S (2014):** Expression und Charakterisierung verkürzter Varianten des murinen short palate, lung and nasal epithelium clone 1 (SPLUNC1). Bachelorarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Pratt LA, Silhavy TJ (1996):** The response regulator SprE controls the stability of RpoS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (6), 2488–2492.
- Rhodium VA, Suh WC, Nonaka G, West J, Gross CA (2006):** Conserved and variable functions of the sigmaE stress response in related genomes. *PLoS biology* 4 (1), e2.
- Römling U, Balsalobre C (2012):** Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of internal medicine* 272 (6), 541–561.
- Rossolini GM, Muscas P, Chiesurin A, Satta G (1993):** Analysis of the Salmonella fim gene cluster: identification of a new gene (fimI) encoding a fimbrin-like protein and located downstream from the fimA gene. *FEMS microbiology letters* 114 (3), 259–265.
- Roxo-Rosa M, da Costa G, Luider TM, Scholte BJ, Coelho AV, Amaral MD, Penque D (2006):** Proteomic analysis of nasal cells from cystic fibrosis patients and non-cystic fibrosis control individuals: search for novel biomarkers of cystic fibrosis lung disease. *Proteomics* 6 (7), 2314–2325.
- Russell PW, Orndorff PE (1992):** Lesions in two Escherichia coli type 1 pilus genes alter pilus number and length without affecting receptor binding. *Journal of bacteriology* 174 (18), 5923–5935.
- Saini S, Pearl JA, Rao CV (2009):** Role of FimW, FimY, and FimZ in regulating the expression of type i fimbriae in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Journal of bacteriology* 191 (9), 3003–3010.
- Sauer FG, Fütterer K, Pinkner JS, Dodson KW, Hultgren SJ, Waksman G (1999):** Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science (New York, N.Y.)* 285 (5430), 1058–1061.
- Sauer FG, Pinkner JS, Waksman G, Hultgren SJ (2002):** Chaperone priming of pilus subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation. *Cell* 111 (4), 543–551.
- Saxena P, Walker JR (1992):** Expression of argU, the Escherichia coli gene coding for a rare arginine tRNA. *Journal of bacteriology* 174 (6), 1956–1964.

- Sayeed S, Nistico L, St Croix C, Di YP (2013):** Multifunctional role of human SPLUNC1 in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infection and immunity* 81 (1), 285–291.
- Schneider I (1972):** Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *Journal of embryology and experimental morphology* 27 (2), 353–365.
- Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ (1990):** Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science (New York, N.Y.)* 249 (4975), 1429–1431.
- Schwan WR (2011):** Regulation of fim genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *World journal of clinical infectious diseases* 1 (1), 17–25.
- Schwartz DJ, Chen SL, Hultgren SJ, Seed PC (2011):** Population dynamics and niche distribution of uropathogenic *Escherichia coli* during acute and chronic urinary tract infection. *Infection and immunity* 79 (10), 4250–4259.
- Shin OS, Uddin T, Citorik R, Wang JP, Della Pelle P, Kradin RL, Bingle CD, Bingle L, Camilli A, Bhuiyan TR, Shirin T, Ryan ET, Calderwood SB, Finberg RW, Qadri F, Larocque RC, Harris JB (2011):** LPLUNC1 modulates innate immune responses to *Vibrio cholerae*. *The Journal of infectious diseases* 204 (9), 1349–1357.
- Soto SM (2014):** Importance of Biofilms in Urinary Tract Infections: New Therapeutic Approaches. *Advances in Biology* 2014.
- Spears PA, Schauer D, Orndorff PE (1986):** Metastable regulation of type 1 piliation in *Escherichia coli* and isolation and characterization of a phenotypically stable mutant. *Journal of bacteriology* 168 (1), 179–185.
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002):** Biofilms as complex differentiated communities. *Annual review of microbiology* 56, 187–209.
- Struve C, Bojer M, Kroghfelt KA (2008):** Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and immunity* 76 (9), 4055–4065.
- Swenson DL, Kim KJ, Six EW, Clegg S (1994):** The gene *fimU* affects expression of *Salmonella typhimurium* type 1 fimbriae and is related to the *Escherichia coli* tRNA gene *argU*. *Molecular & general genetics* : MGG 244 (2), 216–218.

