

Charakterisierung der Oligopeptidpermease von *Mycoplasma hominis*

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Miriam Hopfe
aus Neukirchen-Vluyn

Düsseldorf, 2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. U. Hadding

Korreferent: Prof. Dr. W. Kunz

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.02

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt publiziert:

Henrich B., M. Hopfe, A. Kitzlerow und U. Hadding. 1999. The adherence-associated lipoprotein P100, encoded by an *opp* operon structure, functions as the oligopeptide-binding domain OppA of a putative oligopeptide transport system in *Mycoplasma hominis*. J. Bacteriol. **181**:4873-4878

Tagungsbeiträge:

M. Dürr (Hopfe), B. Henrich, A. Kitzlerow und U. Hadding. 1997. Das Membranprotein P100 von *Mycoplasma hominis*: ein Enzym des aktiven Transports? 49. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 5. – 9. Oktober 1997 in Jena. (Poster)

M. Hopfe, B. Henrich, A. Kitzlerow und U. Hadding. 1998. The membrane protein P100 and its role in an ABC-Transporter in *Mycoplasma hominis*. 50. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, 4.- 9. Oktober 1998 in Berlin. (Poster)

M. Hopfe, B. Henrich, A. Kitzlerow und U. Hadding. 1998. The membrane protein P100 of *Mycoplasma hominis*: an enzyme of the active transport system? 12. Internationaler Kongress der Organisation für Mycoplasmaologie (IOM). 22. - 28. Juli in Sydney, Australien. (Poster)

M. Hopfe, B. Henrich, A. Kitzlerow und U. Hadding. 1999. Das zytoadhäsive Lipoprotein P100 ist die peptidbindende Domäne in einem ABC-Transporter von *Mycoplasma hominis*. 4. Minisymposium „Mikrobielle Pathogenität“ 18. – 20. Juni. Burg Rothenfels (Vortrag)

M. Hopfe, A. Kitzlerow und B. Henrich. 2000. Characterization and topology of the oligopeptide permease in the membrane of *Mycoplasma hominis*. 13. Internationaler Kongress der Organisation für Mycoplasmaologie (IOM). 14. – 19. Juli in Fukuoka, Japan. (Poster)

1.	Einleitung	1
1.1	Die Mycoplasmenmembran	1
1.2	Transportsysteme der Mycoplasmen	2
1.3	Pathogenität und Adhärenz der Mycoplasmen	5
1.4	Fragestellung der Arbeit	6
2.	Materialien	8
2.1	radioaktive Substanzen	8
2.2	Bakterienstämme	8
2.3	Vektoren	9
2.4	Restriktionsenzyme	9
2.5	Membranen	9
2.6	Oligodesoxyribonukleotide	9
3.	Methoden	12
3.1	Kultivierung von Bakterien	12
3.1.1	Mycoplasmen Kultivierung	12
3.1.2	Kultivierung von Bakterien mit Plasmiden	12
3.2	Nukleinsäureisolierungen und –aufreinigungen	12
3.2.1	RNA-Isolierung	12
3.2.2	DNA-Isolierung	13
	Präparation genomischer DNA aus Mycoplasmen	13
	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	13
	Aufreinigung von Oligodesoxyribonukleotiden	13
	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	13
3.3	Nukleinsäuremodifikationen	14
3.3.1	Restriktion	14
3.3.2	Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase	14
3.3.3	Deletionen von restringierter Doppelstrang-DNA	14
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	15
3.3.5	Verbindung von PCR-Produkten über SOE (splicing by overlap extension)	15
3.3.6	RT(reverse Transkriptase)-PCR	15
3.3.7	Markierung von DANN	16
3.3.8	Primer Extension Analyse	16
3.4	Nukleinsäurechromatographie	17
3.4.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA unter nativen Bedingungen	17
3.4.2	Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA unter denaturierenden Bedingungen (Formaldehydgel)	17
3.4.3	Nukleinsäuretransfer auf eine Membran	18
3.5	Hybridisierung und Chemilumineszenzdetektion	18
3.6	Klonierung	19
3.6.1	Ligation von DNA-Fragmenten	19
3.6.2	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	19
3.7	Spektralphotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	19
3.8	DNA-Fällung	20
3.9	Sequenzierung	20
3.10	Proteinchemische Methoden	20
3.10.1	Expression rekombinanter Proteine	20
3.10.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
	Eindimensionale Proteinauftrennung	21

	Zweidimensionale Proteinauftrennung	21
	Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen	21
3.10.3	Westernblotanalyse	22
	Gelelektrophoretischer Proteintransfer	22
	Immundetektion	22
3.10.4	Affinitätschromatographische Auftrennung von Proteinen	23
3.10.5	Osmotische Lyse von Mycoplasmen und Trennung von Membran und Zytoplasma	24
3.10.6	Immunpräzipitation von Membranproteinen	24
3.10.7	Festphasen Antikörperfänger-ELISA (enzyme-linked immunosorbent-assay)	25
3.10.8	Bindungsstudien mit Sepharose-gekoppeltem ATP	25
3.10.9	Untersuchung der ATP-Bindung mittels limitierender Trypsin-vermittelter Proteolyse	26
3.10.10	Epitopkartierung	26
3.10.11	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Phosphorylierung	27
3.10.12	Fluoreszenzspektroskopie	27
3.10.13	ATP-Hydrolyse Assay	28
3.10.14	Einfrieren, Auftauen und Kultivierung von Hybridomzellen	28
3.10.15	Computerprogramme und Internetadressen	29
4.	Ergebnisse	30
4.1	Charakterisierung des <i>opp</i> Locus	30
4.1.1	Fünf Gene und eine mRNA	37
4.1.2	Transkriptionsgrenzen des <i>opp</i> Operons	40
4.2	Die Oligopeptidpermease von <i>M. hominis</i>	42
4.2.1	Generierung und Expression der Proteine OppB, OppC, OppD und OppF	42
4.2.2	Testung und Aufreinigung der OppB-, OppC- und OppD-spezifischen Seren	47
4.2.3	Zelluläre Lokalisation der OppC und OppD Proteine	50
4.2.4	Untersuchung der Komplexbildung der Opp-Proteine	51
4.3	Funktionsanalyse des Lipoproteins OppA	54
4.3.1	Charakterisierung des OppA Proteins als Oligopeptidbindendes-Protein	54
4.3.2	Konstruktion und Expression des OppA Proteins	56
4.3.3	Epitopkartierung der OppA spezifischen monoklonalen Antikörper	58
4.3.3.1	Epitopkartierung durch kontrollierten Abbau der OppA kodierenden Sequenz	58
4.3.3.2	Epitopkartierung mit Hilfe von synthetischen Peptide	59
4.3.4	Untersuchung verschiedener Mycoplasmenisolate mit Hilfe der monoklonalen Antikörper TF6 und DC10	61
4.3.5	Nachweis von OppA in verschiedenen Mycoplasmenspezies	63
4.3.6	Versuch der Selektion OppA-Mutanten exprimierenden <i>M. hominis</i> Isolaten	65
4.3.7	Die ATP-bindenden Eigenschaften der OppA und OppD Proteine	66
4.3.8	Die Proteine OppA und OppD hydrolysieren ATP	71
4.3.9	OppA Protein wird phosphoryliert	73
5.	Diskussion	81
6.	Zusammenfassung	90
7.	Literaturverzeichnis	91
8.	Abkürzungen	100
9.	Danksagungen	102

1. Einleitung

1.1 Die Mycoplasmenmembran

Membranen sind für das Leben einer Zelle von entscheidender Bedeutung. Sie umschließen Zelle und Zellorganellen, grenzen Zellen gegen die Umgebung ab und halten somit lebenswichtige Funktionen der Zelle aufrecht. Trotz unterschiedlicher Funktionen haben alle biologischen Membranen einen gemeinsamen Aufbau: Jede Membran besteht aus einer sehr dünnen Lipiddoppelschicht mit amphipathischen Proteinen, die durch nicht kovalente Wechselwirkung zusammengehalten werden. Die Lipidmoleküle sind in einer durchgehenden Doppelschicht angeordnet und dienen als mehr oder weniger undurchlässige Barriere für die meisten wasserlöslichen Moleküle. Hydrophile und geladene Proteine passieren nur über spezifische Transportwege die Membran.

Für Untersuchungen von Biomembranen wurde die leicht isolierbare Mycoplasmenmembran herangezogen (Razin, 1993). Elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser kleinsten sich selbst replizierenden Organismen, der Mycoplasmen, zeigten, dass ihnen im Gegensatz zu anderen Bakterien, die Zellwand fehlt. Die Mycoplasmen wiesen nur eine einzelne Membran von 80-100 Å Dicke auf.

Analysen der chemischen Komposition zeigten, dass sie hauptsächlich aus Proteinen (60-70% der Membranmasse), Lipiden (20-30 %), einigen Carbohydraten und einer geringen Menge anhaftender zytoplasmatischer Bestandteile (RNA und DNA) zusammengesetzt sind (Razin, 1963). Das prozentuale Verhältnis von Lipiden zu Proteinen konnte durch Änderung der Kultivierungsbedingungen beeinflusst werden, und war auch vom Alter einer Mycoplasmenkultur abhängig.

Im Gegensatz zu anderen bakteriellen Membranen enthalten Mycoplasmenmembranen in der Regel Cholesterin (Argaman & Razin, 1965), welches eine wichtige Rolle als architektonische Komponente in der Lipiddoppelschicht spielt, um der Mycoplasmenmembran die notwendige Festigkeit zu geben, da, wie oben erwähnt, diese Bakterien keine Zellwand besitzen.

Da die Zytoplasmamembran die einzige Membran in Mycoplasmen ist, sind viele enzymatische Prozesse, wie auch spezifische Transportprozesse für die Aufnahme lebensnotwendiger Stoffe mit dieser Membran verbunden. Aufgrund des kleinen Genoms der Mycoplasmen, denen die meisten Gene fehlen, die in der Aminosäurebiosynthese und der Kofaktor-Biosynthese involviert sind, sind Mycoplasmen auf ihre Wirtszelle angewiesen, um

essentielle Aminosäuren, Fettsäuren, Cholesterin und Vitamine über Transportsysteme in die Zelle aufzunehmen (Himmelreich *et al.*, 1996; Pollack *et al.*, 1997). Die Zytadhärenz ist eine notwendige Voraussetzung, um über den engen Kontakt zur Wirtszelle diese lebenswichtigen Bestandteile dem Wirt entziehen zu können. Da Mycoplasmen die äußere Zellwand fehlt, spielen die Bestandteile der Mycoplasmenmembran und die darin enthaltenen Proteine eine wichtige Rolle bei der Adhärenz.

1.2. Transportsysteme der Mycoplasmen

Aufgrund des kleinen Genoms (580 kb bei *Mycoplasma genitalium* und 700-800 kb bei *Mycoplasma hominis*) können, wie oben erwähnt, einige Substanzen wie z.B. einige Fettsäuren, Aminosäuren, Purine, Pyrimidine und Cholesterin von den Mycoplasmen nicht selber synthetisiert werden, sondern müssen von der Umwelt (Wirtszelle, Medienbestandteile) aufgenommen werden. Es wurde angenommen, dass eine erhöhte Anzahl von Transportsystemen für essentielle Nährstoffe in Mycoplasmen existieren (Razin, 1993). Die Sequenzierung der Genome von *M. genitalium* und *M. pneumoniae* zeigte, dass diese Annahme nicht bestätigt werden konnte (Fraser *et al.*, 1995, Himmelreich *et al.*, 1996). Dies veranlasste zu der Hypothese, dass die vorhandenen Transportsysteme geringe Substratspezifitäten besitzen, um den Verlust der spezifischen Transporter, der durch die Genomreduzierung hervorgerufen wurde, zu kompensieren.

Drei Typen von Transportsystemen konnten nach Sequenzanalyse der Genome von *M. genitalium* und *M. pneumoniae* abgeleitet werden. Der erste Transporter bestand aus einem Transmembranprotein, das als Carrier fungiert. Das zweite Transportsystem setzte sich aus einem Phosphoenolpyruvat-abhängigen Zucker-Phosphotransferase-Transportsystem (PTS) zusammen, das Zucker unter Phosphorylierung in die Zelle transportiert, wo er im folgenden dem intrazellulären Metabolismus zugeführt wird. Der dritte Transporttyp umfasst die ABC (ATP-binding-cassette) Transporter, die die größte Gruppe der Transportsysteme bilden. ABC-Transporter besitzen alle einen ähnliche Aufbau, bestehend aus vier Hauptdomänen, die je nach Organismus (prokaryontisch oder eukaryontisch) zu einer Domäne fusionieren oder sich aus mehreren Multi-Domänen zusammensetzen (Higgins, 1995). Viele der ABC Transporter haben eine wichtige klinische Funktion: das menschliche P-Glykoprotein führt durch Überexpression in Krebszellen zu einem Export chemotherapeutischer Medikamente, so dass die Zellen unempfindlich gegenüber cytotoxischen Arzneimitteln werden. Mutationen

in Genen, die für Proteine von ABC-Transportern kodieren, führen zu Syndromen wie Adenoleukodystrophie, Zellweger Syndrom und zytischer Fibrose (Higgins, 1995).

In *Escherichia coli* K-12 mit einer Kodierungskapazität von 4289 Proteinen konnten über 80 ABC-Transporter identifiziert werden, wohingegen nur sechs in *M. genitalium* mit insgesamt 468 Proteine gefunden wurden. *M. genitalium* besitzt nur einen Oligopeptidtransporter, wohingegen in *Bacillus subtilis* ein Di-, ein Tri- und zwei Oligo-Peptidtransporter beschrieben wurde (Perego *et al.*, 1991; Slack *et al.*, 1991; Koide & Hoch, 1994). Es ist anzunehmen, dass der Oligopeptidtransporter in Mycoplasmen durch die reduzierte Substratspezifität die Funktionen der vier Peptidtransporter in *Bacillus subtilis* innehat.

Bisher ist wenig über die ABC-Transporter einschließlich der Oligopeptidpermeasen in Mycoplasmen bekannt. Es konnte nur auf Homologievergleiche zu bereits untersuchten Permeasen zurückgegriffen werden. Wie in Abbildung 1 dargestellt, bestehen die Oligopeptidpermeasen der Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien aus zwei ATP-bindenden Domänen (D und F) und zwei membrandurchspannenden Domänen (B und C). Die Substrat-bindende Domäne (A) ist in Gram-negativen Bakterien im periplasmatischen Spalt lokalisiert, wohingegen diese Domäne in Gram-positiven Bakterien über einen Lipidanker in der Zellmembran verankert ist (Abb. 1).

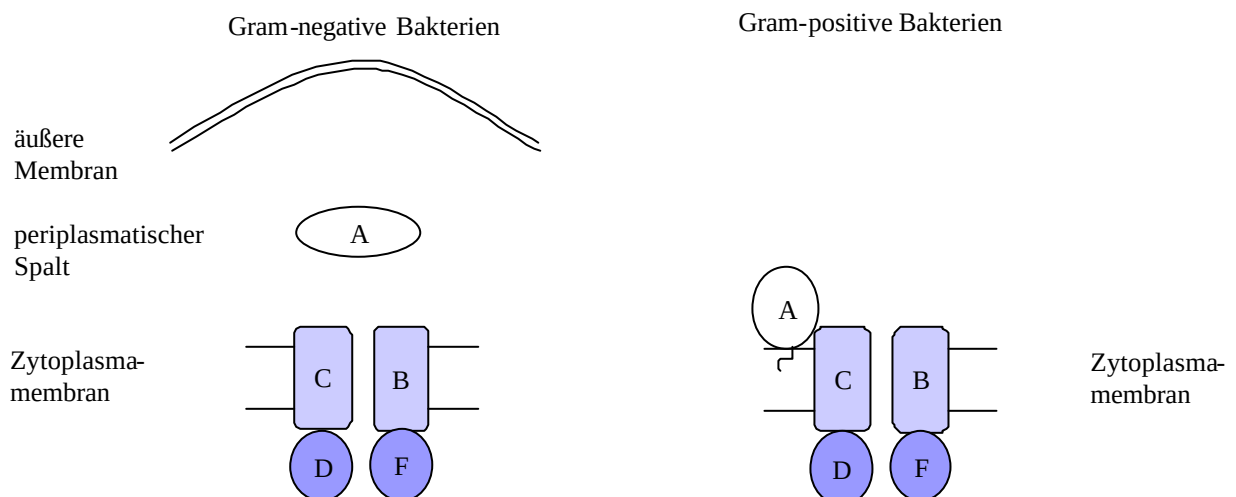


Abb 1. Organisation der Oligopeptidpermease in gram-negativen und gram-positiven Bakterien.

Die Oligopeptidpermease besteht aus einer Substrat-bindenden Domäne OppA (A), die in gram-negativen Bakterien im periplasmatischen Raum frei vorliegt, wohingegen in gram-positiven Bakterien aufgrund des Fehlens einer äußeren Zellmembran das OppA in der Zellmembran verankert ist (A). Desweiteren besteht die Oligopeptidpermease aus zwei hydrophoben integralen Membranproteinen OppB (B) und C (C), die die Pore durch die Membran bilden, und zwei ATP-bindenden Proteinen OppD (D) und OppF (F), die die Energielieferanten des Transporters darstellen.

□ Substrat-bindende Domäne, ▬ membrandurchspannenden Domänen, ● ATP-bindenden Domänen

Der Mechanismus des Peptid-Transports der Permease durch die Zytoplasmamembran wurde von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. Die Substrat-bindende Domäne bindet den Liganden und führt ihn den Transmembrandomänen zu, die durch eine Konformationsänderung, bewirkt durch die ATP-Hydrolyse der zytoplasmatischen ATP-bindenden Domänen, den Transport durch die Membran ermöglichen (Nikaido & Hall, 1998).

Diese ABC-Transporter waren die häufigsten gefundenen Transporter in *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.*, 1995) und *Escherichia coli* (Blattner *et al.*, 1997). Im minimalen Genom von *M. genitalium* wurden sechs putative Proteinbindungs-abhängige-Transportsysteme (PBA) identifiziert, die alle zur Klasse der ABC-Transporter zählten. Fünf dieser Transporter zeigten Homologien zu Permeasen, die Monosaccharide, Phosphate, Disaccharide, Polyamine und Oligopeptide transportierten. Das sechste Transportsystem war homolog zum Proteinbindungs-abhängigen Transportsystem (PBA) von *Mycoplasma hyorhina*, dessen Funktion noch nicht geklärt werden konnte. Von Mushegian und Koonin (1996) wurde aufgrund von Homologievergleichen der Genome von *Mycoplasma genitalium* und *Haemophilus influenzae* der minimale Genbestand einer Zelle mit 256 Genen bestimmt. Von den sechs putativen Permeasen, die in *M. genitalium* identifiziert wurden, zählen die Gene, die die Oligopeptidpermease-Proteine kodieren, zur minimalen Genausstattung. Dieser Befund wies schon auf die Unentbehrlichkeit und Bedeutung von Oligopeptidpermeasen in parasitären Bakterien hin.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit war der genkodierende Bereich der putativen Substrat-bindenden Domäne OppA (dort noch aufgrund seines Molekulargewichtes als P100 benannt) neben den beiden hydrophoben integralen Membrandomänen OppB und OppC einer Oligopeptidpermease in *Mycoplasma hominis* FBG identifiziert worden (Dürr, 1997). Der Nachweis der Substratbindung war zu diesem Zeitpunkt noch nicht erbracht. Überraschenderweise zeigte sich in anderen Mycoplasmaspezies, dass die putative Substrat-bindenden Domänen der Permease neben der postulierten Fähigkeit, Substrat zu binden und den porenbildenden Permeaseproteinen zuzuleiten, auch weitere Eigenschaften aufwiesen. Die substratbindende Domäne P37 von *M. hyorhina* wurde in der Membran einer mit *M. hyorhina* infizierten FS9 Maus Sarcoma Zelllinie identifiziert, wo sie einen Einfluss auf die Invasivität der FS9 Maus-Sarkoma-Zellen hatte (Dudler *et al.*, 1988). Die Substrat-bindende Funktion des P37 für die Permease wurde bislang auf Proteinebene nicht nachgewiesen. In *M. fermentans* zeigte die putative Substrat-bindende Domäne P78 phasenvariable Expression des Proteins. Welche Auswirkungen das An- und Abschalten dieses Proteins auf die Funktion des postulierten ABC-Transporters in *M. fermentans* hat, ist bisher ebenfalls noch nicht

erschöpfend untersucht. Für das von mir in meiner Diplomarbeit charakterisierte OppA Protein der postulierten Oligopeptidpermease von *M. hominis*, konnte nach Computeranalyse eine putative ATP-Bindungsdomäne im C-Terminus wie auch mehrere Phosphorylierungsstellen über das Protein verteilt identifiziert werden. Zusätzlich konnte bereits 1993 von Henrich und Mitarbeitern eine Beteiligung des OppA Proteins an der Zytadhärenz beschrieben werden, so dass ein Ineinandergreifen mehrerer Funktionsmerkmale dieses Proteins in *M. hominis* nahelag.

Für viele ABC-Transporter wurde ein pleiotroper Effekt beschrieben. Diese Transporter zeigen neben ihrem Substrattransport noch andere Funktionen im Bakterium, wie zum Beispiel Adhärenz (Cundell *et al.*, 1995), Virulenz (Vilei & Frey, 2001), sowie Sporulation (Perego *et al.*, 1991) oder Kompetenz (Magnuson *et al.*, 1994).

1.3 Pathogenität und Adhärenz der Mycoplasmen

Wie eingangs beschrieben, spielt neben dem Transport von essentiellen Nährstoffen die Adhärenz eine wichtige Rolle bei Mycoplasmen. Die Konkurrenz um Nährstoffe und Biosynthese-Vorläufer für die Mycoplasmen kann die Integrität und die Funktion der Wirtszelle verändern. Der erste und essentielle Schritt zur Kolonisation der Mycoplasmen ist ihre Fähigkeit, an der Oberfläche der Epithelzellen zu adhären, und führt bei *M. hominis* zu Entzündungen des kleinen Beckens (PID: pelvic inflammatory disease), akuter Infektion des oberen Harntrakts (Pyelonephritis) (Thomsen, 1978), Infektionen post abortum, milder Septikämie nach Aborten und Geburt. Bei Neugeborenen wurde *M. hominis* bei leichten Infektionen im Respirationstraum bis hin zur Meningitis (Waites *et al.*, 1990) isoliert. Die Pathogenität von *M. hominis* scheint insgesamt gering zu sein, da extragenitale Infektionen meiste nur bei Immunsupprimierten auftreten.

Die Zytadhärenz der Mycoplasmen wurde als Hauptvirulenzfaktor angesehen, da adhärenzdefiziente Mutanten avirulent waren und ihnen Strukturen fehlten, wie Glykokalyx, Lipoteichonsäure und Fimbrien (Pili), die in anderen Bakterien als Hauptvirulenzfaktoren beschrieben wurden (Rottem & Naot, 1998). Wie bereits eingangs erwähnt, sind aufgrund der fehlenden Zellwand meist mehrere Membrankomponenten an der Adhärenz beteiligt. In einigen Mycoplasmen, wie z.B. *Mycoplasma pneumoniae*, *M. genitalium* und *M. gallisepticum* wurden spezifische polare „tip“-Strukturen gefunden, die die Anheftung an die

Wirtszelle vermitteln (Hu *et al.*, 1987). Keine dieser spezifischen Anheftungsstrukturen konnte in *M. hominis* identifiziert werden. Von Henrich *et al.* wurden im Jahre 1993 die Membranproteine P50, sowie das oben beschriebene Membranprotein OppA, als Adhäsine von *M. hominis* FBG identifiziert.

Der Mechanismus der Adhärenz wurde von Kahane (1984) und Almagor und Mitarbeitern (1985) intensiv für Mycoplasmen untersucht. Sie konnten mehrere Schritte bei der Adhärenz der Mycoplasmen an ihre Wirtszelle nachweisen und ein Schema für diesen Mechanismus der adhärierenden Mycoplasmen aufstellen. Die Adhärenz der Mycoplasmen erfolgte je nach Spezies an unterschiedliche Wirtszellrezeptoren (Sialoglykokonjugate, Proteine, Sulfatide), so wie durch hydrophobe Interaktion zwischen Membranbestandteilen der Mycoplasmen- und der Wirtszellmembran (Minion *et al.*, 1984; Feldner & Bredt, 1983). Adhärerte Mycoplasmen veränderten den Transportmechanismen der Wirtszelle und induzierten Chromosomen-Aberrationen. Das metabolische Abfallprodukte H_2O_2 , welches nach Transport von Glycerin über einen ABC-Transporter aus diesem als Abbauprodukt entsteht, ruft oxidative Schädigungen an der Wirtszelle hervor (Vilei & Frey, 2001; Razin, 1981b). Durch die Oxidation von Lipiden und Proteinen in der Wirtszellmembran wird die Membran durchlässig. Nährstoffe gelangen durch die Membran und stehen den zytadhäsiven Mycoplasmen zur Verfügung, die wiederum über Transportsysteme diese freigesetzten Nährstoffe aufnehmen. Hier zeigt sich erneut das Zusammenspiel von Transport und Adhärenz der parasitären Mycoplasmen.

1.4 Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass der genkodierende Bereich für das Membranproteins P100, welches sich nach der Arbeit von Henrich *et al.* (1993) an der Zytadhärenz von *Mycoplasma hominis* beteiligt ist, in unmittelbarer Nähe zu zwei Genen, *oppB* und *oppC* lag (Dürr, 1997). Die von der Gensequenz abgeleiteten Proteinsequenzen zeigten Homologien zu den integralen Membranproteinen einer Oligopeptidpermease. Des weiteren konnte ich zeigen, dass diese drei Gene in einer Operonstruktur organisiert waren. Das mRNA-Transkript umfasste 9,5 kb, welches viel größer war, als der Bereich, der von den Genen *p100*, *oppB* und *oppC* abgedeckt wurde. Da nach Higgins *et al.* (1992), Oligopeptidpermeasen von fünf Genen, *oppABCDF*, kodiert werden und in einer

Operonstruktur organisiert sind, wurde angenommen, dass noch weitere Gene im *opp*-Locus von *M. hominis* zu vermuten waren. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die weiteren Gene zu identifizieren, zu sequenzieren und zu zeigen, dass diese Gene mit *oppA*, *oppB* und *oppC* polycistronisch organisiert sind. Bisher existierten keine proteinchemischen Untersuchungen über Oligopeptidpermeasen in Mycoplasmen. So sollte ein weiterer Schwerpunkt meiner Arbeit, die Expression sowie Lokalisation der Opp Proteine in *M. hominis* zu analysieren sein und das OppA Protein, dem mehrere Funktionen zugeschrieben wurden, näher zu charakterisieren, um ein Modell dieser Oligopeptidpermease in *M. hominis* erstellen zu können.

2. Materialien

2.1 radioaktive Substanzen

? (^{32}P)-dATP	5000 Ci/ mmol	Amersham -Pharmacia
? (^{32}P)-ATP	5000 Ci/ mmol	Hartmann Analytic
? (^{32}P)-Phosphorsäure	3000 Ci/ mmol	Hartmann Analytic
a (^{32}P)-ATP	5000 Ci/ mmol	Hartmann Analytic

2.2 Bakterienstämme

Zur Analyse der Spezifität verschiedener Proteine von *Mycoplasma hominis* wurden 125 klinische Isolate verwendet, die aus der Stammsammlung des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Universität Düsseldorf stammten, 47 Isolate wurden von Dr. med. Blenk aus Nürnberg zur Verfügung gestellt (Med. Laboratorium, Rohrmannstr.12, 90429 Nürnberg). Die Stämme *M. hominis* Typ Stamm PG21 (NCTC 10111), *M. pneumoniae* (NCTC 10119) und *M. pulmonis* (NCTC 10139) wurden vom National Collection of Type Cultures, London, United Kingdom bezogen.

Desweiteren wurden folgende *Escherichia coli* Stämme für Klonierungs- und Expressionsstudien verwendet.

DH α F $^{\prime}$ IQ	F $^{\prime}$, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 ($r_{K^{-}}$, $m_{K^{+}}$), supE44, λ^{-} , thi-1, gyrA96, relA1/F $^{\prime}$, proAB $^{+}$, lacI q Z Δ M15, zzf::Tn5 [Km r]	Life Technologies
DH5 α F $^{\prime}$	F $^{\prime}$, ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17 ($r_{K^{-}}$, $m_{K^{+}}$), supE44, λ^{-} , thi-1, gyrA96, relA1	Life Technologies
SG13009 [pREP4]	Nal S Str S rif S , lac $^{-}$ ara $^{-}$ gal $^{-}$ mtI $^{-}$ F $^{-}$ recA $^{+}$ uvr $^{+}$	Qiagen
BL21(DE3)pLysS	F $^{-}$, ompT, hsdS $_B$ ($r_{B^{-}}$ $m_{B^{-}}$) gal dcm (DE3) pLysS (camR)	Novagen

2.3 Vektoren

Zur Klonierung wurden folgende Vektoren verwendet:

Plasmid	Größe (kb)	Restistenz-gene	Charakteristika	Firma
pT7T3 19U	2,9	Amp	pBR322-ori, f1-ori, lacZ'Gen, T3- und T7-Promotor	Pharmacia Biotech
pGEM-T	3,0	Amp	lacZ'Gen, T3- und T7-Promotor, f1-ori	Promega
pQE 40-42	4,0	Amp	6xHis, DHFR, T5 Promotor, 2 lac Operatoren, RBSII	Qiagen
pBX	4,4	Amp	C-terminaler Protein C-Epitope	Roche
pXB	4,4	Amp	N-terminaler Protein C-Epitope	Roche

2.4 Restriktionsenzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von den Firmen Roche, Biolab und MBI verwendet und wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben eingesetzt.

2.5 Membranen

Nylonmembran, positiv geladen	0,45 µm Porengröße	Boehringer Mannheim
Protran, Nitrozellulose	0,45 µm Porengröße	Schleicher und Schuell

2.6 Oligodesoxyribonukleotide (Primer)

Amplikon	Bezeichnung	Tm in °C	Sequenz
oppA-I	P100-1b	56,6	5'GGATGGTACCGCATGCTATGTAAAATAGACC3'
oppA-I	P100-2a	55,7	5'CCACTCGAGGCTTGGGCTGCATAT3'
oppA-D	P100-3	55,7	5'AGCCTCGAGTGGCCAAGCAACTCA3'
oppA-D	P100-4	55,0	5'CATTCATGTATAGTTGTGGAGCATTTAA3'
oppA-E	P100-5	50,8	5'CAACTATACATGAATGCATGGAAAAAGT3'
oppA-E	P100-6	58,1	5'TTTGCGGCCCGCTGCAGTTTTTTAGTATCTTTGA3'
oppB-1*	Oppb2	57,2	5'TTTGCGTCCAGTGTATATATAAAGCAGAGTTTGGGT3'
oppB-1	oppB-1	45,6	5'AAAAAGCATGCACAAAATATATATTTAAA3'
oppB-1	Oppb-2trp1	46,0	5'CATCAAACCATTTTCCACGCTT3'
oppB-2	Oppb-3trp1	50,9	5'GCGTGGAAAATGCTTTGATGTGTCT3'
oppB-2	Oppb-4trp2	50,9	5'TTCCTGGTACCTGCCAATATTGTTC3'
oppB-3	Oppb5-trp2	55,2	5'GAAAATATTGCGCAGGTACCAGGAACATCA3'

Amplikon	Bezeichnung	Tm in °C	Sequenz
oppB-3	Oppb6-trp3	44,0	GAAAAATAACCAATAGTTTCTCTTG ^{3'}
oppB-4	Oppb7-trp3	46,6	^{5'} GAAACTATTGGTTATTTTCTTGGCA ^{3'}
oppB-4	OppB-end	63,1	^{5'} CTCGGGCCGCTCGACGTTATCTCCTTTAACAG ^{3'}
oppC-1*	Oppc2	52,4	^{5'} TCGTGTCGACTTGATGATGTTCTTAATAAA ^{3'}
oppC-1	Oppc-1	51,2	^{5'} TATTTGCATGCAATATAAATGAAGTTAAAGCCTT-T ^{3'}
oppC-1	Opp-2 trp123	53,1	^{5'} CATACCATGCGGTAGTCCAAATATCGT ^{3'}
oppC-2	Oppc-3 trp123	58,1	^{5'} ACTACCGCATGGTATGCAACATGGAGAGCAATT ^{3'}
oppC-2	Opp4-trp4	55,6	^{5'} ATGTCGACATCCATATTAATGTAGGAGGTGCTA ^{3'}
oppC-2	Oppc4- trp4a	40,2	^{5'} ATAATAAGATCCATATTAATGTAGG ^{3'}
oppC-3	Oppc5-trp4	40,2	^{5'} ATTAATATGGATCTTATTATTTGTTT ^{3'}
oppC-3	Oppc6-trp5	48,9	^{5'} AATCTGGCCATCCAATATTGTT ^{3'}
oppC-4	Oppc7-trp5	53,4	^{5'} TTGGATGCCAGGATTTGTTGGAATAAC ^{3'}
oppC-4	Oppc8-trp6	48,1	^{5'} TGATGCTATCCATAGAATAACACCT ^{3'}
oppC-5	oppC9-trp6	47,2	^{5'} TATTCTATGGATAGCATACTAGC ^{3'}
oppC-5	Oppc10- end	60,6	^{5'} ATAAGCGGCGCTCGACCTTACCTTTTCCTTTG ^{3'}
oppD-1	OppD-1a	51,9	^{5'} AAGTACCGCATGCTGGCAAAAATTATTAATAAA ^{3'}
oppD-1	OppD-2	50,9	^{5'} GCCCCCTTATATATTGCCAATATTTTGTTTTT ^{3'}
oppD-2	OppD-3	47,1	^{5'} CAAAAATATTGGCAATATATAAGGGGA ^{3'}
oppD-2	OppD-4	48,5	^{5'} TAAGTTGAGTTTTTCCAATCTTCATTATTATTA ^{3'}
oppD-3	Opp-5b	50,9	^{5'} AATAATGAAGATTGCAAAAACCTCACTTATACTG ^{3'}
oppD-3	OppD7a	52,4	^{5'} GTATAGCGCTAATTAATGCCAAGTATATG ^{3'}
oppD-4	OppD-8	52,4	^{5'} GCATTAATTAGCGCTATACCCGAATCAAAA ^{3'}
oppD-4	OppD-9	51,3	^{5'} CGCAACATGGTTATTATCTCCCTGAAG ^{3'}
oppD-5	OppD-10	53,1	^{5'} CTTCAGGGAGATAATAACCATGTTGCGG ^{3'}
oppD-5	OppD-11a	57,9	^{5'} CTTCGGGCGCGCTCGACCTCATTGTTAAAT ^{3'}
oppF-1	OppF-1a	49,7	^{5'} AGAAGGTACCGCATGCAAAAATAATAAAAAT ^{3'}
oppF-1	OppF-2a	46,9	^{5'} CTTTTAAACATTTAAACCAATCTTTAAAAATATC ^{3'}
oppF-2	OppF-3	41,8	^{5'} TAAAGATTGGTTAAATGTTAAAAAGA ^{3'}
oppF-1	OppF10	59,5	^{5'} ATGCTCGAGTTGAATTCTAGCTTATTAGGTTTTCTGTCCACTT TTAA ^{3'}
oppF-1	OppF11	51,6	^{5'} CTAACTCGAGAAGAATTCAATTTTGACATTTC ^{3'}
oppF-3	OppF-6b	47,3	^{5'} TACCCACTTGTGGTCAATTCC ^{3'}
oppF-4	OppF-6-1	48,9	^{5'} GACCACAAGTGGTAGAAACTAAT ^{3'}
oppF-4	OppF-7-1	51,3	^{5'} TTACGTGACCCCACTTCATATGTTT ^{3'}
oppF-5	OppF-7a	59,4	^{5'} GATGTCGACATATGAAGTGGGTATGCGTAAAAGATA ^{3'}
oppF-5	OppF-8	65,3	^{5'} TGGCGGCGCGCTGCAGTAATTCTTTATGTTCTTTCTCTAATTTT GCATTATGTGTCATTGT ^{3'}
RT-PCR-1	700	61,7	^{5'} GCTCCACAGCTGTACATGAACCGCTGGGAAAAAGT ^{3'}
RT-PCR-1	OPP-3	65,5	^{5'} GACCCAAAAACTAGGCTAAATAAAGGAA ^{3'}
RT-PCR-2/6	OPP-1	60,0	^{5'} ATATTGTTATGTCAATAACCTCA ^{3'}
RT-PCR-2	659	68,0	^{5'} GCCTTATATACAGGATCGGTTTCT ^{3'}
RT-PCR-3	OppC-1	49,1	^{5'} CCTGCATCTTCTCCAATTGT ^{3'}
RT-PCR-3	Oppd2	47,6	^{5'} ATACCCCTGATAGAGTGTGA ^{3'}
RT-PCR-4/5	OppD1	49,0	^{5'} ACATTGGATTGCGTTCC ^{3'}
RT-PCR-4/6	oppF1	50,7	^{5'} TCTAAGTAATCTAAAGCAAATGAAACA ^{3'}
RT-PCR-5	Genxx	48,0	^{5'} CTACTATATGAAGGCAGAAACCA ^{3'}

Primer Extension	Bezeich- nung	Tm in °C	Sequenz
	P100-pe1	53,2	5'GGACCCAAGACCAAGTAATCATAA ^{3'}
	P100-pe2	46,9	5'TACATGAAGCGGCTACTAATC ^{3'}
	<i>oppB</i> -pe1	52,6	5'ACGCTATTCTTTGTAATATATATTTTGTCA ^{3'}
Sequen- zierung			
	607	54,0	5'AGAACCACAAAAGAAAGAAGT ^{3'}
	658	64,0	5'TATGATGCTAAAATTGCAGGTAAGT ^{3'}
	659	68,0	5'GCCTTATATACAGGATCGGTTTCT ^{3'}
	665	64,0	5'ATATTAATGGCAAAGAATACACAGT ^{3'}
	1114 (OppF12)	54,8	5'AAATTGAATTCTAGCTTATTTAGGTTTTCTGTCCA- CTTTTAAA ^{3'}
	1113 (oppF13)	58,9	5'AAGGCAGATCTAAATATTTAATTTTCATATAAGCC ^{3'}
	OppF15	50,0	5'CAAGTATTGGCAAAAATAAAAACC ^{3'}
	OppF-Seq3	50,2	TTTTAATAGTCCAACATCTTCCAAT
	Type II	54,0	5'GTATAAGTTTGAAGTCTACG ^{3'}

Tabelle 1

Oligodesoxyribonukleotide 607, 658, 659, 665 und 1113-1114 wurden von PD Dr. H. Schaal (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, HHU Düsseldorf) synthetisiert; von der Firma Metabion wurden die Oligodesoxyribonukleotide p100-pe1, p100-pe2, *oppB*-pe1 synthetisiert und alle weiteren Oligodesoxyribonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG hergestellt. Das Oligodesoxyribonukleotid Type II wurde von der Firma Qiagen bezogen.

Die unterstrichenen Basen zeigen Mutationen bezüglich der genomischen DNA des *opp*-kodierenden Bereiches. Die entstandenen PCR-Produkte wurden nummeriert (siehe 1. Spalte in der Tabelle, und Amplifikationsschema in Kapitel 3.2.1, Abb.10 und Kapitel 3.3, Abb. 18). Des weiteren sind die Oligodesoxyribonukleotide für die RT-PCR, Primer Extension (p100-pe1, p100-pe2, *oppB*-pe1) und die Sequenzierung der klonierten PCR-Fragmente angegeben.

3. Methoden

3.1 Kultivierung von Bakterien

3.1.1 Mycoplasmen Kultivierung

nach Blazek *et al.*, 1990 und Feldmann *et al.*, 1992

M. hominis FBG wurde in PPLO Medium (2,1 % (w/v) PPLO Broth (Difco), 10% (w/v) Hefeextrat (Flow), 10% (v/v) mykoplasmenfreies und hitzeinaktiviertes Pferdeserum (Gibco), 0,002 % (w/v) Phenolrot) mit 1% (w/v) Arginin (Merck) und *M. pneumoniae*, wie auch *M. pulmonis* wurden in PPLO Medium mit 1% (w/v) Glucose (Merck) bis zu einer logarithmischen Wachstumsphase (Farbumschlag des Kulturmediums) kultiviert. Die Mycoplasmen wurden anschließend 20 min bei 4°C und 7000 x g zentrifugiert und bei -20°C gelagert oder direkt in die unter „Proteinchemische Methoden“ (Kapitel 3.10) beschriebenen Experimente eingesetzt.

