

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene  
der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. K. Pfeffer

**Vergleich der Oligopeptidpermeasen dreier verschiedener  
*Mycoplasma hominis* Isolate und Etablierung eines  
Infektionsassays zur weitergehenden Charakterisierung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Theresa Dahlmanns

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referentin: PD Dr. Henrich  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Fritz

*Für meine Eltern*

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Hopfe, Miriam; Dahlmanns, Theresa; Henrich, Birgit (2011): In *Mycoplasma hominis* the OppA-mediated cytoadhesion depends on its ATPase activity. In: *BMC Microbiology* 11 (1), S. 185.

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. EINLEITUNG</b>                                              | <b>1</b>  |
| 1.1 Eigenschaften von <i>Mycoplasma hominis</i>                   | 1         |
| 1.2 ABC Transporter                                               | 1         |
| 1.3 Intraspezies-Variationen von OppA                             | 3         |
| 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit                                     | 7         |
| <b>2. MATERIAL</b>                                                | <b>8</b>  |
| 2.1 Bakterienstämme                                               | 8         |
| 2.2 Vektoren                                                      | 8         |
| 2.3 Restriktionsenzyme                                            | 8         |
| 2.4 Membranen                                                     | 8         |
| 2.5 Kommerzielle Kits                                             | 8         |
| 2.6 Oligonukleotide (Primer)                                      | 9         |
| 2.7 Mastermixe                                                    | 10        |
| 2.8 Marker                                                        | 10        |
| 2.9 Puffer und Lösungen                                           | 10        |
| 2.10 Chemikalien                                                  | 11        |
| 2.11 Affinitätschromatographie                                    | 11        |
| 2.12 Geräte                                                       | 11        |
| <b>3. METHODEN</b>                                                | <b>13</b> |
| 3.1 Kultivierung von Zellen                                       | 13        |
| 3.1.1 Kultivierung von <i>Mycoplasma hominis</i>                  | 13        |
| 3.1.2 Kultivierung von HeLa-Zellen                                | 13        |
| 3.2 Aufbau des Infektionsassays                                   | 14        |
| 3.3 Nukleinsäurepräparationen                                     | 15        |
| 3.3.1 Guanidin/Cäsiumchlorid-Gradient                             | 15        |
| 3.3.2 RNA-Präparation mittels Trizol (Gibco BRL)                  | 15        |
| 3.3.3 RNA und DNA-Präparation mittels Phenol-Chloroformextraktion | 16        |
| 3.3.4 RNA-Präparation mittels RNeasy MiniKit von Qiagen           | 16        |

|             |                                                                      |           |
|-------------|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.5       | DNA-Präparation mittels Qiamap DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen     | 17        |
| 3.3.6       | Bakterienaufschluss durch Proteinase K-Behandlung                    | 18        |
| 3.3.7       | DNA-Präparation mittels EZ1 Aufreinigung                             | 18        |
| 3.3.8       | Aufreinigung von DNA-Fragmenten                                      | 18        |
| 3.3.9       | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen                      | 19        |
| 3.3.10      | DNase Behandlung der RNA-Proben                                      | 19        |
| <b>3.4</b>  | <b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b>                               | <b>19</b> |
| 3.4.1       | Konventionelle PCR                                                   | 19        |
| 3.4.1.1     | PCR zur Amplifikation großer, überlappender <i>oppA</i> Genbereiche  | 19        |
| 3.4.1.2     | Herstellung von <i>opp</i> Fragmenten zur späteren Klonierung        | 20        |
| 3.4.2       | Reverse Transkriptase (RT)-PCR                                       | 21        |
| 3.4.3       | Real-time PCR                                                        | 21        |
| <b>3.5</b>  | <b>Photometrische Messung von Nukleinsäurekonzentrationen</b>        | <b>22</b> |
| <b>3.6</b>  | <b>Sequenzierung</b>                                                 | <b>22</b> |
| <b>3.7</b>  | <b>Klonierung</b>                                                    | <b>23</b> |
| 3.7.1       | Herstellung kompetenter Zellen                                       | 23        |
| 3.7.2       | Ligation und Transformation                                          | 23        |
| 3.7.3       | Plasmid-Präparation                                                  | 24        |
| 3.7.4       | Standardisierung                                                     | 24        |
| <b>3.8</b>  | <b>Restriktion</b>                                                   | <b>24</b> |
| <b>3.9</b>  | <b>Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren</b>           | <b>25</b> |
| 3.9.1       | DNA-Auftrennung unter nativen Bedingungen (Agarose-Gel)              | 25        |
| 3.9.2       | RNA-Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen (Formaldehyd-Gel)  | 25        |
| <b>3.10</b> | <b>Herstellung und Testung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden</b> | <b>26</b> |
| <b>3.11</b> | <b>Southern Blot-Analyse</b>                                         | <b>27</b> |
| <b>3.12</b> | <b>Proteinchemische Methoden</b>                                     | <b>28</b> |
| 3.12.1      | Proteinaufreinigung                                                  | 28        |
| 3.12.2      | SDS-PAGE                                                             | 28        |
| 3.12.3      | Coomassie Blau-Färbung                                               | 29        |
| 3.12.4      | Western Blot-Analyse                                                 | 29        |
| 3.12.5      | Immunfärbung                                                         | 29        |
| <b>3.13</b> | <b>Massenspektrometrie</b>                                           | <b>30</b> |
| <b>3.14</b> | <b>Computerprogramme und Internetadressen</b>                        | <b>30</b> |

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. ERGEBNISSE</b>                                                                                  | <b>32</b> |
| <b>4.1 OppA Expression in verschiedenen <i>M. hominis</i> Isolaten auf Proteinebene</b>               | <b>32</b> |
| 4.1.1 Ausgangssituation                                                                               | 32        |
| 4.1.2 Die OppA-Sequenzen der <i>M. hominis</i> Isolate 64 und 66                                      | 33        |
| 4.1.3 Analyse der Isolate-spezifischen Proteinsequenzen von OppA                                      | 36        |
| <b>4.2 <i>oppA</i>, ein single-copy Gen</b>                                                           | <b>39</b> |
| <b>4.3 Etablierung eines Infektionsassays</b>                                                         | <b>42</b> |
| 4.3.1 Aufbau des Assays                                                                               | 42        |
| 4.3.2 Testung verschiedener RNA-Präparationen und DNA Extraktion                                      | 43        |
| 4.3.3 Optimierung der RNA - Präparationsmethode und reverse Transkription                             | 45        |
| 4.3.4 Quantitative real-time PCR                                                                      | 47        |
| <b>4.4 Charakterisierung der <i>opp</i> Expression in <i>M. hominis</i> auf mRNA-Ebene</b>            | <b>49</b> |
| 4.4.1 Analyse von genomischer DNA in der qPCR                                                         | 50        |
| 4.4.2 Unterschiede in der <i>opp</i> ABCD <sub>F</sub> Expression und Verhalten im zeitlichen Verlauf | 51        |
| 4.4.3 Relative Quantifizierung durch die „Delta-Delta-Methode“                                        | 52        |
| <b>5. DISKUSSION</b>                                                                                  | <b>55</b> |
| <b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>                                                                             | <b>67</b> |
| <b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>                                                                        | <b>68</b> |
| <b>8. ABKÜRZUNGEN</b>                                                                                 | <b>80</b> |

## 1. Einleitung

### 1.1 Eigenschaften von *Mycoplasma hominis*

*Mycoplasma hominis* ist ein Prokaryont und gehört zur Klasse der *Mollicutes*, zu der u.a. die Gattungen *Mycoplasma* und *Ureaplasma* gehören. *Mollicutes* sind zellwandlose Bakterien, die sich durch ihr kleines Genom (580 – 2200 kb) und einen geringen Anteil an Guanin und Cytosin (unter 30 %) auszeichnen (Clyde *et al.*, 1990). Bei der kompletten Sequenzierung des *M. hominis* Stammes PG21 fand sich ein minimales Genom von 537 annotierten Genen (Pereyre *et al.*, 2009). Dadurch bedingt sind Mycoplasmen nicht fähig, Stoffe wie Cholesterin, Fettsäuren, Purine und Pyrimidine sowie manche Aminosäuren selbst zu synthetisieren, sondern auf deren parasitäre Aufnahme angewiesen (Miles, 1992; Razin, 1993). *M. hominis* ist ein beim Menschen fakultativ pathogener Keim, der vor allem im Urogenitaltrakt vorkommt und hier bakterielle Vaginose, Spontanaborte, akute Pyelonephritis und entzündliche Beckenerkrankungen (Pelvic inflammatory disease, PID) hervorrufen kann (Waites und Talkington, 2005). Auch extragenitale Manifestationen in Form von Meningitis bei Kindern, Arthritis und Sepsis sind beschrieben (Ladefoged, 2000). Fallberichte von durch *M. hominis* verursachten Perikarditiden bei immunsupprimierten Patienten sind ebenfalls bekannt (Kenney *et al.*, 1993).

### 1.2 ABC Transporter

Da Mycoplasmen, wie oben beschrieben, aufgrund ihres kleinen Genoms nicht in der Lage sind, alle essentiellen Stoffe selbst zu synthetisieren (Miles, 1992; Razin, 1993), sind sie in besonderer Weise abhängig vom Import dieser Produkte mit Hilfe von Transportproteinen. Eine besondere Rolle nehmen hierbei die ABC- (ATP-Binding-Cassette-) Transporter ein. Diese membranständigen Proteinkomplexe, die bei Eukaryonten, Prokaryonten und Archaea vorkommen, bestehen im Falle der Oligopeptidpermeasen aus zwei Transmembrandomänen (OppBC) und zwei nukleotidbindenden und -hydrolysierenden Domänen (OppDF) (Holland *et al.*, 2003). In Bakterien gibt es zusätzlich eine substratbindende Domäne (OppA) (Higgins, 1992), die bei Gram-negativen Bakterien im periplasmatischen Raum lokalisiert und bei

Gram-positiven Bakterien über einen Lipidanker an der Zellwand befestigt ist (Perego *et al.*, 1991). Durch Hydrolyse von ATP durch die zytoplasmatischen ATPase-Domänen wird eine Konformationsänderung der Transmembrandomänen bewirkt, wodurch dann Substrate über die biologische Membran transportiert werden können (Nikaido und Hall, 1998). Die ATP-bindenden Domänen besitzen zwei für die ATP-Bindung wichtige Sequenzen:

das Walker A Motiv (auch als P-Loop-Struktur bekannt) und

das Walker B Motiv (Walker *et al.*, 1982).

Diese können in vielen ATP-hydrolysierenden Enzymen, nicht nur in ABC-Transportern gefunden werden (Vetter und Wittinghofer, 1999). Die beiden Motive, Walker A mehr noch als Walker B differieren bei unterschiedlichen Spezies und in verschiedenen Enzymen kaum, sie sind also hoch konserviert (Holland *et al.*, 1999; Linton *et al.*, 2007). Die Konformation der beiden Motive ist eine Schleife, die sich um die Nukleotide spannt und mit Hilfe von hoch konservierten Lysin- und Threoninresten an deren Phosphat-Sauerstoff Atome bindet (Berchtold *et al.*, 1993, Abrahams *et al.*, 1994). In den verschiedenen Enzymen sind jedoch unterschiedliche Faltungen der Walker A Sequenz möglich, nur in den nukleotidbindenden Domänen der ABC-Transporter wird der charakteristische P-loop gebildet (Ramakrishnan *et al.*, 2002).

In *M. hominis* besitzen nicht nur die nukleotidbindenden Domänen des Oligopeptidimporters (Opp) ATPase Aktivität. Auch die substratbindende Domäne OppA, ein ca. 100 kDa großes Membranprotein hydrolysiert ATP und ist die bedeutendste ATPase auf der Zelloberfläche (Hopfe und Henrich, 2003). Hierbei findet sich die Besonderheit, dass die Reihenfolge der Sequenzen von Walker AB zu Walker BA vertauscht ist (Hopfe und Henrich, 2003). Diese Reihenfolge wurde ansonsten nur bei Nematoden und im Myosin von Kaninchen gefunden (Walker *et al.*, 1982).

Zusätzlich zur substratbindenden Domäne mit ecto-ATPase Funktion hat OppA noch andere Aufgaben: Es ist beteiligt an der Zytadhärenz von *M. hominis* (Henrich *et al.*, 1999), wobei die ectoATP-Aktivität von OppA für seine Bindung an Wirtszellen essentiell ist (Hopfe *et al.*, 2011). Außerdem induziert OppA in HeLa Zellen die Abgabe von ATP und Apoptose, so dass die Proliferation von HeLa Zellen bei Infektion mit *M. hominis* abnimmt (Hopfe und Henrich, 2008).

Auch in anderen Bakterien sind ABC-Transporter an der Zytadhärenz beteiligt: In *Yersinia pseudotuberculosis* wird der ABC-Transporter MrtAB benötigt, um die mesenterialen Lymphknoten besiedeln zu können (Crimmins *et al.*, 2012).

### 1.3 Intraspezies-Variationen von OppA

OppA von *M. hominis* hat eine mittels SDS PAGE bestimmte apparente Masse von ca. 100 kDa. Unter 172 untersuchten *M. hominis* Isolaten aus Düsseldorf und Nürnberg konnte nur eine Größenvariation im OppA gefunden werden. Das Isolat 66 der Düsseldorfer Stammsammlung zeigte sich im Polyacrylamidgel 10 kDa schwerer als die anderen Isolate (Hopfe, 2001).

Variationen in der Größe eines Proteins sind bei Mycoplasmen nichts Ungewöhnliches. Bereits 1989 beschrieben Boyer und Wise Größenunterschiede bei Lipid-assoziierten Proteinen verschiedener *M. hyorhina* Isolate, die durch denselben monoklonalen Antikörper detektiert werden konnten (Boyer und Wise, 1989).

Durch sehr variable Oberflächen können Mycoplasmen dem Immunsystem des Wirtorganismus entgehen und chronische Erkrankungen auslösen (Citti und Rosengarten, 1997; Razin, 1999; Lysnyanski *et al.*, 2001; Citti *et al.*, 2010). Dies geschieht durch Veränderungen der Proteingröße, Modifizierung der Antigenstrukturen, Variierung der Proteinexpression und Phasenvariation, wobei Gene durch verschiedene Mechanismen reversibel an- und ausgeschaltet werden, z. B. durch DNA-Methylierung, (Krüger und Seidler, 2007). Häufig werden Variationen von Oberflächenproteinen auch durch Änderungen des Genotyps hervorgerufen. So konnten bei den variablen Oberflächenproteinen (Vsps) von *M. bovis* drei verschiedene Proteingrößen innerhalb eines Stammes gefunden werden. Die Größenunterschiede beruhten auf Insertion und Deletion von repetitiven Sequenzen, vor allem am C-terminalen Ende, aber auch in anderen Proteinregionen (Behrens *et al.*, 1994; Lysnyansky *et al.*, 1999). Dieses Phänomen lässt sich bei vielen Mycoplasmenspezies beobachten: Beim Adhäsionsprotein PvpA von *M. gallisepticum* und bei Oberflächenproteinen von *U. urealyticum* und *U. parvum* beruht der Größenunterschied auf einer veränderten Anzahl von Gen-Repeats am C-terminalen Ende (Boguslavsky *et al.*, 2000; Zimmermann *et al.*, 2009). Das variable Oberflächenlipoprotein (Vlps) von *M. hyorhina*, zu dem sieben Gene gehören, weist bei verschiedenen Stämmen spontane Größenvariationen auf, die zum Einen durch Deletionen, zum Anderen durch Unterschiede der repetitiven Strukturen entstehen. So besitzen zwei der Gene Repeat Motive, die sich von den Tandem Repeats der restlichen Gene deutlich unterscheiden (Rosengarten und Wise, 1990; Citti *et al.*, 2000). Auch Deletionen und Insertionen im N-terminalen Proteinbereich sind beschrieben, z. B. bei *M. capricolum* subsp. *capricolum* und bei *M. mycoides* subsp. *mycoides*. Allerdings wurden diese

bisher deutlich seltener gefunden als solche im C-terminalen Bereich der entsprechenden Proteine (Wise *et al.*, 2006).

Auch in *M. hominis* konnten Größenunterschiede verschiedener Oberflächenproteine nachgewiesen werden: Das Lmp1 Protein zeigt Größenvariationen zwischen verschiedenen *M. hominis* Isolaten, die durch unterschiedlich viele 500 bp Tandem Repeats am 3' Ende des *lmp1* Gens verursacht werden (Ladefoged, 2000). Beim variablen adhärenzassoziierten Lipoprotein P50-Protein (auch Vaa genannt) beruhen die Größenunterschiede auf Gewinn oder Verlust von zentralen repetitiven Sequenzen (Zhang und Wise, 1996). Boesen und Mitarbeiter konnten 2004 zeigen, dass die hohe Variabilität des *vaa*-Gens auf ausgeprägte Intraspezies-Rekombination zurückzuführen ist. Rekombination ist ein wichtiges Mittel, um die Anpassungsfähigkeit und Vielfältigkeit von Bakterien zu gewährleisten. Eine hohe Rekombinationsrate konnte ebenfalls für das Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (*gap*) Gen gezeigt werden (Sogaard *et al.*, 2002). Hier war nicht nur Intra- sondern auch Interspezies-Rekombination aufgetreten. Dass es bei *M. hominis* zu horizontalem Gentransfer mit anderen *Mollicutes* kommt, konnten Pereyre und Mitarbeiter 2009 belegen: So gleichen sich viele Gene von *M. hominis* und *U. parvum*, die dieselbe ökologische Nische bewohnen. Unterschiede liegen vor allem im Bereich der Wege zur Energiegewinnung und in den Genen für Adhärenz und Virulenz (Pereyre *et al.*, 2009). Im Vergleich zu anderen Mycoplasmen besitzt *M. hominis* eine hohe Intraspezies-Diversität (Kokotovic *et al.*, 1999). Kein von verschiedenen Menschen gewonnenes Isolat gleicht dem anderen (Jensen *et al.*, 1998).

