

Institut für Veterinär bakteriologie
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. M. M. Wittenbrink

**Untersuchungen zur Eignung des Chlamydien-spezifischen
Major Outer Membrane Protein als Antigen für die
Erregerspezies-differenzierende Serologie bei Tieren**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Diana Sieber

Tierärztin

von Menziken AG, CH

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. Max M. Wittenbrink, Referent

PD Dr. Adrian Hehl, Korreferent

Zürich 2005

Inhalt

1	Zusammenfassung	4
2	Summary	5
3	Einleitung	6
4	Material und Methoden	14
4.1	Chlamydienstämme und Zellkultur	14
4.2	DNA-Extraktion	14
4.3	Klonierung von <i>ompA</i> -Genen und <i>ompA</i> -Gen-Subfragmenten	15
4.3.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	15
4.3.2	Vorbehandlung des Expressionsplasmids	17
4.3.3	Ligation der PCR-Amplifikate in den Expressionsvektor	17
4.3.4	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	18
4.3.5	Isolierung von Plasmid-DNA	18
4.4	Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen	19
4.5	Reinigung von rekombinanten Proteinen mittels anti- <i>E. coli</i> -Antikörper gekoppelter Sepharose	20
4.6	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	21
4.7	Dot Blot- und Western Blot-Assay	22
4.8	ELISA	23
5	Ergebnisse	24
5.1	Expression von rekombinantem MOMP in <i>Escherichia coli</i>	24
5.2	Dot Blot-Analysen mit rMOMP als Antigen	25
5.3	Expression von rMOMP-Subfragmenten	26
5.4	<i>Antibody profiling</i> mit monoklonalen Antikörpern	27
5.5	<i>Antibody profiling</i> mit polyklonalen Immunsereen	28
6	Diskussion	31
7	Literaturverzeichnis	35

1 Zusammenfassung

Die 40 kDa Major Outer Membrane Proteine (MOMP) von *Ch. pneumoniae*, *Ch. psittaci* und *C. trachomatis* wurden rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt. Mit Immunsereen gegen verschiedene Chlamydienarten wurde untersucht, ob die Seroreaktivität der rekombinanten MOMP (rMOMP) spezifisch für die homologen Chlamydienarten ist. Im Dot Blot konnte eine Erregerart-spezifische Seroreaktivität nachgewiesen werden. Zusammen mit den in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierten rekombinanten MOMP von *Ch. abortus*, *Ch. pecorum* und *C. suis* bilden diese Arbeiten die Grundlage für die Etablierung eines serologischen Tests, mit dem Antikörper gegen speziesspezifische Antigene der verschiedenen Chlamydienarten unterschieden und mit dem die infizierende Chlamydienart identifiziert werden kann. Für immunologische Fragestellungen (z. B. „antibody-profiling“) wurde das MOMP von *Ch. abortus* und *Ch. pecorum* in sechs Subfragmenten hergestellt, welche die vier variablen MOMP-Domänen in unterschiedlicher Anzahl und Kombination enthalten. Auf dem *Ch. abortus*-MOMP wurden die Epitope von neuen monoklonalen Antikörpern in den variablen Domänen VDIII und VDIV lokalisiert. Bei der Analyse von B-Zell-Epitopen mit polyklonalen anti-*Ch. abortus* Immunsereen vom Kaninchen und vom Schwein zeigten die Reaktionsmuster mit den MOMP-Subfragmenten tierartspezifische Unterschiede: Das Immunsereum vom Schwein reagierte mit Epitopen in den VDIII und VDIV. Demgegenüber reagierte das Kaninchensereum mit Epitopen in den VDI und VDII. Genuspezifische Epitope konnten tierartunabhängig in der VDIV lokalisiert werden. Eine Kombination von definierten rMOMP-Fragmenten als Antigene in einem serologischen Test könnte eine weitergehende Analyse der chlamydienspezifischen humoralen Immunantwort ermöglichen, z.B. die Identifizierung der infizierenden Chlamydienart.

2 Summary

The Major Outer Membrane Proteins (MOMP) of *Ch. pneumoniae*, *Ch. psittaci*, and *C. trachomatis* were expressed in *Escherichia coli* and their species-specific seroreactivity was established in Dot Blot using immune sera against representatives of these three chlamydial species. In line with recombinant MOMP of *Ch. abortus*, *Ch. pecorum*, and *C. suis* previously established in our work group these tests form the basis to set up a serological test system which allows to differentiate to antibodies directed against chlamydial species specific antigens thus identifying the infection chlamydial species. For detailed studies of the chlamydial antigenic structures targeted by the antibody response (antibody profiling), the MOMP of *Ch. abortus* and *Ch. pecorum* was expressed in six subfragments which, in turn, contain the variable domains (VD) of the chlamydial MOMP in different numbers and combinations. By using novel monoclonal antibodies established at our institute, we were able to identify species specific *Ch. abortus*-epitopes in the VDIII and VDIV of the MOMP. Mapping B-cell epitopes using polyclonal immune sera raised in pigs and rabbits, different seroreactivity were obtained for either the porcine or the rabbit sera. The porcine antiserum targeted epitopes in VDIII and VDIV whereas the rabbit immune serum reacted predominately with epitopes in VDI and VDII. Thus, it is tempting to speculate whether the antibody reactive pattern against chlamydiae may be dependent of the animals species. Genus-specific epitopes were identified in VDIV regardless of animal species. The combination of defined rMOMP fragments being used as antigen in a serological test ought to enable further a more precise differentiating of the humoral immune response against chlamydiae e.g. the diagnosis of the infecting chlamydial species.

3 Einleitung

Die Familie *Chlamydiaceae* wird taxonomisch in das Genus *Chlamydia* (*C.*) mit den drei Spezies *C. trachomatis*, *C. suis*, *C. muridarum* und in das Genus *Chlamydophila* (*Ch.*) mit den Spezies *Ch. pneumoniae*, *Ch. psittaci*, *Ch. abortus*, *Ch. pecorum*, *Ch. felis* und *Ch. caviae* unterteilt (Everett et al., 1999).

Chlamydien sind obligat intrazelluläre kokkoide Bakterien mit einer Zellwand, deren Aufbau, bis auf das Fehlen der Peptidoglykanschicht, der Zellwand von gramnegativen Bakterien entspricht. Chlamydien sind aufgrund der fehlenden Eigensynthese von Nukleotiden, in ihrem Metabolismus obligat auf eukaryontische Zellen als Nukleotidquelle angewiesen. Bei der Vermehrung durchlaufen Chlamydien einen einzigartigen Entwicklungszyklus, dessen wichtigste Stadien durch eine extrazellulär lebensfähige infektiöse Form (Elementarkörperchen, EK, Ø ca. 0,2 µm) und eine obligat intrazelluläre, stoffwechselaktive, replikative Form (Retikularkörperchen, RK, Ø ca. 0,5-1 µm) repräsentiert werden. Der durch diesen Dimorphismus (EK → RK → EK) charakterisierte Entwicklungszyklus beginnt mit einer rezeptorvermittelten Phagozytose der EK durch die Wirtszelle. Der weitere Entwicklungszyklus läuft ausschliesslich in den Phagosomen ab, die zu grösseren Vakuolen fusionieren können. In diesen bilden sich aus den EK die metabolisch aktiven RK, die sich durch Zweiteilung vermehren. Um einer Inaktivierung durch lysosomale Enzyme der Wirtszelle zu begegnen, modifizieren die Chlamydien die Phagosomenmembran und verhindern so die Fusion der erregerehaltigen Phagosomen mit den enzymatisch aktiven Lysosomen. Ein weiterer essentieller Effekt dieser Membranmodifikation ist die Sicherstellung der transmembranalen Versorgung der Chlamydien mit notwendigen Metaboliten aus der Wirtszelle. Die RK differenzieren sich nach mehreren Teilungszyklen zu infektiösen EK zurück. Dieser mit einer Verkleinerung der Zelle und Verfestigung der Zellwand einhergehende Prozess wird als Kondensation bezeichnet. Die intrazelluläre Vermehrung der Chlamydien ist mikroskopisch in Form der sog. Einschlusskörperchen nachweisbar. Dabei handelt es sich um rundliche, mit Chlamydien unterschiedlicher Entwicklungsstadien angefüllte, membranumhüllte Vakuolen, die sich infolge der Vermehrung der Chlamydien rasch ausdehnen und die häufig in der Peripherie des Zellkernes zu finden sind. Parallel zur intrazellulären Erregervermehrung treten zytopathologische Veränderungen an der Wirtszelle auf, die zur Ruptur der Zelle und

damit zur Freisetzung einer neuen Generation von infektiösen EK führen. Der gesamte Entwicklungszyklus dauert ca. 48-72 Stunden (Wyrick, 2000; Moulder, 1991).

Chlamydien gehören zu den in der Natur am weitesten verbreiteten Mikroorganismen und kommen bei zahlreichen wildlebenden Tieren, bei nahezu allen Haus- und Heimtieren und beim Menschen vor.

In der Humanmedizin sind im Wesentlichen zwei Arten, nämlich *C. trachomatis* und *Ch. pneumoniae* von pathogener Bedeutung. *C. trachomatis* ist weltweit die wichtigste Ursache von sexuell übertragbaren Erkrankungen. In Ländern der Dritten und Vierten Welt verursacht *C. trachomatis* aufgrund der schlechten hygienischen Bedingungen das sog. Trachom bei Säuglingen und Kleinkindern. Diese infizieren sich während der Geburt im Genitaltrakt der Mutter. Unbehandelt führt das Trachom zur Erblindung. Ein wirksamer Impfstoff steht nach wie vor nicht zur Verfügung (Cates & Wasserheit, 1991; Whitcher et al., 2001).

Ch. pneumoniae verursacht Erkrankungen des Respirationstraktes, wie z.B. Pneumonie oder chronische Bronchitis. Daneben wird eine mögliche Beteiligung dieser Chlamydienart an Herz-Kreislauf-Erkrankungen, insbesondere der Atherosklerose diskutiert. Seroprävalenzstudien haben gezeigt, dass weltweit bis zu 70% der Bevölkerung Antikörper gegen *C. pneumoniae* tragen. (Grayston et al., 1993; Blasi et al., 1993; Kuo et al., 1995; Gaydos et al., 1996).

Bei Tieren verursachen Chlamydien ein breites Spektrum von Erkrankungen von z.T. weltweiter Bedeutung. Zu nennen sind an erster Stelle der Enzootische Abort des Schafes und der Ziege (*Ch. abortus*) sowie die Psittakose/Ornithose der Vögel (*Ch. psittaci*).

Bei Haus- und Heimtieren überwiegen klinisch inapparente Infektionen, in vielen Fällen offensichtlich verbunden mit einer Erregerlatenz. Dabei sind keine vermehrungsfähigen Erreger nachweisbar und die humorale Immunantwort ist nur schwach ausgeprägt. Klinische Manifestationen können sich an allen Organen entwickeln. Bei Rind, Schaf und Ziege stehen die Manifestationen am Genitaltrakt und am Respirationstrakt im Vordergrund. Erkrankungen des Bewegungsapparates, des Auges und des Zentralnervensystems sind ebenfalls möglich. Chlamydien können beim Rind, aber auch bei Schaf und Ziege, Mastitiden verursachen; die

klinische Relevanz des Erregers als Ursache von Mastitiden in der Milchproduktion ist jedoch nicht bekannt.

Hierzulande steht die Chlamydiose des Schafes mit der Manifestation als seuchenhaftes Verlammen im Vordergrund. Die Chlamydiose des Rindes ist nach derzeitigem Kenntnisstand als infektiöse Faktorenkrankheit anzusehen, die sich v.a. in grossen Milchkuhbeständen mit ganzjähriger Stallhaltung als Infertilitätssyndrom manifestieren kann. Eine ätiologische Mitbeteiligung an Augenentzündungen konnte in neueren Untersuchungen bestätigt werden (Everett 2000; Griffiths et al., 1995; Aitken et al., 1990; Appleyard et al., 1983).

An den Chlamydiosen des Schweines sind v.a. drei Arten beteiligt, *C. suis*, *Ch. abortus* und *Ch. pecorum*. Sie werden u.a. in Zusammenhang gebracht mit Infektionen des Reproduktionstrakts, Polyarthritiden bei Ferkeln sowie respiratorischen Erkrankungen und Konjunktivitis. Bei einer Vielzahl von Erkrankungen wie z.B. Aborten, chronischen Endometritiden, erhöhten peripartalen Ferkelverlusten waren ausschliesslich Chlamydien als infektiöse Krankheitsursache nachweisbar (Stellmacher et al., 1983; Rogers et al., 1993; Schiller et al., 1997). Im Mittelpunkt aktueller Untersuchungen steht die genitale Chlamydiose der Sau. So konnten Hoelzle et al. (2000) eine signifikant höhere Prävalenz von *Ch. abortus* in Sauen mit Fruchtbarkeitsstörungen nachweisen. Die ätiologische Bedeutung der verschiedenen Chlamydienarten in der Pathogenese der genannten Erkrankungen sind jedoch noch nicht definitiv geklärt.

