

**Periphere CD4-positive T-Zellantworten bei
Morbus Crohn und *Spondylitis ankylosans* nach *in vitro*-
Stimulation mit evolutionär konservierten Proteinen oder
mit Pathogenitätsfaktoren von *Escherichia coli***

vorgelegt von
Diplom-Biologe
Asgar Ergin
aus Berlin

von der Fakultät III - Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Peter Neubauer
Berichter: Prof. Dr. Roland Lauster
Berichter: Prof. Dr. Joachim Sieper
Berichter: PD Dr. Thomas Adam

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 30. März 2009

Berlin 2009

D83

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
1.1	MORBUS CROHN (M. CROHN)	4
1.1.1	Krankheitscharakteristika und Epidemiologie	4
1.1.2	Ätiologie und Pathophysiologie	5
1.1.3	Bakterien und Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen (CED)	11
1.2	SPONDYLITIS ANKYLOSANS (S. ANKYLOSANS)	12
1.2.1	Krankheitscharakteristika, Ätiologie und Epidemiologie	12
1.2.2	Bakterien und Spondylarthritiden (SpA)	15
1.3	KLINISCHE GEMEINSAMKEITEN ZWISCHEN S. ANKYLOSANS UND CED	16
1.4	ZIELE DIESER ARBEIT	17
2	MATERIAL	19
2.1	CHEMIKALIEN	19
2.2	KITS	19
2.3	ANTIBIOTIKA	19
2.4	BAKTERIENSTÄMME	20
2.5	ANTIKÖRPER FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE	20
2.6	SONSTIGE VERBRAUCHSMATERIALIEN	21
2.7	GERÄTE	21
2.8	MEDIEN	22
2.9	PUFFER UND LÖSUNGEN	23
3	METHODEN	26
3.1	BLUTABNAHME BEI PATIENTEN UND GESUNDEN KONTROLLPERSONEN	26
3.2	IDENTIFIZIERUNG DER LUCA-PROTEINE VON E. COLI K12	26
3.3	IDENTIFIZIERUNG DER ECHH-PROTEINE VON E. COLI K12	27
3.4	IDENTIFIZIERUNG VON PATHOGENITÄTSFAKTOREN VON E. COLI	27
3.5	MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN	27
3.5.1	Isolierung genomischer DNA von E. coli	27
3.5.2	Präzipitation von DNA	28
3.5.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	28
3.5.4	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA	28
3.5.5	Restriktionsverdau von DNA	29
3.5.6	Dephosphorylierung von DNA-Enden	29
3.5.7	Ligation von DNA-Molekülen	29
3.5.8	Herstellung und Transformation von kompetenten E. coli Zellen	29
3.5.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
3.5.9.1	Amplifizierung von Genabschnitten	31
3.5.9.2	Kolonie-PCR	32
3.5.10	Agarosegelelektrophorese	33
3.5.11	Herstellung von Plasmid-Vektoren	34
3.5.11.1	pQTEV2	34
3.5.11.2	pD-GEX1	35
3.5.11.3	pD-MAL1	35
3.5.11.4	pD-Nus1	36
3.5.12	Klonierung der amplifizierten Gene in den Vektor pQTEV2	36
3.5.13	Herstellung von Glycerolkulturen	37
3.5.14	Selektion von Expressionsklonen	37
3.5.15	Gateway-Rekombination	37
3.5.16	Sequenzierung von DNA	40
3.6	PROTEINBIOCHEMISCHE ARBEITEN	40
3.6.1	Expression und native Reinigung von Proteinen im kleinen Maßstab	40
3.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
3.6.3	Expression und native Reinigung von Proteinen im großen Maßstab	43
3.6.4	Reinigung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen	44
3.6.5	Entfernung von Lipopolysacchariden (LPS) mit Polymyxin-B	44
3.6.6	Sterilisation von Proteinlösungen	45

3.6.7	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	45
3.6.8	Limulus Amoebozyten Lysat (LAL) -Test.....	45
3.6.9	Herstellung von Proteingemischen	46
3.7	IN SILICO-ARBEITEN	47
3.7.1	Bestimmung des Codon-Adaptations-Index (CAI).....	47
3.7.2	Bestimmung von seltenen Codons	48
3.7.3	Bestimmung von Transmembranhelices	48
3.7.4	Statistische Analysen	48
3.8	IMMUNOLOGISCHE ARBEITEN	48
3.8.1	in vitro-Stimulation von peripheren CD4+ T-Zellen	48
3.8.2	Erythrozytenlyse, Fixierung und Permeabilisierung von Leukozyten	49
3.8.3	Markierung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Zytokinen	50
3.8.4	Durchflusszytometrie	51
4	ERGEBNISSE	53
4.1	KLONIERUNG UND EXPRESSION VON LUCA-PROTEINEN IN PQTEV2.....	53
4.2	KLONIERUNG UND EXPRESSION VON ECHH-PROTEINEN IN PQTEV2.....	54
4.3	GATEWAY-KLONIERUNGEN MIT KONSERVIERTEN GENEN VON E. COLI.....	56
4.4	EFFIZIENZ DER ENTFERNUNG VON LPS MIT POLYMYXIN-B	58
4.5	EXPRESSION UND REINIGUNG VON KONSERVIERTEN PROTEINEN IM GROßEN MAßSTAB60	
4.6	CODON-USAGE IN KONSERVIERTEN PROTEINEN.....	62
4.7	TRANSMEMBRANHELICES IN KONSERVIERTEN PROTEINEN.....	63
4.8	KLONIERUNG, EXPRESSION UND REINIGUNG VON PATHOGENITÄTSFAKTOREN.....	65
4.9	STIMULATION VON PERIPHEREN CD4+ T-ZELLEN.....	67
4.9.1	Stimulation mit Gemischen von hochkonservierten Proteinen von E. coli.....	67
4.9.2	Stimulation mit einzelnen konservierten Proteinen von E. coli	70
4.9.3	Stimulation mit Pathogenitätsfaktoren von E. coli.....	73
4.9.4	Stimulation mit Staphylococcus aureus enterotoxin B (SEB).....	75
4.9.5	Frequenzen von CD4+/Vβ17+ T-Zellen.....	76
4.9.6	Stimulation mit „Recall-Antigenen“	78
4.9.6.1	Cytomegalievirus Phosphoprotein 65 kDa (CMV pp65).....	78
4.9.6.2	Tetanus Toxoid (TT)	79
5	DISKUSSION	81
5.1	HERSTELLUNG DER REKOMBINANTEN PROTEINE VON E. COLI	81
5.2	NIEDRIGERE PERIPHERE CD4+ T-ZELLANTWORTEN BEI PATIENTEN MIT M. CROHN UND S. ANKYLOSANS.....	87
6	ZUSAMMENFASSUNG	92
7	LITERATURVERZEICHNIS	94
8	ABKÜRZUNGEN	107
9	ANHANG	109
9.1	LISTE DER HOCHKONSERVIERTEN PROTEINE VON E. COLI	109
9.2	PLASMIDKARTEN	115
9.3	OLIGONUKLEOTIDE	116
9.3.1	Herstellung von DNA-Fragmenten	116
9.3.2	Kolonie-PCR und DNA-Sequenzierungen.....	116
9.3.3	PCR mit konservierten Genen von E. coli	116
9.3.4	PCR mit Pathogenitätsfaktoren von E. coli.....	119
9.4	PUBLIKATIONSLISTE	120

1 EINLEITUNG

1.1 *Morbus Crohn (M. Crohn)*

1.1.1 Krankheitscharakteristika und Epidemiologie

Bei *Morbus Crohn (M. Crohn)* und *Colitis ulcerosa (C. ulcerosa)* handelt es sich um zwei phänotypische Prototypen von Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen (CED) des Menschen. *Morbus Crohn* wurde erstmalig von Crohn et al. (Crohn et al. 1984) beschrieben und ist charakterisiert durch eine granulomatöse chronische Entzündung, die sich über den gesamten Gastrointestinaltrakt erstreckt, wobei der untere Dünndarm (terminales ileum) vermehrt betroffen ist (Duchmann et al. 2005). Dagegen handelt es sich bei *C. ulcerosa* um eine kontinuierliche chronische Entzündung im Bereich des Dickdarms und des Mastdarms (Colorektum) ohne granulomatöse Charakteristika (Karp et al. 2005). Sowohl bei *M. Crohn* als auch bei *C. ulcerosa* verläuft die chronische Entzündung zumeist in Schüben, wobei im Fall des *M. Crohn* alle Schichten der Darmwand und bei *C. ulcerosa* lediglich die Mukosa und Submukosa betroffen sind.

Je nach Auswertungszeitraum und geografischer Zuordnung von epidemiologischen Studien variieren Inzidenzraten (Neuerkrankungsraten) und Prävalenzraten (Verbreitungsraten) von CED. Für *M. Crohn* wird in der Literatur eine jährliche Inzidenzrate von 5-8/100.000 (Fälle/Einwohner) angegeben. Für *C. ulcerosa* ergibt sich eine jährliche Inzidenzrate von 3-13/100.000. Eine europaweite Studie von 1991 bis 1992 ermittelte eine jährliche Inzidenzrate von *M. Crohn* in Höhe von 5/100.000 und von *C. ulcerosa* in Höhe von 10/100.000 (Shivananda et al. 1996).

Ähnlich hohe Inzidenzraten wurden beispielsweise in Norwegen von 1990 bis 1993 ermittelt. In diesem Zeitraum lag die jährliche Inzidenzrate von *M. Crohn* bei 6/100.000 und von *C. ulcerosa* bei etwa 12/100.000 (Moum et al. 1997). In Deutschland bewegte sich von 1980 bis 1995 die jährliche Inzidenzrate von *M. Crohn* bei etwa 5/100.000 (Timmer et al. 1999a) und von *C. ulcerosa* bei etwa

3/100.000 (Timmer et al. 1999b). In Frankreich lag von 2000 bis 2002 die jährliche Inzidenzrate von *M. Crohn* bei etwa 8/100.000 und von *C. ulcerosa* bei etwa 7/100.000 (Nerich et al. 2006). Von 1990 bis 2000 betrug in Minnesota (USA) die jährliche Inzidenzrate von *M. Crohn* etwa 8/100.000 sowie von *C. ulcerosa* etwa 9/100.000 (Loftus et al. 2007). Von 1971 bis 1982 lag in Nord-Kalifornien (USA) die Inzidenzrate von *M. Crohn* bei 5/100.000 und von *C. ulcerosa* bei 4/100.000 (Hiatt et al. 1988).

Die Prävalenzraten von *M. Crohn* und *C. ulcerosa* lagen in Minnesota im Jahr 2001 bei 174/100.000, bzw. 214/100.000 (Loftus et al. 2007). Dagegen wurde in Deutschland von 1985 bis 1986 eine Prävalenzrate von *M. Crohn* in Höhe von 30/100.000 ermittelt (Loffler et al. 1993).

Für *M. Crohn* wurde die höchste Inzidenzrate in der Altersgruppe 15 bis 29 Jahre und für *C. ulcerosa* in der Altersgruppe 20 bis 34 Jahre festgestellt (Hiatt et al. 1988; Moum et al. 1996a; Moum et al. 1996b; Nerich et al. 2006). Außerdem belegen diverse Studien, dass Männer und Frauen mit der gleichen Häufigkeit an *M. Crohn* oder *C. ulcerosa* erkranken (Hiatt et al. 1988; Moum et al. 1996b; Loftus et al. 2007).

1.1.2 Ätiologie und Pathophysiologie

Die Ätiologie von CED ist nicht vollständig geklärt. Die Forschung nimmt derzeit an, dass es sich um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, an deren Pathogenese genetische Faktoren, Umweltfaktoren und eine fehlregulierte mukosale Immunantwort gegen kommensale Bakterien beteiligt sind (Podolsky 2002). In den vergangenen Jahren gelang es, genetische Faktoren zu identifizieren, die mit CED assoziiert sind. Diesen Genen ist gemein, dass sie bei CED-Patienten häufiger mutiert in Form von Punktmutationen, so genannten SNPs (engl. single nucleotide polymorphisms), vorliegen.

Die Assoziation von CARD15/NOD2-Polymorphismen mit *M. Crohn* wurde nahezu zeitgleich von 3 Arbeitsgruppen veröffentlicht (Hampe et al. 2001; Hugot et al. 2001; Ogura et al. 2001a). Das Gen CARD15

(engl. caspase-recruiting domain) kodiert für das cytoplasmatische Protein NOD2 (engl. nucleotide-binding oligomerization domain 2), das hauptsächlich in Monozyten exprimiert wird (Ogura et al. 2001b). NOD2 ist ein intrazellulärer Rezeptor von Muramyl Dipeptid, einem Bestandteil von Peptidoglykan, das wiederum in der Zellwand von gram-positiven und gram-negativen Bakterien vorkommt (Girardin et al. 2003). Im Rahmen der angeborenen Immunantwort bewirkt die Interaktion zwischen Muramyl Dipeptid und Wildtyp-NOD2 über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (engl. nuclear factor kappa B) die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (Ogura et al. 2001b). Somit nimmt NOD2 bei der Erkennung und der Eliminierung von Bakterien seitens des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle ein. Möglicherweise bewirken CARD15/NOD2-Polymorphismen eine unvollständige Eliminierung kommensaler wie pathogener Bakterien, so dass es zur fehlgesteuerten mukosalen Immunantwort gegen die verbleibenden Bakterien kommt (Franchi et al. 2008).

Franchimont et al. demonstrierten die Assoziation eines Polymorphismus im TLR4-Gen (engl. toll-like receptor 4) mit CED (Franchimont et al. 2004). In Transfektionsexperimenten bewirkte dieser TLR4-Polymorphismus eine geringere Aktivierung von NF- κ B nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) (Arbour et al. 2000). TLR4 fungiert auf der Oberfläche von Immunzellen als Rezeptor von LPS, eine Komponente der äußeren Membran gram-negativer Bakterien. LPS ist ein wichtiger Auslöser für inflammatorische Immunantworten gegen gram-negative Bakterien, wobei die Erkennung von LPS hauptsächlich über TLR4 erfolgt (Medzhitov 2001; Hoebe et al. 2006).

Des Weiteren wurde ein Polymorphismus in der Promoterregion des CD14-Gens mit *M. Crohn* assoziiert (Klein et al. 2002). CD14 ist ein Bestandteil der angeborenen Immunantwort und auch beteiligt an der Erkennung von LPS (Aderem et al. 2000).

Weitere Hinweise für eine Beteiligung von genetischen Faktoren an der Pathogenese von CED lieferten Studien mit Familienangehörigen von CED-Patienten sowie Zwillingsstudien. Bei Verwandten ersten Grades von CED-Patienten konnte im Vergleich zur Normalbevölkerung ein um den Faktor 10

erhöhtes Erkrankungsrisiko ermittelt werden (Orholm et al. 1991). Bei monozygoten Zwillingen war im Vergleich zu dizygoten Zwillingen eine höhere Konkordanz von *M. Crohn*, also eine übereinstimmende Erkrankung bei beiden Zwillingen, festzustellen (Tysk et al. 1988).

Hervorzuheben ist außerdem, dass genetische Variationen in verschiedenen ethnischen Gruppen nachgewiesen werden konnten. Beispielsweise konnten CARD15/NOD2-Polymorphismen weder in der Türkei noch in Tunesien mit *M. Crohn* assoziiert werden (Zouiten-Mekki et al. 2005; Ozen et al. 2006). Bei schottischen *M. Crohn*-Patienten war die Prävalenzrate von CARD15/NOD2-Polymorphismen hingegen niedriger als bei Patienten aus anderen europäischen Ländern und Nord-Amerika. Des Weiteren ergaben sich bei diesen Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Unterschiede bezüglich der Varianten von TLR4 und CD14 (Arnott et al. 2004). Halfvarson et al. demonstrierten, dass nur eine Minderheit der konkordanten monozygoten Zwillinge für *M. Crohn* Träger für eine der 3 CARD15/NOD2-Polymorphismen waren (Halfvarson et al. 2005).

Neben genetischen Faktoren sind vermutlich auch Umweltfaktoren an der Pathogenese von CED beteiligt. So waren weniger als die Hälfte der monozygoten Zwillinge konkordant für *M. Crohn* (Tysk et al. 1988). Darüber hinaus bestätigten zahlreiche epidemiologische Studien steigende Inzidenzraten von CED vornehmlich in industrialisierten Ländern. So waren etwa in Minnesota von 1940 bis in die frühen 1970er Jahre signifikante Steigerungen der Inzidenzraten von *M. Crohn* und *C. ulcerosa* zu beobachten, während sich die Inzidenzraten von beiden Krankheiten innerhalb von 30 Jahren (frühe 1970er Jahre bis 2000) stabilisierten. Von 1991 bis 2001 stieg die Prävalenzrate von *M. Crohn* um 31%, während sich die Prävalenzrate von *C. ulcerosa* in derselben Zeitspanne um 7% verringerte (Loftus et al. 2007). Zwischen 1971 und 1982 sank in Nord-Kalifornien die Inzidenzrate von *C. ulcerosa*. Zeitgleich stieg sie von *M. Crohn* (Hiatt et al. 1988).

In Schottland war von 1981 bis 1995 eine kontinuierliche Zunahme der Inzidenzrate von *M. Crohn* und *C. ulcerosa* bei jugendlichen Patienten zu beobachten. Zudem war die Rate von *M. Crohn* in Nord-Schottland im Vergleich

zu Süd-Schottland signifikant höher (Armitage et al. 2001). Dagegen konnte bei *C. ulcerosa* keine Nord-Süd-Variation festgestellt werden (Armitage et al. 2004). Ähnlich in Frankreich: Auch hier ergab sich eine Nord-Süd-Variation der Inzidenzrate von *M. Crohn*. Im Norden war die Inzidenzrate von *M. Crohn* höher als im Süden. Kein Nord-Süd-Gefälle war bezüglich der Inzidenzrate von *C. ulcerosa* festzustellen (Nerich et al. 2006).

Dagegen bestätigte eine europaweite Studie die Nord-Süd-Variation der Inzidenzraten von *M. Crohn* und *C. ulcerosa*. Die Inzidenzrate von *M. Crohn* und *C. ulcerosa* war im Norden im Vergleich zum Süden um 80% bzw. um 40% erhöht. Die höchste Inzidenzrate von *M. Crohn* wurde in Nordwest-Frankreich und den Niederlanden, dagegen die niedrigste in Griechenland ermittelt. Im Fall der *C. ulcerosa* zeigte sich, dass Island die höchste und Portugal die niedrigste Inzidenzrate aufwies (Shivananda et al. 1996).

Der Zusammenhang zwischen zunehmendem Industrialisierungsgrad und steigender Inzidenzrate von CED wird besonders deutlich am Beispiel von vormals wirtschaftlich unterentwickelten Regionen der Welt. In Osteuropa (Lakatos 2006) und Asien (Leong et al. 2004; Ouyang et al. 2005) sind beispielsweise seit Mitte der 1990er Jahre die Inzidenzraten deutlich gestiegen.

Weitere Hinweise für die Einflüsse von Umweltfaktoren zeigten Studien mit Ehepaaren, bei denen beide Ehepartner an CED erkrankt waren. Bei der Mehrheit der Paare brachen die Erkrankungen bei beiden Partnern erst nach einer bestimmten Dauer des Zusammenlebens aus. Auch der Nachwuchs von betroffenen Eltern war nachweislich einem erhöhten Risiko, an CED zu erkranken, ausgesetzt (Laharie et al. 2001).

Tabakkonsum wird ebenfalls als ein Umweltfaktor für die Pathogenese von CED diskutiert. Bei Geschwisterpaaren, die nicht konkordant für den CED-Subtyp (ein Geschwister an *M. Crohn*, das andere an *C. ulcerosa* erkrankt) und Tabakkonsum waren, wurde bei den Rauchern *M. Crohn* und bei Nichtrauchern *C. ulcerosa* diagnostiziert (Bridger et al. 2002).

Eine interessante Hypothese hinsichtlich der möglichen Verbindung von Umweltfaktoren mit der Pathophysiologie von CED wurde von Hugot et al. formuliert. Laut der so genannten Kühlketten-Hypothese (engl. Cold Chain Hypothesis) stellt die Kältetechnik einen potenziellen Risikofaktor für *M. Crohn* dar: psychrotrophe Bakterien, wie *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*), *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* und *Bacillus cereus*, sind fähig, sich auch bei 4°C zu vermehren. Während des 20. Jahrhunderts verlief die Einführung der Kältetechnik nahezu parallel mit dem Anstieg der Prävalenzrate von *M. Crohn* (Hugot et al. 2003).

Interessant ist auch die Hygiene-Hypothese. Diese ist im Zusammenhang mit der fortschreitenden Industrialisierung zu betrachten und beschreibt, dass der zunehmende Grad an Hygiene zu einem reduzierten Kontakt mit Bakterien, Viren und auch Helminthen, vor allem in der Kindheit und frühen Jugend, führt (Koloski et al. 2008). Dadurch kann es zu einer fehlgesteuerten Immunantwort kommen, wie zuvor bereits für Allergien beschrieben (Strachan 1989).

Die Pathophysiologie von CED wird angesehen als eine fehlregulierte mukosale Immunantwort gegen kommensale Bakterien. Tiermodelle von CED konnten demonstrieren, dass die normale intestinale Flora bei der Entstehung der Krankheit eine entscheidende Rolle spielt: Transgene Mäuse erkrankten in der Gegenwart von kommensalen Bakterien an Colitis. Die Tiere waren wiederum gesund, wenn sie unter keimfreien Bedingungen gehalten wurden (Rath et al. 2001; Strober et al. 2002; Guarner et al. 2003). Ferner konnte eine fehlgesteuerte mukosale Immunantwort der CD4-positiven Thymus-Zellen (CD4+ T-Zellen) in Form einer gesteigerten Produktion von T-Helferzellen-1 (Th1)-Zytokinen nachgewiesen werden. Hierzu zählen die proinflammatorischen Zytokine Interferon- γ (IFN- γ), Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-12 (IL-12) (Strober et al. 2002). Ito et al. belegten in ihren Versuchen, dass IFN- γ im Tiermodell CED verursacht (Ito et al. 2006).

Im menschlichen Darm befinden sich in der Regel hohe Konzentrationen von Antigenen, Bakterien und Speiseresten, die vom darmassoziierten lymphatischen Gewebe (engl. gut associated lymphoid tissue) durch eine intestinale

Epithelschicht getrennt werden. Das mukosale Immunsystem muss die Balance zwischen der notwendigen Reaktion auf pathogene Organismen sowie der gleichzeitigen aktiven Tolerierung kommensaler Bakterien und Nahrungsantigene halten. Möglicherweise bricht bei CED diese Toleranz zusammen, so dass es zur Fehlsteuerung der mukosalen Immunantwort gegen intestinale Bakterien und Antigene kommt (Podolsky 2002; Lakatos et al. 2006). Im Fall des *M. Crohn* gibt es klare Hinweise darauf, dass die intestinale Entzündung Th1-vermittelt ist (Fuss et al. 1996; Parronchi et al. 1997; Cobrin et al. 2005).

Auch eine Fehlsteuerung der adaptiven Immunantwort bei CED-Patienten wird diskutiert. Eine Studie von 1978 wies erhöhte Antikörpertiter gegen *Escherichia coli* (*E. coli*) im Serum von CED-Patienten nach (Tabaqchali et al. 1978). Bei *M. Crohn*-Patienten konnten erhöhte Antikörpertiter gegen bakterielle Antigene wie *E. coli* outer membrane porin C (Mei et al. 2006), Flagellin (Lodes et al. 2004; Sitaraman et al. 2005) und *Pseudomonas fluorescens*-assoziierte Sequenz I2 festgestellt werden (Landers et al. 2002).

Voraussetzung für den Kontakt der mukosalen Immunzellen mit Bakterien und Antigenen aus dem Darmlumen ist eine Störung der epithelialen Barrierefunktion. Diese wurde mehrfach bei *M. Crohn*-Patienten beschrieben. Nachweislich ist die intestinale Permeabilität bei *M. Crohn*-Patienten und ihren Verwandten ersten Grades erhöht. Des Weiteren waren bei Patienten, deren Ileum betroffen war, CARD15/NOD2-Polymorphismen mit erhöhter intestinaler Permeabilität assoziiert (D'Inca et al. 2006). Bei *M. Crohn*-Patienten, deren Ileum betroffen war, konnte eine verringerte Expression von α -Defensinen im Ileum gezeigt werden (Wehkamp et al. 2004). Darüber hinaus waren CARD15/NOD2-Polymorphismen mit einer verstärkten Erniedrigung der α -Defensin-Expression assoziiert. Dagegen lag bei *M. Crohn*-Patienten, deren Colon betroffen war, eine erniedrigte Expression von β -Defensinen vor (Wehkamp et al. 2007).

Defensine sind antibakterielle Peptide, die eine wichtige Rolle bei der mukosalen antibakteriellen Barriere einnehmen. Somit könnte eine erniedrigte Expression von Defensinen und eine erhöhte intestinale Permeabilität eine Störung der epithelialen Barrierefunktion zur Folge haben, welche die vermehrte

Einwanderung von Bakterien aus dem Darmlumen in die intestinale Mukosa begünstigt. Derzeit ist noch unbekannt, ob die Barrierestörung bei *M. Crohn* die Ursache der Erkrankung oder aber eine sekundäre Störung, die die Entzündungsreaktion unterstützt, darstellt.

1.1.3 Bakterien und Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Wie zuvor erwähnt erkranken transgene Mäuse in der Gegenwart von kommensalen Bakterien an Colitis, während die Tiere unter keimfreien Bedingungen gesund bleiben (Rath et al. 2001; Strober et al. 2002; Guarner et al. 2003). Daher ist davon auszugehen, dass Bakterien an der Pathogenese des *M. Crohn* eine zentrale Rolle spielen. Verschiedene Bakterienspezies, insbesondere *E. coli*, wurden mit *M. Crohn* in Verbindung gebracht. So konnten mit Hilfe eines immunhistochemischen Verfahrens Antigene von *E. coli*, *Listeria* und *Streptococcus* in Makrophagen von *M. Crohn*-Patienten nachgewiesen werden (Liu et al. 1995). Außerdem wurde bei 80% der *M. Crohn*-Patienten die DNA von *E. coli* in Granuloma mittels Laser Capture Microdissection und Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction, PCR) gefunden (Ryan et al. 2004).

Bei CED-Patienten ließ sich eine veränderte Zusammensetzung der Bakterien im Darmlumen nachweisen. Während die Zahl von nützlichen Bakterien, wie *Bifidobacterium* und *Lactobacillus*, erniedrigt war, kamen pathogene Bakterien, wie *Bacteroides* und *E. coli*, in einer erhöhten Anzahl vor (Neut et al. 2002; Swidsinski et al. 2002). In der Ileum-Mukosa von *M. Crohn*-Patienten wurden überwiegend adhärente Stämme von *E. coli* nachgewiesen (Darfeuille-Michaud et al. 1998; Kotlowski et al. 2007). So konnte ein Stamm adhärent-invasiver *E. coli* (AIEC) aus der Ileum-Mukosa eines *M. Crohn*-Patienten isoliert werden, der im Zytoplasma der Wirtszelle überlebt und sich vermehrt (Boudeau et al. 1999). Dieser Stamm ist außerdem in der Lage, in Makrophagen zu überleben und sich zu vermehren (Glasser et al. 2001). AIEC sind mit entzündeter Ileum-Mukosa von *M. Crohn*-Patienten assoziiert (Darfeuille-Michaud et al. 2004). Eine Studie bestätigte die Assoziation von AIEC

mit *M. Crohn*, indem sie die abnormale Expression von CEACAM6, einem Rezeptor von AIEC, auf epithelialen Zellen des Ileums von Patienten feststellte (Barnich et al. 2007).

Mycobacterium avium paratuberculosis (MAP) wurde ebenfalls mit *M. Crohn* assoziiert. Dieses Bakterium konnte bei einem Großteil der *M. Crohn*-Patienten aus Biopsien der intestinalen Mukosa gefunden und isoliert werden (Sechi et al. 2005). MAP ruft bei Wiederkäuern die Paratuberkulose (Johnsche Krankheit) hervor. Dabei handelt es sich um eine chronisch granulomatöse Gastroenteritis (Harris et al. 2001), die im Krankheitsbild Ähnlichkeiten zu *M. Crohn* aufweist. Bislang ist nicht geklärt, ob es sich um eine kausale oder aber zufällige Assoziation von MAP mit *M. Crohn* handelt (Uzoigwe et al. 2007).

Eine wichtige Entdeckung haben Duchmann et al. gemacht. Sie konnten demonstrieren, dass periphere und darmständige T-Zellen von CED-Patienten spezifisch auf *Bifidobacterium*, *Bacteroides* und Enterobakterien (unter anderem *E. coli*) reagieren. Dabei konnten Kreuzreaktivitäten der T-Zellen gegenüber diesen Bakterienspezies beobachtet werden. Daraus folgt, dass die T-Zellantwort möglicherweise gegen Antigene gerichtet war, die den verschiedenen *Enterobacteriaceae* gemein und somit evolutionär konserviert sind (Duchmann et al. 1999).

1.2 Spondylitis ankylosans (*S. ankylosans*)

1.2.1 Krankheitscharakteristika, Ätiologie und Epidemiologie

Spondylitis ankylosans (*S. ankylosans*) gehört neben der Reaktiven Arthritis und Gelenkentzündungen, die in Verbindung mit CED oder Psoriasis vulgaris stehen, zur Gruppe der Spondylarthritiden (SpA). *Spondylitis ankylosans* gilt als schwerste Form der SpA (Sieper et al. 2006). Es handelt sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung, bei der hauptsächlich die Sakroiliakgelenke und die Wirbelsäule betroffen sind. *Spondylitis ankylosans* manifestiert sich häufig im

Alter zwischen 20 und 30 Jahren, wobei Männer doppelt so oft betroffen sind (Braun et al. 2003).

Die Ätiologie von *S. ankylosans* ist nicht vollständig geklärt. Jedoch ist mit dem humanen Leukozyten Antigen Klasse I Molekül B27 (HLA-B27) ein genetischer Faktor mit der Erkrankung assoziiert. HLA-B27 ist ein Molekül des Haupthistokompatibilitätskomplexes I (engl. Major Histocompatibility Complex, MHC I), dessen Funktion darin besteht, den T-Zellrezeptoren auf CD8-positiven (CD8+) zytotoxischen T-Zellen Peptide zu präsentieren.

Brewerton et al. zeigten, dass 85 bis 95% der *S. ankylosans*-Patienten HLA-B27-positiv (HLA-B27+) waren (Brewerton et al. 1973). In Norwegen, Großbritannien und Spanien waren zum Beispiel etwa 93% und in Griechenland etwa 80% der weißen *S. ankylosans*-Patienten HLA-B27+ (Brown et al. 1996; Fernandez-Sueiro et al. 2004; Bakland et al. 2005). HLA-B27 ist im gesamten eurasischen Raum verbreitet, jedoch in genetisch isolierten Bevölkerungen von Urvölkern Südamerikas, des äquatorialen und südlichen Afrikas und Australiens kaum vorhanden (Khan 1995).

Je geringer die Entfernung zum Nordpol ist, desto höher liegt die Prävalenzrate von HLA-B27 in der Normalbevölkerung. Im nördlichen Norwegen waren etwa 16% der Normalbevölkerung HLA-B27+, während dies im südlichen Norwegen nur bei 10% der Fall war (Gran et al. 1984). In Deutschland, Großbritannien und Spanien waren etwa 9% der Normalbevölkerung HLA-B27+ (Brown et al. 1996; Braun et al. 1998; Fernandez-Sueiro et al. 2004), hingegen in Kuwait und Japan waren nur 4% bzw. weniger als 1% HLA-B27+ (Alharbi et al. 1996; Hukuda et al. 2001).

Bezüglich der Inzidenz- und Prävalenzrate von *S. ankylosans* wurde ebenfalls eine Nord-Süd-Variation diskutiert. Während in Norwegen, Finnland und Minnesota (USA) jährliche Inzidenzraten von etwa 7/100.000 festgestellt werden konnten (Carbone et al. 1992; Kaipainen-Seppänen et al. 2000; Bakland et al. 2005), lag die Inzidenzrate in Griechenland bei 1,5/100.000 (Alamanos et al. 2004). Die Prävalenzrate lag in Norwegen bei 1,1 bis 1,4% (Gran et al. 1985), in Deutschland

bei 0,86% (Braun et al. 1998) und in Griechenland bei 0,03% (Alamanos et al. 2004).

Diese Daten legen die Vermutung nahe, dass die Höhe der Prävalenzrate von HLA-B27 in der Normalbevölkerung mit höheren Prävalenz- und Inzidenzraten von *S. ankylosans* korreliert. So gibt es in Japan eine niedrige Prävalenzrate von HLA-B27 in der Normalbevölkerung sowie niedrige Prävalenz- und Inzidenzraten von SpA (Hukuda et al. 2001). Laut einer Studie aus dem Jahr 2000 waren HLA-B27 und *S. ankylosans* in den Bevölkerungen Subsahara-Afrikas nahezu nicht existent (Mijiyawa et al. 2000). Anders verhielt es sich in Gambia, wo es keinen Fall von *S. ankylosans* gab. Allerdings lag die Prävalenzrate von HLA-B27 in der Normalbevölkerung bei 6% (Brown et al. 1997a). Diese Rate liegt ähnlich hoch wie beispielsweise in Europa. Offenkundig gibt es in Gambia keine Assoziation zwischen HLA-B27 und *S. ankylosans*.

Bereits 1977 wiesen Khan et al. nach, dass in den USA 48% der afro-amerikanischen und 94% der weißen *S. ankylosans*-Patienten HLA-B27+ waren. Somit war bei afro-amerikanischen Patienten eine geringere Assoziation zu HLA-B27 vorhanden. Demnach waren sie einem geringeren Risiko ausgesetzt, an *S. ankylosans* zu erkranken (Khan et al. 1977).

Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass weniger als 5% der HLA-B27+ Individuen eine *S. ankylosans* entwickeln (Reveille 2006), weisen auf die Beteiligung von weiteren genetischen Faktoren und/oder Umweltfaktoren an der Pathogenese hin. Hinweise hierfür lieferten Zwillingsstudien, die demonstrierten, dass 75% der monozygoten Zwillingspaare und nur 12,5% der dizygoten Zwillingspaare konkordant für *S. ankylosans* waren (Brown et al. 1997b). Des Weiteren zeigte eine Studie, dass Polymorphismen in den Genen des IL-23-Rezeptors und der Aminopeptidase ARTS1 mit *S. ankylosans* assoziiert sind (Burton et al. 2007).

1.2.2 Bakterien und Spondylarthritiden (SpA)

Eine mögliche Beteiligung der kommensalen intestinalen Flora an der Pathogenese von *S. ankylosans* bei zumindest HLA-B27+ Patienten wurde in einem Tiermodell für *S. ankylosans* und SpA aufgezeigt. HLA-B27+ transgene Ratten entwickelten in der Gegenwart der kommensalen intestinalen Flora Gelenkentzündungen und Entzündungen der Darmmukosa, ähnlich derer, die bei CED beobachtet werden. Dagegen zeigten die Ratten unter keimfreien Bedingungen keine dieser Symptome (Taurog et al. 1994).

Möglicherweise geht der Pathogenese von *S. ankylosans* eine bakterielle Infektion oder der Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen voraus. Hierfür sprechen, dass sich bei der Reaktiven Arthritis Gelenkentzündungen nach Infektion mit Enterobakterien, wie *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* und *Campylobacter*, im Darm oder mit *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*) im Urogenitaltrakt entwickeln (Sieper et al. 1996). Zudem entwickeln bis zu 20% der HLA-B27+ Patienten mit Reaktiver Arthritis eine *S. ankylosans* (Leirisalo-Repo 1998). So konnten Antigene von *Yersinia* und *Salmonella* in der Synovialflüssigkeit oder -membran von Patienten mit Reaktiver Arthritis nachgewiesen werden (Granfors et al. 1989; Granfors et al. 1990; Hammer et al. 1990).

Kuon et al. konnten HLA-B27-restringierte Peptide von *C. trachomatis* identifizieren, die CD8+ T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Reaktiver Arthritis stimulierten (Kuon et al. 2001). Diese Daten weisen eine mögliche pathogene Rolle von HLA-B27 hin. In diesem Kontext greift die „arthritogene Peptid-Theorie“. Sie besagt, dass bestimmte Subtypen von HLA-B27 spezifische arthritogene Peptide binden, die danach CD8+ T-Zellen stimulieren (Kuon et al. 2003). Hierzu könnten möglicherweise Peptide von Bakterien zählen, die Reaktive Arthritis induzieren. Aufgrund von Kreuzantigenität mit Autoantigenen könnten HLA-B27-Peptid-Komplexe autoreaktive CD8+ T-Zellen stimulieren, die wiederum zur Schädigung der Gelenke beitragen. Dies bestätigten Atagunduz et al.. Sie konnten bei HLA-B27+ *S. ankylosans*-Patienten HLA-B27-restringierte T-Zellantworten von CD8+ T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit gegen ein Knorpelantigen-Peptid nachweisen

(Atagunduz et al. 2005). Jedoch ist noch nicht bekannt, ob dieses Peptid für die Pathogenese von *S. ankylosans* relevant ist.

Neben der potenziellen Reaktivität von CD8⁺ T-Zellen konnten proliferative T-Zellantworten von CD4⁺ T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Reaktiver Arthritis gegenüber *Chlamydia trachomatis* demonstriert werden (Sieper et al. 1991). Ferner lieferten CD4⁺ T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Reaktiver Arthritis spezifische proliferative Antworten gegenüber Lysaten von Bakterien, die zuvor bei diesen Patienten die Arthritis induziert hatten (Gaston et al. 1989).

Mehrere Studien offenbarten zudem Reaktivitäten von T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Reaktiver Arthritis gegenüber evolutionär konservierten bakteriellen Proteinen. So zeigten T-Zellen proliferative Antworten gegenüber 2 immundominanten Antigenen von *Y. enterocolitica*. Bei einem dieser Proteine handelt es sich um das hochkonservierte 50 S ribosomale Protein L23 (Mertz et al. 1994). In einer anderen Studie konnten Mertz et al. demonstrieren, dass Hitzeschockproteine 60 (Hsp60) von *Y. enterocolitica*, *C. trachomatis*, *Borrelia burgdorferi* und des Menschen proliferative Antworten mit Th1- und Th2-ähnlichen Zytokinsekretionsmuster bei CD4⁺ T-Zellen auslösten (Mertz et al. 1998). Thiel et al. zeigten, dass *Yersinia*-Hsp60-spezifische T-Zellen eines Patienten mit humanem Hsp60 kreuzreagierten (Thiel et al. 2006).

1.3 Klinische Gemeinsamkeiten zwischen *S. ankylosans* und CED

Etwa 6% der SpA-Patienten entwickeln langfristig eine CED (Mielants et al. 1995; De Vos et al. 1996), wengleich histologische Analysen von Darmbiopsien bei etwa 60% der *S. ankylosans*-Patienten entzündliche Läsionen im Darm offenbarten, die denen des *M. Crohn* ähneln (Mielants et al. 1988). Umgekehrt entwickelten 4 bis 8% der CED-Patienten eine *S. ankylosans*. So offenbarten 3 verschiedene Studien, dass 7,8% (Purmann et al. 1988), 3,9% (de Vlam et al. 2000) und 3,7% (Palm et al. 2002) der CED-Patienten an *S. ankylosans* erkrankten. Palm et al. zeigten zudem, dass 73% dieser CED-

S. ankylosans-Patienten HLA-B27+ waren. Dagegen wurde bei CED-Patienten eine Prävalenzrate von HLA-B27 in Höhe von 13% ermittelt (Palm et al. 2002).

Des Weiteren kann es bei CED-Patienten zu rheumatischen Manifestationen wie der Peripheren Arthritis und Sakroiliitis kommen. Periphere Arthritis wurde bei 10% der *M. Crohn*-Patienten und bei 6% der *C. ulcerosa*-Patienten nachgewiesen (Orchard et al. 1998). Dagegen wurde Sakroiliitis bei 23% der *M. Crohn*-Patienten radiologisch diagnostiziert. Interessanterweise war die Sakroiliitis nicht mit HLA-B27, sondern mit CARD15/NOD2-Polymorphismen assoziiert (Peeters et al. 2004).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, evolutionär konservierte Proteine und Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* rekombinant herzustellen und anschließend mit Hilfe eines T-Zell-Assays die potenzielle Rolle dieser Proteine an der Immunpathogenese des *M. Crohn* und der *S. ankylosans* systematisch zu untersuchen.

Anhand der von Duchmann et al. beschriebenen Kreuzreaktivitäten von peripheren und darmständigen T-Zellen von CED-Patienten gegenüber *Bifidobacterium*, *Bacteroides* und Enterobakterien (Duchmann et al. 1999) wurde im Rahmen dieser Arbeit postuliert, dass *M. Crohn*-Patienten *in vitro* eine erhöhte periphere T-Zellantwort gegenüber evolutionär konservierten Proteinen von *E. coli* K12 zeigen. Aufgrund der großen Zahl von 4460 Genen, die im Genom von *E. coli* K12 enthalten sind (Karp et al. 2007), hatte die Vorgehensweise, evolutionär konservierte Proteine testen zu wollen, den Vorteil, dass eine überschaubare Zahl von Proteinen für die rekombinante Herstellung in Betracht kamen.

Daneben sollten unterschiedliche Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* hergestellt werden, um eine Reihe nicht konservierter Proteine von *E. coli* im Repertoire zu haben. Dabei richtete sich die Auswahl der Pathogenitätsfaktoren nach der Maßgabe, viele der unterschiedlichen pathogenen *E. coli* zu repräsentieren.

Die Unterscheidung zwischen konservierten Proteinen und Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* gestattete die Untersuchung möglicher Unterschiede zwischen konservierten und nicht konservierten Proteinen in ihrem Potential, periphere CD4+ T-Zellen zu stimulieren.

Die Proteine sollten mit Hilfe einer Hochdurchsatzmethode hergestellt werden. Sämtliche Proteine sollten mit einem N-terminalen Tandem aus 7 Histidinen (His₇) fusioniert und in *E. coli* zur Expression gebracht werden, um nachfolgend die affinitätschromatografische Reinigung der Proteine zu gewährleisten. Hierbei lag die Herausforderung darin, die relativ große Zahl von Proteinen in ausreichender Menge herzustellen.

Bei der Konzeption dieser Arbeit wurde davon ausgegangen, dass aufgrund geringerer Löslichkeit nicht alle His₇-fusionierten Proteine in ausreichenden Mengen hergestellt werden können. Um die Löslichkeit und somit die Ausbeute der betreffenden Proteine zu steigern, sollten diese mit alternativen Fusionspartnern wie MBP (engl. Maltose Binding Protein), GST (Glutathion S-Transferase) und NusA (engl. N-utilizing substance A) zur Expression gebracht werden. Die Reinigung dieser Fusionsproteine sollte ebenfalls mit Hilfe eines His₇-Tandems erfolgen.

Für den Nachweis von antigenspezifischen Gedächtnis-T-Zellen wurde auf das von Suni et al. beschriebene Vollblut-Assay zurückgegriffen. Hierbei wurde dem Vollblut für einige Stunden *ex vivo* Antigen zugegeben und das Oberflächenmolekül CD28 kostimuliert. Anschließend wurden die Erythrozyten lysiert und die Lymphozyten gegen intrazelluläre Zytokine und den Aktivierungsmarker CD69 mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch analysiert (Suni et al. 1998). Im Gegensatz zum Proliferations-Assay (Lyons et al. 1994) erlaubt der Vollblut-Assay die Identifizierung von T-Zellen, die mit Effektor-Funktionen reagieren. Anstelle von CD69 wurde im Rahmen dieser Arbeit CD40Ligand (CD40L) als Aktivierungsmarker verwendet. Dieser wurde zuvor als universeller Marker für die Aktivierung von antigenspezifischen T-Zellen beschrieben (Frentsch et al. 2005).