Posttranskriptionale und posttranslationale Modifikationen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für die Funktion und Diversität von Proteinen bei allen Lebewesen. Dabei beeinflussen sie sich gegenseitig: Phosphorylierungen in *M. pneumoniae* können Auslöser für andere posttranslationale Modifikationen, z.B. Acetylierungen sein (van Noort *et al.*, 2012). Montgomery und Mitarbeiter zeigten 1992, dass nicht nur die Hypophyse, sondern auch Thymozyten und Lymphozyten in Kultur Prolaktin (PRL) synthetisieren, wobei die Prolaktingröße zwischen 11 und 29 kDa schwankte (Montgomery *et al.*, 1992). Es konnte jedoch nur eine PRL mRNA gefunden werden, so dass die Unterschiede auf posttranslationalen Modifikationen wie Proteolyse und Glykosylierung beruhen müssen. Bei der N-Acetylglucosaminidase von *Candida albicans* konnten zwei Größenvarianten gefunden werden, deren Größenunterschied auf unterschiedlichen Glykosylierungen der Außenketten beruht (Molloy *et al.*, 1994). Auch bei der Synthese des nerve growth factor (NGF), der im Gift der australischen Giftnatter vorkommt, spielt die Glykosylierung eine wichtige Rolle. Bei allen Giftnatterarten konnte ein 243 Aminosäuren großes Vorläuferprotein gefunden werden.

In der 2D-Gelelektrophorese zeigten sich jedoch gravierende Größenunterschiede, die durch N-glykosidische Bindungen zustande kamen und Auswirkungen auf Stabilität und Aktivität des Giftes hatten (Earl *et al.*, 2006). Glykosylierung und andere posttranslationale Modifikationen sind auch bei Mycoplasmen bekannt. Bei *M. gallisepticum* konnten von 446 untersuchten Proteinen zwei Glykoproteine, 10 phosphorylierte und 16 acetylierte Proteine nachgewiesen werden (Demina *et al.*, 2009). Schmidl und Mitarbeiter zeigten 2010, dass die posttranslationale Phosphorylierung der Adhärenzproteine HMW1, HMW3, P1 und MPN474 von *M. pneumoniae* ausschlaggebend für die Entwicklung und Funktion der terminalen Organelle ist (Schmidl *et al.*, 2010). Werden die Proteine nicht phosphoryliert, führt dies zu einem Verlust der Zytotoxizität und einem nicht adhärenen Wachstum.

Posttranslationale proteolytische Spaltung ist für die Funktion vieler Proteine entscheidend. Aus dem *malp* Gen von *M. fermentans* entstehen in unterschiedlichen Isolaten zwei verschiedene Proteine: das 41 kDa Oberflächenlipoprotein MALP-404 und das 2 kDa Makrophagen stimulierende Lipopeptid MALP-2 (Calcutt *et al.*, 1999). MALP-2 und freigesetzte lösliche Fragmente entstehen durch Proteolyse des MALP-404 Proteins. Dieser Mechanismus hilft *M. fermentans* der Immunabwehr des Wirtes zu entgehen (Davis und Wise, 2002). Das integrale Membranprotein P30, dass sich am Ende der terminalen Organelle von *M. pneumoniae* befindet, wird erst durch Spaltung und der damit verbundenen Konformationsänderung im Extrazellularraum und der Freilegung von Bindungsstellen voll funktionsfähig (Chang *et al.*, 2011). Bei *M. hyopneumoniae* wird das Oberflächenprotein P97, das wichtig zur ziliären Adhärenz ist, in verschiedenen Stämmen an unterschiedlichen Stellen, zum Teil auch an mehreren gespalten. Dadurch variiert die Proteingröße und die Oberflächenarchitektur von *M. hyopneumoniae* ist sehr vielfältig (Djordjevic *et al.*, 2004).

Die putativen Adhäsionsmoleküle (pMGA) aus drei verschiedenen Isolaten des Vogelpathogens *M. gallisepticum* zeigten ebenfalls Unterschiede in der Größe und der Antigenität (Markham *et al.*, 1994). Die Ursache hierfür bestand jedoch nicht in posttranslationalen Modifikationen oder unterschiedlicher Genlänge. Stattdessen konnten verschiedene Gene gefunden werden, die alle für ein pMGA-ähnliches Protein kodieren (Markham *et al.*, 1994). Genduplikate sind ein wichtiger Mechanismus, den Verlust von Genen durch Mutationen auszugleichen und genetische Variation zu schaffen (Tautz, 1992; Wilkins, 1997; Seaton *et al.*, 2012). Die Anzahl der Genduplikate steigt mit zunehmender Komplexität des Organismus, bei kleinen Genomen werden multi-copy Gene meistens schnell wieder entfernt (Collins *et al.*, 2011). So liegen bei *M. genitalium* von 460 untersuchten

Genen 89 (19,35%) als Duplikate vor. Bei der Maus, *Mus musculus* sind es von 4267 untersuchten Genen 3664 (85,87%) (Hannay *et al.*, 2008). Durch diese Duplikate werden aber auch funktionell neue Gene geschaffen (Ohno, 1970; Wolfe und Li; 2003, Lynch und Katju, 2004). Dies ist ein wichtiger Bestandteil der Evolution (Ohno, 1970). Neue Funktionen erlangen die Gene mit der Zeit durch Mutationen. Dabei entstehen zuerst Zwischenstufen, wie sie Habu und Mitarbeiter 1997 beim Kubitz Chymotrypsin-Inhibitor der Flügelbohne nachweisen konnten (Habu *et al.*, 1997).

Bei *Drosophila melanogaster* findet sich für das Odorant-bindende Protein (Obp), das zum olfaktorischen System gehört, eine Multigenfamilie, die durch Genduplikation entstanden ist (Vieira *et al.*, 2007). Multiple Kopien von Teilen oder ganzen Genen sind bei pro- und eukaryontischen Parasiten schon seit langem bekannt (Majiwa *et al.*, 1982; Swanson *et al.*, 1987). Im Gegensatz zu Pseudogenen, die auch durch Genduplikation entstehen können, aber funktionell größtenteils nicht mehr aktiv sind (Gerstein und Zheng, 2006; Poliseno *et al.*, 2010), sind multi-copy Gene funktionsfähig und werden transkribiert. Auch das Zytadhäsionsgen P1 von *M. pneumoniae* liegt zu 2/3 als multi-copy Gen vor (Su *et al.*, 1988). Diese Regionen scheinen besonders häufig von Aminosäureaustauschen betroffen zu sein, und die verschiedenen klinischen Isolate lassen sich anhand dieser Variationen in zwei Gruppen einteilen (Su *et al.*, 1990; Dorigo-Zetsma *et al.*, 2000). Erklären lassen sich die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen durch Rekombination (Su *et al.*, 1993; Kenri *et al.*, 1999; Dorigo-Zetsma *et al.*, 2001).

Auch für *oppA* konnten schon mehrere Genloki nachgewiesen werden. So besitzt *E. coli* zwei (Park *et al.*, 1998), *Streptococcus thermophilus* drei (Garault *et al.*, 2002) und *Borrelia burgdorferi* sogar fünf verschiedene *oppA* Gene (Kornacki und Oliver, 1998). Bei *M. hominis* konnten in der Northern Blot Analyse drei verschiedene Banden für *oppA* (9,5 kb, 3,3 kb und 2,2 kb groß) gefunden werden, wobei die 2,2 kb Bande durch Abbauprozesse erklärt wurde. Dies deutet entweder auf einen zweiten Genlokus für *M. hominis oppA* hin oder auf die monocistronische Transkription einer 3.3 kb großen mRNA, zusätzlich zur polycistronischen im 9,5 kb *oppABCDF* Operon (Henrich *et al.*, 1999). Eine solche Transkription konnte bereits für *oppA* von *Salmonella typhimurium* (Gallagher *et al.*, 1989; Pearce *et al.*, 1992) und *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Peltoniemi *et al.*, 2002) gezeigt werden.

## 1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zum Einen, den Größenunterschied von OppA des *M. hominis* Isolats 66 (vorbeschrieben als Isolat 872J) im Vergleich zu allen anderen bisher untersuchten Isolaten zu erklären. Dazu sollte die Sequenz des *oppA*<sup>66</sup> mit der von *oppA* des Stammes FBG und des Isolates 64 (vorbeschrieben als Isolat 3138V), das sich in seiner Antigenität von den beiden anderen unterscheidet, verglichen und mögliche posttranslationale Modifikationen oder Unterschiede in der Proteinfaltung untersucht werden.

Zum Anderen war die Herkunft der zusätzlichen *oppA* Bande im Northern Blot zu klären. Dazu sollte zunächst analysiert werden, ob *oppA* als multi-copy-Gen vorliegt, um dann nach Etablierung eines Infektionsassays von HeLa-Zellen mit *M. hominis* und nachfolgender qPCR Analyse charakterisieren zu können, ob die mono- oder polycistronische Transkription von *oppA* infektionsreguliert ist.

## 2. Material

### 2.1 Bakterienstämme

Wenn nicht explizit erwähnt, wurde für alle Versuche der *Mycoplasma hominis* Stamm FBG verwendet. Zum Vergleich der *oppA* Gensequenzen und abzuleitenden OppA Proteine wurden darüber hinaus die *M. hominis* Isolate 64 und 66 der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der HHU Düsseldorf verwendet. Zur Klonierung wurde der *Escherichia coli* Stamm DH5 $\alpha$  der Firma Gibco BRL verwendet.

### 2.2 Vektoren

Der Vektor pGem-T der Firma Promega wurde zur Klonierung verwendet.

| Größe in kb | Resistenzgen | Besonderheiten                                 |
|-------------|--------------|------------------------------------------------|
| 3,0         | Amp          | <i>lacZ'</i> Gen, T3- und T7- Promotor, fl-ori |

### 2.3 Restriktionsenzyme

Es wurden die Restriktionsenzyme PvuII, EcoRI, HindIII und RsaI der Firma Fermentas, sowie NsiI und NciI der Firma Roche und die zugehörigen Reaktionspuffer, wie in Kapitel 3.7 beschrieben, verwendet.

### 2.4 Membranen

|                                 |                         |                        |
|---------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Nitrozellulose-Membran, Protran | 0,45 $\mu$ m Porengröße | Schleicher und Schuell |
| positiv geladene Nylonmembran   | 0,45 $\mu$ m Porengröße | Boehringer Mannheim    |

### 2.5 Kommerzielle Kits

|                                   |                |
|-----------------------------------|----------------|
| TRIzol Reagent                    | Gibco BRL      |
| RNA Isolation-Kit                 | Fluka          |
| RNeasy Mini Kit                   | Qiagen         |
| Qiasm DNeasy Blood and Tissue Kit | Qiagen         |
| Nucleo Spin Extract II Kit        | Macherey-Nagel |
| High Pure Plasmid Isolation-Kit   | Roche          |

## 2.6 Oligonukleotide (Primer)

| Amplikon                | Länge (bp) | Name             | Tm (C°) | Sequenz (5' - 3')                                       |
|-------------------------|------------|------------------|---------|---------------------------------------------------------|
| <b>qPCR/ Klonierung</b> |            |                  |         |                                                         |
| <i>gap</i>              | 100        | GAPDH Mh-907F    | 65.0    | ATATACAGCAGACCAAAGATTACAAGATG                           |
| <i>gap</i>              |            | GAPDH Mh-1007R   | 59.0    | TTGCAGCACCAGTTGTTGTTG                                   |
| <i>oppA</i>             | 108        | oppA-1726F       | 61.0    | CAAGCAACTCACTGACTTGCAAA                                 |
| <i>oppA</i>             |            | oppA-1834R       | 68.0    | AGTTAGCTTGGTCTCTGAAGTCTGTAATG                           |
| <i>oppB</i>             | 128        | oppB-533F        | 61.0    | TAACTATTTCCGGTCGCATTAGGAAT                              |
| <i>oppB</i>             |            | oppB-661R        | 64.0    | CATAACCTGCTAATGAGGTTATTGACAT                            |
| <i>oppC</i>             | 124        | oppC-873F        | 64.0    | ATGACCAGGATTTGTTGGAATAACTAG                             |
| <i>oppC</i>             |            | oppC-997R        | 59.0    | TTGGTAATGCATGAACGAAAATTCT                               |
| <i>oppD</i>             | 100        | oppD-149F        | 61.0    | TGCATGTTAGTTTCCCTCAAGGT                                 |
| <i>oppD</i>             |            | oppD-249R        | 58.0    | TTCTCCAACGAGGCCAATTAT T                                 |
| <i>oppF</i>             | 120        | oppF-2096F       | 62.0    | CCGATGAACCTATTGCCTCACT                                  |
| <i>oppF</i>             |            | oppF-2216R       | 62.0    | ATCATTGAAAGGTCGTGTGCTATG                                |
| <b>Sequenzierung</b>    |            |                  |         |                                                         |
| Fragment 1              | 372        | 545OppA up-568   | 52.0    | GTTTAAATATTTACAAACAAGATA                                |
| Fragment 1              |            | 875OppA down-903 | 59.0    | TGTTATAGTTATAGTTTTTGTGTTGTT A                           |
| Fragment 2              | 680        | 685              | 56.8    | ATATGTCGACTGCAAAATAGACCCGGCATATGTAAAA                   |
| Fragment 2              |            | 691              | 58.4    | AATGCATACGTATATATGTTACCAAATGACCACTGTTCCACC              |
| Fragment 3              | 580        | 690              | 59.5    | GAAGTTAAAGCAAAAGACTTCTGGTATTCATGGCTGAGAACATA            |
| Fragment 3              |            | 697              | 55.8    | TCTTCAACCCATTTCTTATCCAGTACAGTGTATT                      |
| Fragment 4              | 480        | 692              | 60.5    | ATTGGTCAGTACTGGTATGGGACGTCCGCTAAATCT                    |
| Fragment 4              |            | 694              | 67.7    | TGAGTTGCTGGCCAGAAGATGCCTGGGCTGCATATGTATCCAGTTTAC        |
| Fragment 5              | 800        | 607              | 54.0    | AGAACCACAAAAGAAAGAAGT                                   |
| Fragment 5              |            | 695              | 67.8    | TCGTATGTGCTAGCAACACCGTTATAGTCTGCTGACCATGCCAGCAGGTTTTCAC |
| Fragment 6              | 700        | 700              | 61.7    | GCTCCACAGCTGTACATGAACGCGTGGGAAAAAGT                     |
| Fragment 6              |            | 704              | 51.4    | ATATCTCGAGTTTTTTAGTATCTTTGATTATTCTCCAGTCTTG             |
| Fragment 7              | 550        | 703              | 65.5    | GCTCCACAGCTGTACATGAACGCGTGGGAAAAAGT                     |
| Fragment 7              |            | oppB2trp1        | 46.0    | CATCAAACCATTTTCCACGCTT                                  |
| <b>OppA-Sonden</b>      |            |                  |         |                                                         |
| Sonde 1                 | 370        | 545OppA up-568   | 52.0    | GTTTAAATATTTACAAACAAGATA                                |
| Sonde 1                 |            | 875OppA down-903 | 59.0    | TGTTATAGTTATAGTTTTTGTGTTGTTA                            |
| Sonde 2                 | 546        | 690              | 59.5    | GAAGTTAAAGCAAAAGACTTCTGGTATTCATGGCTGAGAACATA            |
| Sonde 2                 |            | 688              | 59.4    | AGATTTAGCAGACGTCCCATACCACTGACCAAT                       |
| Sonde 3                 | 480        | 699              | 57.2    | AATACACTGTACTGGGATAAGAAATGGGTGGAAGATG                   |
| Sonde 3                 |            | 694              | 67.7    | TGAGTTGCTGGCCAGAAGATGCCTGGGCTGCATATGTATCCAGTTTAC        |
| Sonde 4                 | 407        | 702              | 66.6    | GTGTGGCTAGCACATACGACGACTGTCATGGGGAGCTGC                 |
| Sonde 4                 |            | 701              | 65.6    | GTGCTTGCCAGAAGATTGCAGACCACTGATACAGATCTGTTGGTTC          |
| Sonde 5                 | 260        | 703              | 65.5    | GCTCCACAGCTGTACATGAACGCGTGGGAAAAAGT                     |
| Sonde 5                 |            | 704              | 51.4    | ATATCTCGAGTTTTTTAGTATCTTTGATTATTCTCCAGTCTTG             |

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion synthetisiert.