- Tam C, Missiakas D (2005):** Changes in lipopolysaccharide structure induce the sigma(E)-dependent response of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 55 (5), 1403–1412.
- Tarran R, Redinbo MR (2014):** Mammalian short palate lung and nasal epithelial clone 1 (SPLUNC1) in pH-dependent airway hydration. *The international journal of biochemistry & cell biology* 52, 130–135.
- Teng FY, Tang BL (2008):** Cell autonomous function of Nogo and reticulons: The emerging story at the endoplasmic reticulum. *Journal of cellular physiology* 216 (2), 303–308.
- Thaikootathil JV, Martin RJ, Di PY, Minor M, Case S, Zhang B, Zhang G, Huang H, Chu HW (2012):** SPLUNC1 deficiency enhances airway eosinophilic inflammation in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 47 (2), 253–260.
- Thomas S (2013):** Einfluss von LPLUNC1 (BPIFB1) auf das Adhäsionsverhalten von *Enterobacter cloacae*. Masterarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Tinker JK, Clegg S (2000):** Characterization of FimY as a coactivator of type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and immunity* 68 (6), 3305–3313.
- Tinker JK, Clegg S (2001):** Control of FimY translation and type 1 fimbrial production by the arginine tRNA encoded by *fimU* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular microbiology* 40 (3), 757–768.
- Tinker JK, Hancox LS, Clegg S (2001):** FimW is a negative regulator affecting type 1 fimbrial expression in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of bacteriology* 183 (2), 435–442.
- Tobias PS, Soldau K, Iovine NM, Elsbach P, Weiss J (1997):** Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP form different types of complexes with LPS. *The Journal of biological chemistry* 272 (30), 18682–18685.
- Touaibia M, Roy R (2007):** Glycodendrimers as anti-adhesion drugs against type 1 fimbriated *E. coli* uropathogenic infections. *Mini reviews in medicinal chemistry* 7 (12), 1270–1283.

- Valenski ML, Harris SL, Spears PA, Horton JR, Orndorff PE (2003):** The Product of the fimI gene is necessary for Escherichia coli type 1 pilus biosynthesis. *Journal of bacteriology* 185 (16), 5007–5011.
- van Acker H, van Dijck P, Coenye T (2014):** Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends in microbiology* 22 (6), 326–333.
- van der Schaft DW, Toebes EA, Haseman JR, Mayo KH, Griffioen AW (2000):** Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) inhibits angiogenesis via induction of apoptosis in vascular endothelial cells. *Blood* 96 (1), 176–181.
- Vetsch M, Puorger C, Spirig T, Grauschopf U, Weber-Ban EU, Glockshuber R (2004):** Pilus chaperones represent a new type of protein-folding catalyst. *Nature* 431 (7006), 329–333.
- Weiss J (2003):** Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defence against Gram-negative bacteria. *Biochemical Society transactions* 31 (Pt 4), 785–790.
- Weiss J, Franson RC, Beckerdite S, Schmeidler K, Elsbach P (1975):** Partial characterization and purification of a rabbit granulocyte factor that increases permeability of Escherichia coli. *The Journal of clinical investigation* 55 (1), 33–42.
- Welch RA, Burland V, Plunkett G, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou S, Boutin A, Hackett J, Stroud D, Mayhew GF, Rose DJ, Zhou S, Schwartz DC, Perna NT, Mobley HLT, Sonnenberg MS, Blattner FR (2002):** Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (26), 17020–17024.
- Weston WM, LeClair EE, Trzyna W, McHugh KM, Nugent P, Lafferty CM, Ma L, Tuan RS, Greene RM (1999):** Differential display identification of plunc, a novel gene expressed in embryonic palate, nasal epithelium, and adult lung. *The Journal of biological chemistry* 274 (19), 13698–13703.
- Wiesner J, Vilcinskas A (2010):** Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1 (5), 440–464.