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien

Tab. 1: Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) und Roth (Karlsruhe) bezogen, außer:

Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
APS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Betain	Serva, Heidelberg
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
dNTPs (100 mM)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Glycogen (20 mg/ml)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
IPTG	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lysozym	Roche, Mannheim
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
PMSF	Roche, Mannheim
Polymyxin-B Kugeln	Chemicell, Berlin
Precision Plus Protein Standard (10-250 kDa)	Bio-Rad, USA
Restriktionsendonukleasen	NEB und MBI Fermentas
SAP	Roche, Mannheim
T4-DNA-Ligase	NEB, USA
T4-DNA-Polymerase	NEB, USA
<i>Taq</i> -Polymerase	MPI f. molekulare Genetik, Berlin
TEMED	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Thiamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
1 Kb Plus DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
β -Mercaptoethanol	Fluka, Seelze

2.2 Kits

Tab. 2: Verwendete Kits

Expand High Fidelity PCR System	Roche, Mannheim
Gateway-Technologie	Invitrogen, Karlsruhe
Genopure ds: DNA purification Kit	Bruker Daltonics, Bremen
Plasmid Mini, Maxi, Giga Kits	Qiagen, Hilden

2.3 Antibiotika

Tab. 3: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammkonzentration [mg/ml]	Arbeitskonzentration [μ g/ml]
Ampicillin	50	100
Chloramphenicol	34	34
Kanamycin	50	25

2.4 Bakterienstämme

Tab. 4: Verwendete Stämme von *E. coli* für Transformationen

<i>E. coli</i>	Genotyp	Hersteller
SCS1	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rk- mk+) supE44 relA1</i>	Stratagene, USA
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^f ZdeltaM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Stratagene, USA
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)</i>	Novagen, USA
DB3.1	F ⁻ <i>gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(r_B⁻, m_B) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Sm^R) xyl-5 λ- leu mtl1</i>	Invitrogen, Karlsruhe

Tab. 5: Verwendete Stämme von *E. coli* für genomische DNA-Präparationen

	<i>E. coli</i>	Bezogen von
	K12 (DSMZ 5695)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
a	E2348	Stuart Knutton (Institute of Child Health, University of Birmingham, UK)
b	DSMZ 10973	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
c	536	Helge Karch (Institut für Hygiene, Universitätsklinikum Münster)
d	147/1	Helge Karch
e	DSMZ 9029	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
f	DSMZ 8698	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
g	DSMZ 8579	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
h	042	Chantal Le Bouguéneec (Institut Pasteur, Paris)
i	6228/00	Helge Karch
j	7272/96	Helge Karch
k	7343/96	Dr. Gericke (Robert Koch-Institut, Wernigerode)

2.5 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tab. 6: Verwendete monoklonale Antikörper für die Durchflusszytometrie

Spezifität	Klon	Fluoreszenz-Markierung	Hersteller
CD4	SK3	PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
CD40L	TRAP1	PE / APC	BD Pharmingen, Heidelberg
IFN- γ	B27	APC	BD Pharmingen, Heidelberg
V β 17	ET185	PE	Immunotech, Hamburg

2.6 Sonstige Verbrauchsmaterialien

Tab. 7: Verwendete sonstige Verbrauchsmaterialien

Centriprep Zentrifugen-Filtereinheiten	Millipore, Schwalbach
Chroma Spin-1000 DEPC-H ₂ O Säulen	Clontech, Heidelberg
Elektroporationsküvetten	Biorad, USA
Heparin-Blutröhrchen (Vakutainer)	Becton Dickinson, Heidelberg
NAP-5 Säulen	GE Healthcare, Freiburg
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar, Bodenheim
Plastikküvetten (Photometer)	Eppendorf, Hamburg
Quarz-Küvette für UV-Spektroskopie	Hellma, Müllheim
Reaktionsgefäße (0,5 ml und 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml und 50 ml)	Becton Dickinson Falcon, Heidelberg
Slide-A-Lyzer Dialysekassetten	Pierce, USA
Sterilfilter aus Supormembran für Spritzen (0,2 µm)	Pall, Dreieich
Sterilfilter für Flaschen (0,45 µm)	Nalgene, U.K.
12 ml-Zellkultur Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
15 ml-Polypropylen Säulen mit Fritten	Qiagen, Hilden
24-Tiefloch-Platte	BrandTech, USA
96-Loch-Filterplatte	Macherey & Nagel, Düren
96-Loch-Platte	Nunc, Wiesbaden
96-Thermoloch-Platte	Costar, Bodenheim
96-Tiefloch-Platte	BrandTech, USA

2.7 Geräte

Tab. 8: Verwendete Geräte

BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank Function Line	Heraeus, Hanau
DNA-Elektrophorese Sub-Cell Modell 96	Biorad, USA
Durchflusszytometer FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Elektroporationsgerät Gene Pulser II	Biorad, USA
Fotodokumentation LAS-1000	Fuji, Düsseldorf
Heizblock Dri-Block DB-3D	Techne, Reutlingen
PCR Multi Cycler Modell PTC-200	Peltier, USA
pH-Meter pHM82	Radiometer Copenhagen, Dänemark
Protein-Elektrophorese Mighty Small II	Hoefler Scientific, USA
Roboter Speedy	Zinsser Analytic, Frankfurt a. M.
Schüttler Innova 4430	New Brunswick Scientific, USA
Schüttler Orbital Shaker	Forma Scientific, USA
Schüttler PST-60HL plus	lab4you, Berlin
Spektralphotometer Cary 50 Scan	Varian Instruments, USA
Waage APX-200	Denver Instruments, USA
Waage BL 1500S	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge Avanti J-20 XP	Beckmann Coulter, München
Zentrifuge 4K15	SIGMA, Osterode am Harz
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg

2.8 Medien

Medien und Lösungen wurden im Autoklaven sterilisiert (121°C, 20 min, 1,3 bar).
Lösungen, die nicht autoklaviert werden konnten, wurden steril filtriert.

LB-Medium	10 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt; 10 g NaCl; auf 1000 ml mit bidest. H ₂ O aufgefüllt; pH 7,0
SB-Medium	A) SB: 12 g Trypton; 24 g Hefeextrakt; 4 ml Glycerol; auf 1000 ml mit bidest. H ₂ O aufgefüllt B) 20x KPБ: 46 g KH ₂ PO ₄ ; 243 g K ₂ HPO ₄ ; auf 1000 ml mit bidest. H ₂ O aufgefüllt Die Lösungen wurden separat autoklaviert und SB mit 1x KPБ versetzt.
SOB-Medium	20 g Bactotrypton; 5 g Hefeextrakt; 0,5 g NaCl; 0,186 g KCl; auf 1000 ml mit bidest. H ₂ O aufgefüllt; pH 7.0 Nach Sterilisierung wurde 5 ml steriles 2 M MgCl ₂ zugegeben.
2x YT-Medium	16 g Bactotrypton; 10 g Hefeextrakt; 5 g NaCl; auf 1000 ml mit bidest. H ₂ O aufgefüllt; pH 7,0
2x YT Agar	2x YT-Medium wurde mit 1,5% Agar versetzt

2.9 Puffer und Lösungen

Benzonase (grade II)	25 Einheiten/ μ l Benzonase wurden aufgenommen in 20 mM Tris (pH 8,0); 2 mM $MgCl_2$; 20 mM NaCl; 50% (v/v) Glycerol; bei $-20^\circ C$ aufbewahrt
Benzonasepuffer	20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 1,2 mM $MgCl_2$; 0,1 Einheiten/ μ l Benzonase von Stammlösung
Coomassie-Entfärbelösung	20% Ethanol; 7,5% Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	1,25 g Coomassie Brillant Blue R-250 wurden in 225 ml Ethanol gelöst; 225 ml bidest. H_2O und 50 ml Essigsäure wurden zugeben und 2 h gerührt; die Färbelösung wurde mit Filterpapier gefiltert
10x DNA-Probenpuffer	2,5 ml EDTA (von 0,5 M Stammlösung); 12,5 g Ficoll400 (25%); 0,025 g Bromphenolblau; 0,025 g Xylencyanol; auf 50 ml mit bidest. H_2O aufgefüllt
Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 300 mM NaCl; 500 mM Imidazol
FACS-Puffer	PBS; 0,5% (w/v) BSA; 0,1% (w/v) Natriumazid
10x HMFM	A) 5 mM $MgSO_4 \times 4 H_2O$; 20 mM Na_3 -Citrat $\times 2 H_2O$; 85 mM $(NH_4)_2SO_4$; 45% (v/v) Glycerol B) 0,66 M KH_2PO_4 ; 1,3 M K_2HPO_4 ; Die Lösungen wurden separat autoklaviert und anschließend wurden 4 Volumenteile von Lösung A mit einem Volumenteil von Lösung B vereint.
Imidazol (5 M)	5 M Imidazol in bidest. H_2O ; bei $4^\circ C$ aufbewahrt

MATERIAL

IPTG (1 M)	1 M IPTG in bidest. H ₂ O; bei -20°C aufbewahrt
Lysepuffer	20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 0,1 mM EDTA; 0,17 mg/ml PMSF
Lysozym (Stammlösung)	10 mg/ml Lysozym wurden aufgelöst in 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) und 150 mM NaCl; bei -20°C aufbewahrt
Lysozypuffer	20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 0,5% Brij 58; 0,2 mg/ml Lysozym (von Stammlösung)
PBS	8 g NaCl; 0,2 g KCl; 1,44 g Na ₂ HPO ₄ ; 0,24 g KH ₂ PO ₄ ; auf 1000 ml mit bidest. H ₂ O aufgefüllt; pH 7,4
10x PCR-Puffer	0,5 M KCl; 1% Tween-20; 15 mM MgCl ₂ ; 0,5 M Tris-Base; 150 mM Tris-HCl
PMSF (50 mg/ml)	50 mg/ml PMSF wurden aufgelöst in Ethanol; bei -20°C aufbewahrt
Puffer A	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris-HCl; 6 M Guanidin-HCl; pH 8,0
Puffer B	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris-HCl; 8 M Harnstoff; pH 8,0
Puffer C	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris-HCl; 8 M Harnstoff; pH 6,3
Puffer E	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris-HCl; 8 M Harnstoff; pH 4,5

MATERIAL

4x SDS-Probenpuffer	0,2 M Tris-HCl (pH 6,8); 8% (w/v) SDS; 40% (w/v) Glycerol; 0,004% (w/v) Bromphenolblau; 100 mM DTT
SDS-Laufpuffer	100 ml 10x Tris-Glycin-Puffer; 10 ml 10% SDS; auf 1000 ml mit bidest. H ₂ O aufgefüllt
0,5x TBE-Puffer	45 mM Tris-Base; 45 mM Borat; 1 mM EDTA; pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl ; 1 mM EDTA; pH 8,0
10x Tris-Glycin-Puffer	0,25 M Tris-Base; 1,92 M Glycin
Waschpuffer	20 mM Tris-HCl (pH 8,0); 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol

3 METHODEN

3.1 Blutabnahme bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen

Gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der Charité Berlin und der Einverständniserklärung aller Probanden wurde Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* sowie gesunden Kontrollpersonen peripheres Blut in Heparinröhrchen entnommen. Der untersuchende Arzt stellte individuelle Daten der Patienten wie Geschlecht, Alter, Diagnose, Datum der Diagnosestellung und Medikation zur Verfügung. Für die Diagnose des *M. Crohn* stand der Crohn's Disease Activity Index zur Verfügung (Best et al. 1976). Die Diagnose der *S. ankylosans* erfolgte mit Hilfe des Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) (Garrett et al. 1994).

3.2 Identifizierung der LUCA-Proteine von *E. coli* K12

Kyrpides et al. konnten eine Gruppe von 246 evolutionär konservierten Proteinfunktionen ermitteln, die in den Vertretern der 3 biologischen Reiche Archaea, Prokarya und Eukarya vorkommen. Hierzu war eine Suche mit allen offenen Leserastern (engl. Open Reading Frame) des Archaeabakteriums *Methanococcus jannaschii* in der Proteinsequenz-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) nötig (Kyrpides et al. 1999). Die entsprechenden 246 LUCA-Proteinfunktionen im Genom von *E. coli* K12 wurden mit Hilfe der Protein-Datenbank des NCBI, der Biocyc-Datenbank (<http://www.biocyc.org>) und der Brenda-Enzymdatenbank (Schomburg et al. 2004) (<http://www.brenda-enzymes.info>) identifiziert. Für den Fall, dass diese Vorgehensweise nicht zur Identifizierung von LUCA-Proteinfunktionen im *E. coli* K12-Genom führte, wurden mit Hilfe des BlastP-Algorithmus (Altschul et al. 1997) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) die entsprechenden LUCA-Proteinsequenzen von *Methanococcus jannaschii* (Kyrpides et al. 1999) mit den *E. coli* K12-Proteinsequenzen verglichen. Mit Hilfe dieser kombinierten Strategie gelang es, insgesamt 223 LUCA-Proteine von *E. coli* K12 zu ermitteln.

3.3 Identifizierung der ECHH-Proteine von *E. coli* K12

Mit Hilfe des BlastP-Algorithmus erfolgte der Vergleich aller Proteinsequenzen von *E. coli* K12 mit den entsprechenden humanen Proteinen, um die Proteine von *E. coli* K12 mit den größten Homologien zu humanen Proteinen zu identifizieren. LUCA-Proteine wurden aus dieser Gruppe entfernt. Insgesamt konnten auf diese Weise 48 ECHH-Proteine identifiziert werden.

3.4 Identifizierung von Pathogenitätsfaktoren von *E. coli*

Pathogenitätsfaktoren von verschiedenen *E. coli*-Pathovaren wurden ebenfalls mittels der Protein-Datenbank des NCBI identifiziert.

3.5 Molekularbiologische Arbeiten

3.5.1 Isolierung genomischer DNA von *E. coli*

Um die Gene der konservierten Proteine und der Pathogenitätsfaktoren mit Hilfe der PCR amplifizieren zu können, musste zuvor genomische DNA von *E. coli* mittels Cetylhexatrimethylammoniumbromid (CTAB)-Extraktion isoliert werden. Bei diesem Vorgang werden Zellbestandteile wie Proteine und Polysaccharide durch Komplexbildung mit CTAB abgetrennt (Ausubel et al. 2001).

80 ml LB-Medium wurde mit dem entsprechenden *E. coli*-Stamm beimpft und 16 h bei 37°C kultiviert. Die Flüssigkultur wurde in ein steriles 250 ml-Polypropylen-Zentrifugenröhrchen transferiert und zentrifugiert (8000 x g, 10 min). Das Zellpellet wurde resuspendiert in 10 ml 20 mM Tris-Cl (pH 8,0), 100 µg/ml Proteinase K, 0,5% SDS, 1 mM CaCl₂ und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Suspension wurde 1 h bei 50°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 2 ml 5 M NaCl (714 mM NaCl in Suspension). Dann wurde sie gemischt und mit 1,8 ml CTAB/NaCl (Stamm: 100 g/l CTAB, 700 mM NaCl, steril filtriert) ergänzt (10 g/l CTAB in Suspension). Nach erneuter Mischung wurde die Suspension für weitere 10 min bei 65°C inkubiert. Ein Volumenteil Chloroform/isoamyalkohol (24:1) wurde zugegeben und mit der Suspension vermischt. Nach der Zentrifugation (3880 x g, 15 min) wurde der

wässrige Überstand in ein neues 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumenteil Phenol/Chloroform/isoamylalkohol gemischt und erneut zentrifugiert (8000 x g, 15 min). Der Überstand wurde in ein neues 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 0,6 Volumenteile Isopropylalkohol unter Schwenken des Gefäßes zugegeben. Der DNA-Faden wurde mit einer Pasteurpipette aufgewickelt und einmal in -20°C kaltem Ethanol und zweimal in +20°C warmen Ethanol gewaschen, indem die DNA 2 min eingetaucht und leicht geschwenkt wurde. Die DNA wurde 2 min an der Luft getrocknet und in 500 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.5.2 Präzipitation von DNA

Um DNA zu präzipitieren wurden 0,1 Volumenteile Natriumacetat, 2,5 Volumenteile 100% Ethanol (-20°C) und 1 µl Glycogen der Reihe nach zugegeben und gemischt. Dieses Gemisch wurde 1 h bei -20°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (20.000 x g, 4°C, 20 min). Das DNA-Pellet wurde zweimal mit je 200 µl 75% Ethanol (-20°C) gewaschen (20.000 x g, 4°C, 5 min). Die DNA wurde 10 min an der Luft getrocknet und in 10 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.5.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde in wässriger Lösung photometrisch ermittelt (Sambrook et al. 1989). Dabei wurde die Absorption bei 260 nm ($A_{260 \text{ nm}}$) gemessen und aus diesem Wert die Konzentration errechnet. Eine $A_{260 \text{ nm}} = 1$ doppelsträngiger DNA entspricht etwa einer Konzentration von 50 µg/ml.

3.5.4 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA konnte mit Hilfe von Plasmid-Kits laut Empfehlungen des Herstellers (Qiagen, Hilden) isoliert werden. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte mit Chroma Spin-1000 DEPC-H₂O Säulen gemäß den Empfehlungen des Herstellers (Clontech, Heidelberg).

3.5.5 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsendonukleasen vom Typ II, wie *Bam*HI, *Not*I und *Bg*III, erkennen palindromische Tetra- bis Oktanukleotidsequenzen. Innerhalb dieser Erkennungssequenzen hydrolisieren sie die Phosphodiesterbindungen der DNA. Dabei entstehen überhängende 5'- bzw. 3'-Enden oder glatte Enden. Demgegenüber hydrolisieren Restriktionsendonukleasen vom Typ I, wie *Bpi*I und *Eco*31I, Phosphodiesterbindungen abseits der Erkennungssequenzen. DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl mit 10 Einheiten je Restriktionsenzym 16 h gemäß den Empfehlungen der Hersteller (NEB, USA; MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verdaut.

3.5.6 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Die Alkalische Phosphatase der Eismeergarnele *Pandalus borealis* (engl. Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP) katalysiert die Dephosphorylierung der 5'-Phosphatgruppe von DNA. Beispielsweise wird dadurch die Religation von zuvor mit Restriktionsenzymen verdauter Plasmid-DNA inhibiert. Plasmid-DNA wurde 1 h mit 1 Einheit SAP laut Empfehlungen des Herstellers (Roche, Mannheim) dephosphoryliert.

3.5.7 Ligation von DNA-Molekülen

DNA-Ligasen katalysieren unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einer freien 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-Hydroxylgruppe und verknüpfen auf diese Weise die Termini von 2 beliebigen DNA-Molekülen. DNA-Fragmente und Plasmid-DNA wurden in einem Volumen von 10 µl mit 0,5 µl T4-DNA-Ligase laut Empfehlungen des Herstellers (NEB, USA) ligiert.

3.5.8 Herstellung und Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen

Die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Inoue et al. (Inoue et al. 1990). Die Transformationen erfolgten in 96-Thermoloch-Platten. Hierzu wurden die Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Je

100 µl der Zellen und 5 µl Plasmidlösung (Ligationsansatz) wurden in die Löcher der gekühlten 96-Thermoloch-Platte gegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Die Platte wurde anschließend sofort im PCR Multi Cyclor platziert und die Zellen für 45 s bei 42°C inkubiert. Direkt im Anschluss wurde die Platte für 5 min auf Eis gestellt. Die Zellsuspensionen kamen danach auf eine 96-Tiefloch-Platte, deren Löcher vorher mit je 0,5 ml 2x YT-Medium mit 20 mM MgCl₂ und 20 mM Glukose gefüllt wurden. Die Kulturen wurden 30 min bei 37°C kultiviert und anschließend zentrifugiert (600 x g, 4°C, 10 min). Je Loch wurden 300 µl vom Überstand abgenommen und die Zellen in den restlichen 300 µl Medium resuspendiert. 200 µl der Zellsuspensionen wurden jeweils auf Selektivmedium ausgebreitet und 16 h bei 37°C inkubiert.

Die Herstellung elektro-kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (Hanahan 1983). Für die Transformationen wurden die Zellen zunächst auf Eis aufgetaut und je 30 µl mit 5 µl Plasmidlösung (Ligationsansatz) in einem gekühltem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde in eine Elektroporationsküvette mit 0,1 cm Spaltbreite übertragen und diese in das Elektroporationsgerät gestellt. Die Elektroporation wurde mit folgenden Einstellungen des Geräts durchgeführt: 1,66 kV, 200 W, 25 µF. Sofort wurden die Zellen in 1 ml 2x YT-Medium mit 20 mM MgCl₂ und 20 mM Glukose übertragen und die Kulturen 30 min bei 37°C kultiviert. 200 µl der Zellsuspensionen wurden jeweils auf Selektivmedium ausgebreitet und 16 h bei 37°C inkubiert.

3.5.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wird ein definierter DNA-Abschnitt wiederholt synthetisiert, so dass es zur Vermehrung (Amplifikation) des spezifischen DNA-Fragmentes kommt. Hierbei wird zunächst der DNA-Doppelstrang denaturiert. Bei der folgenden Abkühlung der Umgebungstemperatur binden 2 gewählte Oligonukleotide antiparalell (5'-Primer und 3'-Primer) an die komplementären Einzelstränge und stellen die Startpunkte der DNA-Synthese dar. Die Temperatur, bei der die Primer binden (Hybridisierung), hängt von deren Schmelztemperatur ab. Für die DNA-Synthese ist eine DNA-Polymerase verantwortlich, die die zugegebenen dNTPs in

die wachsende DNA-Kette einbaut. Die Dauer der Strangsynthese ist abhängig von der Länge des Amplifikats, d.h. je 1000 bp Fragmentlänge sollte die Elongationsphase 1 min dauern.

3.5.9.1 Amplifizierung von Genabschnitten

Unter Verwendung des Expand High Fidelity PCR Systems (Roche, Mannheim) wurden die Gene der konservierten Proteine und der Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* aus genomischen DNA-Präparationen amplifiziert.

Die Sequenzen der genspezifischen Primer wurden mit dem Programm Primer3 (Rozen et al. 2000) und mit der Oligo6 Software (Molecular Biology Insights, Inc.) ermittelt. In den Sequenzen sämtlicher 5'-Primer wurden die Start-Codons der zu amplifizierenden Gene nicht berücksichtigt, da die Proteine anschließend N-terminal mit einem His₇-Tandem fusioniert werden sollten. Des Weiteren wurden die Sequenzen der 3'-Primer so gewählt, dass diese stromabwärts des Stopp-Codons hybridisieren. Sämtliche Primer wiesen eine Schmelztemperatur von etwa 55°C auf. Mit Hilfe der Primer wurden Erkennungsequenzen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I am 5'-Ende bzw. am 3'-Ende der PCR-Produkte eingefügt. Im Fall des Vorhandenseins von intragenischen Erkennungssequenzen für *Bam*HI wurde auf das Restriktionsenzym *Bgl*II zurückgegriffen, das identische Überhänge produziert. Alternativ wurden die Erkennungsequenzen für die TypI-Restriktionsendonukleasen *Bpi*I oder *Eco*31I eingefügt, um *Bam*HI- und *Not*I-Überhänge zu generieren.

Sämtliche Primer wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert. Mit Hilfe des Roboters wurden 5'-und 3'-Primer getrennt voneinander jeweils in einer 96-Loch-Platte neu angeordnet. Da sich die 5'-und 3'-Primer einer PCR identische Positionen auf den beiden Platten teilten, war es möglich, bis zu 96 PCR-Ansätze zeitgleich in einer 96-Thermoloch-Platte anzusetzen. Die Standard-PCR in einem Volumen von 75 µl setzte sich wie folgt zusammen:

2 µl (17 ng/µl)	DNA-Substrat
0,5 µl (1,75 U)	Expand-Polymerase
0,15 µl (0,2 mM)	je dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
7,5 µl	10x Expand-Puffer (ohne MgCl ₂)
7,5 µl (2,5 mM)	10x MgCl ₂
2,25 µl (22,5 pmol)	5'-Primer
2,25 µl (22,5 pmol)	3'-Primer
52,4 µl	bidest. H ₂ O

Tab. 9: Protokoll der Expand-PCR mit Zeitgradienten bei der Strangsynthese

A	1 Zyklus	Initiale Denaturierung	5 min bei 95°C
B	10 Zyklen	Denaturierung Primer-Hybridisierung Strangsynthese	30 s bei 95°C 30 s bei 50°C 1 min bei 72°C (je 1000 bp DNA)
C	10 Zyklen	Denaturierung Primer-Hybridisierung Strangsynthese (pro Zyklus um je 5 s verlängert)	30 s bei 95°C 30 s bei 50°C 1 min bei 72°C (je 1000 bp DNA)
D	1 Zyklus	Letzte Strangsynthese	15 min bei 72°C

Nach Beendigung der Reaktion erfolgte die Reinigung des Amplifikats mittels Genopure ds: DNA purification Kit gemäß den Empfehlungen des Herstellers. Die Länge und Konzentration des PCR-Produktes wurde anhand eines Agarosegels geschätzt.

3.5.9.2 Kolonie-PCR

Die Klonierung eines amplifizierten Gens in einen Vektor wurde mittels Kolonie-PCR überprüft. Hierzu wurde eine Einzelkolonie mit einem Zahnstocher in den Reaktionsansatz überführt. Die Kolonie-PCR in einem Volumen von 30 µl stellte sich wie folgt zusammen:

Zellen	DNA-Substrat
0,8 µl	<i>Taq</i> -Polymerase
0,8 µl (65 µM)	dNTP-Mix (2,5 mM)
7,5 µl (1,25 M)	Betain (5 M)
3 µl	10x PCR-Puffer
1,2 µl (12 pmol)	5'-Primer
1,2 µl (12 pmol)	3'-Primer
15,5 µl	bidest. H ₂ O

Tab. 10: Protokoll der Kolonie-PCR

A	1 Zyklus	Initiale Denaturierung	5 min bei 95°C
B	30 Zyklen	Denaturierung Primer-Hybridisierung Strangsynthese	30 s bei 95°C 30 s bei 60°C 1 min bei 72°C (je 1000 bp DNA)
C	1 Zyklus	Letzte Strangsynthese	10 min bei 72°C

Nach Beendigung der Reaktion wurde die Länge PCR-Produktes anhand eines Agarosegels geschätzt.

3.5.10 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese handelt es sich um ein kontinuierliches Trennverfahren, mit dem DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Kleine DNA-Fragmente legen aufgrund der Struktur der Agarose im elektrischen Feld eine größere Strecke zurück als die großen Fragmente. Je nach Anforderung wurden 0,8-1,2 %ige Agarosegele verwendet. Als Puffersystem wurde 0,5x TBE-Puffer verwendet. Die Laufzeit und angelegte Spannung variierte je nach Größe und Konzentration der Agarosegele zwischen 1-3 h bei 70-120 Volt. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld wurde die DNA in den Gelen in einem Ethidiumbromid-Bad (1,3 mg/l) angefärbt. Von den Agarosegelen wurden mit Hilfe der Fotodokumentationsanlage Bilder erstellt.

3.5.11 Herstellung von Plasmid-Vektoren

3.5.11.1 pQTEV2

Sämtliche amplifizierte bakteriellen Gene wurden in den Vektor pQTEV2 (siehe Kapitel 9.2) kloniert. Die Expression von Proteinen mit pQTEV2 lieferte Fusionsproteine bestehend aus dem Zielprotein und einem His₇-Tandem am N-terminalen Ende. Mit Hilfe des His₇-Tandems wurden die Proteine mit Ni-NTA-Agarose gereinigt.

Der Expressionsvektor pQTEV2 [GenBank:EF429248] wurde abgeleitet vom Vektor pQTEV (Bussow et al. 2005). Hierzu wurde der Vektor pQTEV mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* verdaut und anschließend dephosphoryliert. Um in den Vektor pQTEV ein His₇-Tandem, die TEV-Protease-Schnittstelle sowie attB-Sequenzen, die für die Gateway-Rekombination notwendig sind, einzuführen, wurde ein DNA-Fragment mit *EcoRI*- und *HindIII*-Überhängen generiert. Hierzu wurden 9 überlappende Oligonukleotide (je 100 pmol) in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit NEB-Puffer 2 gemischt und 5 min bei 105°C im Heizblock erhitzt (pQTEV2-ds01, pQTEV2-ds02, ara02, ara03, ara04, ara05, ara06, ara07, ara08; siehe Kapitel 9.3.1). Danach wurde das Gerät ausgeschaltet. Das Oligonukleotidgemisch kühlte langsam ab, so dass sich die Oligonukleotide anlagern konnten. Das DNA-Fragment wurde präzipitiert und anschließend mit pQTEV ligiert. Elektro-kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen wurden transformiert und auf 2x YT Agar-Platten mit Ampicillin ausgebreitet. Ausgehend von Einzelkolonien wurden Plasmide isoliert und mit den Primern pQE-65 und pQE-276 (siehe Kapitel 9.3.2) sequenziert. Ein Plasmid-Konstrukt mit erwarteter DNA-Sequenz wurde anschließend mit Hilfe einer Plasmid Giga-Präparation isoliert. Für die Klonierungen wurde der Vektor pQTEV2 mit *BamHI* und *NotI* verdaut und schließlich dephosphoryliert.

Neben pQTEV2 wurden Gateway-Destinationsvektoren hergestellt, die es ermöglichen, Zielproteine mit Hilfe der Gateway-Technologie zeitsparend mit GST, MBP und NusA zu fusionieren. Diese Fusionspartner können die Löslichkeit des Fusionsproteins verbessern.

3.5.11.2 pD-GEX1

Um Zielproteine mit GST zu fusionieren, wurde der Gateway-Destinationsvektor pD-GEX1 (siehe Kapitel 9.2) hergestellt.

Der Vektor pD-GEX1 [GenBank:EF431916] wurde abgeleitet vom Vektor pGEX-5X-1 (GE Healthcare, Freiburg). pGEX-5X-1 wurde mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I verdaut und anschließend dephosphoryliert. Durch Hybridisierung der Oligonukleotide his-tag-pgex-s und his-tag-pgex-as (siehe Kapitel 9.3.1) wurde ein DNA-Fragment mit *Bam*HI- und *Not*I-Überhängen generiert (siehe Kapitel 3.5.11.1), das für ein His₇-Tandem und die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym *Sma*I kodiert. Das DNA-Fragment wurde präzipitiert und mit pGEX-5X-1 ligiert. Anschließend wurden *E. coli* XL1-Blue Zellen transformiert. Ausgehend von Einzelkolonien wurden Plasmide isoliert und mit den Primern pGEX-5' und pGEX-3' (siehe Kapitel 9.3.2) sequenziert. Plasmid-Konstrukte mit erwarteten DNA-Sequenzen wurden mit dem Enzym *Sma*I verdaut und dephosphoryliert. Danach erfolgte die Ligation des Plasmids mit der Gateway-Kassette Rfc.1 (Invitrogen, Karlsruhe) gemäß den Empfehlungen des Herstellers. In Gateway-Kassetten flankieren attP-Sequenzen das Gen für Chloramphenicol-Resistenz (Cm^R) und das Gen *ccdB*, dessen Genprodukt bakterielle Gyrase und somit das Zellwachstum der Wirtszelle hemmt. Daher wurden sämtliche Destinationsvektoren in chemisch-kompetenten *E. coli* DB3.1 Zellen, die im *gyrA*-Gen mutiert sind, propagiert. Die transformierten Zellen wurden auf 2x YT Agar-Platten mit Ampicillin und Chloramphenicol ausgebreitet. Ausgehend von Einzelkolonien wurden Plasmide isoliert und mit den Primern pGEX-5' und pGEX-3' sequenziert. Ein Plasmid mit erwarteter DNA-Sequenz wurde für die Gateway-Klonierung als Destinationsvektor verwendet.

3.5.11.3 pD-MAL1

Der Gateway-Destinationsvektor pD-MAL1 (siehe Kapitel 9.2) wurde hergestellt, um Zielgene mit MBP zu fusionieren.

Der Vektor pD-MAL1 [GenBank:EF431917] wurde abgeleitet vom Vektor pMAL-c2X (NEB, USA). pMAL-c2X wurde mit den Restriktionsenzymen *Sac*I

und *HindIII* verdaut und anschließend dephosphoryliert. Durch Hybridisierung der Oligonukleotide his-tag-pmal-s und his-tag-pmal-as (siehe Kapitel 9.3.1) wurde ein DNA-Fragment mit *SacI*- und *HindIII*-Überhängen generiert, das ebenfalls für ein His₇-Tandem und die Erkennungssequenz für das Enzym *SmaI* kodiert. Ab diesem Punkt wurde weiter gearbeitet wie unter Kapitel 3.5.11.2 beschrieben. Allerdings wurden die Plasmide mit den Primern MalE und M13-Forward (siehe Kapitel 9.3.2) sequenziert. Ein Plasmid mit erwarteter DNA-Sequenz wurde für die Gateway-Klonierung als Destinationsvektor verwendet.

3.5.11.4 pD-Nus1

Der Gateway-Destinationsvektor pD-Nus1 (siehe Kapitel 9.2) wurde hergestellt, um Zielgene mit NusA zu fusionieren.

Der Vektor pD-Nus1 [GenBank:EF431918] wurde abgeleitet vom Vektor pET-44a (Novagen, USA). pET-44a wurde mit den Restriktionsenzymen *SacII* und *XhoI* verdaut. Die überhängenden DNA-Enden konnten mit T4-DNA-Polymerase beseitigt werden. Dieses Enzym ist charakterisiert durch die 3'-5'-Exonuklease-Aktivität. Kohäsive Enden werden mit Hilfe des Enzyms zu stumpfen Enden (blunt ends) modifiziert, da überhängende Enden in 3'-5'-Richtung abgebaut und in 5'-3'-Richtung aufgefüllt werden. Unter Verwendung von 1,25 mM dNTPs, 10x Ligase-Puffer und 3 Einheiten T4-DNA-Polymerase wurde die Reaktion 15 min bei 12°C durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde dephosphoryliert und mit der Gateway-Kassette RfA ligiert. Chemisch kompetente *E. coli* DB3.1 Zellen wurden transformiert und auf 2x YT Agar-Platten mit Ampicillin und Chloramphenicol ausgebreitet. Die Plasmide wurden mit den Primern Colidown und Nus-tag (siehe Kapitel 9.3.2) sequenziert. Ein Plasmid mit erwarteter DNA-Sequenz wurde für die Gateway-Klonierung als Destinationsvektor verwendet.

3.5.12 Klonierung der amplifizierten Gene in den Vektor pQTEV2

Nachdem die PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen verdaut wurden, erfolgte eine visuelle Abschätzung der DNA-Mengen auf Agarosegelen. In der Regel wurden 4 µl PCR-Produkt mit 2,5 µl bidest. H₂O gemischt. Für den Fall, dass PCR-Produkte schwach vorhanden waren, wurden die PCR-Produkte unverdünnt

belassen. Je 6,5 µl des PCR-Produktes wurden mit 2 µl (etwa 16 ng) pQTEV2 (*Bam*HI und *Not*I verdaut), 0,5 µl T4-DNA-Ligase und 1 µl 10x Ligase-Puffer in ein Loch einer 96-Thermoloch-Platte pipettiert. Die Platte wurde mit Folie abgedeckt und die Ansätze 1 h bei 20°C im PCR Multi Cycler inkubiert. Nach Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* SCS1 Zellen wurde jeder Transformationsansatz auf eine einzelne 2x YT Agar-Platte mit Ampicillin aufgetragen und 16 h bei 37°C inkubiert.

3.5.13 Herstellung von Glycerolkulturen

Zur Herstellung von Glycerolkulturen wurden je 200 µl Glycerolmedium (2x YT-Medium, 1x HFMF, Ampicillin, 2% Glukose) in die Löcher einer 96-Loch-Platte vorgelegt und mit Hilfe eines Zahnstochers mit je einer Einzelkolonie beimpft. Die 96-Loch-Platte wurde 16 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend bei -80°C aufbewahrt.

3.5.14 Selektion von Expressionsklonen

Jeweils 6 Einzelkolonien einer Transformation wurden mit sterilen Zahnstochern in je ein Loch einer 96-Loch-Platte mit jeweils 200 µl Glycerolmedium überführt. Die 96-Loch-Platte wurde 16 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei -80°C gelagert. Mit diesen Glycerolkulturen wurde die Kolonie-PCR mit den Primern pQE-65 und pQE-276 (siehe Kapitel 9.3.2) durchgeführt. Da die Primer stromauf- und abwärts des Polylinkers von pQTEV2 binden, konnte bei der Kolonie-PCR die eingefügte DNA-Sequenz amplifiziert und anschließend die Länge dieses PCR-Produkts auf einem Agarosegel analysiert werden. Bei erwarteter Fragmentlänge wurden 2 positive Klone pro Transformation für die Proteinexpression in einer neuen 96-Loch-Platte in Glycerolmedium subkultiviert.

3.5.15 Gateway-Rekombination

Für den Fall, dass nach Expression der Fusionsproteine mit dem Vektor pQTEV2 keine ausreichenden Mengen gereinigt werden konnten, wurden die Zielproteine mit Hilfe der Gateway-Technologie mit den Fusionspartnern MBP, NusA und

GST fusioniert. Diese können die Löslichkeit des Fusionsproteins verbessern und dadurch die Ausbeute des gereinigten Proteins steigern. Hierfür wurden die Gateway-Destinationsvektoren pD-MAL1, pD-GEX1 und pD-Nus1 konstruiert. Die Expression von Zielproteinen mit diesen Vektoren führt zur N-terminalen Fusionierung mit MBP-His₇, GST-His₇ und NusA-His₆. Die Affinität des His-Tandems zu Ni-NTA-Agarose wurde ausgenutzt, um die Fusionsproteine zu reinigen.

Die Gateway-Technologie (Walhout et al. 2000) basiert auf der Eigenschaft des Bakteriophagen λ , in das Genom seines Wirts *E. coli* durch homologe Rekombination integrieren zu können. Für die Rekombination sind spezifische DNA-Sequenzen im Wirtsgenom und im Phagengenom, genannt att-Sequenzen, erforderlich.

Die Gateway-Klonierung ist schematisch in Abb. 1 dargestellt. Im ersten Schritt wurden die Entryklone hergestellt, indem BP-Reaktionen zwischen pQTEV2 und dem Gateway-Donorvektor pDONR221 gemäß den Empfehlungen des Herstellers (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt wurden. Bei pQTEV2 flankieren attB-Sequenzen das Zielgen. Bei pDONR221 flankieren attP-Sequenzen das Gen für Cm^R und das *ccdB*-Gen, dessen Genprodukt bakterielle Gyrase und somit das Zellwachstum hemmt. Außerdem trägt pDONR221 das Gen für Kanamycin-Resistenz (Kan^R). Eine erfolgreiche BP-Reaktion bewirkt die Integration des Zielgens in pDONR221, während *ccdB* und das Gen für Cm^R in pQTEV2 integriert werden. *Escherichia coli* XL1-Blue Zellen wurden transformiert und auf 2x YT Agar-Platten mit Kanamycin ausgebreitet. Die Selektion der Entryklone erfolgte über Kan^R. Des Weiteren sorgt das Genprodukt des *ccdB*-Gens für eine negative Selektion. Die Entryklone wurden mittels Kolonie-PCR mit den Primern M13-Forward und M13-Reverse analysiert. Diese Primer binden stromauf- und abwärts der att-Sequenzen, damit das Zielprotein bei der PCR amplifiziert und das PCR-Produkt auf Agarosegel analysiert werden kann.

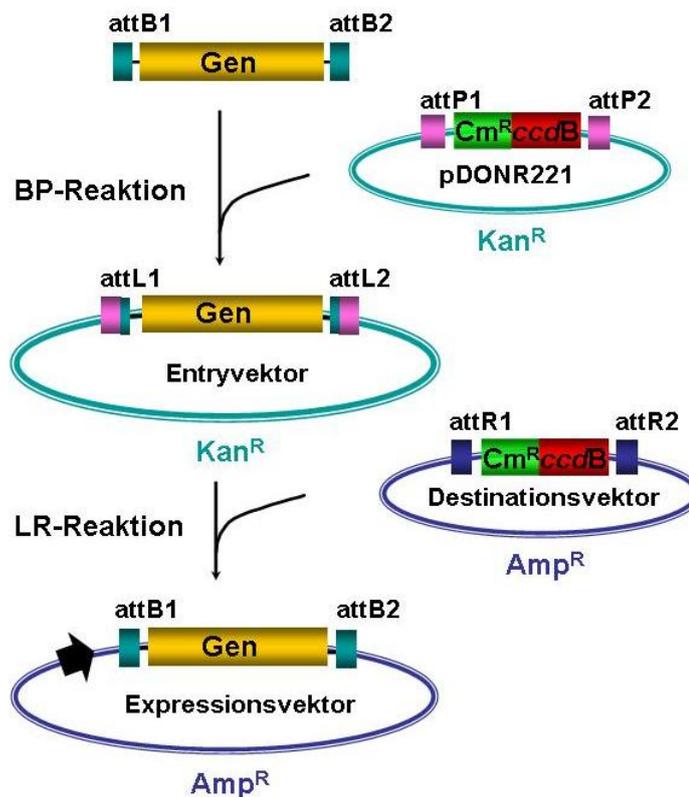


Abb. 1: Schematische Darstellung der Gateway-Klonierung. Zielgene werden im Expressionsvektor pQTEV2 von attB-Sequenzen flankiert. Dagegen werden im Donorvektor pDONR221 das Gen für Chloramphenicol-Resistenz (Cm^{R}) und *ccdB*-Gen von attP-Sequenzen flankiert. Zur Herstellung von Entryklonen erfolgte im ersten Schritt die BP-Reaktion zwischen pQTEV2 mit Zielgen und dem Gateway Donorvektor pDONR221 und anschließend die Transformation von kompetenten *E. coli* Zellen mit dem Entryvektor. Die Selektion der Entryklone erfolgte über Kanamycin-Resistenz (Kan^{R}) und über negative Selektion seitens des *ccdB*-Genproduktes. Zur Herstellung von Expressionsklonen wurde die LR-Reaktion zwischen Entryvektor mit Zielgen und Destinationsvektor durchgeführt. Anschließend wurden kompetente *E. coli* Zellen mit dem Expressionsvektor transformiert. Die Selektion der Expressionsklone erfolgte über Ampicillin-Resistenz (Amp^{R}) und über negative Selektion seitens des *ccdB*-Gens.

Im zweiten Schritt wurden die Expressionsklone generiert, indem LR-Reaktionen zwischen den Destinationsvektoren und den Entryvektoren durchgeführt wurden. Bei Entryvektoren flankieren attL-Sequenzen die Zielgene. Die Destinationsvektoren pD-MAL1, pD-GEX1 und pD-Nus1 tragen Gateway-Kassetten, in denen attR-Sequenzen das Gen für Cm^{R} und das *ccdB*-Gen flankieren. Alle Destinationsvektoren vermitteln zudem Ampicillin-Resistenz (Amp^{R}). Eine erfolgreiche LR-Reaktion bewirkt die Integration des Zielgens in

den Destinationsvektor. Umgekehrt werden das *ccdB*-Gen und das Cm^R-Gen in den Entryvektor integriert. *Escherichia coli* SCS1 Zellen wurden mit den LR-Reaktionen mit pD-MAL1 und pD-GEX1 transformiert, während *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit LR-Reaktionen mit pD-Nus1 transformiert wurden. Die Bakterien wurden auf 2x YT Agar-Platten mit Ampicillin ausgebreitet. Die Selektion der Expressionsklone erfolgte über Amp^R und über das Genprodukt des *ccdB*-Gens. Die Analyse der Expressionsklone erfolgte mit Hilfe der Kolonie-PCR und anschließender Agarosegelelektrophorese. Für pD-MAL1-Konstrukte wurden die Primer M13-Forward und MalE, für pD-GEX1-Konstrukte die Primer pGEX-5' und pGEX-3' und für pD-Nus1-Konstrukte die Primer Nus-tag und Colidown verwendet (siehe Kapitel 9.3.2).

3.5.16 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungen von DNA wurden von der Firma Agowa (Berlin) und vom Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin durchgeführt.

3.6 Proteinbiochemische Arbeiten

3.6.1 Expression und native Reinigung von Proteinen im kleinen Maßstab

Wie bereits zuvor beschrieben, wurden alle amplifizierten Gene von *E. coli* in den Vektor pQTEV2 kloniert, um die Zielproteine mit einem N-terminalen His₇-Tandem zu exprimieren. Die Reinigung der Fusionsproteine erfolgte unter nativen Bedingungen aufgrund der Affinität des His₇-Tandems zu Ni-NTA (siehe Kapitel 3.5.11.1). Je 2 Klone einer Transformation wurden exprimiert und gereinigt.

Um die Proteinmengen nach Expression und Reinigung quantitativ analysieren zu können, erfolgte die Expression sowie die Reinigung unter nativen Bedingungen im kleinen Maßstab nach der automatisierten Methode von Scheich et al. (Scheich et al. 2003). Zudem wurde der Einfluss der Temperatur auf die

Expressionsstärke untersucht. Hierfür wurde die Proteinexpression bei 25°C und 37°C durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert.

Von jedem Klon wurden 2 Flüssigkulturen hergestellt, die in 2 verschiedenen 96-Tiefloch-Platten angeordnet wurden: Je 100 µl 2x YT-Medium mit Ampicillin und 2% Glukose wurden in die Löcher der 2 96-Tiefloch-Platten vorgelegt und inokuliert mit den Glycerolkulturen. Hierfür wurde ein Replikator aus Stahl mit 96 x 6 cm langen Nadeln verwendet. Die Platten wurden mit Kunststoffmatten bedeckt und 16 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Jeweils 900 µl SB-Medium mit Ampicillin und 20 µg/ml Thiamin wurden den Vorkulturen zugegeben und 3 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Proteinexpression wurde induziert durch Zugabe von je 100 µl 11 mM IPTG. Dabei wurde eine Platte 3 h bei 37°C und die andere Platte 6 h bei 25°C schüttelnd inkubiert. Die Kulturen wurden zentrifugiert (600 x g, 4°C, 10 min) und die Zellpellets anschließend bei -80°C aufbewahrt.

Die Reinigung der Fusionsproteine unter nativen Bedingungen erfolgte unter Verwendung des Roboters nach dem Protokoll von Scheich et al. (Scheich et al. 2003). Hierzu wurden die Zellpellets in der 96-Tiefloch-Platte auf Eis aufgetaut und jeweils in 150 µl Lysepuffer 5 min resuspendiert. Jeweils 35 µl Lysozypuffer wurden zugegeben, 1 min geschüttelt und 30 min bei 13°C inkubiert. Jeweils 35 µl Benzonasepuffer wurden zugegeben, 1 min geschüttelt und erneut 30 min bei 13°C inkubiert. Je 20 µl der Lysate wurden in einer 96-Thermoloch-Platte mit 7 µl 4x SDS-Probenpuffer gemischt. Mit diesen Proben erfolgte mittels SDS-PAGE die Analyse der Stärke der Proteinexpression in den Zell-Lysaten. In die restlichen Ansätze wurden jeweils 50 µl einer 50%igen Suspension von Ni-NTA-Agarose (in Waschpuffer äquilibriert) gegeben und 30 min schüttelnd inkubiert. Jeweils 150 µl Waschpuffer wurden zugegeben. Danach wurden die Suspensionen in die Löcher einer 96-Loch-Filterplatte übertragen. Die in den Filtern verbliebene Ni-NTA-Agarose wurde zweimal mit 400 µl Waschpuffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden in eine neue 96-Thermoloch-Platte mit jeweils 60 µl Elutionspuffer eluiert. Diese Proteinlösungen wurden mit jeweils 20 µl 4x SDS-Probenpuffer versetzt und anschließend mit Hilfe der SDS-PAGE bezüglich der Proteinausbeute nach erfolgter Reinigung analysiert.

