

**IMMUNOLOGISCHE UND
MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
DES *OUTER MEMBRANE PROTEIN A*
VON *PROTEUS MIRABILIS***

dem Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines *Doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation von

Mark Hotz

aus Bad Godesberg

Berichterstatterin: Prof. Dr. Kathryn Nixdorff, Inst. f. Mikrobiologie, TU Darmstadt

Mitberichterstatterin: Prof. Dr. Felicitas Pfeifer, Inst. f. Mikrobiologie, TU Darmstadt

Tag der Einreichung: 15. Juli 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 23. September 2005

Darmstadt, 2005

D 17

Meinen Eltern

DANKSAGUNG

Mein besonders herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Kathryn Nixdorff für die Überlassung dieses Themas, die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit in ihrem Labor und die freundliche Betreuung während dieser Zeit. Durch ihr persönliches Engagement wurde mein Bewußtsein gegenüber interdisziplinärer Forschung sensibilisiert.

Frau Prof. Dr. F. Pfeifer danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates und allen Mitgliedern ihrer Arbeitsgruppe für deren Hilfsbereitschaft. Ganz besonders waren mir Herr Dr. Peter Zimmermann bei der Durchführung der Western-Blot-Analysen und Herr Dipl.-Biol. Alexander Treusch bei Fragen zur Genexpression behilflich.

Herrn Prof. Dr. H. Jeske vom Biologischen Institut, Abteilung Molekularbiologie und Virologie der Pflanzen, Universität Stuttgart danke ich für die wertvollen Hilfestellungen bei den PCR-Experimenten.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kathryn Nixdorff danke ich für die freundliche Atmosphäre. Insbesondere Frau Dr. Dagmar Schilling-Leiß für die Durchführung der vergleichenden Untersuchungen mit den TLR-*Knockouts* in Übersee und Frau Aysefa Doganci für die Unterstützung bei der Klonierung von *ompA*.

Frau Astrid Ott und Frau Monique Nadrowitz danke ich für die Unterstützung beim Redigieren dieser Arbeit.

Diese Arbeit wurde durch ein Stipendium der Hans-Böckler-Stiftung sowie durch die Interdisziplinäre Arbeitsgruppe Naturwissenschaft, Technik und Sicherheit (IANUS) der TU Darmstadt gefördert.

 INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
Einleitung	3
1.1. Grundlagen des Immunsystems der Vertebraten	3
1.2. Das Phagozytensystem	5
1.3. Aktivierung der Makrophagen	6
1.3.1. Extrazelluläre Erkennung von LPS durch TLR4.....	8
1.3.2. TLR4-Signaltransduktion.....	9
1.4. Proinflammatorische Zytokine	12
1.5. Outer membrane protein A (OmpA)	13
Problemstellung	17
Material und Methoden	19
3.1. Chemikalien	19
3.2. Biologisches Material / Substanzen	22
3.2.1. Mäuse.....	22
3.2.2. Zelllinien	22
3.2.3. Bakterien	22
3.2.4. Oligonukleotide	23
3.2.5. Vektoren, Konstrukte.....	23
3.2.6. Molekularbiologische Reagenzien.....	25
3.2.7. Stimulatoren	25
3.2.8. Enzyme, Proteine, Antikörper.....	27
3.3. Geräte und Kits	27
3.4. Zellkultur	28
3.4.1. Allgemeine Methoden	28
3.4.2. Präparation, Isolierung und Differenzierung von Knochenmarksmakrophagen.....	29
3.4.3. Anzucht und Rekultivierung von RAW 264.7-Zellen.....	30
3.4.4. Färbung und Zellzahlbestimmung.....	30
3.4.5. Passage und Aussaat	30
3.4.6. Stimulierung von Makrophagen	31
3.4.7. Gentechnische Methoden in der Zellkultur.....	32
3.4.7.1. Transfektion mittels der Calciumphosphat-Methode.....	32
3.4.7.2. Stimulierung von transfizierten Zellen	32
3.4.7.3. Reportergenassays	33
3.5. Biochemische und serologische Nachweismethoden	33
3.5.1. Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test	33
3.5.2. Herstellung von Zellwänden.....	34
3.5.3. ELISA (enzymgebundener Immunoassay).....	34
3.5.3.1. Nachweis von OmpA in Zellwänden.....	35
3.5.3.2. Nachweis der Zytokinproduktion.....	35
3.5.4. Nachweis von NO	36

3.5.5. Western-Blot-Analysen	37
3.5.5.1. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.5.5.2. Blot.....	38
3.5.5.3. Nachweis von OmpA in Zellwänden.....	38
3.5.5.4. Nachweis der Expressionsfragmente	38
3.6. Photometrische Methoden	39
3.7. Molekular-biologische Methoden.....	39
3.7.1. Northern-Analysen	39
3.7.1.1. RNA-Extraktion.....	40
3.7.1.2. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese.....	40
3.7.1.3. Northern-Blot	41
3.7.1.4. Nachweis mit Digoxigenin	41
3.7.2. Isolierung von chromosomaler DNA	42
3.7.3. Gen-Amplifikation.....	42
3.7.4. Gelelektrophorese von DNA	43
3.7.5. Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen.....	43
3.7.6. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion	44
3.7.7. Fällern und Waschen von Nukleinsäuren.....	44
3.7.8. Ligation und Transformation in kompetente Zellen.....	44
3.7.9. Restriktionsanalyse.....	45
3.7.10. Sequenzierung.....	45
3.7.11. Expression rekombinanter OmpA-Fragmente in <i>E. coli</i>	46
3.8. Statistische Methoden	46
Ergebnisse.....	47
4.1. Quantitativer Nachweis von gramnegativen Endotoxinen (LPS) in den verwendeten OmpA Proben	47
4.2. Untersuchungen zur agonistischen Wirkung von OmpA alleine und in Kombination mit LPS auf Makrophagen	48
4.2.1. Einfluß von OmpA auf die Zytokinproduktion bei RAW 264.7- und C3H- Makrophagen	49
4.2.1.1. Dosis-abhängiger Einfluß von OmpA auf die Zytokinproduktion bei RAW 264.7- und C3H-Makrophagen.....	49
4.2.1.2. Effekte von Polymyxin B auf die Produktion von IL-1 β nach Stimulierung mit LPS und OmpA bei RAW 264.7- und C3H/HeJ- Makrophagen.....	54
4.2.1.3. Effekte von Staurosporin auf die Zytokinproduktion bei C3H/HeJ-Makrophagen.....	57
4.2.2. Einfluß von OmpA auf die Produktion von reaktivem Stickstoffmonoxid (NO) bei RAW 264.7- und C3H/HeJ-Makrophagen.....	58
4.2.2.1. Dosis-abhängiger Einfluß von OmpA auf die NO Produktion bei RAW 264.7- und C3H/HeJ-Makrophagen.....	58
4.2.2.2. Kinetik der NO Produktion nach Stimulierung mit LPS und OmpA bei C3H/HeJ-Makrophagen	61
4.2.3. Kinetik der Produktion von IL-1 β nach Stimulierung mit LPS und OmpA bei C3H/HeJ-Makrophagen	62
4.2.4. Transkription der Gene für IL-1 β in C3H/HeJ-Makrophagen nach Stimulierung mit LPS und OmpA	63
4.2.4.1. Kinetik der Transkription von IL-1 β in C3H/HeJ-Makrophagen nach Stimulierung mit LPS und OmpA.....	63

4.2.4.2.	Effekte von Staurosporin auf die IL-1 β -mRNA-Menge in C3H-Makrophagen nach Stimulierung mit LPS und OmpA.....	64
4.2.5.	Einfluß von OmpA auf die Promotoraktivität des IL-1 β -Gens bei RAW 264.7-Makrophagen.....	67
4.3.	Charakterisierung der <i>ompA</i>-Gen-Sequenz von <i>Proteus mirabilis</i> 19 und phylogenetischer Vergleich mit verwandten Bakterien.....	70
4.3.1.	Serologische Charakterisierung des OmpA von <i>Proteus mirabilis</i> mittels der monoklonalen Antikörper (mAk) 2.14.1 und 2.18.1.....	70
4.3.2.	Ermittlung der Sequenz eines 400 bp großen <i>ompA</i> -Fragmentes von <i>Proteus mirabilis</i>	75
4.3.3.	Ermittlung der Sequenz eines 1 kb großen <i>ompA</i> -Fragmentes von <i>Proteus mirabilis</i>	77
4.3.4.	Datenbankanalyse (Blastn) und Vergleich der sequenzierten Nukleotidsequenzen (<i>Proteus mirabilis</i> 19) mit Sequenzen von <i>Proteus mirabilis</i> HI4320.....	81
4.3.5.	Sequenzierung des gesamten <i>ompA</i> -Gens von <i>Proteus mirabilis</i> 19.....	82
4.3.6.	Phylogenetischer Vergleich auf der Basis von OmpA.....	87
4.4.	Herstellung rekombinanter Proteine.....	91
Diskussion.....		98
5.1.	Untersuchungen zur aktivierenden Wirkung von OmpA auf Makrophagen	98
5.1.1.	Bestimmung des Endotoxin (LPS)-Anteils in den verwendeten OmpA-Proben.....	98
5.1.2.	Spezifische Wirkung von OmpA auf Makrophagen.....	98
5.1.3.	Einfluß von Polymyxin B (PMB) auf die spezifische Wirkung von OmpA.....	101
5.1.4.	Einfluß von Staurosporin auf die spezifische Wirkung von OmpA.....	101
5.2.	Differenzierte Modulation LPS-aktivierter Makrophagen durch OmpA von <i>Proteus mirabilis</i> und <i>E. coli</i>.....	102
5.3.	Charakterisierung und phylogenetische Untersuchung der <i>ompA</i>-Gen-Sequenz von <i>Proteus mirabilis</i> 19.....	104
5.4.	Ausblick.....	107
Begleitende Technikfolgenabschätzung.....		109
6.1.	Einführung.....	109
6.2.	Das Modell der ethischen Urteilsbildung.....	115
6.3.	Fallbeispiel: Rheumatoide Arthritis.....	118
6.4.	Ausblick.....	119
Literaturverzeichnis.....		121
Anhang.....		130
Lebenslauf.....		130
Erklärungen.....		132

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Nummer</i>		<i>Seite</i>
Abb. 1	Aktivierung von Zellen der adaptiven Immunität (T-Lymphozyten) durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ)	4
Abb. 2	Einige Toll- <i>like</i> Rezeptoren (TLR) und ihre Liganden	8
Abb. 3	Der TLR-Signalübertragungsweg	10
Abb. 4	Übersicht über die MyD88- abhängige/-unabhängige TLR-Signalübertragung	11
Abb. 5	Struktur der Transmembran-Domäne von OmpA	14
Abb. 6	Konservierte Bereiche der Aminosäuresequenz von OmpA verwandter <i>Enterobacteriaceae</i>	16
Abb. 7	Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Produktion von IL- β in RAW 264.7-Makrophagen	49
Abb. 8	Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Produktion von IL-1 β in C3H/HeJ-Mäusen	50
Abb. 9	Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Produktion von TNF- α in RAW 264.7-Makrophagen	51
Abb. 10	Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Produktion von TNF- α in C3H/HeJ-Mäusen	52
Abb. 11	Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Produktion von IL-6 in Knochenmarksmakrophagen von C3H/HeJ-Mäusen	53
Abb. 12	Einfluß von Polymyxin B auf die Produktion von IL-1 β in RAW 264.7-Makrophagen nach Stimulierung mit LPS und OmpA	55
Abb. 13	Einfluß von Polymyxin B auf die Produktion von IL-1 β in Knochenmarksmakrophagen von C3H/HeJ-Mäusen nach Stimulierung mit LPS und OmpA	56
Abb. 14	Einfluß von Staurosporin auf die OmpA-induzierte Produktion von IL-1 β in Knochenmarksmakrophagen von C3H/HeJ-Mäusen	57
Abb. 15	Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Produktion von NO in RAW 264.7-Makrophagen	59
Abb. 16	Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Produktion von NO in C3H/HeJ-Mäusen	60
Abb. 17	Kinetik der NO Produktion in C3H/HeJ-Mäusen	61
Abb. 18	Kinetik der IL-1 β -Produktion in C3H/HeJ-Mäusen	62
Abb. 19	Kinetik der Transkription von IL-1 β in C3H/HeJ-Mäusen	65
Abb. 20	Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Aktivität der vollständigen humanen IL-1 β -Enhancer- und Promotorregion in RAW 264.7-Makrophagen	68

Abb. 21	Einfluß von Staurosporin auf die OmpA-induzierte Aktivität der vollständigen humanen IL-1 β -Enhancer- und Promotorregion in RAW 264.7-Makrophagen	69
Abb. 22	ELISA der monoklonalen Antikörper 2.14.1 und 2.18.1	72
Abb. 23	Western-Blot-Verfahren zum Nachweis von OmpA	73
Abb. 24	Übersicht zur Auswahl der Primersequenzen	74
Abb. 25	Sequenz des pCR-Blunt II-TOPO-Vektors mit ligiertem 400 bp Gen-Fragment von <i>Proteus mirabilis</i>	76
Abb. 26	Sequenz des pQE-32-Vektors mit ligiertem 1 kb Gen-Fragment von <i>Proteus mirabilis</i>	77-78
Abb. 27	Vergleich aller Sequenzläufe der beiden <i>ompA</i> -Gen-Fragmente von <i>Proteus mirabilis</i>	79-80
Abb. 28	Sequenz des pCR-Blunt II-TOPO-Vektors mit ligiertem <i>ompA</i> -Gen von <i>Proteus mirabilis</i>	83-84
Abb. 29	Vergleich der <i>ompA</i> -Sequenz von <i>Proteus mirabilis</i> H14320 mit der vollständigen <i>ompA</i> -Sequenz von <i>Proteus mirabilis</i> 19	85-86
Abb. 30	Vergleich der Aminosäure-Sequenz des OmpA von <i>Proteus mirabilis</i> H14320 und <i>Proteus mirabilis</i> 19	86
Abb. 31	Vergleich der Aminosäure-Sequenz des OmpA verwandter <i>Enterobacteriaceae</i>	88
Abb. 32	Dendrogramm der Verwandtschaft einiger <i>Enterobacteriaceae</i> auf der Basis von OmpA	89
Abb. 33	Expressionsfragmente von OmpA aus <i>Proteus mirabilis</i> 19	91
Abb. 34	Vergleich der <i>consensus</i> -Sequenzen der Expressionsfragmente von OmpA aus <i>Proteus mirabilis</i> 19	92-93
Abb. 35	Western-Blot-Verfahren zum Nachweis der rekombinanten OmpA-Fragmente AB und A aus <i>Proteus mirabilis</i> 19	95
Abb. 36	Western-Blot-Verfahren zum Nachweis der rekombinanten OmpA-Fragmente B und C aus <i>Proteus mirabilis</i> 19	96
Abb. 37	Schematische Darstellung von OmpA in der äußeren bakteriellen Membran	106
Abb. 38	Topologie verschiedener Konformationen von OmpA	106
Abb. 39	Struktur und Prozeß ethischer Urteilsbildung	116

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

aa	Aminosäuren
Amp	Ampicillin
AP-1	<i>activator protein 1</i>
A-POD	Avidinperoxidase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
APZ = APC	Antigen-präsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAM	Chloramphenicol
CD14	<i>cluster of differentiation 14</i>
CREB	<i>cyclic-AMP response element binding</i>
CXCR	<i>chemokine receptor</i>
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	fötales Kälberserum
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating-factor</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSF	<i>growth differentiation factor</i>
HS	Pferdeserum
Hsp	<i>heat shock protein</i>
IFN	Interferon
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IPTG	Isopropylthiogalactopyranosid
IRAK	<i>interleukin-1-receptor associated kinase</i>
IRF-3	<i>interferon regulatory factor 3</i>

I κ B	Inhibitor von NF- κ B
JNK	Jun <i>N-terminal kinase</i>
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAL	<i>Limulus</i> Amöbozyten-Lysat
LBP	LPS-bindendes Protein
LP	Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MD-2	<i>myeloid differentiation protein 2</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MPS	monozytäres Phagozytensystem
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i>
NF-IL6	<i>nuclear factor interleukin-6</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NO	Stickstoffmonoxid
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
OmpA	<i>outer membrane protein A</i>
RA	rheumatoide Arthritis
Stau	Staurosporin
T _H	T-Helferzelle
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	<i>tumor-necrosis-factor receptor associated-factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β</i>

ZUSAMMENFASSUNG

Eine effektive Verteidigung des Immunsystems gegen bakterielle Infektionen hängt im wesentlichen von der schnellen Erkennung und Beseitigung der Erreger durch Makrophagen ab. Bei der Aktivierung der Makrophagen spielen das Lipopolysaccharid (LPS) und einige wenige Hauptproteine der äußeren Membran von Bakterien eine zentrale Rolle; daran sind Toll-*like* Rezeptoren (TLR) beteiligt. Sobald Makrophagen auf Bakterien treffen, werden diese erkannt und phagozytiert, bevor sie intrazellulär verdaut und proinflammatorische Zytokine sezerniert werden. Diese Zytokine dienen der Aktivierung weiterer Immunzellen und Induktion einer spezifischen Immunantwort. Neben der Abwehr infektiöser Krankheitserreger wirken sie bei der Bekämpfung von Tumorzellen mit oder fungieren als Antigenpräsentierende Zellen und greifen so regulierend in die Prozesse des Immunsystems ein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente durchgeführt, um den Einfluß eines Hauptproteins von *Proteus mirabilis*, dem *outer membrane protein A* (OmpA) auf die Aktivierung von Makrophagen mit LPS näher zu untersuchen. Zudem wurde die Nukleotidsequenz des *ompA*-Gens aus *Proteus mirabilis* 19 erstmalig sequenziert und sowohl das native wie auch rekombinante OmpA-Fragmente serologisch charakterisiert.

Dabei konnte gezeigt werden, daß OmpA aktivierende Eigenschaften besitzt, die jedoch erheblich schwächer als die von LPS sind. Diese Eigenschaften unterschieden sich in ihrer Wirkungsweise in Abhängigkeit der bakteriellen Herkunft. So zeigte das OmpA von *Proteus mirabilis* eine signifikant stärkere Aktivität als das OmpA von *E. coli*, was möglicherweise auf physiologische Eigenschaften zurückzuführen ist.

Zusätzlich haben durchgeführte Untersuchungen an LPS-toleranten Makrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen gezeigt, daß OmpA Makrophagen nicht über den TLR4 aktiviert. Vermutlich ist ein anderer TLR an der Stimulierung mit OmpA beteiligt. Obwohl die Aktivierung von Makrophagen mit OmpA nicht über TLR4 erfolgt, ist die Stimulierung im Verlauf ähnlich zu der gegen LPS, nur viel schwächer. In diesem Zusammenhang führte die Zugabe des allgemeinen Proteinkinase-Inhibitors Staurosporin bei der OmpA-induzierten

Produktion von IL-1 β stets zu einer Erhöhung der IL-1 β -Menge. Dieser Effekt war ähnlich der Wirkung von Staurosporin auf LPS-aktivierte Makrophagen. Ferner konnte OmpA in Reporter-gen-Transfektionsversuchen die Aktivität eines LPS-induzierbaren IL-1 β -Promotors induzieren.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß OmpA ein besonders effektiver Modulator der Immunantwort gegen LPS ist, wobei die Steuerung der Zytokinproduktion auf der Ebene der Promotoraktivität der Gene erfolgte.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das 39 kDa OmpA von *Proteus mirabilis* 19 erstmals vollständig entschlüsselt werden. Bestehend aus 362 Aminosäuren (aa) ist es deutlich größer als das OmpA verwandter Bakterien, wie z.B. *E. coli* (346 aa). Den phylogenetischen Untersuchungen zufolge, weist es im Vergleich mit dem OmpA von *E. coli* einen Identitätsindex von 68% und einen Ähnlichkeitsindex von 79% auf. Diese Differenz könnte die Ursache für die unterschiedliche Aktivierbarkeit von Makrophagen sein.

Auf der Grundlage der gewonnen Sequenzinformationen wurden unterschiedliche OmpA-Fragmente rekombinant hergestellt und für die serologische Charakterisierung der mAk 2.14.1 und 2.18.1 verwendet. Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß es sowohl ein hoch konserviertes generisches Epitop bei allen untersuchten OmpA-Proben (*Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* und *Erwinia amylovora*), wie auch ein spezifisches für *Proteus mirabilis* gibt. Weitere Untersuchungen mit den mAk gaben erste Hinweise darauf, daß beide Epitope in unterschiedlichen Bereichen des Proteins liegen. Während das spezifische Epitop im zentralen Bereich des Proteins sitzt, konnte die Position des generischen Epitops im N-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert werden.

EINLEITUNG

1.1. Grundlagen des Immunsystems der Vertebraten

Das menschliche Immunsystem besitzt eine erstaunliche Konstellation von Abwehrmechanismen, um die Immunität oder Resistenz des lebenden Organismus gegenüber den fortwährenden Angriffen des äußeren und inneren Umfeldes zu erhalten und die innere Unversehrtheit und damit die Gesunderhaltung zu gewährleisten. Darüber hinaus ist das Immunsystem an der Wundheilung und Beseitigung von abgestorbenen körpereigenen Zellen beteiligt.

Das Immunsystem steht ständig in vielerlei dynamischen Wechselwirkungen zum neuroendokrinen, gastrointestinalen, respiratorischen, urogenitalen und muskuloskeletalen System. Diese Wechselwirkungen befinden sich in einem empfindlichen Gleichgewicht. Viele immunologische Antworten besitzen nur eine begrenzte Lebensdauer und werden ständig durch regulatorische Mechanismen begrenzt, um eine Überreaktion zu vermeiden.

Eine bemerkenswerte Funktion des Immunsystems ist die selektive Erkennung zwischen „eigen“ und „fremd“. So ist das Immunsystem in der Lage, aggressiv gegen Fremdsubstanzen (Antigene) zu reagieren, während körpereigene Substanzen kaum eine Immunantwort auslösen, selbst wenn die entsprechenden Substanzen in ihrer Struktur der Fremdsubstanz sehr ähnlich sind.

Ein Antigen ist jede mögliche Substanz, die eine spezifische Immunreaktion auslösen kann. Dazu können in erster Linie Proteine und Kohlenhydrate, aber auch schwächer wirkende Lipide, Nukleinsäuren, organische und anorganische Verbindungen, gehören. Mikroorganismen besitzen demzufolge mehrere Antigensubstanzen. Zwei Arten der Immunität bekämpfen infektiöse Krankheitserreger: die angeborene Immunität und die erworbene Immunität. Während Zellen der erworbenen Immunität (B-Lymphozyten und T-Lymphozyten) über mehrere Tage durch spezifische Antigene aktiviert werden müssen, um ihre Funktion ausüben zu können, sind die Komponenten der angeborenen Immunität praktisch sofort einsatzbereit. Die angeborene Immunität hält Infektionserreger in Schach, bis die erworbene Immunität induziert wird.

Die natürliche Resistenz oder angeborene Immunität wird einerseits durch die Haut und die Epithelien des Respirations-, Gastrointestinal- sowie Urogenitaltraktes vermittelt. Verstärkt wird diese Resistenz durch Kommensalen (10^3 - 10^4 Mikroorganismen pro cm^2 Haut), überwiegend grampositive Bakterien (z.B. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Streptococcus*), aber auch gramnegative Bakterien (z.B. *E.coli*) und durch Pilze (z.B. *Candida*), die die Normal- oder Standortflora der Haut sowie der Schleimhäute bilden [Madigan & Martinko, 2005]. Weitere Barrieren gegenüber pathogenen Mikroorganismen stellen der saure Magensaft ($0,9 < \text{pH} < 3,0$) dar, sowie das im Speichelsekret vorhandene Lysozym, welches die bakteriellen Zellwände abbaut. Einige Mikroorganismen und Parasiten haben sich jedoch in ihrer Evolution so angepaßt, daß sie in der Lage sind, diese Barrieren zu überwinden.

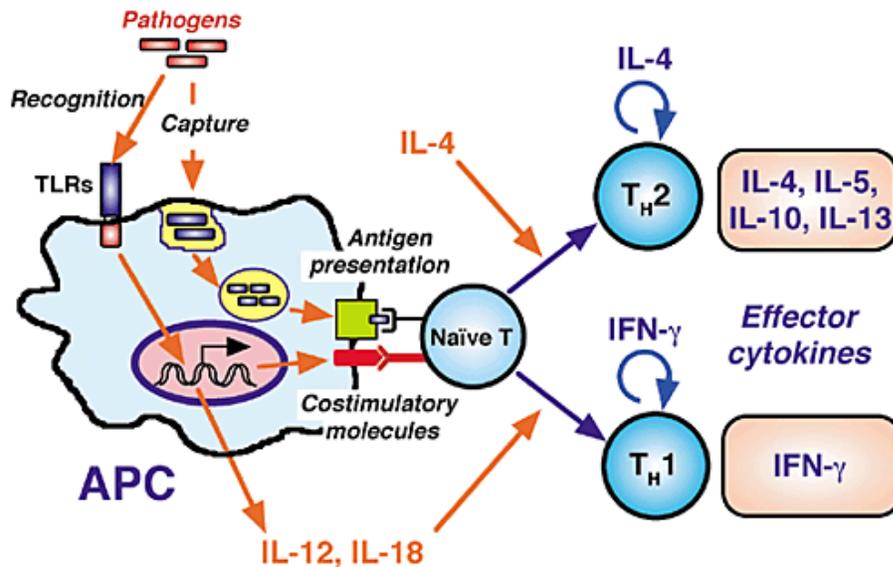


Abb. 1: Aktivierung von Zellen der adaptiven Immunität (T-Lymphozyten) durch Antigen-präsentierende Zellen (APZ, engl. APC). Die Erkennung von pathogenen Organismen oder deren Produkte erfolgt über Toll-like Rezeptoren (TLRs), die zu einer Produktion verschiedener Zytokine führt. Diese Zytokine aktivieren naive T-Zellen, die zu T-Helferzellen differenzieren und weitere Zytokine produzieren (z.B. IFN- γ). Antigene der phagozytierten pathogenen Organismen werden über MHCII-Moleküle auf der Oberfläche der APZs präsentiert und von den T-Lymphozyten erkannt, wodurch die Aktivierung der naiven T-Zellen verstärkt wird; aus: Akira et al., 2001. IFN = Interferon; IL = Interleukin; MHC = *major histocompatibility complex*

Ebenfalls zur natürlichen Immunität gehört das Phagozytensystem, das aus phagozytierenden Zellen wie Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und natürlichen Killerzellen besteht. Diese sind in der Lage, das Fremdmaterial aufzunehmen und zu verdauen (Phagozytose), aber auch Entzündungsreaktionen durch die Produktion von Zytokinen einzuleiten, die u.a. die Blutgefäße erweitern und eine höhere Durchlässigkeit der Kapillarwände bewirken. Die Phagozytose ist für die weiteren Abwehrvorgänge von zentraler Bedeutung. So sind z.B. die Makrophagen in der Lage, zerkleinerte Antigenmoleküle der verdauten Krankheitserreger auf ihrer Oberfläche gegenüber Lymphozyten zu präsentieren, weshalb sie auch der Gruppe der antigen-präsentierenden Zellen (APZ) zugeordnet werden. Durch das Auswandern der APZ in die lymphatischen Organe (Tonsillen, Milz, Lymphknoten und Thymus), werden die Zellen des erworbenen (adaptiven) Immunsystems, die T- und B-Lymphozyten aktiviert (Abbildung 1). Diese können hochspezifisch auf das entsprechende Antigen reagieren und im weiteren Verlauf eine Gedächtnisreaktion vermitteln, wodurch Folgereaktionen gegen das ursprüngliche Antigen verstärkt und schneller ablaufen.

1.2. Das Phagozytensystem

Zu dem System der Phagozyten gehören die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und die mononukleären Monozyten ($\text{\O} 12\text{-}20 \mu\text{m}$), die im Blut zirkulieren. Nach 1-2 Tagen können sie in verschiedene Gewebe, z.B. der Leber (Kupffer-Sternzellen), der Epidermis und Mundschleimhaut (Langerhans-Zellen), der Milz (Ufer-Zellen), der Lunge (Alveolarmakrophagen), des Nervensystems (Mikrogliazellen), der Thorax-Höhle (Pleura-, Peritonealmakrophagen), der Gelenkkapseln (Deckzellen), der Plazenta (Hofbauer-Zellen), der Knochen (Osteoklasten) und in das Bindegewebe (Histiozyten) einwandern und als spezialisierte Phagozyten zu ortsständigen gewebetypischen Makrophagen ($\text{\O} 12\text{-}30 \mu\text{m}$) differenzieren [Roitt, 1997].

Monozyten gehören zu den Leukozyten und entwickeln sich innerhalb des monozytären Phagozytensystems (MPS) unter Einfluß humoraler Faktoren (z.B. koloniestimulierender Faktoren) aus pluripotenten myeloischen Stammzellen (Myeoloblasten) im Knochenmark. Sie zirkulieren mit einer Halbwertszeit von 8 bis zu 70 Stunden im Blutkreislauf und sind größer als Lymphozyten. Ihr Zellkern ist hufeisenförmig oder bizarr geformt und sie besitzen einen relativ breiten Zytoplasmasaum mit zahlreichen lysosomalen Granula. Diese enthalten Peroxidasen und verschiedene Säurehydrolasen für die Bekämpfung von Mikroorganismen.

Monozyten sind zur Phagozytose und Migration befähigt und besitzen auf ihrer Membranoberfläche u.a. Rezeptoren für Komplementproteine (z.B. C3b) und Fc-Rezeptoren für IgG, welche für die Anlagerung und Phagozytose von Mikroorganismen von Bedeutung sind [Burmester & Pezzutto, 1998].

Im Gewebe differenzieren die Monozyten zu Makrophagen aus und entwickeln ausgeprägte Phagozytose-Eigenschaften („Freßzellen“). Makrophagen verbleiben Zeit ihres Lebens im Gewebe (bis zu Jahren). Mit wenigen Ausnahmen (z.B. Kupffer-Zellen), sind sie nicht replikationsfähig. Makrophagen, wie auch Granulozyten, betreiben aktiv Phagozytose, in deren Verlauf partikuläres Material (u.a. Bakterien, Viren sowie weitere Krankheitserreger) aufgenommen und mit Hilfe des oxidativen Metabolismus (reaktive Sauerstoffmetaboliten und Stickoxide) getötet werden und durch lysosomaler Enzyme verdaut wird. Der Vorgang der Phagozytose ist deutlich gesteigert und beschleunigt, wenn die Partikel mit Antikörpern beladen „opsoniert“ vorliegen, und der Opsonierungseffekt wird durch die Beteiligung bestimmter Komponenten des Komplementsystems ein weiteres Mal verstärkt. Nach der Phagozytose oder im aktivierten Zustand sezernieren die Makrophagen eine Vielzahl von Substanzen. Hierzu gehören Enzyme (z.B. Kollagenase, Elastase, Hyaluronidase, lysosomale Proteasen und Lysozym), Proteine, die an Entzündungsreaktionen und unspezifischen Abwehrmechanismen beteiligt sind (z.B. Prostaglandine, die Komplementproteine C1-C5 und das Zytokin Interleukin-1 β , IL-1 β). Ferner werden Faktoren sezerniert, die eine modulierende Wirkung auf andere Zellen und Zellsysteme haben (z.B. mitogenes Protein, koloniestimulierende Faktoren, fibroblastenstimulierender Faktor und das Zytokin Tumornekrosefaktor- α , TNF- α) sowie Blutgerinnungsfaktoren. Daher haben Makrophagen proinflammatorische, chemotaktische und immunmodulierende Eigenschaften und sind im Rahmen der Grundlagenforschung bei der Aufklärung früher Entzündungsprozesse von besonderer Bedeutung [Abbas et al., 2003; Staines et al., 1997].

1.3. Aktivierung der Makrophagen

Die Aktivierung der Makrophagen erfolgt in erster Linie durch die Erkennung mikrobieller Komponenten über die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) der Makrophagen. Eine breite Vielzahl konservierter molekularer Muster auf den bakteriellen, viren- und pilzartigen Krankheitserregern können durch TLRs erkannt werden [Janeway & Medzhitov, 2002; Takeda et al., 2003a; Takeda & Akira, 2003b]. Bakterielle Komponenten, die in der Lage sind,

Makrophagen zu aktivieren, sind z.B. Lipopolysaccharid (Endotoxin, LPS), Peptidoglykan, Lipoteichonsäure, Lipoarabinomannan, Lipopeptide und bakterielle DNA [Nagai et al., 2002]. Das LPS ist jedoch wegen der deutlichen Aktivierung der angeborenen Immunität das am besten untersuchte mikrobielle Produkt [Ulevitch & Tobias, 1995].

Die TLRs sind Typ I-Transmembranproteine und evolutionär innerhalb von *Drosophila*, Reptilien, Vögeln und Säugetieren gut konserviert [Anderson, 2000]. Selbst in Pflanzen konnten bereits mehr als 100 Gene identifiziert werden, die TLR-homologe Domänen aufwiesen [Jebanathirajah et al., 2002]. Der bisher „älteste“ identifizierte TLR, wird in *Caenorhabditis elegans* exponiert [Rich & Trowsdale, 2000]. Bereits 1996 konnte gezeigt werden, daß der *Drosophila* Toll Rezeptor für fungizide Immunität verantwortlich war [Lemaitre et al., 1996]. Diese Studie machte deutlich, daß angeborene Immunität ein geschicktes System ist, das die Invasion von Mikroorganismen erkennen kann. In Säugetieren wurde ein Toll-*like* Rezeptor (TLR) entdeckt, der eine wichtige Rolle bei der Genexpression von proinflammatorischen Proteinen spielte [Medzhitov et al., 1997; Medzhitov & Janeway, 1998; Medzhitov & Janeway, 2000]. Es wurde in Mäusestämmen, die LPS-tolerant waren, eine Mutation im *Tlr4*-Gen entdeckt [Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999]. Dadurch konnte gezeigt werden, daß der TLR4 für die Aktivierung von Makrophagen über LPS essentiell war. Nach und nach wurden weitere Säugetier-homologe TLRs identifiziert. Gegenwärtig besteht die TLR Familie aus mindestens 11 Mitgliedern (TLR1-TLR11). Der zytoplasmatische Teil des TLR weist eine hohe Ähnlichkeit zu der Familie der IL-1-Rezeptoren (IL-1R) auf und ist als die Toll/IL-1-Rezeptor (TIR)-Domäne bekannt. Trotz dieser Ähnlichkeit sind die extrazellulären Bereiche nicht identisch. Während der IL-1R eine Immunglobulin-ähnliche Domäne besitzt, tragen die TLRs Leucin-reiche Wiederholungen (*leucine-rich repeats*, LRRs). Die physiologischen Funktionen von TLRs sind hauptsächlich durch Analysen von *Knockout*-Mäusen aufgedeckt worden [Hoshino et al., 1999; Takeuchi et al., 1999; Takeuchi et al., 2000]. Es liegen gesicherte Erkenntnisse vor, daß jeder TLR bestimmte mikrobielle Komponenten erkennt (Abbildung 2) [Takeda, 2005].

Gegenwärtig richtet sich ein großes Interesse auf die Entschlüsselung und Charakterisierung der komplizierten Signaltransduktionskaskaden, die von TLRs aktiviert werden. Die Transkriptionsfaktoren *nuclear factor κ B* (NF- κ B) und *activator protein 1* (AP-1) sowie *nuclear factor interleukin-6* (NF-IL6), *cyclic-AMP response element binding* (CREB) und *interferon regulatory factor* (IRF) werden aktiviert und sind dabei die Regulatoren der Expression proinflammatorischer Proteine [Janssens & Beyaert, 2003; Takeda et al., 2003a].

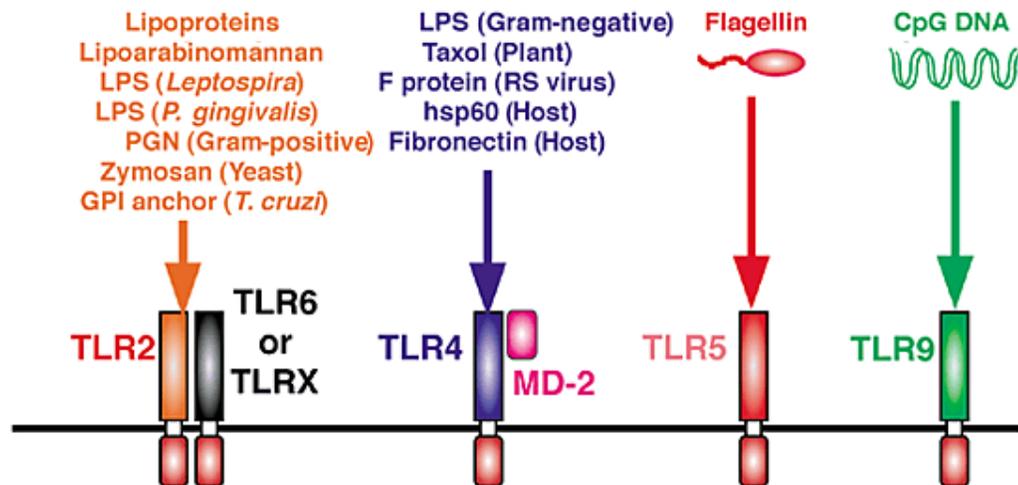


Abb. 2: Einige Toll-like Rezeptoren (TLR) und ihre Liganden. TLR2 erkennt in heterodimerer Form mit anderen TLRs viele verschiedene bakterielle Komponenten (z.B. Peptidoglykan, Lipoproteine, Lipopeptide, etc.). TLR4 und MD-2 erkennen spezifisch LPS gramnegativer Bakterien, phytale und virale Proteine, aber auch Hitzeschockproteine und Fibronectin. Der Ligand für TLR5 ist bakterielles Flagellin. Über TLR9 können nicht-methylierte CpG-DNA-Motive (2'-Didesoxyribo-Cytidin-Phosphat-Guanosin) erkannt werden. Nicht alle TLRs sind auf der Oberfläche vorhanden, sondern können auch bakterielle Komponenten in endozytischen Vesikeln erkennen, wie z.B. TLR9; aus Akira et al., 2001. MD-2 = *myeloid differentiation protein-2*; PGN = Peptidoglykan; GPI = Glycosylphosphatidylinositol; hsp = *heat shock protein*

1.3.1. Extrazelluläre Erkennung von LPS durch TLR4

Für die vorliegende Arbeit ist der TLR4 wegen seiner essentiellen Funktion bei der Aktivierung von Makrophagen durch LPS gramnegativer Bakterien von besonderer Bedeutung. Der genaue Mechanismus ist bis heute noch nicht im Detail entschlüsselt, jedoch konnten in den letzten Jahren große Fortschritte auf diesem Gebiet erzielt werden. Bei der Erkennung von LPS durch den TLR4 sind, anders als bei den meisten anderen TLRs, zusätzliche Moleküle beteiligt. Es konnte bisher keine Dimerisierung von TLR4 entdeckt werden. LPS ist ein komplexes Glykolipid, das aus einem hydrophilen Polysaccharid und einer hydrophoben Domäne, dem Lipid A, besteht, welche verantwortlich für die biologische Aktivität des LPS ist. Nach vorliegenden Erkenntnissen geht man davon aus, daß LPS zunächst an das LPS-bindende Protein (LBP) im Serum bindet. Der LPS-LBP Komplex katalysiert anschließend den Transfer des LPS auf membrangebundenes oder freies CD14 (CD = *cluster of differentiation*) [Ulevitch & Tobias, 1995]. CD14 ist ein glycosylphosphatidylinositol-(GPI)-Molekül, das in der Membran verankert sein kann und nachweislich in

Monozyten/Makrophagen und in Neutrophilen vorkommt. Aufgrund dieser Struktur besitzt es keine Transmembran- oder intrazelluläre Domänen. Es konnte ferner gezeigt werden, daß das Molekül MD-2 mit dem extrazellulären Teil von TLR4 in Wechselwirkung trat, um das Reaktionsvermögen zu LPS zu erhöhen [Shimazu et al., 1999; Akashi et al., 2000]. Daß MD-2 ein essentieller Bestandteil bei der LPS-vermittelten TLR4-Signaltransduktion ist, zeigten Untersuchungen an Mäusen, die kein MD-2 besaßen, wodurch diese in ihrer Reaktion auf LPS stark eingeschränkt waren [Nagai et al., 2002]. Es konnte bis jetzt nicht gezeigt werden, daß LPS direkt mit TLR4 interagiert. Dennoch gibt es Hinweise darauf, daß physikalische Wechselwirkungen zwischen dem LPS-CD14-Komplex bestehen und vermutlich mit TLR4 und noch weitere Moleküle (Hsp70 = *heat-shock protein 70*, Hsp90 = *heat-shock protein 90*, CXCR4 = *chemokine receptor 4* und GDF5 = *growth differentiation factor 5*) bei der LPS-Stimulierung eine Rolle spielen, weshalb bereits ein LPS-*activation cluster* postuliert wurde [Poltorak et al., 2000; Triantafilou & Triantafilou, 2002; Triantafilou & Triantafilou, 2003].

1.3.2. TLR4-Signaltransduktion

Die LPS-induzierte Aktivierung des TLR4 wird durch die TIR-Domäne (*Toll/IL-1R homology domain*) vermittelt, die einen konservierten Signaltransduktionsweg verwendet. An diesem Weg sind die Proteine MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), IRAK (*interleukin-1-receptor-associated kinase*), TRAF6 (*tumor-necrosis-factor receptor-associated factor 6*) sowie weitere Proteine beteiligt (Abbildung 3).

MyD88 ist ein Protein, das mit dem zytoplasmatischen Teil des TLRs über die eigene carboxy-terminale TIR-Domäne in Wechselwirkung tritt. Über eine weitere amino-terminale *death domain* interagiert MyD88 mit der Interleukin-1-Rezeptor-associated kinase, IRAK (Serin/Threoninkinase). IRAK wird aktiviert und leitet das proinflammatorische Signal über den Tumornekrosefaktor-Rezeptor-associated-factor 6 (TRAF6) weiter, was zur Phosphorylierung des I κ B-Komplexes und zur Aktivierung von NF- κ B im Zellkern führt. Das NF- κ B ist, wie auch das AP-1, ein Transkriptionsfaktor. Durch die Bindung an *cis*-Elemente inflammatorischer Gene, induziert NF- κ B die Produktion von IL-1, IL-6, TNF- α , die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und andere.

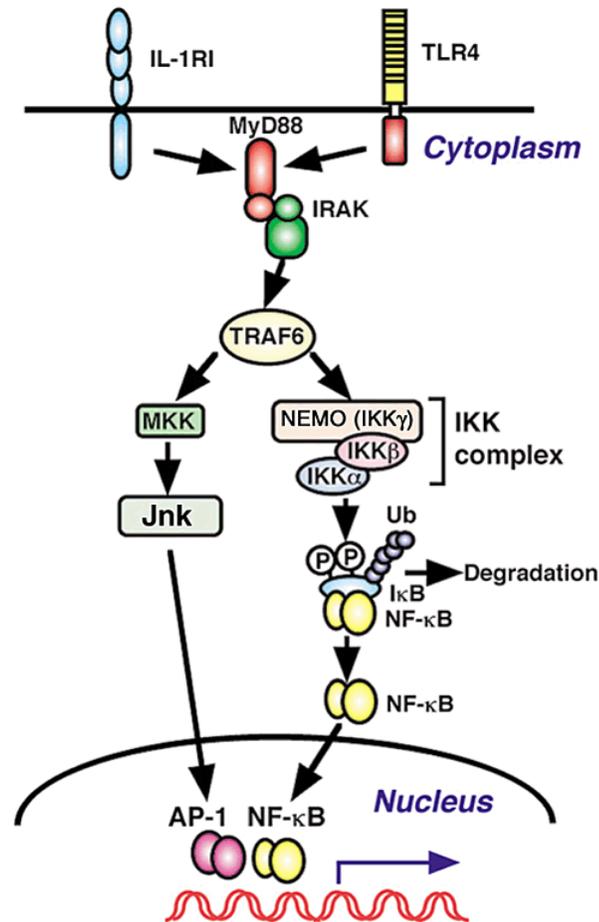


Abb. 3: Der TLR-Signalübertragungsweg. Dargestellt sind die molekularen Komponenten, welche an der Signalübertragung des IL-1R bzw. TLR4 beteiligt sind. Die Signalweiterleitung des aktivierten TLR4 erfolgt über das zyttoplasmatische Adapterprotein MyD88, welches über die TIR-Domäne mit dem TLR in Wechselwirkung tritt. Über die aminoterminalen *death*-Domäne interagiert MyD88 mit IRAK, wodurch ein weiteres Adaptermolekül TRAF6 aktiviert wird. Daraufhin aktiviert TRAF6 gleichzeitig die MAPK-Kinasen (MKKs) und den IKK-Komplex. Über Jnk wird AP-1 aktiviert, während der IKK-Komplex die Phosphorylierung von IκB induziert und nach der anschließenden Degradation von IκB NF-κB aktiviert wird; aus Akira et al., 2001. MyD88 = *myeloid differentiation factor 88*; TIR = Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne; IRAK = *interleukin-1-receptor associated kinase*; TRAF = *tumor-necrosis-factor receptor associated-factor*; MAP = *mitogen-activated protein*; IKK = IκB-Kinase; JNK = *Jun N-terminal kinase*; IκB = Inhibitor von NF-κB

Neben diesem MyD88-abhängigen Signalübertragungsweg konnte zudem ein paralleler MyD88-unabhängiger Weg identifiziert werden [Kawai et al., 2001], welcher über den *interferon regulatory factor 3* (IRF3) die IFN-induzierbaren Gene, z.B. IFN-β, sowie NF-κB zeitlich verzögert aktiviert (Abbildung 4) [Takeda & Akira, 2005].

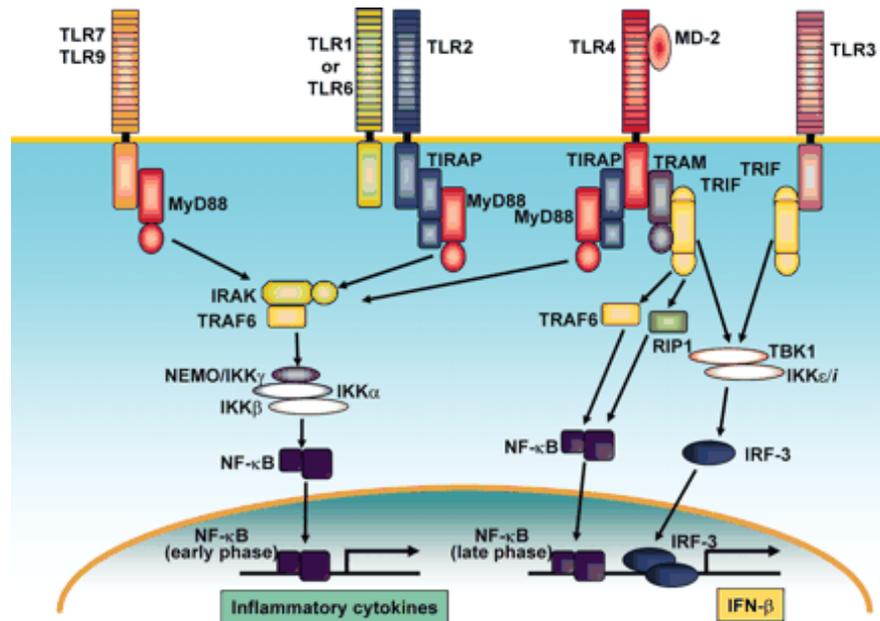


Abb. 4: Übersicht über die MyD88-abhängige/-unabhängige TLR-Signalübertragung. Neben der MyD88-abhängigen Signalübertragung (vgl. Abb. 3) konnte bei der TLR3- und TLR4-vermittelten Signalübertragung die Aktivierung von IRF-3 und IFN- β unabhängig von MyD88 beobachtet werden. Eine essentielle Rolle spielen dabei die Adaptermoleküle TRAM und TRIF, die ebenfalls jeweils eine TIR-Domäne besitzen. Über TRIF und TRAF6 kann ebenfalls NF- κ B aktiviert werden, jedoch zeitlich verzögert im Vergleich mit der Aktivierung über den MyD88-abhängigen Weg; aus Takeda & Akira, 2005. MyD88 = *myeloid differentiation factor 88*; IFN = *interferon*; IRF = *interferon regulatory factor*; TRIF = *TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β* ; TRAM = *TRIF-related adaptor molecule*; TIRAP = *TIR domain-containing adaptor protein*

Bei der TLR-vermittelten Signaltransduktion werden in erster Linie die Transkriptionsaktivatoren NF- κ B und AP-1 aktiviert, die eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen regulieren. Die produzierten Zytokine sind in erster Linie IL-1 β , IL-6, TNF- α sowie IFN- α und IFN- β [Auron & Webb, 1994; May & Ghosh, 1998].

1.4. Proinflammatorische Zytokine

Zytokine sind Protein hormone, die für die Regulation vieler Immunreaktionen sowie für die Stimulation des Wachstums bestimmter Stammzellen verantwortlich. Zytokine werden in vielen verschiedenen Zellen gebildet und wirken als Signalmoleküle, welche die Funktion anderer Zellen (parakrin) oder ihrer Mutterzellen (autokrin) beeinflussen. Jedes einzelne Zytokin verfügt über ein Spektrum von Funktionen, die sich von Zielzelle zu Zielzelle unterscheiden. Die betreffende Zelle muß allerdings den entsprechenden Zytokinrezeptor exprimieren, um überhaupt stimuliert zu werden. Die Zytokinbindung löst in der Zelle ein Signal aus, das bestimmte Gene aktiviert, die ihrerseits eine Aktivitätsänderung der Zelle bewirken. Auf diese Weise können Immunzellen über Zytokin-Rezeptoren sekundär aktiviert werden, was zur Produktion von weiteren Zytokinen, Zytokin-Antagonisten, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen, vasoaktiven Mitteln, Oxydationsmitteln, Proteasen und von diversen Hormonen führen kann.

Die besondere Eigenschaft der proinflammatorischen Zytokine liegt in der schnellen Verfügbarkeit. So werden innerhalb einer Stunde nach Aktivierung der Makrophagen durch mikrobielles Material proinflammatorische Zytokine produziert und sezerniert. Dieser Vorhang ist hauptsächlich auf die proinflammatorischen Zytokingene zurückzuführen, da die Expression dieser Gene ohne die *de novo*-Synthese der notwendigen Proteine abläuft [Auron & Webb, 1994].

Werden Zytokine im Organismus in zu hohen Konzentrationen produziert, kann dies zu Fieber, septischem Schock oder sogar zum Tod führen [Rietschel & Brade, 1993; Dinarello, 1991]. So kann IL-1 β an der Ursache von Fieber und Gewebszerstörungen beteiligt sein. Die febrile Wirkung geht vermutlich auf eine Prostaglandin-E₂-Produktion im Hypothalamus zurück [Estrov & Talpaz, 1996]. Auch TNF- α wirkt nachweislich auf Zellen des Hypothalamus, ist für die Induktion von Fieber mitverantwortlich und wird daher als endogenes Pyrogen bezeichnet. Bei vaskulären Endothelzellen bewirkt TNF- α die Sekretion von weiterem IL-1 β und IL-6. In Hepathozyten verstärkt es, wie auch IL-1 β , die Synthese von verschiedenen Serumproteinen, z.B. Amyloid-A. Dieses Glykoprotein kann sich im Bindegewebe ablagern und zur Störung des Stoffaustauschs an den betroffenen Geweben und Organen führen, was Insuffizienzen und ggf. Funktionsverlust zur Folge haben kann (Amyloidose) [Abbas et al., 2003].