Chlamydien sind bei mindestens 375 Vogelarten nachgewiesen worden. Die Chlamydiose der Vögel in menschlicher Obhut kann schematisch in die Chlamydiose des Wirtschaftsgeflügels und die Chlamydiose der Ziervögel, insbesondere der Psittaciden (Papageienvögel) unterteilt werden. Diese Unterteilung ist mit der unterschiedlichen Antigenstruktur der bislang untersuchten Chlamydienstämme kongruent. *Ch. psittaci*-Stämme von Papageien gehören zum Serotyp A und Isolate von Puten zum Serotyp D. Die von Tauben isolierten *Ch. psittaci* gehören überwiegend zum Serotyp B.

Die aviäre Chlamydiose verläuft als eine systemische, gelegentlich tödlich verlaufende Krankheit. Sie äußert sich in Lethargie, Hyperthermie, Nasen- und Augenausfluss sowie verminderter Legeleistung. Auch Durchfall und starke Atembeschwerden können beobachtet werden (Andersen et al., 1997; Herrera et al., 2001).

Amphibien und Reptilien sind als Heimtierpatienten von zunehmender Bedeutung. Hervorzuheben ist, dass bei Amphibien und Reptilien zunehmend über das Vorkommen der humanpathogenen Art *Ch. pneumoniae* berichtet wird (Soldati et al., 2004; Bodetti et al., 2002; Hotzel et al., 2001).

Die bei Tieren vorkommenden Chlamydien besitzen nur eine geringe Wirtsspezifität. Sie sind auf den Menschen übertragbar und können dort z.T. schwere Erkrankungen verursachen (Abbildung 1;).

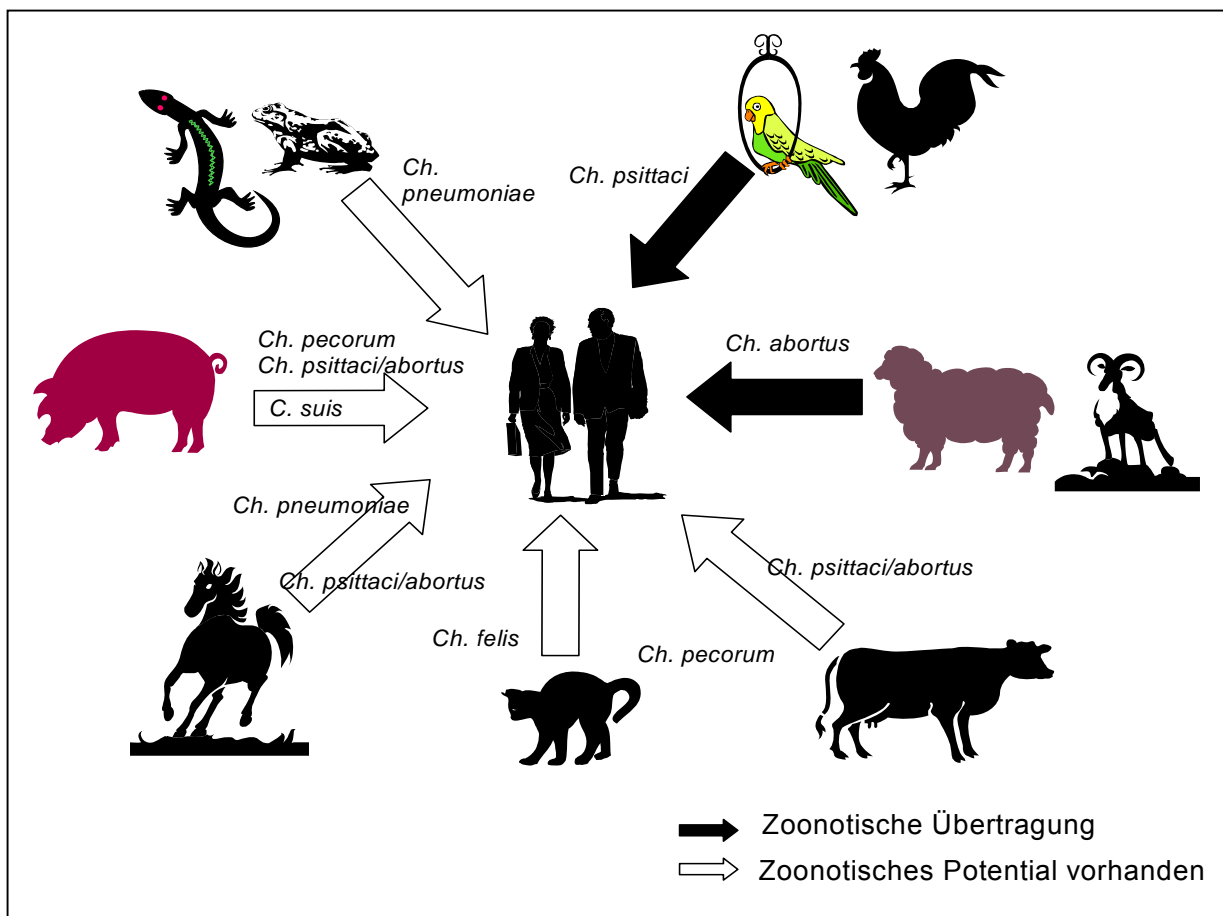


Abbildung 1. Zoonotisches Potential von Chlamydien (Longbottom & Coulter, 2003)

Die bekannteste durch Chlamydien verursachte Zoonose ist die Psittakose/ Ornithose, verursacht durch aviäre Stämme von *Ch. psittaci*. Die Übertragung vom Tier auf den Menschen führt zu einer grippeähnlichen fieberhaften Allgemeinerkrankung, die aufgrund der vorherrschenden Lungenaffektionen als atypische Pneumonie cha-

rakterisiert ist und in schwere, z.T. lebensbedrohende systemische Manifestationen übergehen kann. Der Übertragungsweg ist aerogen; eine Infektion von Mensch zu Mensch ist nicht bekannt. Zu den wichtigsten Risikogruppen gehören Tierärzte, Beschäftigte in Geflügelhaltungen und -schlächtereien wie auch Ziervogelhalter (Ander sen & Vanrompay, 2000).

In Verbindung mit den *Ch. abortus*-bedingten Aborten bei Schafen und Ziegen wurden schwere Allgemeininfektionen bei schwangeren Frauen beschrieben, die zu Fehlgeburten führten (Jorgensen, 1997; Pospischil et al., 2002). Auch *Ch. felis*, der Erreger von Keratokonjunktividen bei der Katze, ist auf den Menschen übertragbar und kann zur analogen Erkrankung führen. Schwerwiegende septische Verlaufsformen in immunsupprimierten Patienten konnten ebenfalls beobachtet werden (Regan et al., 1979; Hartley et al., 2001).

Auch die aktuelle Chlamydienforschung in der Human- und Veterinärmedizin zeigt, dass die mikrobiellen Eigenschaften, insbesondere die Grundlagen der Interaktion zwischen Erreger und Wirt, aufgrund der obligat intrazellulären Erregervermehrung, erst in Ansätzen aufgeklärt ist. In der Tiermedizin ist die medizinische Relevanz auch im Hinblick auf das zoonotische Potential der verschiedenen Chlamydienarten noch ungenügend untersucht. Neue Forschungsergebnisse lassen vermuten, dass die weit verbreiteten, klinisch inapparenten Chlamydieninfektionen bei Tieren ein mögliches Erregerreservoir für chronische Erkrankungen des Menschen sein könnten.

Aus diesen Beobachtungen lassen sich zwei zentrale Fragen ableiten:

- Welche pathogene Bedeutung haben persistente/klinisch inapparente Chlamydieninfektionen bei Mensch und Tier?
- Sind weit verbreitete klinisch inapparente Infektionen bei Tieren ein Erregerreservoir für chronische Krankheiten beim Menschen?

Zur Aufklärung dieser Fragen ist eine sensitive und spezifische Chlamydien-Diagnostik wichtigste Voraussetzung. Neben den heute weit verbreiteten molekularbiologischen Techniken sind serologische Verfahren aus den folgenden Gründen von zentraler Bedeutung:

Durch serologische Verfahren ist es möglich, Chlamydieninfektionen auch noch zu einem Zeitpunkt nachzuweisen, an dem der direkte Erregernachweis nicht mehr gelingt. Die Serologie ist besonders zum Auffinden von persistenten Chlamydieninfektionen geeignet. Ein weiterer Vorteil ist die Durchführbarkeit in Form von standardisierten Reihentests. Mittlerweile sind zahlreiche kommerzielle Testsysteme für die Chlamydienserologie erhältlich. Die Serologie ist für umfangreiche Prävalenzstudien nach wie vor die Methode der Wahl. Die Serologie zeigt stets die stattgefundene immunologische Auseinandersetzung des Wirtsorganismus mit dem Erreger, also die Infektion an. Dadurch kann mit der Serologie im Gegensatz zum direkten molekularbiologischen Nachweis, etwa der PCR, die Infektion, die möglicherweise pathogenetisch relevant ist, von der Kontamination oder den transienten Erregerpassagen unterschieden werden. Insbesondere die sekundäre Kontamination z.B. von Proben aus dem Urogenitaltrakt von Tieren mit Chlamydien intestinalen Ursprungs stellen ein grosses Risiko von falsch positiven Chlamydien-DNA-Amplifikationen dar.

Die Serologie hat jedoch verschiedene Nachteile. So ist mit den in der Veterinärmedizin zur Verfügung stehenden serologischen Testsystemen ein Rückschluss auf die infizierende Chlamydienart nicht oder nur sehr eingeschränkt möglich. Diese Tatsache ist etwa beim Schwein von Bedeutung, da hier mindestens drei verschiedene Chlamydienarten im Zusammenhang mit Erkrankungen vorkommen (Hoelzle et al., 2000; Everett, 2000; Busch et al., 2000). Mit den heute üblichen serologischen Tests (ELISA, IFT, KBR) kann man jedoch nicht differenzieren, welche Chlamydienart die Serokonversion hervorgerufen hat und ob ein Zusammenhang mit dem Krankheitsgeschehen besteht. Ausserdem kann man mit den genannten Tests nicht untersuchen, ob und welche der bei Tieren vorkommenden Chlamydienarten an Erkrankungen des Menschen beteiligt sind. Hierzu müssen zunächst Oberflächenantigene identifiziert sein, die für die einzelnen Chlamydienarten spezifisch sind, so dass im infizierten Patienten speziespezifische Antikörper gegen diese Chlamydien nachweisbar sind. Bislang stehen Testverfahren, in denen Antikörper gegen Chlamydien in einem differenzierenden Schritt Rückschlüsse auf die infizierende Chlamydienart zulassen, nicht zur Verfügung. In der Humanmedizin wird der Mikroimmunfluoreszenztest (MIF) unter Verwendung von gereinigten EK-Suspensionen zur Differenzierung der Serotypen von *C. trachomatis* angewendet. Das Verfahren ist jedoch unsicher und schwierig, insbesondere

hinsichtlich der Herstellung standardisierter Antigene sowie der Validität der Auswertung. Für die Tiermedizin steht ein speziesspezifischer ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen *Ch. abortus* zur Verfügung.

Es kann bislang jedoch nicht untersucht werden, welche zoonotische Bedeutung *C. suis* hat. *C. suis* ist mit der humanpathogenen Chlamydienart *C. trachomatis* sehr eng verwandt. Bislang ist es jedoch nicht möglich, Studien über die Seroprävalenz von *C. suis* beim Menschen durchzuführen, weil ein differenzierender serologischer Test nicht zur Verfügung steht.

Aus diesen Gründen wird seit einigen Jahren am IVB daran gearbeitet, differenzierende Testverfahren für den serologischen Nachweis von Chlamydieninfektionen bei Mensch und Tier zu verbessern mit dem Ziel, über den Antikörpernachweis auch die infizierende Chlamydienart zu identifizieren. Weitere Ziele sind die Unterscheidung klinisch relevanter und irrelevanter Chlamydieninfektionen, die Untersuchung der Epitopmuster, die während der Immunantwort angesprochen werden (u.a. auf Wirtsspezifität) sowie die Aufklärung der zoonotischen Bedeutung von animalen Chlamydien.