3.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Expressionstärke der Proteine in den Zell-Lysaten und die Ausbeute der gereinigten Proteine wurde mittels SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli mit 15%igen Polyacrylamid-Trenngelen analysiert (Laemmli 1970).

Sammel- und Trenngel für 4 SDS-PAGE-Gele wurden nach folgenden Angaben hergestellt:

Tab. 11: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngelen für SDS-PAGE

Trenngel (15 % Polyacrylamid)	
bidest. H ₂ O	6,9 ml
10% SDS	300 µl
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	7,5 ml
Rotiphorese Gel 30 (30% Acrylamid/Bisacrylamid, 29:1)	15 ml
10% APS	300 µl
TEMED	12 µl
Sammelgel (4% Polyacrylamid)	
bidest. H ₂ O	8,9 ml
10% SDS	150 µl
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	3,8 ml
Rotiphorese Gel 30	2 ml
10% APS	150 µl
TEMED	15 µl

Für 1 SDS-PAGE-Gel wurden etwa 7 ml Trenngel in die Glasvorrichtung gegeben und sofort danach mit 500 µl Butanol übergeschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels wurde das Butanol abgegossen und das Gel mit 0,1% SDS gespült. Der Gelkamm wurde eingefügt und etwa 3 ml Sammelgel eingegossen. Nach Polymerisation des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die Geltaschen mit 0,1% SDS ausgespült. Das Gel wurde danach in die mit SDS-Laufpuffer gefüllte Elektrophorese-Apparatur gestellt.

Die Proben wurden 10 min bei 100°C erhitzt und anschließend in die Geltaschen gegeben. Als Größenmarker diente Precision Plus Protein Standard. Bei einer Spannung von 80 Volt wurden die Proben bis in das Trenngel hinein laufen gelassen. Danach wurde die SDS-PAGE bei einer Spannung von 180 Volt weitergeführt.

Nach Beendigung der SDS-PAGE erfolgte die Färbung des Gels für 1 h mit Coomassie-Färbelösung. Nach der Entfärbung wurden die Gele für die Dokumentation gescannt.

Die Expressionsstärke der Proteine in den Zell-Lysaten und die Ausbeute der gereinigten Proteine wurde visuell beurteilt. Dabei wurden folgende Kategorien verwendet: 3 (starke), 2 (moderate), 1 (schwache) und 0 (keine).

3.6.3 Expression und native Reinigung von Proteinen im großen Maßstab

Anhand der Ergebnisse der Proteinreinigungen im kleinen Maßstab, wurden die Kulturvolumina für den großen Maßstab angepasst. Bei starker und moderater Proteinausbeute wurden die Proteinexpressionen in 100 ml bzw. 150 ml Kulturen durchgeführt. Für eine Kultur von 100 ml wurde folgendes Protokoll angewendet:

5 ml SB-Medium mit Ampicillin und 20 µg/ml Thiamin wurde mit einer Glycerolkultur beimpft und 16 h bei 37°C schüttelnd inkubiert. 95 ml vorgewärmtes SB-Medium mit Ampicillin und Thiamin wurde zugegeben und die Kultur bis zu einer $OD_{600nm} = 1,5$ kultiviert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert für 6 h bei 25°C oder 4 h bei 37°C. Nach Zentrifugation der Kulturen (4000 x g, 4°C, 15 min) in einem 50 ml-Reaktionsgefäß wurde das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Proteinreinigung unter nativen Bedingungen wurde das Zellpellet zunächst 15 min auf Eis aufgetaut und in 3 ml Lysepuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit 450 µl Lysozym gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Zell-Lysat wurde mit 600 µl Benzonasepuffer (20 mM Tris, pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 0,4 Einheiten/µl Benzonase) gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation des Lysats (4900 x g, 4°C, 45 min) wurde der Überstand in ein Loch einer 24-Tiefloch-Platte übertragen und 600 µl der 50%igen Suspension der Ni-NTA-Agarose zugegeben. Die Platte wurde 30 min bei 10°C schüttelnd inkubiert und das Gemisch bestehend aus Lysat und

Ni-NTA-Agarose in ein Loch einer 96-Loch-Filterplatte übertragen. Die Ni-NTA-Agarose wurde sechsmal mit 1,5 ml Waschpuffer gewaschen. Gebundenes Protein wurde mit 600 µl Elutionspuffer eluiert. Um Ni²⁺-Ionen, die dabei von der Matrix gelöst werden können zu binden, wurde der Proteinlösung 0,5 mM EDTA zugefügt. Die Umpufferung des Proteins in PBS wurde mit einer NAP-5 Säule (GE Healthcare, Freiburg) laut Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

3.6.4 Reinigung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen

Anders als konservierte Proteine von *E. coli* K12 wurden Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Zunächst wurden die Zellpellets auf Eis aufgetaut. Die Zellpellets wurden in 5 ml Puffer A je Gramm Zellpellet resuspendiert und 16 h bei 20°C schwenkend inkubiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (4000 x g, 20°C, 60 min) und der Überstand in ein neues 50 ml-Reaktionsgefäß dekantiert. Dem Überstand wurde 1 ml einer 50%igen Suspension von Ni-NTA-Agarose (in Puffer A äquilibriert) zugegeben und 30 min schwenkend inkubiert. Das Lysat-Ni-NTA-Gemisch wurde auf eine 15 ml-Polypropylen-Säule mit einer Fritte übertragen. Nachdem die Flüssigkeit durchgeflossen war, wurde die Ni-NTA-Agarose mit 15 ml Puffer B und anschließend zweimal mit 15 ml Puffer C gewaschen. Gebundenes Protein wurde mit 10 ml Puffer E eluiert und mit Centriprep Zentrifugen-Filtereinheiten bis zu einem Volumen von etwa 1 ml konzentriert. Danach erfolgte die Neutralisierung des pH-Wertes der Proteinlösung durch Zugabe von 0,1 Volumenteilen 1 M H₃PO₄-1 M Na₂HPO₄ (pH 7,4).

LPS wurde wie in Kapitel 3.6.5 beschrieben beseitigt. Danach wurde die Proteinlösung zunächst 1 h gegen Puffer E dialysiert. Schließlich wurde die Proteinlösung viermal gegen 0,1%ige Essigsäure dialysiert (Verdünnungsfaktor je Schritt: 1000).

3.6.5 Entfernung von Lipopolysacchariden (LPS) mit Polymyxin-B

Da während der Lyse von bakteriellen Zellen LPS freigesetzt werden kann, welches wiederum auf die *in vitro*-Stimulation peripheren Blutes störend wirken

könnte (Bekeredjian-Ding et al. 2006; Schroder et al. 2006; West et al. 2006), wurde ein zusätzlicher Schritt für die Entfernung von LPS eingeführt. Hierzu wurde Polymyxin-B verwendet, dessen Affinität zum Lipid A von LPS ausgenutzt wurde (Anspach 2001). Polymyxin-B neutralisierte die Aktivität von LPS in peripheren mononukleären Blutzellen (Tsuzuki et al. 2001). Um LPS aus Proteinlösungen zeitsparend zu entfernen, wurden Polymyxin-B-ummantelte magnetische Kugeln verwendet. Je Proteinlösung wurden 10 mg der Polymyxin-B-Kugeln in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Dabei wurden die Kugeln mit PBS vorsichtig gemischt und das Reaktionsgefäß in einen Magneten gestellt. Nach einer Inkubation von 5 min wurde der Puffer aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Die Proteinlösung wurde vorsichtig mit den Polymyxin-B-Kugeln gemischt und 30 min bei 4°C schwenkend inkubiert. Schließlich wurde das Reaktionsgefäß 10 min in den Magneten gestellt und die Proteinlösung vorsichtig aus dem Reaktionsgefäß in ein neues überführt.

3.6.6 Sterilisation von Proteinlösungen

Die Proteinlösungen wurden unter Verwendung von Sterilfiltern mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert.

3.6.7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentration wurde anhand der $A_{280\text{ nm}}$ und des Extinktionskoeffizienten, welcher von der Aminosäuresequenz abgeleitet wird, bestimmt (Mach et al. 1992).

3.6.8 *Limulus* Amoebozyten Lysat (LAL) -Test

Die Bestimmung der Konzentration von LPS in Proteinlösungen wurde mit Hilfe des LAL-Tests durch die Firma Profos AG (Regensburg) durchgeführt.

3.6.9 Herstellung von Proteingemischen

Sämtliche Proteine wurden auf eine einheitliche Konzentration von 500 µg/ml mit PBS (nativ gereinigte Proteine) oder mit 0,1%iger Essigsäure (denaturiert gereinigte Proteine) eingestellt.

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Blut konnten die peripheren T-Zellen nicht mit einzelnen Proteinen stimuliert werden. Stattdessen erfolgte die Stimulation peripherer T-Zellen mit Proteingemischen. Die Gemische enthielten jeweils 10 nach Molekulargewicht geordnete konservierte Proteine, so dass insgesamt 20 „vertikale“ Proteingemische hergestellt wurden. Zudem wurden 20 „horizontale“ Proteingemische hergestellt, wie in Tab. 12 dargestellt. Auf diese Weise wurde jedes konservierte Protein in 2 unterschiedliche Gemische verteilt. Daher ist bei stimulierenden Proteingemischen die Identifizierung von immunogenen Proteinen an der „Schnittstelle“ der „vertikalen“ und „horizontalen“ Gemische möglich.

Tab. 12: Anordnung von 196 konservierten Proteinen und 4 Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* in der „Proteinmatrix“. Je 10 Proteine wurden in 20 vertikalen Proteingemischen verteilt (1-20). Zudem wurden je 10 Proteine in 20 horizontalen Proteingemischen verteilt (A-T). Dadurch wurde gewährleistet, dass jedes Protein in 2 unterschiedlichen Proteingemischen enthalten war. Auf diese Weise war es möglich, ein immunogenes Protein zu identifizieren, wenn beide entsprechenden Gemische stimulierend waren. Alle Proteingemische hatten jeweils eine Proteinkonzentration von 500 µg/ml. Die Gemische 20, Q, R, S und T wurden mit 4 Pathogenitätsfaktoren aufgefüllt.

Gemisch	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	63	100	31	28	37	10	6	61	20	229
B	2	111	238	25	121	120	62	110	30	39
C	142	97	41	119	241	53	35	86	125	117
D	54	5	128	245	136	22	75	59	87	56
E	101	55	11	9	227	137	18	43	226	236
F	13	107	32	33	237	118	85	82	140	122
G	71	26	40	57	115	67	78	16	66	252
H	12	69	81	8	234	103	91	29	95	68
I	42	45	246	233	251	114	94	79	224	253
J	38	84	83	255	242	44	72	36	131	89

Gemisch	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
K	60	235	51	239	132	102	259	141	76	127
L	23	17	74	129	254	230	161	145	151	7
M	70	231	250	240	105	109	156	143	88	1
N	65	80	135	14	243	27	144	249	98	90
O	77	15	106	225	96	104	153	52	92	34
P	49	247	24	248	124	160	150	146	47	99
Q	48	50	116	228	19	159	155	152	93	Tir
R	73	256	112	4	139	138	257	148	244	DsbA
S	46	133	232	134	64	157	154	147	3	EspB
T	21	58	130	126	123	258	158	149	108	EspF

3.7 *in silico*-Arbeiten

3.7.1 Bestimmung des Codon-Adaptations-Index (CAI)

Der CAI (Sharp et al. 1987) ist ein Indikator dafür, wie nahe die Codon-Usage eines Proteins am Optimum liegt, das von Referenzproteinen vorgegeben wird. Mit Hilfe des CAI kann die Codon-Usage eines Proteins mit dem Erfolg seiner Expression korreliert werden. Die CAI aller konservierten Proteine wurden mit dem EMBOSS Software Paket (4.0.0) bestimmt (Rice et al. 2000).

3.7.2 Bestimmung von seltenen Codons

Seltene Codons in den Proteinen wurden mittels NIH rare Codon Calculator analysiert (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>).

3.7.3 Bestimmung von Transmembranhelices

Transmembranhelices in den Proteinen wurden mit Hilfe des CBS prediction servers TMHMM (2.0)(Krogh et al. 2001) analysiert (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>).

3.7.4 Statistische Analysen

Statistische Auswertungen wurden mit Graphad Prism Software Version 4 durchgeführt. Hierfür wurden der Mann-Whitney-Test oder der Fisher's exact test verwendet. Unterschiede wurden bei $p < 0,05$ als signifikant erachtet. In den Diagrammen sind die Medianwerte durch horizontale Linien dargestellt.

3.8 Immunologische Arbeiten

3.8.1 *in vitro*-Stimulation von peripheren CD4+ T-Zellen

CD4+ T-Zellen können in peripherem Blut spezifisch durch Antigene stimuliert werden. Hierfür nehmen antigenpräsentierende Zellen Antigene auf, prozessieren diese intrazellulär und präsentieren sie über Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes II (MHC II) den T-Zellen. In Folge dessen können diese aktiviert werden und produzieren Zytokine. Das Zytokinexpressionsmuster kann durchflusszytometrisch analysiert werden. An der Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen sind neben der Interaktion der MHC II-Moleküle mit dem CD3-Komplex noch weitere Moleküle beteiligt. Eines dieser kostimulatorischen Moleküle ist das Molekül CD28, das auf der Oberfläche von T-Zellen exprimiert wird. CD28 bindet die Moleküle CD80 und CD86, die beide auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden. Die Zugabe von Antikörpern gegen CD28 (anti-CD28) in die Stimulationsansätze verstärkt diese Kostimulation.

Die Stimulation von heparinisiertem Vollblut erfolgte unter Zugabe von 1 µg/ml anti-CD28 (Klon CD28.2, BD Pharmingen, Heidelberg) in 12 ml-Zellkulturröhrchen. Je 1 ml Blut wurde 5 µg/ml der *E. coli*-Proteine (als Gemisch oder Einzelprotein), oder 10 µg/ml *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB; Sigma-Aldrich, Deisenhofen), oder 4 µg/ml Cytomegalievirus Phosphoprotein 65 kDa (CMV pp65; Miltenyi, Bergisch-Gladbach), oder 20 Limes flocculation/ml Tetanus Toxoid (TT; Chiron-Behring, Marburg) zugegeben. Das SEB diente als Positivkontrolle. Dagegen fungierten CMV pp65 und TT als „Recall-Antigene“. Neben den verschiedenen Antigenstimulationen wurde jeweils eine Blutprobe als Negativkontrolle mitgeführt, die ohne Antigen jedoch mit anti-CD28 inkubiert wurde.

Die Zellkulturröhrchen wurden mit 5-10° Neigung im Brutschrank 6 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, um eine größtmögliche Kontaktfläche zwischen der Blutprobe und der Oberfläche des Röhrchens zu gewährleisten. Für die letzten 4 h der Stimulation wurde jeweils 10 µg/ml des Sekretionsinhibitors Brefeldin A (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) zugegeben. Brefeldin A inhibiert die Sekretion der produzierten Zytokine, so dass diese intrazellulär akkumuliert werden. Um Zellinteraktionen so wenig wie möglich zu stören, wurde darauf geachtet, dass die Röhrchen nach Zugabe von Brefeldin A in der gleichen Lage in den Brutschrank gelegt wurden wie in den 2 h zuvor auch geschehen.

3.8.2 Erythrozytenlyse, Fixierung und Permeabilisierung von Leukozyten

Nach Beendigung der Stimulationen erfolgte die Zugabe von 2 mM EDTA. Die Ansätze wurden mit dem Vortexmischer 5 s kräftig gemischt und 15 min bei 20°C inkubiert, um die Zellen von der Oberfläche der Röhrchen zu lösen. FACS Lysing Solution (Becton Dickinson, Heidelberg) wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers zugegeben, um die Erythrozyten zu lysieren und die Leukozyten zu fixieren. Für die anstehende intrazelluläre Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern wurden die Leukozyten mit FACS Permeabilizing Solution 2 (Becton Dickinson, Heidelberg) gemäß den Empfehlungen des Herstellers permeabilisiert.

3.8.3 Markierung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Zytokinen

Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper gegen Oberflächenmoleküle und Zytokine ermöglichen die durchflusszytometrische Analyse und Quantifizierung von Immunzellen. Dadurch können verschiedene Zellpopulationen unterschieden und ihre Zytokinmuster analysiert werden.

Durch Verwendung der Antikörper anti-human CD4-Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (anti-CD4-PerCP), anti-human CD40L-Phycoerythrin (anti-CD40L-PE) und anti-human INF- γ -Allophycocyanin (anti-IFN- γ -APC) wurden CD4⁺ T-Zellen, die CD40L und IFN- γ exprimieren, durchflusszytometrisch erfasst. CD40L diente als Aktivierungsmarker (siehe Abb. 2).

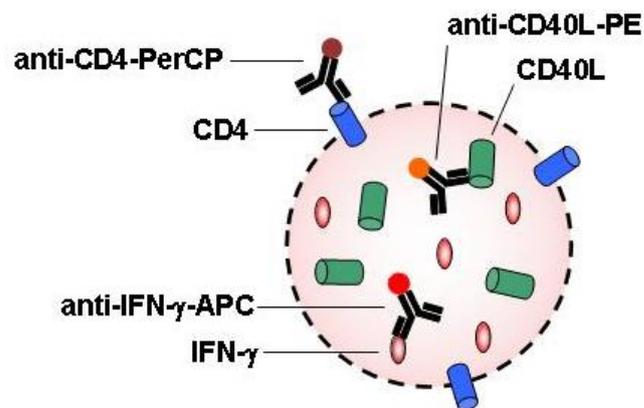


Abb. 2: Schematische Darstellung der Markierung von CD4⁺ T-Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern für die Durchflusszytometrie. Das Oberflächenmolekül CD4 wurde mit anti-CD4-PerCP markiert. Dagegen erfolgte die Markierung von CD40L und IFN- γ intrazellulär mit anti-CD40L-PE und anti-IFN- γ -APC. Mit Hilfe der Antikörper wurden die T-Zellen anschließend durchflusszytometrisch erfasst.

In FACS-Puffer und in der Gegenwart von 1 mg/ml Beriglobin (Chiron-Behring, Marburg) wurden die Zellen 1:10 mit anti-CD4-PerCP, 1:50 mit anti-CD40L-PE und 1:300 mit anti-IFN- γ -APC markiert und 30 min bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Beriglobin bindet an FC-Rezeptoren und verhindert dadurch unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper. Nach den Markierungen

wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen (400 x g, 4°C, 10 min) und für die Messung in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen.

In einem anderen Ansatz wurden die Antikörper anti-CD4-PerCP, anti-CD40L-APC und anti-Vβ17-PE eingesetzt, um die Frequenzen der CD4+/Vβ17+ T-Zellen und die Frequenzen der aktivierten CD4+/Vβ17+ T-Zellen nach Stimulierung mit SEB zu erfassen. Als Aktivierungsmarker diente CD40L. Die fixierten und permeabilisierten Zellen wurden 1:10 mit anti-CD4-PerCp, 1:5 mit anti-CD40L-APC und 1:10 mit anti-Vβ17-PE markiert.

3.8.4 Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie können Zellen aufgrund ihrer Eigenschaft, Licht zu streuen, analysiert werden. Hierbei lassen sich Größe und Granularität der Zellen mit Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC und SSC) ermitteln. Außerdem können Zellen mit spezifischen Antikörpern, an die verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, markiert werden. Im Durchflusszytometer werden die Farbstoffe (PerCp, PE, APC) über Laser angeregt, so dass sie das Licht verschiedener Wellenlängen emittieren. Detektoren messen das Licht der entsprechenden Wellenlängen, so dass sich die Intensität je Zelle in einem Punkt-Diagramm darstellen lässt.

Die Durchflusszytometrie wurde mit Hilfe eines FACSCalibur Durchflusszytometers (Becton-Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Bei jeder Messung wurden nach Möglichkeit 200.000 CD4+ T-Zellen aufgenommen. Mittels Cell Quest Pro Software (Becton Dickinson, Heidelberg) konnten die Frequenzen der CD4+ T-Zellen analysiert werden, die doppel-positiv für CD40L und IFN-γ (CD40L+/ IFN-γ+) waren (siehe Abb. 3). Des Weiteren erfolgte die Erfassung der Frequenzen von CD4+/CD40L+/Vβ17+ T-Zellen und CD4+/Vβ17+ T-Zellen. Als positive T-Zellantwort wurde gewertet, wenn die T-Zellfrequenzen im Vergleich zur Negativkontrolle mindestens dreifach erhöht vorlagen.

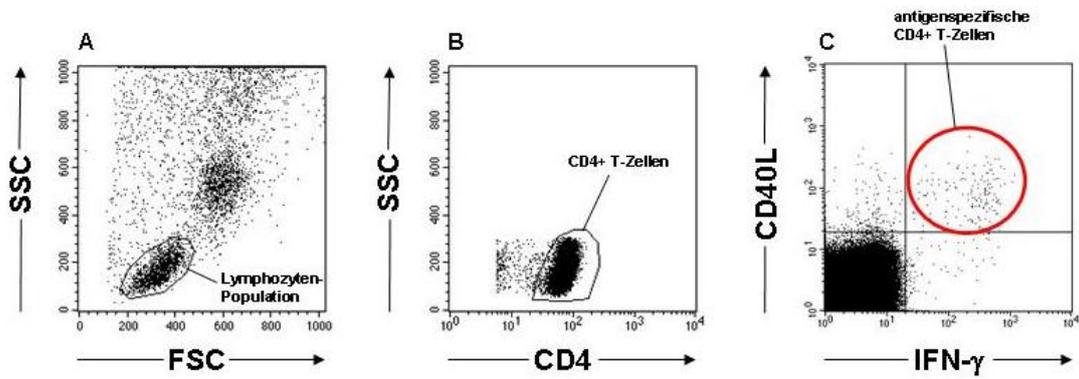
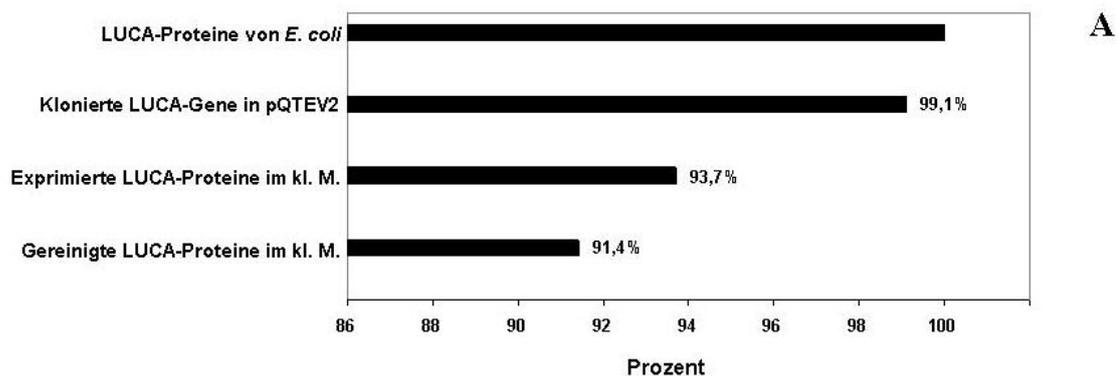


Abb. 3: Vorgehensweise bei der Durchflusszytometrie. Mit Hilfe des Durchflusszytometers erfolgte ausgehend von der Lymphozyten-Population aus peripherem Blut (A.) die Erfassung von CD4+ T-Zellen (B.), die doppel-positiv für CD40L und IFN- γ (CD40L+/IFN- γ +) waren (roter Kreis, C.). Für die Erfassung der CD4+/CD40L+/V β 17+ T-Zellen wurde ähnlich vorgegangen, mit der Ausnahme, dass an Stelle von IFN- γ die Expression von V β 17 gemessen wurde. FSC = Vorwärtsstreulicht; SSC = Seitwärtsstreulicht.

4 ERGEBNISSE

4.1 Klonierung und Expression von LUCA-Proteinen in pQTEV2

Von 246 LUCA-Proteinen (Kyrpides et al. 1999) konnten 223 entsprechende Gene im Genom von *E. coli* K12 identifiziert werden (siehe Kapitel 9.1). Insgesamt wurden 221 dieser Gene erfolgreich in den Expressionsvektor pQTEV2 kloniert. Im kleinen Maßstab war die Expression von 209 His₇-fusionierten Proteinen im Zellextrakt nach Zell-Lyse nachweisbar. Von diesen 209 Proteinen war die Reinigung von 204 Proteinen unter nativen Bedingungen mit Ni-NTA-Agarose erfolgreich (Abb. 4 A).



B

Ausbeute der 204 im kleinen Maßstab gereinigten LUCA-Proteine

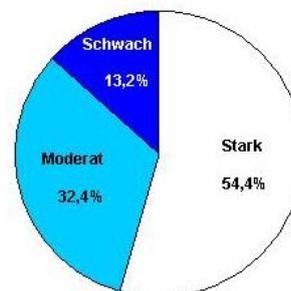


Abb. 4: LUCA-Proteine von *E. coli* - Effizienz der Klonierung der Gene in pQTEV2 und der Proteinexpression und -reinigung im kleinen Maßstab (kl. M.). **A.** Ausgehend von 223 LUCA-Genen von *E. coli* konnten 221 in den Expressionsvektor pQTEV2 kloniert werden. Davon gelang es im kleinen Maßstab 209 Proteine zu exprimieren und anschließend 204 Proteine unter nativen Bedingungen mit Ni-NTA zu reinigen. **B.** Dabei konnten 177 LUCA-Proteine (86,8%) mit zumindest moderaten Mengen gereinigt werden.

Bezüglich der Induktionstemperatur bei der Proteinexpression zeigte sich, dass 161 Proteine bei 37°C und 43 Proteine bei 25°C effizient exprimiert wurden. Davon wurden 111 Proteine mit starker, 66 mit moderater und 27 mit schwacher Ausbeute gereinigt (Abb. 4 B).

Die LUCA-Gene unter den 32 Proteinen, die nicht oder nur mit schwacher Ausbeute gereinigt werden konnten, wurden in Gateway-Destinationsvektoren kloniert. Diese Vorgehensweise zielte darauf ab, die entsprechenden Proteine N-terminal mit MBP-His₇, GST-His₇ und NusA-His₆ zu fusionieren, um die Löslichkeit und möglicherweise die Ausbeute der gereinigten Fusionsproteine zu verbessern (siehe Kapitel 4.3).

4.2 Klonierung und Expression von ECHH-Proteinen in pQTEV2

Von 48 ECHH-Genen konnten 47 erfolgreich in den Vektor pQTEV2 kloniert werden. Im kleinen Maßstab gelang die Expression von 45 His₇-fusionierten Proteinen, wovon 40 Proteine bei 37°C und 5 Proteine bei 25°C effizient exprimiert werden konnten. Sämtliche 45 Proteine wurden im kleinen Maßstab unter nativen Bedingungen mit Ni-NTA-Agarose gereinigt (Abb. 5 A). Dabei ließen sich 36 Proteine mit starker, 7 Proteine mit moderater und 2 Proteine mit schwacher Ausbeute reinigen (Abb. 5 B). Die beiden Gene der letztgenannten Proteine wurden ebenfalls in Gateway-Destinationsvektoren kloniert (siehe Kapitel 4.3).

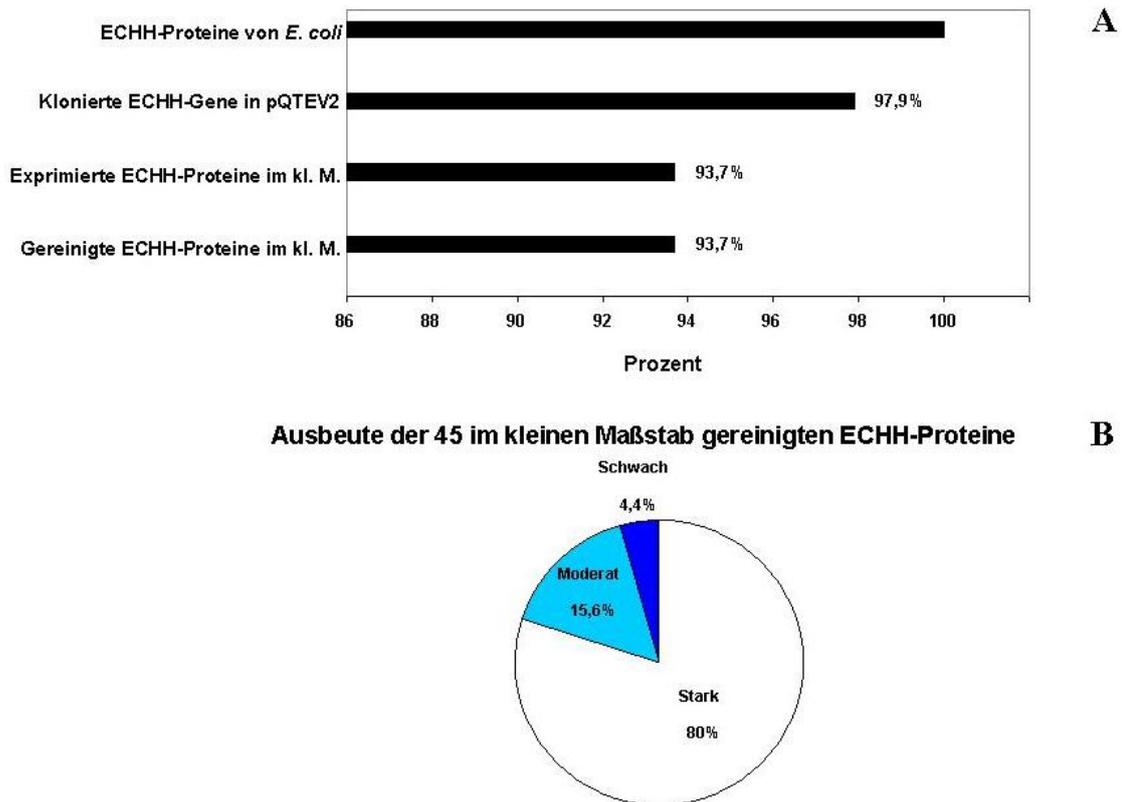


Abb. 5: ECHH-Proteine von *E. coli* - Effizienz der Klonierung der Gene in pQTEV2 und der Proteinexpression und -reinigung im kleinen Maßstab (kl. M.). **A.** Ausgehend von 48 ECHH-Genen von *E. coli* konnten 47 in den Expressionsvektor pQTEV2 kloniert werden. Davon gelang es im kleinen Maßstab 45 Proteine zu exprimieren und anschließend unter nativen Bedingungen mit Ni-NTA zu reinigen. **B.** Dabei konnten 43 ECHH-Proteine (95,6%) mit zumindest moderaten Mengen gereinigt werden.

Insgesamt konnten 14 Proteine (12 LUCA und 2 ECHH) nicht mit dem Expressionsvektor pQTEV2 in *E. coli* SCS1 exprimiert werden. Daneben ließ sich eine Reihe von Proteinen exprimieren, die danach entweder nicht oder aber nur mit schwacher Ausbeute gereinigt werden konnten. Zu den Proteinen, deren Expression nicht gelang, gehören Transportproteine und Enzyme. Mehr als die Hälfte der Transportproteine, die in beiden Proteingruppen vorhanden sind, konnten nicht exprimiert werden. Ein Drittel der ribosomalen Proteine ließ sich nur mit schwacher Ausbeute reinigen. Dagegen war die Reinigung von 187 Enzymen (87,4%), von 15 ribosomalen Proteinen (62,5%) und von 3 Transportproteinen (21,4%) mit zumindest moderater Ausbeute erfolgreich (Tab. 13).

Tab. 13: Verteilung von 48 nicht exprimierten oder schwer zu reinigenden konservierten Proteinen von *E. coli* in funktionellen Gruppen. Im kleinen Maßstab wurde die Expression und Reinigung unter nativen Bedingungen von 268 LUCA- und ECHH-Proteinen analysiert. Die Zahlen in Klammern geben Auskunft über die Gesamtzahlen der Proteine in entsprechenden funktionellen Gruppen. Alle 14 nicht exprimierten Proteine enthalten mindestens 2 Transmembranhelices.

	Enzyme (inkl. putative) (214)	Ribosomale Proteine (24)	Transport- proteine (14)	Putative Struktur- proteine (3)
Nicht exprimiert	6	-	8	-
Nicht gereinigt	3	1	1	-
Gereinigt mit schwacher Ausbeute	18	8	2	1

In Abb. 6 ist beispielhaft die Schätzung der Stärke der Proteinexpression und der Proteinausbeute nach der Reinigung im kleinen Maßstab mit Hilfe der SDS-PAGE dargestellt.

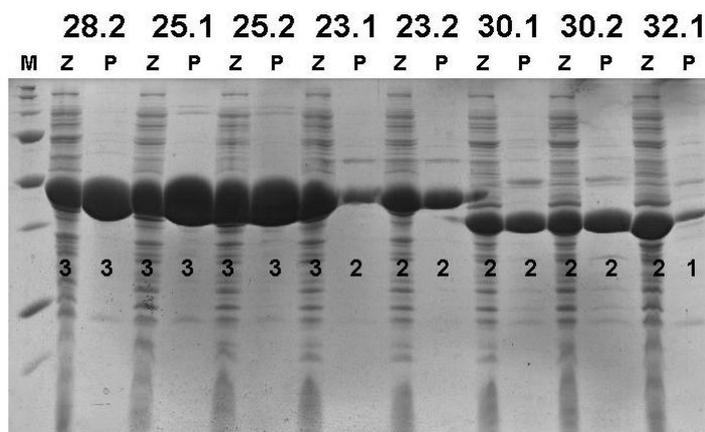


Abb. 6: Analyse der Proteinexpression in den Zellextrakten nach Lyse der Bakterienzellen und der Ausbeute der gereinigten Proteine mittels SDS-PAGE. Zell-Lysate (Z) und gereinigte Proteine (P) wurden mit 4x SDS-Probenpuffer gemischt. Die Proteinbanden wurden mit Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die Ausbeute von exprimierten und gereinigten Proteinen wurde mit folgenden Kategorien, die unter den Proteinbanden dargestellt sind, eingestuft: 3 = stark; 2 = moderat; 1 = schwach. Die Nummern oberhalb des Proteingels bezeichnen die Proteine, die im Kapitel 9.1 aufgelistet sind. Hinweis: Nur einer von 2 Klonen wurde je Protein für die Reinigung im großen Maßstab verwendet.

4.3 Gateway-Klonierungen mit konservierten Genen von *E. coli*

Gene von 34 konservierten Proteinen, die unter nativen Bedingungen nicht oder nur mit schwacher Ausbeute zu reinigen waren, wurden jeweils in die Gateway-

Destinationsvektoren pD-MAL1, pD-GEX1 und pD-Nus1 kloniert. Diese 102 Fusionsproteine wurden jeweils bei 25°C und 37°C im kleinen Maßstab überexprimiert und mit Hilfe von Ni-NTA-Agarose gereinigt. Dadurch konnten optimale Fusionspartner und Expressionstemperaturen ermittelt werden, mit denen sich die Menge der Fusionsproteine nach der Reinigung steigern ließ. Für die nachfolgende Expression im großen Maßstab wurde je Zielprotein diejenige Fusion verwendet, die am effizientesten die Proteinausbeute verbesserte (Tab. 14).

Tab. 14: Gateway-Klonierung von 34 konservierten Genen. Die Ausbeute der gereinigten Proteine wurden mittels SDS-PAGE vor der Gateway-Rekombination (Proteine mit pQTEV2 exprimiert) und nach der Rekombination (jedes Zielprotein fusioniert mit MBP-His₇, GST-His₇ und NusA-His₆) analysiert. Hier ist der Fusionspartner dargestellt, der die Ausbeute des Fusionsproteins am effizientesten verbesserte. Die Proteinausbeute wurde mit folgenden Kategorien eingestuft: 3 = stark; 2 = moderat; 1 = schwach; 0 = nicht gereinigt.

Nr.	Protein	Ausbeute vor Gateway	Fusion mit	Ausbeute nach Gateway
157	aspartokinase I; homoserine dehydrogenase I	1	MBP	3
145	acetolactate synthase III small subunit	1	MBP	3
203	thiogalactoside acetyltransferase	1	MBP	2
200	4-hydroxy-2-ketovalerate aldolase	1	MBP	2
258	putative ATPase	1	MBP	3
204	anthranilate synthase component II	1	MBP	2
155	putative ATP-binding comp. of a transport system	1	MBP	3
201	flagellum-specific ATP synthase	1	MBP	2
259	hypothetical protein (yfcX)	1	MBP	2
156	FFh	1	MBP	2
146	30S ribosomal subunit protein S11	1	MBP	2
147	30S ribosomal subunit protein S13	1	MBP	3
148	50S ribosomal subunit protein L14	1	MBP	3
149	50S ribosomal subunit protein L22	1	MBP	3
151	50S ribosomal subunit protein L23	1	MBP	2
152	30S ribosomal subunit protein S12	1	MBP	2
150	50S ribosomal subunit protein L2	1	MBP	3
154	50S ribosomal subunit protein L1	1	MBP	3
153	Biotin holoenzyme synthetase	1	MBP	3
159	RNA polymerase beta prime subunit	1	MBP	2
143	hypothetical protein (ypeA)	1	MBP	3
144	putative proteoglycan	1	MBP	2
158	endonuclease III	1	MBP	2
161	dihydroxyacid dehydratase	1	MBP	3
202	part of formate-dependent nitrite reductase complex	1	NusA	2
206	hypothetical protein (ygcB)	1	NusA	2
198	50S ribosomal subunit protein L5	0	NusA	2
205	O-6-alkylguanine-DNA methyltransferase	0	NusA	1
199	acetylornithine delta-aminotransferase	0	NusA	1
197	inducible ATP-independent RNA helicase	1	GST	2
160	glutamate synthase large subunit	1		-
207	carbamoyl-phosphate synthase large subunit	1		-
208	ATP-binding transport protein (Membranprotein)	0		-
209	Mg ²⁺ transport ATPase, P-type 1 (Membranprotein)	0		-

Die Proteinausbeute von 30 Zielproteinen verbesserte sich in Folge der Fusion mit einem der 3 Fusionspartner. Dabei zeigte sich, dass die Fusion mit MBP-His₇ bei der Mehrheit der Zielproteine (80%) eine deutliche Verbesserung der Proteinausbeute nach sich zog. Dagegen bewirkten die Fusionen mit NusA-His₆ und GST-His₇ nur bei 16,6% bzw. 3,3% der Zielproteine eine Verbesserung der Proteinausbeute. Bei 4 Proteinen, darunter 2 Membranproteine, bewirkten die 3 Fusionspartner überhaupt keine Verbesserung der Proteinausbeute.

4.4 Effizienz der Entfernung von LPS mit Polymyxin-B

Um zu analysieren, ob die Behandlung der Proteinlösungen mit Polymyxin-B-Kugeln zu einer Reduktion der potenziell durch LPS hervorgerufenen Stimulation von peripheren CD4⁺ T-Zellen führt, wurden 4 Proteinpräparationen mit Polymyxin-B-Kugeln behandelt. Zum direkten Vergleich blieben die jeweiligen Proteinpräparationen unbehandelt. Für die *in vitro*-Stimulation peripherer CD4⁺ T-Zellen mit behandelten und unbehandelten Präparationen wurde Blut von gesunden Spendern verwendet. Dazu war jeweils 5 µg/ml Protein nötig. Anschließend konnten die Frequenzen von CD40L⁺/INF-γ⁺ (doppel-positiven) CD4⁺ T-Zellen erfasst werden.

Nach Stimulation mit den behandelten Proteinen 98, 251 und 256 waren niedrigere Frequenzen doppel-positiver CD4⁺ T-Zellen zu beobachten. Bis auf Protein 98 bei Spender M führten die behandelten Proteine zu niedrigeren Frequenzen doppel-positiver T-Zellen. Insbesondere nach Stimulationen mit Protein 256 waren deutlich niedrigere Frequenzen zu beobachten. Im Gegensatz zu diesen 3 Proteinen bewirkte die Behandlung von Protein 253 mit Polymyxin-B nahezu keine Veränderungen in den Frequenzen doppel-positiver T-Zellen. Bei Spender M war sogar eine höhere Frequenz zu beobachten (Abb. 7 A).

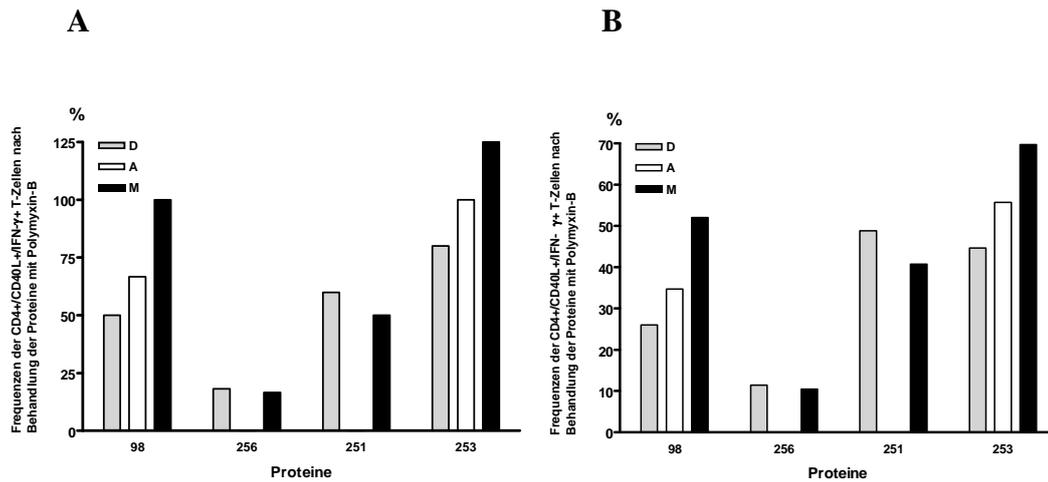


Abb. 7: Behandlung von Proteinlösungen mit Polymyxin-B-Kugeln und der Effekt auf CD4+ T-Zellen. Vier Proteine wurden mit Polymyxin-B-ummantelten magnetischen Kugeln behandelt. **A.** Gleiche Mengen von Proteinen: Vollblut von gesunden Spendern wurde mit je 5 µg/ml behandelten oder mit unbehandelten Proteinlösungen stimuliert. CD4+ T-Zellen wurden durchflusszytometrisch erfasst. Die Frequenzen von CD40L+/IFN-γ+ (doppel-positiven) CD4+ T-Zellen nach Stimulation mit den behandelten Proteinlösungen wurden in Relation gesetzt zu den Frequenzen nach Stimulation mit den unbehandelten Proteinlösungen. Letztere Frequenzen wurden definiert als 100%. **B.** Gleiche Volumina von Proteinen: Basierend auf den Ergebnissen des Experiments (siehe A.) wurden gleiche Volumina der behandelten und unbehandelten Proteinlösungen in die Auswertung einbezogen. Von 8 getesteten Spendern sind die repräsentativen Ergebnisse von 3 Spendern dargestellt.

Die Behandlung der Proteine mit Polymyxin-B-Kugeln war mit einem Proteinverlust unterschiedlicher Stärke verbunden. Daher mussten die Volumina der behandelten Proteine für die Vollblutstimulation entsprechend angepasst werden, um jeweils 5 µg einsetzen zu können. Größere Volumina an behandelten Proteinen könnten dafür verantwortlich sein, dass andere stimulierende bakterielle Bestandteile wie Muramyl Dipeptid (Girardin et al. 2004) und Lipoproteine (Buwitt-Beckmann et al. 2006) akkumulieren. Aus diesem Grund wurden gleiche Volumina von behandelten und unbehandelten Proteinen für die Analyse der Frequenzen eingesetzt. Dies führte zu dem Ergebnis, dass sämtliche behandelten Proteine zu niedrigeren Frequenzen doppel-positiver CD4+ T-Zellen führten (Abb. 7 B).

Des Weiteren wurde die Konzentration von LPS exemplarisch in 2 Proteinlösungen (Proteine 251 and 96) mit Hilfe des LAL-Tests bestimmt.

Zuvor erfolgte die Behandlung der Proteine mit Polymyxin-B-Kugeln. In der Proteinlösung 251 wurde eine Konzentration von 0,08 EU/ml (8 pg/ml) ermittelt. Dagegen lag die Konzentration in der Proteinlösung 96 unterhalb der Detektionsgrenze von 0,05 EU/ml (5 pg/ml).

Um den Proteinverlust während der Behandlung mit Polymyxin-B messen zu können, wurden die Konzentrationen von 34 verschiedenen Proteinen vor und nach der Behandlung gemessen. Bei 61,8% der analysierten Proteine kam es zu einem Proteinverlust von weniger als 50%. Lediglich bei 5,9% der Proteine konnte ein Verlust von 80 bis 90% festgestellt werden (Abb. 8). Nur wenige Proteine fielen durch einen Proteinverlust auf. Aus diesem Grund mussten sämtliche Proteine, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden, mit Polymyxin-B-Kugeln behandelt werden.