3.1.2 Kultivierung von Bakterien mit Plasmiden

Die in Kapitel 2.2 beschriebenen *Escherichia coli* Stämme wurden aus einem Glycerinstock oder von einer Einzelkolonie in LB-Medium (20% (w/v) LB-Broth Base (Gibco BRL)) mit 50-100 µg/ml Ampicillin (Boehringer Mannheim) oder 10-25 µg/ml Kanamycin (Serva) bis zu einer OD_{600nm} von 0,7 bis 1,0 kultiviert. Die Bakterienstämme DH5aF' und BL21 besaßen keine Antibiotika-Resistenz, wohingegen DH5aF'IQ und SG13009 Kanamycinresistent waren. Die Ampicillin-Resistenz erlangten die transformierten Bakterien über ihr Plasmid. Mittels Zentrifugation bei 7000 x g, 30 min und 4°C wurden die Bakterien geerntet.

3.2 Nukleinsäureisolierungen und -aufreinigungen

3.2.1 RNA-Isolierung

nach Chomczynski & Sacchi, 1987

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte aus 2 Litern logarithmisch gewachsener *M. hominis*-Kultur nach der Vorschrift von Chomczynski und Sacchi. Alle verwendeten Lösungen wurden zur Eliminierung der möglichen RNase-Kontaminationen mit 0,04% [v/v] DEPC behandeltem H₂O angesetzt (Maniatis *et al.*, 1989). Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte anschließend gemäß Kapitel 3.7.

3.2.2 DNA-Isolierungen

Präparation genomischer DNA aus Mycoplasmen

Die Isolierung der genomischen DNA erfolgte unter Verwendung des „QIAamp Tissue Kits“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) wie von Henrich et al. (1998) beschrieben.

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

nach Birnboim & Doly, 1979

Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Lyse isoliert. Für analytische Zwecke wurden 1,5 ml Kultur nach Maniatis *et al.* (1989) präpariert, um eine Kloncharakterisierung mittels Restriktion vornehmen zu können. Plasmid-Präparationen für Sequenzierungen wurden nach „Plasmid Mini Purification Protocol“ von Roche durchgeführt. Die erhaltende DNA-Menge lag im Bereich von 1-5µg/ 1,5 ml Kultur.

Größere Mengen DNA wurden aus einer 50-100 ml Bakterienkultur nach dem Protokoll für Maxi-Präparationen von Qiagen aufgereinigt. Diese DNA-Mengen (20-50 µg) reichten für weitere Klonierungs- und DNA-Modifikationen aus.

Aufreinigung von Oligodesoxyribonukleotiden

nach Caruthers, 1982

Die in Kapitel 2.7 angegebenen Oligodesoxyribonukleotide 607, 658-659, 665, 685-704, 1113, 1114 wurden mit der „Applied Biosystems 381“ Maschine nach der Phosphoamidit-Methode synthetisiert. Mittels einer PD-10-Säule (Pharmacia) wurden die Oligodesoxyribonukleotide aus dem ammoniakalischen Milieu in 10 mM Tris/HCl pH 7,5 überführt.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

nach dem „Qiaex II Agarose Gel Extraktions“ Protokoll von Qiagen

Das gelelektrophoretisch getrennte, Ethidiumbromid gefärbte DNA-Fragment wurde unter der UV-Lampe bei einer Wellenlänge von 312 nm aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mit Hilfe des Qiagen-Kits (Qiaex II Agarose Gel Extraktion) über seine Affinität an „Glasmilch“ isoliert.

3.3 Nukleinsäuremodifizierungen

3.3.1 Restriktion

nach Maniatis *et al.*, 1989

1-2 µg Plasmid-DNA wurde mit 2,5 Units der jeweiligen Restriktionsendonuklease unter den vom Hersteller empfohlenen Inkubationsbedingungen für ein bis zwei Stunden inkubiert. Zur Restriktion von 5 µg genomischer DNA wurden 25 Units der Restriktionsendonuklease eingesetzt. Die Analyse der DNA-Fragmente erfolgte auf 0,8 – 2,0 %igen Agarosegelen (Kapitel 3.4.1)

3.3.2 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

nach Maxam & Gilbert, 1980

Um hohe Religationsraten zu vermeiden, wurden bei ungerichteten Klonierungen, d.h. bei kompatiblen Vektorenden oder „blunt-end“-Ligationen die linearisierten Vektoren mit alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) nach der Vorschrift von Maxam und Gilbert (1980) dephosphoryliert. 50 pmol der DNA-Fragment-Enden wurden mit 1 Unit alkalischer inkubiert. Die Dephosphorylierung des Vektors wurde mittels Ligation und Transformation überprüft (siehe Kapitel 3.6.1).

3.3.3 Deletionen von restringierter Doppelstrang DNA

nach Henikoff, 1984

Die Plasmid-DNA (pQE41-oppA^I, siehe Kapitel 4.3.2) wurde mit zwei Restriktionsenzymen (*Sall*, *Pst*I) geschnitten, die jeweils ein 5' und ein 3'überhängendes Ende erzeugten. Mit Hilfe der Exonuklease III wurde die geschnittene Plasmid-DNA von ihrem 5'überhängenden Ende sukzessive verkürzt. Die sukzessive Verkürzung sollte 30 Basen pro Minute betragen. Nach Angaben des Herstellers wurde die NaCl-Konzentration folglich auf 75 mM eingestellt und die Reaktion bei 21 °C durchgeführt. Mit Hilfe der S1-Nuklease wurden die Einzelstrang DNA-Bereiche anschließend entfernt, so dass die nun „blunt end“ vorliegende Plasmid-DNA mit der T4 DNA Ligase, wie in Kapitel 3.5 beschrieben, rezirkularisiert und in kompetente *E.coli* Zellen propagiert werden konnte. Nach Präparation der Plasmid-DNA einzelner *E.coli* Klone wurden die unterschiedlich deletierten Plasmid-DNAs mittels Restriktion untersucht.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

modifiziert nach Saiki *et al.*, 1988

Zur Expression der verschiedenen Opp-Protein-kodierenden Bereiche wurden Oligodesoxyribonukleotide als Primer in die PCR eingesetzt, um die Kodons TGA in TGG umzuwandeln. Um zusätzlich die Klonierung einzelner PCR-Produkte zu erleichtern, wurden Restriktionsschnittstellen in die Primersequenz eingefügt, ohne dass sich die Aminosäuresequenz veränderte.

Die PCR wurde unter den folgenden Bedingungen im DNA Thermal Cyclor 480 von Perkin Elmer oder im UNO-Thermoblock von Biometra durchgeführt. In einem Volumen von 50 µl wurden 1 ng Plasmid DNA als Template, je 100 pmol der beiden Oligodesoxy-ribonukleotide, 200 µM dNTP, 1 x High Fidelity Expand Puffer mit 1,5 mM MgCl₂ und 1,75 U Expand High Fidelity Polymerase (Roche, Deutschland) eingesetzt und die Probe 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend erfolgten 35 Zyklen mit 1 min 95°C, 1 min T_m - 2°C, 1 min plus 3 s pro Zyklus bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert (Kapitel 3.2.1).

3.3.5 Verbindung von PCR-Produkten über SOE (splicing by overlap extension)

modifiziert nach Horten *et al.*, 1989

Mit Hilfe der SOE-Methode wurden in einer ersten Reaktion zwei PCR-Fragmente (je 10 ng), die einen Überlappungsbereich von mindestens 16 Nukleotiden aufwiesen, bei einer Temperatur von 63°C hybridisiert, und die einzelsträngigen Bereiche unter Zuhilfenahme der ExpandTM High Fidelity Polymerase (Roche, Deutschland) bei einer Temperatur von 72°C aufgefüllt. In einer anschließenden PCR (siehe Kapitel 3.3.4) wurde das Gesamtfragment mit zwei endständig hybridisierenden Oligodesoxyribonukleotiden amplifiziert.

3.3.6 RT(reverse Transkriptase)-PCR

Die reverse Transkriptase PCR wurde nach dem von Henrich *et al.* (1999) beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die RT-PCR des Fragments von OppB- bis zum OppF-Protein-kodierenden Bereichs wurde mithilfe der Polymerase Expand long (Roche) nach dem von Kitzerow und Henrich (2001) beschriebenen Protokoll durchgeführt.

3.3.7 Markierung von DNA

nach der „Random Primed DNA Labeling“ - Methode der Firma Boehringer Mannheim

Zur Digoxigeninmarkierung wurden 0,5 – 1 µg DNA eingesetzt und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Konzentrationsbestimmung der Digoxigenin (Dig)-markierten DNA-Sonde wurde eine vorgegebene Dig-markierte Sonde (Boehringer Mannheim, Deutschland) von 1 ng/µl bis 0,01 pg/µl verdünnt und auf die Nylonmembran (Boehringer Mannheim, Deutschland) aufgetragen. Gleichmaßen wurde mit der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde verfahren. Nach UV-Fixierung der DNA-Proben an die Membran wurde eine Chemilumineszenzdetektion der Dig-markierten Sonde durchgeführt (siehe Kapitel 3.4). Durch Signalintensitätsvergleich von Probe und Standard wurde die Konzentrationsbestimmung der synthetisierten Sonde ermöglicht.

3.3.8 Primer Extension Analyse

nach Ayer & Dynan ,1988

Je 30 pmol der Oligodesoxyribonukleotide *p100-pe1*, *p100-pe2* und *oppB-pe1* wurden mit [32 P]dATP 4,5 h bei 37°C mit Hilfe der Polynukleotidkinase (Boeringer Mannheim) nach der Vorschrift von Richardson (1968) markiert und über eine NAP-5-Säule (Pharmacia) aufgereinigt.

Gesamt-RNA (10 µg) von *M.hominis* wurde mit den jeweiligen markierten Oligodesoxyribonukleotide in Hybridisierungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,3, 60 mM NaCl und 10 mM DTT) denaturiert. Die Hybridisierung der Oligodesoxyribonukleotide an die RNA erfolgte bei einer Temperatur, die 3°C unter der Schmelztemperatur der Primer lag (siehe Tabelle 1). Die reverse Transkription der RNA erfolgte mit Hilfe der AMV (avian myeloblastoma virus, Boehringer Mannheim) reversen Transkriptase für 1 Stunde. In einem parallelen Ansatz wurden mit den gleichen Oligodesoxyribonukleotiden Sequenzierungen an genomische DNA durchgeführt, die die gelelektrophoretische Bestimmung der exakten Länge des reverstranskribierten mRNA-Bereichs ermöglichte.

Die Sequenzierungsprodukte und die Proben der „Primer Extension“ Analyse wurden nebeneinander auf einem 8M Harnstoff-Polyacrylamidgel bei 80-100 Watt und einer Temperatur von 55-60°C für 2-4 h in der „Poker Face“ Sequenziergelkammer SE1500 (Hoeffer, San Francisco, USA) aufgetrennt. Als Gel- und Laufpuffer diente TBE-Puffer (9 mM Tris, 9 mM Borsäure, 2 mM EDTA pH 8,0). Nach der Elektrophorese wurden die beiden, das Harnstoff-Polyacrylamidgel umschließenden Platten voneinander getrennt, wobei

das Gel an der mit „BindSilan“ (10 ml Ethanol mit 330 µl 10 %iger Essigsäure und 30 µl BindSilane (Pharmacia) beschichteten Platte haften blieb. Die zweite Platte war vor dem Gießen des Gels mit einer 2 %igen Dimethyldichlorsilanlösung (Pharmacia) in 1,1,1-Trichlorethan beschichtet worden, damit diese Platte gut vom Harnstoff-Polyacrylamidgel zu entfernen war. Zur Entfernung des Harnstoffs wurde das auf der Glasplatte fixierte Sequenziergel für 10 min in 10 %iger Essigsäurelösung und anschließend gründlich in aqua dest. gewaschen. Nach dem Trocknen des Gels (1 h bei 80°C) wurde ein Screen (Kodak) für 1-3 Tage bei Raumtemperatur aufgelegt, der anschließend mittels des Phosphorimagers FLT 3000 (Fuji) analysiert wurde.

3.4 Nukleinsäurechromatographie

3.4.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA unter nativen Bedingungen

nach Maniatis *et al.*, 1989

DNA-Fragmente von 100 bp bis 50 kb wurden in 0,7-2,0 % igen Agarosegelen unter Verwendung von 0,5 x TBE (4,5 mM Tris, 4,5 mM Borsäure, 1,0 mM EDTA, pH 8,0) aufgetrennt. Die mit 1/6 Volumen Probenpuffer (0,25 % [w/v] Bromphenolblau, 0,25 % [w/v] Xylencyanol), 15 % [v/v] Ficoll 400) versetzte DNA wurde bei 40 mA (80 V) 1 bis 2 h bei RT im Agarosegel aufgetrennt. Zur Anfärbung der DNA-Fragmente wurde das Gel nach dem Lauf für die Dauer von 20 min in 0,1 % iger Ethidiumbromidlösung inkubiert. Mittels des Modul-Digit-Store-Duo-Geräts (Intas, Göttingen) wurde das Ethidiumbromid-gefärbte Gel photographiert.

3.4.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA unter denaturierenden Bedingungen (Formaldehydgel)

modifiziert nach Maniatis *et al.*, 1989

Die zu analysierende Mycoplasmen-RNA (40 µg) wurde in RNA-Probenpuffer (7 % [v/v] Formaldehyd, 50 % [v/v] Formamid, in 1 x MOPS) aufgenommen, 10 min bei 68°C denaturiert und bis zum Auftragen der Probe auf Eis gestellt. Die RNA-Probe wurde kurz vor der Auftrennung im Formaldehydgel mit 1/10 Volumen Auftragspuffer (50 % [v/v] Glycerin, 1 mM EDTA, pH 8,0, 0,25 % [w/v] Bromphenolblau, 0,25 % [w/v] Xylenzyanol) versetzt. Die gelelektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte in einem 1 % igen Agarosegel, das 2,2 M Formaldehyd und 1 x MOPS (0,2 M MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7,0) enthielt, für 3 h bei 80 V (50-60 mA). Die Markerspur wurde vom Gel getrennt,

Ethidiumbromid-gefärbt und photographiert. Die zu analysierende RNA wurde durch Diffusionstransfer aus dem Gel auf Nylonmembran transferiert (Kapitel 3.4.3). Zur Beseitigung möglicher RNase Kontaminationen wurden die verwendeten Lösungen mit 0,04 % DEPC (Maniatis *et al.*, 1989) vorbehandelt.

3.4.3 Nukleinsäuretransfer auf eine Membran

Der Nukleinsäuretransfer von DNA und RNA wurde nach der in Maniatis *et al.* (1989) beschriebenen Methode mit folgenden Modifikationen durchgeführt:

Vor Transfer auf Nylonmembran wurde die gelelektrophoretisch getrennte DNA denaturiert (2 x 15 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl)) und anschließend in einer 2 x 15 minütigen Inkubation neutralisiert (Neutralisationslösung (0,5 M Tris/HCl, pH 7,5, 3 M NaCl)).

Die im Formaldehydgel aufgetrennte RNA wurde 5 bis 10 min in H₂O gewaschen, um das Formaldehyd zu entfernen, und anschließend zweimal 20 min in 10 x SSC (1,5 M NaCl, 15 mM Natriumcitrat, pH 7,0) geschwenkt. Der Transfer der DNA und RNA auf die Nylonmembran (Boehringer Mannheim, Deutschland) erfolgte bei RT 3 h bis 16 h in einer Kapillarblotkammer (Capillary blotting Unit; Scotlab Ltd.) nach Vorschrift des Herstellers. Als Transferlösung wurde 10 x SSC verwandt. Die DNA und RNA wurden über UV-Strahlung mit 0,6 J/cm² mit der Membran quervernetzt.

Zur Visualisierung des membranfixierten RNA-Längenstandards wurde dieser mit Methylengrün gefärbt (Maniatis *et al.*, 1989).

3.5 Hybridisierung und Chemilumineszenzdetektion

modifiziert nach Southern, 1975

Die Southern- und Northernblot Analysen erfolgten nach der in Maniatis *et al.* (1989) beschriebenen Methoden mit folgenden Modifikationen:

Die über UV-Quervernetzung an die Nylonmembran gekoppelte DNA und RNA wurde in Churchpuffer (7 % [w/v] SDS, 50 mM Natriumphosphat, pH 7,0) eine Stunde bei 65 °C prähybridisiert und über Nacht bei 65 °C mit der Dig-markierten DNA-Sonde (10-12 ng/ml für DNA, 20-25 ng/ml für RNA) hybridisiert. Zum Entfernen der ungebundenen DNA-Sonde wurde die Membran 30 min bei 65°C und danach noch mal 40 min bei RT in Phosphatpuffer (40 mM Natriumphosphat, pH 7,2, 1 % (w/v) SDS) gewaschen.

Die Detektion der Dig-markierten DNA-Sonde erfolgte nach Herstellerangaben mit Anti-Digoxigenin-Antikörpern, die mit alkalischer Phosphatase konjugiert waren. Die Visualisierung Hybridisierungs-positiver Banden erfolgte mittels enzymatischer Dephosphorylierung des Chemilumineszenzsubstrats CSPC[®] (Boehringer Mannheim, Deutschland) durch die alkalische Phosphatase, wobei das emittierte Licht zur Schwärzung eines Röntgenfilms (Kodak) führte.

3.6 Klonierung

3.6.1 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden mit dem Ligationsskit „T4 DNA Ligase“ von der Firma AGS (Heidelberg) durchgeführt. Bei Ligationen wurde das molare Verhältnis von Vektor- zu Insert-DNA 1:2 gewählt. Die Ligationenansätze wurden 2-3 h bei 22 °C oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert oder direkt zur Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien eingesetzt.

3.6.2 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* modifiziert nach Hanahan, 1995

Zu 100 µl einer aufgetauten, kompetenten *E. coli* Bakterien-Suspension (nach Manatis *et.al.*, 1989) wurden 5-10 ng Plasmid-DNA gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz 2 min bei 42°C erhitzt und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Zur Regeneration der Zellen wurden diese mit 400 µl SOC-Medium (2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,05 % (w/v) NaCl, 20 mM Glucose) versetzt und 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Im Anschluß daran wurde der gesamte Transformationsansatz auf die mit entsprechenden Antibiotika versetzten LB-Platten (1,5 % Agar in LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin oder / und 25 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet.

3.7 Spektralphotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die spektralphotometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration einer Lösung erfolgte nach der von Maniatis *et al.* (1989) beschriebenen Methode.

Die Konzentration wurde folgendermaßen berechnet:

1 OD_{260nm} $\equiv$ 50 μ g /ml DNA
 $\equiv$ 40 μ g/ml RNA
 $\equiv$ 33 μ g/ml Oligodesoxyribonukleotide

3.8 DNA-Fällung

nach Maniatis *et al.* , 1989

Durch die Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat und 3 Volumen 96 % Ethanol wurde die Präzipitation von DNA bei einer 30-minütigen Inkubation bei -70 °C bewirkt. Die DNA wurde durch Zentrifugation bei 11.000 x g, 15 min und 4°C gewonnen. Nach Waschen des DNA-Niederschlags mit kaltem 70 % igen Ethanol und anschließendem Trocknen wurde die DNA in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5 oder H₂O aufgenommen.

3.9 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden vom BMFZ (Biologisch-Medizinisches-Forschungs-Zentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) auf der ABI 373A Maschine nach der Didesoxy-Chain Reaktion (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt.

3.10 Proteinchemische Methoden

3.10.1 Expression rekombinanter Proteine

modifiziert nach Döbeli *et al.*, 1990

Für analytische Zwecke wurden 2,5 ml LB-Amp/Kan-Medium (mit 100 μ g/ μ l Ampicillin und/oder 25 μ g/ml Kanamycin) mit 0,5 ml der Bakterienübernachtskultur von *E. coli* DHa F'IQ oder SG13009 (mit den Plasmiden pQE 40, pBX oder pXB) und für präparative Analysen 500 ml mit 10 ml der Bakterienübernachtskultur beimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,7 bis 0,9 unter Schütteln angezüchtet. Aus der Bakterienkultur wurden 1 ml als Negativkontrolle entnommen, und die verbleibende Bakterienkultur mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) zur Expression des gewünschten Proteins induziert. Die Bakterienkultur wurde für weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 10.000 x g geerntet. Entweder wurde das Bakterienpellet direkt in Probenpuffer (10 % [v/v] SDS, 0,4 M Tris/HCl, pH 6,8, 0,1 % [w/v] Bromphenolblau, 25 % [v/v] Glycerin, 5 % [v/v] β -Mercaptoethanol) aufgenommen und bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung (Kapitel 3.10.2) bei -20°C gelagert oder bei -70°C

eingefroren, um eine spätere Aufreinigung der rekombinant exprimierten Proteine zu ermöglichen (siehe Kapitel 3.10.4).

3.10.2 **Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Eindimensionale Proteinauftrennung

nach Laemmli, 1970

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Tris-Glyzin-Puffern nach der Methode von Laemmli (1970). Die Proteine (Zelllysate oder aufgereinigte Proteine) wurden 10 min bei 95°C im Probenpuffer (10% (w/v) SDS; 0,4 M Tris/HCl pH 6,8; 0,1% (w/v) Bromphenolblau; 25% (v/v) Glycerin; 5% (v/v) β -Mercaptoethanol) denaturiert und in 8-12 %igem SDS-Polyacrylamidgelen, je nach Molekulargewicht der zu trennenden Proteine, mittels eines Vertikalgelelektrophorese-Systems (Life Technology) aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandards wurden der „Low- bzw. High- Range-Standard“ (Gibco, BRL) und der „Prestained“ Standard (Low, High) von Biorad verwendet.

Zweidimensionale Proteinauftrennung

nach O'Farrell *et al.*, 1975

Zur hochauflösenden Proteintrennung wurden die Proteine in der 1. Dimension nach der Methode von O'Farrell unter NEPHGE-Bedingungen gemäß ihrer Ladung für insgesamt 7200 Vh separiert und in der 2. Dimension nach ihren Molekulargewichten getrennt.

Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen

Für die **Coomassie-Färbung** wurden die Gele für mindestens 1h bei RT in einer Lösung aus 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250 (Serva), 10% (v/v) Eisessig, 40% (v/v) Ethanol in aqua dest. geschwenkt. Zur Entfärbung der proteinfreien Bereiche wurde das Gel mit 7% (v/v) Essigsäure, 5% (v/v) Ethanol unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Methode lassen sich Proteinmengen ab ca. 100 ng/Bande nachweisen.

Um geringe Proteinmengen von bis zu 5 ng/Bande visualisieren zu können, wurde eine **Silberfärbung** angewendet (Blum *et al.*, 1987). Das Prinzip dieser Gelfärbung besteht darin, dass Formaldehyd im alkalischen Milieu Silberionen in Proteinkomplexen schneller reduziert als solche, die nicht an Proteine gebunden sind. Die Färbereaktion ist stark pH-abhängig und

kann durch Ansäuern gestoppt werden. Nach mindestens 3 h Fixierung in 50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure, 0,0185% (v/v) Formaldehyd wurde das Gel 2 x 10 min in 50 % (v/v) Methanol und 1 x 10 min in 30 % (v/v) Ethanol gewaschen. Anschließend wurde es in 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat 1 min inkubiert und 3 x 10 sek gewässert. Nach einer 20 minütigen Inkubation in 2% (w/v) Silbernitrat, 0,028% (w/v) Formaldehyd wurde das Polyacrylamidgel gewässert und mit 6% (w/v) Natriumcarbonat, 0,004% (w/v) Natriumthiosulfat, 0,0185% (v/v) Formaldehyd bis zur gewünschten Intensität entwickelt. Die Reaktion wurde mit 25% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure gestoppt.

3.10.3 Westernblotanalyse

Gelelektrophoretischer Proteintransfer

nach Towbin *et al.*, 1979

Die Übertragung der gelelektrophoretisch getrennten Proteine aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell) erfolgte in einer Semitrockenblot-Apparatur (Phase, Mölln) unter Verwendung eines Gel-Membran-Sandwichs mit puffergetränkten Filterpapieren (Whatman 3MM, Maidstone), für 45 min bei 0,8 mA/cm². Je drei Filterpapiere waren mit Kathodenpuffer (25 mM Tris, 40 mM 6-Aminohexansäure, 20% Methanol), Anode I-Puffer (30 mM Tris, 20 % Methanol) oder Anode II-Puffer (300 mM Tris, 20 % Methanol) getränkt und bildeten ein Sandwich aus Kathodenpuffer-getränktem Whatman-Papier, Polyacrylamidgel, Nitrozellulosemembran, Anodenpuffer I-getränktem Whatman-Papier und Anodenpuffer II-getränktem Whatman-Papier.

Immundetektion

Nach dem Transfer der gelelektrophoretisch getrennten Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran wurden die proteinfreien Bindungsstellen der Membran mit 5 % Milchpulver/PBS gesättigt (30 min RT) und die Membran anschließend mit dem 1. Antikörper (Verdünnung je nach Qualität des Antikörpers pur bis 1/100 in 1% Milchpulver in PBS) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membran mit PBS wurden die gebundenen Antikörper durch 1 h Inkubation mit Peroxidase-konjugierten Ziege-anti-Maus-Antikörpern oder Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpern (1:5000 verdünnt;

Dianova) markiert und nach drei weiteren Waschschritten durch Substratumsatz mit ECL (Pierce) nach Angabe des Herstellers sichtbar gemacht.

3.10.4 Affinitätschromatographische Aufreinigungen von Proteinen

Herstellung der Affinitätssäulen

Zur Herstellung der Affinitätssäulen wurden Proteine (250-500 µg) bzw. aufgereinigte Antikörper (1 - 3,5 mg) an 0,25 g CNBR-aktivierte SepharoseTM 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech) gekoppelt, indem die Sepharose mit 1 mM HCl aktiviert und 4 h mit dem Protein/Antikörper auf dem Drehrad inkubiert wurde. Danach wurde das ungebundene Protein bzw. Antikörper aufgefangen und die an der Sepharose noch vorhandenen freien Bindungsstellen mit 25 mM Tris/HCl, pH 8,5 über 1 ½ h – 16 h blockiert. Im Anschluss wurde die Säule 6 mal alternierend mit 25 mM Natriumacetat, pH 3,55 und 25 mM Tris/HCl, pH 8,5 gewaschen und zum Schluss in PBS äquilibriert.

Aufreinigung von Membranproteinen aus *M. hominis*

Die Affinitätssäulen mit den gekoppelten monoklonalen Antikörpern DC10, KD2, BA10, LF8 oder CG4 wurden mit *M. hominis* Zelllysate (mit bis zu 30 mg Protein in 5 ml PBS- 1% IGEPAL (Sigma) oder 0,5 % n-Dodecyl-β-Maltoside (ICN) für mindestens 1 h inkubiert. Nach Waschen der Säulenmatrix mit dem 20 x Säulenvolumen wurde das gebundene Protein mit 3,5 M MgCl₂ (DC10- und KD2-Säulen) oder mit 3,5 M Natriumthiocyanat in PBS (BA10- und LF8- und CG4-Säulen) eluiert und mittels Dialyse in den gewünschten Puffer überführt.

Aufreinigung von polyklonalen Kaninchenserum

Die polyklonalen Kaninchenserum gegen OppC und OppD wurden 1:2 in PBS verdünnt und mit den jeweiligen Sepharose gekoppelten Antigenen für 1-2 h inkubiert. Das nicht gebundene Kaninchenserum wurde aufgefangen und das Säulenmaterial mit dem 20 fachen Säulenvolumen PBS gewaschen. Die Elution gebundener Antikörper erfolgte sukzessive mit Natriumdihydrogenphosphat, pH 4; Dinatriumhydrogenphosphat, pH 10; und 3,5 M

Natriumthiosulfat in PBS. Der pH-Wert der Eluate wurde auf pH 7,5 eingestellt, und die Proben im ELISA auf Reaktivität mit dem Antigen getestet.

Aufreinigung rekombinanter Proteinen aus *E.coli*

Die Aufreinigung der rekombinanten Fusionsproteine OppB^{2r} und OppC^{2r} (siehe Kapitel 4.2) erfolgte nach dem Protokoll von Kitzerow *et al.* (1999) unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von 8M Harnstoff über eine Ni-NTA-Säule (Qiagen). Die Elution des gebundenen Proteins von der Ni-NTA-Säule erfolgte bei pH 4,5.

Die affinitätschromatographische Aufreinigung der Protein C-Epitop tragenden Fusionsproteine OppA, OppD und OppF erfolgte nach Rezaie *et al.* (1992) unter nativen Bedingungen.

Für die Herstellung von polyklonalen Kaninchenseren wurden die Proteine aus Polyacrylamid-Gelen ausgestochen oder nach Aufreinigung aus der Lösung lyophilisiert. Zur Generierung der polyklonalen Kaninchenseren wurden die aufgereinigten Proteine (400µg) zur Firma Eurogentec (Belgien) geschickt, die die Immunisierung durchführten.

3.10.5 Osmotische Lyse von Mycoplasmen und Trennung von Membran und

Zytoplasma

nach Razin, 1981a

Die in 500 ml Argininmedium kultivierten (siehe Kapitel 3.1) und anschließend gewaschenen Zellen von *M. hominis* FBG wurden in 200µl 1:3 verdünntem PBS resuspendiert, zur Lyse der Zellen auf 10 ml mit H₂O aufgefüllt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. In der Ultrazentrifuge wurden die Membranbestandteile 30 min bei 4°C mit 34.000 x g sedimentiert. Der zytoplasmatische Überstand wurde in der Vakuum-Zentrifuge auf ein Volumen von 500 µl eingeeengt, wohingegen das Membranpellet nach Resuspension in 10 ml H₂O ein zweites Mal zentrifugiert wurde. Die Membranfraktion und der zytoplasmatische Überstand wurde im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im Westernblot analysiert (siehe Kapitel 3.10.3).

3.10.6 Immunpräzipitation von Membranproteinen

modifiziert nach Davidson & Nikaido, 1991

Aus einer 250 ml logarithmisch gewachsenen Argininkultur wurden die Mycoplasmen geerntet und mittels osmotischem Schock lysiert. Membranproteine wurden mittels n-

Dodecyl- β -Maltosid (Endkonzentration 1%) in einer 30 minütigen Inkubation bei 4°C aus der Membran gelöst, so dass Proteinkomplexe noch bestehen blieben. Durch Zentrifugation (23.000 x g, 30min, 4°C) wurden die löslichen von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt. Im Anschluss wurde der Überstand auf 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 20% (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) BSA, 0,01% (w/v) n-Dodecyl- β -Maltosid (Puffer C) eingestellt und mit den aufgereinigten polyklonalen Kaninchenseren gegen OppB, OppC oder OppD (1:40 Verdünnung) über Nacht bei 4°C inkubiert. Antigen-Antikörperkomplexe wurden mit Hilfe der Protein G-Sepharose gefangen (2-4 h bei 4°C), anschließend zweimal mit Puffer C, dreimal mit Puffer C plus 0,35 M NaCl und zweimal mit Puffer C ohne BSA gewaschen. Das Präzipitat wurde in 1 x Probenpuffer aufgenommen und gelelektrophoretisch analysiert (3.10.2).

3.10.7 Festphasen Antikörperfänger-ELISA (enzyme-linked immunosorbent-assay)

nach Miles & Hales, 1968 – modifiziert nach Henrich *et al.*, 1996

Die Analyse der Antikörper bzw. polyklonalen Seren erfolgte nach dem von Henrich *et al.*, 1996 beschriebenen ELISA-Protokoll.

3.10.8 Bindungsstudien mit Sepharose-gekoppeltem ATP

modifiziert nach Communi *et al.*, 1993

Sepharose-gekoppeltes ATP (100 μ l; immobilisierte quervernetzte 4% Agarose, Spacer 22 Å, 2,1 μ mol ATP/ ml Matrix) wurden mit dem 10 fachen Säulenvolumen Puffer A (20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 2 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, 0,01 % (w/v) n-Dodecyl- β -Maltosid) gewaschen. Mycoplasmenzelllysate (1mg Protein) bzw. 0,5 – 1 mg aufgereinigte Proteine (natives OppA (OppAⁿ), rekombinantes OppA (OppA^r), rekombinantes OppD (OppD^r), natives P50 (P50ⁿ), rekombinante DHFR (DHFR^r) wurden für 2 h bei 4°C unter Rotation mit dem ATP-Säulenmaterial inkubiert. Anschließend wurden die ATP-Säulen mit Puffer A gewaschen und die gebundenen Proteine mit 2, 20 und 200 mM ATP eluiert. Die Analyse der eluierten Proteine erfolgte über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (3.10.2).

3.10.9 Untersuchung der ATP-Bindung mittels limitierter Trypsin-vermittelter Proteolyse

nach Schneider *et al.*, 1994

Mit Hilfe dieses Versuchs sollte die Bindung von ATP an Proteine gezeigt werden, indem das proteolytische Spaltmuster dieser Protein nach vorheriger Inkubation mit und ohne ATP untersucht wurde. Wurde ATP vom Protein gebunden, so sollte es durch die Bindung des ATPs und die Konformationsänderung des Proteins zu einem veränderten tryptischen Spaltmuster im Vergleich zum Spaltmuster ohne ATP kommen.

Die zu analysierenden Proteine (natives OppA, rekombinantes OppA, rekombinantes OppD, natives P60 und rekombinantes MalK) wurden in Puffer T (50mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 20 % (v/v) Glycerin) gepuffert und auf eine Konzentration von 1 mg/ml gebracht. Vor Zugabe von Trypsin wurde die Probe mit 5mM MgCl₂ und 5mM ATP 10 min bei 4°C inkubiert. Die limitierte proteolytische Spaltung des aufgereinigten Proteins wurde durch Zugabe von Trypsin (Endkonzentration 8 mM) gestartet, und nach 15, 30 und 60 min wurden Proben entnommen. Durch Zugabe von Lämmli-Probenpuffer bzw. eines Trypsininhibitors (Endkonzentration 40 mM) wurde die Proteolyse gestoppt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Das proteolytische Spaltmuster wurde im SDS-Polyacrylamidgel analysiert (siehe Kapitel 3.10.2).

3.10.10 Epitopkartierung

Zur Kartierung der Epitope des OppA Proteins wurden 9 Peptide im Bereich der Aminosäuren 149-176 und 12 Peptide im Bereich der Aminosäuren 370-406 mit jeweils 15 Aminosäuren synthetisiert, von denen 13 Aminosäuren mit dem nachfolgenden Peptid identisch waren. Zusätzlich wurde das bekannte P50-Epitop (Henrich *et al.* (1996)), das vom BA10 Antikörper erkannt wurde, synthetisiert. Die Peptide wurden nach der SPOT-Methode von Frank und Döring (1988) entsprechend den Angaben des Herstellers (Cambridge Research Biochemicals, Cambridge, GB) synthetisiert.

Zur Analyse der Peptide wurden diese in der Immunfärbung mit den monoklonalen Antikörpern DC10, LG3, BG11 und TF6 untersucht (Kapitel 3.10.3).

3.10.11 *In vitro* und *in vivo* Phosphorylierung

modifiziert nach Dirksen *et al.*, 1994

100 ml einer logarithmisch gewachsenen *M. hominis* Kultur (5×10^8 CCU/ml) wurden zentrifugiert und die Bakterien in 10 ml phosphatfreiem Argininmedium weiter kultiviert (siehe Kapitel 3.1). Zur Markierung der Zellen wurde [32 P]- Phosphorsäure (3.500 Ci/mmol) bis zu einer Endkonzentration von 30 μ Ci/ml zum Reaktionsansatz hinzugefügt und die Zellen 1 bis 2 h bei 37°C kultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen geerntet und in TS-Puffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5) gewaschen.

Für die *in vitro* Phosphorylierung wurden die Mycoplasmen, wie oben beschrieben, kultiviert und geerntet und anschließend durch dreimaliges alternierendes Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 4°C lysiert. Zur Markierung mit [32 P]ATP wurden 30 μ Ci (3.000 Ci/mmol) zum Reaktionsansatz hinzugefügt und dieser 30 bis 60 min bei 37°C inkubiert.

Die Aufreinigung der Proteine OppA, P60, P80, P50 und EF-Tu erfolgte affinitätschromatographisch wie in Kapitel 3.10.4 beschrieben.

3.10.12 Fluoreszenzspektroskopie

modifiziert nach Guyer *et al.*, 1986

Das Membranprotein OppA wurde mit Hilfe von 0,5% n-Dodecyl- β -D-Maltosid in PBS (pH 7,3) aus der Membran gelöst und affinitätschromatographisch (Kapitel 3.10.4) aufgereinigt. Das Fluoreszenzspektrum wurde mit einem Shimadzu RF-5001 PC Spektrofluorometer und einem SLM- 8000 (Instruments Urban) aufgenommen. Für das Emissionsspektrum wurde der Anregungsspalt auf 3 nm und der Emissionsspalt auf 5 nm eingestellt. Alle Messungen wurden mit aufgereinigtem OppA Protein in einer Konzentration von 0,15 mg/ml für die Analysen mit Lys₃ und Ala₃ in einem Imidazolpuffer (10 mM Imidazolacetat (pH 7,3), 100 mM NaCl, 0,03% n-Dodecyl- β -Maltosid) durchgeführt, und für die Analysen mit Ala₅ und Ala₃ in einem Natriumphosphatpuffer (10 mM Natriumphosphat (pH 7,0), 0,03% n-Dodecyl- β -Maltosid). Die Peptide (Lys₃, Ala₃, Ala₅ und Ala₃) wurden jeweils in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt. Als Negativkontrolle diente die jeweilige OppA-Probe ohne das angegebene Peptide unter Zusatz des reinen Puffers. Das aufgereinigte OppA wurde erst 10 Minuten mit dem jeweiligen Peptid bei Raumtemperatur inkubiert und dann der Messung bei einer Anregungswellenlänge von 290 nm unterzogen. Das Fluoreszenzemissionsspektrum wurde von 300 nm bis 430 nm bei Raumtemperatur aufgezeichnet.

3.10.13 ATP-Hydrolyse Assay

nach Henkel *et al.*, 1988

Mit Hilfe des ATP-Hydrolyse Assays sollte die Eigenschaft der ATP-bindenden Proteine, ATP in ADP und Phosphat zu hydrolysieren, untersucht werden, wobei die ATP-Hydrolyse-Aktivität über die Bestimmung des freiwerdenden Phosphats gemessen wurde.

Zur Quantifizierung des Phosphatumsatzes wurde eine Eichkurve erstellt, in der NaH_2PO_4 in einer Konzentration von 0,5 bis 20 nmol angesetzt wurde. Nach Zugabe einer Ammoniummolybdatlösung (5,72 % (w/v) Ammoniummolybdat in 6 M HCl, 2,5 % Polyvinylalkohol, 0,0812 % (w/v) Malachitgrün) bildete sich der farbige Komplex Ammoniummolybdatphosphat, dessen Farbintensität bei 620 nm im Spektrophotometer gemessen wurde.

Die aufgereinigten Proteine (OppA^+ , OppD^+ , MalK^+) wurden in phosphatfreier Lösung auf eine Konzentration von 500 nM eingestellt und 3 min bei 37°C inkubiert. Durch Hinzufügen von ATP (2 mM) und MgSO_4 (10 mM) wurde die Reaktion gestartet. Das Experiment wurde nach 10 min gestoppt und die ATP-Hydrolyse-Aktivität durch die Messung des freien Phosphates unter Verwendung der Eichkurve bestimmt.

3.10.14 Einfrieren, Auftauen und Kultivierung von Hybridomzellen

Zur Konservierung wurden die Hybridomzellen gezählt, zentrifugiert und in vorgekühltem Einfriermedium resuspendiert. Aliquots von 1 ml mit ca. 10^5 Zellen wurden langsam auf -70°C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur erneuten Kultivierung wurden die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen schnell aufgetaut und durch langsame Zugabe von 10 ml DMEM (Dulbecco modified eagels medium; Gibco BRL) verdünnt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Zellen in DMEM, 10 % (v/v) FCS, 1% (v/v) Nutridoma (Boehringer Mannheim) resuspendiert und in einer Verdünnungsreihe in Zellkulturplatten (24 well) überführt. Nach 4-10 Tagen wurde das wachstumsfördernde Reagenz Nutridoma aus der Zellkulturlösung entfernt. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage mit frischem DMEM, 10 % (v/v) FCS versorgt.