Im Zentrum der Entwicklung derartig komplexer Tests steht die Frage, welche Antigene die genannten Anforderungen erfüllen können. Die rekombinante Herstellung der Testantigene ist Voraussetzung für die Standardisierung und ggf. auch Kommerzialisierung derartig serodiagnostischer Verfahren. Besonders geeignet für die Etablierung speziesspezifischer serologischer Tests ist das 40 kDa Major Outer Membrane Protein (MOMP) der Chlamydien, da es in der Biologie des Erregers eine zentrale Rolle spielt (Wyllie et al., 1999). Es wird während des ganzen Entwicklungszyklus exprimiert, macht ca. 60% der äusseren Membran von EK und RK aus und ist pathogenetisch für das Anhaften der Chlamydien an die Wirtszelle verantwortlich (Caldwell et al., 1981; Su et al., 1988). Als immunogenes Oberflächenprotein trägt das MOMP genus-, speziess-, subspeziess- und serotypspezifische Epitope (Conlan et al., 1988; Salti-Montesanto et al., 1997). Das MOMP-codierende *ompA*-Gen ist für alle Chlamydienarten bekannt und enthält vier variable Segmente (VSI- VSIV), die für vier immunogene variable Domänen (VD) codieren (Zhang et al., 1987). Die VS sind von fünf konservierten Sequenzbereichen flankiert (Kaltenboeck et al., 1993; Stephens et al., 1987; Conlan et al., 1988; Su et al., 1988;

Herring et al., 1989; Baehr et al., 1988). Die Serotypisierung der Chlamydienarten (z.B. *C. trachomatis*) erfolgt seit Jahren auf der Basis von Antikörpern, die gegen das MOMP gerichtet sind (Stothard et al., 1998; Wang et al., 1985).

In einem ersten Abschnitt wurde am IVB das MOMP von drei veterinärmedizinisch wichtigen Chlamydienarten *Ch. abortus*, *Ch. pecorum* und *C. suis* rekombinant in *Escherichia (E.) coli* exprimiert und das Potential als serodiagnostische Antigene für die Unterscheidung von speziesspezifischen anti-Chlamydien-Antikörpern in Seren von Tieren untersucht (Hoelzle et al., 2003; 2004). Dabei wiesen Seren von Kaninchen und Schweinen, die mit EK von *Ch. abortus*, *Ch. pecorum* oder *C. suis* immunisiert wurden, im Western Blot und im ELISA eine speziesspezifische Seroreaktivität mit dem korrespondierenden homologen, rekombinanten MOMP (rMOMP) auf. Somit erwiesen sich rMOMP prinzipiell als geeignet für die speziesspezifische Chlamydien-Serologie in der Veterinärmedizin. Es zeigte sich aber auch, dass bei der Verwendung des kompletten rMOMP als Antigen marginale serologische Kreuzreaktionen auftraten, deren Natur noch eingehend untersucht werden muss.

Vor diesem Hintergrund sind die Ziele der vorliegenden Arbeit:

1. Herstellung von rMOMP von weiteren Chlamydienarten (*C. trachomatis*, *Ch. psittaci*, *Ch. pneumoniae*)
2. Prüfung der Eignung dieser rMOMP für die speziesspezifische Chlamydien-serologie
3. Serologische Untersuchung und Feinanalyse von Chlamydieninfektionen unter Verwendung von rMOMP-Subfragmenten.

4 Material und Methoden

4.1 Chlamydienstämme und Zellkultur

Die verwendeten Chlamydienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt. Für die Vermehrung der Chlamydienstämme wurde die Affennieren-Zelllinie BGM (Buffalo Green Monkey; European Collection of Cell Cultures Nr. 90092601) verwendet. Die Aufreinigung der Chlamydienpartikel erfolgte nach einer früher beschriebenen Methode mittels Dichtegradientenzentrifugation (Hoelzle et al., 2000).

Spezies	Bezeichnung	Herkunft	Referenz
<i>Ch. abortus</i>	OCLH196	Schaf, Abort	Hoelzle et al., 2000
<i>Ch. pecorum</i>	LW613	Kalb, Gelenk	Storz et al., 1966
<i>C. suis</i>	PCLH197	Schwein, Darm	Hoelzle et al., 2000
<i>Ch. psittaci</i> , Serovar B	V275	Taube, Leber	Sudler et al., 2004
<i>Ch. pneumoniae</i>	Cpn-VR1310	-	Dumrese et al., 2005
<i>C. trachomatis</i> Serovar L2	-	-	ATCC-Nr. VR-885

Tabelle 1. Verwendete Chlamydienstämme.

4.2 DNA Extraktion

Material:

Proteinase K (Roche, Rotkreuz, CH)

TEN-Puffer: 100 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 M NaCl, pH 7.4

Natriumdodecylsulfat (SDS), 10%

Phenol, TE-gesättigt (Roth, Reinach, CH)

IAC: 1 Teil Isoamylalkohol + 24 Teile Chloroform (Sigma, Buchs, CH)

Natriumacetat, 3 M, pH 4.8

TE-Puffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0

Ethanol, 96%, 70%

PBS pH 7.4 (Dulbeccos Phosphate Buffered Saline; Sigma)

Für die Extraktion der DNA wurden 400 µl aufgereinigte Chlamydien-Suspension mit 22,5 µl TEN-Puffer, 45 µl SDS und 10 µl Proteinase K gemischt und 2 h bei 56°C inkubiert. Die freigesetzte DNA wurde mit Phenol und IAC nach Standardmethode aufgereinigt (Sambrook und Russel, 2001). Durch Zugabe von 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung und dem doppelten Volumen absoluten Ethanol wurde die DNA aus dem wässrigen Überstand gefällt (30 min, -80°C). Die Probe wurde anschliessend 30 min bei 4°C mit 15000xg (Biofuge stratos, Heraeus) zentrifugiert, mit 200 µl eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

4.3 Klonierung von *ompA*-Genen und *ompA*-Gen-Subfragmenten

4.3.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Amplifizierung des *ompA*-Gens und der *ompA*-Genfragmente wurden die in Tabelle 2 zusammengestellten Primer verwendet. Die Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Aufteilung des *ompA*-Gens in sechs Subfragmente erfolgte so, dass die Subfragmente die vier variablen *ompA*-Segmente in unterschiedlicher Kombination und Anzahl enthalten. Für die spätere Klonierung in den Plasmidvektor wurden bei den Primern am 5`-Ende die Restriktionsenzymststellen *Bgl*II (AGA TCT) bzw. *Sfu*I (TTC GAA) angefügt.

Amplifikationsansatz:

12.5 µl HotStarTaq Mastermix (2x, Qiagen, Hombrechtikon, CH)

0.2 µl forward Primer (100 pmol/µl, Endkonzentration 0.8 µM)

0.2 µl reverse Primer (100 pmol/µl, Endkonzentration 0.8 µM)

11.1 µl A. bidest.

1.0 µl Template-DNA

Die PCR wurde in einem Thermocycler Modell 2400 (Applied Biosystems, Rotkreuz, CH) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: initiale Denaturierung (15 min, 95°C) gefolgt von 30 Zyklen (Denaturierung, 30 sec, 95°C; Annealing, 30 sec, 52°C; Extension, 30 sec, 72°C). Die Amplifikationsreaktion wurde mit einer terminalen Extension (10 min, 72°C) abgeschlossen.

Chlamydien- art	Genfragment	Gen/Primer
Alle Spezies	<i>ompA</i>	5'-CGC <u>AGA TCT</u> (CT) TGC CTG T(AG)GG GAA(CT) CC(AT)- 3' 5'-GCG <u>TTC GAA</u> GAA (AGT) C(GT)GA A(CT)TG (AT)GCA- 3'
<i>Ch. abortus</i>	<i>ompA sf1ab</i>	5'-CGC <u>AGA TCT</u> (CT) TGC CTG T(AG)GG GAA(CT) CC(AT)- 3' 5'-GCG <u>TTC GAA</u> CAT GTT CAA TCG ATA AGA GAG CG- 3'
	<i>ompA sf2ab</i>	5'-CGC <u>AGA TCT</u> (CT) TGC CTG T(AG)GG GAA(CT) CC(AT)- 3' 5'-GCG <u>TTC GAA</u> GAA CTC TGC TCC TAA AGT CGC- 3'
	<i>ompA sf3ab</i>	5'-CGC <u>AGA TCT</u> (CT) TGC CTG T(AG)GG GAA(CT) CC(AT)- 3' 5'-GCG <u>TTC GAA</u> ATC CCA GAT ATT CAA TGC GAG- 3'
	<i>ompA sf4ab</i>	5'-GCG <u>TTC GAA</u> GAA (AGT) C(GT)GA A(CT)TG (AT)GCA- 3' 5'-GCG <u>AGA TCT</u> AAT GCA TCT TTC CTC GCA- 3'
	<i>ompA sf5ab</i>	5'- GCG <u>TTC GAA</u> GAA (AGT) C(GT)GA A(CT)TG (AT)GCA- 3' 5'-GCG <u>AGA TCT</u> TGG AGT GTA GGT GCA CGC- 3'
	<i>ompA sf6ab</i>	5'-GCG <u>TTC GAA</u> GAA (AGT) C(GT)GA A(CT)TG (AT)GCA- 3' 5'-GCG <u>AGA TCT</u> TGG CAA GTT GGT TTA GCG- 3'
<i>Ch. pecorum</i>	<i>ompA sf1pe</i>	5'-CGC <u>AGA TCT</u> (CT) TGC CTG T(AG)GG GAA(CT) CC(AT)- 3' 5'-GCG <u>TTC GAA</u> CAT ATT CAG TCT ATA TGA CAA TG- 3'
	<i>ompA sf2pe</i>	5'-CGC <u>AGA TCT</u> (CT) TGC CTG T(AG)GG GAA(CT) CC(AT)- 3' 5'-GCG <u>TTC GAA</u> GAA TTC AGC TCC TAA AGT TGC- 3'
	<i>ompA sf3pe</i>	5'-CGC <u>AGA TCT</u> (CT) TGC CTG T(AG)GG GAA(CT) CC(AT)- 3' 5'-GCG <u>TTC GAA</u> ATC CCA GAT ATT TAA CGC AAT- 3'
	<i>ompA sf4pe</i>	5'-GCG <u>TTC GAA</u> GAA (AGT) C(GT)GA A(CT)TG (AT)GCA- 3' 5'-GCG <u>AGA TCT</u> AAT GCA GGT TAC ATT GCG- 3'
	<i>ompA sf5pe</i>	5'-GCG <u>TTC GAA</u> GAA (AGT) C(GT)GA A(CT)TG (AT)GCA- 3' 5'-GCG <u>AGA TCT</u> TGG AGC GTT GGA GCT CGC- 3'
	<i>ompA sf6pe</i>	5'-GCG <u>TTC GAA</u> GAA (AGT) C(GT)GA A(CT)TG (AT)GCA- 3' 5'-GCG <u>AGA TCT</u> TGG CAA GTC GGT GCA GCA- 3'

sf: Subfragment; *ab*: *Ch. abortus*; *pe*: *Ch. pecorum*; *Bgl*II (AGATCT) und *Sfu*I (TTCGAA)
Restriktionsenzym-schnittstellen unterstrichen

Tabelle 2. Primersequenzen.

Die PCR-Amplifikate wurden mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Sfu*I (Roche) verdaut und danach mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gemäss Herstellerangaben aufgereinigt. Zur Quantifizierung des Amplifikats wurden 5 µl des aufgereinigten Ansatzes in einem 1 %-igen Agarose-Gel (Brunschwig, Basel, CH) mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid-Zusatz (Merck) elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht kontrolliert.

4.3.2 Vorbehandlung des Expressionsplasmids

Material:

Restriktionsendonukleasen *SfuI*, *BglII* (Roche)
Vektor-DNA: pBad*MycHisC* (Invitrogen, Basel, CH)
CIP (Calf Intestinal Phosphatase; Roche)
CIP-Puffer, 10x (Roche)
0.1 M EDTA-Lösung, pH 8.0
TE-Puffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.4

Vektor DNA (1 µg) wurde mit je 10 Einheiten Restriktionsenzym *BglII* und *SfuI* geschnitten. Anschliessend wurde dem Verdau-Ansatz 27 µl CIP-Puffer zugegeben und das Volumen mit A. bidest. auf 270 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 µl CIP wurde der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 µl CIP wurde der Ansatz für eine weitere halbe Stunde auf 56°C gehalten. Durch Zugabe von 30 µl 0,1 M EDTA-Lösung und zehnminütiges Erhitzen auf 65°C wurde die Enzymreaktion gestoppt. Die auf diese Weise behandelte Vektor-DNA wurde durch Phenol- und IAC-Extraktion gereinigt, gefällt und in 20 µl TE-Puffer mit einer Endkonzentration von 50 ng/µl resuspendiert.