- Wright KJ, Seed PC, Hultgren SJ (2007):** Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cellular microbiology* 9 (9), 2230–2241.
- Wright PL, Yu J, Di YP, Homer RJ, Chupp G, Elias JA, Cohn L, Sessa WC (2010):** Epithelial reticulon 4B (Nogo-B) is an endogenous regulator of Th2-driven lung inflammation. *The Journal of experimental medicine* 207 (12), 2595–2607.
- Yamagata M, Rook SL, Sassa Y, Ma RC, Gerald P, Goddard L, Clermont A, Gao B, Salti H, Gundel R, White M, Feener EP, Aiello LP, King GL (2006):** Bactericidal/permeability-increasing protein's signaling pathways and its retinal trophic and anti-angiogenic effects. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20 (12), 2058–2067.
- Yeh KS, Hancox LS, Clegg S (1995):** Construction and characterization of a fimZ mutant of *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology* 177 (23), 6861–6865.
- Yu J, Kroll JS (1999):** DsbA: a protein-folding catalyst contributing to bacterial virulence. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 1 (14), 1221–1228.
- Zhou H, Li X, Li G, Zhou M, Liu H, Yang Y, Deng T, Ma J, Sheng S (2008):** Effect of SPLUNC1 protein on the *Pseudomonas aeruginosa* and Epstein-Barr virus. *Molecular and cellular biochemistry* 309 (1-2), 191–197.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	Entwicklungsstadien von bakteriellen Biofilmen	6
Abb. 1-2	Aufbau von Typ 1 Pili	8
Abb. 1-3	Aufbau des <i>fim</i> -Operons von <i>E. coli</i>	9
Abb. 4-1	Einfluss von mLPLUNC1 auf die Adhäsion von <i>K. pneumoniae</i> und <i>S. marcescens</i>	46
Abb. 4-2	mSPLUNC1 und mLPLUNC1 induzieren Adhäsion von UPEC CFT073	48
Abb. 4-3	mSPLUNC1 und mLPLUNC1 induzieren Adhäsion über Typ 1 Pili in UPEC CFT073	50
Abb. 4-4	Inkubation mit Chloramphenicol verhindert die PLUNC-induzierte Adhäsion von CFT073 nicht	52
Abb. 4-5	mSPLUNC1 induziert keine Adhäsion in <i>dsbA</i> - oder <i>surA</i> -defizienten CFT073-Mutanten	55
Abb. 4-6	PLUNC-induzierte Adhäsion in <i>S. Typhimurium arcA</i> -, <i>arcB</i> - und <i>yjjY</i> -Deletionsmutanten	56
Abb. 4-7	LPS inhibiert die mLPLUNC1-induzierte Adhäsion von CFT073	58
Abb. 4-8	Induktion der Adhäsion bei UPEC CFT073 durch den C-Terminus von mSPLUNC1	60
Abb. 4-9	Screening von Hybridoma-Klonen auf Produktion von α -mSPLUNC1-Antikörpern	62
Abb. 4-10	Aufreinigung und Isotypisierung von α -mSPLUNC1 mAk (Klon 8-A3.3.3)	63
Abb. 4-11	Eingrenzung der Bindedomäne von α -mSPLUNC1 mAk (Klon 8-A3.3.3)	64
Abb. 4-12	Etablierung eines ELISAs zum Nachweis von mSPLUNC1	67
Abb. 5-1	Vergleich der Sequenzen von mLPLUNC1 und mSPLUNC1	76

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren der Philipps-Universität Marburg:

Bauer, Beck, Becker, Bölker, Brandl, Brändle, Bremer, Brandis-Heep, Bröring, Buckel, Buttgereit, Essen, Feuser, Frank, Galland, Garten, Glorius, Grolig, Hassel, Heimbrodt, Homberg, Huber, Imhof, Kahmann, Kaufmann, Kirchner, Kostron, Lingelbach, Maier, Maisner, Marahiel, Matthies, Mösch, Önel, Przyborski, Rathke, Rebscher, Reiß, Renkawitz-Pohl, Schachtner, Schnare, Weber, Yu, Zauner, Ziegenhagen

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Markus Schnare nicht nur für die Bereitstellung des Themas, sondern auch für seine große Hilfsbereitschaft und die Möglichkeit, jederzeit mit Fragen zu ihm zu kommen. Vielen Dank für viele interessante und aufschlussreiche Diskussionen.

Weiterhin möchte ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Schnare für ihre Unterstützung danken, insbesondere Sandra Stein, Dr. Maria Stromiedel und Dr. Eva-Maria Wittmann, ohne die gerade die ersten Wochen im Labor deutlich schwieriger geworden wären. Besonderer Dank gebührt auch Dr. Dr. Olaf Pinkenburg, dessen große Erfahrung und Hilfsbereitschaft mir sicher manches gescheiterte Experiment erspart hat und auf dessen Unterstützung ich innerhalb und auch außerhalb des Labors immer zählen konnte.

Ich danke Dr. Roman Gerlach aus Wernigerode für die Kooperation und die Bereitstellung vieler Salmonellen-Mutanten und Dr. Dmitri Cherkasov aus Marburg für die klinischen Isolate.

Großer Dank auch an Prof. Dr. Bauer und alle Angehörigen des Instituts für Immunologie für die freundliche Atmosphäre, viele interessante Gespräche und natürlich für die regelmäßige Versorgung mit Kuchen. Steffi Jöckel und Dr. Hannah-Lena Obermann möchte ich für viele fröhliche Mittagspausen danken, die mich stets mit neuer Energie für meine Arbeit versorgt haben.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die mich auf meinem Lebensweg immer unterstützt und mir vieles ermöglicht haben.