Die Hybridomzellen wurden in DMEM, 10% FCS kultiviert und in Kulturflaschen bis zu einem Volumen von 850 ml expandiert und bis zum Indikator-Umschlag des Mediums ins Gelborange bebrütet. Der zellfreie Überstand wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die

Konzentration der Antikörper in den Hybridomzellkulturüberständen betrug in der Regel 5 -25 µg/ml.

3.10.15 Computerprogramme und Internetadressen

Zur Auswahl von Oligodesoxyribonukleotiden und für die Analyse von DNA- und Protein-Sequenzen wurde das Computerprogramm Lasergene (DNA STAR Inc., Madison, Wis.) verwendet.

Die Auswertung der ELISA-Daten wurde mit Hilfe des Graph Pad Prism Computerprogramm durchgeführt.

Internet-Recherchen wurden unter www.genebee.msu.su zur Analyse von Transkriptionsstopps und unter www.ncbi.nlm.nih.gov sowie www.tigr.org für Homologievergleiche und Sequenzanalysen verwendet.

Die Sequenzen der Opp-Loci verschiedener Mycoplasmen Spezies sowie Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien sind bei EMBL unter folgender Accession-Nummer zugänglich.

Spezies	Accession-Nummer.
<u>Mycoplasma hominis</u>	X99740
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	AL445564
<i>Mycoplasma genitalium</i>	U39688.1
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	AE000058.2
<i>Bacillus subtilis</i>	Z99110.1
<i>Haemophilus influenzae</i>	U32706
<i>Salmonella typhimurium</i>	X05491.1

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des *opp* Locus

Ein 100 kDa Membranprotein von *Mycoplasma hominis*, welches von uns anfänglich als P100 bezeichnet wurde, zeigte sich neben P50, einem 50 kDa Lipoprotein, an der Zytadhärenz dieses zellwandlosen Prokaryonten beteiligt (Henrich *et al.*, 1993).

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollte der P100-genkodierende Bereich sequenziert und das von der Genstruktur abgeleitete P100 Protein auf homologe Sequenzmerkmale mit anderen bereits identifizierten Proteinen untersucht werden. Nach Bestimmung der ersten 10 Aminosäuren eines V8-Protease generierten P100 Peptides gelang die Ableitung eines P100-spezifischen Oligodesoxyribonukleotides, mit dessen Hilfe überlappende genomische Fragmente (*Hind*III-Klon 1, *Hind*III-Klon 2, *Eco*RI-Klon 1 und *Rsa*I-Klon 1) identifiziert und sequenziert wurden (Abb. 2). Wie bereits in meiner Diplomarbeit (Dürr, 1997) dargestellt, konnte im folgenden der genkodierende Bereich des P100 (OppA) Proteins ermittelt werden. Stromabwärts des P100 kodierenden Bereichs wurden bis zu Beginn der hier dargestellten Experimente zwei weitere proteinkodierende Regionen identifiziert (Abb. 2).

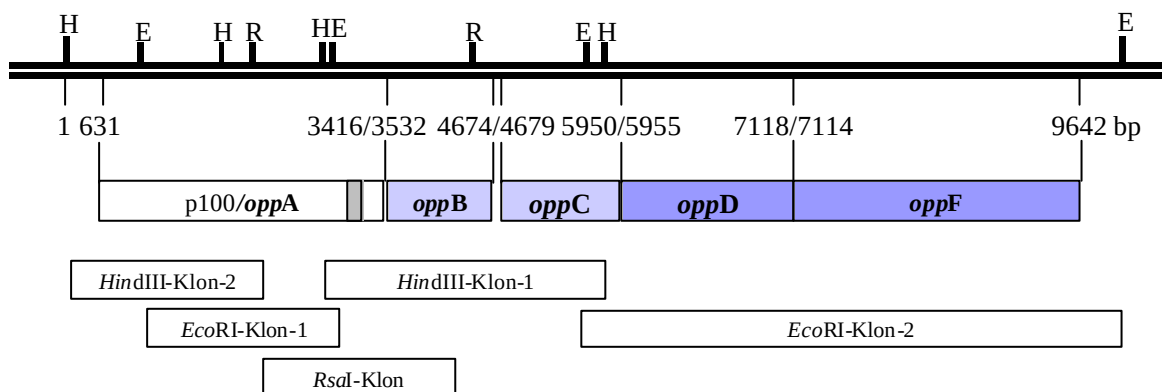


Abb. 2 Physikalische Karte des *opp*-Locus

Darstellung des sequenzierten genomischen Bereichs von *M. hominis* mit den wichtigsten Restriktionschnittstellen (E: *Eco*RI, H: *Hind*III, R: *Rsa*I). Darunter ist schematisch die Position der fünf kodierten *opp*-Gene (*oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* und *oppF*) dargestellt und ihre Position bezüglich des sequenzierten Bereichs (Accession No. X99740), sowie die fünf Restriktionsfragmente (*Hind*III-Klon 1, *Hind*III-Klon 2, *Eco*RI-Klone 1 und 2 und der *Rsa*I-Klon), die zur Sequenzierung herangezogen wurden. Der schraffierte Kasten im *oppA*-Gen markiert die Lage des von der N-terminalen OppA-Proteinsequenz abgeleiteten Oligodesoxyribonukleotids.

□ Gen der Substrat-bindende Domäne, □ Gene der Poren-bildenden Domänen, ▨ Gene der ATP-bindenden Domänen

Diese beiden von der Gensequenz abgeleiteten Proteine wurden aufgrund ihrer Homologie zu den hydrophoben Domänen von Oligopeptidpermeasen (Opp) anderer Bakterien (*Bacillus subtilis* und *Salmonella typhimurium*) als OppB und OppC bezeichnet. In meiner Diplomarbeit hatte ich die These aufgestellt, dass das P100 Protein die Substrat-bindende Domäne OppA der postulierten Oligopeptidpermease in *M. hominis* ist und folglich in OppA umbenannt wurde. Der proteinkodierende Bereich von OppC wurde von dem *Hind*III-Klon-2 nicht vollständig abgedeckt. Es bestand aufgrund von Northernblot-Analysen (siehe Diplomarbeit und Abb. 6) die Vermutung, dass stromabwärts des OppC-kodierenden Bereichs weitere Gene vorhanden sein müssten, die ebenfalls für Proteine der putativen Oligopeptidpermease in *M. hominis* kodieren.

Zu Beginn meiner Doktorarbeit habe ich das Restriktionsfragment *Eco*RI, welches mit dem genomischen-*Hind*III-Fragment (*Hind*III-Klon1) überlappt, kloniert, und sequenziert. Wie vermutet lagen zwei weitere offene Leserahmen (ORF) stromabwärts des OppC-kodierenden Bereichs (Abb. 2). Insgesamt konnte mit den fünf sich überlappenden DNA-Fragmenten (*Hind*III-Klon 2, *Eco*RI-Klon 1, *Rsa*I-Klon 1, *Hind*III-Klon-1, *Eco*RI-Klon 2) ein Bereich von 10,4 kb des *M. hominis* FBG Genoms sequenziert werden, der fünf offene Leserahmen (ORF) enthielt (Abb. 2, *oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* und *oppF*), die im weiteren näher analysiert wurden.

Der erste offene Leserahmen kodierte für das Membranprotein OppA und umfasste 2,9 kb (Abb.2). Stromaufwärts des Protein-kodierenden Bereichs wurde eine putative ribosomale Bindungsstelle (AAGGA) 10 bp vor dem Translationsstartkodon ATG identifiziert. Im N-Terminus der vom *oppA*-Gen abgeleiteten Polypeptidkette konnte eine Signalsequenz von 28 Aminosäuren identifiziert werden (Abb. 3), die aus einer Transmembranhelix im Bereich der Aminosäuren 7 bis 26 und einer Signalpeptidase II-Erkennungsregion in Position 27 bestand. Es war anzunehmen, dass die Signalpeptidase II den N-terminalen Bereich des OppA Proteins vor dem Cystein (LVAASCKIDPA) abtrennt und das reife OppA Protein über das Cystein an ein Lipid gekoppelt in der Membran verankert wurde. Der Versuch, diese Annahme durch Sequenzierung des N-Terminus zu bestätigen, schlug fehl. Der Großteil des OppA-Proteins war nicht sequenzierbar, was auf einen geschlossenen N-Terminus hindeutete.

Das vom *oppA*-Gen abgeleitete reife Protein hat eine kalkulierte Masse von 105,5 kDa und einen isoelektrischen Punkt von pI 7,7.

Datenbank-Analysen mit der gesamten OppA-Protein Sequenz wiesen Homologien zu oligopeptidbindenden Proteinen (OppA) der Permeasen von *Bacillus subtilis*, *Salmonella*

typhimurium und *Haemophilus influenzae* auf (Abb. 3). Weitere homologe Proteine wurden unter den putativen OppA Proteinen in *Mycoplasma pulmonis* (25 %), *M. genitalium* (19,0 %) und *M. pneumoniae* (20 %) identifiziert.

Von Higgins wurde 1992 beschrieben, dass die Gene, die für die Proteine einer Permease kodieren, in einer Operonstruktur organisiert sind. Die genkodierenden Bereiche der putativen OppA Proteine von *M. genitalium* und *M. pneumoniae* lagen jedoch nicht in einer Operonstruktur mit den Genen *oppBCDF* vor, sondern waren an anderen Stellen im Genom dieser Organismen lokalisiert. Die Homologien zum OppA Protein von *M. hominis* fielen sehr gering aus, bis auf die zum putativen OppA Protein von *M. pulmonis* (Abb. 3). Wurde aber die OppA Proteinregion zwischen den Aminosäuren 197 bis 257 für Homologievergleiche (Abb. 3 schraffierter Bereich) ausgewählt, so zeigten sich Ähnlichkeiten von 20 % bis 44 % zu den entsprechenden Bereichen der anderen OppA Proteine.

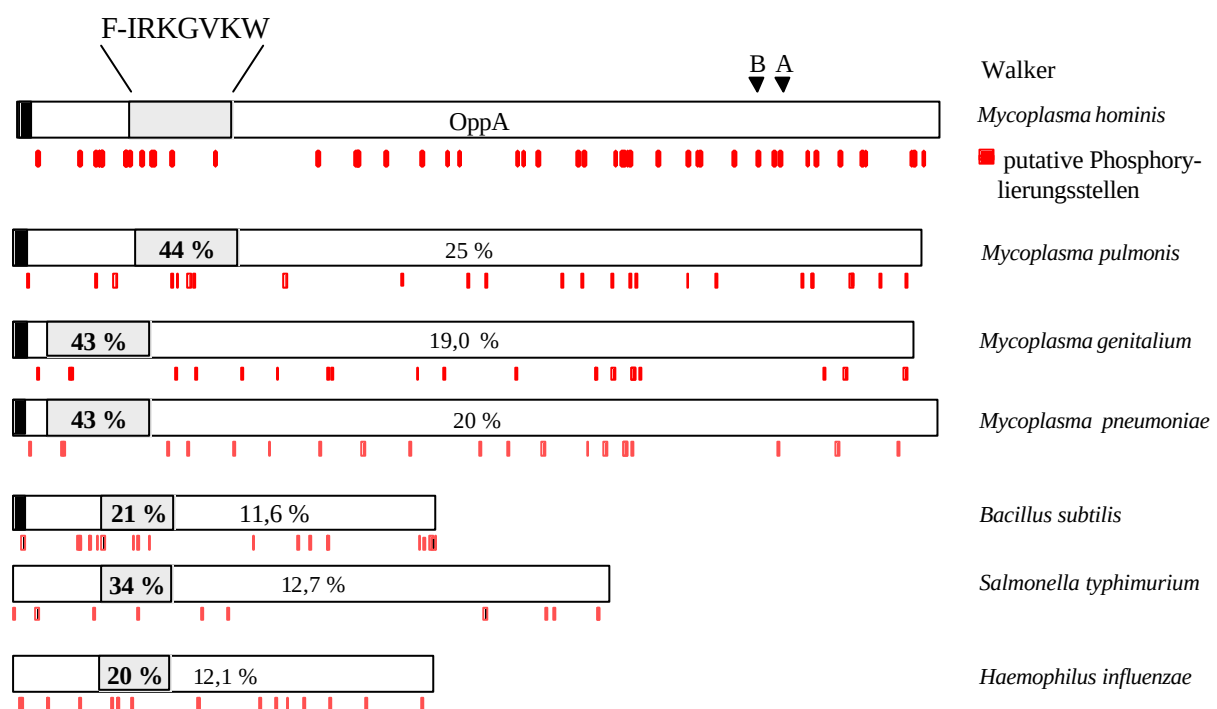


Abb. 3 Schematische Darstellung der Sequenzmerkmale von OppA Proteinen verschiedener Spezies

Die jeweiligen OppA Proteine verschiedener Spezies sind als helle Balken dargestellt. Die einzelnen per Computer ermittelten Merkmale wie Signalpeptidsequenz (schwarzer Kasten), putative Konsensussequenz Peptid-bindender Proteine (schraffierter Bereich) mit Angaben zur Identität in Prozent zum OppA Protein der Aminosäuren 197-257, putative ATP-Bindungsstelle (Walker A und B) und die möglichen Phosphorylierungsstellen wurden schematisch dargestellt. Die Homologien der hier dargestellten OppA Proteine verschiedener Bakterien zum OppA Protein von *M. hominis* sind in Prozent angegeben.

Es fanden sich ebenfalls Homologien zu OppA-fremden Proteinen, die jedoch auch peptidbindende Eigenschaften aufwiesen. Dieses Ergebnis führte zur Identifizierung einer

Konsensussequenz (F-IRKGVKW) für peptidbindende Proteine, welche mit der von OppA übereinstimmte (Henrich *et al.*, 1999).

Eine große Anzahl von Enzymen, die Nukleotide binden und/oder hydrolysieren, besitzen einen kurzen aber hoch konservierten Sequenzbereich, die Phosphatbindungsschleife (P-loop) oder Walker A Sequenz, die als erstes in der β -Untereinheit der F_1 -ATPase identifiziert wurde (Walker *et al.*, 1982, Saraste *et al.*, 1990). Diese von Walker beschriebene resultierende Konsensussequenz für dieses Motiv (G-X-X-X-X-G-K-T/S) wurde zur Identifizierung neuer nukleotidbindender Proteine verwendet. Computergestützte Untersuchungen führten zur Identifizierung einer putative ATP-Bindungsstelle im OppA Protein von *M. hominis*, die durch die Walker A und Walker B Sequenzen gekennzeichnet war (Abb. 3, Walker A und B). Die Walker A Sequenz war im OppA sehr konserviert (nt 869-GKDSSGKS-nt 876), wohingegen die Walker B-Sequenz (nt 737-RFDGVTGENLLAWSAD-nt 752) weniger homologe Bereiche zeigte. Diese ATP-Bindungsstelle wurde nicht in den OppA Proteinen anderer Bakterien identifiziert.

Zusätzlich zeigten sich überraschenderweise mehrere mittels Computeranalyse identifizierte Phosphorylierungsstellen (cAMP-Kinase, Proteinkinase C und Caseinkinase II), die über die gesamte OppA Protein Sequenz verteilt auftraten. Da es sich bei dem OppA-Protein um ein Oberflächen-lokalisiertes Protein handelt (Henrich *et al.*, 1993) und Phosphorylierungen dieser extrazellulären Proteine bislang selten dokumentiert wurden sollte dieser Befund Bestandteil der Charakterisierung des OppA Proteins sein und wird in späteren Experimenten dargestellt werden (Kapitel 4.3.9). Die OppA Proteine anderer Spezies wiesen nach computerunterstützten Analysen weniger Phosphorylierungsstellen als das OppA Protein von *M. hominis* auf (Abb. 3).

Die Untersuchungen der vier offenen Leserahmen stromabwärts des *oppA* Gens zeigten hohe Homologien zu den vier Hauptdomänen der Oligopeptidpermeasen (Opp) in *Bacillus subtilis* (Perego *et al.*, 1991) und *Salmonella typhimurium* (Higgins *et al.*, 1985), die bereits proteinchemisch untersucht wurden. Der erste ORF begann 15 bp stromabwärts des *oppA* Gens von *M. hominis* und kodierte für ein 42,6 kDa Protein mit Homologien von 21,5 % bis 38 % zum OppB Protein von *M. pulmonis*, *M. genitalium* und *M. pneumoniae*, sowie *B. subtilis*, *S. typhimurium* und *H. influenzae* (Abb.4). Der zweite ORF lag 1bp stromabwärts des *oppB* Gens und kodiert ein putatives 47,2 kDa Protein, welches Ähnlichkeiten zum OppC von *M. pulmonis*, *M. genitalium* und *M. pneumoniae* sowie *B. subtilis*, *S. typhimurium* und *H. influenzae* im Bereich von 22,2 % bis 32 % aufwies. Die Proteine OppB und OppC sind

integrale Membranproteine, die die Poren durch die Membran der Oligopeptidpermease bilden. Die Ähnlichkeit zwischen den integralen Membranproteinen von *M. hominis* OppB und OppC zu den Proteinen anderer Spezies stieg auf bis zu 66,6 % (*M. pulmonis*) wenn nur der Bereich zwischen dem vierten und fünften membrandurchspannenden Bereich betrachtet wurde (Abb. 4, helles Viereck). Dieser auf der cytoplasmatischen Seite gelegene „Loop“ wurde als Bindungsstelle der ATP-bindenden Proteine der ABC-Transporter postuliert (Higgins, 1992). Von Dassa und Hofnung (1985) wurde für diesen Bereich eine Konsensussequenz mit der Sequenz EAA---G-----I-LP für 61 integrale Membranproteine von 35 Importsystemen identifiziert. Für die von mir untersuchten OppB Proteine von *M. hominis*, *M. pulmonis*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* und *H. influenzae* konnte eine Konsensussequenz der OppB Proteine -TA--KGL-----H--RN-LP und für die OppC Proteine eine Konsensussequenz -AA---G----R-IF-H-ILP identifiziert werden, die mit der oben beschriebenen Sequenz von Dassa und Hofnung teilweise übereinstimmen.

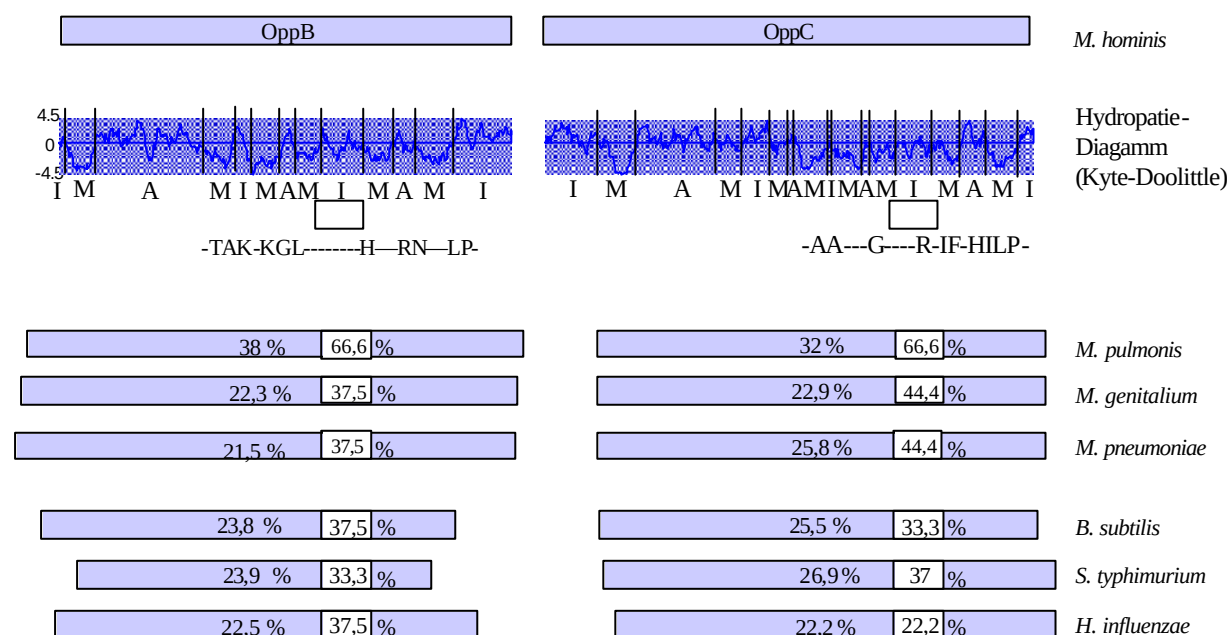


Abb. 4 Hydropathie-Diagramm und Homologievergleich der Proteine OppB und OppC

Die OppB und OppC Proteine verschiedener Spezies sind schematisch als grauer Balken dargestellt. Die hydrophoben (-) und hydrophilen (+) Bereiche der beiden membrandurchspannenden Domänen OppB und OppC führten zu den mittels Computeranalyse identifizierten membrandurchspannenden Bereichen (M), den cytoplasmatischen Bereichen (I) und extrazellulären Bereichen (A). Die cytoplasmatischen Bereiche zwischen dem 4. und 5. membrandurchspannenden Bereich sind mit einem hellen Viereck kenntlich gemacht und die prozentuale Identität zum Bereich in *M. hominis* angegeben. Die Homologien der untersuchten Spezies zu den OppB und OppC Proteinen von *M. hominis* sind in Prozent angegeben.

Weitere charakteristische Merkmale der hydrophoben integralen Membrandomänen OppB und OppC waren die membrandurchspannenden Bereiche, von denen normalerweise sechs pro Protein identifiziert wurden (Hiles *et al.* 1987). Abweichend von dieser Regel wurden in *S. typhimurium* auch fünf (HisQ) oder in *E. coli* acht (MalF) Transmembranbereiche identifiziert. Mittels Computeranalyse konnten in *M. hominis* sechs Transmembranbereiche für OppB und acht membrandurchspannende Bereiche für das OppC Protein ermittelt werden.

Zu Beginn der dieser Promotionsarbeit zugrunde liegenden Experimente wurden der dritte und vierte offene Leserahmen identifiziert und analysiert. Der dritte offene Leserahmen kodiert für ein 43,8 kDa Protein mit Homologien zu OppD, einer der beiden ATP-bindenden Domänen der Permease. Mit einer Überlappung von 4 bp folgte stromabwärts der OppF proteinkodierende Bereich. Die Größe des abgeleiteten OppF Proteins entsprach mit 98,8 kDa der Größe der OppF Proteine, die in weiteren Mycoplasmen identifiziert wurden. OppF Proteine anderer Bakterien waren mit einer Größe von 40 bis 45 kDa deutlich kleiner (Abb. 5).

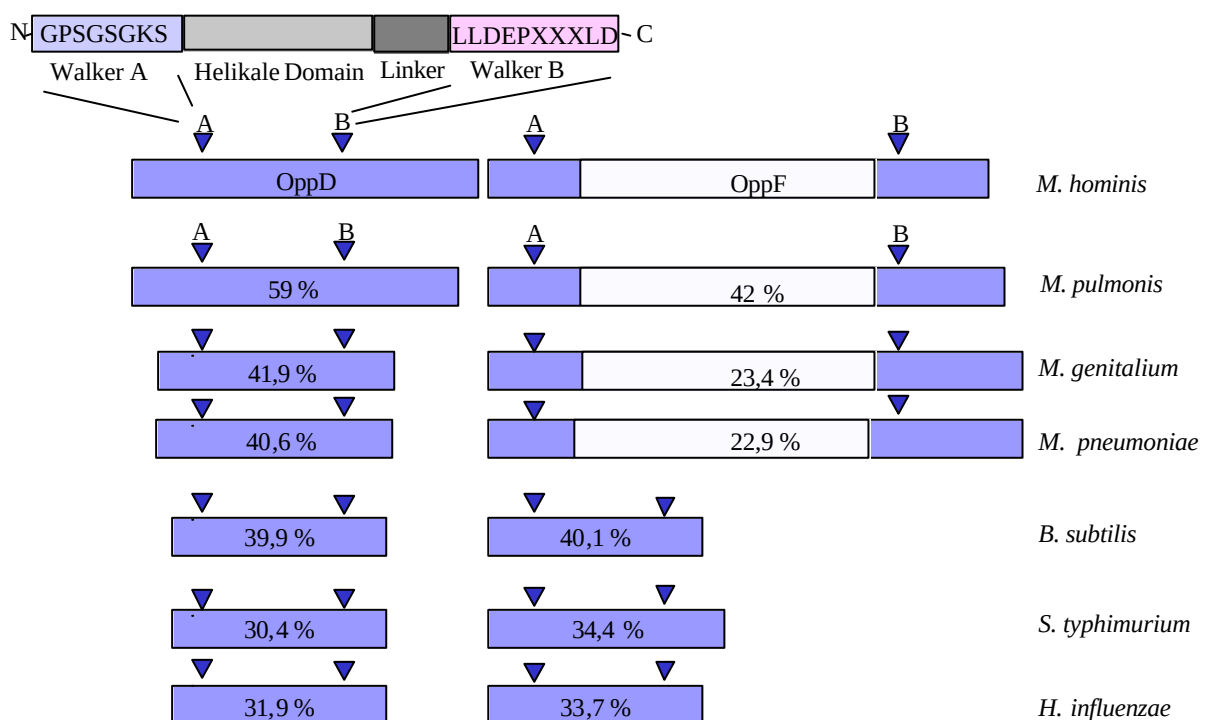


Abb. 5 Schematische Darstellung der ATP-bindenden Proteine OppD und OppF

Die Proteine OppD und OppF sind als dunkler Balken und die Walker A und B Sequenz mit einem markierten Dreieck dargestellt. Darüber ist schematisch die konservierte Walker A Sequenz, die helikale Domäne, der Linker und die nicht so konservierte Walker B Sequenz gezeigt. Der gepunktete Bereich in den mycoplasmalen OppF Proteinen kennzeichnet den nicht homologen Bereich zu OppF Proteinen anderer Spezies. Homologien der OppD und OppF Proteine von *M. hominis* zu anderen OppD und OppF Proteinen anderer Spezies sind in Prozent angegeben.

OppD von *M. hominis* zeigte Homologien im Bereich von 30,4 % bis 59 % zu *M. pulmonis*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* und *H. influenzae* wie es für ATP-bindende Proteine beschrieben wurde (Higgins, 1992). Die Homologie des OppF Proteins von *M. hominis* war gering zu den OppF Proteinen von *M. genitalium* (23,4 %) und *M. pneumoniae* (22,9 %). Zu den OppF Proteinen von *M. pulmonis*, *B. subtilis*, *S. typhimurium* und *H. influenzae* zeigte es Sequenzhomologien von 33,7 % bis 42 % (Abb. 5).

In der Sequenz der OppD und OppF Proteine wurden zwei charakteristische Sequenzmotive identifiziert. Diese als Walker A (P-loop) und Walker B bezeichneten Sequenzmotive sind das charakteristische Merkmal der Superfamilie, der ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter (Higgins, 1990). Die Bereiche der Walker A und Walker B Sequenz bilden die ATP-Bindungstasche. Der Bereich von 100 Aminosäuren, der die Region zwischen Walker A und Walker B Sequenz umfasst, ist ebenfalls konserviert. Er besteht aus einer helikalen Region, die sich in OppD von *M. hominis* zwischen den Aminosäuren 90 bis 200 erstreckt und einem sogenannten Linker Bereich (Aminosäuren 200 – 213), der Glycin- und Glutamin-reich ist. Die helikale Region im OppF Protein von *M. hominis* wird durch einen zusätzlichen Einschub von 532 Aminosäuren (Aminosäure 125 bis 657) unterbrochen. Wie in Abbildung 5, gezeigt wurde dieser Bereich nur in den OppF Proteinen von Mycoplasmen identifiziert und wies Homologien (17,8 %) zu einem charakteristischen Merkmal im Myosin der eukaryontischen Zelle auf. Welche Funktion dieser Bereich in mycoplasmalen OppF Proteinen einnimmt ist noch unklar. Im Bereich der Aminosäuren 460 bis 483 konnte mittels Computeranalyse ein Leucin Zipper-Motiv identifiziert werden. Dieses Struktur-Motiv kommt in vielen DNA-Bindeproteinen vor, indem zwei α -Helices aus getrennten Proteine sich in Form einer Doppelwindel zu einem Reißverschluß-artigen Protein-Dimer verbinden. Hier handelt es sich um einen der wichtigsten Mechanismen, die in Eukaryontenzellen zur Regulation der Genexpression verwendet werden.

Die Analyse der stromaufwärts und stromabwärts des *opp*-Genlocus ermittelten DNA-Sequenzen zeigte, dass auf dem kodogenen Strang 300 bp stromaufwärts und 500 bp stromabwärts der detektieren Operonstruktur keine weiteren offenen Leserahmen identifiziert werden konnten. Außerhalb diese Bereichs wurde nur auf dem Gegenstrang stromabwärts des OppF-kodierenden Bereichs ein weiterer offener Leserahmen in der Position 10205 bis 9711 detektiert. Das von der Gensequenz abgeleitete Protein zeigte Homologien zu einer ribosomalen Untereinheit der Pseudouridine Synthase. Bisher sind die Pseudouridine ein Rätsel in der RNA-Welt. Sie wurden in tRNA, rRNA, snRNA und snoRNA gefunden. Die

weiteren identifizierten offenen Leserahmen zeigten keine Homologien zu anderen bekannten Proteinen.

4.1.1 Fünf Gene und eine mRNA

Die Gene, die für die Domänen eines Oligopeptidtransporters kodieren, werden in *Bacillus subtilis* und *Salmonella typhimurium* polycistronisch transkribiert (Ames, 1986). Die Abstände zwischen den Genen *oppABCDF* waren in *M. hominis* gering bzw. überlappten sogar im Fall von *oppD* und *oppF*. Purinreiche Regionen, die auf eine ribosomale Bindungsstelle hinweisen, wurden 10 bp vor dem *oppA* Gen, 14 bp vor dem *oppC* Gen, 16 bp vor dem *oppD* Gen und 10 bp vor dem *oppF* Gen in *M. hominis* gefunden. Vor dem *oppB* Gen konnte keine ribosomale Bindungsstelle identifiziert werden.

In meiner Diplomarbeit hatte ich in Northernblotanalysen bereits gezeigt, dass mit Hilfe der drei Digoxigenin-markierten Sonden *oppA*, *oppB* und *oppC* jeweils eine 9,5 kb mRNA detektiert wurde (Abb. 6).

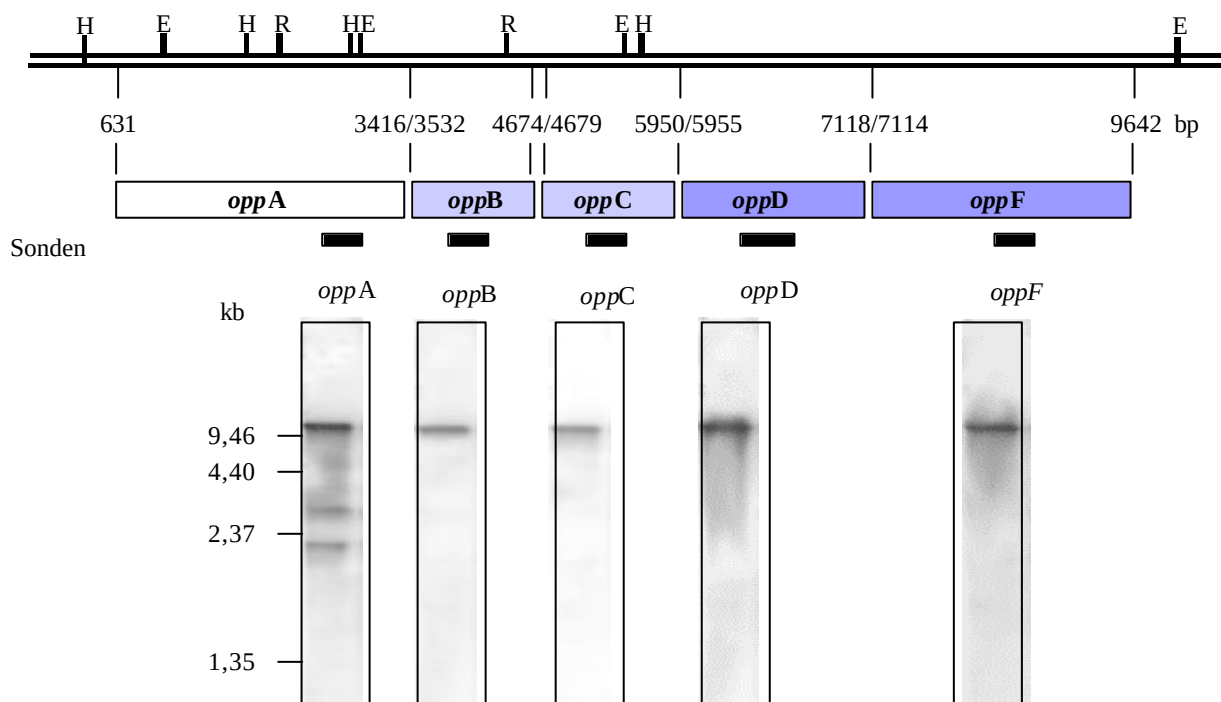


Abb.6 Northernblot-Analyse der fünf *opp*-Gene

Je 40µg *M. hominis* FBG RNA wurden in einem 1 %igen Formaldehydgel aufgetrennt und mit einer der fünf Digoxigenin-markierten Sonden (*oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* und *oppF*) im Northernblot detektiert. Die relative Lage der *oppABCDF* Sonden in den zu untersuchenden Genen *oppABCDF* ist als schwarzer Balken dargestellt. Als Marker ist eine 0,24 – 9,5 RNA-Leiter (Gibco BRL) verwendet worden. Es wurden die wichtigsten Restriktionsschnittstellen (E: *EcoRI*, H: *HindIII*, R: *RsaI*) der genomischen DNA in diesem Bereich von *M. hominis* eingezeichnet.

Nachdem nun ebenfalls die sich stromabwärts anschließenden Gene *oppD* und *oppF* identifiziert worden waren, konnte in der Northernblotanalyse die Transkription der proteinkodierenden Bereiche von *OppD* und *OppF* analysiert werden. Wie in Abbildung 6 zu sehen, werden die Gene von *oppD* und *oppF* auch von einer 9,5 kb mRNA transkribiert. Dies deutete darauf hin, dass alle fünf *opp*-Gene polycistronisch organisiert sind. Mit Hilfe des internet-zugängigen RNA-Analyseprogramm GeneBee (Kapitel 3.10.15) wurde die 10,4 kb Sequenz auf mögliche Transkriptionsstopps untersucht. Es zeigte sich, dass der Bereich zwischen Nukleotid 9663 und 9683 mit dem Bereich 9716 bis 9696 mit einer Energie von $-25,3$ Kkal/mol hybridisieren, so dass sich in der mRNA eine Haarnadelstruktur ausbilden kann, welche den Transkriptionsstopp bewirken könnte. Dieser Bereich lag 24 Nukleotide hinter dem TAA-Kodon des *oppF* Gens. Die Sequenz (Stamm-AAATAAAAAAATTAGACTCTT-Schleife-GACTAAAACT-Stamm-AAGAGTCATTT-TTTTATTT) der Haarnadelstruktur, besteht aus einer A/T reichen Region im Gegensatz zu den in *E.coli* bevorzugt vorkommenden G/C-reichen Haarnadelstruktur. Weitere Internet-unterstützte Computeranalysen zeigten, dass sich 40 bp stromabwärts des *oppA* Gens auch eine Haarnadelstruktur mit $-13,0$ Kkal/mol in der mRNA ausbilden konnte (nt 3552-3560-Stamm-AAGAATAGC-Schleife-GTTT-Stamm-GCTATTCTT nt 3565-3573), so dass dies möglicherweise einen Transkriptionsstopp hinter dem *OppA*-Protein-kodierenden Bereich bewirken könnte.

Weitere potentielle Abbruchstellen für die Transkription konnten in größerer Entfernung vom *oppA* Gen identifiziert werden, wiesen aber alle eine viel niedrigere Energie zur Ausbildung der Haarnadelstruktur auf, so dass anzunehmen war, dass es hauptsächlich nach dem *OppF*-kodierenden Bereich zum Transkriptionsstopp kommt.

Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, konnte mit der *oppA* spezifischen Sonde neben der 9,5 kb mRNA zusätzlich eine 3,3 und eine 2,2 kb mRNA detektiert werden. Es schien, dass die 2,2 kb mRNA ein Degradationsprodukt der 3,3 kb mRNA war, da in anderen Experimenten eine Abnahme des Signals der 3,3 kb mRNA mit der Zunahme des 2,2 kb mRNA Signals verknüpft war. Dieser Befund und die Identifikation eines Transkriptionsstopps 40 bp stromabwärts des *OppA* kodierenden Bereichs, führte zu der Annahme, dass das *oppA*-Gen auch unabhängig von den anderen *opp* Genen exprimiert werden kann und somit eventuell eine weitere Funktion in *M. hominis* innehat, die nichts mit der Substrat-Bindung der *Opp*-Permease zu tun hat.

Zum Beweis, dass in der Northernblotanalyse von den Gen-spezifischen Sonden dieselbe mRNA detektiert wurde, schloss ich eine RT-PCR Analyse an, in der die intergenischen

Bereiche von *opp*ABCD_F an cDNA amplifiziert wurden. Wie in Abbildung 7 dargestellt, wurden diese intergenischen Bereiche zwischen benachbarten Genen amplifiziert (Spuren 1, 2, 3 und 4). Desweiteren konnte an die cDNA ein Amplifikat vom *opp*B Gen bis ins *opp*F Gen mit Hilfe der Long-Expand Polymerase (Roche) erhalten werden, welche für die Amplifikation von langen PCR-Fragmenten geeignet war (Spur 6), so dass die polycistronische Organisation der fünf *opp* Gene bewiesen war. Wie zu erwarten, war eine Amplifikation an die cDNA vom *opp*D kodierenden Bereich zu einem Bereich, der stromabwärts des postulierten Transkriptionsstopps lag, nicht möglich (Spur 5 c).

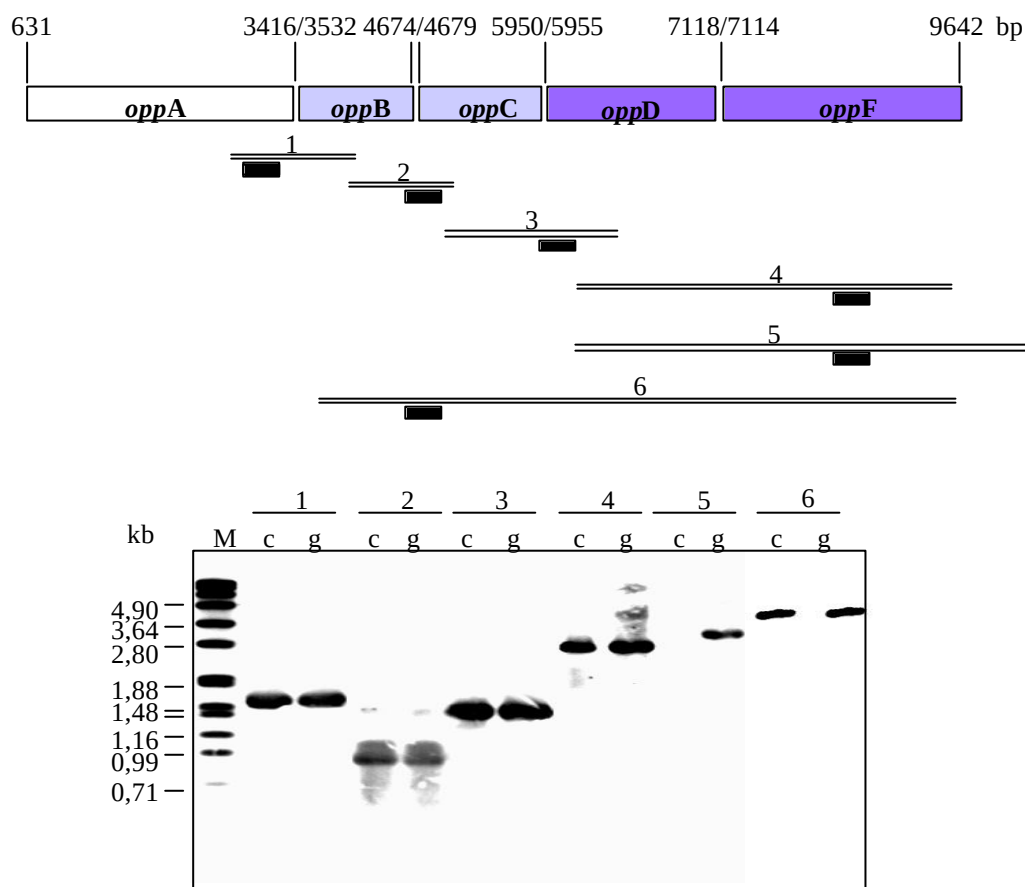


Abb.7 RT-PCR-Analyse

Ausgehend von cDNA und genomischer DNA von *M. hominis* FBG wurden in dem Bereich der Gene *opp*ABCD_F PCR-Amplifikate hergestellt, deren Position bezüglich des sequenzierten *opp*-Locus schematisch dargestellt sind. Nach Southerntransfer erfolgte die Detektion der PCR-Amplifikate mit den in der Abbildung schwarz eingezeichneten Dig-markierten DNA-Sonden. Als Längenstandard (M) ist ein Dig-markierter Marker VII (Boehringer Mannheim) verwendet worden.