Nimmt die Überproduktion der Zytokine einen chronischen Verlauf, kann dies zu Autoimmunkrankheiten führen. Ein Beispiel hierfür ist die rheumatoide Arthritis (vgl. Kapitel 6). Bei der rheumatoiden Arthritis sezernieren Synovialmakrophagen die Zytokine TNF- α und IL-1 β , die ihrerseits Osteoklasten und Chondrozyten aktivieren, was zur Synovitis mit Pannusbildung und der konsekutiven Knochen- und Gelenkschädigung führt. Chondrozyten produzieren dann große Mengen von Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) und Granulozyten-Makrophagenwachstumsfaktor (GM-CSF), die in einem schädlichen Kreislauf erneut auf Makrophagen wirken können [Burmester & Pezzutto, 1998].

1.5. *Outer membrane protein A (OmpA)*

Gramnegative Bakterien, wie z.B. *Escherichia coli*, besitzen durch die äußere Membrane eine zusätzliche Membranstruktur neben der Zytoplasmamembran und der Peptidoglykanschicht. Der Anteil der Proteine in der äußeren Membran beträgt bei gramnegativen Bakterien 9-12% des gesamten Zellproteins. Im Gegensatz zur Zytoplasmamembran befinden sich in der äußeren Membran nur wenige unterschiedliche Proteine, die aber in hoher Kopienzahl in der Matrix eingelagert sind und daher Hauptproteine genannt werden. Die meisten Hauptproteine verfügen über 3-9 Polypeptidketten und weisen eine molekulare Masse von 7 bis 40 kDa auf. Diese Proteine zeichnen sich durch außergewöhnliche Eigenschaften aus [Karch, 1982]. Im membrangebundenen Zustand sind sie meist resistent gegenüber Proteasen, besitzen in der nativen Konformation einen hohen Gehalt an β -Faltblattstruktur sowie eine starke Aggregationsfähigkeit mit sich selbst, dem Murein und anderen Membranproteinen, wie z.B. dem LPS. Da die äußere Membrane als Permeabilitätsbarriere für das Bakterium dient, d.h. toxische Moleküle am Eintritt hindert bzw. ausschleust, gleichzeitig die Zelle aber mit Nährstoffen versorgt, wird der größte Teil dieser Proteine funktionell zu den Poren-bildenden Proteinen, den Porinen gezählt [Nikaido & Vaara, 1985; Nikaido, 1992; Schulz, 1993]. Die meisten Porine lagern sich zu trimeren Polypeptid-Komplexen zusammen, bilden wassergefüllte Kanäle und ermöglichen so die unspezifische Diffusion hydrophiler Moleküle über die äußere Membran. Auf diese Weise wirkt die äußere Membran als Molekularsieb mit einer Ausschlußgröße von 300-600 Da.

Die in der Membranmatrix der äußeren Membran integrierten Proteine tragen jedoch nicht nur zur selektiven Permeabilität, sondern auch zur Erhaltung der Membranstabilität bei. Neben LPS sind diese Proteine auch für die Resistenz gramnegativer Bakterien gegenüber

Detergenzien verantwortlich [Weber, 1991; Korn, 1992]. Eines dieser Hauptproteine ist das Protein A (OmpA). Es hat die Ausmaße von 26 x 57 Å und kommt bei *Enterobacteriaceae* ca. 10⁵ mal pro Zelle vor. Es besitzt eine β-barrel-Struktur und dient neben der bereits erwähnten Stabilisierung der äußeren Membran auch als Rezeptor für Bakteriophagen, der Vermittlung von Virulenz und Pathogenität und ist an der bakteriellen Konjugation beteiligt [Kim, 2002; Wang & Kim, 2002; Khan et al., 2003]. Darüber hinaus gehört es zur Gruppe der Penicillin-bindenden Proteine und ist an der Septenbildung beteiligt. Ferner ist OmpA mit der Virulenz einiger pathogener Stämme von *E. coli* verbunden [Kim, 2002].

Röntgen-Kristallstruktur-Analysen haben gezeigt, daß zwei Drittel des N-terminalen Moleküls die äußere Membran acht Mal durchspannen und dabei an der Oberfläche der Bakterien vier kurze Peptidschleifen formen (Abbildung 5). Das Interieur des *barrel*s ist zwar polar und besitzt mehrere Salzbrücken und viele wassergefüllte Kavitäten, ist jedoch wegen einer Salzbrücke zwischen Glu52 und Arg138 nicht für die Passage von Wasser oder Ionen geeignet [Pautsch & Schulz, 1998; Koebnik, 1999; Puohiniemi et al., 1990; Nikaïdo, 2003].

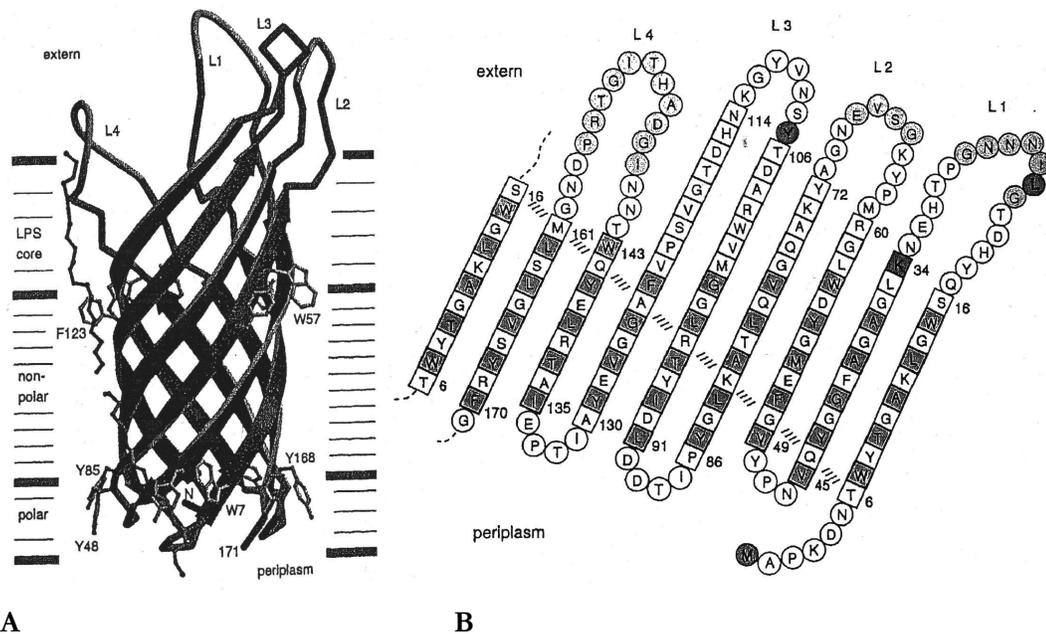


Abb. 5: Struktur der Transmembran-Domäne von OmpA. In der *Ribbon*-Darstellung ist die *barrel*-Struktur des OmpA zu erkennen; das umgebende LPS ist angedeutet (A). In der topologischen Darstellung sind die acht parallelen Stränge des β-Faltblatts zu erkennen, die durch Wasserstoffbrücken stabilisiert werden (angedeutet). Die vier extrazellulären Schleifen (L1-4), die aus 7 bis 17 Aminosäuren bestehen, können der Abbildung ebenfalls entnommen werden (B); aus: Pautsch & Schulz, 1998.

OmpA besitzt zudem immunmodulatorische Eigenschaften. Es ist in erster Linie ein starkes immunogenes Protein [Karch et al., 1983; Nixdorff et al., 1992; Nixdorff et al., 1999], wogegen hoch reaktive monoklonale Antikörper gewonnen werden konnten [Korn et al., 1995].

Obwohl OmpA stark immunogen ist, ist die Fähigkeit des Proteins, Makrophagen zu aktivieren, umstritten. Auf der einen Seite haben Untersuchungen gezeigt, daß OmpA aus *Proteus mirabilis* allein murine Knochenmarksmakrophagen nicht zur Zytokinproduktion anregen konnte. Das Protein konnte jedoch die LPS-induzierte Zytotoxizität (TNF- α -Produktion) von Makrophagen erheblich verstärken [Weber et al., 1993]. Ferner konnte OmpA die Aufnahme von LPS durch Makrophagen enorm erhöhen [Korn et al., 1995].

Dagegen führte rekombinantes OmpA aus *Klebsiella pneumoniae* zu einer deutlichen Zunahme der Produktion von IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12 und TNF- α durch murine Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7 [Soulas et al., 2000].

Zudem konnte gezeigt werden, daß neben Makrophagen auch dendritische Zellen von OmpA (*Klebsiella pneumoniae*) aktiviert werden können [Jeannin et al., 2002; Jeannin et al., 2003].

Ein Problem bei der Stimulierung von Makrophagen mit nativem OmpA ist die Möglichkeit einer Kontaminierung mit LPS. Nur eine kleine Verunreinigung des Proteins mit LPS könnte zu falsch positiven Ergebnissen führen [Nixdorff et al., 1999].

In der vorliegenden Arbeit soll am Beispiel von *Proteus mirabilis* das OmpA näher untersucht werden. *Proteus mirabilis* ist ein gramnegatives, peritrich begeißeltes Stäbchenbakterium und gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Nach 16S rRNA-Analysen steht es in enger Verwandtschaft mit Bakterien der Gattung *Morganella* bzw. *Providencia*. Biochemisch charakteristisch ist die Produktion von Urease. Obwohl *Proteus* in der Natur ubiquitär vorkommt, ist sein primärer Standort der Darmtrakt von Mensch und Tier. *Proteus* ist einer der wichtigsten aeroben Proteinzerersetzer und an den meisten Fäulnisprozessen beteiligt [Hauser, 1885]. *Proteus mirabilis* ist ein opportunistischer Erreger für Harnwegsinfekte, seltener Sepsis (Urosepsis) oder Infektionen anderer Organe (Emphyem, Gallenwegsinfekte, Peritonitis und Gastroenteritis) und daher in die Risikogruppe 2 (BSL2) eingestuft.

Das OmpA von gramnegativen Bakterien ist hoch konserviert (Abbildung 6) [Movva et al., 1980]. Die Sequenz des OmpA von *P. mirabilis* war zum Anfang dieser Arbeit unbekannt. In früheren Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. K. Nixdorff wurden einige monoklonale Antikörper (mAk) gegen das OmpA aus *P. mirabilis* gewonnen. Einer dieser mAk reagierte mit OmpA aus *E. coli*, während ein zweiter mAk nur gegen OmpA aus *P. mirabilis* reagierte [Nixdorff et al., 1999]. Es bestand die Frage, inwieweit die Aminosäuresequenz des OmpA aus *P. mirabilis* mit der von OmpA aus *E. coli* übereinstimmte.

A

```

E.coli      : MKKTAIAIAVALAGFATVAQAAPKDNWTGAKLGWSQYHDTGFINNNGPTHENQLGAGAFGGYQVNPYVGFEMG : 75
S.typhim.  : MKKTAIAIAVALAGFATVAQAAPKDNWTYAGAKLGWSQYHDTGFIHNDGPTHENQLGAGAFGGYQVNPYVGFEMG : 75
S.dysent.  : MKKTAIAITVALAGFATVAQAAPKDNWTGAKLGWSQYHDTGFIIDNNGPTHENQLGAGAFGGYQVNPYVGFEMG : 75
Consensus  : MKKTAIAIAVALAGFATVAQAAPKDNWTGAKLGWSQYHDTGFIINIGPTHENQLGAGAFGGYQVNPYVGFEMG

E.coli      : YDWLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQLTAKLGYPITDDLDIYTRLGGMVWRADTKSNVYG----KNHDTGVSPVFA : 145
S.typhim.  : YDWLGRMPYKGDNINGAYKAQGVQLTAKLGYPITDDLDIFYTRLGGMVWRADTKSNVPGGPST-KDHDITGVSPVFA : 149
S.dysent.  : YDWLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQLTAKLGYPITDDLDVYTRLGGMVWRADTKAHNNVTGESEKNHDTGVSPVFA : 150
Consensus  : YDWLGRMPYKGSVENGAYKAQGVQLTAKLGYPITDDLD6YTRLGGMVWRADTKSNVNGGGE3EK1HDTGVSPVFA

E.coli      : GGVEYAITPEIATRLEYQWTNNIGDAHTIGTRPDNGMLSLGVSYRFGQGEAAPVVAPAPAPAPEVQTKHF TLKSD : 220
S.typhim.  : GGIEYAITPEIATRLEYQWTNNIGDANTIIGTRPDNGLLSVGSYRFGQGEAAPVVAPAPAPAPEVQTKHF TLKSD : 224
S.dysent.  : GGVEWAITPEIATRLEYQWTNNIGDAHTIGTRPDNGLLSVGSYRFGQGEAAPVVAPAPAPAPEVQTKHF TLKSD : 225
Consensus  : GG6E5AITPEIATRLEYQWTNNIGDAHTIGTRPDNG6LS6VGSYRFGQGEAAPVVAPAPAPAPEVQTKHF TLKSD

E.coli      : VLFNFKATLKPEGQAALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIGSDAYNOGLSERRAQSVVDYLIISKGIPADKI : 295
S.typhim.  : VLFNFKATLKPEGQAALDQLYIQLSNLDPKDGSVVVLGFTDRIGSDAYNOGLSEKRAQSVVDYLIISKGIPADKI : 299
S.dysent.  : VLFNFKATLKPEGQAALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLGYTDRIGSDAYNOGLSERRAQSVVDYLIISKGIPADKI : 300
Consensus  : VLFNFKATLKPEGQAALDQLYSQLSNLDPKDGSVVVLG5TDRIGSDAYNOGLSE4RAQSVVDYLIISKGIPADKI

E.coli      : SARGMGESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLAPDRRVEIEVKGIKDVTQPQA : 346
S.typhim.  : SARGMGESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLAPDRRVEIEVKGKVDVTQPQA : 350
S.dysent.  : SARGMGESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLAPDRRVEIEVKGIKDVTQPQA : 351
Consensus  : SARGMGESNPVTGNTCDNVKQRAALIDCLAPDRRVEIEVKG6KDVVTQPQA
    
```

B

	E. coli	S. typhim.	S. dysent.
E. coli	-	92 % 96 %	95 % 97 %
S. typhim.		-	90 % 94%

Abb. 6: Konservierte Bereiche der Aminosäuresequenz von OmpA verwandter *Enterobacteriaceae*. Für die Erstellung wurden die OmpA-Sequenz folgender Organismen verwendet: E.coli = *Escherichia coli*; S.typhim. = *Salmonella typhimurim*; S.dysent. = *Shigella dysenteriae*; Konservierte Bereiche in grau (A). Übersicht der Identität und Ähnlichkeit einiger *Enterobacteriaceae*. Für die Berechnung wurde die Software GenDoc verwendet. Jeweils der obere prozentuale Wert gibt die Identität und der untere Wert die Ähnlichkeit an (B).

PROBLEMSTELLUNG

Das Hauptziel des Vorhabens war es, eine nähere Charakterisierung des OmpA gramnegativer Bakterien vorzunehmen. Insbesondere sollten die intrazellulären Prozesse der Wechselwirkung zwischen OmpA und Makrophagen auf der Ebene der Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , TNF- α , IL-6), der Transkription der Gene (mRNA-Akkumulation) sowie der Promotoraktivität der Gene untersucht werden. In diesem Zusammenhang war es von besonderem Interesse, die Wirkung des OmpA auf Makrophagen mit der des LPS zu vergleichen. In diesen Versuchen wurden zunächst murine RAW 264.7-Makrophagen verwendet. Um Rückschlüsse auf potentielle Signalweiterleitungswege nach Induktion mit OmpA ziehen zu können, wurden auch primäre Knochenmarksmakrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen verwendet, die einen, durch eine Punktmutation induzierten, defekten TLR4-Rezeptor besitzen, wodurch keine intrazelluläre Signalkaskade durch LPS ausgelöst werden sollte. Bei der Verwendung von C3H/HeJ-Mäusen konnte nämlich eine Stimulierung der Makrophagen durch LPS über TLR4 ausgeschlossen werden.

Untersuchungen, die bereits in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Kathryn Nixdorff am Institut für Mikrobiologie und Genetik der TU Darmstadt durchgeführt wurden, haben sich u.a. mit der differenzierten Regulation der Produktion proinflammatorischer Zytokine in LPS-stimulierten Makrophagen befaßt. Dabei wurde die unterschiedliche Regulation der Zytokinproduktion durch den Einsatz von Modulatoren deutlich zu differenzieren versucht. Bisherige Ergebnisse der Arbeitsgruppe [Schilling et al., 1997; Nixdorff et al., 1999; Schilling et al., 2001] haben gezeigt, daß bei der negativen Regulation der IL-1 β -Produktion in LPS-stimulierten Makrophagen offensichtlich eine Staurosporin-empfindliche Proteinkinase beteiligt sein muß. Denn bei gleichzeitiger Behandlung der LPS-stimulierten Makrohagen mit Staurosporin wurde die negative Regulation des Zytokins aufgehoben. Ebenso konnte gezeigt werden, daß die negative Regulation auf der Ebene der Transkription nachweisbar war und auf einer Verminderung der Aktivität des Promoters in der IL-1 β -Genregion beruht. Bis heute ist nur wenig über die negativ wirkenden Mechanismen, die zur anschließenden Abnahme der IL-1 β -Produktion führen, bekannt. Gerade dies könnte ein Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer, anti-inflammatorischer Medikamente sein. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, daß eine derartige negative Kontrolle bei der Produktion des proinflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor nicht festgestellt werden konnte. Im Rahmen meiner Diplomarbeit war ich an diesen Untersuchungen beteiligt [Hotz, 1999].

Des Weiteren sollte eine serologische Charakterisierung der Reaktionen von OmpA mit zwei monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen OmpA aus *Proteus mirabilis* durchgeführt werden. Unter Verwendung dieser mAk sollten die Reaktionen von OmpA verschiedener Bakterien im ELISA verglichen und in Western-Analyse-Verfahren untersucht werden.

Gleichzeitig wurde die bisher unveröffentlichte Nukleotidsequenz des *ompA*-Gens von *Proteus mirabilis* ermittelt und mit verwandten *Enterobacteriaceae* verglichen. Dabei waren phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse von besonderem Interesse.

Ferner sollten die mAk gegen verschiedene Bereiche des OmpA aus *P. mirabilis* getestet werden, um Epitop-Bereiche näher zu charakterisieren. Hierzu sollten *ompA*-DNA-Fragmente in *E. coli* kloniert und das rekombinante Protein produziert werden. Anschließend sollten die Reaktionen der rekombinanten Protein-Fragmente gegen die mAk in Western-Analyse-Verfahren geprüft werden. Diese Versuche sollten den endgültigen Beweis für die Spezifität der OmpA-mAk liefern.

Da die Arbeiten den Umgang mit Methoden der Biotechnologie bzw. Gentechnik beinhalten und auch mit der Problematik der möglichen Anwendung von Forschungsergebnissen für therapeutische Zwecke verbunden sind, wurde begleitend zu den naturwissenschaftlichen Arbeiten eine Technikfolgenabschätzung nach dem Modell der ethischen Urteilsbildung [Bender, 1988; Bender et al., 1995] durchgeführt, um positive und negative gesellschaftliche Folgen solcher Ansätze, sowie ethische Zusammenhänge sichtbar zu machen. Dabei wurde zunächst die Problematik der therapeutischen Ansätze im Zusammenhang mit Zytokinen analysiert und erläutert. Anschließend wurde an konkreten Beispielen (z.B. der rheumatoiden Arthritis) solcher Forschungsaktivitäten bzw. Ansätzen mit IL-1 β und TNF- α in der Therapie, die verschiedene Richtungen beschreiben, das Modell einer konstruktiven und prospektiven Forschungsbewertung verwendet. Ziel dabei war es, aufzuzeigen und zu prüfen, inwieweit diese Ansätze gerechtfertigt sind. Das Modell der ethischen Urteilsbildung hat sich im Zusammenhang mit der Analyse der *dual-use*-Problematik biotechnologischer Forschungen sehr bewährt [Nixdorff & Bender, 2002]. Dabei wurden Regeln für die Güterabwägung formuliert, sowie Regeln für eine Urteils- und Entscheidungsfindung, auch wenn Konsequenzen aus der getroffenen Entscheidung ungewiß sind.

Das vorrangige Ziel dieser vorliegenden Technikfolgenabschätzung war es, den Fokus der Aufmerksamkeit von Naturwissenschaftlern auf die *dual-use*-Problematik zu richten und auf die Bedeutung der Reflexion molekularbiologischer Forschungen einzugehen.

MATERIAL UND METHODEN

3.1. Chemikalien

Aceton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Agarose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin (Amp)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Avidinperoxidase (A-POD)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bacto Agar	Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Bromphenolblau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Casein, Pepton	Merck KGaA, Darmstadt
Chloramphenicol (CAM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloronaphтол	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
CSPD-Substrat	Tropix Inc., Bedford, MA, USA
Dextransulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
DMEM-Trockenmedium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ethylenglycoltetraacetat (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Eisessig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol (EtOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Merck KGaA, Darmstadt
Fötale Kälberserum (FCS)	Vitromex GmbH, Selters
Formaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Glucose	Merck KGaA, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glycylglycin (Gly-Gly)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Griess-Ilosvays-Reagenz	Merck KGaA, Darmstadt
Guanidiniumthiocyanat (GSCN)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
HPLC-Wasser (<i>high pressure liquid chromatography</i>)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kanamycin (Kan)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kodak-Film-Entwickler	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kodak-Film-Fixierer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Loading Dye 6-fach	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Luziferin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	Merck KGaA, Darmstadt
Maleinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magermilchpulver	Töpfer GmbH, Dietmannsried
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Naphtylendiamindihydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumacetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumazid (NaN_3)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	Merck KGaA, Darmstadt
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumnitrit ($NaNO_2$)	Merck KGaA, Darmstadt
Nichtessentielle Aminosäuren	Biochrom KG, Berlin
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck KGaA, Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natrium-Lauroyl-Sarcosinat	Fluka Biochemika, Buchs, CH
Natriumpyruvat	Biochrom KG, Berlin
o-Nitrophenyl-Galactopyranosid (ONPG)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom KG, Berlin
Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pferdeserum (HS)	Gibco GmbH, Karlsruhe
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Phosphorsäure (H_3PO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
Polyethylenglykol 8000 (PEG)	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Polymyxin B Sulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ponceaurot S	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
RBS 35	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RNase-Inhibitor	Promega GmbH, Mannheim
Rotisol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RPMI1640-Trockenmedium	Biochrom KG, Berlin
Saccharose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Schwefelsäure (H_2SO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
Staurosporin (Stau)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tris <i>Ultra Pure</i>	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Triton-X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trimethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Trypanblau	Biochrom KG, Berlin
Tween-20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Xylencyanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

3.2. Biologisches Material / Substanzen

3.2.1. Mäuse

C3H/HeJ-Mäuse

Charles River, Sulzfeld

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente erfolgten ausschließlich an weiblichen Mäusen, die im Alter von 6-7 Wochen angeliefert und nach einer Quarantänezeit von mindestens 7 Tagen in den jeweiligen Versuchen verbraucht wurden. Mäuse des Stamms C3H/HeJ tragen einen mutierten, nicht funktionsfähigen TLR-4 Rezeptor, der als LPS bindender Rezeptor charakterisiert ist, was sie resistent gegen die Wirkung von LPS macht.

3.2.2. Zelllinien

RAW 264.7-Zellen

ATCC, Rockville, Maryland, USA

Bei der Zelllinie RAW 264.7 handelt es sich um eine permanente murine Monozyten/Makrophagen-Tumorzelllinie mit adhärentem Wachstum, die durch einen Abelsonmausleukämievirus-infizierten Tumor in Mäusen entstanden ist.

L929

ATCC, Rockville, Maryland, USA

Die Zelllinie L929 ist eine permanente murine Fibroblasten-Zelllinie aus C3H Mäusen. In den durchgeführten Versuchen dienen die L929 Fibroblasten zur Produktion von M-CSF-haltigen Überständen. Die Zellen wurden in RPMI / 5% FCS kultiviert und zweimal pro Woche passagiert.

3.2.3. Bakterien

Proteus mirabilis 19

Prof. Dr. H. H. Martin, TH Darmstadt

E. coli TOP10

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

E. coli DH5 α

Stratagene GmbH, Heidelberg

E. coli BL21 (DE3) pLysS

Novagen, Merck Biosciences, Darmstadt

Die chemisch kompetenten *E. coli* Stämme (PEG-Methode) wurden zur Transformation und Amplifizierung verschiedener Plasmide sowie zur Proteinexpression verwendet. Die Kultivierung erfolgte in Reinigungsausstrichen auf LB-Agarplatten bei 37°C.

3.2.4. Oligonukleotide

P2	<i>sense</i>	5'-GCT CCA GTA GTT GCT CCG GCT CCA-3'
P4	<i>antisense</i>	5'-ACG ATC CGG AGC CAG GCA GTC GAT CAG TGC AGC-3'
P10	<i>sense</i>	5'-CAA AAA ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT-3'
P22	<i>antisense</i>	5'-ACG ATC TGG TGC CAG GCA GTC GAT CAG TGC AGC-3'
P26	<i>sense</i>	5'-CAT <u>GCG AGC TCA</u> AAT GAA AAA GAC AGC TAT-3'
P27	<i>antisense</i>	5'-TAA <u>TTA AGC TTC</u> AGG CAG TCG ATC AGT GCA-3'
P42	<i>sense</i>	5'-ATT TAA CCA AGG GCA AAT AAT AAG G-3'
P43	<i>antisense</i>	5'-TTA AAG TCA TCA TCA AAA GAA AAA CC-3'
P44	<i>sense</i>	5'-ATA <u>TAC CAT GGA</u> AAA GAC AGC TAT CGC ATT-3'
P45	<i>antisense</i>	5'-GCC <u>GCA AGC TTG</u> ACC AGG TTG AAC AA-3'
P46	<i>sense</i>	5'-ATA <u>TAC CAT GGA</u> CAA TAC TTG GTA TAC CGG-3'
P47	<i>antisense</i>	5'-GCC <u>GCA AGC TTG</u> ACG AGC GTT CAG AG-3'
P48	<i>sense</i>	5'-ATA <u>TAC CAT GGA</u> CAA TGG TAT GCT GAG TGT-3'
P50	<i>antisense</i>	5'-GCC <u>GCA AGC TTG</u> ACC AGG TTG AAC AA-3'
P51	<i>sense</i>	5'-ATA <u>TAC CAT GGC</u> TCA AGG TAT CCA ATT AAC-3'
P52	<i>antisense</i>	5'-GCC <u>GCA AGC TTG</u> AGT TGG GTC GAT GT-3'
M13	<i>sense</i>	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
M13	<i>antisense</i>	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
T7	<i>sense</i>	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
T7	<i>antisense</i>	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3'

3.2.5. Vektoren, Konstrukte

pGL-3/XT-luc, ca. 8555 bp, M. J. Fenton, *Boston University School of Medicine*, USA

Das Reportergenkonstrukt pXT-luc wurde in der vorliegenden Arbeit in den Transfektionsexperimenten verwendet. Da für eine hohe Transfektionseffizienz die Reinheit des rekombinanten Plasmids von besonderer Bedeutung ist, wurde es über Anionenaustauschersäulen (Nucleobond PC 100 Kit, Machery-Nagel GmbH, Düren) aufgereinigt. Zur Vermehrung des Vektors in *E.coli*, besitzt er einen Replikationsstartpunkt, sowie eine Selektionsmarker (Ampicillin-Resistenzgen). Das Reportergen (Leuchtkäfer-Luziferase-Gen aus *Photinus pyralis*) unterliegt der Kontrolle der vollständigen Enhancer- und Promotorregion des humanen IL-1 β -Gens (XT-Region im Vektor). Untersuchungen [Shirakawa et al., 1993; Buras et al., 1994] haben gezeigt, daß die transkriptionelle Regulation im murinen System vergleichbar mit dem humanen System ist. Die Sequenz der XT-Region wurde aus dem Vektor pXT-CAT [Buras et al., 1994; Hatzigeorgiou et al., 1996] in den Luziferase-Expressionsvektor pGL3-*basic* (Promega, Madison, USA) subkloniert, wobei die Sequenz der genomischen Sequenz des humanen IL-1 β -Gens (GenBank *accession number* U265440 und X04500) von Position -3757 stromaufwärts bis +11 stromabwärts vom Transkriptionsstart entspricht.

pCR[®]-Blunt II-TOPO[®], 3519 bp

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Der Klonierungs- und Sequenzierungsvektor pCR[®]-Blunt II-TOPO[®] (Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit, Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurde in der vorliegenden Arbeit zur Sequenzierung amplifizierter *ompA*-Fragmente verwendet. Die Aufreinigung des rekombinanten Plasmids erfolgte über Anionenaustauscher-Säulen (Nucleobond PC 100 Kit, Machery-Nagel GmbH, Düren). Zur Vermehrung des Vektors besitzt er einen Replikationsstartpunkt, sowie drei Selektionsmarker (Kanamycin- und Zeocin-Resistenzgen, *lacZ*-Gen). Zusätzlich enthält der Vektor ein Letalitätsgen (*ccdB*) im Bereich der *multiple cloning site*, um das Wachstum von Negativ-Mutanten zu unterdrücken. Vor der Ligation liegt der Vektor linearisiert vor und ist von zwei Topoisomerase-Molekülen flankiert, die die *blunt-end*-Ligation katalysieren. Nach erfolgter Ligation des Vektors mit einem *blunt-end*-PCR-Produkt wird die Funktion des Letalitätsgens unterdrückt. Für die anschließende Sequenzierung wurden M13-Primer verwendet, da der Vektor eine M13-*forward*- und eine M13-*reverse-priming-site* besitzt.

pQE-32, 3462 bp

Qiagen AG, Hilden

Der Expressions- und Sequenzierungsvektor pQE-32 wurde in der vorliegenden Arbeit zur Sequenzierung amplifizierter *ompA*-Fragmente verwendet. Da für eine Sequenzierung die Reinheit des rekombinanten Plasmids von besonderer Bedeutung ist, wurde es über Anionenaustauscher-Säulen (Nucleobond PC 100 Kit, Machery-Nagel GmbH, Düren) aufgereinigt. Zur Vermehrung des Vektors in *E.coli* besitzt er einen Replikationsstartpunkt, sowie eine Selektionsmarker (Ampicillin-Resistenzgen).

pET-28, 5369 bp

Novagen, Merck Biosciences, Darmstadt

Der Expressions- und Sequenzierungsvektor pET-28 wurde in der vorliegenden Arbeit zur Expression und Sequenzierung amplifizierter *ompA*-Fragmente verwendet (vgl. 3.7.11.). Die Aufreinigung des rekombinanten Plasmids erfolgte über Anionenaustauscher-Säulen (Nucleobond PC 100 Kit, Machery-Nagel GmbH, Düren). Zur Vermehrung des Vektors in *E.coli* besitzt er einen Replikationsstartpunkt, sowie eine Selektionsmarker (Ampicillin-Resistenzgen). Das über die *multiple cloning site* in den Vektor klonierte Gen unterliegt der Kontrolle des *lac*-Operons, das wiederum unter der negativen Kontrolle des *lac*-Repressors steht. Da der Promotor erst induziert wird, wenn IPTG an den *lac*-Repressor bindet und sich

dieser vom Promotor ablöst, wurde der Expressionsvektor nach erfolgter Klonierung des *ompA*-Fragmentes in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen transformiert. Diese Zellen besitzen das Gen der T7 RNA Polymerase, welches bereits durch DE3-Bakteriophagen in das chromosomale Genom integriert wurde [Studier & Moffatt, 1986; Novy & Morris, 2001]. Dieses Gen steht unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors, welcher durch IPTG induzierbar ist. So veranlaßte die Zugabe von IPTG die Produktion der T7 RNA Polymerase, die wiederum das in den Expressionsvektor (pET-28) inserierte *ompA*-Genfragment transkribierte, welches selbst unter der Kontrolle eines T7 Promotors steht. Zusätzlich trugen die verwendeten *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen das pLysS-Plasmid, welches einen weiteren Selektionsmarker (Chloramphenicol-Resistenzgen) vermittelt und zusätzlich eine basale Expression über den T7-Promotor in den DE3-lysogenen Zellen unterdrückt; dabei wird T7-Lysozym produziert, welches der natürliche Inhibitor der T7 RNA Polymerase ist. Für die anschließende Sequenzierung wurden T7-Primer verwendet, da der Vektor eine T7-*promotor*- und eine T7-*terminator-priming-site* besitzt.

3.2.6. Molekularbiologische Reagenzien

GeneRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
MassRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
peqGOLD dNTP-Set	Peqlab GmbH, Erlangen
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Thermo-Fast 96 PCR Plates	Peqlab GmbH, Erlangen

3.2.7. Stimulatoren

LPS, Probe 7, <i>Proteus mirabilis</i> 19	C. Eckrich, TH Darmstadt
---	--------------------------

Das in den Experimenten zur Stimulierung der Makrophagen verwendete LPS stammt aus *Proteus mirabilis* 19 (Probe 11) und wurde von C. Eckrich (am 05.10.93) mittels der Phenol-Wasser-Methode [Westphal et al., 1952] isoliert. Eine Aufreinigung erfolgte durch Ultrazentrifugation [Gmeiner, 1975], wobei die Trennung zweier LPS-Typen, die sich in der Länge ihrer O-Polysaccharidkette unterschieden, erreicht wurde. Zur weiteren Reinigung wurde das LPS nochmals mit Phenol-Wasser extrahiert, gewaschen und lyophilisiert. Für die Experimente wurde das kurzkettige LPS eingewogen, in ¼ des Endvolumens in 0,05 N NaOH aufgenommen und 10 min in einem Ultraschallbad homogenisiert. Nach Zugabe von

$\frac{3}{4}$ des Endvolumens an Gebrauchsmedium wurde die LPS-Lösung 10 min unter UV-Licht (254 nm) sterilisiert.

OmpA, Probe 13, 14, *E. coli* B
OmpA, Probe 25, *Proteus mirabilis* 19
OmpA, Probe 32, *Proteus mirabilis* 19

R. Schubert, TH Darmstadt
W. Ruiner, TH Darmstadt
H.-P. Berger, TH Darmstadt

Für die Experimente zur Stimulierung von Makrophagen wurden verschiedene Proben von OmpA eingesetzt, die bereits unter Verwendung von 1 % Natriumdesoxycholat aus der äußeren Membran von *E. coli* bzw. *P. mirabilis* 19 isoliert und durch zweimalige Säulenchromatographie über Sephadex S-300 (Pharmacia, Freiburg i. B.) aufgereinigt waren. Um LPS-Kontaminationen zu entfernen, wurde das Protein mit Phenol-Wasser und 1 % Natriumdodecylsulfat behandelt und anschließend aus der Phenolphase mit gleichen Volumina Diethylether und Aceton im Eisbad präzipitiert. Danach erfolgte erneut eine Gelfiltration, anschließend wurde das Protein lyophilisiert [Westphal et al., 1952; Nixdorff et al., 1977; Weber, 1991]. Für die Experimente wurde das OmpA alleine oder in einigen Ansätzen in Kombination mit LPS in $\frac{1}{4}$ des Endvolumens in 0,05 N NaOH aufgenommen, mit einem Glasstab zerrieben und 10 min in einem Ultraschallbad homogenisiert. Nach Zugabe von $\frac{3}{4}$ des Endvolumens an Gebrauchsmedium wurde die OmpA-Lösung 10 min unter UV-Licht sterilisiert.

Staurosporin

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Der in einigen Experimenten eingesetzte Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin ist ein Alkaloid aus *Streptomyces staurosporeus*. Es konnte 1977 aus *Streptomyces* isoliert [Omura et al., 1977] und erstmals 1996 synthetisiert werden. Staurosporin ist ein potenter Inhibitor für verschiedene Proteinkinasen (cAMP-abhängige Proteinkinase, Proteinkinase C, cGMP-abhängige Proteinkinase und Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen). Aufgrund der chemischen Struktur interagiert Staurosporin mit der ATP-Bindungsstelle von Proteinkinasen und verhindert dort durch seine höhere Affinität zu dieser Stelle die Bindung von ATP kompetitiv. Wegen seiner hohen Toxizität wurde Staurosporin nie therapeutisch eingesetzt. Für die Verwendung in Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde Staurosporin in Konzentrationen eingesetzt, die keine zytotoxischen Effekte gezeigt haben [Schilling, 2000]. Zur Aufbewahrung (4°C, lichtgeschützt) wurde es in einer Stammlösung von 100 μ M in DMSO angesetzt.

3.2.8. Enzyme, Proteine, Antikörper

<i>calf intestine</i> Alkaline Phosphatase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>EcoRI</i>	Promega GmbH, Mannheim
<i>HindIII</i>	Promega GmbH, Mannheim
<i>NcoI</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T4 DNA-Ligase	Promega GmbH, Mannheim
T4 Polynukleotidkinase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T7 Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
<i>Taq</i> DNA-Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
<i>PstI</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>SacI</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Prestained Protein Ladder</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
α -Maus IgG, Kaninchen, Peroxidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
α -OmpA 2.14.1, Maus IgG2a	A. Korn, TH Darmstadt
α -OmpA (<i>P. mirabilis</i>) 2.18.1, Maus IgG2b	A. Korn, TH Darmstadt
α -Penta-His, Maus IgG1	Qiagen AG, Hilden

3.3. Geräte und Kits

Alle verwendeten Glasgeräte wie Pipetten, Flaschen, Meßzylinder usw. wurden in bidestilliertem (Millipore) Wasser 15 Minuten ausgekocht und bei 160°C trockener Hitze zwei Stunden hitzesterilisiert. Glaspipetten wurden zuvor 1-2 Stunden in heißer Waschlösung (RBS 35) eingeweicht, 1 Stunde mit Leitungswasser und über Nacht mit entionisiertes Wasser gespült. Die verwendeten Plastikmaterialien wie Pipettenspitzen (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) und Reaktionsgefäße (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurden durch 15 min Autoklavieren bei 121°C und 2 bar sterilisiert. Getrocknet wurden diese Materialien in einem Trockenschrank bei 100°C.

API 20E	BioMerieux GmbH, Nürtingen
DIG Luminescent Detection Kit	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
<i>Gen Elute Minus EtBr</i> Spin Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
IL-1 β Maus OptEIA Set	BD Pharmingen GmbH, Heidelberg
IL-6 Maus ELISA Kit (Biotrak)	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
Limulus Amebocyte Lysate Kit	Pyroquant Diagnostik GmbH, Mörfelden
Nucleobond PC 100 Kit	Machery-Nagel GmbH, Düren
SAWADY Taq-DNA-Polymerase Kit	Peqlab GmbH, Erlangen
TNF- α Maus ELISA Kit (Biotrak)	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

3.4. Zellkultur

3.4.1. Allgemeine Methoden

Die Durchführung aller Zellkulturmethoden und die Behandlung sämtlicher Geräte, Labormaterialien und Chemikalien erfolgten nach Mishell & Shiigi [1980] sowie Lindl & Bauer [1987]. Auf Abweichungen wird in dieser Arbeit hingewiesen.

Für die Herstellung von Zellkulturmedien und Zellkulturlösungen wurde pyrogenfreies Milli-Q-Wasser benutzt, das in einer Wasserhochreinigungsanlage der Firma Millipore GmbH (Eschborn) aufgereinigt wurde. Hitzestabile Lösungen wurden entweder 15 Minuten bei 2 bar und 121°C autoklaviert oder mit Sterilfiltern (ZapCap S Sterilfilter, 0,2 µm Celluloseacetat-Membran, Schleicher & Schuell GmbH) sterilisiert, sofern sie hitzelabile Komponenten enthielten.

Biofolie	Vivascience AG, Hannover
Kulturflaschen (25 bzw. 75 cm ³)	Renner GmbH, Dannstadt
Kulturplatten (6- bzw. 24- <i>well</i>)	Renner GmbH, Dannstadt
Kryoröhrchen	Nalgene Company, New York, USA
Petrischalen	Sarstedt AG, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Renner GmbH, Dannstadt

Die Arbeiten mit RAW 264.7-Zellen und Knochenmarksmakrophagen wurden in einer Sterilbank (Envirco Steril Flow, Ceag Schirp Reinraumtechnik, Bork, Westfalen) durchgeführt [Morgan & Darling, 1994].

Die RAW 264.7-Zellen wurden in einem elektronisch geregelten CO₂-Begasungsbrutschrank (Typ B5060EK/CO₂, Heraeus GmbH, Hanau) in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Die Knochenmarksmakrophagen wurden in sterilen, selbst hergestellten Beuteln (5 x 30 cm, hydrophobe Seite nach innen) aus Teflonfolie (Vivascience AG, Hannover) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

3.4.2. Präparation, Isolierung und Differenzierung von Knochenmarksmakrophagen

Nach einer Quarantänezeit von mindestens einer Woche wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Der Femur wurde unter sterilen Bedingungen frei von Gewebe präpariert, an beiden Seiten mit einem Skalpell geöffnet und das femorale Knochenmark mit einer Spritze (5 ml Gebrauchsmedium) ausgespült. Die Knochenmarkszellen wurden zweimal mit RPMI-Waschmedium gewaschen (1.200 upm, 4°C, 10 min) und gezählt.

Für die weitere Differenzierung zu Makrophagen wurden die Knochenmarkszellen in Anzuchtmedium (M-CSF-haltig) überführt und in Teflonbeuteln inkubiert. Diese Methode führt nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen zu einer fast (97%) homogenen Population von Knochenmarksmakrophagen [Hume & Gordon, 1983; Weber et al., 1993].

Durch die geringe Adhärenz der Makrophagen an der hydrophoben Teflonfolie ließen sie sich einfach ablösen. Vor der Aussaat in eine Zellkulturplatte wurden sie zweimal mit RPMI-Waschmedium gewaschen (1.200 upm, 4°C, 10 min) und gezählt.

RPMI-Grundmedium, pH 7,2:	10,41 g/l	RPMI1640-Trockenmedium
	20 mM	NaHCO ₃
	10 mM	HEPES
	100 U/ml	Penicillin/Streptomycin
	0,05 mM	β-Mercaptoethanol
RPMI-Waschmedium:	RPMI-Grundmedium	
	5% (v/v)	FCS
	15 mM	Glucose
	1 mM	Natriumpyruvat
	1% (v/v)	nichtessentielle Aminosäuren
RPMI-Anzuchtmedium:	Waschmedium	
	10% (v/v)	FCS
	5% (v/v)	HS
	30% (v/v)	M-CSF-haltiger Kulturüberstand
RPMI-Gebrauchsmedium:	RPMI-Grundmedium	
	10% (v/v)	FCS
	1 mM	Natriumpyruvat
	1% (v/v)	nichtessentielle Aminosäuren

3.4.3. Anzucht und Rekultivierung von RAW 264.7-Zellen

Die für die vorliegende Arbeit verwendeten RAW 264.7-Zellen wurden zuvor als Kryokonserven in flüssigem Stickstoff gelagert. Die verwendete Kryokonserven wurde bei 37°C schnell aufgetaut, mit 10 ml DMEM-Gebrauchsmedium verdünnt und sedimentiert (1.200 upm, 4°C, 10 min). Zur Kryokonservierung (Reduktion des Wassergehaltes) wurde das toxische DMSO eingesetzt, welches auf diese Weise verdünnt und entfernt wurde. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen (1.200 upm, 4°C, 10 min) und gezählt.

DMEM-Grundmedium, pH 6,9:	13,3 g/l	DMEM-Trockenmedium
	44 mM	NaHCO ₃
	100 U/ml	Penicillin/Streptomycin

DMEM-Gebrauchsmedium:	DMEM-Grundmedium
	10% (v/v) FCS
	1 mM Natriumpyruvat
	2 mM L-Glutamin

3.4.4. Färbung und Zellzahlbestimmung

Die für viele zellbiologische Anwendungen unerläßliche Bestimmung der Lebendzellzahl wurde nach der Trypanblau-Exklusionsmethode durchgeführt. Dafür wurde ein Aliquot der jeweiligen Zellsuspension entnommen und mit einer isotonischen Trypanblau-Lösung gemischt. Trypanblau liegt im physiologischen pH-Bereich als Anion vor, kann leicht an Proteine binden und diffundiert so bei geschädigten Zellen ins Zytoplasma. Durch Akkumulation werden nur tote und absterbende Zellen blau gefärbt. Die Anzahl der lebenden und toten Zellen wurde anschließend in einer Thoma-Zählkammer bestimmt.

Isotonische Trypanblaulösung:	0,85% (w/v) NaCl
	0,16% (w/v) Trypanblau

3.4.5. Passage und Aussaat

Die Passage der RAW 264.7-Zellen erfolgte alle 2-3 Tage. Die adhärennten Zellen wurden zunächst mit frischem Gebrauchsmedium gewaschen. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen vorsichtig vom Boden der Kulturflasche abgelöst und zweimal gewaschen. Nach der Zellzahlbestimmung wurden 2×10^6 Zellen mit 10 ml Gebrauchsmedium in eine kleine Kulturflasche ausgesät.

3.4.6. Stimulierung von Makrophagen

Untersuchungen, die bereits in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kathryn Nixdorff am Institut für Mikrobiologie und Genetik der TU Darmstadt durchgeführt wurden, haben sich u.a. mit der differenzierten Regulation der Produktion proinflammatorischer Zytokine in LPS-stimulierten Makrophagen befaßt. Durch den Einsatz des Proteinkinase-Inhibitors Staurosporin wurde die Produktion von IL-1 β erheblich verstärkt. Dies deutete auf eine negative Regulation von IL-1 β hin, die durch die Wirkung von Staurosporin aufgehoben wurde.

In der vorliegenden Arbeit war es von besonderem Interesse, die Wirkung von OmpA mit der Wirkung von LPS auf Makrophagen zu vergleichen. Hierzu wurde LPS aus *P. mirabilis* bzw. *E. coli* in einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ zu 8×10^5 Makrophagen (RAW 264.7-Zellen bzw. C3H/HeJ-Knochenmarksmakrophagen) in dem entsprechenden Gebrauchsmedium eingesetzt. Abweichungen von diesen Konzentrationen wurden im Ergebnis-Teil vermerkt.

Da die Wirkung des OmpA auf die Makrophagen von besonderem Interesse war, wurden die Makrophagen in einigen Ansätzen zusätzlich mit OmpA von *P. mirabilis* bzw. *E. coli* behandelt. Die Zugabe des OmpA erfolgte ebenfalls über eine Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$. Abweichungen von dieser Konzentration sind vermerkt.

Durch den Einsatz von Staurosporin sollten mögliche Effekte des Inhibitors auf die Stimulierung von Makrophagen mit LPS bzw. OmpA untersucht werden. Ausgehend von früheren Versuchen an RAW 264.7-Zellen und Knochenmarksmakrophagen wurden verschiedene Staurosporin-Konzentrationen verwendet [Schilling, 2000]. Die Staurosporin-Konzentration wurde bei Knochenmarksmakrophagen auf 50 nM pro Ansatz und bei RAW 264.7-Zellen auf 10 nM pro Ansatz eingestellt.

Zum Vergleich wurde in einigen Experimenten das Braun'sche Lipoprotein (7 kDa) eingesetzt, von dem bekannt war, daß es ein Agonist für den TLR2-Rezeptor ist. Dieses Protein wurde in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Abweichungen von dieser Konzentration sind vermerkt.

3.4.7. Gentechnische Methoden in der Zellkultur

3.4.7.1. Transfektion mittels der Calciumphosphat-Methode

Der Vorgang der Transfektion beschreibt die Einführung von „fremder“ DNA in eukaryotische Zellen. Bei dieser Methode wird die rekombinante DNA (Reportergenkonstrukt) mit Calciumchlorid in Gegenwart von Phosphat gemischt, wobei ein Komplex aus DNA und Calciumphosphat entsteht. Dieser Komplex heftet sich an die Zellmembran an und wird durch Endozytose ins Zytoplasma aufgenommen [Kriegler, 1990; Smith et al., 1994; Schilling et al., 2000].

Die Transfektionsexperimente wurden mit einem Reportergenkonstrukt (pXT-luc) durchgeführt, das die vollständige Enhancer- und Promotor-Sequenz des IL-1 β -Gens sowie ein Reportergen (Luziferase-Gen) enthält. Der Vorteil von Reportergen-Konstrukten ist ihre bis zu 100fach höhere Sensitivität verglichen mit anderen Nachweissystemen [de Wet et al., 1987; Williams et al., 1989]. So kann die Aktivität der Enhancer- und Promotorregion des IL-1 β -Gens in den Zellen indirekt über die Menge des gebildeten Reportergen-Produktes Luziferase gemessen werden. Da sich primäre Zellen bisher nicht transfizieren ließen, wurde im Rahmen dieser Arbeit RAW 264.7-Zellen transfiziert. Um eine gleichmäßige Transfektionseffizienz der Ansätze einer Versuchsreihe untereinander zu gewährleisten, wurden pro *well* 6×10^6 Zellen mit 10 μg des Reportergenkonstruktes in einer Kulturschale gemischt und nach dem Glycerinschock jeweils 1×10^6 transfizierte Zellen (2 ml des Transfektionsansatzes) pro Kavität einer 6-*well*-Platte ausgesät. Die Transfektionsansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.4.7.2. Stimulierung von transfizierten Zellen

Nach der Inkubation von ca. 18 Stunden wurde ein Mediumswechsel durchgeführt und die transfizierten Zellen wurden für 24 Stunden mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OmpA in An- und Abwesenheit von 10 nM Staurosporin stimuliert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte nach Zugabe von je 350 μl des Triton-Gly-Gly-Lysepuffers für 10 min auf Eis. Die Zellrückstände wurden abzentrifugiert (13.000 upm, RT, 5 min) und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt [Brasier & Fortin, 1995].

Triton-Gly-Gly-Lysepuffer:	autoklaviertes H ₂ O
	25 mM Gly-Gly
	15 mM MgSO ₄
	4 mM EGTA
	1 mM DTT
	1% (v/v) Triton X-100

3.4.7.3. Reporteragenassays

Der Nachweis beruht auf der ATP-abhängigen Oxidation von Luziferin durch die produzierte Luziferase und wurde nach Brasier und Fortin [1995] durchgeführt. Dabei sind Modifikationen von Beißert [1999] berücksichtigt. Für eine Messung wurden 180 µl Assaypuffer mit 50 µl Lysat gemischt und 100 µl der 200 µM Luziferin-Lösung zugegeben. Die bei dieser Oxidationsreaktion resultierende Lichtemission wurde mittels eines Luminometers gemessen. Da diese Lichtemission proportional zu der Luziferaseaktivität in den Zelllysaten ist, kann mit dieser Methode indirekt die entsprechende Promotoraktivität bestimmt werden.

