

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Charakterisierung des HinT-Proteins in Mollicutes

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sarah Katharina Hessemann

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windorf
Dekan
Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Birgit Henrich
Korreferent: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Für Johannes Hessemann

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	3
1.1 Humanpathogene Mykoplasmen	3
1.2 Genetische Eigenschaften der untersuchten Mykoplasmen-Spezies	5
1.3 Membranproteine als Adhäsine und Virulenzfaktoren	7
1.4 Die Hit-Superfamilie	8
1.5 Ziel der Arbeit	11
2. Materialien	12
2.1. Bakterienstämme	12
2.2 Oligodesoxyribonukleotide (Primer)	12
2.3 Enzyme und Antikörper	13
2.4 Längenstandards	14
2.5 Gebrauchsmaterialien	14
2.6 Geräte	15
2.7 Chemikalien	16
3. Methoden	18
3.1 Kultivierungsmethoden	18
3.1.1 Nährmedien für <i>E. coli</i>	18
3.1.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> in Flüssigkulturen	18
3.1.3 Kultivierung von <i>E. coli</i> auf LB-Platten	18
3.1.4 Nährmedien für Mykoplasmen und Ureaplasmen	19
3.1.5 Kultivierung von Mykoplasmen und Ureaplasmen	19
3.2 Proteinchemische Methoden	20
3.2.1 Herstellung von Mykoplasmen- und Ureaplasmen-Lysat	20
3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford	20
3.2.3 TCA-Fällung	20
3.2.4 Ethanol-fällung	21
3.2.5 Mykoplasmen-Aufschluss mittels osmotischer Lyse und unter verschiedenen Detergenzien mit anschließender Trennung von löslichen und unlöslichen Bestandteilen	21
3.2.6 Gelfiltration über NAP-Säulen	21
3.2.7 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	22
3.2.8 Isolation und Nachweis der Proteine aus den Bakterienkulturen	22
3.2.8.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	22

Inhaltsverzeichnis

3.2.8.2	Konzentrierungsgel	24
3.2.8.3	2D-Gel	24
3.2.8.4	Coomassie Brilliant Blau Färbung	24
3.2.8.5	Kolloidale Coomassie Brilliant Blau Färbung	25
3.2.8.6	Silberfärbung von SDS Gelen	25
3.2.8.7	Western Blot-Analyse	26
3.2.8.8	Dot-Blot-Verfahren	27
3.2.8.9	Amidoschwarz-Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen	27
3.2.7.10	Detektion von Radioaktiv markierten Proteinen im SDS-Gel	28
3.2.9	Affinitätschromatographische Methoden	28
3.2.9.1	Native Aufreinigung	28
3.2.9.2	Herstellung von Affinitätssäulen	29
3.2.9.3	Aufreinigung von polyklonalen α -HinT-Kaninchenseren über Affinitätssäulen	30
3.2.9.4	Affinitätschromatographische Aufreinigung HinT-bindender Proteine (Pulldown)	30
3.2.9.5	Quervernetzung mit Sulfo-SBED	31
3.2.10	Vorbereitung von Proteinproben für die Immunisierung	32
3.2.11	Identifizierung von Proteinen mittels ESI-MS	32
3.2.12	Affinitätschromatische Überprüfung der Interaktion zwischen HinT ^F und in vitro translatierter Proteine	33
3.3	Immunologische Methoden	34
3.3.1	Immunfärbung	34
3.3.2	Festphasen-Antigen-ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay)	34
3.3.3	Immunopräzipitation	34
3.4	Computerprogramme und Datenbanken	35
3.4.1	Einscannen von getrockneten Gelen	36
4.	Ergebnisteil	37
4.1.	Charakterisierung der HinT-Proteine aus <i>U. parvum</i> , <i>M. genitalium</i> , <i>M. pneumoniae</i> und <i>M. hominis</i>	37
4.2.	Homologieanalyse der Hit-Loki	37
4.3.	Die rekombinanten HinT-Proteine von Mhom, Up, Mpneu und Mgen ließen sich nativ aufreinigen	38
4.4.	<i>U. parvum</i> exprimiert HinT	40

Inhaltsverzeichnis

4.5. Höchste Solubilisierungseffizienz mykoplasmales (Membran-) Proteine mittels Dodecylmaltoside	42
4.6. Identifizierung von 8 HinT-interagierenden Proteine von <i>M. hominis</i>	45
4.7. Identifizierung von 3 HinT-interagierenden Proteine von <i>M. pneumoniae</i>	57
4.8. Detektion von 4 putativ HinT-interagierende Proteine von <i>U. parvum</i>	60
4.9. Detektion von 3 putativ HinT-interagierende Proteine von <i>M. genitalium</i>	63
5. Diskussion	66
6. Zusammenfassung	74
7. Literaturverzeichnis	75
8. Danksagungen	81
9. Abkürzungen	82

1. Einleitung

1.1 Humanpathogene Mykoplasmen

Mykoplasmen sind die kleinsten, sich selbst replizierenden Bakterien, die man bislang charakterisieren konnte. Sie verfügen über eine reduzierte Genausstattung, die einen parasitären Lebensstil erfordert, da sie Aminosäuren, Fettsäuren, Kofaktoren und Vitamine größtenteils nicht synthetisieren können (Rottem, 2003). Die Familie der Mykoplasmen beherbergt zellwandlose Bakterien der Klasse der *Mollicutes*, die in zwei Genera, *Mycoplasma* und *Ureaplasma*, unterteilt werden. Beim Menschen kommen Mykoplasmen entweder als apathogene Kommensale - also als Bestandteil der epithelialen Flora - vor oder lösen Infektionen aus (pathogene Vertreter), die oft chronisch verlaufen. Zu den humanpathogenen Mykoplasmen-Spezies zählen unter anderem *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. salivarium* und *M. penetrans* (fakultativ pathogen) sowie die ebenfalls fakultativ humanpathogenen Ureaplasmen *U. parvum* und *U. urealyticum* (Razin *et al.*, 1998). Kommensalische wie auch fakultativ-pathogene Mykoplasmen sind beinahe ideale Parasiten, da sie bei ihren Wirten meist wenige Schäden hervorrufen. Die krankheitsauslösende Wirkung einiger Vertreter ist vor allem durch die immunologische Antwort des Wirtes und weniger durch direkt toxische Wirkung der Bakterien ausgelöst. Es wird aktuell noch diskutiert, welchem der Faktoren – Immunantwort oder direkte Toxizität – generell die gewichtigere Rolle zukommt (Razin und Hayflick, 2010). So löst beispielsweise *M. pneumoniae* Pneumonien aus, *M. genitalium* und *U. parvum* können Infektionen des Urogenitaltraktes bedingen (siehe unten).

Um der Immunantwort des Wirtes zu entgehen, bedienen sich die Organismen zweier Mechanismen, der molekularen Mimikry und der phenotypischen Plastizität (Rottem, 2003). Molekulares Mimikry bedeutet, dass Mykoplasmen Antigenepitope aufweisen, welche ebenfalls auf Strukturen der Wirtszelle gefunden werden und somit i.d.R. immuntolerant sind. Die phänotypische Variabilität von Mollicutes ist unter anderem durch eine hohe Mutationsrate von Oberflächenantigenen gekennzeichnet. Dieses Phänomen wird auch als Antigenvarianz bezeichnet und zeichnet sich durch eine reversible Änderung der Expression und Modifikation der Membranproteine aus (Razin, 2010; Yogeve *et al.*, 2002). Bei *M. bovis*-Stämmen zum Beispiel analysierten Nussbaum und Mitarbeiter 2002 das genomische Cluster der *vsp* Gene und identifizierten es als Mediator eines hochfrequenten Wechsels in der

1. Einleitung

Expression der oberflächenlokalisierten Lipidprotein-Antigene. Bei *M. hominis* wurde das Vaa-Antigen als variables Oberflächenantigen identifiziert (Henrich *et al.*, 1993).

Die vier in dieser Arbeit untersuchten humanpathogenen Mykoplasmen, *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. hominis*, und *U. parvum*, haben sich auf zwei verschiedene Organsysteme, oder auch ökologische Nischen, im humanen Organismus spezialisiert. *M. pneumoniae* besiedelt vor allem respiratorische Epithelien und konnte in ca. 15-20% bei Erwachsenen und bei Kindern sogar in bis zu 40% als Erreger bei ambulant erworbenen Pneumonien nachgewiesen werden (Waites *et al.*, 2004). *M. genitalium*, *M. hominis* und *U. parvum* und kolonisieren hingegen hauptsächlich Epithelien des Urogenitaltraktes. Innerhalb dieser Nische haben sich diese drei Organismen noch weiter spezialisiert. Eine Beteiligung an der Urethritis des Mannes wird nur *M. genitalium* und *U. parvum* zugeschrieben (Waites *et al.*, 2005). Während Waites und Mitarbeiter 2005 noch postulierten, dass *M. genitalium* als einziges der drei Organismen an Zervizitiden beteiligt ist, konnten Rodrigues und Mitarbeiter 2011 bei Analysen von Cervixabstrichen eine Besiedelung in 21,9% mit *M. hominis*, in 38,4% mit *Ureaplasma* Subspezies und nur 0,9% mit *M. genitalium* nachweisen. *M. hominis* kann als Erreger bei bakteriellen Vaginosen isoliert werden. Besiedelung mit Ureaplasmen werden mit Frühgeburtlichkeit, niedrigem Geburtsgewicht und kindlichen chronischen Lungeninfekten in Verbindung gebracht (Waites *et al.*, 2005).

Die fakultativ humanpathogenen Mykoplasmen haben im Laufe der Evolution verschiedene pathophysiologische Mechanismen entwickelt, durch welche sie an die jeweiligen ökologischen Nischen innerhalb des menschlichen Körpers angepasst sind und welche eine gewisse Oberflächenspezifität bedingen.

1.2. Genetische Eigenschaften der untersuchten Mykoplasmen-Spezies

Aufgrund der geringen Anzahl von Proteinen eignen sich Mykoplasmen gut für Analysen von Proteininteraktionen. Die Genome sind sehr klein und betragen bei *M. genitalium* ca. 580kbp, bei *M. pneumoniae* ca. 816kbp, bei *M. hominis* ca. 665kbp und bei *U. parvum* ca. 751kbp. *E. coli* beispielsweise verfügt mit ca. 4639kbp über ein wesentlich größeres Genom. Es gibt Evidenzen, dass sich Mykoplasmen durch reduktive Evolution aus dem Zweig der grampositiven Bakterien entwickelt haben. Der Verlust der rigiden Zellwand wird als eine Anpassung an die konstanten Lebensbedingungen in der direkten Nähe zum Wirt bewertet. Da Proteine zum Aufbau dieser Zellwand nicht mehr benötigt wurden, konnte auf eine große Anzahl von Strukturgenen verzichtet werden. Des Weiteren besitzen Mykoplasmen eine

1. Einleitung

minimale Ausstattung an Zellorganellen, bestehend aus einem zirkulären doppelsträngigen DNA-Molekül, den Ribosomen und der Plasmamembran (Razin, 1992). Zusätzliche zytoplasmatische Membranen besitzen sie nicht (Razin, 2010). Da sich die Membranfraktionen gut aufbereiten lassen, können Interaktionen zytoplasmatischer als auch membranständiger Proteine untersucht werden.

M. genitalium ist der Organismus mit dem kleinsten Genom (ca. 580 kbp), der in zellfreiem Kulturmedium kultiviert werden kann (Fraser *et al.*, 1995). Er verfügt über 482 proteinkodierende Gene. Glass und Mitarbeiter zeigten 2006 mittels 'globaler-Transposon-Mutagenese', dass 100 Gene nicht essentiell für das Überleben von *M. genitalium* sind und die restlichen 382 Gene überlebensnotwendig sind.

Nach Analysen der sequenzierten Genome der drei urogenitalen Mykoplasmen *M. hominis*, *M. genitalium* und *U. parvum* wurde festgestellt, dass 247 Strukturgene eine starke Ähnlichkeit aufweisen. Pereyre und Mitarbeiter teilten 2009 die spezies-spezifischen Gene – 220 Gene bei *M. hominis*, 172 Gene bei *M. genitalium*, und 280 Gene bei *U. parvum* - in zwei Gruppen ein: zum einen Gene, die für Enzyme energiegewinnender Stoffwechselwege kodieren, zum anderen Gene, die an der Ausprägung von Zytadhärenz und Virulenz beteiligt sind. Die gemeinsamen Gene bilden somit die Grundausrüstung und die spezies-spezifischen Gene variieren je nach Spezialisierung und Anpassung an die jeweilige Nische. So unterscheiden sich die Organismen hinsichtlich der Fähigkeit an verschiedene - meist epitheliale - Zellen zu adhären, hinsichtlich ihrer Virulenz und ihrer Möglichkeiten zur Energiegewinnung.

Die begrenzte Anzahl an Stoffwechsellzymen der Mykoplasmen sind Resultat einer reduzierten Anzahl an Genen. Die eingeschränkten Stoffwechselleistungen bedingen hohe Ansprüche an den Nährstoffgehalt der Umgebung und gleichzeitig eine starke Abhängigkeit von den Wirtszellen. Aminosäuren, Fettsäuren, Vitamine und Cholesterin können nicht eigenständig synthetisiert werden, der Bedarf muss durch direkte Aufnahme gedeckt werden (Razin, 1992). Die Kultivierung von Mykoplasmen gelingt daher nur in bzw. auf speziellen Nährmedien, die meist hohe Mengen an Serum enthalten, um den Ansprüchen der Bakterien gerecht zu werden (Miles, 1992).

Die vier in dieser Arbeit analysierten Organismen benutzen verschiedene Wege der Energiegewinnung. *M. pneumoniae* und *M. genitalium* sind fermentierende Bakterien. Dies bedeutet, dass sie ihren Energiebedarf über die Verstoffwechslung von Glukose (Glykolyse) gewinnen. Sie verfügen über alle Enzyme des Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) Stoffwechselweges (Miles, 1992), welcher die Enzyme der oxidativen Glykolyse beinhaltet.

1. Einleitung

In den Genomen von *M. hominis* und *U. parvum* ist die Enzymausstattung des EMP-Glykolyse-Stoffwechsels nicht vollständig kodiert. Beiden Bakterien fehlt jeweils eines der Enzyme: Bei *M. hominis* ist es die 6-Phosphofruktokinase, bei *U. parvum* fehlt das kodierende Gen für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase (Pereyre *et al.*, 2009). Als alternativer Energielieferant dient den Ureaplasmen Harnstoff, welcher mittels der Urease metabolisiert wird (Miles, 1992). *M. hominis* hingegen verstoffwechselt zur Energiegewinnung unter anderem Arginin. Der Abbau von einem Mol Arginin liefert über drei enzymatisch katalysierte Schritte ein Mol ATP. Die beteiligten Enzyme sind die Arginindeiminase, die Ornithin-Carbamoyltransferase und die Carbamat-Kinase (Barile *et al.*, 1966). Lin zeigte 1986, dass die Arginindeiminase in zwei verschiedenen Formen vorkommt, in einer zytosolischen Form und in einer weniger stoffwechselaktiven membrangebundenen Form (Lin, 1986).

Auch hinsichtlich der Adhäsionsfähigkeit an verschiedene Epithelien unterscheiden sich die einzelnen Spezies. Diese wird unter anderem durch die verschiedenen speziesspezifischen Oberflächenproteine vermittelt (Pereyre *et al.*, 2009). Neben der Zytadhärenz wurden bislang als weitere patho-physiologische Faktoren der Mykoplasmen diskutiert: a) ein Wettstreit mit der besiedelten Wirtszelle um Nahrung, b) die Sekretion mykoplasmalear Proteine und c) oxidativer Stress (Razin *et al.*, 1997). Pollak und Mitarbeiter zeigten 1997, dass der oxidative Stress unter anderem durch NADH-Oxidase-Reaktion vermittelt wird.

1.3 Membranproteine als Adhäsine und Virulenzfaktoren

Den ersten Schritt einer Infektion stellt die Adhäsion des Pathogens an epitheliale Zellen dar. Die Zytadhärenz, d.h. die Bindung des Pathogens an die Wirtszelle, wird über verschiedene Mechanismen vermittelt: *M. pneumoniae* verfügt über eine sogenannte Tip-Organelle (Rottem, 2003), welche der Anheftung an die Wirtszelle dient und dem Bakterium die Möglichkeit zur Motilität mit gleitendem Charakter verleiht. Hauptbestandteil der Tip-Organelle ist das Protein P1; ihm wird eine entscheidende Rolle bei der Zytoadhäsion zugesprochen. P1-defiziente Klone verloren ihre Fähigkeit zur Zytoadhäsion und waren apathogen (Dallo *et al.*, 1988). Während *M. genitalium* ebenfalls über eine homologe Tip-Struktur an urogenitales Epithel bindet, weisen die Ureaplasmen und *M. hominis* keine spezielle Anheftungsorganelle auf. Hier sind die in der trilaminaren Membran verankerten Oberflächenstrukturen an der Bindung an das zu kolonisierende und zu infizierende Gewebe verantwortlich. Für *Mycoplasma hominis* wurden am Institut für Medizinische Mikrobiologie

1. Einleitung

und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf 1993 die ersten zytadhäsiven Proteine beschrieben (Henrich et al., 1993). So wurde ein 50 kDa Lipoprotein, P50 als Oberflächenantigen mit zytadhäsiven Eigenschaften identifiziert und in den folgenden Jahren weiter charakterisiert (Henrich *et al.*, 1993). P50 stellte sich als variantenreiches variables Adhärenz-assoziiertes (Vaa) Antigen heraus, das über einen konservierten membranverankerten N-Terminus und einen variablen repetitiven C-Terminus verfügt. Zhang und Wise konnten 1996 nachweisen, dass dieser an der Adhäsion beteiligt ist).

Die begrenzte Anzahl an Proteinen und Genen hat zur Folge, dass einzelne Proteine mehrere Funktionen innerhalb des Organismus übernehmen. So werden in Mykoplasmen eigentlich zytoplasmatische Proteine in der Membran gefunden. Wie beispielsweise für *M. pneumoniae* gezeigt werden konnte, ist hier der eigentlich zytoplasmatische Elongationsfaktor Tu (EFTu) in der Membran nachweisbar und spielt dort durch die Bindung an Fibronectin eine Rolle als Adhäsionsfaktor (Balasubramanian et al., 2008). So ist die Funktion von EFTu hier nicht auf die enzymatische beschränkt, sondern ist in diesem Fall zusätzlich ein möglicher Pathogenitätsfaktor.

Intrazelluläre Proteine können auch über Interaktion mit Membranproteinen Einfluss auf die Pathogenität der Organismen nehmen. Für *M. hominis* wurde eine Interaktion des Membranständigen P80 mit dem zytosolischen HinT nachgewiesen. P80 ist hauptsächlich oberflächenexponiert und bildet einen Membrankomplex mit P60 (Henrich et al., 1993). Die Interaktion mit HinT ist wahrscheinlich über das zytosolische n-terminale Ende des Proteins vermittelt (Kitzerow & Henrich, 2001).

In der hiesigen Mykoplasmen-Arbeitsgruppe wurde in den letzten Jahren unter anderem das HinT-Protein und seine Expression sowie Funktion in Mykoplasmen und Chlamydien näher beleuchtet. In dieser Arbeit werden weitere Untersuchungen des HinT-Proteins - ein Mitglied der Hit-Superfamilie - in den fakultativ humanpathogenen Mykoplasmen folgen.

1.4. Die Hit-Superfamilie

Die Hit-Superfamilie beinhaltet nukleotid-bindende Proteine mit einem konservierten Sequenzmotiv über sieben Aminosäuren: His- \emptyset -His- \emptyset -His- \emptyset - \emptyset (His = Histidin; \emptyset = eine hydrophobe Aminosäure) (Seraphin, 1992). Zu den ursprünglichen drei Zweigen der Proteinfamilie, dem HinT (Histidin-Triade Nukleosid bindendes Protein) -Zweig, dem Fhit (fragiles Histidin-Triade verwandtes Homolog) -Zweig und der GalT (Galaktose-1-Phosphate Uridylyltransferase) (Brenner *et al.*, 1999), sind nach aktuellen Studien zwei weitere

1. Einleitung

eigenständige Zweige, das Apraxin (Hirono *et al.*, 2004) und das DcpS (Scavenger mRNA decapping Enzym) (Liu *et al.*, 2002) in Eukaryonten identifiziert worden.

Die Fhit-Proteinfamilie wird in Tieren und Pilzen gefunden. Fhit bindet und hydrolysiert Diadenosin Phosphate (Ap_nA) wie ApppA und AppppA (Brenner *et al.*, 1999). Seine Rolle als Tumorsuppressor-Gen ist schon vielfach beleuchtet worden. 1998 konnten Sozzi und Mitarbeiter zeigen, dass der Verlust der Fhit-Expression die häufigste und früheste Gen-Veränderung beim Lungenkarzinom ist. Aktuell werden drei mögliche Modelle zur Erklärung der Tumorsupressorfunktion diskutiert: a) die Tumorsuppression ist direkt von der enzymatischen Aktivität abhängig, b) Signalübertragung durch gebundene Fhit Formen spielen eine Rolle oder c) die Tumorsuppression ist Nukleotid unabhängig (Hassan *et al.*, 2009).

Das zweite Enzym des Leloir Stoffwechselweges der Galaktose-Verwertung, die GalT, ist ebenfalls ein HIT-Protein. Beim Menschen führen Mutationen des GalT-Genes zur Ausbildung einer Galaktosämie und sind die häufigsten Mutationen bei Galaktosämie-Patienten (Brenner, 2002).

Ein weiterer Vertreter der Hit Proteine ist das DcpS. 2002 wurde das scavenger mRNA Decapping-Enzym von Liu und Mitarbeitern durch Sequenzierung als Mitglied der Hit-Familie identifiziert. Es ist durch Hydrolyse der Kappe am Abbau von mRNA beteiligt. Diese Decapping-Funktion konnte der Histidin-Triade-Sequenz zugeordnet werden. In anderen Eukaryoten (z.B. Mäusen und Drosophila) und in prokaryoten Hefezellen konnten - durch Sequenzuntersuchungen in der GenBank - DcpS-Analoga mit HIT Motiv gefunden werden.

Das Apraxin ist ein Zink-Finger-Protein, sein Defekt führt beim Menschen zur Ataxie mit okulomotorischer Apraxie (AOA). Die AOA ist charakterisiert durch cerebellare Ataxie, periphere Neuropathie und Hypalbuminämie. Die HIT-Region des Apraxinproteins scheint eine entscheidende Rolle an der enzymatischen Funktion zu spielen. Das phänotypische Krankheitsausmaß korreliert stark negativ mit der Enzymaktivität und weniger mit der Anzahl der Genprodukte (Hirano *et al.*, 2004). Kijas und Mitarbeiter wiesen 2006 nach, dass das Apraxin an DNA Reparaturmechanismen beteiligt ist und DNA- und RNA-Moleküle binden kann.

HinT ist der älteste Vertreter der Hit-Proteine und wird als phylogenetischer Vorfahre der anderen Zweige gesehen. Es konnte als einziges Hit-Protein in allen Reichen des Lebens nachgewiesen werden (Brenner, 2002). Kristallographische Analysen zeigten, dass HinT als Homodimer vorkommt, und dass es über mögliche Interaktionsareale für Purinbasen, Ribose und 5' Monophosphat verfügt. Es wurde nachgewiesen, dass HinT über eine

1. Einleitung

Hydrolaseaktivität verfügt. Als Substrat dienen AMP-NH₂ und AMP an Lysinseitenketten in Proteinen. Nach Hydrolyse verbleibt das unveränderte Lysin am Protein. Möglicherweise übernimmt HinT die Aufgabe der AMP Abspaltung spontan adenylierter Proteine (Brenner, 2002).

Im humanen Proteom wurden vier HinT-Homologe identifiziert. Hint1 konnte eine Rolle bei der Transkription zugesprochen werden. Es interagiert mit dem microphthalmia-assoziierten Transkriptionsfaktor (MITF) und der Zyklin abhängigen Kinase 7 (CDK7). Der MITF spielt eine Rolle bei Wachstum und Funktion von Melanozyten und Mastzellen. Durch Cotransfektions-Studien in Fibroblasten wurde Hint1 als Negativ-Regulator des MITF identifiziert (Razin E. *et al.*, 1999). Die CDK7 bildet mit weiteren Proteinen eine Kinasekatalytische-Untereinheit der CDK-aktivierten Kinase (CAK) und ist Teil des generellen Transkriptionsfaktors II (TFIIH). Der TFIIH bildet die C-terminale Kinaseaktivität der RNA-Polymerase 2. Die Interaktion zwischen Hint1 und der CDK7 wurde durch Co-Immunoprecipitations Analysen und subzellulären Lokalisationsstudien verifiziert (Korsisaari *et al.*, 2000).

Unabhängig von seiner enzymatischen Aktivität wird dem Hint1-Protein eine Apoptose-triggernde Funktion zugesprochen. Hint1 führt zu einer Steigerung der p53- und BAX-Expression. BAX ist ein proapoptotischer Faktor. Gleichzeitig erfolgte durch Hint1 eine Drosselung der Bcl-2-Expression. Bcl-2 ist ein Apoptoseinhibitor (Weiske *et al.*, 2006).

Möglicherweise spielt Hint1 neben seiner Rolle in der Transkription und der Apoptose auch eine als Tumorsuppressor. In Hint1 Knock-out-Mäusen wurde eine normale embryonale Entwicklung beobachtet. Im Alter von 2 – 3 Jahren wiesen die Hint1 *-/-* Mäuse eine signifikant erhöhte Rate an spontan entstandenen Tumoren auf. Außerdem war die Empfindlichkeit der Hint1 *-/-* Tiere für eine Tumorinduktion durch Karzinogene bei Ovarial- und Mammakarzinomen erhöht (Li *et al.*, 2006).

Zusammenfassend sind die Proteine der Hit-Superfamilie an mehreren Prozessen beteiligt: Tumorsuppression (Fhit), Energiegewinnung (GalT), Decapping (DcpS), DNA-Reparatur (Apraxin) und Modulation der Transkription und Apoptose (HinT). Diese Funktionen waren vor allem im Bereich der Eukaryoten erforscht worden. Die Erkenntnisse über die Aktivitäten von Proteinen der HIT-Familie in Prokaryoten waren lange auf Sequenzanalysen beschränkt. In *E. coli* stellt HinT die einzige Purin-Nukleosid-Phosphoramidase dar und zeigte sich essentiell für das Wachstum der Bakterien bei hohen Salzkonzentrationen (Chou *et al.*, 2005). In den letzten Jahren wurden in der hiesige Mykoplasmen Arbeitsgruppe am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene die *hit*-Loci von Mykoplasmen und

1. Einleitung

Chlamydien näher charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass vom *hit*-Locus von *M. hominis* - neben HinT - die Membran-Proteine P60 und P80 kodiert werden. Mittels RT-PCR Analysen wurde nachgewiesen, dass die drei Proteine ko-exprimiert werden. P60 und P80 bilden, wie oben beschrieben, einen gemeinsamen Membrankomplex, wobei das reife P80 Protein nach Abspaltung des N-terminalen Signalpeptides sezerniert wird. Das HinT Protein von *M. hominis* liegt cytoplasmatisch vor und zeigt eine Interaktion mit der P80-Domäne des membranständigen Proteinkomplexes. Diese Interaktion konnte mittels BIAcore-Analysen gezeigt werden (Kitzerow & Henrich, 2001).