Als Positivkontrolle wurden die entsprechenden Amplifikation an genomische DNA durchgeführt (Abb. 7, Spur c). Diese RT-PCR bestätigt die bereits durch die Northern-

blotanalyse erhaltenen Ergebnisse, dass die Gene *opp*ABCD*F* polycistronisch organisiert sind, und der Transkriptionsstopp der mRNA stromabwärts des *OppF* kodierenden Bereichs liegt.

4.1.2 Transkriptionsgrenzen des *opp* Operons

Wie in den vorhergehenden Experimenten gezeigt werden konnte, sind die fünf *opp*-Gene polycistronisch organisiert. Der Transkriptionsstart der 9,5 kb mRNA sollte mit Hilfe der „Primer Extension“-Methode bestimmt werden (siehe Kapitel 3.3.8), indem zwei Oligodesoxyribonukleotide des *oppA* Gens (*oppA*-pe1 und *oppA*-pe2) und ein Oligodesoxyribonukleotid des *oppB* Gens (*oppB*-pe1) ausgewählt wurden.

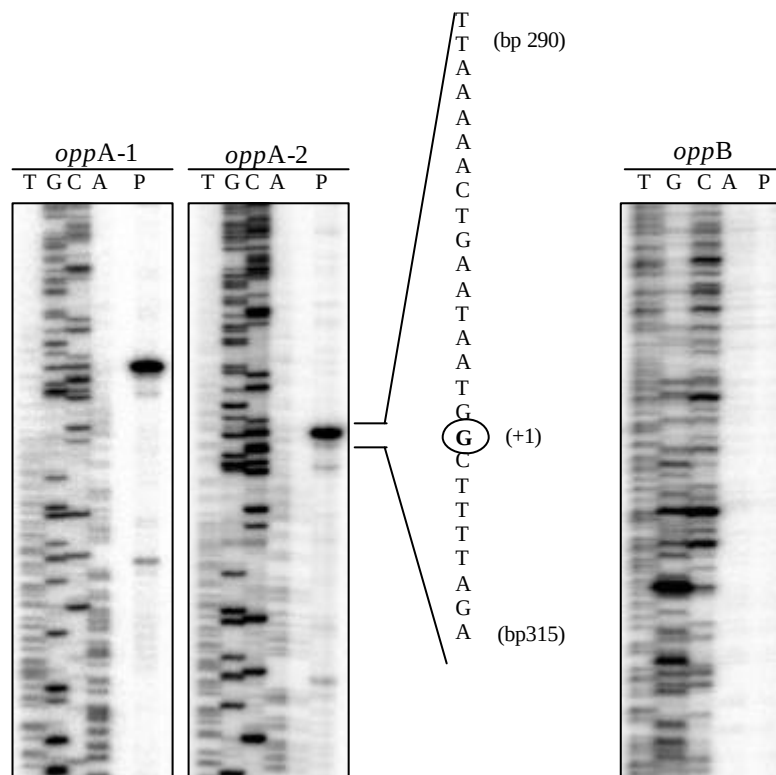


Abb.8. Primer Extension Analyse des *opp*-Operons

Der Transkriptionsstart der 9,5 kb RNA wurde durch Primer Extension mit zwei ? [³²P] ATP-markierten Oligodesoxyribonukleotiden des *oppA* Gens (*oppA*-pe1 und *oppA*-pe2) und einem ? [³²P] ATP-markierten *oppB* spezifischen Oligodesoxyribonukleotid (*oppB*-pe1) ermittelt (Spur P). Um den Transkriptionsstart zu bestimmen, wurde eine Sequenzierung (TGCA) an genomischer DNA von *M. hominis* mit denselben Oligodesoxyribonukleotiden durchgeführt. Die Nukleotidsequenz des Transkriptionsstarts (+1) ist dargestellt.

Alle drei Desoxyribonukleotide hybridisierten an den kodogenen Strang stromabwärts des ATG-Kodons der Gene *oppA* und *oppB*. Mit diesen Desoxyribonukleotiden wurden reverse

Transkriptionen der mRNA durchgeführt, und parallel mit den gleichen Desoxyribonukleotiden dieser Bereich in der genomischer DNA sequenziert.

Mit dem Desoxyribonukleotid *oppB*-pe1 wurde kein distinktes Reaktionsprodukt erhalten (Abb.8, *oppB*-P), wohingegen mit beiden *oppA*-Primern-pe1 und -pe2 der Transkriptionsstartpunkt der 9,5 kb mRNA als Guanodin in der Position 307 bezüglich des sequenzierten Bereichs bestimmt werden konnte. Demzufolge liegt der Start der polycistronischen mRNA 323 Nukleotide vor dem Startkodon des *OppA* proteinkodierenden Bereichs. Die Analyse der Promotorregionen zeigte 10 bp vor dem Transkriptionsstart die (–10) Region mit der Sequenzfolge [TAAAAA] und die (–35) Region mit der Sequenz [TATATT]. Aufgrund des hohen AT-Reichtums von Mycoplasma-Sequenzen ist die theoretische Bestimmung von Transkriptionsstart und Promotorstrukturen fehlerbehaftet. Die Konsensussequenz der bisher untersuchten (–10) Regionen deckt sich gut mit den bereits untersuchten Regionen in Mycoplasmen. Wohingegen die (–35) Region in Mycoplasmen meist nicht so konserviert ist (Gafny *et al.*, 1988; Taschke & Herrman, 1985; Yamao *et al.*, 1988).

Per Computer wurde ein weiterer Transkriptionsstart 77 Nukleotide vor dem ATG-Kodon des *oppB* kodierenden Bereichs postuliert. Dieser lies sich durch das Ergebnis der „Primer Extension“-Analyse nicht bestätigen. In den Bereichen stromaufwärts der anderen drei Gene, *oppC*, *oppD* und *oppF* wurden keine signifikanten Promotorstrukturen vorhergesagt. Aus den hier dargelegten Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die fünf *opp*-Gene polycistronisch organisiert sind, die Transkription 323 bp stromaufwärts des Translationskodons des *oppA* Gens beginnt und stromabwärts des offenen Leserahmens des *OppF* Proteins endet. Diese Ergebnisse haben wir im Journal of Bacteriology veröffentlicht (Henrich *et al.*, 1999).

4.2 Die Oligopeptidpermease von *M. hominis*

Proteine, deren Gene polycistronisch organisiert sind, werden in der Regel zeitgleich benötigt; sie sind entweder funktionell oder strukturell (z.B. als Protein eines Komplexes) miteinander verbunden. Folglich konnte aufgrund der bisher erhaltenen Ergebnisse und den in der Literatur beschriebenen Resultaten angenommen werden, dass die in *M. hominis* identifizierten Gene *oppABCDF* für eine Oligopeptidpermease kodieren, die sich aus dem substratbindenden Protein OppA, den zwei porenbildenden Proteinen OppB und OppC, sowie den beiden ATP-bindenden Proteinen OppD und OppF zusammensetzt. Zur Absicherung dieser These habe ich in den weiteren Experimenten die Expression dieser fünf Proteine analysiert.

4.2.1 Generierung und Expression der Proteine Opp B, OppC, OppD und OppF

Für die Analyse der Expression und Lokalisation der Proteine OppB, OppC, OppD und OppF standen zu Beginn meiner Arbeit keine Antikörper zur Verfügung, so dass ich zunächst diese Proteine rekombinant herstellen wollte, um sie zur Generierung Protein-spezifischer polyklonaler Seren verwenden zu können. Zur weiteren Charakterisierung des OppA Proteins existierten bereits vier monoklonale Antikörper (TF6, BG11, DC10, LG3).

Für die heterologe Expression der Proteine in *E. coli* stellte sich folgende Problematik: In Mycoplasmen kodiert das TGA Kodon für die Aminosäure Tryptophan, welches bei Expression in *E. coli* einen Abbuch der Translation bewirken würde. Demzufolge mussten die TGA-Kodons in den proteinkodierenden Bereichen der vier *oppBCDF* Gene vor der Expression im *E. coli* in TGG-Kodons verändert werden. Mit Hilfe von Oligodesoxyribonukleotiden wurden die Sequenzen zwischen zwei TGA-Kodons amplifiziert und gleichzeitig über die Punktmutationen in der Sequenz der Oligodesoxyribonukleotide das TGA-Kodon in TGG umgewandelt. Desweiteren wurden die Oligodesoxyribonukleotide so ausgewählt, dass benachbarte PCR Amplifikate jeweils um mindestens 16 Nukleotide überlappten, so dass sie, wie in Abbildung 9 dargestellt, mit Hilfe der SOE (splicing by overlap extension)-Methode (Kapitel 3.4.5) miteinander fusioniert werden konnten. Die erhaltenen PCR-Produkte konnten mittels generierter Restriktionsschnittstellen an den Enden der PCR-Fragmente in den Expressionsvektor pBX kloniert werden, der das Protein in Fusion mit dem C-terminal anhängenden Protein-C-Epitop exprimiert.

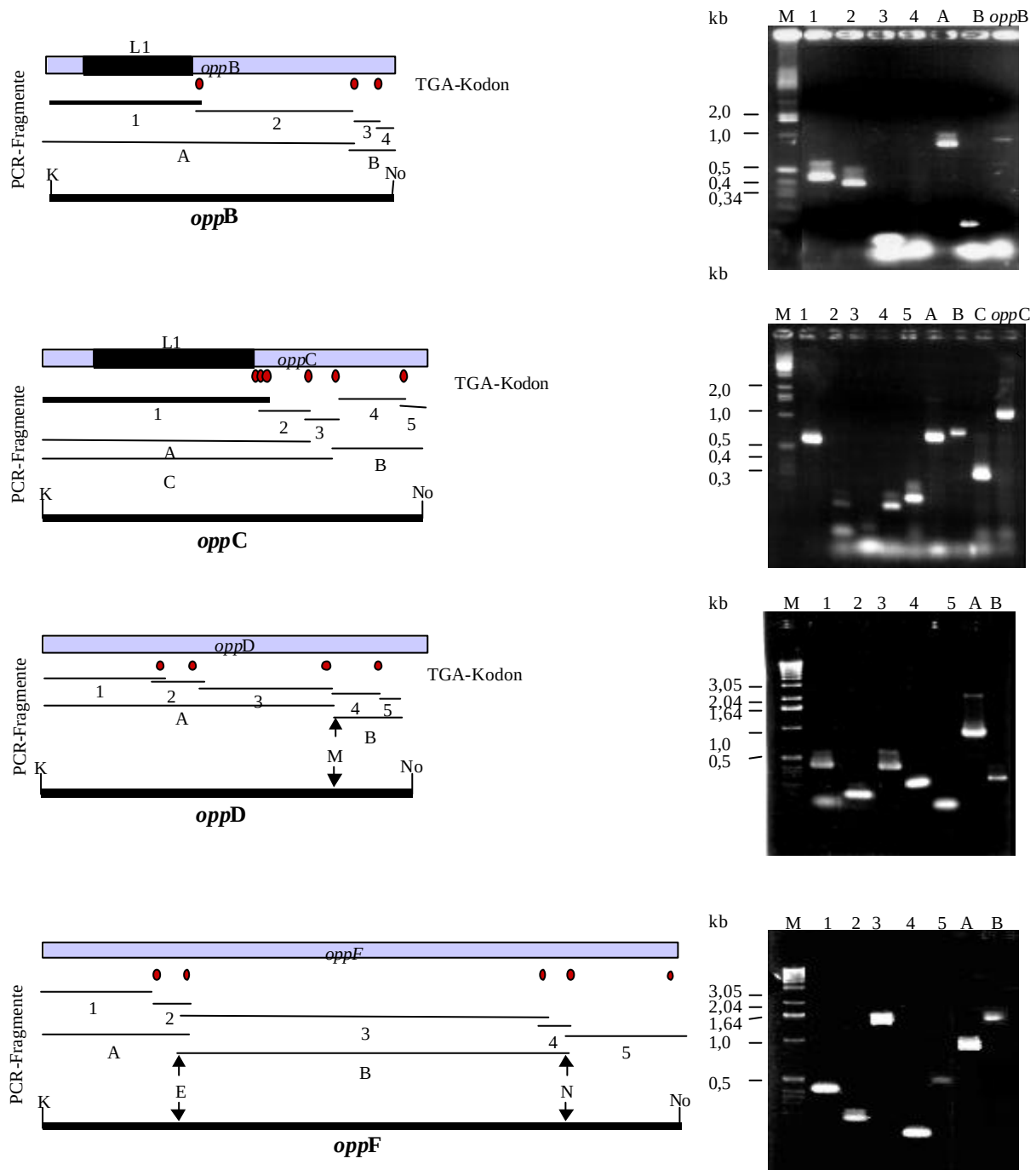


Abb. 9 Amplifikation der proteinkodierenden Bereiche von OppB, OppC, OppD und OppF unter Mutation der TGA-Kodons

Auf der linken Seite sind die proteinkodierenden Bereiche der Gene *oppB*, *oppC*, *oppD* und *oppF* als grau unterlegte Balken schematisch dargestellt. Die Kreise bezeichnen die Lage der TGA-Kodons. Die amplifizierten PCR-Produkte (1-5) wurden über SOE-PCR fusioniert (A-C) und die erhaltenen PCR- und SOE-Fragmente in einem 1 % igen Agarosegel aufgetrennt und Ethiumbromid gefärbt (siehe rechte Seite). L1 bezeichnet den 1. hydrophilen Bereich der OppB und OppC Proteine, der extrazellulär liegt. Die wichtigsten Restriktionsschnittstellen zur Klonierung der erhaltenen PCR-Produkt sind abgekürzt *EcoRI* (E), *KpnI* (K), *MluI* (M), *NdeI* (N), *NotI* (No). Als Längenstandard ist eine 1 kb-Leiter (M) von Gibco verwendet worden.

Dies ermöglichte es mir, die Expressionsprodukte mit dem anti-Protein-C-Antikörper zu detektieren und aufzureinigen. Alle PCR-Fragmente (*oppB*, *oppC*, *oppD* und *oppF*) wurden erfolgreich in den Expressionvektor pBX kloniert. Mittels Sequenzierung wurde sichergestellt, dass keine Fehler in der Sequenz vorkamen, die zur Veränderung der exprimierten Proteinsequenz oder zum Stopp der Translation führen könnten.

Die Expression der *opp*-Fragmente wurden mittels IPTG induziert, das *E. coli* Lysat anschließend gelelektrophoretisch getrennt und im Coomassie-gefärbtem Gel oder in der Westernblot-Analyse mit dem anti-Protein-C-Antikörper untersucht. Es zeigte sich, dass nur das OppD Protein in voller Länge exprimiert wurde (Abb. 10, OppD^r). Zusätzlich konnte das rekombinante OppD^r Protein über eine anti-Protein-C-Affinitätsmatrix aufgereinigt werden (Abb. 10, Spur A). Das aufgereinigte rekombinante OppD^r (400µg OppD^r) wurde zur kommerziellen Herstellung eines polyklonalen Kaninchenserums verwendet.

Die drei Expressionsprodukte OppB^r, OppC^r und OppF^r konnten nicht mit dem anti-Protein-C-Antikörper detektiert werden. Hieraus war abzuleiten, dass sie entweder nicht exprimiert wurden oder es zu einem vorzeitigen Synthese-Abbruch kam, so dass der C-terminal kodierende Protein-C-Teil nicht exprimiert wurde. Zur Überprüfung dieser Möglichkeiten wurden die drei proteinkodierenden Bereiche von *oppB*, *oppC* und *oppF* in den Vektor pXB kloniert, der die rekombinanten Proteine in Fusion mit N-terminal positioniertem Protein-C-Epitop exprimiert. Westernblotanalysen legten offen, dass das OppF-Protein nur bis zu einer Größe von 60 kDa exprimiert wurde (Abb.10, OppF^r), während die hydrophoben Proteine OppB^r und OppC^r nicht exprimiert wurden.

Da OppF^r ein Molekulargewicht von 100.000 haben sollte, jedoch nur ein 60 kDa Protein zu detektieren war, wurde der OppF-kodierende Bereich des pXB-OppF-Klons nochmals mittels Sequenzierung überprüft. Es konnte keine für ein Translationsstopp kodierende Sequenz und auch keine Veränderung in der aus der Gensequenz resultierenden Aminosäuresequenz identifiziert werden, die einen Abbruch der Expression hätte bewirken können. Computeranalysen zum Transkriptionsstopp wiesen im Abbruchbereich keine nennenswerten Haarnadelstrukturen der mRNA auf, die für den vorzeitigen Stopp der Transkription hätten verantwortlich sein könnten. Da ein vorzeitiger Abbruch der Expression A/T reicher Mycoplasmensequenzen in *E. coli* schon häufiger beobachtet worden war, versuchte ich die Region, innerhalb der es zum Translationstopp kam, zu deletieren. Trotz Deletion eines 830 bp Bereichs (Aminosäure 185 bis 462 von OppF) kam es erneut zu einem frühzeitigen Abbruch der Expression des deletierten OppF Proteins (30 kDa statt 68 kDa).

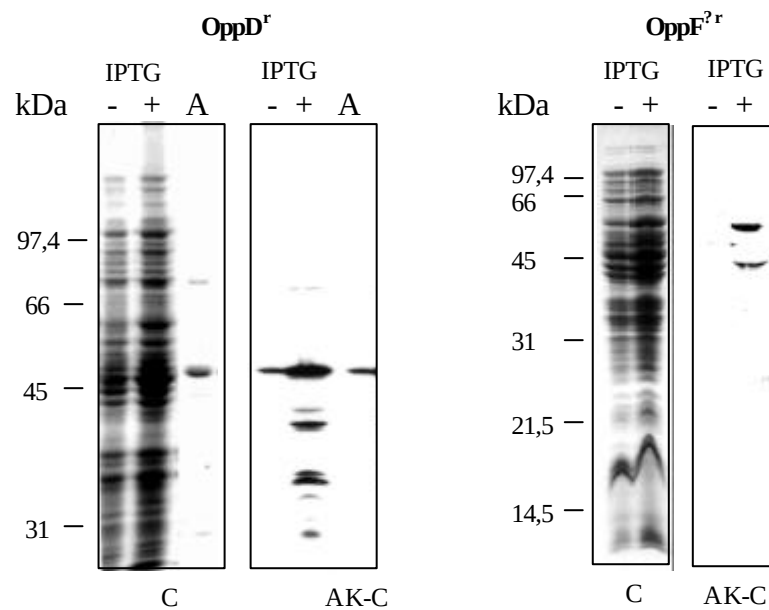


Abb.10 Gelelektrophoretische Analyse von OppD^r und OppF^{2r}

Die Bakterienlysate vor (-IPTG), nach (+IPTG) IPTG-Induktion und das aufbereitete Protein (A) wurden gelelektrophoretisch (9,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel) getrennt und entweder Coomassie Brilliant Blau (C) gefärbt oder im Westernblot mit dem anti-Protein C-Antikörper (AK-C) immungefärbt. Als Längenstandard ist der low-range Marker (Gibco) verwendet worden.

Die Veränderungen der Expressionsbedingungen (Senkung der Kultivierungstemperatur auf 25°C und Variation der IPTG Konzentration von 0,1 bis 2 mM) hatten keinen Einfluss auf die Expression des OppF Proteins in *E. coli* (SG13009). Da das OppF-Protein nicht in voller Länge exprimiert werden konnte, wurde gegen dieses Protein kein polyklonales Serum hergestellt, weil uns ein Serum gegen eine der beiden ATP-bindenden Domänen (OppD) für die weiteren Experimente ausreichend erschien.

In der Literatur wurde beschrieben, dass rekombinante Proteine mit hydrophoben Regionen oft einen toxischen Effekt auf ihre Wirtszelle haben. So war anzunehmen, dass die beiden hydrophoben integralen Membranproteine OppB und OppC aufgrund ihres hydrophoben Charakters nicht in *E. coli* exprimierbar waren. Aus diesem Grund sollten soweit wie möglich die Sequenzen, die für die Transmembranbereiche kodieren, vor der Klonierung in den Expressionsvektor entfernt werden. Wie in Abbildung 9 mit L1 bezeichnet kodiert das 1. PCR-Fragment sowohl in OppB^r als auch OppC^r für den größten extrazellulär liegenden hydrophilen Bereich beider Proteine. Die zu exprimierenden Peptide OppB^{2r} und OppC^{2r}

wiesen ohne Fusionspartner nur eine Größe von 10-14 kDa auf. In Vorversuchen konnte ich zeigen, dass diese Peptide vom *E. coli* nicht synthetisiert wurden, bzw. schneller degradiert wurden, als dass sie nachweisbar waren. Aus diesem Grund wurden das PCR-Fragment *oppB*^{2r} (Aminosäure 2 bis 158) in den pQE40 Vektor und *oppC*^{2r} (Aminosäure 2 bis 179) in den Expressionvektor pQE41 kloniert. Die resultierenden rekombinanten Peptide exprimierten in Fusion mit 6 Histidinen und der Dihydrofolatreduktase (DHFR) im C-Terminus. Die Expression in der rekombinanten Proteine *OppB*^{2r} und *OppC*^{2r} unterlag einer Induktion durch IPTG. Die rekombinanten Peptide waren nach Auftrennung des Bakterienlysats (Abb. 11, [+IPTG]) im SDS-Polyacrylamidgel im Vergleich mit Lysat einer nicht IPTG-induzierten Kultur (Abb. 11, [-IPTG]) als zusätzliche Bande zu erkennen.

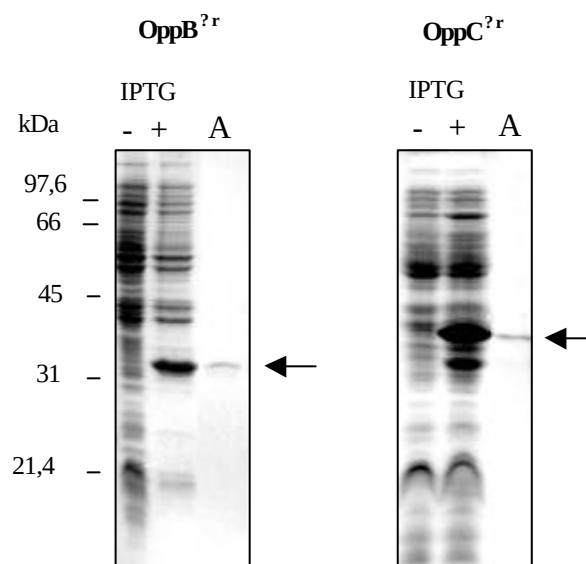


Abb 11. Gelelektrophoretische Analyse der Expressionsprodukte *OppB*^{2r} und *OppC*^{2r}

Die Bakterienlysate von *E.coli*-Kultur SG13009 mit den exprimierten Fusionsproteinen DHFR-*OppB*^{2r} und DHFR-*OppC*^{2r} und deren aufgereinigten Proteine sind in einem 12%igem SDS-Polyacrylamidgel gelelektrophoretisch getrennt und Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Die exprimierten und aufgereinigten Proteine *OppB*^{2r} und *OppC*^{2r} sind mit Pfeilen kenntlich gemacht. Als Längenstandard ist ein low-range Marker (Gibco) verwendet worden.

Nachfolgend wurden unter denaturierenden Bedingungen die rekombinanten Proteine *OppB*^{2r} und *OppC*^{2r} mittels Ni-NTA-Chelatbildung aufgereinigt (Abb. 11 A). Nach gelelektrophoretischer Analyse wurden die Peptide aus dem SDS-Polyacrylamidgel ausgestochen und jeweils 400µg der rekombinante Proteine zur Generierung polyklonaler Kaninchenserum verwendet.

4.2.2 Testung und Aufreinigung der OppB-, OppC- und OppD-spezifischen Seren

Zur Charakterisierung der generierten polyklonalen Kaninchenserum bezüglich ihrer Qualität und Antikörper-Titer wurden Westernblot-Analysen mit gelelektrophoretisch getrenntem *E. coli* und *M. hominis* Zelllysate durchgeführt.

Das anti-OppB-Serum erkannte das zur Immunisierung verwendete OppB-Peptid nicht, zeigte jedoch Reaktivitäten mit anderen Proteinen von *E. coli* und *M. hominis*. Aus diesem Grund wurden kürzere hydrophile Bereiche des OppB Proteins ausgewählt, die nach Computeranalyse sehr immunogen sein sollten. Zwei Peptide, die der Aminosäuresequenz 59-73 (KLEIENGLAYKDNP) und 332-345 (KIKYSTNSKANYWL) des OppB Proteins entsprachen, wurden von der Firma Eurogentec (Belgien) synthetisiert und zur Immunisierung eingesetzt, um weitere anti-OppB-Seren zu erhalten.

In der Westernblot-Analyse mit gelelektrophoretisch getrennten Proteinen von *M. hominis*, *E. coli* und dem rekombinanten OppB^{2r} wurden das OppB Peptid-spezifische polyklonale Kaninchenserum untersucht. Wie in Abbildung 12 (Spur F) zu erkennen ist, wurden von dem anti-OppB-Serum mehrere *M. hominis* Proteine detektiert.

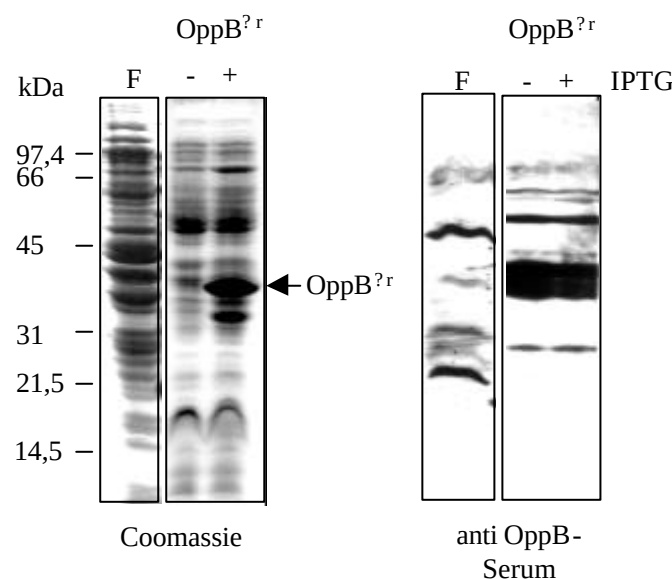


Abb. 12 Detektion von *M. hominis* und *E. coli* Zelllysate mit anti-OppB-Serum-1
Gelelektrophoretische Auftrennung von *M. hominis* FBG Zelllysate (F) (10-15 µg Protein/Spur) und *E. coli* Zelllysate (OppB^{2r} vor (-) und nach (+)IPTG-Induktion) in einem 12 %igen Polyacrylamidgel mit anschließender Coomassie Brilliant Blau oder Immunfärbung mit dem aufgereinigten anti-OppB-Serum. (1:100 verdünnt). Als Längenstandard ist ein low-range Marker (Gibco) verwendet worden.

Im *E. coli* Zelllysate mit dem Plasmid pQE-40-*oppB*^{2r} wurde vor und nach IPTG Induktion mit dem anti-OppB Serum die gleichen Banden detektiert. Es konnte folglich davon ausgegangen

werden, dass mit diesem Serum das exprimierte OppB^{2r} Protein nicht erkannt wurden und die in der Immunfärbung sichtbare Bande nicht dem rekombinanten Protein entspricht. Diese Versuchsergebnisse sprachen für eine unspezifische Bindung des OppB-Serums.

Das OppB spezifische Serum wurden mit Hilfe des Peptids 1 (Aminosäuresequenz 59-73) aufgereinigt. Dies zeigten kein verändertes Detektionsmuster in *M. hominis*- und *E. coli*-Zelllysate. In einem Versuchsansatz konnte im Bereich von 32 kDa eine schwache Bande mit dem OppB-Serum in der Membranfraktion von *M. hominis* detektiert werden. Es wurde vermutet, dass es sich hier bei um das OppB Protein von *M. hominis* handelt. Dies ließ sich in weiteren Versuchen nicht reproduzieren. So konnte trotz Variation des zur Immunisierung verwendeten OppB-Bereichs keine anti-OppB-spezifische Seren generiert werden, was auf eine geringe Immunogenität des OppB Protein hinweist.

In weiteren Experimenten wurden die anti-OppC und anti-OppD Seren getestet. Die anti-OppC- und anti-OppD-Seren erkannten neben ihrem Immunisationsantigen auch die Fusionspartner DHFR und das Protein C-Epitop (Abb. 13).

Demzufolge war es auch hier notwendig, diese beiden Kaninchenserum aufzureinigen. Mittels Affinitätschromatographie über Sepharose-gekoppelte DHFR wurde erst die DHFR aus den Seren depletiert, um dann die OppC-Antikörper mit Sepharose-gekoppeltem OppC zu isolieren. Mit dem aufgereinigten anti OppC Serum wurde in frisch präpariertem *Mycoplasma hominis* FBG Zelllysate eine 34 kDa Bande und im *E. coli* Zelllysate das rekombinante Proteinfragment OppC^{2r} (Aminosäure 1 bis 173) mit einer Größe von 36 kDa detektiert (Abb. 13, Spur F). Die Bande war in *M. hominis* nur schwach zu erkennen und auch nur dann, wenn frisch präpariertes *M. hominis* Zelllysate verwendet wurde. Die von der Gensequenz abgeleitete Proteinsequenz des OppC-Proteins hatte eine kalkulierte Masse von 47,2 kDa. Hydrophobe Proteine wandern im SDS-Polyacrylamidgel jedoch häufig anomal, welches den Größenunterschied zwischen der detektierten 34 kDa Bande im *M. hominis* Zelllysate zu der erwartenden Größe von 47,2 kDa erklären könnte. Wie Pearce *et al.* (1992) beschrieb, zeigt das OppB Protein von *S. typhimurium* im SDS-Polyacrylamidgel ein apparentes Molekulargewicht von 25 kDa, wohingegen es rein rechnerisch eine Größe von 34 kDa hat.

Ich konnte hier mit dem Nachweis des OppC Proteins die Expression einer porenbildenden Domäne der Oligopeptidpermease in *Mycoplasma hominis* zeigen.

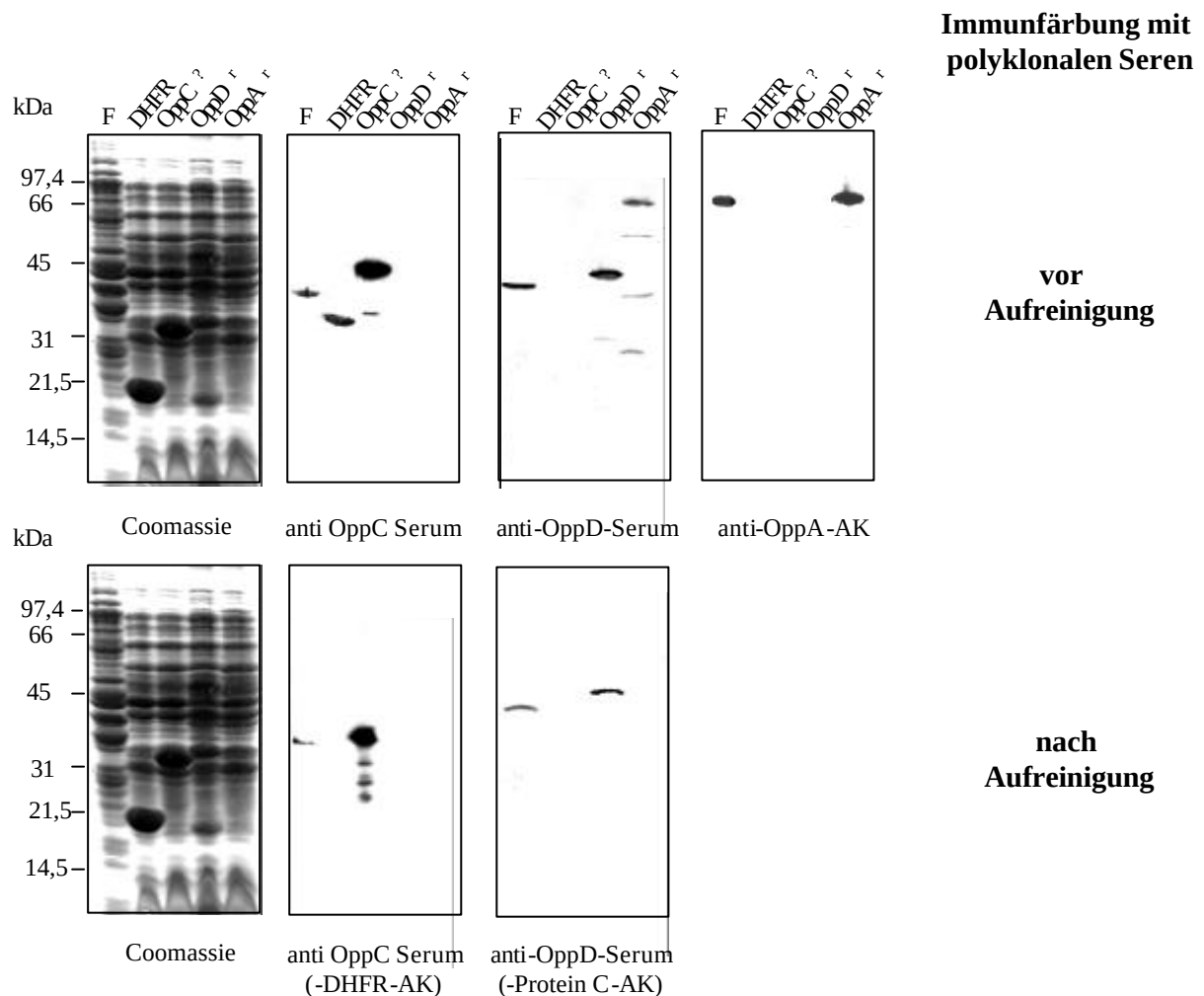


Abb.13 Westernblotanalyse der Proteine OppC und OppD in *M. hominis* und *E. coli*. Frisches *M. hominis* FBG Zelllysats (20µg Protein/Spur (F)), *E. coli* (SG13009) Zelllysats mit exprimierter DHFR, OppC^r, OppD^r und OppA^r wurden im 12%igen SDS-Polyarylamidgel aufgetrennt und Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder im Westernblot analysiert. Als Antikörperprobe wurde das anti-OppC Serum, sowie das anti-OppD Serum vor und nach ihrer Aufreinigung und der OppA spezifische Antikörper TF6 eingesetzt. Als Längenstandard ist ein low-range Marker (Gibco) verwendet.

Im folgenden wurde für den Nachweis des putative ATP-bindenden Proteins OppD das anti-OppD-Serum aufgereinigt. Die OppD-spezifischen Antikörper wurden aus dem polyklonalen Serum mittels Sepharose-gekoppeltem OppD isoliert. Dieses aufgereinigte anti-OppD-Serum detektierte neben dem rekombinanten 45 kDa OppD^r Protein ein 43 kDa Protein in *M. hominis* FBG Zelllysats. Es befanden sich jedoch noch Antikörper gegen den Protein-C-Fusionspartner im aufgereinigten anti-OppD-Serum, da mit diesem Serum auch das rekombinante OppA^r Protein immunzufärben war, das wie OppD^r im C-Terminus das Protein-C-Epitop trägt (Abb. 13). Die Antikörper gegen das Protein-C-Epitop wurden zuerst über eine Protein-C-Affinitätschromatographie entfernt und anschließend die OppD-spezifischen Antikörper mittels OppD^r-Affinitätschromatographie isoliert. In Westernblotanalysen konnte

mit diesem aufbereiteten anti-OppD Serum in einer 1/20 Verdünnung das rekombinante Protein (OppD^r) in *E. coli* als auch das OppD Protein in *M. hominis* detektiert werden.

Die Ergebnisse mit den aufgereinigten Seren gegen OppC und OppD zeigten zum ersten Mal die Expression von OppC und OppD in *Mycoplasma hominis*. Dies war der erste proteinchemische Beweis, dass das charakterisierte *opp*-Operon nicht nur transkriptionsaktiv, sondern auch translationsaktiv ist.

4.2.3 Zelluläre Lokalisation der OppC und OppD Proteine

Nachdem Antiseren gegen die Permeasedomänen OppC und OppD zur Verfügung standen, und diese Proteine auch in frisch präpariertem Lysat von *M. hominis* immunzufärben waren, sollte die Lokalisation dieser beiden Domänen innerhalb von *M. hominis* bestimmt werden. Hierzu wurde Zelllysat des *M. hominis* Isolats FBG mittels osmotischer Lyse und anschließender Zentrifugation in Membran- und zytoplasmatische Bestandteile separiert. Die verschiedenen Proteinpräparationen wurden im SDS-Polyacrylamidgel getrennt und im Westernblot mit den polyklonalen Seren gegen OppC^r und OppD^r inkubiert. Das Ergebnis dieser Immunfärbung ist in Abbildung 14 dargestellt.

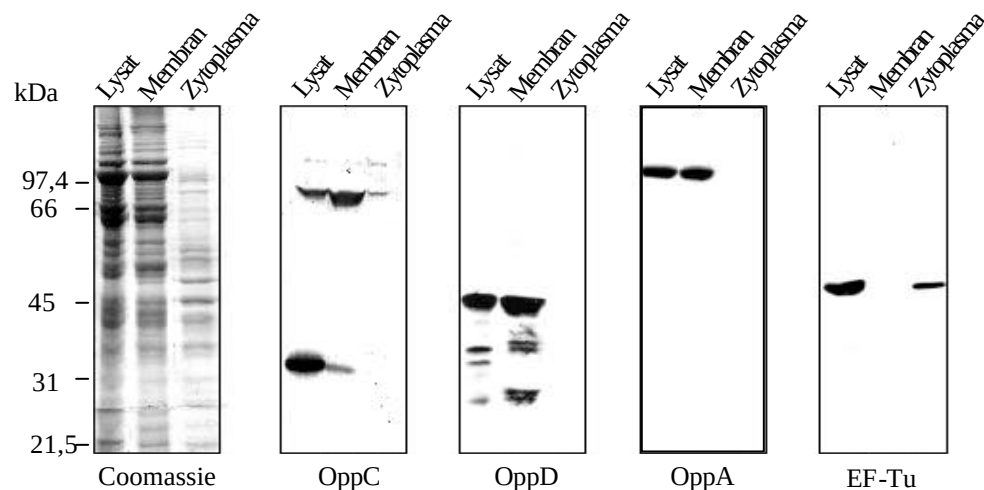


Abb.14 Zelluläre Lokalisation von OppC und OppD.

Frisch präpariertes *M. hominis* Zelllysat wurde in die Membran- und Zytoplasma-Fraktion getrennt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder in der Immunfärbung mit dem anti-OppC Serum (OppC), anti-OppD Serum (OppD), mAK TF6 (OppA) oder mAK KD2 (EF-Tu) detektiert. Als Längenstandard ist ein low-range Marker (Gibco) verwendet worden.

Wie zu erwarten, wurde das hydrophobe Membranprotein OppC in der Membranfraktion detektiert. Überraschenderweise war das OppD Protein ebenfalls in der Membranfraktion lokalisiert, obwohl OppD keine Membran-durchspannenden-Bereiche aufwies. So war daraus zu schließen, dass die in der Literatur beschriebene Protein-Protein-Wechselwirkung der hydrophoben, Poren-bildenden Proteine OppB und OppC mit den ATP-bindenden Proteinen OppD und OppF so stark ist, dass die peripher gebundenen ATPasen in der Membranfraktion verbleiben (Shuman & Shilhavy, 1981).