Assaypuffer:	autoklaviertes H ₂ O
	25 mM Gly-Gly
	15 mM K ₂ HPO ₄ , pH 8,0
	15 mM MgSO ₄
	4 mM EGTA
	2 mM ATP
	1 mM DTT

3.5. Biochemische und serologische Nachweismethoden

3.5.1. Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten OmpA Proben wurden mittels des *Limulus Amebocyte Lysate* Kits (Pyroquant Diagnostik GmbH, Mörfelden) auf eine mögliche Endotoxin-Verunreinigung (LPS) hin nach Angaben des Herstellers untersucht.

Das *Limulus* Amöbozyten-Lysat (LAL) ist ein wässriger Extrakt von Blutzellen (Amöbozyten) des Pfeilschwanzkrebses, *Limulus polyphemus*. In Gegenwart von Endotoxinen werden im LAL Faktoren einer proteolytischen Kaskade aktiviert, die zur Spaltung eines Peptidsubstrats führen. Die proteolytische Spaltung des Substrates setzt p-Nitroanilin (pNA) frei, welches

mit Nitrit in HCl und dann mit N-(1-Naphtyl)-Ethylendiamin (NEDA) reagiert und eine Diazo-Magenta-Verbindung bildet, die in einem Bereich zwischen 540 und 550 nm absorbieren kann. Bei dieser chromogenen Endpunkt-Methode kann die nach einer festgelegten Inkubationszeit freigesetzte Menge an pNA bestimmt werden. Mit Hilfe einer Standardkurve, in der die gemessene optische Dichte graphisch gegen die bekannte Standard-Endotoxin-Konzentration aufgetragen wird, wird die Konzentration in den Proben bestimmt.

Die auf diese Weise bestimmten LPS-Konzentrationen wurden ins Verhältnis (Prozent) mit den verwendeten OmpA Mengen gesetzt.

3.5.2. Herstellung von Zellwänden

Für den Nachweis von OmpA in bakteriellen Zellwänden mittels ELISA (vgl. 3.5.3.2.) und Western-Blot-Analysen wurden die Zellen einer 400 ml Übernachtskultur abzentrifugiert (12.500 upm, 15°C, 30 min, Sorvall RC 2B, GSA-Rotor) und in 250 ml 0,4% SDS (pH 7) resuspendiert und kurz im Ultra Turrax homogenisiert. Durch Zugabe von Glasperlen (0,17 – 0,18 mm) und Mahlen für 20 min in einer Zelmühle (Bühler, Tübingen) wurden die Zellen aufgeschlossen. Die gemahlene Zellen wurden durch Filtration von den Glasperlen abgetrennt und zweimal in 0,9% NaCl gewaschen (12.500 upm, 15°C, 30 min, Sorvall RC 2B, GSA-Rotor), um die Zellwände von der zytosolischen Phase zu trennen. Anschließend wurden die Zellwände in destilliertem Milli-Q-Wasser gewaschen und lyophilisiert.

3.5.3. ELISA (enzymgebundener Immunoassay)

Als Nachweis der Zytokinproduktion in Makrophagen bzw. dem OmpA aus Zellwänden von *Enterobacteriaceae* wurde ein *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)-System nach der *sandwich*-Methode verwendet. Dabei werden Antigene oder Antikörper kovalent mit einem niedermolekularen Enzym, das eine hohe Umsatzzahl hat, verbunden. Eine erfolgte Antigen-Antikörper-Bindung kann indirekt dadurch sichtbar gemacht werden, daß die gekoppelten Enzyme (A-POD) aus einem farblosen Chromogen ein farbiges Reaktionsprodukt liefern, das photometrisch bestimmt werden kann.

3.5.3.1. Nachweis von OmpA in Zellwänden

Zum Vergleich verschiedener *Enterobacteriaceae* auf der Grundlage von OmpA in Zellwänden wurde ein ELISA mit den monoklonalen Antikörpern 2.14.1 und 2.18.1 durchgeführt. Hierzu wurden ca. 400 µg der Zellwände in 200 µl 0,05 N NaOH aufgenommen und 10 min im Ultraschallbad inkubiert. Anschließend wurden sie mit Coating-Puffer auf eine Konzentration von 160 µg/ml eingestellt. Jeweils 100 µl dieser Suspension wurden in die Kavitäten einer 96-*well*-Platte gegeben pipettiert. Die Anheftung der Zellwände erfolgte über Nacht. Danach wurde nicht-gebundenes Antigen durch dreimaliges Waschen mit PBS-Tween entfernt.

Coating-Puffer, pH 9,6:	15 mM Na ₂ CO ₃ 35 mM NaHCO ₃ 3 mM NaN ₃
PBS-Tween, pH 7,4:	9,55 g/l 0,05% (v/v) Tween

Von den monoklonalen Antikörpern wurden serielle Verdünnungen (1:2) hergestellt, auf die gecoateten Zellwände gegeben und für eine Stunde schüttelnd bei RT inkubiert. Die Kavitäten wurden drei Mal mit PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurden jeweils 100 µl des 1:1000 verdünnten Zweitantikörpers α -Maus IgG, Alkalische Phosphatase-Konjugat zugegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden drei Mal gewaschen und das Enzymsubstrat (p-Nitrophenylphosphat) zugegeben. Die Alkalische Phosphatase katalysiert die Abspaltung einer Phosphatgruppe des Substrats, wodurch es zu einer deutlichen Gelbfärbung kommt. Die Absorptionsmessungen wurden bei 405 nm und 690 nm als Referenz durchgeführt (EAR 400 ATX, SLT Labinstruments Deutschland, Crailsheim). Für die Auswertung wurde die OD graphisch gegen den Reziprokwert der Verdünnung aufgetragen.

3.5.3.2. Nachweis der Zytokinproduktion

In den durchgeführten Experimenten wurden 8×10^5 Makrophagen in 1 ml in einer 24-*well*-Kulturplatte für 24 Stunden mit 1 µg/ml LPS bzw. verschiedenen Mengen (0,01 - 10 µg/ml OmpA) in An- und Abwesenheit von Staurosporin stimuliert. Anschließend wurden die Kulturüberstände abgenommen und die Zellen mit 1 ml 0,01 % Triton-Lyselösung pro Kavität für 15 Minuten auf Eis lysiert.

Der Zytokin-Nachweis von IL-1 β wurde in den Zelllysaten gemessen, TNF- α und IL-6 dagegen in den Kultur-Überständen der Makrophagen mit Hilfe von ELISA Sets, bei denen die entsprechenden Antikörper bereits austitriert waren:

IL-1 β Maus OptEIA Set	BD Pharmingen GmbH, Heidelberg
TNF- α Maus OptEIA Set	BD Pharmingen GmbH, Heidelberg

Zur Überprüfung der Ergebnisse dieser ELISA Sets wurden Messungen bestehender Proben mit einem ELISA Kit wiederholt:

IL-1 β Maus ELISA Kit (Biotrak™)	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
IL-6 Maus ELISA Kit (Biotrak™)	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
TNF- α Maus ELISA Kit (Biotrak™)	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg

Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die spektralphotometrische Messung (EAR 400 ATX, SLT Labinstrumente Deutschland, Crailsheim) erfolgte bei 450 nm und gegen 690 nm als Referenz. Mit Hilfe einer Regressionsanalyse der gemessenen Standardproben wurde unter Berücksichtigung der entsprechenden Lysatverdünnung eine Standardkurve berechnet, über die anschließend die jeweilige Zytokinproduktion der Zellen bestimmt werden konnte.

3.5.4. Nachweis von NO

In den Experimenten zur Bestimmung der NO-Produktion in Makrophagen wurden 8×10^5 Makrophagen in 1 ml in einer 24-well-Kulturplatte für 24 Stunden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ OmpA in An- und Abwesenheit von Staurosporin stimuliert. Anschließend wurden die Kulturüberstände abgenommen, abzentrifugiert (13.000 upm, RT, 15 min) und in neue Reaktionsgefäße überführt. Da das produzierte NO an der Luft zu Nitrit oxidiert [Nathan & Hibbs, 1991], kann das NO indirekt über die Menge von Nitrit in den Kulturüberständen durch eine Farbreaktion mit Griess-Ilosvays-Reagenz kolorimetrisch gemessen werden [Stuehr & Nathan, 1989]. Die spektralphotometrische Messung (EAR 400 ATX, SLT Labinstrumente Deutschland, Crailsheim) erfolgte bei 540 nm und gegen 690 nm als Referenz. Mit Hilfe einer Regressionsanalyse der gemessenen Nitrit-Standardproben wurde eine Standardkurve berechnet, über die anschließend die jeweilige NO-Produktion der Zellen bestimmt werden konnte.

3.5.5. Western-Blot-Analysen

Bei der Western-Blot-Analyse werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung in einem SDS-haltigen Puffer gelelektrophoretisch (SDS-PAGE) in Abhängigkeit ihrer molekularen Masse aufgetrennt, auf eine Membran (Nitrozellulose) übertragen und dort einer Nachweisreaktion unterzogen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode sowohl für die Charakterisierung des OmpA in Zellwänden verschiedener *Enterobacteriaceae* wie auch als Nachweis für die rekombinant hergestellten OmpA-Fragmente verwendet. Die Proben wurden wie unter 3.5.2. beschrieben hergestellt. Da sich die Durchführung beider Fragestellungen bis auf die Nachweisreaktion nicht unterscheidet (vgl. 3.5.5.3. und 3.5.5.4.), werden im folgenden die SDS-PAGE und das Blotten einheitlich beschrieben.

3.5.5.1. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese der Proteingemische erfolgte unter Verwendung eines SDS-haltigen, diskontinuierlichen Puffersystems [Laemmli, 1970] in einer Mighty Small SE 235 Gelkammer (Hofer Scientific Instruments, Heidelberg) nach Angaben des Herstellers.

Für die Charakterisierung des OmpA in Zellwänden wurden jeweils 15 µg der isolierten Zellwände und von den rekombinant hergestellten OmpA-Fragmenten jeweils 20 µg der Zellysate aufgetragen und in einem Gel, bestehend aus 5%igem Sammelgel und 15%igem Trenngel, 2 Stunden bei 250 Volt und 20 mA aufgetrennt.

5%iges Sammelgel:	5% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 375 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,1% (v/v) SDS 0,08% (v/v) APS 0,08% (v/v) TEMED
15%iges Trenngel:	15% (v/v) Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung 375 mM Tris-HCl, pH 8,8 0,1% (v/v) SDS 0,08% (v/v) APS 0,08% (v/v) TEMED

3.5.5.2. Blot

Für den anschließenden Blot wurden die Nitrozellulose-Membran (BA 85, Porengröße 0,45 µm, Schleicher & Schuell, Dassel) und das SDS-Gel 30 Minuten in Transblotpuffer äquilibriert. Anschließend wurde der „Blotsandwich“ nach Angaben des Herstellers aufgebaut (Mighty Small TE-22, Hoefer Scientific Instruments, Heidelberg). Die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte bei 100 Volt, max. Amperestärke über 1 Stunde.

Transblotpuffer (Carbonatpuffer), pH 9,9:	10 mM	Natriumhydrogencarbonat
	3 mM	Natriumcarbonat
	20% (v/v)	Methanol

Nach dem Blot wurde die Membran 15 min in Ponceau Rot gefärbt, die Banden des Größenmarkers zusätzlich gekennzeichnet (Bleistift) und die Membran in PBS-Tween entfärbt.

3.5.5.3. Nachweis von OmpA in Zellwänden

Der Nachweis von OmpA in den Zellwänden (s. 3.5.2.) verschiedener *Enterobacteriaceae* erfolgte über Schwärzungsbanden auf einer Nitrozellulosemembran. Dazu wurde nach dem Blot die Membran zunächst mit 1%iger Magermilch für 2 Stunden blockiert und im Anschluß mit den monoklonalen Antikörpern 2.14.1 und 2.18.1 (1:500 Verdünnung) zunächst 1 Stunde bei RT sowie bei 4°C über Nacht behandelt. Der auf diese Weise entstandene Antigen-Antikörper-Komplex wurde durch den Zweit-Antikörper α -Maus IgG (mit Peroxidase konjugiert) erkannt. Die Peroxidase katalysierte anschließend die Spaltung des Substrats Chloronaphthol, was zu Schwärzungsbanden auf der Membran führte.

3.5.5.4. Nachweis der Expressionsfragmente

Der Nachweis der produzierten OmpA-Fragmente (s. 3.7.11.) erfolgte im (qualitativen) Western-Blot-Verfahren mittels der bereits verwendeten mAk 2.14.1 und 2.18.1. Der Nachweis erfolgte mittels des ECL-Kits (*enhanced chemiluminescence of luminol*) auf einem Röntgenfilm dargestellt. Als Positivkontrolle diente das native OmpA (P30) von *Proteus mirabilis*. Dabei diente jedoch nicht Chloronaphthol als Substrat, sondern Luminol. Dieses wird von der Peroxidase gespalten, was zu einer Freisetzung von Licht und Filmschwärzung führt.

3.6. Photometrische Methoden

Für die durchgeführten Transfektionen war die Reinheit der verwendeten Plasmid-DNA von besonderer Bedeutung. Ein erhöhter Gehalt an Proteinen oder Salzen hätte die Bildung eines Transfektionskomplexes stark beeinträchtigt.

Daher wurde die Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren in einem Spektralphotometer (Spectronic 601, Milton Roy) über die optische Dichte (OD) bestimmt. Die Reinheit von Nukleinsäuren wurde über das Verhältnis der OD bei 260 nm zur OD bei 280 nm berechnet, da das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren (Thymidin) bei 260 nm und bei Proteinen (Tryptophan) bei 280 nm liegt. Bei einem Verhältnis von $OD_{260}/OD_{280}=1,8$ bis 2 wurde von einer guten Reinheit ausgegangen.

Zudem wurde die Konzentration der Nukleinsäure aus der OD_{260} , unter der Berücksichtigung von Näherungsformeln [Sambrook et al., 1989], berechnet.

$$c[\text{DNA}] = (\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen} \times 50) / 1000 = [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

$$c[\text{RNA}] = (\text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Volumen} \times 40) / 1000 = [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

Die Messungen wurden in einer Quarzküvette bei einer 1:250 Verdünnung durchgeführt.

3.7. Molekular-biologische Methoden

3.7.1. Northern-Analysen

In den durchgeführten Experimenten wurden $3,2 \times 10^6$ Makrophagen in 4 ml in einer *6-well*-Kulturplatte für 24 Stunden mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS bzw. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ OmpA in An- und Abwesenheit von Staurosporin stimuliert. Anschließend wurden die Kulturüberstände abgenommen und die Zellen mit 400 μl Guanidiniumthiocyanat pro Kavität für 20 Minuten auf Eis lysiert.

3.7.1.1. RNA-Extraktion

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Makrophagen erfolgte nach der Methode der Einschnitt-Isolierung [Chomczynski & Sacchi, 1987; Schilling, 2000]. Diese Methode beruht auf einer sauren Lyse durch Guanidiniumthiocyanat (GSCN) gefolgt von einer Phenol-Chloroform-Extraktion.

Nach langsamen Auftauen der Lysate wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit 1 Volumen Phenol (pH 4,0-4,5) und 0,2 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) durchgeführt. Die Ansätze wurden kräftig gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert, woraufhin eine Phasentrennung durch Zentrifugation (4°C, 13.000 upm, 20 min; Universal RF 30, Hettich GmbH, Tuttlingen) eingeleitet wurde. Die obere wässrige Phase wurde ohne die Interphase abgenommen und die RNA mit 1 Volumen Isopropanol bei -20°C über Nacht gefällt. Das Präzipitat wurde in 70% Ethanol gewaschen und 10 Minuten unter Vakuum getrocknet. Das Sediment wurde in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und die Reinheit und Konzentration der RNA wurden spektralphotometrisch bestimmt. Anschließend wurde die RNA erneut in 100% Ethanol/3 M NaAcetat pH 5,2 bei -20°C über Nacht gefällt, gewaschen, getrocknet und zuletzt mit 0,5% SDS auf eine Konzentration von 2 µg/µl eingestellt.

3.7.1.2. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen einzelsträngiger RNA wurde eine denaturierende Gelelektrophorese durchgeführt. Als denaturierendes Agens wurde Formaldehyd verwendet [Lehrbach et al., 1977].

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 1,5%igen Agarosegel (10% MOPS, 6,6% Formaldehyd; 20 x 10 cm Gelkammer, Stratagene, Heidelberg) bei 16 Volt, 300 Ampere für 17 Stunden, wobei das Gel mit MOPS-Laufpuffer (10% MOPS, 1% Formamid) überschichtet wurde. Vor dem Gellauf wurde die RNA in Denaturierungspuffer verdünnt, mit Nukleinsäure-Farbmarker versetzt und für 15 min bei 60°C inkubiert. Das Auftragsvolumen betrug jeweils 20 µl. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 30 min mit DEPC-Wasser behandelt, um das Formaldehyd zu entfernen und bei 302 nm unter UV-Licht photographiert. Die aufgetrennte RNA wurde anschließend mittels Northern-Blot auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) übertragen.

3.7.1.3. Northern-Blot

Für die Detektion mit einer DIG-markierten Sonde wurde die RNA zunächst in einer Vakuumblot-Apparatur (VacuGene, Pharmacia LKB, Freiburg) auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) übertragen. Die Membran wurde vor der Übertragung 5 Minuten in autoklaviertem Wasser und 15 min in 20x SSC äquilibriert. Nach dem Abdichten des Gels zur Vakuumblot-Apparatur mit 1%iger Agarose wurde die RNA unter Vakuum (65 mbar) von dem mit 20x SSC überschichteten Gel 4 Stunden auf die Nylonmembran übertragen. Nach dem Blot wurde die Membran kurz in 2x SSC geschwenkt und für 2 Stunden bei 80°C gebacken, um eine Fixierung der RNA auf der Membran zu erzielen. Danach wurden das Gel und die Membran erneut bei 302 nm unter UV-Licht photographiert, um den Erfolg des Blots zu überprüfen.

3.7.1.4. Nachweis mit Digoxigenin

Zur Detektion der mRNA diente der Digoxigenin-RNA-Nachweis. Dieser Nachweis beruht auf der Hybridisierung der isolierten und auf eine Nylonmembran übertragene RNA mit strangspezifischen RNA-Sonden, die zuvor DIG-markiert wurden. Die DIG-markierten-Antisense-Sonden werden mit Antikörpern gegen DIG inkubiert, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert sind. Die alkalische Phosphatase wiederum bewirkt die Umsetzung des Chemilumineszenz-aktiven Substrats CSPD[®], was zu einer Lichtemission (Emissionsmaximum 477 nm) führt, die die Schwärzung eines Films bewirkt. Der DIG-Nachweis wurde mit dem *DIG Luminescent Detection Kit* (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Die bei dieser Hybridisierung eingesetzte IL-1 β -Sonde wurde von Claudia Zimdars und die zur Kontrolle verwendete β -Aktin-Sonde wurde von Kai Kronfeld im Rahmen ihrer Diplomarbeiten hergestellt.

Die Durchführung erfolgte strikt nach Angaben des Herstellers. Hierzu wurde die Membran in eine Plastikfolie eingeschweißt, mit einem Film (BioMax Light-1, Kodak) bedeckt und in einer Exponierbox bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Die Inkubationszeiten wurden nach der Filmentwicklung bei Bedarf verändert bis eine auswertbare Detektion vorhanden war.

Danach wurde die hybridisierte IL-1 β -Sonde stringent von der Membran gewaschen (20 min bei 55°C; 20 min bei 60°C; 20 min 65°C mit jeweils 0,2x SSC/0,1% SDS) und der Vorgang mit der β -Aktin-Sonde wiederholt.

Der Film wurde densitometrisch ausgewertet. Hierzu wurde er im „Transmissionsmodus“ eingescannt, die Banden mit identischen Flächen markiert und der Schwärzungsgrad mittels eines Densitometers (GS-700 Imaging Densitometer, BioRad Laboratories GmbH) bestimmt (Multi-Analyst™/PC Version 1.1, BioRad Laboratories GmbH). Die Meßwerte der β -Aktin Hybridisierung dienten als Referenz, um eine gleichmäßige RNA-Menge im Ergebnis zu berücksichtigen, da die RNA für das β -Aktin in den Zellen konstitutiv transkribiert wird.

3.7.2. Isolierung von chromosomaler DNA

Die für die folgende Gen-Amplifikation notwendige chromosomale DNA aus *Proteus mirabilis* 19 wurde nach Vorlage der *current protocols* 2.4.1 unter Einwirkung von 10% SDS, 20 mg/ml Proteinase K und 5 M NaCl-Lösung isoliert. Dabei wurden Komponenten der bakteriellen Zellwand mit einer CTAB/NaCl-Lösung komplexiert. Die Aufreinigung der isolierten DNA erfolgte mittels der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (vgl. 3.7.6.).

3.7.3. Gen-Amplifikation

Durch den Einsatz der *polymerase chain reaction* (PCR) wurden in der vorliegenden Arbeit chromosomale Abschnitte des *ompA*-Gens von *Proteus mirabilis* amplifiziert. Die PCR-Methode ist mittlerweile weit verbreitet und beruht auf der Eigenschaft der DNA-Polymerasen, ausgehend von einer Startsequenz (Oligonukleotidprimer) unter Verwendung von Einzelnukleotiden (dNTPs) in einem temperaturabhängigen, zyklischen Prozeß, doppelsträngige DNA zu synthetisieren (Amplifikation). Dabei dient ein aufgeschmolzener Einzelstrang des chromosomalen Abschnitts als Vorlage [Newton & Graham, 1994].

Die für die Amplifikation notwendigen Oligonukleotidprimer sind unter 3.2.4. beschrieben. Die notwendigen Reagenzien und Enzyme für die PCR-Reaktion sind unter 3.2.6. und 3.2.8. aufgeführt. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (PCR Express, Thermo Hybaid) durchgeführt. Im ersten Zyklus wurden die DNA-Stränge für 5 min bei 95°C denaturiert, die Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA-Matrize erfolgte je nach GC-Gehalt und der Länge der Oligonukleotide, die als Primer eingesetzt wurden, für 1 bis 2 min bei 50 bis 65°C. Die Polymerisierung erfolgte für 1 min pro kb zu polymerisierender DNA bei 72°C. Anschließend folgten 30 bis 35 identische Zyklen. In einem abschließenden Zyklus wurde die Polymerisationszeit auf 10 min erhöht, um alle Matrizenstränge nach Anlagerung der Primer vollständig zu verlängern.

Zusammensetzung der PCR-Ansätze:	0,1 µg	DNA als Matrize
	1/10 Vol.	10x Reaktionspuffer (o. Mg ²⁺)
	200 µM	dNTP-Mix
	3 mM	MgCl ₂
	je 20 pmol	Primer
	2 U	DNA-Polymerase
	ad 50 µl	HPLC-Wasser

3.7.4. Gelelektrophorese von DNA

Für den Nachweis der in der PCR-Reaktion amplifzierten DNA wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte dabei in einem 2%igen Agarosegel und TAE-Elektrophoresepuffer in einer Flachbettkammer (10 x 10 cm, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) für 1,5 Stunden bei 100 Volt und 300 mA.

TAE-Elektrophoresepuffer (50-fach):	2 M	Tris
	1 M	Essigsäure
	0,1 M	EDTA

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 30 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung inkubiert. Dabei lagert sich Ethidiumbromid an die DNA an und fluoresziert unter UV-Licht.

3.7.5. Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen

An einigen Stellen war es nötig, die über Gelelektrophorese aufgetrennten PCR-Produkte aus dem Gel für die weitere Verwendung aufzureinigen. Dazu wurde unter UV-Licht die entsprechende Bande ausgeschnitten und die DNA mittels *Gen Elute™ Minus EtBr Spin Columns* Kit (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen) aufgereinigt. Dabei werden die Agarose und das Ethidiumbromid in Zentrifugensäulen zurück gehalten, während die DNA in einem Schritt eluiert werden kann.

3.7.6. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion

Die Aufreinigung amplifizierter DNA (diskrete Bande) aus einer PCR-Reaktion chromosomaler DNA und Plasmid-DNA wurde in den häufigsten Fällen mittels der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI-Extraktion) durchgeführt. Dabei wird die DNA von Proteinen getrennt. Durch die denaturierende Eigenschaft von Phenol und Chloroform findet eine Phasentrennung statt, wobei sich die Proteine in der unteren organischen Phase und die DNA in der oberen wäßrigen Phase sammeln. Dieser Effekt wird durch den Isoamylalkohol noch verstärkt.

Das Verhältnis von Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol betrug 25:24:1 (v/v).

3.7.7. Fällen und Waschen von Nukleinsäuren

In erster Linie dient das Fällen der DNA dazu, ihre Konzentration zu erhöhen. Zusätzlich werden nicht gewünschte Salze entfernt. Für die Fällung wurde Ethanol (reinst.) verwendet und die Probe für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 upm, 4°C, 20 min) wurde die sedimentierte DNA mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Durch erneute Zentrifugation (13.000 upm, 4°C, 20 Minuten) wurden zusätzlich Salze entfernt und die DNA anschließend unter Vakuum getrocknet.

3.7.8. Ligation und Transformation in kompetente Zellen

Neben der „klassischen“ Ligation mit T4-Ligase wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit* (Invitrogen, Karlsruhe) gearbeitet. Der pCR-Blunt II-TOPO-Vektor ist für die Ligationen mit *blunt-end*-PCR-Produkten vorgesehen und ermöglicht, durch die Gegenwart der Topoisomerase, eine Zeitersparnis bei der Ligrationsreaktion. Alle PCR-Produkte für die Ligation in den pCR-Blunt II-TOPO-Vektor wurden mit der *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega GmbH) amplifiziert. Die Klonierung in den Vektor erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die anschließende Transformation erfolgte in mitgelieferte TOP10-*E. coli*-Zellen, aber auch in andere kompetente *E. coli*-Zellen der Arbeitsgruppe. Die Transformation erfolgte mittels Hitzeschock für 1,5 min bei 42°C. Kultiviert wurden die transformierten Zellen auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten bei 37°C über Nacht.

Luria-Bertani (LB)-Medium, pH 7,5:	0,5% (w/v) Hefeextrakt 0,2 M NaCl 1,0% (w/v) Pepton aus Casein
------------------------------------	--

Luria-Bertani (LB)-Agar:	LB-Medium 1,2% (w/v) Bacto-Agar
--------------------------	------------------------------------

3.7.9. Restriktionsanalyse

Die Überprüfung der konstruierten Plasmide erfolgte mittels Restriktionsanalyse. Dazu wurde die Plasmid-DNA zunächst nach dem Verfahren von Maniatis [Sambrook et al., 1989] aus den positiven Transformanten aufgereinigt. Eine Einzelkolonie wurde mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und unter Selektionsbedingungen bei 37°C in einer Flüssigkultur (LB-Medium) von 5 ml über Nacht vermehrt. Die Zellen der Flüssigkultur wurden abzentrifugiert (13.000 upm, 4°C, 5 min) und nach Zugabe des Proteinase K-haltigen Puffers lysiert. Im Anschluß folgten eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (vgl. 3.7.6.) und die Fällung der DNA mit Ethanol (vgl. 3.7.7.).

Die aufgereinigten Plasmide wurden unter Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme (vgl. 3.2.9.) einfach oder mehrfach bei 37°C über Nacht geschnitten. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung (vgl. 3.7.4.) der geschnittenen Plasmide konnte anhand des Bandenmusters der Ligationseffizienz überprüft werden, sowie die Orientierung des klonierten PCR-Produktes bestimmt werden.

3.7.10. Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden die hergestellten Vektoren bzw. Expressionskonstrukte mittels dem Nucleobond AX 100 Kit (Machery-Nagel, Düren) aus den transformierten Klonen isoliert und aufgereinigt, da die Reinheit der DNA für das Gelingen der Sequenzierung von besonderer Bedeutung ist. Die Methode beruht auf der Basis der Säulen-Affinitätschromatographie.

Die spektralphotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration (vgl. 3.6.) ergab stets eine Reinheit von 1,8 bis 2,0.

Nach eindeutiger Restriktionsanalyse wurde der hergestellte Vektor von der Firma AGOWA GmbH (Berlin) sequenziert. Die Auswertung und Überarbeitung der Chromatogramme erfolgte von Hand.

3.7.11. Expression rekombinanter OmpA-Fragmente in *E. coli*

Das komplette *ompA*-Gen sowie DNA-Fragmente des Gens von *P. mirabilis* wurden über PCR amplifiziert (vgl. 3.7.2. – 3.7.10.) und in den Expressionsvektor pET-28 (vgl. 3.2.5.) kloniert. Anschließend wurden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit diesen Konstrukten transformiert und in einer Übernachtskultur mit LB_{Kan/CAM}-Medium gezüchtet.

Für die Expression der rekombinanten Proteine bzw. Peptide wurde ein Kolben mit 50 ml LB_{Kan/CAM}-Medium mit 2 ml der entsprechenden Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C schüttelnd ca. 3 Stunden inkubiert, wobei die optische Dichte (OD) regelmäßig kontrolliert wurde. Die Zugabe von 1 mM IPTG zur Induktion der Expression erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,6. Unmittelbar vor der Zugabe von IPTG sowie nach 0,5; 1; 2; 3 und 4 Stunden wurde 1 ml der Kultur abgenommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert (13.000 upm, RT, 5 min, Biofuge 13, Heraeus GmbH, Hanau), mit 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 gewaschen, mit 1 µg/ml DNAase versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Sediment in 100 µl Laemmli-Puffer (SDS-haltig) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff lysiert. Ein zusätzlicher Zellaufschluß erfolgte im Ultraschallbad für 10 min.

Laemmli-Puffer:	10% (v/v) Glycerin
	62,5 mM Tris/HCl, pH 6,75
	2% (v/v) SDS
	5% (v/v) β-Mercaptoethanol
	0,001% (w/v) Bromphenolblau

3.8. Statistische Methoden

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden jeweils in Parallelansätzen durchgeführt. Jeder Versuch wurde mindestens einmal wiederholt. Aus den resultierenden arithmetischen Mittelwerten wurde die Standardabweichung für jeden Versuch berechnet. Aus allen Versuchen einer Versuchsreihe wurde der Standardfehler ermittelt [Cavalli-Sforza, 1980].

ERGEBNISSE

4.1. Quantitativer Nachweis von gramnegativen Endotoxinen (LPS) in den verwendeten OmpA Proben

Wie bereits erwähnt gibt es in der Literatur noch keine unumstrittenen Hinweise darauf, daß OmpA ein Agonist für Makrophagen ist. Da OmpA mit LPS fest bindet, und diese Bindung schwierig zu lösen ist, kann eine Verunreinigung mit LPS die Stimulierung von Makrophagen durch OmpA stark beeinflussen. Aus diesem Grund muß darauf geachtet werden, daß OmpA nicht mit LPS verunreinigt ist.

Alle verwendeten OmpA-Proben wurden in verschiedenen Verdünnungen mindestens zweimal nach Angaben des Herstellers mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysat-Assay (LAL) vermessen. Die Mittelwerte der Ergebnisse sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die im LAL-Test untersuchten Stimulatoren. Die in der Zellkultur verwendeten OmpA Proben sind grau unterlegt.

Bezeichnung	aufgereinigt	von	Proteingehalt nach Lowry	LPS-Gehalt
LPS (7) / <i>P.m.</i> 19	(2x ger.) 05.10.93	C. Eckrich	-	-
LPS (11) / <i>E.c.</i>	(2x ger.)	H. Karch	-	-
LPS (14) / <i>P.m.</i> D52	(unger.) 16.02.83	M. Ollman	-	-
OmpA (P2) / <i>P.m.</i> D52	16.11.82	M. Ollman	33,0 %	9,0 %
OmpA (P13) / <i>E.c.</i> B	02.05.95 ger.	R. Schubert	94,1 %	< 1 ‰
OmpA (P14) / <i>E.c.</i> B	02.05.95	R. Schubert	62,3 %	15,0 %
OmpA (P15) / <i>P.m.</i> 19	08.08.91	J. Brauburger	46,1 %	13,7 %
OmpA (P23) / <i>P.m.</i> 19	01.03.94	W. Ruiner	61,8 %	20,5 %
OmpA (P25) / <i>P.m.</i> 19	27.08.92	W. Ruiner	88,7 %	5,3 %
OmpA (P26) / <i>P.m.</i> 19	08.03.91		50,7 %	10,4 %
OmpA (P30) / <i>P.m.</i> 19	27.02.97	W. Ruiner	60,7 %	8,0 %
OmpA (P32) / <i>P.m.</i> 19	02.04.90 ger.	H.-P. Berger	100 %	< 1 ‰
Lipoprotein (P28) / <i>E.c.</i>		J. Gmeiner	96,2 %	-

P.m. = *Proteus mirabilis*; *E.c.* = *Escherichia coli*

4.2. Untersuchungen zur agonistischen Wirkung von OmpA alleine und in Kombination mit LPS auf Makrophagen

Frühere Arbeiten gaben einen Hinweis darauf, daß OmpA ein besonders effektiver Modulator der Immunantwort gegen LPS ist [Nixdorff et al., 1992; Weber et al., 1993; Brauburger, 1996; Nixdorff et al., 1999]. Bei Versuchen an murinen Knochenmarksmakrophagen konnte gezeigt werden, daß OmpA die LPS-induzierte IL-1 β -Produktion auf der Ebene der Transkription hemmte, während es die LPS-induzierte TNF- α -Produktion deutlich verstärkte.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse sollte eine nähere Charakterisierung des OmpA erfolgen. Insbesondere sollten die intrazellulären Prozesse der Wechselwirkung zwischen OmpA und Makrophagen untersucht werden. Diese Prozesse wurden auf der Ebene der Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , TNF- α , IL-6), der Transkription der Gene (IL-1 β -mRNA-Akkumulation) sowie der Promotoraktivität der Gene (IL-1 β -Promotor) untersucht. Die in diesen Versuchen verwendeten Makrophagen stammten aus der Zelllinie RAW 264.7 (TIB-71, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) bzw. wurden als primäre Knochenmarksmakrophagen aus dem Knochenmark von C3H/HeJ-Mäusen gewonnen. In diesem Zusammenhang war es von besonderem Interesse, die Wirkung des OmpA auf die verschiedenen LPS-aktivierten Makrophagen-Typen untereinander zu vergleichen, um Rückschlüsse auf die beteiligten TLR-Rezeptoren zu erhalten.

Dazu wurden verschiedene Proben von OmpA, die zur Verfügung gestellt wurden, verwendet (vgl. Tabelle 1). Diese waren bereits unter Verwendung von 1 % Natriumdesoxycholat aus der äußeren Membran von *E. coli* bzw. *Proteus mirabilis* 19 isoliert und durch zweimalige Säulenchromatographie über Sephadex S-300 (Pharmacia, Freiburg i. B.) aufgereinigt. Um LPS-Kontaminationen weiter zu entfernen, wurde das Protein mit Phenol-Wasser und 1 % Natriumdodecylsulfat behandelt und anschließend aus der Phenolphase mit gleichen Volumina Diethylether und Aceton im Eisbad präzipitiert. Danach erfolgte erneut eine Gelfiltration, wie bereits beschrieben [Weber, 1991]. Der ggf. verbliebene Anteil an LPS-Kontaminationen wurde mittels Limulus-Amöbozyten-Lysat-Assay (Pyroquant Diagnostik GmbH, Mörfelden) bestimmt (vgl. Kapitel 4.1.).

4.2.1. Einfluß von OmpA auf die Zytokinproduktion bei RAW 264.7- und C3H-Makrophagen

Für die Untersuchungen zur Zytokinproduktion nach Zugabe von OmpA wurden OmpA Proben verwendet, die nach dem LAL-Test frei von LPS-Kontaminationen waren (P13 bzw. P32). Zum Vergleich dienten die OmpA Proben (P14 bzw. P25), bei denen eine mäßige LPS-Kontamination festgestellt werden konnte (Tabelle 1). Zur Kontrolle der Stimulierbarkeit der Zellen wurden sie mit Lipoprotein (P28; Braun'sche Lipoprotein, 7 kDa) behandelt.

4.2.1.1. Dosis-abhängiger Einfluß von OmpA auf die Zytokinproduktion bei RAW 264.7- und C3H-Makrophagen

Zunächst wurde die Dosisabhängigkeit der Zytokinproduktion bei RAW 264.7- und C3H-Makrophagen nach Stimulierung mit LPS und OmpA untersucht. Hierzu wurden 8×10^5 Zellen für 24 Stunden mit jeweils den Konzentrationen 0,01; 0,1; 1 und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS bzw. OmpA von *Proteus mirabilis* (P32) und *E. coli* (P13) stimuliert. Zur quantitativen Bestimmung wurde die Produktion des proinflammatorischen IL-1 β in den Zelllysaten in einem ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

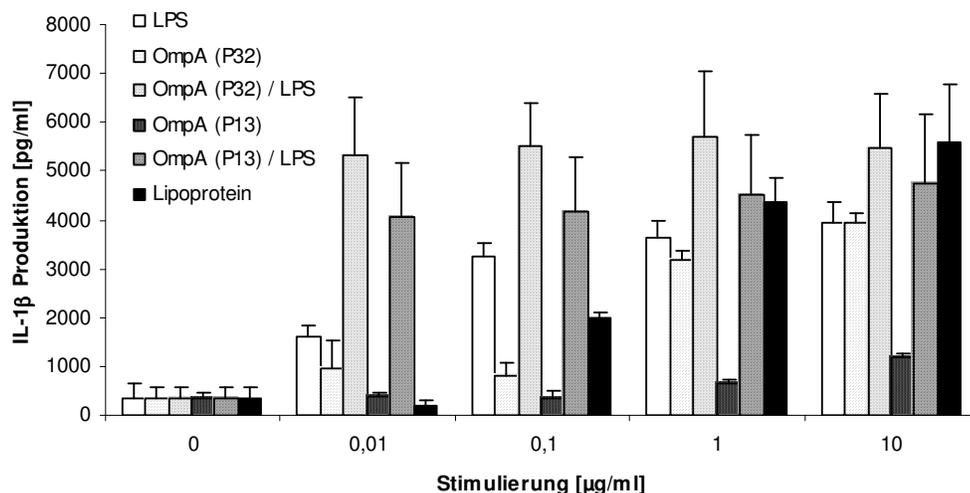


Abb. 7: Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Produktion von IL-1 β in RAW 264.7-Makrophagen. 8×10^5 Makrophagen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an LPS von *Proteus mirabilis* und OmpA von *Proteus mirabilis* (P32) und *E. coli* (P13) stimuliert. Zum Vergleich wurde das Braun'sche Lipoprotein als Agonist verwendet. Der Nachweis von IL-1 β erfolgte im Zelllysate mittels ELISA. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus drei unabhängigen Versuchen.

Die zunehmenden Mengen von LPS führten zu einer kontinuierlich steigenden Produktion von IL-1 β , während die Produktion von IL-1 β nach Stimulierung mit den gleichen Konzentrationen von OmpA weitaus schwächer war und erst bei einer Konzentration von >1 $\mu\text{g/ml}$ zu einer nachweisbaren Zytokinproduktion führte. Auffällig ist, daß die Makrophagen unterschiedlich auf die beiden OmpA Proben bei einer Konzentration von >1 $\mu\text{g/ml}$ reagieren. Erste Hinweise auf diese Beobachtung konnten bereits in früheren Arbeiten gesammelt werden [Brauburger, 1996]. Bei niedrigeren OmpA-Konzentrationen wurden keine großen Unterschiede festgestellt. Interessant ist der additive bzw. synergistische, plateauartige Effekt ab einer Konzentration von 0,01 $\mu\text{g/ml}$ OmpA+LPS.

Zum Vergleich wurden Stimulierungsversuche unter den gleichen Bedingungen mit primären Knochenmarksmakrophagen von C3H/HeJ Mäusen durchgeführt, um Effekte durch LPS auszuschließen. Da diese Mäuse eine Mutation im TLR-4-Gen haben, reagieren ihre Makrophagen als „low responders“ auf LPS. Sie werden jedoch deutlich von anderen mikrobiellen Komponenten, wie das Lipoprotein der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, aktiviert, da dieses einen anderen TLR als Rezeptor verwendet (TLR2). Zur Kontrolle wurden die Zellen wieder mit Lipoprotein von *E. coli* stimuliert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

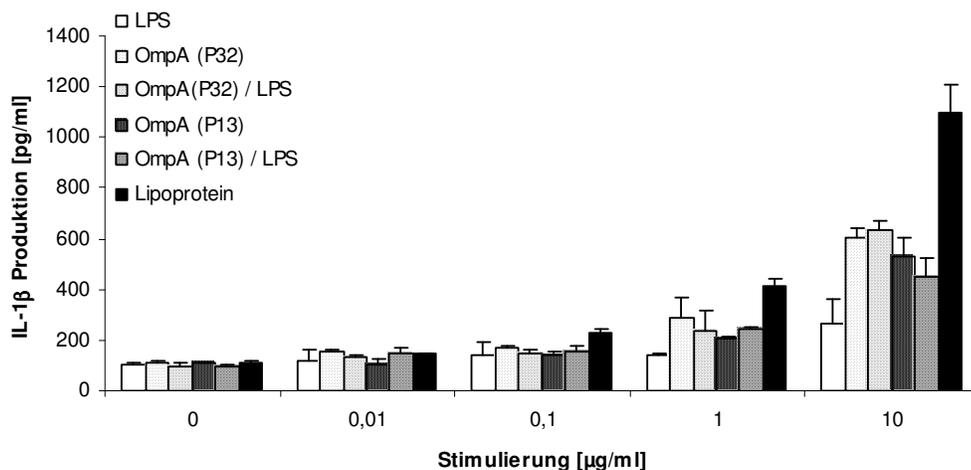


Abb. 8: Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Produktion von IL-1 β in Knochenmarksmakrophagen von C3H/HeJ Mäusen. 8×10^5 Makrophagen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an LPS von *Proteus mirabilis* und OmpA von *Proteus mirabilis* (P32) und *E. coli* (P13) stimuliert. Zum Vergleich wurde das Braun'sche Lipoprotein als Agonist verwendet. Der Nachweis von IL-1 β erfolgte im Zelllysate mittels ELISA. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus drei unabhängigen Versuchen.

Wie der Abbildung 8 zu entnehmen ist, produzierten die Knochenmarksmakrophagen der C3H/HeJ-Mäuse weitaus weniger IL-1 β , als dies bei den RAW-Zellen gemessen wurde.

Die Stimulierung mit LPS führte bei den Knochenmarksmakrophagen der C3H/HeJ Mäuse zu keiner nennenswerten Zytokinproduktion. Dagegen nahm die Produktion von IL-1 β nach der Stimulierung mit OmpA bei einer Konzentration von > 1 $\mu\text{g/ml}$ Protein geringfügig zu. Eine unterschiedliche Wirkungsweise beider OmpA Proben, wie sie bei den Versuchen an den RAW 264.7-Makrophagen festgestellt wurde, trat hier nicht auf. Auch der additive Effekt von LPS+OmpA konnte hier nicht beobachtet werden.

Die generelle Stimulierbarkeit der Zellen konnte mit der Behandlung von Lipoprotein gezeigt werden. Die vergleichsweise starke Reaktion ist auf die unterschiedliche Aktivierung der intrazellulären Signalkaskade zurückzuführen, die bei Stimulierung mit Lipoprotein nicht über den TLR4, sondern über den TLR2-Rezeptor vermittelt wird.

Zur quantitativen Bestimmung der Produktion von TNF- α erfolgte der Nachweis in den Kulturüberständen aus der oben beschriebenen Stimulierung mittels ELISA. Die Ergebnisse der RAW 264.7-Makrophagen sind in der Abbildung 9, die Ergebnisse der Makrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen in der Abbildung 10 dargestellt.

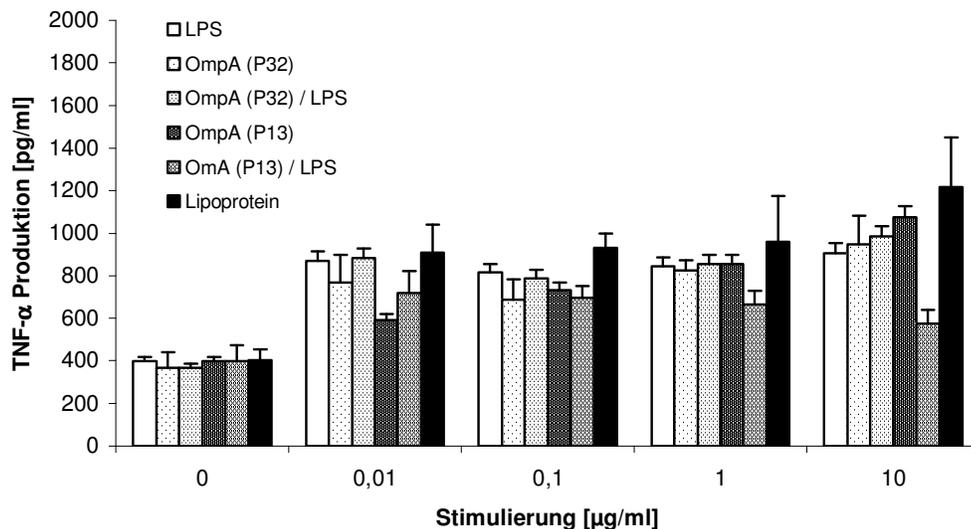


Abb. 9: Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Produktion von TNF- α in RAW 264.7-Makrophagen. 8×10^5 Makrophagen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an LPS von *Proteus mirabilis* und OmpA von *Proteus mirabilis* (P32) und *E. coli* (P13) stimuliert. Zum Vergleich wurde das Braun'sche Lipoprotein als Agonist verwendet. Der Nachweis von TNF- α erfolgte im Kulturüberstand mittels ELISA. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Das TNF- α wurde in den RAW 264.7-Makrophagen, anders als das IL-1 β , nach der Stimulierung mit LPS plateauartig produziert. D.h., die Konzentration von 0,01 $\mu\text{g/ml}$ war bereits in der Lage, eine ähnliche Menge an TNF- α zu induzieren, wie 10 $\mu\text{g/ml}$ Antigen. Eine stetige Zunahme der Zytokinproduktion, wie bei der IL-1 β -Produktion, konnte hier nicht beobachtet werden. Dagegen konnte ein dosisabhängiger Effekt nach Stimulierung mit den beiden OmpA Proben (P13 und P32) beobachtet werden, auch wenn die Zunahme der TNF- α -Produktion geringer war im Vergleich mit IL-1 β -Produktion (vgl. Abbildung 7).

Bei der Stimulierung der Makrophagen mit dem LPS-OmpA-Komplex konnte bei dem OmpA von *Proteus mirabilis* ein plateauartiger Dosisseffekt, vergleichbar dem LPS, beobachtet werden. Es konnte allerdings kein additiver bzw. synergistische Effekt beobachtet werden. Der LPS-OmpA-Komplex von *E.coli* führte sogar zu einer deutlichen Abnahme der TNF- α -Menge bei Konzentrationen $> 0,1 \mu\text{g/ml}$ Antigen.

Wie auch bei den vorangegangenen Untersuchungen bei den Makrophagen der C3H/HeJ-Mäuse war auch die absolute TNF- α -Produktion im Vergleich mit den RAW 264.7-Makrophagen geringer (vgl. Abbildung 10). Die Stimulierung durch LPS war erwartungsgemäß schwach.

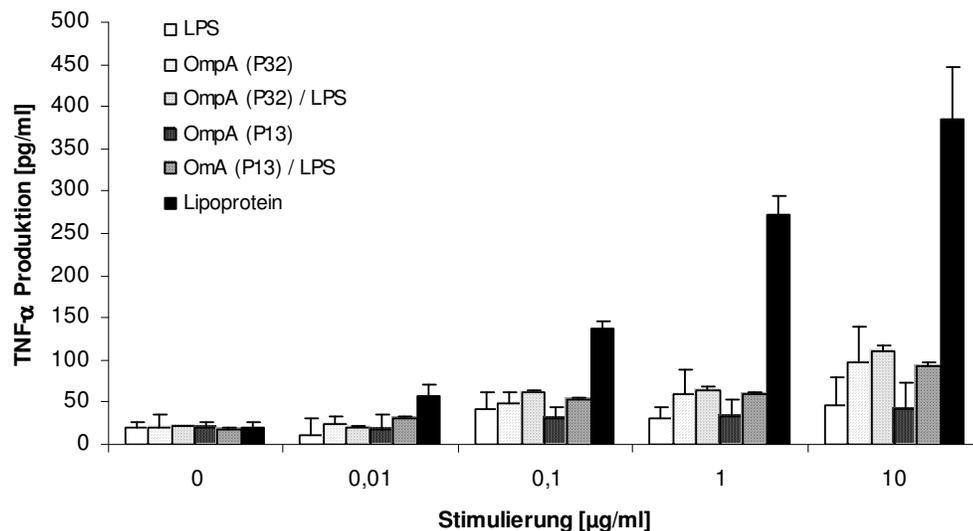


Abb. 10: Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Produktion von TNF- α in Knochenmarksmakrophagen von C3H/HeJ-Mäusen. 8×10^5 Makrophagen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an LPS von *Proteus mirabilis* und OmpA von *Proteus mirabilis* (P32) und *E. coli* (P13) stimuliert. Zum Vergleich wurde das Braun'sche Lipoprotein als Agonist verwendet. Der Nachweis von TNF- α erfolgte im Kulturüberstand mittels ELISA. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Ähnlich der Produktion von IL- β war hier eine sehr geringe aber stetige Zunahme der TNF- α -Produktion nach Stimulierung mit OmpA aus *Proteus mirabilis* zu erkennen, ebenso wie nach Stimulierung mit dem LPS-OmpA-Komplex.

Das OmpA von *E. coli* führte zu keiner nennenswerten TNF- α -Produktion, lediglich der LPS-OmpA-Komplex zeigte einen geringfügig verstärkten Effekt, der jedoch nicht signifikant war.

Ein weiterer Aspekt der Untersuchungen war die Produktion von IL-6 in Abhängigkeit der LPS- bzw. OmpA-Konzentration in Makrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen. Zur quantitativen Bestimmung wurde die Produktion des IL-6 in den Zellkulturüberständen in einem ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.

Während diese Makrophagen aufgrund ihres defekten TLR4-Rezeptors keine signifikanten Mengen IL-6 nach LPS-Stimulierung produzieren, ist eine deutliche Produktion von IL-6 nach OmpA-Induktion zu erkennen, wobei beide OmpA Proben vergleichbare Mengen von IL-6 induzierten.

Dieser Effekt ist deutlich bei Konzentrationen von $> 0,1 \mu\text{g/ml}$ Agonist zu erkennen.