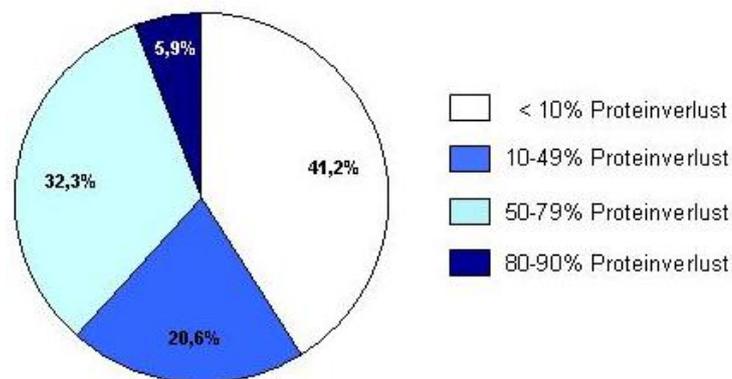


Abb. 8: Proteinverlust nach Behandlung von 34 Proteinen mit Polymyxin-B-ummantelten magnetischen Kugeln. Um den Proteinverlust [%] in Folge der Behandlung der Proteine mit Polymyxin-B-Kugeln zu untersuchen, wurden die Proteinmengen nach der Behandlung in Relation gesetzt zu den Mengen vor der Behandlung. Ein Proteinverlust von unter 10% wurde bei 14 Proteinen festgestellt. Sieben Proteine waren gekennzeichnet durch einen Verlust von 10 bis 49%. Dagegen konnte bei 11 Proteinen ein Verlust von 50 bis 79% nachgewiesen werden. Lediglich bei 2 Proteinen wurde ein Verlust von 80 bis 90% ermittelt.

4.5 Expression und Reinigung von konservierten Proteinen im großen Maßstab

Nach der Expression mit pQTEV2 und der Reinigung im kleinen Maßstab konnten 220 konservierte Proteine mit starker und moderater Ausbeute gereinigt

werden (Abb. 4 B, 5 B). Mit dem Ziel, von jedem Protein nach Behandlung mit Polymyxin-B, Umpufferung in PBS und steril Filtration mindestens 500 µg zu erhalten, wurden die Volumina der Expressionskulturen vergrößert. Ausgehend von den 220 konservierten Proteinen gelang es im großen Maßstab 176 Proteine (80%) mit der Mindestmenge von 500 µg herzustellen (Abb. 9). Die Expression und Reinigung im kleinen Maßstab von 34 Gateway-Fusionsproteinen lieferte 28 Proteine mit starker oder moderater Ausbeute (Tab. 14). Im großen Maßstab konnten davon 21 mit MBP-His₇ fusioniert (75%) in ausreichender Menge hergestellt werden (Abb. 9). Mit Hilfe der Standard-Expression der Proteine mit dem Vektor pQTEV2 und der Gateway-Klonierung war somit die Herstellung von insgesamt 197 konservierten Proteinen möglich.

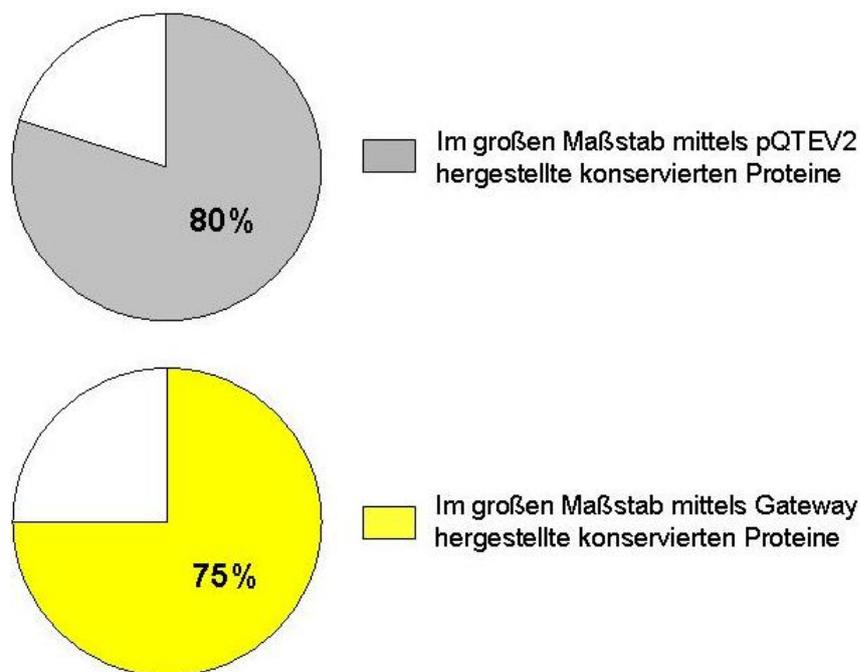


Abb. 9: Herstellung von konservierten Proteinen von *E. coli* im großen Maßstab mit dem Expressionsvektor pQTEV2 und dem Gateway-Destinationsvektor pD-MAL1. Ausgehend von 220 Proteinen, die mit pQTEV2 exprimiert und im kleinen Maßstab zumindest mit moderater Ausbeute gereinigt werden konnten, gelang die Herstellung im großen Maßstab von 176 (80%) Proteinen mit der Mindestmenge von 500 µg. Von 28 Proteinen, die mit pD-MAL1 exprimiert und im kleinen Maßstab mit zumindest moderater Ausbeute gereinigt werden konnten, gelang die Herstellung von 21 Fusionsproteinen (75%) mit der Mindestmenge von 500 µg.

4.6 Codon-Usage in konservierten Proteinen

Um die Codon-Usage eines Proteins mit dem Erfolg seiner Expression zu korrelieren, wurde der Codon-Adaptations-Index (CAI) für jedes Protein ermittelt. Der CAI ist ein Indikator dafür, wie nahe die Codon-Usage eines Proteins am Optimum liegt. Dieses Optimum wird abgeleitet von der Codon-Usage von Referenzproteinen (Sharp et al. 1987). Wie in Abb. 10 A verdeutlicht, konnten alle Proteine mit einem CAI größer als 0,6 mit dem Expressionsvektor pQTEV2 überexprimiert werden.

Daneben wurden einzelne in *E. coli* am seltensten verwendeten Codons in einer repräsentativen Gruppe der Proteine untersucht. Diese Analyse zeigte, dass einige seltene Codons in nicht exprimierten Proteinen überrepräsentiert vorliegen (Abb. 10 B). Dieses trifft z.B. besonders auf das Codon ATA (Isoleucin) zu, da es in nicht exprimierten Proteinen um den Faktor 3 häufiger vorkommt als in schwach exprimierten Proteinen und darüber hinaus um den Faktor 15 häufiger vorkommt als in stark exprimierten Proteinen.

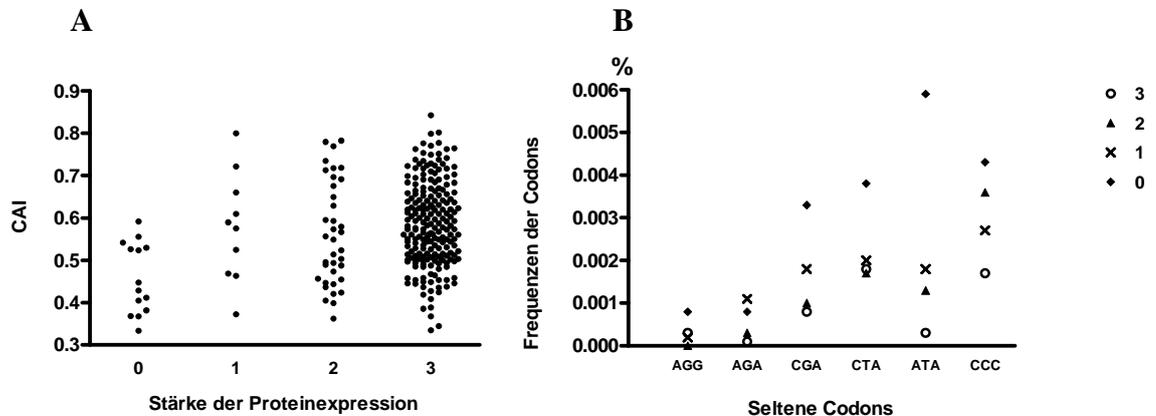


Abb. 10: Codon-Usage. **A.** Umfassende Analyse: Der Codon-Adaptations-Index (CAI) wurde für jedes konservierte Protein ermittelt und nach der Expressionstärke sortiert (3 = stark, 2 = moderat, 1 = schwach, 0 = keine Expression). **B.** Analyse von 6 einzelnen seltenen Codons. 52 konservierte Proteine wurden in die Auswertung einbezogen: sämtliche 14 nicht exprimierten Proteine (0), sämtliche 10 schwach exprimierten Proteine (1) und eine zufällige Auswahl von jeweils 14 moderat (2) und stark exprimierten Proteinen (3). Im Diagramm sind die Frequenzen für jedes der 6 Codons in Bezug auf die Gesamtzahl der Codons in Proteinen derselben Expressionsstärke abgebildet (Zahl des seltenen Codons X / Gesamtzahl der Codons in Proteinen einer Expressionsgruppe). AGG, AGA, CGA (Arginin); CTA (Leucin); ATA (Isoleucin); CCC (Prolin).

4.7 Transmembranhelices in konservierten Proteinen

Membranständige Proteine sind durch Lipophilie gekennzeichnet. Lipophilie könnte die Beobachtung erklären, dass einige der konservierten *E. coli* Proteine mit geringerer Effizienz exprimiert bzw. nativ gereinigt werden konnten. Möglicherweise handelt es sich dabei um Membranständige Proteine. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob es sich bei den 48 His₇-fusionierten Proteinen, die im kleinen Maßstab nicht exprimiert werden konnten, sich nicht oder nur in geringen Mengen reinigen ließen (Tab. 13), um Membranständige Proteine handelt. Hierfür wurden die entsprechenden Aminosäuresequenzen auf das Vorhandensein von Transmembranhelices analysiert.

In Tab. 15 ist dargestellt, dass alle 14 nicht exprimierten Proteine mindestens 2 Transmembranhelices enthalten (Proteine 210-221, 269, 270). Zwei Proteine (208 und 209), die zwar exprimiert, aber nicht gereinigt werden konnten – auch nicht als Gateway-Fusionsproteine –, enthalten 5 bzw. 7 Transmembranhelices. Demgegenüber enthalten 2 Proteine (202 und 258), die exprimiert und mit schwacher Ausbeute gereinigt werden konnten, 1 bzw. 8 Transmembranhelices.

Tab. 15: Zahl der Transmembranhelices in 48 His₇-fusionierten Proteinen, die nicht exprimiert werden konnten, oder nicht bzw. schwer zu reinigen waren. Die Zahl der Transmembranhelices (TMH) wurde mit CBS prediction server TMHMM (2.0) ermittelt. Die Proteinausbeute nach Expression und Reinigung wurde dargestellt mit den Kategorien: 3 = stark; 2 = moderat; 1 = schwach; 0 = nicht exprimiert oder gereinigt.

Protein-Nr.	Expression	Reinigung	Zahl der TMH
143	2	1	-
144	3	1	-
145	3	1	-
146	3	1	-
147	3	1	-
148	3	1	-
149	3	1	-
150	3	1	-
151	3	1	-
152	3	1	-
153	2	1	-
154	3	1	-
155	3	1	-
156	3	1	-
157	2	1	-
158	2	1	-
159	2	1	-
160	2	1	-
161	1	1	-
197	3	1	-
258	2	1	8
259	3	1	-
200	3	1	-
201	3	1	-
202	3	1	1
203	1	1	-
204	3	1	-
206	3	1	-
207	3	1	-
205	2	0	-
198	3	0	-
199	3	0	-
208	1	0	5
209	2	0	7
210	0		5
211	0		10
212	0		2
213	0		9
214	0		10
215	0		11
216	0		5
217	0		12
218	0		7
219	0		8
220	0		10
221	0		10
269	0		9
270	0		5

4.8 Klonierung, Expression und Reinigung von Pathogenitätsfaktoren

Die Effizienz der Klonierung, der Expression und Reinigung von 39 ausgewählten Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* ist in Tab. 16 dargestellt. Ausgehend von 39 Pathogenitätsfaktoren verschiedener pathogener Stämme von *E. coli*, konnten 28 Gene mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pQTEV2 kloniert werden. Davon wurden im kleinen Maßstab 23 Pathogenitätsfaktoren exprimiert.

Unter nativen Bedingungen ließen sich hiervon 8 Pathogenitätsfaktoren nur mit schwacher und eines mit moderater Ausbeute reinigen. Dagegen bewirkte die Reinigung im großen Maßstab unter denaturierenden Bedingungen zumeist eine deutliche Verbesserung der Proteinausbeute. Auf diese Weise konnten 13 Pathogenitätsfaktoren mit der Mindestmenge von 500 µg hergestellt werden.

Transmembranhelices wurden in nur 6 Pathogenitätsfaktoren ermittelt, von denen 4 exprimiert werden konnten. Davon konnten 2 unter denaturierenden Bedingungen mit starker Ausbeute, 1 nur unter nativen Bedingungen mit schwacher Ausbeute sowie 1 weiterer, weder unter nativen noch unter denaturierenden Bedingungen, gereinigt werden.

Seltene Codons waren ausschließlich in stark oder moderat exprimierten Pathogenitätsfaktoren vorhanden, von denen der Großteil denaturiert gereinigt werden konnte.

Tab. 16: Effizienz der Klonierung, Expression und Reinigung von Pathogenitätsfaktoren verschiedener Pathovaren von *E. coli* und die Anzahl der Transmembranhelices (TMH) und seltenen Codons. Nach PCR-Amplifizierung der Gene wurden diese in pQTEV2 kloniert (+ = erfolgreiche Klonierung). Anschließend wurden die Pathogenitätsfaktoren zunächst im kleinen Maßstab exprimiert und unter nativen Bedingungen gereinigt. Die Reinigung im großen Maßstab erfolgte unter denaturierenden Bedingungen. Die Proteinausbeute nach Expression und Reinigung wurde eingestuft nach folgenden Kategorien: 3 = stark; 2 = moderat; 1 = schwach; 0 = nicht exprimiert oder gereinigt. Die pathogenen Stämme von *E. coli* sind mit ihrer genauen Bezeichnung in Tab. 5 aufgeführt. EPEC: Enteropathogene *E. coli*; UPEC: Uropathogene *E. coli*; ETEC: Enterotoxische *E. coli*; EIEC: Enteroinvasive *E. coli*; EHEC: Enterohämorrhagische *E. coli*; EAEC: Enteroaggregative *E. coli*; DAEC: Diffus-adhärenente *E. coli*; *S. dys.*: *Shigella dysenteriae* sg. 1; Versch.: Verschiedene der aufgelisteten Stämme.

Nr.	Gen	Genbank Accession	<i>E. coli</i> Pathovar	Stamm	Klo- niert	Expri- miert	Nativ gereinigt	Denat. gereinigt	Zahl der TMH	Seltene Codons
1	<i>espB</i>	AAC38396	EPEC	a	+	3	1	3	1	2 x ATA
2	<i>dsbA</i>	NP_418297	ETEC	b	+	3	1	3	-	
3	<i>papA</i>	CAA43562	UPEC	c	+	3	0	3	-	AGA, AGG
4	<i>espD</i>	AAC38395	EPEC	a	+	3	0	0	2	ATA
5	<i>orf19</i>	AAC38389	EPEC	a	+	3	0	0	-	
6	<i>cs6</i>	AAC45093	ETEC	d	+	3	0	3	-	
7	<i>tir</i>	AAC38390	EPEC	a	+	2	2	3	-	
8	<i>ipaB</i>	NP_858261	EIEC	e	+	2	1	0	2	AGG
9	<i>ipgC</i>	NP_858262	EIEC	e	+	2	1	3	-	
10	<i>cesT</i>	BAB37983	EPEC	f	+	2	1	3	-	AGA
11	<i>stx2B</i>	NP_286977	EHEC	g	+	2	0	3	-	
12	<i>espA</i>	AAC38394	EPEC	f	+	2	0	3	-	
13	<i>papB</i>	CAA43561	UPEC	c	+	2	0	3	-	
14	<i>papK</i>	CAA43567	UPEC	c	+	2	0	3	-	ATA
15	<i>cs5</i>	CAA11820	ETEC	d	+	2	0	3	1	
16	<i>ipaA</i>	NP_858258	EIEC	e	+	1	1	0	-	
17	<i>espF</i>	AAC38400	EPEC	a	+	1	1	3	-	
18	<i>senA</i>	CAC05789	EIEC	e	+	1	1	0	-	
19	<i>eltA</i>	CAA23532	ETEC	b	+	1	0	1	-	
20	<i>sta3</i>	AAA24652	ETEC	b	+	1	0	0	-	
21	<i>cs3</i>	AAA23614	ETEC	b	+	1	0	0	-	
22	<i>astA</i>	AAM88299	EAEC	h	+	1	0	0	-	
23	<i>icsA</i>	AAM89671	EIEC	e	+	1	0	0	-	
24	<i>lngA</i>	AAC33154	ETEC	i	+	0	0	0	1	
25	<i>hlyA</i>	CAA60042	EHEC	g	+	0	0	0	-	
26	<i>aggA</i>	AAA57454	EAEC	j	+	0	0	0	-	
27	<i>stx1A</i>	NP_288673	<i>S. dys.</i>	k	+	0	0	0	1	
28	<i>stx1B</i>	NP_288672	<i>S. dys.</i>	k	+	0	0	0	-	
29	<i>papE</i>	CAA43568	UPEC	c	-	-	-	-	-	
30	<i>csdD</i>	AAQ19777	ETEC	i	-	-	-	-	-	
31	<i>eae</i>	AAC38392	EPEC	a	-	-	-	-	-	
32	<i>stx2A</i>	NP_286976	EHEC	g	-	-	-	-	-	
33	<i>aafA</i>	AAB82330	EAEC	Versch.	-	-	-	-	-	
34	<i>cfaC</i>	AAC41416	ETEC	Versch.	-	-	-	-	-	
35	<i>cfaE</i>	AAC41417	ETEC	Versch.	-	-	-	-	-	
36	<i>csdA</i>	AAQ19775	ETEC	Versch.	-	-	-	-	-	
37	<i>CFA/I</i>	AAB30543	ETEC	Versch.	-	-	-	-	-	
38	<i>afaE</i>	AAD44028	DAEC	Versch.	-	-	-	-	-	
39	<i>cfaA</i>	AAC41414	ETEC	Versch.	-	-	-	-	-	

4.9 Stimulation von peripheren CD4+ T-Zellen

4.9.1 Stimulation mit Gemischen von hochkonservierten Proteinen von *E. coli*

Peripheres Blut von 40 *M. Crohn*-Patienten (22 weiblich, 18 männlich; Durchschnittsalter: 45; Altersspanne: 17 bis 70), 20 *S. ankylosans*-Patienten (9 weiblich, 11 männlich; Durchschnittsalter: 43; Altersspanne: 27 bis 63) und 20 gesunden Kontrollpersonen (11 weiblich, 9 männlich; Durchschnittsalter: 37; Altersspanne: 20 bis 61) wurde mit 40 Proteingemischen stimuliert, die jeweils 10 konservierte Proteine von *E. coli* enthielten (Tab. 12).

Im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen führte die Stimulation peripheren Blutes mit 7 Proteingemischen bei einer signifikant kleineren Zahl von *M. Crohn*-Patienten zu CD40L+/ IFN- γ + (doppel-positiven) CD4+ T-Zellantworten. Gegen 3 dieser 7 Proteingemische reagierte ebenfalls eine signifikant kleinere Zahl von *S. ankylosans*-Patienten (Tab. 17). Die doppel-positiven T-Zellen waren bei Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* gegen eine kleinere Zahl von Proteingemischen gerichtet (Abb. 11, Tab. 17). Nach Stimulation mit einigen Proteingemischen waren doppel-positive T-Zellen nur bei gesunden Kontrollpersonen und *M. Crohn*-Patienten (Proteingemische 1, 5, 15), oder nur bei gesunden Kontrollpersonen und *S. ankylosans*-Patienten (Proteingemisch 6), oder nur bei gesunden Kontrollpersonen (Proteingemische 4, 11, 14) zu beobachten. Indes lösten die Proteingemische 3 und 7 weder bei Patienten noch bei gesunden Kontrollpersonen doppel-positive T-Zellantworten aus. Einige Proteingemische führten bei relativ vielen Individuen in beiden Patientengruppen und der Kontrollgruppe zu T-Zellantworten (10, 13, 17, 18, 19, 20).

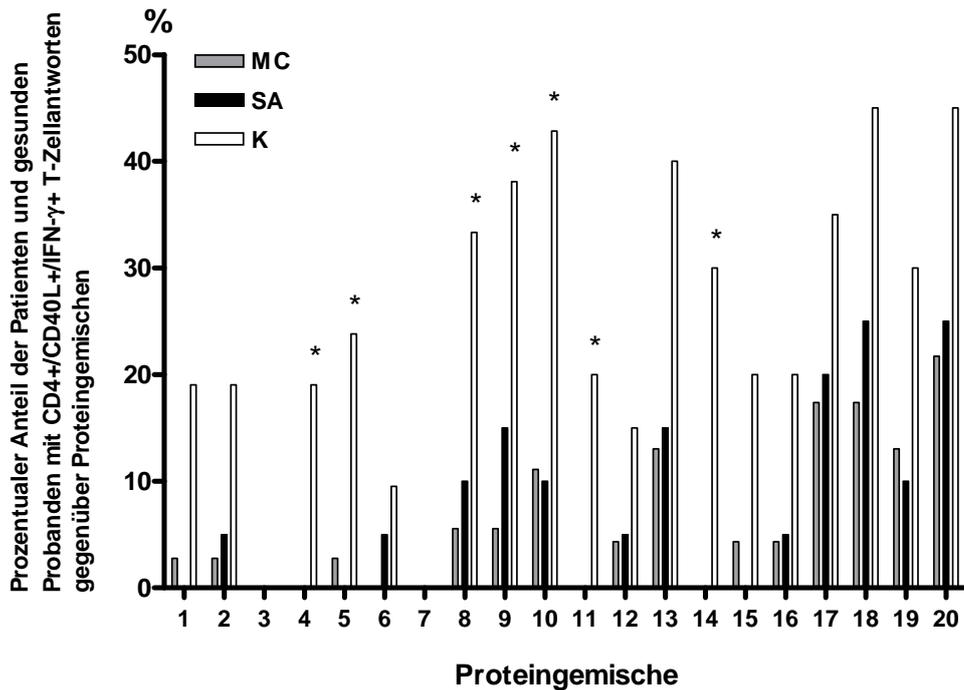


Abb. 11: Stimulation von peripheren CD4+ T-Zellen mit Gemischen von hochkonservierten Proteinen. Vollblut von 40 Patienten mit *Morbus Crohn* (MC), 20 Patienten mit *Spondylitis ankylosans* (SA) und 20 gesunden Kontrollpersonen (K) wurde mit Proteingemischen 6 h stimuliert. Leukozyten wurden mit Antikörpern gegen CD4, CD40L und IFN- γ markiert. CD4+ T-Zellen wurden durchflusszytometrisch erfasst und die Frequenzen von CD40L+/IFN- γ + (doppel-positiven) CD4+ T-Zellen analysiert. Hier sind die prozentualen Anteile der Patienten und gesunden Kontrollpersonen als Balken dargestellt, bei denen doppel-positiv T-Zellantworten gegenüber den Proteingemischen 1-20 festgestellt wurden. Die Sterne markieren Proteingemische, gegen die eine signifikant kleinere Zahl von Patienten reagierte (siehe Tab. 17).

Tab. 17: Statistische Auswertung der Zahl der Patienten und gesunden Kontrollpersonen mit doppelpositiven CD4+ T-Zellantworten gegenüber den 20 Proteingemischen. Hier sind die Zahlen der gesunden Kontrollpersonen (K) und Patienten mit *Morbus Crohn* (MC) und *Spondylitis ankylosans* (SA) dargestellt, die gegenüber den 20 Proteingemischen mit doppelpositiven T-Zellen reagierten. In den Klammern sind die prozentualen Anteile bezogen auf die Gesamtzahl der Individuen einer Gruppe (K, MC, SA) dargestellt. Für die Berechnung der *p*-Werte wurde der Fisher's exact test verwendet (* = MC im Vergleich zu K; + = SA im Vergleich zu K).

Gemisch	K	MC	<i>p</i> *	SA	<i>p</i> +
1	4 (19)	1 (2,7)	n.s.	0	n.s.
2	4 (19)	1 (2,7)	n.s.	1 (5)	n.s.
3	0	0	-	0	-
4	4 (19)	0	0,0152	0	n.s.
5	5 (23,8)	1 (2,7)	0,0217	0	0,0478
6	2 (9,5)	0	n.s.	1 (5)	n.s.
7	0	0	-	0	-
8	7 (33,3)	2 (5,5)	0,0090	2 (10)	n.s.
9	8 (38,1)	2 (5,5)	0,0032	3 (15)	n.s.
10	9 (42,8)	4 (11,1)	0,0091	2 (10)	0,0325
11	4 (20)	0	0,0393	0	n.s.
12	3 (15)	1 (4,3)	n.s.	1 (5)	n.s.
13	8 (40)	3 (13)	n.s.	3 (15)	n.s.
14	6 (30)	0	0,0064	0	0,0202
15	4 (20)	1 (4,3)	n.s.	0	n.s.
16	4 (20)	1 (4,3)	n.s.	1 (5)	n.s.
17	7 (35)	4 (17,4)	n.s.	4 (20)	n.s.
18	9 (45%)	4 (17,4)	n.s.	5 (25)	n.s.
19	6 (30%)	3 (13)	n.s.	2 (10)	n.s.
20	9 (45%)	5 (21,7)	n.s.	5 (25)	n.s.

Zum Zeitpunkt der Blutabnahme waren 36 *M. Crohn*-Patienten in klinischer Remission (90%) und 4 Patienten klinisch aktiv (10%).

Sämtliche 9 *M. Crohn*-Patienten, bei denen doppel-positive CD4+ T-Zellen gegenüber einzelnen Proteingemischen beobachtet wurden, befanden sich in klinischer Remission (25% der Patienten in klinischer Remission). Von diesen 9 Patienten bekamen 6 zum Zeitpunkt der Blutabnahme immunsuppressive Medikamente, wie Infliximab, Azathioprin und Steroide. Drei Patienten wurden nicht medikamentös behandelt.

Bei der Mehrheit der *M. Crohn*-Patienten konnten keine doppel-positiven T-Zellen gegenüber den Proteingemischen nachgewiesen werden. Davon waren

27 Patienten in klinischer Remission (14 mit immunsuppressiver Medikation) und 4 Patienten klinisch aktiv (mit immunsuppressiver Medikation).

Von 8 *S. ankylosans*-Patienten, bei denen doppel-positive T-Zellen gegenüber einzelnen Proteingemischen beobachtet wurden, waren 5 Patienten klinisch aktiv (41% der klinisch aktiven *S. ankylosans*-Patienten). Dagegen waren 3 Patienten nicht klinisch aktiv. Ein BASDAI kleiner als 4 wurde als nicht aktive, dagegen ein BASDAI größer als 4 als aktive *S. ankylosans* gewertet. Keiner der 20 *S. ankylosans*-Patienten erhielt zum Zeitpunkt der Blutabnahme immunsuppressive Medikamente.

4.9.2 Stimulation mit einzelnen konservierten Proteinen von *E. coli*

Einige Proteingemische führten bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen wie oben dargestellt häufiger zu doppel-positiven T-Zellantworten. Daher wurde analysiert, ob und welche einzelnen konservierten Proteine aus diesen Proteingemischen diese T-Zellantworten auslösen. Hierzu war es nötig, zunächst Blut von je 2 Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* und einer gesunden Kontrollperson, die auf die Proteingemische 10, 13, 17, 18, 19 und 20 reagierte, mit den einzelnen Proteinen, die in diesen Gemischen enthalten waren, zu stimulieren.

Insgesamt wurden 9 konservierte Proteine ermittelt, die bei diesen 5 Personen zu doppel-positiven T-Zellantworten führten (Tab. 18). Jedoch waren nicht alle Proteine bei den Personen übereinstimmend immunogen. Beispielsweise gab es Proteine, die nur bei 2 Personen zu T-Zellantworten führten. In Abb. 12 wird verdeutlicht, dass es mit Hilfe der „Proteinmatrix“ gelang, immunogene Proteine zu identifizieren.

Um die Zahl der Patienten und gesunden Kontrollpersonen zu ermitteln, die gegenüber diesen 9 Proteinen mit doppel-positiven T-Zellen reagieren, wurde Vollblut von jeweils 10 Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* und von 12 gesunden Kontrollpersonen mit den Proteinen stimuliert.

Tab. 18: Identifizierung von konservierten Proteinen aus immunogenen Proteingemischen.

Ausgehend von Proteingemischen, die zu CD40L+/IFN- γ + (doppel-positiven) CD4+ T-Zellantworten bei 2 Patienten mit *M. Crohn*, 2 Patienten mit *S. ankylosans* und 1 gesunden Kontrollperson führten, wurden einzelne Proteine, die in diesen Gemischen enthalten waren, für die Stimulation von peripheren CD4+ T-Zellen dieser Personen verwendet. Die aufgelisteten Proteine führten zu doppel-positiven T-Zellantworten bei den getesteten Personen.

Nr.	Protein (Nr.)	in Proteingemisch
1	NAD-linked malate dehydrogenase (232)	13
2	phosphoribosylaminoimidazole synthetase (87)	9
3	predicted carbohydrate kinase (52)	18
4	putative control proteins-Lipoprotein NlpI (1)	20
5	RecA (140)	9
6	30S ribosomal subunit protein S13 (147)	18
7	50S ribosomal subunit protein L14 (148)	18
8	50S ribosomal subunit protein L2 (150)	17
9	Ffh (156)	17

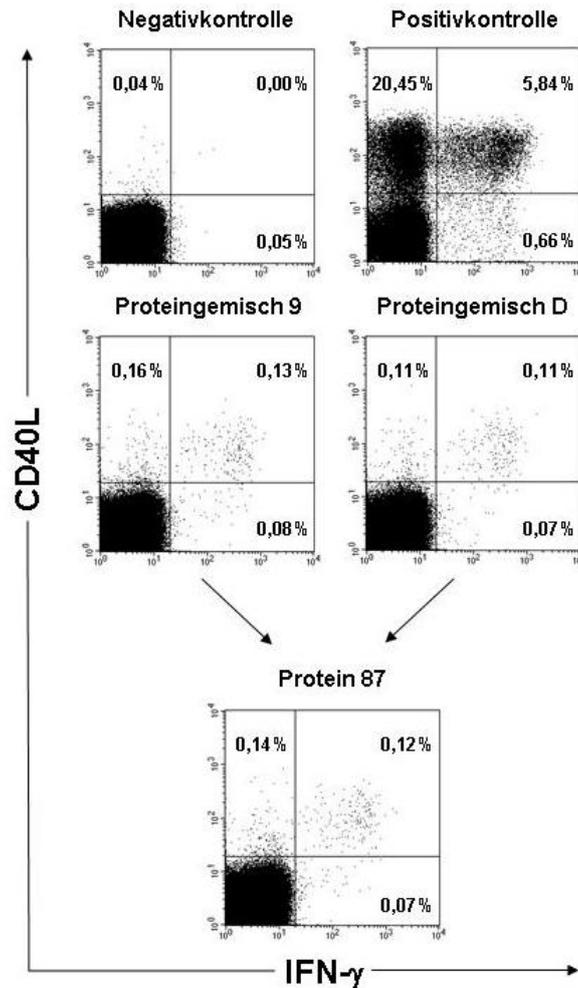


Abb. 12: Identifizierung eines immunogenen Proteins mit Hilfe der „Proteinmatrix“. Periphere CD4⁺ T-Zellen eines *M. Crohn*-Patienten wurden mit den 40 Proteingemischen stimuliert. Aufgrund der CD40L⁺/IFN-γ⁺ T-Zellantworten gegenüber den Proteingemischen 9 und D erfolgte anschließend die Stimulation mit dem Protein 87, das laut „Proteinmatrix“ diese T-Zellantworten zu verantworten hatte. Die Stimulation peripherer T-Zellen mit anti-CD28 diente als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurden periphere T-Zellen mit anti-CD28 und SEB stimuliert.

Gegen das konservierte Protein 7 (50S ribosomal subunit protein L14) reagierte eine signifikant kleinere Zahl von Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans*. Dagegen reagierte gegen Protein 4 (putative control proteins-Lipoprotein NlpI) eine kleine Zahl von *M. Crohn*-Patienten. Bei den anderen 7 Proteinen konnten keine signifikanten Unterschiede zu den gesunden Kontrollpersonen festgestellt werden (Abb. 13). Des Weiteren konnte kein konserviertes Protein identifiziert werden, das ausschließlich doppel-positive T-Zellantworten bei *M. Crohn*- und/oder *S. ankylosans*-Patienten auslöste.

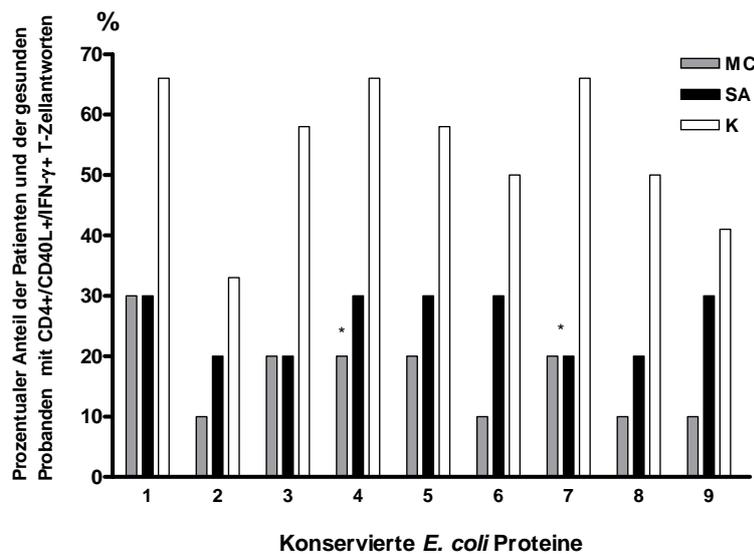


Abb. 13: Stimulation von peripheren CD4+ T-Zellen mit einzelnen konservierten Proteinen von *E. coli*. Vollblut von jeweils 10 Patienten mit *Morbus Crohn* (MC) und *Spondylitis ankylosans* (SA) und von 12 gesunden Kontrollpersonen (K) wurde mit 9 konservierten Proteinen (siehe Tab. 18) stimuliert. CD4+ T-Zellen wurden durchflusszytometrisch gemessen und die Frequenzen von CD40L+/IFN- γ + (doppel-positiven) T-Zellen analysiert. Hier sind die prozentualen Anteile der Patienten und der gesunden Kontrollpersonen dargestellt, bei denen doppel-positive T-Zellantworten gegenüber den 9 konservierten Proteinen von *E. coli* festgestellt wurden. Gegen Protein 4 reagierte eine signifikant kleinere Zahl von MC-Patienten ($p = 0,0427$), während gegenüber Protein 7 eine kleinere Zahl sowohl von MC-Patienten ($p = 0,0427$) als auch von SA-Patienten ($p = 0,0427$) im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen reagierte. Für die Berechnung der p -Werte wurde der Fisher's exact test verwendet.

4.9.3 Stimulation mit Pathogenitätsfaktoren von *E. coli*

Aufgrund der Assoziation von pathogenen *E. coli* mit *M. Crohn* wurde untersucht, ob CD4+ T-Zellen – insbesondere von *M. Crohn*-Patienten – mit verschiedenen Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* antigenspezifisch stimuliert werden können.

Vollblut von 17 *M. Crohn*-Patienten (7 weiblich, 10 männlich; Durchschnittsalter: 40, Altersspanne: 18 bis 70), 14 *S. ankylosans*-Patienten (5 weiblich, 9 männlich; Durchschnittsalter: 37; Altersspanne: 25 bis 61) und 18 gesunden Kontrollpersonen (9 weiblich, 9 männlich; Durchschnittsalter: 38; Altersspanne: 25 bis 61) wurde mit 13 Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* stimuliert.

Lediglich bei 3 Pathogenitätsfaktoren (PapA, PapB und Tir) konnte gezeigt werden, dass eine signifikant kleinere Zahl von *M. Crohn*-Patienten mit doppel-positiven T-Zellen reagierte im Vergleich zu *S. ankylosans*-Patienten und gesunden Kontrollpersonen. Bei den restlichen 10 Pathogenitätsfaktoren waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen und den gesunden Kontrollpersonen ermittelbar (Abb. 14). Sämtliche *M. Crohn*-Patienten, die mit doppel-positiven T-Zellen reagierten, waren in klinischer Remission. Im Fall der *S. ankylosans*-Patienten zeigten sowohl klinisch aktive als auch nicht aktive Patienten T-Zellreaktivität. Ferner war es nicht möglich, einen Pathogenitätsfaktor zu identifizieren, der ausschließlich bei *M. Crohn*-Patienten doppel-positive T-Zellantworten hervorrief.

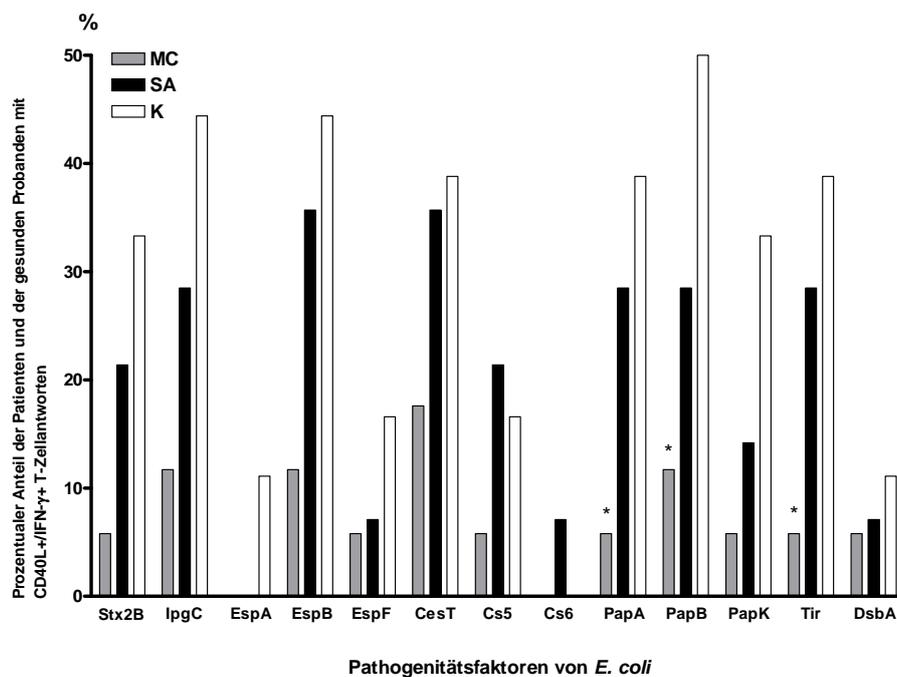


Abb. 14: Stimulation von peripheren CD4+ T-Zellen mit Pathogenitätsfaktoren von *E. coli*. Vollblut von 17 Patienten mit *Morbus Crohn* (MC), 14 Patienten mit *Spondylitis ankylosans* (SA) und 18 gesunden Kontrollpersonen (K) wurde mit 13 Pathogenitätsfaktoren stimuliert. Hier sind die prozentualen Anteile der Patienten und der gesunden Kontrollpersonen dargestellt, bei denen CD40L+/IFN- γ + (doppel-positive) CD4+ T-Zellantworten gegenüber den Pathogenitätsfaktoren beobachtet wurden. Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen reagierte eine signifikant kleinere Zahl von MC-Patienten gegen PapA ($p = 0,0408$), PapB ($p = 0,0275$) und Tir ($p = 0,0408$). Für die Berechnung der p -Werte wurde der Fisher's exact test verwendet.

4.9.4 Stimulation mit *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB)

Um zu klären, ob die bei Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* beobachtete potenzielle Suppression der peripheren CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit Gemischen von konservierten Proteinen von *E. coli* auch gegenüber dem Superantigen SEB gezeigt werden kann, erfolgte die Stimulation peripheren Blutes von gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* mit SEB. Anschließend wurden die doppel-positiven CD4⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch erfasst.

Vollblut von 45 *M. Crohn*-Patienten (23 weiblich, 22 männlich; Durchschnittsalter: 43; Altersspanne: 17 bis 70), 27 *S. ankylosans*-Patienten (11 weiblich, 16 männlich; Durchschnittsalter: 41; Altersspanne: 25 bis 63) und 30 gesunden Kontrollpersonen (17 weiblich, 13 männlich; Durchschnittsalter: 37; Altersspanne: 20 bis 61) wurde mit SEB stimuliert.

Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen konnten bei Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* signifikant geringere Frequenzen von doppel-positiven T-Zellen gegenüber SEB nachgewiesen werden (Abb. 15 A). Gleichzeitig bewirkten immunsuppressive Medikamente bei *M. Crohn*-Patienten keine signifikanten Unterschiede in den Frequenzen der doppel-positiven T-Zellen. Es konnte jedoch nicht einwandfrei geklärt werden, ob der Krankheitszustand die Höhe der Frequenzen beeinflusst, da nur wenige klinisch aktive Patienten getestet wurden (Abb. 15 B). Bei Patienten mit *S. ankylosans* ließen sich bezüglich des Krankheitszustands ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den Frequenzen der doppel-positiven T-Zellen ermitteln (Abb. 15 C).

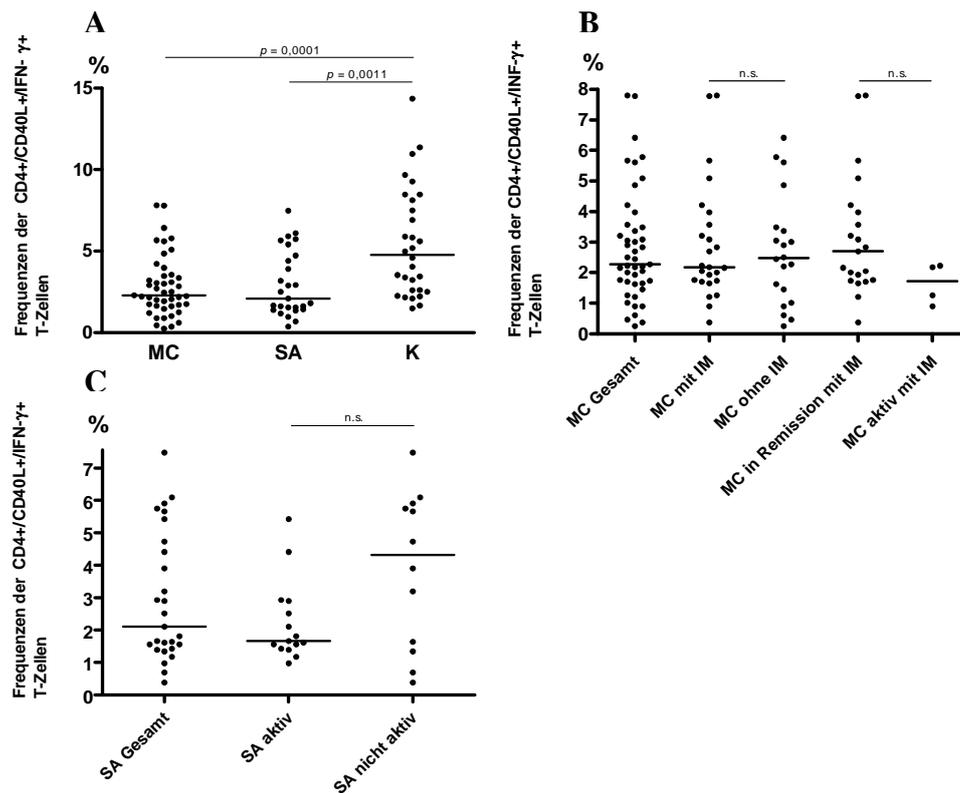


Abb. 15: Stimulation von peripheren CD4+ T-Zellen mit *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB). **A.** Vollblut von 45 Patienten mit *Morbus Crohn* (MC), 27 Patienten mit *Spondylitis ankylosans* (SA) und 30 gesunden Kontrollpersonen (K) wurde mit SEB stimuliert. Hier sind die individuellen Frequenzen der CD40L+/IFN- γ + (doppel-positiven) CD4+ T-Zellen von Patienten und gesunden Kontrollpersonen dargestellt. **B.** Individuelle Frequenzen der doppel-positiven T-Zellen von sämtlichen getesteten 45 *M. Crohn*-Patienten, von 25 *M. Crohn*-Patienten, die immunsuppressive Medikation (IM) erhielten, von 20 Patienten, die keine IM erhielten, von 21 *M. Crohn*-Patienten, die in klinischer Remission waren und IM erhielten und von 4 klinisch aktiven Patienten, die IM erhielten. **C.** Individuelle Frequenzen der doppel-positiven T-Zellen von sämtlichen getesteten 27 *S. ankylosans*-Patienten, von 15 klinisch aktiven und 12 nicht aktiven Patienten (BASDAI kleiner 4 = nicht aktiv; BASDAI größer 4 = aktiv). Die horizontalen Linien repräsentieren die Medianwerte. Für die Berechnung der p -Werte wurde der Mann-Whitney-Test verwendet (n.s. = nicht signifikant).