Um beweisen zu können, dass die Zytoplasma- und Membran-Fractionen gut voneinander getrennt wurden, wurden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proben (Lysat, Membran, Zytoplasma) auf Membran- und Zytoplasma-spezifische Proteine untersucht. Wie für eine saubere Präparation zu erwarten, wurde das Membran-lokalisierte OppA nur in der Membranfraktion identifiziert, wohingegen der Elongationsfaktor EF-Tu ausschließlich in der zytoplasmatischen Fraktion gefunden wurde (Abb.14, OppA und EF-Tu).

Diese Experimente zeigen, dass die drei Permease-Proteine OppA, OppC und OppD in der Membran lokalisiert bzw. mit der Membran assoziiert sind, womit sie die Grundvoraussetzung erfüllen, die sie für ein funktionelles Zusammenspiel in einem Oligopeptid-permease-Proteinkomplex benötigen: die Lokalisation im gleichen Kompartiment.

4.2.4 Untersuchung der Komplexbildung der Opp-Proteine

Die Assoziation der Proteine OppA, OppB, OppC, OppD und OppF in einem Proteinkomplex der Mycoplasmenmembran sollte als nächstes mit Hilfe der Immunpräzipitation charakterisiert werden. Vorversuche hatten gezeigt, dass in der Immunpräzipitation mit dem OppA-Antikörper DC10 unspezifisch Proteine präzipitiert wurden. Da das anti-OppB-Serum sein Antigen nicht erkannte und hauptsächlich unspezifische Proteine in *M. hominis* detektierte, konnte dieses Serum auch nicht zur Immunpräzipitation verwendet werden. Folglich sollte der Proteinkomplex aus der Mycoplasma-membran mit den polyklonalen Seren OppC und OppD immunpräzipitiert werden. In Abbildung 15 sind die im Westernblot nachgewiesenen Immunpräzipitate abgebildet. Mit dem aufgereinigten anti-OppC-Serum konnte im Westernblot kein OppC-Präzipitat detektiert werden, weder in der OppD- noch in der OppC-vermittelten Präzipitation. Dies mag darin begründet sein, dass das hydrophobe OppC-Protein nur in frisch präpariertem Lysat detektiert werden konnte und unter den Bedingungen der Immunpräzipitation (24 h nach Präparation) nicht mehr mit dem anti-OppC-

Serum erkannt wurde. Erschwert wurde die Auswertung der Immunfärbung durch die Detektion der leichten und schweren Kette der Antikörper (Abb.15, OppD).

Das OppD Protein wurde mit dem anti-OppC Serum präzipitiert, schien sich selber aber nicht zu präzipitieren (Abb.15, OppD-Spur C). Desweiteren konnte im Bereich von 150 kDa eine Bande im OppC-Präzipitat der Immunfärbung mit Hilfe des anti-OppD Serums detektiert werden. Diese Bande verschwand nach β -Mercaptoethanol-Behandlung des Präzipitates, was auf eine S-S-Brückenbildung in einem OppC- und OppD-haltigen Proteinkomplex schließen ließ. Es konnten jedoch weder mit einem anderen Antikörper (TF6, anti-OppC-Serum) diese 150 kDa Bande detektiert werden, so dass angenommen wurde, dass diese Bande artifiziell ist.

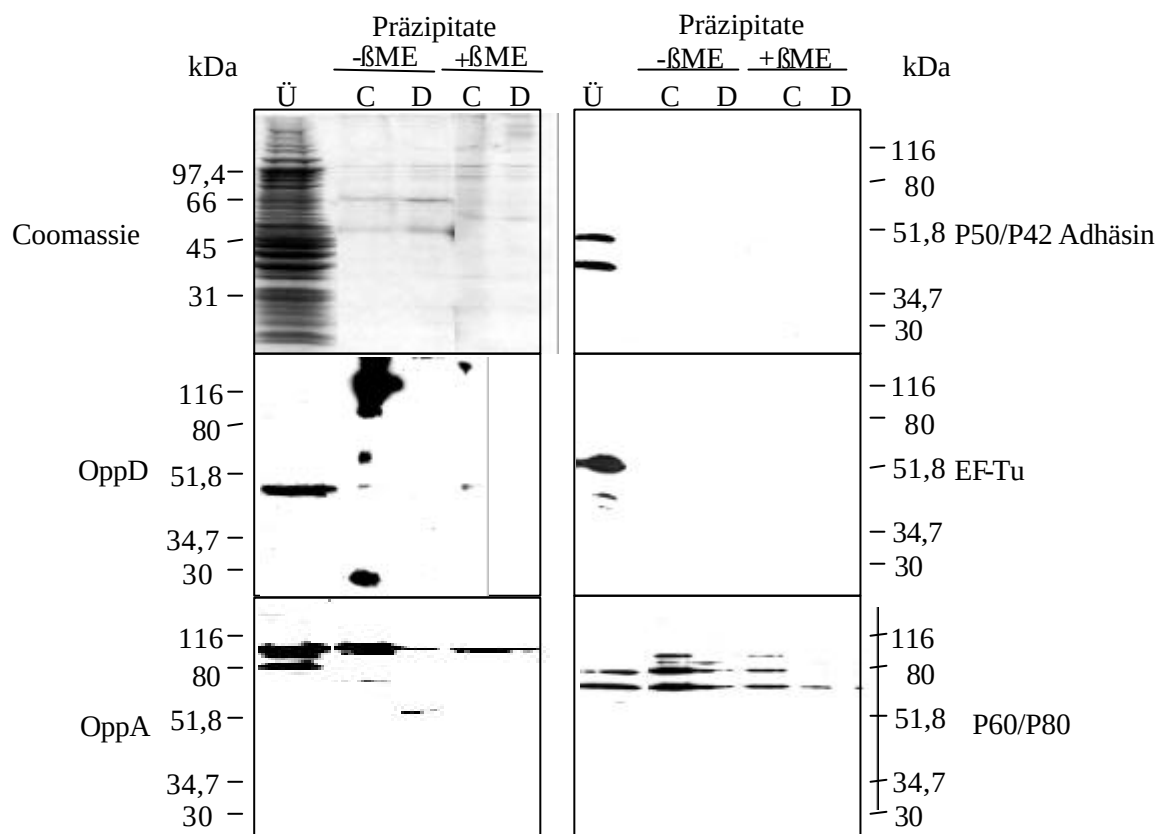


Abb.15 Immunpräzipitationen

Nach Immunpräzipitation (Kapitel 3.10.6) sind das Gesamt-Zelllysate (Ü) und präzipitierte Proteine mit den polyklonalen Seren gegen OppC (C) und OppD (D) (mit (+) und ohne (-) β -Mercaptoethanol) in einem 9,5 % igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder in der Immunfärbung mit den spezifischen Antikörpern gegen das OppA, OppD, P50 und P60 /P80 detektiert worden. Als Längenstandards sind der low range Marker (Gibco) und der prestained low range Marker verwendet worden.

Unter Verwendung des OppA spezifischen Antikörpers TF6 konnte in der Westernblotanalyse in den OppC-vermittelten Präzipitaten und viel schwächer in den OppD-vermittelten Präzipitationen das OppA Protein detektiert werden. Dies zeigt, dass das OppC-Protein sowohl mit dem OppD- Protein als auch mit dem OppA-Protein in Wechselwirkung steht. Das in Kapitel 4.2.3 beschriebenen Experiment deuten draufhin, dass der Proteinkomplex in der Membran von *Mycoplasma hominis* FBG lokalisiert ist, da alle untersuchten Protein in der Membranfraktion identifiziert wurden.

Zur Kontrolle der Spezifität der Immunpräzipitation wurden die Präzipitate auf die Anwesenheit des Membranproteins P50 (BA10 Antikörper) und des cytoplasmatisch lokalisierten Elongationsfaktors EF-Tu untersucht. Die beiden Proteine P50 und EF-Tu wurden nicht mit den OppC- und OppD-Seren präzipitiert. Wie in früheren Experimenten gezeigt werden konnte, detektierten die verwendeten OppC- und OppD-Seren spezifisch ihr Protein und keine weiteren Protein in der Westernblotanalyse. Folglich ist die Präzipitation des OppA Proteins mit dem anti-OppC Serum auf eine Molekül-spezifische-Präzipitation zurückzuführen und beruht nicht auf der unspezifischen Präzipitation größere Membranbestandteile. Der monoklonale OppA-Antikörper TF6 zeigte die stärkste Bindung an sein Antigen im Gegensatz zu den verwendeten polyklonalen Kaninchenseren OppC und OppD. Die beiden polyklonalen Seren OppC und OppD zeigten schon in der Westernblotanalyse, dass sie ihr Protein nur unter optimalen Bedingungen erkannten, was die verminderte Detektion bzw. der fehlende Nachweis in der Immunpräzipitaten erklärt. Mit diesen Experimenten konnte zum ersten Mal die Protein-Protein Wechselwirkung der Proteine OppA, OppC und OppD in *Mycoplasma hominis* nachgewiesen werden, so dass nahe lag, dass diese Proteine mit den nicht detektierbaren Proteinen OppB und OppF eine aktive Oligopeptidpermease in *M. hominis* bilden.

Die beiden Membranproteine P60 und P80, die komplexiert in der Membran vorliegen (Kitzerow & Henrich, 2001), wurden mit den anti-OppC- und anti-OppD-Serum präzipitiert (Abb.15). Der Grund für diese Präzipitation bleibt noch zu klären, wobei ein funktionelles Zusammenspiel beider Proteinkomplexe in der Membran denkbar ist (siehe Diskussion).

4.3 Funktionsanalyse des Lipoproteins OppA

Nachdem sich mittels Immunpräzipitation bestärken ließ, dass OppA mit den porenbildenden Domänen der Oligopeptidpermease komplexiert ist, sollte seine Charakterisierung fortgeführt werden.

4.3.1 Charakterisierung des OppA Proteins als Oligopeptidbindendes-Protein

Aufgrund der Homologieuntersuchungen von OppA zu anderen oligopeptidbindenden Proteinen war angenommen worden, dass das OppA Protein die Funktion der oligopeptidbindenden Domäne im der Permease einnahm. Wie von Guyer *et al.* (1986) beschrieben wurde, erfolgt die Bindung von Oligopeptiden an das OppA Protein unter Veränderung seiner Konformation, die in einem Fluoreszenzspektrometer zu messen ist. Mittels Fluoreszenzmessung sollte auch in den folgenden Experimenten die Bindung von Oligopeptiden an das OppA-Protein von *M. hominis* gezeigt werden.

Bei dem von Guyer untersuchten Protein handelte es sich um ein oligopeptidbindendes Protein, welches im Periplasma lokalisiert war und somit in löslicher Form vorlag. Im Gegensatz zu diesem periplasmatisch lokalisierten OppA, ist das OppA Protein von *M. hominis*, wie in Kapitel 4.1 beschrieben, über einen Lipidanker in der Membran verankert, so dass es erst mit Hilfe des Detergenz n-Dodecyl- β -D-Maltosid aus der Mycoplasma-membran gelöst werden kann. Das Detergenz IGEPAL, welches anfänglich zur Solubilisierung des OppA Proteins eingesetzt worden war, zeigte Interferenzen in der Fluoreszenzmessung und wurde aus diesem Grund nicht verwendet. Für die Fluoreszenzmessung waren aromatische Aminosäuren in der Sequenz des OppA Proteins notwendig, da Konformationsänderungen in der Nähe von aromatischen Aminosäuren, vor allem Tryptophanen, zu einer Veränderung der Tryptophanfluoreszenz führten, die im Fluoreszenzspektrometer gemessen wurden. Das OppA Protein besitzt 16 Tryptophane, die sich bei 290 nm anregen ließen und zu einem Emissionsmaximum bei 330 nm führten (Abb. 16A). Wurde das Oligopeptid Trilysin (Lys₃) zum Reaktionsansatz hinzugefügt, kam es durch die Konformationsänderung nach Bindung des Peptids zu einer Erhöhung der Tryptophanfluoreszenz um 7% mit einer Verschiebung des Emissionsmaximums um 1,6 nm zum höherwelligen Bereich (Abb. 16). Das Hinzufügen von Pentaalanin (Ala₅) führte auch zu einer Steigerung der Tryptophan-Fluoreszenz, wobei hier eine Blauverschiebung um 1,7 nm zu beobachten war. Wurden in den nachfolgenden Versuchen die Oligopeptide Dialanin (Ala₂), Trialanin (Ala₃) oder Tetraalanin (Ala₄)

zusammen mit dem OppA Protein im Fluoreszenzspektrometer gemessen, so zeigte sich eine Reduktion im Emissionsspektrum und keine Verschiebung des Emissionsmaximums.

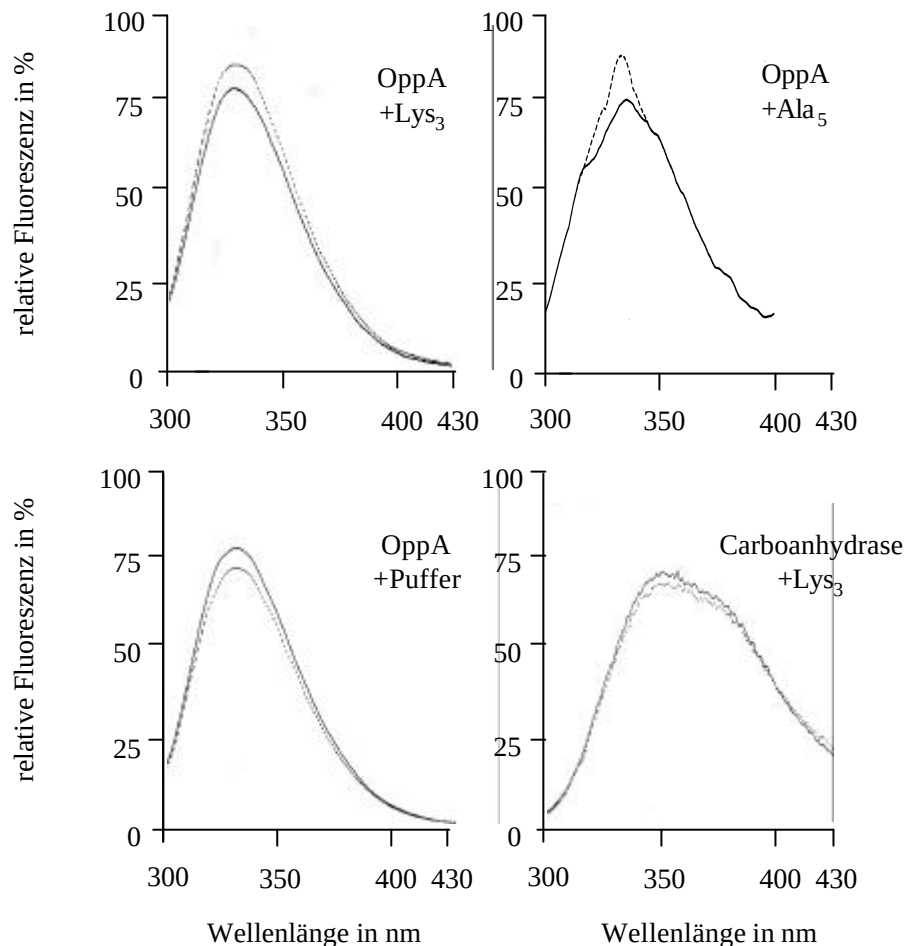


Abb.16 Fluoreszenzspektrometrie des OppA Proteins.

Nach Anregung der Probe bei 290 nm wurde ein Emissionsspektrum von 300 bis 430 nm bzw 400 nm aufgenommen. Die durchgezogene Linie zeigt das Fluoreszenzspektrum des OppA Proteins und der Carboanhydrase ohne Peptidzugabe, wohingegen die gestrichelte Linie das Fluoreszenzspektrum nach Peptid- oder Pufferzugabe darstellt.

Als Negativkontrolle wurde dem OppA Protein statt Peptiden das gleiche Volumen Puffer zugesetzt. Dies bewirkte eine Erniedrigung der Tryptophan-Fluoreszenz (Abb. 16), wie nach Zugabe der Di-, Tri- und Tetraalanine. Dies bedeutete, dass es unter den Reaktionsbedingungen zu keiner Bindung der Oligopeptide Dialanin (Ala₂), Trialanin (Ala₃) und Tetraalanin (Ala₄) an das OppA Proteine gekommen war.

Um zu zeigen, dass die Verschiebung des Fluoreszenzmaximums, bewirkt durch die Bindung der Oligopeptide Trilysin und Pentaalanin an OppA, auf einer wirklichen Bindung mit

Konformationsänderung und nicht auf einem Artefakt beruht, wurde ein Fluoreszenzspektrum von der Carboanhydrase aufgenommen, die keine Peptidbindungseigenschaften besitzt und die Messung nach Zugabe des Trilysins wiederholt. Es konnte eine geringfügige Verminderung der Tryptophanfluoreszenz gemessen werden und keine Verschiebung des Fluoreszenzmaximums (Abb. 16). Dies bestätigte, dass die Carboanhydrase keine Oligopeptidbindungseigenschaften besitzt.

Bedauerlicherweise konnte nur mit jeder dritten OppA Präparation eine Bindung von Oligopeptiden nachgewiesen werden. Teilweise war die Konzentration des OppA Proteins nach der Präparation aus der Membran sehr gering, so dass ein Konzentrierungsschritt notwendig war. Dadurch wurde die Detergenzkonzentration erhöht, was zur Inaktivierung des Proteins beigetragen haben mag.

Die Befunde, die mit funktionsaktivem OppA Protein durchgeführt werden konnten, beweisen, dass das OppA Protein in der Lage ist, Oligopeptide zu binden. Es war naheliegend, dass es als Substratbindende Domäne der Oligopeptidpermease in *M. hominis* fungierte, wie von unserer Arbeitsgruppe 1999 publiziert werden konnte (Henrich *et al.*, 1999).

4.3.2 Konstruktion und Expression des OppA Proteins

Für weitere Experimente zur Charakterisierung des OppA Proteins erschien es mir wünschenswert, das OppA Protein auch rekombinant ohne Lipidanker zur Verfügung zu haben.

Zur rekombinanten Expression des OppA Proteins konnte ich auf Vorversuche zurückgreifen, die in meiner Diplomarbeit detailliert dargestellt sind (Dürr, 1997). Dort war es mir schon gelungen, die 16 TGA Kodons des OppA Proteins, die in *M. hominis* für die Aminosäure Tryptophan kodieren, in die für die Expression in *E. coli* benötigten TGG-Kodons mit Hilfe der PCR-Methode umzuwandeln.

Aus 5 PCR-Fragmenten wurde über die SOE-PCR das *oppA*-Fragment I erhalten und in den Expressionsvektor pQE41 kloniert. Das OppA-Fragment II wurde mit Hilfe von 4 PCR-Fragmenten hergestellt und in den pQE40 Vektor kloniert (Abb. 17). Die beiden rekombinanten OppA-Peptide wurden mit einem N-terminal fusionierter DHFR exprimiert. Wie die gelelektrophoretische Analyse zeigte, besitzt das OppA^I Peptid ein Molekulargewicht von 88.000. Es umfasst die Aminosäuren 30 bis 578 des OppA-Vorläufer

Proteins. Das OppA^{II}-Peptid (Aminosäuren 578 - 963) hat eine Molekulargewicht von 68.000. Diese beiden OppA-Peptide sollten für die Epitopkartierung der OppA-spezifischen Antikörper herangezogen werden (siehe Kapitel 4.3.3). Es zeigte sich in der Westernblotanalyse, dass nur das rekombinante OppA^I von den Antikörpern erkannt wurde, deren Epitope folglich im Bereich der Aminosäure 30 bis 578 des Vorläufer OppA Proteins liegen müssen. In Abbildung 17 ist dies für die Immunfärbung mit dem TF6 Antikörper gezeigt.

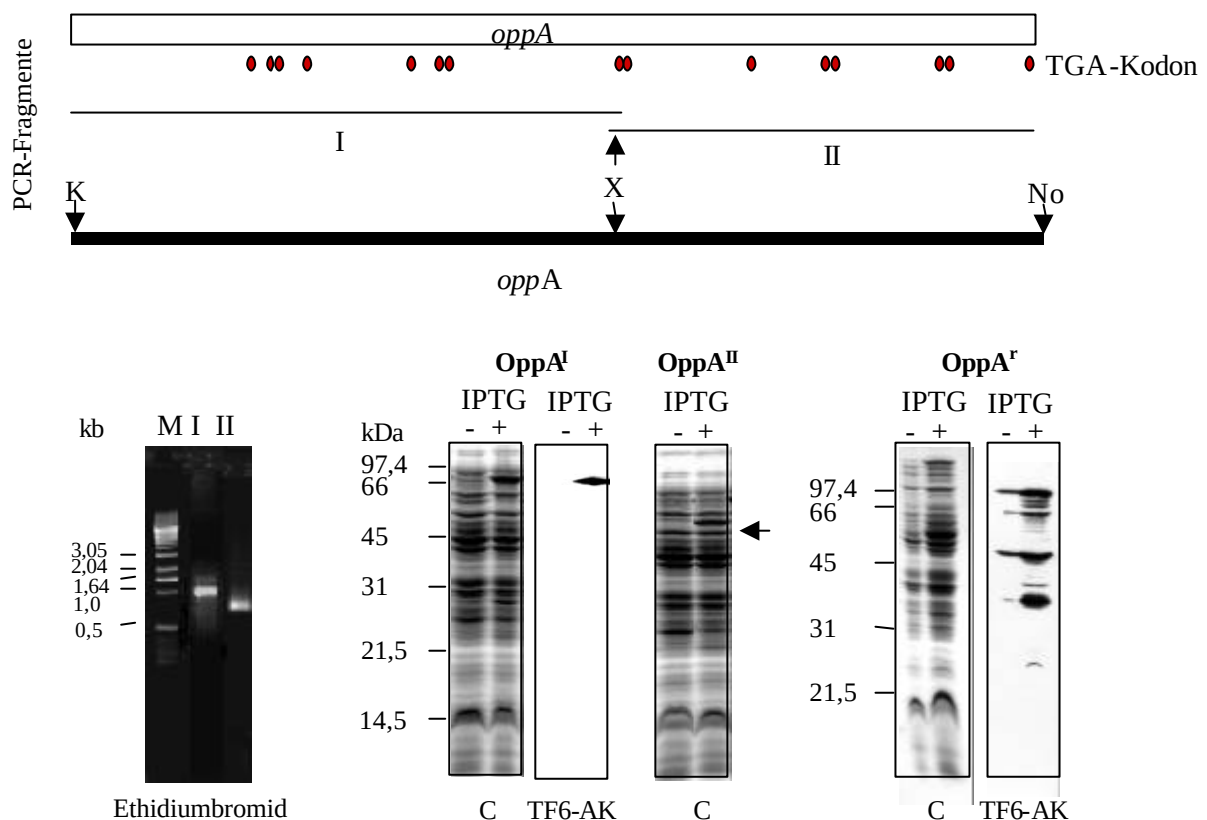


Abb.17 Darstellung der Konstruktion und Expression von rekombinantem OppA^r

Der proteinkodierende Bereich des *oppA* Gens ist als Balken und die relative Lage der TGA-Kodons im *oppA* Gen sind als Kreise dargestellt. Die beiden erhalten *oppA*-Fragmente I und II sind darunter gezeigt. Die Restriktionsschnittstellen *KpnI* (K), *NotI* (No) und *XhoI* (X) sind mit Pfeilen kenntlich gemacht. Links sind die in einem 1 %igen Agarosegel getrennten *oppA*-Fragmente I und II abgebildet. Als Längenstandard ist eine 1 kb-Leiter (M) von Gibco verwendet worden. Auf der rechten Seite sind in einem 9,5%igem SDS-Polyacrylamidgel die Bakterienlysate mit den exprimierten Proteine OppA^I, OppA^{II}, OppA^r getrennt, Coomassie (C) Brilliant Blau gefärbt oder in der Immunfärbung mit dem anti-OppA AK-TF6 detektiert. Als Standard ist der low-range Marker von Gibco verwendet worden.

Für weitere Funktionsanalysen des OppA Proteins war es notwendig, das Protein auch in seiner vollen Länge zu exprimieren. Hierzu wurden die beiden OppA-Fragmente I und II über

generierte Restriktionsschnittstellen fusioniert (SOE-PCR) und in den Expressionsvektor pBX kloniert (Aminosäure 30-961). Das IPTG induzierbare Expressionsprodukt trägt C-terminal das Protein-C-Epitop, so dass eine Immunfärbung und Aufreinigung des rekombinanten OppA^r Proteins über den Protein-C-Teil möglich war.

Wie in Abbildung 17 zu sehen ist, konnte das Expressionsprodukt OppA^r in dem Coomassie-gefärbten Gel nicht erkannt werden, zeigte sich jedoch in der Westernblotanalyse mit einem Molekulargewicht von 100.000. Hier wurde die Degradation des rekombinanten OppA^r Proteins sichtbar. Da das rekombinante OppA^r-Protein über das C-terminal fusionierte Protein-C-Epitop aufgereinigt werden konnte, konnte es von proteolytischen Bruchstücken getrennt isoliert und für Funktionsanalysen (ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse) des OppA-Proteins verwendet werden.

4.3.3 Epitopkartierung der OppA spezifischen monoklonalen Antikörper

4.3.3.1 Epitopkartierung durch kontrollierten Abbau der OppA kodierenden Sequenz

Zur Untersuchung der Epitope des OppA Proteins wurde das OppA¹-Peptide, das N-terminal den Fusionspartner DHFR trug, herangezogen, da alle vier monoklonalen OppA Antikörper (TF6, BG11, DC10 und LG3) dieses OppA¹-Peptid detektierten (Abb. 17).

Durch sukzessiven Abbau des *oppA*¹-Klons mit Hilfe der Exonuklease III wurde vom C-terminal-kodierenden Bereich die *oppA*¹-Sequenz verkürzt. Die trunkierten *oppA*-Sequenzen wurden zur Expression gebracht. Immunfärbungen mit den Antikörpern DC10 und LG3 zeigten, dass das OppA⁵-Peptid mit 392 Aminosäuren erkannt wurde, aber das OppA⁶-Peptid, welches nur vier Aminosäuren kürzer war, von den Antikörpern nicht mehr erkannt wurde (Abb. 18). Daraus ließ sich schließen, dass das Epitop der Antikörper DC10 und LG3 im Bereich der Aminosäuren 388 und 392 liegt (Abb.18). Die Antikörper TF6 und BG11 erkannten das OppA⁹-Peptid (Aminosäure 30 bis 196), wohingegen das OppA¹⁰-Peptid (Aminosäuren 30-128) nicht mehr von den beiden Antikörpern detektiert wurde. Dieses Ergebnis deutet auf eine Epitopausprägung im Bereich der Aminosäuren 128-196 für die Antikörper TF6 und BG 11 hin (Abb. 18).

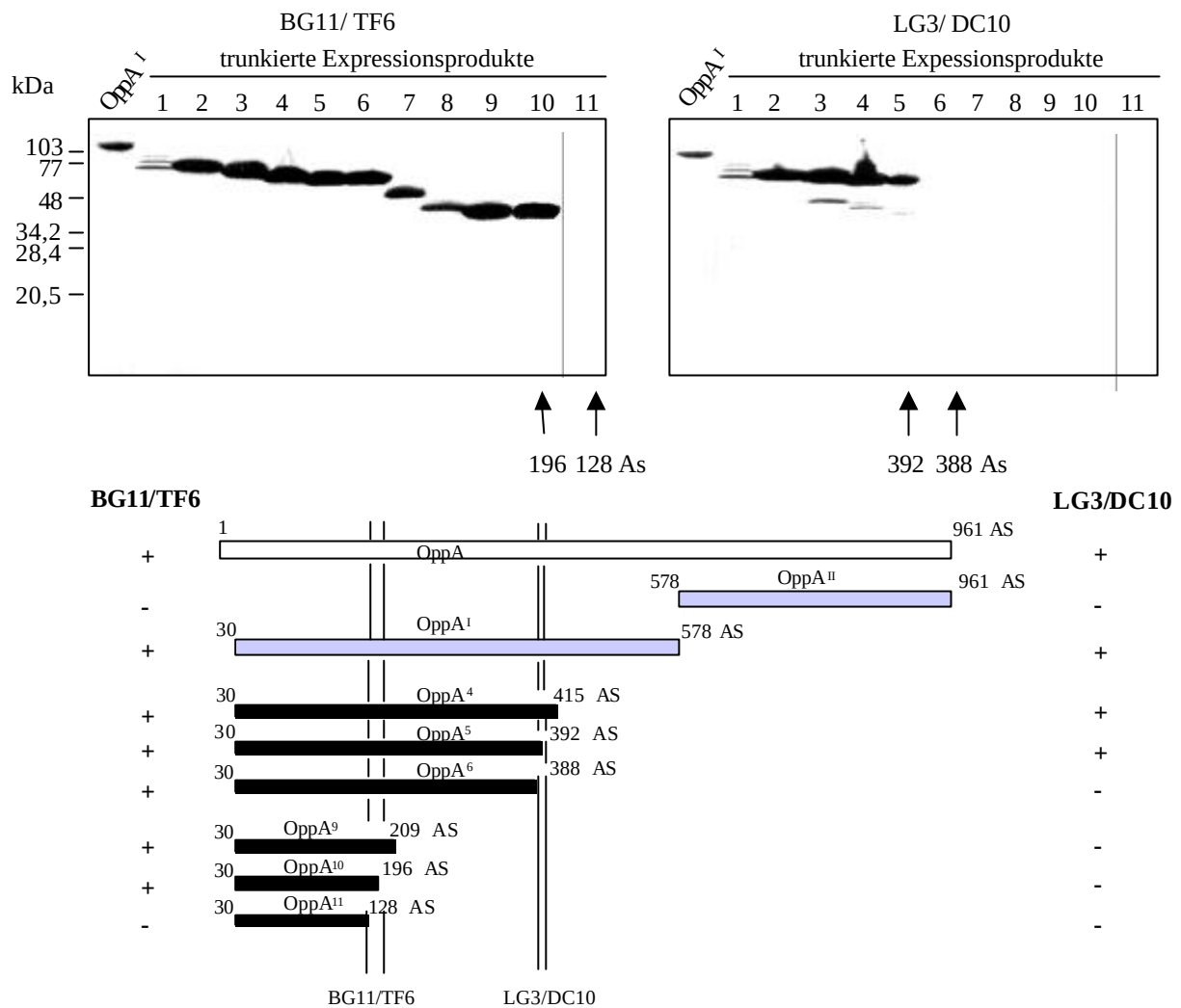


Abb.18 Schematische Darstellung der verschiedenen Deletionsklone von OppA^I und ihres Immunfärbungsmuster mit TF6 und DC10

In der oben dargestellten Immunfärbung sind die Lysate der OppA^I Deletionsklone in einem 12 %igen Polyacrylamidgel getrennt und mit den Antikörpern TF6 und DC10 detektiert worden. Im unteren Teil befindet sich die schematische Darstellung der wichtigsten Deletionsklone mit Angaben der exprimierten Aminosäuren bezüglich des OppA-Vorläufer Proteins.

4.3.3.2 Epitopkartierung mit Hilfe synthetischer Peptide

Mit Hilfe synthetischer Peptide sollten im folgenden die Epitope der Antikörper weiter eingegrenzt werden. Die 15 Aminosäuren langen Peptide für die Untersuchung des Epitops der Antikörper DC10 und LG3 deckten den Bereich zwischen den Aminosäuren 370 bis 406 ab und überlappten mit den jeweils benachbarten Peptiden um 13 Aminosäuren. Die an eine Zellulosemembran gekoppelten Peptide (SPOT-Synthese Kapitel 3.10.10) wurden mit den zwei monoklonalen Antikörpern inkubiert. Das Ergebnis zeigte, dass mehrere Peptide von diesen Antikörpern erkannt wurden, deren Lage zwischen den Aminosäuren 389 und 406 zu

finden waren. Die Peptide im Bereich der Aminosäuren 381 bis 397 wurden nicht von den Antikörpern detektiert, aber die Peptide vor und hinter diesem Bereich (Abb 19 oben).

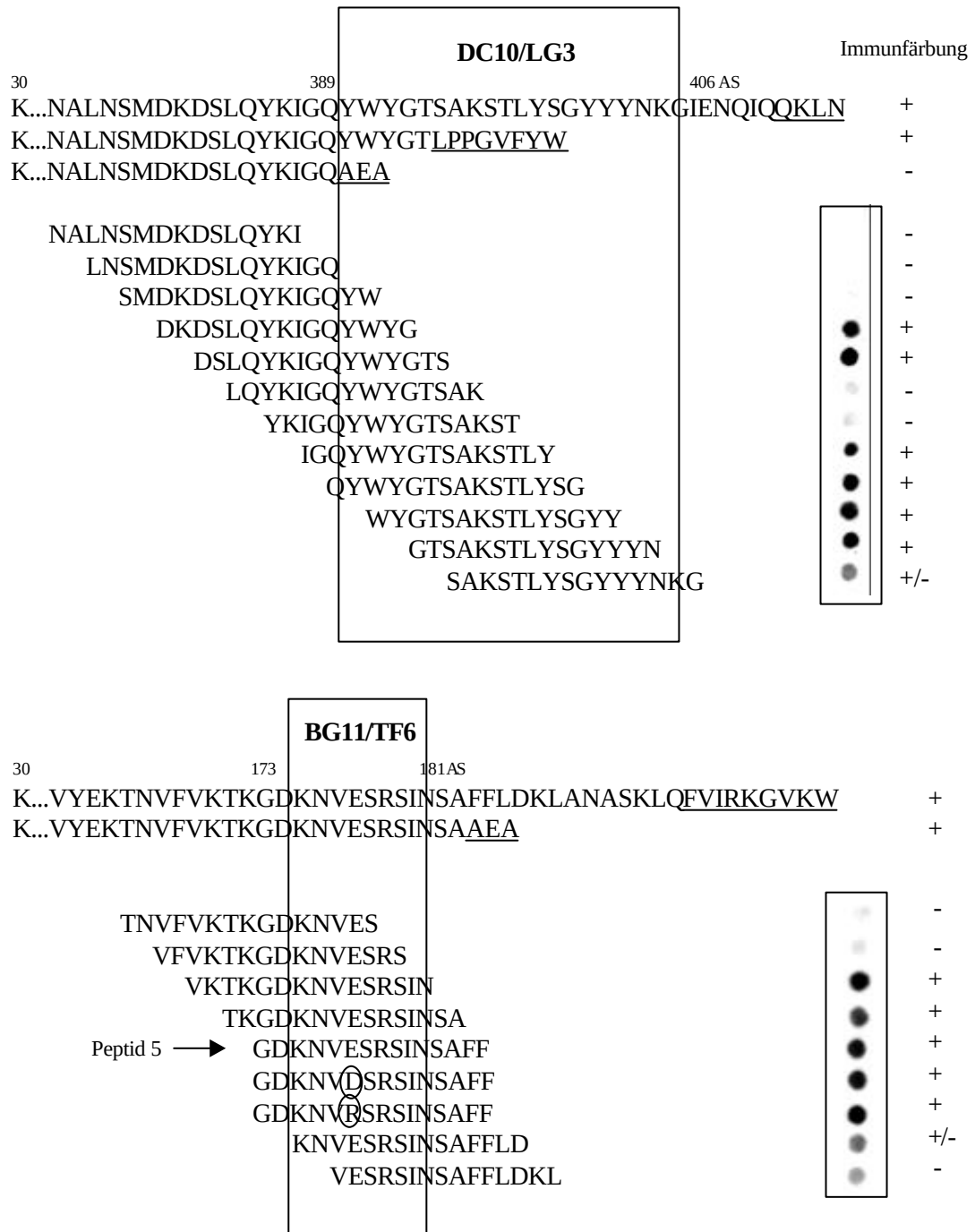


Abb.19 Epitopkartierung der Antikörper DC10/ LG3 und BG11/TF6 mit Hilfe von synthetischen OppA Peptiden
Die Sequenzen der synthetisierten OppA-Peptide ist angegeben, wobei der Bereich der Epitope der jeweiligen deletierten Expressionsprodukte über der Sequenz der Peptide dargestellt ist. Der unterstrichende Bereich kennzeichnet Aminosäuren des Expressionsvektors. Auf der rechten Seite sind die Immunfärbungen der Peptide dargestellt. Die Lage der resultierenden Epitope ist umrandet (+ = positive Immunfärbung; - = negative Immunfärbung).

Vorhergehende Untersuchungen hatten gezeigt, dass die monoklonalen Antikörper DC10 und LG3 das OppA Protein in nativer Konformation (z.B. im ELISA) erkannten, jedoch selten nach Denaturierung des OppA-Proteins. Dies ließ vermuten, dass es sich hier um ein Konformationsepitop handelt, welches nur nach Ausbildung der korrekten Tertiärstruktur aus mehreren Sequenzbereichen erkannt wird.

Die Analyse der BG11 und TF6 Epitope beschränkte sich aufgrund der Deletionsexperimente (Kapitel 4.3.3.1) auf den Bereich der Aminosäuren 163 bis 189, der ebenfalls mit Peptiden von 15 Aminosäuren, die jeweils um 13 Aminosäuren überlappen, abgedeckt wurde. Wie in Abbildung 19 dargestellt, konnte ein gemeinsamer Bereich von 9 Aminosäuren (173-181) für die Epitope der monoklonalen Antikörper TF6 und BG11 identifiziert werden. Daraus ging hervor, dass es sich bei den Antikörpern TF6 und BG11 um ein und denselben Antikörper handelt, so dass in den nachfolgenden Versuchen hauptsächlich der TF6 Antikörper verwendet wurde.

Der Austausch der negativ geladenen Glutaminsäure in Position 178 gegen das positiv geladene Arginin in Peptid 5 sollte eine Konformationsänderung bewirken. Da keine Veränderung in der Reaktivität des Antikörpers detektiert wurde, kann angenommen werden, dass die Aminosäure Glutaminsäure für das Epitop des TF6 Antikörpers nicht essentiell ist. Der TF6-Antikörper detektierte das OppA Protein auch unter denaturierenden Bedingungen, so dass es sich hier um ein konformationsunabhängiges Epitop handelt.

4.3.4 Untersuchung verschiedener Mycoplasmenisolate mit Hilfe der monoklonalen Anti-körper TF6 und DC10

Nachdem die Epitope der OppA Antikörper kartiert waren, sollten die im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie vorhandenen 125 Düsseldorfer *Mycoplasma hominis* Isolate und 47 *Mycoplasma hominis* Isolate aus Nürnberg im Westernblot mit den monoklonalen Antikörpern TF6/BG11 und DC10/LG3 untersucht werden.

Von unserer Arbeitsgruppe wurde 1993 beschrieben, dass alle bis dato in Düsseldorf vorhandenen *M. hominis* Isolate mit dem DC10 Antikörper im ELISA detektiert wurden (Henrich *et al.*, 1993), wohingegen die Antikörper BG11, TF6 und LG3 unterschiedliche *M. hominis* Isolate erkannten. In den von mir durchgeführten Westernblotanalysen zeigte sich, dass alle 125 *M. hominis* Isolate aus Düsseldorf und die 47 Nürnberg-Isolate von den beiden Antikörpern DC10 und LG3 erkannt wurden. Diese Versuchsergebnisse unterstützten die Annahme, dass es sich ebenfalls bei den Antikörpern DC10 und LG3 um denselben

Antikörper handelt, zumal auch die Epitopkartierung die Identität beider Antikörperbindungsstellen gezeigt hatte. Die Antikörper TF6/BG11 erkannten nur 36 % der untersuchten *M. hominis* Isolate. In Abb. 20 sind exemplarisch die Immunfärbungen von drei verschiedenen *M. hominis* Isolaten abgebildet. Wie bereits erwähnt, wurden mit dem DC10 Antikörper alle untersuchten *M. hominis* Isolate detektiert, wohingegen mit dem TF6 Antikörper nur ein Teil der Isolate erkannt wurden, wie zum Beispiel die Isolate 872J und 770J im Gegensatz zum Isolat 3138U.