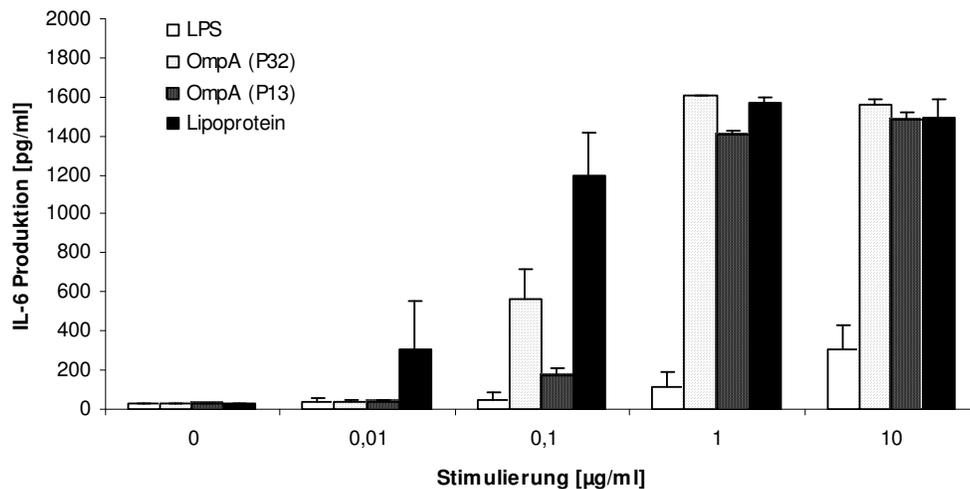


Abb. 11: Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Produktion von IL-6 in Knochenmarksmakrophagen von C3H/HeJ-Mäusen. 8×10^5 Makrophagen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an LPS von *Proteus mirabilis* und OmpA von *Proteus mirabilis* (P32) und *E. coli* (P13) stimuliert. Zum Vergleich wurde das Braun'sche Lipoprotein als Agonist verwendet. Der Nachweis von IL-6 erfolgte in Kulturüberständen mittels ELISA. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Diese Ergebnisse deuten an, daß eine signifikante Stimulierung von Makrophagen zur IL-1 β - oder TNF- α -Produktion durch OmpA nur in Verbindung mit LPS stattfinden kann. Die Untersuchungen an den TLR4-defekten Makrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen haben diese Annahme unterstrichen. Erst wenn sehr hohe Konzentrationen des Agonisten eingesetzt wurden, konnte eine geringfügige Produktion von IL-1 β oder TNF- α beobachtet werden.

Allerdings erfolgte eine deutliche Stimulierung von Makrophagen zur IL-6-Produktion mit OmpA alleine. Ab einer Dosis von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ war dieser Respons mit dem des Lipoproteins sogar vergleichbar.

Diese Ergebnisse zeigen bereits, daß die Stimulierung der Makrophagen zur Zytokinproduktion durch LPS und OmpA über getrennte Signaltransduktionswege erfolgen muß.

An dieser Stelle läßt sich festhalten, daß eine Agonistkonzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für die weiteren Untersuchungen geeignet ist, um die Unterschiede in der Zytokinproduktion ausführlicher zu untersuchen.

4.2.1.2. Effekte von Polymyxin B auf die Produktion von IL-1 β nach Stimulierung mit LPS und OmpA bei RAW 264.7- und C3H/HeJ-Makrophagen

Polymyxin B (PMB, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) ist ein kationisches Peptid und gehört zur Wirkstoffgruppe der Polypeptid-Antibiotika. Im Pharmabereich wird es zur Behandlung von bakteriell infizierten Hautstellen und bakteriellen Infektionen im Bereich des Auges eingesetzt. PMB bindet an die Zytoplasmamembran von gramnegativen Bakterien, erhöht spezifisch die Permeabilität der Membran und führt so zur Schädigung der Zytoplasmamembran und Efflux essentieller Komponenten. Die Bindung erfolgt über die anionischen Gruppen des LPS, was den Aktivitätsverlust des LPS zur Folge hat [Brandenburg et al., 2002].

Um auszuschließen, daß der induzierende Effekt von OmpA auf die Produktion von IL-1 β auf geringe LPS-Verunreinigungen zurückzuführen ist, wurden die Makrophagen in Gegenwart von 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PMB mit LPS und OmpA stimuliert. Da *Proteus mirabilis*, wegen der vorhandenen 4-Amino-L-Arabinose, eine hohe Resistenz gegenüber PMB aufweist

[Radziejeweska-Lebrecht et al., 1990; Kaca et al., 1990], wurden in diesem Versuch ausschließlich OmpA Proben (P13 und P14) von *E.coli* verwendet. Zur quantitativen Bestimmung wurde die Produktion von IL-1 β in den Zellysaten in einem ELISA gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 12 dargestellt.

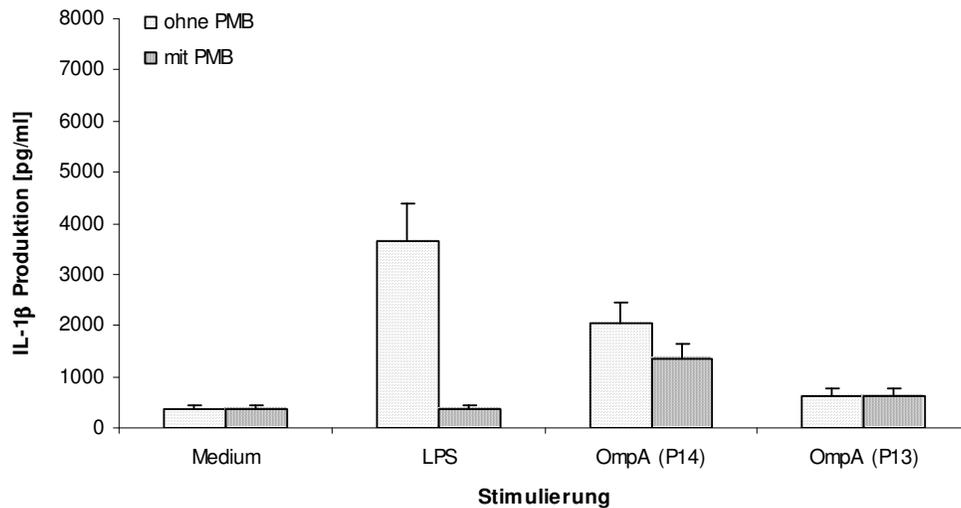


Abb. 12: Einfluß von Polymyxin B auf die Produktion von IL-1 β in RAW 264.7-Makrophagen nach Stimulierung mit LPS und OmpA. 8×10^5 Makrophagen wurden für 24 Stunden mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS von *E. coli* und $1 \mu\text{g/ml}$ OmpA von *E. coli* (P13, P14) in Anwesenheit und Abwesenheit von $5 \mu\text{g/ml}$ Polymyxin B stimuliert. Der Nachweis von IL-1 β erfolgte im Zellysat mittels ELISA. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Wie der Abbildung 12 zu entnehmen ist, war der Einfluß von PMB auf die LPS-induzierte Produktion von IL-1 β deutlich zu beobachten. So war die gemessene IL-1 β -Konzentration mit der des Mediums vergleichbar. Der Effekt von LPS wurde komplett aufgehoben.

Die IL-1 β -Produktion nach Stimulierung der RAW 264.7-Makrophagen mit der OmpA Probe P14 lag erheblich über der ermittelten IL-1 β -Konzentration nach Induktion mit der zweiten OmpA Probe (P13). Dies resultiert hauptsächlich aus der relativ hohen LPS-Verunreinigung von 15% (Tabelle 1). Daher läßt sich auch die Wirkung des PMB auf das OmpA P14 erklären.

Da das PMB keinen Einfluß auf die IL-1 β -Produktion nach der Stimulierung mit OmpA P13 hatte, ist dies ein weiterer Hinweis, daß die Probe OmpA P13 frei von nachweisbaren Verunreinigungen mit LPS ist.

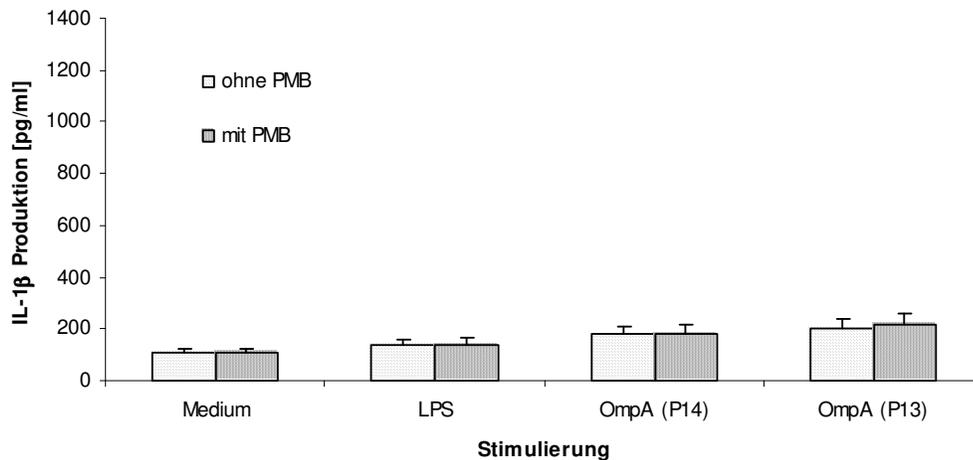


Abb. 13: Einfluß von Polymyxin B auf die Produktion von IL-1 β in Knochenmarksmakrophagen von C3H/HeJ-Mäusen nach Stimulierung mit LPS und OmpA. 8×10^5 Makrophagen wurden für 24 Stunden mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS von *E. coli* und $1 \mu\text{g/ml}$ OmpA von *E. coli* (P13, P14) in Gegenwart von $5 \mu\text{g/ml}$ Polymyxin B stimuliert. Der Nachweis von IL-1 β erfolgte im Zelllysate mittels ELISA. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Anders als bei den RAW 264.7-Makrophagen hatte das PMB bei den Knochenmarksmakrophagen der C3H/HeJ-Mäuse keinen Einfluß auf die IL-1 β -Produktion. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. Dabei führte das OmpA P14 mit einer LPS-Verunreinigung von 15% zu keiner signifikanten Erhöhung der IL-1 β -Produktion. Ebenfalls konnte kein Einfluß von PMB auf die IL-1 β -Produktion unter den gegebenen Bedingungen festgestellt werden, was durch den defekten TLR4-Rezeptor dieser Mäuse zu erklären ist.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die C3H/HeJ-Makrophagen nicht auf LPS reagieren, auch nicht, wenn OmpA mit LPS verunreinigt ist.

Die Versuche mit Polymyxin B haben gezeigt, daß das OmpA P13 eine geeignete OmpA-Probe für weitere Untersuchungen darstellt.

4.2.1.3. Effekte von Staurosporin auf die Zytokinproduktion bei C3H/HeJ-Makrophagen

Analog der Bestimmung der IL-1 β -Produktion nach Stimulierung mit LPS und OmpA wurde der Effekt von Staurosporin auf die OmpA-induzierte Produktion von IL-1 β untersucht.

Bisherige Ergebnisse der Arbeitsgruppe [Schilling et al., 1997; Schilling, 2000; Schilling et al., 2001] haben gezeigt, dass der Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin eine negative Regulation der LPS-induzierten Produktion von IL-1 β aufhob. Es war von großem Interesse zu prüfen, ob die Induktion der IL- β -Produktion durch OmpA ähnlich reguliert wird.

Hierzu wurden RAW 264.7-Makrophagen (Daten nicht gezeigt) und Knochenmarksmakrophagen aus C3H/HeJ Mäusen für 24 Stunden mit verschiedenen OmpA-Konzentrationen bei Zugabe von 50 nM Staurosporin stimuliert. Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass Staurosporin-Konzentrationen von 50 nM eine signifikante Erhöhung der LPS-induzierten IL-1 β -Produktion bewirken, ohne dabei zytotoxisch oder apoptotisch auf die Knochenmarksmakrophagen zu wirken [Schilling, 2000]. Die IL-1 β -Produktion in den Zelllysaten wurde anschließend in einem ELISA gemessen. Die ermittelten Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt.

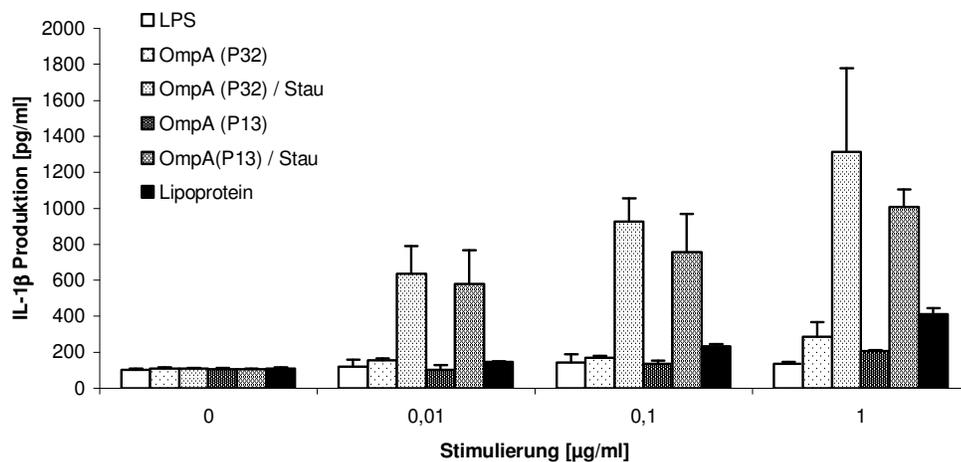


Abb. 14: Einfluß von Staurosporin auf die OmpA-induzierte Produktion von IL-1 β in Knochenmarksmakrophagen von C3H/HeJ-Mäusen. 8×10^5 Makrophagen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an LPS von *Proteus mirabilis* und OmpA von *Proteus mirabilis* (P32) und *E. coli* (P13) in Gegenwart von 50 nM Staurosporin stimuliert. Zum Vergleich wurde das Braun'sche Lipoprotein als Agonist verwendet. Der Nachweis von IL-1 β erfolgte im Zelllysate mittels ELISA. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Wie der Abbildung 14 zu entnehmen ist, wurde die OmpA-induzierte Produktion von IL-1 β nach Zugabe von Staurosporin deutlich erhöht. Sie lag signifikant über der durch Lipoprotein verursachte IL-1 β -Konzentrationen. Unterschiede zwischen den verwendeten OmpA Proben konnten nicht beobachtet werden.

Vor dem Hintergrund, daß die OmpA Proben P13 und P32 frei von LPS-Kontaminationen sind (vgl. Tab. 1 sowie Abb. 12 und 13), könnten diese Ergebnisse darauf hindeuten, daß OmpA generell eine Repression der IL-1 β -Produktion vermittelt (vgl. Abb. 7 und 8), die durch Staurosporin aufgehoben wäre.

4.2.2. Einfluß von OmpA auf die Produktion von reaktivem Stickstoffmonoxid (NO) bei RAW 264.7- und C3H/HeJ-Makrophagen

4.2.2.1. Dosis-abhängiger Einfluß von OmpA auf die NO Produktion bei RAW 264.7- und C3H/HeJ-Makrophagen

Um einen besseren Einblick in die unterschiedliche Regulation der Zytokinproduktion und zum Vergleich mit den Ergebnissen aus dem IL-1 β -ELISA wurde zunächst die Produktion von reaktiven Stickstoffmonoxid (NO) in Abhängigkeit der LPS- bzw. OmpA-Konzentration in RAW 264.7 Makrophagen und C3H/HeJ-Makrophagen gemessen.

Das NO ist ein radikales Gas, das sowohl zytotoxisch als auch regulatorisch wirksam sein kann. Nerven-, Immun- und Kardiovaskular-Systeme werden in entscheidendem Maße von NO reguliert.

In den folgenden Versuchen wurden 8×10^5 RAW 264.7-Zellen und Knochenmarksmakrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen für 24 Stunden mit verschiedenen LPS- bzw. OmpA-Konzentrationen stimuliert. Das NO wurde in Form von Nitrit (Oxidation von NO an der Luft) in den Zellkulturüberständen gemessen. Der Nachweis von Nitrit/NO erfolgte in den Zellkulturüberständen mittels Griess-Ilosvays-Reagenz. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt.

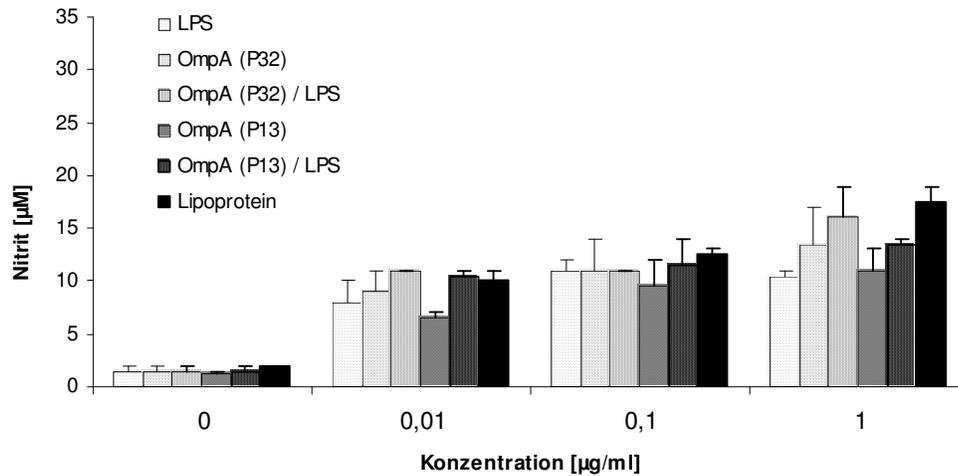


Abb. 15: Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Produktion von NO in RAW 264.7-Makrophagen. 8×10^5 Makrophagen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an LPS von *Proteus mirabilis* und OmpA von *Proteus mirabilis* (P32) und *E. coli* (P13) stimuliert. Zum Vergleich wurde das Braun'sche Lipoprotein als Agonist verwendet. Der Nachweis von Nitrit erfolgte in den Kulturüberständen mittels Griess-Ilosvays-Reagenz. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus drei unabhängigen Versuchen.

Wie der Abbildung 15 zu entnehmen ist, produzieren RAW 264.7-Makrophagen signifikante Mengen von NO. Im Vergleich zu den Versuchen, bei denen der Einfluß auf die IL-1 β -Produktion gemessen wurde, nimmt die NO Produktion mit steigender LPS-Konzentration nur schwach zu. Eine ähnlich schwache Zunahme der NO Produktion ist nach Stimulierung mit OmpA zu erkennen. Der Einfluß beider Stimulatoren (LPS und OmpA) ist annähernd gleich.

Die Stimulierung mit dem LPS-OmpA-Komplex führte zu keiner wesentlichen Steigerung der NO-Produktion.

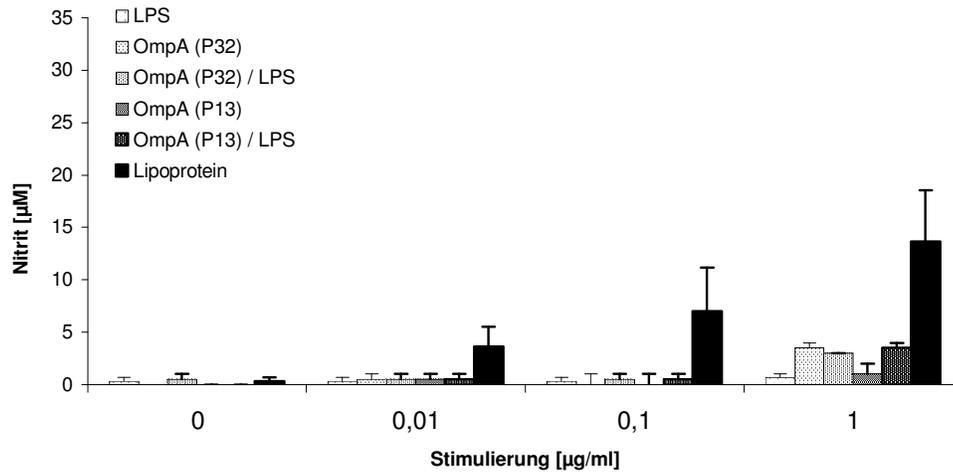


Abb. 16: Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Produktion von NO in Knochenmarksmakrophagen von C3H/HeJ-Mäusen. 8×10^5 Makrophagen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an LPS von *Proteus mirabilis* und OmpA von *Proteus mirabilis* (P32) und *E. coli* (P13) stimuliert. Zum Vergleich wurde das Braun'sche Lipoprotein als Agonist verwendet. Der Nachweis von Nitrit erfolgte in den Kulturüberständen mittels Griess-Ilosvays-Reagenz. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus drei unabhängigen Versuchen.

Wie der Abbildung 16 zu entnehmen ist, gibt es einen deutlichen Unterschied in der NO-Produktion beider Zelltypen. Während RAW-Zellen NO nach LPS- oder OmpA-Induktion produzieren, konnte bei C3H/HeJ-Makrophagen keine signifikante NO Produktion festgestellt werden.

Auch bei dieser Stimulierung haben die Komplexe mit LPS und OmpA keine Steigerung der NO-Produktion bewirkt.

4.2.2.2. Kinetik der NO Produktion nach Stimulierung mit LPS und OmpA bei C3H/HeJ-Makrophagen

Um den Ablauf der Stimulierung verfolgen zu können, wurden Zeitkinetikversuche zur Bestimmung der NO-Produktion nach Induktion mit LPS, OmpA und Lipoprotein durchgeführt. Dabei sollte die Abhängigkeit der LPS- bzw. OmpA-induzierte Produktion von NO mit der Zeit bei C3H/HeJ-Makrophagen untersucht werden. Die Makrophagen (8×10^5 Zellen) wurden dabei mit je $1 \mu\text{g/ml}$ LPS bzw. $10 \mu\text{g/ml}$ OmpA (P13 und P32) zu verschiedenen Zeiten stimuliert. Zur Kontrolle der Stimulierbarkeit wurden die Zellen zusätzlich mit Lipoprotein behandelt.

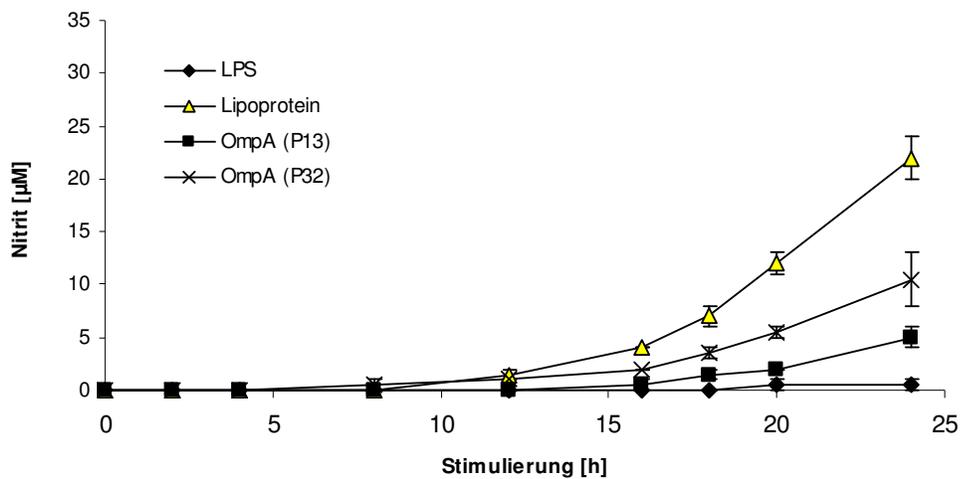


Abb. 17: Kinetik der NO Produktion in C3H/HeJ-Mäusen. 8×10^5 Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS von *Proteus mirabilis* und $10 \mu\text{g/ml}$ OmpA von *Proteus mirabilis* (P32) und *E. coli* (P13) sowie $1 \mu\text{g/ml}$ Braun'schem Lipoprotein stimuliert. Der Nachweis von Nitrit erfolgte in den Kulturüberständen mittels Griess-Ilosvays-Reagenz. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Wie der Abbildung 17 zu entnehmen ist, erfolgt keine NO-Produktion nach Stimulierung mit LPS. Eine relativ schwache OmpA-induzierte NO Produktion ist dagegen nach 18 Stunden zu erkennen. Auch an dieser Stelle konnte im Vergleich beider OmpA Proben miteinander eine stärkere Stimulierbarkeit der Knochenmarksmakrophagen durch das OmpA von *Proteus mirabilis* festgestellt werden.

Die relativ gute NO Produktion nach Stimulierung mit Lipoprotein erfolgte zu einem sehr späten Zeitpunkt, nämlich erst nach 12 Stunden.

4.2.3. Kinetik der Produktion von IL-1 β nach Stimulierung mit LPS und OmpA bei C3H/HeJ-Makrophagen

In der folgenden Studie wurde die Produktion von IL-1 β durch C3H/HeJ-Makrophagen zu verschiedenen Zeiten der Stimulierung mit OmpA untersucht. Die Makrophagen wurden dabei mit je 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$ OmpA (P13 und P32) zu verschiedenen Zeiten stimuliert. Zur Kontrolle der Stimulierbarkeit wurden die Zellen zusätzlich mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Lipoprotein behandelt.

Wie der Abbildung 18 zu entnehmen ist, wurden erwartungsgemäß keine signifikanten Mengen an IL-1 β in den C3H/HeJ-Makrophagen nach LPS-Induktion produziert. Nach Stimulierung mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Lipoprotein konnten jedoch hohe IL-1 β -Konzentrationen in den Zelllysaten gemessen werden. Die maximale IL-1 β -Konzentration wurde nach 16 Stunden (ca. 5 ng/ml) erreicht.

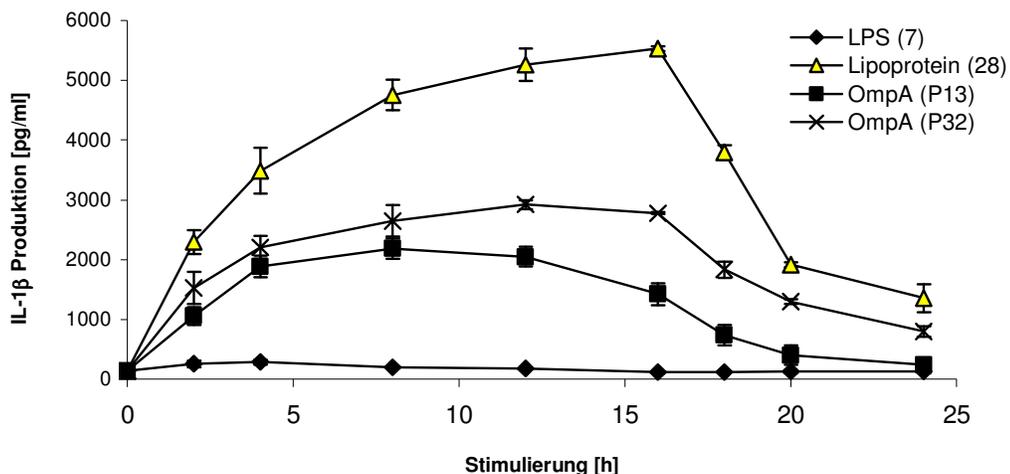


Abb. 18: Kinetik der IL-1 β -Produktion in C3H/HeJ-Mäusen. 8×10^5 Makrophagen wurden für verschiedene Zeiten mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS von *Proteus mirabilis* und 10 $\mu\text{g/ml}$ OmpA von *Proteus mirabilis* (P32) und *E. coli* (P13) sowie 1 $\mu\text{g/ml}$ Lipoprotein stimuliert. Der Nachweis von IL-1 β erfolgte im Zelllysate mittels ELISA. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Die Stimulierung mit den beiden OmpA Proben führte lediglich zu einer mäßigen Produktion von IL-1 β , die im Verlauf wieder abnahm. Das Maximum nach Stimulierung mit dem OmpA von *E.coli* (P13) wurde nach 8 Stunden erreicht. Dagegen war die IL-1 β -Produktion nach Stimulierung mit dem OmpA von *Proteus mirabilis* (P32) länger anhaltend

und die höchste Konzentration wurde erst nach 12 Stunden erreicht. Unstimulierte Zellen produzierten keine signifikanten Mengen an IL-1 β .

Die IL-1 β -Produktion sank bei allen Stimulierungen nach Erreichen des Maximums bis zum Ende der Inkubationszeit ab.

Diese kinetische Studie der IL-1 β -Produktion in C3H/HeJ-Makrophagen hat gezeigt, daß OmpA eine schwache aber deutliche, jedoch transiente Induktion von IL-1 β bewirken konnte.

4.2.4. Transkription der Gene für IL-1 β in C3H/HeJ-Makrophagen nach Stimulierung mit LPS und OmpA

Frühere Arbeiten an Knochenmarksmakrophagen [Brauburger, 1996; Schilling et al., 2001] haben gezeigt, daß ein hohes Maß an Übereinstimmung zwischen der Transkription der Gene und der Zytokinproduktion besteht. Zur Überprüfung, ob diese Beobachtung auch auf C3H/HeJ-Makrophagen zutrifft, wurde zunächst die Kinetik der Transkription von IL-1 β nach Stimulierung mit LPS und OmpA aus *E. coli* in Northern-Analysen untersucht. Des Weiteren wurden Northern Analysen auch durchgeführt, um festzustellen, ob der beobachtete Effekt von Staurosporin auf die Zytokinproduktion bereits auf der Ebene der Zytokintranskription auftritt.

4.2.4.1. Kinetik der Transkription von IL-1 β in C3H/HeJ-Makrophagen nach Stimulierung mit LPS und OmpA

Vergleichend zu den bereits vorhandenen Ergebnissen aus den Zeitkinetikmessungen zur Zytokinproduktion (vgl. Kapitel 4.2.3.) wurden Zeitkinetikstudien zur Bestimmung der OmpA-induzierten IL-1 β -mRNA-Akkumulation an Knochenmarksmakrophagen von C3H/HeJ-Mäusen mittels Northern-Analyse durchgeführt.

Hierzu wurden $3,2 \times 10^6$ Knochenmarksmakrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen für verschiedene Zeiten mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS von *Proteus mirabilis*, $1 \mu\text{g/ml}$ OmpA von *E. coli* (P13) und $1 \mu\text{g/ml}$ Lipoprotein stimuliert. Zur quantitativen Bestimmung der Transkription wurde die gesamte RNA isoliert und aufgereinigt. Jeweils $10 \mu\text{g}$ Gesamt-RNA wurden in der Northern-Analyse mit einer DIG-markierten IL-1 β -mRNA-Sonde (cDNA) untersucht. Als Auftragskontrolle der RNA wurde eine β -Aktin-mRNA-Sonde verwendet, da das Gen für β -Aktin in Makrophagen konstitutiv exprimiert wird [Contel et al., 1993]. Zudem haben frühere Untersuchungen [Brauburger, 1996] gezeigt, daß die β -Aktin-mRNA-Akkumulation in Knochenmarksmakrophagen weder durch LPS noch durch OmpA beeinflusst wird. Die auf den Filmen der Northern-Analyse detektierten Schwärzungsbanden wurden densitometrisch ausgewertet. Dabei wurde der densitometrische Wert der Schwärzungsbande der IL-1 β -Sonde auf den entsprechenden Wert der Schwärzungsbande durch die β -Aktin-Sonde bezogen. Der auf diese Weise ermittelte (Verhältnis-)Wert ist somit dimensionslos und wird als IL-1 β -mRNA-Level bezeichnet. Unstimulierte Zellen der durchgeführten Versuche zeigten sowohl nach 2 Stunden wie auch nach 24 Stunden keine nachweisbare mRNA-Menge (nicht gezeigt). Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

4.2.4.2. Effekte von Staurosporin auf die IL-1 β -mRNA-Menge in C3H-Makrophagen nach Stimulierung mit LPS und OmpA

In diesen kinetischen Untersuchungen der IL-1 β -Transkription wurden $3,2 \times 10^6$ C3H-Makrophagen für verschiedene Zeiten mit OmpA aus *E. coli* in Anwesenheit von 50 mM Staurosporin stimuliert. Die Zugabe von Staurosporin erfolgte unter gleichzeitig mit der OmpA-Stimulierung. Die Bestimmung der IL-1 β -Akkumulation erfolgte und den gleichen Bedingungen wie im Kapitel 4.2.3.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

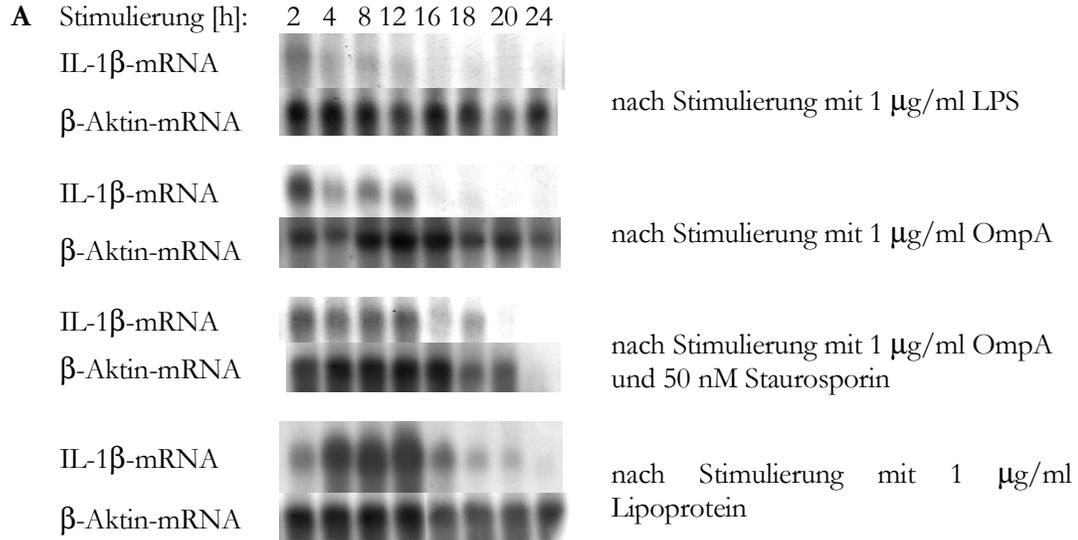
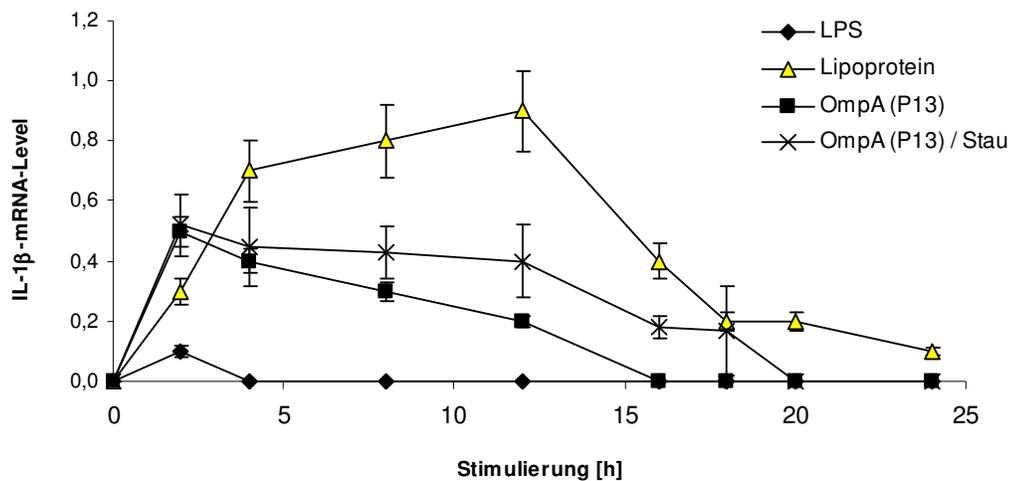
**B**

Abb. 19: Kinetik der Transkription von IL-1 β in C3H/HeJ-Mäusen. $3,2 \times 10^6$ Knochenmarksmakrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen wurden für verschiedene Zeiten mit 1 μ g/ml LPS von *Proteus mirabilis*, 1 μ g/ml OmpA von *E. coli* (P13) in An- und Abwesenheit von 50 nM Staurosporin und 1 μ g/ml Lipoprotein stimuliert. Jeweils 10 μ g der RNA-Extrakte dieser Zellen wurden im Northern-Blot-Verfahren mit DIG-markierten IL-1 β - und β -Aktin-mRNA-Sonden untersucht (A). Exemplarisch sind die Ergebnisse aus einem Versuch dargestellt. In B ist die graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung von zwei unabhängigen Versuchen gezeigt. Aufgetragen sind die relativen RNA-Verhältnisse (IL-1 β / β -Aktin) aus den Schwärzungsbanden des Röntgenfilms. Bei unstimulierten Zellen wurde keine nachweisbare Transkription des IL-1 β -Gens beobachtet. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Wie der Abbildung 19 zu entnehmen ist, konnte keine nennenswerte IL-1 β -mRNA Akkumulation nach der Stimulierung der Knochenmarksmakrophagen mit LPS beobachtet werden.

Nach Stimulierung mit Lipoprotein konnte dagegen eine stetige Zunahme der mRNA-Menge über einen Zeitraum von 12 Stunden festgestellt werden, wobei die RNA-Akkumulation danach schrittweise abnahm.

Obwohl die Menge der IL-1 β -Transkripte nach OmpA-Stimulierung der Makrophagen insgesamt relativ gering war, zeigten die Ergebnisse deutliche Tendenzen.

Die Stimulierung mit OmpA von *E. coli* erreichte bereits nach 2 Stunden das Transkriptionsmaximum. Im weiteren Verlauf nahm die RNA-Akkumulation stetig ab, wobei nach 16 Stunden keine signifikante RNA-Akkumulation mehr gemessen werden konnte.

Zudem konnte ein geringerer Effekt von Staurosporin auf die Transkription von IL-1 β nach OmpA-Induktion beobachtet werden. Demnach vermittelt Staurosporin auch auf Ebene der Transkription eine Zunahme der IL-1 β -mRNA-Akkumulation bei gleichzeitiger Stimulierung mit OmpA.

Im Vergleich mit den Ergebnissen zur IL-1 β -Produktion (vgl. Kapitel 4.2.3.) korrelieren die Ergebnisse miteinander. Der Verlauf der Transkription und Sekretion von IL-1 β nach Stimulierung mit LPS, OmpA aus *E. coli* oder Lipoprotein ist annähernd vergleichbar, wenn auch die Transkription nachvollziehbar früher als die Sekretion stattfindet.

Diese an C3H-Makrophagen gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß es eine gute Übereinstimmung zwischen der Transkription der Gene und der Zytokinproduktion gibt.

4.2.5. Einfluß von OmpA auf die Promotoraktivität des IL-1 β -Gens bei RAW 264.7-Makrophagen

Nachdem die durchgeführten Untersuchungen gezeigt haben, daß OmpA auf der Ebene der Zytokinproduktion und Zytokintranskription einen geringen, aber deutlichen Effekt gezeigt haben, sollte in weiteren Untersuchungen geprüft werden, ob OmpA ebenfalls eine Erhöhung der IL-1 β -Promotoraktivität in Makrophagen vermittelt.

Die Untersuchungen zur IL-1 β -Promotoraktivität wurden mit RAW 264.7-Makrophagen durchgeführt, da sich die Knochenmarksmakrophagen der C3H-Mäuse trotz vielfach durchgeführter Transfektionsversuche auch bei der Anwendung verschiedener Transfektionsmethoden (Ca_2PO_4 -Präzipitation, Superfect- und Effectene-Methode von Qiagen, Dextransulfat-Methode und Elektroporation) nicht reproduzierbar transfizieren ließen.

Die Transfektionsexperimente wurden mit einem Reporter-gen-Konstrukt pXT-luc durchgeführt, das die vollständige Enhancer- und Promotor-Sequenz des IL-1 β -Gens, sowie ein Reporter-gen (Luziferase-Gen) enthält. Der Vorteil von Reporter-gen-Konstrukten ist ihre bis zu 100fach höhere Sensitivität verglichen mit anderen Nachweissystemen [de Wet et al., 1987; Williams et al., 1989]. So kann die Aktivität der Enhancer- und Promotorregion des IL-1 β -Gens in den Zellen indirekt über die Menge des gebildeten Reporter-gen-Produktes Luziferase gemessen werden.

Dazu wurden 5×10^6 Zellen unter Verwendung der Ca_2PO_4 -Methode mit 10 μg des Reporter-genkonstruktes pXT-luc transfiziert. Nach 18 stündiger Inkubation erfolgte die Stimulierung mit verschiedenen Konzentrationen von LPS und OmpA (P13) für 24 Stunden. Nach Aufschluß der Zellen mit Lysepuffer und Zugabe von Luziferin (Substrat der Luziferase) wurde die Luziferaseaktivität in den Zellysaten in einem Luminometer bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

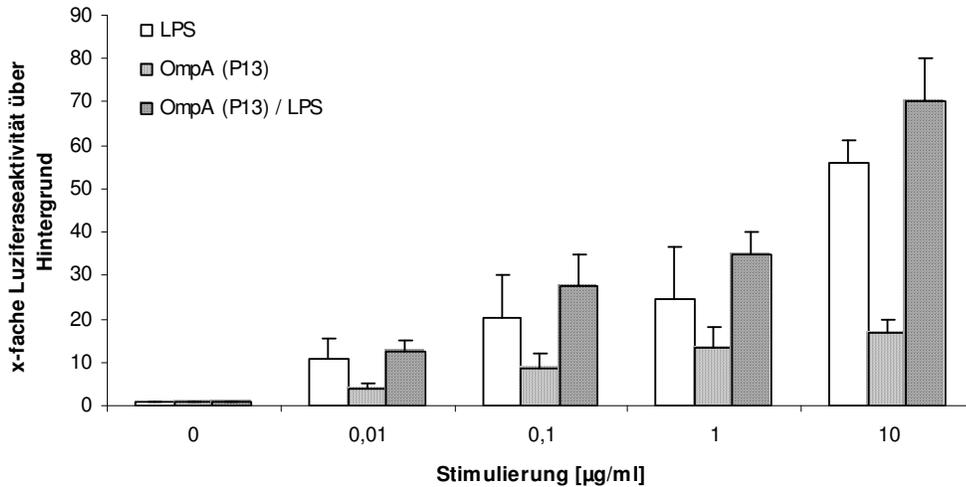


Abb. 20: Einfluß verschiedener Agonist-Konzentrationen auf die Aktivität der vollständigen humanen IL-1 β -Enhancer- und Promotorregion in RAW 264.7-Makrophagen. 5×10^6 Zellen wurden unter Verwendung der Ca_2PO_4 -Methode mit $10 \mu\text{g}$ des Reportergergenkonstruktes pXT-luc transfiziert. Nach 18 Stunden wurden die Zellen mit verschiedenen Antigen-Konzentrationen für 24 Stunden stimuliert. Stimulatoren: LPS von *Proteus mirabilis* und OmpA (P13) von *E. coli*. Nach der Lyse der Zellen wurde die Luziferaseaktivität in den Zelllysaten in einem Luminometer gemessen. Aufgetragen wurde die x-fache Luziferaseaktivität über dem Hintergrund (unstimulierte Zellen). Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

Wie in Abbildung 20 ersichtlich, führten gegenüber den unstimulierten Zellen (Hintergrund) sowohl LPS als auch OmpA zu einer Dosis-abhängigen Erhöhung der IL-1 β -Promotoraktivität. Die Aktivierung der Promotoraktivität war bei gleicher Antigen-Konzentration nach Stimulierung mit LPS annähernd doppelt so hoch wie im Vergleich nach Stimulierung mit OmpA (außer bei $10 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Der Einfluß von OmpA auf die Promotoraktivität des IL-1 β -Gens war also im Vergleich mit LPS deutlich geringer.

Analog zu den Untersuchungen der Effekte von Staurosporin auf die OmpA-induzierte Produktion von IL-1 β und IL-1 β -mRNA-Akkumulation sollte der Einfluß von Staurosporin auf die Promotoraktivität des IL-1 β -Gens untersucht werden.

Dazu wurden 5×10^6 Zellen unter Verwendung der Ca_2PO_4 -Methode mit $10 \mu\text{g}$ des Reportergergenkonstruktes pXT-luc transfiziert. Nach 18-stündiger Inkubation erfolgte die Stimulierung mit verschiedenen Konzentrationen von LPS und OmpA (P13) in An- und Abwesenheit von 10 nM Staurosporin für 24 Stunden. Nach Aufschluß der Zellen mit Lysepuffer und Zugabe von Luziferin wurde die Luziferaseaktivität in den Zelllysaten in einem Luminometer bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

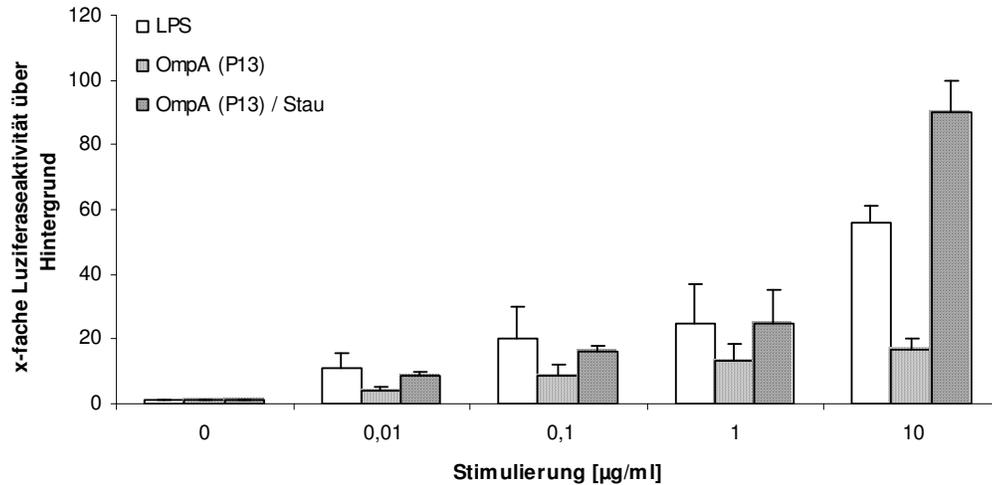


Abb. 21: Einfluß von Staurosporin auf die OmpA-induzierte Aktivität der vollständigen humanen IL-1 β -Enhancer- und Promotorregion in RAW 264.7-Makrophagen. 5×10^6 Zellen wurden unter Verwendung der Ca_2PO_4 -Methode mit $10 \mu\text{g}$ des Reportergenkonstruktes pXT-luc transfiziert. Nach 18 Stunden wurden die Zellen mit verschiedenen Antigen-Konzentrationen für 24 Stunden stimuliert. Stimulatoren: LPS von *Proteus mirabilis* und OmpA (P13) von *E. coli* in An- und Abwesenheit von 10 nM Staurosporin. Nach der Lyse der Zellen wurde die Luziferaseaktivität in den Zellysaten in einem Luminometer gemessen. Aufgetragen wurde die x-fache Luziferaseaktivität über dem Hintergrund (unstimulierte Zellen). Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen. Stau = Staurosporin

Wie aus der Abbildung 21 ersichtlich ist, führte die gleichzeitige Zugabe von OmpA und Staurosporin zu einer Zunahme der Luziferaseaktivität im Vergleich zur OmpA-stimulierten Probe. Die Zunahme erfolgte ebenfalls Dosis-abhängig. Auffällig ist, daß die Wirkung von OmpA in Anwesenheit von Staurosporin gegenüber der Wirkung von LPS bei Antigenkonzentrationen $< 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ geringer ist, während die Wirkung von Staurosporin auf $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ OmpA um ein Vielfaches höher ist. Man kann jedoch einen teilweisen Effekt von LPS-Verunreinigungen nicht ausschließen.

4.3. Charakterisierung der *ompA*-Gen-Sequenz von *Proteus mirabilis* 19 und phylogenetischer Vergleich mit verwandten Bakterien

Vorarbeiten mit OmpA von *Proteus mirabilis* haben gezeigt, daß dieses OmpA eine starke immunologische Wirkung besitzt [Karch & Nixdorff, 1981] und es sich um ein 39 kDa Protein handelt [Korn et al., 1993]. Zudem konnten monoklonale Antikörper (mAk) gegen das OmpA von *P. mirabilis* gewonnen werden [Korn et al., 1995]. Diese mAk haben eine unterschiedliche Reaktivität gegen OmpAs von *P. mirabilis* und *E. coli* gezeigt. In diesem Zusammenhang konnte eine starke Reaktion des mAk 2.14.1 mit OmpA von *P. mirabilis* bzw. *E.coli* beobachtet werden. Dagegen hat der mAk 2.18.1 nur mit OmpA von *P. mirabilis* reagiert. Eine mögliche Erklärung dafür könnten Sequenzvariationen der verwendeten OmpAs sein.

Diese Annahme konnte bereits ansatzweise durch kurze sequenzierte Bereiche der Aminosäurestruktur von OmpA aus *P. mirabilis* 19 in der Arbeitsgruppe bestätigt werden [Korn et al., 1993].

In der vorliegenden Arbeit soll eine nähere Charakterisierung der OmpA-Sequenz vorgenommen werden, um mögliche Strukturunterschiede zwischen verschiedenen OmpAs im Vergleich zu den von *P. mirabilis* festzulegen.

4.3.1. Serologische Charakterisierung des OmpA von *Proteus mirabilis* mittels der monoklonalen Antikörper (mAk) 2.14.1 und 2.18.1

Zur serologischen Charakterisierung wurden die eigens im Labor hergestellten monoklonalen Antikörper (mAk) 2.14.1 und 2.18.1 verwendet [Korn et al., 1995], welche gegen das OmpA von *P. mirabilis* gerichtet sind. Beide Antikörper unterscheiden sich darin, daß der mAk 1.18.1 vermutlich gegen ein spezifisches Epitop des OmpA Proteins von *P. mirabilis* gerichtet ist, während der mAk 2.14.1 gegen ein konserviertes Epitop von OmpA gerichtet ist, das bei vielen gramnegativen Bakterien vorkommt [Nixdorff et al., 1999]. Die nähere serologische Charakterisierung erfolgte durch den enzymgebundenen Immunoassay (ELISA) nach der Indirekt-Methode und das Western-Blot-Verfahren gegen Zellwände aus verschiedenen Bakterien.

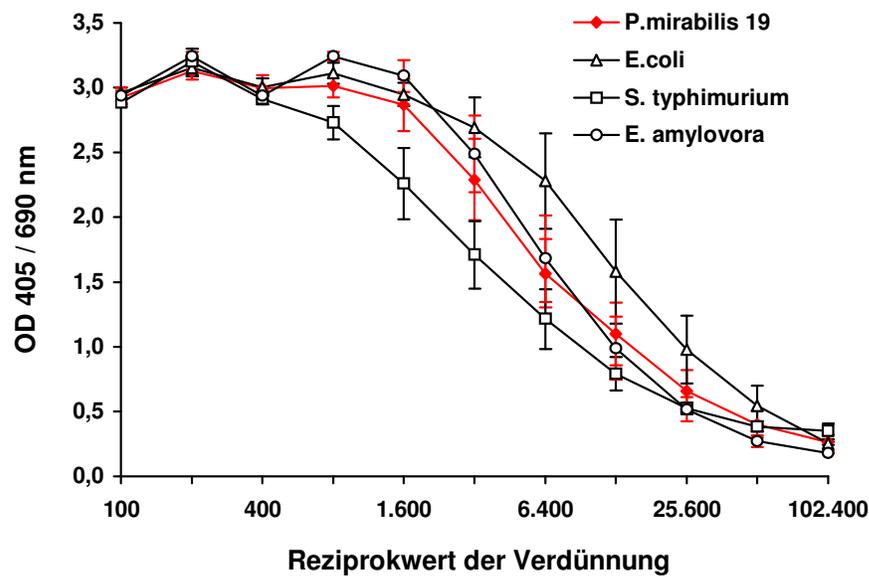
Hierfür wurden bereits vorhandene Zellwände, die das OmpA enthalten, von *P. mirabilis*, *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* verwendet. Zusätzlich wurde das bisher wenig untersuchte OmpA von *Erwinia amylovora*, einem pflanzenpathogenen Bakterium, untersucht. Hierzu wurde *E. amylovora* zunächst gezüchtet und die Zellwände aus den Bakterien isoliert. Der monoklonale Charakter und die Spezifität der mAk für OmpA wurden vorher in der Arbeitsgruppe geprüft [Korn et al., 1995].