4.3.3 Ligation der PCR-Amplifikate in den Expressionsvektor

Material:

T4-DNA-Ligase (Roche)
Ligationspuffer (10x) (Roche)
Insert-DNA (PCR-Amplifikate, *BglII*- und *SfuI*-geschnitten; 100 ng/µl)
pBad*MycHis*-Expressionsvektor *BglII*- und *SfuI*-geschnitten; 50 ng/µl

Die Ligation der PCR-Amplifikate in den Expressionsvektor pBad*MycHisC* erfolgte im molaren Verhältnis 7:1 (Insert:Vektor). Nach Zugabe von 1 µl T4-DNA-Ligase und 1 µl Ligationspuffer wurde das Ansatzvolumen mit A. bidest. auf 10 µl aufgefüllt und der Ligationsansatz 12-24 h bei 14°C im Wasserbad inkubiert.

4.3.4 Transformation von *Escherichia (E.) coli* mit rekombinanten Plasmiden

Material:

E. coli K12 TOP10, chemisch kompetent (Invitrogen)

E. coli, K12 LMG194, chemisch kompetent (Invitrogen)

SOC-Medium (Invitrogen)

LB-Agarplatten: 37.0 g/l LB-Agar-Medium (Merck), 100 mg/l Ampicillin (Fluka)

2 µl des Ligationsansatzes wurden zu 50 µl chemisch kompetenten *E. coli* gegeben und 30 min auf Eis inkubiert und dann für 30 s bei 42°C einem Hitzeschock unterzogen. Der Reaktionsansatz wurde mit 250 µl SOC-Medium aufgefüllt und 1 h bei 37°C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet.

4.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Material:

LB-Medium: 25 g/l LB-Bouillon (Merck), 100 mg/l Ampicillin (Fluka)

Puffer 1: 50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0

Puffer 2: 200 mM NaOH, 1 % SDS

Puffer 3: 3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure

Ethanol, 96%, 70 %

Aqua dest. mit RNase (100 µg/ml)

Einzelkolonien wurden in 5 ml LB-Medium verimpft und über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. 1.5 ml jeder Kultur wurden bei Raumtemperatur 5 min mit 2420xg (Biofuge pico, Heraeus) zentrifugiert und der Überstand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Pellet wurde in 300 µl Puffer 1 resuspendiert. Nach der Zugabe von 300 µl Puffer 2 wurde die Suspension durch mehrmaliges Schwenken gemischt, dann 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und 300 µl Puffer 3 dazugegeben. Die Suspension wurde durch mehrmaliges Schwenken gemischt, 15 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 4°C mit 15.100xg (Biofuge stratos, Heraeus) zentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde mit 800 µl absolutem Ethanol (Raumtemperatur) gefällt und 30 min bei 4°C mit 15.100xg zentrifugiert. Danach wurde das Pellet mit 70% eiskaltem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschliessend getrocknet und in 20 µl Aqua dest. mit RNase resuspendiert.

Zur Überprüfung der Klonierung wurde die Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen *Bgl*II und *Sfi*I geschnitten und mittels Elektrophorese in einem 1 %-igen Agarose-Gel aufgetrennt. Für die Expression des MOMP und seiner Subfragmente in *E. coli* wurden die rekombinanten Plasmid-Konstrukte in den für das Expressionssystem pBADMycHis optimierten *E. coli*-Stamm LMG194 umtransformiert.

4.4 Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Material:

M9 Salzlösung: 85.2 mM NaCl, 422.0 mM Na₂HPO₄, 220.0 mM KH₂PO₄, 187.0 mM NH₄Cl, pH 7.4

RM-Medium: 20.0 g Casaminosäuren (Becton Dickinson), 10.0 ml Glycerol 99%, ad 880 ml mit A. bidest. autoklavieren, Zugabe von 1.0 ml 1 M MgSO₄, 10.0 ml 20% Glucose, 100.0 ml M9 Salzlösung, 1.0 ml Ampicillin (100 mg/ml)

Arabinose, 20 %

Urea-Puffer: 8.0 M Urea, 20.0 mM Tris, pH 8.0, 10.0 mM Imidazol

Elutionspuffer: 8.0 M Urea, 20.0 mM Tris, pH 8.0, 400.0 mM Imidazol

Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, Otelfingen, CH)

Nickelsulfat-Lösung, NiSO₄, 0.2 M

Bradford Protein Quantifizierungskit (BioRad)

Mit 2 ml einer frischen Übernachtskultur wurden 200 ml RM-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0.6 inkubiert. Durch Zugabe von Arabinose bis zu einer Endkonzentration von 0.02 bis 0.2% wurde die Proteinexpression induziert und die Kulturen weitere 4-6 h geschüttelt. Anschliessend wurden die Bakterien 10 min mit 6500xg bei 4°C zentrifugiert (Heraeus Suprafuge 22, Rotor: HFA 12.500).

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte durch Metall-Affinitätschromatographie unter Verwendung von Chelating Sepharose Fast Flow, die mit Ni²⁺-Ionen gekoppelt wurde. Ni²⁺-Ionen binden mit hoher Affinität an die dem rekombinanten Protein angefügten sechs Histidin-Reste (6xHis). Die Elution erfolgt mit Imidazol, da Imidazol aufgrund seiner homologen Struktur 6xHis kompetitiv aus der Bindung verdrängt. Chelating Sepharose (1 ml) wurde nach den Weisungen des Herstellers unter Verwendung von NiSO₄-Lösung mit Ni²⁺ gekoppelt.

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte unter strikt denaturierenden Bedingungen. Dazu wurde das Bakterienpellet mit 20 ml Urea-Puffer resuspendiert, anschliessend auf Eis beschallt (Ultrasonic Processor; Vibra cell, Merck). Die Suspension wurde dann zentrifugiert (30 min, 4°C, 26.000xg; Heraeus Suprafuge 22, Rotor: HFA 21.94). Der Überstand wurde mit der Ni²⁺-gekoppelten Sepharose vermischt und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert, um die 6xHis-Proteine an die Ni²⁺-Sepharose zu binden. Nach dem Binden der Proteine wurden die Proben bei Raumtemperatur 3 min mit 500xg zentrifugiert, die Sepharose drei Mal mit 20 ml Urea-Puffer gewaschen und die Proteine in 3x1 ml Fraktionen mit Elutionspuffer eluiert. Als Kontrolle wurden rekombinante *E. coli* LMG194-pBadMyHis (ohne Insert) in gleicher Weise mitgeführt. Die Konzentration der rekombinanten Proteine wurde mit einem Bradford Protein-Quantifizierungskit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proteine bei -80°C gelagert.

4.5 Reinigung von rekombinanten Proteinen mittels anti-*E. coli*-Antikörper gekoppelter Sepharose

Material:

Sepharose 4B CNBr-aktiviert (Amersham Bioscience)

1 mM HCl, pH 2.5

Kopplungspuffer: 100 mM NaHCO₃, 500 mM NaCl, pH 8.3

Waschpuffer 1: 100 mM Tris, pH 8.0, 500 mM NaCl

Waschpuffer 2: 100 mM Natriumacetat (Sigma), 500 mM NaCl, pH 4.0

Glycin-Puffer: 200 mM Glycin (Roth), pH 8.0

PBS, pH 7.4

Polypropylen Säule (1 ml; Qiagen)

Spectra/Por® Dialysemembran (MW 12.000, Roth)

Elutionspuffer: 500 mM Ammoniumhydroxid, 1 M Kaliumthiocyanat, pH 9.0

Zur Entfernung von *E. coli*-Bestandteilen aus den Protein-Präparationen wurde ein zusätzlicher affinitätschromatographischer Aufreinigungsschritt durchgeführt. Sepharose (0.3 g) wurde in 50 ml 1 mM HCl aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der HCl-Puffer wurde abgesaugt und die Sepharose in 20 ml Kopplungspuffer gewaschen. Protein A-gereinigtes anti-pBADMyHis-Kaninchen

IgG (2-3 mg) wurde in 2 ml Kopplungspuffer aufgenommen und 2 h bei 37°C unter vorsichtigem Mischen mit der gewaschenen Sepharose inkubiert. Anschliessend wurde der Kopplungspuffer abgesaugt und die freien aktiven Gruppen der Sepharose durch Glycinpuffer (10 ml) blockiert (2 h, 37°C). Dann wurde die Sepharose sechs Mal abwechselnd mit Waschpuffer 1 und Waschpuffer 2 gewaschen und in PBS äquilibriert. Nach Packen der Säule in einen Polypropylen-Mantel wurde mit 20 ml PBS gewaschen und rekombinantes, gegen PBS dialysiertes Protein aufgetragen. Der Durchfluss wurde aufgefangen und das Protein in der SDS-PAGE auf Reinheit überprüft. Zur Regeneration der IgG-Säule wurde gebundenes Protein mit 5 ml Elutionspuffer entfernt und die Säule mit 20 ml PBS gewaschen.

4.6 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Material:

Mini-Protean 3 Elektrophorese-System

Acrylamid-/Bisacrylamid-Lösung 30 %, 37,5:1 (Roth)

Trenngel-Puffer: 1,88 M Tris, pH 8.8

Sammelgel-Puffer: 0.50 M Tris, pH 6.8

Probenpuffer (5x): 18.4 ml A. bidest., 4.0 ml Sammelgel-Puffer, 3.2 ml Glycerol, 3.2 ml SDS 10%, 1.6 ml Bromphenolblau, 1% 500 µl β-Mercaptoethanol

Laufpuffer: 0.03 M Tris, 0.23 M Glycin, 0.08% SDS

Prestained Protein Marker (BioLabs, Allschwil, CH)

TEMED (BioRad)

Ammoniumpersulfat 10%

Trenngel: 1.7 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung, 1.0 ml Trenngel-Puffer, 1.0 ml SDS 0,5%, 1.3 ml A. bidest., 10 µl TEMED, 40 µl Ammoniumpersulfat

Sammelgel: 0.33 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung, 0.40 ml Sammelgel-Puffer, 0.40 ml SDS 0,5%, 0.87 ml A. bidest., 10 µl TEMED, 10 µl Ammoniumpersulfat

Die Trenngel-Lösung wurde gemischt, mit einer Glaspipette bis zu einer Höhe von 5 cm zwischen zwei Glasplatten gefüllt und mit 96% Ethanol überschichtet. Die Polymerisation des Gels war nach 1 h abgeschlossen.

Das Ethanol wurde vom Trenngel abgegossen, das Sammelgel eingefüllt und der Kamm zur Bildung der Probenaschen eingesetzt. Die Polymerisationszeit des Sammelgels betrug 30 min. Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer (5x) vermischt und 10 min gekocht. Für die Elektrophorese wurde das Lämmli-

Puffersystem (Lämmli, 1970) verwendet. Pro Geltasche wurden 1 µg Protein bzw. Kontrollpräparation aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 V für ca. 35 min. In jedem Lauf wurde der Molekulargewichtsstandard mitgeführt.

4.7 Dot Blot- und Western Blot-Assay

Material:

Transferkammer: Mini Trans-Blot Cell-System (Biorad)

Protran Nitrocellulose-Transfermembran, Porengrösse 0,45 µm Schleicher & Schuell, Riehen, CH)

Gel-Blotting-Filterpapier

Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol

TBS: 10 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 8.5

TBS-Tween: TBS mit 0,05% Tween 20 (Merck)

Blockingpuffer: TBS + 2% Magermilchpulver (Fluka)

POD-konjugiertes anti-Kaninchen, anti-Schwein, anti-Schaf (Sigma)

Entwickler-Lösung A: 60 mg 4-Chloro-1-naphthol (Sigma), 20 ml Methanol, eiskalt

Entwickler-Lösung B: 100 ml TBS, eiskalt, 60 µl H₂O₂ (30%; Merck)

Für die Dot Blot-Assays wurde je 1 µl der Antigen-Präparationen auf die Nitrocellulosemembran aufgetropft und luftgetrocknet.

Für die Western Blot Analysen wurden die in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine im Semidry-Verfahren auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde das Gel zunächst kurz im Transferpuffer äquilibriert und mit Whatman-filterpapier und Nitrozellulosemembran (angefeuchtet mit Transferpuffer) in das Semidry-Blottinggerät (TransBlot, BioRad) entsprechend den Angaben des Herstellers eingelegt. Der Transfer erfolgte bei 10 Volt, 30 min.