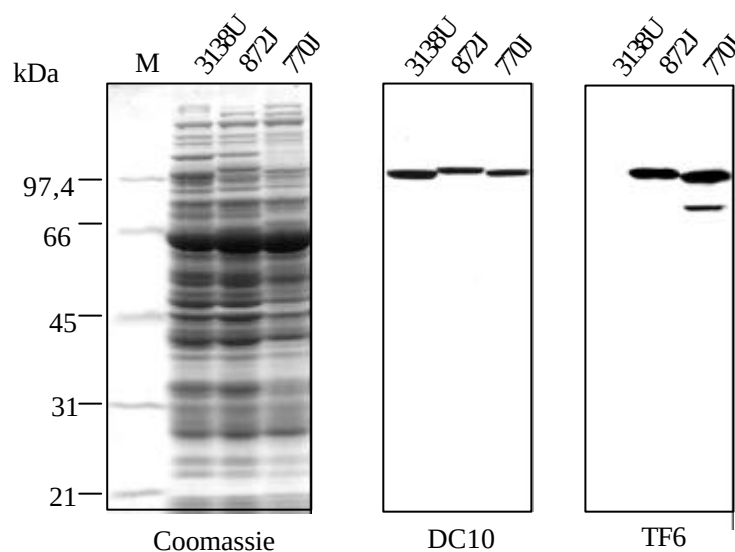


Abb. 20. Exemplarische Darstellung der drei klinischen *M. hominis* Isolate 3138U, 872J und 770J. Jeweils 15 µg Protein/Spur wurden von den drei *M. hominis* Isolate (Kapitel 3.1.1) in einem 9,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder in der Immunfärbung mit den OppA spezifischen Antikörpern DC10 und TF6 detektiert. Als Längenstandard (M) ist ein low-range Standard (Gibco) verwendet worden.

Zusätzlich ist im Coomassie gefärbten Polyacrylamidgel wie auch in der Westernblotanalyse ersichtlich, dass das OppA-Proteine im Isolat 872J größer ist als in den beiden anderen Isolaten (3138U und 770J). Dies ist das bislang einzige Beispiel einer Größenvariation des OppA Proteins. Welcher Bereich von der Größenvariation betroffen ist, und ob diese Größenveränderung des OppA Proteins eine Auswirkung auf seine Funktion hat, bleibt noch zu untersuchen.

4.3.5 Nachweis von OppA in verschiedenen Mycoplasmenspezies

Homologievergleiche hatten gezeigt, dass ein Lipoprotein von *M. pulmonis* 25 % Identität und ein Lipoprotein von *M. pneumoniae* 20 % Sequenzgleichheit zum Lipoprotein OppA von *M. hominis* aufwies (Kapitel 4.1).

Die Analyse der homologen Epitopbereiche des Antikörpers TF6 zeigten 33 % Identität zum putative 96 kDa OppA Proteins von *M. pulmonis* und 40 % zum 98 kDa OppA Protein von *M. pneumoniae*. Untersuchungen des DC10 Epitop von *M. hominis* zeigte 40 % Homologien zum OppA Proteine von *M. pulmonis* und 31 % Identität zum OppA Protein von *M. pneumoniae*. Dies zeigt, dass die antigenen Bereiche des Opp Proteins speziesübergreifend konservierter sind als die anderer Regionen von OppA (Abb. 21).

Als Positivkontrolle wurde mit den Antikörpern TF6 und DC10 das OppA Protein in den beiden *M. hominis* Stämmen FBG und PG21 (NCTC-Stamm) detektiert (Abb. 21, Spuren FBG und PG21). In aufgetrenntem *M. pulmonis* Zelllysate konnte ein 105 kDa Protein wie auch ein 116 kDa Protein detektiert werden. Es kann keine Aussage darüber gemacht werden, welches der beiden Proteine dem OppA Protein von *M. hominis* entspricht. Nicht vorhersagbaren strukturelle Merkmalen in der Tertiärstruktur des OppA Proteins von *M. pulmonis* könnten der großen Unterschied des apparenten Molekulargewichts zum computerbestimmten Molekulargewicht erklären. Die Ansequenzierung der detektierten 116 kDa und 105 kDa Bande soll zur Identifizierung dieses OppA Proteins von *M. pulmonis* beitragen. Mit den beiden Antikörpern TF6 und DC10 wurde in *M. pneumoniae* Zelllysate kein OppA detektiert. Aufgrund der Homologie von 40 % zu dem im OppA Protein von *M. hominis* detektieren TF6-Epitop ist es verwunderlich, dass das OppA Protein in *M. pneumoniae* nicht von dem TF6 Antikörper erkannt wurde. Möglich wäre das die Sequenzfolge von –SIN– des Epitop die in *M. hominis* und *M. pulmonis* identifiziert wurde, für die Bindung des Antikörpers notwendig ist, welches die ergebnislose Detektion des OppA Proteins in *M. pneumoniae* mit dem TF6 Antikörper erklären würde.

In weiteren Versuchen mit dem *M. hominis* spezifischen polyklonalen anti-OppD Serum wurde das 43 kDa OppD Protein in *M. hominis* FBG und im Typ Stamm PG21 wie auch in *M. pulmonis* detektiert. Das OppD Protein in *M. pulmonis* wurde nur schwach immungefärbt. Eine Kontamination mit Proteinen des NCTC-Stamms PG21 aus der Nachbarspur war auszuschließen, da im Originalexperiment zwei leere Spuren zwischen den im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Mycoplasmen-Zelllysaten befanden. Obwohl die Homologie zwischen den OppD Proteinen von *M. hominis* und *M. pulmonis* relativ hoch war (59 %),

wurde angenommen, dass das polyklonale Serum doch speziesspezifisch OppD von *M. hominis* am besten detektiert. In *M. pneumoniae* konnte kein OppD detektiert werden. Hier betrug die Homologie zwischen den beiden OppA Proteine nur 40,6 %.

TF6-Epitop

<i>M. hominis</i>	<u>173</u>	K	N	V	E	S	R	S	I	N	<u>181</u>	AS
<i>M. pulmonis</i>	<u>159</u>	E	S	S	D	P	K	S	I	N	<u>167</u>	
<i>M. pneumoniae</i>	<u>151</u>	N	N	Q	Q	S	K	S	I	T	<u>159</u>	

DC10-Epitop

<i>M. hominis</i>	<u>389</u>	Y	W	Y	G	T	S	A	-	K	S	T	L	Y	S	G	Y	Y	Y	N	K	<u>407</u>	AS
<i>M. pulmonis</i>	<u>349</u>	Y	W	Y	G	E	K	P	-	S	D	F	L	S	A	G	P	Y	Y	L	S	<u>366</u>	
<i>M. pneumoniae</i>	<u>350</u>	Y	G	G	G	V	N	A	W	R	D	T	W	S	V	G	P	Y	Y	V	E	<u>369</u>	

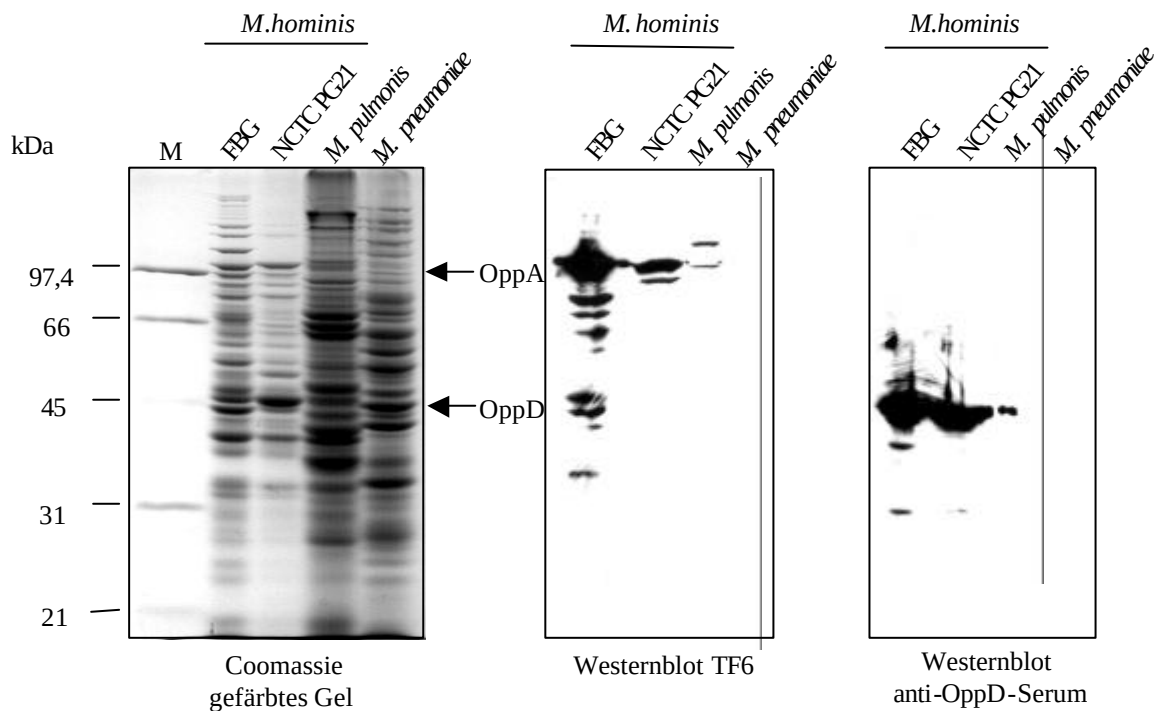


Abb.21 Westernblotanalyse verschiedener Mycoplasmenisolate mit dem anti-OppA- und dem anti-OppD-Serum. Je 10 µg *M. hominis* FBG und PG21 Zelllysate sowie je 20 µg Zelllysate von *M. pulmonis* und *M. pneumoniae* gelelektrophoretisch in einem 9,5 % igem SDS-Polyacrylamidgel getrennt, Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder in der Immunfärbung mit dem anti-OppA-Antikörper TF6 bzw. dem anti-OppD-Serum detektiert worden. Als Längenstandard ist der low-range Marker (Gibco) verwendet worden. Darüber sind die Epitope der Antikörper TF6 und DC10 der verschiedenen Mycoplasmenarten dargestellt

Diese Ergebnisse zeigen zum ersten Mal den Nachweis der Oligopeptidpermease-Domänen OppA und OppD von *M. pulmonis* und beweisen, dass sie auch in dieser Mycoplasmenspezies exprimiert werden.

4.3.6 Versuch der Selektion von OppA-Mutanten exprimierenden *M. hominis* Isolaten

Eine *in vitro* Selektion von variablen Oberflächenantigenen durch Inkubation von Viren bzw. Bakterien mit speziesspezifischen Antikörpern wurde für mehrere Viren z.B. für Coxsackievirus B (Van Houten *et al.*, 1991) und Hepatitis B Virus (Carman *et al.*, 1990) und einige Parasiten (Wood *et al.*, 1989) sowie für *M. hominis* (Jensen *et al.*, 1995), *M. hyorhinis* (Citti *et al.*, 1997), *M. bovis* (Le Grand *et al.*, 1996) und *M. gallisepticum* (Gordon & Geary, 1997) beschrieben. Es wurde angenommen, dass die Veränderung der Antigengröße eine Umgehung der Wirtszellimmunantwort ermöglicht. Dieser Mechanismus ist für das Überleben eines Parasiten sehr wichtig.

Diese Befunde aus der Literatur sollten als Grundlage dienen, Mutanten des OppA Proteins in seinem Molekulargewicht zu selektionieren und eine damit verbundene Funktionsänderung des OppA untersuchen zu können. Von Henrich *et al.* konnte 1993 gezeigt werden, dass eine vorherige Bindung der zwei monoklonalen Antikörper BG11 und TF6 an das Membranprotein OppA die Adhärenz dieses Proteins an HeLa-Zellen vermindert. Es war zu hoffen, dass bei *Mycoplasma hominis* in Gegenwart der Antikörper TF6 und BG11 Mutanten selektioniert würden, die eine Veränderung in der OppA Größe oder eine Modifikation im Bereich der Antikörperbindungsstellen besäßen, so dass das OppA Protein von den beiden monoklonalen Antikörpern in diesen Populationen nicht mehr erkannt würde.

Aus diesem Grund wurde *M. hominis* FBG in Gegenwart der monoklonalen Antikörper BG11 und TF6 über einen Zeitraum von 3 Monaten inkubiert. Die Mycoplasmen wurden alle 3 Tage in frischem Argininmedium mit der entsprechenden Menge an Antikörper (1µg/ml) passagiert und nach 7 Tagen im Westernblot untersucht. Die Westernblotanalysen zeigten keine Veränderung des OppA Proteins, weder im Molekulargewicht noch in seinem Immunfärbungsmuster. Dies zeigte, dass das OppA Protein sich nicht wie das oberflächenlokalisierte 135 kDa Proteine (Lmp-1) aus *Mycoplasma hominis* PG21 (Jensen *et al.*, 1995) verhält, was vermuten läßt, dass eine Veränderung im OppA Protein möglicherweise zu nicht lebensfähigen Zellen führt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass OppA speziesübergreifender Bestandteil der Oligopeptidpermease in Mycoplasmen ist und die dargestellten Ergebnisse für sein lebensnotwendiges Vorkommen in Mycoplasmen sprechen, sollten seine putativen funktionellen Domänen wie ATP-Bindung und Phosphorylierung charakterisiert werden.

4.3.7 Die ATP-bindenden Eigenschaften der OppA und OppD Proteine

Wie in Abbildung 5 dargestellt, wies OppA Sequenzmerkmale einer ATP-Bindungsstelle auf. Im Gegensatz zu OppD und OppF, die die Sequenzmotive Walker A und B, helikale Domäne und Linker Region zeigten, fehlt OppA der helikale und der Linker Bereich und die Walker A und B Sequenz waren vertauscht. Um die Funktionalität dieser Proteinregion zu testen wurden Zelllysate von *M. hominis* mit Sepharose-gekoppeltem ATP inkubiert, so dass alle Proteine, die ATP binden, aus dem Gesamtzelllysat isoliert wurden. Die an die ATP-Sepharose gebundenen Proteine wurden durch steigende Konzentrationen von ATP (2, 20, 200 mM) vom Säulenmaterial kompetitiv eluiert. Im Silber gefärbten SDS-Polyacrylamidgel wurden mehrere Proteine im Elutat sichtbar. Westernblotanalysen zeigten, dass OppA, OppD und der Elongationsfaktor EF-Tu (GTP-bindendes Protein) an das Säulenmaterial banden. Dies war ein erster Hinweis auf die ATP-Bindungseigenschaft dieser Proteine. Es konnten aber auch die Membranproteine P50, P60 und P80 in den Elutionen vom Säulenmaterial nachgewiesen werden, so dass nicht davon ausgegangen werden konnte, dass unter diesen Reaktionsbedingungen nur ATP-bindende Proteine aufgereinigt worden waren.

Zur Minimierung unerwünschter unspezifischer Proteinbindungen an die ATP-Sepharose wurden nun aufgereinigte Proteine (Kapitel 3.10.4) mit Sepharose-gekoppelten ATP inkubiert. Die Säulenmatrix wurde mehrfach gewaschen und die gebundenen Proteine anschließend mit steigenden ATP-Konzentrationen von 2 mM bis 200 mM von der Säule kompetitiv eluiert (Abb. 22).

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Eluate konnte im silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel das native OppA Protein (OppAⁿ) in den Proben mit 2 mM ATP und in abnehmender Konzentration in den Proben mit 20 mM ATP und 200 mM ATP identifiziert werden (Abb. 22, OppAⁿ). Das rekombinante OppA^r zeigte eine sehr geringe Affinität zur ATP-Matrix, wie an der geringen Menge des von der ATP-Sepharose eluierten OppA^r Proteins zu sehen ist (Abb. 22, Spuren 1-3 und 9-11). Im Gegensatz zum OppA^r schien das OppD^r-Protein gut an die ATP-Sepharose zu binden, da die Menge des OppD^r nach Inkubation mit der ATP-Sepharose im Überstand deutlich reduziert war (Abb. 22, Spuren

vor/nach-ATP-Säule). Es konnte jedoch kein rekombinantes OppD^r Protein von der ATP-Sepharose eluiert werden. Der Grund für die nicht reversible Bindung des OppD^r Proteins an die ATP-Sepharose ist unklar, so dass keine Aussage gemacht werden kann, ob das rekombinante OppD^r Protein ATP bindet oder unspezifisch an die ATP-Sepharose bindet.

Als Positivkontrolle wurde der native Elongationsfaktor EF-Tu verwendet. Wie bereits erwähnt, besitzt der EF-Tu eine Nukleotid-Bindungsstelle und konnte wie erwartet bereits mit einer geringen Konzentration ATP (2 mM) und im folgenden auch mit höheren Konzentrationen ATP von der ATP-Sepharose kompetitiv entfernt werden (Abb. 22, Spur 1-3).

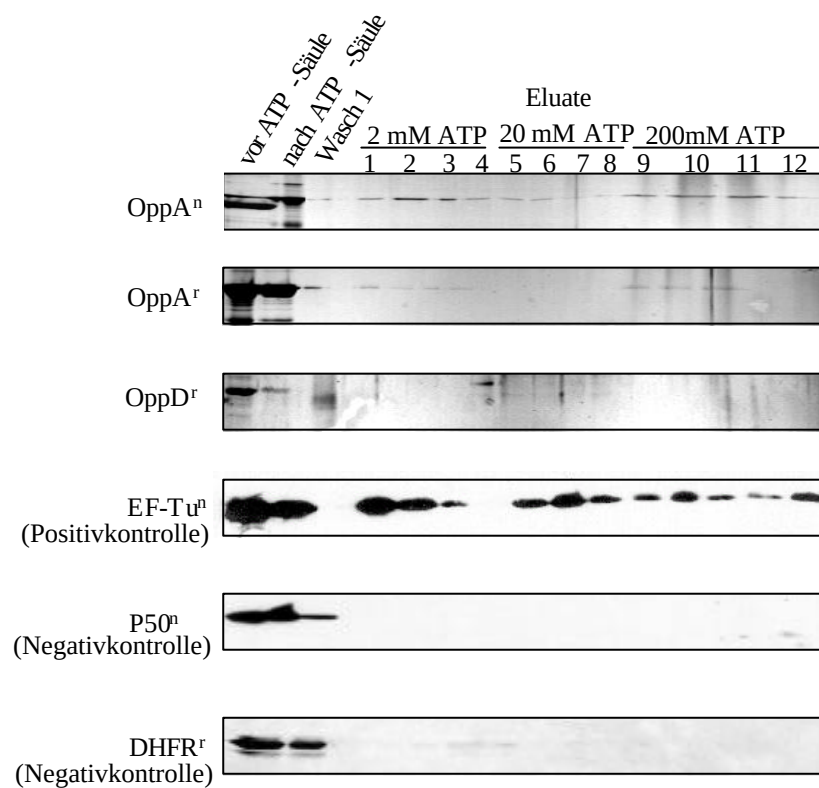


Abb.22 Affinitätschromatographische Aufreinigung von ATP-bindenden Proteinen.

Die aufgereinigten Proteine OppAⁿ, OppA^r, OppD^r, EF-Tuⁿ, P50ⁿ und DHFR^r (0,5 mg/ml) wurden mit Sepharose-gekoppeltem ATP (0,2 µmol) inkubiert. Gebundene Proteine wurden mit Hilfe von steigenden ATP-Konzentrationen eluiert, im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Silberfärbung visualisiert.

Dies spricht für die gute Bindung dieses Proteins an die ATP-Sepharose. Die beiden Negativkontrollen, das native *M. hominis* Adhäsins P50 und die rekombinante Dihydrofolatreduktase (DHFR) wurden in den Elutaten nicht detektiert. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass unter diesen Versuchsbedingungen keine unspezifische Proteinbindung an die ATP-Sepharose stattfand. Die hier erstmals gezeigte Bindung des

nativen OppA Proteins an ATP-Sepharose beweist, dass das OppA Protein von *M. hominis* ein ATP-bindendes Protein ist.

Zur Bestätigung der Spezifität der ATP-Bindung von OppA wurde ein weiterer methodischer Zugang zum Nachweis der ATP-Bindung beschritten.

In der Literatur wurde der Mechanismus der ATP-Bindung folgendermaßen beschrieben: Die Walker A Sequenz interagiert mit dem Adeninring des ATP, wohingegen die Walker B Sequenz das γ -Phosphat während der Mg-ATP-Hydrolyse bindet. Folglich müssen die Walker A und Walker B Sequenz in räumliche Nähe zueinander gebracht werden, um ATP binden zu können. Von Schneider und Mitarbeitern wurde 1994 für das ATP-bindende MalK Protein des Maltosetransporters in *S. typhimurium* eine Änderung in der Sensitivität gegenüber Proteasen beschrieben, wenn ATP gebunden war. Dies führte zu einem veränderten Degradationsmuster Proteins. Schneider interpretierte seine Ergebnisse so, dass aufgrund der Bindung von ATP und der daraus resultierenden Konformationsänderung im ATP-bindenden Protein einige Spaltstellen des Trypsins nicht mehr zugänglich waren. Daraus resultierte die Veränderung im proteolytischen Spaltmuster im Vergleich zum Spaltmuster ohne vorangegangene ATP-Inkubation. Diesen experimentellen Zugang habe ich benutzt, um die ATP-Bindungen von OppA^r und OppD^r Proteins zu zeigen.

Bei limitierter Proteolyse von rekombinantem OppA^r, rekombinantem OppD^r, rekombinantem MalK^r und rekombinantem P60^r (einem Membranprotein von *M. hominis*) mittels Trypsin zeigte sich, dass alle Proteine durch Trypsin proteolytisch gespalten wurden. Natives OppA wurde trotz erhöhter Trypsinkonzentrationen nicht proteolytisch gespalten.

Dies mag durch inhibitorische Substanzen (Detergenzien) kommen, die während der Proteinpräparation in die Probe gelangten. Die rekombinanten Proteine wurden Detergenzienfrei präpariert

Nach ATP-Bindung zeigte das MalK^r Protein wie erwartet ein verändertes tryptisches Spaltmuster (Abb. 23). Als Negativkontrolle wurde das rekombinante Membranprotein P60 verwendet, welches kein ATP binden sollte. Es wurde sehr schlecht tryptisch gespalten, in den Proben, die über einen Zeitraum von 60 Minuten inkubiert wurden, wird jedoch ein schwacher Abbau sichtbar, der unabhängig von der Gegenwart des Mg-ATP ist. Das P60 Protein bindet folglich kein ATP.

Das OppA^r Protein, für das in der ATP-Bindungsstudie eine schwache ATP-Bindung nachgewiesen werden konnte, zeigte in diesem Versuchsaufbau eine Veränderung im Trypsinspaltmuster bei vorheriger Inkubation mit ATP. Dies war ein weiterer Hinweis auf

seine ATP-Bindung und bekräftigt die Ergebnisse der Bindungsstudie, dass OppA ATP bindet.

Eine der beiden ATPasen der Oligopeptidpermease, das OppD, wurde über den analysierten Zeitraum von 15 bis 60 Minuten hauptsächlich in ein 31 kDa, 30 kDa und 28,5 kDa Fragment gespalten, welche vom polyklonalen anti-OppD Serum im Westernblot detektiert wurden (Abb. 23).

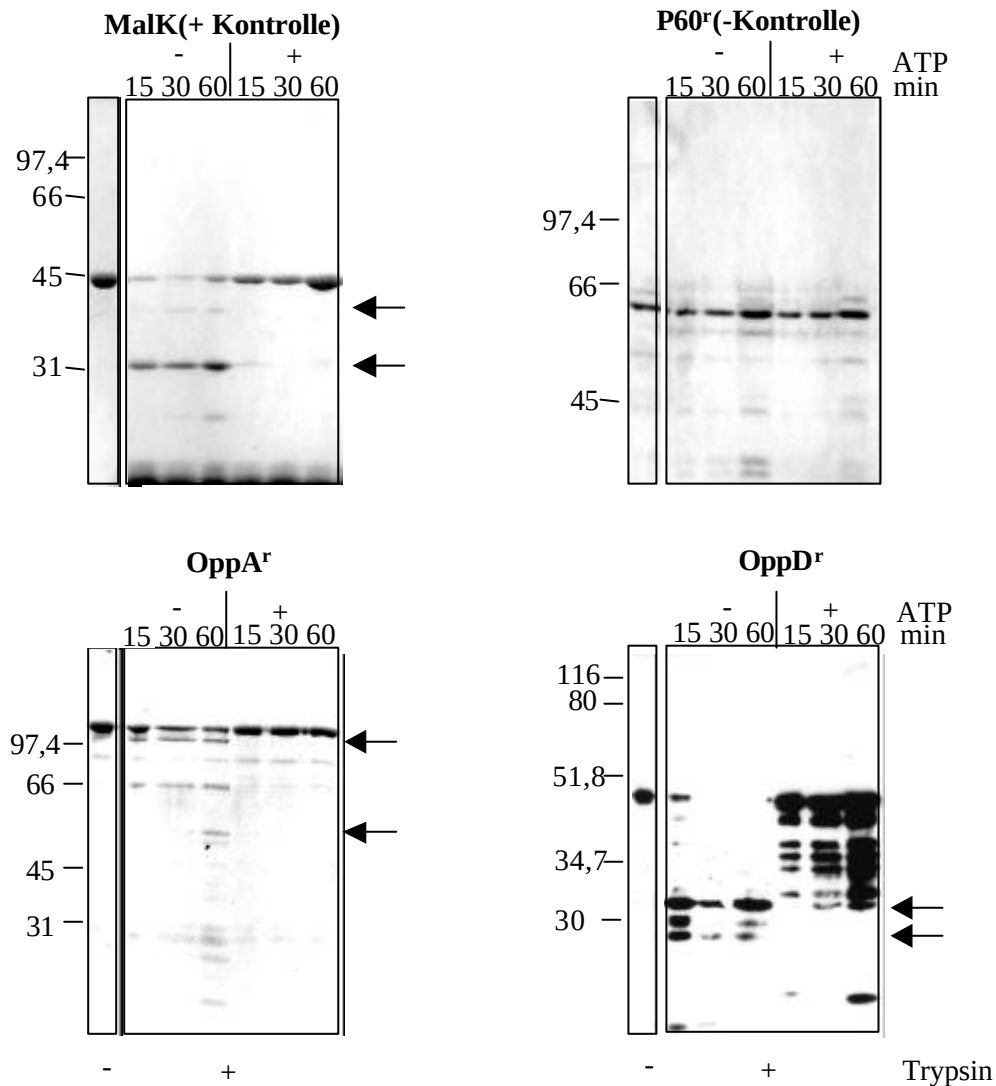


Abb.23 Limitierte Proteolyse der Proteine MalK^r, P60^r, OppA^r und OppD^r nach vorheriger Inkubation mit/ohne ATP.

Die aufgereinigten Proteine MalK^r, P60^r, OppA^r und OppD^r (0,5mg/ml) wurden mit und ohne ATP (5 mM) über einen Zeitraum von 15-60 min mit 50 ng/ml Trypsin behandelt. Die erhaltenen Proben sind gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt oder die behandelten OppD Spaltprodukte mit dem anti-OppD-Serum in der Immunfärbung detektiert worden. Die Pfeile kennzeichnen die Banden, die nur ohne (-) ATP Behandlung entstanden. Als Längenstandards sind ein low-range Marker (Gibco) und ein prestained low-range (Biorad) verwendet worden.

Inkubation mit Mg-ATP und nachfolgende Trypsinspaltung führten zu einer deutlich geringeren proteolytischen Spaltung des Proteins. Dies war der erste Beweis, dass das OppD Protein eine ATP-bindende Domäne der Oligopeptidpermease in *M. hominis* ist.

Zur weiteren Charakterisierung der ATP-Bindung der Proteine OppA^r und OppD^r sollte gezeigt werden, ob MgCl₂ die ATP-Bindung beeinflusst, und ob durch EDTA die ATP-Bindung zu inhibieren war. Das Nukleotid ATP wurde außerdem gegen die Nukleotide ADP, GTP und CTP ausgetauscht um zu untersuchen, ob diese auch von OppA^r und OppD^r gebunden werden. Die in Abbildung 24 dargestellten Bindungsstudien zeigen, dass zweiwertige Ionen für die Bindung von ATP wichtig zu sein scheinen, da bei gleichzeitiger Inkubation mit EDTA, welches zweiwertige Ionen komplexiert, die Bindung von ATP an OppA^r und OppD^r vermindert wurde. Vergleicht man die Ergebnisse mit ATP und ATP+EDTA der Abbildung 24, so sieht man in den +EDTA-Spuren einen verstärkten Abbau der Proteine OppA und OppD. Folglich ist Magnesium für die ATP-Bindung essentiell.

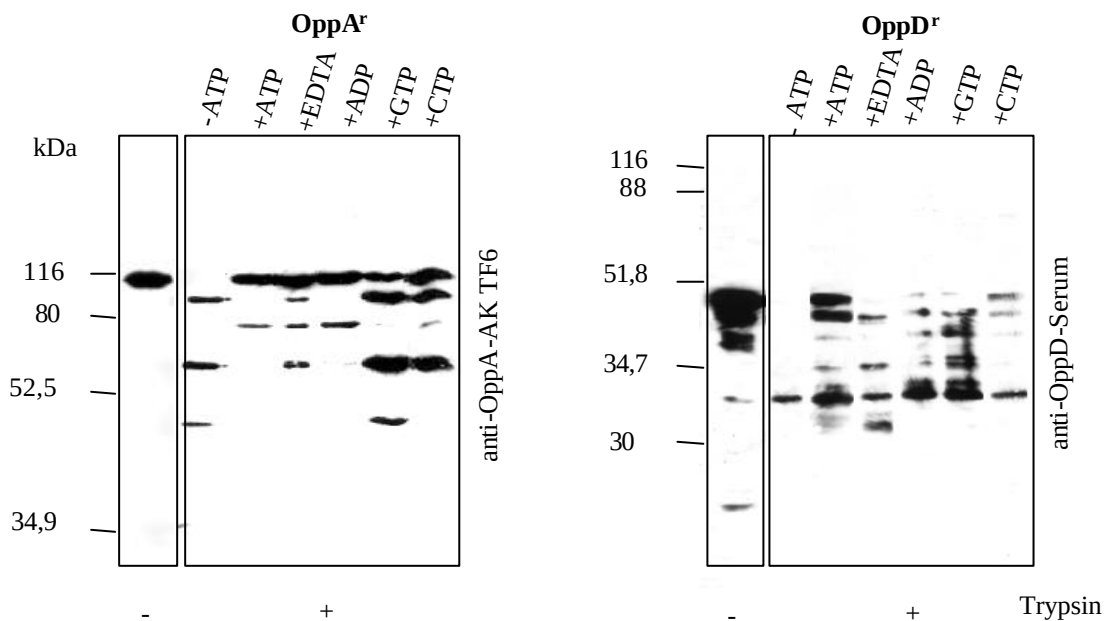


Abb. 24 Proteolytisches Spaltmuster der Proteine OppA^r und OppD^r

Die aufgereinigten Proteine OppA^r und OppD^r (0,5 µg/ml) wurden mit (+) und ohne (-) ATP, mit ATP (5 mM) plus EDTA (10 mM), ADP (5 mM), GTP (5 mM) und CTP (5 mM) inkubiert. Die anschließende Trypsinspaltung erfolgte für 30 min bei 4°C. Die Spaltprodukte wurden gelelektrophoretisch in einem 9,5 bzw 12 %igem Polyacrylamidgel getrennt und mit dem monoklonalen AK TF6 (OppA^r) und dem anti-OppD-Serum (OppD^r) immungefärbt. Als Längenstandard ist ein prestained low range Marker (Biorad) verwendet worden.

Die vorherige Inkubation der rekombinanten Proteine mit den drei Nukleotiden ADP, GTP oder CTP führte, wie in Abbildung 24 ebenfalls dargestellt ist, zu einer stärkeren proteolytischen Spaltung als die nach Inkubation mit dem ATP-Nukleotid. Einzige Ausnahme bildete das proteolytische Spaltmuster des OppA^r Proteins nach Inkubation mit ADP, welches keine Veränderung zum Spaltmuster nach ATP-Inkubation zeigte.

Folglich bindet OppA^r die Nukleotide ATP und ADP, wohingegen CTP und GTP eine geringe Affinität zum OppA^r Protein zeigen. Das OppD Protein wies neben seiner ATP-Bindungsfähigkeit eine geringe Affinität zu den drei Nukleotiden ADP, GTP und CTP auf (Abb. 24).

4.3.8. Die Proteine OppA und OppD hydrolysieren ATP

Nachdem ich zeigen konnte, dass die rekombinanten Proteine OppA^r und OppD^r ATP binden, stellte sich die Frage, ob sie, wie es in der Literatur für andere ATP-bindenden Proteine beschrieben wird, das ATP auch hydrolysieren können (Morbach *et al.*, 1997).

Zur Quantifizierung der ATP-Hydrolyse Aktivität werden meist spektroskopische Methoden verwendet, um das freie anorganische Phosphat (P_i) des ATPs zu messen. Die Messung des Phosphats erfolgte in den hier durchgeführten Versuch indirekt durch Messung von Phosphomolybdat, das bei der Inkubation von Ammoniummolybdat mit dem freigesetzten anorganischen Phosphat entstand und mit Malachitgrün einen Komplex bildete. Diese Farbreaktion konnte anschließend im Spektrometer bei 620 nm gemessen werden. Mit Hilfe von NaH_2PO_4 wurde ein Standard für die Messung des Phosphats im Bereich von 20 nmol bis 0,25 nmol erstellt. Die Hydrolyse von ATP durch die Proteine OppA^r, OppD^r, MalK^r (als Positivkontrolle) und Carboanhydrase (als Negativkontrolle) wurde anhand des entstandenen anorganischen Phosphats gemessen (Kapitel 3.10.13) und auf die Inkubationszeit und die eingesetzte Proteinmenge bezogen, um die spezifische Aktivität der untersuchten Proteine zu ermitteln (Morbach *et al.*, 1997). Für diese Experimente wurden die rekombinanten Proteine verwendet, da sie ohne Detergenzien aufgereinigt werden konnten. Die Detergenzien störten die ATP-Hydrolyse Experimente.

Für das OppA Protein konnte eine spezifische ATP-Hydrolyse-Aktivität von $145 \text{ nmol } P_i \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ OppA Protein gemessen werden, wohingegen für das OppD Protein eine 2,8 mal höhere spezifische Aktivität gemessen werden konnte (Abb. 25, OppA/OppD). Die Normierung der spezifischen Aktivität auf die Molarität der eingesetzten Proteine, zeigt das die Hydrolyseaktivität von OppD der von OppA entspricht, da OppA mehr als die doppelte

Masse des OppD Proteins besitzt und aus diesem Grund in dem Versuchsansatz doppelt so viele Moleküle OppD als OppA vorhanden waren.

Die Positivkontrolle mit MalK zeigte nur eine spezifische Aktivität von $54 \text{ nmol P}_i \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$, wohingegen in der Literatur eine Aktivität von $1,1 \text{ } \mu\text{mol P}_i \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ beschrieben wurde (Morbach *et al.*, 1997). Die reduzierte Hydrolyse-Aktivität ist wahrscheinlich auf folgenden Grund zurückzuführen: Das MalK ist ein sehr empfindliches Protein, dessen eine Lagerung bei -70°C empfohlen wurde. Es zeigte sich schon nach einiger Zeit eine partielle proteolytische Spaltung des MalK Proteins in der gelelektrophoretischen Analyse. Da uns das MalK Protein freundlicherweise von Herr Dr. Schneider (Humboldt-Universität zu Berlin, Institut für Biologie) zur Verfügung gestellt wurde, konnte es durch den Transport und die längere Lagerung zum Teil seine Hydrolyse-Aktivität verloren haben.

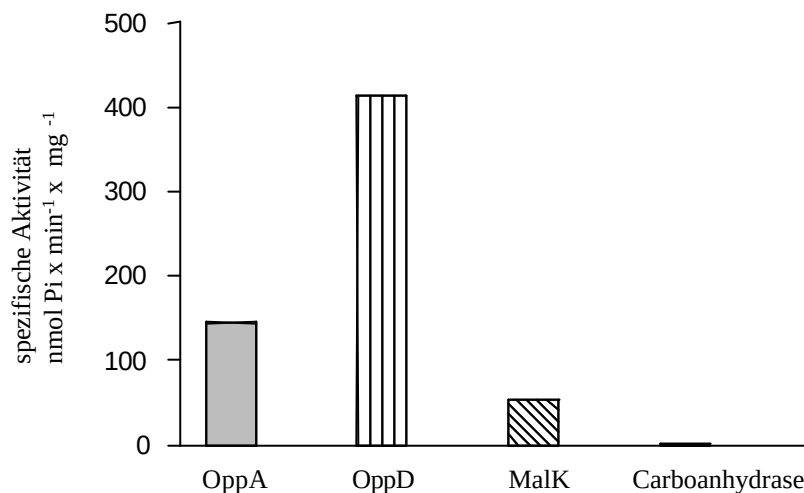


Abb.25 ATP-Hydrolyse Assay.

Messung der spezifischen Aktivität der aufgereinigten Proteinen OppA^r, OppD^r, MalK^r, und Carboanhydrase nach Zugabe von ATP.

Die Carboanhydrase als Negativkontrolle zeigte keine Hydrolyseaktivität.

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die rekombinanten Protein OppD^r, OppA^r und MalK^r in der Lage sind, ATP zu hydrolysieren.

Mit diesen Experimenten konnte erstmals neben der ATP-Bindung auch eine ATP-Hydrolyse-Aktivität bei den Proteinen OppA und OppD von *M. hominis* nachgewiesen werden.

4.3.9 OppA Protein wird phosphoryliert

Nachdem die vorhergehenden Experimente gezeigt haben, dass die beiden *M. hominis* Proteine OppA und OppD enzymatische Aktivitäten besitzen, schloß sich die Frage an, ob und wie diese Proteine reguliert sein können. Für viele bakterielle und eukaryontische Proteine wurden Regulationen ihrer Enzymaktivität über Phosphorylierung beschrieben.

Computergestützte Analysen wiesen darauf hin, dass das OppA Protein von *M. hominis* mehrere Phosphorylierungstellen besaß, die hauptsächlich von Proteinkinase C- und Caseinkinase II erkannt werden (Abb. 3).

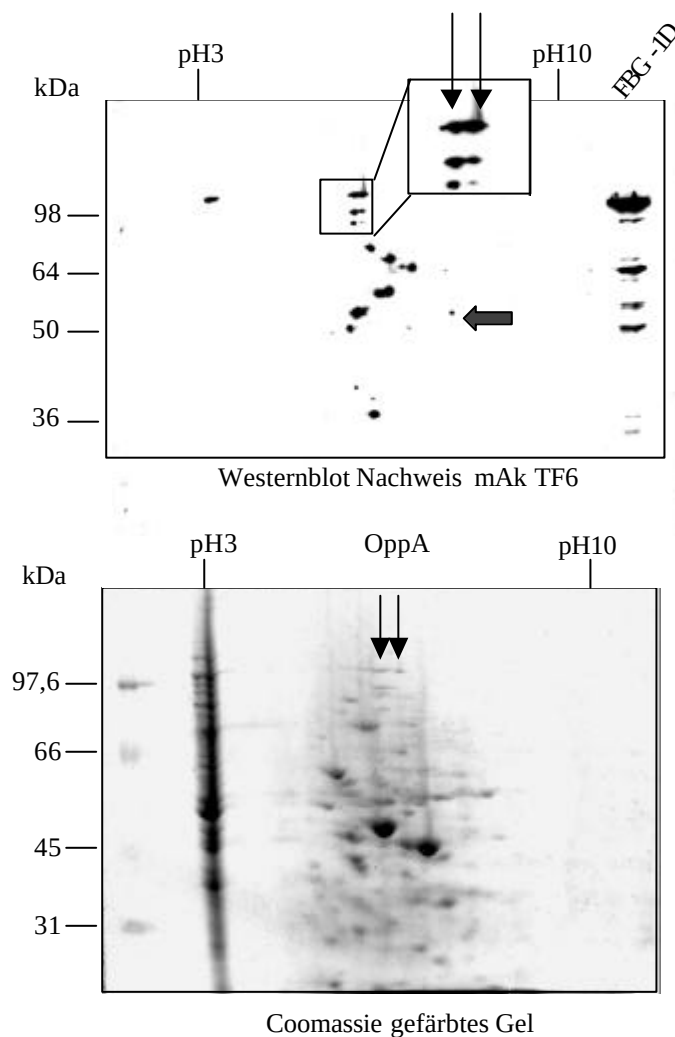


Abb. 27. 2D-Gelelektrophoretische Auftrennung von *M. hominis* FBG Lysat.

M. hominis FBG Lysat (250µg Gesamtprotein) wurde nach NEPHGE in der 1. Dimension im pH Bereich von 3 bis 10 bei 7200 Vh aufgetrennt und in der 2. Dimension nach ihren Molekulargewichten separiert. Die Proteine wurden mit dem OppA spezifischen Antikörper TF6 detektiert oder Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Als Längenstandards sind ein low-range Marker (Gibco) und ein prestained low range Marker (Biorad) verwendet worden.

