

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

**Mit begleitender Technikfolgenabschätzung**

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt  
zur Erlangung des akademischen Grades  
eines *Doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.)  
genehmigte Dissertation von

**Dipl.-Biol. Mark E. Hotz**

aus Bad Godesberg

Berichterstatterin:	Prof. Dr. Kathryn Nixdorff
Mitberichterstatterin:	Prof. Dr. Felicitas Pfeifer
Tag der Einreichung:	15. Juli 2005
Tag der mündlichen Prüfung:	23. September 2005

Darmstadt, 2005

D 17



Berichte aus der Biologie

**Mark E. Hotz**

**Immunologische und molekular-  
biologische Untersuchungen  
des *outer membrane protein A*  
von *Proteus mirabilis***

Mit begleitender Technikfolgenabschätzung

D 17 (Diss. TU Darmstadt)

Shaker Verlag  
Aachen 2006

**Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Zugl.: Darmstadt, Techn. Univ., Diss., 2005

Copyright Shaker Verlag 2006

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8322-4887-0

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: [www.shaker.de](http://www.shaker.de) • eMail: [info@shaker.de](mailto:info@shaker.de)

# 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.

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.

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1. Grundlagen des Immunsystems der Vertebraten</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2. Das Phagozytensystem</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3. Aktivierung der Makrophagen</b> .....	<b>6</b>
1.3.1. Extrazelluläre Erkennung von LPS durch TLR4 .....	8
1.3.2. TLR4-Signaltransduktion .....	9
<b>1.4. Proinflammatorische Zytokine</b> .....	<b>12</b>
<b>1.5. Outer membrane protein A (OmpA)</b> .....	<b>13</b>
<b>Problemstellung</b> .....	<b>17</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1. Chemikalien</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2. Biologisches Material / Substanzen</b> .....	<b>22</b>
3.2.1. Mäuse .....	22
3.2.2. Zelllinien .....	22
3.2.3. Bakterien .....	23
3.2.4. Oligonukleotide .....	23
3.2.5. Vektoren, Konstrukte .....	24
3.2.6. Molekularbiologische Reagenzien .....	26
3.2.7. Stimulatoren .....	26
3.2.8. Enzyme, Proteine, Antikörper .....	27
<b>3.3. Geräte und Kits</b> .....	<b>28</b>
<b>3.4. Zellkultur</b> .....	<b>28</b>
3.4.1. Allgemeine Methoden .....	28
3.4.2. Präparation, Isolierung und Differenzierung von Knochenmarksmakrophagen .....	29
3.4.3. Anzucht und Reaktivierung von RAW 264.7-Zellen .....	30
3.4.4. Färbung und Zellzahlbestimmung .....	31
3.4.5. Passage und Aussaat .....	31
3.4.6. Stimulierung von Makrophagen .....	32
3.4.7. Gentechnische Methoden in der Zellkultur .....	33
3.4.7.1. Transfektion mittels der Calciumphosphat-Methode .....	33
3.4.7.2. Stimulierung von transfizierten Zellen .....	33
3.4.7.3. Reportergenassays .....	34
<b>3.5. Biochemische und serologische Nachweismethoden</b> .....	<b>34</b>
3.5.1. Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test .....	34
3.5.2. Herstellung von Zellwänden .....	35
3.5.3. ELISA (enzymgebunder Immunoassay) .....	35
3.5.3.1. Nachweis von OmpA in Zellwänden .....	36
3.5.3.2. Nachweis der Zytokinproduktion .....	37
3.5.4. Nachweis von NO .....	37