Zur Durchführung der immunologischen Detektion wurden die Membranen 1 h in Blockingpuffer bei Raumtemperatur abgesättigt und anschliessend zweimal 10 min in TBS gewaschen. Die Membranen wurden für mindestens 2 h in Serumverdünnungen (Schweineseren: 1:100, Kaninchenseren 1:200, Schafseren 1:100 in Blockingpuffer) auf dem Schüttler (Platform Shaker STR6, Stuart Scientific) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in TBS (10 min bei Raumtemperatur) wurden die Membranen in verdünnten POD-konjugierten Sekundärantikörpern (1:2000 in Blockingpuffer) 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschliessend wurden die Membranen je zweimal für 10 min bei Raumtemperatur in TBS-Tween und TBS

gewaschen. Die immunologische Färbung erfolgte in dem Gemisch aus den Entwickler-Lösungen A und B für 20-30 min. Danach wurden die Membranen mehrmals in A. bidest. gewaschen und zwischen zwei Filterpapieren getrocknet. Die Auswertung der Grösse der detektierten Bande erfolgte mit Hilfe des BioProfil-Bildanalyse-Systems (Fröbel, Wasserburg, D).

4.8 ELISA

Material:

96-Loch-Mikrotiterplatten (Microlon, Greiner, Nürtingen, D)

Coating-Puffer: 15.0 mM Na₂CO₃, 34.8 mM NaHCO₃, 3.0 mM NaN₃, pH 9.6

Blockingpuffer: PBS pH 7.4 (Sigma), 1% Proteose-Pepton (Brunschwig, Basel, CH)

Verdünnungspuffer: PBS pH 7.4 (Sigma), 0.5% Proteose-Pepton, 0.05% Tween 20

Waschpuffer: PBS pH 7.4, 0.05% Tween 20

Horseradish-Peroxidase-konjugiertes Konjugat (Sigma)

Substrat: 0.73 mM ABTS (2,2-Azino-di [3-ethyl-Benzthiazolinsulfat]; Roche), 100 mM Zitrat-Phosphat-Puffer, pH 4.2, 2 mM H₂O₂

Rekombinante Proteine wurden in Coating-Puffer auf eine Konzentration von 10 µg/ml eingestellt. Mikrotiterplatten wurden mit 100 µl Antigen pro Vertiefung beschickt, 1 h bei Raumtemperatur (RT) auf einem Plattenschüttler geschüttelt und anschliessend über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Platten mit einem automatischen Waschgerät (Tecan, Männedorf, CH) gewaschen. Alle weiteren Inkubationsschritte wurden bei RT 1 h auf einem Plattenschüttler durchgeführt, und zwischen den Inkubationsschritten wurden die Platten gewaschen. Zur Verhinderung von unspezifischen Reaktionen wurde mit 200 µl Blockingpuffer inkubiert. Die Testseren und monoklonalen Antikörper (mAk) wurden in Verdünnungen von 1:500 (Kaninchen), 1:100 (Schwein und Schaf) und 1:20 (mAk; 100 µl/Vertiefung) verwendet. Von den in Vorversuchen ermittelten Gebrauchsverdünnungen der Konjugate wurden 100 µl/Vertiefung eingesetzt. Nach 1 h Inkubation wurden nach dem Waschen 100 µl Substrat zugegeben und 30 min inkubiert. Ein computergesteuerter Mikroplattenleser (Tecan) lieferte die OD-Werte bei 405 nm.

5 Ergebnisse

5.1 Expression von rekombinantem MOMP in *Escherichia coli*

Für die Klonierung und Expression der *ompA*-Gene wurde das Expressionssystem pBadMycHis verwendet. Dieses Arabinose-induzierbare System lässt keine basale Expression zu. Dem Exprimat werden am C-terminalen Ende sechs Histidin-Reste angefügt, die eine einfache affinitätschromatographische Aufreinigung der rekombinanten Exprimat nach Standardprotokoll ermöglichen.

Mit dieser Technik wurden die *ompA*-Gene von drei tier- bzw. humanmedizinisch wichtigen Chlamydienarten (*Ch. psittaci*, *Ch. pneumoniae*, *C. trachomatis*) kloniert, exprimiert und die rMOMP affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Expression konnte im Western Blot durch immunologische Detektion mit einem anti-rMOMP-Kaninchenimmenserum nachgewiesen werden (Abbildung 2).

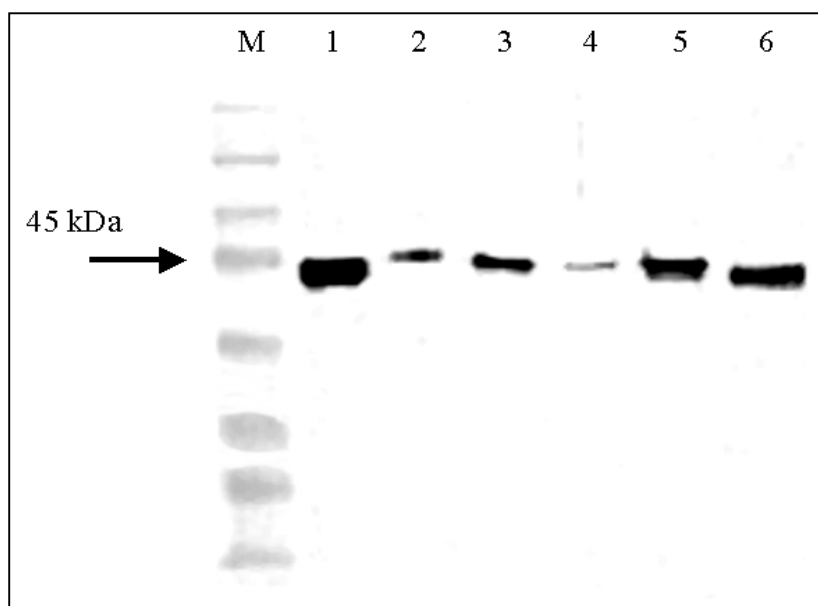


Abbildung 2. Nachweis der Expression von rMOMP im Western Blot.

M: Molekulargewichtsstandard

1: rMOMP *Ch. abortus* OCLH196

2: rMOMP *C. suis* PCLH197

3: rMOMP *Ch. pecorum* LW613

4: rMOMP *Ch. psittaci*

5: rMOMP *C. trachomatis*

6: rMOMP *Ch. pneumoniae*

5.2 Dot Blot-Analysen mit rMOMP als Antigen

In Dot-Blot-Analysen wurde geprüft, ob die rekombinant hergestellten und partiell gereinigten MOMP als Antigene zum spezifischen Nachweis von Antikörpern gegen die homologe Chlamydienart geeignet sind. Zur Herstellung der Immunsereen wurden Kaninchen mit den EK-Suspensionen der verschiedenen Chlamydienspezies immunisiert (Hoelzle et al., 2004). In Dot Blot-Analysen zeigte sich eine deutliche speziesspezifische Reaktivität. Marginale Kreuzreaktionen konnten zwischen den nahe verwandten Spezies *C. trachomatis* und *C. suis* sowie zwischen *Ch. abortus* und *Ch. pecorum* beobachtet werden (Abbildung 3).

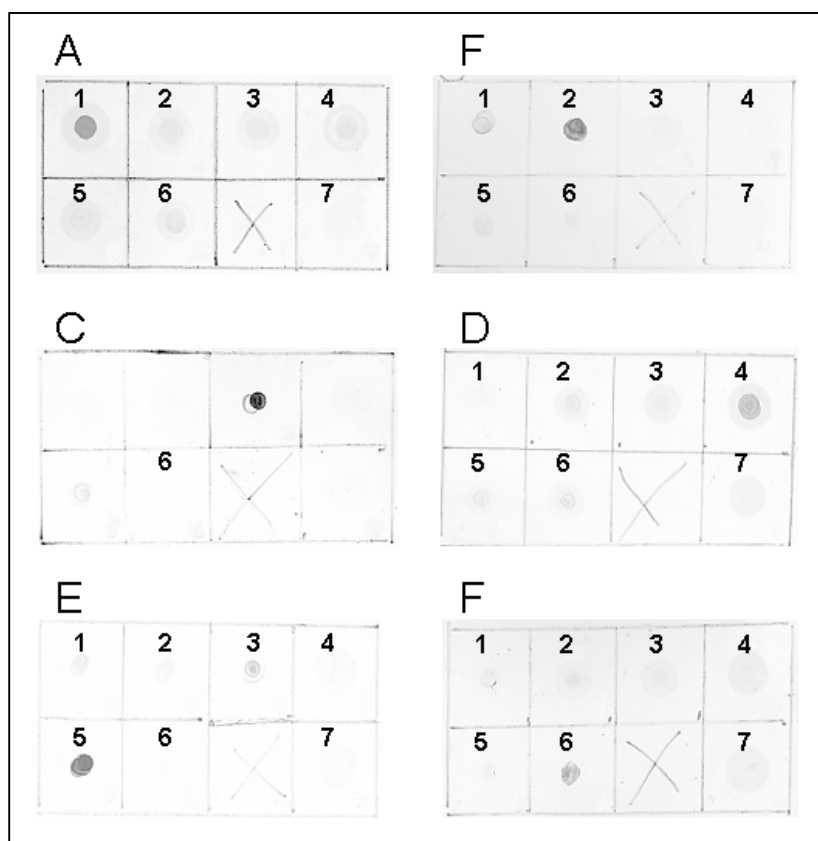


Abbildung 3. Reaktivität der rMOMP im Dot Blot.

Die rMOMP von sechs Chlamydienarten wurden als Antigen eingesetzt: 1, *Ch. abortus*; 2, *Ch. pecorum*; 3, *C. suis*; 4, *Ch. psittaci*; 5, *C. trachomatis*; 6, *Ch. pneumoniae*; 7, *E. coli*-Kontrolle.

Als Antiseren wurden Immunsereen gegen sechs Chlamydienarten eingesetzt: A, anti-*Ch. abortus*-Serum; B, anti-*Ch. pecorum*-Serum; C, anti-*C. suis*-Serum; D, anti-*Ch. psittaci*-Serum; E, anti-*C. trachomatis*-Serum; F, anti-*Ch. pneumoniae*-Serum.

5.3 Expression von rMOMP-Subfragmenten

Für das *antibody profiling* zur Untersuchung von Reaktionsmustern der Immunseren gegen Partialantigene des Chlamydien-MOMP wurde das *ompA*-Gen in sechs Subfragmente unterteilt. Die exprimierten Subfragmente enthalten eine unterschiedliche Anzahl und Kombination der vier variablen Domänen. (Abbildung 4, Tabelle 3). Die Genfragmente wurden mittels PCR amplifiziert, durch Sequenzierung verifiziert und im pBadMycHis-System exprimiert. Die rMOMP-Subfragmente von *Ch. abortus* OCLH196 und *Ch. pecorum* LW613 wurden auf diese Weise rekombinant in *E. coli* hergestellt. Abbildung 5 zeigt exemplarisch die Expression der Subfragmente von *Ch. abortus* OCLH196.

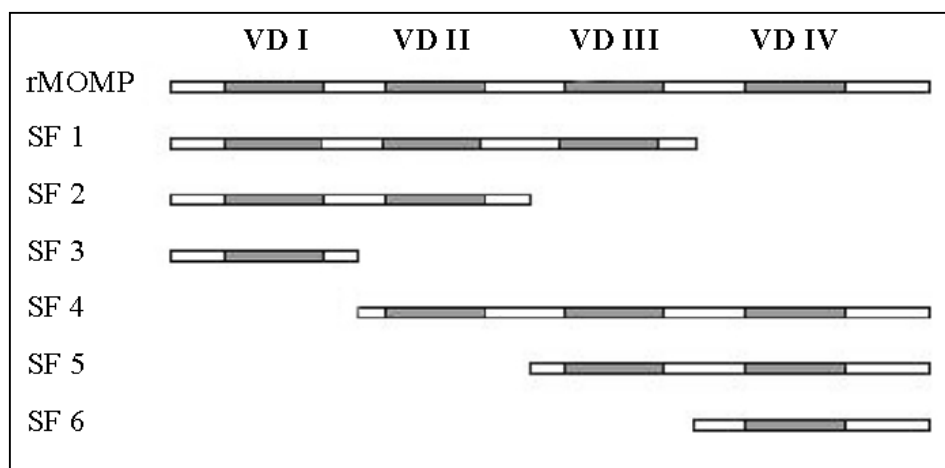


Abbildung 4. Schematische Darstellung der rMOMP-Subfragmente.