## 2.7 Mastermixe

|                                   |            |
|-----------------------------------|------------|
| Expand High Fidelity              | Roche      |
| 2 x IQ Supermix                   | BioRad     |
| 2 x Mesa Green qPCR MaserMix plus | Eurogentec |
| EZ1 Reagent Cartridges Tissue 6   | Qiagen     |

## 2.8 Marker

| Marker                                 | Firma      | Bereich         | Verwendung        |
|----------------------------------------|------------|-----------------|-------------------|
| SeeBlue Prestained Standard            | Invitrogen | 4 – 250 kDa     | Western Blot      |
| Prestained SDS-PAGE low-range Standard | Rio-Rad    | 14,4 – 97,4 kDa | Coomassie-Färbung |
| Mass Ruler DNA Ladder Mix              | Fermentas  | 0,2 – 10 kb     | Southern Blot     |
| Ribo Ruler RNA Ladder High Range       | Fermentas  | 200 – 6000 bp   | Formaldehydgel    |

## 2.9 Puffer und Lösungen

| Name                      | Verwendung                      | Zusammensetzung                                                                                  |
|---------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CsCl-Lösung               | Guanidin-Cäsiumchlorid-Gradient | 5,7M CsCl, 0,5M EDTA; pH 8,0                                                                     |
| Guanidinthiocyanat-Lösung | Guanidin-Cäsiumchlorid-Gradient | (4M GSCN; 20mM NaOAc; 0,1mM DTT; 0,5% (w/v) N-Laurylsarcosin in DEPC-behandeltem Wasser; pH 5,2) |
| TBE-Puffer                | Agarose Gel                     | 4,5 mM Tris; 4,5 mM Borsäure, 1,0 mM EDTA; pH 8,0                                                |
| DNA-Probenpuffer          | Agarose Gel                     | 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol                                              |
| RNA-Probenpuffer          | Formaldehydgel                  | 50% (v/v) Formamid; 7% (v/v) Formaldehyd in 1 x MOPS                                             |
| Auftragspuffer            | Formaldehydgel                  | 50% (v/v) Glyzerin; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol        |
| 10 x MOPS Puffer          | Formaldehydgel                  | 0,2 M MOPS; 80 mM NaAC; 10 mM EDTA; pH 7,4                                                       |
| Nothern-Waschpuffer       | DNA Sonden                      | 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; 0,3% (v/v) Tween 20                                              |
| Blockierungslösung        | DNA Sonden                      | 1% (w/v) Blockierungsreagenz (Boehringer Mannheim); 0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl               |
| Puffer A                  | DNA Sonden                      | 100 mM Tris/HCl pH 9,5; 100 mM NaCl                                                              |
| Churchpuffer              | Southern Blot                   | 7% (w/v) SDS; 50 mM Natriumphosphat; pH 7,0                                                      |

| Name              | Verwendung          | Zusammensetzung                                                                                                       |
|-------------------|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Churchwaschpuffer | Southern Blot       | 40 mM Natriumphosphat; 1% (w/v) SDS                                                                                   |
| Tris-Puffer       | Proteinaufreinigung | 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 25 mM NaCl                                                                                     |
| Anode-I-Puffer    | Western Blot        | 300 mM Tris/HCl; 20% (v/v) Methanol                                                                                   |
| Anode-II-Puffer   | Western Blot        | 30 mM Tris/HCl; 20% (v/v) Methanol                                                                                    |
| Kathodenpuffer    | Western Blot        | 25 mM Tris/HCl; 40 mM 6-Aminohexansäure; 20% (v/v) Methanol                                                           |
| RF1-Lösung        | Klonierung          | 100 mM RbCl; 50 mM MnCl <sub>2</sub> ; 30 mM Kaliumacetat; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% (v/v) Glycerin; pH 5,8       |
| RF2-Lösung        | Klonierung          | 10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15% (v/v) Glycerin; pH 6,8                                          |
| Probenpuffer      | SDS-PAGE            | 3% (w/v) SDS; 0,4 M Tris/HCl pH 6,8; 0,1% (w/v) Bromphenolblau; 25% (v/v) Glycerin; 5% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol |

## 2.10 Chemikalien

Zur Herstellung der Digoxigenin-makierten Sonden wurde Digoxigenin (DIG)-dUTP von der Firma Roche verwendet.

Alle weiteren Chemikalien wurden in p.A. Qualität von den Firmen Merck, Carl Roth GmbH, Gibco BRL, Invitrogen, Roche, Becton Dickinson & Company, Fermentas, BioWhittaker, Delta Select GmbH und Sigma bezogen.

## 2.11 Affinitätschromatographie

Bei der Proteinaufreinigung wurden PD10-Säulen der Firma Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden zur Umpufferung verwendet.

## 2.12 Geräte

|                                 |                            |
|---------------------------------|----------------------------|
| Thermocycler Gradient           | Biometra                   |
| Thermocycler T3                 | Biometra                   |
| iCycler iQ5                     | BioRad                     |
| iCycler CFX                     | BioRad                     |
| BioRobot EZ 1                   | Qiagen                     |
| Heizblock Thermomixer 5436      | Eppendorf                  |
| NanoDrop 1000 Spectrophotometer | PeQLab Biotechnologie GmbH |

|                                           |           |
|-------------------------------------------|-----------|
| Spectrophotometer UV mini 1240            | Shimadzu  |
| Wasser-Filtrieranlage Elix Advantage 3 UV | Millipore |
| Tischzentrifuge MiniSpin                  | Eppendorf |
| Zentrifuge Universal 320R                 | Hettich   |
| Zentrifuge Rotanta 460R                   | Hettich   |
| L 60 Ultracentrifuge                      | Beckman   |
| Zentrifuge J 2 - 21                       | Beckman   |
| Cawomat 2000 IR                           | Cawo      |

### 3. Methoden

#### 3.1 Kultivierung von Zellen

##### 3.1.1 Kultivierung von *Mycoplasma hominis*

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

*Mycoplasma hominis* Stämme wurden in Arginin-Medium (2,1% (w/v) PPLO Broth, 10% (v/v) Pferdeserum, 10% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) sterilfiltrierte Argininlösung und 0,002% (w/v) Phenolrot) kultiviert. Der pH-Wert wurde mit 1M HCl auf pH 6,5-6,6 eingestellt. Die Mycoplasmen eines -70°C Gefrierstocks wurden mit 10, 100 oder 1000fachem Volumen frischen Argininmediums versetzt und bis zur logarithmischen Wachstumsphase, die am Farbumschlag des Mediums zu erkennen war, bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden sie 20 min bei 4°C und 7000 x g pelletiert. Das Bakteriensediment wurde entweder bei -20°C eingefroren oder direkt zur Nukleinsäurepräparation (siehe Kapitel 3.3) eingesetzt.

##### 3.1.2 Kultivierung von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden in DMEM-Medium (Gibco BRL) kultiviert, das mit 10% (v/v) Hitze inaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS) und 1% (w/v) Penicillin/Streptokinase angereichert war. Wenn die adhärenen Zellen nach 3 bis 4 Tagen in 25 ml Zellkulturflaschen konfluent gewachsen waren (ca.  $1 - 2 \times 10^7$  Zellen), wurden sie entweder in 6Well-Platten überführt und für Nukleinsäurepräparationen und Infektionsassays verwendet (siehe Kap. 3.2 und 4.3.1) oder zur weiteren Kultivierung verdünnt. Für Letzteres wurde der Überstand entfernt, die adhärenen Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend für 2 min mit 3 ml Trypsinlösung bedeckt. Nach Entfernen der Trypsinlösung konnten die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert werden, von dem 3 ml in eine neue Zellkulturflasche überführt wurden, in der bereits 7 ml Medium vorgelegt waren. Im Brutschrank wurden die Zellen dann wieder bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.2 Aufbau des Infektionsassays

Für den Infektionsassay wurden, wie in Abbildung 7 dargestellt, in 6 Well Platten pro Well  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen in DMEM-Medium/ 10% FCS ausgesät und über Nacht bei 37°C bebrütet, sodass ein dichter Zellrasen am Boden entstand. Am nächsten Tag wurden die adhärenenten HeLa-Zellen mit  $0,5 - 2 \times 10^9$  *M. hominis* FBG Zellen pro Well infiziert. Anschließend kamen die Platten zurück in den Brutschrank.

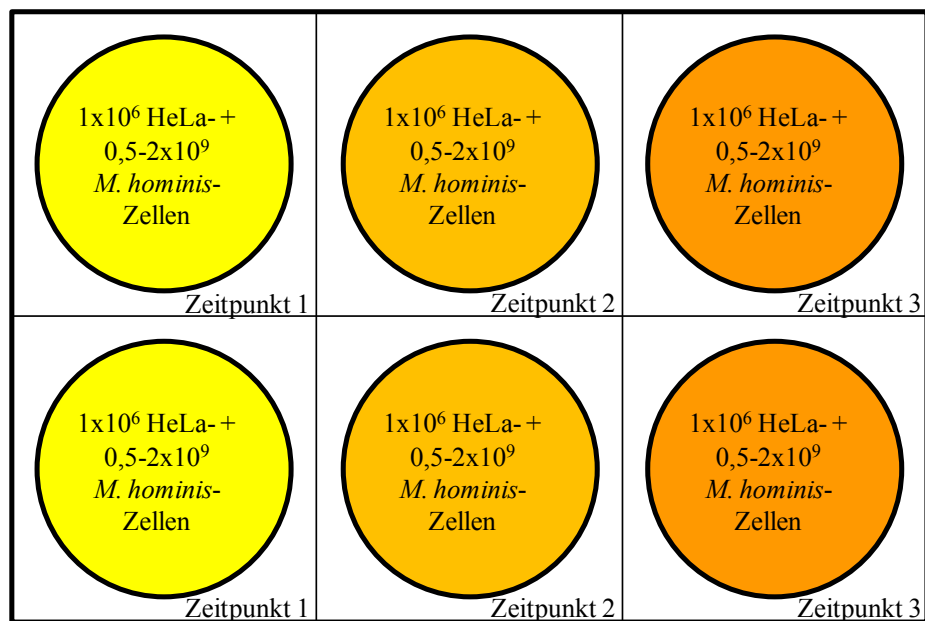


Abbildung 7: Aufbau des Infektionsassays.

In 6 Well Platten wurden am Vortag jeweils  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen in DMEM-Medium ausgesät und am nächsten Tag mit  $0,5 - 2 \times 10^9$  *M. hominis* infiziert. Für die in den Ergebnissen genannten Zeitpunkte wurde die RNA aus 2 Parallelansätzen gewonnen.

Zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 h und 72 h wurde die Gesamt-DNA und RNA der Mycoplasmen und HeLa-Zellen wie in Kapitel 3.3. beschrieben präpariert. Dabei wurden für jeden Zeitpunkt 2 Wells verwendet.

### 3.3 Nukleinsäurepräparationen

#### 3.3.1 Guanidin/Cäsiumchlorid-Gradient

modifiziert nach Cseke *et al.*, 2004

Die Isolierung der RNA erfolgte aus 10 ml logarithmisch gewachsener *M. hominis* Kultur bzw. aus  $3 \times 10^6$  HeLa-Zellen. Die Mycoplasmen wurden 3 x mit PBS gewaschen und jeweils für 15 min bei 16060 x g und 4°C zentrifugiert, die HeLa-Zellen wurden zuerst in 1 ml PBS im 6Well abgeschabt und dann ebenso wie die Mycoplasmen behandelt. Die Zellsedimente wurden für 3 1/2 h bei -80°C eingefroren und anschließend auf Eis aufgetaut. In je 4 ml Guanidinthiocyanat-Lösung wurden die Zellen lysiert, anschließend wurden je 3 ml DEPC behandeltes Wasser zugefügt. Die Proben wurden in Polyallomertubes (Beckmann) gegeben, in denen sich bereits 3 ml CsCl-Lösung befand. Mit Paraffinöl wurden die Tubes austariert und bei Raumtemperatur 16 h bei 133927 x g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und die RNA-Pellets 3 x mit 70% (v/v) eiskaltem Ethanol gewaschen. Nachdem die RNA getrocknet war, wurde sie in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert und anschließend bis zur Verwendung bei -80°C eingefroren.

#### 3.3.2 RNA-Präparation mittels Trizol (Gibco BRL)

modifiziert nach dem Protokoll "TRIzol Reagent" von Life Technologies

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden die Zellen aus 10 ml logarithmisch gewachsener *M. hominis* Kultur sedimentiert (10 min bei 16882 x g, 4°C) und 3 x mit PBS gewaschen. Zur Präparation von HeLa-Zell RNA wurden je  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen aus drei Wells einer 6-Well Platte mit einem Zellschaber abgekratzt, ebenfalls in PBS gewaschen und 10 min bei 4500 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in je 300 µl Trizol lysiert und für 10 min bei 21382 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und nach 5 min Inkubation bei RT mit 60µl Chloroform versetzt und 15 s gevortext, bevor die Proben weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Durch erneute Zentrifugation für 15 min bei 21382 x g wurden 3 Phasen erzeugt, die RNA-haltige, farblose obere Phase wurde abgenommen, mit 150 µl Isopropanol versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurden die Proben 10 min bei 21382 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, die RNA-Pellets mit 300 µl 75% (v/v) Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert (s.o.). Nachdem die RNA getrocknet war, wurde sie in 40 µl DEPC behandeltem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

### 3.3.3 RNA und DNA-Präparation mittels Phenol-Chloroformextraktion

nach dem Protokoll "RNA Isolation Kit" von Fluka

Die RNA und DNA logarithmisch gewachsener *M. hominis* und HeLa-Zell-Kulturen wurden mit Hilfe des RNA Isolation Kits (Fluka) nach Herstellerangaben isoliert. Dazu wurden wiederum 10 ml logarithmisch gewachsener *M. hominis* Kultur bzw.  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen verwendet. Die präparierte RNA wurde in DEPC behandeltem Wasser aufgenommen und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die DNA wurde in 75% (v/v) Ethanol resuspendiert, wobei für jeden ml vorher verwendetes TRI REAGENT 1,5 ml Ethanol genommen wurden, und bei 4°C gelagert.

### 3.3.4 RNA-Präparation mittels RNeasy MiniKit von Qiagen

nach dem Protokoll "RNeasy Mini Kit" von Qiagen

Es wurde entweder Gesamt-RNA von logarithmisch gewachsenen Mycoplasmen bzw. HeLa-Zellen verwendet oder von Mycoplasmen und HeLa-Zellen zusammen. Diese wurde aus einem Infektionsassay gewonnen, bei dem HeLa-Zellen ( $1 \times 10^6/6$ -Well) mit  $0,5 - 2 \times 10^9$  Mycoplasmen beimpft worden waren (siehe Kap. 4.3.1). Die Zellen der reinen Mycoplasmenkultur wurden zuerst 10 min bei 11068 x g und 4°C zentrifugiert und anschließend gewaschen, indem das Bakterienpellet 3 x in PBS aufgenommen und wie oben beschrieben pelletiert wurde. Für die HeLa-Zellen und die Zellen des Infektionsassays wurde das Medium aus den Wells der 6 Well Platten entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen entweder in 1 ml PBS abgekratzt und für 10 min bei 9503 x g und 4°C zentrifugiert oder die Zellen wurden noch im Well mit 650 µl RLT-Puffer lysiert, wobei zur späteren Gewinnung von genomischer DNA direkt 50 µl abgenommen und bei -20°C eingefroren wurden (siehe Kapitel 3.2.7). Die Pellets wurden jeweils in 600 µl RLT-Puffer aufgenommen. Die Lysate wurden für 2 min bei 13171 x g über

Qiashredder Spin Columns zentrifugiert. Der Durchlauf wurde mit 600 µl 70% (v/v) Ethanol gemischt und in 600 µl Fraktionen über RNeasy Spin Säulen gegeben (1 min, 13171 x g). Dann wurden die RNA-tragenden Säulen zuerst mit 700 µl RW1-Puffer (30 s, 6720 x g) gewaschen, danach 2 x mit 500 µl RPE-Puffer, wobei die Dauer der Zentrifugation bei 6720 x g von 30 s beim ersten Mal auf 2 min beim zweiten Mal erhöht wurde. Zuletzt wurden die Säulen ohne Zusatz 1 min bei 13171 x g zentrifugiert und anschließend 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Säulen wurden in neue 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße überführt, 45 µl DEPC behandeltes Wasser wurden auf die Säulenmatrix pipettiert, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die solubilisierte RNA 1 min bei 6720 x g eluiert. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt, so dass pro Probe jeweils 2 Elutionen gewonnen wurden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des NanoDrop 1000 Spectrophotometer, PeQLab Biotechnologie (s. Kapitel 3.4). Die RNA wurde anschließend entweder direkt in Experimenten eingesetzt (Formaldehyd-Gel, RT-PCR, qPCR) oder bis zur Verwendung bei -80°C bis -20°C gelagert.

Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Zentrifugationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Alle selbst hergestellten Lösungen wurden mit 0,04 % DEPC (Maniatis *et al.*, 1989) behandelt, um eine RNase Kontamination zu vermeiden.

### 3.3.5 DNA-Präparation mittels Qiamp DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen

modifiziert nach dem Protokoll "DNeasy Blood & Tissue Kit" von Qiagen

Bakterien aus 250 ml logarithmisch gewachsener *M. hominis* Kultur wurde 20 min bei 7084 x g und 4°C sedimentiert, anschließend 2 x mit 20 ml PBS gewaschen und für 15 min bei 11068 x g, 4°C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 6 ml ATL-Puffer resuspendiert, 2 ml Proteinase K-Lösung (100 ng/ml Lösung) wurde zugegeben und der Ansatz bei 55°C für 2 h inkubiert. Dann wurden zuerst 1,36 ml RNase A -Lösung(10 mg/ml) und nach 10 min bei Raumtemperatur 7,5 ml AL-Puffer, auf 55°C vorgewärmt, hinzugefügt und der Ansatz gut gemischt. Nach 10 minütiger Inkubation bei 70°C wurden 7,8 ml 100% Ethanol zupipettiert und das Gemisch in 700 µl Fraktionen über die DNeasy Mini Spin Säulen gegeben (1 min, 4301 x g, RT). Anschließend wurden die Säulen zuerst mit 500µl AW1-Puffer (1 min, 4301 x g, RT) und dann mit 500µl AW2-Puffer (3 min, 11357 x g, RT) gewaschen. Auf jede Säule wurden 200 µl auf 70°C vorgewärmter AE-Puffer gegeben, für 5 min bei 70°C inkubiert und in 1 min bei 11357 x g, RT eluiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Die

Konzentration der genomischen DNA wurde im NanoDrop gemessen und bis zur Verwendung im Southern Blot bei -20°C gelagert.