4.9.5 Frequenzen von CD4+/V β 17+ T-Zellen

SEB ist ein Superantigen, das V β -Ketten des T-Zellrezeptors mit MHC II-Molekülen quervernetzt. Auf diese Weise aktiviert es T-Zellen, die unter anderem V β 17 exprimieren (Choi et al. 1989; Hong et al. 1996). Mit Hilfe eines anti-V β 17 Antikörpers ist die Erfassung der Population der CD4+/V β 17+ T-Zellen möglich.

Auf diese Weise wurde untersucht, ob sich die bei *M. Crohn* und *S. ankylosans* beobachtete niedrigere T-Zellantwort gegenüber SEB durch ein numerisches Defizit von CD4+/Vβ17+ T-Zellen erklären lässt. Daneben wurden die Frequenzen der aktivierten CD4+/Vβ17+ T-Zellen erfasst. Dabei diente CD40L als Aktivierungsmarker.

Bezüglich der Frequenzen von CD4+/Vβ17+ T-Zellen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* (Abb. 16 A).

Dagegen konnten nach Stimulation mit SEB signifikant niedrigere Frequenzen von aktivierten CD4+/Vβ17+ T-Zellen bei *M. Crohn*-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und *S. ankylosans*-Patienten beobachtet werden (Abb. 16 B).

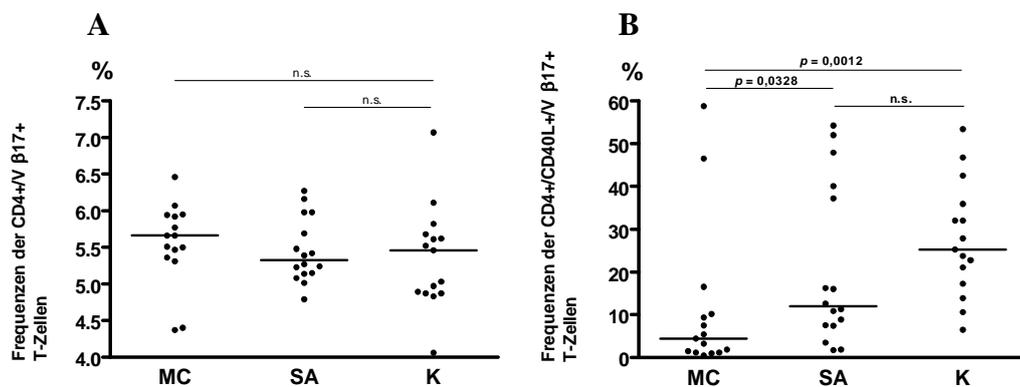


Abb. 16: Periphere CD4+ und Vβ17+ T-Zellen nach Stimulation mit *Staphylococcus aureus* enterotoxin B (SEB). **A.** Vollblut von 15 Patienten mit *Morbus Crohn* (MC), 16 Patienten mit *Spondylitis ankylosans* (SA) und 15 gesunden Kontrollpersonen (K) wurde mit SEB stimuliert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Leukozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD4, CD40L und Vβ17 markiert. CD4+ T-Zellen wurden durchflusszytometrisch gemessen und die Frequenzen der Vβ17+ T-Zellen analysiert. Hier sind die individuellen Frequenzen der Vβ17+ T-Zellen von Patienten und gesunden Kontrollpersonen dargestellt. **B.** Frequenzen der CD40L+/Vβ17+ T-Zellen bei Patienten und gesunden Kontrollpersonen. CD40L wurde als Aktivierungsmarker verwendet. Die horizontalen Linien repräsentieren die Medianwerte. Für die Berechnung der *p*-Werte wurde der Mann-Whitney-Test verwendet (n.s. = nicht signifikant).

4.9.6 Stimulation mit „Recall-Antigenen“

Nach dem Superantigen SEB wurden die „Recall-Antigene“ Cytomegalievirus Phosphoprotein 65 kDa (CMV pp65) und Tetanus Toxoid (TT) getestet, um periphere Gedächtnis-T-Zellen zu stimulieren. Im Gegensatz zu SEB werden CMV pp65 und TT zunächst in antigenpräsentierenden Zellen prozessiert und anschließend den T-Zellen präsentiert. Auf diese Weise sollte geklärt werden, ob bei Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* nach Stimulation mit CMV pp65 und TT ebenfalls eine potenzielle Suppression der T-Zellen beobachtet werden konnte.

Vollblut von 27 *M. Crohn*-Patienten (15 weiblich, 12 männlich; Durchschnittsalter: 45; Altersspanne: 18 bis 70), 24 *S. ankylosans*-Patienten (9 weiblich, 15 männlich; Durchschnittsalter: 42; Altersspanne: 25 bis 63) und 25 gesunden Kontrollpersonen (15 weiblich, 10 männlich; Durchschnittsalter: 39; Altersspanne: 25 bis 61) wurde mit CMV pp65 und TT stimuliert.

4.9.6.1 Cytomegalievirus Phosphoprotein 65 kDa (CMV pp65)

CMV ist eine häufige Infektion und es kann von einer Durchseuchung in der Normalbevölkerung von bis zu 90% ausgegangen werden (Staras et al. 2006). CMV pp65 ist eines der immundominanten Antigene bei CD4⁺ T-Zellantworten gegenüber CMV (Beninga et al. 1995). Nach Stimulation peripheren Blutes mit CMV pp65 wurden die Frequenzen der CD40L⁺/IFN- γ ⁺ T-Zellen erfasst. Bei 60% der gesunden Kontrollpersonen, 48% der *M. Crohn*-Patienten und 29% der *S. ankylosans*-Patienten konnten doppel-positive T-Zellen gegenüber CMV pp65 festgestellt werden. Allerdings waren bei CMV-reaktiven gesunden Kontrollpersonen und Patienten keine signifikanten Unterschiede in den Frequenzen der doppel-positiven T-Zellen zu beobachten (Abb. 17).

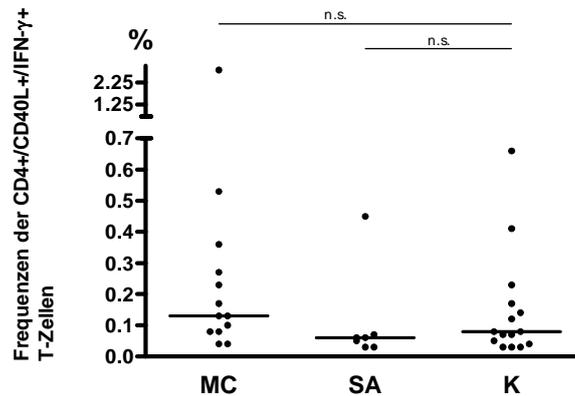


Abb. 17: Stimulation von peripheren CD4⁺ T-Zellen mit Cytomegalievirus Phosphoprotein 65 kDa (CMV pp65). A. Vollblut von 27 Patienten mit *Morbus Crohn* (MC), 24 Patienten mit *Spondylitis ankylosans* (SA) und 25 gesunden Kontrollpersonen wurde mit CMV pp65 stimuliert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Leukozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD4, CD40L und IFN- γ markiert. CD4⁺ T-Zellen wurden durchflusszytometrisch gemessen und die Frequenzen der CD40L⁺/IFN- γ ⁺ (doppel-positiven) T-Zellen analysiert. Bei 13 *M. Crohn*-Patienten, 7 *S. ankylosans*-Patienten und 15 gesunde Kontrollpersonen konnten doppel-positiv T-Zellantworten gegenüber CMV pp65 gezeigt werden. Hier sind die individuellen Frequenzen der doppel-positiven T-Zellen von CMV-reaktiven Individuen dargestellt. Die horizontalen Linien repräsentieren die Medianwerte. Für die Berechnung der *p*-Werte wurde der Mann-Whitney-Test verwendet (n.s. = nicht signifikant).

4.9.6.2 Tetanus Toxoid (TT)

Nach Stimulation peripheren Blutes mit TT-Antigen wurde die Population der CD4⁺/CD40L⁺ T-Zellen erfasst. Bei 72% der gesunden Kontrollpersonen, 48% der *M. Crohn*-Patienten und 62% der *S. ankylosans*-Patienten konnten CD4⁺/CD40L⁺ T-Zellen gegenüber TT festgestellt werden. Dabei waren zwischen gesunden Kontrollpersonen und Patienten keine Unterschiede in den Frequenzen der T-Zellen zu beobachten (Abb. 18).

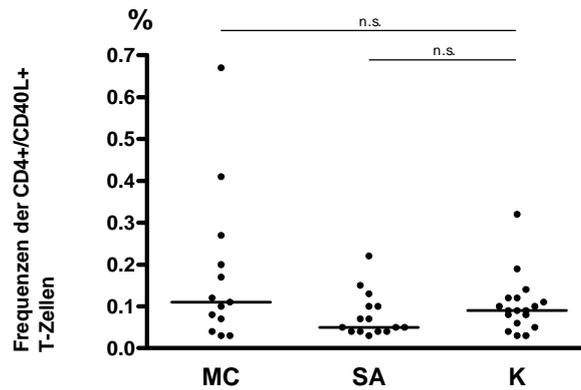


Abb. 18: Stimulation von peripheren CD4⁺ T-Zellen mit Tetanus Toxoid (TT). A. Vollblut von 27 Patienten mit *Morbus Crohn* (MC), 24 Patienten mit *Spondylitis ankylosans* (SA) und 25 gesunden Kontrollpersonen wurde mit TT stimuliert. Nach Fixierung und Permeabilisierung der Leukozyten wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD4, CD40L und IFN- γ markiert. CD4⁺ T-Zellen wurden durchflusszytometrisch gemessen und die Frequenzen der CD4⁺/CD40L⁺ T-Zellen analysiert. Bei 13 *M. Crohn*-Patienten, 15 *S. ankylosans*-Patienten und 18 gesunden Kontrollpersonen konnten CD40L⁺ T-Zellantworten gegenüber TT gezeigt werden. Hier sind die individuellen Frequenzen der CD40L⁺ T-Zellen von TT-reaktiven Individuen dargestellt. Die horizontalen Linien repräsentieren die Medianwerte. Für die Berechnung der p -Werte wurde der Mann-Whitney-Test verwendet (n.s. = nicht signifikant).

5 DISKUSSION

5.1 Herstellung der rekombinanten Proteine von *E. coli*

Ziel dieser Arbeit war es, zunächst eine große Zahl evolutionär konservierter Proteine sowie eine kleinere Zahl von Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* zu exprimieren und zu reinigen. Nachdem dies gelungen war, wurden periphere CD4+ T-Zellen von gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* mit den rekombinanten bakteriellen Proteinen stimuliert. Sämtliche Zielgene wurden in den Expressionsvektor pQTEV2 kloniert, um in der nachfolgenden Proteinexpression ein Fusionsprotein - bestehend aus dem Zielprotein und einem N-terminalen His₇-Tandem - zu generieren. Das His₇-Tandem ermöglichte die affinitätschromatografische Reinigung des Fusionsproteins mit Hilfe von Ni-NTA. Die Überexpression und Reinigung der Proteine wurde zunächst im kleinen Maßstab durchgeführt, um jene Klone zu identifizieren, die lösliche Proteine lieferten. Proteine, die nicht oder nur mit schwacher Ausbeute gereinigt werden konnten, wurden mit Hilfe des Gateway-Systems mit Proteinen fusioniert, die die Löslichkeit der Fusionsproteine steigern können. Zu diesen Fusionspartnern zählen MBP, GST und NusA.

Mittels PCR ließen sich nahezu 99% der konservierten Zielgene erfolgreich amplifizieren. Lediglich 3 Gene konnten nicht amplifiziert werden. Dieses Resultat bestätigt bereits veröffentlichte Ergebnisse bezüglich der Amplifizierung bakterieller Gene mittels PCR (Lesley et al. 2002; Vincentelli et al. 2003; Moy et al. 2004). Die PCR-Produkte wurden in der Regel mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I verdaut (82,1%). Bei 11,6% der PCR-Produkte wurde anstelle von *Bam*HI das Enzym *Bgl*III verwendet. Des Weiteren wurden die Typ I-Restriktionsendonukleasen *Eco*31I und *Bpi*I bei 5,6% bzw. bei 0,7% der PCR-Produkte eingesetzt. Daraufhin konnten alle PCR-Produkte erfolgreich in den Vektor pQTEV2 kloniert werden. Anschließend wurden etwa 95% dieser Proteine als Fusionen mit dem N-terminalen His₇-Tandem im kleinen Maßstab zur Expression gebracht. In der Literatur werden hierzu ähnlich hohe Zahlen beschrieben. Vincentelli et al. konnten mit Hilfe des Gateway-Systems 87% der ausgesuchten Proteine von *E. coli* im kleinen Maßstab

als Fusionen mit einem His₆-Tandem exprimieren. Hierbei wurden verschiedene *E. coli* Wirtsstämme verwendet, um die Effizienz der Proteinexpression zu optimieren (Vincentelli et al. 2003).

In der Studie von Luan et al. wurde die Expression von Proteinen des eukaryontischen Organismus *Caenorhabditis elegans* in *E. coli* beschrieben. Hierzu klonierten die Forscher zunächst 10.167 offene Leseraster in einen Gateway-Vektor. Für die Proteinexpression verwendeten sie 2 verschiedene *E. coli* Wirtsstämme. Am Ende konnten nur 48% der Proteine im kleinen Maßstab exprimiert werden (Luan et al. 2004). Des Weiteren wurden auch humane Proteine in *E. coli* exprimiert, wenn auch nur mit geringer Effizienz. Nur 16% der Proteine ließen sich in löslicher Form exprimieren (Bussow et al. 2005). Ein ähnliches Resultat lieferten Proteine von *Caenorhabditis elegans*: 15% der Proteine lagen in löslicher Form vor (Luan et al. 2004). Diese geringe Zahl löslicher eukaryontischer Proteine ist nicht überraschend: Sowohl unterschiedliche Codon Usage als auch fehlende posttranslationale Modifikationen in *E. coli* kommen als mögliche Ursachen für die geringe Expressionseffizienz in Frage.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich etwa 93% der klonierten konservierten Proteine von *E. coli* im kleinen Maßstab in löslicher Form exprimieren ließen. Möglicherweise ist dies eine Folge der Selektion von hochkonservierten Proteinen. Bei einer anderen Zusammenstellung von *E. coli* Proteinen konnten nämlich nur 60% der Zielproteine in löslicher Form exprimiert werden (Vincentelli et al. 2003). Eine ähnliche Beobachtung war bei der Expression löslicher Proteine von *Bacillus anthracis* in *E. coli* möglich: 86% der konservierten, jedoch lediglich 69% der nicht konservierten Proteine von *Bacillus anthracis*, ließen sich in löslicher Form zur Expression bringen (Au et al. 2006).

Mit der Strategie, Zielgene mit molekularbiologischen Standardtechniken in den Vektor pQTEV2 zu klonieren, um Fusionsproteine mit dem His₇-Tandem im Wirtstamm *E. coli* SCS1 zu produzieren, konnte eine große Zahl von Proteinen gereinigt werden. Für den Fall, dass sich Proteine nicht oder aber nur mit

schwacher Ausbeute reinigen ließen, wurde die Gateway-Technologie angewendet, um diese Proteine mit MBP-His₇, GST-His₇ oder NusA-His₆ zu fusionieren.

Die Fusionierung von Proteinen mit den genannten Fusionspartnern kann die Löslichkeit der Fusionsproteine deutlich verbessern (Cabrita et al. 2006). Im Ergebnis war die Proteinausbeute der meisten konservierten Proteine von *E. coli* höher, wenn sie mit MBP-His₇ fusioniert wurden. Dieses Ergebnis bestätigt die Resultate einer Studie aus dem Jahr 1999, bei der 6 Zielproteine verschiedenen Ursprungs mit Fusionspartnern fusioniert wurden (Kapust et al. 1999). Shih et al. haben beschrieben, dass 60% der untersuchten eukaryontischen Proteine in löslicher Form exprimiert wurden, wenn sie mit MBP oder NusA fusioniert waren. Dagegen konnten nur 38% der Proteine in löslicher Form exprimiert werden, wenn sie mit GST fusioniert waren (Shih et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit brachten die Fusionierungen mit GST und NusA bei einer geringen Zahl von Zielproteinen eine Verbesserung der Ausbeute nach den Reinigungen mit sich. Dieser Unterschied ist möglicherweise den verschiedenen Ursprüngen der Proteine geschuldet (eukaryontische vs. prokaryontische Proteine).

Je Transformation wurden 2 Klone der Expression im kleinen Maßstab zugeführt. Mit Ausnahme von 18 konservierten Genen konnte mit Hilfe dieser Strategie bei jeder Transformation mindestens 1 Klon ermittelt werden, bei dem eine Proteinexpression nachgewiesen werden konnte. Im Fall der 18 nicht exprimierten Gene wurde die Proteinexpression bei jeweils 2 weiteren Klonen getestet und anschließend die Reinigung im kleinen Maßstab durchgeführt. Diese Vorgehensweise ermöglichte die Identifizierung zweier weiterer Proteine, die in löslicher Form exprimiert wurden. Bezüglich der verbleibenden 16 Gene wurde die Klonierungen beginnend mit der PCR wiederholt. Nach dieser zweiten Runde der Klonierung konnten erneut 2 weitere in löslicher Form exprimierte Proteine nachgewiesen werden. Die verbleibenden 14 Gene ließen sich nicht einmal nach einer dritten Runde der Klonierung exprimieren.

Diesen Proteinen war gemein, dass sie mindestens 2 Transmembranhelices enthielten. So ist beschrieben, dass sich die Überexpression und Reinigung von Membranproteinen als schwierig gestaltet (Dobrovetsky et al. 2005). Möglicherweise ist die Reinigung unter nativen Bedingungen nicht die geeignete Methode für diese Proteine, da es während der Expression potenziell zur Bildung von unlöslichen „Einschlusskörpern“ (engl. inclusion bodies) kommen kann. Stattdessen könnte die Reinigung dieser Proteine unter denaturierenden Bedingungen für eine ausreichende Proteinausbeute sorgen.

Des Weiteren sind in den nicht exprimierten Proteinen seltene Codons höher frequentiert. Es wäre daher möglich, dass einige dieser Proteine in Wirtstämmen, die seltene t-RNAs überexprimieren, zur Expression gebracht werden. Alternativ könnten die seltenen Codons mutagenisiert werden, um die Effizienz der Expression zu steigern.

Während des Wachstums, der Zellteilung und der Lyse von *E. coli* Zellen wird LPS freigesetzt (Anspach 2001). Da LPS in Proteinlösungen störend bei der *in vitro*-Stimulation von peripheren T-Zellen wirkt (Bekeredjian-Ding et al. 2006; Schroder et al. 2006; West et al. 2006), war die Entfernung von LPS ein notwendiger Schritt. LPS ist unter neutralen Bedingungen negativ geladen. Dagegen ist Polymyxin-B, ein potenter Ligand von LPS, unter schwachen ionischen Bedingungen an der Aminogruppe positiv geladen. Polymyxin-B bindet LPS hauptsächlich über hydrophobe Interaktionen mit Lipid-A und über elektrostatische Interaktionen. Es wird vermutet, dass die elektrostatischen Interaktionen zwischen dem negativ geladenen LPS und Polymyxin-B stärker sind als die zwischen Proteinen und Polymyxin-B. Zudem sind die geladenen und hydrophoben Gruppen der Proteine aufgrund der globulären Struktur der Proteine fixiert. Dennoch ist die Bindung negativ geladener Proteine an Polymyxin-B möglich, welches Proteinverlust nach sich ziehen kann (Anspach 2001).

Die Stimulation peripherer CD4⁺ T-Zellen von gesunden Spendern zeigte, dass Polymyxin-B behandelte Proteine eine geringere Hintergrundstimulation von T-Zellen bewirkten als gleiche Mengen von unbehandelten Proteinen. Wenn gleiche Volumina von Polymyxin-B behandelten oder unbehandelten Proteinen

analysiert wurden, zeigte sich ebenfalls eine verringerte Hintergrundstimulation. Unter der Annahme, dass diese Proteine keine antigenspezifischen T-Zellantworten auslösen, ist die Verringerung der Hintergrundstimulation vermutlich eine Folge der Entfernung von LPS. Im umgekehrten Fall, also unter der Annahme, dass die Proteine antigenspezifische T-Zellantworten auslösen, bewirkt die Verdünnung der Proteine vermutlich die Verringerung der T-Zellreaktivitäten. In beiden Fällen ist es wahrscheinlich, dass andere bakterielle Kontaminationen keinen bedeutenden Einfluss auf die Stimulation der T-Zellen hatten.

Mit Hilfe des LAL-Tests wurde die Konzentration von LPS in 2 Proteinlösungen, die mit Polymyxin-B-Kugeln behandelt wurden, ermittelt. Beide Proteinlösungen enthielten weniger als 9 pg/ml LPS. Nakagawa et al. stimulierten humanes Vollblut mit Endotoxin (LPS), um die Mindestmenge von LPS zu ermitteln, mit der die Sekretion von Zytokinen in Monozyten ausgelöst wurde. Die ermittelte Menge, bei der es zur Sekretion von TNF- α und IL-6 kam, lag bei 14 pg/ml. Zum Nachweis der LPS-induzierten Sekretion von IL-1 war sogar eine Mindestkonzentration von 100 pg/ml LPS erforderlich (Nakagawa et al. 2002). Die Konzentrationen von LPS in beiden Proteinlösungen lagen eindeutig unterhalb dieser vermutlich kritischen Konzentrationen.

Nach der Expression im großen Maßstab stand fest, dass 52 Proteine nicht mit den erwarteten Mengen gereinigt werden konnten, obwohl die Reinigung dieser Proteine im kleinen Maßstab mit moderater oder starker Ausbeute gelang. Im großen Maßstab ließ sich oftmals die Präzipitation von Proteinen unmittelbar nach der Affinitätschromatografie beobachten. Dies war nicht bei der Reinigung im kleinen Maßstab der Fall, da die Proteine nach der Elution sofort in 4x SDS-Probenpuffer denaturiert wurden. Eine Erklärung für die Präzipitation könnten höhere Proteinkonzentrationen sein, die die Reinigungen im großen Maßstab nach sich ziehen. Des Weiteren erfolgten im großen Maßstab weitere Reinigungsschritte, wie die Umpufferung und die Entfernung von LPS, die zu Proteinverlusten führen.

Aus diesem Grund ist es als gutes Ergebnis zu werten, dass sich insgesamt 73% der ausgesuchten konservierten Proteine von *E. coli* mit der Mindestmenge von 500 µg herstellen ließen. Dabei hat sich die Strategie, Restriktionsklonierung mit der Gateway-Technologie zu kombinieren, als zuverlässige und effiziente Vorgehensweise erwiesen.

Neben den konservierten Proteinen von *E. coli* wurden 39 Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* mit dem Ziel ausgewählt, eine Gruppe variabler Proteine, also nicht konservierter Proteine, herzustellen und diese für die Stimulation peripherer CD4+ T-Zellen zu verwenden. Von diesen 39 Pathogenitätsfaktoren ließen sich 71% erfolgreich in den Vektor pQTEV2 klonieren. 82% der klonierten Gene konnten zur Expression gebracht werden. Davon konnten unter nativen Bedingungen im kleinen Maßstab nur 39% hauptsächlich mit schwacher Ausbeute und unter denaturierenden Bedingungen im großen Maßstab 56% mit starker Ausbeute gereinigt werden. Somit erwies sich die Reinigung der Pathogenitätsfaktoren unter denaturierenden Bedingungen als effizienter. Jedoch bei einigen Pathogenitätsfaktoren, die zwar exprimiert werden konnten, war anschließend die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen nicht erfolgreich. Zumeist handelt es sich hier um Pathogenitätsfaktoren, die nur mit schwacher Ausbeute exprimiert werden konnten, so dass möglicherweise für die anschließende Reinigung zu wenig Protein zur Verfügung stand.

Anders als bei den konservierten Proteinen konnte bei Pathogenitätsfaktoren kein möglicher Zusammenhang zwischen nicht vorhandener, bzw. schwacher Proteinexpression und dem Vorhandensein von Transmembranhelices und seltenen Codons hergestellt werden. So zeigte sich, dass Pathogenitätsfaktoren, die nicht oder aber nur mit schwacher Ausbeute exprimiert werden konnten, keine seltenen Codons enthalten. Im Gegenteil: seltene Codons sind vereinzelt bei stark und moderat exprimierten Pathogenitätsfaktoren vorhanden. Ferner sind Transmembranhelices sowohl in exprimierten als auch in nicht exprimierten Pathogenitätsfaktoren enthalten.

5.2 Niedrigere periphere CD4+ T-Zellantworten bei Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans*

Sowohl bei *M. Crohn* als auch bei *S. ankylosans* ist die Immunpathogenese derzeit nicht vollständig verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurde postuliert, dass hochkonservierte Proteine sowie Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* möglicherweise eine fehlgesteuerte Immunantwort peripherer CD4+ T-Zellen auslösen.

In Tiermodellen konnte demonstriert werden, dass die normale kommensale Darmflora Colitis (Rath et al. 2001; Strober et al. 2002; Guarner et al. 2003) oder Entzündungen der Gelenke und der intestinalen Mukosa (Taurog et al. 1994) hervorruft. *Morbus Crohn* wurde insbesondere mit *E. coli* (Liu et al. 1995; Ryan et al. 2004), darunter auch pathogene Stämme, assoziiert (Boudeau et al. 1999; Glasser et al. 2001; Neut et al. 2002; Swidsinski et al. 2002; Darfeuille-Michaud et al. 2004). Dagegen wurde die Reaktive Arthritis, die einen Subtyp der SpA darstellt, mit Bakterien wie *Chlamydia trachomatis*, *Yersinia* und *Salmonella* (Granfors et al. 1989; Granfors et al. 1990; Hammer et al. 1990; Sieper et al. 1991; Sieper et al. 1996) in Verbindung gebracht.

Duchmann et al. konnten zeigen, dass T-Zellen von Patienten mit *M. Crohn* gegenüber verschiedenen *Enterobacteriaceae* kreuzreagierten (Duchmann et al. 1999). Bei Reaktiver Arthritis-Patienten konnten Kreuzreaktivitäten gegenüber verschiedenen konservierten Hsp60-Proteinen bakteriellen und menschlichen Ursprungs nachgewiesen werden (Mertz et al. 1998; Thiel et al. 2006). Diese Kreuzreaktivitäten auf der Ebene der T-Zellen legten die Vermutung nahe, dass möglicherweise hochkonservierte bakterielle Proteine periphere CD4+ T-Zellantworten bei *M. Crohn* und *S. ankylosans* auszulösen vermögen.

Auf der anderen Seite stellen Pathogenitätsfaktoren eine spezielle Gruppe von bakteriellen Proteinen dar. Im Gegensatz zu den konservierten Proteinen sind sie ausschließlich im biologischen Reich der Bacteria anzutreffen. Daher handelt es sich um eine interessante Gruppe von bakteriellen Proteinen hinsichtlich ihrer

möglichen Beteiligung an der Immunpathogenese des *M. Crohn* und der *S. ankylosans*.

Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen reagierte eine signifikant kleinere Zahl von Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* mit einer T-Zellantwort gegenüber Gemischen von evolutionär konservierten Proteinen von *E. coli*. Bei *M. Crohn* handelte es sich hierbei um 7 und bei *S. ankylosans* um 3 Proteingemische. Dieses Ergebnis zeigte sich sowohl nach Stimulation mit Proteingemischen als auch nach Stimulation mit einzelnen konservierten Proteinen. In Bezug auf die getesteten Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* konnte gezeigt werden, dass eine signifikant kleinere Zahl von *M. Crohn*-Patienten gegenüber 3 Pathogenitätsfaktoren mit einer positiven T-Zellantwort reagierte. Dabei ist insbesondere hervorzuheben, dass nur *M. Crohn*-Patienten in klinischer Remission eine positive T-Zellantwort zeigten, unabhängig davon, ob diese Patienten mit Immunsuppressiva behandelt wurden oder nicht.

Daher stellte sich die Frage besonders für Patienten mit klinisch aktiven *M. Crohn*: ist die niedrige T-Zellantwort Folge einer generellen Immunsuppression oder Folge eines „antigen specific recruitment“ von antigenspezifischen Zellen zum Darm, also zum Ort der Entzündung?

Um diese Frage zu beantworten, wurde zunächst peripheres Blut mit dem Superantigen SEB stimuliert. Hier reagierten wiederum sowohl *M. Crohn*-Patienten als auch *S. ankylosans*-Patienten mit niedrigeren T-Zellantworten. Anschließend stellte sich die Frage, ob diese niedrigere Immunantwort die Folge eines numerischen Defizits von SEB-spezifischen T-Zellen war. Zur Klärung dieser Frage wurde erneut peripheres Blut mit SEB stimuliert, jedoch erfolgte nun im Anschluss die Erfassung von V β 17+ T-Zellen. Dieser Vorgehensweise lag zu Grunde, dass SEB V β -Ketten des T-Zellrezeptors mit MHC II-Molekülen quervernetzt und auf diese Weise vorwiegend T-Zellen aktiviert, die unter anderem V β 17 exprimieren (Choi et al. 1989; Hong et al. 1996). Bei der folgenden Analyse stellte sich heraus, dass es bei gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* keine signifikanten Unterschiede in den Frequenzen der V β 17+ T-Zellen gibt. Daher kann ein numerisches Defizit von

V β 17+ T-Zellen als Ursache für die niedrigeren T-Zellantworten gegenüber SEB bei Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse würden eher für eine generelle Immunsuppression sprechen.

Daraufhin wurde dann die T-Zellantwort auf typische „Recall Antigene“ wie Cytomegalievirus Phosphoprotein 65 kDa und Tetanus Toxoid untersucht. Hier zeigte sich keine T-Zellsuppression bei den Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen. Diese letzteren Ergebnisse lassen daher eher den Schluss zu, dass die *E. coli*-spezifischen T-Zellen doch eher selektiv an den Ort der Entzündung rekrutiert und dort spezifisch gebunden werden, jedoch nicht andere T-Zellen, die spezifisch sind für nicht Darm-assoziierte Antigene.

Wie können nun diese widersprüchlichen Ergebnisse erklärt werden? Hierzu werden in der Literatur zahlreiche Möglichkeiten aufgezeigt.

Marks et al. (Marks et al. 2006) stellten bei *M. Crohn*-Patienten abnorm erniedrigte Immunantworten fest. Nach Verletzung der rektalen Mukosa durch Biopsien war bei *M. Crohn*-Patienten eine wesentlich schwächere Akkumulation von Neutrophilen und IL-8+ Zellen festzustellen als bei gesunden Kontrollpersonen und *C. ulcerosa*-Patienten beobachtet worden war. Ein ähnliches Resultat war auch im Dünndarm von *M. Crohn*-Patienten beobachtet worden. Daneben war die Wanderung von Neutrophilen in experimentell hervorgerufene Verletzungen der Haut bei *M. Crohn* im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen und Patienten mit Rheumatoider Arthritis und *C. ulcerosa* beeinträchtigt. Des Weiteren konnten bei *M. Crohn*-Patienten geringere Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und IL-1 β in der Wundflüssigkeit nachgewiesen werden. Jedoch normalisierte sich bei *M. Crohn*-Patienten die Wanderung von Neutrophilen nach topischer Anwendung von rekombinantem IL-8 unabhängig vom CARD15/NOD2-Status der Patienten. Dagegen bewirkte die topische Anwendung von Muramyl Dipeptid nur bei *M. Crohn*-Patienten mit Wildtyp-CARD15/NOD2 eine gesteigerte Sekretion von IL-8 und nicht bei Patienten, die Träger von CARD15/NOD2-Polymorphismen waren.

Dass LPS die periphere T-Zellantwort negativ beeinflussen kann, demonstrierten Srinivasan et al. Hier wurden *Salmonella*-infizierten Mäusen LPS in Kombination mit einem Peptid (OVA oder Flagellin-Peptid) intravenös verabreicht. In der Folge war die Produktion von IL-2 und TNF- α in antigenspezifischen CD4+ T-Zellen supprimiert. Für diese Suppression war nicht das Antigen verantwortlich, sondern die Existenz von LPS (Srinivasan et al. 2007). Erhöhte Konzentrationen von LPS im Blutplasma konnten bei 48% der untersuchten *M. Crohn*-Patienten und 28% der *C. ulcerosa*-Patienten nachgewiesen werden (Pastor Rojo et al. 2007). Indirekt könnte somit ein Zusammenhang zwischen einer abnormal erhöhten Konzentration von LPS im peripheren Blut von *M. Crohn*-Patienten und einer daraus resultierenden geschwächten peripheren Immunantwort abgeleitet werden.

Bei *S. ankylosans*-Patienten konnten nach Stimulation mit PMA/Ionomycin geringere Frequenzen von peripheren CD4+ T-Zellen festgestellt werden, die IFN- γ und TNF- α produzieren (Rudwaleit et al. 2001). Ebenfalls nach Stimulation mit PMA/Ionomycin konnten bei *M. Crohn*-Patienten geringere Zahlen von peripheren Lymphozyten, CD8+ T-Zellen und CD4+ T-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Auch hier war daher die Produktion von IFN- γ und anderen Zytokinen durch CD4+ T-Zellen beeinträchtigt (Ogura et al. 2005). Eine weitere Studie konnte mittels quantitativer Reverse Transkriptase-PCR demonstrieren, dass die Produktion von IFN- γ und anderen Zytokinen in peripheren mononukleären Blutzellen von Patienten mit *M. Crohn* und *C. ulcerosa* herunterreguliert war (Raddatz et al. 2005).

Dagegen zeigten CD4+ T-Zellen aus entzündeter intestinaler Mukosa von *M. Crohn*-Patienten eine gesteigerte Produktion von IFN- γ (Fuss et al. 1996). CD4+ T-Zellklone aus Darmbiopsien von CED-Patienten zeigten ebenfalls eine gesteigerte Produktion von IFN- γ , nachdem diese mit PMA stimuliert worden waren (Parronchi et al. 1997). CD4+ T-Zellen aus der entzündeten Mukosa von klinisch aktiven *M. Crohn*-Patienten waren gekennzeichnet durch eine gesteigerte Produktion von TNF, IFN- γ und IL-10 im Vergleich zu nicht klinisch aktiven *M. Crohn*-Patienten und Kontrollpatienten. Zudem hatten klinisch aktive *M. Crohn*-Patienten einen geringeren Anteil von peripheren CD4+ Gedächtnis-

T-Zellen, die das Adhäsionsmolekül CD62L exprimieren. Das Adhäsionsmolekül fördert die Migration dieser Zellen zur Mukosa, so dass diese T-Zellpopulation an der Immunpathogenese des *M. Crohn* relevant sein könnte (Garcia de Tena et al. 2006).

Neben Defekten auf der Ebene der T-Zellen könnte auch eine gestörte Antigenpräsentation zu dem Phänomen der niedrigeren peripheren T-Zellantworten beitragen. Baumgart et al. wiesen bei CED-Patienten, die sich in klinischer Remission befanden, einen leichten Rückgang in der Zahl der unreifen dendritischen Zellen im Blut nach. Dagegen konnte bei klinisch aktiven CED-Patienten eine deutliche Reduktion der dendritischen Zellzahlen festgestellt werden. Darüber hinaus konnte die Expression von $\alpha 4\beta 7$ -Integrin auf der Oberfläche der unreifen dendritischen Zellen nachgewiesen werden, so dass es möglich wäre, dass diese Zellen zum Darm migrieren (Baumgart et al. 2005).

Die immunologischen Daten, die im Rahmen dieser Arbeit zusammengetragen wurden, lassen keine eindeutigen Schlüsse bezüglich der niedrigeren peripheren T-Zellantworten bei Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* zu. Wie oben bereits erläutert wurde, deuten die Ergebnisse an, dass möglicherweise *E. coli*-spezifische T-Zellen im Darm angereichert werden. Diese indirekten Schlussfolgerungen müssen durch Untersuchungen von *E. coli*-spezifischen T-Zellen aus dem Darm von *M. Crohn*-Patienten bestätigt werden, indem die T-Zellantwort von intestinalen und peripheren T-Zellen gegenüber den *E. coli* Proteinen verglichen wird.

Auch wenn die Ergebnisse eine spezielle Rolle für *E. coli* als Target für die zelluläre Immunantwort möglich erscheinen lassen, konnten keine einzelnen immundominanten *E. coli*-Proteine identifiziert werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Ätiologie von Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen (CED) wie *Morbus Crohn* (*M. Crohn*) und *Colitis ulcerosa* ist nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass es sich um eine multifaktorielle Erkrankung handelt, an deren Pathogenese genetische Faktoren, Umweltfaktoren und eine fehlregulierte mukosale Immunantwort gegen kommensale Bakterien beteiligt sind. Tiermodelle verdeutlichen, dass die normale Darmflora entscheidend am Entstehen der intestinalen Entzündungsreaktion beteiligt ist. Dabei nimmt das Darmbakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) eine besondere Rolle ein, da es vermutlich mit CED assoziiert ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass T-Zellen von CED-Patienten gegenüber verschiedenen Bakterienspezies kreuzreagieren und diese T-Zellantworten somit vermutlich gegen konservierte bakterielle Proteine gerichtet sind. Daneben gibt es Hinweise, dass vermutlich auch pathogene *E. coli* mit *M. Crohn* assoziiert sind. Daher haben wir neben hochkonservierten Proteinen auch Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* als Test-Antigene ausgesucht, um abnormale T-Zellantworten bei Patienten mit *M. Crohn* und *Spondylitis ankylosans* (*S. ankylosans*) zu untersuchen. Letztere Patienten waren aufgrund der klinischen Gemeinsamkeiten zwischen *S. ankylosans* und *M. Crohn* von Interesse.

Sämtliche Proteine wurden mittels Hochdurchsatzmethoden mit einem N-terminalen Tandem aus 7 Histidinen (His₇) fusioniert und in *E. coli* im kleinen Maßstab exprimiert und unter nativen Bedingungen affinitätschromatografisch gereinigt. Dabei zeigte sich, dass die Mehrheit der konservierten Proteine mit starker Ausbeute gereinigt werden konnte. Proteine dagegen, deren Reinigung nur mit schwacher Ausbeute gelang, wurden N-terminal mit MBP, GST und NusA fusioniert, da diese Fusionspartner die Löslichkeit und somit die Ausbeute des Fusionsproteins steigern können. Auf der anderen Seite wurden sämtliche Pathogenitätsfaktoren als His₇-Fusionsproteine unter denaturierenden Bedingungen gereinigt. Um die Proteinausbeute zu steigern, wurde jedes Protein im großen Maßstab exprimiert. Anschließend erfolgte die Entfernung von Lipopolysaccharid aus den Proteinpräparationen mittels Einsatzes von Polymyxin-B beschichteten magnetischen Kugeln. Insgesamt gelang es

197 konservierte Proteine und 13 Pathogenitätsfaktoren von *E. coli* mit der Mindestmenge von 500 µg herzustellen.