Computer-basierte Sequenzanalysen ergaben, dass die *hit*-Loci von *M. pulmonis*, *M. mycoides* spp. *mycoides* SC, *M. mobile* und *Mesoplasma florum* einen Aufbau zeigen, der dem von *M. hominis* sehr ähnlich ist. In *M. pneumoniae* und *M. genitalium* kodiert der *hit*-Locus für HinT und für ein putatives Membran-Protein mit mehreren Transmembrandomänen. Das *U. parvum*-HinT wird mit UU270, einem putativ porenbildendem Protein, UU271, einem P60 Homolog und UU273, einem weiteren postulierten Membranprotein, kodiert. Eine polycistronische Organisation der *hit*-Locus kodierten Gene konnte 2005 von Hopfe und Mitarbeitern mittels RT-PCR für *M. hominis*, *M. pulmonis* und *U. parvum* gezeigt werden. Hierbei ist anzumerken, dass eine polycistronische Organisation von prokaryotischen Genen oft Proteingruppen anzeigt, die interagieren bzw. zeitgleich gebraucht werden. Dies ist als weiterer Hinweis dafür zu werten, dass HinT auch in denen in der Arbeit näher beleuchteten Mykoplasmen - *M. pneumoniae*, *M. genitalium* und *U. parvum* - mit putativ membranständigen Proteinen interagieren könnte, und infolgedessen HinT eine pathophysiologisch wichtige Rolle spielen könnte.

1.5. Ziel der Arbeit

Anknüpfend an die Forschungsergebnisse der hiesigen Mykoplasmen-Arbeitsgruppe sollte HinT, seine Interaktionspartner und Funktion in den Mykoplasmen *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *U. parvum*, weiter untersucht werden. Mit Hilfe von verschiedenen Methoden wurden mögliche Interaktionspartner von HinT detektiert und identifiziert. Die Ergebnisse der verschiedenen Analysen wurden im Anschluss auf Übereinstimmungen hin untersucht. Abschließend wurde geprüft, inwiefern die Resultate bereits Bekanntes bestätigten oder neue Eigenschaften des HinT-Proteins darstellten.

2. Material

2.1. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle/Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Gibco BRL Life Technologies
<i>Escherichia coli</i> DH5 α F'	F', ϕ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-arg7)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r_K^- , m_K^+), <i>supE44</i> , λ^- , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Promega
<i>Mycoplasma genitalium</i> ATCC 33530	Wildtyp	American Type Culture Collection, London
<i>Mycoplasma hominis</i> FBG	Wildtyp	klinisches Isolat, Universität Freiburg
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> NCTC 10119	Wildtyp	National Collection of Type Cultures, London
<i>Ureaplasma parvum</i> Serovar 3	Wildtyp	Public Health Laboratory, London

2.2. Oligodesoxyribonukleotide (Primer)

Amplikon	Primer bezeichnung	Sequenz 5' \Rightarrow 3'
<i>M. genitalium</i> hit	MG132 up <i>Bam</i> HI	ATG↓GATCCCTATGGAAAAAAC ACCACAAGTAGT
<i>M. genitalium</i> hit	MG132 low <i>Sac</i> I	ATGAGCT↓CTTAATTTTTGCTTTCA GATATTAGTTGGTAG
<i>M. pneumoniae</i> hit	MPN273 up	ATGGTGCAAAAACAAAGT
<i>M. pneumoniae</i> hit	MPN273 low	GTTAATCTACCTCTTTAGTAAGTA
<i>U. parvum</i> hit	UU272 up <i>Bam</i> HI	AGGATCCTGATGCAAGATTGT ATTTTT
<i>U. parvum</i> hit	UU272 low <i>Sac</i> I	TGAGCTCTTCCATATTTTTTG ATTATACCATA
<i>M. hominis</i> hit	<i>hit-1</i>	TTTAGGATCCGCATGCATGATGATA TTTTTGAA
<i>tuf</i>	<i>tuf</i> for <i>Bam</i> HI	TGGGGATCCTTATGGCAAATA GA
<i>tuf</i>	<i>tuf</i> rev <i>Pst</i> I	CTGTTAGTCCTGCAGATTATTATT AAGAAT
<i>ack</i>	<i>ack</i> for <i>Bam</i> HI	ATAGGGATCCTTATGTCAAAA

2. Material

<i>ack</i>	<i>ack rev</i> <i>PstI</i>	TTTCTGCAGTTACCTTATATTAT
<i>adi</i>	<i>adi for</i> <i>BamHI</i>	TGTCTGTATTTGACAGTAAA
<i>adi</i>	<i>adi rev</i> <i>PstI</i>	CCACTTAACATCTTTACG

pGBKT7: Cat.No.630303 (Clontech)

ack-Punktmutationen:

nt 218: tga→tgg

nt 310: tga→tgg

nt 862: tga→tgg

adi-Punktmutationen:

nt 603: tga→tgg

nt 816: tga→tgg

nt 882: tga→tgg

2.3 Enzyme und Antikörper

Enzym

DNase

Lysozym

alkalische

Proteinase K

RNase

T4 DNA Ligase

Taq-DNA-Polymerase

“Expand High Fidelity PCR-System”

Bezugsquelle

Roche

Sigma

Phosphatase Roche

usb

Roche

Roche

Invitrogen

Roche

Antiserum

anti-Tetra-His-Antikörper

Ziege-anti-Maus-HRP-Konjugat

Ziege-anti-Kaninchen-HRP-Konjugat

Kaninchen-anti-Human-HRP-Konjugat

Kaninchen-anti-Mg-HinT-Antiserum

Kaninchen-anti-Mp-HinT-Antiserum

Kaninchen-anti-LCD-Antiserum

Maus-anti-Mh-HinT-Antiserum

Humanseren Diagnostik

Bezugsquelle

Qiagen

Dianova

Dianova

Dianova

Eurogentec, Belgien

Eurogentec, Belgien

Eurogentec, Belgien

Eurogentec, Belgien

(Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Krankenhaushygiene)

2. Material

2.4 Längenstandards

DNA-Molekulargewichtsstandard:

“Mass RulerTM DNA Ladder Mix“ Fermentas
10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.031, 900,
800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 80 bp

Protein-Molekulargewichtsstandards:

- „SDS-Page Molecular Weight Standards, Low Range“ (BioRad):
14,4 (Lysozym); 21,5 (Sojabohnen Trypsin-Inhibitor); 31,0 (Carboanhydrase); 45,0
(Ovalbumin); 66,2 (Serumalbumin); 97,4 (Phosphorylase B) kDa
- „PageRulerTM Protein Ladder“ (Fermentas, Mix aus rekombinanten Proteinen)
10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 85, 100, 120, 150, 200 kDa
- „See Blue[®] Plus2 Pre-Stained Standard“ (Invitrogen):
4 (Insulin, B-Kette), 6 (Aprotinin), 16 (Lysozym), 22 (Myoglobin rot), 36 (Carboanhydrase),
50 (Alkoholdehydrogenase), 64 (Glutamat-Dehydrogenase), 98 (Serumalbumin), 148
(Phosphorylase), 250 (Myosin) kDa

2.5 Gebrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien

Cryo-Tubes (Nunc Cryo Tube Vials)
Eppendorf-Tubes
(„Safe-lock“ Tubes; 0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)
Whatman-Paper
Hyperfilm ECL-Röntgenfilme
Impfösen (steril)
Kanülen
Maxi-Sorb- und Mikrotiterplatten
Nylonmembran, (HybondTM-N+)
Parafilm M
PCR-Softstrips (0,2 ml)
Plastikwaren
Protran BA 85 Nitrozellulose-Membran
Skalpelle (Scalpel Feather)
Sterilfilter
Sterilpipetten (Costar Stripette)

Bezugsquelle

Nunc, Roskilde, Dänemark
Eppendorf, Hamburg
Schleicher & Schuell, Dassel
GE Healthcare (Amersham), Solingen
Greiner, Frickenhausen
BD Pharma, Heidelberg
Nunc, Roskilde, Dänemark
GE Healthcare (Amersham), Solingen
Pechiney Plastic Packagig, Chigago, USA
Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf
BD Biosciences (Falcon), Heidelberg
Schleicher & Schuell, Dassel
AliMed, Dedham, USA
Millipore, Schwalbach
Corning Incorporated, Schipol-Rijk,
Niederlande

Alle hier nicht aufgeführten Materialien entsprechen den allgemeinen Laborstandards.

2. Material

2.6 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage (Chyo JL-180)	Welabo, Düsseldorf
Bakterienschüttler:	
GFL 3015 / GFL 3019	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Brutschrank (HERA cell)	Kendro (Heraeus), Langenselbold
Digitalkamera (Powershot G2)	Kanon, Amsterdam, Niederlande
Dot-Blot-Apparatur	Schleicher & Schuell
Drehrad (Model L 28)	Labinco BV, Breda, Niederlande
Elektrophoresekammern für DNA:	
DNA Pocket Bloc-UV	Biozym-Diagnostik, Hameln
Elektrophoresekammer für SDS-Gele:	
P8DS	Owi Separation System, Inc.
Model V16-2	Bethesda Research Laboratories, Inc.
„ELISA-Reader“,	Rainbow Tecan, Schweiz
Entwicklermaschine (Curix 60)	AGFA, Leverkusen
Geldokumentationsanlage	Biometra, Göttingen
Heizblock	Labor Technik Barkey, Bielefeld
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Magnetrührer	IKA, Staufen
Mikrowelle	AEG, Nürnberg
PCR-Automaten:	
T-Gradient	Biometra, Göttingen
T3	Biometra, Göttingen
pH-Meter (MP225)	Mettler Toledo, Giessen
Photometer (UV mini-1240)	Shimadzu, Duisburg
Phosphoimager	Fujifilm FLA 3000
„Pipet-Boy“	Integra Bioscience
Blotkammer	Phase, Mölln
Schwenker für Gele/Membranen	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Spannungsgeber	Gibco BRL, Amersham Pharmacia Bioscience
Sicherheitswerkbank der Klasse II	Antair
Ultraschallgerät (Labsonic U)	B. Braun
UV-Crosslinker	Biometra, Göttingen
Vortexer (MS2 Mini-Shaker)	IKA [®] , Staufen
Waage (Precisa 600)	Oehmen, Essen
Wasseranlage (Milli-Q-System)	Millipore, Schwalbach
Wasserbad (thermed 5001 electr.)	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

2. Material

Zentrifugen:

Beckmann [®] Model J2-21 (Rotoren: JA-10, JA-20)	Beckmann
Biofuge 13	Kendro (Heraeus), Langenselbold
Mini Spin	Eppendorf, Hamburg
Rotana 46RC	Hettich, Bäch, Schweiz
Universal 32R	Hettich, Bäch, Schweiz

Alle hier nicht aufgeführten Kleingeräte entsprechen den allgemeinen Laborstandards.

2.7 Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid (Rotiphorese [®] Gel 30)	Roth
Agar	Difco
Agarose	Invitrogen
Amidoschwarz 10B	Merck
Ampicillin	Merck
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck
β -Mercaptoethanol	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma
Bromphenolblau	Merck
n-Butanol	Merck
3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]- 1-Propan-Sulfonat (CHAPS)	Sigma
Coomassie Brilliant Blau G250	Merck
Desoxynukleotid-5'-Phosphat (dNTP)-Mix	Fermentas, PeqLab
Dodecylmaltosid	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Riedel de Haën
Eisessig 100%	Merck
Entwickler für Röntgenfilme	Agfa
Essigsäure 96%	Roth
Ethanol _{abs.}	Merck
Ethidiumbromid	BioRad
Fixierer für Röntgenfilme	Agfa
D-Glukose-Monohydrat	Merck
Glycin	Roth
Glycerin	Merck
Guanidin-Hydrochlorid (GuHCl)	Merck

2. Material

Harnstoff	Merck
Hefeextrakt	Gibco BRL
Igepal (NP 40)	Sigma
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
N-Lauroylsarcosin (Sarkosyl)	Sigma
LB-Medium/Agar	Roth
Luminol (ECL) Amersham	Bioscience
Magnesiumsulfat	Merck
Malachitgrün (Oxalat)	Merck
Methanol	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Milchpulver ("Skim Milk Powder")	Oxoid
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Natronlauge (NaOH)	Merck
Nickel ²⁺ -Nitrilo-Triessigsäure (Ni ²⁺ -NTA)-Agarose	Qiagen
2N-Octylglycosid	Boehringer Mannheim
Pefabloc SC	Roche
Pferdeserum	Gibco BRL
Phenolrot	Sigma
Phosphorsäure	Merck
PPLO-Broth	Difco
2-Propanol	Merck
Salzsäure 37% (HCl)	Roth
CNBr-aktivierte Sepharose [®]	Pharmacia Biotech
Silbernitrat	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck
N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin (TEMED)	Merck
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma
3,3',5'5-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Roth
Triton X-100	Merck
Tween 20	Merck

Alle übrigen Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth oder Sigma in analytischem Reinheitsgrad bezogen.

3. Methoden

3.1.4 Nährmedien für Mykoplasmen und Ureaplasmen

(Blazek *et al.*, 1990)

PPLO-Flüssigmedium wurde 20 min bei 121°C und einem Druck von 2 bar autoklaviert. Autoklavierter Hefeextrakt, bei 56°C hitzeinaktiviertes Pferdeserum und sterilfiltriertes Phenolrot wurden dem PPLO-Flüssigmedium unter sterilen Bedingungen hinzugefügt. Anschließend wurden die jeweiligen Zusätze (Tab. 1) im sterilfiltriertem Zustand zugegeben; der pH-Wert wurde mit ebenfalls sterilfiltrierter 1 - 2 M NaOH, bzw. 1 - 2 M HCl eingestellt.

Basismedium	2,1% w/v PPLO-Broth
	1% w/v Hefeextrakt
	10% v/v hitzeinaktiviertes Pferdeserum
	0,002% w/v Phenolrot

Tab. 1: Artspezifische Zusätze und pH-Werte für die Medien Spezies

Spezies	<i>M. genitalium</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. pneumoniae</i>	<i>U. parvum</i>
Medienzusatz	1% (w/v) Glukose	1% (w/v) Arginin	1% (w/v) Glukose	1% (w/v) Harnstoff
pH-Wert	7,5-7,6	6,5-6,6	7,5-7,6	6,5-6,6

3.1.5 Kultivierung von Mykoplasmen und Ureaplasmen

Gefrierkulturen, die bei -70°C gelagert waren, wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und 1:10 in sterilem, für die jeweilige Art spezifischem Medium (Tab. 1), verdünnt. In fest verschlossenen Röhrchen oder Kulturflaschen wurden die Kulturen anaerob bei 37°C bebrütet. Das Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase wurde durch den beginnenden Farbumschlag des pH-Indikators, Phenolrot deutlich, (Tab. 2) welcher durch die Verstoffwechslung der artspezifischen Medienzusätze zustande kam.

Tab. 2: Wachstumsindikator und Wachstumszeit Spezies

Spezies	<i>M. genitalium</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. pneumoniae</i>	<i>U. parvum</i>
Farbumschlag	Rot - Gelb	Gelb - Rot	Rot - Gelb	Gelb - Rot
Wachstumszeit	120 h	16 h	72 h	12 h

3. Methoden

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Herstellung von Mykoplasmen- und Ureaplasmen-Lysat

Eine Mykoplasmen- oder Ureaplasmen-Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase wurde 20 - 30 min bei 4°C und 14.300 x g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde 3 x mit kaltem PBS gewaschen, wobei die dazwischen liegenden Zentrifugationsschritte für 20 – 30 min bei 4°C und 10.000 - 14.000 x g durchgeführt wurden. Das gewaschene Bakterienpellet wurde in PBS resuspendiert, und der Proteingehalt nach Bradford (3.2.2) gemessen. Anschließend wurden die Mykoplasmen durch dreimaliges Einfrieren in Flüssigstickstoff und jeweiliges Auftauen aufgeschlossen. Die cytoplasmatischen Proteine lagen nun in gelöster Form vor.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen nach Bradford

(Bradford, 1976)

Proteinreagenz-Stammlösung: 0,067% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G 250
32% (v/v) EtOH 96%
57% (v/v) ortho-Phosphorsäure 85%

Bei der Bindung von Coomassie Brilliant Blau G 250 an Proteine im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm ohne Protein zu 595 nm mit Protein. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Bei der Durchführung der Proteinbestimmung nach Bradford wurden die zu bestimmenden Proteinlösungen in einer Verdünnungsreihe, neben einer BSA-Verdünnungsreihe (10 – 200 µg/ml), in Mikrotiterplatten (Nunc) pipettiert und mit 1:5 in A. dest. verdünntem Proteinreagenz versetzt. Anschließend wurde die OD bei 595 nm im „ELISA-Reader“ gemessen. Die Werte des Standards wurden graphisch aufgetragen. So war anhand der Standardkurve die Konzentration der zu bestimmenden Probe abzulesen.

3.2.3. TCA-Fällung

Die Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) wurde angewandt, um Proteine aus Lösungen zu konzentrieren oder hohe Salzkonzentrationen zu entfernen. Die proteinhaltigen Lösungen wurden 20-fach mit A. dest. verdünnt und auf 10% TCA (w/v) gebracht. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde der Ansatz bei 20.400 x g und 4°C 30 min zentrifugiert, mit gleichem Volumen 70%

3. Methoden

Ethanol gewaschen und getrocknet. Die Pellets wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und auf SDS-Gelen (Kapitel 3.2.8.1) analysiert.

3.2.4 Ethanolfällung

Proteinproben in Lösung wurden mit 5 facher Menge 70% Ethanol (-20°C) aufgefüllt und 15 min auf Trockeneis gestellt. Nach 15 min Zentrifugieren befanden sich die gefällten Proteine im Pellet und konnten für weitere Analysen in den entsprechenden Puffern aufgenommen werden.

3.2.5 Mykoplasmen-Aufschluss mittels osmotischer Lyse und unter verschiedenen Detergenzien mit anschließender Trennung von löslichen und unlöslichen Bestandteilen

Mykoplasmenlysate in PBS mit bekannter Proteinkonzentration (*M. hominis* 6-12 mg/ml, *M. genitalium* 1-3mg/ml, *M. pneumoniae*:1-3mg/ml, *Ureaplasma parvum* 4,5mg/ml) wurde 3 mal auf Trockeneis gefroren und im Wasserbad bei Raumtemperatur wieder aufgetaut, dann in gleicher Menge mit verschiedenen in PBS gelösten Detergenzien vermischt. Die Detergenzkonzentration betrug 0,5% - 5%. Für die Proteininteraktionsstudien wurde zur Herstellung der Lysate 1% Dodekylmaltoside verwendet. Die Proben wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Drehrad inkubiert und anschließend für 45 min bei 20.400 g zentrifugiert. Im Überstand befanden sich jetzt die cytoplasmatischen Proteine sowie durch das Detergenz gelöste membranständige Proteine. Diese Fraktion und auch die unlöslichen Zellbestandteile in den Pellets, wurden dann im SDS-Gel aufgetrennt und geblottet oder Coomassie, bzw. Silber gefärbt. Die lösliche Fraktion stand nun zu weiterführenden Interaktionsstudien zur Verfügung und konnte direkt verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

3.2.6 Gelfiltration über NAP-Säulen (nach Herstellerangaben)

Die Gelmatrix der NAP-Säulen, Sephadex[®]G-25 (Pharmacia Biotech), besteht aus porösen Polymerkügelchen. Je größer das zu trennende Molekül, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit der Diffusion in die Gelkügelchen. Größere Moleküle wandern daher schneller durch die Säule als kleine. Proteinlösungen wurden nach Herstellerangaben (Amersham Bioscience) mit Hilfe der NAP-Säulen entsalzt. Das Wasser, in der sich die Gelmatrix befindet, wurde abgelassen und die Gelmatrix mit dem gewünschten Puffer äquilibriert. Nach Auftragen der Probe erfolgte die direkte Elution (bei der NAP-5-Säule

3. Methoden

wurden 0,5 ml Probe in 1 ml 0,5 x PBS eluiert; bei der NAP-10-Säule: 1 ml Probe in 1,5 ml 0,5 x PBS; bei der PD-10 Säule wurden 2,5 ml Probe in 3,5 ml 0,5 x PBS eluiert).

3.2.7 Transformation von *E. coli*-Zellen

(modifiziert nach Hanahan, 1983)

SOC-Medium (pH 7,0): 2,5 mM KCl
 10 mM MgCl₂
 20 mM Glukose
 in LB-Flüssigmedium

Zu 100 µl transformationskompetenten Zellen (nach Sambrook *et al.*, 1989) wurde Plasmid DNA (4×10^{-4} µg/µl) gegeben. Es folgten 30 min Inkubation auf Eis, 90 s Hitzeschock bei 42 °C und 2 min Abkühlen auf Eis. Nun wurden die Zellen in 4-7facher Menge SOC-Medium (37°C) 1 h bei 37°C geschüttelt. Danach wurden 1/10 und 9/10 der Transformationsansätze auf LB-Amp-Platten (100 µg/ml Amp) ausplattiert oder direkt größere Mengen Kultur angesetzt (500 ml – 2 L LB-Amp-Medium) und über Nacht bebrütet.

Die zur Transformation verwendeten Plasmide wurden wie in der Diplomarbeit von Frau Kolter 2006 beschrieben hergestellt.

3.2.8 Isolation und Nachweis der Proteine aus den Bakterienkulturen

3.2.8.1 Denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

(Laemmli 1970)

SDS GEL nach Lämmli

5 x SDS-Probenpuffer: 0,4 M Tris/HCl, pH 6.8
 25% (v/v) Glycerin
 10% (w/v) SDS
 5% (v/v) β-Mercaptoethanol
 0,1% (w/v) Bromphenolblau

Elektrophorese-Laufpuffer (pH 8,8): 50 mM Tris
 385 mM Glycin
 0,1% (w/v) SDS

3. Methoden

Rotiphorese® Gel 30: 30 % Acrylamid-Stammlösung
0,8 % Bisacrylamid

Tab. 5: Zusammensetzung von 12% und 15% SDS-Polyacrylamid-Gelen.

Die Mengenangaben gelten für ein großes Gel (0,8 mm), bzw. zwei kleine Gele. Lösungen	Sammelgel (3%)	Trenngel (12%)	Trenngel (15%)
Rotiphorese® Gel 30	0,5 ml	8 ml	10 ml
1,5 M Tris/HCl, pH 8.8	---	5 ml	5 ml
0,5 M Tris/HCl, pH 6.8	1,25 ml	---	---
A. dest.	3,25 ml	6 ml	5 ml
10% (w/v) SDS	50 µl	200 µl	200 µl
10% (w/v) APS	75 µl	200 µl	200 µl
TEMED	7,5 µl	25 µl	25 µl

Eine proteinhaltende Probe (100ng-100µg) wurde mit ¼ 5 x SDS Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Proben wurden auf SDS-Polyacrylamid-Gelen verschiedener Prozentigkeit aufgetragen.

Proteine wurden auf großen Gelen (18 cm x 12 cm x 0,8 mm) im Model V16-2 der Firma BRL in Elektrophoresepuffern über Nacht bei ca. 40 V oder über Tag bei ca. 250 V elektrophoriert, kleine Gele (8 cm x 8 cm x 0,8 mm), in Apparaturen der Firma Owi Separation Systems Inc., bei einer Stromstärke von 40 mA für ca. 1,5 h.

Die meisten Proteine, vollständig denaturiert durch das im Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol, bildeten durch Anlagerung des SDS negativ geladene SDS-Proteinkomplexe mit konstantem Ladungs- zu Masseverhältnis. Die Proteine konnten nun unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung im Gel durch einen Stromfluss nach Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Proben nach Quervernetzung (Kapitel 3.2.9.5) wurden teilweise ohne β-Mercaptoethanol im Laufpuffer im SDS-Gel aufgetrennt.

3. Methoden

3.2.8.2 Konzentrierungsgel

Um Banden von Proben mit niedriger Proteinkonzentration zu intensivieren, wurden SDS-Gele mit langen Taschen aufgebaut. Statt der normalen 1 cm betrug die Länge der Taschen hier ca. 4 cm, dadurch konnte vier Mal so viel Probe, also 120 µl statt 30 µl, in einer Tasche aufgetragen werden. Das Sammelgel lief über eine Strecke von ca. 2,5 cm und das Trenngel über eine Strecke von 10 cm. So konnte in den Banden eine 4 fache Aufkonzentrierung, im Vergleich zu der Proben im Standard-SDS-Gel, erfolgen.

3.2.8.3 2D-Gel

Die 2D- Gele wurden im Anschluss an die Quervernetzung mit Sulfo-SBED (Kapitel 3.2.9.5) gefahren. In der ersten Dimension wurden die Proben in einem SDS-Gel ohne β -Mercaptoethanol über Nacht aufgetrennt. Dann wurde die gesamte Spur der Probe ausgeschnitten und für minimal 2 Stunden in 1fach SDS-Probenpuffer mit β -Mercaptoethanol (5fach SDS-Probenpuffer, siehe Kapitel 3.2.8.1, 1:4 mit PBS-Puffer verdünnt) umgepuffert. Diese Spur wurde auf den oberen Rand eines SDS-Geles ohne Taschen gelegt, langsam in das Sammelgel laufen gelassen und nun über Tag aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel geblottet oder Coomassie, bzw. Silber gefärbt. In einer Diagonalen über das Gel liefen jetzt die Proteine, die sich nicht in Komplexen befunden hatten. Das β -Mercaptoethanol spaltet die Disulfidbrücke des Quervernetzers Sulfo-SBED. Alle Proteine, die sich durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol aus ihrem Komplex getrennt hatten, liefen unterhalb der Diagonalen.

3.2.8.4 Coomassie Brilliant Blau Färbung

(Merril, 1990)

Färbelösung: 7,5% (v/v) Eisessig
50% (v/v) Ethanol
0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250

Entfärbelösung: 7,5% (v/v) Eisessig
25% (v/v) Ethanol

Bei einer Proteinmenge von mehr als 200-400 ng Protein/Bande wurde eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Die SDS-Gele wurden für mindestens 1 h bei Raumtemperatur in der Färbelösung geschwenkt und anschließend in Entfärbelösung, die ca. alle 30 min gewechselt wurde, entfärbt, bis die proteinfreien Bereiche wieder farblos waren.

3. Methoden

3.2.8.5 Kolloidale Coomassie Brilliant Blau Färbung

(modifiziert nach Kang, 2002)

Fixierlösung:	30% (v/v) Ethanol 2% (v/v) Phosphorsäure
Färbelösung:	0,02% (w/v) Coomassie Brilliant Blau G250 2% (v/v) Phosphorsäure 5% (w/v) Aluminiumsulfat ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x(\text{H}_2\text{O})_x$, $x=14-18$) 10% (v/v) Ethanol
Entfärbelösung:	10% (v/v) Ethanol 2% (v/v) Phosphorsäure

Diese spezielle Coomassie Färbung wurde zur Färbung der SDS-Gele vor Proteinidentifizierung angewandt. Sie war laut Kang in der Lage Proteinbanden ab 1ng Proteingehalt zu visualisieren.

SDS-Gele wurden nach dem Lauf der Gelkassette entnommen und 3 x 10 min mit A. dest. gewaschen und danach 30 min in der Fixierlösung geschwenkt. Nun folgte die Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht in der Färbelösung. Die Gele entwickelten gewöhnlich wenig Hintergrund, so dass sie nur in wenigen Fällen zur Kontrasterhöhung mit der Entfärbelösung gewaschen wurden.

3.2.8.6 Silberfärbung von SDS Gelen

(Abgewandelt Blum *et al.*, 1987)

Die Silberfärbung wurde zur Visualisierung geringer Proteinmengen eingesetzt. Die Nachweisgrenze ist mit 5 – 30 ng/Proteinbande wesentlich geringer als die der normalen Coomassie Färbung (Kapitel 3.2.8.4). Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass Silberionen Komplexe mit den Glutamin-, Asparagin- und Cystein-Resten der Proteine bilden. Im alkalischen Milieu werden Silberionen in Proteinkomplexen schneller reduziert als solche, die nicht komplexiert vorliegen.

3. Methoden

Tab. 4: Vorschrift für die Silberfärbung von SDS-Gelen. Schritt

Schritt	Vorgang	Dauer	Lösungen
1	Fixierung	≥ 3 h - über Nacht	40% (v/v) EtOH 7% (v/v) Eisessig
2	Waschen	2 x 5 min	10% (v/v) EtOH
3	Waschen	3 x 5 min	A. dest.
4	Silberanlagerung	30 min	0,1% (w/v) AgNO ₃
5	Waschen	10 s	A. dest.
6	Entwicklung	5 – 30 min	3% (w/v) NaCO ₃ 0,02% (v/v) Formaldehyd
7	Reaktionsstopp	5 – 10 min	1% (v/v) Essigsäure
8	Abschwächung	5 min	0,2% (w/v) K ₃ [Fe(CN) ₆] 0,2% (w/v) NaS ₂ O ₃

Zur Intensivierung der Signale wurden die Schritte 4-7 wiederholt.