3.5.5. Western-Blot-Analysen .....	38
3.5.5.1. SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) .....	38
3.5.5.2. Blot .....	39
3.5.5.3. Nachweis von OmpA in Zellwänden .....	39
3.5.5.4. Nachweis der Expressionsfragmente .....	40
<b>3.6. Photometrische Methoden .....</b>	<b>40</b>
<b>3.7. Molekular-biologische Methoden .....</b>	<b>41</b>
3.7.1. Northern-Analysen .....	41
3.7.1.1. RNA-Extraktion .....	41
3.7.1.2. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese .....	41
3.7.1.3. Northern-Blot .....	42
3.7.1.4. Nachweis mit Digoxigenin .....	42
3.7.2. Isolierung von chromosomaler DNA .....	43
3.7.3. Gen-Amplifikation .....	44
3.7.4. Gelelektrophorese von DNA .....	44
3.7.5. Extraktion von DNA aus Agarose-Gelen .....	45
3.7.6. Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion .....	45
3.7.7. Fällern und Waschen von Nukleinsäuren .....	45
3.7.8. Ligation und Transformation in kompetente Zellen .....	46
3.7.9. Restriktionsanalyse .....	46
3.7.10. Sequenzierung .....	47
3.7.11. Expression rekombinanter OmpA-Fragmente in <i>E. coli</i> .....	47
<b>3.8. Statistische Methoden .....</b>	<b>48</b>
<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1. Quantitativer Nachweis von gramnegativen Endotoxinen (LPS) in den verwendeten OmpA Proben .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2. Untersuchungen zur agonistischen Wirkung von OmpA alleine und in Kombination mit LPS auf Makrophagen .....</b>	<b>50</b>
4.2.1. Einfluß von OmpA auf die Zytokinproduktion bei RAW 264.7- und C3H- Makrophagen .....	51
4.2.1.1. Dosis-abhängiger Einfluß von OmpA auf die Zytokinproduktion bei RAW 264.7- und C3H-Makrophagen .....	51
4.2.1.2. Effekte von Polymyxin B auf die Produktion von IL-1 $\beta$ nach Stimulierung mit LPS und OmpA bei RAW 264.7- und C3H/HeJ- Makrophagen .....	56
4.2.1.3. Effekte von Staurosporin auf die Zytokinproduktion bei C3H/HeJ- Makrophagen .....	59
4.2.2. Einfluß von OmpA auf die Produktion von reaktivem Stickstoffmonoxid (NO) bei RAW 264.7- und C3H/HeJ-Makrophagen .....	60
4.2.2.1. Dosis-abhängiger Einfluß von OmpA auf die NO Produktion bei RAW 264.7- und C3H/HeJ-Makrophagen .....	60
4.2.2.2. Kinetik der NO Produktion nach Stimulierung mit LPS und OmpA bei C3H/HeJ-Makrophagen .....	63
4.2.3. Kinetik der Produktion von IL-1 $\beta$ nach Stimulierung mit LPS und OmpA bei C3H/HeJ-Makrophagen .....	64
4.2.4. Transkription der Gene für IL-1 $\beta$ in C3H/HeJ-Makrophagen nach Stimulierung mit LPS und OmpA .....	65

4.2.4.1.	Kinetik der Transkription von IL-1 $\beta$ in C3H/HeJ-Makrophagen nach Stimulierung mit LPS und OmpA.....	65
4.2.4.2.	Effekte von Staurosporin auf die IL-1 $\beta$ -mRNA-Menge in C3H-Makrophagen nach Stimulierung mit LPS und OmpA.....	66
4.2.5.	Einfluß von OmpA auf die Promotoraktivität des IL-1 $\beta$ -Gens bei RAW 264.7-Makrophagen .....	69
<b>4.3.</b>	<b>Charakterisierung der <i>ompA</i>-Gen-Sequenz von <i>Proteus mirabilis</i> 19 und phylogenetischer Vergleich mit verwandten Bakterien.....</b>	<b>72</b>
4.3.1.	Serologische Charakterisierung des OmpA von <i>Proteus mirabilis</i> mittels der monoklonalen Antikörper (mAk) 2.14.1 und 2.18.1 .....	72
4.3.2.	Ermittlung der Sequenz eines 400 bp großen <i>ompA</i> -Fragmentes von <i>Proteus mirabilis</i> .....	77
4.3.3.	Ermittlung der Sequenz eines 1 kb großen <i>ompA</i> -Fragmentes von <i>Proteus mirabilis</i> ..	79
4.3.4.	Datenbankanalyse (Blastn) und Vergleich der sequenzierten Nukleotidsequenzen ( <i>Proteus mirabilis</i> 19) mit Sequenzen von <i>Proteus mirabilis</i> HI4320.....	83
4.3.5.	Sequenzierung des gesamten <i>ompA</i> -Gens von <i>Proteus mirabilis</i> 19 .....	84
4.3.6.	Phylogenetischer Vergleich auf der Basis von OmpA.....	88
<b>4.4.</b>	<b>Herstellung rekombinanter Proteine.....</b>	<b>92</b>
<b>Diskussion.....</b>		<b>99</b>
<b>5.1.</b>	<b>Untersuchungen zur aktivierenden Wirkung von OmpA auf Makrophagen .....</b>	<b>99</b>
5.1.1.	Bestimmung des Endotoxin (LPS)-Anteils in den verwendeten OmpA-Proben..	99
5.1.2.	Spezifische Wirkung von OmpA auf Makrophagen.....	99
5.1.3.	Einfluß von Polymyxin B (PMB) auf die spezifische Wirkung von OmpA .....	102
5.1.4.	Einfluß von Staurosporin auf die spezifische Wirkung von OmpA .....	102
<b>5.2.</b>	<b>Differenzierte Modulation LPS-aktivierter Makrophagen durch OmpA von <i>Proteus mirabilis</i> und <i>E. coli</i>.....</b>	<b>103</b>
<b>5.3.</b>	<b>Charakterisierung und phylogenetische Untersuchung der <i>ompA</i>-Gen-Sequenz von <i>Proteus mirabilis</i> 19 .....</b>	<b>105</b>
<b>5.4.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>108</b>
<b>Begleitende Technikfolgenabschätzung .....</b>		<b>110</b>
6.1.	Einführung.....	110
6.2.	Das Modell der ethischen Urteilsbildung .....	116
6.3.	Fallbeispiel: Rheumatoide Arthritis.....	119
6.4.	Ausblick.....	120
<b>Literaturverzeichnis .....</b>		<b>122</b>
<b>Anhang .....</b>		<b>132</b>
Lebenslauf .....		132