### 3.3.6 Bakterienaufschluss durch Proteinase K-Behandlung

nach Sachse und Frey, 2002

Zur Gewinnung von genomischer DNA wurde 1 ml logarithmisch gewachsene *M. hominis* Kultur bzw  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen, die im Well abgeschabt wurden, 3 x mit 500µl PBS gewaschen und jeweils 5 min bei 16060 x g, 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in 25-50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert und mit 0,5 x Volumen Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) (Roche) 1 h bei 56°C inkubiert und die Proteinase K anschließend 30 min bei 95°C inaktiviert. Danach wurden die Bakterienlysate entweder bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert oder direkt in verschiedene Experimente, z.B. konventionelle PCRs, eingesetzt.

### 3.3.7 DNA-Präparation mittels EZ1 Aufreinigung

über den Bio-Roboter EZ1 von Qiagen

50 µl Zelllysate, das bei der RNA-Aufreinigung mit dem RNeasy-Kit von Qiagen (siehe Kapitel 3.2.4) gewonnen wurde, wurde mit G2 Puffer (Qiagen) auf 200 µl aufgefüllt und die DNA nach Herstellerangaben über den Bio-Roboter EZ1 von Qiagen aufgereinigt. Das Elutionsvolumen betrug 50 µl. Die gewonnene DNA wurde bis zu ihrem Gebrauch in der qPCR bei -20°C gelagert.

### 3.3.8 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

nach dem Protokoll "Nucleo Spin Extract II" von Macherey-Nagel

PCR-Amplifikate aus konventionellen PCRs wurden nach Überprüfung der Größe auf Agarosegelen mit Hilfe des Nucleo Spin Extract II Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Elution erfolgte in 25 µl Elutionspuffer. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Nano-Drop-Messung. Bis zur Sequenzierung wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

### 3.3.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

nach dem Protokoll "Nucleo Spin Extract II" von Macherey-Nagel

Nach Auftrennung der Proben auf Ethidiumbromid gefärbtem Agarose-Gel wurden die gewünschten Banden unter UV-Beleuchtung bei einer Wellenlänge von 312 nm ausgeschnitten und die DNA-Fragmente mit dem Nucleo Spin Extract II Kit von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben isoliert. Bis zur Sequenzierung wurden die Proben bei -20°C eingefroren.

### 3.3.10 DNase Behandlung der RNA-Proben

Nach Gewinnung der RNA Proben mit dem RNeasy Kit von Qiagen wurden je 20 µg RNA mit 4 µl DNase I (Roche) nach folgendem Schema im PCR-Gerät TGradient, Biometra, inkubiert, um die Kontamination durch genomische DNA zu minimieren.

|                  |      |
|------------------|------|
| 20 min           | 37°C |
| 40 min           | 25°C |
| 10 min           | 75°C |
| Bis zur Entnahme | 4°C  |

Die Proben wurden anschließend in der RT-PCR (s. Kapitel 3.3.2) in cDNA umgeschrieben.

## 3.4 **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

### 3.4.1 Konventionelle PCR

modifiziert nach Saiki *et al.*, 1988

#### 3.4.1.1 PCR zur Amplifikation großer, überlappender *oppA* Genbereiche

Zur späteren Sequenzierung der *oppA*-Gene verschiedener *M. hominis* Isolate wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

|                                                         |            |
|---------------------------------------------------------|------------|
| <i>M. hominis</i> Lysat (siehe Kap. 3.2.6) (2-50 ng/μl) | 2,5 - 5 μl |
| dNTP-Mix (dCTP, dGTP, dATP, dTTP, je 2 mM)              | 8 μl       |
| Expand (Expand High Fidelity Kit, Roche)                | 0,5 μl     |
| Forward Primer (100 μM)                                 | 1 μl       |
| Reverse Primer (100 μM)                                 | 1 μl       |
| 5 x Puffer (Expand High Fidelity Kit, Roche)            | 10 μl      |
| Aqua ad iniectabilia                                    | auf 50 μl  |

und mit folgendem Temperatur-Protokoll im PCR-Gerät TGradient, Biometra, durchgeführt:

|       |                                     |                 |                      |                           |
|-------|-------------------------------------|-----------------|----------------------|---------------------------|
| 5 min | 95°C                                |                 |                      |                           |
| 1 min | 95°C                                |                 |                      |                           |
| 1 min | 50°C-58°C (abhängig vom Primerpaar) |                 |                      |                           |
|       | Opp<br>Fragment                     | Primer          | Annealing<br>Temp °C | Größe der<br>PCR Produkte |
|       | 1                                   | 685<br>691      | 57,2                 | 680 bp                    |
|       | 2                                   | 690<br>697      | 54,7                 | 580 bp                    |
|       | 3                                   | 692<br>694      | 57,4                 | 480 bp                    |
|       | 4                                   | 607<br>695      | 53,8                 | 800 bp                    |
|       | 5                                   | 700<br>704      | 52,5                 | 700 bp                    |
|       | 6                                   | 703<br>opp2trp1 | 50                   | 590 bp                    |
| 2 min | 72°C                                |                 |                      |                           |

Die letzten 3 Schritte wurden 35-mal wiederholt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Zusatz genomischer DNA mitgeführt. Die Proben wurden im Agarose-Gel (siehe Kapitel 3.8.1) analysiert, aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.8/3.2.9) und zur Sequenzierung ins BMFZ gegeben.

#### 3.4.1.2 Herstellung von *opp* Fragmenten zur späteren Klonierung

Zur Gewinnung von DNA-Fragmenten zur Klonierung wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

|                                                         |           |
|---------------------------------------------------------|-----------|
| <i>M. hominis</i> Lysat (siehe Kap. 3.2.6) (1-25 ng/μl) | 6 - 12 μl |
| 2 x IQ Supermix, BioRad                                 | 30 μl     |
| Forward Primer (100μM)                                  | 0,5μl     |
| Reverse Primer (100μM)                                  | 0,5μl     |
| Aqua ad iniectabilia                                    | ad 60 μl  |

Es wurden dieselben Primer verwendet, die auch in der qPCR eingesetzt wurden (s. Kapitel 2.6 und 4.3.4).

Mit dem nachstehenden TaqMan-Protokoll wurde die PCR im DNA Thermocycler T3, Whatman Biometra, durchgeführt

|        |      |
|--------|------|
| 10 min | 50°C |
| 10 min | 95°C |
| 15 sec | 95°C |
| 1 min  | 60°C |

Die letzten 2 Schritte wurden 35 Mal wiederholt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne DNA mitgeführt. Die Proben wurden ebenfalls gelelektrophoretisch analysiert (siehe Kapitel 3.8.1).

### 3.4.2 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

nach dem Protokoll "M-MLV Reverse Transcriptase", Invitrogen

Zur Herstellung von cDNA wurde die RT-PCR nach Herstellerangaben mit 500 ng/μl RNA und Random Hexamer Primern im TGradient, Biometra, durchgeführt. Die cDNA wurde bei 4°C über kurze Zeiträume oder bei -80°C für längere Zeiträume bis zur Verwendung in qPCR Versuchen aufbewahrt.

### 3.4.3 Real-time PCR

Die qPCRs wurden auf den Realtimegeräten iQ5 und CFX96 der Firma BioRad mit folgender Zusammensetzung durchgeführt:

|                                                |          |
|------------------------------------------------|----------|
| 2 x Mesa Green qPCR MasterMix Plus, Eurogentec | 12,5 µl  |
| Forward Primer (100 µM)                        | 0,075 µl |
| Reverse Primer (100 µM)                        | 0,075 µl |
| Aqua ad iniectabilia                           | 10,5 µl  |

Die verwendeten Primer sind in den Kapiteln 2.6 beschrieben.

Dieser Ansatz wurde im Mastermixraum hergestellt und in 96 Well Platten pipettiert. Anschließend wurden 2,5 µl genomische DNA (100-500ng/µl), cDNA (100-500ng/µl), mRNA (100-500ng/µl) (als Negativkontrolle) oder Aqua ad iniectabilia (Negativkontrolle) in einem anderen Raum zugefügt. Es wurde das nachstehendem Temperaturprotokoll verwendet, wobei die letzten beiden Schritte 35 Mal wiederholt wurden.

|        |      |
|--------|------|
| 10 min | 50°C |
| 10 min | 95°C |
| 15 sec | 95°C |
| 1 min  | 60°C |

Die Auswertung erfolgte wie in Kapitel 3.13 beschrieben.

### 3.5 Photometrische Messung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde mittels NanoDrop (PreQLab Biotechnologie GmbH) nach Herstellerangaben gemessen und die Güte der Proben mit Hilfe des 260/280 Quotienten bestimmt, wobei Werte zwischen 1,8 und 2,1 als rein angesehen wurden.

### 3.6 Sequenzierung

nach Sanger *et al.*, 1977

Die Sequenzierung von PCR-Produkten (siehe Kapitel 3.3.1) erfolgte im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf nach der Sanger-Methode. Dazu wurden dem BMFZ 50 ng (bei PCR Produkten bis 0,5 kb) bzw.

100 ng (0,5 bis 1 kb) PCR-Produkt in einer Konzentration von 10-15 ng/μl sowie mehrere μl Primer (10 pmol/μl) zur Verfügung gestellt.

### 3.7 Klonierung

#### 3.7.1 Herstellung kompetenter Zellen

Am Vortag wurden *E. coli* Zellen (DH5α) aus einem Glycerinstock in 3 ml LB-Medium (1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; pH 7,5) angeimpft und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. 1 ml von dieser Kultur wurde auf 110 ml LB-Amp-Medium (1% (w/v) Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 1% (w/v) NaCl; 100 μg/μl Ampicillin; pH 7,5) gegeben und bei 37°C langsam schaukelnd inkubiert, bis eine optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600nm}$ ) von 0,4 - 0,6 erreicht war. Dann wurden die Zellen in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 min auf Eis gestellt, anschließend bei 443 x g, 10 min, 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet unter sterilen Bedingungen in 40 ml 4°C kalter RF1-Lösung resuspendiert und für 1 - 2 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 443 x g, 10 min, 4°C pelletiert, der Überstand dekantiert und das Zellsediment in 8 ml 4°C kalter RF2-Lösung resuspendiert. Die nun kompetenten Zellen wurden in 300 μl Aliquots in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße gegeben und bei -80°C eingefroren.

#### 3.7.2 Ligation und Transformation

modifiziert nach Hanahan, 1995

Zur Ligation wurden 2 - 4 μl des gewünschten DNA-Fragments (5-20 ng/μl) (siehe Kapitel 3.3.1.2) mit 12,5 ng pGem-T Vektor, Promega (Verhältnis zwischen Vektor und DNA 1:3); 1 μl DNA Dilution Buffer, 5 x conc.; 5 μl T4 DNA Ligation Buffer, 2 x conc.; 0,5 μl T4 DNA Ligase (Rapid Ligation Kit, Roche) mit ddH<sub>2</sub>O auf 10 μl aufgefüllt und 30 min bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle wurde in einem Ansatz das DNA-Fragment durch ddH<sub>2</sub>O ersetzt. Zum Ligationsansatz wurden 100 μl kompetente *E. coli* Zellen (DH5α) gegeben und der Transformationsansatz für 30 min auf Eis und 2 min bei 42°C inkubiert. Die Transformationsansätze wurden wieder kurz auf Eis gestellt und anschließend in autoklavierte

und mit 400 µl SOC-Medium (2% (w/v) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,05% (w/v) NaCl; 20 mM Glukose) gefüllte Glasröhrchen überführt und 1 – 1.5 h bei 37°C geschüttelt. Die Zellsuspension wurde daraufhin auf LB-Amp-Platten (1,5% (w/v) Agar in LB-Medium; 100 µg/ml Ampicillin; 60 µg/µl X-Gal; 10 mM IPTG) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden weiße Kolonien gepickt und in je 3 ml LB-Amp-Medium über Nacht bei 37°C geschüttelt.

### 3.7.3 Plasmid-Präparation

nach dem Protokoll "High Pure Plasmid Isolation Kit" von Roche

Die „Über-Nacht“-Kulturen der gepickten Klone (siehe Kapitel 3.6.2) wurden nach Herstellerangaben mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche, aufgereinigt und mittels Restriktion (siehe Kapitel 3.7) auf das Vorhandensein des gewünschten Inserts hin überprüft.

### 3.7.4 Standardisierung

Bevor die Plasmide als Quantifizierungsstandard in der qPCR eingesetzt werden konnten, wurde die Konzentration der Plasmidlösungen mit Hilfe des NanoDrops (siehe Kapitel 3.5) bestimmt, und der Verdünnungsfaktor für eine Plasmidkonzentration von  $10^9$  Kopien/µl berechnet:

Plasmidanzahl /µl = Plasmidkonzentration [ng/µl] x  $(9,13 \times 10^8 / \text{Vektor kbp} + \text{Insert [kbp]})$ ).  
Anschließend wurden Verdünnungsreihen von  $10^7$ ,  $10^5$ ,  $10^3$  und  $10^2$  Plasmidkopien/µl Tris/HCl, pH 8,0 hergestellt.

## 3.8 **Restriktion**

nach Maniatis *et al.*, 1989

0,2 - 1 µg Plasmid-DNA, bzw. 10 µg genomische DNA wurden mit 10 Units Restriktionsenzym/mg DNA 1 h (Plasmid-DNA) oder über Nacht (gen. DNA) bei 37°C mit verschiedenen Restriktionsenzymen (PvuII, EcoRI, HindIII, RsaI, NsiI, NciI) nach

Herstellerangaben inkubiert und die restringierte DNA anschließend im Agarose-Gel aufgetrennt (siehe Kapitel 3.8.1).

### **3.9 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren**

#### **3.9.1 DNA-Auftrennung unter nativen Bedingungen (Agarose-Gel)**

nach Maniatis *et al.*, 1989

Agarose wurde in 0,5-fachem TBE-Puffer aufgekocht und zu 0,8 - 2%igen (w/v) Gelen gegossen. Die DNA-Fragmente wurden mit 1/6 Volumen DNA-Probenpuffer vermischt und bei 40 mA in 1 - 2 h im Agarose-Gel aufgetrennt. Durch den Zusatz von Farbstoffen konnte der Fortschritt der Gelelektrophorese abgeschätzt werden. Anschließend wurde das Gel 20 - 40 min in 0,1%iger Ethidiumbromidlösung gefärbt, 20-40 min in H<sub>2</sub>O zum Entfärben der DNA-freien Bereiche geschüttelt und anschließend mit der digitalen Photodokumentationsanlage UV mini 1240, Shimadzu, photographiert. Für den Southern Blot (siehe Kapitel 3.10) wurden 0,5 ng/ml Ethidiumbromid direkt in das Agarosegel gegeben, wodurch der nachträgliche Schritt der Färbung entfiel. Als Marker wurde der MassRuler DNA Ladder Mix der Fima Fermentas verwendet.

#### **3.9.2 RNA-Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen (Formaldehyd-Gel)**

nach Maniatis *et al.*, 1989

Die RNA-Fragmente wurden in 1%igem Formaldehyd-Gel (1% (w/v) Agarose; 2,2 M Formaldehyd; 10% 10 x MOPS) aufgetrennt. Die RNA (10 µg) wurde in Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 65°C im Wasserbad denaturiert. Anschließend wurde 1/3 des Volumens Auftragspuffer zugegeben. Die Auftrennung erfolgte über Nacht bei 30 V. Am nächsten Tag wurde das Gel ca. 30 min in 0,1%iger Ethidiumbromidlösung gefärbt und anschließend photographiert. Als Längenstandard wurde der Marker RiboRuler RNA Ladder, High Range von Fermentas nach Herstellerangaben verwendet.

### 3.10 Herstellung und Testung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden

nach den Herstellerangaben von Boehringer Mannheim

Die Digoxigenin-markierten DNA-Sonden wurden mittels PCR hergestellt. Dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

|                                                                  |            |
|------------------------------------------------------------------|------------|
| <i>M. hominis</i> Lysat (siehe Kap. 3.2.6) (1-25 ng/μl)          | 0,5 - 2 μl |
| dNTP-dig (je 2mM dCTP, dGTP, dATP; 1,3 mM dTTP; 0,7 mM dig dUTP) | 4 μl       |
| Taq-Polymerase, Invitrogen                                       | 0,25 μl    |
| Forward Primer (100 μM)                                          | 0,25 μl    |
| Reverse Primer (100 μM)                                          | 0,25 μl    |
| 10 x Puffer, Perkin Elmer                                        | 2,5 μl     |
| Aqua ad iniectabilia                                             | ad 25 μl   |

Die PCR wurde im TGradient, Biometra, unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

|       |                                     |                |                   |                        |
|-------|-------------------------------------|----------------|-------------------|------------------------|
| 1 min | 95°C                                |                |                   |                        |
| 1 min | 95°C                                |                |                   |                        |
| 1 min | 41°C-58°C (abhängig vom Primerpaar) |                |                   |                        |
|       | oppA Sonden                         | Primer         | Annealing Temp °C | Größe der PCR Produkte |
|       | 1                                   | G 368<br>G 369 | 41,2              | 370 bp                 |
|       | 2                                   | 690<br>688     | 57,7              | 546 bp                 |
|       | 3                                   | 699<br>694     | 56,2              | 480 bp                 |
|       | 4                                   | 701<br>702     | 64                | 407 bp                 |
|       | 5                                   | 703<br>704     | 54,4              | 260 bp                 |
| 1 min | 72°C                                |                |                   |                        |

Schritte 2-4 wurden 40 Mal zyklisch wiederholt.