Rekombinantes Protein	Grösse (kDa)	Variable Domänen
MOMP	40.0	I, II, III, IV
SF1	34.5	I, II, III
SF2	25.5	I, II
SF3	16.5	I
SF4	33.5	II, III, IV
SF5	24.5	III, IV
SF6	15.0	IV

Tabelle 3. Eigenschaften der MOMP-Subfragmente.

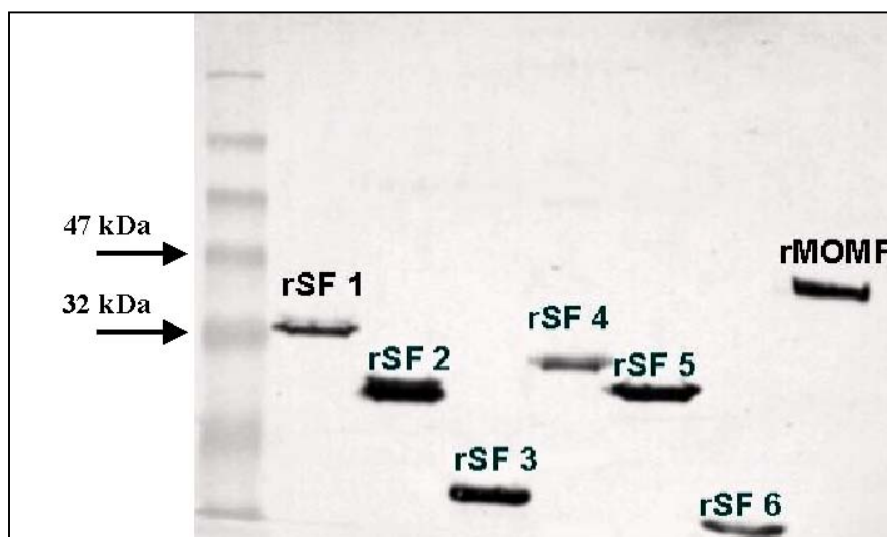


Abbildung 5. Western Blot zum Nachweis der Expression der rMOMP-Subfragmente von *Ch. abortus* OCLH196.

5.4 *Antibody profiling* mit monoklonalen Antikörpern

Die Eignung der rekombinanten Subfragmente des MOMP für eine serologische Feinanalyse der antigenen Eigenschaften des rMOMP wurde mit Hilfe von fünf monoklonalen Antikörpern (mAk) untersucht. Die fünf mAk zeigen eine streng speziesspezifische Reaktivität mit *Ch. abortus* MOMP.

Die Reaktionsmuster der mAk mit den sechs rMOMP Subfragmenten von *Ch. abortus* OCLH196 wurden im ELISA bestimmt (Abbildung 6). Die mAk 7F12, 8H2, 3F12 und 2A10 zeigten ELISA-Reaktivitäten mit dem rMOMP und SF1, SF4 und SF5 von *Ch. abortus* OCLH196. Zur Auswertung wurden die in den reaktiven Subfragmenten enthaltenen VD untereinander geschrieben. Die VD, die den reaktiven Subfragmenten gemeinsam war, repräsentiert den Epitopbereich des mAk. Die Detailanalyse ergab, dass die variable Domäne VDIII in allen reaktiven Fragmenten enthalten ist und daher die Epitope der mAk 7F12, 8H2, 3F12 und 2A10 im Bereich des VDIII lokalisiert sind. Der mAk 10C3 reagierte mit dem rMOMP sowie SF5 und SF6. Die Analyse dieses Reaktionsmusters ergab die Lokalisation des 10C3-Epitops in der VDIV.

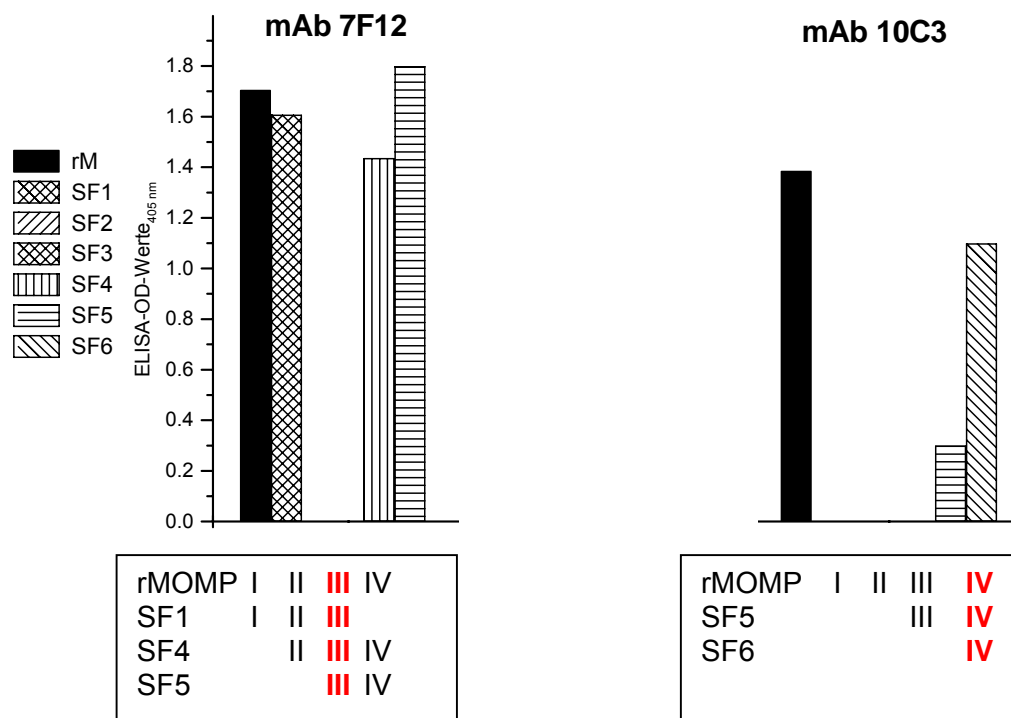


Abbildung 6. Reaktivitäten der monoklonalen Antikörper 7F12 und 10C3 im Subfragment-ELISA (*Ch. abortus* OCLH196).

5.5 Antibody profiling mit polyklonalen Immunsereen

Für die Untersuchung der Epitopverteilung und der Lokalisation von spezies- und genusspezifischen Epitopen auf dem rMOMP standen Immunsereen von Schweinen und Kaninchen zur Verfügung (Tabelle 4). Für die Immunisierungen wurden unterschiedliche Antigenpräparationen verwendet: (1) *Ch. abortus*-Suspensionen, vermehrt in BGM-Zellkulturen und (2) *Ch. abortus*-Suspensionen, vermehrt in embryonierten Hühnereiern. Beide Suspensionen wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation partiell gereinigt. Als Adjuvans wurde für die initiale Immunisierung das komplette, für die nachfolgenden Immunisierungen das inkomplette Freund'sche Adjuvans verwendet.

Die Reaktionsmuster der Seren mit den rekombinanten MOMP-Subfragmenten von *Ch. abortus* und *Ch. pecorum* wurden im ELISA analysiert. Das Kaninchenserum

reagierte bei den homologen *Ch. abortus* Subfragmenten am stärksten mit SF1 und SF2 (Abbildung 7A). Diesen beiden Subfragmenten sind die variablen Domänen VDI und VDII gemeinsam, die beim Kaninchen immunologisch bevorzugt beantwortet werden.

Die Schweineseren reagierten, unabhängig von dem verwendeten Immunisierungsantigen, am stärksten mit den homologen Subfragmenten SF5 und SF6 (Abbildung 7A). Dies entspricht einer Hauptreaktivität mit den variablen Domänen VDIII und VDIV.

Um genusspezifische Epitopbereiche zu kartieren, wurden die Reaktionsmuster der anti-*Ch. abortus*-Immunsereen mit den heterologen *Ch. pecorum*-Subfragmenten bestimmt (Abbildung 7B). Dabei ergaben sich, unabhängig von der Tierart und vom Immunisierungsantigen ähnliche Reaktionsmuster. Alle Seren reagierten am stärksten mit den Subfragmenten SF4, SF5 und SF6, denen die variable Domäne VDIV gemeinsam ist.

Serum	Tierart	Herkunft des Antigens	Referenz
anti- <i>Ch. abortus</i> -Kaninchen Immunsereum	Kaninchen	BGM-Zellkultur	Hoelzle et al., 2004
anti- <i>Ch. abortus</i> -Schwein Immunsereum	Schwein	BGM-Zellkultur	Knitz et al., 2003
anti- <i>Ch. abortus</i> -Schwein Immunsereum	Schwein	Embryoniertes Hühnerei	Hoelzle et al., 2004

Tabelle 4. Übersicht der verwendeten Immunsereen.

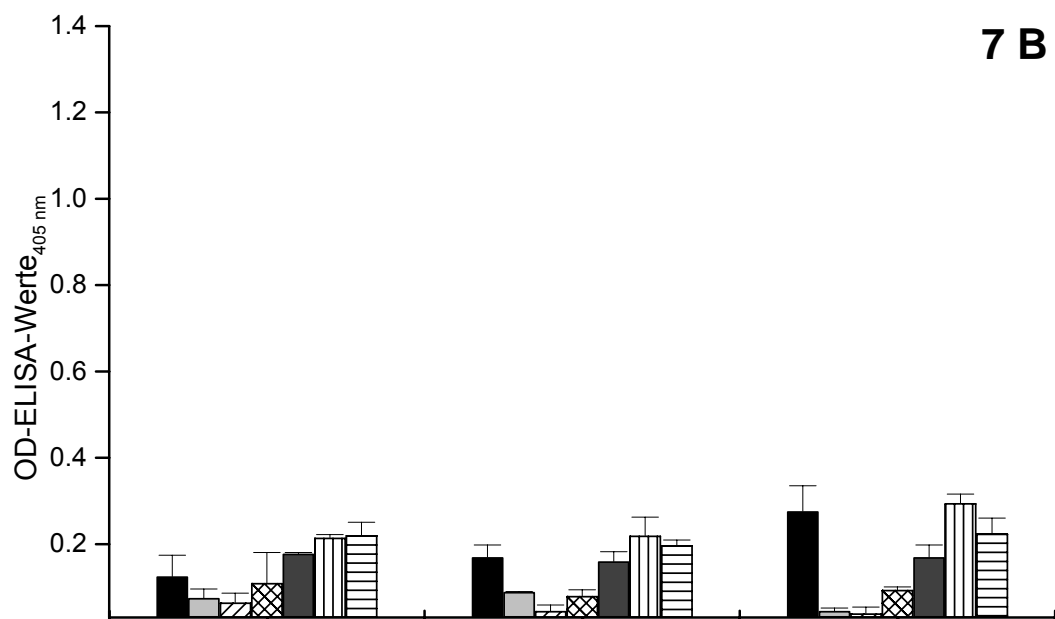
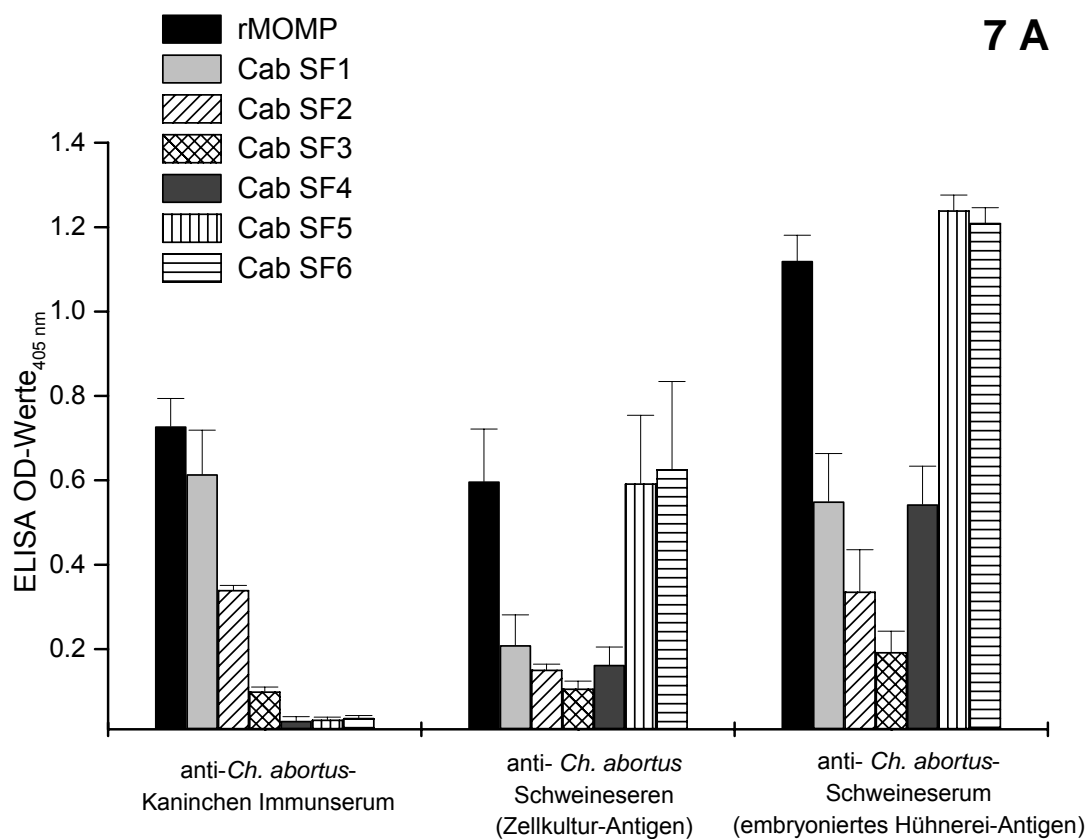


Abbildung 7. Seroreaktivität von polyklonalen Immunsereen mit dem rMOMP bzw. mit rMOMP-Subfragmenten von *Ch. abortus* (7A) und *Ch. pecorum* (7B).