3.2.8.7 Western Blot-Analyse

(Towbin *et al.*, 1979)

Kathodenpuffer:

25 mM Tris/HCl
40 mM 6-Aminohexansäure
20% (v/v) Methanol

Anodepuffer I:

300 mM Tris/HCl
20% (v/v) Methanol

3. Methoden

Anodepuffer II: 30 mM Tris/HCl
20% (v/v) Methanol

Der elektrophoretische Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylgelen auf Nitrozellulosemembranen erfolgte in einer Semitrocken-Blot-Apparatur (Phase, Mölln). Es wurde ein Gel-Membran-Sandwich aufgebaut, indem drei Whatmanpapiere (Whatman 3 MM), getränkt in Kathodenpuffer, das SDS-Gel, die in den Anodenpuffer I getränkte Nitrozellulosemembran gefolgt von drei Whatmanpapieren, getränkt in Anodenpuffer I, und 3 Whatmanpapieren, getränkt in Anodenpuffer II, luftblasenfrei übereinander auf die Kathodengraphitplatte gelegt und mit der Anodengraphitplatte bedeckt wurden.

Der Blotvorgang erfolgte für 1 h bei 0,8 mA/cm². Hierbei wandern die SDS-Proteinkomplexe vom Gel Richtung Anode zur Membran, auf welcher die Proteine teilweise wieder renaturieren, so dass anschließend hauptsächlich segmentielle Epitope der Proteine wieder vorhanden sind.

3.2.8.8 Dot-Blot-Verfahren

Das Antigen wurde mit Hilfe einer Dot-Blot-Apparatur durch einen Aufsatz mit 8 x 12 Vertiefungen direkt auf Nitrozellulose-Membran aufgetragen. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran sofort mit Amidoschwarz 10B (Kapitel 3.2.8.9) oder immun gefärbt (Kapitel 3.3.1).

3.2.8.9 Amidoschwarz-Färbung von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen

Färbelösung: 10% (v/v) Eisessig
50% (v/v) Ethanol
0,1% (w/v) Amidoschwarz 10B

Entfärbelösung: 10% (v/v) Eisessig
50% (v/v) Ethanol

Nitrozellulose-Membranen wurden sofort nach dem Auftragen der Proteine mittels Dot-Blot-Verfahren (Kapitel 3.2.8.8) mit Amidoschwarz für 5 – 10 min gefärbt und ca. 15 min mit Entfärbelösung, unter ständigem Wechseln der Lösung, entfärbt. So konnten wässrige

3. Methoden

Proteinlösungen innerhalb weniger Minuten in ihrem Proteingehalt verglichen werden, z.B., zur Überprüfung der Kopplung von Proteinen an Sepharose[®] (Kapitel 3.2.9.2).

3.2.8.10 Detektion von radioaktiv markierten Proteinen im SDS-Gel

Die Radioaktivität der [³⁵S]methionin-markierten Proteine (Kapitel 3.2.12) wurde nach Auftrennung im 15% SDS-Gel mittels Phosphoimager (Fujifilm FLA 3000) auf einem Film detektiert.

3.2.9 Affinitätschromatographische Methoden

3.2.9.1 Native Aufreinigung

Qiagen

Puffer A:	20 mM Tris/HCl pH 8,5 500 mM KCl 20 mM Imidazol 10 mM β -Mercaptoethanol 10 % (v/v) Glycerin
Puffer B:	20 mM Tris/HCl pH 8,5 1 M KCl 10 mM β -Mercaptoethanol 10 % (v/v) Glycerin
Puffer C :	20 mM Tris/HCl pH 8,5 100 mM KCl 100 mM Imidazol 10 mM β -Mercaptoethanol 10 % (v/v) Glycerin

Die Aufreinigung der N-terminal His-markierten HinT-Proteine erfolgte unter nativen Bedingungen über eine Ni²⁺-NTA Säule. Zwischen Ni²⁺ und NTA herrschte eine stabile Interaktion. Die Ni²⁺-Ionen konnten über Histidinreste Proteine binden. Diese Bindung konnte durch Protonierung des Histidins oder durch metallbindende Liganden, die in Konkurrenz mit den Histidinresten traten, gelöst werden.

3. Methoden

Für die Aufreinigung im großen Maßstab wurden 1 – 3L protein-exprimierenden *E. coli* Kultur über Nacht in Flüssig-LB-Amp-Nährmedium angezogen. Die Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5 α F', welcher konstitutiv das plasmidkodierte Protein (HinT^r) exprimiert, konnten sofort geerntet werden. Befand sich das Plasmid, wie es für *U. parvum* HinT^r der Fall war, im *E. coli* DH5 α IQ, mussten die Bakterien durch die Zugabe von 1mM IPTG zur Expression des HinT^r angeregt werden. Um eine optimale Proteinexpression zu erhalten, sollten sich die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, wenn diese mit IPTG induziert werden. Nach Induktion wurden die Kulturen für 2 weitere Stunden bebrütet und konnten dann ebenfalls durch 20 minütige Zentrifugation mit 4500 xg bei 4°C geerntet werden.

Das Bakterienpellet wurde danach in 20 – 60 ml Puffer A resuspendiert. Nach Sonifizierung der Bakterienlösung (3 x 5 – 10 min auf Eis bei maximaler Belastung (Nadelsonde 40T) gefolgt von 1 min Pause) wurden die löslichen Proteine durch Zentrifugation (15-30 min bei 13000 rpm, 4°C) von unlöslichen Membranproteinen getrennt. Die in 100 – 500 μ l Puffer A equilibrierte Ni²⁺-NTA-Agarose (Bindungskapazität: 5 – 10 mg His-markierte Proteine pro ml) wurden mit dem klaren, die löslichen Proteine enthaltenden Überstand für 1 h auf einem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension Ni²⁺-NTA-Agarose wurde über eine Säule gegeben, um den Durchlauf von der Ni²⁺-NTA zu trennen. Die Agarose wurde 3 x mit Waschpuffer (je 1 ml Puffer A, Puffer B, Puffer A) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen.

Die Proteine wurden nach 2 - 5 min Inkubation mit Puffer C, entsprechend dem Säulenvolumen, eluiert. Es folgte die Analyse des Ausgangsmaterials, Durchlaufes und Elutionen nach Auftrennung auf einem SDS-Gel (Kapitel 3.2.8.1).

Um das aufgereinigte Protein an Sepharose-Säulen zu koppeln (Kapitel 3.2.9.2), musste es über eine NAP-Säule in PBS umgepuffert werden (Kapitel 3.2.6).

3.2.9.2 Herstellung von Affinitätssäulen

(nach Handbuch des Herstellers)

CNBr-aktivierte Sepharose[®]4 Fast Flow (Amersham Bioscience) ist eine kreuzvernetzte Agarose-Matrix. Die Kopplung der Proteine an die Matrix erfolgte über primäre Aminogruppen. Für die Kopplung wurden 0,25 g CNBr-aktivierte Sepharose[®]4 Fast Flow abgewogen, mit 1 ml 1 mM HCl gelöst und in eine leere PD 10-Säule überführt. Anschließend wurde die Sepharose durch 10 Waschschrte mit je 1 ml 1 mM HCl aktiviert. Hierbei quoll das Säulenvolumen auf ca. 750 μ l auf. Ungefähr 1,5 ml Proteinlösung (150-

3. Methoden

1200 µg rekombinantes, entsalztes (Kapitel 3.2.8.1) Protein/PBS oder aufgereinigter AK) wurde in die Säule überführt. Nachdem der pH-Wert auf 7,5 eingestellt war, wurde die Suspension in der Säule auf einem Drehrad bei Raumtemperatur mindestens 4 h oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Kopplung erfolgte die Analyse ungebundener Proteine des Durchlauf mittels Dot-Blot-Verfahren (Kapitel 3.2.8.8), um die Kopplungseffizienz zu überprüfen. Danach folgten zwei Waschstre mit je 1 ml PBS. Die noch vorhandenen freien Bindungsstellen an der Sepharose wurden in 1,5 stündiger Inkubation mit 25 mM Tris/HCl, pH 8,5 auf dem Drehrad bei Raumtemperatur blockiert. Nach der Blockierung wurde die Säulenmatrix sechs mal alternierend mit je 3 ml 25 mM Natriumacetat, pH 3,55 und 25 mM Tris/HCl, pH 8,5 gewaschen. Abschließend wurde die Säule in PBS äquilibriert und bei 4°C bis zur weiteren Verwendung (Kapitel 3.2.9.3 und 3.2.9.4) gelagert.

3.2.9.3 Aufreinigung von polyklonalen α -HinT-Kaninchenseren über Affinitätsäulen

Das polyklonale Kaninchenserum wurde 1:1 mit PBS gemischt und 1 – 2 h mit der jeweiligen HinT^f-Sepharose auf dem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden im Durchlauf aufgefangen. Nach einem Waschstre mit 20 ml PBS wurden folgende Elutionen abgenommen (wobei zwischen jedem Pufferwechsel ein Waschstre mit 1 ml 1 x PBS durchgeführt wurde):

4 x 1 ml 25 mM NaH₂PO₄ pH ≤ 4

(4 x 1 ml 25 mM Na₂HPO₄ pH ≥ 10)

1x 1 ml 3,5 M NaSCN/PBS pH 7,3

Die Elutionen wurden auf pH 7,5 eingestellt und im Festphasen-Antigen-ELISA (Kapitel 3.3.2) und im Western Blot (Kapitel 3.2.8.7) parallel zum Ausgangsmaterial und Durchlauf auf Reaktivität mit dem entsprechenden HinT^f-Protein getestet.

3.2.9.4 Affinitätschromatographische Aufreinigung HinT-bindender Proteine (Pull-down)

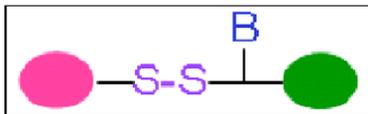
In den Detergenzfractionen (Kapitel 3.2.5) von *M. hominis*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae* und *U. parvum* (1 l Ausgangskultur von *M. hominis* enthielt 15-30 mg Protein, bzw. 6 l von *M. genitalium* und *M. pneumoniae* 5-10 mg und 10 l *U. parvum* 2mg) wurde die Detergenzkonzentration durch die Zugabe von PBS auf 0,4% gesenkt und der Proteingehalt auf 1,5-4 mg/ml eingestellt. Dann wurden die Fractionen mit der jeweiligen HinT^f-Sepharose (Kapitel 3.2.8.2), im Verhältnis 1 : 20 – 1 : 100 (HinT^f : Proteinmenge im Lysat), für mindestens 1 h auf einem Drehrad bei Raumtemperatur inkubiert. Der Durchlauf wurde für

3. Methoden

eine spätere Analyse auf einem SDS-Gel aufbewahrt. Nachdem die HinT^r-Sephrose-Matrix mit 10 fachen Säulenvolumen PBS (mit Detergenz in gleicher Konzentration) gewaschen wurde, wurde 5 x mit 3,5 M Na-isothiocyanat in PBS (mit Detergenz in gleicher Konzentration) eluiert. Das Ausgangsmaterial, der Durchlauf und die Elutionen wurden auf SDS-Gelen mit verschiedenen Konzentrationen (Kapitel 2.2.8.1) mit anschließender Silberfärbung (Kapitel 3.2.8.6) analysiert.

3.2.10 Quervernetzung mit Sulfo-SBED (Sulfosuccinimidyl[2-6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido]-ethyl-1,3'-dithiopropionate)

Als weitere Möglichkeit Interaktionspartner von HinT zu finden, diente die Quervernetzung von rekombinanten HinT mit möglichen Interaktionspartnern im Mykoplasmen- oder Ureaplasmen-Lysat. Das hierzu verwendete Sulfo-SBED (siehe Schema 1) verfügte zusätzlich zu der Vernetzungsfunktion auch über die Funktion einer Label-Übertragung, verwendet wurde das Sulfo-SBED Biotin Label Transfer Reagent, No-Weigh Format Kit von Pierce (Bonn, Deutschland). Durch Übertragen einer Biotin-Gruppe auf das interagierende Protein konnte dieses auch nach Abspaltung des Quervernetzers vom rekombinanten HinT detektiert werden. Die Abspaltung erfolgte durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol, welches die Disulfidbrücke des Sulfo-SBED löste.



Schema 1: In diesem Schema ist dargestellt, wie der Quervernetzer Sulfo-SBED das rekombinante HinT (rosa) mit putativen Interaktionspartnern (grün) kovalent verbindet. Durch Zugabe von β -Mercaptoethanol konnte die Disulfidbrücke (S-S) gespalten und der Biotinmarker (B) auf den Interaktionspartner übertragen werden.

Die Quervernetzer-Reaktion teilte sich in zwei Schritte auf: Die EHS-Ester-Reaktion und die Quervernetzungsreaktion. Bei der EHS-Ester-Reaktion reagierte die EHS-Ester-Gruppe des Sulfo-SBEDs mit den Aminogruppen des aufgereinigten rekombinanten HinT in wässriger Lösung. Nachdem das Protein mit den möglichen Interaktionspartnern reagieren konnte, wurde durch Photoaktivierung mit UV-Licht mit einer Wellenlänge von 365 nm für 15 min die eigentliche Quervernetzung ausgelöst. Hierbei entstand eine kovalente Bindung zwischen der photoaktiven Gruppe des Sulfo-SBEDs und C-H oder N-H Gruppen des Interaktionspartners.

Alle Schritte der EHS-Ester Reaktion fanden im Dunklen statt, um eine vorzeitige Reaktion der photoaktiven Gruppen zu verhindern. Das zunächst aufgereinigte HinT^r wurde in PBS

3. Methoden

umgepuffert (Kapitel 3.2.6) und anschließend gemäß den Herstellerangaben über die EHS-Reaktion an Sulfo-SBED gebunden.

Die Quervernetzung von HinT^r mit potentiellen Interaktionspartnern in Mykoplasmen- oder Ureaplasmen-Lysat mit 0,4% DDM oder ohne Detergenz folgte in den nächsten Schritten ebenfalls nach Herstellerangaben.

Die Proben wurden nun mit und ohne β -Mercaptoethanol in SDS-Gelen aufgetrennt und anschließend mit Streptavidin-HRP geblottet, um Interaktionspartner sichtbar zu machen. Alternativ wurde ein 2D-Gel, in dem nur in der zweiten Dimension eine Zugabe von β -Mercaptoethanol erfolgte, gefahren (Kapitel 3.2.8.3).

3.2.11 Vorbereitung von Proteinproben für die Immunisierung

Zur Generierung von polyklonalen Antikörpern gegen das *U. parvum* HinT^r wurden insgesamt 1000 μ g Protein benötigt. Um höhere Proteinausbeuten zu erzielen, wurde das *U. parvum* HinT^r tragende Plasmid in den *E. coli*-Stamm DH5 α IQ transformiert. Dieser Stamm kann durch die Zugabe von 1mM IPTG zur Expression von HinT angeregt werden. Es folgte eine Aufreinigung des *U. parvum* HinT^r unter nativen Bedingungen (Kapitel 3.2.9.1).

Für die Gewinnung der 1000 μ g Protein wurden 1,5 L induzierte Über-Nacht-Kultur über 400 μ l Ni²⁺-NTA-Säule aufgereinigt, in 3500 μ l Puffer eluiert und anschließend in 5000 μ l 0,5PBS umgepuffert. Der letzte Schritt erfolgte über eine Nap-5-Säule. Eine Kontrolle des Umpufferns erfolgte über einen Dot-Blot mit anschließender Amidoschwarz-Färbung.. Diese 5000 μ l wurden dann in der Lyophilie auf 2500 μ l PBS eingeeengt und in Aliquots zu je 100 μ l zum Immunisieren gegeben.

3.2.12 Identifizierung von Proteinen mittels ESI-MS

Die Proteinidentifizierung wurde am Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf nach dem dortigen Protokoll (<http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/BMFZ/mambo/images/igv.doc>) durchgeführt. Die zu identifizierenden Proteine wurden nach Auftrennung im SDS-Gel kolloidal Coomassieblau gefärbt (siehe Kapitel 3.2.8.5). Die Protein enthaltenden Gelstücke (Bande/Spot) wurden mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in PBS gekühlt zur Analyse gegeben.

3. Methoden

3.2.13 Affinitätschromatographische Überprüfung der Interaktionen zwischen HinT^f und in vitro translatierter Proteine

Puffer D: 20 mM Tris/HCl pH 8,5
500 mM KCl
10 mM Imidazol
10 % (v/v) Glycerin

Puffer E: 20 mM Tris/HCl pH 8,5
100 mM KCl
100 mM Imidazol
10 % (v/v) Glycerin

Die in vitro Translation von (durch ESI-MS identifizierten) *M. hominis* HinT-interagierenden Proteinen erfolgte im TNT[®] gekoppelten Retikulozyten Lysat System vom Promega. Der Versuch wurde entsprechend den Herstellerangaben für die Standardreaktion mit [³⁵S]methionin (Technical Bullitin Part TB126 von Promega, Kapitel IV) bis Schritt 3 durchgeführt. Das verwendete [³⁵S]methionin hatte eine Radioaktivität von 11mCi/ml. T7 RNA Polymerase wurde eingesetzt.

Die Interaktion der radioaktiv markierten Proteine mit rekombinanten HinT wurde mit einer affinitätschromatographischen Methode überprüft. Die 50µl Reaktionsansätze der Translation wurden in je 2 Proben aufgeteilt. Probe 1 wurde mit 0,5µg HinT^f/50µl in Puffer D und Probe 2 als Negativkontrolle nur mit Puffer D versetzt. Die Proben inkubierten 1,5h auf dem Drehrad bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 20µl 50% Ni²⁺-NTA-Sepharose Slurry in Puffer D inkubierten beide Proben weitere 1,5h auf dem Drehrad bei Raumtemperatur. Ni²⁺-NTA bindete an die Histidine im Tag des rekombinanten HinTs. Nach Zentrifugation (1min. bei 7500rpm) konnte der Durchlauf von der Ni²⁺-NTA-Sepharose getrennt werden. Sechs Waschschrte mit je 500µl Puffer A folgten. Die Elutionen erfolgten nach 10min Inkubation bei Raumtemperatur mit 20µl Puffer C.

Die Proteine aus den Waschschrten wurden TCA gefällt (2.2.3). Der Durchlauf, der erste und der sechste Waschschrte, sowie die Elution wurden in Probenpuffer aufgenommen, 5min auf 95°C erhitzt und auf einem 15% SDS Gel bei 35V über Nacht aufgetrennt (Kapitel 3.2.9.1). Die Radioaktivität der [³⁵S]methionin-markierten Proteine im Gel wurde auf einem Film detektiert (Kapitel 3.2.8.10).

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Immunfärbung

Nach dem Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen mittels Western Blot oder Dot-Blots folgte eine 15 – 30 min Blockierung der freien Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran bei Raumtemperatur mit 5 % Milchpulver. Die Membran wurde dann für mindestens 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit einem Erst-Antikörper (Tetra-His-AK [0.2µg/ml], Kaninchen-Anti-Seren in verschiedenen Verdünnungen) inkubiert, drei mal 10 min in 1 x PBS gewaschen, bevor sie für 1 h mit Peroxidase konjugierten α -Maus-AK bzw. α -Kaninchen-AK inkubiert wurde. Anschließend folgten drei weitere Waschschrte von je 5 min in 1 x PBS.

Den Herstellernangaben folgend wurde nun eine ECL- („Enhanced Chemiluminescence Western Blotting Detection System“, Amersham Bioscience) Entwicklung durchgeführt.

3.3.2 Festphasen-Antigen-ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay)

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

Die Analyse der Antikörper bzw. polyklonalen Seren erfolgte nach dem von Henrich und Mitarbeitern 1996 beschriebenen ELISA-Protokoll. Als Erst-Antikörper wurden hier generierte α -HinT-Kaninchenseren, aufgereinigte polyklonale α -HinT-AKs oder α -Tetra-His-AKs in serieller Verdünnung eingesetzt, die mit spezifischen Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper detektiert wurden.

3.3.3 Immunopräzipitation

Puffer A:

- 5mM MgCl₂
- 1mM DTT
- 20% Glyzerin
- 20mM Tris/HCl pH 8,0

Puffer C:

- 150mM NaCl
- 0.01% DDM
- 0,4mM Pefabloc
- 50mM Tris/HCl pH 7,5

3. Methoden

Proteine aus frischem *M. hominis*-Lysat (aus 2L Kultur) oder *U. parvum*-Lysat (aus 3,6L Kultur) wurden in 3ml Puffer A aufgenommen und kamen bei Raumtemperatur für ca. 1h auf das Drehrad. Die Trennung der unlöslichen Proteine von der löslichen Fraktion erfolgte mittels Zentrifugation (45min, 13.000rpm, 4°C). Zum Überstand wurde das 1,5fache (4,5ml) Volumen Puffer C mit 20% / ohne Glycerin gegeben.

Nun wurde die Lösung in 5 Proben (siehe Tabelle 5) aufgeteilt. Die Proben wurden 1h bei Raumtemperatur mit rekombinanten HinT (0,03µg/µl) inkubiert und anschließend über Nacht bei 4°C mit Tetra-His Ak (0,005 µg/µl) oder mit polyklonalem anti-HinT Serum (1/20 des Probenvolumens) inkubiert.

Die Inkubation aller fünf Proben erfolgte für 3h bei 4°C mit je 30µl Protein G-Sepharose-Slurry (0,05 µg/µl, 1:1 in PBS). Die Sepharosen wurden nun mittels Zentrifugation von den Überständen getrennt und folgendermaßen gewaschen:

3 x mit je 80 x Säulenvolumen Puffer C

3 x mit je 80 x Säulenvolumen Puffer C plus 0,5M NaCl

2 x mit je 80 x Säulenvolumen Puffer C.

Die Pellets (Sepharosen) wurden anschließend in Probenpuffer aufgekocht, im SDS-Gel aufgetrennt und analysiert.

Tabelle 5: Aufbau der verschiedenen Versuchsansätze

Proben	Tag 1	über Nacht	Tag 2
P1		+ Serum	+ Protein G
P2			+ Protein G
P3	+ HinTr		+ Protein G
P4		+ α-Tetra-His-AK	+ Protein G
P5	+ HinTr	+ α-Tetra-His-AK	+ Protein G

3.4 Computerprogramme und Datenbanken

Klonierungsstrategien, Homologievergleiche und Sequenzierungsergebnisse wurden unter der Verwendung der Programme Lasergene 5.0 (DNASar Inc., Madison USA) und Vector NTI Advance 10.0 (Invitrogen) bearbeitet. Für Datenbankrecherchen wurden im Internet folgende Seiten genutzt:

- „ExPASy Molecular Biology Server“ <http://www.expasy.org/>

- „MolliGen V 2,0 – A database dedicated to the comparative genomics of Mollicutes“ <http://cbi.labri.fr/outils/molligen/>

- „National Center for Biotechnology Information“ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Tabelle 6: Die Proteindaten der analysierten HinT-Proteine sind bei NCBI unter folgenden Zugangs-Nummern (“Accession-Numbers”) zugänglich:

Spezies	Accession-Nr. HinT-Proteine
<i>Ureaplasma parvum</i>	AAF30681
<i>Mycoplasma genitalium</i>	NP_072794
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	NP_109916
<i>Mycoplasma hominis</i>	CAB92785
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	NP_444817
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CAA98693
<i>Mus musculus</i>	NP_032274
<i>Oryctolagus caniculus</i>	P80912
<i>Homo sapiens</i>	NP_005331

3.4.1 Einscannen von getrockneten Gelen

Coomassie- oder silbergefärbte SDS Gele wurden vakuumgetrocknet und mit der Geldokumentation der Firma Intas eingescannt. Die Proteinbanden wurden anschließend mit dem Aida Image Analyser v.3.24 analysiert. Das Programm maß die Bandenintensität aus und stellte diese graphisch dar, so dass die Intensitäten verschiedener Spuren direkt nebeneinander verglichen werden.

4. Ergebnisteil

4.1. Charakterisierung der HinT-Proteine aus *U. parvum*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae* und *M. hominis*

Basierend auf den Erkenntnissen der Mykoplasmen-Arbeitsgruppe am Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, dass in *Mycoplasma hominis* das zytoplasmatische HinT Protein mit einem Membranproteinkomplex interagiert, dessen 80 kDa-Domäne sezerniert werden kann, wurden in dieser Arbeit weitere putative Interaktionspartner der HinT Proteine der humanpathogenen *Mollicutes Mycoplasma hominis* (Mhom), *M. genitalium* (Mgen), *M. pneumoniae* (Mpneu) und *Ureaplasma parvum* (Up) charakterisiert und identifiziert. Hilfreich war hierbei, dass die Genome dieser *Mollicutes* vollständig sequenziert waren und sich die Organismen phylogenetisch nahe verwandt zeigten (Peyere *et al.*, 2009; Glass *et al.*, 2000; Fraser *et al.*, 1995; Himmelreich *et al.*, 1996).

4.2. Die *hit*-Loki der analysierten *Mollicutes*

Der *hit*-Lokus von *M. hominis* beinhaltet drei Gene, welche für die Proteine P60, P80 und HinT kodieren. Durch RT-PCR Analysen konnte gezeigt werden, dass diese drei Proteine polycistronisch organisiert sind, also ko-exprimiert werden (Kitzerow & Henrich, 2001). Polycistronisch organisierte Proteine werden häufig für mit einander in Beziehung stehende Prozesse und gleichzeitig im Organismus benötigt.

Wie in Abbildung 1 schematisch gezeigt, unterscheiden sich die *hit*-Loki der weiteren vier *Mollicutes* deutlich von dem *M. hominis* Hit-Lokus. Alle drei beinhalten das Gen eines hypothetisch integralen porenbildenden Proteins mit mehreren Transmembrandomänen stromaufwärts des Hit Gens (*hitL*).

4. Ergebnisteil

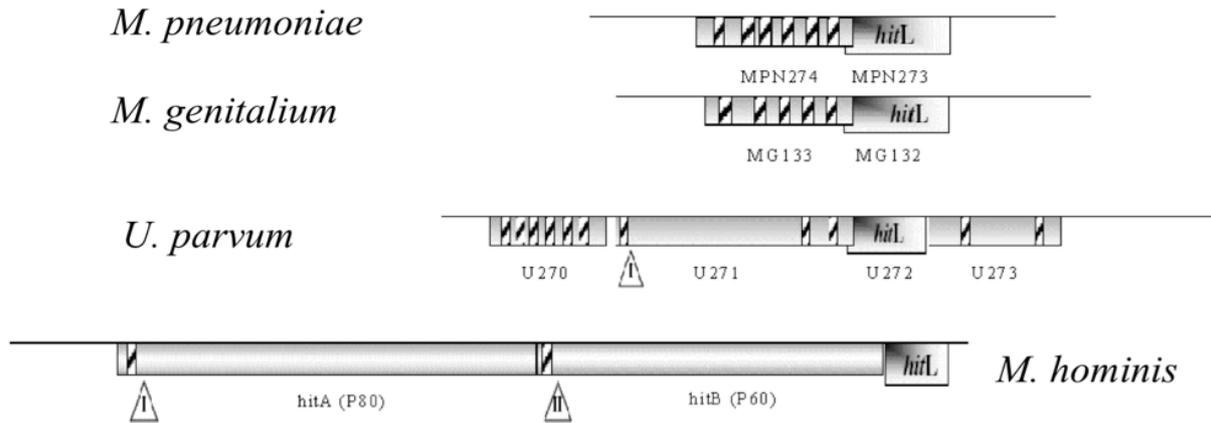


Abbildung 1: Vergleich der verschiedenen Hit-Loki. Dargestellt sind die vier Hit-Loki der humanpathogenen *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *U. parvum* und *M. hominis*. Die Dreiecke markieren SPase I, bzw. SPase II Schnittstellen. Der gestreifte Balken steht für eine Transmembranregion.