Zur (semiquantitativen) Charakterisierung des OmpA Proteins von *P. mirabilis* wurden die Reaktionen der oben beschriebenen Zellwände mit den mAk 2.14.1 und 2.18.1 in einem ELISA gemessen. Um die als Antigene fungierenden Zellwände gleichmäßig in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte zu verteilen, wurden sie mit 0,05 N NaOH versetzt und in einem Ultraschallbad für 10 min beschallt (homogenisiert). Anschließend wurden die Zellwände zu einer Konzentration von 160 µg/ml in Coating-Puffer eingesetzt. Der Nachweis erfolgte in einer Mikrotiterplatte mit seriellen Verdünnungen der mAk. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

Wie der Abbildung 22 zu entnehmen ist, reagierte der mAk 2.14.1 (A) mit dem OmpA Protein aller vier getesteter Bakterien(-Zellwände). Es ist klar zu erkennen, daß der mAk 2.14.1 mit einer sehr hohen Affinität bei niedrigen Ak-Verdünnungen an ein gemeinsam vorhandenes Antigenepitop aller getesteten Zellwände reagiert hat. Diese Reaktionen waren bei allen untersuchten Antigenen etwa gleich stark. Unterschiede in der Bindung zwischen Antikörper und Antigen konnten geringfügig festgestellt werden, tendenziell aber stimmten die Ergebnisse überein. Dagegen reagierte der mAk 2.18.1 (B) mit einem Epitop von OmpA, das spezifisch für *Proteus mirabilis* ist. Grundsätzlich binden also beide mAk an Epitope vom OmpA aus *Proteus mirabilis*, aber offensichtlich an unterschiedliche. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme der Aminosäure-Sequenzvariation bei OmpA von *P. mirabilis* gegenüber anderen OmpAs.

Analog zu den Untersuchungen mittels ELISA wurden die mAk im (qualitativen) Western-Blot-Verfahren eingesetzt. Die bereits im ELISA verwendeten Proteine aus *P. mirabilis*, *E. coli*, *S. typhimurium* und *E. amylovora* wurden zunächst durch Erhitzen der Zellwände in einem SDS-haltigen Puffer gelöst und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit den mAk 2.14.1 und 2.18.1 behandelt. Der Nachweis erfolgte über einen Zweitantikörper (α -Maus IgG, mit Peroxidase konjugiert). Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt.

A.



B.

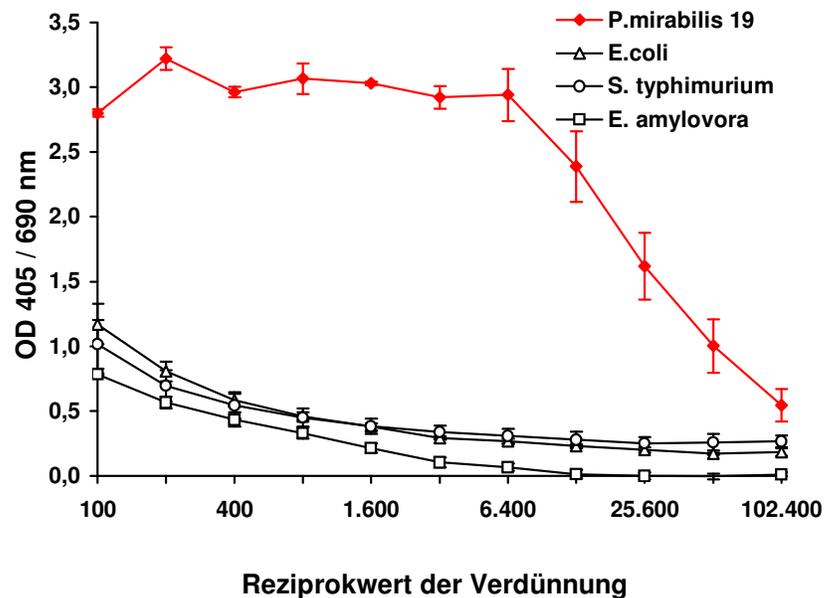


Abb. 22: ELISA der monoklonalen Antikörper 2.14.1 (A) und 2.18.1 (B) gegen Epitope von OmpA aus *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* und *Erwinia amylovora*. Jeweils 160 µg/ml Zellwände wurden pro well in einer Mikrotiterplatte über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellwände mit dem mAk 2.14.1 (A) und 2.18.1 (B) für eine Stunde in verschiedenen Verdünnungen inkubiert. Nach Zugabe des Zweitantikörpers (α -Maus IgG, konjugiert mit alkalischer Phosphatase) und des Substrates erfolgte der Nachweis im ELISA-Reader bei 450 nm gegen eine Referenz von 690 nm. Die arithmetischen Mittelwerte \pm Standardfehler stammen aus zwei unabhängigen Versuchen.

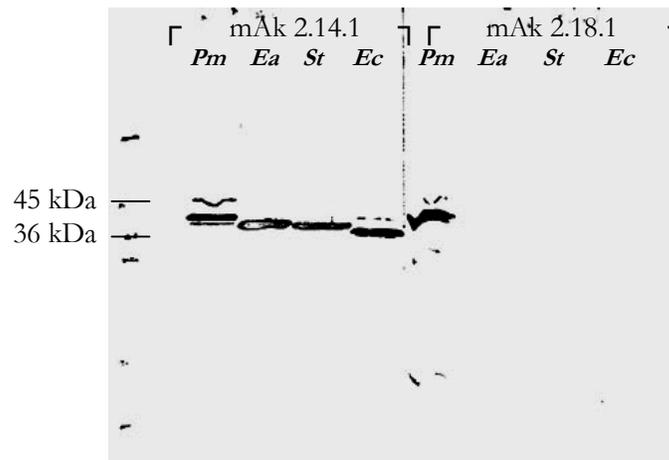


Abb. 23: Western-Blot-Verfahren zum Nachweis von OmpA aus *Proteus mirabilis* (*Pm*), *Erwinia amylovora* (*Ea*), *Salmonella typhimurium* (*St*) und *E. coli* (*Ec*). Jeweils 30 µg Zellwände wurden hitzedenaturiert und über zwei Stunden elektrophoretisch in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend für 1,5 Stunden auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit dem mAk 2.14.1 und 2.18.1 für eine Stunde inkubiert. Nach Zugabe des Zweitantikörpers (α -Maus IgG, konjugiert mit Peroxidase) und des Substrates erfolgte die Schwärzung der Membran.

Das Western-Blot-Verfahren lieferte ähnliche Ergebnisse wie der ELISA. So zeigen die Ergebnisse eindeutig, daß der verwendete mAk 2.14.1 eine Reaktion mit den OmpA Proteinen aller vier untersuchten Bakterien verursacht hat, während mit dem mAk 2.18.1 erwartungsgemäß nur das OmpA von *P. mirabilis* nachgewiesen werden konnte. Wie man dem Ergebnis ebenfalls entnehmen kann, hat das OmpA von *P. mirabilis* im Elektrophoresegel eine scheinbare molekulare Masse von 39 kDa, wie es für das OmpA Protein von *P. mirabilis* charakteristisch ist, während die scheinbare molekulare Masse des OmpA von *E. coli* bei ca. 33 kDa lag. Die OmpA Proteine der anderen Bakterien weichen von diesen molekularen Massen leicht ab. Im Gegensatz zum mAk 2.14.1 zeigt der mAk 2.18.1 lediglich eine Reaktion mit dem OmpA Protein von *P. mirabilis*, was bei der Spezifität des mAk zu erwarten war. Bezüglich der Charakterisierung des mAk 2.18.1 weisen die Ergebnisse des Western-Blot-Verfahren darauf hin, daß dieser Ak in der Lage ist, auch Abbauprodukte des OmpA von *Proteus* zu erkennen, da unter der 39 kDa-Bande weitere zu sehen sind. Dies entspricht früheren Beobachtungen [Korn et al., 1995]. Wie die Ergebnisse im ELISA bereits gezeigt haben, hat auch im Western-Blot-Verfahren der mAk 2.18.1 spezifisch an ein Epitop des OmpA von *P. mirabilis* gebunden. Offensichtlich erkennt der mAk 2.18.1 ein einzigartiges, zugängliches Erkennungsmotiv auf dem OmpA Protein von

P. mirabilis, das die anderen Bakterien nicht besitzen oder dort nicht zugänglich ist. Somit konnte durch den Einsatz der mAk 2.14.1 und 2.18.1 gezeigt werden, daß es vermutlich unterschiedliche Domänen in der Aminosäuresequenz von OmpA aus *P. mirabilis* und anderen Mikroorganismen geben muß, was auf Sequenzvariationen zurückzuführen sein könnte.

Hinsichtlich der weiteren Charakterisierung des OmpA von *P. mirabilis* bezüglich phylogenetischer Verwandtschaftsverhältnisse zu anderen *Enterobacteriaceae* wurde zunächst die *ompA*-Genomsequenz bestimmt, um davon die Aminosäuresequenz ableiten zu können. Dazu wurde die genomische DNA von *Proteus mirabilis* 19 isoliert und aufgereinigt. Entsprechende Abschnitte des *ompA*-Gens wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert, dann in einen geeigneten Sequenziervektor kloniert und sequenziert. Da jedoch zu Beginn der Untersuchungen keinerlei Nukleotidsequenzen von *Proteus mirabilis* in den frei zugänglichen Gendatenbanken verfügbar waren, wurden Primer-Sequenzen aus homologen Bereichen verwandter Organismen ausgewählt, um Fragmente des *ompA*-Gens zu amplifizieren.

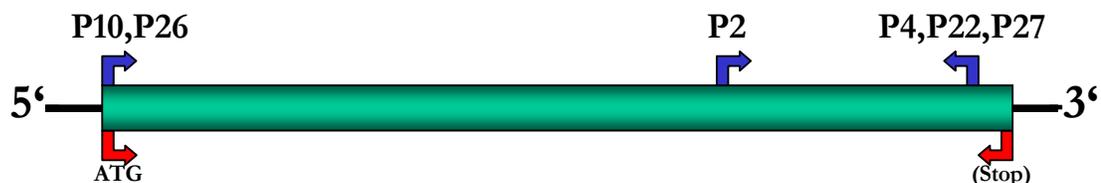


Abb. 24: Übersicht zur Auswahl der Primer-Sequenzen. Vermeintliches *ompA*-Gen von *Proteus mirabilis* (Start-/Stop-Codon). Primer 2 und Primer 4 flankieren das 400 bp Fragment im letzten Drittel des *ompA*-Gens. Primer 10 und Primer 22 flankieren das 1kb Fragment. Der Primer 22 besitzt die gleiche Position wie Primer 4, wurde in der Sequenz jedoch aufgrund der *Annealing*-Temperatur leicht modifiziert. Die Primer 26 und Primer 27 sind mit den Primern 10 und 22 identisch, wurden jedoch um eine Restriktionsschnittstelle zur Klonierung erweitert. P = Primer.

Die Abbildung 24 gibt einen Überblick über die Lage der wichtigsten Primer. Dargestellt sind die Primerpositionen relativ zum *ompA*-Gen zur Amplifikation des 400 bp und 1kb Fragmentes. Eine Übersicht aller verwendeten Primer-Sequenzen ist im Kapitel 3 dargestellt.

Als Vorlage der Primersequenzen 2, 4 und 10 diente das *ompA*-Gen von *E.coli*. Mittels der Primerkombination 2 und 4 konnte zunächst ein 400 bp großes *ompA*-Fragment amplifiziert, kloniert und sequenziert werden. Für die Amplifikation des 1 kb großen Fragmentes mit Primer 10 wurde der Primer 4 leicht modifiziert (=P22). Schließlich wurden die Primer 10 und 22 mit Restriktionsschnittstellen (*SacI* und *HindIII*) für die Klonierung in den Sequenziervektor (pQE-32) versehen (Primer 26 und Primer 27).

4.3.2. Ermittlung der Sequenz eines 400 bp großen *ompA*-Fragmentes von *Proteus mirabilis*

Vorbereitend wurden zwei Reinigungsausstriche einer Glycerinkultur von *Proteus mirabilis* 19 durchgeführt und die Bakterien mittels eines API 20E-Tests auf ihre Art hin überprüft.

Für die Amplifikation verschiedener Fragmente wurde die chromosomale DNA von *Proteus mirabilis* 19 mittels der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion aufgereinigt. Die mit Ethanol (reinst.) gefällte DNA wurde in HPLC-H₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Das 400 bp Fragment wurde mit den Oligonukleotid-Primern 2 (*sense*) und 4 (*antisense*) bei einer *Annealing*-Temperatur von 60,3°C durch eine *Pfu*-Polymerase (Promega) amplifiziert. Die Amplifikate wurden in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA-Bande bei 400 bp aus dem Gel ausgeschnitten und mittels *Gen Elute Minus EtBr Spin Kit* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) aufgereinigt. Für die weitere Sequenzierung wurde das aufgereinigte Amplifikat mittels dem *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit* (Invitrogen, Karlsruhe) in einen geeigneten Sequenziervektor (pCR-Blunt II-TOPO, 3519 bp) kloniert. Die auf diese Weise hergestellten positiven Klone wurden mittels *Screening*-PCR (M13-Primer) identifiziert.

Zur weiteren Überprüfung der positiven Klone der *Screening*-PCR wurden die Plasmide nach Maniatis aufgereinigt und zusätzlich durch eine Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *PstI* untersucht. Auf diese Weise wurde ein Klon ausgewählt, das Plasmid nach Nukleobond aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzierung wurde zweimal am Institut durch Sybille Traupe, AG Brackhage und einmal (*forward* und *reverse*) durch die Firma AGOWA, Berlin durchgeführt. Mit Hilfe des Programms GeneDoc (*Multiple Sequence Alignment Editor & Shading Utility Version 2.6.002*) [Nicholas, 1997] wurden die Sequenzen verglichen. Das Ergebnis der vier Sequenzläufe ist in Abbildung 25 dargestellt.

```

          *           20           *           40           *           60           *
Seq1-0204f: TGGAAATTCGCCCTT GCTCCAGTAGTTGCTCCGGCTCCAGTTGTTGAGAACAAAACCTTTACTCTGCGTTCAGACGT : 76
Seq2-0204r: TGGAAATTCGCCCTT GCTCCAGTAGTTGCTCCGGCTCCAGTTGTTGAGAACAAAACCTTTACTCTGCGTTCAGACGT : 76
Seq3-0204f: TGGAAATTCGCCCTT GCTCCAGTAGTTGCTCCGGCTCCAGTTGTTGAGAACAAAACCTTTACTCTGCGTTCAGACGT : 76
Seq3-0204r: -----ACTCTGCGTTCAGACGT : 17
pCR-TOPO : TGGAAATTCGCCCTT ----- : 14
Consensus : TGGAAATTCGCCCTT GCTCCAGTAGTTGCTCCGGCTCCAGTTGTTGAGAACAAAACCTTTACTCTGCGTTCAGACGT

          80           *           100          *           120          *           140          *
Seq1-0204f: TCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGCACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGCT : 152
Seq2-0204r: TCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGCACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGCT : 152
Seq3-0204f: TCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGCACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGCT : 152
Seq3-0204r: TCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGCACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGCT : 93
pCR-TOPO : ----- : -
Consensus : TCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGCACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGCT

          160          *           180          *           200          *           220
Seq1-0204f: AACATCGACCCAACTCAAGGTCGTGTCGTAGTTATCGGTTACACTGACCGTATCGGTTCTCAAAACTACAACCTGC : 228
Seq2-0204r: AACATCGACCCAACTCAAGGTCGTGTCGTAGTTATCGGTTACACTGACCGTATCGGTTCTCAAAACTACAACCTGC : 228
Seq3-0204f: AACATCGACCCAACTCAAGGTCGTGTCGTAGTTATCGGTTACACTGACCGTATCGGTTCTCAAAACTACAACCTGC : 228
Seq3-0204r: AACATCGACCCAACTCAAGGTCGTGTCGTAGTTATCGGTTACACTGACCGTATCGGTTCTCAAAACTACAACCTGC : 169
pCR-TOPO : ----- : -
Consensus : AACATCGACCCAACTCAAGGTCGTGTCGTAGTTATCGGTTACACTGACCGTATCGGTTCTCAAAACTACAACCTGC

          *           240          *           260          *           280          *           300
Seq1-0204f: CTCTGTCAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTAAAGGTATTCTGCAAAACAGCATCTCTGC : 304
Seq2-0204r: CTCTGTCAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTAAAGGTATTCTGCAAAACAGCATCTCTGC : 304
Seq3-0204f: CTCTGTCAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTAAAGGTATTCTGCAAAACAGCATCTCTGC : 304
Seq3-0204r: CTCTGTCAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTAAAGGTATTCTGCAAAACAGCATCTCTGC : 245
pCR-TOPO : ----- : -
Consensus : CTCTGTCAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTAAAGGTATTCTGCAAAACAGCATCTCTGC

          *           320          *           340          *           360          *           380
Seq1-0204f: AGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAACTGGCAACACTTGTGACAACGTCAAAGCTCGTGCAGCTCTGATCGAC : 380
Seq2-0204r: AGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAACTGGCAACACTTGTGACAACGTCAAAGCTCGTGCAGCTCTGATCGAC : 380
Seq3-0204f: AGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAACTGGCAACACTTGTGACAACGTCAAAGCTCGTGCAGCTCTGATCGAC : 368
Seq3-0204r: AGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAACTGGCAACACTTGTGACAACGTCAAAGCTCGTGCAGCTCTGATCGAC : 321
pCR-TOPO : ----- : -
Consensus : AGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAACTGGCAACACTTGTGACAACGTCAAAGCTCGTGCAGCTCTGATCGAC

          *           400
Seq1-0204f: TGCCTGGCTCCGGATCGTAAGGGCGAAT : 408
Seq2-0204r: TGCCTGGCTCCGGATCGTAAGGGCGAAT : 408
Seq3-0204f: ----- : -
Seq3-0204r: TGCCTGGCTCCGGATCGTAAGGGCGAAT : 349
pCR-TOPO : -----AAGGGCGAAT : 24
Consensus : TGCCTGGCTCCGGATCGTAAGGGCGAAT

```

Abb. 25: Sequenz des pCR-Blunt II-TOPO-Vektors mit ligiertem 400 bp Gen-Fragment von *Proteus mirabilis*. Die Sequenzläufe Seq1-0204f und Seq2-0204r wurden von Sybille Traupe, AG Brackhage, die Sequenzläufe Seq3-0204f und Seq3-0204r von der Firma AGOWA GmbH in Berlin durchgeführt. f = *forward* (5'-3'-Orientierung); r = *reverse* (3'-5'-komplementäre Orientierung); Vektorabschnitt in grau

Wie dem Sequenzvergleich aus Abbildung 25 zu entnehmen ist, sind alle vier (unabhängig) durchgeführten Sequenzläufe identisch. Daher wurden auf Grundlage dieser Sequenz neue Primer abgeleitet.

4.3.3. Ermittlung der Sequenz eines 1 kb großen *ompA*-Fragmentes von *Proteus mirabilis*

Durch die Auswahl von weiteren Primer-Sequenzen gelang es, ein 1 kb großes Fragment zu amplifizieren, klonieren und zu sequenzieren. An dieser Durchführung war Aysefa Doganci [Doganci, 2003] beteiligt.

Für die Amplifikation des großen Fragmentes wurden zunächst die Oligonukleotid-Primer 10 (*sense*) und 22 (*antisense*) verwendet. Für weitere Untersuchungen wurde das erfolgreich amplifizierte große Fragment in den Expressionsvektor pQE-32 (Qiagen) kloniert, der sich außerdem als Sequenziervektor eignet. Dafür war es notwendig, die Oligonukleotid-Primer mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen (*SacI* und *HindIII*) auszustatten, um eine gerichtete Klonierung zu erreichen. So konnte das Konstrukt *ompA*($\Delta 3'$)-pQE-32 mit den Oligonukleotid-Primern 26 (*sense*) und 27 (*antisense*) hergestellt werden [Doganci, 2003].

Die Sequenzierung wurde einmal (*forward* und *reverse*) durch die Firma AGOWA, Berlin durchgeführt. Mit Hilfe von GeneDoc wurden die Sequenzen verglichen. Das Ergebnis der Sequenzläufe ist in Abbildung 26 dargestellt.

```

Seq1-2627f: -----*      20      *      40      *      60      *
                ATCTCACCATCACCATCACCATGGGATCCGCATGCCGAGCTCAAATGAAAAAGACAGCTATCGCATTAG : 68
Seq1-2627r: ----- : -
pQE-32 : ATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATGGGATCCGCATGCCGAGCTC----- : 49
Consensus : ATGAGAGGATCTCACCATCACCATCACCATGGGATCCGCATGCCGAGCTCAAATGAAAAAGACAGCTATCGCATTAG

Seq1-2627f:      80      *      100      *      120      *      140      *
                CAGTGGCAGTGGCAGCTTTCGCAACTGCAGCGCAAGCAGCTCCAAAAGACAATACTTGGTATACCGGTGGTAAATT : 144
Seq1-2627r: ----- : -
pQE-32 : ----- : -
Consensus : CAGTGGCAGTGGCAGCTTTCGCAACTGCAGCGCAAGCAGCTCCAAAAGACAATACTTGGTATACCGGTGGTAAATT

Seq1-2627f:      160      *      180      *      200      *      220
                AGTTGGTCTCAGTATCAAAGTACTGGTAACAATTGGGACGGCGTGAATATCGGTAACGGTAGCACACAAAAGAC : 220
Seq1-2627r: ----- : -
pQE-32 : ----- : -
Consensus : AGTTGGTCTCAGTATCAAAGTACTGGTAACAATTGGGACGGCGTGAATATCGGTAACGGTAGCACACAAAAGAC

Seq1-2627f:      *      240      *      260      *      280      *      300
                CAAATGGTGCTGGTGCATTTGCTGGTTATCAGTACAACCAATACTTAGGTTTGAAGTGGGTTATGACTGGTTAG : 296
Seq1-2627r: ----- : -
pQE-32 : ----- : -
Consensus : CAAATGGTGCTGGTGCATTTGCTGGTTATCAGTACAACCAATACTTAGGTTTGAAGTGGGTTATGACTGGTTAG

Seq1-2627f:      *      320      *      340      *      360      *      380
                GTCGTATGGCTTATAAAGGTTTATACAACAACGGTGCATTCAAAGCTCAAGGTATCCAATTAACCACTAAATTAAG : 372
Seq1-2627r: -----GCTTATAAAGGTTTATACAACAACGGTGCATTCAAAGCTCAAGGTATCCAATTAACCACTAAATTAAG : 68
pQE-32 : ----- : -
Consensus : GTCGTATGGCTTATAAAGGTTTATACAACAACGGTGCATTCAAAGCTCAAGGTATCCAATTAACCACTAAATTAAG

Seq1-2627f:      *      400      *      420      *      440      *
                CTATCCAGTAATGGATGACTTAGACGTTTATACACGTTTAGGTGGTATGGTATGGCGTGCAGATTCAACTGCAACT : 448
Seq1-2627r: CTATCCAGTAATGGATGACTTAGACGTTTATACACGTTTAGGTGGTATGGTATGGCGTGCAGATTCAACTGCAACT : 144
pQE-32 : ----- : -
Consensus : CTATCCAGTAATGGATGACTTAGACGTTTATACACGTTTAGGTGGTATGGTATGGCGTGCAGATTCAACTGCAACT

```

```

      460          *          480          *          500          *          520          *
Seq1-2627f: ATTAATGCAACTTCAGCAGGAACTCAAAAACGTTTCTCTGAAAATGATACTGGCGTTTCTCCAGTATTCGCATTAG : 524
Seq1-2627r: ATTAATGCAACTTCAGCAGGAACTCAAAAACGTTTCTCTGAAAATGATACTGGCGTTTCTCCAGTATTCGCATTAG : 220
pQE-32 : ----- : -
Consensus : ATTAATGCAACTTCAGCAGGAACTCAAAAACGTTTCTCTGAAAATGATACTGGCGTTTCTCCAGTATTCGCATTAG

      540          *          560          *          580          *          600
Seq1-2627f: GTACTGAATACGCGATCACTCCTAACATTGCTACTCGTCTTGGTATCAGTGGATCAACAACATCGGTGATAAAGG : 600
Seq1-2627r: GTACTGAATACGCGATCACTCCTAACATTGCTACTCGTCTTGGTATCAGTGGATCAACAACATCGGTGATAAAGG : 296
pQE-32 : ----- : -
Consensus : GTACTGAATACGCGATCACTCCTAACATTGCTACTCGTCTTGGTATCAGTGGATCAACAACATCGGTGATAAAGG

      *          620          *          640          *          660          *          680
Seq1-2627f: TACTCTGAAACGCTCGTCCAGACAATGGTATGCTGAGTGTGGTGTGCTTACCCTTTCAACCAAGAAACTCCAGCT : 676
Seq1-2627r: TACTCTGAAACGCTCGTCCAGACAATGGTATGCTGAGTGTGGTGTGCTTACCCTTTCAACCAAGAAACTCCAGCT : 372
pQE-32 : ----- : -
Consensus : TACTCTGAAACGCTCGTCCAGACAATGGTATGCTGAGTGTGGTGTGCTTACCCTTTCAACCAAGAAACTCCAGCT

      *          700          *          720          *          740          *          760
Seq1-2627f: CCAGTTGTTGAGCCAGCTCCAGTAGTGTGCTCCAGCTCCAGTTGTTGAGAACAAAACCTTTACTCTGCGTTCAGACG : 752
Seq1-2627r: CCAGTTGTTGAGCCAGCTCCAGTAGTGTGCTCCAGCTCCAGTTGTTGAGAACAAAACCTTTACTCTGCGTTCAGACG : 448
pQE-32 : ----- : -
Consensus : CCAGTTGTTGAGCCAGCTCCAGTAGTGTGCTCCAGCTCCAGTTGTTGAGAACAAAACCTTTACTCTGCGTTCAGACG

      *          780          *          800          *          820          *
Seq1-2627f: TTCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAAGCTGAAGGTCAAGAAGC----- : 801
Seq1-2627r: TTCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAAGCTGAAGGTCAAGAAGCACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGC : 524
pQE-32 : ----- : -
Consensus : TTCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAAGCTGAAGGTCAAGAAGCACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGC

      840          *          860          *          880          *          900          *
Seq1-2627f: ----- : -
Seq1-2627r: TAACATCGACCCAACCTCAAGGTCGTGCTAGTTATCGGTTACTGACCGTATCGGTTCTCAAACCTACAACCTG : 600
pQE-32 : ----- : -
Consensus : TAACATCGACCCAACCTCAAGGTCGTGCTAGTTATCGGTTACTGACCGTATCGGTTCTCAAACCTACAACCTG

      920          *          940          *          960          *          980
Seq1-2627f: ----- : -
Seq1-2627r: CCTCTGTGCAAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTAAAGGTATTCTGCAAACAGCATCTCTG : 676
pQE-32 : ----- : -
Consensus : CCTCTGTGCAAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTAAAGGTATTCTGCAAACAGCATCTCTG

      *          1000          *          1020          *          1040
Seq1-2627f: ----- : -
Seq1-2627r: CAGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAACCTGGCAACACTTGTGACAACGTCAAAGCTT : 736
pQE-32 : -----GTCAAAGCTT : 59
Consensus : CAGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAACCTGGCAACACTTGTGACAACGTCAAAGCTT

```

Abb. 26: Sequenz des pQE-32-Vektors mit ligiertem 1 kb Gen-Fragment von *Proteus mirabilis*. Alle Sequenzläufe wurden von der Firma AGOWA GmbH in Berlin durchgeführt. f = *forward* (5'-3'-Orientierung); r = *reverse* (3'-5'-komplementäre Orientierung); Vektorabschnitt in grau

Beide Sequenzläufe besitzen einen überlappenden Bereich (nt313-nt809) von 496 bp. Dieser Bereich ist identisch.

Wie bereits in Abbildung 24 gezeigt, besitzen die beiden hergestellten Fragmente (400 bp und 1 kb) einen überlappenden Bereich und deckten zusammen annähernd 95% des gesamten *ompA*-Gens von *Proteus mirabilis* 19 ab. Die fehlenden 5% befinden sich am 3'-Ende des Gens (mit Stop-Codon). Mit Hilfe von GeneDoc wurden die beiden Sequenzen des 400 bp-Fragments mit der Sequenz des 1 kb-Fragments verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt.

```

Seq1-2627f: AAATGAAAAGACAGCTATCGCATTAGCAGTGGCAGTGGCAGCTTTCGCAACTGCAGCGCAAGCAGCTCCAAAAGA : 76
Seq1-2627r: ----- : -
Seq1-0204f: ----- : -
Seq2-0204r: ----- : -
Seq3-0204f: ----- : -
Seq3-0204r: ----- : -
Consensus : AAATGAAAAGACAGCTATCGCATTAGCAGTGGCAGTGGCAGCTTTCGCAACTGCAGCGCAAGCAGCTCCAAAAGA

          *           20           *           40           *           60           *
Seq1-2627f: CAATACTTGGTATACCGGTGGTAAATTAGGTTGGTCTCAGTATCAAAGTACTGGTAACAATTGGGACGGCGTGAAT : 152
Seq1-2627r: ----- : -
Seq1-0204f: ----- : -
Seq2-0204r: ----- : -
Seq3-0204f: ----- : -
Seq3-0204r: ----- : -
Consensus : CAATACTTGGTATACCGGTGGTAAATTAGGTTGGTCTCAGTATCAAAGTACTGGTAACAATTGGGACGGCGTGAAT

          80           *           100          *           120          *           140          *
Seq1-2627f: ATCGGTAACGGTAGCACACACAAAGACCAAATTTGGTCTGGTGCATTTGCTGGTTATCAGTACAACCAACTACTTAG : 228
Seq1-2627r: ----- : -
Seq1-0204f: ----- : -
Seq2-0204r: ----- : -
Seq3-0204f: ----- : -
Seq3-0204r: ----- : -
Consensus : ATCGGTAACGGTAGCACACACAAAGACCAAATTTGGTCTGGTGCATTTGCTGGTTATCAGTACAACCAACTACTTAG

          160          *           180           *           200           *           220
Seq1-2627f: GTTTTGAACTGGGTTATGACTGGTTAGGTCGTATGGCTTATAAAGGTTTCATACAACACGGTGCATCAAAGCTCA : 304
Seq1-2627r: -----GCTTATAAAGGTTTCATACAACACGGTGCATCAAAGCTCA : 41
Seq1-0204f: ----- : -
Seq2-0204r: ----- : -
Seq3-0204f: ----- : -
Seq3-0204r: ----- : -
Consensus : GTTTTGAACTGGGTTATGACTGGTTAGGTCGTATGGCTTATAAAGGTTTCATACAACACGGTGCATCAAAGCTCA

          *           240          *           260          *           280          *           300
Seq1-2627f: AGGTATCCAATTAACCACATAAATTAAGCTATCCAGTAATGGATGACTTAGACGTTTATACACGTTTAGTGGTATG : 380
Seq1-2627r: AGGTATCCAATTAACCACATAAATTAAGCTATCCAGTAATGGATGACTTAGACGTTTATACACGTTTAGTGGTATG : 117
Seq1-0204f: ----- : -
Seq2-0204r: ----- : -
Seq3-0204f: ----- : -
Seq3-0204r: ----- : -
Consensus : AGGTATCCAATTAACCACATAAATTAAGCTATCCAGTAATGGATGACTTAGACGTTTATACACGTTTAGTGGTATG

          *           320          *           340          *           360          *           380
Seq1-2627f: GTATGGCGTGCAGATTCAACTGCAACTATTAATGCAACTTCAGCAGGAAC TCAAAAACGTTTCTCTGAAAATGATA : 456
Seq1-2627r: GTATGGCGTGCAGATTCAACTGCAACTATTAATGCAACTTCAGCAGGAAC TCAAAAACGTTTCTCTGAAAATGATA : 193
Seq1-0204f: ----- : -
Seq2-0204r: ----- : -
Seq3-0204f: ----- : -
Seq3-0204r: ----- : -
Consensus : GTATGGCGTGCAGATTCAACTGCAACTATTAATGCAACTTCAGCAGGAAC TCAAAAACGTTTCTCTGAAAATGATA

          *           400          *           420          *           440          *
Seq1-2627f: CTGGCGTTTCTCCAGTATTCGCATTAGGTAATACGCGATCACTCCTAACATTGCTACTCGTCTTGAGTATCA : 532
Seq1-2627r: CTGGCGTTTCTCCAGTATTCGCATTAGGTAATACGCGATCACTCCTAACATTGCTACTCGTCTTGAGTATCA : 269
Seq1-0204f: ----- : -
Seq2-0204r: ----- : -
Seq3-0204f: ----- : -
Seq3-0204r: ----- : -
Consensus : CTGGCGTTTCTCCAGTATTCGCATTAGGTAATACGCGATCACTCCTAACATTGCTACTCGTCTTGAGTATCA

          460          *           480          *           500          *           520          *
Seq1-2627f: GTGGATCAACAACATCGGTGATAAAGGTACTCTGAACGCTCGTCCAGACAATGGTATGCTGAGTGTGGTGTGCT : 608
Seq1-2627r: GTGGATCAACAACATCGGTGATAAAGGTACTCTGAACGCTCGTCCAGACAATGGTATGCTGAGTGTGGTGTGCT : 345
Seq1-0204f: ----- : -
Seq2-0204r: ----- : -
Seq3-0204f: ----- : -
Seq3-0204r: ----- : -
Consensus : GTGGATCAACAACATCGGTGATAAAGGTACTCTGAACGCTCGTCCAGACAATGGTATGCTGAGTGTGGTGTGCT

```

```

*           620           *           640           *           660           *           680
Seq1-2627f: TACCGTTTCAACCAAGAAACTCCAGCTCCAGTTGTTGAGCCAGCTCCAGTAGTTGCTCCAGCTCCAGTTGTTGAGA : 684
Seq1-2627r: TACCGTTTCAACCAAGAAACTCCAGCTCCAGTTGTTGAGCCAGCTCCAGTAGTTGCTCCAGCTCCAGTTGTTGAGA : 421
Seq1-0204f: -----GCTCCAGTAGTTGCTCCGGCTCCAGTTGTTGAGA : 34
Seq2-0204r: -----GCTCCAGTAGTTGCTCCGGCTCCAGTTGTTGAGA : 34
Seq3-0204f: -----GCTCCAGTAGTTGCTCCGGCTCCAGTTGTTGAGA : 34
Seq3-0204r: -----GCTCCAGTAGTTGCTCCGGCTCCAGTTGTTGAGA : 34
Consensus : TACCGTTTCAACCAAGAAACTCCAGCTCCAGTTGTTGAGCCAGCTCCAGTAGTTGCTCCGGCTCCAGTTGTTGAGA

*           700           *           720           *           740           *           760
Seq1-2627f: ACAAAACCTTTACTCTGCGTTTCAGACGTTCTGTTCACCTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGC : 760
Seq1-2627r: ACAAAACCTTTACTCTGCGTTTCAGACGTTCTGTTCACCTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGC : 497
Seq1-0204f: ACAAAACCTTTACTCTGCGTTTCAGACGTTCTGTTCACCTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGC : 110
Seq2-0204r: ACAAAACCTTTACTCTGCGTTTCAGACGTTCTGTTCACCTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGC : 110
Seq3-0204f: ACAAAACCTTTACTCTGCGTTTCAGACGTTCTGTTCACCTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGC : 110
Seq3-0204r: -----ACTCTGCGTTTCAGACGTTCTGTTCACCTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGC : 65
Consensus : ACAAAACCTTTACTCTGCGTTTCAGACGTTCTGTTCACCTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGC

*           780           *           800           *           820           *
Seq1-2627f: ----- : -
Seq1-2627r: ACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGCTAACATCGACCCAACCTCAAGGTCGTGTCGTAAGTTATCGGTTACACTGAC : 573
Seq1-0204f: ACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGCTAACATCGACCCAACCTCAAGGTCGTGTCGTAAGTTATCGGTTACACTGAC : 186
Seq2-0204r: ACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGCTAACATCGACCCAACCTCAAGGTCGTGTCGTAAGTTATCGGTTACACTGAC : 186
Seq3-0204f: ACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGCTAACATCGACCCAACCTCAAGGTCGTGTCGTAAGTTATCGGTTACACTGAC : 186
Seq3-0204r: ACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGCTAACATCGACCCAACCTCAAGGTCGTGTCGTAAGTTATCGGTTACACTGAC : 141
Consensus : ACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGCTAACATCGACCCAACCTCAAGGTCGTGTCGTAAGTTATCGGTTACACTGAC

*           840           *           860           *           880           *           900           *
Seq1-2627f: ----- : -
Seq1-2627r: CGTATCGGTTCTCAAACCTACAACCTGCCTCTGTGAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTA : 649
Seq1-0204f: CGTATCGGTTCTCAAACCTACAACCTGCCTCTGTGAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTA : 262
Seq2-0204r: CGTATCGGTTCTCAAACCTACAACCTGCCTCTGTGAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTA : 262
Seq3-0204f: CGTATCGGTTCTCAAACCTACAACCTGCCTCTGTGAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTA : 262
Seq3-0204r: CGTATCGGTTCTCAAACCTACAACCTGCCTCTGTGAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTA : 217
Consensus : CGTATCGGTTCTCAAACCTACAACCTGCCTCTGTGAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTA

*           920           *           940           *           960           *           980
Seq1-2627f: ----- : -
Seq1-2627r: AAGGTATTCTCCTGCAAAACAGCATCTCTGCAGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAAGTGGCAACACTTGTGACAA : 725
Seq1-0204f: AAGGTATTCTCCTGCAAAACAGCATCTCTGCAGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAAGTGGCAACACTTGTGACAA : 338
Seq2-0204r: AAGGTATTCTCCTGCAAAACAGCATCTCTGCAGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAAGTGGCAACACTTGTGACAA : 338
Seq3-0204f: AAGGTATTCTCCTGCAAAACAGCATCTCTGCAGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAAGTGGCAACACTTGTGACAA : 338
Seq3-0204r: AAGGTATTCTCCTGCAAAACAGCATCTCTGCAGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAAGTGGCAACACTTGTGACAA : 293
Consensus : AAGGTATTCTCCTGCAAAACAGCATCTCTGCAGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAAGTGGCAACACTTGTGACAA

*           1000           *           1020           *
Seq1-2627f: ----- : -
Seq1-2627r: C----- : 726
Seq1-0204f: CGTCAAAGCTCGTGCAGCTCTGATCGACTGCCTGGCTCCGGATCGT : 384
Seq2-0204r: CGTCAAAGCTCGTGCAGCTCTGATCGACTGCCTGGCTCCGGATCGT : 384
Seq3-0204f: CGTCAAAGCTCGTGC----- : 354
Seq3-0204r: CGTCAAAGCTCGTGCAGCTCTGATCGACTGCCTGGCTCCGGATCGT : 339
Consensus : CGTCAAAGCTCGTGCAGCTCTGATCGACTGCCTGGCTCCGGATCGT

```

Abb. 27: Vergleich aller Sequenzläufe der beiden *ompA*-Gen-Fragmente von *Proteus mirabilis*. f = *forward* (5'-3'-Orientierung); r = *reverse* (3'-5'-komplementäre Orientierung)

Wie der Abbildung 27 zu entnehmen ist, besitzen beide *ompA*-Gen-Fragmente einen überlappenden Bereich (nt651-nt989) von 338 bp. Die Sequenzen der beiden Fragmente sind in diesem Bereich identisch.

Es wurde zunächst versucht, weitere degenerative Oligonukleotid-Primer einzusetzen, um die übrigen 5% der Sequenz zu ermitteln. Dies brachte jedoch kein Ergebnis.

Schließlich wurde die ermittelte *consensus*-Sequenz für eine erneute Datenbanksuche (Blastn) eingesetzt.

4.3.4. Datenbankanalyse (Blastn) und Vergleich der sequenzierten Nukleotidsequenzen (*Proteus mirabilis* 19) mit Sequenzen von *Proteus mirabilis* HI4320

Dabei wurde die Internet-Datenbank des *Wellcome Trust Sanger* Institutes, UK unter www.sanger.ac.uk verwendet. Dort waren bei Durchführung dieser Untersuchungen 46.003 *shotgun* Sequenzen (*single reads* eines ABI Sequenzierers; Lesefehler sind durch *E. coli* und Vektor-Kontaminationen nicht ausgeschlossen) aus dem gegenwärtig laufenden Genom Projekts von *Proteus mirabilis* HI4320 verfügbar, was einer Datengröße von insgesamt 31.338 Mb und einem theoretischen Umfang von 99,97% des gesamten Genoms (3,9 Mb) entspricht.

Bei dieser Suche konnten insgesamt 16 *shotgun* Sequenzen gefunden werden, die zu 90 bis 100% identisch waren. Eine Übersicht der gefunden Sequenzen ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Ergebnis der Blastn-Suche. 16 *shotgun* Sequenzen aus *Proteus mirabilis* HI4320 (mira-Sequenzen)

Sequenzen	High Score	Identität	Wahrscheinlichkeit
mira122g09.q1k	3650	99%	2.3e-160
mira133b08.q1k	3543	99%	1.5e-155
mira208c01.q1k	3525	99%	1.1e-154
mira149c11.q1k	2755	98%	6.8e-120
mira77g06.p1k	2735	98%	4.6e-119
mira257d09.p1k	2332	99%	7.5e-101
mira254a09.q1k	2052	99%	3.5e-88
mira255d04.q1k	2007	99%	6.1e-86
mira136g01.p1k	1832	95%	3.1e-78
mira142f03.p1k	1643	97%	2.3e-69
mira129b09.p1k	1557	99%	7.2e-66
mira64h03.q1k	1055	100%	4.1e-43
mira146b01.p1k	1018	96%	1.7e-41
mira235d04.q1k	963	96%	5.6e-39
mira59d06.p1k	733	94%	1.2e-28
mira278f10.p1k	307	90%	3.5e-08

Die gefundenen Sequenzen aus *Proteus mirabilis* HI4320 (mira-Sequenzen) wurden mit der bisher vorliegenden Sequenz von *Proteus mirabilis* 19 (Sequenz 2627+0204) mit Hilfe von GeneDoc verglichen (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der hohen Identität von 99% der Sequenzen beider Stämme, wurden die neuen Sequenzinformationen von *Proteus mirabilis* HI4320 (mira) als Vorlage für die Synthese zusätzlicher Oligonukleotid-Primer verwendet, um die vollständige *ompA*-Sequenz von *Proteus mirabilis* 19 zu amplifizieren, klonieren und zu sequenzieren.

4.3.5. Sequenzierung des gesamten *ompA*-Gens von *Proteus mirabilis* 19

Für die Amplifikation des gesamten *ompA*-Gens wurde mit den Oligonukleotid-Primern 42 (*sense*) und 43 (*antisense*) bei einer *Annealing*-Temperatur von 60,1°C durch eine *Pfu*-Polymerase (Promega) ein 1,25 kb großes Produkt amplifiziert, das an beiden Enden über das *ompA*-Gen hinaus geht. Die Amplifikate wurden in einem 1%igen Agarosegel zur Kontrolle elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das gesamte PCR-Produkt (diskrete Bande im Gel) mittels der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion aufgereinigt und mit Ethanol gefällt. Das Amplifikat wurde in HPLC-H₂O gelöst und mittels dem *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit* (Invitrogen, Karlsruhe) in den Sequenziervektor (pCR-Blunt II-TOPO, 3519 bp) kloniert. Die hergestellten positiven Klone wurden mittels *Screening*-PCR (M13-Primer) identifiziert. Zur weiteren Überprüfung der positiven Klone der *Screening*-PCR wurden die Plasmide nach Maniatis aufgereinigt und zusätzlich durch eine Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *HindIII* untersucht. Auf diese Weise wurden zwei Klone (K157 und K158) ausgewählt, die Plasmide nach Nucleobond aufgereinigt und sequenziert. Jeder Klon wurde einmal (*forward* und *reverse*) durch die Firma SEQLAB, Göttingen sequenziert. Mit Hilfe von GeneDoc wurden die Sequenzen verglichen. Das Ergebnis der vier Sequenzläufe ist in Abbildung 28 dargestellt.

Wie der Abbildung 28 zu entnehmen ist, sind jeweils die beiden komplementären Sequenzen (*sense* und *antisense*) eines Klons identisch. Darüber hinaus besteht ebenfalls vollständige Übereinstimmung der Sequenzen beider (unabhängig hergestellter) Klone zueinander.

```

                *      20      *      40      *      60      *
4243-157-f: CCCTTAACCAAGGGCAAATAATAAGGCTTAAAGCCAAATGCCTAACTGGATGATAACGAGGCGTAAATGAAAAA : 76
4243-158-f: CCCTTAACCAAGGGCAAATAATAAGGCTTAAAGCCAAATGCCTAACTGGATGATAACGAGGCGTAAATGAAAAA : 76
4243-157-r: ----- : -
4243-158-r: ----- : -
pCR-TOPO : CCCTT----- : 5

                80      *      100      *      120      *      140      *
4243-157-f: GACAGCTATCGCATTAGCAGTGGCAGTGGCAGCTTTCGCAACTGCAGCGCAAGCAGCTCCAAAAGACAATACTTGG : 152
4243-158-f: GACAGCTATCGCATTAGCAGTGGCAGTGGCAGCTTTCGCAACTGCAGCGCAAGCAGCTCCAAAAGACAATACTTGG : 152
4243-157-r: ----- : -
4243-158-r: ----- : -
pCR-TOPO : ----- : -

                160      *      180      *      200      *      220
4243-157-f: TATACCGGTGGTAAATTAGGTTGGTCTCAGTATCAAAGTACTGGTAACAATTGGGACGGCGTGAATATCGGTAACG : 228
4243-158-f: TATACCGGTGGTAAATTAGGTTGGTCTCAGTATCAAAGTACTGGTAACAATTGGGACGGCGTGAATATCGGTAACG : 228
4243-157-r: ----- : -
4243-158-r: ----- : -
pCR-TOPO : ----- : -

                *      240      *      260      *      280      *      300
4243-157-f: GTAGCACACACAAGACCAAATTGGTGTCTGGTGCATTTGCTGGTTATCAGTACAACCAATACTTAGTGTGTTGAACT : 304
4243-158-f: GTAGCACACACAAGACCAAATTGGTGTCTGGTGCATTTGCTGGTTATCAGTACAACCAATACTTAGTGTGTTGAACT : 304
4243-157-r: ----- : -
4243-158-r: ----- : -
pCR-TOPO : ----- : -

                *      320      *      340      *      360      *      380
4243-157-f: GGGTTATGACTGGTTAGGTCGTATGGCTTATAAAGGTTTCATACAACAACGGTGCATTCAAAGCTCAAGGTATCCAA : 380
4243-158-f: GGGTTATGACTGGTTAGGTCGTATGGCTTATAAAGGTTTCATACAACAACGGTGCATTCAAAGCTCAAGGTATCCAA : 380
4243-157-r: ----- : -
4243-158-r: ----- : -
pCR-TOPO : ----- : -

                *      400      *      420      *      440      *
4243-157-f: TTAACCACTAAATTAAGCTATCCAGTAATGGATGACTTAGACGTTTATACACGTTTAGGTGGTATGGTATGGCGTG : 456
4243-158-f: TTAACCACTAAATTAAGCTATCCAGTAATGGATGACTTAGACGTTTATACACGTTTAGGTGGTATGGTATGGCGTG : 456
4243-157-r: ----- : -
4243-158-r: ----- : -
pCR-TOPO : ----- : -

                460      *      480      *      500      *      520      *
4243-157-f: CAGATTCAACTGCAACTATTAATGAACCTTCAGCAGGAACCTCAAAAACGTTTCTCTGAAAATGATACTGGCGTTTC : 532
4243-158-f: CAGATTCAACTGCAACTATT----- : 476
4243-157-r: ----- : -
4243-158-r: -----CGTTTCTCTTGAAATGATACTGGCGTTTC : 29
pCR-TOPO : ----- : -

                540      *      560      *      580      *      600
4243-157-f: TCCAGTATTCGCATTAGGTACTGAATACGCGATCACTCCTAACATTGCTACTCGTCTTGAGTATCAGTGGATCAAC : 608
4243-158-f: ----- : -
4243-157-r: -----CGCATTAGGTACTGAATACGCGATCACTCCTAACATTGCTACTCGTCTTGAGTATCAGTGGATCAAC : 67
4243-158-r: TCCAGTATTCGCATTAGGTACTGAATACGCGATCACTCCTAACATTGCTACTCGTCTTGAGTATCAGTGGATCAAC : 105
pCR-TOPO : ----- : -

                *      620      *      640      *      660      *      680
4243-157-f: AACATCGGTGATAAAGGTACTCTGAACGCTCGTCCAGACAATGGTAATGCTGAGTGTGGTGTGCTTACCGTTTC : 684
4243-158-f: ----- : -
4243-157-r: AACATCGGTGATAAAGGTACTCTGAACGCTCGTCCAGACAATGGTAATGCTGAGTGTGGTGTGCTTACCGTTTC : 143
4243-158-r: AACATCGGTGATAAAGGTACTCTGAACGCTCGTCCAGACAATGGTAATGCTGAGTGTGGTGTGCTTACCGTTTC : 181
pCR-TOPO : ----- : -

```

```

      *           700           *           720           *           740           *           760
4243-157-f: AACCAAGAAACTCCAGCTCCAGTTGTTGAGCCA----- : 717
4243-158-f: ----- : -
4243-157-r: AACCAAGAAACTCCAGCTCCAGTTGTTGAGCCAGCTCCAGTAGTTGCTCCAGCTCCAGTTGTTGAGAACAAAACCT : 219
4243-158-r: AACCAAGAAACTCCAGCTCCAGTTGTTGAGCCAGCTCCAGTAGTTGCTCCAGCTCCAGTTGTTGAGAACAAAACCT : 257
pCR-TOPO : ----- : -

      *           780           *           800           *           820           *
4243-157-f: ----- : -
4243-158-f: ----- : -
4243-157-r: TTACTCTGCGTTTCAGACGTTCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGCACTGAATGG : 295
4243-158-r: TTACTCTGCGTTTCAGACGTTCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGCACTGAATGG : 333
pCR-TOPO : ----- : -

      840           *           860           *           880           *           900           *
4243-157-f: ----- : -
4243-158-f: ----- : -
4243-157-r: TCTGTACAATGAATTAGCTAACATCGACCCAACCTCAAGGTCGTCGTCGTAGTTATCGGTTACACTGACCGTATCGGT : 371
4243-158-r: TCTGTACAATGAATTAGCTAACATCGACCCAACCTCAAGGTCGTCGTCGTAGTTATCGGTTACACTGACCGTATCGGT : 409
pCR-TOPO : ----- : -

      920           *           940           *           960           *           980
4243-157-f: ----- : -
4243-158-f: ----- : -
4243-157-r: TCTCAAAACTACAACCTGCCTCTGTCAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTAAAGGTATTTC : 447
4243-158-r: TCTCAAAACTACAACCTGCCTCTGTCAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTACCTGGTATCTAAAGGTATTTC : 485
pCR-TOPO : ----- : -

      *           1000           *           1020           *           1040           *           1060
4243-157-f: ----- : -
4243-158-f: ----- : -
4243-157-r: CTGCAAACAGCATCTCTGCAGAAGGTCGTGGTAAAGAGAACCAGTAACCTGGCAACACTTGTGACAACGTCAAAAGC : 523
4243-158-r: CTGCAAACAGCATCTCTGCAGAAGGTCGTGGTAAAGAGAACCAGTAACCTGGCAACACTTGTGACAACGTCAAAAGC : 561
pCR-TOPO : ----- : -

      *           1080           *           1100           *           1120           *           1140
4243-157-f: ----- : -
4243-158-f: ----- : -
4243-157-r: TCGTGCAGCTCTGATCGATTGCTTAGCGCCAGACCGTCGTTGAAATCGAAATCCAAGGTACAACCTGAAGTTGTT : 599
4243-158-r: TCGTGCAGCTCTGATCGATTGCTTAGCGCCAGACCGTCGTTGAAATCGAAATCCAAGGTACAACCTGAAGTTGTT : 637
pCR-TOPO : ----- : -

      *           1160           *           1180           *           1200           *
4243-157-f: ----- : -
4243-158-f: ----- : -
4243-157-r: GTTCAACCTGGTCAA[TAA]TTCAAATAGTAGAGACATCTACTGTAATGAATTCTAAAAAACCCCTGCTTCGGCAGGG : 675
4243-158-r: GTTCAACCTGGTCAA[TAA]TTCAAATAGTAGAGACATCTACTGTAATGAATTCTAAAAAACCCCTGCTTCGGCAGGG : 713
pCR-TOPO : ----- : -

      1220           *           1240
4243-157-f: ----- : -
4243-158-f: ----- : -
4243-157-r: TCTTCTTTTGTGATGACTTTACAAGGG : 704
4243-158-r: TCTTCTTTTGTGATGACTTTACAAGGG : 742
pCR-TOPO : -----AAGGG : 10

```

Abb. 28: Sequenz des pCR-Blunt II-TOPO-Vektors mit ligiertem *ompA*-Gen von *Proteus mirabilis* 19. Alle Sequenzläufe wurden von der Firma SEQLAB in Göttingen durchgeführt. Sequenzen aus Klon 157 (K157): 4243-157-f und 4243-157-r. Sequenzen aus Klon 158 (K158): 4243-158-f und 4243-158-r. f = *forward* (5'-3'-Orientierung); r = *reverse* (3'-5'-komplementäre Orientierung); Vektorabschnitt in grau; Start-ATG und Stop-TAA Codon sind markiert.