Erste Hinweise auf eine posttranslationale Modifizierung des OppA Proteins zeigten sich in der Westernblotanalyse eines zweidimensional aufgetrennten *M. hominis* FBG Proteinlysats. Mehrere Spots mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten, aber gleichen Molekulargewichten konnten mit Hilfe des OppA spezifischen monoklonalen Antikörpers TF6 detektiert werden (Abb. 27).

Es war anzunehmen, dass die beiden Protein-„Spots“ im Bereich von 100 kDa, die mit Hilfe des anti-OppA Antikörpers TF6 detektiert wurden, auf unterschiedliche Phosphorylierungsformen des OppA Proteins zurückzuführen waren. Bei den in der Immunfärbung sichtbaren Spots mit niedrigeren Molekulargewichten handelt es sich um Abbauprodukte des OppA Proteins, die ebenfalls mit dem Antikörper TF6 erkannt wurden. Das paarweise Auftreten der postulierten phosphorylierten und nicht phosphorylierten Formen des OppA Proteins setzte sich bis zu einem Molekulargewicht von 50 kDa der Abbauprodukte fort (Abb. 27, Pfeil). Aufgrund der N-terminalen Lokalisation des TF6 Epitops lässt sich die Phosphorylierungsstelle im mittleren Bereich des OppA kartieren (Abb. 32).

Zur Bestätigung der Phosphorylierung des OppA Proteins wurde Zelllysats von *M. hominis* FBG mit [32 P]-ATP für 30 Minuten inkubiert. Das OppA Protein wurde anschließend über eine DC10-Affinitätssäule aufgereinigt, und die Hälfte der Probe mit alkalischer Phosphatase behandelt.

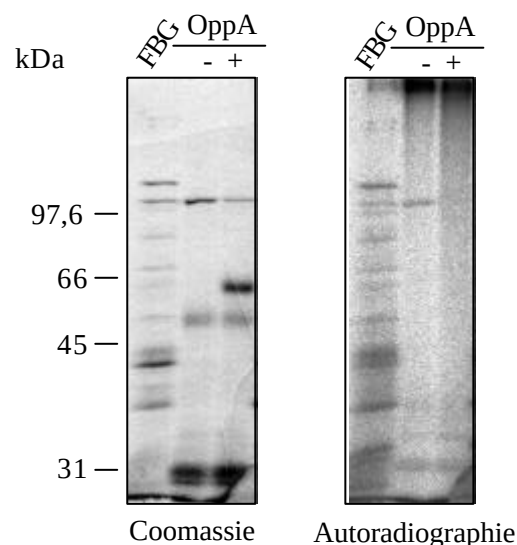


Abb. 28 *In vitro* Phosphorylierung des OppA Proteins

Zelllysats des *M. hominis* Isolates FBG (2 mg Gesamtprotein) wurde mit 30 μ Ci [32 P]-ATP inkubiert, und das OppA Protein affinitätschromatographisch aufgereinigt, die Hälfte der Probe mit alkalischer Phosphatase (+) inkubiert und in einem 9,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend Coomassie Brilliant Blau gefärbt und in der Autoradiographie untersucht. Als Standard ist ein low-range Marker (Gibco) verwendet worden.

Nach gelelektrophoretischer Trennung der Proteine zeigte sich in der Autoradiographie, dass einige Proteine *in vitro* phosphoryliert wurden (Abb. 28, Spur FBG). Wie vermutet gehörte das OppA Protein zu diesen Proteinen. Diese Phosphorylierung wurde durch die Inkubation mit alkalischer Phosphatase entfernt was die kovalente Bindung des Phosphates an OppA unterstreicht (Abb. 28, Spur OppA +/-).

In Untersuchungen unter Verwendung intakter Zellen zeigte sich ebenfalls eine Phosphorylierung des OppA Proteins. Mit diesem Experiment wurden die aus der zwei dimensional Gelelektrophorese erhaltenen Ergebnisse bestätigt, dass das OppA Protein *in vitro* phosphoryliert wird.

Um ausschließen zu können, dass es sich hier nicht nur um eine kovalente Bindung des $[^{32}\text{P}]$ ATP an das OppA Protein handelt, wurden *in vivo* Phosphorylierungen durchgeführt. Hierzu wurden *M. hominis* FBG Zellen in phosphatfreiem Medium unter Zugabe von $[^{32}\text{P}]$ Phosphorsäure inkubiert. Das OppA Protein, das P50-Adhäsion, die beiden Membranproteine P60 und P80 und der Elongationsfaktor EF-Tu von *M. hominis* wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt, die Hälfte jeder aufgereinigten Proteinprobe mit alkalischer Phosphatase behandelt und alle Proben im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Abb.29).

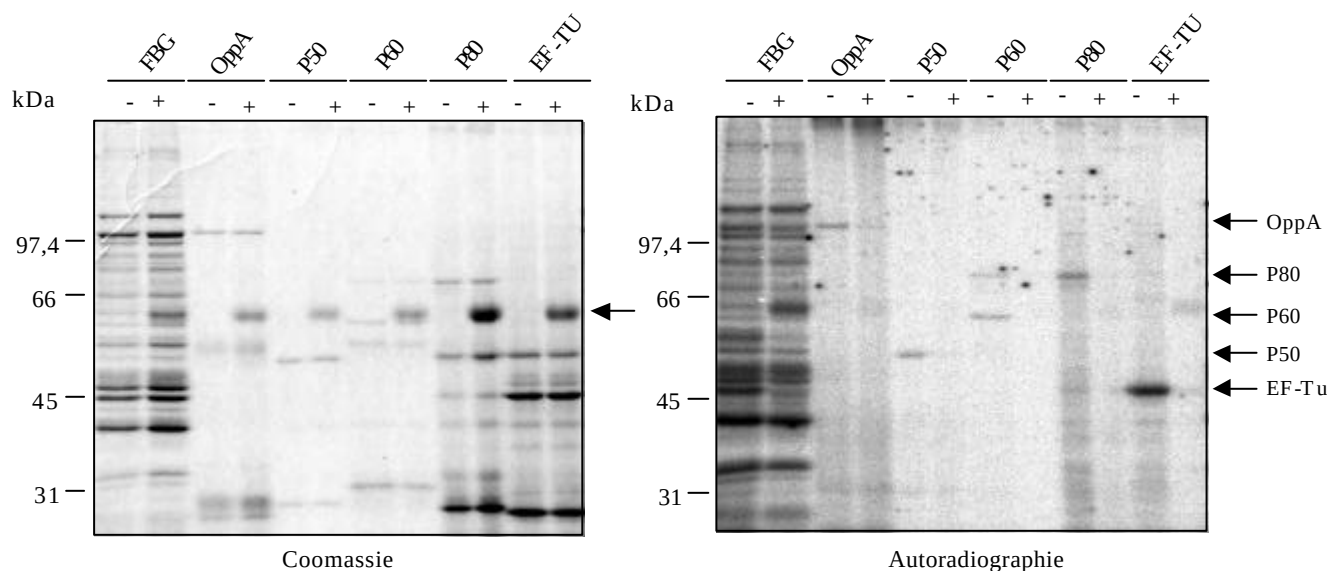


Abb.29. *In vivo* Phosphorylierung von *M. hominis* Proteinen

M. hominis Zellen wurden *in vivo* mit $[^{32}\text{P}]$ Phosphorsäure inkubiert, die Protein OppA, P50, P60, P80 und EF-Tu affinitätschromatographisch aufgereinigt, und die eine Hälfte der Probe mit (+), die andere Hälfte ohne (-) alkalische Phosphatase inkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem 9,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel wurde das Gel Coomassie gefärbt und einer Autoradiographie unterzogen. Als Längenstandard ist der low range Marker (Gibco) verwendet worden. Die im Gel getrennte alkalische Phosphatase ist mit einem Pfeil markiert.

Wie in Abbildung 29 in der Autoradiographie dargestellt ist, wurden alle fünf Proteine durch [^{32}P]Phosphorsäure markiert.

Mittels alkalischer Phosphatase wurde diese kovalent gebundenen Phosphate abgespalten, was sich im Verlust der Bande in der Autoradiographie widerspiegelt. Betrachtet man die Autoradiographie des FBG Lysates, so ist zu sehen, dass eine Vielzahl von Proteinen phosphoryliert wurde. Hier zeigte sich, dass nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase einige Signale schwächer wurden, wie zum Beispiel im Bereich von 45 kDa. Bei dieser Bande könnte es sich um das EF-Tu Protein handeln, dessen Dephosphorylierung bereits in der Spur (EF-Tu+) gezeigt wurde. Darüber hinaus wurden Proteine im Bereich von 55-60 kDa und im Bereich von 31 kDa mit Hilfe der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert.

Die im Coomassie gefärbten Gel sichtbare 62 kDa Bande entspricht der alkalische Phosphatase.

Aus vorhergehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (Henrich et al., 1993) war bereits bekannt, dass bei Aufreinigung des P60 Proteins das P80 Proteins mit isoliert wird. Die Komplexierung beider Proben in der *M. hominis* Membran wurde 1999 publiziert (Kitzerow & Henrich). Aus diesem Grund ist im Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel in der Spur P80 ebenfalls das P60 Protein erkennbar. Die affinitätschromatographische Aufreinigung von den Proteinen P80 und EF-Tu war, wie in dem Coomassie gefärbtem Gel der Abbildung 29 zu sehen nicht erfolgreich, da in beiden Proben neben den gewünschten Proteinen noch andere Proteine zu erkennen sind. Nichtsdestotrotz zeigt sich in der Autoradiographie, dass das P80 Protein und der EF-Tu am stärksten phosphoryliert wurden.

Zur Bestätigung der *in vivo* und *in vitro* Phosphorylierung des OppA Proteins sollte abschließend sichergestellt werden, dass die Signale der Autoradiographie nicht auf OppA gebundene radioaktiv markierte DNA oder RNA zurückzuführen war. Es zeigte sich, dass nach DNase und RNase Behandlung die radioaktive Markierung des OppA Proteins bestehen blieb und folglich nicht auf die Bindung radioaktiv markierter Nukleinsäure beruhte (Abb. 30, Spuren OppA-R/D). Mittels Trypsin konnte das OppA Protein vollständig degradiert werden, so dass die in der Autoradiographie erkennbare OppA Bande verschwand (Abb. 30, Spur OppA-T).

Durch Inkubation der Polyacrylamidgele in 0,1 N NaOH/50 % Methanol lassen sich nicht kovalent assoziierte Moleküle wie ATP, Phosphoenolpyruvat und Phosphate von Proteinen entfernen. Wie in der Autoradiographie von Abbildung 30 zu sehen ist, blieb nach Inkubation in 0,1 N NaOH/50 % Methanol die Phosphorylierung des OppA Proteins erhalten; ein weiteres Indiz, dass das Opp A Proteins wirklich phosphoryliert wurde.

Die Phosphorylierung des OppA Proteins präsentierte sich säurestabil, da sie einer Inkubation mit 15 % TCA für 60 min bei 95°C standhielt, wohingegen das OppA Protein durch eine basische Behandlung (1M NaOH 30 min 60°C) dephosphoryliert wurde. All dies waren Befunde, die die Phosphorylierung des OppA Proteins bestätigten.

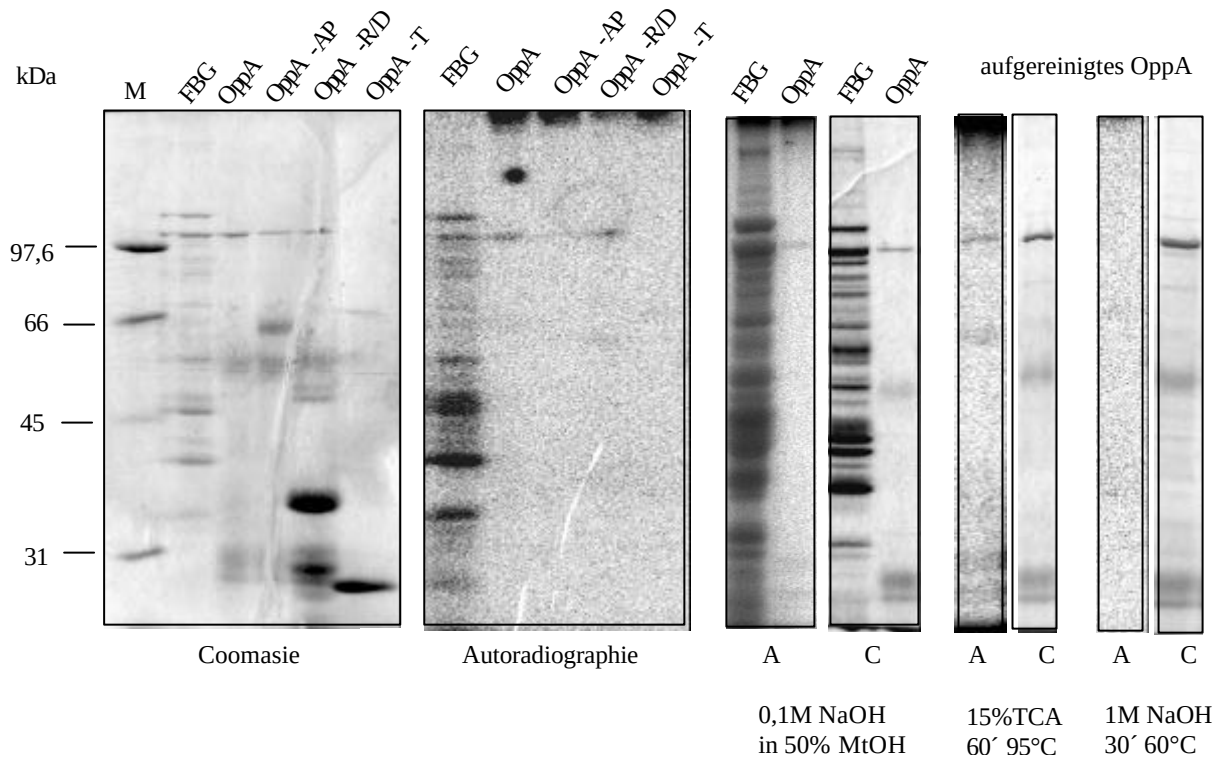


Abb.30 Analyse des phosphorylierten OppA Proteins.

Zellen von *M. hominis* (2 mg Gesamtprotein) wurde *in vivo* phosphoryliert, das OppA Protein affinitätschromatographisch aufgereinigt und mit alkalischer Phosphatase (OppA-AP), RNase und DNase (OppD-R/D), Trypsin (OppD-T), 15 % TCA oder 1M NaOH inkubiert. Die Proben wurden in einem 9,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel separiert und mittels Coomassie-Färbung (C) und Autoradiographie (A) analysiert. Als Längenstandard ist der low range Marker (Gibco) verwendet worden.

Um zu untersuchen, ob das OppA Protein phosphoryliert, nicht phosphoryliert oder in beiden Formen in *Mycoplasma hominis* vorliegt, wurden die Proteine von *in vivo* phosphorylierten *M. hominis* Zellen nach NEPHGE (O'Farrell *et al.*, 1977) zweidimensional getrennt. Das Coomassie gefärbte Gel zeigte zwei OppA Spots, wohingegen in der Autoradiographie nur der Spot des OppA Proteins mit dem sauren pI sichtbar war (Abb. 31; mit Pfeilen gekennzeichnet). Beide Proteinspots wurden aus dem Polyacrylamidgel ausgestochen, über HPLC aufgereinigt und massenspektrometrisch im Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum analysiert. Beide Spots entsprachen dem OppA Protein. Folglich konnte mit diesen Experimenten eindeutig gezeigt werden, dass das reife OppA Protein von *M. hominis* in phosphorylierter und nicht phosphorylierter Form vorliegt.

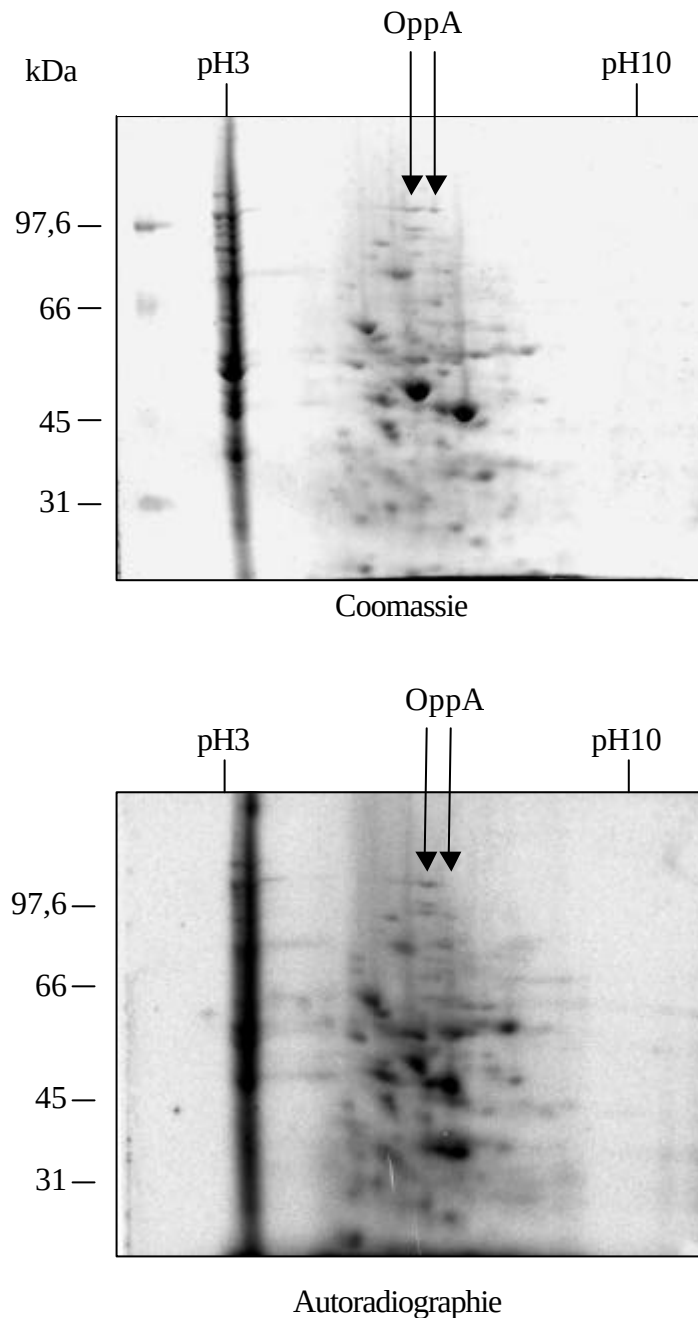


Abb.31 2D-Gelelektrophorese in vivo phosphorylierter *M. hominis* Proteine

M. hominis FBG Lysat wurde in der 1. Dimension nach NEPHGE und in der 2. Dimension gemäß ihrer Molekulargewichte nach Laemmli (1970) in einem 9,5 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt und in der Autoradiographie analysiert. Als Längenstandard ist der low range Marker (Gibco) verwendet worden.

Durch diese Experimente konnte ich erstmals beschreiben, dass die oberflächen-lokalisierte Substrat-bindende Domäne einer Permease in *M. hominis* phosphoryliert wird. Ob diese Phosphorylierung mit der enzymatischen Aktivität des Proteins, d. h. mit der Regulation seiner Substratbindung oder der Adhärenz des OppA Proteins in Zusammenhang steht, wird die Basis für weitere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe sein.

Zusammenfassend zeichnete sich ein komplexes Bild für das OppA Protein von *M. hominis*. Wie in Abbildung 32 nochmals dargestellt, konnte ich im Laufe meiner Promotionsarbeit folgende Funktionsmerkmale charakterisieren:

1. Das OppA Protein besitzt die Fähigkeit, Oligopeptide unter Konformationsänderung zu binden.
2. Neben der ATP-Bindung konnte für das OppA Protein ATP-Hydrolyseaktivität gezeigt werden
3. Das OppA Protein liegt in phosphorylierter und nicht phosphorylierter Form vor. Die Phosphorylierungsstelle konnte auf einen Bereich in der Mitte der Polypeptidkette eingegrenzt werden.

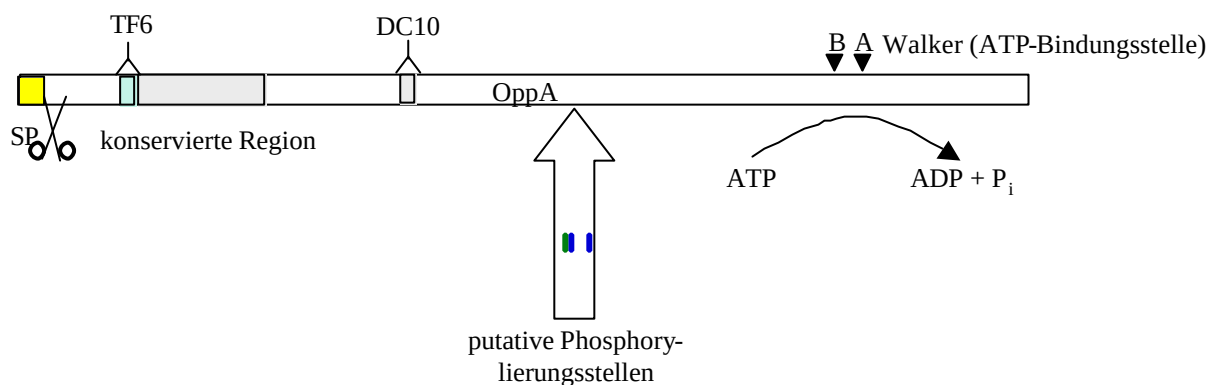


Abb.32 Charakteristische Merkmale des OppA Proteins von *M. hominis*

In der Abbildung ist das OppA Protein als Balken schematisch und das Signalpeptid (SP) als schwarzer Kasten dargestellt. Die beiden Antikörperbindungsstellen TF6 und DC10 sind als karierte Bereiche markiert und die konservierte Region der OppA Proteine als gestreifete Region gekennzeichnet. Die ATP-Bindungsstelle Walker A und B liegen im C-terminalen Bereich des OppA Proteins. Die putative Phosphorylierungsstelle ist für den mittleren Bereich bestimmt worden.

4. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper TF6 und DC10, deren Epitope im N-terminalen Bereich des OppA Proteins lokalisiert sind, konnte ich erstmalig das putative OppA Protein von *M. pulmonis* nachweisen.
5. Desweiteren konnte in *Mycoplasma hominis* die Protein-Protein-Wechselwirkung von OppA mit der Transmembrandomäne OppC, sowie die Interaktion von OppC mit der ATP-bindenden Domäne OppD gezeigt, und ihre Lokalisation in der Mycoplasmenmembran bestätigt werden..

6. Im Bereich der Aminosäuren 197 bis 257 konnte eine konservierte Region in mehreren Peptidbindenden Domänen von Permeasen identifiziert werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse zeichnet sich folgendes Bild. Die Substrat-bindende Domäne OppA des Oligopeptidtransporters wird phosphoryliert und besitzt die Eigenschaft, ATP zu binden, wie auch zu hydrolysieren. Das OppA Lipoprotein liegt in der Membran als Komplex mit den anderen Proteinen der Oligopeptidpermease vor. Dieser Komplex bildet einen funktionsfähigen Transporter, der sowohl an dem Transport von Oligopeptiden, wie auch der OppA-vermittelten Adhärenz der Mycoplasmen an die Wirtszelle beteiligt zu sein scheint. Diese Funktionen des OppA Proteins schließen sich gegenseitig nicht aus, sondern mögen erst den Substrattransport über die Zytoadhärenz von *M. hominis* ermöglichen.

5. Diskussion

Mycoplasma hominis besitzt mit 700-800 kbp ein sehr kleines Genom und weist als fakultativ pathogener Keim des humanen Urogenitaltrakts eine parasitäre Lebensweise auf (Razin, 1993). Aus diesem Grund spielen Transportsysteme wie ABC-Transporter eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von essentiellen Substanzen wie Zuckern, Proteinen und Peptiden (Himmelreich *et al.*, 1996). ABC-Transporter von Pro- bis Eukaryonten besitzen alle einen ähnlichen Aufbau. Ihre vier Core-Domänen setzen sich aus den hydrophoben integralen Domänen und den ATP-hydrolysierenden Domänen zusammen, die als einzelne Proteine (meist in Prokaryonten) oder fusionierte Multidomänen (in Eukaryonten z.B. beim Multi-Resistenz-Transporter oder dem zystischen Fibrosegenprodukt; Higgins, 1995) zu finden waren. Von Mushegian und Koonin wurde 1996 durch Vergleich der kleinsten bekannten Genome von *M. genitalium* und *H. influenzae* der minimale Genbestand einer Zelle auf 256 Gene eingegrenzt. Sie bestimmten unter anderem, dass die vier Core-Domänen des Oligopeptidtransporters zum minimalen Genbestand zählten. Folglich scheinen ABC-Transporter eine lebenswichtige Rolle in einer Zelle zu spielen. Die Substrat-bindende Domäne des Oligopeptidtransporters von *M. genitalium* zählte nicht zu dem minimalen Genbestand und konnte in *M. genitalium*, *H. influenzae* (Fleischmann *et al.*, 1995) und *Streptococcus pneumoniae* (Alloing *et al.*, 1994) nicht in unmittelbarer Nähe zu den anderen Oligopeptidpermease kodierenden Genen identifiziert werden. Mittels Computeranalyse konnte aber für *M. genitalium* das homologe OppA Protein in einer anderen Region in dessen Genom identifiziert werden (Saurin und Dassa, 1996). Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeiten konnte ich zeigen, dass die Substrat-bindende Domäne OppA der Oligopeptidpermease von *M. hominis* in einer Operonstruktur mit den anderen vier Genen des Transporters im Genom vorliegt. Dies wurde auch für die Proteine des Oligopeptid-, des Histidin-, des Maltose-, des Ribose und des Phosphattransportsystems in anderen Bakterien beschrieben (Ames, 1986). Der Promotor konnte 323 bp stromaufwärts des ATG-Kodon des OppA-kodierenden Bereichs kartiert werden und der Transkriptionsstopp wurde stromabwärts des Stopkodons des OppF-kodierenden Bereichs identifiziert. Wie bereits in meiner Diplomarbeit und nachfolgend in dieser Promotionsarbeit nochmals bestätigt wurde, konnte ein unabhängiges 3,3 kb mRNA-Transkript für das *oppA*-Gen detektiert werden. Der Bereich vom determinierten Transkriptionsstart bis zur identifizierten Haarnadelstruktur stromabwärts des OppA-kodierenden Bereichs entspricht der detektierten Größe von 3,3 kb. Keine weiteren Stoppsignale der Transkription wurden hinter den Genen *oppB*, *oppC*, oder *oppD* identifiziert.

So ist anzunehmen, dass unabhängig von der Expression des *opp*-Operons ebenfalls ein reines *oppA*-Transkript entstehen kann. Folglich wäre ein gehäuftes Vorkommen des OppA Proteins gegenüber den anderen Opp-Proteinen möglich. Dies Ergebnis korreliert mit dem in der Literatur beschriebenen Befund, dass die Substrat-bindenden Domänen einiger ABC-Transporter stärker exprimiert wurden als die anderen Domänen des Transporters (Pearce *et al.*, 1992; Gallagher *et al.*, 1989), welches ebenfalls mit einer unabhängigen Transkription bzw. Translation des OppA-kodierenden Bereichs begründet wurde.

Quervernetzungsexperimente der Membranproteine von *M. hominis* legten offen, dass das OppA Protein hauptsächlich mit sich selber quervernetzt wurde. Es war so gut wie unmöglich, eine Quervernetzung mit anderen Proteinen (z.B. den anderen Proteinen der Oligopeptid-permease) nachzuweisen. Dieses Ergebnis sprach schon für ein gehäuftes Vorkommen des OppA Proteins in der Mycoplasmenmembran von *M. hominis*. So kann gefolgert werden, dass für den Peptidtransport zwei Poren-bildende Proteine (OppB und OppC), zwei ATP-bindende Proteine (OppD und OppF), aber möglicherweise mehrere OppA Proteine in der *Mycoplasma hominis* Membran vorhanden sein müssen.

Die dargestellten Befunde belegen, dass die 100 kDa Substrat-bindende Domäne OppA der Oligopeptidpermease in *M. hominis* in allen von mir bis dato untersuchten *M. hominis* Isolaten identifiziert werden konnte und keine OppA-defizienten oder OppA varianten Populationen aus der *M. hominis* Kultur selektioniert werden konnten. Erste Transfektionsexperimente, die in dieser Doktorarbeit nicht dargestellt wurden, zeigten, dass keine OppA-negative Mutante zu erzeugen war. Diese Befunde legen nahe, dass das OppA Protein eine lebenswichtige Funktion in *M. hominis* innehat und nicht, wie von Mushegian und Koonin angenommen wurde, entbehrlich ist.

Nachdem ich mit den dieser Arbeit zugrundeliegenden Experimenten habe zeigen können, dass das Substrat-bindende Protein OppA in *M. hominis* essentiell zu sein scheint, möchte ich im folgenden seine möglichen Funktionen diskutieren. Die Substrat-bindenden Domänen von ABC-Transportern zeigten zueinander eine geringe Homologie, eine unterschiedliche Größen (26 - 60 kDa in zellwandhaltigen Prokaryonten), besaßen aber alle eine ähnliche Tertiärstruktur (Quioco und Ledvina, 1996). Homologievergleiche verschiedener OppA-Proteine zeigten, dass ein N-terminaler Bereich, der im OppA von *M. hominis* 60 Aminosäuren (Aminosäure 197 bis 257) umfasste, konservierter war als die anderen Bereiche der Proteine. In der von Tame *et al.* (1994) untersuchten kristallographischen Analyse des OppA Proteins von *S. typhimurium* konnten zwei Hauptdomänen und eine kleinere Domäne identifiziert werden. Die Substratbindungsdomäne liegt als Spalt zwischen den beiden Haupt-

Domänen, welche durch ein flexibles Gelenk verbunden ist. Unter der Bindung des Liganden erfolgt eine Konformationsänderung des Proteins, so dass sich der Spalt zwischen den beiden Domänen schließt und der Ligand umschlossen wird. Dieser Bindungsmechanismus wurde als „Venus-Fliegenfalle“ bezeichnet (Mao *et al.*, 1982; Sack *et al.*, 1989). Trotz der Ähnlichkeiten in der Tertiärstruktur wurden keine Homologien in der Primärstruktur der Substrat-bindenden Proteine identifiziert. Der Strukturvergleich des charakterisierten OppA Proteins von *S. typhimurium* mit dem OppA Protein von *M. hominis* stellte sich als schwierig heraus, insbesondere da das OppA Protein von *M. hominis* doppelt so groß ist und es sich als schwierig erwies die beiden Haupt-Domänen, die an der Bindung des Substrats beteiligt sind identifizieren zu können. Sequenzvergleich der OppA Proteine beider Spezies zeigten, dass die konservierte Region im OppA Protein von *M. hominis* (Aminosäure 197-257) nach den Analysen des OppA Proteins von *S. typhimurium* in eine Region fällt, die in vielen untersuchten periplasmatisch-bindenden Domänen von Transportsystemen detektiert wurden. Für diese Region wurde nur geringe Bindungsaffinität zum Liganden gezeigt. Die Funktion dieser Region ist unbekannt (Tame *et al.*, 1994). Da diese konservierte Region in fast allen Substrat-bindungs-abhängigen Transportsystem identifiziert wurden, postulierte ich, dass die Region mit den Poren-bildenden Proteinen interagiert, um den gebundenen Liganden an den Transporter weiterzuleiten.

Die Bindung des Liganden an das Substrat-bindende Protein konnte mittels des Fluoreszenzspektrometers gemessen werden. Für das OppA Protein von *M. hominis* konnte unter Bindung von Trilysin und Pentaalanin eine Konformationsänderung im OppA Protein gezeigt werden. In dieser Fluoreszenzmessung wurde unter Bindung von Trilysin eine Rotverschiebung des Fluoreszenzmaximums von OppA gegenüber dem Fluoreszenzmaximums ohne Peptidzugabe gemessen, wohingegen eine Blauverschiebung nach Bindung des Pentaalanins gemessen wurde. Die unterschiedlichen Verschiebungen des Fluoreszenzmaximums konnten auf verschiedene Bindungszustände dieser Oligopeptide an das Substrat-bindende Protein zurückgeführt werden (Hall *et al.*, 1997a), die schon für das Maltose-bindende Protein (MBP) der Maltosepermease von *Escherichia coli* beschrieben wurde. Hier führte die Maltosebindung zu einer Rotverschiebung des MBP-Fluoreszenzmaximums, die als R- Bindungsform bezeichnet wurde, wohingegen die B-Bindungsform eine Blauverschiebung nach Bindung von reduziertem, oxidiertem oder zyklischem Maltodextrin bewirkte (Hall *et al.*, 1997a). Liganden, die ausschließlich über die B-Bindungsform von MBP gebunden waren, wurden nicht in die Zelle transportiert. In weiteren Experimenten von Hall und Mitarbeitern (1997b) konnte gezeigt werden, dass die R-

Bindungsformen eine offene Konformation (R-Form) der Substratbindungsstelle aufwiesen, wohingegen in der B-Bindungsform eine geschlossene Konformation (B-Form) des MBP-Maltose-Komplexes identifiziert wurde. Folglich scheinen nur die Liganden über die Permease transportiert zu werden, die in der geschlossenen Form vorliegen, in der der Ligand wie in einer Venus-Fliegenfalle umschlossen ist. Es ist denkbar, dass das OppA Protein seine Oligopeptide ebenfalls wie eine Venus-Fliegenfalle bindet, die im Falle der Trilysinbindung zur B-Form und somit zum Transport des Peptids führt.

Bisher war kaum etwas über die Regulation dieser Ligandenbindung bekannt. In *E.coli* K-12 wurden für die beiden Substrat-bindenden Domänen des Arginin-Ornithin-Transports und des Lysin-Arginin-Ornithin (LAO)-Transports eine phosphorylierte und eine nicht phosphorylierte Form beschrieben. Die Phosphorylierung erfolgte über eine Kinase, die zudem eine ATP-Hydrolyseeigenschaft aufwies (Urban und Celis, 1990). Die Hydrolyse von ATP in der Abwesenheit eines Phosphatakzeptors ist ein Merkmal vieler Kinasen wie z.B. der Hexokinasen (Viola *et al.*, 1982) oder der cAMP-abhängigen Kinasen (Mol *et al.*, 1976). Dies lässt sich nicht für alle Kinasen bestätigen, da in einigen Kinasen, die eine intrinsische ATPase-Aktivität besitzen, eine niedrigere ATP-Hydrolyserate gegenüber einer viel höheren Phosphorylierungsrate identifiziert wurde (Todhunter & Purich, 1977; Pomerantz *et al.*, 1977). Das OppA Protein zeigt sowohl eine ATP-Bindung, wie auch eine ATP-Hydrolyse-Aktivität. Dieses Versuchsergebnis deutet auf eine Kinase oder eine ATPase hin. Wie oben erwähnt besitzen Kinasen die Fähigkeit ATP in Abwesenheit eines Phosphatakzeptors zu hydrolysieren. Würde es sich um eine ATPase handeln müsste die bei der ATP-Hydrolyse entstandene Energie für Energie-betriebene Prozesse verwendet werden. Bisher existieren keine Beweise der ATPase-Eigenschaft des OppA Protein. Desweiteren konnte ich zeigen, dass das OppA Protein mittels γ -ATP phosphoryliert wird. Hier ist unklar ob das OppA Protein durch eine andere Kinase phosphoryliert oder autophosphoryliert wird. Für viele Proteinkinasen werden durch kovalente Phosphorylierung reguliert (Roach, 1984). Sie besitzen die Fähigkeit der Autophosphorylierung. Diese Autophosphorylierung ist schwer nachweisbar, da mit Kontaminationen in den aufgereinigten Proteinkinasen gerechnet werden muß, die die Phosphorylierung der zu untersuchenden Kinase bewirken könnten. Das aufgereinigte OppA Protein von *M. hominis* konnte nach Inkubation mit [32 P] γ -ATP phosphoryliert werden. Wie in der Literatur beschrieben befindet man sich bei diesen Phosphorylierungsexperimenten in einem nicht physiologischen Bereich, so dass der Nachweis der Autophosphorylierung umstritten ist (Roach, 1984). Wichtig ist, dass die

Phosphorylierung des OppA Proteins von *M. hominis* wahrscheinlich regulatorische Eigenschaften besitzt, die für den Transport essentiell sind.

Eine Mutante mit einem Defekt in der Phosphorylierung des Arginin-Ornithin und des LAO periplasmatischen Transportproteins zeigte eine niedrigere Transportaktivität im Vergleich zur Wildtypvariante. Dies verdeutlichte, dass Phosphorylierung ein wichtiger Bestandteil des Transportmechanismus ist.

Ein möglicher Mechanismus des Peptidtransports, der in dieser Arbeit charakterisierten Oligopeptid-Permease von *Mycoplasma hominis*, habe ich in dem folgenden Modell schematisch skizziert (Abb. 33):

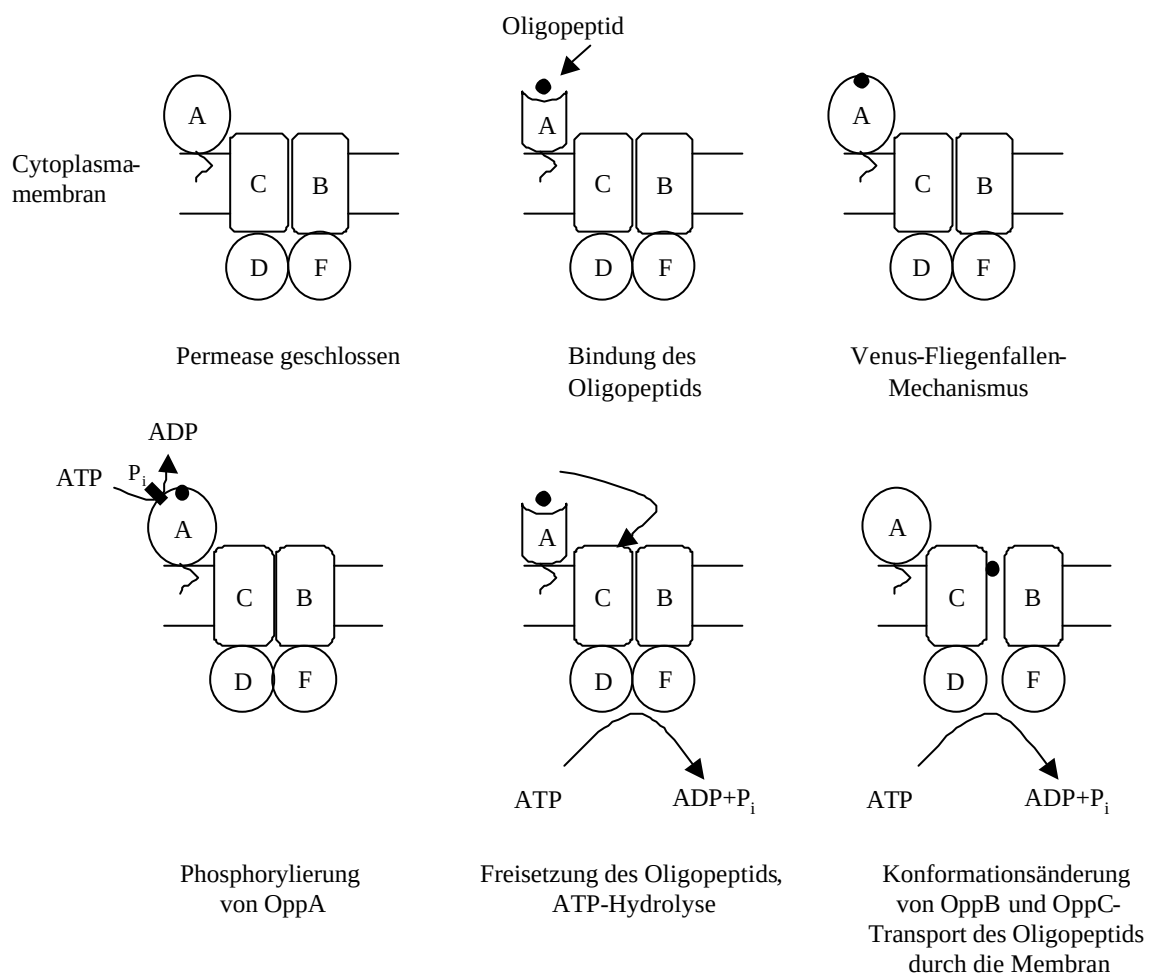


Abb. 33. Modell des Oligopeptid-Transportes in *Mycoplasma hominis*

Das OppA Protein existiert in mehreren Konformationen: der geöffneten, die die Bindung der Oligopeptide ermöglicht, der geschlossenen Konformation, in der das Oligopeptid gebunden ist, und der phosphorylierten, die das Oligopeptid an die Transmembrandomäne freigibt und möglicherweise nach Dephosphorylierung, in die geöffnete Konformation zurückkehrt. Das Oligopeptid ist als schwarzer Kreis dargestellt. Die beiden porenbildenden Proteine OppB (B) und OppC (C) sind in Abwesenheit des Oligopeptids geschlossen. Durch die Hydrolyse von ATP mittels der cytoplasmatischen ATP-bindenden Proteine OppD (D) und OppF (F) ist ein Transport über die Membran möglich.