In den *hit*-Loki der phylogenetisch eng verwandten Organismen *M. genitalium* und *M. pneumoniae* überlappen die Gene (MG133 und MPN274) mit den jeweiligen Hit-Genen (MG132 und MPN274) und kodieren putativ integrale porenbildende Proteine mit fünf (MG133) bzw. sechs (MPN274) Transmembranregionen.

Der *hit*-Lokus von *U. parvum* beinhaltet vier Gene. Am weitesten stromaufwärts liegt auch hier das Gen für das hypothetisch integrale porenbildende Protein (U270) mit sechs Transmembrandomänen. Stromabwärts davon befindet sich ein Gen, das für ein hypothetisches Protein (U271) mit drei Transmembranregionen kodiert, welches wiederum mit dem *HinT*-Gen (U272) überlappt. U271 weist eine hypothetische N-terminale Signalpeptidase I-Erkennungsstelle (SPase I) auf, die ein Merkmal sekretierter Proteine ist, und eine geringe Sequenzhomologie zu dem Lipoprotein P60 von *M. hominis*. Abwärts von U272 liegt ein Gen (U273) mit zwei Transmembranregionen, dessen abzuleitende Proteinsequenz keine signifikanten Homologien zu bereits charakterisierten Proteinen besitzt.

4.3. Die rekombinanten *HinT*-Proteine von *Mhom*, *Up*, *Mpneu* und *Mgen* ließen sich nativ aufreinigen

Zur Identifizierung putativer Interaktionspartner von *HinT* wurden die spezies-spezifischen rekombinanten *HinT* (*HinT^r*)-Proteine in *E. coli* exprimiert und durch das fusionierte N-terminale Poly-Histidinende affinitätschromatographisch über eine Ni-NTA unter nativen Bedingungen aufgereinigt. Hierzu konnten die *HinT*-Expressionskonstrukte von Geraldine Kolter genutzt werden, die 2006 im Rahmen ihrer Diplomarbeit etabliert worden waren.

4. Ergebnisteil

Die Sequenzen der verschiedenen Hit-Gene wurden mittels PCR amplifiziert, in einen pQE31-Expressionsvektor kloniert und in den DH5 α *E. coli* Bakterien exprimiert. Die rekombinanten HinT-Proteine (HinT^r) waren hierbei mit einem N-terminalen (6 x Histidin)-Tag fusioniert, durch welchen sie über Ni²⁺-NTA-Säulen aufzureinigen waren. Die HinT^r-Proteine aller vier Mollicutes-Stämme ließen sich ohne vorheriges Denaturieren unter nativen Bedingungen nach Aufschluss der *E. coli*-Bakterien aufreinigen (Kapitel 3.2.9.1).

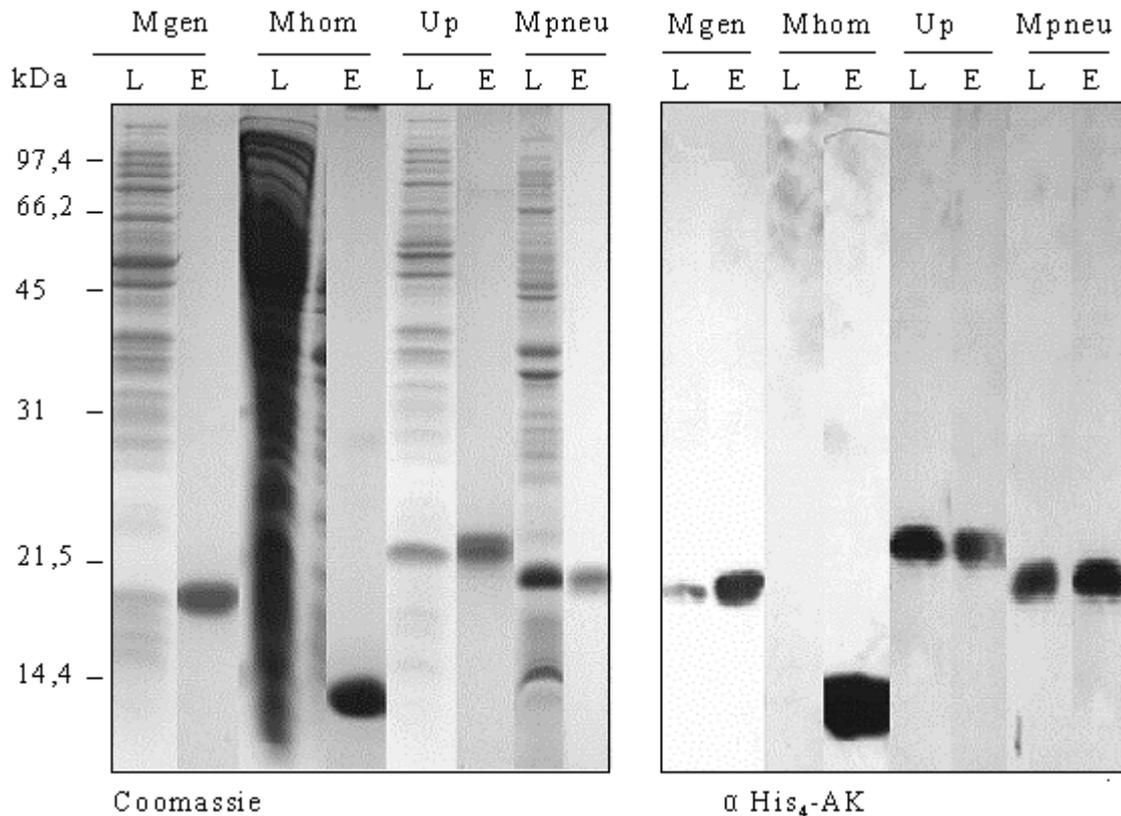


Abbildung 2: native Aufreinigung der α His₄-markierten HinT^r Proteine

Proteine aus 0,5 ml Über-Nacht-Kultur HinT^r-exprimierender *E. coli*-Klone (L) und 10 μ l Elution von 200 μ l nach Aufreinigung der His₆ markierten HinT^r-Proteine über eine Ni²⁺-Affinitätsäule (E) wurden in einem 15% SDS-Gel aufgetrennt. Die Proben wurden Coomassie blau gefärbt, als Längenstandard wurde der „Low Range Standard“ von Bio Rad verwendet, zusätzlich wurden die HinT^r im Western Blot mit α His₄-Ak immunologisch gefärbt nachgewiesen.

Abbildung 2 zeigt Proteine entsprechend einer Menge von 0,5ml Über-Nacht-Kultur der verschiedenen HinT-exprimierenden *E. coli*-Klone. Im SDS-Gel wurden Lysate, welche 0,5ml der jeweiligen *E. coli* Über-Nacht-Kulturen entsprachen, sowie die aufgereinigten eluierten Proteine aufgetrennt. Wie in der Coomassiefärbung gut zu sehen, zeigten die *E. coli*-Lysate von *M. pneumoniae* HinT^r und *U. parvum* HinT^r eine deutliche Überexpression der rekombinanten Proteine. Mgen HinT^r hat eine Größe von 17kDa, Mhom HinT^r 13,5kDa, Up HinT^r 18,7kDa und Mpneu HinT^r 18,7kDa. Das Protein von *M. hominis* HinT^r-Lysat ließ sich im Western Blot nicht anfärben, in der Elution aber stellte sich eine deutliche Bande dar. Im

4. Ergebnisteil

Coomassiegelel erkennt man, dass die Proteine im Lysat nicht sauber aufzutrennen waren, wahrscheinlich ist HinT deshalb hier im Blot nicht anfärbbar. Die rekombinanten HinT-Proteine von *M. genitalium*, *M. pneumoniae* und *U. parvum* ließen sich im Western Blot sowohl im Lysat, als auch in den Elutionen gut anfärben. Bei allen vier HinT-Varianten zeigte sich in der Coomassiefärbung, dass die HinT^r Proteine unter nativen Bedingungen sauber aufgereinigt waren.

Zur Generierung von polyklonalem Antiserum gegen das *U. parvum* HinT^r wurde insgesamt 1mg aufgereinigtes Protein benötigt. Um höhere Proteinausbeuten zu erzielen, wurde der *U. parvum* HinT^r enthaltende Expressionsvektor in den *E. coli* Stamm DH5 α IQ transformiert, bei dem die Expression von HinT^r durch Zugabe von IPTG induziert wurde. Es folgte eine Aufreinigung des *U. parvum* HinT^r unter nativen Bedingungen (Kapitel 3.2.9.1). Nach Elution von der Ni-NTA-Matrix wurde das Protein in PBS umgepuffert und in 0,1ml Aliquots, die je 120 μ g Protein enthielten, zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

4.4. *U. parvum* exprimiert HinT

Zur Gewinnung von polyklonalen α -Up-HinT-Seren wurden zwei Kaninchen mit nachweislich geringer Grundimmunität ausgewählt. Entsprechend dem Standard-Immunisierungsprogramm der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) wurden die Tiere mit dem aufgereinigten HinT^r immunisiert. Nach einem festen Schema wurden Serumproben zur Kontrolle der immunologischen Reaktion abgenommen. (siehe Abbildung 3)

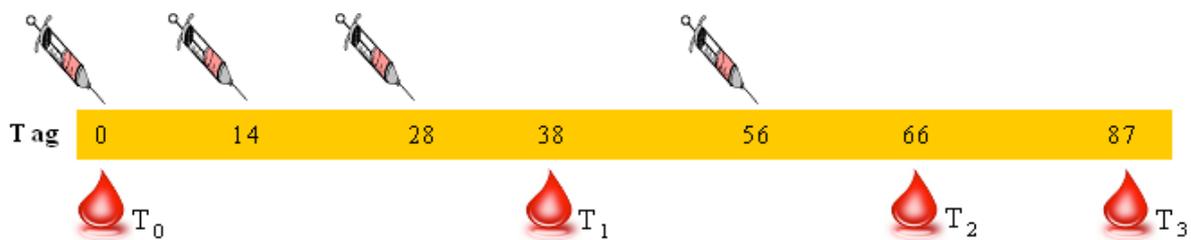


Abbildung 3: Generierung polyklonaler α -HinT-Antikörper: Der gelbe Balken zeigt den Zeitverlauf über 87 Tage. An Tag 0, 14, 28 und 56 wurden die Kaninchen mit dem Antigen immunisiert. Am Tag 0, 38, 66 und 87 wurden Blutproben zur Bestimmung der Antikörperkonzentration entnommen (T₀, T₁, T₂ und T₃).

Die Kaninchenserum wurden zu drei verschiedenen Zeitpunkten ($t_0 \rightarrow$ vor der Immunisierung, $t_1 \rightarrow$ nach der ersten und $t_2 \rightarrow$ nach der zweiten Immunisierung) im Western Blot auf ihre Reaktivität mit 0,5 μ g aufgereinigtem HinT^r aus *E. coli*-Lysat und mit Gesamtproteinen aus 50, bzw. 200ml *U. parvum*-Lysat analysiert. Als Positivkontrolle diente die Reaktivität des α -4-His-AK mit den entsprechenden Proben. Das rekombinante HinT hat eine berechnete Größe

4. Ergebnisteil

von ca. 19kDa, das native *U. parvum* HinT unterscheidet sich mit einer berechneten Größe von 17,5kDa wenig davon.

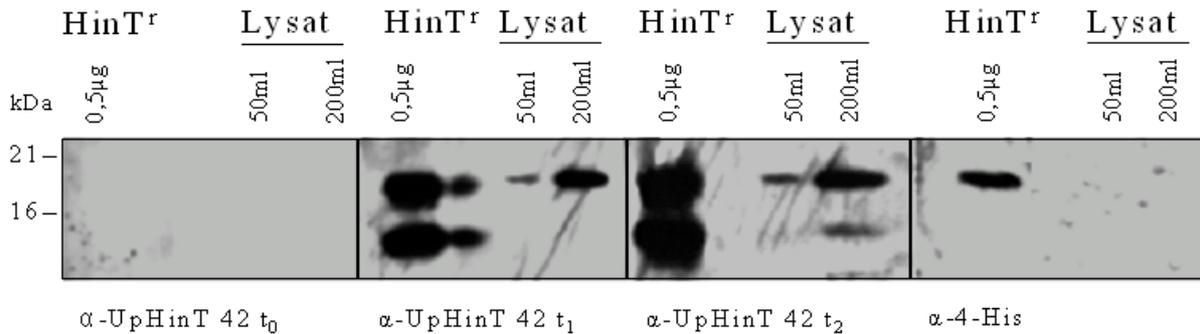


Abbildung 4: Austestung verschiedener α -Up-HinT-Seren von *U. parvum*

In einem 15% SDS Gel wurden 0,5µg Up HinT^r und Ureaplasmen-Lysat aus 50 ml bzw. 200 ml Ureaplasmen-Kultur elektrophoretisch getrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen wurde eine Immunfärbung mit dem Präimmunsereum (AS-t₀), sowie dem AS-t₁ und AS-t₂ durchgeführt. Als Längenstandard wurde der „Prestained Marker“ von Invitrogen verwendet.

Wie in Abbildung 4 zu sehen, zeigte das Serum des hier untersuchten Kaninchen keine Grundimmunität gegen HinT (siehe Antiserum AS-t₀), wohingegen AS-t₁ und AS-t₂ sowohl rekombinantes als auch natives UpHinT aus *U. parvum* mit zunehmender Stärke detektierten. Wie zu erwarten, detektierte der α -4-His-AK nur das rekombinante UpHinT^r, wohingegen im Ureaplasmen-Lysat keine immunologische Reaktion zu detektieren war. Hiermit war der Nachweis, dass *U. parvum* das HinT-Protein exprimiert, erstmalig erbracht. Das ebenfalls immungefärbte Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 14kDa, scheint ein Abbauprodukt des nativen bzw. des rekombinanten HinT zu sein. Die Analysen der Serumproben des zweiten immunisierten Kaninchen zeigten ein vergleichbares Ergebnis (nicht dargestellt).

4. Ergebnisteil

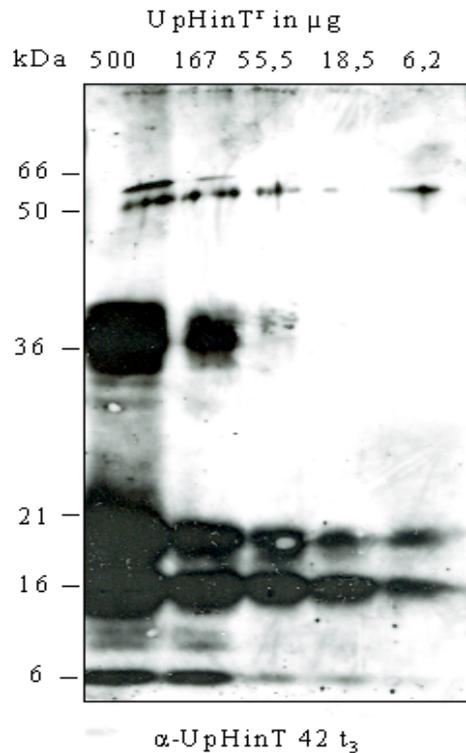


Abbildung 5: Western Blot Analyse zur Testung der Reaktivität des α -Up-HinT^T-Serums: Aufgereinigtes Up HinT^T wurde in einer Verdünnungsreihe auf ein 15% SDS Gel getrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Membran wurde anschließend mit dem t₃-Serum immunologisch gefärbt. Es wurde der „Prestained Marker“ von Invitrogen verwendet.

Um die Reaktivität des Antiserums im Western Blot noch weiter zu charakterisieren, wurde aufgereinigtes *U. parvum* HinT^T in einer Verdünnungsreihe aufgetrennt und immunologisch mit t₃-Serum gefärbt (siehe Abbildung 5). Das α -HinT-Serum konnte das HinT-Protein ab einer Menge von 6,2 μ g detektieren. Zusätzlich zeigten sich Proteinbanden bei 36kDa, die dem HinT-Dimer entsprechen könnten, so wie die Bande bei ca. 14kDa, einem Abbauprodukt von HinT. Mit diesem Versuch wurde gezeigt, dass das Antiserum in der Lage ist, bereits Mengen am *U. parvum* HinT im einstelligen Mikrogrammbereich nachzuweisen.

Des Weiteren standen polyklonale Seren gegen *M. hominis* HinT^T für die später folgenden Interaktionsstudien zur Verfügung, die in Mäusen generiert worden waren.

4.5. Höchste Solubilisierungseffizienz mykoplasmalear (Membran-) Proteine mittels Dodecylmaltosid

Um Studien zur Identifizierung möglicher Interaktionspartner von HinT durchzuführen, wurde Mykoplasmenlysat benötigt. Da Mit P80 in *M. hominis* bereits ein Membranprotein als Interaktionspartner bekannt war, sollten sowohl Membranproteine als auch zytoplasmatische

4. Ergebnisteil

Proteine im Lysat für Interaktionsstudien zur Verfügung stehen. Zur Herstellung der Mykoplasmenlysate wurden die Bakterien jeweils in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und unter Solubilisierung der Membran mittels verschiedener Detergenzien präpariert (siehe Tab. 1). Detergenzien bilden Mizellen aus, in denen sich fettlösliche Zellbestandteile, unter anderem Membranproteine, lösen und so für Bindungen auch in der wässrigen Phase zur Verfügung stehen. Bei der Auswahl geeigneter Detergenzien waren folgende Kriterien wichtig: Das Detergenz sollte die Proteininteraktion nicht stören, außerdem sollte es bei niedriger Konzentration eine möglichst hohe Solubilisierungs-Effizienz haben. Eine wichtige Kerneigenschaft eines Detergenz ist seine CMC („critical micelle concentration“). Sie ist die maximale Konzentration an Detergenz-Monomeren, die in Wasser gelöst vorliegen können. Jede darüber hinausgehende Erhöhung der Konzentration führt zur Ausbildung von Mizellen. Als Mizellen bezeichnet man die meist kugelförmigen Aggregate aus amphiphilen chemischen Verbindungen, also zum Beispiel Detergenzien. Wird die CMC unterschritten, lösen sich die Mizellen auf und das Detergenz geht in seine monomere Form über. Ein Unterschreiten der CMC ist nicht erwünscht, da Monomere keine Stabilisierung der Membranproteine in Lösung ermöglichen.

Tabelle 1: Auflistung der getesteten Detergenzien

Detergenz	CMC in mM	CMC in %	chemische Gruppe
Tween-20	0,06	0,007	nicht ionisch
n-Dodecylmaltoside (DDM)	0,18	0,009	“
Triton X-114	0,2	0,012	“
Triton X-110	0,2	0,013	“
Igepal	0,083	0,005	“
CHAPS	4	0,25	zwitterionisch
N-Laurylsarcosine (NLS)	14,6	0,43	Anionisch

Es wurde die Solubilisierungs-Effizienz von sieben Detergenzien mit unterschiedlichen CMC und aus verschiedenen chemischen Gruppen (siehe Tabelle 1) in 0,5% und 5% (w/v) Konzentration miteinander verglichen. Dafür wurden die Bakterien einer *M. hominis*-Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, aufgeschlossen (Kapitel 3.2.1) und dann mit Detergenz in der entsprechenden Konzentration für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation befanden sich die gelösten Proteine im Überstand, die ungelösten Proteine verblieben im Sediment (Kapitel 3.2.5).

Im Coomassieblau-gefärbten SDS-Gel wurden die gelösten (Überstand) und unlöslichen Proteine (Pellet) nebeneinander aufgetrennt (siehe Abb. 6.A). Die verschiedenen Detergenz-

4. Ergebnisteil

Proben der gelösten Proteine unterschieden sich kaum im Bandenmuster, dafür aber in der Intensität der Proteinbanden. Je mehr Protein solubilisiert werden konnte, desto stärkere Banden wurden nach der Färbung detektiert. Die Proben der unlöslichen Proteine waren bei hoher Solubilisierung folglich abgereichert an Protein.

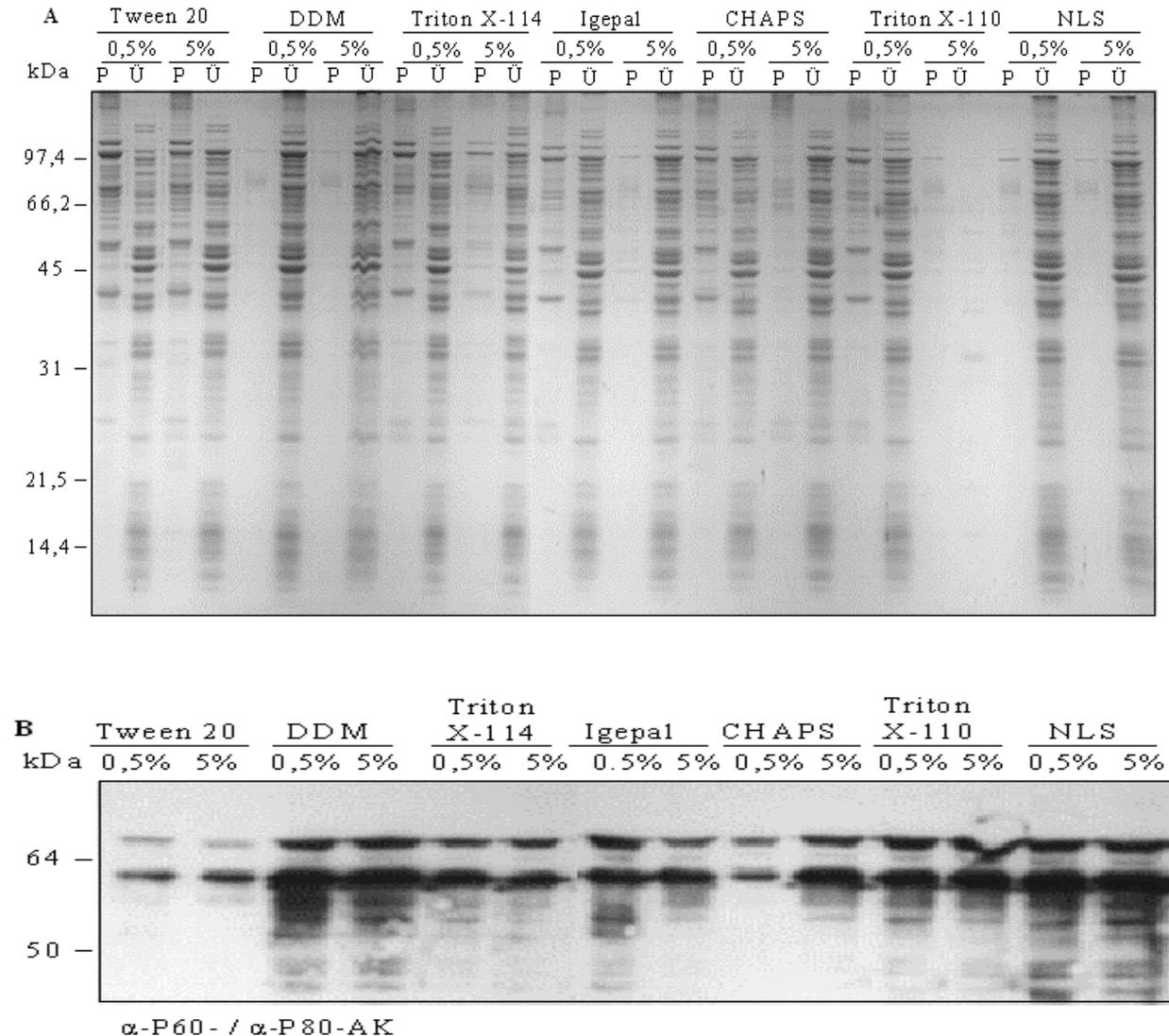


Abbildung 6: Solubilisierung von Mykoplasmenproteinen mittels verschiedener Detergenzien.

A. *M. hominis*-Kulturen in der logarithmischen Wachstumsphase wurden geerntet und mit sieben verschiedenen Detergenzien (in 0,5% oder 5% Lösung) aufgeschlossen. Entsprechend 10 μ g *M. hominis*-Gesamtprotein wurden Proben der pelletierten unlöslichen Proteine (P) und der gelösten Proteine aus den Überständen (Ü) in einem 15% SDS-Gel getrennt und Coomassieblau gefärbt. Als Marker wurde der „Low Range Standard“ von Bio Rad verwendet.

B. Nach einem Western Blot wurden die Proben (Ü) mit monoklonalen α -P60- und α -P80-Antikörpern immunologisch gefärbt. Es wurde der „Prestained Marker“ von Invitrogen verwendet.

Die Detergenzien n-Dodecylmaltosid (DDM) in 0,5 / 5%, N-Laurylsarcosine (NLS) in 0,5 / 5% und Igepal 5% zeigten die besten Löslichkeitseffizienzen. In den entsprechenden Überständen wurde in der Coomassiefärbung die größte Menge an gelösten Proteine gefunden (siehe Abbildung 6 A). In einer zweiten Analyse wurden die gelösten Proteine der Überstände

4. Ergebnisteil

im SDS-Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit Antikörpern gegen die membranständigen Proteine P60 und P80 immunologisch gefärbt, um die Solubilisierungseffizienz von Membranproteinen zu charakterisieren. Die stärksten Signale der P60- und P80-Banden wurden in den Fraktionen detektiert, die durch DDM und NLS gelöst worden waren (siehe Abbildung 6 B).

Basierend auf diesen Ergebnissen, ersten Vorstudien (Interaktionsstudien im kleinen Maßstab) und publizierten Interaktionsstudien mit diesem Detergenz (Davidson *et al.*, 1991) wurde für die weiteren Analysen der Aufschluss der Mykoplasmen mit DDM durchgeführt.

Die Proteinausbeute der Mykoplasmenlysate variierte stark in Abhängigkeit von der untersuchten Bakterienart. *M. hominis* lieferte mit ca. 10mg Protein je 1 Liter Kultur die höchste Ausbeute. Die Kulturen von *M. genitalium* und *M. pneumoniae* lieferten mittlere Proteinmengen. *U. parvum*-Kulturen erzeugten mit Abstand die niedrigste Ausbeute. Um hier genügend Mengen an Protein für Interaktionsstudien zu ernten, wurden für 3-6mg Protein 10-20L Kultur in der logarithmischen Wachstumsphase benötigt. Aufgrund der höheren Verfügbarkeit der *M. hominis*-Proteine wurden die meisten Voruntersuchungen zur Optimierung der Versuchsanordnungen der Interaktionen in diesem Organismus etabliert und auf die anderen übertragen.

4.6. Identifizierung von HinT-interagierenden Proteinen von *M. hominis*

Mit drei verschiedenen Versuchsansätzen wurde nach HinT-bindenden Proteinen in *M. hominis* gesucht. In Pull-down-Assay (Kapitel 3.2.9.4), Quervernetzer-Assay mit Sulfo-SBED (Kapitel 3.2.9.5) und Co-Immunopräzipitationen (Kapitel 3.3.3) wurden putative Interaktionspartner von HinT detektiert, wovon sieben nach Isolation mittels MalDI-MS-Analysen identifiziert werden konnten. Die Interaktion von *M. hominis* HinT und drei der identifizierten Proteine wurde anschließend in einer vierten Studie analysiert, der affinitätschromatographischen Überprüfung der Interaktionen zwischen HinT^f und in vitro translaterter Proteine.

Für den Pull-down-Assay wurde aufgereinigtes *M. hominis*-HinT^f an eine Protein G Sepharose gekoppelt (Kapitel 3.2.9.2). Die HinT^f-Sepharose wurde mit Gesamtprotein aus Mykoplasmen-Lysat, das mit oder ohne Detergenz aufgeschlossen wurde, inkubiert. Nach vier WaschschrItten konnten putative Interaktionspartner in 3,5M Na-isothiozyanat / PBS^{+/-DDM} eluiert und analysiert werden. Als Negativkontrolle (K) wurde ein

4. Ergebnisteil

mykoplasmenfremdes Protein, die Dihydrofolatreduktase, an Sepharose gekoppelt und mit Mykoplasmen-Lysat mit oder ohne Detergenz inkubiert.