Weiterhin wurde die ermittelte *consensus*-Sequenz der Klone K157 und K158 mit der *ompA*-Gen-Sequenz von *Proteus mirabilis* HI4320 aus der Datenbank mittels GeneDoc verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.

```

      *           20           *           40           *           60           *
miraOmpA: ATGAAAAAGACAGCTATCGCATTAGCAGTGGCAGTGGCAGCTTTCGCAACTGCAGCGCAAGCAGCTCCAAAAGACAA : 77
Pm19OmpA: ATGAAAAAGACAGCTATCGCATTAGCAGTGGCAGTGGCAGCTTTCGCAACTGCAGCGCAAGCAGCTCCAAAAGACAA : 77
Consensus ATGAAAAAGACAGCTATCGCATTAGCAGTGGCAGTGGCAGCTTTCGCAACTGCAGCGCAAGCAGCTCCAAAAGACAA

      80           *           100          *           120          *           140          *
miraOmpA: TACTTGGTATACCGGTGGTAAATTAGGTTGGTCTCAGTATCAAAGTACTGGTAAACAATTGGGACGGCGTGAATATCG : 154
Pm19OmpA: TACTTGGTATACCGGTGGTAAATTAGGTTGGTCTCAGTATCAAAGTACTGGTAAACAATTGGGACGGCGTGAATATCG : 154
Consensus TACTTGGTATACCGGTGGTAAATTAGGTTGGTCTCAGTATCAAAGTACTGGTAAACAATTGGGACGGCGTGAATATCG

      160          *           180          *           200          *           220          *
miraOmpA: GTAACGGTAGCACACACAAAGACCAAATGGTGTGGTGCATTGCTGGTTATCAGTACAACCAATACTTAGGTTTT : 231
Pm19OmpA: GTAACGGTAGCACACACAAAGACCAAATGGTGTGGTGCATTGCTGGTTATCAGTACAACCAATACTTAGGTTTT : 231
Consensus GTAACGGTAGCACACACAAAGACCAAATGGTGTGGTGCATTGCTGGTTATCAGTACAACCAATACTTAGGTTTT

      240          *           260          *           280          *           300
miraOmpA: GAACTGGGTTATGACTGGTTAGGTCGTATGGCTTATAAAGGTTTCATACAACAACGGTGCATTCAAAGTCAAGGTAT : 308
Pm19OmpA: GAACTGGGTTATGACTGGTTAGGTCGTATGGCTTATAAAGGTTTCATACAACAACGGTGCATTCAAAGTCAAGGTAT : 308
Consensus GAACTGGGTTATGACTGGTTAGGTCGTATGGCTTATAAAGGTTTCATACAACAACGGTGCATTCAAAGTCAAGGTAT

      *           320          *           340          *           360          *           380
miraOmpA: CCAATTAACCACTAAATTAAGCTATCCAGTAATGGATGACTTAGACGTTTATACACGTTTAGTGGTATGGTATGGC : 385
Pm19OmpA: CCAATTAACCACTAAATTAAGCTATCCAGTAATGGATGACTTAGACGTTTATACACGTTTAGTGGTATGGTATGGC : 385
Consensus CCAATTAACCACTAAATTAAGCTATCCAGTAATGGATGACTTAGACGTTTATACACGTTTAGTGGTATGGTATGGC

      *           400          *           420          *           440          *           460
miraOmpA: GTGCAGATTCAACTGCAACTATTAATGCAACTTCAGCAGAGACTCAAAAACGTTTCTCTGTAATGATACTGGCGTT : 462
Pm19OmpA: GTGCAGATTCAACTGCAACTATTAATGCAACTTCAGCAGAGACTCAAAAACGTTTCTCTGTAATGATACTGGCGTT : 462
Consensus GTGCAGATTCAACTGCAACTATTAATGCAACTTCAGCAGAGACTCAAAAACGTTTCTCTGTAATGATACTGGCGTT

      *           480          *           500          *           520          *           54
miraOmpA: TCTCCAGTATTCGCATTAGGTACTGAATACGGCATCACTCCTAACATTGCTACTCGTCTTGAGTATCAGTGGATCAA : 539
Pm19OmpA: TCTCCAGTATTCGCATTAGGTACTGAATACGGCATCACTCCTAACATTGCTACTCGTCTTGAGTATCAGTGGATCAA : 539
Consensus TCTCCAGTATTCGCATTAGGTACTGAATACGGCATCACTCCTAACATTGCTACTCGTCTTGAGTATCAGTGGATCAA

      0           *           560          *           580          *           600          *
miraOmpA: CAACATCGGTGATAAAGGTACTCTGAACGCTCGTCCAGACAATGGTATGCTGAGTGTGGTGTGGTTACCGTTTCA : 616
Pm19OmpA: CAACATCGGTGATAAAGGTACTCTGAACGCTCGTCCAGACAATGGTATGCTGAGTGTGGTGTGGTTACCGTTTCA : 616
Consensus CAACATCGGTGATAAAGGTACTCTGAACGCTCGTCCAGACAATGGTATGCTGAGTGTGGTGTGGTTACCGTTTCA

      620          *           640          *           660          *           680          *
miraOmpA: ACCAAGAACTCCAGCTCCAGTTGTTGAGCCAGCTCCAGTAGTTGCTCCAGCTCCAGTTGTTGAGAACAAAACCTTT : 693
Pm19OmpA: ACCAAGAACTCCAGCTCCAGTTGTTGAGCCAGCTCCAGTAGTTGCTCCAGCTCCAGTTGTTGAGAACAAAACCTTT : 693
Consensus ACCAAGAACTCCAGCTCCAGTTGTTGAGCCAGCTCCAGTAGTTGCTCCAGCTCCAGTTGTTGAGAACAAAACCTTT

      700          *           720          *           740          *           760          *
miraOmpA: ACTCTGCGTTCAGACGTTCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGCACTGAATGGTCT : 770
Pm19OmpA: ACTCTGCGTTCAGACGTTCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGCACTGAATGGTCT : 770
Consensus ACTCTGCGTTCAGACGTTCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGTCAAGAAGCACTGAATGGTCT

      780          *           800          *           820          *           840
miraOmpA: GTACAAAGAATTAGCTAACATCGACCCAACCTCAAGGTCGTGTCGTAGTTATCGGTTACACTGACCGTATCGGTTCTC : 847
Pm19OmpA: GTACAAAGAATTAGCTAACATCGACCCAACCTCAAGGTCGTGTCGTAGTTATCGGTTACACTGACCGTATCGGTTCTC : 847
Consensus GTACAAAGAATTAGCTAACATCGACCCAACCTCAAGGTCGTGTCGTAGTTATCGGTTACACTGACCGTATCGGTTCTC

      *           860          *           880          *           900          *           920
miraOmpA: AAAACTACAACCTGCCTCTGTCAGAAAAACGTCCTCAATCTGTAGTTGATTACCTAGTATCTAAAGGTATTCTCTGCA : 924
Pm19OmpA: AAAACTACAACCTGCCTCTGTCAGAAAAACGTCCTCAATCTGTAGTTGATTACCTAGTATCTAAAGGTATTCTCTGCA : 924
Consensus AAAACTACAACCTGCCTCTGTCAGAAAAACGTCCTCAATCTGTAGTTGATTACCTAGTATCTAAAGGTATTCTCTGCA

      *           940          *           960          *           980          *           1000
miraOmpA: AACAGCATCTCTGCAGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAAGTGGCAACACTTGTGACAACATCAAAGCTCGTGC : 1001
Pm19OmpA: AACAGCATCTCTGCAGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAAGTGGCAACACTTGTGACAACATCAAAGCTCGTGC : 1001
Consensus AACAGCATCTCTGCAGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAAGTGGCAACACTTGTGACAACATCAAAGCTCGTGC

```

```

          *      1020          *      1040          *      1060          *      10
miraOmpA: AGCTCTGATCGATTGCTTAGCGCCAGACCGTCGTGTAGAAATCGAAATCCAAGGTACAAC : 1078
Pm19OmpA: AGCTCTGATCGATTGCTTAGCGCCAGACCGTCGTGTAGAAATCGAAATCCAAGGTACAAC : 1078
Consensus AGCTCTGATCGATTGCTTAGCGCCAGACCGTCGTGTAGAAATCGAAATCCAAGGTACAAC : 1078

          80
miraOmpA: CTGGTCAA TAA : 1089
Pm19OmpA: CTGGTCAA TAA : 1089
Consensus CTGGTCAA TAA

```

Abb. 29: Vergleich der *ompA*-Sequenz von *Proteus mirabilis* HI4320 mit der vollständigen *ompA*-Sequenz von *Proteus mirabilis* 19. miraOmpA = *ompA*-Gen-Sequenz von *Proteus mirabilis* HI4320; Pm19OmpA = *ompA*-Gen-Sequenz von *Proteus mirabilis* 19. Sequenzabweichungen in grau; Start- und Stop-Codon sind markiert.

Nach diesem Sequenzvergleich (Abbildung 29) umfaßt die *ompA*-Gen-Sequenz bei beiden Organismen 1.089 Basenpaare. An 7 Positionen (nt380, nt425, nt426, nt447, nt777, nt903, nt988) konnten Abweichungen in der Sequenz festgestellt werden, was einer Identität von 99,36% (1.082 bp / 1.089 bp) entspricht.

Zum Vergleich dieser Ergebnisse auf der Ebene der Aminosäure wurden beide Sequenzen unter Verwendung des Programms SeqaidII (*DNA Sequence Manipulation and Analysis Program, Version 3.81*) [Rhoads & Roufa, 1991] in die entsprechende Aminosäuresequenz übersetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

```

          *      20          *      40          *      60          *
miraOmpA : MKKTAIALAVAVAAAFATAAQAAPKDNTWYTGKGLGWSQYQSTGNNWDGVNIGNSTHKDQIGAGAFAGYQYNQYL : 75
Pm19OmpA : MKKTAIALAVAVAAAFATAAQAAPKDNTWYTGKGLGWSQYQSTGNNWDGVNIGNSTHKDQIGAGAFAGYQYNQYL : 75
Consensus MKKTAIALAVAVAAAFATAAQAAPKDNTWYTGKGLGWSQYQSTGNNWDGVNIGNSTHKDQIGAGAFAGYQYNQYL

          80          *      100          *      120          *      140          *
miraOmpA : GFELGYDWLGRMAYKGSYNNGAFKAQGIQLTTKLSYPVMDLVDVYTRLGGMWRADSTATINATSAE TQKRFS DN : 150
Pm19OmpA : GFELGYDWLGRMAYKGSYNNGAFKAQGIQLTTKLSYPVMDLVDVYTRLGGMWRADSTATINATSAG TQKRFS EN : 150
Consensus GFELGYDWLGRMAYKGSYNNGAFKAQGIQLTTKLSYPVMDLVDVYTRLGGMWRADSTATINATSAE TQKRFS DN

          160          *      180          *      200          *      220
miraOmpA : DTGVSPVFBALGTEYAITPNIATRLEYQWVWINNIGDKGTLNARPDNGMLSVGVAYRFNQETPAPVVEPAPVVPAPV : 225
Pm19OmpA : DTGVSPVFBALGTEYAITPNIATRLEYQWVWINNIGDKGTLNARPDNGMLSVGVAYRFNQETPAPVVEPAPVVPAPV : 225
Consensus DTGVSPVFBALGTEYAITPNIATRLEYQWVWINNIGDKGTLNARPDNGMLSVGVAYRFNQETPAPVVEPAPVVPAPV

          *      240          *      260          *      280          *      300
miraOmpA : VENKFTLRSDVLFNFKSSSLKAEQGEALNGLYNELANIDPTQGRVVVIGYTDRIQSQNYNLP LSEKRAQSVVDY : 300
Pm19OmpA : VENKFTLRSDVLFNFKSSSLKAEQGEALNGLYNELANIDPTQGRVVVIGYTDRIQSQNYNLP LSEKRAQSVVDY : 300
Consensus VENKFTLRSDVLFNFKSSSLKAEQGEALNGLYNELANIDPTQGRVVVIGYTDRIQSQNYNLP LSEKRAQSVVDY

          *      320          *      340          *      360
miraOmpA : LVSKGIPANSISAEGRGKENPVTGNTCDN KARAALIDCLAPDRRVEIEIQGTTEVVVQPGQ : 362
Pm19OmpA : LVSKGIPANSISAEGRGKENPVTGNTCDN KARAALIDCLAPDRRVEIEIQGTTEVVVQPGQ : 362
Consensus LVSKGIPANSISAEGRGKENPVTGNTCDN KARAALIDCLAPDRRVEIEIQGTTEVVVQPGQ

```

Abb. 30: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen des OmpA von *Proteus mirabilis* HI4320 und *Proteus mirabilis* 19. miraOmpA = OmpA-Sequenz von *Proteus mirabilis* HI4320; Pm19OmpA = OmpA-Sequenz von *Proteus mirabilis* 19. Sequenzabweichungen in grau

Wie der Abbildung 30 zu entnehmen ist, gibt es in den 362 langen Aminosäureketten an 4 Positionen (aa127, aa142, aa149 und aa330) Abweichungen. Dies entspricht einer Identität von 98,90% (358 aa / 362 aa).

4.3.6. Phylogenetischer Vergleich auf der Basis von OmpA

Anhand der Aminosäuresequenz des OmpA von *Proteus mirabilis* 19 konnte ein Vergleich der phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse mit anderen *Enterobacteriaceae* erstellt werden. Hierzu wurden die Aminosäuresequenzen von *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae* und *Enterobacter aerogenes* aus der Gendatenbank www.ncbi.nlm.nih.gov herangezogen. Die Aminosäuresequenz von *Erwinia amylovora* wurde im Labor zeitgleich von Sibylle Ohlweiler im Rahmen einer Diplomarbeit [Ohlweiler, 2002] ermittelt. Aus früheren Untersuchungen zur Sequenzaufklärung des OmpA wurden zusätzlich kurze Peptid-Sequenzen aus *Proteus mirabilis* 19 [Korn et al., 1993] in den Vergleich mit aufgenommen. Der Vergleich der verschiedenen Aminosäuresequenzen erfolgte mit GeneDoc. Die Ergebnisse des Sequenzvergleichs sind in Abbildung 31 dargestellt.

Diese Auswertung diente als Grundlage für die weitergehende Betrachtung phylogenetischer Verwandtschaftsbeziehungen. Für die Erstellung eines Dendrogramms wurde die Software CLUSTRAL W und NJPlot verwendet.

In Abbildung 32 sind die aus dem Vergleich der Aminosäure-Sequenzen des OmpA (s. Abbildung 31) gewonnen evolutionären Distanzen graphisch und in Tabelle 3 tabellarisch dargestellt.

Die evolutionäre Distanz stellt die durch den verwendeten Algorithmus errechnete phylogenetische Entfernung verschiedener Arten auf Basis einer spezifischen Sequenz (hier OmpA-Aminosäuresequenz) dar. Demnach liegt eine enge Verwandtschaft zwischen *E. coli* (Ec), *S. dysenteriae* (Sd) und *S. typhimurium* (St) vor, während die evolutionäre Distanz zu *E. aerogenes* (Eae) und *E. amylovora* (Ea) größer wird. Die größte evolutionäre Distanz wurde zu den beiden *Proteus* Arten berechnet. Zwischen *Proteus mirabilis* 19 und *Proteus mirabilis* H14320 besteht erwartungsgemäß die geringste berechnete Distanz.

E.coli	:	MKKTAAIAI	20	*	GAKL	40	*	WYHTGFIN	60	*	-----NNGP	THEN	QL	GAGAF	GGYQ	VNP	PYV	:	70																																																								
S.typhim.	:	MKKTAAIAI	20	*	WYAG	40	*	KLWGSQ	60	*	-----NDGP	THEN	QL	GAGAF	GGYQ	VNP	PYV	:	70																																																								
S.dysent.	:	MKKTAAIT	20	*	WYHTG	40	*	FIN	60	*	-----NNGP	THEN	QL	GAGAF	GGYQ	VNP	PYV	:	70																																																								
E.amylov.	:	MKKTAAIAI	20	*	WYHTG	40	*	FIN	60	*	-----NNGP	THEN	QL	GAGAF	GGYQ	VNP	PYV	:	75																																																								
E.aerog.	:	MKKTAAIAI	20	*	WYHTG	40	*	FIN	60	*	-----NNGP	THEN	QL	GAGAF	GGYQ	VNP	PYV	:	74																																																								
mira	:	MKKTAAIAI	20	*	WYHTG	40	*	FIN	60	*	-----NNGP	THEN	QL	GAGAF	GGYQ	VNP	PYV	:	75																																																								
P.mir.19	:	MKKTAAIAI	20	*	WYHTG	40	*	FIN	60	*	-----NNGP	THEN	QL	GAGAF	GGYQ	VNP	PYV	:	75																																																								
A.Korn	:	-----	20	*	WYHTG	40	*	FIN	60	*	-----NNGP	THEN	QL	GAGAF	GGYQ	VNP	PYV	:	10																																																								
Consensus	:	MKKTAAIA	20	*	WYHTG	40	*	FIN	60	*	-----NNGP	THEN	QL	GAGAF	GGYQ	VNP	PYV	:	70																																																								
E.coli	:	GFEMGYD	80	*	WLRMPY	100	*	KGVS	120	*	VENG	AYK	QGV	QL	TAK	LG	YP	IT	DD	LD	Y	TR	LG	GM	VW	RA	D	T	K	S	N	V	Y	G	----	K	N	H	----	:	136																																		
S.typhim.	:	GFEMGYD	80	*	WLRMPY	100	*	KGVS	120	*	VENG	AYK	QGV	QL	TAK	LG	YP	IT	DD	LD	Y	TR	LG	GM	VW	RA	D	T	K	S	N	V	Y	G	----	K	N	H	----	:	140																																		
S.dysent.	:	GFEMGYD	80	*	WLRMPY	100	*	KGVS	120	*	VENG	AYK	QGV	QL	TAK	LG	YP	IT	DD	LD	Y	TR	LG	GM	VW	RA	D	T	K	S	N	V	Y	G	----	K	N	H	----	:	141																																		
E.amylov.	:	GFELGYD	80	*	WLRMPN	100	*	KCDV	120	*	NGAF	KA	QGI	Q	MA	AK	L	S	Y	P	I	AD	LD	V	Y	TR	LG	GM	VW	RA	D	A	T	Q	N	P	T	Y	G	R	I	S	----	N	H	----	:	145																											
E.aerog.	:	GFEMGYD	80	*	WLRMPY	100	*	KGVS	120	*	VENG	AYK	QGV	QL	TAK	LG	YP	IT	DD	LD	Y	TR	LG	GM	VW	RA	D	S	----	S	N	S	----	I	A	G	D	N	H	----	:	140																																	
mira	:	GFELGYD	80	*	WLRMAY	100	*	KGVS	120	*	YNNG	AF	KA	Q	I	L	T	T	K	L	S	Y	P	V	M	D	L	D	V	Y	TR	LG	GM	E	W	R	A	D	S	T	A	T	I	N	A	T	S	A	E	T	Q	K	R	F	S	D	N	:	150																
P.mir.19	:	GFELGYD	80	*	WLRMAY	100	*	KGVS	120	*	YNNG	AF	KA	Q	I	L	T	T	K	L	S	Y	P	V	M	D	L	D	V	Y	TR	LG	GM	E	W	R	A	D	S	T	A	T	I	N	A	T	S	A	E	T	Q	K	R	F	S	D	N	:	150																
A.Korn	:	-----	80	*	WLRMAY	100	*	KGVS	120	*	YNNG	AF	KA	Q	I	L	T	T	K	L	S	Y	P	V	M	D	L	D	V	Y	TR	LG	GM	E	W	R	A	D	S	T	A	T	I	N	A	T	S	A	E	T	Q	K	R	F	S	D	N	:	34																
Consensus	:	GF	E	6	Y	D	W	L	G	R	M	P	Y	K	G	S	V	N	G	A	5	K	A	Q	G	6	Q	6	T	A	K	L	G	Y	P	6	T	D	D	L	6	Y	T	R	L	G	M	V	W	R	A	D	3	K	S	N	6	N	A	T	S	A	3	K	1	H	F	S	D	N	:	34			
E.coli	:	DTGVSPV	160	*	FAGG	180	*	VEYAIT	200	*	PEIATR	LEYQ	W	T	N	N	I	G	D	A	H	T	I	G	T	R	P	D	N	G	M	L	S	L	G	V	S	Y	R	F	G	Q	E	A	A	P	V	V	A	P	----	A	P	A	P	----	:	209																	
S.typhim.	:	DTGVSPV	160	*	FAGG	180	*	VEYAIT	200	*	PEIATR	LEYQ	W	T	N	N	I	G	D	A	H	T	I	G	T	R	P	D	N	G	M	L	S	L	G	V	S	Y	R	F	G	Q	E	A	A	P	V	V	A	P	----	A	P	A	P	----	:	213																	
S.dysent.	:	DTGVSPV	160	*	FAGG	180	*	VEYAIT	200	*	PEIATR	LEYQ	W	T	N	N	I	G	D	A	H	T	I	G	T	R	P	D	N	G	M	L	S	L	G	V	S	Y	R	F	G	Q	E	A	A	P	V	V	A	P	----	A	P	A	P	----	:	214																	
E.amylov.	:	DTGVSPV	160	*	FAGG	180	*	VEYAIT	200	*	PEIATR	LEYQ	W	T	N	N	I	G	D	A	H	T	I	G	T	R	P	D	N	G	M	L	S	L	G	V	S	Y	R	F	G	Q	E	A	A	P	V	V	A	P	----	A	P	A	P	----	:	218																	
E.aerog.	:	DTGVSPV	160	*	FAGG	180	*	VEYAIT	200	*	PEIATR	LEYQ	W	T	N	N	I	G	D	A	H	T	I	G	T	R	P	D	N	G	M	L	S	L	G	V	S	Y	R	F	G	Q	E	A	A	P	V	V	A	P	----	A	P	A	P	----	:	213																	
mira	:	DTGVSPV	160	*	FAGG	180	*	VEYAIT	200	*	PEIATR	LEYQ	W	T	N	N	I	G	D	A	H	T	I	G	T	R	P	D	N	G	M	L	S	L	G	V	S	Y	R	F	G	Q	E	A	A	P	V	V	A	P	----	A	P	A	P	----	:	225																	
P.mir.19	:	DTGVSPV	160	*	FAGG	180	*	VEYAIT	200	*	PEIATR	LEYQ	W	T	N	N	I	G	D	A	H	T	I	G	T	R	P	D	N	G	M	L	S	L	G	V	S	Y	R	F	G	Q	E	A	A	P	V	V	A	P	----	A	P	A	P	----	:	225																	
A.Korn	:	-----	160	*	FAGG	180	*	VEYAIT	200	*	PEIATR	LEYQ	W	T	N	N	I	G	D	A	H	T	I	G	T	R	P	D	N	G	M	L	S	L	G	V	S	Y	R	F	G	Q	E	A	A	P	V	V	A	P	----	A	P	A	P	----	:	48																	
Consensus	:	DT	G	V	S	P	6	F	A	G	G	6	E	5	A	6	T	P	1	I	A	T	R	L	E	Y	Q	W	6	N	N	I	G	D	A	G	T	6	G	A	R	P	D	N	G	6	L	S	6	G	V	S	Y	R	F	G	Q	E	A	A	P	V	V	A	P	----	A	P	A	P	----	:	48		
E.coli	:	VQTKHF	240	*	TLKSD	260	*	VL	280	*	VLFN	FN	KAT	TLK	PE	G	Q	A	L	D	Q	L	Y	Q	L	S	N	L	D	P	K	D	G	S	V	V	L	G	Y	T	D	R	I	G	S	D	A	Y	N	Q	L	S	E	R	R	A	Q	S	V	V	D	Y	:	284											
S.typhim.	:	VQTKHF	240	*	TLKSD	260	*	VL	280	*	VLFN	FN	KAT	TLK	PE	G	Q	A	L	D	Q	L	Y	Q	L	S	N	L	D	P	K	D	G	S	V	V	L	G	Y	T	D	R	I	G	S	D	A	Y	N	Q	L	S	E	R	R	A	Q	S	V	V	D	Y	:	288											
S.dysent.	:	VQTKHF	240	*	TLKSD	260	*	VL	280	*	VLFN	FN	KAT	TLK	PE	G	Q	A	L	D	Q	L	Y	Q	L	S	N	L	D	P	K	D	G	S	V	V	L	G	Y	T	D	R	I	G	S	D	A	Y	N	Q	L	S	E	R	R	A	Q	S	V	V	D	Y	:	289											
E.amylov.	:	VETKRF	240	*	TLKSD	260	*	VL	280	*	TFN	KST	TLK	PE	G	Q	A	L	D	Q	L	Y	T	Q	L	S	N	L	D	P	K	D	G	S	V	V	L	G	Y	T	D	R	I	G	S	E	Q	Y	N	Q	L	S	E	R	R	A	Q	S	V	V	D	Y	:	293											
E.aerog.	:	VTTKTF	240	*	TLKSD	260	*	VL	280	*	VLFN	FN	KAT	TLK	PE	G	Q	A	L	D	Q	L	Y	T	Q	L	S	N	L	D	P	K	D	G	S	V	V	L	G	Y	T	D	R	I	G	S	E	Q	Y	N	Q	L	S	E	R	R	A	Q	S	V	V	D	Y	:	288										
mira	:	VENKTF	240	*	TLRSD	260	*	VL	280	*	FNY	NK	S	L	K	A	E	G	Q	E	A	L	N	G	L	Y	N	E	L	A	N	I	D	P	T	Q	G	R	V	V	I	G	Y	T	D	R	I	G	S	Q	Y	N	L	P	L	S	E	K	R	A	Q	S	V	V	D	Y	:	300							
P.mir.19	:	VENKTF	240	*	TLRSD	260	*	VL	280	*	FNY	NK	S	L	K	A	E	G	Q	E	A	L	N	G	L	Y	N	E	L	A	N	I	D	P	T	Q	G	R	V	V	I	G	Y	T	D	R	I	G	S	Q	Y	N	L	P	L	S	E	K	R	A	Q	S	V	V	D	Y	:	300							
A.Korn	:	-----	240	*	TLRSD	260	*	VL	280	*	FNY	NK	S	L	K	A	E	G	Q	E	A	L	N	G	L	Y	N	E	L	A	N	I	D	P	T	Q	G	R	V	V	I	G	Y	T	D	R	I	G	S	Q	Y	N	L	P	L	S	E	K	R	A	Q	S	V	V	D	Y	:	91							
Consensus	:	V	2	T	K	H	F	T	L	4	S	D	V	L	F	N	5	N	K	S	3	L	K	P	E	G	Q	2	A	L	1	Q	L	Y	3	2	L	S	N	6	P	K	D	G	S	V	V	6	G	5	T	1	R	I	G	S	2	1	Y	N	Q	L	S	E	4	R	A	Q	S	V	V	1	Y	:	91
E.coli	:	LIS	320	*	KGIP	340	*	AD	360	*	KL	IS	ARG	MG	ES	N	P	V	T	G	N	T	C	D	N	V	K	Q	R	A	L	I	D	C	L	A	P	D	R	R	V	E	I	E	V	K	G	I	K	D	V	V	T	Q	P	Q	A	:	346																
S.typhim.	:	LIS	320	*	KGIP	340	*	AD	360	*	KL	IS	ARG	MG	ES	N	P	V	T	G	N	T	C	D	N	V	K	Q	R	A	L	I	D	C	L	A	P	D	R	R	V	E	I	E	V	K	G	I	K	D	V	V	T	Q	P	Q	A	:	350																
S.dysent.	:	LIS	320	*	KGIP	340	*	AD	360	*	KL	IS	ARG	MG	ES	N	P	V	T	G	N	T	C	D	N	V	K	Q	R	A	L	I	D	C	L	A	P	D	R	R	V	E	I	E	V	K	G	I	K	D	V	V	T	Q	P	Q	A	:	351																
E.amylov.	:	LV	320	*	SKG	340	*	I	360	*	PS	N	K	I	S	A	R	G	M	G	E	S	D	P	V	T	G	N	T	C	D	N	V	K	A	R	A	L	I	D	C	L	A	P	D	R	R	V	E	I	Q	V	K	G	I	K	D	V	V	T	Q	P	Q	A	:	355									
E.aerog.	:	LV	320	*	SKG	340	*	I	360	*	PS	N	K	I	S	A	R	G	M	G	E	S	D	P	V	T	G	N	T	C	D	N	V	K	A	R	A	L	I	D	C	L	A	P	D	R	R	V	E	I	E	V	K	G	I	K	D	V	V	T	Q	P	Q	A	:	350									
mira	:	LV	320	*	SKG	340	*	I	360	*	PS	N	K	I	S	A	R	G	M	G	E	S	D	P	V	T	G	N	T	C	D	N	V	K	A	R	A	L	I	D	C	L	A	P	D	R	R	V</																											

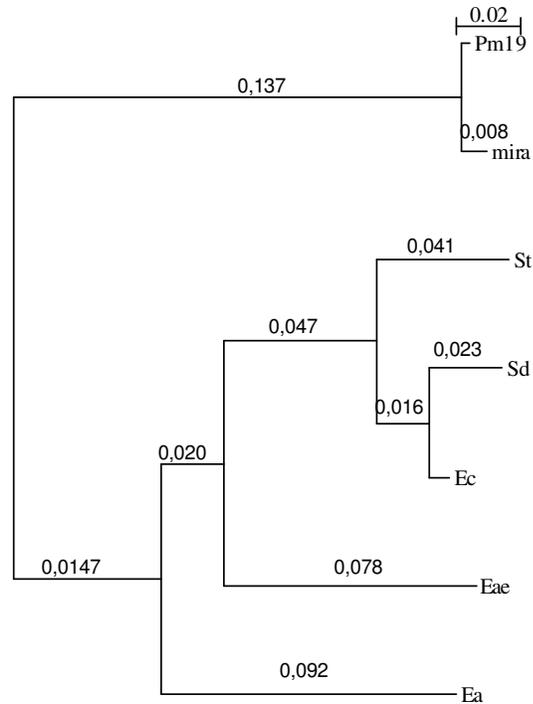


Abb. 32: Dendrogramm der Verwandtschaft einiger *Enterobacteriaceae* auf der Basis von OmpA. Für die Erstellung wurde die Software ClustalW und NJPlot verwendet. Die OmpA-Aminosäuresequenz folgender Organismen wurde verwendet: *Proteus mirabilis* 19 (Pm19), *Proteus mirabilis* HI4320 (mira), *Salmonella typhimurium* (St), *Shigella dysenteriae* (Sd), *Escherichia coli* (Ec), *Enterobacter aerogenes* (Eae), *Erwinia amylovora* (Ea). Balken = evolutionäre Distanz (Maßstab).

Tabelle 3: Übersicht der evolutionären Distanzen der einiger *Enterobacteriaceae* auf der Basis der OmpA-Aminosäuresequenz. Für die Erstellung wurde die Software ClustalW und NJPlot verwendet. Ausgehend von der OmpA-Aminosäuresequenz folgender Organismen wurden die Distanzen berechnet: *Proteus mirabilis* 19 (P.mir.19), *Proteus mirabilis* HI4320 (mira), *Salmonella typhimurium* (S.typhim.), *Shigella dysenteriae* (S.dysent.), *Escherichia coli* (E.coli), *Enterobacter aerogenes* (E.aerog.), *Erwinia amylovora* (E.amylov.).

	E.coli	S.typhim.	S.dysent.	E.amylov.	E.aerog.	mira	P.mir.19
E.coli	-	0,057	0,023	0,175	0,141	0,275	0,267
S.typhim.		-	0,080	0,200	0,166	0,300	0,292
S.dysent.			-	0,198	0,164	0,298	0,290
E.amylov.				-	0,190	0,284	0,276
E.aerog.					-	0,290	0,282
mira						-	0,008
P.mir.19							-

Vergleichend wurde die Ähnlichkeit und Identität der untersuchten Enterobacteriaceae untereinander durch das Programm GeneDoc berechnet. Die Identität gibt dabei den prozentualen Wert identisch positionierter Aminosäuren im Protein an, während sich die Ähnlichkeit auf chemisch verwandte Aminosäurereste bezieht. In Tabelle 4 sind diese Ergebnisse dargestellt.

Tabelle 4: Übersicht der Identität und Ähnlichkeit einiger *Enterobacteriaceae* auf der Basis der OmpA-Aminosäuresequenz. Für die Berechnung wurde die Software GenDoc verwendet. Jeweils der obere prozentuale Wert gibt die Identität und der untere Wert die Ähnlichkeit an. *Proteus mirabilis* 19 (P.mir.19), *Proteus mirabilis* H14320 (mira), *Salmonella typhimurim* (S.typhim.), *Shigella dysenteriae* (S.dysent.), *Escherichia coli* (E.coli), *Enterobacter aerogenes* (E.aerog.), *Erwinia amylovora* (E.amylov.).

	E.coli	S.typhim.	S.dysent.	E.amylov.	E.aerog.	mira	P.mir.19
E.coli	-	92% 96%	95% 97%	78% 86%	83% 89%	68% 78%	68% 79%
S.typhim.		-	90% 94%	79% 85%	82% 89%	67% 78%	67% 78%
S.dysent.			-	78% 86%	81% 89%	68% 78%	69% 79%
E.amylov.				-	79% 87%	69% 79%	69% 79%
E.aerog.					-	67% 78%	68% 78%
mira						-	98% 99%
P.mir.19							-

Beim Vergleich der Aminosäure-Sequenz des OmpA von *Proteus mirabilis* 19 ergibt sich erwartungsgemäß eine hohe Identität von 98% zu der Sequenz von *Proteus mirabilis* H14320. Die Identitäten zu den anderen Bakterien sind deutlich niedriger und bewegen sich in einem Bereich von 67-69%. Ein ähnliches Bild ergibt sich beim Vergleich der Ähnlichkeiten. Diese bewegen sich in einem prozentualen Bereich von 78-79%. Daraus läßt sich ableiten, daß das OmpA innerhalb der untersuchten Organismengruppe konserviert ist, geringe Sequenzunterschiede in der Aminosäurezusammensetzung jedoch vorhanden sind.

4.4. Herstellung rekombinanter Proteine

Aus den Vorversuchen mit den mAk 2.14.1 und 2.18.1 und der Ermittlung der Sequenz des *ompA*-Gens von *Proteus mirabilis* wurde vermutet, daß das OmpA von *Proteus mirabilis* immunrelevante, spezifische Erkennungsdomänen besitzt.

Daher wurden erste Versuche durchgeführt, um diese Gebiete näher zu identifizieren. Hierzu wurden verschiedene Fragmente des Proteins rekombinant in *E. coli* produziert und anschließend in Western-Blot-Analysen mit den monoklonalen Antikörpern untersucht.

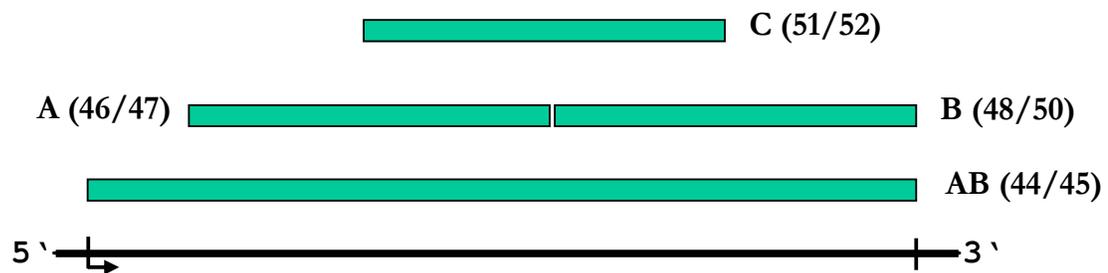


Abb. 33: Expressionsfragmente von OmpA aus *Proteus mirabilis* 19. Dargestellt sind die einzelnen Expressionsfragmente (grün) sowie das *ompA*-Gen (schwarz) aus *P. mirabilis* 19. Die Angaben in Klammern geben die Primerkombination an, mit der die Fragmente zunächst amplifiziert wurden.

Die Abbildung 33 gibt einen Überblick über die relative Größe der einzelnen Expressionsfragmente (AB, A, B und C) und die Position relativ zum *ompA*-Gen. Das Fragment AB (362aa) beinhaltet die vollständige OmpA-Sequenz, während die Fragmente A (187aa), B (189aa) und C (188aa) Bruchstücke dieser sind, die annähernd die gleiche Größe haben.

Zunächst wurden anhand der neuen *ompA*-Sequenz von *P. mirabilis* 19 entsprechende Oligonukleotid-Primer ausgewählt und für die spätere Klonierung in den Expressionsvektor (pET-28, Novagen) mit Restriktionsschnittstellen (*Nco*I und *Hind*III) versehen. Das Fragment AB wurde mit den Oligonukleotid-Primern 44 (*sense*) und 45 (*antisense*) bei einer *Annealing*-Temperatur von 63,8°C durch eine *Pfu*-Polymerase (Promega) amplifiziert. Die kleineren Fragmente wurden bei ähnlichen Bedingungen amplifiziert (Fragment A: Primer 46 und 47 bei 59,2°C; Fragment B: Primer 48 und 50 bei 59,2°C; Fragment C: Primer 51 und 52 bei 58,1°C). Die Amplifikate wurden in einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch

aufgetrennt. Da es sich bei allen Amplifikaten um diskrete Banden im Agarosegel handelte, wurden sämtliche PCR-Produkte über eine PCI-Extraktion aufgereinigt. Für die weitere Expression wurden die aufgereinigten Amplifikate in getrennten Ansätzen mittels einer T_4 -Ligase (Promega) in den Expressionsvektor pET-28 (5369 bp, Novagen) kloniert. Die auf diese Weise hergestellten positiven Klone wurden mittels *Screening*-PCR (I7-Primer) identifiziert.

Zur weiteren Überprüfung der positiven Klone der *Screening*-PCR wurden die Plasmide nach Maniatis aufgereinigt und zusätzlich durch eine Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Hind*III untersucht. Auf diese Weise wurde jeweils ein Klon ausgewählt, das Plasmid nach Nukleobond aufgereinigt und sequenziert. Die Sequenzierung wurde zweimal durch die Firma Seqlab, Göttingen durchgeführt. Mit Hilfe des Programms GeneDoc wurden die Sequenzen einzeln verglichen und die *consensus*-Sequenz ermittelt (nicht gezeigt). Die *consensus*-Sequenzen aller vier Fragmente sind in Abbildung 34 dargestellt.

```

4445-161-n: ATG G A A A A G A C A G C T A T C G C A T T A G C A G T G G C A G T G G C A G C T T T C G C A A C T G C A G C G C A A G C A G C T C C A A A A G A C : 75
4647-170-n: -----ATG G A C : 6
4850-172-n: -----: -
5152-178-n: -----: -

      80          *          100          *          120          *          140          *
4445-161-n: A A T A C T T G G T A T A C C G G T G G T A A A T T A G G T T G G T C T C A G T A T C A A A G T A C T G G T A A C A A T T G G G A C G G C G T G A A T : 150
4647-170-n: A A T A C T T G G T A T A C C G G T G G T A A A T T A G G T T G G T C T C A G T A T C A A A G T A C T G G T A A C A A T T G G G A C G G C G T G A A T : 81
4850-172-n: -----: -
5152-178-n: -----: -

      160          *          180          *          200          *          220
4445-161-n: A T C G G T A A C G G T A G C A C A C A C A A A G A C C A A A T T G G T G C T G G T G C A T T T G C T G G T T A T C A G T A C A A C C A A T A C T T A : 225
4647-170-n: A T C G G T A A C G G T A G C A C A C A C A A A G A C C A A A T T G G T G C T G G T G C A T T T G C T G G T T A T C A G T A C A A C C A A T A C T T A : 156
4850-172-n: -----: -
5152-178-n: -----: -

      *          240          *          260          *          280          *          300
4445-161-n: G G T T T T G A A C T G G G T T A T G A C T G G T T A G G T C G T A T G G C T T A T A A A G G T T C A T A C A A C A A C G G T G C A T T C A A A G C T : 300
4647-170-n: G G T T T T G A A C T G G G T T A T G A C T G G T T A G G T C G T A T G G C T T A T A A A G G T T C A T A C A A C A A C G G T G C A T T C A A A G C T : 231
4850-172-n: -----: -
5152-178-n: -----ATG G C T : 6

      *          320          *          340          *          360          *
4445-161-n: C A A G G T A T C C A A T T A A C C A C T A A A T T A A G C T A T C C A G T A A T G G A T G A C T T A G A C G T T T A T A C A C G T T T A G G T G G T : 375
4647-170-n: C A A G G T A T C C A A T T A A C C A C T A A A T T A A G C T A T C C A G T A A T G G A T G A C T T A G A C G T T T A T A C A C G T T T A G G T G G T : 306
4850-172-n: -----: -
5152-178-n: C A A G G T A T C C A A T T A A C C A C T A A A T T A A G C T A T C C A G T A A T G G A T G A C T T A G A C G T T T A T A C A C G T T T A G G T G G T : 81

      380          *          400          *          420          *          440          *
4445-161-n: A T G G T A T G G C G T G C A G A T T C A A C T G C A A C T A T T A A T G C A A C T T C A G C A G G A A C T C A A A A C G T T T C T C T G A A A A T : 450
4647-170-n: A T G G T A T G G C G T G C A G A T T C A A C T G C A A C T A T T A A T G C A A C T T C A G C A G G A A C T C A A A A C G T T T C T C T G A A A A T : 381
4850-172-n: -----: -
5152-178-n: A T G G T A T G G C G T G C A G A T T C A A C T G C A A C T A T T A A T G C A A C T T C A G C A G G A A C T C A A A A C G T T T C T C T G A A A A T : 156

      460          *          480          *          500          *          520
4445-161-n: G A T A C T G G C G T T T C C A G T A T T C G C A T T A G G T A C T G A A T A C G C G A T C A C T C C T A A C A T T G C T A C T C G T C T T G A G : 525
4647-170-n: G A T A C T G G C G T T T C C A G T A T T C G C A T T A G G T A C T G A A T A C G C G A T C A C T C C T A A C A T T G C T A C T C G T C T T G A G : 456
4850-172-n: -----: -
5152-178-n: G A T A C T G G C G T T T C C A G T A T T C G C A T T A G G T A C T G A A T A C G C G A T C A C T C C T A A C A T T G C T A C T C G T C T T G A G : 231

```

```

*           540           *           560           *           580           *           600
4445-161-n: TATCAGTGGATCAACAACATCGGTGATAAAGGTACTCTGAACGCTCGTCCAGACAATGGTATGCTGAGTGTGGT : 600
4647-170-n: TATCAGTGGATCAACAACATCGGTGATAAAGGTACTCTGAACGCTCGTC----- : 505
4850-172-n: -----ATG-----GACAATGGTATGCTGAGTGTGGT : 27
5152-178-n: TATCAGTGGATCAACAACATCGGTGATAAAGGTACTCTGAACGCTCGTCCAGACAATGGTATGCTGAGTGTGGT : 306

*           620           *           640           *           660           *
4445-161-n: GTTGCTTACCGTTTCAACCAAGAAACTCCAGCTCCAGTTGTTGAGCCAGCTCCAGTAGTTGCTCCAGCTCCAGTT : 675
4647-170-n: ----- : -
4850-172-n: GTTGCTTACCGTTTCAACCAAGAAACTCCAGCTCCAGTTGTTGAGCCAGCTCCAGTAGTTGCTCCAGCTCCAGTT : 102
5152-178-n: GTTGCTTACCGTTTCAACCAAGAAACTCCAGCTCCAGTTGTTGAGCCAGCTCCAGTAGTTGCTCCAGCTCCAGTT : 381

*           680           *           700           *           720           *           740           *
4445-161-n: GTTGAGAACAAAACCTTTACTCTGCGTTCAGACGTTCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGT : 750
4647-170-n: ----- : -
4850-172-n: GTTGAGAACAAAACCTTTACTCTGCGTTCAGACGTTCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGT : 177
5152-178-n: GTTGAGAACAAAACCTTTACTCTGCGTTCAGACGTTCTGTTCAACTACAACAAATCTTCTCTGAAAGCTGAAGGT : 456

*           760           *           780           *           800           *           820
4445-161-n: CAAGAAGCACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGCTAACATCGACCAACTCAAGGTCGTGCTAGTTATCGGT : 825
4647-170-n: ----- : -
4850-172-n: CAAGAAGCACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGCTAACATCGACCAACTCAAGGTCGTGCTAGTTATCGGT : 252
5152-178-n: CAAGAAGCACTGAATGGTCTGTACAATGAATTAGCTAACATCGACCAACTCAAG----- : 511

*           840           *           860           *           880           *           900
4445-161-n: TACACTGACCGTATCGGTTCTCAAAACTACAACCTGCCTCTGTGCAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTAC : 900
4647-170-n: ----- : -
4850-172-n: TACACTGACCGTATCGGTTCTCAAAACTACAACCTGCCTCTGTGCAGAAAAACGTGCTCAATCTGTAGTTGATTAC : 327
5152-178-n: ----- : -

*           920           *           940           *           960           *
4445-161-n: CTGGTATCTAAAGGTATTCTGCAAAACAGCATCTCTGCAGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAACTGGCAAC : 975
4647-170-n: ----- : -
4850-172-n: CTGGTATCTAAAGGTATTCTGCAAAACAGCATCTCTGCAGAAGGTCGTGGTAAAGAAAACCCAGTAACTGGCAAC : 402
5152-178-n: ----- : -

*           980           *           1000           *           1020           *           1040           *
4445-161-n: ACTTGTGACAACGTCAAAGCTCGTGCAGCTCTGATCGATTGCTTAGCGCCAGACCGTCTGTTAGAAAATCGAAAATC : 1050
4647-170-n: ----- : -
4850-172-n: ACTTGTGACAACGTCAAAGCTCGTGCAGCTCTGATCGATTGCTTAGCGCCAGACCGTCTGTTAGAAAATCGAAAATC : 477
5152-178-n: ----- : -

*           1060           *           1080
4445-161-n: CAAGGTACAACCTGAAGTTGTTGTTCAACCTGGTCAA : 1086
4647-170-n: ----- : -
4850-172-n: CAAGGTACAACCTGAAGTTGTTGTTCAACCTGGTCAA : 513
5152-178-n: ----- : -

```

Abb. 34: Vergleich der *consensus*-Sequenzen der Expressionsfragmente von *OmpA* aus *Proteus mirabilis* 19. Dargestellt sind die *consensus*-Sequenzen der einzelnen Expressionsfragmente. 4445-161-n = AB; 4647-170-n = A; 4850-172-n = B; 5152-178-n = C.

Wie der Abbildung 34 zu entnehmen ist, sind die Sequenzen der einzelnen Fragmente in den überlappenden Bereichen identisch (vgl. Lage der einzelnen Fragmente in Abb. 33).

Für die weitere Expression der Protein-Fragmente wurden die vier Expressionsvektoren (pET-28- 4445-161-AB, pET-28-4647-170-A, pET-28-4850-172-B und pET-28-5152-178-C) in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen transformiert. Diese Zellen besitzen das Gen der T7 RNA Polymerase, welches bereits durch DE3-Bakteriophagen in das chromosomale Genom integriert wurde [Studier & Moffatt, 1986; Novy & Morris, 2001]. Dieses Gen steht unter der Kontrolle des *lacUV5* Promotors, welcher durch IPTG induzierbar ist. So veranlaßte die Zugabe von IPTG die Produktion der T7 RNA Polymerase, die wiederum das in den Expressionsvektor (pET-28) inserierte *ompA*-Genfragment transkribierte, welches selbst unter der Kontrolle eines T7 Promotors steht. Zusätzlich trugen die verwendeten *E. coli*

BL21 (DE3)-Zellen das pLysS-Plasmid, welches einen weiteren Selektionsmarker (Chloramphenicol-Resistenz) vermittelt. Zusätzlich wird eine basale Expression des Zielgens über den T7-Promotor in den DE3-lysogenen Zellen unterdrückt, in dem T7-Lysozym produziert wurde, welches der natürliche Inhibitor der T7 RNA Polymerase ist.

Zur qualitativen Kontrolle der exprimierten Protein-Fragmente wurde die C-terminalen His-Tag-Sequenz des Vektors verwendet. Die nahe der *Hind*III-Schnittstelle des multiplen Klonierungsbereichs gelegene His-Tag-Sequenz codiert für sechs Histidin-Reste, welche in dem nachfolgenden Western-Blot-Verfahren mittels eines His-Antikörpers nachgewiesen wurde.