Die Testung der Sonden erfolgte durch Vergleich mit seriell verdünnter Kontroll-DNA (1 ng/μl bis 0,01 pg/μl). Die hergestellten DNA-Sonden wurden in gleicher Weise verdünnt und je 1 μl auf eine Nylonmembran getropft. Anschließend wurde die Membran 30 min bei 80°C

gebacken. Nun wurde die Membran 2 min im Waschpuffer gewaschen, 30 min in Blockierungslösung blockiert und mit 75 mU/ml Anti-Digoxigenin-AP Konjugat, Boehringer Mannheim, zur Antikörper Bindung für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 15 min in Northern-Waschpuffer gewaschen, in Puffer A äquilibriert und 5 min mit CSPD (Dinatrium 3- (4-methoxispiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.<sup>3,7</sup>] decan}-4-yl) phenyl phosphat ) 1:100 verdünnt in Puffer A in der Dunkelkammer inkubiert. Die Membran wurde 15 min bei 37°C belassen, anschließend wurde für 1 - 10 min ein Fotofilm (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) aufgelegt und dieser über den Cawomat 2000 IR, Cawo, entwickelt. Die Stärke der hergestellten Sonden wurde mit der der Kontroll-DNA verglichen und so die Konzentration bestimmt.

### 3.11 Southern Blot-Analyse

modifiziert nach Southern, 1975

Pro Restriktionsenzym (NsiI, NciI, EcoRI, HindIII, RsaI; 10U Enzym/mg) wurde 10 µg genomische *M. hominis* DNA über Nacht bei 37°C restringiert. Die DNA-Fragmente wurden, wie in Kapitel 3.8.1 beschrieben, in 0,8%igem Agarosegel aufgetrennt.

Um die DNA einzelsträngig auf eine Nylonmembran zu transferieren, wurde das Agarosegel zuerst 15 min in 0,25 N HCl und dann 1 h in 0,4 M NaOH denaturiert. Der nach unten gerichtete Blot erfolgte über Nacht auf eine positiv geladene, in 0,4 M NaOH getränkte, Nylonmembran. Als Transferpuffer wurde ebenfalls 0,4 M NaOH verwendet. Am nächsten Tag wurde die Nylonmembran 15 min in 2 x SSC gewaschen, getrocknet und 30 min bei 80°C gecrosslinkt.

Die Nylonmembranen wurden anschließend 20 min bei 65°C in Churchpuffer prähybridisiert und über Nacht mit je 57,5 ng/ml der Dig-markierten Sonde (siehe Kapitel 3.9) bei 65°C hybridisiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3 x mit Churchwaschpuffer gewaschen, zuerst 5 min bei Raumtemperatur, dann 30 min bei 65°C und abschließend 45 min bei 65°C. Danach wurden die Dig-markierten Fragmente durch Anti-Digoxigenin-AP Konjugat, wie in Kapitel 3.9 beschrieben, in der Chemilumineszenz mit CSPD sichtbar gemacht. Auf die mit Saranfolie bedeckten Membranen wurden Amersham Hyperfilm ECL-Filme im Dunkeln (in Filmkassetten) aufgelegt, für 2 h bei Raumtemperatur exponiert und dann entwickelt.

### 3.12 Proteinchemische Methoden

#### 3.12.1 Proteinaufreinigung

nach dem Protokoll von Hopfe, 2001

Bakterien aus 1l logarithmisch gewachsener *M. hominis* Kultur wurden pelletiert, indem zuerst der Liter Kultur bei RT und 8419 x g zentrifugiert und das Bakterienpellet noch zweimal in 20 ml PBS aufgenommen und wie oben beschrieben zentrifugiert wurde. Das Bakterienpellet wurde nun in 1% (w/v) n-Dodecylmaltosid (Sigma) in PBS resuspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde 20 min bei 11068 x g und 4°C zentrifugiert, der die gelösten Proteine enthaltende Überstand mit 0,1% (w/v) n-Dodecylmaltosid/PBS auf 200 ml aufgefüllt und über Nacht mit OppA-spezifischem, Sepharose-gekoppeltem DC10-Antikörper in einer 10 ml Säule inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Säulenmatrix mit dem 20 fachen an Säulenvolumen mit 0,1% (w/v) n-Dodecylmaltosid/PBS gewaschen und das gebundene OppA-Protein mit 3,5 M MgCl<sub>2</sub> in 0,1% n-Dodecylmaltosid/PBS in 10 x 0,5 ml Fraktionen eluiert. Nach gelelektrophoretischer Analyse des Proteingehaltes in den einzelnen Fraktionen (siehe Kap. 3.11.2) wurden die OppA-haltigen Proben gepoolt und mit Hilfe von PD10-Säulen (Pharmacia Biotech) umgepuffert. Dafür wurden die PD10-Säulen zuerst mit 25 ml Tris-Puffer gewaschen, dann wurden 2,5 ml OppA-haltiger Proben über die PD10-Säulen gegeben und anschließend mit 3,5 ml Tris-Puffer eluiert. Die aufgereinigten Proteinproben wurden für Western Blot Analysen und Massenspektrometrie verwendet.

#### 3.12.2 SDS-PAGE

nach Laemmli, 1970

Die gelelektrophoretische Auftrennung einzelner Proteine und Proteingemische wurde mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), wie von Laemmli 1970 beschrieben, durchgeführt. Das Zelllysatz bzw. die aufgereinigten Proteine wurden in Laemmli-Probenpuffer 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf 7,5 - 9,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 40 V über Nacht gelelektrophoretisch getrennt. Als Marker wurden für die Western Blot-Analyse der SeeBlue Plus2 Pre-Stained Standard von Invitrogen und für die

Commassie Blaufärbung des Proteinmusters der SDS-PAGE Molecular Weight Standard, Low Range, der Firma BioRad verwendet.

### 3.12.3 Coomassie Blau-Färbung

nach Laemmli, 1970

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele in 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250 (Serva); 10% (v/v) Eisessig; 40% (v/v) Ethanol für mindestens 2 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend wurden die proteinfreien Bereiche der Gele in 7,45% (v/v) Eisessig; 20% (v/v) Ethanol entfärbt. Dazu wurden die Gele mindestens 2 h in der Lösung bei RT geschüttelt, die zwei- bis dreimal durch frische Entfärbelösung ersetzt wurde.

### 3.12.4 Western Blot-Analyse

nach Towbin *et al.*, 1979

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Semi-Trockenblotkammer durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf Nitrozellulose-Membran übertragen. Hierzu kamen zuerst 3 Whatman-Papiere in Kathodenpuffer getränkt auf die Kathoden-Graphitplatte der Kammer, darauf das Gel, die Nitrozellulosemembran, getränkt in Anode-I-Puffer, und zum Schluss jeweils 3 Whatman-Papiere, getränkt in Anode-I- bzw. Anode-II-Puffer. Nach Auflage des Anoden-Graphitplatte tragenden Deckels wurde für 1 h eine Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gelfläche angelegt, so dass die Proteine aus dem Gel auf die Membran wanderten.

### 3.12.5 Immunfärbung

Nach Transfer der Proteine aus der SDS-PAGE auf Nitrozellulosemembran wurde diese 30 min bei RT in 5% Milchpulver/PBS geschüttelt, um die proteinfreien Bereiche auf der Nitrozellulose zu blockieren und somit einer unspezifischen Bindung der folgenden Reagenzien vorzubeugen. Dann wurde einer der OppA-spezifischen monoklonalen Antikörper, entweder der TF6-Antikörper (Hybridomzellkulturüberstand mit 5% Milchpulver/PBS 1:5 verdünnt) oder der LG3-Antikörper (unverdünnter

Hybridomzellkulturüberstand) auf die Membran gegeben und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurde die Membran 3 x mit PBS gewaschen und mit dem zweiten, Peroxidase-konjugierten Antikörper (POX-Anti-Mouse-Antikörper ) (1:250 verdünnt in 5% Milchpulver/PBS) ca. 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach nochmals 3x mit PBS gewaschen. Nun wurden die OppA Bereiche durch eine Chemiluminiszenzreaktion mittels ECL (GE Healthcare), nach Herstellerangaben detektiert. Die belichteten Röntgenfilme (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) wurden nach 15 s - 10 min Belichtungszeit über den Cawomat 2000 IR, Cawo, entwickelt.

### **3.13 Massenspektrometrie**

Die massenspektrometrische Proteinanalyse und der Sequenzvergleich mit der Mascot-Datenbank erfolgten im Analytischen Labor des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf ([www.bmfz.de](http://www.bmfz.de)).

### **3.14 Computerprogramme und Internetadressen**

Die DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme EditSeq, MegAlign und SeqMan des Softwareprogrammpakets Lasergene der Firma DNA STAR, Madison, USA analysiert. Oligonukleotide wurden mit dem Programm PrimerSelect desselben Anbieters ausgewählt. Zum Homologievergleich wurde die Internetseite <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> verwendet.

In silico Analysen der Sekundärstrukturen der verschiedenen OppA Proteinsequenzen wurden durch SOPMA Secondary Prediction Method (Pôle BioInformatique Lyonnaise Network Protein Sequence Analysis; [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)) ausgeführt.

Um Sequenzen auf mögliche posttranslationale Modifikationen zu überprüfen, wurden folgende Internetprogramme genutzt: <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> und <http://www.ebi.ac.uk/Tools/ppsearch/index.html>, außerdem das Programm Prosite des Softwarepaketes von Lasergene.

Die Auswertung der realtime PCR Versuche wurde durch die zugehörige Software von BioRad (iQ5, Version 2.0, und CFX, Version 1.5) und durch Excel, Microsoft durchgeführt. Die Abbildungen wurden mit Hilfe des Programmes Inkscape Version 0.47 ([www.inkscape.org](http://www.inkscape.org)) erstellt.

## 4. Ergebnisse

Im ersten Teil meiner experimentellen Arbeiten widmete ich mich der Beantwortung der Fragestellung, welche molekularen Unterschiede zu der Variation von OppA in Antigenität (Isolat 64) oder Größe (Isolat 66) bzgl. des gut charakterisierten FBG-Isolates führten, die sich in der Western Blot Analyse gezeigt hatten. Hierzu wurden das *oppA* Gen der zwei Isolate sequenziert und die abzuleitenden Proteinsequenzen miteinander verglichen.

Im Weiteren ging es um die Frage, ob *oppA* nur polycistronisch, gemeinsam mit *oppBCDF* oder auch monocistronisch exprimiert wird. Dazu wurde zuerst in der Southern Blot Analyse ermittelt, ob *oppA* ein single-copy Gen ist. Anschließend wurde ein Infektionsassay entwickelt, um Veränderungen und Unterschiede in der Expression von *oppABCDF* nachweisen zu können.

### 4.1 OppA Expression in verschiedenen *M. hominis* Isolaten auf Proteinebene

#### 4.1.1 Ausgangssituation

Am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf war OppA, die substratbindende Domäne eines Oligopeptidimporters von *Mycoplasma hominis* seit einigen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Bei der Charakterisierung drei verschiedener *M. hominis* Isolate (Isolate 64, 66 und FBG) hatten sich in der Western Blot Analyse Unterschiede sowohl im apparenten Molekulargewicht als auch in der Antigenität von OppA gezeigt (Hopfe, 2001).

So wies OppA des Isolats 66 (OppA<sup>66</sup>) einen Größenunterschied von +10 kDa zu OppA der Isolate 64 (OppA<sup>64</sup>) und FBG (OppA<sup>FBG</sup>) auf (Abb. 1). Dieses Isolat war insofern interessant, als es unter den mehr als 200 analysierten *M. hominis*-Isolaten der Düsseldorfer Stammsammlung das einzige mit Größenvariation des OppA Proteins war. Das Isolat 64 wurde für die weitere Analyse ausgesucht, da es zu der Gruppe der *M. hominis*-Isolate zählte, die sich im Gegensatz zu den Isolaten FBG und 66, im Western Blot nicht mit dem OppA-spezifischen Antikörper TF6 nachweisen ließen. Alle drei Isolate wurden jedoch durch den OppA-spezifischen Antikörper LG3 detektiert. (Abb. 1).

### Charakteristika in der Expression von OppA der *M. hominis* Isolate FBG, 64 und 66

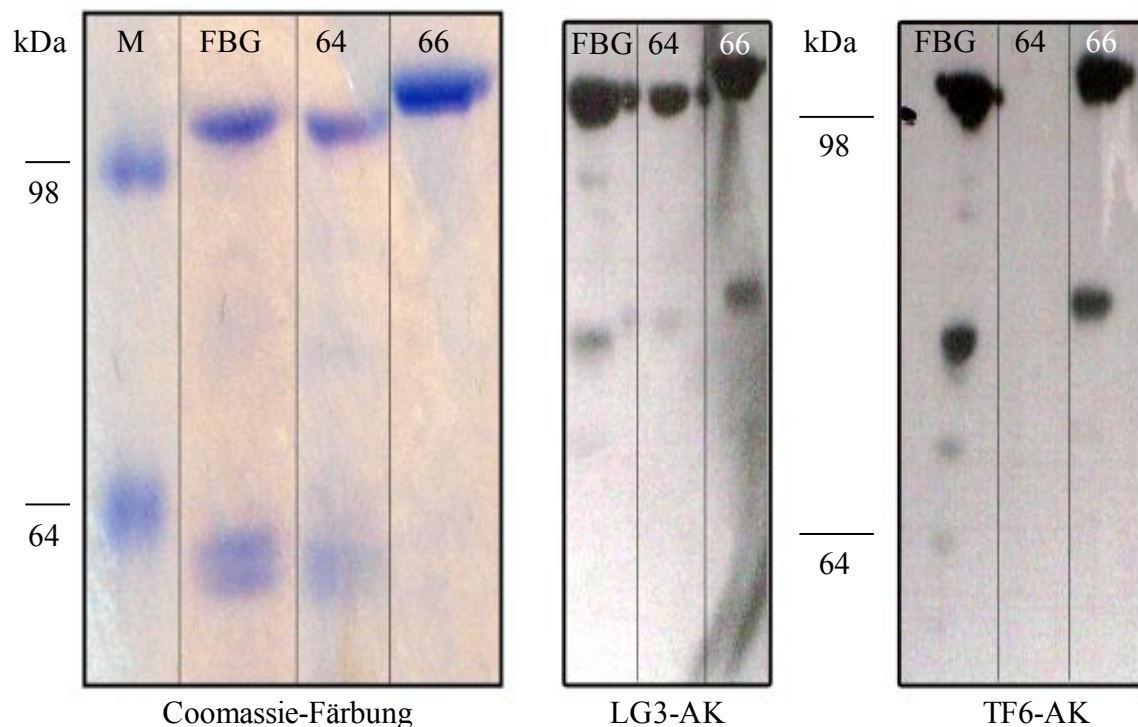


Abbildung 1: Westernblotanalyse von OppA der *M. hominis* Isolate FBG, 64, 66.

Auftrennung von aufgereinigtem *M. hominis* OppA Protein (2 µg Protein/Slot) in 9,5%igem SDS-Polyacrylamidgel. Anschließend erfolgte die Färbung mit Coomassie Brilliant Blau bzw. die Westernblotanalyse. Als Antikörper wurde LG3 bzw. TF6 benutzt. Als Längenstandard wurde bei der Westernblotanalyse der SeeBlue Pre-Stained Standard (Invitrogen) verwendet und bei der Coomassie-Färbung ein low-range Marker (Bio-Rad).

Es stellte sich somit die Frage, wodurch die abweichende Größe des OppA Proteins im Isolat 66 bedingt ist. Sollte bereits die genomische Sequenz länger sein, wäre interessant zu analysieren, welcher Bereich von dieser Insertion betroffen ist, und ob dies Auswirkungen auf die Funktionen von OppA hat. Weitere denkbare Ursachen für eine Längenvariation wären posttranslationale Modifikationen oder eine veränderte Proteinfaltung. Der Verlust der TF6-Bindung an OppA<sup>64</sup> ließ auf eine Variation im TF6-Epitop schließen.

#### 4.1.2 Die OppA-Sequenzen der *M. hominis* Isolate 64 und 66

Um diese Thesen zu klären, wurde von mir zunächst das *oppA* Gen der zwei Isolate sequenziert. Hierzu wurden mittels konventioneller PCR (s. Kapitel 3.4.1.1) sieben überlappende Fragmente generiert (Abb. 2).

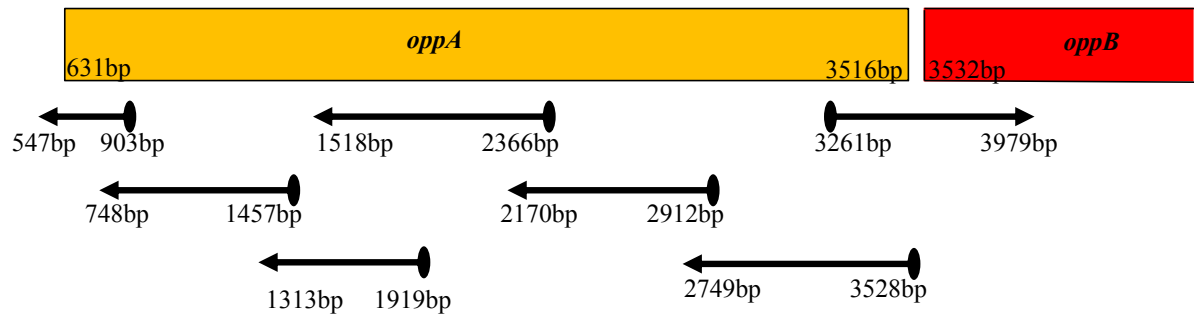


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Strategie zur *oppA*-Gensequenzierung. Für jedes Isolat (64, 66 und FBG) wurden sieben überlappende *oppA*-PCR-Fragmente generiert. Diese wurden im BMFZ sequenziert. Die Pfeile geben die jeweilige Richtung der Sequenzierung an. Die Fragmentlänge und die Lokalisation - bezogen auf das Gen - ist in bp angegeben.