Anschließend wurden die Elutionen nebeneinander auf einem 9,5%igen und einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt und Silber gefärbt. Die Bandenmuster der HinT- und der K⁻-Elutionen wurden eingescannt und beide Proteinprofile (Molekulargewicht gegen Intensität) übereinander abgebildet (Kapitel 3.4.1). Die Intensitätspeaks im Kurvenverlauf entsprachen den einzelnen Proteinbanden. Peaks, die in beiden Kurven parallel verliefen, entsprachen Proteinen, die unspezifisch mit der Sepharose interagierten. Putative Interaktionspartner fanden sich dementsprechend in den Peaks, die nur im Kurvenverlauf der Elution der HinT^r-Sepharose auftraten.

Im 9,5% SDS-Gel wurden hochmolekulare Proteine aufgetrennt. In Abb. 7 ist exemplarisch die Interaktionsanalyse von 20mg Gesamtprotein aus *M. hominis* Lysat mit 0,4% DDM und die entsprechende Negativkontrolle mit 220µg Sepharosegekoppeltem-HinT^r Protein zu sehen.

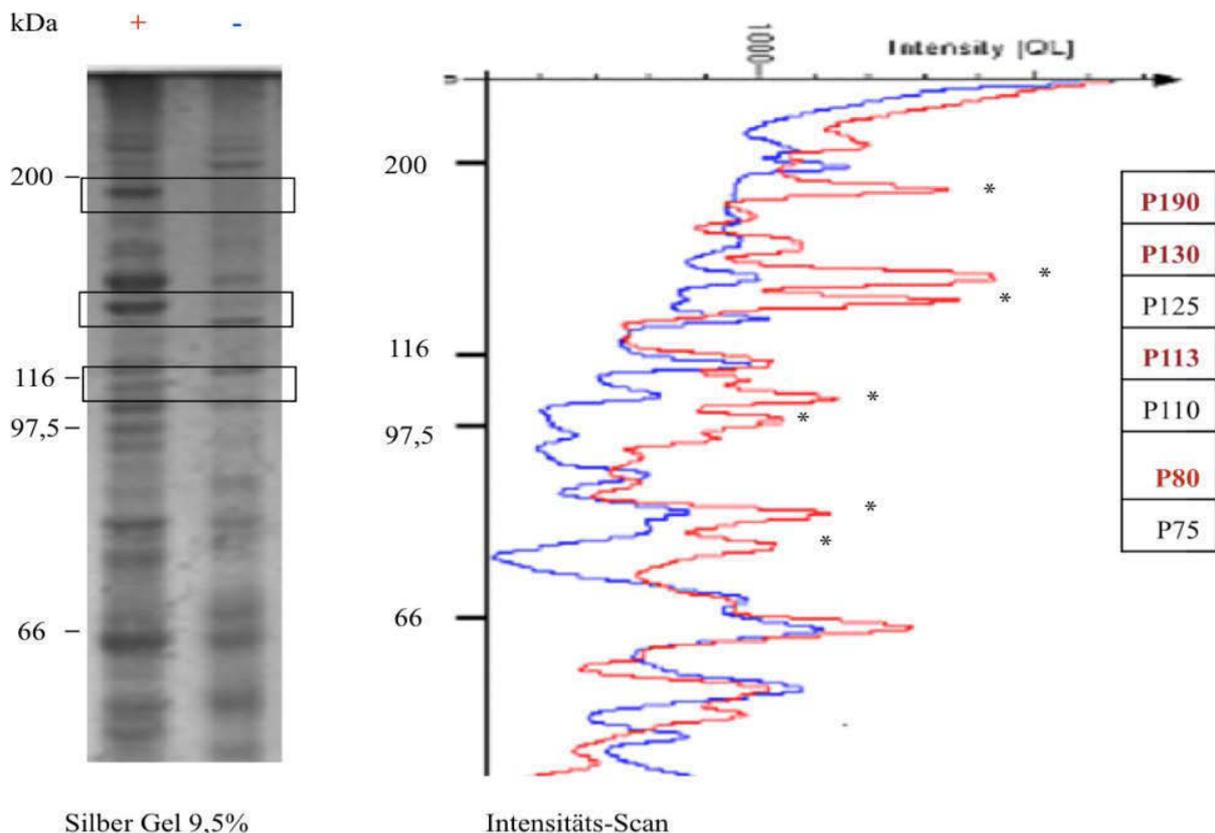


Abbildung 7: Analyse der hochmolekularen Proteine eines Pull-down-Assays auf einem 9,5% SDS-Gel. Die Elutionen zweier Ansätze (+ 0,22mg HinT^r an Sepharose, - Negativkontrolle inkubiert mit 20mg Proteinlysate^{DDM}) wurden nebeneinander auf einem 9,5% SDS-Gel getrennt und Silber gefärbt. Die Intensitäten der Banden wurden durch ein Computerprogramm dem Aida Image Analyser v.3.24 eingescannt, analysiert und nebeneinander (Intensität gegen Molekulargewicht) abgebildet.

4. Ergebnisteil

Im vergleichenden Intensitätsscan wurden als hochmolekulare Interaktionspartner P190 (d.h. 190kDa), P130 (130kDa), P125, P113, P115, P80 und P70 detektiert. Die Versuche wurden in verschiedenen Ansätzen wiederholt, dabei wurden pro Ansatz 10-220µg HinT^r Protein mit 0,6 – 20 mg Gesamtprotein aus Mykoplasmen-Lysat mit oder ohne Detergenz inkubiert, eluiert und analysiert. Die in der Tabelle rot markierten Proteine (P190, P130, P113, und P80) konnten unter variierenden Bedingungen im Pull-down-Assay, detektiert werden (Daten nicht gezeigt). P130 und P113 zeigten auch ohne Detergenz eine Interaktion mit HinT^r. Eine Interaktion zwischen P190 oder P80 und HinT konnte ohne Detergenz nicht beobachtet werden. Bei P80, das nur nach Aufschluss der Mykoplasmen mit Detergenz als Interaktionspartner detektiert werden konnte, handelt es sich um das bereits als HinT-interagierend-charakterisierte P80 Protein (Kitzerow & Henrich, 2001), da es sich im konzentrierten Eluat mittels eines P80-spezifischen Antikörpers anfärben ließ (nicht abgebildet).

Parallel wurde ein Teil der Proben im 15% SDS-Gel analysiert, um eine bessere Auftrennung der niedermolekularen Proteine zu erzielen. In Abb. 8 ist exemplarisch wieder die Elution nach Interaktion von 220µg HinT^r an Sepharose mit 20mg Protein in *M. hominis* Lysat mit 0,4% DDM gezeigt. Im Intensitätsscan zeigten sich folgende Proteine als mögliche Interaktionspartner: P75, P50, P46, P42, P38, P31, P33, P29, P27, P26 und P14, da diese in der Negativkontrolle nicht zu sehen waren. Die rot markierten Proteine P38, P31, P26 und P13 wurden auch unter wechselnden Versuchsbedingungen konstant detektiert. P50 und P44 wurden in einem Großteil der Experimente, P50 in drei von fünf und P44 in vier von fünf, als Interaktionspartner detektiert, jedoch zeigten sie teilweise auch eine wechselnd starke unspezifische Bindung an die Sepharose der Negativkontrolle.

4. Ergebnisteil

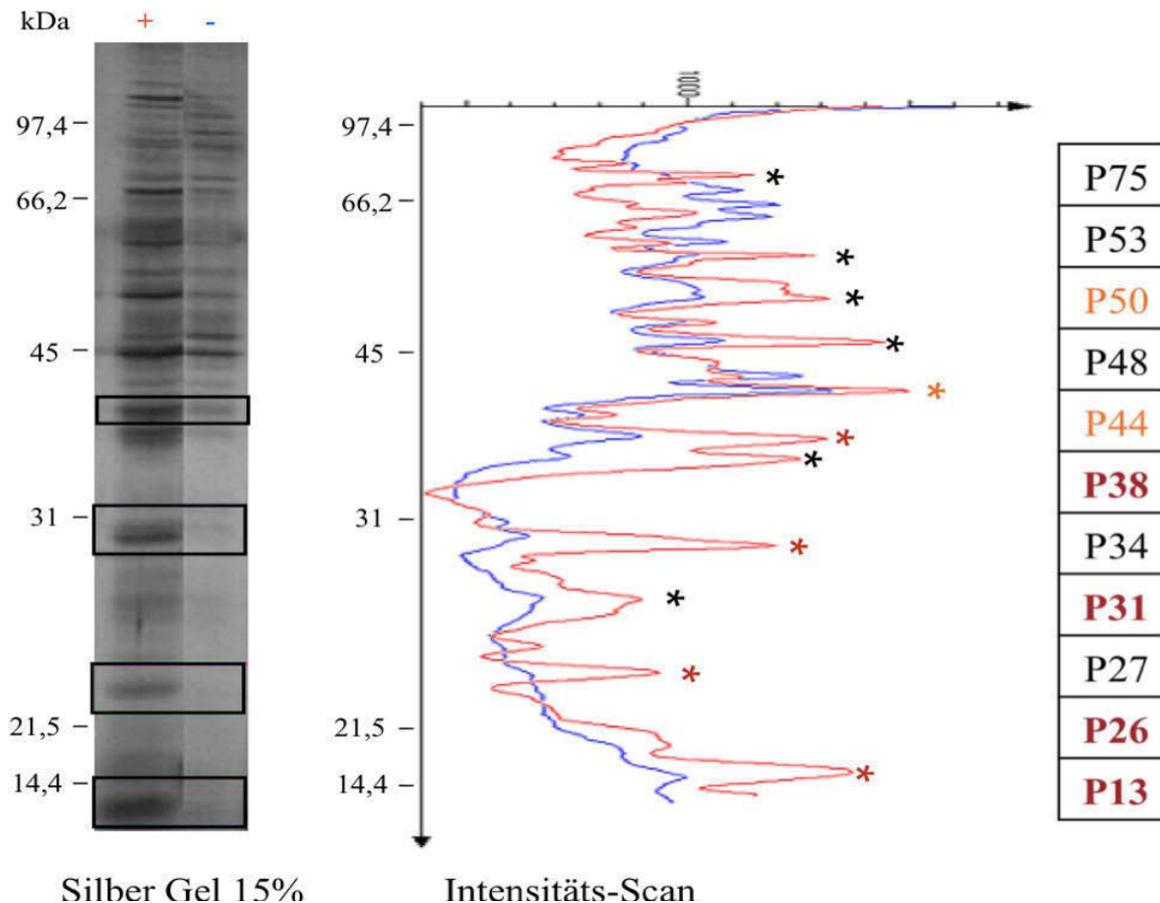


Abbildung 8: Intensitätsanalyse eines Pull-down-Assays im niedermolekularen Bereich. Die Elutionen gebundener Proteine an 0,22mg HinT^r (+), oder DHFR (-) aus 20mg *M. hominis* Proteinlysate^{+DDM} wurden auf einem 15% SDS-Gel aufgetrennt und Silber-gefärbt. Die Proteinprofile wurden durch den Aida image Analyser v.3.24 gescannt und übereinander abgebildet (Intensität gegen Molekulargewicht)

Insgesamt ergaben sich aus den Pull-down-Analysen 10 mögliche Interaktionspartner von HinT: P190, P130, P113, P80, P50, P44, P38, P31, P26 und P14, die unter variablen Versuchsbedingungen (Kapitel 3.2.9.4) eine spezifische Bindung an HinT^r gezeigt hatten und sich unter Hochsalz davon eluieren ließen.

Nachdem die eluierten Proteine mehrerer Versuchsansätze vereinigt, mit Hilfe eines Konzentrierungsgels aufgetrennt (Kapitel 3.2.8.2) und kolloidal Coomassieblau gefärbt worden waren (Kapitel 3.2.8.5), lagen drei Proteine in ausreichender Menge vor, um mit Hilfe der ESI-MS (Kapitel 3.2.11) identifiziert zu werden. Bei P113 handelte es sich um die DNA-abhängige RNA Polymerase Beta Kette (gi|23307628, 112,5kDa) (RNA-Poly.), bei P38 um das 50 S ribosomale Protein L4 (gi|23306474, 36,2kDa) (RP-L4) und die Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase (gi|6523351 29,0kDa) (GAPDH), und bei P31 um das 50 S ribosomale Protein L1 (ca. 25kDa) (RP-L4). P13 entspricht s.w. dem nativen HinT und P26 dem HinT-Dimer, so dass sich hier die bereits bekannte Interaktion von HinT mit HinT zeigte. Exemplarisch zeigt Tabelle 2 das Ergebnis der ESI-MS Identifizierung von P38.

4. Ergebnisteil

Tabelle 2: Ergebnis der ESI-MS Identifizierung von P38

Masse	Ladung	Molekulargewicht [M+H ⁺]	Sequenz	Protein
530.29	3+	1588.87	VYSEKDPLNLPW K	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [Mycoplasma hominis] gi 6523351
628.33	3+	1882.99	LNENISHTENSIIV DGK	s.o.
665.86	2+	1330.72	DATVQEINEAIK	s.o.
707.82	2+	1414.64	ELNVDIVIEGTGR	s.o.
761.72	3+	2283.16	SASESLEYPEPI VSSDIIGAK	s.o.
911.47	2+	1821.94	TVVYSVNEDIITP EDK	s.o.
484.26	3+	1450.78	VKNEEAIDYLEK	50S ribosomal protein L4 [Mycoplasma hominis] gi 23306474
551.64	3+	1652.92	IYNQAIFDAILSER	s.o.
826.94	2+	1652.88		
831.46	2+	1661.92	VLLVSNNETVFLS AR	s.o.
614.39	2+	1227.78	NALLSALTLLAK	s.o.

Leu (L) und Ile (I) können im MS aufgrund ihrer identischen Masse nicht unterschieden werden.
Lys (K) und Gln (Q) können aufgrund ihrer ähnlichen Massen nicht eindeutig zugeordnet werden.

Für die Quervernetzer-Studien (Kapitel 3.2.9.5) wurde rekombinantes HinT^r unter nativen Bedingungen über den His-Tag aufgereinigt und in PBS-Puffer umgepuffert. *M. hominis*-Protein-Lysat^{DDM} wurde wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben hergestellt. Die Quervernetzung fand bei einer Detergenzkonzentration von 0,25% DDM statt. Hierzu wurde das HinT^r (800µg/ml) den Hersteller-Angaben folgend an den Quervernetzer Sulfo-SBED gekoppelt und anschließend für verschiedene Ansätze aliquotiert. Nach Inkubation mit *M. hominis*-Lysat^{+DDM/-DDM} (20mg/ml Proteingehalt) erfolgte die UV-Licht-vermittelte Quervernetzung mit HinT^r-gebundenen Proteinen (Kapitel 3.2.9.5). Die Proben wurden dann zweidimensional im SDS-Gel (Kapitel 3.2.8.3) aufgetrennt. In der ersten Dimension wurden die quervernetzten Proben ohne Zugabe von β-Mercaptoethanol getrennt. Die Proteinspur wurde aus dem Gel ausgeschnitten und in Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol, welches die Disulfidbrücke im Sulfo-SBED spaltet, inkubiert und längs auf einem zweiten SDS-Gel positioniert, nun in zweiter Dimension unter vollständig denaturierenden Bedingungen nach Molekulargewichten aufgetrennt.

4. Ergebnisteil

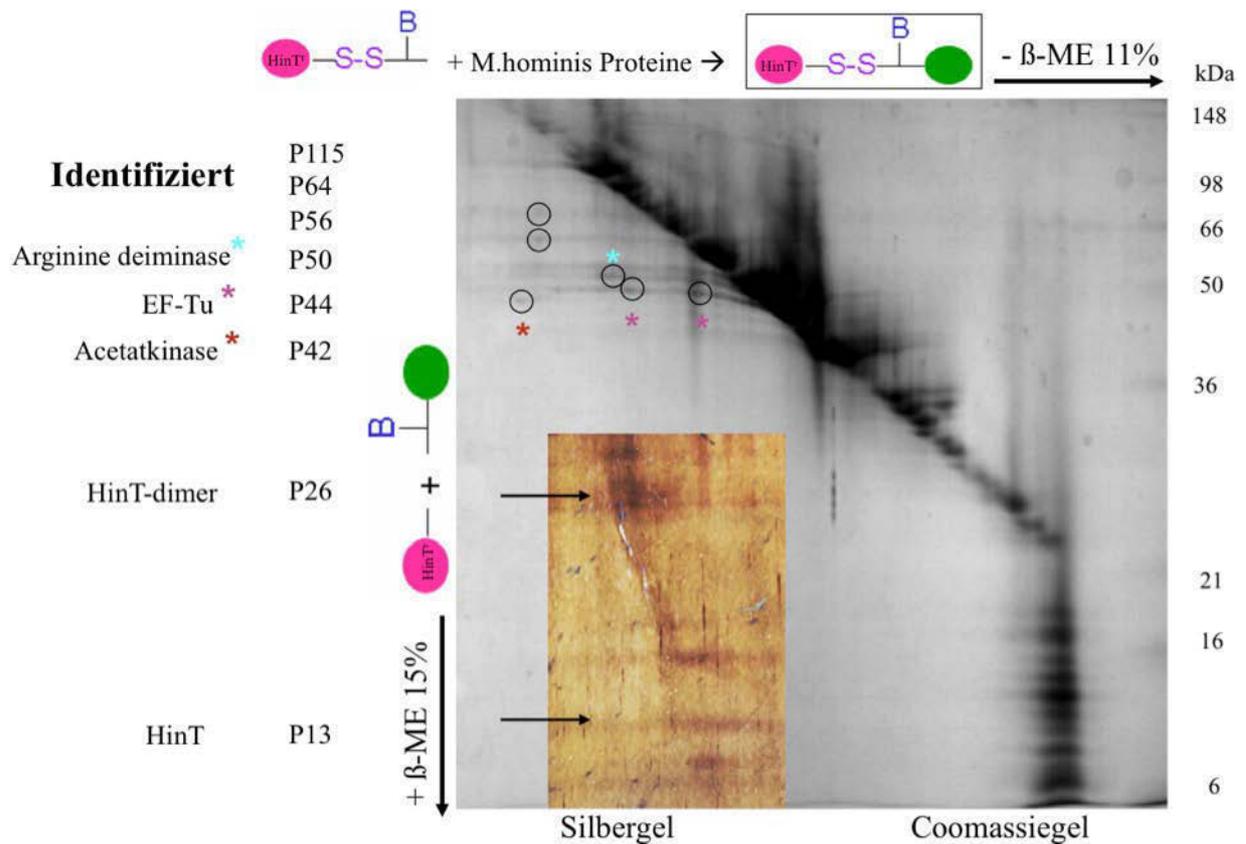


Abbildung 9: Analyse der Quervernetzung von *M. hominis* HinT^r und Lysat im 2D Gel: 2,5µg Mhom HinT^r wurden mittels Sulfo-SBED mit Proteinen aus 330µg *M. hominis*-Lysat^{DDM} quervernetzt. Anschließend wurden die Proben in der ersten Dimension auf einem 11% SDS-Gel ohne β-ME, und in der zweiten Dimension im 15% SDS-Gel mit β-ME aufgetrennt. Das Gel wurde erst Coomassie und dann Silber gefärbt (in Teilen abgebildet).

Alle nicht vernetzten Proteine liefen in einer Diagonale über das Gel. Unter der Diagonale zeigten sich jene Proteine, die in erster Dimension in einem höhermolekularen Proteinkomplex mit HinT vernetzt vorlagen und sich dann in 2. Dimension nach Zugabe von β-Mercaptoethanol als aus dem Komplex freigesetzte, isolierte Proteine gemäß ihrer Molekulargewichte auftrennten.

Exemplarisch ist in Abb. 9 ein 2D-Gel gezeigt, wo 2,5µg HinT^r mit 330µg Mykoplasmenprotein mit DDM vernetzt worden sind. In der ersten Dimension ohne β-Mercaptoethanol trennten sich die Proteine nicht sauber auf, ihre Banden färbten sich verschwommen an. Nach der Abspaltung durch β-Mercaptoethanol waren sechs Protein-Punkte kolloidal Coomassieblau gefärbt unter der Diagonale erkennbar: P115, P64, P56, P50, P44 und P42. Die eingekreisten Proteinpunkte wurden ausgestochen und im analytischen Labor des BiologischMedizinischenForschungsZentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf nach tryptischen Verdau massenspektrometrisch sequenziert und identifiziert. In der anschließenden Silberfärbung (hier nur im Ausschnitt dargestellt) stellten sich im niedermolekularen Bereich weitere Proteine dar, von denen P26 und P13 dem

4. Ergebnisteil

rekombinanten HinT zuzuschreiben sind. Ein Beweis für diese These konnte leider nicht erbracht werden, da sich die Silber gefärbten Proteine massenspektrometrisch nicht mehr identifizieren lassen, da Silber diese Analyse stört.

Insgesamt waren die durchgeführten Quervernetzungsanalysen nicht zufriedenstellend, da das Biotin, das vom HinT auf das interagierende, quervernetzte Protein übergehen sollte, nicht sauber nachweisbar war. Die detektierten Banden im Röntgenfilm waren unscharf und teils vermutlich wegen zu schneller Reaktion nicht nachweisbar, so dass die interagierenden Proteine nur nach ihrem Verhalten im 2D-Gel identifiziert und über den Nachweis von HinT^f in den Spuren der 2. Dimension bekräftigt wurden.

Die ausgestochenen P64- und P56-Spots konnten in der MALDI-MS Analyse nicht identifiziert werden. Der P50-Spot wurde als Arginin deiminase (gi|728876) (Adi), P44 als EF-Tu (gi|119209) und P42 als Acetatkinase (gi|37727324) (Ack) identifiziert.

Insgesamt konnten sieben putative HinT-interagierende Proteine identifiziert werden. Tabelle 3 gibt eine Übersicht darüber, ob sich die mittels Pull-down Assay identifizierten Proteine auch in der Quervernetzungsstudie zeigten und vice versa. Hierzu wurde die Methode der Identifizierung, das Protein, das berechnete Molekulargewicht in kDa, die Größe der Bande aus der es identifiziert worden ist und wie spezifisch ein entsprechender Interaktionspartner in den Methoden detektiert wurde, angegeben.

Tabelle 3: Zwischenanalyse nach Identifizierung von sieben möglichen Interaktionspartnern

Methode der Identifizierung	Protein	Berechnetes MG in kDa	Identif. Bande MG in kDa	Pull-down-Assay	Quervernetzung
Quer-Vernetzung	EF-Tu	43,6	44	+/-	+
	Ack	43	42	+/-	+
	Adi	46,3	50	+	+
Pull-down-Assay	RNA-Polym.	112,5	>100	+++	+
	GAPDH	29	38	+	+/-
	RP-L4	36,2	38	+	+/-
	RP-L1	25	31	++	

Die beiden durch die Quervernetzer-Studie identifizierten Proteine EF-Tu und Ack unterscheiden sich hinsichtlich ihres berechneten Molekulargewichtes kaum, im SDS-PAGE bandierte der EF-Tu jedoch eher bei 44kDa und die Ack bei 42kDa. In den verschiedenen

4. Ergebnisteil

Pull-down-Assays wurde eine Proteinbande bei ca. 44kDa in wechselnder Intensität eluiert, die jedoch teils auch in der Negativkontrolle detektiert wurde, so dass ein Teil der Bindung von P44 unspezifisch an die Sepharose stattfindet. Die Proteinbande, aus der die Arginindeiminase Adi identifiziert wurde, zeigte ein Molekulargewicht von 50kDa; in den Pull-down-Assays konnte eine spezifische Interaktion zwischen HinT und einem 50kDa Protein nachgewiesen werden, da in den Eluaten der Negativkontrolle kein entsprechend großes Protein zu detektieren war.

Die RNA-Polymerase hat ein berechnetes Molekulargewicht von 112,5 kDa und wurde sowohl mit als auch ohne Detergenz im Pull-down-Assay deutlich spezifisch eluiert. Im 2D-Gel der Quervernetzungsanalyse zeigte sich ebenfalls eine (schwache) Bande bei ca. 115 kDa, möglicherweise auch die RNA-Polymerase. Die Proteinbande bei 36kDa im 2D-Gel der Quervernetzungsanalyse (nicht gezeigt) könnte der GAPDH oder dem ribosomalen Protein L4 entsprechen, die beide im SDS-PAGE bei 38kDa detektiert wurden. Zusammenfassend lässt sich eine Interaktion der Adi (50 kDa) und der RNA-Polymerase (113 kDa) mit HinT durch die Ergebnisse der zweiten Analysenmethoden untermauern.

In einer dritten Interaktionsstudie wurde zur weiteren Identifizierung von Interaktionspartnern der Immunopräzipitations-Assay verwendet. Im Unterschied zu dem Pull-down-Assay fand die Interaktion zwischen HinT und seinen Partnern hier in Lösung statt. HinT-Protein haltige Proteinkomplexe wurden anschließend über HinT-spezifische Antikörper isoliert. Hierzu wurden 50 mg Gesamtproteine aus 2l frischem *M. hominis*-Lysat in 3ml Puffer A aufgenommen und, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, aufgeschlossen. Das Lysat wurde in 4 Ansätze (P1-P4) aufgeteilt (siehe Tabelle 4). Probe 1 wurde über Nacht mit 30µl α Mhom HinT Serum bei 4°C inkubiert. Probe 2 wurde über Nacht bei 4°C gelagert. Probe 4 wurde ca. 1h lang bei RT mit 50µg rekombinanten HinT inkubiert, Probe 3 und 4 wurden dann über Nacht mit 10µg Tetra-His Antikörper bei 4°C inkubiert.

Tabelle 4: Versuchsanordnung zur Immunpräzipitation von HinT-haltigen Proteinkomplexen aus *M. hominis*

Proben	Tag 1	über Nacht	Tag 2
P1		+ 30µl α Mhom HinT Serum	+ 25µl Protein G
P2			+ 25µl Protein G
P3	+ 50µg HinT ^r	+ 10µg α -Tetra-His-AK	+ 25µl Protein G
P4		+ 10µg α -Tetra-His-AK	+ 25µl Protein G

4. Ergebnisteil

Nun wurden alle 4 Proben 3h bei 4°C mit je 25µl Protein G Sepharose Slurry inkubiert. Die Sepharose wurde nun mittels Zentrifugation vom Überstand getrennt und gewaschen. Die Pellets wurden anschließend in 80µl SDS-Probenpuffer aufgekocht. Die Proteine wurden dann erst in einem 15%igen und in einem 9,5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Gel-Spuren der Proben 3 und 4 wurden eingescannt, die Kurvenverläufe der Intensitäten übereinander abgebildet (siehe Abb. 10).

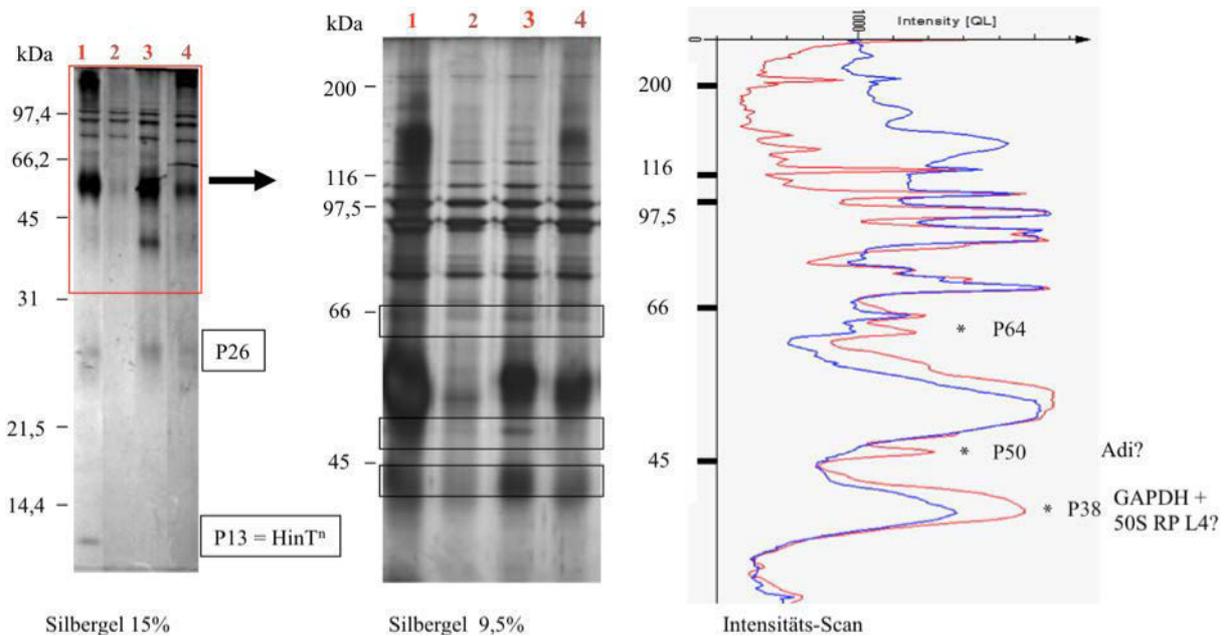


Abbildung 10: Coimmunopräzipitation mit α -Mhom HinT Serum, bzw. HinT^r und Tetra-His Ak, und *M. hominis*-Lysat. Auf einem 15% und einem 9,5% SDS-Gel getrennt wurden 8µl von 80 µl der Elutionen (entsprechend 20 ml Kultur). Die Gele wurden anschließend Silber gefärbt. Die Banden von P3 und P4 wurden eingescannt, analysiert und nebeneinander (Intensität gegen Molekulargewicht) abgebildet.