Für die Expression wurden vier Kolben mit 50 ml LB_{Kan/CAM}-Medium mit jeweils 2 ml der entsprechenden Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C schüttelnd ca. 3 Stunden inkubiert, wobei die optische Dichte (OD) regelmäßig kontrolliert wurde. Die Zugabe von 1 mM IPTG erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,6. Unmittelbar vor der Zugabe von IPTG sowie nach 0,5; 1; 2; 3 und 4 Stunden wurde 1 ml der Kultur abgenommen. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 gewaschen und bei -70°C eingefroren.

Der Nachweis der produzierten OmpA-Fragmente erfolgte im (qualitativen) Western-Blot-Verfahren mittels der bereits verwendeten mAk 2.14.1 und 2.18.1. Dazu wurden die Sedimente zunächst aufgetaut, in 100 µl Laemmli-Puffer (SDS-haltig) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff lysiert. Ein zusätzlicher Zellaufschluß erfolgte im Ultraschallbad für 10 min. Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Lysate wurden mittels Bradford-Assay kontrolliert und ggf. eingestellt. Für das Western-Blot-Verfahren wurden jeweils 20 µg Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit den mAk 2.14.1 und 2.18.1 behandelt. Der Nachweis erfolgte über das ECL-Verfahren auf einem Röntgenfilm dargestellt. Als Längenstandard diente ein Proteinmarker der MBI Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und als Positivkontrolle das native OmpA (P30) von *Proteus mirabilis*.

Die Ergebnisse des Western-Blot-Verfahrens sind in den Abbildungen 35 und 36 dargestellt.

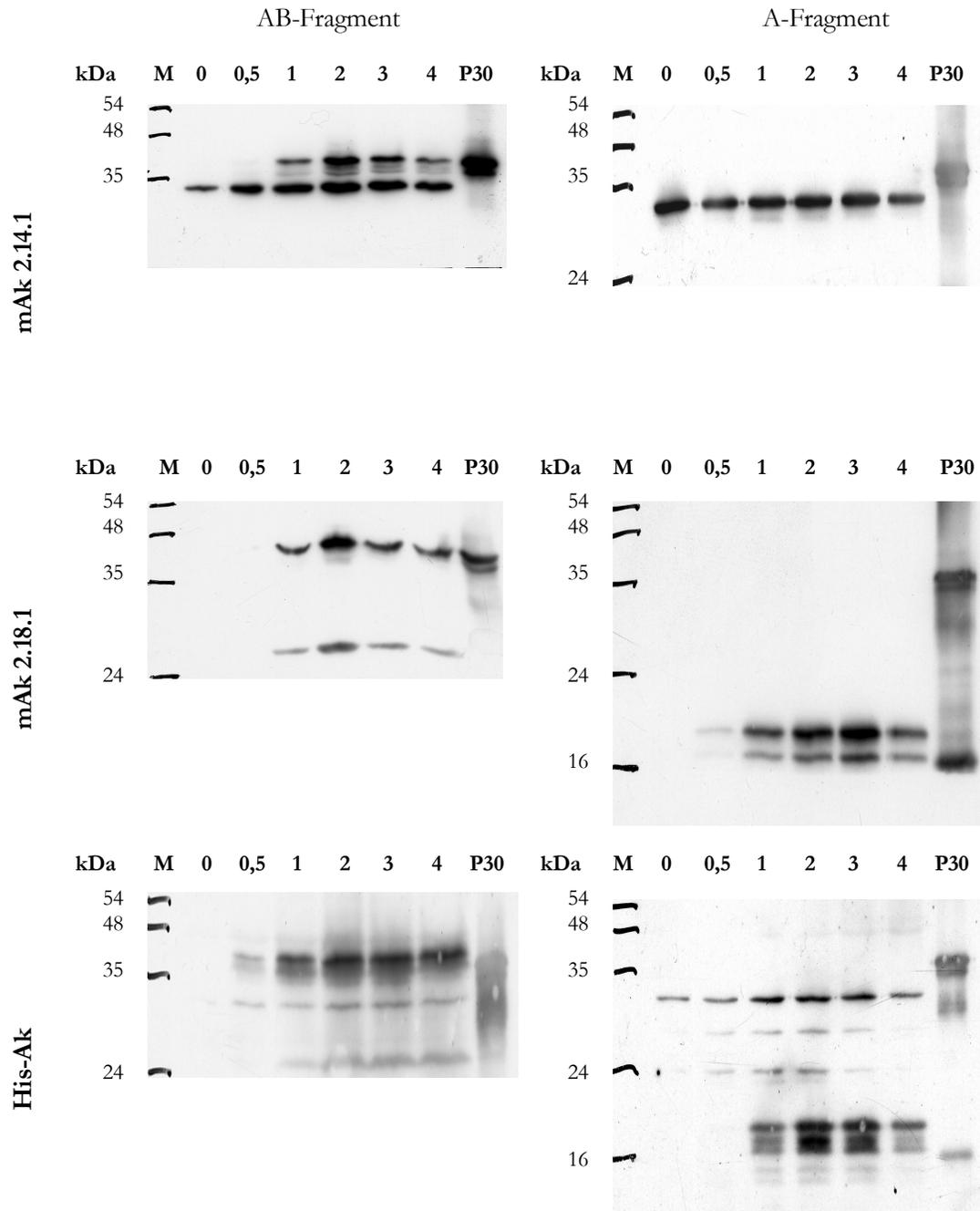


Abb. 35: Western-Blot-Verfahren zum Nachweis der rekombinanten OmpA-Fragmente AB und A aus *Proteus mirabilis*. Jeweils 20 μ g Zellysat-Protein wurde hitzedenaturiert und über zwei Stunden elektrophoretisch in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend für 1,5 Stunden auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit dem mAk 2.14.1 und 2.18.1 sowie His-Tag-Ak für eine Stunde inkubiert. Der Nachweis erfolgte nach dem ECL-Verfahren auf Röntgenfilm. Auftragung von links nach rechts: Längenstandard, Lysate (Induktion von 0-4 Stunden), Positivkontrolle (natives OmpA von *Proteus mirabilis*, P30), links: Expressionsprodukt AB (4445-161), rechts: Expressionsprodukt A (4647-170), M = Längenstandard

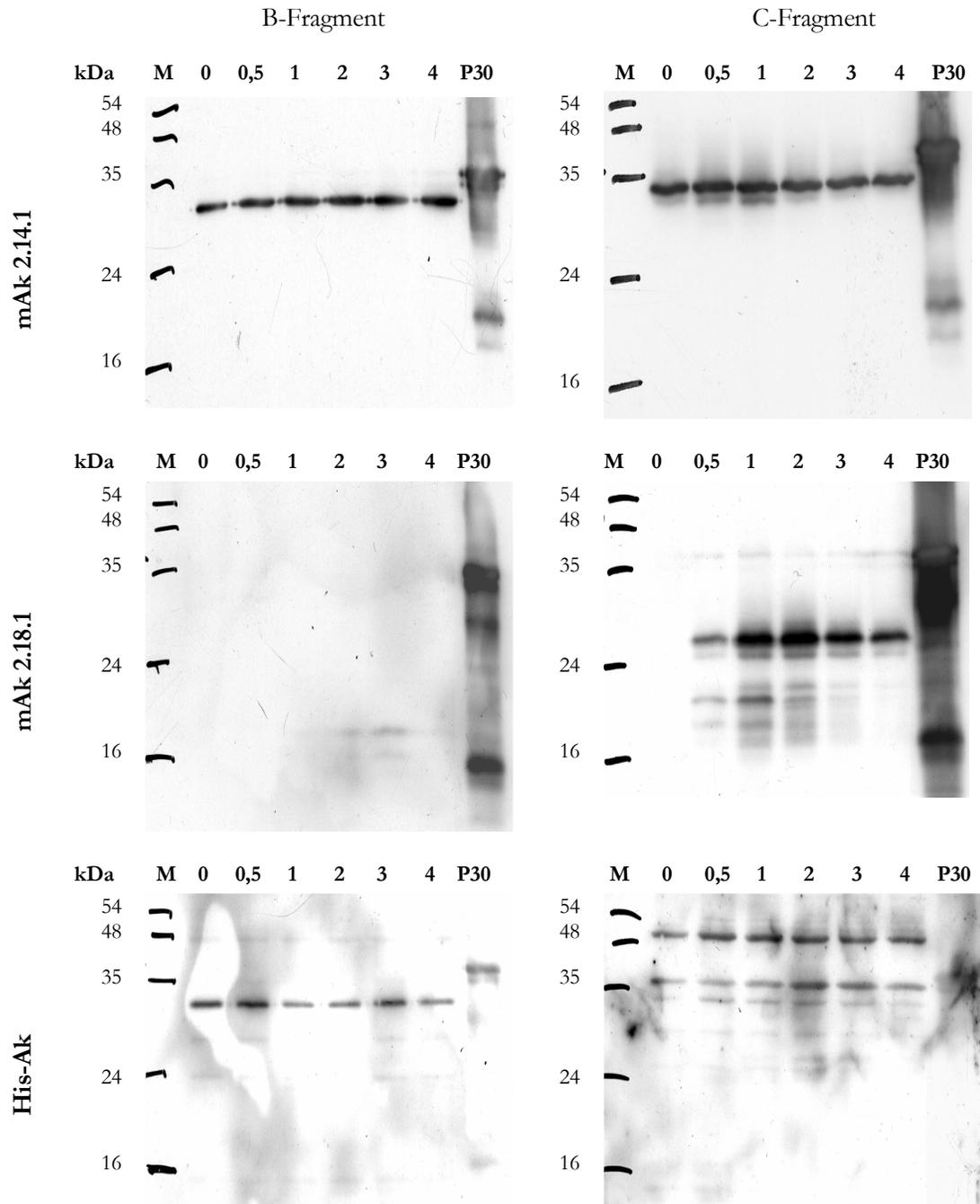


Abb. 36: Western-Blot-Verfahren zum Nachweis der rekombinanten OmpA-Fragmente B und C aus *Proteus mirabilis*. Jeweils 20 µg Zellysate-Protein wurde hitzedenaturiert und über zwei Stunden elektrophoretisch in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend für 1,5 Stunden auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit dem mAk 2.14.1 und 2.18.1 sowie His-Tag-Ak für eine Stunde inkubiert. Der Nachweis erfolgte nach dem ECL-Verfahren auf Röntgenfilm. Auftragung von links nach rechts: Längenstandard, Lysate (Induktion von 0-4 Stunden), Positivkontrolle (natives OmpA von *Proteus mirabilis*, P30), links: Expressionsprodukt B (4850-172), rechts: Expressionsprodukt C (5152-178), M = Längenstandard

Wie der Abbildung 35 zu entnehmen ist, konnte durch den mAk 2.14.1 sowohl das Fragment AB (vollständiges OmpA Protein von *P. mirabilis*) sowie das OmpA von *E. coli* (Expressionszellen) eindeutig nachgewiesen werden. Ebenfalls kann man dem Ergebnis ebenfalls entnehmen, daß das OmpA von *P. mirabilis* im Elektrophoresegel eine scheinbare molekulare Masse von 39 kDa hat (Nachweis mit mAk 2.18.1 und His-Ak), wie es für das OmpA Protein von *P. mirabilis* charakteristisch ist, während die scheinbare molekulare Masse des OmpA von *E. coli* bei ca. 33 kDa lag.

Eine Detektion des Fragments A durch den mAk 2.14.1 erfolgte nicht, lediglich das OmpA von *E. coli*. Dagegen konnte mittels des mAk 2.18.1 und des His-Ak das Fragment A eindeutig mit einer scheinbaren molekularen Masse von ca. 19 kDa nachgewiesen werden (neben Abbauprodukten).

Wie der Abbildung 36 zu entnehmen ist, konnte das Expressionsprodukt B weder durch den mAk 2.14.1 noch durch den mAk 2.18.1 nachgewiesen werden. Lediglich das OmpA von *E. coli* wurde nachgewiesen. Durch den His-Ak konnten Proteine mit der Größe von 32 kDa nachgewiesen werden. Diese entsprachen ihrer Größe nach eher dem OmpA von *E. coli*, da für das Fragment B kleinere Produkte zu erwarten gewesen wären.

Das „zentrale“ Proteinfragment C (Abbildung 38, rechts) konnte mit dem mAk 2.18.1 bei 28 kDa nachgewiesen werden, jedoch nicht durch den generischen mAk 2.14.1. Die Größe des Fragments C erscheint dennoch ein wenig zu groß. Wie schon bei Fragment B, war auch bei Fragment C keine eindeutige His-Reaktion zu erkennen. Ein Grund dafür könnte eine unvollständige Faltung sein.

Diese Ergebnisse deuten auf folgende Annahmen hin:

- Die beiden mAk 2.14.1 und 2.18.1 binden jeweils in unterschiedlichen Bereichen (mAk 2.14.1 nur bei Fragment AB; mAk 2.18.1 bei den Fragmenten AB, A und C, nicht aber bei Fragment B)
- Der generische mAk 2.14.1 bindet im N-terminalen Bereich des Proteins (Detektion nur von Fragment AB), vermutlich im konservierten Bereich von aa 1 – 70 (vgl. Abbildung 31)
- Der spezifische mAk 2.18.1 bindet in einem zentralen Bereich des Proteins (Detektion der Fragmente AB, A und C), vermutlich im heterogenen Bereich von aa 130 – 150 (vgl. Abbildung 31)

DISKUSSION

5.1. Untersuchungen zur aktivierenden Wirkung von OmpA auf Makrophagen

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der intrazellulären Prozesse der Wechselwirkung zwischen OmpA und Makrophagen. Diese Prozesse wurden auf der Ebene der Produktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , TNF- α , IL-6), der Transkription des IL-1 β -Gens (IL-1 β -mRNA-Akkumulation) sowie der Promotoraktivität des IL-1 β -Gens untersucht. Zusätzlich wurde die Wirkung des OmpA auf verschiedene Makrophagen-Typen untersucht, um Rückschlüsse auf die beteiligten Toll-*like*-Rezeptoren zu erhalten.

Dazu wurden Proben von nativen OmpA verwendet, die aus der äußeren Membran von *E. coli* bzw. *Proteus mirabilis* 19 isoliert und aufgereinigt waren. Vorhandene Mengen LPS wurden durch eine Phenol-Wasser-Behandlung entfernt. Das Protein wurde aus der Phenolphase mit Diethylether und Aceton präzipitiert und erneut durch eine Gelfiltration gereinigt. Die Effizienz dieser Aufreinigungsmethode wurde mittels Limulus-Amöbozyten-Lysat-Assay (LAL-Assay) bestimmt.

5.1.1. Bestimmung des Endotoxin (LPS)-Anteils in den verwendeten OmpA-Proben

Der verwendete LAL-Assay hat laut Angabe des Herstellers eine sichere Nachweisgrenze von 0,25 EU/ml (EU = *endotoxin unit*; 1 EU/ml = 83,33 pg/ml). Für die mit diesem Test untersuchten und in den Versuchsreihen eingesetzten Proben P13 (OmpA aus *E. coli*) und P32 (OmpA aus *Proteus mirabilis*) wurde ein LPS-Anteil von < 1 ‰ bestimmt. Dieser LPS-Anteil muß bei der Betrachtung der Ergebnisse der Versuchsreihen berücksichtigt werden. Bei einer Stimulierung mit 10 μ g/ml OmpA ergibt sich ein LPS-Gehalt von < 0,1 ng/ml.

5.1.2. Spezifische Wirkung von OmpA auf Makrophagen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Regulation der Produktion proinflammatorischer Zytokine am Beispiel von IL-1 β , TNF- α , IL-6 und dem reaktiven Stickstoffmonoxid (NO) nach Stimulierung mit Lipopolysaccharid (LPS) und dem bakteriellen Membranprotein *outer membrane protein A* (OmpA) haben gezeigt, daß murine

Makrophagen der Zelllinie RAW 264.7 nach LPS-Stimulierung (1 µg/ml) hohe Mengen von IL-1β, IL-6 und NO produzieren. Dagegen ist diese Aktivierung der Makrophagen nach Stimulierung mit OmpA nur bedingt festzustellen: Während nach Stimulierung mit OmpA (0,1 µg/ml) keine signifikante Produktion von IL-1β in den Zelllysaten gemessen werden konnte, fand eine deutliche Produktion von TNF-α und NO statt. Die produzierten Mengen an TNF-α und NO lagen um einen Faktor 0,8 bis 0,9 unter den produzierten Mengen nach LPS-Stimulierung. Somit sind für einen vergleichbaren Effekt von OmpA und LPS höhere OmpA-Konzentrationen nötig, was frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe an RAW 264.7 Makrophagen bestätigt haben [Ohlweiler, 2002; Doganci, 2003].

Bei Stimulierung der RAW 264.7 Makrophagen mit hohen OmpA-Konzentrationen (>1µg/ml) konnte eine vergleichbare IL-1β Produktion wie nach der Stimulierung mit LPS beobachtet werden. Dieser Dosis-abhängige Effekt trat auch bei der Produktion von NO auf, bei der Sezernierung von TNF-α war er dagegen nicht so stark ausgeprägt. Auffällig war jedoch, daß die OmpA-Probe von *Proteus mirabilis* stets zu einer stärkeren Stimulierung führte, als die OmpA-Probe von *E. coli*.

Es stellte sich die Frage, ob die Aktivierung der RAW 264.7-Makrophagen mit OmpA auf eine Kontamination mit LPS zurückzuführen wäre. Daher wurden Untersuchungen mit Makrophagen aus C3H/HeJ-Mäusen, die einen defekten TLR4 haben, durchgeführt, um mögliche Effekte von LPS auszuschließen. Erwartungsgemäß zeigte die Stimulierung von LPS bei diesen „low responders“ keinen Effekt auf die Produktion von IL-1β, TNF-α, IL-6 und NO. Es konnte jedoch ein aktivierender Effekt vom OmpA beobachtet werden. Während die Stimulierung mit OmpA (1 µg/ml) nur zu einer mäßigen Produktion von IL-1β, TNF-α und NO führte, sezernierten die Knochenmarksmakrophagen deutlich IL-6, wobei die absoluten Zytokinmengen wegen der unterschiedlichen Makrophagen-Typen nicht miteinander vergleichbar sind. Erst in Kinetik-Versuchen konnte eine signifikante, wenn auch schwache Induktion der IL-1β-Produktion durch OmpA beobachtet werden. Diese Versuche haben gezeigt, daß OmpA die Aktivierung der C3H/HeJ-Makrophagen zur IL-1β-Produktion nur kurzzeitig bewirken konnte. So erreichte die Zytokinproduktion nach Stimulierung der Knochenmarksmakrophagen mit OmpA aus *E. coli* nach 8 Stunden ihre maximale Rate, in Folge wieder stetig abnahm und schließlich nach 24 Stunden keine nennenswerten Zytokinmengen in den Zelllysaten mehr gemessen werden konnten. Nach Stimulierung der Zellen mit OmpA aus *Proteus mirabilis* wurde erst nach 12 Stunden die

maximale Rate erreicht. Dadurch wird verständlich, daß IL-1 β kaum 24 Stunden nach OmpA-Stimulierung der Makrophagen gemessen werden kann. Insofern erscheint dies ungewöhnlich, weil üblicherweise 24 Stunden nach Aktivierung der Makrophagen die Messung der Zytokinproduktion erfolgt [Soulas et al., 2000; Schilling et al., 1997]. Ob diese enorm kurzzeitige Aktivierung nur für die C3H/HeJ-Makrophagen charakteristisch ist, ist unwahrscheinlich, da größere Mengen von IL-6 24 Stunden nach OmpA-Stimulierung gemessen wurden (vgl. Abbildung 11).

Die Ergebnisse aus den Transkriptionsversuchen korrelierten mit der Zytokinproduktion. So konnte die maximale IL-1 β -mRNA-Akkumulation bereits nach 2 Stunden festgestellt werden, die in Folge nach 12 - 16 Stunden wieder auf ihr ursprüngliches Level (Ausgangslevel) abfiel. Es besteht folglich eine gute Übereinstimmung zwischen Transkription der Gene und Zytokinproduktion. Auf der Ebene der Promotoraktivität der Gene (IL-1 β -Promotor) war der Einfluß von OmpA (aus *E.coli*) bei RAW 264.7 Makrophagen ebenfalls deutlich geringer als nach Stimulierung mit LPS. Verglichen mit dem Effekt von OmpA auf der Ebene der IL-1 β Produktion ergab sich auch in diesem Fall eine Korrelation der Ergebnisse, wobei die Steuerung der Zytokinproduktion in Makrophagen im wesentlichen auf der Ebene der Promotoraktivität der Gene erfolgt.

Überraschend war das Ergebnis nach der starken Produktion von IL-6 durch OmpA und das Lipoprotein in C3H/HeJ-Mäusen (vgl. Abbildung 11). Normalerweise ist die Produktion von IL-6 eine TLR4-vermittelte Reaktion, die in diesen mutierten Mäusen wegen des defekten TLR4 nicht stattfinden sollte. Auf jeden Fall ist bekannt, daß es keine Produktion von IL-6 über die Aktivierung von TLR2 gibt. TLR2-Agonisten sollten demnach keine großen Mengen von IL-6 induzieren. Dies konnte durch Stimulierungsversuche mit Pam₃Cys, einem TLR2-Agonisten gezeigt werden [Toshchakov et al., 2002; Schilling et al., 2002].

Zusätzlich konnte durch entsprechende Versuche mit Knochenmarksmakrophagen aus TLR2-Doppel-*Knockout*-Mäusen, die von Frau Dr. Dagmar Schilling an der *Boston University School of Medicine* in den USA durchgeführt wurden, gezeigt werden, daß OmpA von *E. coli* die Produktion von IL-1 β signifikant erhöht hat (Daten bisher unveröffentlicht). Diese Beobachtungen und die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse aus den Versuchen zur IL-6-Produktion geben möglicherweise einen Hinweis darauf, daß OmpA und das Lipoprotein zur Aktivierung der Makrophagen andere TLRs, als TLR4 und TLR2 verwenden.

5.1.3. Einfluß von Polymyxin B (PMB) auf die spezifische Wirkung von OmpA

Da mittels des LAL-Assays (vgl. Kapitel 4.1.) lediglich LPS-Verunreinigungen bei der OmpA Aufreinigung im Bereich von $<1 \mu\text{g/ml}$ ausgeschlossen werden konnten, jedoch LPS bereits in kleinen Mengen ein Aktivator von Makrophagen ist [Hoffmann et al., 1988], wurden in einer Versuchsreihe Makrophagen in Gegenwart von $5 \mu\text{g/ml}$ PMB mit LPS und OmpA (*E. coli*) stimuliert. Dabei konnte gezeigt werden, daß die LPS-induzierte Produktion von IL-1 β bei RAW 264.7-Makrophagen in Gegenwart von PMB inhibiert wurde. Bei der Stimulierung von RAW 264.7-Makrophagen mit der *E. coli* OmpA Probe P14 (15% LPS-Verunreinigung) wurde der Effekt von OmpA etwas inhibiert, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die vorhandenen Mengen LPS zurückzuführen ist. Dagegen führte die Stimulierung der RAW 264.7 Makrophagen mit OmpA P13 aus *E. coli* in Gegenwart von PMB zu keiner Veränderung in der IL-1 β Produktion. Das gleiche Ergebnis konnte bei Knochenmarksmakrophagen von C3H/HeJ-Mäusen beobachtet werden. Mögliche (nicht nachweisbare) LPS-Verunreinigungen in den in dieser Arbeit verwendeten OmpA Proben aus *E. coli* (P13) scheinen offenbar keinen aktivierenden Effekt mehr auf Makrophagen auszuüben.

5.1.4. Einfluß von Staurosporin auf die spezifische Wirkung von OmpA

Der Effekt von Staurosporin auf die LPS-induzierte Produktion von IL-1 β wurde in der Arbeitsgruppe bereits hinreichend untersucht [Schilling et al., 1997; Schilling, 2000; Schilling et al., 2001]. Dabei konnte gezeigt werden, daß der Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin eine negative Regulation der LPS-induzierten Produktion von IL-1 β aufhob. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Induktion der IL- β -Produktion durch OmpA ähnlich reguliert wird.

In den durchgeführten Zytokinstudien führte Staurosporin sowohl bei RAW 264.7-Makrophagen wie auch bei Knochenmarksmakrophagen von C3H/HeJ-Mäusen zu einer deutlichen Erhöhung der OmpA-induzierten Produktion von IL-1 β . Diese lag sogar signifikant über der IL-1 β Produktion, die durch das Lipoprotein induziert wurde. Der Einsatz unterschiedlicher OmpA Proben (P13 und P32) hatte keinen Einfluß auf den Effekt von Staurosporin. Dieser Effekt von Staurosporin konnte ebenfalls auf der Ebene der Transkription (Zunahme der IL-1 β -mRNA-Akkumulation) und auf Promotorebene (Zunahme der IL-1 β -Promotoraktivität) beobachtet werden.

5.2. Differenzierte Modulation LPS-aktivierter Makrophagen durch OmpA von *Proteus mirabilis* und *E. coli*

Neben der Beobachtung, daß OmpA generell Makrophagen-aktivierende Eigenschaften besitzt, die vergleichbar, jedoch schwächer mit denen von LPS sind, konnte zudem ein „additiver“ bzw. synergistischer Effekt bei der Stimulierung mit Komplexen aus LPS und OmpA in murinen Makrophagen beobachtet werden. Diese Beobachtung unterstreicht frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe, wonach OmpA eine sehr differenzierte Modulation der spezifischen Immunantwort gegen LPS vermittelt und offensichtlich die Interaktion von LPS mit den Makrophagen beeinflusst [Weber et al., 1993].

In den durchgeführten Versuchen der vorliegenden Arbeit konnte dieser synergistische Effekt durch OmpA bei der Produktion von IL-1 β und NO in LPS-induzierten RAW 264.7 Makrophagen beobachtet werden, wobei keine Unterschiede bei der Verwendung unterschiedlicher OmpA Proben (P13 und P32) festgestellt werden konnten. Eine differenzierte Modulation wurde dagegen bei der Produktion von TNF- α beobachtet: Während ein schwacher synergistischer Effekt durch das OmpA von *Proteus mirabilis* bei verschiedenen Antigen-Konzentrationen verursacht wurde, hemmte das OmpA von *E. coli* die LPS-induzierte Freisetzung von TNF- α deutlich bei Konzentrationen $>0,1 \mu\text{g/ml}$.

Die entsprechend durchgeführten Zytokinstudien bei Knochenmarksmakrophagen von C3H/HeJ-Mäusen ergaben, daß aufgrund des mutierten TLR4 kein eindeutiger synergistischer Effekt bei der Produktion von IL-1 β auftrat. Lediglich hohe Konzentrationen ($>1 \mu\text{g/ml}$) des OmpA von *E. coli* bewirkten einen schwachen synergistischen Effekt bei der Produktion von TNF- α und NO. Umgekehrt konnte ein schwacher inhibitorischer Effekt bei der Produktion von IL-1 β beobachtet werden konnte. Ein schwacher synergistischer Effekt durch das OmpA von *Proteus mirabilis* konnte dagegen bei der Produktion von NO registriert werden.

Zusammenfassend unterstützen diese Ergebnisse frühere Beobachtungen, daß OmpA ein sehr differenzierter Modulator der Immunantwort gegen LPS und ein sehr differenzierter Modulator der LPS-induzierten Makrophagenaktivierung ist [Weber et al., 1993], auch wenn die Art der Modulation aufgrund unterschiedlicher Makrophagensysteme nicht vergleichbar ist.

Auch Soulas et al. [2000] beschrieben eine Interaktion von OmpA und Aktivierung von Makrophagen. Sie wiesen die Bindung und Internalisation von rekombinantem OmpA aus *Klebsiella pneumoniae* mittels FACS-Analyse nach und konnten bei humanen peripheren Blutmonozyten sowohl die stimulierende Wirkung von OmpA auf die Produktion von IL-1 β , IL-8 und IL-12 zeigen, wie auch einen ähnlichen Adjuvants-Effekt des LPS-OmpA-Komplexes auf die Produktion von TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-12, IL-10 und NO feststellen.

Für den Makrophagen-aktivierenden Effekt und die modulierende Wirkung von OmpA kann es unterschiedliche Gründe geben. Einerseits können die beobachteten Effekte auf einer Aggregatausbildung von OmpA mit LPS oder anderen Proteinen erklärt werden [Nixdorff et al., 1977; Korn, 1995]. Diese Aggregate werden von Makrophagen phagozytiert und bewirken aufgrund der vernetzten LPS-OmpA-Struktur den beobachteten Adjuvants-Effekt. Dabei ist eine differenzierte Wirkung auf CD14 durch das LPS im Komplex mit OmpA vergleichbar mit den Eigenschaften des LPS-bindenden Proteins (LBP) denkbar [Weber et al., 1993; Brauburger, 1996]. Andererseits spricht besonders die differenzierte Modulation des OmpA für eine Induktion verschiedener Signaltransduktionswege. Die Stimulierung von Makrophagen aus C3H/HeJ- sowie aus TLR4-Doppel-Knockout-Mäusen mit OmpA und die differenzierte Regulation der Zytokinproduktion von IL-1 β und TNF- α lassen neben der Beteiligung von TLR4 noch weitere essentielle Rezeptoren vermuten. Gegenwärtig sind bereits einige Liganden der TLR-Rezeptoren beschrieben [Takeda & Akira, 2005], ein typischer Rezeptor für OmpA wurde bisher nicht publiziert, obwohl bekannt ist, daß TLR2 eine große Bandbreite von mikrobiellen Komponenten (z.B. Lipopeptide, Lipoproteine, Peptidoglykane und LPS von gramnegativen Bakterien, *Leptospira*, *Porphyromonas* und *Helicobacter*, sowie Lipoarabinomannan von Mycobakterien) erkennt. Da Untersuchungen an TLR6-Doppel-Knockout-Mäusen gezeigt haben, daß diese keine Antwort auf bakterielle Lipopeptide und Lipoproteine induzieren und TLR6, wie auch TLR1, mit TLR2 Heterodimere bilden, sollte diese Rezeptor-Kombination bei der Suche nach „OmpA-Rezeptoren“ in die engere Wahl genommen werden.

Die Frage nach der unterschiedlichen Wirkung von OmpA aus verschiedenen Bakterien war für den zweiten Teil dieser Arbeit von besonderer Bedeutung. In den durchgeführten Versuchsreihen führte das OmpA von *Proteus mirabilis* zu einer wesentlich stärkeren Aktivierung der Makrophagen als das OmpA von *E. coli*. Auch in der differenzierten Modulation der TNF- α Produktion bei LPS-induzierten RAW 264.7 Makrophagen unterschieden sich beide OmpA-Proben grundsätzlich. Während der Komplex aus LPS und

OmpA aus *Proteus mirabilis* den bereits beschriebenen synergistischen Effekt hervorrief, inhibierte das OmpA aus *E.coli* die LPS-induzierte Produktion von TNF- α . Obwohl beide Bakterien phylogenetisch zu den *Enterobacteriaceae* gehören, scheinen deutliche Unterschiede zwischen diesen Proteinen zu bestehen.

5.3. Charakterisierung und phylogenetische Untersuchung der *ompA*-Gen-Sequenz von *Proteus mirabilis* 19

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der vollständigen Entschlüsselung der *ompA*-Sequenz von *Proteus mirabilis* 19 und der Ableitung der Aminosäuresequenz. Mit Hilfe von verschiedenen molekularbiologischen Methoden konnten zunächst zwei Fragmente des *ompA*-Gens von *Proteus mirabilis* 19 amplifiziert und sequenziert werden und schließlich das gesamte Gen vollständig in einen Sequenziervektor kloniert werden. Durch die Sequenzierung des gesamten Gens konnte die Nukleotidsequenz der Fragmente bestätigt werden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde mit der von verwandten Bakterien verglichen und phylogenetische Merkmale untersucht. Dabei wurde ein Dendrogramm erstellt, das die Verwandtschaftsverhältnisse von *Proteus mirabilis* 19 und *E. coli* auf der Grundlage des OmpA verdeutlicht. Demnach ist die Verwandtschaft von *E. coli* zu den anderen untersuchten Bakterien (*Shigella*, *Salmonella*, *Erwinia* und *Enterobacter*) größer als mit *Proteus*. Die beiden *Proteus* Arten (*Proteus mirabilis* 19 und *Proteus mirabilis* HI4320) bilden eher ein eigenes Cluster. Während OmpA von *E. coli* aus 346 Aminosäuren besteht und in den durchgeführten Western-Blot-Analysen eine molekulare Masse von 33 kDa aufwies, ergab die Sequenzierung von OmpA aus *Proteus mirabilis* 19 1.089 bp sowie 362 Aminosäuren. In den durchgeführten Western-Blot-Analysen konnte seine molekulare Masse mit 39 kDa bestimmt werden. Beide Proteine haben einen Identitätsindex von 68% und einen Ähnlichkeitsindex von 79%. Auch wenn beide Organismen aufgrund ähnlicher physiologischer Eigenschaften in der Familie der *Enterobacteriaceae* zusammengefaßt werden, haben die durchgeführten phylogenetischen Untersuchungen gezeigt, daß neben 68% konservierten Bereichen in der Aminosäuresequenz auch Unterschiede in den Eigenschaften von OmpA der beiden Bakterien vorhanden sind, was die zuvor beschriebenen differenzierten Makrophagen-aktivierende Eigenschaften unterstützt.

Diese Unterschiede konnten durch weitere Untersuchungen mit den monoklonalen Antikörpern (α -OmpA) 2.14.1 und 2.18.1 bestätigt werden. So konnte mit dem mAk 2.14.1 ein generisches Epitop bei *Proteus mirabilis*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* und *Erwinia amylovora*

nachgewiesen werden, welches hoch konserviert sein muß, da der Titer der Ag-Ak-Wechselwirkungen bei allen Organismen die gleiche Potenz aufwies. Dagegen konnte mit dem mAk 2.18.1 gezeigt werden, daß neben hoch konservierten Bereichen ebenfalls Epitope vorhanden sein müssen, die hoch spezifisch für *Proteus mirabilis* 19 sind. Das Vorhandensein solcher für *Proteus* hoch spezifischen Epitope konnte durch die Ergebnisse der phylogenetischen Untersuchungen bestätigt werden.

Durch die Expression verschieden großer rekombinanter OmpA-Fragmente auf Grundlage der *ompA*-Sequenz von *Proteus mirabilis* 19, sollte die Lage des generischen bzw. spezifischen Epitops näher charakterisiert werden. Dabei konnte gezeigt werden, daß beide Epitope in unterschiedlichen Bereichen des Proteins liegen. Das generische Epitop befindet sich demnach im N-terminalen Bereich des Proteins. Dieser Bereich (aa 1 – 70) zeichnet sich durch seine hoch konservierte Aminosäuresequenz aus (vgl. Abbildung 31). Das spezifische Epitop konnte dagegen im zentralen Bereich des Proteins ausgemacht werden, der besonders für *Proteus* im Vergleich mit anderen *Enterobacteriaceae* eine sehr heterogene Aminosäuresequenz aufweist (vgl. Abbildung 31, aa 130-150). Grundsätzlich existieren zudem sehr homologe Bereiche im C-terminalen Bereich des Proteins (aa 230 – 240; aa 293 – 302; aa 310 – 320), die sich für die Erkennung von generischen Antikörpern eignen. So konnten Puohiniemi et al. [1990] Antikörper gegen OmpA von *E. coli* herstellen, die jedoch fast ausschließlich gegen den C-terminalen Teil des Proteins gerichtet waren. Singh et al. [2003] konnten ebenfalls mehrere Antikörper gegen das OmpA von *Salmonella typhimurium* herstellen, welche ausschließlich eine Spezifität gegen ein identisches Epitop im C-terminalen Bereich von OmpA besaßen. Diese Beobachtungen sind insoweit verwunderlich, da man bisher davon ausging, daß sich der C-terminale Bereich des OmpA im Periplasma befindet und so keinen Zugang zur bakteriellen Oberfläche besitzt, wie in Abbildung 37 dargestellt.

Als mögliche Erklärung wird eine veränderte Konformation des OmpA genannt. Das OmpA durchzieht in den häufigsten Fällen mit 1/2 bis 2/3 seines N-terminalen Teils in acht β -barrels die äußere Membran. Zudem ist in seltenen Fällen aber auch eine Konformation denkbar, bei der das OmpA, ähnlich einem klassischen Porin, vollständig Schleifen in der äußeren Membran bildet. Folglich werden auch C-terminale Bereiche des OmpA an der Oberfläche der Bakterien exponiert [Singh et al., 2003]. Eine Skizze dieser Hypothese ist in Abbildung 38 dargestellt.

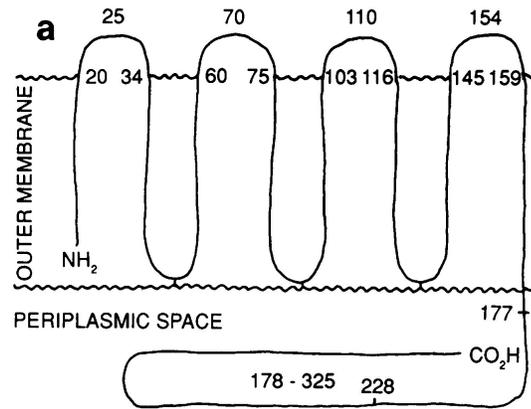


Abb. 37: Schematische Darstellung von OmpA in der äußeren bakteriellen Membran. Die exponierten Bereiche sind mit den entsprechenden Aminosäuren numeriert; aus: Puohiniemi et al., 1990

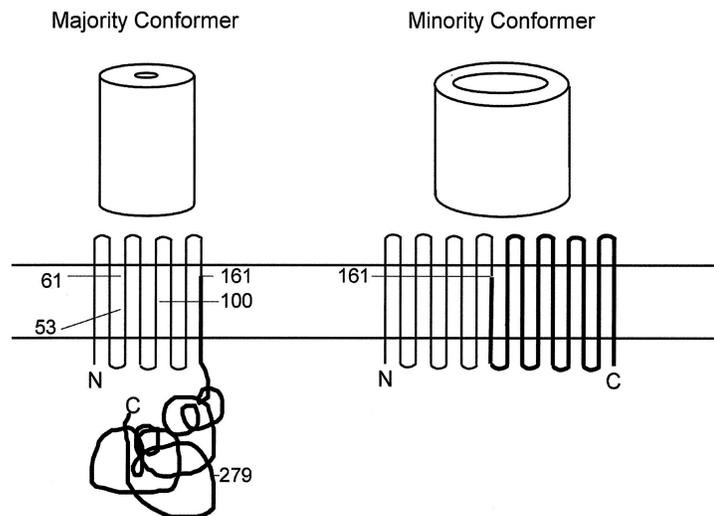


Abb. 38: Topologie verschiedener Konformationen von OmpA. Häufige (links) und seltene (rechts) Konformation von OmpA in der äußeren bakteriellen Membran. Alle Methioninreste sind numeriert, der C-terminale Bereich des Proteins ist verstärkt markiert; aus: Singh et al., 2003

Sollte sich diese Hypothese bestätigen, so muß das OmpA, das für die Herstellung der monoklonalen Antikörper 2.14.1 und 2.18.1 verwendet wurde, offensichtlich in der wahrscheinlicheren (häufigeren) Konformation vorgelegen haben.

Ein Grund für die unterschiedliche Spezifität der monoklonalen Antikörper könnte in der Herstellung liegen. Während für die Gewinnung der mAk 2.14.1 und 2.18.1 Mäuse mit OmpA-LPS-Komplexen immunisiert wurden, verwendeten Puohiniemi et al. [1990] und Singh et al. [2003] hauptsächlich Bakterien, gereinigtes OmpA oder OmpA in Freund's Adjuvans für die Immunisierung verwendet.

Bei der Expression der rekombinanten OmpA-Fragmente B und C könnte die anschließende Faltung zu der beobachteten Störung der His-Ak-Reaktion geführt haben (vgl. Abbildung 36). Bereits in früheren Untersuchungen konnte dieses Problem durch Renaturierung des verwendeten OmpA kompensiert werden [Korn et al., 1995]. Eine Optimierung der durchgeführten Western-Blot-Analysen dahingehend erscheint sinnvoll.

5.4. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, daß bakterielle Proteine sehr differenziert an der Signaltransduktion und Regulation der Produktion von Zytokinen in Makrophagen beteiligt sind. Dabei sind neben den stimulierenden Effekten die modulierenden Wirkungsweisen von besonderer Bedeutung.

Weiterführende Untersuchungen müßten der Frage nachgehen, ob OmpA Makrophagen über andere TLRs aktivieren kann. Dafür wären zusätzliche Versuchsreihen mit TLR1- bzw. TLR6-Doppel-*Knockout*-Mäusen notwendig.

Des weiteren muß die Frage diskutiert werden, ob sich diese Ergebnisse auf den menschlichen Organismus übertragen lassen.

Die durchgeführten Untersuchungen zur Charakterisierung der Epitope für die monoklonalen OmpA-Antikörper haben zu Annahmen über die mögliche Position dieser Epitope innerhalb des Proteins geführt. Diese Annahmen sind durch weitere Untersuchung, z.B. mit zusätzlichen Proteinfragmenten oder Mutationen, zu überprüfen.

Da es offensichtlich deutliche Unterschiede in den physiologischen Eigenschaften von OmpA aus verschiedenen Bakterien gibt, sind weitere Untersuchungen mit zusätzlichen OmpA Proben unterschiedlicher Herkunft nötig. Dabei kann die Unterscheidung nach pathogener bzw. apathogener Herkunft sinnvoll sein. Auch ist die Herstellung von kurzen synthetischen OmpA-Fragmenten denkbar, um modulierende Effekte in Signaltransduktionswegen eingehender zu untersuchen.

Neben dem Verständnis grundlegender Funktionsweisen der Signaltransduktion bietet die Suche nach weiteren Immunmodulatoren mit einem effektiveren und spezifischen Wirkungsspektrum neue Ansätze für Immuntherapien, z.B. bei der Bekämpfung der rheumatoiden Arthritis. Gerade der Einsatz differenzierter Immunadjuvantien, die keine toxischen Effekte auf das Immunsystem ausüben, wie z.B. OmpA, kann einen Beitrag zu der Entwicklung neuer und verträglicher Vakzine leisten.

BEGLEITENDE TECHNIKFOLGENABSCHÄTZUNG

6.1. Einführung

Gegenwärtig erleiden in Europa jährlich bis zu 550.000 Menschen einen septischen Schock. 146.000 überleben ihn nicht [Sands et al., 1997]. Nach neuesten Schätzungen werden in Deutschland jedes Jahr bis zu 120.000 Menschen mit Symptomen des septischen Schocks und der Sepsis intensivmedizinisch behandelt. Genaue Inzidenz-Daten liegen nicht vor. Literaturrecherchen ergaben 95.000 Neuerkrankungen an schwerer Sepsis pro Jahr. Eine Analyse von Mortalitätsstatistiken dreier Universitätskliniken (Göttingen, Halle, Jena) errechnete 44.000 neue Fälle mit einer Sterblichkeit von 43% [Davies et al., 2001]. Damit sterben jährlich etwa gleich viele Menschen an septischem Schock und Sepsis wie an Lungenkrebs, Darmkrebs oder Brustkrebs. Aufgrund der demographischen Entwicklung sowie der Zunahme immunkompromittierender Erkrankungen und invasiver Maßnahmen im Krankenhaus ist davon auszugehen, daß die Zahl der Sepsis-Erkrankungen weiter deutlich steigen wird. Die bedeuten auch für das deutsche Gesundheitswesen eine enorme Belastung. Auch wenn die medizinische Biotechnologie in den letzten fünf Jahren Fortschritte bei der Entwicklung anti-inflammatorischer Medikamente verzeichnen konnte, so fehlt es heute immer noch an erfolgreichen Therapien [Schmid et al., 2002].

Ein anderes Beispiel für die chronische Überproduktion der Zytokine, stellt die rheumatoide Arthritis (RA) dar. Hierbei zeichnen sich dagegen vielversprechende Therapieansätze ab. Die RA, die auch chronische Polyarthritis genannt wird, ist eine chronisch entzündliche Erkrankung, welche überwiegend die Gelenke, aber auch innere Organe wie die Augen und die Haut befallen kann.

Die RA ist gegenwärtig die häufigste der rheumatischen Erkrankungen. In Deutschland leiden etwa 0,5% der Bevölkerung daran. Es erkranken drei Mal so viele Frauen wie Männer, unabhängig des Alters. Am häufigsten beginnt die Erkrankung jedoch zwischen dem 35. und 45. und über dem 60. Lebensjahr.

Die Ursachen für die Entstehung der RA sind noch immer nicht endgültig geklärt. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß zu Beginn des Krankheitsprozesses eine Art Fehlerkennung stattfindet. Normalerweise kann das Immunsystem körpereigene Zellen von fremden Erregern (z.B. Bakterien oder Viren) unterscheiden. Diese Fähigkeit wird als Immuntoleranz oder auch Selbsttoleranz bezeichnet. In seltenen Fällen kann es jedoch auch dazu kommen,

daß das Immunsystem fälschlicherweise die körpereigenen, gesunden Zellen (Autoantigene) als fremd erkennt.

Im Falle der RA wandern fehlgesteuerte Immunzellen in das betroffene Gelenk ein und produzieren dort Zytokine. An der Zellmembran der Zielzelle befinden sich Rezeptoren, an die Zytokinmoleküle nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip binden können. Dadurch werden Signale ins Zellinnere weiter geleitet, die eine ganz bestimmte Antwort der Zielzelle auslösen (Signaltransduktion). Um diese Antworten zu begrenzen, haben manche Zytokine Gegenspieler, sogenannte Antagonisten. Sie sind ebenfalls in der Lage, die Rezeptoren der Empfängerzellen zu besetzen. Dadurch verhindern sie das Andocken der Zytokine und das Auslösen der Zellantwort. Normalerweise befinden sich Zytokine und Antagonisten in einem Gleichgewicht.

Dieses Gleichgewicht ist bei der RA gestört, bestimmte Zytokine sind in der Überzahl. Hierzu gehören als wichtigste Vertreter IL-1 β und TNF- α . TNF- α scheint für den zerstörerischen Entzündungsprozeß verantwortlich zu sein. IL-1 β fördert darüber hinaus die Zerstörung von Knorpelgewebe und aktiviert u.a. knochenabbauenden Zellen, die Osteoklasten.

Durch die Wirkung der Zytokine entsteht aus der Gelenkinnenhaut (Synovialis) ein geschwulstartiges Gewebe, der sogenannte Pannus, welcher nach einiger Zeit Knorpel, Knochen und auch andere Strukturen des betroffenen Gelenks zerstört.

Im weiteren werde ich ausschließlich die medikamentöse Therapie erörtern, da ich sie für die effektivste Methode halte. Um den gelenkzerstörenden Verlauf der rheumatoiden Arthritis aufzuhalten, wird eine konsequente und ausreichende medikamentöse Therapie empfohlen. Das Ziel ist dabei, die Entzündung der Gelenke so weit wie möglich zu kontrollieren.

Das Therapieprinzip der rheumatoiden Arthritis beruht auf dem Wiederherstellen des Gleichgewichtes zwischen den entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Faktoren. Dabei wurden die Prinzipien der biologischen Rheumatherapie bereits erfolgreich bei anderen entzündlichen Erkrankungen getestet.

So haben Antikörper gegen TNF- α in ersten Therapien gute Wirksamkeit beim Morbus Bechterew (rheumatische Erkrankung der Wirbelsäule) und beim Morbus Crohn (chronisch entzündliche Darmerkrankung) gezeigt.

Vor dem Hintergrund, daß TNF- α und IL-1 β bei der Entstehung der RA eine entscheidende Rolle spielen, sind bereits seit fünf Jahren in Deutschland zwei TNF- α -Blocker (Etanercept und Infliximab) verfügbar. Zwei Jahre zuvor wurden diese Medikamente in den USA zugelassen und bis zur Einführung in Deutschland 60.000 Patienten mit akuter RA behandelt. Klinische Vorstudien hatten ergeben, daß die beiden TNF- α -Blocker ein akzeptables Sicherheitsprofil und eine deutliche Wirksamkeit bei den Fällen von RA aufwiesen, bei denen herkömmliche Therapieansätze versagt haben [Maini & Taylor, 2000]. Bei den beiden Medikamenten handelt es sich zum einen um ein rekombinant hergestelltes Fusionsprotein, das an TNF- α bindet und so die weitere Sekretion entzündungsfördernder Zytokine blockiert (Etanercept). Dagegen ist Infliximab ein durch die Gentechnik hergestellter chimärer monoklonaler Antikörper gegen TNF- α . Er besitzt an der TNF- α -Bindestelle einen murinen Anteil, während die konstante Region dem humanen IgG1 entspricht. Es bindet mit hoher Affinität und Spezifität an freies und membranständiges TNF- α und hemmt damit die proinflammatorische Aktivität. Die klinische Wirksamkeit von Infliximab erreicht Therapieansprechraten von 40-75% und die Wirkung hält im Mittel 6-8 Wochen an. Da Infliximab kein vollhumaner Antikörper ist, besteht die Gefahr allergischer Reaktionen, die durch die gleichzeitige Gabe von Methotrexat verringert werden kann. Da diese Therapie keine kausale Behandlung der RA ist, stellen sich nach Behandlungsende erneut Symptome der Krankheitsaktivität bei allen Patienten wieder ein. Trotz dieses Behandlungserfolges sprechen 25% der Patienten auf diese Therapie, auch in Kombination mit Methotrexat nicht an. Deshalb wird bereits nach neuen Therapieformen gesucht, bei denen direkt in ablaufende inflammatorische Reaktionen eingegriffen werden soll. Denkbar wäre der Einsatz von rekombinanten humanen IL-1R (als Antagonist des IL-1 β), um eine sekundäre Aktivierung der Immunzellen zu verhindern [Gabay, 2000] oder der Einsatz von rekombinanten humanen IL-10. Zukünftige Strategien könnten ebenfalls die Blockade der T-Zell-Stimulierung, die Induktion von Apoptose in synovialen Geweben und die Gentherapie sein [Afeltra, 2001].

Erste Untersuchungen zur Evaluation der Verwendung von Adeno-assoziierten Viren (AAV) als Vektoren für den Gentransfer im Rahmen einer Arthrotherapie haben gezeigt, daß diese Vektoren empirische Vorteile für eine Gentherapie *in vivo* besitzen, da AAVs vorzugsweise als Vektoren für Synovial-Makrophagen und Chondrozyten innerhalb des arthritischen Gewebes *in vivo* einsetzbar waren. Der Gentransfer auf die Makrophagen konnte zusätzlich durch Substanzen, die DNA-Reparatur-Enzyme induzieren, optimiert werden. Bei diesen Versuchen wurde das bakterielle β -Galaktosidase-Gen (*lacZ*) in einen AAV-Vektor kloniert

und der rekombinante Vektor sowohl in gesundes wie auch arthritisches Gewebe in das Kniegelenk von Mäusen transferiert. Anschließend wurde die Expression der β -Galaktosidase mittels Chemilumineszenz und die Transduktionseffizienz des Vektors auf Synovial-Makrophagen *in vitro* mittels FACS-Analysen gemessen [Goater et al., 2000].