Die PCR-Produkte wurden nach Aufreinigung im Zentrallabor des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums sequenziert (s. Abb. 2). Die Analyse der resultierenden *oppA*-Gensequenzen zeigte, dass sich das abzuleitende OppA<sup>66</sup> Protein in der Anzahl der Aminosäuren und dem berechneten Molekulargewicht nicht von OppA<sup>64</sup> und OppA<sup>FBG</sup> unterschied. Alle drei OppA-Proteine haben eine Polypeptidkette von 961 Aminosäuren, N- und C-Terminus der jeweiligen Sequenzen zeigten sich identisch (Abb. 3). FBG und Isolat 66 waren mit einer kalkulierten Masse von 108,3 kDa gleich, Isolat 64 mit einer kalkulierten Molekülmasse von 108,1 kDa nur unwesentlich leichter. Auch die isoelektrischen Punkte (pI) lagen nah beieinander: der pI-Wert von Isolat 66 war mit 7,98 nur etwas niedriger als der von Isolat 64 (pI 8,52) und FBG (pI 8,31) (Tab 1). Der Anteil von Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin war in den drei Genen vergleichbar; der Anteil an Guanin und Cytosin war mit ca. 15% niedrig, wie es bei Mycoplasmengenen charakteristisch ist.

Tabelle 1: Charakteristika der OppA-Sequenzen der Isolate FBG, 64 und 66

|                       | <b>FBG</b> | <b>Isolat 64</b> | <b>Isolat 66</b> |
|-----------------------|------------|------------------|------------------|
| Anzahl Aminosäuren    | 961        | 961              | 961              |
| Größe in kDa          | 108,3      | 108,1            | 108,3            |
| isoelektrischer Punkt | 8,31       | 8,52             | 7,98             |
| % Adenin              | 40,92      | 40,58            | 40,85            |
| % Guanin              | 15,9       | 15,7             | 15,59            |
| % Thymin              | 27,69      | 27,96            | 27,75            |
| % Cytosin             | 15,49      | 15,77            | 15,8             |

Die hoch konservierte Walker A Region (Aminosäure 869 – 876) unterschied sich in den drei Isolaten nicht. In der weniger konservierten Walker B Region (Aminosäure 737 – 752) zeigten sich nur geringe Unterschiede, so war Valin an Position 741 in FBG in den Isolaten 64 und 66 durch das ebenfalls hydrophobe Leucin ersetzt. Auch in den konservierten Regionen CS1 (Aminosäure 179 – 244), CS2 (Aminosäure 387 – 394) und CS3 (Aminosäure 701 – 729), die eine wichtige Rolle in der ATPase-Aktivität von OppA spielen (Hopfe *et.al.*, 2011), zeigten sich keine bis geringfügige Veränderungen. So waren die Aminosäuresequenzen der drei Isolate in der CS2-Region identisch, in der CS1-Region war an AS Position 235 Glutaminsäure bei FBG zu Asparaginsäure bei den Isolaten 64 und 66 verändert und an AS Position 239 Asparagin (FBG) zu Serin (Isolate 64 und 66). In der CS3-Region fanden sich ebenfalls zwei Aminosäureaustausche, an Position 701 wurde aus Methionin (FBG) Isoleucin (Isolate 64 und 66), an Position 711 aus Valin (FBG) Phenylalanin (Isolate 64 und 66) (Abb. 3).

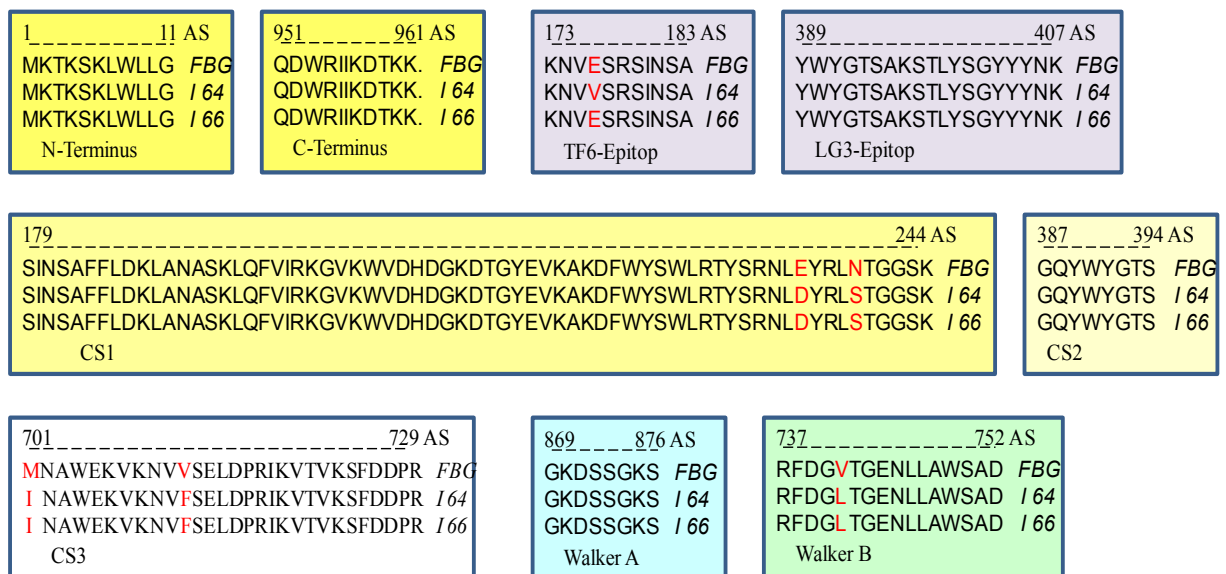


Abbildung 3: Darstellung varianter OppA-Proteinregionen in den Isolaten FBG, 64 und 66.

Die Analyse der nach Sequenzierung (siehe Kapitel 3.6) abzuleitenden OppA-Sequenzen von FBG, Isolat 64 und Isolat 66 erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms MegAlign, DNA STAR.

Auffällig war erstens, dass das OppA in den beiden Isolaten 64 und 66 an diesen, in konservierten Regionen liegenden Positionen dieselben Mutationen aufwiesen und zweitens, dass die ausgetauschten Aminosäuren aus derselben Gruppe stammen, also z.B. die hydrophobe Aminosäure Valin durch die ebenfalls hydrophobe Aminosäure Phenylalanin ersetzt wurde.

In der Bindungsregion des TF6-Antikörpers (Aminosäure 173 - 183) wurde im OppA-Protein des Isolates 64 eine Mutation der negativ geladenen und hydrophilen Aminosäure Glutaminsäure zur nichtpolaren, hydrophoben Aminosäure Valin (<sup>E176V</sup>) detektiert. Diese scheint auszureichen, um das TF6-Epitop zu zerstören und Isolat 64 nicht mehr durch den Antikörper TF6 detektierbar zu machen. Die Sequenz des LG3-Epitops (Aminosäure 389 - 407), das bisher bei allen *M. hominis* Stämmen detektiert wurde, war, wie zu erwarten, bei den OppA Proteinen der drei Isolate identisch.

Im Vergleich der *oppA*-Sequenzen zeigten sich insgesamt zwar einige einzelne Mutationen, insgesamt sind sich die abzuleitenden Proteine jedoch sehr ähnlich. Der Grund für den Größenunterschied des OppA<sup>66</sup> Proteins, der im SDS-PAGE zu sehen ist, konnte somit nicht auf eine Massenzunahme zurückgeführt werden.

#### 4.1.3 Analyse der Isolate-spezifischen Proteinsequenzen von OppA

Die von den Gensequenzen abgeleiteten OppA Proteinsequenzen wurden mit Hilfe von internetbasierten Softwareprogrammen auf Unterschiede der zu erwartenden Sekundärstrukturen und auf mögliche posttranslationale Modifikationen untersucht; dies in der Hoffnung, dass hierin der Grund für den apparenten Größenunterschied des OppA<sup>66</sup> Proteins gefunden werden kann.

Die Sekundärstrukturen wurden durch das Programm SOPMA-NPS ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html)) nach der Methode von Geourjon und Deléage (1995) berechnet. OppA<sup>66</sup> zeigte im Vergleich zur Sekundärstruktur von OppA<sup>FBG</sup> geringfügige Strukturunterschiede, allerdings waren diese in einem ähnlichen Ausmaß zu verzeichnen wie für OppA<sup>64</sup> (Abb. 4).

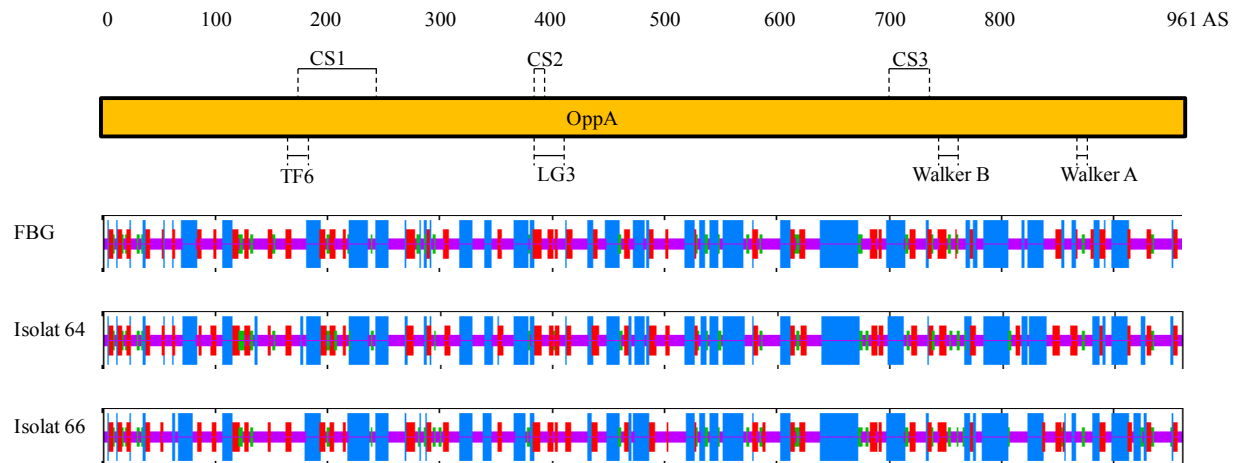


Abbildung 4: Vergleich der Sekundärstrukturen der OppA<sup>FBG</sup>, OppA<sup>64</sup> und OppA<sup>66</sup> Varianten von *M. hominis*.

Schematische Darstellung des OppA Proteins der Isolate FBG, 64 und 66 unter Angabe der funktionellen Bereiche CS1, CS2, CS3, Walker A, Walker B und der Bindungsstellen der Antikörper TF6 und LB3. Bei den folgenden Sekundärstrukturen bedeutet blau:  $\alpha$ -Helix, rot: „extended Strand“, grün:  $\beta$ -Schleife, und gelb: „random Coil“; nach Geourjon und Deléage, 1995.

Auch bei der Suche nach posttranslationalen Modifikationen zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen den drei Proteinsequenzen (Tab. 2).

Tabelle 2: Postulierte Phosphorylierungsstellen von OppA der Isolate FBG, 64 und 66.

| Score >0,5         | Serin | Threonin | Tyrosin | Gesamt | Score >0,7 | Serin | Threonin | Tyrosin | Gesamt |
|--------------------|-------|----------|---------|--------|------------|-------|----------|---------|--------|
| FBG                | 38    | 18       | 19      | 75     | FBG        | 25    | 6        | 16      | 47     |
| 64                 | 40    | 19       | 18      | 77     | 64         | 30    | 8        | 15      | 53     |
| 66                 | 38    | 21       | 21      | 80     | 66         | 29    | 7        | 16      | 52     |
| Score $\geq 0,995$ | Serin | Threonin | Tyrosin | Gesamt |            |       |          |         |        |
| FBG                | 3     | 0        | 0       | 3      |            |       |          |         |        |
| 64                 | 3     | 0        | 0       | 3      |            |       |          |         |        |
| 66                 | 3     | 0        | 0       | 3      |            |       |          |         |        |

Mit dem Programm NetPhos von CBS (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) wurden potentielle Phosphorylierungsstellen angezeigt. OppA<sup>66</sup> zeigte hier bei einem Score von > 0,5 80 Phosphorylierungsstellen und somit nur unwesentlich mehr als OppA<sup>FBG</sup> mit 75. Der Score gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der eine angezeigte Stelle phosphoryliert wird. Wählte man einen höheren Score von > 0,7 und damit auch eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass die

Phosphorylierungen tatsächlich stattfinden, lag OppA<sup>64</sup> mit 53 möglichen Stellen sogar noch vor OppA<sup>66</sup> mit 52 Stellen. Ab einem Score > 0,99 unterschieden sich die Anzahl der möglichen Phosphorylierungsstellen bei den drei Isolaten nicht mehr. Bei einem Score von  $\geq 0,995$  fanden sich jeweils drei Phosphorylierungsstellen an Serinen (S<sup>649</sup>, S<sup>724</sup>, S<sup>876</sup>), über 0,995 findet man jeweils nur noch eine. Das OppA tatsächlich phosphoryliert wird und *in vivo* in einer phosphorylierten und nicht phosphorylierten Form vorliegt, konnte Hopfe 2001 nachweisen. Allerdings beträgt die Massenzunahme durch eine Phosphorylierung nur 80 Dalton (Miesbauer *et al.*, 1994; Eysers und Gaskell, 2007), so dass sich der Unterschied von >10 kDa bei OppA<sup>66</sup> nicht durch Phosphorylierungen alleine erklären lässt.

Auf der Suche nach weiteren posttranslationalen Modifikationen wurden die Proteinsequenzen mit den Programmen Prosite des Softwarepaketes von Lasergene und PPsearch der EMBL-EBI Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/ppsearch/>) analysiert, wobei nur kleine Unterschiede gefunden wurden: So zeigten die OppA Varianten der Isolate 64 und 66 zum Beispiel zwei mögliche Myristoylierungsstellen mehr als OppA<sup>FBG</sup> (Tab 3), die jedoch den OppA Größenunterschied von >10kDa im Isolat 66 nicht zu erklären vermochten.

Tabelle 3: Putative posttranslationale Modifikationen

| Isolat | N-Myristylierung | N-Glycosylierung | PKC-Phosphorylierung | CK2-Phosphorylierung | cAMP-Phosphorylierung | TK-Phosphorylierung | ATP binding site | Gesamt |
|--------|------------------|------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|---------------------|------------------|--------|
| FBG    | 12               | 5                | 19                   | 26                   | 2                     | 2                   | 1                | 67     |
| 64     | 14               | 4                | 20                   | 26                   | 2                     | 2                   | 1                | 69     |
| 66     | 14               | 5                | 20                   | 25                   | 2                     | 2                   | 1                | 69     |

Da durch diese computergestützten Analysen nicht eindeutig zu klären war, warum die OppA-Variante des Isolats 66 in der SDS-PAGE Analyse ein größeres Molekulargewicht anzeigte als die der Isolate 64 und FBG, wurde eine massenspektrometrische Analyse durchgeführt, um mögliche unterschiedliche posttranslationale Modifikationen direkt erfassen und nachweisen zu können. Die Massenspektrometrie mittels MALDI-TOF wurde im Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität an den affinitätschromatographisch-aufgereinigten OppA-Proteinen der drei Isolate durchgeführt. Es konnten 28% der jeweiligen Polypeptidkette detektiert werden, wobei in diesen Regionen keine OppA<sup>66</sup>-spezifischen posttranslationalen Modifikationen gefunden wurden.

Das höhere Laufverhalten des OppA<sup>66</sup> Proteins im SDS-PAGE ließ sich also weder durch eine unterschiedliche Sequenzlänge noch durch posttranslationale Modifikationen erklären. Daher blieb zu vermuten, dass die identifizierten Aminosäureaustausche im OppA<sup>66</sup>, die zu einer leicht divergierenden Sekundärstruktur führten, ausreichend waren, um im SDS-PAGE zu einer verzögerten Laufgeschwindigkeit zu führen.

#### 4.2 *oppA*, ein single-copy Gen

Wie Henrich und Mitarbeiter 1999 zeigen konnten, lässt sich in der Northern Blot Analyse für die fünf *oppABCDF* -Gene je eine 9,5 kb Bande detektieren (Henrich *et al.*, 1999). Dies ließ darauf schließen, dass die *opp*-Gene polycistronisch organisiert sind. Bei *oppA* zeigten sich zusätzlich zur 9,5 kb Bande noch eine 3,3 kb und eine 2,2 kb große Bande, wobei letztere als Abbauprodukt der 3,3 kb Bande bewertet wurde (Abb. 5).