6. Diskussion

Die aktuellen Forschungsaktivitäten auf dem Gebiet der Chlamydien beschäftigen sich mit der Charakterisierung des Vorkommens, der Verbreitung und des Wirtsspektrums sowie der generellen Bedeutung und des zoonotischen Potentials dieser Bakterien. Für die Untersuchung dieser Fragestellungen können serologische Verfahren nur dann wertvoll sein, wenn sie differenzierendes Potential besitzen. In der Humanmedizin ist als differenzierendes Testsystem für die Chlamydienserologie der Mikroimmunfluoreszenztest (MIF) weit verbreitet (Wang and Grayston, 1974; Clad et al., 2000). Nachteile dieser Methode sind aber eine aufwändige Antigenpräparation und die subjektive Auswertung, die ein hohes Mass an praktischer Erfahrung erfordert. In der Veterinärmedizin lässt sich mit den bisher verfügbaren differenzierenden Tests (kompetitiver ELISA; POMP-ELISA) nur beim kleinen Wiederkäuer *Ch. abortus* von anderen Chlamydienarten abgrenzen (Salti-Montesanto et al., 1997; Longbottom et al., 2001; 2002). Unter dem Aspekt der vielfältigen Chlamydien-assoziierten Erkrankungen v.a. bei Schwein und Rind unter Beteiligung von verschiedenen Chlamydienarten ergibt sich aber die Notwendigkeit von differenzierenden serologischen Testverfahren, die zwischen allen tiermedizinisch relevanten Chlamydienarten unterscheiden können. In unserer Arbeitsgruppe wurde daher ein System zur Expression des Major Outer Membrane Protein (MOMP) von Chlamydien in *Escherichia coli* etabliert (Hoelzle et al., 2003). Mit dem rMOMP von den drei tierpathogenen Chlamydienarten (*Ch. abortus*, *Ch. pecorum*, *C. suis*) wurde ein Immunoassay entwickelt, mit dem bei Tieren die serologische Identifizierung der infizierenden Chlamydienart gelingt (Hoelzle et al., 2004).

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, diese differenzierende MOMP-basierte Serologie auf weitere, auch humanmedizinisch und zoonotisch wichtige Chlamydien-Spezies (*C. trachomatis*, *Ch. pneumoniae*, *Ch. psittaci*) auszudehnen. Ausserdem sollte die Eignung von rekombinanten MOMP-Subfragmenten als Antigen für die serologische Untersuchung und Feinanalyse von Chlamydieninfektionen untersucht werden. Dabei waren folgende Fragen von besonderer Bedeutung: i) können wir genus- und speziesspezifische B-Zell-Epitope auf dem MOMP kartieren? ii) Ist das bei natürlichen Infektionen zu findende immunologisch beantwortete Epitopmuster

tierartsspezifisch? iii) Besteht bei der Immunisierung mit Chlamydien eine Korrelation zwischen verwendetem Antigen und dem induzierten Epitopmuster?

Dazu wurde zunächst das MOMP von *C. trachomatis*, *Ch. pneumoniae* und *Ch. psittaci* in *E. coli* rekombinant hergestellt. Damit konnte gezeigt werden, dass das etablierte Expressionssystem offensichtlich bei allen Chlamydienarten erfolgreich angewendet werden kann. Im Dot Blot reagierten alle untersuchten rMOMP eindeutig speziesspezifisch mit den homologen, durch Immunisierung mit EB hergestellten Kaninchenimmunsereen. Diese Ergebnisse bestätigen eindeutig frühere Beobachtungen, die zeigten, dass bei Chlamydieninfektionen die Immunantwort v.a. gegen die speziesspezifischen und nicht gegen kreuzreaktive, genus- oder familien-spezifische Epitope gerichtet ist (Mondesire et al., 1989; Baghian et al., 1990; Jensen et al., 1993). Dennoch waren marginale Kreuzreaktionen bei nahe verwandten Spezies zu beobachten. So reagierten Immunsereen gegen *C. trachomatis* auch schwach mit *C. suis* rMOMP und Immunsereen gegen *Ch. pecorum* mit *Ch. abortus* rMOMP. Über die antigene Struktur des MOMP von tiermedizinisch relevanten Chlamydien ist nur sehr wenig bekannt. So gibt es nur wenige Daten über das Vorkommen und die Lokalisation von speziesspezifischen und genus-/familien-spezifischen B-Zell-Epitopen auf dem MOMP von *C. suis*, *Ch. pecorum* und *Ch. psittaci*. Um sich diesem Problem zu nähern, wurden die MOMP von *Ch. abortus* und *Ch. pecorum* in Subfragmenten rekombinant hergestellt. Die Strategie war dabei so gewählt, dass die Subfragmente bei konstantem N-Terminus (SF1 bis SF3) bzw. C-Terminus (SF4 bis SF7) sukzessive um je eine VD verkürzt wurden. Dadurch konnte ein evtl. vorhandener Einfluss der flankierenden konstanten MOMP-Bereiche auf die Ausbildung und Bindungseigenschaften von B-Zell-Epitopen in den VD untersucht werden. Durch die Kombination von mehreren VD pro Subfragment sollten möglicherweise zu findende diskontinuierliche B-Zell-Epitope detektiert werden. Derartige Epitope wurden als Bindungsdomäne von neutralisierenden mAk auf dem MOMP von *Ch. abortus* bereits beschrieben (Vretou et al., 2001).

Unsere Untersuchungen zeigten, dass derartige strategische rMOMP-Subfragmente für Epitop-Studien geeignet sind, da die Epitope von monoklonalen Antikörpern eindeutig zugeordnet werden konnten. Erstmals konnten Epitope von gegen *Ch. abortus* gerichteten monoklonalen Antikörpern in der VDIII des MOMP lokalisiert

werden. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu früheren Studien, die B-Zell-Epitope in den VDI, VDII und VDIV des MOMP von *Ch. abortus* nachweisen konnten (Vretou et al., 2001; Salti-Montesanto et al., 1997). Für die Chlamydienarten *Ch. pneumoniae* und *C. trachomatis* Serovar K wurden dagegen bereits B-Zell-Epitope in der VDIII des MOMP gefunden (Klein et al., 2003; Villeneuve et al., 1994).

Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob unsere rMOMP Subfragmente für eine serologische Feinanalyse von Chlamydieninfektionen eingesetzt werden können. Die Reaktivität der *Ch. abortus*-Fragmente mit anti-*Ch. abortus*-Hyperimmunseren vom Kaninchen und Schwein zeigten unterschiedliche, offensichtlich von der Tierart abhängige Reaktionsmuster: Schweineseren erkannten hauptsächlich Epitope in den variablen Domänen III und IV, Kaninchenseren dagegen Epitope in den VDI und VDII. Um dieses möglicherweise tierartspezifische Reaktionsverhalten aufzuklären, sind weitere umfangreiche Untersuchungen mit definierten Immun- und Feldseren nötig, v.a. im Hinblick auf die Etablierung eines serologischen Tests.

Bei den Immunseren vom Schwein standen zwei Gruppen zur Verfügung, die mit unterschiedlich hergestellten Antigenen immunisiert worden waren. Beide Serumgruppen zeigten in unseren ELISA-Studien ein kongruentes Reaktionsverhalten. Dadurch kann ein Einfluss des bei der Antigenherstellung verwendeten Kultursystems (Zellkultur vs. embryoniertes Hühnerei) auf die im immunisierten Wirt induzierten Antikörper ausgeschlossen werden.

Um die Bereiche zu lokalisieren, die für die Kreuzreaktionen auf dem gesamten MOMP verantwortlich sind, wurden die anti-*Ch. abortus*-Immunseren hinsichtlich ihrer Reaktivität mit den heterologen *Ch. pecorum*-Subfragmenten untersucht. Die Ergebnisse haben eindeutig gezeigt, dass die kreuzreaktiven Epitope auf dem MOMP hauptsächlich in der variablen Domäne VDIV lokalisiert sind und dass diese Kreuzreaktivität, im Gegensatz zur speziesspezifischen Reaktivität, nicht Tierart-abhängig ist.

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erwarten wir, dass die Kombination von definierten rMOMP-Fragmenten als Antigene in einem serologischen Test neben der Identifizierung der infizierenden Chlamydienart eine Feindifferenzierung der

chlamydien-spezifischen humoralen Immunantwort (*Antibody profiling*) ermöglicht mit der Option, dass wir mit diesem Test bei Mensch und Tier klinisch irrelevante von klinisch relevanten Chlamydieninfektionen unterscheiden können. Auch die tiermedizinisch relevante Unterscheidung geimpfter und natürlich infizierter Tiere könnte mit so einem Test möglich sein.

7 Literaturverzeichnis

Aitken, I.D., M.J. Clarkson, K. Linklater (1990). Enzootic abortion of ewes. *Vet. Rec.* 126: 136-138.

Andersen, A.A. (1997). Two new serovars of *Chlamydia psittaci* from North American birds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 9: 159–164.

Andersen, A.A., D. Vanrompay (2000). Avian chlamydiosis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 19: 396–404.

Appleyard, W.T., I.D. Aitken, I. Anderson (1983). Outbreak of chlamydial abortion in goats. *Vet. Rec.* 113: 63

Baehr, W., Y.X. Zhang, T. Joseph, H. Su, F.E. Nano, K.D.E. Everett, H.D. Caldwell (1988). Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane Protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 4000-4004.

Baghian, A., L. Shaffer , J. Storz (1990). Antibody Response to Epitopes of Chlamydial Major Outer Membrane Proteins on Infectious Elementary Bodies and of the Reduced Polyacrylamide Gel Electrophoresis-Separated Form. *Infect. Immun.* 58: 1379-1383.

Batteiger, B.E., W.J. Newhall, P. Terho, C.E. Wilde, R.B. Jones (1986). Antigenic Analysis of the Major Outer Membrane Protein of *Chlamydia trachomatis* with Murine Monoclonal Antibodies. *Infect. Immun.* 53: 530-533.

Blasi, F., D. Legnani, V.M. Lombardo, G.G. Negretto, E. Magliano, R. Bozzoli, F. Chiodo, A. Fasoli, L. Allegra (1993). *Chlamydia pneumoniae* infection in acute exacerbations of COPD. *Eur Respir J.* 6: 19-22.

Bodetti, T.J., E. Jacobson, C. Wan, L. Hafner, A. Pospischil, K. Rose, P. Timms (2002). Molecular evidence to support the expansion of the hostrange of *Chlamydochlamydia pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. *Syst. Appl. Microbiol.* 25: 146-152.

Busch, M., R. Thoma, I. Schiller, L. Corboz, A. Pospischil (2000). Occurrence of chlamydiae in the genital tracts of sows at slaughter and their possible significance for reproductive failure. *J. Vet. Med. B* 47: 471-480.

Caldwell, H.D., J. Kromhout, J. Schachter (1981). Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Infect. Immun.* 31: 1161-1176.

Cates, W., J.N. Wasserheit (1991). Genital chlamydial infections: epidemiology and reproductive sequelae. *Am. J. Obst. Gynecol.* 164: 1771-81.

Clad, A., H.M. Freidank, M. Kunze, U. Schoeckel, S. Hofmeier, U. Flecken, E.E. Petersen (2000). Detection of seroconversion and persistence of *Chlamydia trachomatis* antibodies in five different serological tests. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19: 932-937.