Im Intensitätsscan stellten sich drei Peaks P64, P50 und P38 deutlich in der Elution von der Protein G-Sepharose, aber nicht in der Negativkontrolle dar. P38 sollte kritisch bewertet werden, vom Laufverhalten her könnte es sich bei dieser Bande um Antikörperbestandteile handeln. Zusätzlich konnte man bereits im Silber-gefärbten 15% SDS-Gel P26 und P13 detektieren. P26 entspricht dem Molekulargewicht nach dem HinT-Dimer und P13 dem nativen HinT.

Im Blot der aufgetrennten Elution, entwickelt mit dem polyklonalen Anti-HinT Serum (SAA3), konnte P13 in der Spur P1 detektiert und somit gezeigt werden, dass es sich hierbei um das native HinT handelte (nicht dargestellt). Dieses Ergebnis bestätigt die Interaktion mit einem 50kDa Protein, bei welchem es sich um die Adi handeln könnte. Bei dem 38kDa Protein könnte es sich um die GAPDH oder das ribosomale Protein L4 handeln.

4. Ergebnisteil

Um die Interaktionen von HinT mit der Acetatkinase (Ack), der Arginin Deiminase (Adi) und dem Elongationsfaktor-Tu (EF-Tu) zu bestätigen, wurde eine weitere Methode eingesetzt, die affinitätschromatographische Überprüfung der Interaktionen zwischen HinT^r und *in vitro* translaterter Proteine. Dazu wurden die Proteine in einem TNTgekoppelten Retikulozyten Lysat System *in vitro* [³⁵S]Methionin markiert und translatiert. Als DNA Templates dienten pGAD- und pGBKT7-Vektoren, in welche die entsprechenden Sequenzen inkloniert wurden und als Fusionsprotein mit der bindenden Domäne (AD) oder mit der aktivierenden Domäne (BD) translatiert wurden. Es folgte eine affinitätschromatographische Überprüfung der Interaktionen zwischen tetra-His-gekoppeltem HinT^r und den *in vitro* translatierten Proteinen (Kapitel 3.2.12) Dafür wurde der Translationsansatz erst mit rekombinanten HinT und dann mit Ni²⁺-NTA-Sepharose inkubiert. Nach sechs Waschschrinen wurden HinT^r mit ggf. gebundenen Proteinen (Adi, Ack, EF-Tu oder HinT) von der Säule eluiert und in einem 15% SDS-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abbildung 11). Die radioaktiv-markierten Proteine wurden anschließend im Autoradiogramm mit Hilfe eines Phosphorimager detektiert.

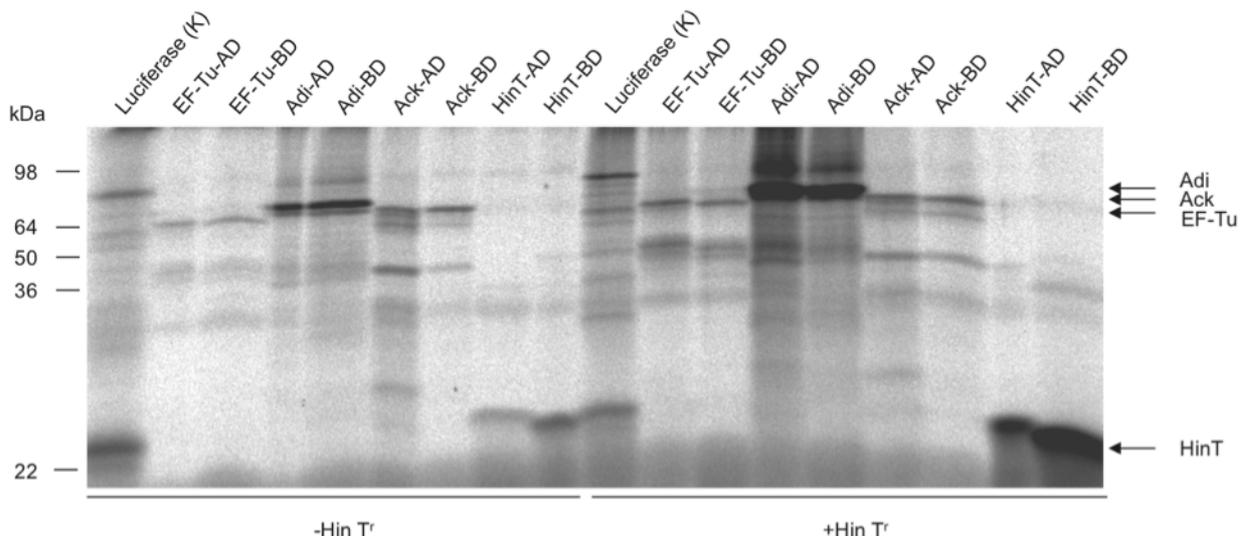


Abbildung 11: Autoradiogramm der Interaktion zwischen HinT^r und *in vitro* translaterter Proteine.

In einem 15%-Gel wurden die von der Ni-NTA-Sepharose eluierten Proteinkomplexe aufgetrennt, die aus *in vitro* translatierten [³⁵S]Methionin markiert Fusionsproteinen (EF-Tu-AD, EF-Tu-BD, Adi-AD, Adi-BD, Ack-AD, Ack-BD, HinT-AD, HinT-BD) mit HinT^r bestanden. Als Negativkontrolle wurden parallele Ansätze ohne Zugabe von HinT^r durchgeführt (-HinT^r). Die radioaktivmarkierten Proteine wurden mittels Autoradiographie unter Verwendung eines Phosphorimager analysiert. Als Marker wurde der prestained low-molecular weight Marker (Biorad) verwendet.

Zur Detektion von unspezifischen Bindungen an die Ni²⁺-NTA-Sepharose wurden vergleichend die translatierten Proteine (EF-Tu-AD, EF-Tu-BD, Adi-AD, Adi-BD, Ack-AD, Ack-BD, HinT-AD, HinT-BD) auch ohne Tetra-His-gekoppelten HinT^r inkubiert (siehe Abbildung 11). Alle radioaktiv-markierten Proteine zeigten eine unspezifische Bindung an Ni²⁺-NTA-Sepharose (siehe Abbildung 11(-HinT^r)). Die beiden 68 kDa Fusionsproteine Adi-

4. Ergebnisteil

AD und Adi-BD zeigten in den Elutionen mit HinT^r jedoch viel stärkere Banden als in den Elutionen ohne HinT^r, was als Interaktion der Arginindeiminase mit HinT gewertet wurde. Im Falle der 66,3 kDa Acetatkinase (Ack) und des 64,8 kDa Elongationsfaktor-Tu (EF-Tu) wurden in den Elutionen mit und ohne HinT^r gleiche Bandenintensitäten im Phosphorimager gemessen. Es konnte im Pull-down-Assay unter Einsatz der *in vitro* translatierten Proteine die Interaktion von HinT^r mit der Acetatkinase oder dem EF-Tu nicht gezeigt werden. Die bereits bekannte Interaktion von HinT mit sich selber wurde als Positivkontrolle verwendet und zeigte - wie zu erwarten - eine deutlich höhere Bandenintensität im Ansatz mit HinT^r. Das Enzym Luciferase wurde als Kontrolle der Translation verwendet (Abbildung 11 Luciferase (K)). Dies zeigte, dass die Versuchsanordnung geeignet war, um Interaktionen zu detektieren und bestätigte die Interaktion von HinT mit der Arginindeiminase.

4. Ergebnisteil

Abbildung 12 gibt eine Übersicht der möglichen HinT-Interaktionspartner und stellt dar, welche Proteine durch ESI-Massenspektrometrie identifiziert werden konnten.

Protein	Pulldown	IP	Crosslinker	in-Vitro	ESI-MS identifizierung
P190	+				
P130	+				
P125	+				
P113	+*		+		DNA-abhängige RNA-polymerase
P110	+				
P80	+				
P75	+				
P64		+	+		
P53	+				
P50	+	+	+*	+	Arginindeiminase
P48	+				
P44	+		+*		Elongationsfaktor-Tu
P42			+*		Acetatkinase
P38	+*	+			GAPDH+50S RP-L1
P34	+				
P33	+				
P29	+*				50S RP-14
P27	+				
P26	+	+	+		HinT
P13	+	+	+	+	

Abbildung 12: Tabellarische Darstellung der identifizierten HinT-Interaktionspartner. Die Spalten listen das Molekulargewicht der Proteine, die Methode in der sie identifiziert wurden und die Proteine die identifiziert werden konnten nebeneinander auf. Die Sternchen markieren durch welchen Versuch die Proteine mittels ESI-MS identifiziert worden waren.

P64, P44 (im Crosslinker-Assay als EF-TU identifiziert), P38 (in Pull-down-Assay als GAPDH und/oder 50 S ribosomalen Proteine L4 identifiziert) wurden in je zwei verschiedenen Assays gefunden.

P50 (im Crosslinker-Assay als Arginindeiminase identifiziert) stellte sich in allen drei Assays als Interaktionspartner von HinT dar. Die Interaktion zwischen *M. hominis* HinT^r und der Arginindeiminase konnte im Crosslinker- wie auch Pull down-Assay nach *in vitro* Translation des Proteins validiert werden (unterstrichen in Abbildung 12).

4. Ergebnisteil

Abschließend ist zu erwähnen, dass nach den Interaktionsstudien sieben Interaktionspartner identifiziert wurden. Es waren die DNA-abhängige RNA Polymerase Beta Kette (RNA-polymerase B), die 50 S ribosomalen Proteine L4 und L1 (50SrPL4 und 50SrPL4), die Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH), die Acetatkinase (Ack), die Arginindeiminase (Adi) und der Elongationsfaktor-Tu (EF-Tu). Die Interaktion von HinT mit den drei letztgenannten Proteinen wurde nach *in vitro* Translationen überprüft. Hier bestätigte sich die Interaktion von der Arginindeiminase mit HinT, was jedoch nicht ausschließt, dass *in vivo* eine Interaktion von HinT mit den anderen beiden Proteinen stattfindet.

4.7. Identifizierung von drei HinT-interagierenden Proteinen von *M. pneumoniae*

Zur Analyse HinT interagierender Proteine in *M. pneumoniae* wurden für den Pull-down-Assay 100µg - unter nativen Bedingungen aufgereinigtes - *M. pneumoniae* HinT^F an eine Protein G Sepharose gekoppelt (Kapitel 3.2.9.2). Die Bakterien aus 4-6 L *M. pneumoniae*-Kultur wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet, in PBS aufgenommen und aufgeschlossen (Kapitel 3.2.1). Bei einem Teil des Bakterienlysates wurde eine Präparation der Membranproteine mit 1% DDM (Kapitel 3.2.5) angeschlossen. Die HinT^F-Sepharose wurde mit ca. 2mg Gesamtprotein in *M. pneumoniae*-Lysat^{Zyto}, bzw. Lysat^{DDM} 0,4% für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In drei Schritten wurden nicht gebundene Proteine mit dem je 10fachen Säulenvolumen an Waschpuffer von der Säule entfernt. Nach dreiminütiger Inkubation in Elutionspuffer wurden die gebundenen Interaktionspartner von HinT in fünf Schritten à 150µl eluiert. 13µl der Eluate wurden parallel zu den Eluatzen der Negativkontrolle, wo statt HinT-Sepharose Dihydrofolatreduktase-Sepharose eingesetzt worden war, in einem 15% SDS-Gel aufgetrennt und Silber gefärbt.

Wie in Abb. 13 deutlich zu sehen, zeigte der Intensitätsscan in der Präparation mit Detergenz die Proteine P72, P50, P45, P40, P36, P34, P31 und P14 als mögliche Interaktionspartner.

4. Ergebnisteil

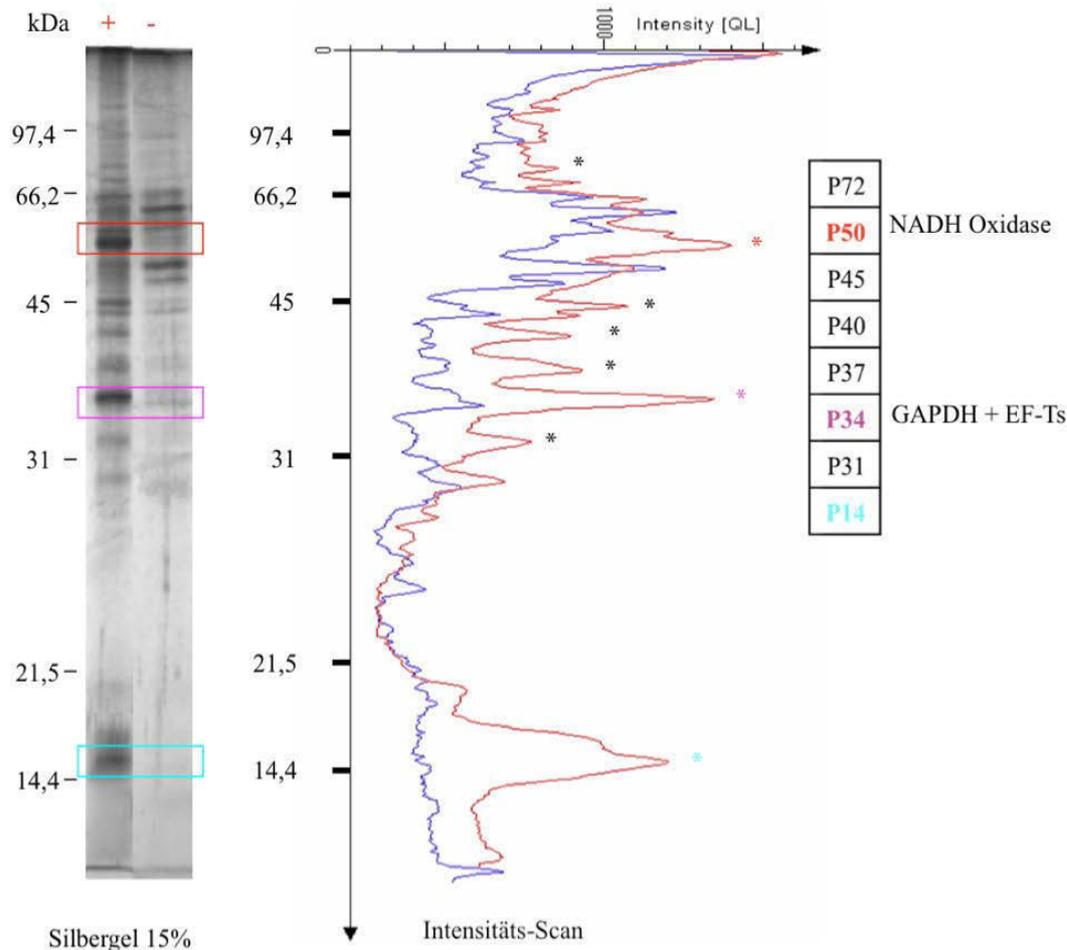


Abbildung 13: Intensitätsanalyse eines *M. pneumoniae* HinT^r Pull-down-Assays. Die Elutionen zweier Ansätze (+ 100 µg HinT^r an Sepharose, - Negativkontrolle) nach Inkubation mit 4mg Protein im Lysat wurden nebeneinander auf einem 15% SDS-Gel getrennt und Silber gefärbt. Die Intensitäten der Banden wurden eingescannt, analysiert und nebeneinander (Intensität gegen Molekulargewicht) abgebildet.

In Pull-down-Assays, die mit der zytoplasmatischen Fraktion (ohne Solubilisierung mittels DDM) durchgeführt worden waren, bestätigte sich, dass P72, P50, P34 (jedoch deutlich schwächer als in der DDM-Präparation) und P14 ebenfalls an HinT^r binden (nicht dargestellt). P25 wurde nur in der Analyse zytoplasmatischer Proteine eluiert. Die Interaktion von HinT^r mit P34 scheint also durch die Zugabe von DDM begünstigt zu werden oder in der DDM-Präparation lag mehr P34 in Lösung vor als in der zytoplasmatischen Präparation. P25 hingegen wurde durch DDM in seiner Interaktion mit HinT gehemmt.

Nach Ankonzentrierung mehrerer gepoolter Eluate konnten P50 und P34 im 15% SDS-Gel mittels kolloidaler Coomassiefärbung detektiert werden (Kapitel 3.2.8.5). Ihre Banden wurden ausgestochen und mittels ESI-Massenspektrometrie analysiert. P50 konnte als NADH-Oxidase (gi|13508133) identifiziert werden. Die bei 34 kDa detektierte Proteinbande enthielt die Proteine Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) (gi|2494646) und Elongationsfaktor-Ts (EF-Ts) (gi| 876992).

4. Ergebnisteil

Die Quervernetzungsstudie wurde (analog zu Kapitel 3.2.9.5) mit 1 - 3 μg *M. pneumoniae* HinT^r und 40 - 200 μg Gesamtprotein in *M. pneumoniae*-Lysat^{DDM} wie beschrieben durchgeführt. Die Abbildung 14 zeigt die Proben nach Auftrennung in einem 15% 2D-Gel. Die erste Dimension wurde ohne, die zweite mit β -Mercaptoethanol gefahren. Wie in Kapitel 3.2.10 beschrieben, spaltet das β -Mercaptoethanol die Disulfidbrücke des Sulfo-SBED und trennt so mögliche Interaktionspartner, die zuvor mit HinT^r quervernetzt worden waren, aus den Proteinkomplexen. Diese Proteine laufen unter der diagonalen Spur. P50 konnte als möglicher Interaktionspartner von *M. pneumoniae* HinT aus einem Komplex gespalten werden und lief als Proteinpunkt unterhalb der Diagonalen. Es konnten keine weiteren Proteine unter der diagonalen Spur detektiert werden. P50 war somit das einzige Protein, das in ausreichender Menge an HinT^r quervernetzt worden war.

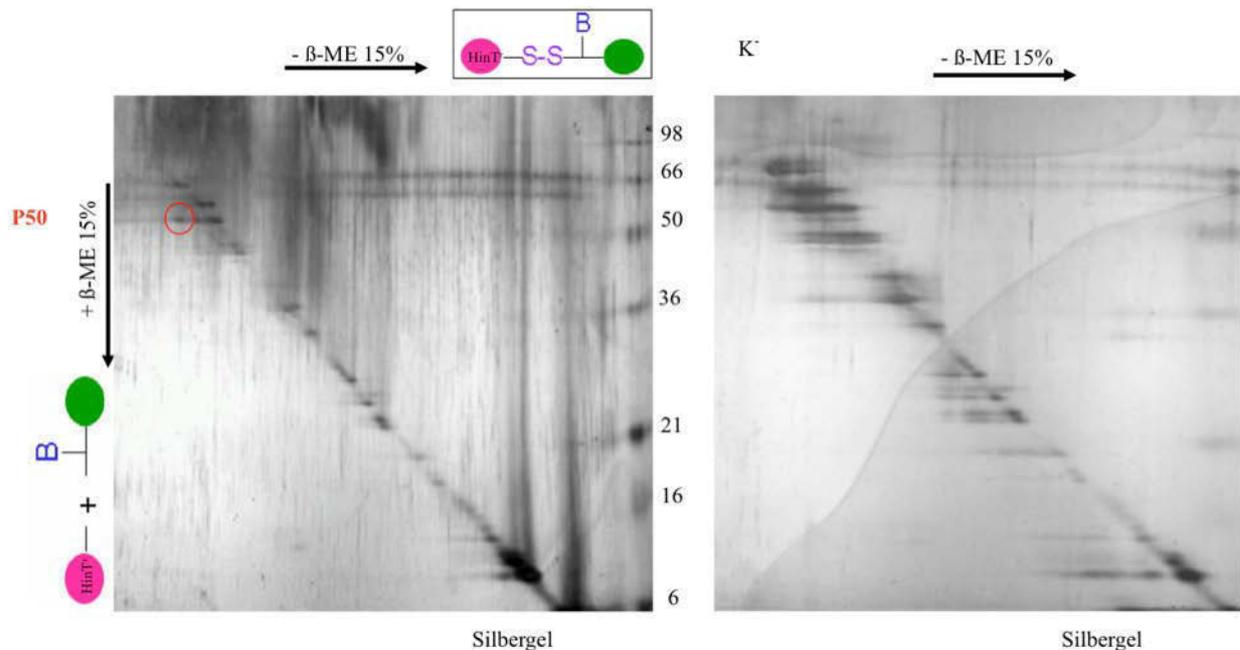


Abbildung 14: Analyse der Quervernetzung von *M. pneumoniae* HinT^r und Lysat im 2D Gel. 3 μg Mpneu HinT^r wurden, wie im Methodenteil beschrieben, mittels Sulfo-SBED mit potentiellen Proteinen in 55 μg *M. pneumoniae*-Lysat quervernetzt. Anschließend wurden die Proben in der ersten Dimension auf einem 15% SDS-Gel ohne β -ME, und in der zweiten Dimension auf einem 15% SDS-Gel mit β -ME getrennt. Das Gel wurde erst Coomassie und dann Silber gefärbt.

Da in beiden Interaktionsassays (Pull-down-Assay und Quervernetzungsstudie) HinT-Interaktionspartner mit einem Molekulargewicht von ca. 50kDa detektiert wurde und P50 aus dem Pull-down-Assay als die NADH Oxidase von *M. pneumoniae* identifiziert wurde, bleibt zu vermuten, dass es sich bei dem P50, das bei der Quervernetzungsstudie detektiert wurde, ebenfalls um die NADH-Oxidase handelt. Dies ließe sich beispielsweise durch immunologisches Anfärben mit einem entsprechenden Antikörper oder eine ESI-MS Sequenzierung bestätigen.

4.8. Detektion von vier putativ HinT-interagierende Proteinen von *U. parvum*

Zur Analyse HinT interagierender Proteine aus *U. parvum* wurde der Pull-down-Assay, wie zuvor beschrieben, durchgeführt. In diesem Fall wurden ca. 50µg *U. parvum* HinT^r an Sepharose gekoppelt (Kapitel 3.2.9.2) und mit 1,6mg / 0,8mg Gesamtprotein in *U. parvum*-Lysat^{DDM}, bzw. Lysat^{Zyto} aus ca. 6 l Kultur inkubiert. Die Eluate wurden auf einem 15% SDS-Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung und Intensitätsscan analysiert. Abbildung 15 zeigt im Silbergel HinT-interagierende Proteine in P53, P15 und P12, die auch durch Intensitätsspitzen im Graphen dargestellt sind. Diese drei Proteine eluierten von der *U. parvum* HinT^r-Säule, aber nicht von der Säule der Negativkontrolle. Im Versuchsansatz mit dem Lysat^{Zyto} eluierte mehr P53 von der Säule (nicht dargestellt). Deshalb kann angenommen werden, dass DDM die Interaktion mit HinT^r hemmt. Es gelang nicht, ausreichend Protein für eine ESI-MS Identifikation zu eluieren.

4. Ergebnisteil

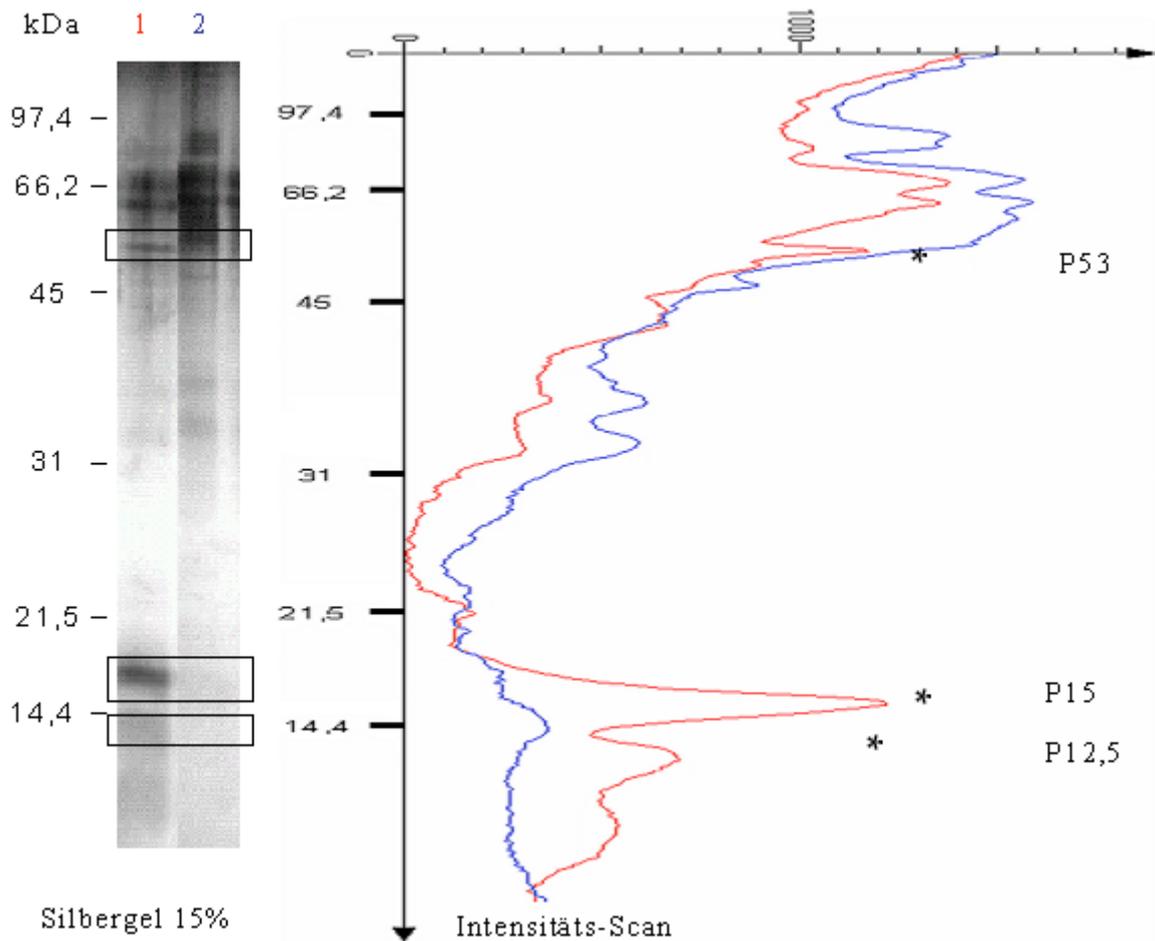


Abbildung 15: Intensitätsanalyse eines *U. parvum* Pull-down-Assays mit Lysat^{DDM}. Die Elutionen zweier Ansätze (+ 50µg HinT^r an Sepharose, - Negativkontrolle) wurden nebeneinander auf einem 15% SDS-Gel getrennt und Silber gefärbt. Die Intensitäten der Banden wurden eingescannt, analysiert und nebeneinander (Intensität gegen Molekulargewicht) abgebildet. Intensitätsspitzen, die sich in der + Kurve darstellten, nicht aber in der - Kurve, repräsentieren die Banden möglicher Interaktionspartner von HinT^r.