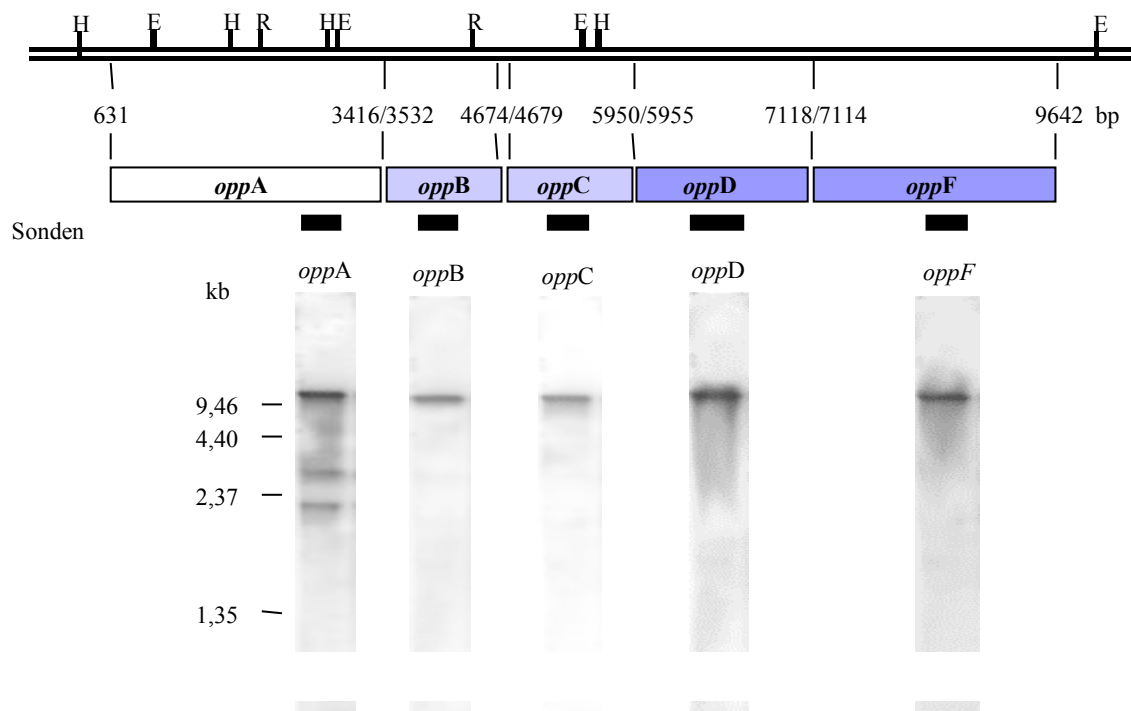


Abbildung 5: Northern Blot-Analyse der fünf *opp*-Gene.  
(mit freundlicher Genehmigung von Dr. Miriam Hopfe (Hopfe, 2001)).

Die 3,3 kb RNA-Bande ließ vermuten, dass *oppA* entweder in der Operonstruktur nicht nur polycistronisch sondern zusätzlich monocistronisch exprimiert wird, oder dass es für *oppA*

noch einen weiteren Genlokus ohne *oppBCDF* gibt. Dies konnte schon bei anderen Mycoplasmenspezies gezeigt werden, z.B. für ein Adhäsionsgen von *M. genitalium* (Dallo *et al.*, 1991), bei dem die Hälfte des Gens als single-copy Gen vorlag, während es von der anderen Hälfte multiple Kopien gab. Für das Oberflächenprotein pMGA von *M. gallisepticum* konnten sogar sechs verschiedene Gene gefunden werden, die vermutlich durch eine Reihe von Genduplikationen entstanden sind (Markham *et al.*, 1994).

Um einen zweiten Genlokus für *oppA* ausschließen zu können, wurde von mir eine Southern Blot Analyse von *oppA* des *M. hominis* FBG Stammes durchgeführt (siehe Kapitel 3.11). Hierzu wurden zunächst 5 Sonden hergestellt, mit denen verschiedene Bereiche des *oppA* Gens detektiert werden konnten (Abb. 6).

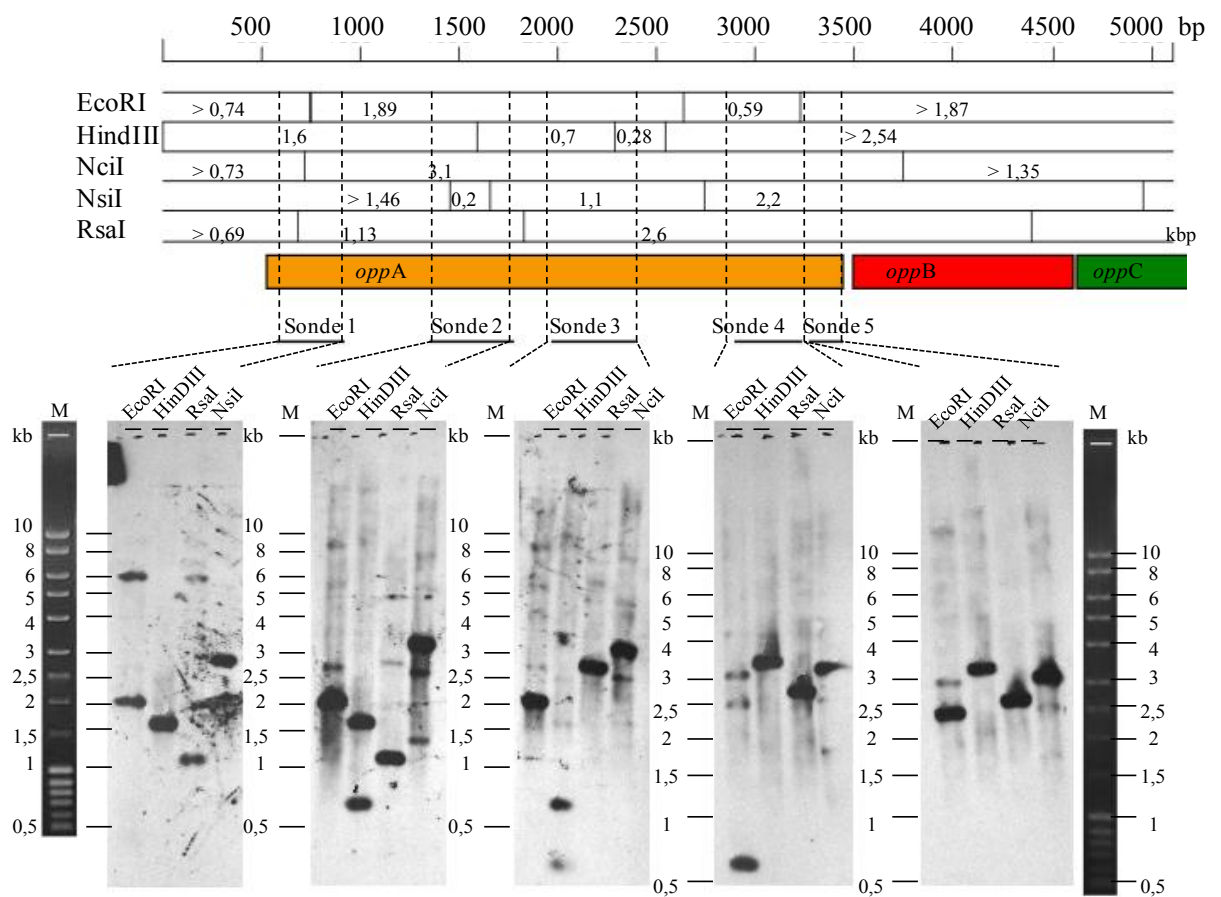


Abbildung 6: Southern Blot Analyse von *oppA*.

*M. hominis* DNA wurde mit dem Qiaamp Blood and Tissue Kit (Qiagen) gewonnen. Je 10 µg DNA wurden mit 10 U/mg Restriktionsenzym (EcoRI, HindIII, RsaI und NsiI (Sonde 1) bzw. NciI (Sonde 2 - 5)) 12 h bei 37°C geschnitten. Die Fragmente wurden in 0,8% igen Agarosegelen aufgetrennt und auf Nylonmembranen geblottet. Die Detektion der verschiedenen *oppA*-Genregionen erfolgte mit den in der Abbildung eingezeichneten Dig-markierten DNA-Sonden. Als Marker (M) wurde der MassRuler DNA Ladder Mix (Fermentas) verwendet. Die Restriktionsschnittstellen der genutzten Enzyme in diesem Bereich der *M. hominis* DNA wurden eingezeichnet.

Mit der Sonde 1 wurden nach Restriktion der genomischen DNA von *M. hominis* FBG mit dem Enzym *EcoRI* 2 Banden von 5,5 kb und 1,9 kb detektiert, nach Restriktion mit dem Enzym *HinDIII* eine Bande von 1,7 kb, mit *RsaI* zwei Banden der Größe 1,2 kb und 5,5 kb und mit *NsiI* eine Bande von 2,8 kb. Diese Banden entsprachen alle den zu erwartenden Banden des *opp*-Genlokus. Zusätzliche Banden konnten nicht detektiert werden.

Die Sonde 2 detektierte nach Restriktion mit den Enzymen *EcoRI* und *RsaI* die zu erwartenden Banden von 1,9 bzw. 1,1 kb. Die zusätzlich zu detektierenden schwachen Banden im Bereich von 8,5 und 2,6 kb (*EcoRI*), bzw. 4,9 und 2,7 kb (*RsaI*) ließen sich durch nicht vollständig restringierte DNA erklären. Für *HinDIII* wurden zwei Banden der Größe 0,7 und 1,6 kb nachgewiesen, was ebenfalls den erwarteten Größen entsprach.

Nach Restriktion mit dem Enzym *NciI* wurde mit den Sonden 2,3,4 und 5 die gewünschte 3,1 kb Bande detektiert. Die von allen vier Sonden schwach markierten Banden von 1,7 und 2,6 kb entsprechen sehr wahrscheinlich degradierter DNA.

Mit der Sonde 3 wurden nach Restriktion der genomische DNA mit den Enzymen *HinDIII* und *RsaI* die erwarteten Banden von 0,3 und 0,7 kb (*HinDIII*) sowie 2,6 kb (*RsaI*) detektiert. Bei mit *EcoRI* geschnittener DNA wurden zusätzlich zu der erwarteten 1,9 kb Bande auch noch Banden der Größe 8,5 und 2,6 kb nachgewiesen, die sich wiederum mit nicht vollständig geschnittener DNA erklären lassen.

Ein ähnliches Hybridisierungsmuster ergaben die Sonden 4 und 5. Nach Restriktion mit den Enzymen *HinDIII* und *RsaI* wurden die erwarteten Banden der Größe 3,3 und 2,6 kb nachgewiesen. Mit der Sonde 4 sollte nach Restriktion mit *EcoRI* eine 0,6 kb Bande und eine Bande größer als 1,9 kb detektiert werden. Neben der erwarteten 0,6 kb Bande wurden jedoch zwei Banden größer als 1,9 kb (2,9kb und 2,4 kb) nachgewiesen.

Eine Bande größer 1,9 kb sollte des Weiteren mit der Sonde 5 nachgewiesen werden. Wie schon bei Sonde 4 zu sehen war, sind auch hier zwei Banden größer 1.9 kb sichtbar, die ebenfalls 2,9 und 2,4 kb groß sind. Hier erkennt man deutlich, dass das Signal der 2,4 kb Bande erheblich stärker ist als das der 2.9 kb großen Bande. Trotz dieser einzelnen zu beobachteten Veränderungen stimmen die anderen detektierten Banden größtenteils mit den zu erwartenden überein. Die wenigen Abweichungen lassen sich durch Abbauprozesse und unvollständige Restriktion erklären.

Zusammenfassend zeigte die Southern Blot Analyse recht deutlich, dass es für *oppA* nur einen Genlokus gibt. Dies bestätigte sich kürzlich durch die vollständige Sequenzierung des *M. hominis* Genoms des Stammes PG21, in dem ebenfalls nur ein Genlokus für *oppA* zu finden ist (Pereyre *et.al.*, 2009). Folglich kann die im Northern Blot detektierte 3,3 kb *oppA*

RNA-Bande nur vom *opp* Genlokus kodiert sein, was die These der mono- und polycistronischen OppA-Expression stützt.

### 4.3 Etablierung eines Infektionsassays

Zur Überprüfung der These, ob und unter welchen Bedingungen *oppA* nicht nur polycistronisch, sondern auch monocistronisch ohne *oppBCDF* exprimiert wird, habe ich einen Infektionsassay im 6 Well-Mikrotiterplattenformat entwickelt. Bei diesem wurden plastikadhärente HeLa-Zellen für unterschiedlich lange Zeiten mit *M. hominis* FBG inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA sowie zum Vergleich Gesamt-DNA gewonnen und die Transkripte wie auch Genbereiche von *oppA*, B, C, D und F durch qPCR Analysen quantifiziert. Wenn die These zuträfe, dass *oppA* bei Zytadhärenz auch monocistronisch exprimiert wird, sollte der Anteil an *oppA*-Transkripten signifikant höher sein als der für die *oppB-F*-Transkripte.

#### 4.3.1 Aufbau des Assays

Der Infektionsassay wurde wie in Kapitel 3.2 beschrieben durchgeführt. Die Gesamt-DNA und -RNA der Zellen (Mycoplasmen und HeLa-Zellen) wurde zu verschiedenen Zeitpunkten zwischen 0 h und 72 h (wie in Kapitel 3.3 beschrieben) präpariert. Für jeden Zeitpunkt wurden 2 Wells verwendet, so dass die Versuche in Doppelbestimmung durchgeführt wurden. Der 0 h-Wert wurde sofort nach Zugabe der Mycoplasmen zu den HeLa-Zellen gewonnen und nachfolgend als Ausgangszustand der Mycoplasmen angesehen, da sie kaum Zeit zur Enzyminduktion oder -repression hatten.

Während der Infektion blieb die Anzahl der lebenden HeLa-Zellen, die durch Anfärbung mit Trypanblau bestimmt wurde, in den ersten 24 Stunden vergleichbar mit HeLa-Zellen, die als Referenz nicht infiziert mitgeführt wurden (4,5 bzw.  $3 \times 10^5$  Zellen). Zu späteren Zeitpunkten zeigte sich, dass es weniger infizierte HeLa-Zellen (bei 48h:  $0,5 \times 10^5$ ) gab, als in der Referenzgruppe (bei 48h:  $7,5 \times 10^5$ ). Auch hier zeigte sich also, dass HeLa-Zellen weniger gut proliferieren, wenn sie mit *M. hominis* infiziert sind, wie Hopfe und Henrich bereits 2008 beschrieben (Hopfe und Henrich, 2008).

#### 4.3.2 Testung verschiedener RNA-Präparationen und DNA Extraktion

Um ein optimales qPCR Ergebnis zu erzielen, wurden zuerst verschiedene Methoden zur RNA Gewinnung getestet (siehe Kapitel 3.3) und zur Qualitätskontrolle auf einem RNA-Formaldehydgel aufgetragen (Abb. 8). Außerdem wurde bei allen Proben die optische Dichte bei 260 nm gemessen und der 260 nm/280 nm Quotient bestimmt, der bei intakter RNA zwischen 1,8 und 2,1 liegen sollte.

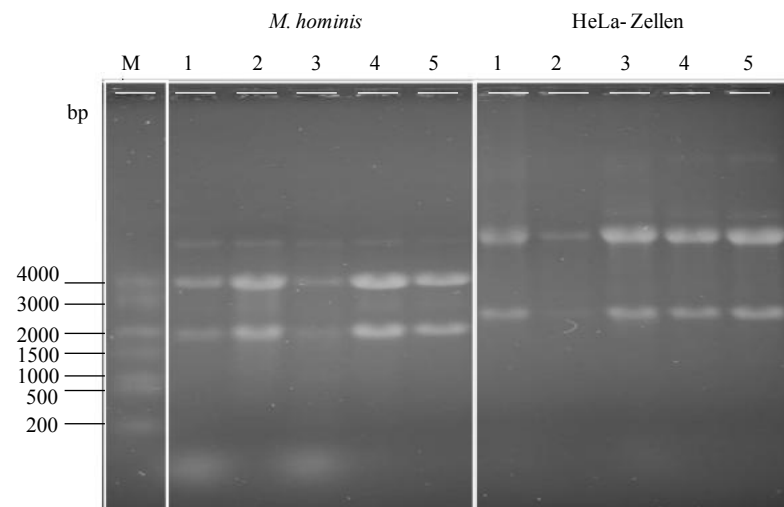


Abbildung 8: Analyse verschiedener RNA-Präparationen.

Auf einem 1% igen Formaldehydgel wurden jeweils 10µg RNA/Slot aufgetragen. Es wurde RNA von *M. hominis* und HeLa-Zellen mit verschiedenen Präparationsmethoden gewonnen: 1: Phenol-Chloroform, Fluka; 2: Guanidin/ Cäsiumchlorid-Gradient; 3: Trizol, Gibco BRL; 4 und 5: RNeasy Kit, Qiagen (Elution 1 und 2). Als Marker wurde der Ribo Ruler RNA Ladder, High Range (Fermentas) verwendet.

Der Vorteil der Phenol-Chloroformextraktion (Fluka) war, dass die Lyse direkt im Well durchgeführt werden konnte. Es entfiel also das Abkratzen der Zellen (wie z.B. bei der Trizol Methode), was allein schon möglicherweise die Expression von Enzymen modulierte. Durch direkte Lyse im Well ließ sich außerdem aus einem Well RNA und DNA gewinnen, was den Vergleich von Transkripten zu vorliegenden Genomequivalenten erleichterte. Daher wäre diese Methode optimal für den Infektionsassay gewesen. Allerdings stellte sich die RNA nach Phenol-Chloroform-Extraktion jedoch als degradiert heraus (Spur 1) und der 260 nm/280 nm Quotient der RNA lag zum Teil unter 1 (statt bei 1.8-2.1), so dass diese Methode nicht weiter angewendet wurde.

Mit dem Guanidin-Cäsiumchlorid-Gradienten ließen sich die Mycoplasmen, im Gegensatz zu den HeLa-Zellen, gut präparieren (Spur 2). Ein Nachteil war allerdings, dass die Zellen zuerst aus dem Well abgekratzt werden mussten. Die Methode eignete sich außerdem nicht für

größere Versuchsansätze, wie sie für diese Arbeit benötigt wurden, da jede Probe 16 h in der Ultrazentrifuge zentrifugiert werden musste. Dabei hätten nur 6 Proben gleichzeitig im Rotor Platz gefunden. Das stellte ein Ausschlusskriterium für diese Methode dar.