So könnte die nicht phosphorylierte Form des OppA Proteins von *M. hominis* die Oligopeptide in der Art einer Venusfliegenfalle umschließen. Durch Phosphorylierung kommt es zu einer Konformationsänderung im OppA Protein, so dass das gebundene Oligopeptid aus seiner Bindung zum OppA Protein gelockert und an die Transmembran-domäne zum Import in die Zelle weitergegeben wird.

Die Interaktion des Substrat-bindenden-Proteins OppA mit dem Transmembranprotein OppC, sowie des OppC Proteins mit dem ATP-bindenden Protein OppD konnte im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit zum ersten Mal für *Mycoplasma hominis* gezeigt werden. Aufgrund der gekoppelten Genexpression von *oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* und *oppF* und deren Homologie zu bereits proteinchemisch charakterisierten Oligopeptidpermeasen ist es sehr wahrscheinlich, dass die beiden Proteine OppB und OppF, die nicht immunologisch nachweisbar waren, auch in dem Komplex aus OppABCDF vorhanden sind. Demzufolge wird (Abb. 33 für OppC dargestellt) der Ligand vom OppA Protein an eine der Poren-bildenden Domäne OppB bzw. OppC weitergeleitet.

In *E.coli* zeigte der Maltosetransport, dass nur in Anwesenheit des gebundenen Liganden am Maltose-bindenden-Protein eine ATP Hydrolyse von den zytoplasmatischen ATPase OppD und OppF Proteinen möglich war (Quioco & Ledvina, 1996). Folglich kam es durch ein noch unbekanntes Signal zu einer Aktivierung der zytoplasmatischen ATPase Domäne, das vom Substrat-bindenden Protein mit gebundenem Ligand ausgesendet und über die Transmembranproteine an die ATPase weitergeführt wurde. Durch die ATP-Hydrolyse der zytoplasmatischen ATPase wurde in einer Art Rückkopplung eine Konformationsänderung in den Transmembranproteinen und somit Öffnung der Pore bewirkt, so dass ein Transport des Liganden über die Membran möglich war. Aufgrund gezeigter Interaktionen der Porenbildenden und der ATP-bindenden Protein mit der Substrat-bindenden Domäne OppA in *M. hominis* wird, wie in Abbildung 33 dargestellt, postuliert, dass durch die Hydrolyse von ATP ein Substrat-Transport über die Mycoplasmenmembran möglich ist. Für OppD wurde eine ATP-Hydrolyse Aktivität gemessen, die der von anderen beschriebenen ATP-bindenden Proteine entspricht (Liu *et al.*, 1997). Die Vermutung liegt nah, dass die Energie für den Transport aus der Hydrolyse von ATP entsteht. Die Funktion des OppF Protein in *M. hominis* ist noch uncharakterisiert. Alle bisher untersuchten putativen OppF Proteine von Mykoplasmen zeigten ein Molekulargewicht von etwa 96.000, im Gegensatz zu den nicht-mycoplasmalen OppF Domänen anderer Spezies mit einer molekularen Masse um 36 kDa. Der Bereich zwischen Aminosäure 125 bis 657 des OppF Proteins von *M. hominis* zeigte keine Sequenzhomologien zu anderen ATP-bindenden Proteinen. In diesem Bereich wurde

aufgrund von Homologievergleichen ein charakteristisches Merkmal des Myosins der eukaryontischen Zellen entdeckt. Dies ist nicht verwunderlich, da Myosin auch Nukleotide bindet und strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen ATP-bindenden Proteinen aufweist (Smith & Rayment, 1996). Aufgrund des vorzeitigen Translationsstopps konnte das OppF Protein nicht auf mögliche ATP-Bindungseigenschaften untersucht werden. Obwohl die charakteristische Struktur mit Walker A, helikalem Bereich, Linker und Walker B von 532 Aminosäuren unterbrochen ist, könnten Walker A und Walker B räumlich benachbart ATP-Bindungseigenschaften aufweist. Es bleibt jedoch zu bemerken, dass OppA ATP-Bindungseigenschaften besitzt, obgleich hier die Abfolge von Walker A und Walker B sogar vertauscht ist und der beschriebene helikale Bereich und die Linker Region fehlen.

Muir und Werdle beschrieben 1989, dass die ATP-Hydrolyse zum Substrattransport 1:1 beträgt, d.h. dass ein Substratmolekül unter der Hydrolyse von einem ATP-Molekül transportiert wird. Damit stellt sich die Frage, wieso immer 2 ATP-bindende Domänen auftreten, wenn nur ein ATP-Molekül gespalten wird. Von Perego *et al.*, wurde 1991 beschrieben, dass OppD für den Transport von Oligopeptiden in *B. subtilis* essentiell ist und das OppF Protein durch OppD ersetzbar ist, jedoch nicht umgekehrt.

Welche Rolle spielt dann das OppF Protein im Transporter? Bisher liegen keine Informationen vor, ob das OppF Protein von *M. hominis* durch OppD zu ersetzen ist. Aufgrund des minimalen Genoms der Mycoplasmen ist jedoch anzunehmen, dass das OppF Protein eine weitere Funktion innehat. In der computerunterstützten Analyse des OppF Proteins zeigte sich ein Leucin-Zipper (Aminosäure 460-483). Dieses Sequenzmotiv könnte mit einem anderen Protein, auch mit einem Leucin-Zipper, ein Heterodimer bilden, die die Regulation der Genexpression bewirken. Den ATP-bindenden Proteinen werden folgende Funktionen zugeschrieben: Der C-terminale Bereich der ATP-bindenden Proteine soll einen Einfluss auf die Transkription der Gen-kodierenden Bereiche des Transporters haben und es konnte eine Beeinflussung der Kompetenz in OppF-Mutanten von *Bacillus subtilis* nachgewiesen werden (Perego *et al.*, 1991). Folglich könnte Genregulation eine Aufgabe des OppF Proteins sein. In Permeasen wurden bisher immer zwei ATP-bindende Domänen beschrieben, so könnte die Komplexierung des OppF Proteins mit dem OppD Protein im Transport notwendige Voraussetzung für die ATP-Bindung und -Hydrolyse von OppD und die Induzierung der Konformationsänderung der porenbildenden Domänen sein. Das OppF Protein ist, wie oben erwähnt, in Mycoplasmen viel größer als die nicht-mycoplasmalen OppF Proteine. So ist eine weitere durch diesen Bereich vermittelte Funktion dieses Proteins nicht auszuschließen.

In Immunpräzipitationsexperimenten mit den anti-OppD und anti-OppC-Seren konnte eine Protein-Proteinwechselwirkung der Oligopeptidpermeasen OppD und OppC mit den Membranproteinen P60 und P80 in *M. hominis* nachgewiesen werden. Diese beiden Proteine kopräzipitieren (Kitzerow & Henrich, 2001), und das P80 Protein interagiert mit dem zytoplasmatischen HinT (Histidine-triad nucleotide-binding) Protein. Sequenzanalysen legten nahe, dass das P60 Protein über einen N-terminalen Lipidanker Cystein in der Membran verankert ist, wohingegen das P80 Protein im N-terminalen Bereich eine hydrophobe Region trägt, die groß genug ist, um die Membran zu durchspannen und eine Interaktion des N-Terminus mit dem zytoplasmatisch lokalisierten HinT zu ermöglichen. Eine Regulation der Oligopeptidpermease durch den P60/P80-Proteinkomplex wäre denkbar, da dieser Proteinkomplex als oberflächenlokalisierter Startpunkt eines Signaltransduktionsweges diskutiert wird.

Welche Funktionen die Oligopeptidpermeasen in Mycoplasmen haben ist bisher ungeklärt. Wie bereits erwähnt, konnte ich die Substratbindungsfähigkeit von OppA Protein zeigen. Die bisher in anderen Organismen untersuchten Oligopeptidpermeasen transportierten Oligopeptide mit einer Länge von 2 bis 5 Aminosäuren unabhängig von ihrer Sequenz (Tame *et al.*, 1994). In *Streptococcus gordonii* wurde ein Transport von Hexa- und Heptapeptiden beschrieben (Jenkinson *et al.*, 1996), für den Oligopeptidtransporter in *Lactococcus lactis* konnten Bindungen des OppA Proteins zu Nona- und Dodecapeptiden identifiziert werden (Lanfermeijer *et al.*, 1999). Der Peptidtransport in Gram-positiven Bakterien zeigt sich als ein essentieller Bestandteil der Zelle zur Aufnahme von Oligopeptiden, die als Nahrungsquelle dienen (Jenkinson *et al.*, 1996). Der Transporter war jedoch auch in andere Prozesse involviert, wie zum Beispiel der Sporulation in *B. subtilis* (Perego *et al.*, 1991), der Kompetenz der Transformation (Magnuson *et al.*, 1994) und der Adhärenz von *S. pneumoniae* (Cundell *et al.*, 1995). Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen Adhärenz und Oligopeptidtransport in den untersuchten Bakterien erstellt werden. OppA in *M. hominis* hat neben seiner Funktion als Substrat-bindende Domäne der Oligopeptidpermease ebenfalls zytadhäsive Eigenschaften (Henrich *et al.*, 1993). So kann das in Abbildung 33 gezeigte Modell des Oligopeptidtransportes in *M. hominis* noch ergänzt werden durch die adhärenz-vermittelnden Eigenschaften des OppA Proteins. Durch die OppA vermittelnde Zytadhärenz kommt der Transporter in unmittelbare Nähe zur Wirtszelle, wodurch eine Aufnahme essentieller Nährstoffe von der Wirtszelle über den Oligopeptidimport in die Mycoplasmen zu gewährleisten ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass nicht nur essentielle Peptide über den Oligopeptidtransporter importiert werden, sondern auch Signalstoffe, die über diesen Weg in

die Zelle gelangen und dort in bestimmte Prozesse eingreifen. Dies wurde für den Peptidtransport von *B. subtilis* beschrieben, wo über den Oligopeptidtransporter importierte Signalstoffe die Sporulation induzieren (Koide & Hoch, 1994).

Die Adhärenz der Mycoplasmen an die Wirtszelle verändert ihrerseits die Transportmechanismen der Wirtszelle (DeBey & Ross, 1994). Durch membrangebundene mycoplasmale Phospholipasen kommt es zu einer Beeinflussung der Hydrolyse der Wirtszell-Phospholipide und in Folge zur Induktion spezifischer Signalkaskaden, die auf Phosphorylierungsprozesse beruhen (Salman & Rottem, 1995; Shibata *et al.*, 1995). So ist auch denkbar, dass das OppA Protein bei der Adhärenz an den Wirt die Rezeptoren bzw. anderer Proteine in der Wirtszellmembran phosphoryliert und damit eine Signalkaskade in Gang setzt, die die Abgabe essentieller Nährstoffe an die adhärenzten Mycoplasmen zur Folge hat. In vielen eukaryonten Zellenmembranen sind ecto-Kinasen beschrieben worden, wohingegen nur eine ecto-Kinase in *Streptokokkus* der Gruppe C mit einer unbekannten Funktion beschrieben wurde. Die ecto-Kinasen phosphorylieren extrazelluläre lösliche Substrate oder Zelloberflächen Proteine insbesondere die ecto-Domänen. Diese Ecto-Kinasen spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zell-Zell-Interaktion, Liganden Bindung und Signal Transduktion (Regegeld *et al.*, 1999). Diese Funktionen sind auch für OppA postuliert worden.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Expression der Oligopeptidpermease von *Mycoplasma hominis* untersucht. Es konnte eine polycistronische Organisation der kodierenden Gene *oppA*, *oppB*, *oppC*, *oppD* und *oppF* nachgewiesen werden. So zeigte sich, dass die 9,5 kb mRNA 323 Nukleotide vor dem *OppA* kodierenden Bereich beginnt und stromabwärts des *oppF* Gens durch Ausbildung einer Haarnadelstruktur endet.

Zur proteinchemischen Charakterisierung der Oligopeptidpermease wurden gegen die Proteine *OppB*, *OppC* und *OppD* polyklonale Seren generiert. Für die Detektion von *OppA* existierten bereits monoklonale Antikörper. Von den generierten polyklonalen Seren erkannten nur die Seren gegen *OppC* und *OppD* ihr Antigen. Untersuchungen zur Lokalisation der *Opp*-Domänen zeigten, dass diese Proteine in der Membranfraktion vorkommen. Darüberhinaus wurde eine Interaktion von *OppC* mit *OppD* und *OppC* mit *OppA* nachgewiesen. Diese in der Immunpräzipitation gezeigte Protein-Protein-Wechselwirkung weist auf die Komplexbildung dieser Proteine in der Membran von *M. hominis* hin. Obwohl die Expression der Proteine *OppB* und *OppF* aufgrund fehlender Nachweisantikörper nicht gezeigt werden konnte, kann aufgrund der gemeinsamen Expression der *opp*-Gene geschlossen werden, dass alle *Opp*-Proteine exprimiert werden und in der Membran komplexiert die Funktion einer Oligopeptidpermease ausüben. Im Laufe dieser Promotionsarbeit wurde das *OppA* Protein weiter charakterisiert, um seine Funktion in der Oligopeptidpermease analysieren zu können. So zeigte das *OppA* Protein Peptidbindungseigenschaften, die es als Substrat-bindende Domäne der Oligopeptidpermease identifizierten. Weitere Funktionsmerkmale waren neben der ATP-Bindung auch ATP-hydrolysierende Eigenschaften, was darauf hindeutet, dass das *OppA* Protein ATP spaltet und entweder mit dem abgespaltenen Phosphat andere Protein phosphoryliert oder aus der ATP-Hydrolyse freiwerdende Energie Energie-benötigenden Prozessen zuführt. Die von mir postulierte Kinaseeigenschaft des *OppA* Proteins wird ergänzt durch die Adhärenz-vermittelnde Eigenschaft des *OppA* Proteins, da ecto-Kinasen Membranproteine phosphorylieren können und Zell-Zell-Interaktionen vermitteln sowie Signaltransduktionswege und Ligandenbindungen induzieren.

Der Nachweis, dass das Substrat-bindende Protein *OppA* in einer phosphorylierten und einer nicht phosphorylierten Form vorkommt, weist darüber hinaus auf eine Regulation der Peptidbindung des *OppA* Proteins und somit der Oligopeptidpermease hin.

7. Literaturverzeichnis

- **Alloing G., de Philip P., Claverys J.P.** 1994. Three highly homologous membrane-bound lipoproteins participate in oligopeptide transport by the Ami system of the gram-positive *Streptococcus pneumoniae*. J. Mol. Biol. **241**:44-58.
- **Ames G.F.-L.** 1986. Bacterial periplasmic transport system: structure, mechanism, and evolution. Annu.Rev. Biochem. **55**:397-425
- **Argaman M., Razin S.** 1965. Cholesterol and cholesterol esters in mycoplasma. J. Gen. Microbiol. **38**:153-168
- **Almagor M., Kahane I., Wiesel J.M., Yatziv S.** 1985. Human ciliated epithelial cells from nasal polyps as an experimental model for *Mycoplasma pneumoniae* infection. Infect. Immun. **48**:552-555
- **Ayer D.E., Dynan W.S.** 1988. Simian virus 40 major late promoter: a novel tripartite structure that includes intragenic sequences. Mol. Cell. Biol. **8**: 2021-2033
- **Birnboim H.C., Doly S.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic. Acids. Res. **7**: 1513-1523
- **Blattner F.R., Plunkett III G., Bloch C.A., Perna N.T., Burland V., Riley M., Collado-Vides J., Glasner J.D., Rode C.K., Mayhew G.F., Gregor J., Davis N.W., Kirkpatrick H.A., Goedon M.A., Rose D.J., Mau B., Shao Y.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. Science **277**:1453-1462
- **Blazek R., Schmitt K., Krafft U., Hadding U.** 1990. Fast and simple procedure for the detection of cell culture mycoplasmas using a single monoclonal antibody. J. Immunol. Methods **131**:203-212
- **Blum H., Beier H., Gross H.J.** 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyarylamide gels. Electrophoresis **8**:93-99
- **Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Waters J., Manzillo G., Tanzi E., Zuckerman A. J., Thomas H.C.** 1990. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. Lancet. **11**:325-329
- **Caruthers M.H.** 1982. New methods for synthesizing desoxyoligonucleotides. Genet. Eng. **4**:1-16
- **Chomczynski P., Sacchi N.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. **162**: 156-159
- **Citti C., Kim M.F., Wise K.S.** 1997. Elongated versions of Vlp surface lipoproteins protect *Mycoplasma hyorhinis* escape variants from growth-inhibiting host antibodies. Infect. Immun. **65**:1773-1785

- **Communi D., Takazawa K., Erneux C.** 1993. Lys-197 and Asp-414 are critical residues of binding of ATP-Mg²⁺ by rat brain inositol 1,4,5-triphosphate 3-kinase. *Biochem. J.* **291**:811-816
- **Cundell D.R., Pearce B. J., Sandros J., Naughton A.M., Masure H.R.** 1995. Peptide permease from *Streptococcus pneumoniae* affect adherence to eukaryotic cells. *Infect. Immun.* **63**: 2493-2498
- **Dassa E., Hofnung M.** 1985. Sequence of gene *malG* in *E. coli* K12: homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems. *EMBO* **4**:2287-2293
- **Davidson A.L., Nikaido H.** 1991. Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* **266**:8946-8951
- **DeBay M.C., Ross R.F.** 1994. Ciliostasis and loss induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect.Immun.* **62**:5312-5318
- **Dirksen L.B., Krebs K.A., Krause D.C.** 1994. Phosphorylation of cytoadherence-accessory proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **176**:7499-7505
- **Döbeli H., Trzeciak A., Gillesen D., Matile H., Srivastava I.K., Perrin L.H., Jakob P.E., Certa U.** 1990. Expression, purification, biochemical characterization and inhibition of rekombinant *Plasmodium falciparum* aldolase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41**:259-268
- **Dudler R., Schmidhauser C., Parish R.W., Wetterhall E.H., Schmidt T.** 1988. A mycoplasma high-affinity transport system and the in vitro invasiveness of mouse sarcoma cells. *EMBO J.* **7**: 3963-3970
- **Dürr M.** 1997 Das Membranprotein P100 von *Mycoplasma hominis*: Untersuchung zur Organisation und Expression des Gens und Synthese des rekombinanten Proteins. Diplomarbeit im Fach Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- **Feldmann R.-C., Henrich B., Kolb-Bachofen V., Hadding U.** 1992. Decreased metabolism and viability of *Mycoplasma hominis* induced by monoclonal antibody-mediated agglutination. *Infect. Immun.* **60**:166-174
- **Feldner J., Bredt W.** 1983. Analyse of polypeptides of mutants of *Mycoplasma pneumoniae* that lack the ability to haemadsorb. *J. Gen.Microbiol.* **129**:841-848
- **Fleischmann R.D., Adams M.D., White O., Clayton R.A., Kirkness E.F., Kerlavage A.R., Bult C.J., Tomb J.F., Dougherty B.A., Merrick J.M., et al.** 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae*. *Science* **269**:496-512

- **Frank R., Döring R.** 1988. Simultaneous mutiple peptide synthese under continuous flow conditions on cellulose paper discs as segmental solid synthesis. *Tetrahedron* **44**:6031-6040
- **Fraser C.M., Gocayne J.D., White O., Adams M.D., Clayton R.A., Fleischmann R.D., Bult C.J., Kerlavage A.R., Sutton G., Kelley J.M., Fritschman J.L., Weidmann J.F., Small K.V., Sandusky M., Fuhrmann J.L., Nguyen D.T., Utterback T.R., Saudek D.M., Phillips C.A., Merrick J.M., Tomb J.-F., Dougherty B.A., Bott K.F., Hu R.-C., Lucier T.S., Peterson S.N., Smith H.O., Hutchison III C.A., Venter J.C.** 1995. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**:397-403
- **Gafny R., Hyman H.C., Razin S., Glaser G.** 1988. Promotor of *Mycoplasma capricolum* ribosomal RNA operons: identical activities but different regulation in homologous and heterologous cells. *Nucleic Acids Res.* **16**: 61-76
- **Gallagher M.P., Pearce S.R., Higgins C.F.** 1989. Identification and localization of the membrane-associated , ATP-binding subunits of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *Eur.J.Biochem.* **180**: 133-141
- **Gordon T.S., Geary S.J.** 1997. Antibody-mediated selection of a *Mycoplasma gallisepticum* phenotype expression variable protein. *FEMS* **155**:31-38
- **Guyer C.A., Morgan D.G., Staros J.V.** 1986. Binding specificity of the periplasmic oligopeptide-binding protein from *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* **168**: 775-779
- **Hall J.A., Gehring K., Nikaido H.** 1997a. Two models of ligand binding in maltose-binding protein of *Escherichia coli*. *J.Biol. Chem.* **272**:17605-17609
- **Hall J.A., Thorgeirsson T.E., Liu J., Shin Y.-K., Nikaido H.** 1997b. Two models of ligand binding in maltose-binding protein of *Escherichia coli*. Electron paramagnetic resonance study of ligand-induced global conformational changes by site directed spin labeling. *J.Biol.Chem.* **272**:17610-17614
- **Hanahan D.** 1995. Techniques for transformation of *E. coli*. In: DNA cloning by D.M. Glover (Volume 1) Oxford [u.a.]: IRL Press
- **Henikoff S.** 1984. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28**:351-359
- **Henkel R.D., Van de Berg J.L., Walsh R.A.** 1988. A microassay for ATPase. *Anal. Biochem.* **169**:312-318
- **Henrich B., Feldmann R.-C., Hadding U.** 1993. Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infect. Immun.* **61**:2945-2951
- **Henrich B., Kitzerow A., Feldmann R.-C., Schaal H., Hadding U.** 1996. Repetitive elements of the *Mycoplasma hominis* adhesion p50 can be differentiated by monoclonal antibodies. *Infect.Immun.* **64**: 4027-4034

- **Henrich B., Lang K., Kitzerow A., MacKenzie C., Hadding U.** 1998. Truncation as a novel form of variation of the p50 gene in *Mycoplasma hominis*. Microbiol. **144**:2979-2985
- **Henrich B., Hopfe M., Kitzerow A., Hadding U.** 1999. The adherence-associated lipoprotein P100, encoded by an *opp* operon structure, functions as the oligopeptide-binding domain OppA of a putative oligopeptide transport system in *Mycoplasma hominis*. J.Bacteriol. **181**:4873-4878
- **Higgins C.F., Hiles I.D., Whalley K., Jamieson D.J.** 1985. Nucleotide binding by membrane components of bacterial periplasmic binding protein-dependent transport. EMBO **4**: 1033-1040
- **Higgins C.F., Hyde S.C., Mimmack M.M., Gileadi U., Gill D.R., Gallagher M.P.** 1990. Binding protein-dependent transport system. J. Bioenerg. Biomembr. **22**:571-592
- **Higgins C.F.** 1992. ABC transporters: From microorganismus to man. Annu. Rev. Cell Biol. **8**:67-113
- **Higgins C.F.** 1995. The ABC of channel regulation. Cell **82**:693-696
- **Hiles I.D., Gallagher M.P., Jamieson D.J., Higgins C.F.** 1987. Molecular characterization of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. J.Mol. Biol. **195**:125-142
- **Himmelreich R., Hilbert H., Plagens H., Pirkel E., Li B.-C., Herrmann R.** 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae*. Nucleic Acids Res. **24**:4420-4449
- **Horten R.H., Hunt H.D., Ho S.N., Pullen J.K., Pease L.R.** 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. Gene **77**:161-166
- **Hu P.C., Cole R.M., Collier A.M., Clyde W.A., Horikawa M., Huang Y.-S., Barile B.F.** 1987. *Mycoplasma genitalium* protein resembling the Mycoplasma attachment protein. Infect. Immun. **55**:1126-1131
- **Jenkinson H.F., Baker R.A., Tannock G.W.** 1996. A binding-lipoprotein-dependent oligopeptide transport system in *Streptococcus gordonii* essential for uptake of hexa- and heptapeptides. J. Bacteriol. **178**:68-77
- **Jensen L.T., Ladefoged S., Birkelund S., Christiansen G.** 1995. Selection of *Mycoplasma hominis* PG21 deletion mutants by cultivation in the presence of monoclonal antibody 552. Infect. Immun. **63**:3336-3347
- **Kahane I.** 1984. *In vitro* studies on the mechanism of adherence and pathogenicity of mycoplasma. Isr.J.Med. Sci. **20**:874-877

- **Kahane I., Horowitz S.** 1993. in: Subcellular Biochemistry, Volume 20: Mycoplasma Cell Membranes. Plenum Press, New York, S. 225-241
- **Kitzerow A., Hadding U., Henrich B.** 1999. Cyto-adherence studies of the adhesion P50 of *Mycoplasma hominis*. J. Med. Microbiol. **48**:485-493
- **Kitzerow A., Henrich B.** 2001. The cytosolic HinT protein of *Mycoplasma hominis* interacts with two membrane proteins. Mol. Microbiol. **41**:279-287
- **Koide A., Hoch J.A.** 1994. Identification of a second oligopeptide transport system in *Bacillus subtilis* and determination of its role in sporulation. Mol. Microbiol. **13**:417-426
- **Kunst F., Ogasawre N., Moszer I. Albertini A.M., Alloni G. Azevedo V., Bertero M.G. Boursier L., Brans A., Braun M., Brignell S.C., Bron S., Brouillet S., Bruschi C.V., Caldwell B., Capuano V., Carter N.M., Choi S.K., Codani J.J., Connerton J.J., Connerton I.F., Danchin A., et al.** 1995. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature **390**: 249-256
- **Laemmli U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685
- **Lanfermeijer F.C., Picon A., Konings W.N., Poolman B.** 1999. Kinetics and consequences of binding of nona- and dodecapeptides to the oligopeptide binding protein (OppA) of *Lactococcus lactis*. Biochem. **38**: 14440-14450
- **Le Grand D., Solsona M., Rosengarten R., Poumarat F.** 1996. Adaptive surface antigen variation in *Mycoplasma bovis* to the host immune response. FEMS **144**:267-275
- **Liu C.E., Liu P-Q., Ames G. F.-L.** 1997. Characterization of the adenosine triphosphatase activity of the periplasmic histidine permease, a traffic ATPase (ABC Transporter). J. Biol. Chem. **272**:21883-21891
- **Magnuson R., Solomon J., Grossman A.D.** 1994. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *Bacillus subtilis*. Cell **77**:981-988
- **Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- **Mao B., Pear M.R., McCammon J.A., Quijcho F.A.** 1982. Thermodynamics of binding of L-arabinose and of D-galactose to the L-arabinose-binding protein of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **257**: 1131-1133
- **Maxam A.M., Gilbert W.** 1980. Sequencing and labeled DNA with base specific chemical cleavages. Methods. Enzymol. **65**:499
- **Miles L.E.M., Hales C.N.** 1968. Labeled antibodies and immunological assay system. Nature **219**:186-189

- **Minion F.C., Cassell G.H., Pnini S., Kahane I.** 1984. Multiphase interaction of *Mycoplasma pulmonis* with red blood cells defined by adherence and hemagglutination. *Infect.Immun.* **44**:394-400
- **Mol G.W., Kaiser E.T.** 1976. Phosphorylation of histone catalyzed by a bovine brain protein kinase. *J. Biol. Chem.* **251**:3993-400
- **Morbach S., Tebe S., Schneider E.** 1997. The ATP-binding cassette (ABC) for maltose/maltodextrines of *Salmonella typhimurium*. Characterization of the ATPase activity associated with purified MalK subunit. *J. Biol. Chem.* **268**:18617-18621
- **Muir T.C., Werdle K.A.** 1989. Vascular smooth muscle response in normo- and hypertensive rats to sympathetic nerve stimulation and putative transmitters. *J. Auton. Pharmacol.* **9**:23-24
- **Mushegian A.R., Koonin E.V.** 1996. A minimal gene set for cellular life derived by comparison of complete bacterial genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:10268-10273
- **Nikaido H., Hall J.A.** 1998. Overview of bacterial ABC transporters. *Methods. Enzymol.* **292**:3-20
- **O'Farrell P.Z., H.M. Goodman, O'Farrell P.H.** 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Bio. Chem.* **250**:4007-4021
- **Perego M., Higgins C.F., Pearce S.R., Gallagher M.P., Joch J.A.** 1991. The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol. Microbiol.* **5**:173-185
- **Pearce S.R., Mimmack M.L., Gallagher M.P., Gileadi U., Hyde S.C., Higgins C.F.** 1992. Membrane topology of the integral membrane components, *OppB* and *OppC*, of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **6**:47-57
- **Pollack J.D., Williams M.V., McElhaney R.N.** 1997. The comparative metabolism of the mollicutes (Mycoplasmas): the utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. *Crit Rev Microbiol.* **23**:269-354.
- **Pomerantz A.H., Allfrey V.G., Merrifield R.B., Johnson E.M.** 1977. Studies on the mechanism of phosphorylation of synthetic polypeptides by a calf thymus. *Proc.Natl. Acad. Sci.* **74**:4261-4265
- **Quiocho F.A., Ledvina P. S.** 1996. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes. *Mol. Microbiol.* **20**:17-25
- **Razin, S.** 1963. Structure, composition and properties of the PPLO cell envelope, in: *Recent Progress in Microbiology*, VIII, University of Toronto Press, Toronto, S.526-534

- **Razin S.** 1981a. The mycoplasma membran. In: Organization of prokaryotic cell membranes, Volume I (B.K. Ghosh, ed.), CRC Press, Boca Raton, Fla., pp 165-250
- **Razin S., Kahane I., Banai M. und Bredt W.** 1981b. Adhesion of mycoplasma to eukaryotic cells. Ciba Found. Symp. **80**:98-118
- **Razin S.** 1993. Mycoplasma membranes as models in membran research. Subcellular Biochemistry **20**:1-27
- **Redeged F.A., Caldwell C.C., Sitkovsky M.V.** 1999. Ecto-protein kinase: domain phosphorylation as a novel target for pharmacological manipulation? TIPS **20**:453-559
- **Rezaie A.R., Fiore M.M., Neuenschwander P.F., Esmon C.T., Morrissey J.H.** 1992. Expression and purification of a soluble tissue factor fusion protein with an epitope for an unusual calcium-dependent antibody. Protein Expression and Purification **3**:453-460
- **Richardson D.** Phosphorylation of nucleic acid by an enzym form T4 bacteriophage-infeket *Escherichia coli*. 1968. Proc. Natl. Acad. Sci. **54**:158-163
- **Roach P.J.** 1984. Protein Kinase. Methods in enzymology 107:138-101
- **Rottem S., Naot Y.** 1998. Subversion and exploitation of host cells by mycoplasmas. Trends in Microbiology **6**:436-440
- **Sack J.S., Saper M.A., Quiocho F.A.** 1989. Periplasmic binding protein structure and function. Refined X-ray structures of the leucine/isoleucine/valine-binding protein and its complex with leucine. J.Mol.Biol. **206**:171-191
- **Saiki R.H., Gelfand D.H., Stoffe S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K. B., Erlich H.A.** 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**:487-491
- **Salman M., Rottem S.** 1995. The cell membrane of *Mycoplasma penetrans*: lipid composition and phospholipase A1 activity. Biochem. Biophys. Acta. **1235**:369-377
- **Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.** 1977. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**:5436-5467
- **Saraste M., Sibbald P.R., Wittinghofer A.** 1990. The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. Trends Biol. Sci. **15**:430-434
- **Saurin W., Köster W., Dassa E.** 1994. Bacterial binding protein-dependent permeases: characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membran proteins. Mol. Microbiol. **12**:993-1004
- **Saurin W., Dassa E.** 1996. MicroCorrespondence: In the search of *Mycoplasma genitalium* lost substrate-binding proteins: sequence divergence could be the result of a broader substrate specificity. Mol. Microbiol. **22**:389-391

- **Schneider E., Wilken S., Schmid R.** 1994. Nucleotide-induced conformational changes of MalK, a bacterial ATP binding cassette transporter protein. *J. Biol. Chem.* **269**:20456-20461
- **Shibata K.-I., Sasaki T., Watanabe T.** 1995. AIDS-associated mycoplasmas possess phospholipase C in the membran. *Infect. Immun.* **63**:4174-4177
- **Shuman, H.A., Silhavy T.J.** 1981. Identification of the *malK* gene product. *J.Bio.Chem.* **256**:560-562
- **Slack F.J., Mueller J.P., Strauch M.A., Mathiopoulos C., Sonenshein A.L.** 1991. Transcriptional regulation of a *Bacillus subtilis* dipeptide transport operon. *Mol. Microbiol.* **5**:1915-1925
- **Smith C.A., Rayment I.** 1996. Active site comparisons highlight structural similarities between myosin and other P-loop proteins. *Biophysical J.* **70**:590-1602
- **Southern E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517
- **Tame J.R.H., Murshudov G.N., Dodson E.J., Neil T.K., Dodson G.G., Higgins C.F., Wilkinson A.J.** 1994. The structural basis of sequence-independent peptide binding by OppA protein. *Science* **264**:1578-1581
- **Taschke C., Herrman R.** 1985. Analysis of transcription and processing signals in the 5'-region of the two *Mycoplasma capricolum* rRNA operons. *Mol. Gen. Genet.* **212**: 522-530
- **Thomsen A.C.** 1978. Occurrence of mycoplasmas in urinary tracts of patients with acute pyelonephritis. *Clin.Microbiol.* **8**:197-202
- **Todhunter J.A., Purich D.L.** 1977. Autophosphorylation of cardiac 3',5'-cyclic AMP-stimulated protein kinase. Kinetic evidence for the regulation subunit directly acting at the active site in the R2C2 complex. *Biochim. Biophys. Acta* **485**:87-94
- **Towbin H., Staehlin T., Gordon J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins form polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad. Sci.* **76**:4350-4354
- **Urban C., Celis R.T.** 1990. Purification and properties of a kinase from *Escherichia* K12 that phosphorylates two periplasmic transport proteins. *J. Biol. Chem.* **265**:1783-1786
- **Van Houten N., Bouchard P.E., Moraska A., Huber S.A.** 1991. Selection of an attenuated coxsackievirus B3 variant, using a monoclonal antibody reactive to myocyte antigen. *J. Virol.* **65**: 1286-1290

- **Vilei E.M., Frey J.** 2001. Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: Its impact on H₂O₂ production and virulence. Clin.Diagn.Lab.Immunol. **8**:85-92
- **Viola R.E. , Raushel R.M., Rendina A.R., Cleland W.W.** 1982. Substrate synergism and the kinetic mechanism of yeast hexokinase. Biochemistry **21**:1295-1302
- **Waites, K. B., Cox N.R., Crouse D.T., McIntosh J.C., Cassel G.H.** 1990. Mycoplasma infections of the central nervous system in humans and animals, p.379-387. In G. Stanek, G.H. Cassel, J.G. Tully und R.F. Whitcomb (ed.), Recent Advances in Mycoplasmaology. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- **Walker J. E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J.** 1982. Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases, and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J. **1**: 945-951
- **Wood J.C., Sales de Aguiar J.C., Jarra W., Ogun S.A., Snounou G., Brown K.N.** 1989. *In vivo* selection of populations of *Plasmodium chabaudi chabaudi* as resistant to a monoclonal antibody that reacts with the precursor to the major merozoite surface antigen. Infect. Immun. **57**: 2128-2135
- **Yamao F., Iwagami S., Azumi Y., Muto A., Osawa S., Fujita N., Ishihama A.** 1988. Evolutionary dynamics of tryptophan tRNA in *Mycoplasma capricolum*. Mol. Gen. Genet. **212**: 364-369

8. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
Ara	Arabinose
arg	Arginin
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
Aqua des.	Destilliertes H ₂ O
ATP	Adenosintriphosphat
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BSA	Bovine serum albumin
C	Cytosin
CCU	colony changing unit
CFTG	cytische Fibrose transmembranales Regulator Protein
CTP	Cytosintriphosphat
CSPD	Dinatrium 3- (4-methoxispiro {1,2-dioxetane-3,2'- (5'-chloro) tricyclo [3.3.1. ^{3,7}] decan} -4-yl) phenyl phosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
Dig	Digoxigenin
DMEM	Dulbeccco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratories
FBG	Freiburg
G	Erdbeschleunigung
G	Guanin
gal	Galaktose
GTP	Guanosintriphosphat
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
His	Histidin
HisQ	Poren-bildende Domäne des Histidintransportsystems
HPLC	high performance liquid chromatography
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Lac	Lactose
LAO	Lysin- Arginin- Ornithin
LB	Luria- Bertani- (Medium)
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
Mal	Maltosetransportsystem
MalF	Poren-bildende Domäne des Maltosetransportsystems
MalK	ATP-bindende Domäne des Maltosetransportsystems
MtOH	Methanol
MBP	Maltose-bindungs-Protein
min	Minute

MMLV	mouse mammary tumor virus
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
OD	optische Dichte
<i>opp</i>	Oligopeptidpermeasegen
Opp	<u>O</u> ligopeptidpermease
OppA ⁿ	Natives OppA
OppA ^r	rekombinantes OppA
ORF	Offener Leserahmen (open reading frame)
Ori	Origin
PBA	Protein-bindungs-abhängiges Transportsystem
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PID	pelvic inflammatory disease
P-loop	„phosphate-binding-loop“
PPLO	pleuro-pneumoniae-like organism
PTS	Phosphor-Transfer-System
RBS	Ribosomale-Bindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
sek	Sekunde
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-Puffer
TCA	Trichloessigsäure
Vh	Voltstunden
v/v	(„volume pro volume“) Volumenprozent
w/v	(„weight pro volume“) Gewichtsprozent

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. Hadding danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit und Vertretung der Arbeit vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, sowie für die Zuverfügungstellung des Arbeitsplatzes im Labor und die hilfreichen Anmerkungen und Diskussionen zur Abrundung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Kunz gilt mein Dank für die Begutachtung meine Arbeit, sowie diese durch anregende Diskussionen zu unterstützen.

Mein Dank gilt insbesondere Frau PD. Dr. B. Henrich. Nach der Übernahme des Themas gab sie mir die Möglichkeiten, die man sich nur wünschen kann und stand mir ständig mit Rat und großem Zeitaufwand zur Seite, um diese Arbeit realisieren zu können.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau M. Czarna und Frau Dr. A. Kitzerow für die unermüdliche Hilfe, sowie hilfreichen Diskussionen bedanken.

Ich danke allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Virologie, von denen jeder seinen Teil dazu beigetragen hat, dass ich gerne dort gearbeitet habe und die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Herrn PD. Dr. H. Schaal (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie) gilt mein Dank für die Synthese der Oligodesoxyribonukleotiden und seinen guten Ratschlägen. Frau Dr. S. Scheuring (Biologisch-medizinisches Forschungszentrum der HHU Düsseldorf) danke ich für die vielen Sequenzierungsarbeiten. Herr Prof. Dr. E. Meyer und seinen Mitarbeitern (Institut für Physiologische Chemie der Ruhr-Universität Bochum) danke ich für die Zusammenarbeit bei der Sequenzierung des OppA Proteins. Herrn Dr. E. Schneider (Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin) gilt mein Dank für die Bereitstellung des MalK Proteins.

Zum Schluß möchte ich mich insbesondere bei meiner Familie für die Unterstützung und ihre Geduld bedanken. Vielen Dank Patrice, dass Du viele einsame Abende und Wochenenden ertragen und mich immer ermuntert hast.