Die Quervernetzungs-Studie wurde mit HinT^r und *U. parvum*-Lysat^{DDM} aus 8l Kultur wie beschrieben durchgeführt (Kapitel 3.2.9.5). Die Proben enthielten 1,75µg Up-HinT^r und 0,1 µg bzw. 0,3µg *U. parvum*-Protein im Lysat. Nach der Vernetzung wurden je zwei Proben der verschiedenen Ansätze in Laufpuffern - einer enthielt β-ME, der andere war ohne den Zusatz von β-ME - aufgenommen, um die Proben in zwei getrennten 15% SDS-Gelen aufzutrennen. Für zusätzliche Analysen in 2D-Gelen stand nicht genügend Material zur Verfügung. Die Proben wurden nach der Trennung auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Der Quervernetzer Sulfo-SBED enthielt einen Biotinmarker, der nach Spaltung der Disulfidbrücke an dem interagierenden Protein verblieb. Das Biotin konnte nun mit Hilfe von HRP-Streptavidin im Western Blot detektiert werden.

Im Blot ohne β-Mercaptoethanol (Abbildung 16 A) wurden Komplexe aus HinT^r und den vernetzten Proteinen über den Biotin Marker detektiert. Auch HinT^r das nur mit Sulfo-SBED, aber nicht mit weiteren Proteinen vernetzt war, konnte so angefärbt werden. Drei deutliche

4. Ergebnisteil

Banden P19, P38 und P69 wurden sichtbar. P19 entsprach in seiner Größe dem nicht vernetzten HinT^r, P38 einem Dimer aus HinT^r/HinT^r oder HinT^r/HinTⁿ. P69 entsprach einem vernetzten Proteinkomplex von HinT^r mit interagierendem Protein. Nach Abspaltung des vernetzten HinT^r war zu erwarten, dass der Interaktionspartner im Proteingel bei ca. 48kDa bandiert.

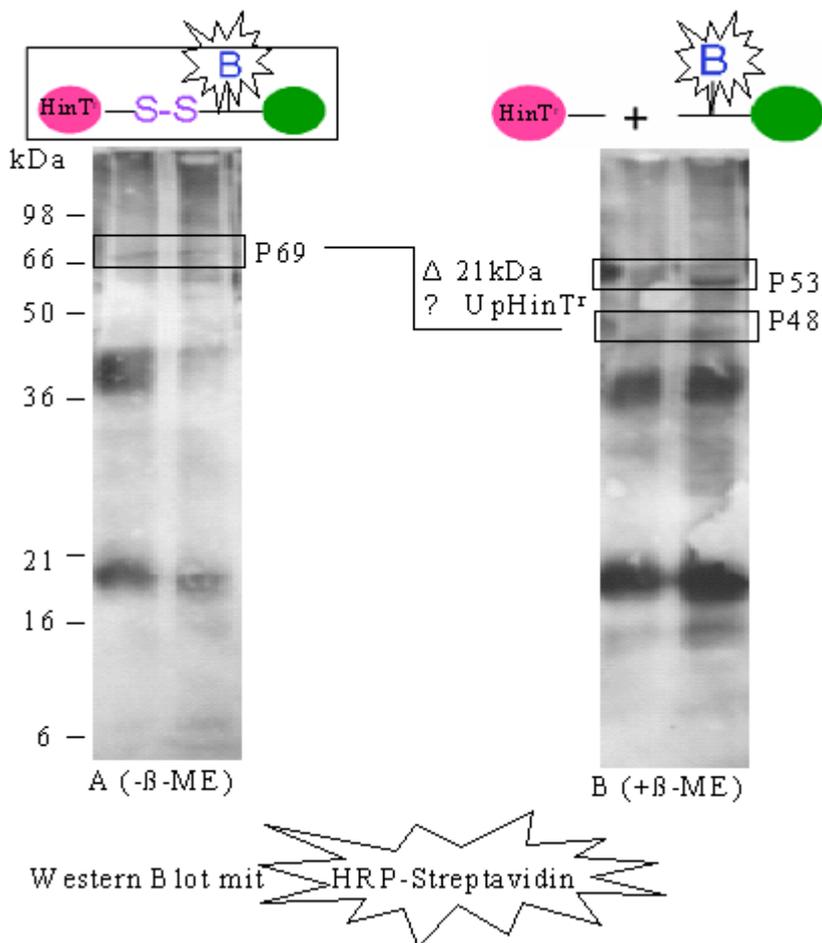


Abbildung 16: Analyse der Quervernetzung von *U. parvum* HinT^r und Lysat im Western Blot. 1,75µg Up HinT^r wurden mittels Sulfo-SBED mit potentiellen Proteinen in 0,1µg (erste Spur) und 0,3µg (zweite Spur) *U. parvum*-Lysat quervernetzt. Die Proben des Versuches wurden auf einem 15% SDS-Gel ohne β-ME (A), und auf einem mit β-ME (B) getrennt und geblottet. Die Blots wurden mit HRP-gekoppelten Streptavidin immunologisch gefärbt.

Nach der Zugabe von β-Mercaptoethanol (Abb. 16.B) wurden zusätzlich zu dem HinT^r-Monomer (P19) und dem HinT-Dimer (P38) ein Protein bei 53 kDa und - wie erwartet eines bei 48kDa detektiert. Beide Proteine, P53 und P48, sind putative HinT-Interaktionspartner, wobei sich ein Protein mit einer Größe von 53kDa als HinT-bindendes Protein durch zwei verschiedene Assays nachweisen ließ. Der Nachweis, dass es sich jeweils um dasselbe Protein handelt, könnte beispielsweise durch Reproduktion der Assays in größerem Maßstab und anschließende Sequenzierung der Proteine erbracht werden.

4. Ergebnisteil

P53 in der vernetzten Form wäre vor der Abspaltung des HinT^r bei 74kDa bzw. bei einer Vernetzung mit dem HinT-Dimer bei 95kDa zu erwarten gewesen. Im Blot ohne β -ME war jedoch keine entsprechenden Banden anfärbbar. Dies mag an der Wahl der höherprozentigen Gelmatrix gelegen haben, die keine saubere Auftrennung der Proteine im höhermolekularen Bereich zuließ.

Es fiel auf, dass nach dem Auftrennen der Disulfidbrücke, das P19, also das HinT-Monomer, intensiver angefärbt war. Es könnte sich um natives HinT mit Biotin. Markierung handeln, das vorher im Dimer mit dem rekombinanten HinT quervernetzt worden war.

Eine Entwicklung der Nitrozellulosemembran mit dem Tetra-His-AK, der den Histidin-Tag des *U. parvum* HinT^r markierte, wurde angeschlossen (nicht dargestellt). In den Proben, die ohne β -Mercaptoethanol aufgetrennt worden waren, konnte zusätzlich zu P19 und P38, ebenfalls P69 schwach detektiert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um einen Proteinkomplex handelte, der das rekombinante HinT enthielt. Da P19 und P38 auch nach dem Zusatz von β -Mercaptoethanol starke Signale zeigten, lief das rekombinante HinT auch hier in beiden Banden.

4.9. Detektion von 3 putativ HinT-interagierende Proteine von *M. genitalium*

In einer letzten Versuchserie wurden HinT-interagierende Proteine von *M. genitalium* gesucht. Hierzu wurde abermals der Pull-down-Assay angewendet.

Wie Abbildung 17 zeigt, führten analoge Pull-down-Assays mit Mgen HinT^r und *M. genitalium*-Lysat^{DDM} zur Detektion von zwei Proteinen, P38 und P15,5, wobei es sich bei letzterem sehr wahrscheinlich um das intrinsische HinT handelt.

4. Ergebnisteil

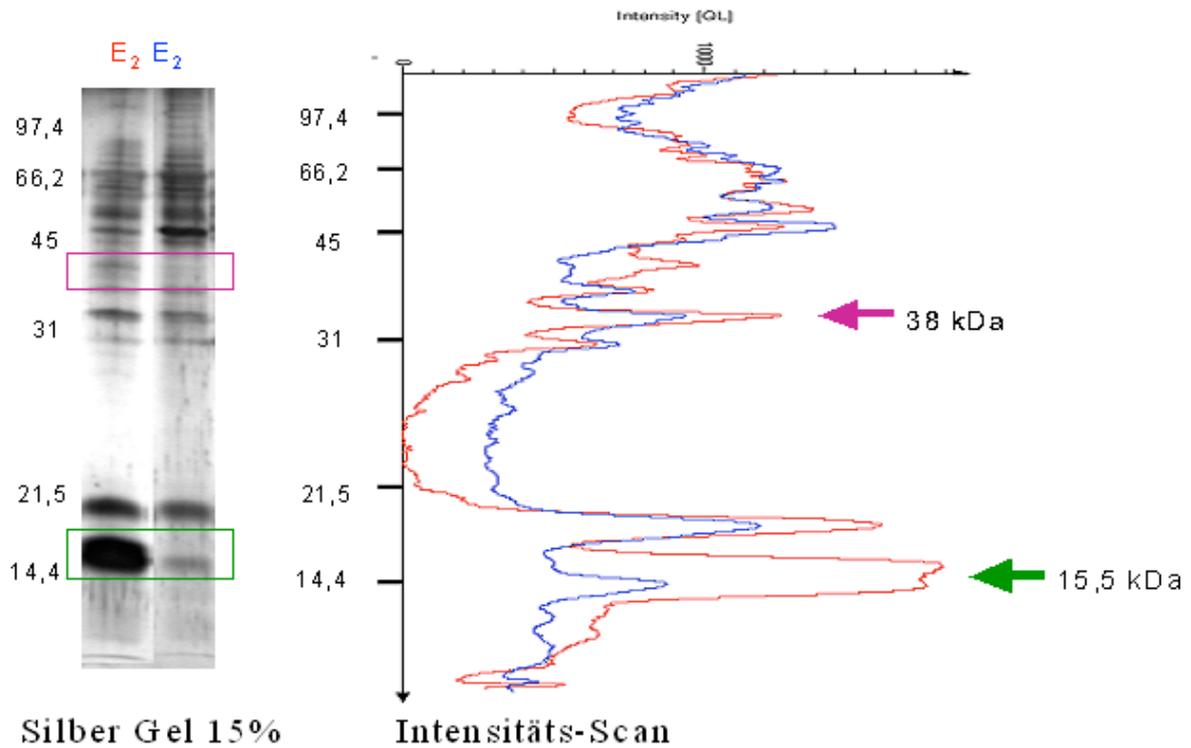


Abbildung 17: Intensitätsanalyse eines *M. genitalium* Pull-down-Assays. Die Elutionen zweier Ansätze (+ 0,15mg Mgen $HinT^F$ an Sepharose, - Negativkontrolle) wurden nebeneinander in einem 15% SDS-Gel aufgetrennt und Silber gefärbt. Die Intensitäten der Banden wurden durch ein Computerprogramm eingescannt, analysiert und nebeneinander (Intensität gegen Molekulargewicht) abgebildet.

Da die Proteine P38 und P15,5 ebenso im Pull-down-Assay mit Lysat ohne Detergenz-Zusatz detektiert wurden, handelt es sich sehr wahrscheinlich um zytoplasmatische Proteine.

4. Ergebnisteil

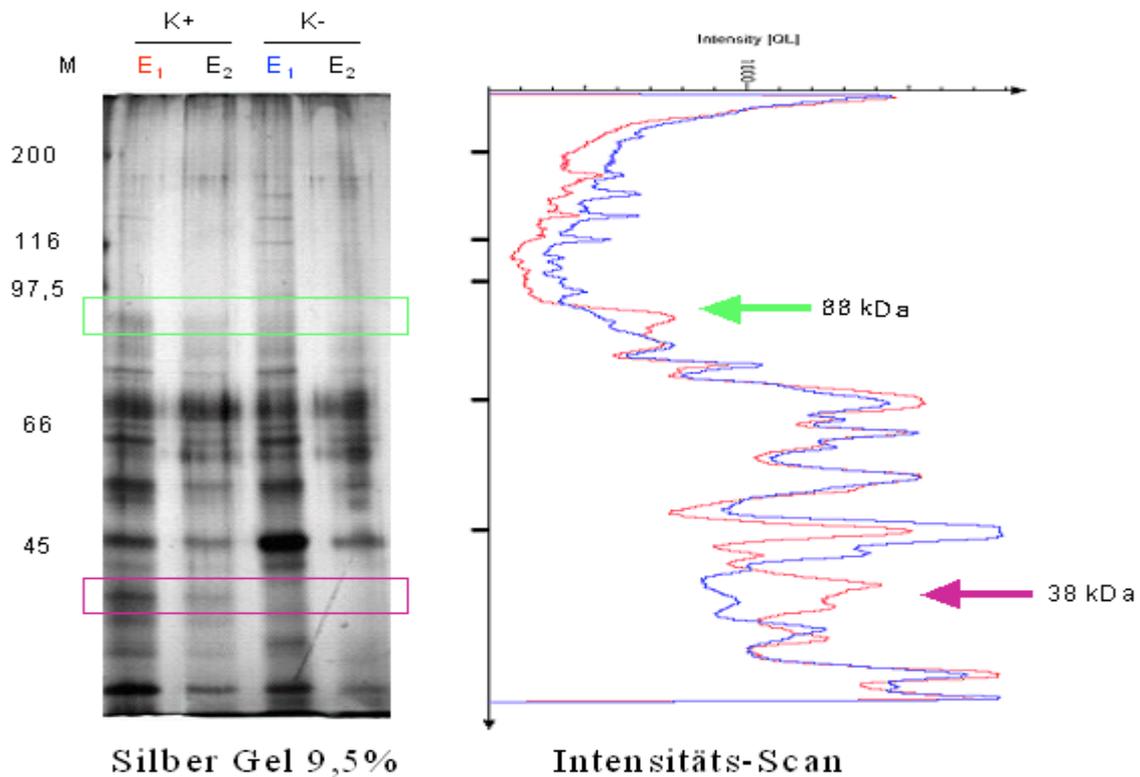


Abbildung 18: Intensitätsanalyse eines *M. genitalium* Pull-down-Assays. Die Elutionen zweier Ansätze (+ 0,15mg Mgen HinT^r an Sepharose, - Negativkontrolle) wurden nebeneinander in einem 9,5% SDS-Gel aufgetrennt und Silber gefärbt. Die Intensitäten der Banden wurden durch ein Computerprogramm eingescannt, analysiert und nebeneinander (Intensität gegen Molekulargewicht) abgebildet.

Abbildung 18 zeigt den hochmolekularen Bereich. Im Silbergel konnte erneut P38 detektiert werden, nach dem Intensitätsscan kam P88 als weiterer Interaktionskandidat zur Darstellung. Weitere Proteine, die eine Interaktion mit HinT eingegangen waren, konnten nicht eluiert werden. Leider standen für weitere Interaktionsstudien nicht genügend *M. genitalium*-Lysat zur Verfügung.

5. Diskussion

Im Rahmen der dieser Dissertation zu Grunde liegenden experimentellen Arbeiten wurde das HinT-Protein von vier (teils fakultativ) humanpathogenen Mykoplasmen charakterisiert. Schon in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *Mycoplasma hominis*, *M. genitalium* und *M. pneumoniae* HinT exprimieren (Henrich *et al.*, 2001, Kolter 2006). Die Expression des *Ureaplasma parvum* HinT wurde erstmalig in dieser Arbeit durch Immunfärbung mit dem polyklonalen Up-HinT-Serum nachgewiesen.

HinT ist ein zytosolisches Protein der Hit-Superfamilie. Das humane Hint1 wurde als Apoptose-triggernder Faktor (Weiske *et al.*; 2006) und Tumorsuppressor (Hassan *et al.*; 2009) charakterisiert. Korsiaari und Mekälä zeigten 2000 im Hefesystem, dass Hint1 mit einem Teil des generellen Transkriptionsfaktors TFIIH interagiert. HinT knock-out-Mäuse zeigten eine höhere Ovarial- und Mammakarzinomrate nach Exposition gegenüber Karzinogenen. HinT besitzt demnach in Eukaryoten unter anderem eine Rolle als Tumorsuppressor und Transkriptionsmodulator. In Prokaryoten wurde die Funktion von HinT unter anderem in *E. coli* näher beleuchtet. Wie Chou und Mitarbeiter 2005 zeigten, ist HinT in *E. coli* die einzige Purin Nukleosid Phosphoramidase und essentiell für das Wachstum der Bakterien unter hohen Salzbedingungen. Die Funktion von HinT in Mykoplasmen und Chlamydien wurde von der Mykoplasmen-Arbeitsgruppe am Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf charakterisiert.

Proteininteraktionen der im *hit*-Lokus von *M. hominis* kodierten Proteine - P60, P80 und HinT - waren analysiert worden. Es konnte mittels Biacore-Analysen gezeigt werden, dass die polycistronisch exprimierten Proteine auch in Interaktion zueinander stehen. Das zytoplasmatische HinT interagiert mit der P80-Domäne des membranständigen P60-P80-Proteinkomplexes. Das reife P80-Protein (ohne N-Terminus) hingegen wird in den Überstand sezerniert (Kitzerow & Henrich, 2001). Ob HinT über die Interaktion mit P80 die Sekretion des reifen Proteins beeinflusst – also triggert oder inhibiert – bleibt noch zu untersuchen. Die nachgewiesenen Interaktionen legten nahe, dass der Komplex Teil einer Signalkaskade sein könnte. Proteine, die ihrerseits - auf zytoplasmatischer Seite oder an anderer Stelle in der Membran lokalisiert - mit HinT interagieren, könnten diese Kaskade beeinflussen. In dieser Arbeit wurden weitere Interaktionspartner von HinT identifiziert, die generell als zytoplasmatisch lokalisiert beschrieben sind, in einigen Mykoplasmen jedoch auch membranassoziiert gefunden wurden (siehe unten).

Da für *M. hominis* eine Interaktion mit dem im *hit*-Lokus polycistronisch exprimierten P-80 Protein nachgewiesen werden konnte (Kitzerow & Henrich, 2001), wurden die

5. Diskussion

Ergebnisse daraufhin analysiert, ob sich auch in den anderen vier teils fakultativ humanpathogenen Mykoplasmen solche Interaktionen abzeichnen. Tabelle 1 gibt eine Übersicht der *hit*-Lokus kodierten Proteine der untersuchten Organismen.

Tabelle 1: *hit*-Lokus kodierte Proteine der vier analysierten Mykoplasmen.

Organismus	Hit-Lokus kodierte Proteine			
<i>M. hominis</i>	HinT	P60	P80	
<i>M. pneumoniae</i>	HinT	<i>MPN_274 (31kDa)</i>		
<i>M. genitalium</i>	HinT	<i>MG_133 (27kDa)</i>		
<i>U. parvum / urealyticum</i>	HinT	<i>U_270 (26kDa)</i>	<i>U_271 (55kDa)</i>	<i>U_273 (30kDa)</i>

verifizierte Interaktionen mit HinT sind fett markiert und mögliche Interaktionen kursiv.

Im *hit*-Lokus von *M. pneumoniae* ist neben HinT das fakultativ porenbildende Membranprotein MPN_274 mit einem errechneten Molekulargewicht von ca. 31kDa kodiert. Es ist eine putative ABC-Transporter-Permeaseuntereinheit (Molligen 3.0). Im Pull-down-Assay konnte ein 31 kDa HinT-bindendes Protein, P31, identifiziert werden. Ob es sich hierbei um MPN_274 handelt, muss noch bestätigt werden. Das im *M. genitalium* hit-Lokus kodierte MG_133 ist ein hypothetisches Protein mit fünf Transmembrandomänen und einem Molekulargewicht von ca. 27kDa. Eine entsprechende Proteinbande konnte in den Analysen nicht detektiert werden. Für beide Proteine, MPN_274 und MG_133 ist anzumerken, dass sie mit sieben bzw. fünf Transmembranregionen in detergentenfreiem Milieu nicht löslich sind. Im *hit*-Lokus von *U. parvum/urealyticum* sind neben HinT drei weitere Proteine - U_270 (26kDa), U_271 (55kDa) und U_273 (30kDa) - kodiert. Im Pull-down-Assay und der Quervernetzer-Studie war ein Protein bei ca. 53kDa detektiert worden, welches möglicherweise das hypothetische U_271 darstellt. Das vom Gen abzuleitende Protein ist wahrscheinlich membranständig, da es über drei Transmembrandomänen verfügt. Dass die Interaktion zwischen HinT und P53 im Pull-down-Assay ohne Detergenz deutlicher nachzuweisen war als mit, spricht jedoch eher dagegen, dass es sich bei P53 um ein Membranprotein (wie U_271) handelt. Die Proteinlysate für die Quervernetzer-Studie wurden jedoch mit Detergenz aufgearbeitet. So könnte es sich hier bei P53 um U_271 handeln. Gestützt wird diese Vermutung noch durch die Sequenzhomologien von U_271 zu P60 von *Mycoplasma hominis* und dadurch, dass U_271, wie das HinT-interagierende P80-Protein von *M. hominis* als Vorläuferprotein exprimiert wird, über eine SPase I Schnittstelle verfügt

5. Diskussion

(Hopfe *et al.*, 2005). Eine U_270 oder U_273 entsprechende Proteinbande konnte in den Analysen nicht detektiert werden.

Um die Funktionen von HinT in den zellwandlosen Bakterien umfassend zu charakterisieren, standen nicht nur die hit-Lokus kodierten Proteine im Fokus. Deshalb waren die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente so angelegt, dass weitere zytoplasmatische aber auch membranständige Proteine als HinT-interagierend identifiziert werden konnten. Insgesamt neun verschiedene HinT-Interaktionspartner wurden mittels nachgeschalteter massenspektrometrischer Analyse (ESI-MS) identifiziert. Überraschenderweise besaßen alle neun Proteine enzymatische Aktivität. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die beschriebenen Lokalisationen dieser Proteine innerhalb der Mykoplasmen und deren Funktion.

Tabelle 4: Lokalisation und Funktion der identifizierten Interaktionspartner.

	Lokalisation	Funktion
EF-Tu	zytosolisch Membranoberfläche	Translation (Energieverbrauch) Fibronectin-bindend (Balasubramanian et al., 2008)
EF-TS	zytosolisch	Translation (Energieverbrauch) Chaperonfunktion für EF-Tu (Krab et al., 2001)
50S-RP-L4	zytosolisch	Translation (Energieverbrauch) Teil des Peptid Exit Tunnels (O'Connor et al., 2004)
50S-RP-L1	zytosolisch	Translation (Energieverbrauch) Interagiert mit deazylierter t-RNA (Cornish et al., 2008)
RNA-polymerase	zytosolisch	Transkription (Energieverbrauch)
GAPDH	zytosolisch Membranoberfläche	Glykolyse, Karbohydrat-Metabolismus (Energieproduktion) Mucin-bindend (Alvarez et al., 2003), Fibrinogen-bindend (Dumke et. al, 2011)
Arginin Deiminase	zytosolisch membranständig	Arginine-Abbau (Energieproduktion) Enzymatische Aktivität geringer (Lin 1986)
NADH-Oxidase	membranständig innere Membranseite	oxidative Phosphorylierung ($\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+$) Karbohydrat-Metabolismus
Acetatkinase	zytosolisch	Phosphorylierung ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{Pi}$) Energie-Metabolismus

Grün hinterlegt sind Enzyme der Proteinbiosynthese, blau hinterlegte Enzyme sind an der Bereitstellung von Energie beteiligt, und die rot hinterlegten Interaktionspartner haben phosphorylierende Eigenschaften.

5. Diskussion

Die identifizierten Proteine können in drei funktionelle Gruppen aufgeteilt werden. Die größte Gruppe bilden der Elongations-Faktor-Tu (EF-Tu), der Elongations-Faktor-Ts (EF-Ts), das 50S ribosomale Protein L1 (50S-RP-L1), das 50S ribosomale Protein L4 (50S-RP-L4) und die DNA-abhängige RNA-Polymerase. Die fünf Enzyme sind an der Proteinbiosynthese, einem energieverbrauchenden Prozess, beteiligt. Diese Proteine sind alle im Zytoplasma der Organismen aktiv. Der Elongations-Faktor-Tu von *M. pneumoniae* ist zusätzlich in einer membranständigen Form nachgewiesen worden. In dieser Lokalisation verfügt er auch über eine Fibronectin-bindende Funktion, welche über eine oberflächenexponierte Karboxyl-region vermittelt wird (Balasubramanian *et al.*, 2008.). Mit Ausnahme der DNA-abhängigen RNA-Polymerase, die ein Enzym der Transkription ist, katalysieren die Proteine der ersten Gruppe die Translation.

Die zweite Gruppe bilden die Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Arginindeiminase (Adi). Beide sind an der Energieproduktion im Stoffwechsel der Mykoplasmen beteiligt. Bei *M. hominis* wird der Energiebedarf zum Hauptteil durch die Verstoffwechselung von Arginin bereitgestellt, woran die Arginindeiminase beteiligt ist. In Mykoplasmen sind die GAPDH und die Arginindeiminase hauptsächlich zytoplasmatische Proteine. Dumke und Mitarbeiter identifizierten 2011 eine fibrinogenbindende oberflächenlokalisierte Form der GAPDH in *M. pneumoniae* und Alvarez und Mitarbeiter zeigten 2003, dass die *M. genitalium* die GAPDH auch in einer membrangebundenen, oberflächenlokalisierten Form existiert und hier an der Mucinbindung beteiligt ist. Bei *M. hominis* wurde eine Isoform der Arginindeiminase in der Membran lokalisiert (Lin, 1986).

Im Pull-down-Assay von *M. genitalium* HinT^r wurde ein Protein von 37kDa –entsprechend der *M. genitalium* GAPDH – eluiert, die Interaktion von Mgen HinT mit P37 zeigte auch G. Kolter 2006 im Rahmen ihrer Diplomarbeit. Ob *M. genitalium* HinT tatsächlich mit der *M. genitalium* GAPDH interagiert, könnte mit immunologischen Methoden, beispielsweise mit einem GAPDH Antikörper, untersucht werden.

Die Enzyme der dritten Gruppe, die NADH-Oxidase und die Acetatkinase, spielen eine Rolle bei der Phosphorylierung. Die NADH-Oxidase ist an der Membraninnenseite (Klömkes *et al.*; 1985) und die Acetatkinase im Zytoplasma lokalisiert (Muhlrad *et al.*; 1981).

Die Interaktion des *M. hominis* HinT mit der Arginindeiminase wurde nach Identifizierung des Proteins aus der Quervernetzer-Studie noch durch einen weiteren Versuchsaufbau verifiziert, die Immunopräzipitation nach in vitro Translation. Die Arginindeiminase gehört zu der Familie der Hydrolasen und katalysiert die Reaktion: L-Arginin + H₂O \rightleftharpoons L-Citrullin + NH₃. Die Verstoffwechselung von Arginin stellt für das nicht fermentative *M. hominis* eine

5. Diskussion

alternative Energiequelle dar (Fenske *et al.*, 1976), jedoch zeigte Vinther 1983, dass dieser Stoffwechselweg nicht den Haupt-ATP-Bedarf des Organismus deckt. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass die Arginindeiminase neben der Stoffwechselaktivität weitere Funktionen in *M. hominis* übernimmt, die über die Interaktion mit HinT vermittelt sein könnten. Das Enzym wurde bei *M. hominis* in einer zytoplasmatischen und in einer weniger enzymatisch aktiven membrangebundenen Form beschrieben (Lin, 1986). Es bleibt in diesem Kontext noch zu klären, ob HinT mit der zytosolischen oder mit der membranassoziierten Form der Arginindeiminase interagiert. Die Quervernetzer-Studie wurde mit Proteinlysate nach Detergenzbehandlung durchgeführt. Falls sich eine Interaktion der membranständigen Arginindeiminase mit HinT nachweisen ließe, wäre dies eine weitere – neben der bekannten Interaktion von HinT mit dem P60/P80-Komplex - denkbaren Signalkaskade, über welche HinT Prozesse außerhalb der Zelle beeinflussen könnte oder Prozesse außerhalb der Zelle auf HinT einwirken könnten. *M. hominis* wäre nicht der erste Prokaryot, bei dem neben der Stoffwechselaktivität weitere Funktionen der Adi beschrieben wurden. Wu & Xie konnten bei *Streptococcus cristatus* die oberflächen-lokalisierte Adi als Inhibitor der Biofilmbildung von *Porphyromonas gingivalis* charakterisieren und zeigen, dass die Arginindeiminase in der Lage ist, die Expression von FimA – ein Fimbrinprotein von *P. gingivalis* – zu inhibieren (Wu & Xie, 2010).