Im anschließenden Vollblut-Assay wurden aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von Vollblut Gemische mit jeweils 10 konservierten Proteinen eingesetzt. Dagegen wurden die Pathogenitätsfaktoren einzeln getestet. Im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen konnten bei einer signifikant kleineren Zahl von Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* CD4+ T-Zellantworten gegenüber einer Reihe von Proteingemischen beobachtet werden. Zudem reagierten Patienten mit *M. Crohn* und *S. ankylosans* gegenüber dem Superantigen *Staphylococcus aureus* enterotoxin B mit signifikant geringeren Frequenzen von CD4+ T-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Zusammengenommen sprachen diese Ergebnisse eher für eine generelle Immunsuppression als Grund für die niedrige T-Zellantwort. Jedoch konnten diese niedrigen T-Zellantworten nach Vollblutstimulierung mit den „Recall-Antigenen“ Cytomegalievirus Phosphoprotein 65 kDa und Tetanus Toxoid nicht bestätigt werden. Möglicherweise lassen sich diese letzteren Ergebnisse so deuten, dass bei *M. Crohn* und *S. ankylosans* die *E. coli*-spezifischen T-Zellen selektiv an den Ort der Entzündung (Darm) rekrutiert und dort spezifisch gebunden werden, jedoch nicht andere antigenspezifische T-Zellen. Auch wenn die Ergebnisse eine spezielle Rolle für *E. coli* als Target für die zelluläre Immunantwort möglich erscheinen lassen, konnten keine einzelnen immundominanten *E. coli*-Proteine identifiziert werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aderem, A. and Ulevitch, R. J. (2000). "Toll-like receptors in the induction of the innate immune response." *Nature* **406**(6797): 782-7.
- Alamanos, Y.;Papadopoulos, N. G.;Voulgari, P. V.;Karakatsanis, A.;Siozos, C. and Drosos, A. A. (2004). "Epidemiology of ankylosing spondylitis in Northwest Greece, 1983-2002." *Rheumatology (Oxford)* **43**(5): 615-8.
- Alharbi, S. A.;Mahmoud, F. F.;Al Awadi, A.;Al Jumma, R. A.;Khodakhast, F. and Alsulaiman, S. M. (1996). "Association of MHC class I with spondyloarthropathies in Kuwait." *Eur J Immunogenet* **23**(1): 67-70.
- Altschul, S. F.;Madden, T. L.;Schaffer, A. A.;Zhang, J.;Zhang, Z.;Miller, W. and Lipman, D. J. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* **25**(17): 3389-402.
- Anspach, F. B. (2001). "Endotoxin removal by affinity sorbents." *J Biochem Biophys Methods* **49**(1-3): 665-81.
- Arbour, N. C.;Lorenz, E.;Schutte, B. C.;Zabner, J.;Kline, J. N.;Jones, M.;Frees, K.;Watt, J. L. and Schwartz, D. A. (2000). "TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans." *Nat Genet* **25**(2): 187-91.
- Armitage, E.;Drummond, H. E.;Wilson, D. C. and Ghosh, S. (2001). "Increasing incidence of both juvenile-onset Crohn's disease and ulcerative colitis in Scotland." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **13**(12): 1439-47.
- Armitage, E. L.;Aldhous, M. C.;Anderson, N.;Drummond, H. E.;Riemersma, R. A.;Ghosh, S. and Satsangi, J. (2004). "Incidence of juvenile-onset Crohn's disease in Scotland: association with northern latitude and affluence." *Gastroenterology* **127**(4): 1051-7.
- Arnott, I. D.;Nimmo, E. R.;Drummond, H. E.;Fennell, J.;Smith, B. R.;MacKinlay, E.;Morecroft, J.;Anderson, N.;Kelleher, D.;O'Sullivan, M.;McManus, R. and Satsangi, J. (2004). "NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe?" *Genes Immun* **5**(5): 417-25.
- Atagunduz, P.;Appel, H.;Kuon, W.;Wu, P.;Thiel, A.;Kloetzel, P. M. and Sieper, J. (2005). "HLA-B27-restricted CD8+ T cell response to cartilage-derived self peptides in ankylosing spondylitis." *Arthritis Rheum* **52**(3): 892-901.
- Au, K.;Berrow, N. S.;Blagova, E.;Boucher, I. W.;Boyle, M. P.;Brannigan, J. A.;Carter, L. G.;Dierks, T.;Folkers, G.;Grenha, R.;Harlos, K.;Kaptein, R.;Kalliomaa, A. K.;Levdikov, V. M.;Meier, C.;Milioti, N.;Moroz, O.;Muller, A.;Owens, R. J.;Rzechorzek, N.;Sainsbury, S.;Stuart, D. I.;Walter, T. S.;Waterman, D. G.;Wilkinson, A. J.;Wilson, K. S.;Zaccai, N.;Esnouf, R. M. and Fogg, M. J. (2006). "Application of high-throughput technologies to a structural proteomics-type analysis of *Bacillus anthracis*." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **62**(Pt 10): 1267-75.
- Ausubel, F. M.;Brent, R.;Kingston, R. E.;Moore, D. D.;Seidman, J. G.;Smith, J. A. and Struhl, K. (2001). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Bakland, G.;Nossent, H. C. and Gran, J. T. (2005). "Incidence and prevalence of ankylosing spondylitis in Northern Norway." *Arthritis Rheum* **53**(6): 850-5.
- Barnich, N.;Carvalho, F. A.;Glasser, A. L.;Darcha, C.;Jantscheff, P.;Allez, M.;Peeters, H.;Bommelaer, G.;Desreumaux, P.;Colombel, J. F. and

- Darfeuille-Michaud, A. (2007). "CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive E. coli, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease." *J Clin Invest* **117**(6): 1566-74.
- Baumgart, D. C.; Metzke, D.; Schmitz, J.; Scheffold, A.; Sturm, A.; Wiedenmann, B. and Dignass, A. U. (2005). "Patients with active inflammatory bowel disease lack immature peripheral blood plasmacytoid and myeloid dendritic cells." *Gut* **54**(2): 228-36.
- Bekeredjian-Ding, I.; Roth, S. I.; Gilles, S.; Giese, T.; Ablasser, A.; Hornung, V.; Endres, S. and Hartmann, G. (2006). "T cell-independent, TLR-induced IL-12p70 production in primary human monocytes." *J Immunol* **176**(12): 7438-46.
- Beninga, J.; Kropff, B. and Mach, M. (1995). "Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response." *J Gen Virol* **76** (Pt 1): 153-60.
- Best, W. R.; Bechtel, J. M.; Singleton, J. W. and Kern, F., Jr. (1976). "Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study." *Gastroenterology* **70**(3): 439-44.
- Boudeau, J.; Glasser, A. L.; Masseret, E.; Joly, B. and Darfeuille-Michaud, A. (1999). "Invasive ability of an Escherichia coli strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease." *Infect Immun* **67**(9): 4499-509.
- Braun, J.; Bollow, M.; Remlinger, G.; Eggens, U.; Rudwaleit, M.; Distler, A. and Sieper, J. (1998). "Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors." *Arthritis Rheum* **41**(1): 58-67.
- Braun, J. and Sieper, J. (2003). Spondyloarthritides and related arthritides. *Oxford Textbook of Medicine*. Warrel, Cox, Firth and Benz. New York, Oxford University Press: 43-53.
- Brewerton, D. A.; Hart, F. D.; Nicholls, A.; Caffrey, M.; James, D. C. and Sturrock, R. D. (1973). "Ankylosing spondylitis and HL-A 27." *Lancet* **1**(7809): 904-7.
- Bridger, S.; Lee, J. C.; Bjarnason, I.; Jones, J. E. and Macpherson, A. J. (2002). "In siblings with similar genetic susceptibility for inflammatory bowel disease, smokers tend to develop Crohn's disease and non-smokers develop ulcerative colitis." *Gut* **51**(1): 21-5.
- Brown, M. A.; Jepson, A.; Young, A.; Whittle, H. C.; Greenwood, B. M. and Wordsworth, B. P. (1997a). "Ankylosing spondylitis in West Africans--evidence for a non-HLA-B27 protective effect." *Ann Rheum Dis* **56**(1): 68-70.
- Brown, M. A.; Kennedy, L. G.; MacGregor, A. J.; Darke, C.; Duncan, E.; Shatford, J. L.; Taylor, A.; Calin, A. and Wordsworth, P. (1997b). "Susceptibility to ankylosing spondylitis in twins: the role of genes, HLA, and the environment." *Arthritis Rheum* **40**(10): 1823-8.
- Brown, M. A.; Pile, K. D.; Kennedy, L. G.; Calin, A.; Darke, C.; Bell, J.; Wordsworth, B. P. and Cornelis, F. (1996). "HLA class I associations of ankylosing spondylitis in the white population in the United Kingdom." *Ann Rheum Dis* **55**(4): 268-70.
- Burton, P. R.; Clayton, D. G.; Cardon, L. R.; Craddock, N.; Deloukas, P.; Duncanson, A.; Kwiatkowski, D. P.; McCarthy, M. I.; Ouwehand, W. H.; Samani, N. J.; Todd, J. A.; Donnelly, P.; Barrett, J. C.; Davison, D.; Easton, D.; Evans, D. M.; Leung, H. T.; Marchini, J. L.; Morris, A. P.; Spencer, C. C.; Tobin, M. D.; Attwood, A. P.; Boorman, J. P.; Cant,

- B.;Everson, U.;Hussey, J. M.;Jolley, J. D.;Knight, A. S.;Koch, K.;Meech, E.;Nutland, S.;Prowse, C. V.;Stevens, H. E.;Taylor, N. C.;Walters, G. R.;Walker, N. M.;Watkins, N. A.;Winzer, T.;Jones, R. W.;McArdle, W. L.;Ring, S. M.;Strachan, D. P.;Pembrey, M.;Breen, G.;St Clair, D.;Caesar, S.;Gordon-Smith, K.;Jones, L.;Fraser, C.;Green, E. K.;Grozeva, D.;Hamshere, M. L.;Holmans, P. A.;Jones, I. R.;Kirov, G.;Moskivina, V.;Nikolov, I.;O'Donovan, M. C.;Owen, M. J.;Collier, D. A.;Elkin, A.;Farmer, A.;Williamson, R.;McGuffin, P.;Young, A. H.;Ferrier, I. N.;Ball, S. G.;Balmforth, A. J.;Barrett, J. H.;Bishop, T. D.;Iles, M. M.;Maqbool, A.;Yuldasheva, N.;Hall, A. S.;Braund, P. S.;Dixon, R. J.;Mangino, M.;Stevens, S.;Thompson, J. R.;Bredin, F.;Tremelling, M.;Parkes, M.;Drummond, H.;Lees, C. W.;Nimmo, E. R.;Satsangi, J.;Fisher, S. A.;Forbes, A.;Lewis, C. M.;Onnie, C. M.;Prescott, N. J.;Sanderson, J.;Matthew, C. G.;Barbour, J.;Mohiuddin, M. K.;Todhunter, C. E.;Mansfield, J. C.;Ahmad, T.;Cummings, F. R.;Jewell, D. P.;Webster, J.;Brown, M. J.;Lathrop, M. G.;Connell, J.;Dominiczak, A.;Marcano, C. A.;Burke, B.;Dobson, R.;Gungadoo, J.;Lee, K. L.;Munroe, P. B.;Newhouse, S. J.;Onipinla, A.;Wallace, C.;Xue, M.;Caulfield, M.;Farrall, M.;Barton, A.;Bruce, I. N.;Donovan, H.;Eyre, S.;Gilbert, P. D.;Hilder, S. L.;Hinks, A. M.;John, S. L.;Potter, C.;Silman, A. J.;Symmons, D. P.;Thomson, W.;Worthington, J.;Dunger, D. B.;Widmer, B.;Frayling, T. M.;Freathy, R. M.;Lango, H.;Perry, J. R.;Shields, B. M.;Weedon, M. N.;Hattersley, A. T.;Hitman, G. A.;Walker, M.;Elliott, K. S.;Groves, C. J.;Lindgren, C. M.;Rayner, N. W.;Timpson, N. J.;Zeggini, E.;Newport, M.;Sirugo, G.;Lyons, E.;Vannberg, F.;Hill, A. V.;Bradbury, L. A.;Farrar, C.;Pointon, J. J.;Wordsworth, P.;Brown, M. A.;Franklyn, J. A.;Heward, J. M.;Simmonds, M. J.;Gough, S. C.;Seal, S.;Stratton, M. R.;Rahman, N.;Ban, M.;Goris, A.;Sawcer, S. J.;Compston, A.;Conway, D.;Jallow, M.;Newport, M.;Sirugo, G.;Rockett, K. A.;Bumpstead, S. J.;Chaney, A.;Downes, K.;Ghori, M. J.;Gwilliam, R.;Hunt, S. E.;Inouye, M.;Keniry, A.;King, E.;McGinnis, R.;Potter, S.;Ravindrarajah, R.;Whittaker, P.;Widdén, C.;Withers, D.;Cardin, N. J.;Davison, D.;Ferreira, T.;Pereira-Gale, J.;Hallgrimsdóttir, I. B.;Howie, B. N.;Su, Z.;Teo, Y. Y.;Vukcevic, D.;Bentley, D.;Brown, M. A.;Compston, A.;Farrall, M.;Hall, A. S.;Hattersley, A. T.;Hill, A. V.;Parkes, M.;Pembrey, M.;Stratton, M. R.;Mitchell, S. L.;Newby, P. R.;Brand, O. J.;Carr-Smith, J.;Pearce, S. H.;McGinnis, R.;Keniry, A.;Deloukas, P.;Reveille, J. D.;Zhou, X.;Sims, A. M.;Dowling, A.;Taylor, J.;Doan, T.;Davis, J. C.;Savage, L.;Ward, M. M.;Learch, T. L.;Weisman, M. H. and Brown, M. (2007). "Association scan of 14,500 nonsynonymous SNPs in four diseases identifies autoimmunity variants." *Nat Genet* **39**(11): 1329-37.
- Bussow, K.;Scheich, C.;Sievert, V.;Harttig, U.;Schultz, J.;Simon, B.;Bork, P.;Lehrach, H. and Heinemann, U. (2005). "Structural genomics of human proteins--target selection and generation of a public catalogue of expression clones." *Microb Cell Fact* **4**: 21.
- Buwitt-Beckmann, U.;Heine, H.;Wiesmuller, K. H.;Jung, G.;Brock, R.;Akira, S. and Ulmer, A. J. (2006). "TLR1- and TLR6-independent recognition of bacterial lipopeptides." *J Biol Chem* **281**(14): 9049-57.

- Cabrita, L. D.; Dai, W. and Bottomley, S. P. (2006). "A family of E. coli expression vectors for laboratory scale and high throughput soluble protein production." BMC Biotechnol **6**: 12.
- Carbone, L. D.; Cooper, C.; Michet, C. J.; Atkinson, E. J.; O'Fallon, W. M. and Melton, L. J., 3rd (1992). "Ankylosing spondylitis in Rochester, Minnesota, 1935-1989. Is the epidemiology changing?" Arthritis Rheum **35**(12): 1476-82.
- Choi, Y. W.; Kotzin, B.; Herron, L.; Callahan, J.; Marrack, P. and Kappler, J. (1989). "Interaction of Staphylococcus aureus toxin "superantigens" with human T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(22): 8941-5.
- Cobrin, G. M. and Abreu, M. T. (2005). "Defects in mucosal immunity leading to Crohn's disease." Immunol Rev **206**: 277-95.
- Crohn, B. B.; Ginzburg, L. and Oppenheimer, G. D. (1984). "Landmark article Oct 15, 1932. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. By Burril B. Crohn, Leon Ginzburg, and Gordon D. Oppenheimer." Jama **251**(1): 73-9.
- D'Inca, R.; Annese, V.; di Leo, V.; Latiano, A.; Quaino, V.; Abazia, C.; Vettorato, M. G. and Sturniolo, G. C. (2006). "Increased intestinal permeability and NOD2 variants in familial and sporadic Crohn's disease." Aliment Pharmacol Ther **23**(10): 1455-61.
- Darfeuille-Michaud, A.; Boudeau, J.; Bulois, P.; Neut, C.; Glasser, A. L.; Barnich, N.; Bringer, M. A.; Swidsinski, A.; Beaugerie, L. and Colombel, J. F. (2004). "High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease." Gastroenterology **127**(2): 412-21.
- Darfeuille-Michaud, A.; Neut, C.; Barnich, N.; Lederman, E.; Di Martino, P.; Desreumaux, P.; Gambiez, L.; Joly, B.; Cortot, A. and Colombel, J. F. (1998). "Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease." Gastroenterology **115**(6): 1405-13.
- de Vlam, K.; Mielants, H.; Cuvelier, C.; De Keyser, F.; Veys, E. M. and De Vos, M. (2000). "Spondyloarthropathy is underestimated in inflammatory bowel disease: prevalence and HLA association." J Rheumatol **27**(12): 2860-5.
- De Vos, M.; Mielants, H.; Cuvelier, C.; Elewaut, A. and Veys, E. (1996). "Long-term evolution of gut inflammation in patients with spondyloarthropathy." Gastroenterology **110**(6): 1696-703.
- Dobrovetsky, E.; Lu, M. L.; Andorn-Broza, R.; Khutoreskaya, G.; Bray, J. E.; Savchenko, A.; Arrowsmith, C. H.; Edwards, A. M. and Koth, C. M. (2005). "High-throughput production of prokaryotic membrane proteins." J Struct Funct Genomics **6**(1): 33-50.
- Duchmann, R.; May, E.; Heike, M.; Knolle, P.; Neurath, M. and Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1999). "T cell specificity and cross reactivity towards enterobacteria, bacteroides, bifidobacterium, and antigens from resident intestinal flora in humans." Gut **44**(6): 812-8.
- Duchmann, R. and Zeitz, M. (2005). Crohn's Disease: Current Pathogenetic Paradigms. Mucosal Immunology. J. Mestecky, J. Bienenstock, M. Lammet al, Elsevier Academic Press: 1265 - 1286.
- Fernandez-Sueiro, J. L.; Alonso, C.; Blanco, F. J.; Rodriguez-Gomez, M.; Galdo, F. and Gonzalez-Gay, M. A. (2004). "Prevalence of HLA-B27 and subtypes of HLA-B27 associated with ankylosing spondylitis in Galicia, Spain." Clin Exp Rheumatol **22**(4): 465-8.
- Franchi, L.; Park, J. H.; Shaw, M. H.; Marina-Garcia, N.; Chen, G.; Kim, Y. G. and Nunez, G. (2008). "Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease." Cell Microbiol **10**(1): 1-8.

- Franchimont, D.; Vermeire, S.; El Housni, H.; Pierik, M.; Van Steen, K.; Gustot, T.; Quertinmont, E.; Abramowicz, M.; Van Gossum, A.; Deviere, J. and Rutgeerts, P. (2004). "Deficient host-bacteria interactions in inflammatory bowel disease? The toll-like receptor (TLR)-4 Asp299gly polymorphism is associated with Crohn's disease and ulcerative colitis." Gut **53**(7): 987-92.
- Frentsch, M.; Arbach, O.; Kirchoff, D.; Moewes, B.; Worm, M.; Rothe, M.; Scheffold, A. and Thiel, A. (2005). "Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression." Nat Med **11**(10): 1118-24.
- Fuss, I. J.; Neurath, M.; Boirivant, M.; Klein, J. S.; de la Motte, C.; Strong, S. A.; Fiocchi, C. and Strober, W. (1996). "Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5." J Immunol **157**(3): 1261-70.
- Garcia de Tena, J.; Manzano, L.; Leal, J. C.; San Antonio, E.; Sualdea, V. and Alvarez-Mon, M. (2006). "Distinctive pattern of cytokine production and adhesion molecule expression in peripheral blood memory CD4+ T cells from patients with active Crohn's disease." J Clin Immunol **26**(3): 233-42.
- Garrett, S.; Jenkinson, T.; Kennedy, L. G.; Whitelock, H.; Gaisford, P. and Calin, A. (1994). "A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index." J Rheumatol **21**(12): 2286-91.
- Gaston, J. S.; Life, P. F.; Granfors, K.; Merilahti-Palo, R.; Bailey, L.; Consalvey, S.; Toivanen, A. and Bacon, P. A. (1989). "Synovial T lymphocyte recognition of organisms that trigger reactive arthritis." Clin Exp Immunol **76**(3): 348-53.
- Girardin, S. E.; Boneca, I. G.; Viala, J.; Chamaillard, M.; Labigne, A.; Thomas, G.; Philpott, D. J. and Sansonetti, P. J. (2003). "Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection." J Biol Chem **278**(11): 8869-72.
- Girardin, S. E. and Philpott, D. J. (2004). "Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity." Eur J Immunol **34**(7): 1777-82.
- Glasser, A. L.; Boudeau, J.; Barnich, N.; Perruchot, M. H.; Colombel, J. F. and Darfeuille-Michaud, A. (2001). "Adherent invasive Escherichia coli strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death." Infect Immun **69**(9): 5529-37.
- Gran, J. T.; Husby, G. and Hordvik, M. (1985). "Prevalence of ankylosing spondylitis in males and females in a young middle-aged population of Tromso, northern Norway." Ann Rheum Dis **44**(6): 359-67.
- Gran, J. T.; Mellby, A. S. and Husby, G. (1984). "The prevalence of HLA-B27 in Northern Norway." Scand J Rheumatol **13**(2): 173-6.
- Granfors, K.; Jalkanen, S.; Lindberg, A. A.; Maki-Ikola, O.; von Essen, R.; Lahesmaa-Rantala, R.; Isomaki, H.; Saario, R.; Arnold, W. J. and Toivanen, A. (1990). "Salmonella lipopolysaccharide in synovial cells from patients with reactive arthritis." Lancet **335**(8691): 685-8.
- Granfors, K.; Jalkanen, S.; von Essen, R.; Lahesmaa-Rantala, R.; Isomaki, O.; Pekkola-Heino, K.; Merilahti-Palo, R.; Saario, R.; Isomaki, H. and Toivanen, A. (1989). "Yersinia antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis." N Engl J Med **320**(4): 216-21.

- Guarner, F. and Malagelada, J. R. (2003). "Role of bacteria in experimental colitis." *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **17**(5): 793-804.
- Halfvarson, J.;Bresso, F.;D'Amato, M.;Jannerot, G.;Pettersson, S. and Tysk, C. (2005). "CARD15/NOD2 polymorphisms do not explain concordance of Crohn's disease in Swedish monozygotic twins." *Dig Liver Dis* **37**(10): 768-72.
- Hammer, M.;Zeidler, H.;Klimsa, S. and Heesemann, J. (1990). "Yersinia enterocolitica in the synovial membrane of patients with Yersinia-induced arthritis." *Arthritis Rheum* **33**(12): 1795-800.
- Hampe, J.;Cuthbert, A.;Croucher, P. J.;Mirza, M. M.;Mascheretti, S.;Fisher, S.;Frenzel, H.;King, K.;Hasselmeyer, A.;MacPherson, A. J.;Bridger, S.;van Deventer, S.;Forbes, A.;Nikolaus, S.;Lennard-Jones, J. E.;Foelsch, U. R.;Krawczak, M.;Lewis, C.;Schreiber, S. and Mathew, C. G. (2001). "Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations." *Lancet* **357**(9272): 1925-8.
- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." *J Mol Biol* **166**(4): 557-80.
- Harris, J. E. and Lammerding, A. M. (2001). "Crohn's disease and Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: current issues." *J Food Prot* **64**(12): 2103-10.
- Hiatt, R. A. and Kaufman, L. (1988). "Epidemiology of inflammatory bowel disease in a defined northern California population." *West J Med* **149**(5): 541-6.
- Hoebe, K.;Jiang, Z.;Tabeta, K.;Du, X.;Georgel, P.;Crozat, K. and Beutler, B. (2006). "Genetic analysis of innate immunity." *Adv Immunol* **91**: 175-226.
- Hong, S. C.;Waterbury, G. and Janeway, C. A., Jr. (1996). "Different superantigens interact with distinct sites in the Vbeta domain of a single T cell receptor." *J Exp Med* **183**(4): 1437-46.
- Hugot, J. P.;Alberti, C.;Berrebi, D.;Bingen, E. and Cezard, J. P. (2003). "Crohn's disease: the cold chain hypothesis." *Lancet* **362**(9400): 2012-5.
- Hugot, J. P.;Chamaillard, M.;Zouali, H.;Lesage, S.;Cezard, J. P.;Belaiche, J.;Almer, S.;Tysk, C.;O'Morain, C. A.;Gassull, M.;Binder, V.;Finkel, Y.;Cortot, A.;Modigliani, R.;Laurent-Puig, P.;Gower-Rousseau, C.;Macry, J.;Colombel, J. F.;Sahbatou, M. and Thomas, G. (2001). "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease." *Nature* **411**(6837): 599-603.
- Hukuda, S.;Minami, M.;Saito, T.;Mitsui, H.;Matsui, N.;Komatsubara, Y.;Makino, H.;Shibata, T.;Shingu, M.;Sakou, T. and Shichikawa, K. (2001). "Spondyloarthropathies in Japan: nationwide questionnaire survey performed by the Japan Ankylosing Spondylitis Society." *J Rheumatol* **28**(3): 554-9.
- Inoue, H.;Nojima, H. and Okayama, H. (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-8.
- Ito, R.;Shin-Ya, M.;Kishida, T.;Urano, A.;Takada, R.;Sakagami, J.;Imanishi, J.;Kita, M.;Ueda, Y.;Iwakura, Y.;Kataoka, K.;Okanoue, T. and Mazda, O. (2006). "Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice." *Clin Exp Immunol* **146**(2): 330-8.
- Kaipainen-Seppanen, O. and Aho, K. (2000). "Incidence of chronic inflammatory joint diseases in Finland in 1995." *J Rheumatol* **27**(1): 94-100.

- Kapust, R. B. and Waugh, D. S. (1999). "Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused." Protein Sci **8**(8): 1668-74.
- Karp, L. C. and Targan, S. R. (2005). Ulcerative Colitis: Evolving Insights into Pathogenesis. Mucosal Immunology. J. Mestecky, J. Bienenstock, M. Lammet al, Elsevier Academic Press: 1255 - 1264.
- Karp, P. D.;Keseler, I. M.;Shearer, A.;Latendresse, M.;Krummenacker, M.;Paley, S. M.;Paulsen, I.;Collado-Vides, J.;Gama-Castro, S.;Peralta-Gil, M.;Santos-Zavaleta, A.;Penalozza-Spinola, M. I.;Bonavides-Martinez, C. and Ingraham, J. (2007). "Multidimensional annotation of the Escherichia coli K-12 genome." Nucleic Acids Res **35**(22): 7577-90.
- Khan, M. A. (1995). "HLA-B27 and its subtypes in world populations." Curr Opin Rheumatol **7**(4): 263-9.
- Khan, M. A.;Braun, W. E.;Kushner, I.;Grecek, D. E.;Muir, W. A. and Steinberg, A. G. (1977). "HLA B27 in ankylosing spondylitis: differences in frequency and relative risk in American Blacks and Caucasians." J Rheumatol Suppl **3**: 39-43.
- Klein, W.;Tromm, A.;Griga, T.;Fricke, H.;Folwaczny, C.;Hocke, M.;Eitner, K.;Marx, M.;Duerig, N. and Epplen, J. T. (2002). "A polymorphism in the CD14 gene is associated with Crohn disease." Scand J Gastroenterol **37**(2): 189-91.
- Koloski, N. A.;Bret, L. and Radford-Smith, G. (2008). "Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: a critical review of the literature." World J Gastroenterol **14**(2): 165-73.
- Kotlowski, R.;Bernstein, C. N.;Sepeshri, S. and Krause, D. O. (2007). "High prevalence of Escherichia coli belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease." Gut **56**(5): 669-75.
- Krogh, A.;Larsson, B.;von Heijne, G. and Sonnhammer, E. L. (2001). "Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes." J Mol Biol **305**(3): 567-80.
- Kuon, W.;Holzhutter, H. G.;Appel, H.;Grolms, M.;Kollnberger, S.;Traeder, A.;Henklein, P.;Weiss, E.;Thiel, A.;Lauster, R.;Bowness, P.;Radbruch, A.;Kloetzel, P. M. and Sieper, J. (2001). "Identification of HLA-B27-restricted peptides from the Chlamydia trachomatis proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases." J Immunol **167**(8): 4738-46.
- Kuon, W. and Sieper, J. (2003). "Identification of HLA-B27-restricted peptides in reactive arthritis and other spondyloarthropathies: computer algorithms and fluorescent activated cell sorting analysis as tools for hunting of HLA-B27-restricted chlamydial and autologous crossreactive peptides involved in reactive arthritis and ankylosing spondylitis." Rheum Dis Clin North Am **29**(3): 595-611.
- Kyrpides, N.;Overbeek, R. and Ouzounis, C. (1999). "Universal protein families and the functional content of the last universal common ancestor." J Mol Evol **49**(4): 413-23.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-5.
- Laharie, D.;Debeugny, S.;Peeters, M.;Van Gossum, A.;Gower-Rousseau, C.;Belaiche, J.;Fiasse, R.;Dupas, J. L.;Lerebours, E.;Piotte, S.;Cortot, A.;Vermeire, S.;Grandbastien, B. and Colombel, J. F. (2001).

- "Inflammatory bowel disease in spouses and their offspring."
Gastroenterology **120**(4): 816-9.
- Lakatos, P. L. (2006). "Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: up or down?" World J Gastroenterol **12**(38): 6102-8.
- Lakatos, P. L.;Fischer, S.;Lakatos, L.;Gal, I. and Papp, J. (2006). "Current concept on the pathogenesis of inflammatory bowel disease-crosstalk between genetic and microbial factors: pathogenic bacteria and altered bacterial sensing or changes in mucosal integrity take "toll" ?" World J Gastroenterol **12**(12): 1829-41.
- Landers, C. J.;Cohavy, O.;Misra, R.;Yang, H.;Lin, Y. C.;Braun, J. and Targan, S. R. (2002). "Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto- and microbial antigens." Gastroenterology **123**(3): 689-99.
- Leirisalo-Repo, M. (1998). "Prognosis, course of disease, and treatment of the spondyloarthropathies." Rheum Dis Clin North Am **24**(4): 737-51, viii.
- Leong, R. W.;Lau, J. Y. and Sung, J. J. (2004). "The epidemiology and phenotype of Crohn's disease in the Chinese population." Inflamm Bowel Dis **10**(5): 646-51.
- Lesley, S. A.;Kuhn, P.;Godzik, A.;Deacon, A. M.;Mathews, I.;Kreusch, A.;Spraggon, G.;Klock, H. E.;McMullan, D.;Shin, T.;Vincent, J.;Robb, A.;Brinen, L. S.;Miller, M. D.;McPhillips, T. M.;Miller, M. A.;Scheibe, D.;Canaves, J. M.;Guda, C.;Jaroszewski, L.;Selby, T. L.;Elslinger, M. A.;Wooley, J.;Taylor, S. S.;Hodgson, K. O.;Wilson, I. A.;Schultz, P. G. and Stevens, R. C. (2002). "Structural genomics of the Thermotoga maritima proteome implemented in a high-throughput structure determination pipeline." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11664-9.
- Liu, Y.;van Kruiningen, H. J.;West, A. B.;Cartun, R. W.;Cortot, A. and Colombel, J. F. (1995). "Immunocytochemical evidence of Listeria, Escherichia coli, and Streptococcus antigens in Crohn's disease." Gastroenterology **108**(5): 1396-404.
- Lodes, M. J.;Cong, Y.;Elson, C. O.;Mohamath, R.;Landers, C. J.;Targan, S. R.;Fort, M. and Hershberg, R. M. (2004). "Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease." J Clin Invest **113**(9): 1296-306.
- Loffler, A. and Glados, M. (1993). "[Data on the epidemiology of Crohn disease in the city of Cologne]." Med Klin (Munich) **88**(9): 516-9.
- Loftus, C. G.;Loftus, E. V., Jr.;Harmsen, W. S.;Zinsmeister, A. R.;Tremaine, W. J.;Melton, L. J., 3rd and Sandborn, W. J. (2007). "Update on the incidence and prevalence of Crohn's disease and ulcerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-2000." Inflamm Bowel Dis **13**(3): 254-61.
- Luan, C. H.;Qiu, S.;Finley, J. B.;Carson, M.;Gray, R. J.;Huang, W.;Johnson, D.;Tsao, J.;Reboul, J.;Vaglio, P.;Hill, D. E.;Vidal, M.;Delucas, L. J. and Luo, M. (2004). "High-throughput expression of C. elegans proteins." Genome Res **14**(10B): 2102-10.
- Lyons, A. B. and Parish, C. R. (1994). "Determination of lymphocyte division by flow cytometry." J Immunol Methods **171**(1): 131-7.
- Mach, H.;Middaugh, C. R. and Lewis, R. V. (1992). "Detection of proteins and phenol in DNA samples with second-derivative absorption spectroscopy." Anal Biochem **200**(1): 20-6.
- Marks, D. J.;Harbord, M. W.;MacAllister, R.;Rahman, F. Z.;Young, J.;Al-Lazikani, B.;Lees, W.;Novelli, M.;Bloom, S. and Segal, A. W. (2006).

- "Defective acute inflammation in Crohn's disease: a clinical investigation." Lancet **367**(9511): 668-78.
- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nat Rev Immunol **1**(2): 135-45.
- Mei, L.;Targan, S. R.;Landers, C. J.;Dutridge, D.;Ippoliti, A.;Vasiliauskas, E. A.;Papadakis, K. A.;Fleshner, P. R.;Rotter, J. I. and Yang, H. (2006). "Familial expression of anti-Escherichia coli outer membrane porin C in relatives of patients with Crohn's disease." Gastroenterology **130**(4): 1078-85.
- Mertz, A. K.;Daser, A.;Skurnik, M.;Wiesmuller, K. H.;Braun, J.;Appel, H.;Batsford, S.;Wu, P.;Distler, A. and Sieper, J. (1994). "The evolutionarily conserved ribosomal protein L23 and the cationic urease beta-subunit of Yersinia enterocolitica O:3 belong to the immunodominant antigens in Yersinia-triggered reactive arthritis: implications for autoimmunity." Mol Med **1**(1): 44-55.
- Mertz, A. K.;Ugrinovic, S.;Lauster, R.;Wu, P.;Grolms, M.;Bottcher, U.;Appel, H.;Yin, Z.;Schiltz, E.;Batsford, S.;Schauer-Petrowski, C.;Braun, J.;Distler, A. and Sieper, J. (1998). "Characterization of the synovial T cell response to various recombinant Yersinia antigens in Yersinia enterocolitica-triggered reactive arthritis. Heat-shock protein 60 drives a major immune response." Arthritis Rheum **41**(2): 315-26.
- Mielants, H.;Veys, E. M.;Cuvelier, C. and de Vos, M. (1988). "Ileocolonoscopy findings in seronegative spondylarthropathies." Br J Rheumatol **27 Suppl 2**: 95-105.
- Mielants, H.;Veys, E. M.;De Vos, M.;Cuvelier, C.;Goemaere, S.;De Clercq, L.;Schatteman, L. and Elewaut, D. (1995). "The evolution of spondyloarthropathies in relation to gut histology. I. Clinical aspects." J Rheumatol **22**(12): 2266-72.
- Mijiyawa, M.;Oniankitan, O. and Khan, M. A. (2000). "Spondyloarthropathies in sub-Saharan Africa." Curr Opin Rheumatol **12**(4): 281-6.
- Moum, B.;Ekbom, A.;Vatn, M. H.;Aadland, E.;Sauar, J.;Lygren, I.;Schulz, T.;Stray, N. and Fausa, O. (1997). "Inflammatory bowel disease: re-evaluation of the diagnosis in a prospective population based study in south eastern Norway." Gut **40**(3): 328-32.
- Moum, B.;Vatn, M. H.;Ekbom, A.;Aadland, E.;Fausa, O.;Lygren, I.;Sauar, J.;Schulz, T. and Stray, N. (1996a). "Incidence of ulcerative colitis and indeterminate colitis in four counties of southeastern Norway, 1990-93. A prospective population-based study. The Inflammatory Bowel South-Eastern Norway (IBSEN) Study Group of Gastroenterologists." Scand J Gastroenterol **31**(4): 362-6.
- Moum, B.;Vatn, M. H.;Ekbom, A.;Aadland, E.;Fausa, O.;Lygren, I.;Stray, N.;Sauar, J. and Schulz, T. (1996b). "Incidence of Crohn's disease in four counties in southeastern Norway, 1990-93. A prospective population-based study. The Inflammatory Bowel South-Eastern Norway (IBSEN) Study Group of Gastroenterologists." Scand J Gastroenterol **31**(4): 355-61.
- Moy, S.;Dieckman, L.;Schiffer, M.;Maltsev, N.;Yu, G. X. and Collart, F. R. (2004). "Genome-scale expression of proteins from Bacillus subtilis." J Struct Funct Genomics **5**(1-2): 103-9.
- Nakagawa, Y.;Maeda, H. and Murai, T. (2002). "Evaluation of the in vitro pyrogen test system based on proinflammatory cytokine release from human monocytes: comparison with a human whole blood culture test

- system and with the rabbit pyrogen test." Clin Diagn Lab Immunol **9**(3): 588-97.
- Nerich, V.;Monnet, E.;Etienne, A.;Louafi, S.;Ramee, C.;Rican, S.;Weill, A.;Vallier, N.;Vanbockstael, V.;Auleley, G. R.;Allemand, H. and Carbonnel, F. (2006). "Geographical variations of inflammatory bowel disease in France: a study based on national health insurance data." Inflamm Bowel Dis **12**(3): 218-26.
- Neut, C.;Bulois, P.;Desreumaux, P.;Membre, J. M.;Lederman, E.;Gambiez, L.;Cortot, A.;Quandalle, P.;van Kruiningen, H. and Colombel, J. F. (2002). "Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease." Am J Gastroenterol **97**(4): 939-46.
- Ogura, Y.;Bonen, D. K.;Inohara, N.;Nicolae, D. L.;Chen, F. F.;Ramos, R.;Britton, H.;Moran, T.;Karaliuskas, R.;Duerr, R. H.;Achkar, J. P.;Brant, S. R.;Bayless, T. M.;Kirschner, B. S.;Hanauer, S. B.;Nunez, G. and Cho, J. H. (2001a). "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease." Nature **411**(6837): 603-6.
- Ogura, Y.;Imamura, Y.;Murakami, Y.;Takesue, Y.;Yokoyama, T.;Sueda, T. and Hiyama, E. (2005). "Intracellular cytokine patterns of peripheral blood T cells as a useful indicator of activeness of Crohn's disease." Hiroshima J Med Sci **54**(1): 1-8.
- Ogura, Y.;Inohara, N.;Benito, A.;Chen, F. F.;Yamaoka, S. and Nunez, G. (2001b). "Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB." J Biol Chem **276**(7): 4812-8.
- Orchard, T. R.;Wordsworth, B. P. and Jewell, D. P. (1998). "Peripheral arthropathies in inflammatory bowel disease: their articular distribution and natural history." Gut **42**(3): 387-91.
- Orholm, M.;Munkholm, P.;Langholz, E.;Nielsen, O. H.;Sorensen, T. I. and Binder, V. (1991). "Familial occurrence of inflammatory bowel disease." N Engl J Med **324**(2): 84-8.
- Ouyang, Q.;Tandon, R.;Goh, K. L.;Ooi, C. J.;Ogata, H. and Fiocchi, C. (2005). "The emergence of inflammatory bowel disease in the Asian Pacific region." Curr Opin Gastroenterol **21**(4): 408-13.
- Ozen, S. C.;Dagli, U.;Kilic, M. Y.;Toruner, M.;Celik, Y.;Ozkan, M.;Soykan, I.;Cetinkaya, H.;Ulker, A.;Ozden, A. and Bozdayi, A. M. (2006). "NOD2/CARD15, NOD1/CARD4, and ICAM-1 gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease." J Gastroenterol **41**(4): 304-10.
- Palm, O.;Moum, B.;Ongre, A. and Gran, J. T. (2002). "Prevalence of ankylosing spondylitis and other spondyloarthropathies among patients with inflammatory bowel disease: a population study (the IBSEN study)." J Rheumatol **29**(3): 511-5.
- Parronchi, P.;Romagnani, P.;Annunziato, F.;Sampognaro, S.;Becchio, A.;Giannarini, L.;Maggi, E.;Pupilli, C.;Tonelli, F. and Romagnani, S. (1997). "Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease." Am J Pathol **150**(3): 823-32.
- Pastor Rojo, O.;Lopez San Roman, A.;Albeniz Arbizu, E.;de la Hera Martinez, A.;Ripoll Sevillano, E. and Albillos Martinez, A. (2007). "Serum lipopolysaccharide-binding protein in endotoxemic patients with inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **13**(3): 269-77.

- Peeters, H.;Vander Cruyssen, B.;Laukens, D.;Coucke, P.;Marichal, D.;Van Den Berghe, M.;Cuvelier, C.;Remaut, E.;Mielants, H.;De Keyser, F. and Vos, M. D. (2004). "Radiological sacroiliitis, a hallmark of spondylitis, is linked with CARD15 gene polymorphisms in patients with Crohn's disease." Ann Rheum Dis **63**(9): 1131-4.
- Podolsky, D. K. (2002). "Inflammatory bowel disease." N Engl J Med **347**(6): 417-29.
- Purmann, J.;Zeidler, H.;Bertrams, J.;Juli, E.;Cleveland, S.;Berges, W.;Gemsa, R.;Specker, C. and Reis, H. E. (1988). "HLA antigens in ankylosing spondylitis associated with Crohn's disease. Increased frequency of the HLA phenotype B27,B44." J Rheumatol **15**(11): 1658-61.
- Raddatz, D.;Bockemuhl, M. and Ramadori, G. (2005). "Quantitative measurement of cytokine mRNA in inflammatory bowel disease: relation to clinical and endoscopic activity and outcome." Eur J Gastroenterol Hepatol **17**(5): 547-57.
- Rath, H. C.;Schultz, M.;Freitag, R.;Dieleman, L. A.;Li, F.;Linde, H. J.;Scholmerich, J. and Sartor, R. B. (2001). "Different subsets of enteric bacteria induce and perpetuate experimental colitis in rats and mice." Infect Immun **69**(4): 2277-85.
- Reveille, J. D. (2006). "Major histocompatibility genes and ankylosing spondylitis." Best Pract Res Clin Rheumatol **20**(3): 601-9.
- Rice, P.;Longden, I. and Bleasby, A. (2000). "EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite." Trends Genet **16**(6): 276-7.
- Rozen, S. and Skaletsky, H. (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." Methods Mol Biol **132**: 365-86.
- Rudwaleit, M.;Siegert, S.;Yin, Z.;Eick, J.;Thiel, A.;Radbruch, A.;Sieper, J. and Braun, J. (2001). "Low T cell production of TNFalpha and IFNgamma in ankylosing spondylitis: its relation to HLA-B27 and influence of the TNF-308 gene polymorphism." Ann Rheum Dis **60**(1): 36-42.
- Ryan, P.;Kelly, R. G.;Lee, G.;Collins, J. K.;O'Sullivan, G. C.;O'Connell, J. and Shanahan, F. (2004). "Bacterial DNA within granulomas of patients with Crohn's disease--detection by laser capture microdissection and PCR." Am J Gastroenterol **99**(8): 1539-43.
- Sambrook, J.;Maniatis, T. and Fritsch, E. F. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour, New York, Laboratory Press.
- Scheich, C.;Sievert, V. and Bussow, K. (2003). "An automated method for high-throughput protein purification applied to a comparison of His-tag and GST-tag affinity chromatography." BMC Biotechnol **3**: 12.
- Schomburg, I.;Chang, A.;Ebeling, C.;Gremse, M.;Heldt, C.;Huhn, G. and Schomburg, D. (2004). "BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments." Nucleic Acids Res **32**(Database issue): D431-3.
- Schroder, K.;Sweet, M. J. and Hume, D. A. (2006). "Signal integration between IFNgamma and TLR signalling pathways in macrophages." Immunobiology **211**(6-8): 511-24.
- Sechi, L. A.;Scanu, A. M.;Molicotti, P.;Cannas, S.;Mura, M.;Dettori, G.;Fadda, G. and Zanetti, S. (2005). "Detection and Isolation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis from intestinal mucosal biopsies of patients with and without Crohn's disease in Sardinia." Am J Gastroenterol **100**(7): 1529-36.

- Sharp, P. M. and Li, W. H. (1987). "The codon Adaptation Index--a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications." Nucleic Acids Res **15**(3): 1281-95.
- Shih, Y. P.;Kung, W. M.;Chen, J. C.;Yeh, C. H.;Wang, A. H. and Wang, T. F. (2002). "High-throughput screening of soluble recombinant proteins." Protein Sci **11**(7): 1714-9.
- Shivananda, S.;Lennard-Jones, J.;Logan, R.;Fear, N.;Price, A.;Carpenter, L. and van Blankenstein, M. (1996). "Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD)." Gut **39**(5): 690-7.
- Sieper, J.;Kingsley, G.;Palacios-Boix, A.;Pitzalis, C.;Treharne, J.;Hughes, R.;Keat, A. and Panayi, G. S. (1991). "Synovial T lymphocyte-specific immune response to Chlamydia trachomatis in Reiter's disease." Arthritis Rheum **34**(5): 588-98.
- Sieper, J.;Kingsley, G. H. and Marker-Hermann, E. (1996). "Aetiological agents and immune mechanisms in enterogenic reactive arthritis." Baillieres Clin Rheumatol **10**(1): 105-21.
- Sieper, J.;Rudwaleit, M.;Khan, M. A. and Braun, J. (2006). "Concepts and epidemiology of spondyloarthritis." Best Pract Res Clin Rheumatol **20**(3): 401-17.
- Sitaraman, S. V.;Klapproth, J. M.;Moore, D. A., 3rd;Landers, C.;Targan, S.;Williams, I. R. and Gewirtz, A. T. (2005). "Elevated flagellin-specific immunoglobulins in Crohn's disease." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **288**(2): G403-6.
- Srinivasan, A. and McSorley, S. J. (2007). "Pivotal advance: exposure to LPS suppresses CD4+ T cell cytokine production in Salmonella-infected mice and exacerbates murine typhoid." J Leukoc Biol **81**(2): 403-11.
- Staras, S. A.;Dollard, S. C.;Radford, K. W.;Flanders, W. D.;Pass, R. F. and Cannon, M. J. (2006). "Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994." Clin Infect Dis **43**(9): 1143-51.
- Strachan, D. P. (1989). "Hay fever, hygiene, and household size." Bmj **299**(6710): 1259-60.
- Strober, W.;Fuss, I. J. and Blumberg, R. S. (2002). "The immunology of mucosal models of inflammation." Annu Rev Immunol **20**: 495-549.
- Suni, M. A.;Picker, L. J. and Maino, V. C. (1998). "Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry." J Immunol Methods **212**(1): 89-98.
- Swidsinski, A.;Ladhoff, A.;Pernthaler, A.;Swidsinski, S.;Loening-Baucke, V.;Ortner, M.;Weber, J.;Hoffmann, U.;Schreiber, S.;Dietel, M. and Lochs, H. (2002). "Mucosal flora in inflammatory bowel disease." Gastroenterology **122**(1): 44-54.
- Tabaqchali, S.;O'Donoghue, D. P. and Bettelheim, K. A. (1978). "Escherichia coli antibodies in patients with inflammatory bowel disease." Gut **19**(2): 108-13.
- Taurog, J. D.;Richardson, J. A.;Croft, J. T.;Simmons, W. A.;Zhou, M.;Fernandez-Sueiro, J. L.;Balish, E. and Hammer, R. E. (1994). "The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats." J Exp Med **180**(6): 2359-64.
- Thiel, A.;Wu, P.;Lanowska, M.;Dong, J.;Radbruch, A. and Sieper, J. (2006). "Identification of immunodominant CD4+ T cell epitopes in patients with

- Yersinia-induced reactive arthritis by cytometric cytokine secretion assay." Arthritis Rheum **54**(11): 3583-90.
- Timmer, A.;Breuer-Katschinski, B. and Goebell, H. (1999a). "Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany." Inflamm Bowel Dis **5**(2): 79-84.
- Timmer, A. and Goebell, H. (1999b). "Incidence of ulcerative colitis, 1980-1995-- a prospective study in an urban population in Germany." Z Gastroenterol **37**(11): 1079-84.
- Tsuzuki, H.;Tani, T.;Ueyama, H. and Kodama, M. (2001). "Lipopolysaccharide: neutralization by polymyxin B shuts down the signaling pathway of nuclear factor kappaB in peripheral blood mononuclear cells, even during activation." J Surg Res **100**(1): 127-34.
- Tysk, C.;Lindberg, E.;Järnerot, G. and Floderus-Myrhed, B. (1988). "Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking." Gut **29**(7): 990-6.
- Uzoigwe, J. C.;Khaita, M. L. and Gibbs, P. S. (2007). "Epidemiological evidence for Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis as a cause of Crohn's disease." Epidemiol Infect **135**(7): 1057-68.
- Vincentelli, R.;Bignon, C.;Gruez, A.;Canaan, S.;Sulzenbacher, G.;Tegoni, M.;Campanacci, V. and Cambillau, C. (2003). "Medium-scale structural genomics: strategies for protein expression and crystallization." Acc Chem Res **36**(3): 165-72.
- Walhout, A. J.;Temple, G. F.;Brasch, M. A.;Hartley, J. L.;Lorson, M. A.;van den Heuvel, S. and Vidal, M. (2000). "GATEWAY recombinational cloning: application to the cloning of large numbers of open reading frames or ORFeomes." Methods Enzymol **328**: 575-92.
- Wehkamp, J.;Harder, J.;Weichenthal, M.;Schwab, M.;Schaffeler, E.;Schlee, M.;Herrlinger, K. R.;Stallmach, A.;Noack, F.;Fritz, P.;Schroder, J. M.;Bevins, C. L.;Fellermann, K. and Stange, E. F. (2004). "NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression." Gut **53**(11): 1658-64.
- Wehkamp, J.;Schmid, M. and Stange, E. F. (2007). "Defensins and other antimicrobial peptides in inflammatory bowel disease." Curr Opin Gastroenterol **23**(4): 370-8.
- West, A. P.;Koblansky, A. A. and Ghosh, S. (2006). "Recognition and signaling by toll-like receptors." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 409-37.
- Zouiten-Mekki, L.;Zaouali, H.;Boubaker, J.;Karoui, S.;Fekih, M.;Matri, S.;Hamzaoui, S.;Filali, A.;Chaabouni, H. and Hugot, J. P. (2005). "CARD15/NOD2 in a Tunisian population with Crohn's disease." Dig Dis Sci **50**(1): 130-5.