- Conlan, J.W., I.N. Clarke, M.E. Ward (1988). Epitope mapping with solid-phase peptides: identification of type-, subspecies-, species- and genus-reactive antibody binding domains on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *Mol. Microbiol.* 2: 673-679.
- Dumrese, C., C.F. Maurus, D. Gygi, M.K. Schneider, M. Walch, P. Groscurth, U. Ziegler (2005). *Chlamydia pneumoniae* induces aponeurosis in human aortic smooth muscle cells. *BMC Microbiol.* 21: 2.
- Everett, K.D.E., R.M. Busch, A.A. Andersen (1999). Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 415-440.
- Everett, K.D.E. (2000). *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. *Vet. Microbiol.* 75: 109-126.
- Gaydos, C.A., J.T. Summersgill, N.N. Sahney, J.A. Ramirez, T.C. Quinn (1996). Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. *Infect. Immun.* 64: 1614-1620.
- Grayston, J.T., C.C. Kuo, L.A. Campbell, E.P. Benditt (1993). *Chlamydia pneumoniae*, strain TWAR and atherosclerosis. *Eur. Heart J. Suppl. K*: 66-71.
- Griffiths, P.C., J.M. Plater, T.C. Martin, S.L. Hughes, K.J. Hughes, R.G. Hewinson, M. Dawson (1995). Epizootic bovine abortion in a dairy herd: characterization of a *Chlamydia psittaci* isolate and antibody response. *Br. Vet. J.* 151: 683-693.
- Hartley, J.C., S. Stevenson, A.J. Robinson, J.D. Littlewood, C. Carder, J. Cartledge, C. Clark., G.L. Ridgway (2001). Conjunctivitis due to *Chlamydomphila felis* (*Chlamydia psittaci* feline pneumonitis agent) acquired from a cat: case report with molecular characterization of isolates from the patient and cat. *J. Infect.* 43: 7-11.
- Herrera, I., S.R. Khan, E.F. Kaleta, H. Muller, G. Dolz, U. Neumann (2001). Serological status for *Chlamydomphila psittaci*, Newcastle disease virus, avian polyoma virus, and Pacheco disease virus in scarlet macaws (*Ara macao*) kept in captivity in Costa Rica. *J. Vet. Med. B* 48: 721-726.
- Herring, A.J., T.W. Tan, S. Baxter, N.F. Inglis, S. Dunbar (1989). Sequence analysis of the major outer membrane protein gene of an ovine abortion strain of *Chlamydia psittaci*. *FEMS Microbiology Letters* 65: 153-158.
- Hoelzle, L.E., G. Steinhausen, M.M. Wittenbrink (2000). PCR-based detection of chlamydial infection in swine and subsequent PCR-coupled genotyping of chlamydial *omp1*-gene amplicons by DNA-hybridization, RFLP-analysis, and nucleotide sequence analysis. *Epidemiol. Infect.* 125: 427-439.
- Hoelzle, L.E., K. Hoelzle, M.M. Wittenbrink (2003). Expression of the Major Outer Membrane Protein (MOMP) of *Chlamydomphila abortus*, *Chlamydomphila pecorum*, and *Chlamydia suis* in *Escherichia coli* using an Arabionse-inducible Plasmid Vector. *J. Vet. Med. B* 50: 383-389.

- Hoelzle, L.E., K. Hoelzle, M.M. Wittenbrink (2004). Recombinant Major Outer Membrane Protein (MOMP) of *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pecorum*, and *Chlamydia suis* as antigens to distinguish chlamydial species-specific antibodies in animal sera. *Vet. Microbiol.* 103: 85-90.
- Hotzel, H., E. Grossmann, F. Mutschmann, K. Sachse (2001). Genetic characterization of a *Chlamydophila pneumoniae* isolate from an African frog and comparison to currently accepted biovars. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 63-66.
- Jensen, A.E., A.A. Andersen, J.P. Jr Tappe, C.O. Thoen (1993). Immunoblots of outer membrane proteins of *chlamydiae* with sera from turkeys experimentally exposed to avian and mammalian *Chlamydia psittaci*. *Avian Dis.* 37: 170-176.
- Jorgensen, D.M. (1997). Gestational psittacosis in a Montana sheep rancher. *Emerg. Infect. Dis.* 3: 191-194.
- Kaltenboeck, B, K.G. Kousoulas, J. Storz (1993). Structures of and allelic diversity and relationships among the major outer membrane protein (*ompA*) genes of the four chlamydial species. *J. Bacteriol.* 175: 487-502.
- Klein, M., A. Kötz, K. Bernardo, M Krönke (2003). Detection of *Chlamydia pneumoniae*-specific antibodies binding to the VD2 and VD3 regions of the major outer membrane protein. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1957-1962.
- Knitz, J.C., L.E. Hoelzle, P. Affolter, A. Hamburger, K. Zimmermann, K. Heinritzi, M.M. Wittenbrink (2003). [Humoral immune response in breeding sows after vaccination with a herd-specific *Chlamydophila abortus* vaccine]. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 110: 369-374.
- Kuo, C.C., J.T. Grayston, L.A. Campbell, Y.A. Goo, R.W. Wissler, E.P. Benditt (1995). *Chlamydia pneumoniae* (TWAR) in coronary arteries of young adults (15-34 years old). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92: 6911-6914.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Longbottom, D., L.J. Coulter (2003). Animal chlamydiosis and zoonotic implications. *J. Comp. Pathol.* 128: 217-244.
- Longbottom, D., S. Fairley, S. Chapman, E. Psarrou, E. Vretou, M. Livingstone (2002). Serological diagnosis of ovine enzootic abortion by enzyme-linked immunosorbent assay with a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP90 of *Chlamydophila abortus*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 4235-4243.
- Longbottom, D., E. Psarrou, M. Livingstone, E. Vretou (2001). Diagnosis of ovine enzootic abortion using an indirect ELISA (rOMP91B iELISA) based on a recombinant protein fragment of the polymorphic outer membrane protein POMP91B of *Chlamydophila abortus*. *FEMS Microbiol. Letters* 195: 157-161.

- Mondesire, R.R., I.W. Maclean, P.E. Shewen, S.E. Winston (1989). Identification of Genus-Specific Epitopes on the Outer Membrane Complexes of *Chlamydia trachomatis* and *Chlamydia psittaci* Immunotypes 1 und 2. *Infect. Immun.* 57: 2914-2918.
- Moulder, J.W. (1991). Interaction of *Chlamydiae* and Host Cells in vitro. *Microbiol. Rev.* 55: 143-190.
- Pospischil, A., R. Thoma, M. Hilbe, P. Grest, D. Zimmermann, J.O. Gebbers (2002). Abort beim Menschen durch *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* Serovar 1). *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 144: 463-466.
- Regan, R.J., J.R.E. Dathnan J.D. Treharne (1979). Infective endocarditis and glomerulonephritis associated with cat *Chlamydia* (*C. psittaci*) infection. *Br. Heart J.* 42: 349-352.
- Rogers, D.G., A.A. Andersen, A. Hogg, D.L. Nielsen, M.A. Huebert (1993). Conjunctivitis and keratoconjunctivitis associated with *chlamydiae* in swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 203: 1321-1323.
- Salti-Montesanto, V., E. Tsoli, P. Papavassiliou, E. Psarrou, B. Markey, G.E. Jones, E. Vretou (1997). Diagnosis of ovine enzootic abortion, using a competitive ELISA based on monoclonal antibodies against variable segments 1 and 2 of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* serotype 1. *Am. J. Vet. Res.* 58: 228-235.
- Sambrook and Russel (2001). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. 3. Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Schiller, I., R. Koesters, R. Weilenmann, R. Thoma, B. Kaltenboeck, P. Heitz, A. Pospischil (1997). Mixed infections with porcine *Chlamydia trachomatis/pecorum* and infections with ruminant *Chlamydia psittaci* serovar 1 associated with abortions in swine. *Vet. Microbiol.* 58: 251-260.
- Soldati, G., Z.H. Lu, L. Vaughan, A. Polkinghorne, D.R. Zimmermann, J.B. Huder, A. Pospischil (2004). Detection of *mycobacteria* and *chlamydiae* in granulomatous inflammation of reptiles: a retrospective study. *Vet. Pathol.* 41: 388-397.
- Stellmacher, H., P. Kielstein, F. Horsch, J. Martin (1983). Zur Bedeutung der Chlamydien-Infektion des Schweines unter besonderer Berücksichtigung der Pneumonien. *Mh. Vet. Med.* 38: 601-606.
- Stephens, R.S., R. Sanchez-Pescador, E.A. Wagar, C. Inouye, M.S. Urdea (1987). Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. *J. Bacteriol.* 169: 3879-3885.
- Stothard, D.R., G. Boguslawski, R.B. Jones (1998). Phylogenetic analysis of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein and examination of potential pathogenic determinants. *Infect. Immun.* 66: 3618-3625.
- Su, H.,Y.X. Zhang, O. Barrera, N.G. Watkins, H.D. Caldwell (1988). Differential effect of trypsin on infectivity of *Chlamydia trachomatis*: loss of infectivity requires cleavage of major outer membrane protein variable domains II and IV. *Infect. Immun.* 56: 2094-2100.

- Sudler, C., L.E. Hoelzle, I. Schiller, R.K. Hoop (2004). Molecular characterization of chlamydial isolates from birds. *Vet. Microbiol.* 98: 235-241.
- Villeneuve, A., L. Brossay, G. Paradis, J. Hébert (1994). Determination of neutralizing epitopes in variable domains I and IV of the major outer membrane protein from *Chlamydia trachomatis* serovar K. *Microbiol.* 140: 2481-2487.
- Vretou, E., E. Psarrou, M. Kaiser, I. Vlisidou, V. Salti-Montesanto, D. Longbottom (2001). Identification of protective Epitopes by sequencing of the major outer membrane protein gene of a variant strain of *Chlamydia psittaci* serotype 1 (*Chlamydophila abortus*). *Infect. Immun.* 69: 607-612.
- Wang, S.P., C.C. Kuo, R.C. Barnes, R.S. Stephens, J.R. Grayston (1985). Immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 152: 791-800.
- Wang, S.P., J.T. Grayston (1974). Human serology in *Chlamydia trachomatis* infection with microimmunofluorescence. *J. Infect. Dis.* 130: 388-397.
- Whitcher, J.P., M. Srinivasan, M. P. Upadhyay (2001). Corneal blindness: a global perspective. *Bull. WHO* 79: 214-221.
- Wyllie, S., D. Longbottom, A.J. Herring und R.H. Ashley (1999). Single channel analysis of recombinant major outer membrane protein porins from *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia pneumoniae*. *FEBS Letters* 445: 192-196.
- Wyrick, P. B. (2000). Intracellular survival by *Chlamydia*. *Cell. Microbiol.* 2: 275-282.
- Zhang, Y.X., S. Stewart, T. Josef, H.R. Taylor, H.D. Caldwell (1987). Protective monoclonal antibodies recognize epitopes located on the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. *J. Immunol.* 138: 575-581.

Lebenslauf

Name Diana Sieber
Geburtsdatum 05.10.1968
Geburtsort Wettingen
Nationalität CH
Heimatort Menziken AG

1976 – 1982 Primarschule Stäfa und Hombrechtikon

1982 – 1985 Sekundarschule Hombrechtikon

1985 – 1986 Arztgehilfennenschule Zürich

1986 – 1993 berufliche Tätigkeit als Arzthelferin

1993 – 1997 Maturitätsschule AKAD Zürich

1997 Eidgenössische Maturität Typ D

1997 – 2003 Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich,
Schweiz

2003 Eidgenössische Schlussprüfung für Tierärzte an der Universität
Zürich, Schweiz

2003 – 2005 Doktorandin am Institut für Veterinärbakteriologie Zürich der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich, Schweiz

Verdankung

An erster Stelle möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Max M. Wittenbrink dafür bedanken, dass ich an seinem Institut als Doktorandin mitarbeiten durfte. Seine sehr freundliche Betreuung und die jederzeit gewährte fachliche Unterstützung werden mir stets in Erinnerung bleiben.

Meinen ganz herzlichen Dank möchte ich Herrn Dr. Ludwig Hoelzle und Frau Dr. Katharina Hoelzle aussprechen. Ihre enorme fachliche Unterstützung, ihre sehr geduldige Betreuung und ihre sehr hohe Hilfsbereitschaft bis zum letzten Tag meiner Doktorandenzeit sind einzigartig.

Den Mitarbeitern der Forschungsgruppe des Institutes für Veterinärbakteriologie möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei verschiedenen Arbeiten im Labor danken.