Auch die Glyzeralaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) - identifiziert als Interaktionspartner von *M. hominis* und *M. pneumoniae* HinT^r - ist ein Enzym des Energiestoffwechsels. Sie katalysiert den sechsten Schritt der Glykolyse. Die Enzyme des EMP-Stoffwechselweges sind im *M. hominis*-Genom nicht vollständig kodiert, es fehlt das 6-Phosphofruktokinase-Gen (Pereyre *et al.*, 2009). Das Genom von *M. pneumoniae*, ein fermentierendes Bakterium, kodiert für alle Enzyme der Glykolyse (Miles *et al.*, 1992). Doch auch die Funktion der GAPDH scheint nicht auf die Energieproduktion beschränkt zu sein. In *M. genitalium* wurde sie ebenfalls in einer membranassoziierten Form beschrieben: 2003 zeigten Alvarez und Mitarbeiter, dass die in *M. genitalium* oberflächen-lokalisierte Form der GAPDH an Mucin bindet und diskutierten sie als einen möglichen Adhäsionsfaktor. Auch in anderen Prokaryoten wird die GAPDH als ein Oberflächenantigen beschrieben, wie beispielsweise bei B Streptokokken. Hier interagiert sie mit humanem Plasminogen, Aktin und Fibrinogen (Seifert *et al.*, 2003). Die GAPDH ist folglich auch als Pathogenitätsfaktor anzusehen. Aktuell konnte auch bei *M. pneumoniae* eine Fibrinogen-bindende, oberflächenlokalisierte Form der GAPDH nachgewiesen werden. Die Bindung der Bakterien an humane Zelllinien konnte durch die Zugabe eines spezifischen Anti-GAPDH Serum

5. Diskussion

inhibiert werden (Dumke *et al.*; 2011). Dies zeigte, dass die *M. pneumoniae* GAPDH eine Rolle bei der Besiedelung der humanen Epithelien spielen könnte. Eine oberflächenlokalisierte Form der GAPDH ist für *M. hominis* noch nicht nachgewiesen worden, Untersuchungen in diese Richtung wären sinnvoll. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass sich die Interaktion zwischen *M. pneumoniae* HinT^r und der GAPDH durch die Zugabe von Detergenz verstärken ließ, was auf eine Membranassoziation der mit HinT interagierenden GAPDH hinweist (siehe Kapitel 4.7). So ist HinT in Mykoplasmen schon mit vier membranassoziierten Proteinen - P80, GAPDH und EF-Tu und Arginindeiminase - in Verbindung zu bringen. Über Interaktion mit diesen Proteinen könnte das zytoplasmatische HinT Prozesse außerhalb der Zelle – wie die Exkretion des P80 und Zytoadhärenz über die membranlokalisierten Formen der GAPDH oder des EF-TU - beeinflussen und somit die Pathogenität der Mykoplasmen verändern.

Die HinT interagierende Acetatkinase ist ein zytosolisches Enzym des Acetatkinase-Phosphotransacetylase-Stoffwechselweges, an dessen Ende die Produktion von Acetyl-CoA steht. Das *M. hominis*-Genom kodiert nicht für alle Enzyme dieses Stoffwechselweges. Die Rolle der Acetatkinase bei der Produktion von ATP wurde noch nicht abschließend beurteilt, wird aber von Pereyre 2009 als gering bezeichnet. Möglicherweise hat die Acetatkinase in *M. hominis* weitere Funktionen zu der Enzymaktivität übernommen. Für die Bakterien *M. pneumoniae*, *M. pulmonis* und *U. parvum* haben Pollak und Mitarbeiter 2002 diskutiert, dass die eigentlich essentielle Nukleosiddiphosphat-Kinaseaktivität (NDPK) unter anderem von der Acetatkinase übernommen würde. Diesen vier Organismen fehlt das sonst für die NDPK kodierende Gen (*ndk*), in diesen Organismen übernimmt die Acetatkinase eine bis dahin unbekannte Funktion. Welche Rolle die Interaktion der Acetatkinase mit HinT in *M. hominis* spielt, bleibt noch zu beleuchten. Vielleicht hat die Acetatkinase auch in *M. hominis* weitere bis jetzt unbekannte Funktionen übernommen, die durch HinT beeinflusst werden könnten. Ob HinT beispielsweise die enzymatische Aktivität der Acetatkinase beeinflussen kann, könnte mittels Enzym-Assays überprüft werden.

Die NADH-Oxidase konnte als *M. pneumoniae* HinT^r interagierendes Protein identifiziert werden. Sie ist ein flavinhaltiges Enzym und katalysiert in Mykoplasmen die Übertragung von Elektronen von NADH auf Sauerstoff. Der NADH-Pool ist ein zentraler Speicher für Elektronen, die im Zusammenhang mit dem Pyrimidinstoffwechsel produziert werden. Der Elektronentransfer vom NADH zu anderen Molekülen produziert NAD⁺, welches eine wichtige Rolle im Intermediärstoffwechsel spielt. Ohne die Bereitstellung von NAD⁺ kämen viele Stoffwechselwege zum Erliegen (Pollack, 1997). Miles konnte 1992 die NADH-

5. Diskussion

Oxidaseaktivität hauptsächlich in der löslichen Fraktion der Mykoplasmen nachweisen, was auf eine zytosolische Lokalisation des Enzyms hinweist. Welchen Einfluss die Interaktion mit HinT auf die NADH-Oxidase ausübt, bleibt noch zu erforschen.

Die weiteren identifizierten Interaktionspartner sind an Prozessen der Proteinexpression, also der Transkription (DNA-abhängige RNA-Polymerase) und Translation (50S-RP-L1, 50S-RP-L4, EF-Tu und EF-Ts) beteiligt. In eukaryotischen und prokaryotischen Organismen sind Interaktionen von Hint1 mit Proteinen der Transkription bereits nachgewiesen worden. Humanes Hint1 interagiert in einem Hefesystem mit der CDK7, die Teil des generellen Transkriptionsfaktors TFIIF ist, welches die C-terminale Hauptkinaseaktivität der RNA-Polymerase 2 beinhaltet. Auch für Hefezellen wurde eine Interaktion zwischen Hint1 und der Kin28, einem CDK7-Homolog, nachgewiesen (Brenner, 2002). Weiske und Huber zeigten 2006, dass das eukaryotische Hint1 über die Anlagerung an den Microphthalmie-assoziierten Transkriptionsfaktor eine Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und Transkription spielt. In Mykoplasmen scheint diese transkriptionsbeeinflussende Funktion von HinT konserviert und zeigt sich hier in der Interaktion von HinT mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase.

Das in Säugetierzellen vorkommende DcpS (ein scavenger decapping Enzym) wurde als Protein der Hit-Superfamilie identifiziert. Über die Abspaltung der Kappe ist es am Abbau von mRNA beteiligt. Die Geschwindigkeit des mRNA-Abbaus bestimmt deren Halbwertszeiten und ist eine entscheidende Einflussgröße für die Regulation der Genexpression. Liu und Mitarbeiter zeigten 2002, dass die decapping-Funktion der DcpS über das Hit-Motiv vermittelt wird. In Hefezellen konnten zwei DcpS analoge Proteine nachgewiesen werden, die beide ein Hit-Motiv aufweisen (Liu *et al.*, 2002). Über die Interaktion mit den Proteinen 50S-RP-L1, 50S-RP-L4, EF-Tu und EF-Ts könnte HinT in Mykoplasmen - wie das DcpS - die Genexpression anderer Proteine regulieren. In diesem Fall würde der Einfluss bereits während der Translation stattfinden. Möglicherweise ist das Hit-Motiv auch hier an der Bindung von mRNA Molekülen beteiligt. Welchen Effekt HinT auf die Translation ausübt, und ob es sich um einen selektiven Prozess für die Expression bestimmter Proteine oder einen Effekt auf die Proteinbiosynthese im allgemeinen handelt, muss noch näher untersucht werden. Die Funktion des EF-Tu ist in Mykoplasmen nicht auf die Translation beschränkt. Balasubramanian und Mitarbeiter konnten bei *M. pneumoniae* den EF-Tu in der Membran lokalisieren und zeigen, dass dort eine Bindung an Fibronectin stattfindet. Diese Eigenschaft konnte beim EF-Tu von *M. genitalium* trotz 96%iger Homologie nicht nachgewiesen werden (Balasubramanian *et al.*, 2009). Bei *M. hominis* ist der EF-Tu im Zytoplasma lokalisiert und

5. Diskussion

besitzt keine zytadhärenten Eigenschaften (Henrich *et al.*; 1993). Ob er auch in einer oberflächenlokalisierten existiert Form wurde nicht analysiert.

Die Beeinflussung der Proteinproduktion durch Proteine der Hit-Superfamilie ist in eukaryotischen Organismen schon länger bekannt (Beeinflussung der RNA-Polymerase 2 durch humanes HinT, Korsisaari *et al.*, 2000). Das hochkonservierte Hit-Motiv weist darin eine konservierte Funktion auf. Die Verbindung von Energiestoffwechsel und Zytadhärenz, die nach der Analyse der identifizierten Interaktionspartner als Funktion von HinT in *M. pneumoniae* und *M. hominis* hergestellt werden konnte, deutet auf Funktionen von HinT hin, die bis dato nicht beschrieben waren. Eventuell handelt es sich hier um Mykoplasmen-spezifische Funktionen

Interessant ist die Verbindung zwischen dem zytosolischen HinT und den in einigen Mykoplasmen membranassoziierten Proteinen P80 (*M. hominis*, Kitzerow *et al.*, 2001), EF-Tu (*M. pneumoniae* und *M. genitalium*, Balasubramanian *et al.*, 2009), GAPDH (*M. pneumoniae*, Dumke *et al.*, 2011; *M. genitalium*, Alvarez *et al.*, 2003) und Arginindeiminase (*M. hominis*, Lin, 1986). Diese Proteine könnten gemeinsam mit HinT Teil einer Signalkaskade sein. Zu untersuchen bleibt, ob über die Kaskade das zytosolische HinT die membranständigen Proteine beeinflusst und somit möglicherweise die Pathogenität der Organismen verändert, oder ob Signale außerhalb der Zelle über die membranständigen Proteine an das zytoplasmatische HinT weitergegeben werden und somit Reaktionen innerhalb des Organismus anregen oder inhibieren können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einige, in Prokaryoten bis jetzt unbekannte, Interaktionen von HinT in Mykoplasmen auf. Dass HinT gerade in Mykoplasmen mit so unterschiedlichen Prozessen in Verbindung steht, könnte Ergebnis der reduktiven Entwicklungsgeschichte dieser zellwandlosen Bakterien sein, die bedingt, dass ein Protein mehrere Aufgaben innerhalb der Organismen übernehmen muss. Die Zusammenhänge weiter zu beleuchten, wird dazu beitragen, die patho-physiologischen Prozesse bei Infektionen mit einem dieser kleinsten, sich selbst replizierenden Bakterien zu verstehen.

6. Zusammenfassung

Anknüpfend an die Forschungsergebnisse der Mykoplasmen-Arbeitsgruppe am Institut für Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sollten putative Interaktionspartner der HinT Proteine der (z.T. fakultativ) humanpathogenen eng miteinander verwandten *Mollicutes Mycoplasma hominis*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae* und *Ureaplasma parvum* charakterisiert werden. Aufgrund der generell sehr begrenzten Genomausstattung der *Mollicutes* eignen sie sich besonders als Modellorganismen zur Analyse von Proteininteraktionen.

Die Hit-Superfamilie beinhaltet nukleotid-bindende Proteine mit einer absolut konservierten Sequenz über sieben Aminosäuren (Seraphin, 1992). Proteininteraktionen der im Hit-Lokus von *M. hominis* kodierten Proteine - P60, P80 und HinT - waren von der oben genannten Mykoplasmen-Arbeitsgruppe analysiert worden. Das zytoplasmatische HinT interagiert mit der P80-Domäne des membranständigen P60-P80-Proteinkomplexes. Das reife P80-Protein (ohne N-Terminus) wird in den Überstand sezerniert (Kitzerow & Henrich, 2001).

Durch die Interaktionsstudien gelang es, insgesamt neun verschiedene Proteine unter den möglichen Interaktionspartnern mittels ESI-MS zu identifizieren. Alle identifizierten HinT-interagierenden Proteine sind Enzyme und lassen sich in drei Gruppen einteilen: (1) Elongations-Faktor-Tu, Elongations-Faktor-Ts, 50S ribosomales Protein L1, 50S ribosomales Protein L4 und DNA-abhängige RNA-Polymerase sind Proteine der Proteinbiosynthese; (2) Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase und Arginindeiminase (Adi) sind an der Energieproduktion im Stoffwechsel der Mykoplasmen beteiligt; (3) NADH-Oxidase und Acetatkinase spielen eine Rolle bei der Phosphorylierung. Bei drei der identifizierten Enzyme ist in einigen Mykoplasmen membranassoziierte Formen des Proteins beschrieben: (1) EF-Tu in *M. pneumoniae* und *M. genitalium* hier Fibronectin-bindend (Balasubramanian *et al.*, 2009), (2) GAPDH in *M. genitalium* hier Mucin-bindend (Alvarez *et al.*, 2003), sowie in *M. pneumoniae* hier Fibriogen-bindend (Dumke *et al.*, 2011) und (3) Arginindeiminase in *M. hominis* (Lin, 1986). Möglicherweise sind diese Proteine gemeinsam mit HinT Teil einer Signalkaskade, in der das zytosolische HinT membranständige Pathogenitätsfaktoren beeinflussen könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen mit Verbindung zum Energiestoffwechsel und zur Zytadhärenz - in Prokaryoten bis jetzt unbekannte - mögliche Funktionen von HinT in Mykoplasmen auf und könnten das Ergebnis der reduktiven Entwicklungsgeschichte dieser zellwandlosen Bakterien sein, die bedingt, dass ein Protein mehrere Aufgaben innerhalb der Organismen übernehmen muss.

7. Literaturverzeichnis

Alvarez, R. A., Blaylock, M. W., Baseman, J. B. (2003)

Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin

Mol Microbiol. **48** (5):1417-25.

Balasubramanian, S., Kannan, T. R., Baseman, J. B. (2008)

The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumoniae* elongation factor Tu interacts with fibronectin.

Infect Immun. **76** (7):3116-23. Epub 2008 Apr 14.

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** (2):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

Bradford, M.M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of Protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem. **72**:248-254

Brenner, C., Bieganowski, P., Pace, H. C., Huebner, K. (1999)

The histidine triad superfamily of nucleotide-binding proteins.

J Cell Physiol. **181** (2):179-87.

Brenner, C. (2002)

Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases.

Biochemistry. **41** (29):9003-9014

Chou, T.F., Bieganowski, P., Shilinski, K., Cheng, J., Brenner, C., Wagner, C.R. (2005)

³¹P NMR and genetic analysis establish hinT as the only *Escherichia coli* purine nucleoside phosphoramidase and as essential for growth under high salt conditions.

J Biol Chem. **280** (15):15356-15361

O'Connor, M., Gregory, S. T., Dahlberg, A. E. (2004)

Multiple defects in translation associated with altered ribosomal protein L4

Nucleic Acids Res. **32** (19):5750-6. Print 2004.

Cornish, P. V., Ermolenko, D. N., Staple, D. W., Hoang, L., Hickerson, R. P., Noller, H. F., Ha, T. (2009)

Following movement of the L1 stalk between three functional states in single ribosomes

Proc Natl Acad Sci U S A. **106** (8):2571-6. Epub 2009 Feb 3.

7. Literaturverzeichnis

Dallo, S.F., Su, C.J., Horton, J.R., Baseman, J.B. (1988)

Identification of P1 gene domain containing epitope(s) mediating *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence.

J Exp Med. **167** (2):718-23

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** (14):8946-51

Dumke, R., Hausner, M., Jacobs, E. (2011)

Role of *Mycoplasma pneumoniae* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in mediating interactions with the human extracellular matrix.

Microbiology **157** (Pt 8):2328-38

Fenske, J. D., Kenny, G. E. (1976)

Role of Arginine Deiminase in Growth of *Mycoplasma hominis*

J Bacteriol. **126** (1):501-10.

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., Fritchman, R.D., Weidman, J.F., Small, K.V., Sandusky, M., Fuhrmann, J., Nguyen, D., Utterback, T.R., Saudek, D.M., Phillips, C.A., Merrick, J.M., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Bott, K.F., Hu, P.C., Lucier, T.S., Peterson, S.N., Smith, H.O., Hutchison, C.A. 3rd, Venter, J.C. (1995)

The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*.

Science. **270** (5235):397-403

Glass, J.I., Assad-Garcia, N., Alperovich, N., Yooseph, S., Lewis, M.R., Maruf, M., Hutchison, C.A. 3rd, Smith, H.O., Venter, J.C. (2006)

Essential genes of a minimal bacterium.

Proc Natl Acad Sci U S A. **103** (2):425-430

Glass, J.I., Lefkowitz, E.J., Glass, J.S., Heiner, C.R., Chen, E.Y., Cassell, G.H. (2000)

The complete sequence of the mucosomal pathogen *Ureaplasma urealyticum*.

Nature. **407** (6805): 757-762

Hanahan, D. (1983)

Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.

J Mol Biol. **166** (4):557-580

Henrich, B., Feldmann, R.C., Hadding, U. (1993)

Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*.

Infect Immun. **61** (7):2945-2951

Henrich, B., Kitzerow, A., Feldmann, R.C., Schaal, H., Hadding, U. (1996)

Repetitive elements of the *Mycoplasma hominis* adhesin p50 can be differentiated by monoclonal antibodies.

Infect Immun. **64** (10):4027-4034

7. Literaturverzeichnis

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** (16):4873-4878

Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H. Pirkl, E., Li, B.C., Herrmann, R. (1996)

Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*.

Nucleic Acids Res. **24** (22): 4420-4449

Hirano, M., Furiya, Y., Kariya, S., Nishiwaki, T., Ueno, S. (2004)

Loss of function mechanism in aprataxin-related early-onset ataxia.

Biochem Biophys Res Commun. **322** (2):380-6.

Hassan, M. I., Naiyer, A., Ahmad, F. (2010)

Fragile histidine triad protein: structure, function and its association with tumorigenesis

J Cancer Res Clin Oncol. **136** (3):333-50. Epub 2009 Dec 24.

Hopfe, M., Hegemann, J.H., Henrich, B. (2005)

HinT and their putative interaction partners in *Mollicutes* and *Chlamydiaceae*.

BMC Microbiol. **5**(1): 27

Korsisaari, N., Mäkelä, T.P. (2000)

Interactions of Cdk7 and Kin28 with Hint/PKCI-1 and Hnt1 histidine triad proteins.

J Biol Chem. **275** (45):34837-34840

Kijas, A. W., Harris, J. L., Harris, J. M., Lavin, M. F. (2006)

Aprataxin forms a discrete branch in the HIT (histidine triad) superfamily of proteins with both DNA/RNA binding and nucleotide hydrolase activities.

J Biol Chem. **281** (20):13939-48. Epub 2006 Mar 16.

Kitzerow, A., Henrich, B. (2001)

The cytosolic HinT protein of *Mycoplasma hominis* interacts with two membrane proteins.

Mol Microbiol. **41** (1):279-287

Klömkes, M., Altdorf, R., Ohlenbusch, H. D. (1985)

Purification and properties of an FAD-containing NADH oxidase from *Mycoplasma capricolum*

Biol Chem Hoppe Seyler. **366** (10):963-9

Krab, I. M., te Biesebeke, R., Bernardi, A., Parmeggiani, A. (2001)

Elongation factor Ts can act as a steric chaperone by increasing the solubility of nucleotide binding-impaired elongation factor-Tu.

Biochemistry. **40** (29):8531-5.

Laemmli, U.K. (1970)

Cleavage of the structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature. **277**:680-685

7. Literaturverzeichnis

Lin, J. S. (1986)

Arginine deiminase of *Mycoplasma hominis*: cytoplasmic and membrane-associated forms. *Sex Transm Dis.* **10** (4 Suppl):244-6.

Liu, H., Rodgers, N. D., Jiao, X., Kiledjian, M. (2002)

The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.* **21** (17):4699-708.

Merril, C.R. (1990)

Gel-staining techniques. *Methods Enzymol.* **182**:477-488

Miles, R. J. (2002)

Catabolism in mollicutes. *J Gen Microbiol.* **138** (9):1773-83.

Miles, L.E.M., Hales, C.N. (1968)

Labeled antibodies and immunological assay system. *Nature* **219**:186-189

Muhlrad, A., Peleg, I., Robertson, J. A., Robinson, I. M., Kahane, I. (1981)

Acetate kinase activity in mycoplasmas. *J Bacteriol.* **147** (1):271-3

Nussbaum, S., Lysnyansky, I., Sachse, K., Levisohn, S., Yogev, D. (2002)

Extended repertoire of genes encoding variable surface lipoproteins in *Mycoplasma bovis* strains. *Infect Immun.* **70** (4):2220-5

Pereyre, S., Sirand-Pugnet, P., Beven, L., Alain Charron, A., Renaudin, H., Barre, A., Avenaude, P., Jacob, D., Couloux, A., Barbe, V., de Daruvar, A., Blanchard, A., Bebear, C. (2009)

Life on Arginine for *Mycoplasma hominis*: Clues from Its Minimal Genome and Comparison with Other Human Urogenital Mycoplasmas. *PLoS Genet.* **5** (10):e1000677. Epub 2009 Oct 9

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** (4):269-354.

Pollack, J. D., Myers, M. A., Dandekar, T., Herrmann, R. (2002)

Suspected utility of enzymes with multiple activities in the small genome *Mycoplasma* species: the replacement of the missing "household" nucleoside diphosphate kinase gene and activity by glycolytic kinases. *OMICS.* **6** (3):247-58.

7. Literaturverzeichnis

Razin, E., Zhang, Z.C., Nechushtan, H., Frenkel, S., Lee, Y.N., Arudchandran, R., Rivera, J. (1999)

Suppression of microphthalmia transcriptional activity by its association with protein kinase C-interacting protein 1 in mast cells.
J Biol Chem. **274** (48):34272-34276

Razin, S. (1992)

Peculiar properties of mycoplasmas: The smallest self-replicating prokaryotes
FEMS Microbiol Lett. **79** (1-3):423-31.

Razin, S., Yogeve, D., Naot, Y. (1998)

Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.
Microbiol Mol Biol Rev. **62** (4):1094-1156 Review.

Razin, S., Hayflick, L. (2010)

Highlights of mycoplasma research - an historical perspective.
Biologicals **38** (2):183-90

Rodrigues, M. M., Fernandes, P. Á., Haddad, J. P., Paiva, M. C., Souza Mdo, C., Andrade, T. C., Fernandes, A. P. (2011)

Frequency of Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, Mycoplasma genitalium, Mycoplasma hominis and Ureaplasma species in cervical samples.
J Obstet Gynaecol. **31** (3):237-41

Rottem, S. (2003)

Interaction of mycoplasmas with host cells.
Physiol Rev. **83** (2):417-432

Seifert, K. N., McArthur, W. P., Bleiweis, A. S., Brady, L.J. (2003)

Characterization of group B streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: surface localization, enzymatic activity, and protein-protein interactions
Can J Microbiol. **49** (5):350-6.

Seraphin, B. (1992)

The HIT protein family: a new family of proteins present in prokaryotes, yeast and mammals.
DNA Seq. **3** (3):177-179

Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J. (1979).

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications.
Proc.Natl.Acad. Sci. **76**:4350-4354

Vinther, O. (1983)

Biochemistry of Mycoplasma hominis.
Sex Transm Dis. **10** (4 Suppl):244-6.

Waites, K. B., Talkington, D. F. (2004)

Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen.
Clin Microbiol Rev. **17** (4):697-728, table of contents.

7. Literaturverzeichnis

Waites, K.B., Katz, B., Schelonka, R. L. (2005)

Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens.
Clin Microbiol Rev. **18** (4):757-89.

Weiske, J., Huber, O. (2006)

The histidine triad protein Hint1 triggers apoptosis independent of its enzymatic activity.
J Biol Chem. 2006 **281** (37):27356-66. Epub 2006 Jul 11.

Wu, J., Xie, H. (2010)

Role of arginine deiminase of Streptococcus cristatus in Porphyromonas gingivalis
colonization
Antimicrob Agents Chemother. **54** (11):4694-8. Epub 2010 Jul 26.

Zhang, Q., Wise, K. S. (1996)

Molecular basis of size and antigenic variation of a Mycoplasma hominis adhesin encoded by
divergent vaa genes.
Infect Imm. **64** (7):2737-44

8. Danksagung

8. Danksagungen

Mein ganz besonderer Dank gebührt Frau Prof. Dr. Birgit Henrich für die spannende Themenstellung, die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, die intensive Betreuung, sowie zahlreiche Diskussionen und Anregungen, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Ulrich Germing danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Einen herzlichen Dank für zahlreiche Diskussionen, ein immer offenes Ohr und zudem eine ständige Hilfsbereitschaft möchte ich Dana Belick, Miriam Hopfe und Melanie Schwarz aussprechen.

Ich danke den Mitarbeitern des BMFZ der Universität Düsseldorf für die gute Zusammenarbeit zur Identifizierung der Proteinbanden.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene und des Institutes für Virologie für das angenehme Arbeitsklima, die wertvollen Tipps und die vielen netten Gespräche bedanken.

Des Weiteren danke ich meiner Familie und meinen Freunden für deren fortwährende Unterstützung und Ermutigung.

9. Abkürzungen

9. Abkürzungen

A	Adenin
A. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	zirka
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]- 1-Propan-Sulfonat
cm ²	Quadratcentimeter
CNBr	Cyan-Bromid
C-Terminus	Carboxy-terminales Ende
Dig	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-Phosphat
ECL	Luminol "enhanced chemiluminescence"
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	"enzyme-linked-immunosorbent assay"
<i>et al.</i>	und andere
Fhit	Fragiles Histidin-Triade Protein
g	Gramm
G	Guanin
GalT	Galaktose-1-Phosphat Uridylyltransferase
GMP	Guanidinmonophosphat
h	Stunde(n)

9. Abkürzungen

HinT	natives Histidin-Triade Nukleotid-bindendes Protein
HinT ^r	rekombinantes Histidin-Triade Nukleotid bindendes Protein
HPLC	„high performance liquid chromatography“
HRP	„horse radish peroxidase“ (Merrettich Peroxidase)
J	Joule
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani (Medium)
M	Molar
m	milli
mA	Milliampere
MALDI	„matrix assisted laser desorption/ionisation“
min	Minute(n)
MITF	Microphthalmia-Transkriptionsfaktor
μ	micro
MOPS	3-[N-Morpholino] propansulfonsäure
nm	Nanometer
NAP	„nucleic-acid-purification“
NaSCN	Natriumisothiocyanat
Ni ²⁺ -NTA	Nickel ²⁺ -Nitrilo-Triessigsäure
N-Terminus	Amino-terminales Ende
OD	optische Dichte
PBS	Physiologischer Phosphatpuffer (Phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
POX	Peroxidase
PPLO	„Pleuro-Pneumoniae-Like-Organism“
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SPase	Signalpeptidase

9. Abkürzungen

SSC	Saliner Sodium-Citrat-Puffer
Sulfo-SBED	Sulfosuccinimidyl[2-6-(biotinamido)-2-(p-azidobenzamido)-hexanoamido]-ethyl-1,3'-dithiopropionate
T	Thymin
TCA	Trichloressigsäure
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
TMB	3,3',5'5-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheiten)
UDP	Uracildiphosphat
UV	Ultraviolett
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
W	Watt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x g	mal Erdbeschleunigung
α	Anti
%	Prozent