8 ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
att	engl. attachment
bidest. H ₂ O	zweifach destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAI	Codon-Adaptations-Index
CD	engl. Cluster of Differentiation
Cm ^R	Chloramphenicol-Resistenz
CMV pp65	Cytomegalievirus Phosphoprotein 65 kDa
DNA	engl. Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	engl. Fluorescence activated cell sorting
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung
GST	engl. Glutathione S-transferase
h	Stunde(n)
HLA	engl. Human Leukocyte Antigene
HMFM	engl. Hogness modified freezing medium
IFN- γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
L	Ligand
LAL	Limulus-Amoebocyten-Lysat
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
M	molar
MBP	engl. Maltose binding protein
MHC	engl. Major Histocompatibility Complex
min	Minute(n)
Ni-NTA	engl. Nickel-nitrilotriacetic acid
NusA	engl. N-utilizing substance A
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl. Polymerase Chain Reaction
PE	Phycocerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	engl. Ribonucleic Acid
s	Sekunden
SAP	engl. Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEB	<i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxin B

ABKÜRZUNGEN

Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TT	Tetanus Toxoid
V β	V-beta
w/v	Gewicht/Volumen

Präfixe vor Einheiten:

p	Pico (10^{-12})
n	Nano (10^{-9})
μ	Mikro (10^{-6})
m	Milli (10^{-3})

9 ANHANG

9.1 Liste der hochkonservierten Proteine von *E. coli*

Nr.	GenBank	Proteinbezeichnung (LUCA)	Kloniert	Ausbeute (kl. Maßstab) nach Expression	Reinigung	Gateway	>500 µg	CAI	seltene Codons						Transmembranhelices
									AGG	AGA	CGA	CTA	ATA	CCC	
1	NP_417632	putative regulator	+	3	3	3	ja	0,368	2	0	2	1	1	1	1
2	NP_414613	isopropylmalate isomerase subunit	+	3	3	3	ja	0,581	0	0	1	0	0	1	1
3	NP_417401	phosphoglycerate kinase	+	3	3	3	ja	0,763	0	0	0	0	0	0	0
4	NP_417410	transketolase 1 isozyme	+	3	3	3	ja	0,777	0	0	0	0	0	0	0
5	NP_417412	agmatinase	+	3	3	3	ja	0,657	0	0	0	0	0	0	0
6	NP_417429	putative ribosomal protein	+	3	3	3	ja	0,562	0	0	0	0	0	0	1
7	NP_417536	putative O-sialoglycoprotein endopeptidase	+	2	3	3	ja	0,549	0	0	1	2	0	0	0
8	NP_417640	argininosuccinate synthetase	+	3	3	3	ja	0,637	0	0	1	0	0	0	0
9	NP_417722	acetyl CoA carboxylase	+	3	3	3	ja	0,684	0	0	0	1	0	0	0
10	NP_417771	50S ribosomal subunit protein L29	+	3	3	3	ja	0,428	0	0	0	0	0	0	0
11	NP_417843	tryptophan tRNA synthetase	+	3	3	3	ja	0,623	0	0	0	1	0	0	2
12	NP_417845	D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase	+	3	3	3	ja	0,551	0	0	0	0	0	0	1
13	NP_418099	orotate phosphoribosyltransferase	+	3	3	3	ja	0,671	0	0	0	4	0	0	0
14	NP_418185	L-glutamine:D-fructose-6-phosphate aminotransferase	+	3	3	3	ja	0,706	0	0	0	0	0	0	1
15	NP_418222	ketol-acid reductoisomerase	+	3	3	3	ja	0,449	0	1	0	2	1	1	1
16	NP_418249	porphobilinogen deaminase; hydroxymethylbilane synthase	+	3	3	3	ja	0,738	0	0	0	0	0	0	0
17	NP_418306	glutamine synthetase	+	3	3	3	ja	0,754	0	0	1	0	0	0	0
18	NP_418354	triosephosphate isomerase	+	3	3	3	ja	0,574	0	0	0	0	0	0	0
19	NP_418375	aspartokinase II; homoserine dehydrogenase II	+	3	3	3	ja	0,498	0	0	0	0	0	0	0
20	NP_418393	N-acetyl-gamma-glutamylphosphate reductase	+	3	3	3	ja	0,578	1	0	0	1	0	0	0
21	NP_418395	argininosuccinate lyase	+	3	3	3	ja	0,8	0	0	0	2	0	0	0
22	NP_418410	50S ribosomal subunit protein L11	+	1	3	3	ja	0,647	0	0	0	0	0	0	0
23	NP_418433	phosphoribosylglycinamide synthetase; GAR synthetase	+	3	3	3	ja	0,697	0	0	0	0	0	0	0
24	NP_418449	glucosephosphate isomerase	+	3	3	3	ja	0,725	0	0	0	0	0	0	0
25	NP_418598	adenylosuccinate synthetase	+	3	3	3	ja	0,574	0	0	0	0	0	0	0
26	NP_418666	aspartate carbamoyltransferase, catalytic subunit	+	3	3	3	ja	0,752	0	0	0	0	0	0	0
27	NP_418679	valine tRNA synthetase	+	3	3	3	ja	0,67	0	0	0	0	0	0	0
28	NP_418799	thymidine phosphorylase	+	3	3	3	ja	0,573	0	0	0	0	0	0	0
29	NP_418805	3-phosphoserine phosphatase	+	3	3	3	ja	0,419	0	0	0	0	0	0	0
30	NP_417878	RNA phosphate cyclase	+	3	3	3	ja	0,545	0	0	0	0	0	0	0
31	NP_414903	5-aminolevulinat dehydratase; porphobilinogen synthase	+	3	3	3	ja	0,586	0	0	0	0	0	0	0
32	NP_415280	UDP-galactose-4-epimerase	+	3	3	3	ja	0,715	0	0	0	0	0	0	0
33	NP_415045	putative hydrolase	+	3	3	3	ja	0,596	0	0	0	0	0	0	0
34	NP_415056	phosphoribosylaminimidazole carboxylase; AIR carboxylase	+	3	3	3	ja	0,485	0	0	0	0	0	0	0
35	NP_415698	putative isomerase	+	3	3	3	ja	0,518	0	0	0	0	0	0	0
36	NP_415860	predicted C32 tRNA thiolase	+	3	3	3	ja	0,459	0	0	0	0	0	0	0
37	NP_416191	pyruvate kinase I	+	3	3	3	ja	0,506	0	0	0	0	0	0	0
38	NP_416207	putative oxidoreductase	+	3	3	3	ja	0,446	0	0	0	0	0	0	0
39	NP_416314	putative tartrate dehydrogenase	+	3	3	3	ja	0,593	0	0	0	0	0	0	0
40	NP_416728	acetyl-CoA acetyltransferase	+	3	3	3	ja	0,465	0	0	0	0	0	0	0
41	NP_416822	putative PTS system enzyme IIA component	+	3	3	3	ja	0,459	0	0	0	0	0	0	0
42	NP_416902	xanthosine phosphorylase	+	3	3	3	ja	0,49	0	0	0	0	0	0	0
43	NP_417105	NAD kinase	+	3	3	3	ja	0,543	0	0	0	0	0	0	0
44	NP_417622	predicted intracellular protease	+	2	3	3	ja								
45	NP_417654	octaprenyl diphosphate synthase	+	3	3	3	ja								

Nr.	GenBank	Proteinbezeichnung (LUCA)	Kloniert	Expression	Ausbeute (kl. Maßstab) nach Reinigung	Gateway	>500 µg	CAI	AGG	AGA	selene Codons	ATA	CCC	Transmembranhelices
											CGA	CTA		
46	NP_417827	uroporphyrinogen III methylase	+	3	3	3	ja	0,502	0	0	0	0	0	
47	NP_417879	hypothetical conserved protein (uncharacterized)	+	3	3	3	ja	0,562						
48	NP_418162	GTP-binding protein in thiophene and furan oxidation	+	3	3	3	ja	0,507						
49	NP_418186	N-acetyl glucosamine-1-phosphate uridylyltransferase	+	3	3	3	ja	0,609						
50	NP_418220	threonine deaminase	+	3	3	3	ja	0,555						
51	NP_418567	GroEL	+	3	3	3	ja	0,802						
52	NP_418588	predicted carbohydrate kinase	+	3	3	3	ja	0,454						
53	NP_415621	purine nucleoside phosphorylase	+	3	3	3	ja	0,497						
54	NP_415783	hypothetical conserved protein (putative translation factor)	+	2	3	3	ja	0,514	0	0	1	0	0	
55	NP_414544	homoserine kinase	+	3	3	3	ja	0,499						
56	NP_414573	carbamoyl-phosphate synthetase	+	3	3	3	ja	0,531						
57	NP_414614	3-isopropylmalate isomerase (dehydratase) subunit	+	3	3	3	ja	0,622						
58	NP_414616	2-isopropylmalate synthase	+	2	3	3	ja	0,574	0	1	0	2	2	
59	NP_414663	spermidine synthase = putrescine aminopropyltransferase	+	2	3	3	ja	0,58	0	0	1	3	0	2
60	NP_414696	glutamate-1-semialdehyde aminotransferase	+	3	3	3	ja	0,592						
61	NP_414710	methionine aminopeptidase	+	3	3	3	ja	0,611						
62	NP_415007	Adk	+	3	3	3	ja	0,665						
63	NP_415138	alkyl hydroperoxide reductase C22 subunit	+	3	3	3	ja	0,738						
64	NP_415175	leucine tRNA synthetase	+	2	3	3	ja	0,718	0	0	1	1	2	
65	NP_415295	7,8-diaminopelargonic acid synthetase	+	3	3	3	ja	0,535						
66	NP_415296	BioB	+	3	3	3	ja	0,512						
67	NP_415303	molybdopterin biosynthesis protein B	+	3	3	3	ja	0,526						
68	NP_415348	MoeA	+	3	3	3	ja	0,511						
69	NP_415408	thioredoxin reductase	+	2	3	3	ja	0,593	0	0	0	0	1	
70	NP_415428	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase	+	2	3	3	ja	0,524	0	0	0	0	3	
71	NP_415616	thymidylate kinase	+	3	3	3	ja	0,515						
72	NP_415776	tryptophan synthase alpha	+	3	3	3	ja	0,509						
73	NP_415778	N-(5-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	+	3	3	3	ja	0,493						
74	NP_415780	anthranilate synthase component I	+	3	3	3	ja	0,516						
75	NP_415797	orotidine-5'-phosphate decarboxylase	+	2	3	3	ja	0,494	0	0	0	0	1	
76	NP_416010	glutamate decarboxylase isozyme	+	3	3	3	ja	0,625						
77	NP_416154	tyrosine tRNA synthetase	+	3	3	3	ja	0,624						
78	NP_416208	3-dehydroquinate dehydratase	+	3	3	3	ja	0,522						
79	NP_416293	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	+	3	3	3	ja	0,799						
80	NP_416349	putative nucleolar proteins	+	3	3	3	ja	0,454						
81	NP_416363	phosphoribosylglycinamide formyltransferase 2	+	1	3	3	ja	0,469	0	0	2	0	3	
82	NP_416523	ATP phosphoribosyltransferase	+	3	3	3	ja	0,577						
83	NP_416524	L-histidinol:NAD ⁺ oxidoreductase; L-histidinol:NAD ⁺ oxidoreductase	+	3	3	3	ja	0,566						
84	NP_416602	predicted hydrolase	+	3	3	3	ja	0,503						
85	NP_416971	phosphoribosylaminoimidazole-succinocarboxamide synthetase	+	3	3	3	ja	0,642						
86	NP_416973	dihydrodipicolinate synthase	+	3	3	3	ja	0,499						
87	NP_416994	phosphoribosylaminoimidazole synthetase; AIR synthetase	+	3	3	3	ja	0,573						
88	NP_417009	histidine tRNA synthetase	+	3	3	3	ja	0,544						
89	NP_417046	serine hydroxymethyltransferase	+	3	3	3	ja	0,75						
90	NP_417223	L-isospartate protein carboxylmethyltransferase type II	+	2	3	3	ja	0,405	0	1	1	1	1	

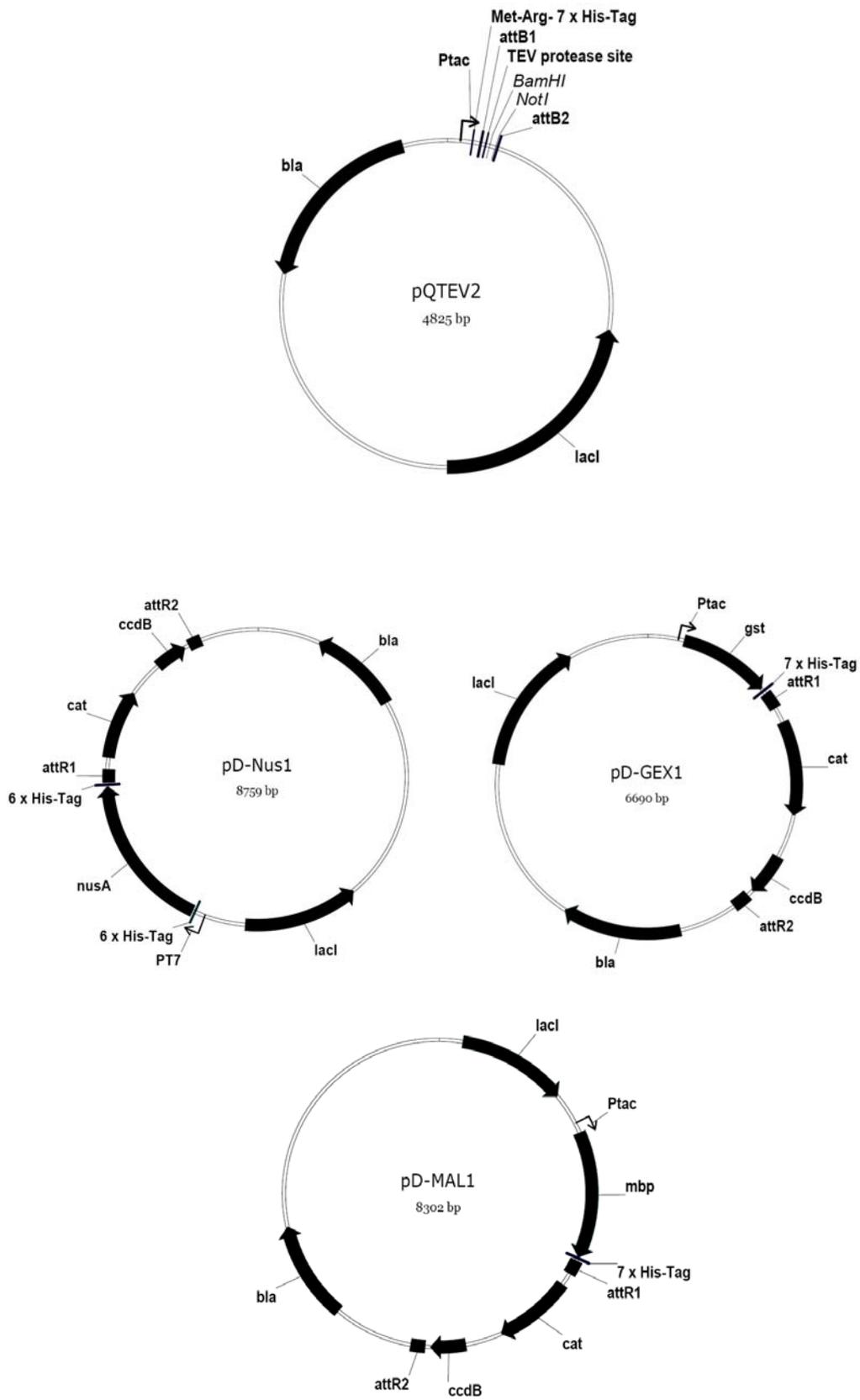
Nr.	GenBank	Proteinbezeichnung (LUCA)	Kloniert	Expression	Ausbeute (kl. Maßstab) nach	>500 µg	CAI	AGG	AGA	selte Codons	ATA	CCC	Transmembranhelices
					Reinigung	Gateway				CGA	CTA		
91	NP_417242	3-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate reductase	+	3	3	ja	0,5						
92	NP_417259	enolase	+	3	3	ja	0,843						
93	NP_417388	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	+	1	3	ja	0,59	0	0	1	3	0	1
94	NP_416529	imidazole glycerol phosphate synthase holoenzyme	+	3	3	ja	0,588						
95	NP_417225	putative hydrogenase subunit	+	3	3	ja	0,48						
96	NP_418273	tetrahydropteroylglutamate methyltransferase	+	3	3	ja	0,583						
97	NP_416771	binuclear zinc phosphodiesterase	+	3	3	ja	0,425						
98	NP_414585	flavoprotein	+	3	3	ja	0,521						
99	NP_415798	hypothetical conserved protein (putative translation factor)	+	2	3	ja	0,424	0	0	0	1	0	1
100	NP_417703	maleate dehydrogenase	+	3	2	ja	0,679						
101	NP_418381	putative transaldolase	+	2	2	ja	0,455	0	0	0	4	2	
102	NP_417637	protein chain initiation factor IF-2	+	2	2	ja	0,735	0	0	1	0	0	0
103	NP_417764	50S ribosomal subunit protein L6	+	1	2	ja	0,722	0	0	0	0	0	0
104	NP_417765	30S ribosomal subunit protein S8	+	3	2	ja	0,742						
105	NP_417799	GTP-binding protein chain elongation factor EF-G	+	2	2	ja	0,78						
106	NP_418127	acetylactate synthase I large subunit	+	2	2	ja	0,567	0	1	0	0	2	5
107	NP_418218	branched-chain amino-acid aminotransferase	+	3	2	ja	0,619						
108	NP_416886	putative peptidase	+	1	2	ja	0,464	0	0	0	1	1	1
109	NP_414567	isoleucine tRNA synthetase	+	3	2	ja	0,691						
110	NP_414593	S-adenosylmethionine-C ₅ -N ₇ -adenosyl (rRNA) dimethyltransferase	+	2	2	ja	0,474						
111	NP_414651	quinolinate phosphoribosyltransferase	+	2	2	ja	0,437						
112	NP_414736	proline tRNA synthetase	+	3	2	ja	0,691						
113	NP_414973	ATP-dependent protease La	+	3	2	ja	0,62						
114	NP_415002	adenine phosphoribosyltransferase	+	3	2	ja	0,619						
115	NP_415200	asparagine synthetase B	+	3	2	ja	0,631						
116	NP_415206	glutamine tRNA synthetase	+	3	2	ja	0,691						
117	NP_415256	succinyl-CoA synthetase beta subunit	+	2	2	ja	0,65						
118	NP_415304	molybdopterin biosynthesis protein C	+	3	2	ja	0,528						
119	NP_415413	serine tRNA synthetase	+	3	2	ja	0,636						
120	NP_415488	predicted acylphosphatase	+	3	2	ja	0,345						
121	NP_415649	adenylosuccinate lyase	+	3	2	ja	0,659						
122	NP_415777	tryptophan synthase beta	+	3	2	ja	0,549						
123	NP_415790	DNA topoisomerase type I omega protein	+	3	2	ja	0,599						
124	NP_416228	phenylalanine tRNA synthetase beta-subunit	+	3	2	ja	0,654						
125	NP_416229	phenylalanine tRNA synthetase alpha-subunit	+	3	2	ja	0,603						
126	NP_416234	threonine tRNA synthetase	+	3	2	ja	0,614						
127	NP_416278	selenophosphate synthase	+	3	2	ja	0,561						
128	NP_416281	cytoplasmic L-asparaginase I	+	3	2	ja	0,488						
129	NP_416380	aspartate tRNA synthetase	+	3	2	ja	0,718						
130	NP_416390	arginine tRNA synthetase	+	3	2	ja	0,664						
131	NP_416525	histidinol-phosphate aminotransferase	+	3	2	ja	0,509						
132	NP_416617	methionine tRNA synthetase	+	3	2	ja	0,685						
133	NP_416815	amidophosphoribosyltransferase; PRPP amidotransferase	+	3	2	ja	0,609						
134	NP_416960	transketolase 2 isozyme	+	3	2	ja	0,529						
135	NP_417002	GMP synthetase	+	3	2	ja	0,703						

Nr.	GenBank	Proteinbezeichnung (LUCA)	Kloniert	Expression	Ausbeute (kl. Maßstab) nach Reinigung	Gateway	>500 µg	CAI	AGG	AGA	CGA	CTA	ATA	CCC	Transmembranhelices
136	NP_417003	IMP dehydrogenase	+	3	2	2	ja	0,721							
137	NP_417013	nucleoside diphosphate kinase	+	3	2	2	ja	0,683							
138	NP_417052	phosphoribosylformyl-glycinamide synthetase; FGAM synthetase	+	3	2	2	ja	0,641							
139	NP_417177	alanyl-tRNA synthetase	+	3	2	2	ja	0,645							
140	NP_417179	RecA	+	3	2	2	ja	0,699							
141	NP_417260	CTP synthetase	+	3	2	2	ja	0,631							
142	NP_417389	ribosephosphate isomerase	+	3	2	2	ja	0,568							
143	NP_416929	predicted acyltransferase with acyl-CoA N-acyltransferase domain	+	2	1	3	ja	0,457							0
144	NP_417355	putative proteoglycan	+	3	1	2	ja	0,502							0
145	NP_414620	acetolactate synthase III small subunit	+	3	1	3	ja	0,386							0
146	NP_417756	30S ribosomal subunit protein S11	+	3	1	2	ja	0,604							0
147	NP_417757	30S ribosomal subunit protein S13	+	3	1	3	ja	0,516							0
148	NP_417769	50S ribosomal subunit protein L14	+	3	1	3	ja	0,516							0
149	NP_417774	50S ribosomal subunit protein L22	+	3	1	3	ja	0,536							0
150	NP_417776	50S ribosomal subunit protein L2	+	3	1	3	ja	0,672							0
151	NP_417777	50S ribosomal subunit protein L23	+	3	1	2	ja	0,529							0
152	NP_417801	30S ribosomal subunit protein S12	+	3	1	2	ja	0,651							0
153	NP_418404	biotin-[acetyl-CoA carboxylase] holoenzyme synthetase	+	2	1	3	ja	0,399							0
154	NP_418411	50S ribosomal subunit protein L1	+	3	1	3	ja	0,729							0
155	NP_416372	putative ATP-binding component of a transport system	+	3	1	3	ja	0,389							0
156	NP_417401	FFh	+	3	1	2	ja	0,597							0
157	NP_414543	aspartokinase I; homoserine dehydrogenase I	+	2	1	2	ja	0,503							0
158	NP_416150	endonuclease III	+	2	1	2	ja	0,447							0
159	NP_418415	RNA polymerase beta prime subunit	+	2	1	2	ja	0,783							0
160	NP_417679	glutamate synthase large subunit	+	2	1	1	ja	0,629							0
161	NP_418219	dihydroxyacid dehydratase	+	1	1	3	ja	0,61	0	1	0	1	1	1	0
162	NP_417634	30S ribosomal subunit protein S15	+	3	2	2	nein	0,62							2
163	NP_417645	HfIB	+	1	2	2	nein	0,66	0	0	0	2	1	2	
164	NP_417646	cell division protein	+	3	3	3	nein	0,438							
165	NP_417698	50S ribosomal subunit protein L13	+	3	3	3	nein	0,703							
166	NP_417755	30S ribosomal subunit protein S4	+	3	2	2	nein	0,593							
167	NP_417762	30S ribosomal subunit protein S5	+	2	2	2	nein	0,713							
168	NP_417770	30S ribosomal subunit protein S17	+	3	3	3	nein	0,639							
169	NP_417773	30S ribosomal subunit protein S3	+	2	2	2	nein	0,77							
170	NP_417775	30S ribosomal subunit protein S19	+	3	3	3	nein	0,409							
171	NP_417780	30S ribosomal subunit protein S10	+	3	2	2	nein	0,544							
172	NP_417800	30S ribosomal subunit protein S7	+	2	2	2	nein	0,595							
173	NP_415618	predicted metaldependent hydrolase	+	3	3	3	nein	0,506							
174	NP_416793	putative aminotransferase	+	3	2	2	nein	0,551							
175	NP_416821	pseudouridylyl synthase I	+	3	3	3	nein	0,436							
176	NP_417295	N-acetylglutamate synthase; amino acid acetyltransferase	+	3	3	3	nein	0,494							
177	NP_418188	membrane-bound ATP synthase, F1 sector, beta-subunit	+	2	2	2	nein	0,719							
178	NP_418480	hypothetical conserved protein (uncharacterized)	+	2	2	2	nein	0,444							
179	NP_418723	putative nucleoside triphosphatase	+	3	2	2	nein	0,437							
180	NP_414171	30S ribosomal subunit protein S2	+	3	3	3	nein	0,695							

Nr.	GenBank	Proteinbezeichnung (LUCA)	Kloniert	Expression	Ausbeute (Kl. Maßstab) nach Reinigung	Gateway	>500 µg	CAI	AGG	AGA	CGA	CTA	ATA	CCC	Transmembranhelices
181	NP_414725	RNAse HII	+	3	3	3	nein	0,555							
182	NP_415251	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	+	2	2	2	nein	0,697							
183	NP_415257	succinyl-CoA synthetase alpha subunit	+	2	2	2	nein	0,692							
184	NP_415693	cell division inhibitor	+	2	2	2	nein	0,488							
185	NP_415725	phosphoribosylpyrophosphate synthetase	+	3	2	2	nein	0,663							
186	NP_416530	phosphoribosyl-amp cyclohydrolase	+	3	2	2	nein	0,514							
187	NP_416532	UDP-glucose 6-dehydrogenase	+	3	3	3	nein	0,458							
188	NP_416832	chorismate synthase	+	3	2	2	nein	0,577							
189	NP_417071	ATP-dependent RNA helicase	+	3	2	2	nein	0,59							
190	NP_417090	chorismate mutase-P	+	3	2	2	nein	0,468							
191	NP_417091	chorismate mutase-T	+	3	3	3	nein	0,486							
192	NP_417779	50S ribosomal subunit protein L3	+	3	2	2	nein	0,667							
193	NP_415315	YbhF	+	3	3	3	nein	0,491							
194	NP_416652	putative oxidoreductase	+	3	2	2	nein	0,501							
195	NP_418414	RNA polymerase beta subunit	+	3	2	2	nein	0,735							
196	NP_415194	isopentenyl-adenosine A37 tRNA methylthiolase	+	3	2	2	nein	0,611							
197	NP_417631	inducible ATP-independent RNA helicase	+	3	1	2	nein	0,717							0
198	NP_417767	50S ribosomal subunit protein L5	+	3	0	2	nein	0,613							0
199	NP_417818	acetylornithine delta-aminotransferase	+	3	0	1	nein	0,55							0
200	NP_414886	4-hydroxy-2-keovalerate aldolase	+	3	1	2	nein	0,549							0
201	NP_416451	flagellum-specific ATP synthase	+	3	1	2	nein	0,5							0
202	NP_418500	part of formate-dependent nitrite reductase complex	+	3	1	2	nein	0,45							1
203	NP_414876	thiogalactoside acetyltransferase	+	1	1	2	nein	0,373	0	5	0	1	4	1	0
204	NP_415779	anthranilate synthase component II	+	3	1	2	nein	0,541							0
205	NP_415851	O-6-alkylguanine-DNAcysteine-protein methyltransferase	+	2	0	1	nein	0,363							0
206	NP_417241	conserved protein, member of DEAD box family (predicted helicase)	+	3	1	2	nein	0,335							0
207	NP_414574	carbamoyl-phosphate synthase large subunit	+	3	1	1	nein	0,723							0
208	NP_415434	ATP-binding transport protein	+	1	0	0	nein	0,576	0	0	3	0	0	0	5
209	NP_418663	Mg2+ transport ATPase, P-type 1	+	2	0	0		0,496							7
210	NP_415541	predicted glycosyl transferase	+	0	2	0		0,429	2	1	4	1	6	5	5
211	NP_414629	phospho-N-acetylmuramoyl-pentapeptide transferase	+	0	0	1		0,556	0	0	1	1	2	1	10
212	NP_416757	putative sugar transferase	+	0	0	2		0,448	2	0	0	2	0	3	2
213	NP_417663	predicted calcium/sodium:proton antiporter	+	0	0	1		0,368	0	1	1	2	4	3	9
214	NP_417950	low-affinity phosphate transport	+	0	0	0		0,542	0	0	0	1	0	0	10
215	NP_418565	putative transport	+	0	0	3		0,412	0	0	3	4	2	4	11
216	NP_415926	predicted inner membrane protein	+	0	0	1		0,334	1	0	0	1	5	2	5
217	NP_414985	putative ammonium transporter	+	0	0	2		0,524	0	0	2	0	4	1	12
218	NP_415766	putative potassium channel protein	+	0	0	3		0,369	0	0	3	1	4	2	7
219	NP_415946	TehA	+	0	0	1		0,405	0	1	1	2	3	1	8
220	NP_416109	putative chloride channel	+	0	0	1		0,382	0	0	1	6	2	4	10
221	NP_417759	putative ATPase subunit of translocase	+	0	0	1		0,526	0	1	3	0	1	0	10
222	NP_416170	Lhr	-												
223	NP_418675	Ornithine carbamoyltransferase-1	-												

Nr.	GenBank	Proteinbezeichnung (ECHH)	Kloniert	Expression	Ausbeute (Kl. Maßstab) nach Reinigung	Gateway	>500 µg	CAI	AGG	AGA	CGA	CTA	ATA	CCC	Transmembranhelices
224	NP_414890	alcohol dehydrogenase class III	+	3	3	3	ja	0,6							
225	NP_414555	chaperone Hsp70	+	3	3	3	ja	0,771							
226	NP_414646	GMP reductase	+	3	3	3	ja	0,599							
227	NP_414846	NAD+-dependent betaine aldehyde dehydrogenase	+	3	3	3	ja	0,621							
228	NP_415006	chaperone Hsp90; heat shock protein C 62.5	+	3	3	3	ja	0,724							
229	NP_415427	3-phosphoserine aminotransferase	+	3	3	3	ja	0,561							
230	NP_415792	aconitate hydratase 1	+	3	3	3	ja	0,485							
231	NP_415816	aldehyde dehydrogenase	+	3	3	3	ja	0,553							
232	NP_415996	NAD-linked malate dehydrogenase	+	3	3	3	ja	0,551							
233	NP_416128	fumarate C; fumarate hydratase class II isozyme	+	3	3	3	ja	0,506							
234	NP_416134	beta-D-glucuronidase	+	3	3	3	ja	0,561							
235	NP_416533	gluconate-6-phosphate dehydrogenase, decarboxylating	+	3	3	3	ja	0,657							
236	NP_416557	GDP-D-mannose dehydratase	+	3	3	3	ja	0,68							
237	NP_416874	predicted oxalyl-CoA decarboxylase	+	3	3	3	ja	0,446							
238	NP_416959	transaldolase A	+	3	3	3	ja	0,494							
239	NP_417021	HscA	+	3	3	3	ja	0,61							
240	NP_417064	GTP-binding elongation factor	+	3	3	3	ja	0,643							
241	NP_417147	succinate-semialdehyde dehydrogenase, NADP-dependent activity	+	3	3	3	ja	0,625							
242	NP_417379	glycine decarboxylase	+	3	3	3	ja	0,66							
243	NP_417392	methylmalonyl-CoA mutase	+	3	3	3	ja	0,574							
244	NP_417417	methionine adenosyltransferase 1	+	3	3	3	ja	0,71							
245	NP_417957	glutathione oxidoreductase	+	3	3	3	ja	0,631							
246	NP_418074	2-amino-3-ketobutyrate CoA ligase; glycine acetyltransferase	+	3	3	3	ja	0,641							
247	NP_418190	membrane-bound ATP synthase, F1 sector, alpha-subunit	+	3	3	3	ja	0,728							
248	NP_418197	glucose-inhibited division	+	3	3	3	ja	0,582							
249	NP_418361	glycerol kinase	+	3	3	3	ja	0,619							
250	NP_418553	lysine tRNA synthetase	+	3	3	3	ja	0,561							
251	NP_417876	maltoedextrin phosphorylase	+	3	3	3	ja	0,636							
252	NP_418407	protein chain elongation factor EF-Tu	+	3	3	3	ja	0,778							
253	NP_417025	putative aminotransferase	+	3	3	3	ja	0,717							
254	NP_417633	polynucleotide phosphorylase	+	3	3	3	ja	0,763							
255	NP_414658	lipoamide dehydrogenase (NADH)	+	3	3	3	ja	0,728							
256	NP_418045	aldehyde dehydrogenase B	+	3	3	3	ja	0,534							
257	NP_418578	FrdA	+	2	2	2	ja	0,676							
258	NP_415017	putative ATPase	+	2	1	3	ja	0,557							8
259	NP_416843	fused enoyl-CoA hydratase and epimerase and isomerase	+	3	1	2	ja	0,454							0
260	NP_415903	phenylacetaldehyde dehydrogenase	+	2	2	2	nein	0,421							
261	NP_414845	choline dehydrogenase	+	3	2	2	nein	0,556							
262	NP_414869	putative propionyl-CoA synthetase	+	1	2	2	nein	0,525	1	0	3	0	1	3	
263	NP_417298	protease III	+	3	3	3	nein	0,503							
264	NP_417321	putative acyltransferase	+	3	2	2	nein	0,445							
265	NP_417811	putative ATP-binding component of a transport system	+	3	3	3	nein	0,565							
266	NP_418288	4-enzyme protein; 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	+	3	3	3	nein	0,653							
267	NP_415831	helicase, ATP-dependent	+	3	2	2	nein	0,544							
268	NP_416246	catalase; hydroperoxidase HPI(III)	+	3	2	2	nein	0,536							
269	NP_416119	pyridine nucleotide transhydrogenase beta subunit	+	0	0	0		0,592	0	0	0	0	1	0	9
270	NP_416120	pyridine nucleotide transhydrogenase alpha subunit	+	0	0	0		0,53	0	1	1	2	2	0	5
271	NP_415254	alpha-ketoglutarate decarboxylase	-												

9.2 Plasmidkarten



9.3 Oligonukleotide

9.3.1 Herstellung von DNA-Fragmenten

Primer	Sequenz (5' → 3')
his-tag-pgex-s	GATCCATCACCATCACCATCACCATTCCCGGGC
his-tag-pgex-as	GGCCGCCCGGAATGGTGTATGGTGTATGGTGTATG
his-tag-pmal-s	CGCATCACCATCACCATCACCATTCCCGGGA
his-tag-pmal-as	AGTTCCTCCCGGAATGGTGTATGGTGTATGGTGTATGCGAGCT
pQTEV2-ds01	AATTCATTAAGAGGAGAAAATAACTATGAAACATCACCATCACCATCACCATG
ara02	GTGCTGCAGGTACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCGAGAATCTTTATTTTCAGG
ara03	GATCCAGTCTTCGCATGCATGAAGACGCGGC
ara04	CGCTAGGACCCAGCTTTCTGTACAAAAGTGGTA
pQTEV2-ds02	CATAGTTAATTTCTCTCTTTAATG
ara05	GTACAACTTGTACCTGCAGCACCATGGTGTATGGTGTATGGTGTATGTTT
ara06	CGAAGACTGGATCCCTGAAAATAAAGATTCTCGCTGCTTTTTT
ara07	TGGTCTTAGCGCGCCGCTTCTCATGCATG
ara08	AGTTACCCTTTGTACAAGAAAGC

9.3.2 Kolonie-PCR und DNA-Sequenzierungen

Primer	Sequenz (5' → 3')
pQE-65	TGAGCGGATAACAATTTACACACAG
pQE-276	GGCAACCGAGCGTTCTGAAC
Colidown	TTCACTTCTGAGTTCGGCATGG
Nus-tag	AAGCCGGAGCACTGATTATGG
pGEX-3'	CCGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
pGEX-5'	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
M13-Forward	GACGTGTGAAAACGACGGCCAG
M13-Reverse	CACAGGAAACAGCTATGACC
MalE	GGTCGCAGACTGTCGATGAAGCC

9.3.3 PCR mit konservierten Genen von *E. coli*

Nr.	GenBank	5'-Primer	Sequenz (5' → 3')	3'-Primer	Sequenz (5' → 3')
1	NP_417632	EC_345	GAGGATCCAAGCCTTTTTGCGCT	EC_546	GAGAGCGGCCGAGGTGTATTAACGAACAACA
2	NP_414613	EC_421	CAAGATCTGCAGAGAAATTTATCAAAACAC	EC_422	GAGAGCGGCCGCAAAAGTTAAAGACGTTTGTAT
3	NP_417401	EC_231	CTGGATCCTCTGTAATTAAGATGACCGA	EC_232	GTGTGCGGCCGATGAAAAATIGCGTGTCTC
4	NP_417410	EC_233	CTGGATCCTCCTCACGTAAAGAGCTT	EC_234	GAGAGCGGCCGCGGACATATCAAGGTAATAA
5	NP_417412	EC_235	CGGTCTCCGATCCAGCACCTTAGGTCATCAA	EC_236	CGGTCTCCGCCCCATTAAATGGCAGTTTTA
6	NP_417429	EC_237	GTGGATCCCAAAAAGTTGCTCCGCA	EC_238	GAGAGCGGCCGCGGATGTGAATGTAGAGAC
7	NP_417536	EC_239	GAGGATCCCGTACTGGGTAATTGAA	EC_240	GTGTGCGGCCGCTGTGTCTTAAAGTGAGGA
8	NP_417640	EC_247	CAGGATCCACGACGATTCTCAAGCAT	EC_248	GAGAGCGGCCGCGGAGTTTACAGAGGATAAGC
9	NP_417722	EC_257	GAGGATCCCTGGATAAAAATTGTTATTGCC	EC_258	GAGAGCGGCCGCGTCCGATCCCCAGTAATAA
10	NP_417771	EC_289	GAGGATCCAAGCAAAAGAGCTGCGT	EC_290	GACAGCGGCCGCTGCAGAGTACGGATTTTATC
11	NP_417843	EC_315	CAGGATCCACTAAGCCCATCGTTTT	EC_316	GTGTGCGGCCGCTATGTGCATTACTTTGTAGG
12	NP_417845	EC_317	GAGGATCCAAACAGTATTGATIGCCC	EC_318	GTGAGCGGCCGCGTACCATCAAGATCAAA
13	NP_418099	EC_331	GAAGATCTAAACCATATCAGCGCCAG	EC_332	CACAGCGGCCGCGCACAGTTGCAGTAATATG
14	NP_418185	EC_339	GTGGATCCTGTGGAATTGTTGGCG	EC_340	GACAGCGGCCGACATAACAGGAAAGAAAAATG
15	NP_418222	EC_353	CAGGATCCGCTAACTACTTCAATACACTG	EC_354	GAGTGGCGGCCGTGAGTGTTTTCTCCCTCT
16	NP_418249	EC_357	GAGGATCCATAATGACGGTAACAAGCA	EC_358	CAGAGCGGCCGAGACGGCTCACTAECTCT
17	NP_418306	EC_363	CGGTCTCCGATCCTCCGCTGAACACGTA	EC_364	CGGTCTCCGCCCCCTTCCACGGCACTAAAAC
18	NP_418354	EC_365	GTGGATCCCGACATCCTTATAGTATGG	EC_366	GAGAGCGGCCGCGAAGAGTTAAGGAAAGTAAG
19	NP_418375	EC_367	GAGGATCCAGTGTGATTGCGCAGG	EC_368	GAGAGCGGCCGCAAAACATGATACCGGGC
20	NP_418393	EC_369	GTGGATCCTTGAATACGCTGATTGTG	EC_370	GACAGCGGCCGCCAGTTTGATAATTAATGGA
21	NP_418395	EC_373	CGGTCTCCGATCCGCACTTTGGGGCGGG	EC_374	CGGTCTCCGCCCCAGCCAGGCTCAAATTTATAC
22	NP_418410	EC_379	CAGGATCCGCTAAGAAAAGTACAAGCC	EC_380	GTGAGCGGCCGCGATGCTGACTGTTTGGTT
23	NP_418433	EC_387	GAGGATCCAAGTATTAGTATTGTTAAGC	EC_388	GAGAGCGGCCGCGCAAAACTGTCCGG
24	NP_418449	EC_391	GAGGATCCAAAAACATCAATCCAACGC	EC_392	GAGAGCGGCCGCGCCTACATATCAGCAGATG
25	NP_418598	EC_395	GAGGATCCCGTAACAACGTCGCTGA	EC_396	GAGAGCGGCCGCAATGTATCACACTGTTCCG
26	NP_418666	EC_399	CAGGATCCGCTAATCCGCTATATCAGA	EC_400	GACAGCGGCCGCGCAATTTATATCGTGTGTC
27	NP_418679	EC_401	CGGTCTCCGATCCGAAAAGACATATAACCCAAA	EC_402	CGGTCTCCGCCCCCTTTCATCACTGTGTTTTGA
28	NP_418799	EC_403	GTGGATCCTTGTCTTCGCAACAAGAA	EC_404	CTGAGCGGCCGCTTCAAATTTAAATGATCAGA
29	NP_418805	EC_405	CAGGATCCCTAACATTACCTGGTGC	EC_406	CAGTGGCGGCCGTACCTCGTTAATGCTGTG
30	NP_417878	EC_409	GAGGATCCATGAAAAGGATGATTTGGC	EC_410	GAGTGGCGGCCGTACCGCGTGTAAAGTTTAG
31	NP_414903	EC_411	CAGGATCCACAGACTTAATCCAACGC	EC_412	GTGAGCGGCCGCTTCTGAGAGGAAACAATA
32	NP_415280	EC_413	GAGGATCCGAGCGAATTAATGAGAGTTCT	EC_414	GAGAGCGGCCGCAATCAACGGGATTTAAATG
33	NP_415045	EC_445	CTGGATCCTCTTTGATTAATCATTAATAAACG	EC_446	GACAGCGGCCGCGCAAAATGAAACATAAACAC
34	NP_415056	EC_447	CTGGATCCTCTTCCCGCAATAATCC	EC_448	GAGAGCGGCCGCGGAGGACCGCAAACTTG
35	NP_415698	EC_461	GTGGATCCTATCAACATCAACTGGC	EC_462	GTGTGCGGCCGCTATAACCACTCTGGCACA
36	NP_415860	EC_467	GAGGATCCCAAGAAAATCAACAATTAACAAG	EC_468	GTGAGCGGCCGCAATAAGAGTACCCGATG
37	NP_416191	EC_479	GAGGATCCAAAAAGCAAAATTTGTTG	EC_480	GAGAGCGGCCGCAAAATTAATCACAAAAGCAA
38	NP_416207	EC_481	GAGGATCCGATGTTACCGCAAAATACG	EC_482	GAGTGGCGGCCGTACAGTACCGTTTTCATTT
39	NP_416314	EC_483	GAGGATCCATGAAAACGATGCGTATTG	EC_484	GAGAGCGGCCGCAAAATAAATCGTGTGTGACC
40	NP_416728	EC_495	GAGGATCCAAAAATTTGTCTATCGTCA	EC_496	GAGAGCGGCCGCAATCGGGTGTTTTTATTG
41	NP_416822	EC_503	CTGGATCCTCTGAAAGGCTGGAACATT	EC_504	GTCAGCGGCCGCACTACTGCGCTGCTACT
42	NP_416902	EC_511	CTGGATCCTCTCAGGTTCAATTTTCTCA	EC_512	GACAGCGGCCGCTTCTTATTTGTTTTTC
43	NP_417105	EC_521	GAGGATCCAAATATCATTTCAGGTGATTGG	EC_522	GACTGCGGCCGCTCTGTATGAAAACCATTA