Das Prinzip der Gen-Therapie besteht darin, daß das Gen eines potentiellen Zytokin-Inhibitors, wie z.B. dem TNF- α -Rezeptor, mit einem geeigneten *targeted-delivery*-System in das entzündete Gewebe gebracht wird. *Targeted-delivery*-Systeme sind Komponenten, die es ermöglichen, daß einzelne Gene mittels eines Vektors in die Zellen des entsprechenden Gewebes eingebracht werden können, wo aus der DNA-Sequenz des Gens mit Hilfe der körpereigenen Zellmaschinerie die benötigten Proteine produziert werden können.

So konnte eine Arbeitsgruppe in den USA zeigen, daß die Transfektion des TNF- α -Rezeptorgens in Tumorzellen zu einer Zunahme der zytotoxischen Effekte von TNF- α in diesen Zellen führte. Weiterhin konnte die Gruppe zeigen, daß der Transfer des IL-13R-Gens (Rezeptor für das Zytokin IL-13) in Tumorzellen, die über diesen Rezeptor vorher nicht verfügten, zu einer starken Sensibilisierung dieser Tumorzellen gegenüber einem Fusionszytotoxin führte, das aus einer IL-13-Komponente und einer mutierten Form des *Pseudomonas*-Toxins bestand [Kawakami et al., 2002].

Während das Gen für den Rezeptor in den oben erwähnten Studien mittels Transfektion in die Zielzellen geschleust wurde, stehen gegenwärtig auch andere *targeted-delivery*-Systeme zur Verfügung, wie z.B. virale Vektoren. Untersuchungen an arthritischen Mäusen, denen ein retrovirales Konstrukt eines humanen TNF- α -Rezeptors in das betreffende Gewebe injiziert wurde, haben gezeigt, daß die Entzündung im Gewebe bereits nach 14-34 Tagen auffällig zurückging. Es wurde vermutet, daß der beobachtete Effekt hauptsächlich durch die Unterdrückung der inflammatorischen Th1-Antwort (T-Helferzellen, die Entzündungsreaktionen unterstützen) erreicht wurde. [Mukherjee et al., 2003].

Ein weiterer Artikel aus jüngster Zeit berichtet über Untersuchungen, bei denen das Gen eines TNF- α -verwandten Proteins in das Genom eines rekombinanten Adenovirus integriert wurde, um damit eine humane Tumor-Zelllinie zu infizieren. Hintergrund der Forschung waren dabei Bemühungen, das Tumorstadium zu kontrollieren [Yoshida et al., 2003].

So wichtig und notwendig diese Forschungen für die Entwicklung von neuen Therapieansätzen in der Biomedizin auch sind, so dürfen die Risiken, die sich daraus ergeben, nicht unterschätzt werden.

Eine Studie in der Fachzeitschrift *Nature* berichtet davon, daß eine Therapie mit genetisch veränderten Adenoviren aufgenommen werden sollte, die, wie ein Jahr zuvor bekannt gegeben wurde, Gesundheitsstörungen verursachen. In dieser Studie sollte der veränderte Adenovirus untersucht werden, der zuvor in einer Gen-Therapie verwendet wurde, um Hämophilie und cystische Fibrose zu behandeln. Genetiker fanden heraus, daß das Virus das Potential hat, die gleichen Gesundheitsstörungen zu verursachen, wie die Adenoviren, die ein Jahr zuvor in einer Gen-Therapie verwendet wurden, um als Vektor „korrigierende“ Gene in die Zellen eines Patienten zu transferieren. In der früheren Gen-Therapie sollten zwei an *Severe Combined Immunodeficiency* (SCID) erkrankte Kinder behandelt werden. Nach der Therapie erkrankten beide jedoch an Leukämie [Check, 2002]. Kay und seine Kollegen konnten nachweisen, daß sich der Vektor, der zuvor gegen Hämophilie und cystische Fibroseversuche verwendet wurde, häufiger in Gene integriert, als in uncodierte DNA-Regionen, die keine Gene enthalten. Diese Eigenschaft könnte die zellulären Defekte bei den SCID Patienten verursacht haben, die schließlich zu Leukämie führten [Check, 2003].

Diese Studien zeigen deutlich die Risiken auf, die mit neuen Entwicklungen in der Biomedizin (Gen-Therapie) verbunden sind. Gerade die Wirksamkeit der *targeted-delivery*-Systeme wird dadurch in Frage gestellt. Dennoch sind die *targeted-delivery*-Systeme Gegenstand aktiver Forschung mit dem Ziel, diese immer noch effizienter zu gestalten, so daß zukünftig neue Therapie-Ansätze erwartet werden können.

Gerade wegen diesen Fortschritten in der medizinischen Biotechnologie und insbesondere der Gentechnik stehen diese Forschungen wie keine anderen Technologien im Mittelpunkt öffentlicher Kontroversen [Nixdorff et al., 2003; Nixdorff et al., 2004]. Positive und negative Folgen für die Gesellschaft sowie ethische Zusammenhänge sind auch bei der Problematik der möglichen Anwendung von Forschungsergebnissen für therapeutische Zwecke nicht immer sichtbar. Die potentiellen Gefahren, die mit biomedizinischen Forschungen verbunden sein können, wurden am Fallbeispiel des „Mäusepockenvirus“ deutlich, das vor wenigen Jahren durch die Schlagzeilen „*Disaster in the making: An engineered mouse virus leaves us one step away from the ultimate bioweapon*“ in der Zeitschrift *New Scientist* für große Aufmerksamkeit gesorgt hat [Nowak, 2001].

Ziel der australischen Wissenschaftler war es, eine Nagetierplage über eine Art Geburtskontrolle der Tierpopulation zu beseitigen. In einer ersten Versuchsreihe wurde das Gen für ein murines Eizellen-Protein in ein Mäusepockenvirus kloniert und Mäuse mit diesem gentechnisch veränderten Virus infiziert, nachdem sie zuvor gegen das Mäusepockenvirus immunisiert wurden. Da die erwartete Ak-Reaktion gegen das Eizellen-Protein jedoch nur schwach war, wurde das rekombinante Virus in einer zweiten Versuchsreihe zusätzlich mit dem Interleukin-4-Gen ausgestattet, von dem bekannt war, daß es die Ak-Produktion zusätzlich verstärkt. Dieser Effekt trat auch ein, aber gleichzeitig wurde durch das Interleukin-4 die Aktivierung zytotoxischen T-Lymphozyten gehemmt, die eine essentielle Rolle bei der Virus-Bekämpfung spielen. Die Folge war, daß die überwiegende Anzahl der Versuchsmäuse starben, obwohl sie resistent gegen das Virus sein sollten [Jackson et al., 1998; Jackson et al., 2001].

Gerade dieses Beispiel hat die *dual-use*-Problematik der modernen Biowissenschaften deutlich gemacht. Zudem weist es auf die Verantwortung der naturwissenschaftlich arbeitenden Forscher hin, denn eigentlich hätte das „versehentliche“ Desaster vorher erkannt werden müssen, da bereits 1996 der negative Einfluß von Interleukin-4 bei der Bekämpfung von viralen Infektionen beobachtet wurde.

Deutlicher wird diese *dual-use*-Problematik, wenn man sich vor Augen hält, daß das Wissen, das aus dem Wissenschaftsfortschritt gewonnen wird, dazu verwendet wird, die Entwicklung von wirkungsvolleren therapeutischen Verfahren zu beschleunigen. Gleichzeitig jedoch kann nicht verhindert werden, daß dasselbe Wissen dazu mißbraucht werden kann, neue und wirkungsvollere biologische Waffen zu produzieren [Nixdorff et al., 2001; Nixdorff et al., 2002]. Gerade das Wissen um die unzähligen dynamischen Wechselwirkungen zwischen Neuroendokrinsystem und Immunsystem, die sich in einem empfindlichen Gleichgewicht befinden und durch regulatorische Mechanismen (Bioregulatoren) begrenzt werden, ist enorm anfällig für den Mißbrauch. Es bedarf der ständigen Kontrolle, um Fehlanwendungen wie im Fall des Mäusepockenvirus verhindern zu können. Den Fokus der Aufmerksamkeit der in diesem Bereich arbeitenden Forscher auf diese Problematik zu lenken und einer ethischen Urteilsbildung zu unterziehen, könnte ein Ansatzpunkt sein.

Eine Analyse zur prospektiven Folgenabschätzung biotechnologischer Forschungen nach dem Modell der ethischen Urteilsbildung [Bender, 1988] führe ich am Fallbeispiel der oben erwähnten Therapie von rheumatoider Arthritis durch.

6.2. Das Modell der ethischen Urteilsbildung

Das Konzept ethischer Urteilsbildung ist ein dynamischer, kommunikativer und iterativer Prozeß. Ethische Urteilsbildung beinhaltet diskursive (*Gerechtigkeitsfragen*), narrative (*Erfahrungen*), kognitive (*Hoffnungen*), emotionale (*Einflüsse*), prospektive (*Zukunftsorientierung*) und kreative (*Handlungsorientierung*) Merkmale. Die ethische Urteilsbildung orientiert sich in erster Linie an der Frage nach dem gerechten und guten Leben des Einzelnen und der Gesellschaft. In diesem Modell muß das ethische Urteil vom moralischen Urteil unterschieden werden. Das moralische Urteil orientiert sich an faktisch gelebten Überzeugungen, Werten und Normen, also an dem, was in einer Gesellschaft als solches akzeptiert ist und eingehalten wird. Im Unterschied dazu setzt das ethische Urteil einen Distanzierungsvorgang gegenüber gewohnten Einstellungen und Verhaltensweisen voraus. Also die kritische, prüfende oder begründete Reflexion über die Inhalte der Moral [Bender, 1988].

So bezieht sich Ethik auf die Urteilsbildung, basierend auf moralischen Prinzipien, und wird dann nötig, wenn moralische Normen nicht mehr als bindend angesehen werden, oder auch Handlungssituationen auftreten, die mit den bisherigen Normen nicht mehr regelbar sind. Ethische Urteilsbildung wird besonders dann zu einem kommunikativen Prozeß, wenn alle Erfahrungen, Einstellungen und Argumentationen sämtlicher Akteure, die an einer bestimmten Situation beteiligt bzw. betroffen sind, berücksichtigt werden. Wegen seiner problemorientierten Annäherung in Richtung einer konstruktiven und prospektiven Ethik, stellt das Konzept ethischer Urteilsbildung ein unerläßliches Modell für die Entscheidungsfindung im Kontext von moderner Forschung und Technologie sowie Fragen der *dual-use*-Problematik [Bender et al., 1995] dar.

Die Abbildung 39 gibt einen Überblick über die vier Ebenen des Strukturmodells ethischer Urteilsbildung [Bender et al., 1995].

In der ersten Ebene muß das Problem und das funktionelle Ziel der Forschung oder Technologie definiert werden. Dies hat unter Einbeziehung der ethischen Leitprinzipien von Erhaltung und Entfaltung zu erfolgen. Dabei ist die vorläufige Zielbestimmung zu überprüfen und zu präzisieren. Das ethische Prinzip der Erhaltung bezieht sich dabei auf die Fortsetzung des menschlichen Lebens, während sich Entfaltung auf die innere Dynamik der Menschen innerhalb der Gesellschaft bezieht, deren Erhaltung nur Sinn macht, wenn sie das Entwickeln ihrer Fähigkeiten und Talente bedeutet. Normalerweise sollte dies für die meisten

Programme biomedizinischer Forschung unproblematisch sein. Da das Strukturmodell ethischer Urteilsbildung mit der Thematisierung des zu lösenden Problems einen problemorientierten Ansatz von Technikbewertung vertritt, müssen zur Problemlösung möglichst alle alternativen Mittel überprüft werden.

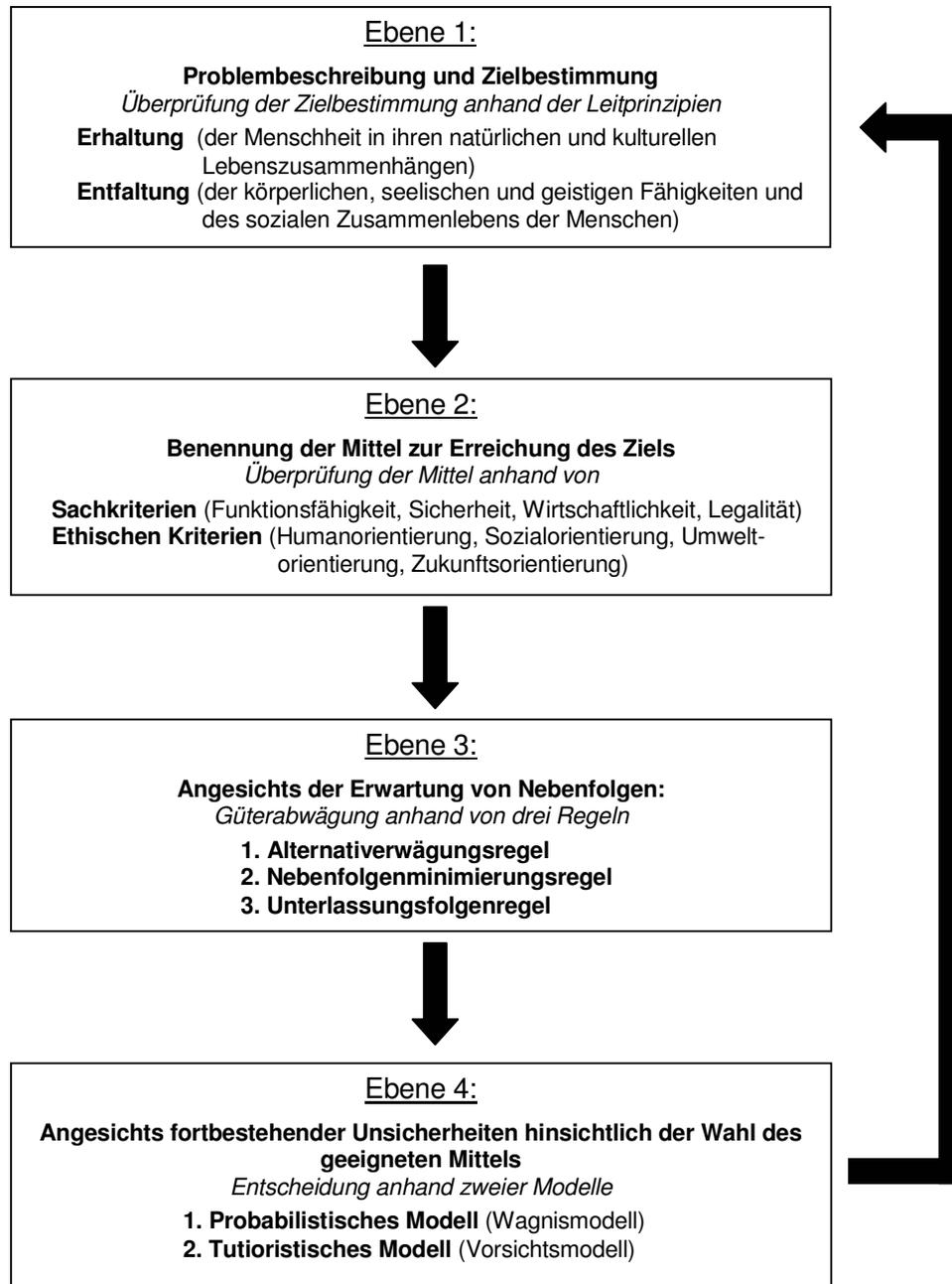


Abb. 39: Struktur und Prozeß ethischer Urteilsbildung aus: Bender et al., 1995

In der zweiten Ebene erfolgt zunächst die Benennung der Mittel (Sachkriterien und ethische Kriterien), die in Betracht zu ziehen sind, um das Ziel zu erreichen und schließlich die Überprüfung dieser. Entscheidend für die Beurteilung sind einerseits die Sachkriterien der Wirtschaftlichkeit, Funktionsfähigkeit und Sicherheit und andererseits die ethischen Kriterien der Human-, Sozial-, Umwelt- und Zukunftsorientierung. Das Kriterium der Zukunftsorientierung ist für eine prospektive Friedensethik besonders relevant und erfordert die Befolgung bestimmter ethischer Normen. Dabei ist stets nach den Normen zu handeln, daß „kein Problem an die Nachwelt weiter gegeben wird, daß nicht auch in der Gegenwart gelöst werden könnte“ sowie „keine zusätzlichen Quellen der Gefahr zum Klima und zur Menschheit aufgetan werden, die über die bereits bestehenden hinausgehen“.

In der dritten Ebene werden Mehrfachfolgen, insbesondere mit nicht vorhersehbaren Folgen, wie z.B. die unbeabsichtigte Schaffung eines gefährlichen Krankheitserregers während der Erforschung von Pathogenitätsfaktoren, in den Prozeß der Urteilsbildung einbezogen. Dies erfolgt anhand von drei Entscheidungsregeln: Nach der *Alternativenewägungsregel* ist unter mehreren technischen Lösungsmöglichkeiten diejenige auszuwählen, die mit den wenigsten negativen Folgen behaftet ist. Nach der *Nebenfolgenminimierungsregel* ist die Problemlösung unter mehreren auszuwählen, bei der die negativen Folgen auf das kleinste mögliche Maß reduziert werden. Schließlich können laut der *Unterlassungsfolgenregel* negative Folgen auch durch das Unterlassen von Handlungen erfolgen, wodurch abzuwägen ist, ob die negativen Folgen technikinduzierter Forschung geringer sind, als die Nachteile und Schäden, die durch das Nichthandeln entstehen würden.

In der vierten Ebene werden zwei Modellvorstellungen in den Urteilsbildungsvorgang integriert, die sich mit den Unsicherheiten auseinandersetzen, die nach sorgfältiger Anwendung der Prüfkriterien und Regeln der Güterabwägung übrig bleiben. Das *probabilistische Modell* hat dabei höhere Freiheitsgrade und verlangt für die Wahl der Handlungspräferenz wahrscheinlich zutreffende Gründe, weshalb es auch als Wagnismodell angesehen wird. Das *tutoristische Modell* dagegen setzt auf die Begrenzung des eintretenden Risikos und Gefahren und verlangt für die Präferenz der Handlung sicherere Gründe, weshalb es das Sicherheitsmodell darstellt.

6.3. Fallbeispiel: Rheumatoide Arthritis

Am Fallbeispiel der rheumatoiden Arthritis soll das Modell ethischer Urteilsbildung angewendet werden. Einerseits um die Anwendbarkeit dieses Modells im Bereich von Forschungen, die zweifelsfrei mit dem Aspekt des *dual-use* behaftet ist, zu überprüfen. Wie bereits erwähnt, sind neue Therapieansätze zur Bekämpfung der RA eindeutig *dual-use*-Technologien, wenn man an den Einsatz von Bioregulatoren (Zytokine) denkt, die mit geeigneten *targeted-delivery*-Systemen in die Zellen des entsprechenden arthritischen Gewebes transferiert werden sollen. Andererseits, bei erfolgreicher Anwendbarkeit, um negative Folgen, die aus diesen neuen Therapieansätzen entstehen können, rechtzeitig erkennen und minimieren oder abwenden zu können.

Zur Therapie der RA bedarf es der Wiederherstellung des Ungleichgewichtes zwischen den entzündungsfördernden und entzündungshemmenden Faktoren in dem arthritischen Gewebe. Als effektivste unter den gegenwärtig praktizierten Therapieformen hat sich die medikamentöse Therapie herausgestellt. Die vorhandenen kommerziellen Medikamente Etanercept und Infliximab dienen jedoch nicht der kausalen Behandlung der RA, weshalb nach neuen Therapieformen gesucht wird. Seit einigen Jahren wird in diesem Zusammenhang über den Einsatz und die Weiterentwicklung der Gen-Therapie diskutiert, bei der mittels geeigneter *targeted-delivery*-Systeme „korrigierende Gene“ in die Zellen des entzündeten Gewebes transferiert werden sollen. Die Anforderungen der beiden Leitprinzipien aus Ebene 1 des Modells wären somit erfüllt. Eine derartige Gen-Therapie würde im allgemeinen sowohl die Erhaltung wie auch die Entfaltung der Menschheit fördern. Im speziellen Fall würde eine Therapie entwickelt werden, die nachhaltig die Ursache der RA heilt.

Die Überprüfung der Mittel, anhand von Sach- und ethischen Problemen aus Ebene 2, die zur Einführung der Gen-Therapie nötig sind, wirft einige Fragen auf. Die Humanförderlichkeit steht dabei sicher nicht zur Diskussion, jedoch stellt sich die Frage nach der Bezahlbarkeit (Wirtschaftlichkeit) und Sozialverträglichkeit einer solchen Methode. Wie kann sichergestellt sein, daß sie später der gesamten Gesellschaft und nicht ausschließlich privilegierten Kreisen zur Verfügung steht, sofern sie überhaupt zuverlässig funktioniert (Funktionsfähigkeit und Sicherheit)? Eine weitere Frage stellt sich nach der Zukunftsverträglichkeit des Wissens, das aus der Entwicklung dieser Therapie gesammelt wird. Wie kann der Wissenstransfer stattfinden und verhindert werden, daß das daraus gewonnene Wissen z.B. für die Ausbringung von Bioregulatoren mißbraucht werden kann?

Eine Abwägung anhand der Alternativenerwägungsregel in Ebene 3 kann an dieser Stelle nicht durchgeführt werden, da keine vergleichbaren Therapiealternativen, zumindest gegenwärtig, zur Verfügung stehen. Entsprechend der möglichen Nebenfolgen wäre eine alternative Therapie vorzuziehen, bei der die Risiken minimiert werden könnten, z.B. bei der Verwendung von sicheren *targeted-delivery*-Systemen. Auf der anderen Seite könnten durch Lösung der offenen Fragen aus Ebene 2 die negativen Folgen auf ein geringstmögliches Maß reduziert werden. Das Restrisiko der Gen-Therapie wäre dann mit den Nachteilen bzw. Schäden abzuwägen, die durch die Nicht-Entwicklung entstehen würde. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Höhe und Tragweite des Wissensverlusts, sofern diese Therapie in einer konkurrierenden Gesellschaft etabliert würde.

Vor dem Hintergrund der fortbestehenden Unsicherheiten hinsichtlich der unerwarteten Nebenfolgen muß auf Ebene 4 eine Entscheidung für den Einsatz der Gen-Therapie zum gegenwärtigen Zeitpunkt aufgrund des Risikovermeidungsmodells abgelehnt werden. Da jedoch das Konzept der ethischen Urteilsbildung einen iterativen Prozeß darstellt, erscheint eine positive Entscheidung für die Gen-Therapie zu einem späteren Zeitpunkt und nach Klärung der offenen Fragen aus Ebene 2 durch die Häufung von wahrscheinlich zutreffenden Gründen für eine Gen-Therapie (Wahrscheinlichkeitsmodell) denkbar.

6.4. Ausblick

Wie die oben dargestellten Ausführungen zeigen, können ethische Modelle nützlich bei der Urteilsbildung über Forschungsstrategien sein. Darüber hinaus können solche Modelle eine Grundlage für die Betrachtung der Risiken schaffen, die mit Forschungsvorhaben verbunden sind. Dennoch ist die Anwendung ethischer Normen auf moderne Technologien keine einfache Aufgabe. Die Richtung, die letztendlich zur Erreichung des Ziels eingeschlagen wird, hängt ausschließlich von der subjektiven Urteilsbildung des Forschers ab. Modelle wie dieses, sind für die Reflexion sehr nützlich und können zu einem erhöhten Bewußtsein gegenüber bestimmter beteiligter Risiken führen. Eine problemorientierte und prospektive Technikbewertung und Technikgestaltung zu einem sehr frühen Zeitpunkt des Forschungsprozesses ist besonders effektiv, da Forschung dann noch in eine verantwortbare Richtung gesteuert werden kann und plötzliche Überraschungen vermieden werden können.

Die Entwicklungen in der medizinischen Biotechnologie der letzten 10 Jahre sind vielversprechend und müssen weiter betrieben werden. Dabei ist jedoch ein spezieller Codex (*code of conduct*) für Naturwissenschaftler im Umgang mit Forschungen nötig, um der Verantwortung gerecht zu werden, das Bewußtsein gegenüber Risiken zu schärfen und zur Reflexion über alternative Strategien anzuregen. Dieser *code of conduct* schließt die Ausbildung aller betroffenen Wissenschaftler über die Biowaffenkonvention und ihre Verantwortung bezüglich der Einhaltung dieser mit ein. Auch sollten sie über die Optionen unterrichtet werden, die sie bei dem Prozeß der bioethischen Urteilsbildung im Verlauf ihrer Arbeit haben.

Die Aktualität dieses Themas wird durch die Tatsache deutlich, daß die Einführung von Verhaltenskodizes für Wissenschaftler im Juni 2005 Gegenstand des Expertentreffens der Staatsparteien zur Biowaffenkonvention in Genf war, das zur Vorbereitung des Vertragsstaatentreffens im Dezember 2005 stattfand.

LITERATURVERZEICHNIS

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, and J. S. Pober.** 2003. Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- Afeltra, A.** 2001. Treatment of rheumatoid arthritis: new therapeutic approaches with biological agents. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Disord.* **1**: 45-65.
- Anderson, K. V.** 2000. Toll signalling pathway in the innate immune response. *Curr. Opin. Immunol.* **12**: 13-19.
- Akashi, S., R. Shimazu, H. Ogata, Y. Nagai, K., Takeda, M. Kimono, and K. Miyake.** 2000. Cutting Edge: Cell Surface Expression and Lipopolysaccharide Signaling via the Toll-like Receptor 4-MD-2 Complex an Mouse Peritoneal Macrophages. *J. Immunol.* **164**: 3471-3475.
- Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho.** 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology.* **2**(8): 675-680.
- Auron, P. E. and A. C. Webb.** 1994. Interleukin-1: a gene expression system regulated at multiple levels. *Eur. Cytokine Netw.* **5**: 573-592.
- Beißert, T.** 1999. Untersuchungen zur Zytokinproduktion in Lipopolysaccharid-stimulierten RAW-Makrophagen. Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- Bender, W.** 1988. Ethische Urteilsbildung. Kohlhammer, Stuttgart. 174-185.
- Bender, W., Platzer, K. and K. Sinemus.** 1995. On the assessment of genetic technology: reaching ethical judgments in the light of modern technology. *Science and Engineering Ethics.* **1**: 21-32.
- Brasier, A. R., and J.J. Fortin.** 1995. Nonisotopic assays for reporter gene activity. Firefly luciferase reporter gene assay. In F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (eds), *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. **1**, p. 9.7.12-9.7.21. John Wiley and Sons, Inc. New York, NY.
- Brandenburg K, Moriyon I, Arraiza MD, Lewark-Yvetot G, Koch MHJ, Seydel U.** 2002. Biophysical investigations into the interaction of lipopolysaccharide with polymyxins. *Thermochim Acta*; **382**:189-198.
- Brauburger, J.** 1996. Untersuchungen zur Signaltransduktion in Makrophagen nach Stimulierung mit Lipopolysaccharid und Protein A aus der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Dissertation, TH Darmstadt.
- Buras, J. A., B. G. Monks, and M. J. Fenton.** 1994. The NF- κ A-binding element, not an overlapping NF-IL-6-binding element, is required for maximal IL-1 β gene expression. *J. Immunol.* **152**: 4444-4454.
- Burmester, G. R and A. Pezzutto.** 1998. Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik. Thieme, Stuttgart.

- Cavalli-Sforza, L.** 1980. Biometrie. Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Check, E.** 2002. Regulators split on gene therapy as patient shows signs of cancer. *Nature*. **419**: 545-546.
- Check, E.** 2003. Harmful potential of viral vectors fuels doubts over gene therapy. *Nature*. **423**: 573-574.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraktion. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159.
- Contel, C., N. Termine, D. J. Charron, and M. A. Parant.** 1993. Modulation of lipopolysaccharide-induced cytokine gene expression in mouse bone marrow-derived macrophages by muramyl dipeptide. *J. Immunol.* **150**: 4541-4549.
- Davies, A., J. Hutton, Green, and C. Chinn.** 2001. Severe Sepsis: A European estimate of the burden of disease in ICU. *Int. Care Med.* **27**: 284.
- de Wet, J. R., K. V. Wood, M. DeLuca, D.R. Helsinki, and S. Subramani.** 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 725-737.
- Dinarelo, C. A.** 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood.* **77**: 1627-1652.
- Doganci, A.** 2003. Untersuchungen zur Charakterisierung des outer membrane protein A (OmpA) aus *Proteus mirabilis*. Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- Estrov, Z., and M. Talpaz.** 1996. Role of interleukin-1 β converting enzyme (ICE) in leukemia. *Cytokines and molecular therapy.* **2**: 1-11.
- Gabay, C.** 2000. IL-1 inhibitors: novel agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* **9**(1): 113-127.
- Gmeiner, J.** 1975, The isolation of two different LPS fractions from various *Proteus mirabilis* strains. *Eur. J. Biochem.* **58**: 621-626.
- Goater J., R. Muller, G. Kollias, G. S. Firestein, I. Sanz, R. J. O'Keefe, E. M. Schwarz.** 2000. Empirical advantages of adeno associated viral vectors in vivo gene therapy for arthritis. *J. Rheumatol.* **27**(4): 983-989.
- Hatzigeorgiou, D. E., J. Geng, G. Zhu, Y. Zhang, K. Lin, W. N. Rom, M. J. Fenton, S. J. Turco, and J. L. Ho.** 1996. Lipophosphoglycan from *Leishmania* suppresses agonist-induced interleukin-1 β gene expression in human monocytes via an unique promoter sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 14708-14713.
- Hoffmann, P., S. Heinle, U. E. Schade, H. Loppnow, A. J. Ulmer, H. D. Flad, G. Jung, and W. G. Bessler.** 1988. Stimulation of human and murine adherent cells by bacterial lipoprotein and synthetic Lipopeptide analogues. *Immunobiol.* **177**: 158-170.
- Hauser, G.** 1885. Über Fäulnisbakterien und deren Beziehung zur Septicämie. Ein Beitrag zur Morphologie der Spaltpilze. Vogel, Leipzig.

- Hoshino, K., O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira.** 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* **162**: 3749-3752.
- Hotz, M.** 1999. Untersuchungen zur Regulation der Zytokinproduktion in humanen Makrophagen. Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- Hume, D. A., and S. Gordon.** 1983. Optimal conditions for proliferation of bone marrow-derived macrophages in culture: the role of CSF-1, serum, Ca²⁺ and adherence. *J. Cell. Physiol.* **117**: 189-194.
- Jackson, R.J., D.J. Maguire, L.A. Hinds, and I.A. Ramshaw.** 1998. Infertility in mice induced by a recombinant ectromelia virus expressing mouse zona pellucida glycoprotein. *Biology of Reproduction.* **58**: 152-159.
- Jackson, R.J., A.J. Ramsay, C. Christensen, S. Beaton, D.F.R. Hall, and I.A. Ramshaw.** 2001. Expression of mouse interleukin-4 by a recombinant ectromelia virus suppresses cytolytic lymphocyte responses and overcomes genetic resistance to mousepox. *Journal of Virology.* **75**: 1205-1210.
- Janeway, Ch. A. and R. Medzhitov.** 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **20**: 197-216.
- Janssens, S. and R. Beyaert.** 2003. Role of Toll-Like receptors in pathogen recognition. *Clinical Microbiology Reviews.* **16**(4): 637-646.
- Jeannin, P., G. Magistrelli, L. Goetsch, J. F. Haeuw, N. Thieblemont, J. Y. Bonnefoy, and Y. Delneste.** 2002. Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies. *Vaccine.* **20**: A23-27.
- Jeannin, P., G. Magistrelli, N. Herbault, L. Goetsch, S. Godefroy, P. Charbonnier, A. Gonzalez, and Y. Delneste.** 2003. Outer membrane protein A renders dendritic cells and macrophages responsive to CCL21 and triggers dendritic cell migration to secondary lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* **33**(2): 326-333.
- Jebanathirajah, J., S. Peri, and A. Pandey.** 2002. Toll and interleukin-1 receptor (TIR) domain-containing proteins in plants: a genomic perspective. *Trends Plant Sci.* **7**: 388-391.
- Kaca, W., J. Radziejeweska-Lebrecht, and U. R. Bhat.** 1990. Effect of polymyxins on the lipopolysaccharide-defective mutants of *Proteus mirabilis*. *Microbios.* **61**: 23-32.
- Karch, H. and K. Nixdorff.** 1981. Antibody-producing cell responses to an isolated outer membrane protein and to complexes of this antigen with LPS or with vesicles of phospholipids from *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun.* **31**: 862-867.
- Karch, H.** 1982. Untersuchungen zur quantitativen und qualitativen Immunantwort von Mäusen gegen Hauptantigene der äußeren Membran von *Proteus mirabilis*. Dissertation, TH Darmstadt.

- Karch, H., J. Gmeiner and K. Nixdorff.** 1983. Alteration of the immunoglobulin G subclass responses in mice to lipopolysaccharide: effects of nonbacterial proteins and bacteria membrane phospholipids or outer membrane proteins of *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun.* **40**: 157-165.
- Kawai, T., O. Takeuchi, T. Fujita, J. Inoue, P. F. Mühlrad, S. Sato, K. Hoshino, and S. Akira.** 2001. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-Inducible Genes. *J. Immunol.* **167**: 5887-5891.
- Kawakami, K., M. Kawakami, R.K. Puri.** 2002. Cytokine receptor as a sensitizer for targeted cancer therapy. *Anticancer Drugs.* **7**: 693-699.
- Khan, N. A., S. Shin, J. W. Chung, K. J. Kim, S. Elliott, Y. Wang, and K. S. Kim.** 2003. Outer membrane protein A and cytotoxic necrotizing factor-1 use diverse signalling mechanisms for *Escherichia coli* K1 invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Microb. Pathog.* **35**(1): 35-42.
- Kim, K. S.** 2002. Strategy of *Escherichia coli* for crossing the blood-brain barrier. *Journal of Infectious Diseases.* **186**(2): 220-224.
- Koebnik, R.** 1999. Structural and functional roles of the surface-exposed loops of the beta-barrel membrane protein OmpA from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **181**(12): 3688-3694.
- Korn, A.** 1992. Monoklonale Antikörper zur Untersuchung der Wechselwirkung von Lipopolysaccharid mit Makrophagen. Dissertation. TH Darmstadt.
- Korn, A., H.-P. Kroll, H.-P. Berger, A. Kahler, R. Heßler, J. Brauburger, K.-P. Müller, and K. Nixdorff.** 1993. The 39-Kilodalton outer membrane protein of *Proteus mirabilis* is an OmpA protein and mitogen for murine B lymphocytes. *Infection and Immunity* **61**: 4915-4918.
- Korn, A., Z. Rajabi, B. Wassum, W. Ruiner, and K. Nixdorff.** 1995. Enhancement of uptake of lipopolysaccharide in macrophages by the major outer membrane protein OmpA of Gram-negative bacteria. *Infection and Immunity* **63**: 2697-2705.
- Kriegler, M.** 1990. Gene transfer and expression. A laboratory manual. Stockton Press, New York.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 681-685.
- Lehrbach, H., D. Diamond, J. M. Wozney, and H. Boedtke.** 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* **16**: 4743-4751.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.-M. Reichhart, and J. A. Hoffmann.** 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette spaetzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* **86**: 973-983.
- Lindl, T., und J. Bauer.** 1987. Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer, Stuttgart.

- Madigan, M. T., and J. M. Martinko.** 2005. Brock - Biology of Microorganisms, Prentice-Hall, Inc. New Jersey.
- Maini, R. N., and P. C. Taylor.** 2000. Anti-cytokine therapy for rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Med.* **51**: 207-229.
- May, M. J., and S. Ghoch.** 1998. Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol. Today.* **19**:80-88.
- Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and Ch. A. Janeway, Jr.** 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**: 394-397.
- Medzhitov, R. and Ch. A. Janeway, Jr.** 1998. An ancient system of host defense. *Current Opinion in Immunology.* **10**: 12-15.
- Medzhitov, R. and Ch. A. Janeway, Jr.** 2000. The Toll receptor family and microbial recognition. *TRENDS in Microbiology* **8**: 452- 456.
- Mishell, B. B., and S. M. Shiigi.** 1980. Selected methods in cellular immunology. W.H. Freeman and Company, San Francisco, CA.
- Morgan, S. J., und D. C. Darling.** 1994. Kultur tierischer Zellen. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Movva, N.R., K. Nakamura, and M. Inouye.** 1980. Regulatory region of the gene for the ompA protein, a major outer membrane protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 3845-3849.
- Mukherjee, P., B. Wu, L. Mayton, S.-H. Kim, P.D. Robbins, and P.H. Wooley.** 2003. TNF receptor gene therapy results in suppression of IgG2a anticollagen antibody in collagen induced arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases.* **62**: 707-714.
- Nagai, Y., S. Akashi, M. Nagafuku, M. Ogata, Y. Iwakura, S. Akira, T. Kitamura, A. Kosugi, M. Mimoto, and K. Miyake.** 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nature Immunology.* **3**(7): 667-672.
- Nathan, C. and J.B. Hibbs, Jr.** 1991. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* **3**: 65-70.
- Newton, C.R., and A. Graham.** 1994. PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Nicholas, K.B. and H.B. Nicholas, Jr.** 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. (<http://www.cris.com/~Ketchup/genedoc.shtml>).
- Nikaido H. and M. Vaara.** 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**(1): 1-32.
- Nikaido, H.** 1992. Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Molecular Microbiology.* **6**(4): 435-442.
- Nikaido, H.** 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Reviews* **67**: 593-656.

- Nixdorff, K., H. Fitzer, J. Gmeiner, and H.H. Martin.** 1977. Reconstitution of model membranes from phospholipid and outer membrane protein of *Proteus mirabilis*. Role of proteins in the formation of hydrophilic pores and protection of membranes against detergents. *Eur. J. Biochem.* **81**: 63-69.
- Nixdorff, K., G. Weber, K. Kaniecki, W. Ruiner, and S. Schell.** 1992. Bacterial protein-LPS complexes and immunomodulation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **319**:49-61.
- Nixdorff, K., D. Schilling, and W. Ruiner.** 1999. Immunological properties of microbial outer membrane proteins and their effects as modulators of LPS immunobiology, p. 651-665. *In*: H. Brade, S.M. Opal, S.N. Vogel and D.C. Morrison (ed.). *Endotoxin in health and disease*. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Nixdorff, K., D. Schilling, and M. Hotz.** 2001. Milzbrand: Nur der Anfang? *Spektrum der Wissenschaft* **12**: 86-90.
- Nixdorff, K. and W. Bender.** 2002. Ethics of university research, biotechnology and potential military spin-off. *In*: Zanders, J.P. (ed.): *Ethics and norms in chemical and biological weapons research*, Minerva **40**: 15-35.
- Nixdorff, K., D. Schilling, and M. Hotz.** 2002. Wie Fortschritte in der Biotechnologie mißbraucht werden können. *Biologie in unserer Zeit* **1**: 58-63.
- Nixdorff, K., M. Hotz, D. Schilling, and M. Dando.** 2003. Biotechnology and the biological weapons convention. *Series Science, Disarmament and International Security* 3, Agenda Verlag, Münster.
- Nixdorff, K., D. Schilling, and M. Hotz.** 2004. Critical aspects of biotechnology in relation to proliferation. *In* M. I. Chevrier et al., *The Implementation of legally binding measures to strengthen the biological and toxin weapons convention*. Kluwer Academic Publishers: 33-51.
- Novy, R., and B. Morris.** 2001. *in* *Novations* **13**: 8-10.
- Nowak, R.** 2001. Disaster in the making. An engineered mouse virus leaves us one step away from the ultimate bioweapon. *New Scientist* **13**: 4-5.
- Ohlweiler, S.** 2002. Immunologische, molekularbiologische und phylogenetische Untersuchungen zum outer membrane protein A (OmpA) von *Erwinia amylovora*, *Proteus mirabilis* und *Escherichia coli*. Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- Omura, S., Iwai, Y., and A. Hirano.** 1997. A new alkaloid Am-2282 of *Streptomyces* origin: Taxonomy, fermentation, isolation, and preliminary characterisation. *J Antibiot*, **30**: 275-282.
- Pautsch, A. and G. E. Schulz.** 1998. Structure of the outer membrane protein A transmembrane domain. *Nature Structural Biology.* **5**(11): 1013-1017.
- Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M.- Y. Liu, C. van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton, and B. Beutler.** 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**: 2085-2088.

- Poltorak, A., R. Ricciardi-Castagnoli, S. Citterio, and B. Beutler.** 2000. Physical contact between lipopolysaccharide and Toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**(5): 2163-2167.
- Puohiniemi R., M. Karvonen, J. Vuopio-Varkila, A. Muotiala, I. M. Helander, and M. Sarvas.** 1990. A strong antibody response to the periplasmic C-terminal domain of the OmpA protein of *Escherichia coli* is produced by immunization with purified OmpA or with whole *E. coli* or *Salmonella typhimurium* bacteria. *Infect. Immun.* **58**(6): 1691-1696.
- Qureshi, S.T., L. Lariviere, G. Leveque, S. Clermont, K.J. Moore, P. Gros, and D. Malo.** 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**:615-625.
- Radziejewska-Lebrecht, J., J. D. Krajewska-Pietrasik, and H. Mayer.** 1990. Terminal and chain-linked residues of D-galacturonic acid: characteristic constituents of the R-core regions of *Proteaceae* and of *Serratia marcescens*. *System. Appl. Microbiol.* **13**: 214-219.
- Rhoads, D. D. and D. J. Roufa.** 1991. SEQAID II Software (multifunctional program for DNA and protein sequence analysis) Version 3.81, available by anonymous FTP from BIONET (net.bio.net), Kansas State University.
- Rich, T., R. Allen, and J. Trowsdale.** 2000. How low can Toll go? *Trends Genet.* **16**: 292-294.
- Rietschel, E. T. and H. Brade.** 1993. Bakterielle Endotoxine. *Spektrum der Wissenschaft.* **1**: 34-42.
- Roitt, I.** 1997. *Essential Immunology.* Blackwell Science Ltd.
- Sambrook, J., T. Maniatis, and E. F. Fritsch.** 1989. *Molecular cloning.* Cold Spring Harbour Laboratory, New York, NY.
- Sands K. E., D. W. Bates, P. N. Lanke, P. S. Graman, P. L. Hibberd, K. L. Kahn, J. Parsonnet, R. Panzer, E. J. Orav, and D. R. Snyderman.** 1997. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *JAMA.* **278**(3): 234-240.
- Schilling, D., J. Brauburger, W. Ruiner, and K. Nixdorff.** 1997. Modulation of interleukin 1 β production in macrophages stimulated with lipopolysaccharide by the protein kinase inhibitor staurosporine. *J. Endotoxin Res* **4**: 251-260.
- Schilling, D.** 2000. Untersuchungen zur differenzierten Regulation der Produktion proinflammatorischer Zytokine und Charakterisierung der negativen Regulation von Interleukin-1 β in Lipopolysaccharid-aktivierten Makrophagen. Dissertation, TU Darmstadt.
- Schilling, D., W. Ruiner, M. Hotz, and Nixdorff.** 2000. Negative regulation of IL-1 β gene promoter activity in LPS stimulated macrophages. *Immunobiol.* **203**:124.
- Schilling, D., T. Beißert, M.J. Fenton, and K. Nixdorff.** 2001. Negative Regulation of IL-1 β production at the level of transcription in macrophages stimulated with LPS. *Cytokine* **16**: 51-61.

- Schilling D, K. Thomas, K. Nixdorff, S. N. Vogel, and M. J. Fenton.** 2002. Toll-like receptor 4 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein (TIRAP)/myeloid differentiation protein 88 adapter-like (Mal) contribute to maximal IL-6 expression in macrophages. *J. Immunol.* **169**: 5874-5880.
- Schmid, A., H. Burchardi, J. Clouth, and H. Schneider.** 2002. Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany. *Eur. J. Health Econ.* **3**(2): 77-82.
- Schulz, G. E.** 1993. Bacterial porins: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**(4): 701-707.
- Shimazu, R., S. Akashi, H. Ogata, Y. Nagai, K. Fukudome, K. Miyake, and M. Kimoto.** 1999. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* **189**: 1777-1782.
- Shirakawa, F., K. Saito, C. A. Bonagura, D. L. Galson, M. J. Fenton, A. C. Webb, and P. E. Auron.** 1993. The human prointerleukin 1 β gene requires DNA sequences both proximal and distal to the transcription start site for tissue-specific induction. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1332-1344.
- Singh SP, Williams YU, Miller S, Nikaido H.** 2003. The C-terminal domain of Salmonella enterica serovar typhimurium OmpA is an immunodominant antigen in mice but appears to be only partially exposed on the bacterial cell surface. *Infect. Immun.* **71**(7): 3937-3946.
- Smith, M. F., D. Eidlen, W. P. Arend, and A. Gutierrez-Hartmann.** 1994. LPS-induced expression of the human IL-1 receptor antagonist gene is controlled by multiple interacting promoter elements. *J. Immunol.* **153**: 3584-3590.
- Soulas, C., T. Baussant, J. P. Aubry, Y. Delneste, N. Barillat, G. Caron, T. Renno, J. Y. Bonnefoy, and P. Jeannin.** 2000. Cutting Edge: Outer membrane protein A (OmpA) binds to and activates human macrophages. *J. Immunol.* **165**(5): 2335-2340.
- Staines, N., J. Brostoff, and K. James.** 1997. *Immunologisches Grundwissen.* Gustav Fischer, Stuttgart.
- Studier, F. W., and B. A. Moffatt.** 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* **189**(1):113-130.
- Stuehr, D. J., and C. F. Nathan.** 1989. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* **169**: 1543-1555.
- Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira.** 2003a. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* **21**: 335-376.
- Takeda, K. and S. Akira.** 2003b. Toll receptors and pathogen resistance. *Cellular Microbiology.* **5**(3): 143-153.
- Takeda, K.** 2005. Evolution and integration of innate immune recognition systems: the Toll-like receptors. *Journal of Endotoxin Research.* **11**(1): 51-55.

- Takeda, K. and S. Akira.** 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. **17**(1): 1-14.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira.** 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. **11**(4): 443-451.
- Takeuchi, O., A. Kaufmann, K. Grote, T. Kawai, K. Hoshino, M. Morr, P. F. Mühlradt, and S. Akira.** 2000. Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* **164**(2): 554-557.
- Toshchakov V, B. W. Jones, P. Y. Perera, K. Thomas, M. J. Cody, S. Zhang, B. R. Williams, J. Major, T. A. Hamilton, M. J. Fenton, and S. N. Vogel.** 2002. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat. Immunol.* **3**: 392-398.
- Triantafilou, M. and K. Triantafilou.** 2002. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *TRENDS in Immunology*. **23**(6): 301-304.
- Triantafilou, M. and K. Triantafilou.** 2003. Receptor cluster formation during activation by bacterial products. *Journal of Endotoxin Research*. **9**(5): 331-335.
- Ulevitch, R.J. and P.S. Tobias.** 1995. Receptor-dependant mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Ann. Rev. Immunol.* **13**: 437-457.
- Wang, Y. and K. S. Kim.** 2002. Role of OmpA and IbeB in *Escherichia coli* K1 invasion of brain microvascular endothelial cells in vitro and in vivo. *Pediatr. Res.* **51**(5): 559-563.
- Weber, G.** 1991. Modulation der Interaktion von Lipopolysacchariden mit Makrophagen durch ein bakterielles Oberflächenprotein. Dissertation, TH Darmstadt.
- Weber, G., F. Link, E. Ferber, P.G. Munder, D. Zeitter, R.R. Bartlett, and K. Nixdorff.** 1993. Differential modulation of the effects of lipopolysaccharide on macrophages by a major outer membrane protein of *Proteus mirabilis*. *J. Immunol.* **151**: 415-424.
- Westphal, O., O. Lüderitz, und F. Bister.** 1952. Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. *Z. Naturforsch.* **7b**: 147-155.
- Williams, T. M., J. E. Buerlein, S. Ogdem, L. J. Kricka, and J. A. Kant.** 1989. Advantages of the firefly luciferase as reporter gene: application to the interleukin-2 gene promoter. *Anal. Biochem.* **176**: 28-32.
- Yoshida, H., Y. Katayose, M. Unno, M. Suzuki, H. Kodama, S. Takemura, R. Asano, H. Hayashi, K. Yamamoto, S. Matsuno, and T. Kudo.** 2003. A novel adenovirus expressing human 4-1BB ligand enhances tumor immunity. *Cancer Immunol. Immunother.* **52**: 97-106.

ANHANG

Lebenslauf

Geburtsdatum	30.05.1973	
Geburtsort	Bad Godesberg, Kreis Bonn, NRW	
Schulausbildung	1979 – 1983	Grundschule Dietzenbach
	1983 – 1985	Gesamtschule Dietzenbach, Förderstufe
	1985 – 1992	Gesamtschule mit gymnasialer Oberstufe Dietzenbach-Steinberg, Abschluß: Allgemeine Hochschulreife
Wehrdienst	1992 – 1994	Wehrdienst in der Bundeswehr
Akademische Ausbildung	1994 – 2000	Studium der Biologie an der Technischen Universität Darmstadt, Abschluß: Diplom-Biologe
	2000 – 2001	wissenschaftlicher Mitarbeiter bei IANUS, TU Darmstadt, IANUS-Forschungsprojekt
	2001 – 2004	Promotionsstipendiat der Hans-Böckler- Stiftung
	2004 – 2005	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Mikrobiologie und Genetik der TU Darmstadt

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Hotz, M., M. J. Fenton, D. Schilling, and K. Nixdorff. 2005. Differential productions of pro-inflammatory cytokines in response to OmpA in macrophages. *In Vorbereitung zur Erscheinung in Journal of Immunology.*

Hotz, M., A. Doganci, S. Ohlweiler, A. Korn, and K. Nixdorff. 2005. Cloning the OmpA gene from *P. mirabilis* and expression of the protein in *E. coli*. Comparison with OmpAs from other gram-negative bacteria. *In Vorbereitung zur Erscheinung in Infection and Immunity.*

Beiträge für internationale wissenschaftliche Kongresse:

Hotz, M., D. Schilling, and K. Nixdorff. 2001. Relevance of biotechnology for the biological and toxin weapons convention – experimental studies on methods for identifying microorganisms in environmental samples. NATO Advanced Study Institute “Scientific and Technical Aspects of the Implementation of the Protocol to the Biological and Toxin Weapons Convention”, Budapest, Hungary, March 19 – 29, 2001.

Hotz, M., D. Schilling, S. Ohlweiler, and K. Nixdorff. 2002. Differential signaling for IL-1 β and NO production in macrophages stimulated with OmpA. *Journal of Endotoxin Research.* 8: 184-185.

7th Conference of the International Endotoxin Society, Washington, DC, USA, July 18 – 21, 2002.

Hotz, M., and K. Nixdorff. 2003. Analysis of new developments in biotechnology: an approach for a controversial discourse. 15th International Summer Symposium on Science and World Affairs, Moscow, Russia, July 23 – 31, 2003.

Erklärungen

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Kathryn Nixdorff an der Technischen Universität Darmstadt am Institut für Mikrobiologie und Genetik in der Zeit von Juli 2001 bis Juli 2005 angefertigt.

Diese *Elektronische Publikation Darmstadt (EPDA)* erscheint parallel in Buchform beim Shaker Verlag, Aachen.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Weiterhin erkläre ich, daß ich bisher keinen Versuch unternommen habe, an einer deutschen oder ausländischen Universität zu promovieren.

Darmstadt, den 15.07.2005

(Mark Hotz)