ANHANG

Nr.	GenBank	5'-Primer	Sequenz (5' → 3')	3'-Primer	Sequenz (5' → 3')
44	NP 417622	EC 541	GAGGATCCGTGGGAAATTCGCCTC	EC 542	GAGAGCGCCGCGATTTGGCTACGCGAC
45	NP 417654	EC 547	GAGGATCCAATTTAGAAAAATCAATGAGTTA	EC 548	GTGTGCGGCCGCTTTTATGGAAGTACTGGAA
46	NP 417827	EC 555	GAGGATCCGTGGATCAATTTGCTATAIT	EC 556	GTGAGCGGCCGCAATTAAGAAAGGCCAGAAAT
47	NP 417879	EC 559	GAGGATCCAATTACGAATTAAGTACCAC	EC 560	GAGAGCGCCGCAATCACTCTTTCAATCAT
48	NP 418162	EC 567	CGGTCTCCGATCCAGCGATAATGACACTATCG	EC 568	CGGTCTCCGCGCCCAACAGAGGTGTAACAATG
49	NP 418186	EC 569	GTGGATCCTTGAATAATGCTATGAGCG	EC 570	GTGAGCGCCGCGATTTGTTATCTTCTCATCC
50	NP 418220	EC 577	CAGGATCCGCTGACTCGCAACCCC	EC 578	GAGAGCGCCGCGAAGCGCTATCAGGCAT
51	NP 418567	EC 597	CAAGATCTGCAGCTAAAGACGTAATAAT	EC 598	GAGAGCGCCGCGGGTTTGTATTCTTCTGC
52	NP 418588	EC 601	CAGGATCCACGGACCATAACAATGAAG	EC 602	GAGTGGCGCCGCTACAGATAGATTACGGTTGC
53	NP 415621	EC 611	GTGGATCCTTGA AAAAGGAAAATGTCGT	EC 612	GTGAGCGCCGCGAGTAACAACACAGAGACAC
54	NP 415783	EC 613	GAGGATCCAGCCAGTTTTTATATTATCC	EC 614	CAGAGCGCCGCTGTATCAACAGCAAAA
55	NP 414544	EC 003	GAGGATCCGTAAAGTTATGCCCCG	EC 004	GTGTGCGGCCGCTGTGATCTTTCAGATTGTAAG
56	NP 414573	EC 011	GTGGATCCTTGAATTAAGTCAGCGCTA	EC 012	GAGGGCGCCGCTATGGCTCTTTTACTCCTG
57	NP 414614	EC 017	CAGGATCCGCTAAGACGTTATACGAAA	EC 018	GTGTGCGGCCGCTTTGATAAATTTCTCTG
58	NP 414616	EC 019	GAGGATCCAGCCAGCAAGTCATTATTT	EC 020	GTGAGCGCCGCAATATGGTAATTTCTTGACA
59	NP 414663	EC 023	CAGGATCCGCGGAAAAAACAAGTGG	EC 024	CTGTGCGGCCGCTTTTCAATTTCTTATCTTCC
60	NP 414696	EC 025	GAGGATCCAGTAAGTCTGAAAATCTTTACAG	EC 026	CTGAGCGCCGCGAATCTGATAGTCCGATAAG
61	NP 414710	EC 027	CAGGATCCGCTATCTCAATCAAGACCC	EC 028	GTGAGCGCCGCAATAAGTAAATTAATCGCAT
62	NP 415007	EC 047	GAGGATCCGCTATCTTCTGTGGC	EC 048	GAGAGCGCCGCTGAGATTGCTGATAGTTT
63	NP 415138	EC 053	CTGGATCCTCTTGAATAACACAAAAT	EC 054	GAGAGCGCCGCGTGAAGACGAAAGAAAT
64	NP 415175	EC 055	GAGGATCCCAAGAGCAATACCGCCC	EC 056	GACAGCGCCGCGCCAGAGATAACAACAAT
65	NP 415295	EC 069	CGAGATCTACAACGGACGATCTTGC	EC 070	GAGAGCGCCGCTTACCGCGACTTCTCG
66	NP 415296	EC 071	CAGGATCCGCTACCGCCACGCT	EC 072	GAGAGCGCCGCGTGTATTTCTCTGCGCAGC
67	NP 415303	EC 073	GAGGATCCAGTCAGTAAGCATGAA	EC 074	GTGAGCGCCGCTGTGATTTGGGTGACTTG
68	NP 415348	EC 077	GAGGATCCGAATTTACCACCGGATTG	EC 078	GAGAGCGCCGCTCTGTATCTGTGAGTTG
69	NP 415408	EC 079	GAGGATCCGCGACGCAACAACACAGT	EC 080	GACAGCGCCGCGCTTCTTACTTTGTTTACT
70	NP 415428	EC 083	GAGGATCCGAATCCCTGACGTTACAA	EC 084	GAGAGCGCCGCAAAAAGAAAGATTTGCTACT
71	NP 415616	EC 093	GAGGATCCGCGAGTAAGTATATCGTCA	EC 094	GAGAGCGCCGCAATCAGGTCGTAACCAT
72	NP 415776	EC 107	GAGGATCCGAACGCTACGAATCTCTG	EC 108	GAGAGCGCCGCGCTTCAATAAGAAAGAAAT
73	NP 415778	EC 111	GAGGATCCATGCAAAACCGTTTATAGCG	EC 112	GAGTGGCGCCGCTAATGTTGCTAATGTTCTT
74	NP 415780	EC 115	GAGGATCCCAAAACACAAAACCGACT	EC 116	GAGTGGCGCCGCTGTACGTAAGAAAGGCTGAT
75	NP 415797	EC 119	CAGGATCCGCTTAACTGCTTCACT	EC 120	GTGAGCGCCGCGTGTTCCTGTAGTAGAC
76	NP 416010	EC 129	GAGGATCCGATAAGAAGCAAGTAACGG	EC 130	CAGAGCGCCGCGAACAGACTTTGGAAATG
77	NP 416154	EC 135	CAAGATCTGCAAGCAGTAACCTGAT	EC 136	GAGAGCGCCGCTATGTTCCCTGTATAAAAACC
78	NP 416208	EC 139	GAGGATCCAAACCGTAACCTGTAAGAAAT	EC 140	GAGAGCGCCGCGCAACAGAGACTACGAAATA
79	NP 416293	EC 151	CGGTCTCCGATCCACTATCAAAGTAGGTATCAACG	EC 152	CGGTCTCCGCGCCAGTCGCTCTTTTATGATCA
80	NP 416349	EC 153	GAGGATCCCTCGTGCCCAACACAC	EC 154	GTGAGCGCCGCAATTTTACGCTAGTTGAG
81	NP 416363	EC 155	CGAAGACCGGATCGACGTTATAGGCAGTCCG	EC 156	CGAAGACCGGCGCGCTAAGCTGTAAGAAAGTCAA
82	NP 416523	EC 161	CAGGATCCACAGCAACACTCGTTTA	EC 162	GAGAGCGCCGCGCTCAATGATTTGTTAAAGC
83	NP 416524	EC 163	GAGGATCCGCTTAAACAACATCTTGA	EC 164	GAGAGCGCCGCTTAAACTGTAAGTGTGACTCAG
84	NP 416602	EC 177	GAGGATCCAAACAGAAGCTATTTCTCG	EC 178	GAGAGCGCCGCGAGCTGTGTAATCGAGC
85	NP 416971	EC 187	GAGGATCCAAAAGCAAGCTGATGTTG	EC 188	GAGAGCGCCGCGCAAGATGATGAACAGAAAA
86	NP 416973	EC 189	GTGGATCCTTCCAGGGAAGTATTTGCT	EC 190	GAGAGCGCCGCGCAACAAGAGTAAAGCTCAA
87	NP 416994	EC 191	GAGGATCCGTGACCGATAAAACCTCT	EC 192	GTGAGCGCCGCAATAAGCACAACCAATTTCA
88	NP 417009	EC 199	GAGGATCCGCTGGCAAAAACATCAAAG	EC 200	CTGAGCGCCGCTTCACTCGTGGCTTTT
89	NP 417046	EC 205	GTGGATCCTTAAAGCGTGAAATGAACA	EC 206	GACAGCGCCGCGACTTACAGCAAAATCAC
90	NP 417223	EC 219	GAGGATCCGTAAAGCAGACCGTACAA	EC 220	GAGAGCGCCGCAAAAATCCAGGATTTCTCT
91	NP 417242	EC 221	CTGGATCCTTCCAAACTCGATCTAAACG	EC 222	GAGAGCGCCGCGCTTGAACACAGAGCTAA
92	NP 417259	EC 223	CTGGATCCTTCCAAAATCGTAAAAATCAT	EC 224	GAGAGCGCCGCTGGCATTTTTAAATCAGATAA
93	NP 417388	EC 227	CAAGATCTGCAAAGGTATCGTGGAG	EC 228	GTGAGCGCCGCGCTGTGATTTTCAGAGAA
94	NP 416529	EC 489	GAGGATCCCTGGCAAAACGCTAATAAT	EC 490	GAGAGCGCCGCGCTGATGTTGTTGCTG
95	NP 417225	EC 525	GAGGATCCATTGAGTTGATAATCTCACTT	EC 526	GAGAGCGCCGCGTGTGATATCCGGGTGTC
96	NP 418273	EC 579	CAGGATCCACAATTAAGAAATCACCCCT	EC 580	GAGGGCGCCGCAAGAAGTCTGCTGTAATGAG
97	NP 416771	EC 621	GAGGATCCGAATTAATTTTTTAGTACTTCAGC	EC 622	GAGAGCGCCGCGTGTGGTGGATATATGAG
98	NP 414585	EC 419	CTAGATCTTCCGAAGATATCTTTGACG	EC 420	GAGTGGCGCCGCTTCACTGACATTTGAAATTTAT
99	NP 415798	EC 121	GAGGATCCATGAGTGAATTTCCAACAGC	EC 699	GAGAGCGCCGCGCTGAATAATACGCAAGATAA
100	NP 417703	EC 551	GGGGATCCAAAGTCGACGTCCTCG	EC 552	GAGAGCGCCGCGTCACTTACAGGAATATC
101	NP 418381	EC 585	GAGGATCCGAAGTGTATCTGGACACC	EC 586	GAGAGCGCCGCGATGTTATTTACCCGTGAT
102	NP 417637	EC 245	CAGGATCCACAGATGTAACGATTA AAAACG	EC 246	GAGTGGCGCCGCTTACGTTGACCTGATAA
103	NP 417764	EC 275	CTGGATCCTTCTGTTGTTGCTAAAGCA	EC 276	GAGAGCGCCGCGCAGAGATTTCTTATCC
104	NP 417765	EC 277	GAGGATCCAGCATGCAAGATCCGATC	EC 278	GTGAGCGCCGCGCTTTAGCAACACAGAGACA
105	NP 417799	EC 307	CAGGATCCGCTCGTACAACACCCATC	EC 308	GAGAGCGCCGCGACTTGTGATTAACCCCTTAG
106	NP 418127	EC 337	CAGGATCCGCAAGTTCCGGCACAACA	EC 338	GTGAGCGCCGCAATACGTTGCTATGAGTTGT
107	NP 418218	EC 349	CAGGATCCACCACGAAGAAGCTGAT	EC 350	GAGTGGCGCCGCTTATTTACTCCAGTGTCTG
108	NP 416886	EC 509	CAGGATCCACATTAATCTCGTCTCGCTG	EC 510	GTGTGCGCCGCTTTTAAATAGGATAAATCCA
109	NP 414567	EC 009	CGGTCTCCGATCCAGTGAATAATAACCCCTG	EC 010	CGGTCTCCGCGCCGCTGTTGAACAGATGTGAC
110	NP 414593	EC 015	GAGGATCCAAATAATCGAGTCCACCAG	EC 016	GTGTGCGCCGCTTTGAACCTGAATACACAT
111	NP 414651	EC 021	CAGGATCCCGCTCGCCGCTATAAC	EC 022	GAGAGCGCCGCGGAGCGGATAAATCTGTCACTA
112	NP 414736	EC 033	GAGGATCCGCTACTAGCAATACCTCGC	EC 034	GACAGCGCCGCGCTCAATTTTATCAATCTCATG
113	NP 414973	EC 041	GAAGATCTAATCTGAGCGTCTGAA	EC 042	CAGAGCGCCGCGAGCCCTGTTTATTAATGATG
114	NP 415002	EC 045	CAGGATCCACCGCGAGTGCACAGC	EC 046	GAGAGCGCCGCGGAGCACAAGACTGCG
115	NP 415200	EC 057	GTGGATCCTGTTCATTTTGGCGTGA	EC 058	CAGAGCGCCGCGCACCTCAATAACTGAAACAG
116	NP 415206	EC 059	GAGGATCCAGTAGGCGAGAAGCCC	EC 060	GTGTGCGCCGCGACTAAACGCCCCATC
117	NP 415256	EC 063	GAGGATCCAACTTACATGAATAATCAGGCA	EC 064	GTGAGCGCCGCGATAAACCTTTGGTGTITATC
118	NP 415304	EC 075	CTGGATCCTCGCAACTGACCCATATC	EC 076	CTGAGCGCCGCGCTTCAACAGTGTGGGAAAT
119	NP 415413	EC 081	CGGTCTCCGATCCCTCGATCCCAATCTGCTG	EC 082	CGGTCTCCGCGCCCTTATGATTCAGAAAATTTGG
120	NP 415488	EC 089	CTGGATCCTCGAAAGTCTGCAATAATTTG	EC 090	GAGAGCGCCGCGCAAAAACCGGTAATAATGAT
121	NP 415649	EC 095	GTGGATCCGAAATTAATCTCACTGACCGC	EC 096	GAGAGCGCCGCGCAAAAACCGGATAATCTTAAT
122	NP 415777	EC 109	CAGGATCCACAACATTAATTAACCCCT	EC 110	GAGAGCGCCGCGCAACAACAGACTGCTAGC
123	NP 415790	EC 117	GAAGATCTGGTAAAGCTCTTGTCTAGC	EC 118	GAGAGCGCCGCAAAAACCTGACAGAATTAAG
124	NP 416228	EC 141	CGAAGACCGGATCGAAATTCAGTGAAGTGGT	EC 142	CGAAGACCGGCGCGCAATTTACGCTTTTGTAG
125	NP 416229	EC 143	CTGGATCCTCACATCTCGCAAGACTG	EC 144	GACAGCGCCGCGCAACTCACTCAAGTTTCAATA
126	NP 416234	EC 145	CAGGATCCCGTGTATAACTCTTCTGTA	EC 146	GTGAGCGCCGCGCTTTCGCGCTTTTATATAC
127	NP 416278	EC 147	GAGGATCCAGCGAGAACTCGATTCTG	EC 148	GAGAGCGCCGCGCAATAAACAACCCGACTT
128	NP 416281	EC 149	GAGGATCCAAAAGAAATCAATTTACGTTG	EC 150	GTGTGCGCCGCTTTGTAATCGACCAGTAAC
129	NP 416380	EC 157	GAGGATCCCGTACAGAATATTTGGGACA	EC 158	GTGAGCGCCGCAATGATTTCTGTATTTGAG
130	NP 416390	EC 159	GAGGATCCGTGAATATTCAGGCTCTCT	EC 160	CTGAGCGCCGCGCTTCACTCTACGAAAAAT
131	NP 416525	EC 165	GAGGATCCAGCACCGTACTTATACC	EC 166	GACAGCGCCGCGCGATCGATAAAAAGATAC
132	NP 416617	EC 179	CAAGATCTACTCAAGTCGCGAAGAAA	EC 180	GAGAGCGCCGCGCAAAAACCACTTTAGGAA
133	NP 416815	EC 181	GTGGATCCTCGGATTTGTCGGATC	EC 182	GAGAGCGCCGCAATAAATAGTTCGCTGTICA
134	NP 416960	EC 185	CTGGATCCTCCGAAAAGACCTTGC	EC 186	GAGAGCGCCGCGTATGAGCCGGATAAAGACG
135	NP 417002	EC 195	CAGGATCCACGGA AAAACATTCATAAGC	EC 196	GTGTGCGCCGCTGTAGGTAACAGAGGTTTG
136	NP 417003	EC 197	GAGGATCCCTACGTATCGCTAAAGAACG	EC 198	GAGAGCGCCGCGCAAGTGAACAGATAATA
137	NP 417013	EC 201	CAGGATCCGCTATTAAGACGTAATTTTCC	EC 202	GACAGCGCCGCGCAATTTGATAAATTTCTGG
138	NP 417052	EC 207	GAGGATCCATGAAAATTTGCTGTGTT	EC 208	GAGAGCGCCGCGCACTTATGATAGTGGTTGG

ANHANG

Nr.	GenBank	5'-Primer	Sequenz (5' → 3')	3'-Primer	Sequenz (5' → 3')
139	NP 417177	EC 215	CGGTCTCCGATCCAGCAAGAGCACCGCTGA	EC 216	CGGTCTCCGCGCCCGATAGCGTTAATGCGAATG
140	NP 417179	EC 217	CAGGATCCGCTATCGACGAAAAACAAA	EC 218	GTGTGCGGCCGTGTGTATCAAAACAAGACGA
141	NP 417260	EC 225	CAAGATCTACAACGAACTATTTTTGTGA	EC 226	GAGAGCGGCCGCAACTGAAACTCCAGACAAA
142	NP 417389	EC 229	CAGGATCCACGAGGATGAATGAAA	EC 230	GAGAGCGGCCGCTTTTTTTTACCGGGGAG
143	NP 416929	EC 623	GAGGATCCGAGATACCGGTATTCGC	EC 624	GAGAGCGGCCGCTAATGAGCAGGATGAAAC
144	NP 417355	EC 627	GTGGATCCTTGATCTGAAGAATGTFCAC	EC 628	CTGTGCGGCCGCTTTCTTTATTTAACCCTTT
145	NP 414620	EC 423	GAGGATCCCGCCGGATATTATCAGTC	EC 424	CAGAGCGGCCGCTGCTTTTATCCAGGTT
146	NP 417756	EC 265	CAGGATCCGCAAAAGCCACCAATTCGT	EC 266	GTGAGCGGCCGCAATATCTTCCATTTTCTTTC
147	NP 417757	EC 267	GAGGATCCCGTGGCCCGTATAGCAG	EC 268	CAGTGGCGCCGCTTGGCCATTTCAATCAC
148	NP 417769	EC 285	GAGGATCCATCCAGAACAGACTATGC	EC 286	CAGTGGCGCCGCTAACACGATAACTTCGCAT
149	NP 417774	EC 293	GAGGATCCGAAACTATCGCTAAACATCG	EC 294	GAGTGGCGCCGCTAGAGTTCATGGTITTACA
150	NP 417776	EC 297	CAGGATCCCGAGTGTGTTAAATGTAACCC	EC 298	GAGAGCGGCCGCAAGTGCAGGTACATAAAG
151	NP 417777	EC 299	GAGGATCCATCTCGTAAGAAGCTGTG	EC 300	CAGAGCGGCCGCAACTGCCATTTGATTACTC
152	NP 417801	EC 311	CAGGATCCGCAACAGTAAACAGCTG	EC 312	GTGAGCGGCCGCTTACTTAACGGAACCA
153	NP 418404	EC 375	GAGGATCCAAGGATAACACCGTGCCA	EC 376	GAGAGCGGCCGCTAGAAGAGGTGAGACTACG
154	NP 418411	EC 381	CAGGATCCCGTAAACTGACCAAGCCG	EC 382	GAGAGCGGCCGCGGGTAAAGATGTAGACAAA
155	NP 416372	EC 485	CAGGATCCCAAGTCTGGTTTCCCTG	EC 486	GAGAGCGGCCGCGGGGAAATAATAATTCAA
156	NP 417101	EC 519	GTGGATCCTTTGATAAATTAACCGATCG	EC 520	GAGAGCGGCCGCGACGAGCACAATCCCGG
157	NP 414543	EC 001	GAGGATCCCGAGTGTGGAAAGTTCGCG	EC 002	GAGAGCGGCCGCGGGGCAATAACTTTAACCAT
158	NP 416150	EC 133	GAGGATCCAATAAAGCAAAACGCGCTG	EC 134	GAGTGGCGCCGCTAAAGAAAGGTTATCAATGG
159	NP 418415	EC 385	GAGGATCCGTTGAAAGATTTATTAAGTTTCTGA	EC 386	GAGTGGCGCCGCTTACGTTATTTGCGGATTA
160	NP 417679	EC 253	CAGGATCCACACGCAAAACCCCGTC	EC 254	CTGAGCGGCCGCAATCTGCAATCTGTGCT
161	NP 418219	EC 351	GAGGATCCGTCGTAATATGGCGGGT	EC 352	GAGTGGCGCCGCTTAAATATTCGGCACCTT
162	NP 417634	EC 241	CTGGATCCTCTAAGTACTGAAGCAAC	EC 242	GTGAGCGGCCGCTAGTGTTCAGTGAATTG
163	NP 417645	EC 249	CAAGATCTCGCAAAAACCTAATCTCTG	EC 250	GAGTGGCGCCGCTTCGGTACAAATACAGTCAT
164	NP 417646	EC 251	CAAGATCTACAGGTAAGAAGCGTTCT	EC 252	GAGAGCGGCCGCAAACTTCGCTGTGAAATC
165	NP 417698	EC 255	GAGGATCCAAAACCTTTACAGCTTAAACCA	EC 256	GAGAGCGGCCGCGTATGATTTTCAGCCATT
166	NP 417755	EC 263	CAGGATCCGCAAGATATTTGGGTCTC	EC 264	GTGAGCGGCCGCTATGTGICCTCTCTTGG
167	NP 417762	EC 271	CAGGATCCGCTCACATCGAAAACAAA	EC 272	GAGTGGCGCCGCTGAGTAATTTAATAGCTTTGC
168	NP 417770	EC 287	CAGGATCCACGATAAAAATCCGATCTC	EC 288	GTGAGCGGCCGCGTATTTACTGATTTGAGAGA
169	NP 417773	EC 291	GTGGATCCGGTCAAGAAAGTACATCTC	EC 292	GTGGCGGCCGCTATTTGATACCTTTGGTIT
170	NP 417775	EC 295	CAGGATCCCGACGTTCTCTCAAGAAA	EC 296	GAGAGCGGCCGCTAGTTTCCATCTTCTCTC
171	NP 417780	EC 305	GAGGATCCGAGAACCAAGAAATCCGT	EC 306	CAGTGGCGCCGCTACCAGCTAAACCAATCAT
172	NP 417800	EC 309	CAAGATCTCCACGTCGTCGCGTCT	EC 310	GTGAGCGGCCGCTATTTTCTCTGTTTATCT
173	NP 415618	EC 459	GTGGATCCTTTTATGTCAGCTACACT	EC 460	GTGTGCGCCGCTTACTCGTTTACTGATTA
174	NP 416793	EC 499	CTGGATCCTCCCCATTTGAAAATATCC	EC 500	CTCTGCGGCCGCTCTGTTTCATAGTGACC
175	NP 416821	EC 501	CGGTCTCCGATCCCGACCGACCAACAAC	EC 502	CGGTCTCCGCGCCCATTTTACAGCTGTAAC
176	NP 417295	EC 529	GAGGATCCGTTGTTAAAGGAACGTAAAA	EC 530	GAGGCGGCCGCTGACAGTGTACAGCATGT
177	NP 418188	EC 571	CAGGATCCGCTACTGGAAAGATTTGCC	EC 572	GAGAGCGGCCGCTAAGTTCATGCCATATCA
178	NP 418480	EC 589	GTGGATCCTGGTATCAAAAAGCGCTG	EC 590	CAGAGCGGCCGCTGCAATATGCAATCACTC
179	NP 418723	EC 607	GAAGATCTAGTTGGCTGAAAGAGGTT	EC 608	GAGAGCGGCCGCAAGAGGCTATTGCTCTTT
180	NP 414711	EC 029	CAGGATCCGCAACTGTTTCCATGCG	EC 030	GTGAGCGGCCGCTACTATTTTGGGGAGTTAT
181	NP 414725	EC 031	GAGGATCCCATCGAATTTGTTTATCCCG	EC 032	GTGAGCGGCCGCTAATCTCGACACAAAGAA
182	NP 415251	EC 061	GAGGATCCAAATTTGCCAGTCAGAGAA	EC 062	CAGTGGCGCCGCTAGGCAATAATGAAAACTC
183	NP 415257	EC 065	CTGGATCCCATTTTAAATCGATAAAAAC	EC 066	GAGAGCGGCCGCGAGGGCTATTTCTTATTAC
184	NP 415693	EC 099	CAGGATCCGACGCAATATTGTTGTT	EC 100	GAGAGCGGCCGCAAGAAAGAAATCGAGTAATG
185	NP 415725	EC 101	GAGGATCCGTTGCTGATGAAAGCTTT	EC 102	GAGAGCGGCCGCAAAATGATATTACAGCAAAA
186	NP 416530	EC 169	GTGGATCCTTAAACAGAAACCAACAGCTG	EC 170	GTCTGCGGCCGCAATATCCGATCTCCGTTAC
187	NP 416532	EC 171	GAGGATCCAAAATTCACCATTTCCGGT	EC 172	GTGAGCGGCCGCAATAGCCCTGATAACAAAG
188	NP 416832	EC 183	CAAGATCTGCTGGAACACAATTTGGA	EC 184	GAGAGCGGCCGCAAGGTTGGGTTATTTT
189	NP 417071	EC 209	CAGGATCCCACTGTAACGACTTTTTCGG	EC 210	GAGAGCGGCCGCACTTTTAAATACAGGCTTA
190	NP 417090	EC 211	CAGGATCCACATCGGAAAACCGGTGA	EC 212	GACAGCGGCCGCAATCCGCGAGTAATAATC
191	NP 417091	EC 213	GGGTCTCGGATCGGTTGCTGAAATGACCG	EC 214	CGGTCTCCGCGCCGATCCAACTGATGAAAG
192	NP 417779	EC 303	GAGGATCCATGGTTTGTGCGTAAAAAA	EC 304	GAGTGGCGCCGCTAATTCATTTGCTATCTCC
193	NP 415315	EC 609	GAGGATCCAAATGATGCGGTTATCAGC	EC 610	GAGAGCGGCCGCGCTCTTTTAAACCGACAG
194	NP 416652	EC 619	GTGGATCCTTAAACGAAAGATCTTTTCGAT	EC 620	CAGGCGGCCGCAAGCTCAACTATGATTTG
195	NP 418414	EC 383	GTGGATCCGTTTACTCTTATACCGAAGAA	EC 384	CAGAGCGGCCGCAATGACCTGTTGAGCGAG
196	NP 415194	EC 449	CAGGATCCCAAAAACATCCATATTTAAAC	EC 450	GTGAGCGGCCGCAATAAAGATGGGATAAAGA
197	NP 417631	EC 543	GAGGATCCATGAGTTATGTAGACTGGCC	EC 544	GAGAGCGGCCGCTATTACAGATTGTGTTCCG
198	NP 417767	EC 281	CAGGATCCCGCAAACTGCAATGATTAC	EC 282	CAGTGGCGCCGCTTGTCTTACGCAATTTAGTAA
199	NP 417818	EC 313	CAGGATCCCGAATTTGAACAAACAGCA	EC 314	GAGAGCGGCCGCAATGCAATCCGATTAAGG
200	NP 414886	EC 437	GAGGATCCAAACGTTAAAAAATTTATATCTG	EC 438	GAGTGGCGCCGCTAACAATGCAAGCTTCTC
201	NP 416451	EC 487	CGGTCTCCGATCCACCACCGCGCTGACT	EC 488	CGGTCTCCGCGCCCATCTCTACTCTTTTCTG
202	NP 418500	EC 591	GAGGATCCAAAACAGCCAAAATACCG	EC 592	GACAGCGGCCGCAATAATCTTATCACCAGA
203	NP 414876	EC 037	GTGGATCCTTGAACATGCAATGACCC	EC 038	GTGAGCGGCCGCGCTATCAGGCAATTTTAT
204	NP 415779	EC 113	CAGGATCCCGTGCATTTCTGCTGCTC	EC 114	CAGGAGCGGCCGCTATCTTGAATGAACTG
205	NP 415851	EC 123	GAGGATCCCTGAGATTACTTGAAAGAAAAAT	EC 124	GAGAGCGGCCGCAATAAAGTGTGAAACAAGCTG
206	NP 417241	EC 527	GAGGATCCGAACCTTTTAAATATATATGCC	EC 528	GACTGCGGCCGCTATGATAACAATCATTCC
207	NP 414574	EC 013	CAGGATCCCAAAAACGTACAGATATAAAAAAG	EC 014	GAGTGGCGCCGCTTAGCGGATGAAAAATTC
208	NP 415434	EC 455	GAGGATCCCAATAACGACAAAAGATCTCTC	EC 456	GTGAGCGGCCGCAATCCAGCAGCAGGATTT
209	NP 418663	EC 603	GTGGATCCTTTAAAGAAATTTTACCAGGCG	EC 604	CAGAGCGGCCGCAAAAACCACTACTTGTCT
210	NP 415541	EC 457	GAGGATCCATTAATCGATCGTATCGT	EC 458	GTGAGCGGCCGCAAGAAACGACTGTTGATTG
211	NP 414629	EC 427	GTGGATCCTTAGTTTGGCTGGCCG	EC 428	GAGAGCGGCCGCAATAATGACGACATTTTACC
212	NP 416757	EC 497	GGGATCCTTTGAAATCCACCTGTT	EC 498	GAGAGCGGCCGCAATGCAATGAAACGAGGG
213	NP 417663	EC 549	GAGGATCCCTTTTACTACGGCACTG	EC 550	CTCAGCGGCCGCACTTACGTCGCAATAAT
214	NP 417950	EC 561	GAGGATCCCTACATTTGTTGCTGGC	EC 562	GTGAGCGGCCGCAATGTCACAACTGGAAGC
215	NP 418565	EC 595	GAGGATCCAGTGGACTCAAAACAAGAA	EC 596	GTGAGCGGCCGCTTATGATCAAAAGACGAT
216	NP 415926	EC 615	CAGGATCCACGCTTACCAGATAAAAAC	EC 616	GTGAGCGGCCGCAAGTGTGACAGATTTT
217	NP 414985	EC 043	GAGGATCCCAAGATAGCGACGATAAAAAC	EC 044	GAGAGCGGCCGCTGTTTGTGAGTGTCTG
218	NP 415766	EC 105	GAGGATCCGTTGAGTCACTGGGCTACA	EC 106	CACAGCGGCCGCGCCAAATAAGTTACTTTC
219	NP 415946	EC 127	GAGGATCCAGAGCGATAAAGTGTCTC	EC 128	GACTGCGGCCGCTCAGTACTTACAGATGTGT
220	NP 416109	EC 131	GAGGATCCCGTGTTCATTTGCCATTT	EC 132	GTGAGCGGCCGCAATGTTGATTAACCTTAT
221	NP 417759	EC 269	CAGGATCCGCTAAACAACCGGGATTA	EC 270	GAGTGGCGCCGCTTATTTTACTTCCGTA
222	NP 416170				
223	NP 418675	EC 605	CTGGATCCTCCGGGTTTTATCATAAGC	EC 606	GTGAGCGGCCGCGGTTTCCGCTTCTTATAG
224	NP 414890	EC 439	GAGGATCCAAATCACGTCGTCGCG	EC 440	GAGAGCGGCCGCGGGGAGAGATTAAGAACC
225	NP 414555	EC 425	GAGGATCCCGGTAATAATAATGTTATCGACC	EC 426	GAGAGCGGCCGCTACGATATAATCCCGTITT
226	NP 414646	EC 429	GAGGATCCCGTATGAAAGAAATCTGGAAG	EC 430	GTGAGCGGCCGCAATGATCTGCCAATTTTC
227	NP 414846	EC 433	CTGGATCCTCCGAATGGCAGAAC	EC 434	CACAGCGGCCGCAACAATAATGATGTAGTC
228	NP 415006	EC 441	GAGGATCCAAAGGACCAAGAAACTCTGT	EC 442	GAGAGCGGCCGCAAGATGATAAAGAAATG
229	NP 415427	EC 453	CAGGATCCGCTCAAATCTTCAATTTAGTT	EC 454	GACTGCGGCCGCTCCTAATGAACTCACTCTA
230	NP 415792	EC 463	CTAGATCTTCGTCAAACCTCAGAGAA	EC 464	GTGAGCGGCCGCTGTTGTAATTAATCTGCTT
231	NP 415816	EC 465	GAGGATCCAAATTTTATCATCTGGCTTAC	EC 466	GTGAGCGGCCGCGTAGTAACTGCTGGTATGT
232	NP 415996	EC 469	CGGTCTCCGATCCGATATCAAAAAGAGTGAGTG	EC 470	CGGTCTCCGCGCCCAATGATGAGATGTGAAAA
233	NP 416128	EC 475	GAGGATCCCAATACAGTACCGACGAA	EC 476	GAGAGCGGCCGCAACTGCACTTATAAACCTC

ANHANG

Nr.	GenBank	5'-Primer	Sequenz (5' → 3')	3'-Primer	Sequenz (5' → 3')
234	NP 416134	EC 477	GTAGATCTTTACGTCCTGTAGAAACC	EC 478	GAGAGCGGCCGCTAACTCAACAGGAAGAGC
235	NP 416533	EC 491	CTGGATCCTCCAAGCAACAGATCGG	EC 492	GTGTGCGGCCGCTTTATGTGTGGTAAATCAGA
236	NP 416557	EC 493	CTAGATCTTCAAAAAGTCGCTCTCATC	EC 494	GAGAGCGGCCGCAAAAACCTCGTGTGTACTCA
237	NP 416874	EC 507	CTAGATCTTCAGATCAACTTCAAATGAC	EC 508	GAGAGCGGCCGACAGGAGCAGTGTCAAGTA
238	NP 416959	EC 513	GAGGATCCAACGAGTTAGACGGCATC	EC 514	CTGTGCGGCCGCTTTCGGGACATATTAACACT
239	NP 417021	EC 515	CAGGATCCGCTTATTACAAAATFAGTGAAC	EC 516	GAGAGCGGCCGCAAAAATAACAATCTTTGGCATA
240	NP 417064	EC 517	GAGGATCCAAGAATATACGTAACCTTTTCGA	EC 518	GAGAGCGGCCGATCAGGGCAACATATTC
241	NP 417147	EC 523	GAGGATCCAACCTTAACGACAGTAACCTTAT	EC 524	GAGAGCGGCCGCTTATTTGCTGTTCATTC
242	NP 417379	EC 535	CAGGATCCACACAGACGTTAAGCCAG	EC 536	GAGTGGCGCCGCTTGCATCTGACTAAAAAGG
243	NP 417392	EC 537	CTAGATCTTCTAACGTGACGAGGAGTGG	EC 538	GAGAGCGGCCGCGGAATACTTTCTGCCAG
244	NP 417417	EC 539	CAAGATCTGCAAAACACCTTTTACGT	EC 540	GACAGCGGCCGCGCTATCCAAAAGAAAA
245	NP 417957	EC 563	CAGGATCCACTAAACACTAIGATATCATCG	EC 564	GACAGCGGCCGCGCTAAATTAAGCGCTAAGAG
246	NP 418074	EC 565	GAGGATCCCGTGGAGAATTTATCAGC	EC 566	GTGTGCGGCCGATGAACGCTTTCATCTCAC
247	NP 418190	EC 573	GAGGATCCCAACTGAATTCACCGAA	EC 574	GAGTGGCGCCGCTGATCTTACTACGTATCT
248	NP 418197	EC 575	CGGTCTCAGATCGTTTTATCCGGATCCCTTTG	EC 576	CGGTCTCCGGCCCGCTTACCAGGCATTTTAAAT
249	NP 418361	EC 583	CAAGATCTACTGAAAAAATATATCGTTG	EC 584	GAGAGCGGCCGCTTCTTCGGCATTTACA
250	NP 418553	EC 593	CTGGATCCTTGAACAAGAAACACGG	EC 594	CAGAGCGGCCGCTGCTTCGTTCAATTAAGT
251	NP 417876	EC 557	CTGGATCCTCAACAACCTATTTTAAACGAT	EC 558	GTGAGCGGCCGCTTATCCAGACGTTTGTCT
252	NP 418407	EC 587	CTGGATCCTTAAAGAAAAGTTTGAACGT	EC 588	GTGAGCGGCCGCTATGGCTCAAAATGTTAT
253	NP 417025	EC 625	GAGGATCCAATTACCGATTTATCTCGAC	EC 626	CAGAGCGGCCGCAAGCCATTATAAATCTCTCT
254	NP 417633	EC 629	GTGGATCCTTGCTTAATCCGATCGTT	EC 630	GAGAGCGGCCGCTTAACAAGCGCTCCTGC
255	NP 414658	EC 633	GAGGATCCAGTACTGAAATCAAATCCAG	EC 634	GAGAGCGGCCGCTAAATTAAGCGCTAAGAAA
256	NP 418045	EC 635	CAGGATCCACCAATAATCCCCCTTCA	EC 636	GTGAGCGGCCGCTATGATAAGACGCGTAAG
257	NP 418578	EC 599	GAGGATCCGTGCAACCTTTCAAGC	EC 600	GAGAGCGGCCGCAATTTTCAAGTTTTCAT
258	NP 415017	EC 443	CTGGATCCTCAAAAACCTATCGACCTGA	EC 444	GAGAGCGGCCGCTACCCGCAATGTGTATC
259	NP 416843	EC 505	GAGGATCCGAAATGACATCAGCGTTT	EC 506	GAGTGGCGCCGCTTCAATAGCTTTGACCTTC
260	NP 415903	EC 637	CAGGATCCACAGAGCCGCTATGAGC	EC 638	GTGTGCGGCCGCTTTACTTATGAGCGAACCC
261	NP 414845	EC 431	GTGGATCCTTGAATTTGACTACATCAT	EC 432	GAGAGCGGCCGCAACGGTAACTCTCAATCTG
262	NP 414869	EC 435	CTGGATCCTTITTAGCGAATTTTATCAG	EC 436	GAGAGCGGCCGCGACGCATCCGACAATAAC
263	NP 417298	EC 531	CAGGATCCCCCGCAGCACTGGT	EC 532	GAGAGCGGCCGCGCAAGGCAATGTGTCTCG
264	NP 417321	EC 533	GAGGATCCGTGATGAAAGAGCTTGTG	EC 534	GAGAGCGGCCGCTATTTATCGGTAAGGAGGA
265	NP 417811	EC 553	GGGATCCATTGTTTTCTCCTGTATACA	EC 554	GAGAGCGGCCGCGACAGTGCATTAATGAAAG
266	NP 418288	EC 581	GAGGATCCCTTTACAAAGCGACACC	EC 582	GAGAGCGGCCGCGACAATGACAACCTGTTC
267	NP 415931	EC 617	CGGTCTCCGATCCACAGAACAAACAAATGACC	EC 618	CGGTCTCCGGCCCTTCTTTATCAGGCAAAATG
268	NP 416246	EC 631	CTAGATCTTCGCAACATAACGAAAG	EC 632	GAGAGCGGCCGCAAGCGCAATGATAAATC
269	NP 416119	EC 471	CTGGATCCTCTGGAGGATTAGTTACAGC	EC 472	CTGAGCGGCCGCTATCAATAAAGAGTGACG
270	NP 416120	EC 473	GAGGATCCCGAATTGGCATACCAAGA	EC 474	GTGTGCGGCCGCTGTAACCTTCTCCAGACA
271	NP 415254				

9.3.4 PCR mit Pathogenitätsfaktoren von *E. coli*

Nr.	Gen	5'-Primer	Sequenz (5' → 3')	3'-Primer	Sequenz (5' → 3')
1	espB	EC 669	GAGGATCCAATACTATCGATAATAACAATGCG	EC 670	CAGAGCGGCCGCAAAACACTTCATCATTAAACG
2	dsbA	EC 649	GAGGATCCAAAAGATTGGCTGGCG	EC 650	GACAGCGGCCGCGCGGCTTTATGTAAATTT
3	papA	EC 715	GAGGATCCATTAAGTCGGTATTGGC	EC 716IG	CACAGCGGCCGCTTACTGATAAGTCAGGTTGAA
4	espD	EC 667	GAGGATCCCTTAATGTAATAACGATATCCAG	EC 668	CTGAGCGGCCGCTTCAATAAACCGCTT
5	orf19	EC 659	GTAGATCTTTAGTCCAACGGCAATG	EC 660	GAGAGCGGCCGATAACAGCGCAGTAAGTTT
6	cs6	EC 677	GAGGATCCAAGAAAACAATTTGGTTAAATCT	EC 678	GTGAGCGGCCGCAATAACAATAGCCGGAATAAT
7	tir	EC 661	CAGGATCCCTATTGGTAACTTGGT	EC 662	GACAGCGGCCGCGCCCAACCTCAATAATC
8	ipaB	EC 689	GAGGATCCATAATGTAAGCACCAAC	EC 690	GTGAGCGGCCGCTCAAGCAGTAGTTTGTGTC
9	ipgC	EC 673	CTGGATCCTCTTAAATATCACCGAAAATGA	EC 674	GAGAGCGGCCGCTATTTTGGCAAGAGGAA
10	ces1	EC 639	CTGGATCCTCAAGATCTGAACTTTTAT	EC 640	CACAGCGGCCGCGCACAAATGAGTTAGAAITGAG
11	stx2B	EC 645	GAGGATCCAAGAAAGATGTTATGGCGG	EC 646	GTGTGCGGCCGCTGTGACACAGATTAACACTTG
12	espA	EC 665	GAGGATCCGATACATCAACTACAGCATC	EC 666	GAGAGCGGCCGCTCACAGACGATGATCTGCT
13	papB	EC 713	GAGGATCCGCGCATATGAAGTCATC	EC 714	CACAGCGGCCGCAACTCCGAAITGCCATAA
14	papK	EC 717	GAGGATCCATAAAAAGCACAGGCGCT	EC 718IG	CACAGCGGCCGCTAACGATATGTAATTAACAAC
15	cs5	EC 657	GAGGATCCAAGAAAATTTACTGATACTTCAG	EC 658	GAGTGGCGCCGCTTGGTATAAAAATAATGCAGA
16	ipaA	EC 675	GAGGATCCATAATGTAATAATACTCAAGCG	EC 676	CTGTGCGGCCGCTTCTTCAGATAGTTTGTGCT
17	espF	EC 671	GAGGATCCCTTAATGGAATTAGTAACTGCT	EC 672	CTGAGCGGCCGCAATGTTTTAAATGATTTGG
18	senA	EC 697	CAGGATCCCATCAGTAAATTTAATCC	EC 698	GTGAGCGGCCGCTCAGCTTTTATATCTTCATA
19	sta3	EC 641	GAGGATCCAAGAAATCAATATTTATTTTCTTCT	EC 642	GACTGCGGCCGCTATCAGAAATCAGAACAAT
20	cs3	EC 685	GAGGATCCTTAAAAATAAATACTTATAATAGG	EC 686	GTGAGCGGCCGCGCAAGGCTACGCTTATTATATA
21	lngA	EC 695	GAGGATCCCTATCCGIGTATAACCGG	EC 696	CACAGCGGCCGCTTAACGGCTACTTAAGTAA
22	astA	EC 653	CAGGATCCCATCAACGAGTATATCC	EC 654	GAGTGGCGCCGCTTATCTGAGGATAGCGACT
23	icsA	EC 687	GAGGATCCCTTGGGAGCTGGTG	EC 688	GTGAGCGGCCGCTTAGACTACTGATTTCCAGCTAAAAT
24	hlyA	EC 651	CAGGATCCACAGTAAATAAATAAAGAACATTTTC	EC 652	CTGAGCGGCCGCTACCTCTCTTTTATG
25	eltA	EC 693	CAGGATCCAAAATAATACTTTTCAATTTT	EC 694	CACAGCGGCCGCTTCAATAATTCATCCCGAA
26	aggA	EC 679	GAGGATCCAACATTAATAAATATGAGAAGAAAG	EC 680	GAGAGCGGCCGCGGCTATTTCCCATATAGTTC
27	stx1A	EC 691	GAGGATCCAATAAATTTTATAGAGTGC	EC 692	GTGAGCGGCCGCTCAACTGCTAATAGTCTCGC
28	stx1B	EC 647	GAGGATCCAAAACATTTAATAAGCTGCA	EC 648	GAGTGGCGCCGCTGATTTTCACTGAGCTAT
29	papE	EC 719	GAGGATCCAAGAAGATAAGAGGTTTGTG	EC 720IG	CACAGCGGCCGCTACGAAATATGATGCAACC
30	csdD	EC 723	GAGGATCCAAAAGATATTTATTTTGTG	EC 724IG	CACAGCGGCCGCTATAAATTTTGCACACTG
31	aafA	EC 655	GAGGATCCAAAATAACAGATGTTTGGC	EC 656	GAGTGGCGCCGCTTATATGTCACAAGCTCAG
32	cfaC	EC 703	GAGGATCCAAGCATAAAAAAGAATAGA	EC 704IG	CACAGCGGCCGCTTATCTTTATCTTTTGC
33	cfaE	EC 705	GAGGATCCAATAAATTTTATTTTATACA	EC 706IG	CACAGCGGCCGCTTAGACTGATTTTACTAGTGGT
34	csdA	EC 721	GAGGATCCAACCTGAAGAAAACAATTTGG	EC 722IG	CACAGCGGCCGCTTAAGTTTTTTGTAGCTATGAT
35	cfa/I	EC 683	GAAGATCTAAATTTAAAAAATATTTGGTGC	EC 684	GAGAGCGGCCGCTAAACATACCCCTCTCT
36	aafE	EC 681	GAGGATCCGAGATCTGATATGAAATTTTACTAA	EC 682	GTGAGCGGCCGCAATAATGAACTTCTTGAAA
37	eae	EC 663	GAGGATCCATTACTCATGTTTATATGCC	EC 664	GAGAGCGGCCGCAAAATGCTCCGATAAAGAT
38	stx2A	EC 643	GAGGATCCAAAGTATATATTTTAAATGGTACT	EC 644	GTGAGCGGCCGCAATAAACATCTTCTCATGC
39	cfaA	EC 701	GAGGATCCATAAATTTATCTTACTAAGTT	EC 702IG	CACAGCGGCCGCTCAAGGAACCTTAAATGTGA

9.4 Publikationsliste

1. Ergin A, Büsow K, Sieper J, Thiel A, Duchmann R, Adam T, *Homologous high-throughput expression and purification of highly conserved E coli proteins*. Microb Cell Fact, 2007. **6**: p. 18.
2. Sievert V, Ergin A, Büsow K, *High throughput cloning with restriction enzymes*. Methods Mol Biol, 2008. **426**: p. 163-73.
3. Ergin A, Adam T, Büsow K, Thiel A, Sieper J, Duchmann R, *Identification of the predominant antigenic epitopes in intestinal flora in IBD*. Mucosal Immunol, 2008. **1 Suppl 1**: p. S19-23.
4. Ergin A, Thiel A, Adam T, Büsow K, Duchmann R, Sieper J, *Peripheral CD4+ T cell responses in patients with Crohn's disease and ankylosing spondylitis upon in vitro stimulation with highly conserved proteins and with pathogenicity factors of Escherichia coli*. Publikation in Vorbereitung.

Danksagung

Ich möchte mich bei den Projektleitern des SFB633/A4 Dr. Konrad Büssow, Prof. Dr. Rainer Duchmann, Prof. Dr. Joachim Sieper, Dr. Andreas Thiel und PD Dr. Thomas Adam für ihre Unterstützung und regen Diskussionen bedanken.

Prof. Dr. Roland Lauster möchte ich danken, dass er meine Dissertation an der Technischen Universität Berlin unterstützt hat.

Die vorliegende Arbeit wurde hauptsächlich in den Laboren von Dr. Büssow (Proteinstrukturfabrik), Prof. Dr. Sieper (Rheumatologie, Charité CBF) und PD Dr. Adam (Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité CCM) durchgeführt.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern Dr. Christoph Scheich, Dr. Volker Sievert, Dr. Ulf Lenski, Claudia Quedenau, Janett Tischer vom Labor Dr. Büssow, sowie Peihua Wu, Rebecca Scheer, Dorothee Köhler, Maren Kuhne, Adelheid Ditten, René Heydrich, PD Dr. Heiner Appel vom Labor Prof. Dr. Sieper und Kerstin Kapp vom Labor Prof. Dr. Duchmann für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank geht auch an Dr. Soroush Sharbati-Tehrani für die hilfreichen Diskussionen und für die wertvollen Anregungen zum Manuskript.

Schließlich danke ich meiner Familie und meiner Frau für die Geduld und permanente Unterstützung.