Auch bei der RNA Präparation mittels TRIzol (Gibco BRL) mussten die Zellen im Well abgekratzt werden. Im Vergleich zur Phenol-Chloroform Methode bestand außerdem noch der Nachteil, dass nur die RNA, nicht aber die DNA gewonnen werden konnte. Wie in Abbildung 8, Spur 3 zu sehen ist, war auch hier die RNA degradiert, so dass auch diese Methode keine weitere Verwendung fand.

Nach Präparation der RNA mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen zeigte sich auf dem Formaldehydgel keine Degradation der RNA (Abb.8, Spuren 4 und 5). Die Werte des 260 nm/280 nm Quotienten lagen im gewünschten Bereich zwischen 1,8 und 2,1. Da auch die Lyse direkt im Well möglich war, so dass das Abkratzen der Zellen und die damit verbundenen Probleme entfielen, wurde diese Methode für die weiteren Infektionsansätze verwendet.

Um die gute Qualität der RNA nach Präparation mit dem RNeasy Mini Kit zu verifizieren, wurde eine solche Probe im BMFZ mit dem Bioanalyzer 2100 untersucht. Außerdem wurde dort RNA nach Extraktion mit Phenol-Chloroform analysiert. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass durch diese Methode, die in der Theorie allen Anforderungen (Lyse im Well, zeitgleiche RNA und DNA Präparation) entsprach, tatsächlich nur degradierte RNA gewonnen wurde. Wie in Abbildung 9 ersichtlich ist, wurden die vorherigen Ergebnisse bestätigt. Die RNA hat nach Präparation mit dem RNeasy Kit eine außergewöhnlich gute RNA-Integritätsnummer (RIN) von 9,5, bei der der maximal erreichbare Höchstwert 10 beträgt. Die RIN nach Phenol-Chloroform-Extraktion lag bei nur 2,5, die RNA war also höchstgradig degradiert. Auch die durch den Bioanalyzer durchgeführte elektrophoretische Auftrennung korreliert mit den restlichen Befunden. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion waren überhaupt keine Peaks und Banden für die 16S rRNA und die 23S rRNA zu detektieren, während sie nach der Präparation mit RNeasy in der gewünschten Intensität vorlagen. Diese Ergebnisse unterstützten die Entscheidung, zur weiteren RNA Präparation das RNeasy Mini Kit von Qiagen zu verwenden.

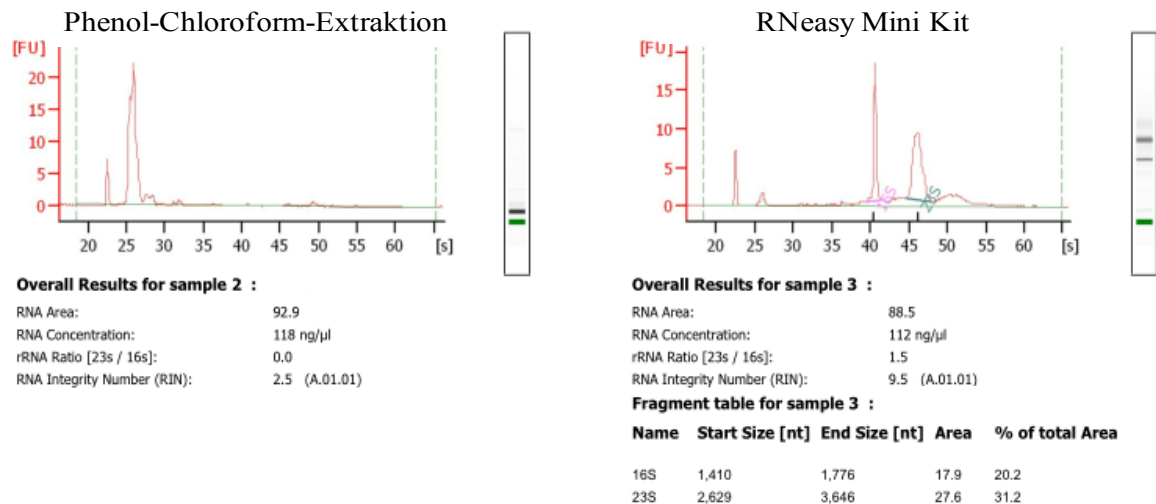


Abbildung 9: RNA-Analysen mittels des Bioanalyzers 2100.

Nach RNA Präparation mit Phenol-Chloroform (Fluka) und dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) wurden die Proben im Bioanalyzer 2100 Version 2.4 im BMFZ der HHU Düsseldorf gemessen.

Um genomische DNA aus den Infektionsansätzen gewinnen zu können, wurde die DNA aus einem Aliquot der mittels RNeasy MiniKit lysierten Zellen im Bio-Roboter EZ1 isoliert (siehe Kapitel 3.3.7). Diese Variante wählte ich für die folgenden Versuche, da so RNA und DNA aus demselben Well gewonnen werden konnten. Allerdings war bei der Bewertung der Ergebnisse trotzdem zu bedenken, dass verschiedene Methoden zur RNA- und DNA-Präparation verwendet wurden, die sich in ihrer Extraktionseffizienz unterscheiden haben könnten.

#### 4.3.3 Optimierung der RNA - Präparationsmethode und reverse Transkription

Nachdem die Entscheidung für die Verwendung des RNeasy Mini Kits von Qiagen getroffen war, stellte sich schnell heraus, dass die RNA-Präparationen mit genomischer DNA kontaminiert waren. Die präparierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in der qPCR Analyse mit nicht umgeschriebener RNA verglichen. Wie in Abbildung 10, in der Darstellung „Ohne DNase I Behandlung“, zu sehen ist, waren die Transkripte pro Kopienzahl von cDNA und RNA fast gleich, was auf einen hohen DNA Gehalt in der RNA-Präparation schließen ließ.

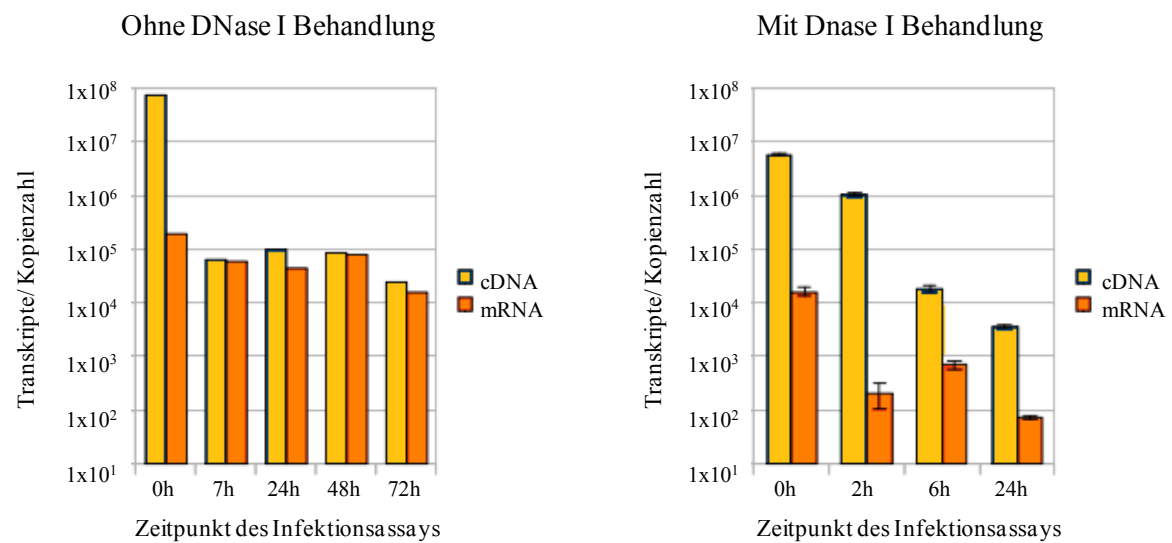


Abbildung 10: Analyse der RNA-Präparation (+/-) DNase I Behandlung.

Der Infektionsversuch wurde wie in Kap. 4.3.1 beschrieben durchgeführt. Die RNA wurde mit dem RNeasy Kit (Qiagen) gewonnen und entweder direkt in cDNA umgeschrieben (Ohne DNase I Behandlung) oder vorher noch mit DNase I (Roche) behandelt (Mit DNase I Behandlung). Die cDNA- und nicht umgeschriebenen mRNA-Proben wurden in der Realtime PCR mit den Primern OppA-1726F und OppA-1834R in Doppelbestimmung amplifiziert.

Um die Expression von *oppA* auf RNA Ebene nachzuweisen und quantifizieren zu können, war genomische DNA in diesen Konzentrationen ein nicht zu tolerierender Störfaktor.

Zur Eliminierung der kontaminierenden genomischen DNA wurden die RNA-Proben vor der reversen Transkriptase-Reaktion mit DNase I inkubiert (siehe Kapitel 3.3.10). Wie in Abbildung 10, „Mit DNase I Behandlung“, deutlich zu sehen ist, zeigte die *oppA*-qPCR an cDNA deutlich höhere Transkriptmengen als an RNA. In allen weiteren Versuchen wurden die RNA-Proben deshalb einer DNase Behandlung unterzogen, bevor die RNA durch RT-PCR in cDNA umgeschrieben wurde (s. Kapitel 3.4.2). Bei der RT-PCR wurde von mir immer dieselbe Menge RNA eingesetzt, damit es zu keinen Unterschieden in der Effizienz der reversen Transkription kommen konnte, die die Ergebnisse der nachfolgenden qPCR Analysen beeinflusst hätte (Stahlberg *et al.*, 2004a und 2004b). Aus dem gleichen Grund wurden immer Random Hexamer Primer genutzt.

Die in den RNA-Proben gemessenen Kopien kontaminierender genomischer DNA konnten nun als Hintergrund von der an cDNA nachgewiesenen Transkriptmenge abgezogen werden.

#### 4.3.4 Quantitative real-time PCR

Die, wie in Kapitel 4.3.3 beschrieben, gewonnenen DNA-, RNA- und cDNA- Proben aus den Infektionsassays konnten nun in qPCR Analysen eingesetzt werden. Hierzu wurden zunächst Primer generiert, mit denen die einzelnen Transkriptregionen des *opp*ABCDF-Genlokus und das Transkript vom Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (*gap*) Gen analysiert werden konnten. *gap* ist ein nicht reguliertes Housekeeping Gen, das als Referenzgen eingesetzt wurde. In Abbildung 11 sind die Positionen der Primer im Bereich von *opp*ABCDF dargestellt. Die qPCRs wurden nach der Lage des entsprechenden Amplikons benannt. Die *oppA*-qPCR bezieht sich also auf das Amplikon, dass mit den Primern *oppA*-1726for und *oppA*-1834rev synthetisiert wurde.

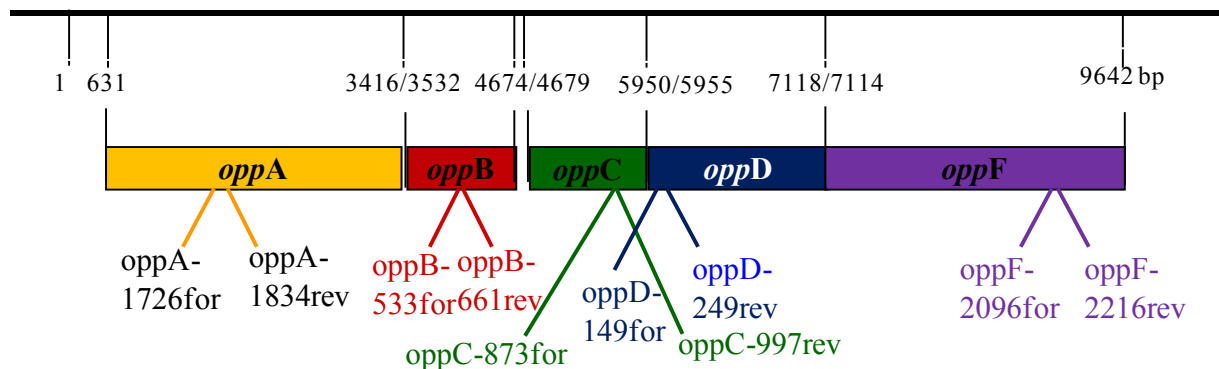


Abbildung 11: Lage der analysierten *opp*-Regionen.

Die Lage der Primer ist in Relation zu den fünf Genen, *oppA*, B, C, D und F eingezeichnet und gemäß ihrer Position im jeweiligen Gen bezeichnet. for: forward Primer; rev: reverse Primer.

Zur absoluten Quantifizierung der einzelnen Transkripte und Genomäquivalente in den gewonnenen Proben wurden Plasmide konstruiert, in die das jeweilige qPCR-Produkt (Amplikon) einkloniert wurde (s. Kapitel 3.7). Die Konzentration der Plasmide wurde so eingestellt, dass die simultane Amplifikation der Plasmide in mindestens zwei unterschiedlichen Verdünnungsstufen ( $10^7$  und  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l) die Quantifizierung der Proben über eine Kalibrierungskurve ermöglichte. Es wurde darauf geachtet, dass die Verdünnungsreihe der Quantifizierungsplasmide linear verlief. Bei einer Erhöhung der  $C_q$ -Werte, die dem Punkt entsprechen, an dem die Fluoreszenz des untersuchten Gens die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, wurden die verwendeten Plasmide neu verdünnt. Das war etwa alle zwei bis drei Monate notwendig. Um nachzuweisen, dass alle Standards der verschiedenen Amplikons wirklich gleich konzentriert waren, wurde eine qPCR an einem

Bereich des Klonierungsvektors pGem-T durchgeführt, der für alle Standards verwendet worden war. Wie in der Abbildung 12 zu sehen ist, schneiden alle Standards der untersuchten Amplikons in den zwei Verdünnungsstufen  $10^9$  bzw.  $10^5$  Plasmidkopien den Threshold jeweils innerhalb eines Zyklus.

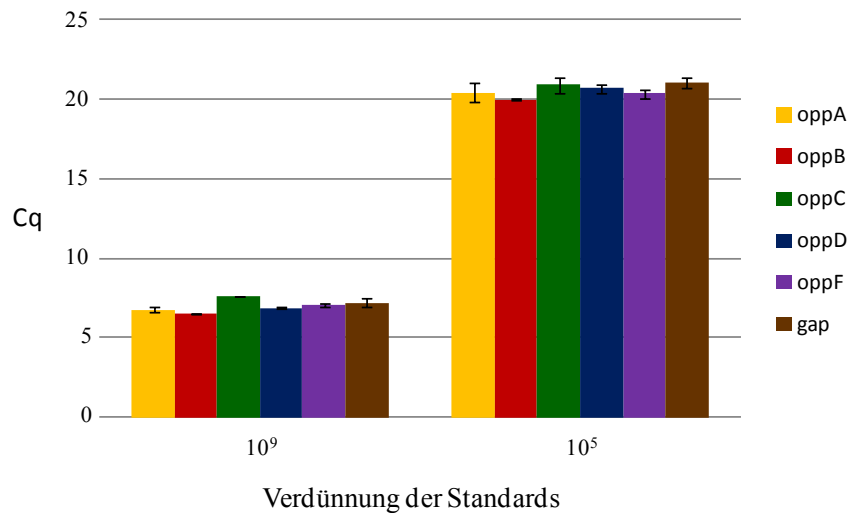


Abbildung 12: Vergleich der Standards in der pGemT-qPCR.

Die verschiedenen Verdünnungen der Plasmid-klonierten Standards für die qPCR-Analysen wurden anhand einer qPCR-Analyse verglichen, die einen Bereich des pGemT Vektors amplifiziert. Die qPCR wurde in Doppelbestimmung durchgeführt. Dargestellt ist der Cq-Wert, der dem Punkt entspricht, an dem die Fluoreszenz des untersuchten Gens die Hintergrundfluoreszenz übersteigt.

Durch die Referenzgene *gap* und das Elongationsfaktor Tu (*tuf*) Gen erfolgte die relative Quantifizierung der Genexpression. Mit Hilfe einer leicht modifizierten  $\Delta\Delta C_P$  Methode (Ratio =  $2^{-\Delta\Delta C_P}$ , entwickelt von PE Applied Biosystems, Perkin Elmer; Änderung nach Pfaffl, 2001) ließen sich alle Einzelwerte einer Gruppe zusammenfassen, so dass der mittlere Expressionsunterschied bestimmt werden konnte. Die Rechnung wurde wie folgt durchgeführt:

$$\text{Ratio} = 2^{-[\Delta C_q \text{ Behandlung} - \Delta C_q \text{ Kontrolle}]}, \Delta C_q = C_q \text{ Mittelwert Zielgen} - C_q \text{ Mittelwert Referenzgen}.$$

Hierdurch wurde die Expression der Zielgene, in unserem Fall also *oppA*, B, C, D und F, mit Hilfe der Referenzgene *gap* und *tuf*, sowie mit *hitA*, das das für die Zytadhärenz wichtige Protein P80 kodiert (Hopfe *et al.*, 2004), normiert und durch den Vergleich mit Kontrollproben, hier den 0 h-Werten des Infektionsassays, Unterschiede in der Expression

errechnet. Ein Wert über 1 bedeutet Hochregulierung des entsprechenden Gens, unter 1 Herunterregulierung.

Die Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen qPCR Analysen der unterschiedlichen Amplikons war somit gewährleistet. In allen Versuchen wurde Aqua ad iniectabilia als Negativkontrolle mitgeführt. In die weitere Auswertung gelangten nur Versuche, bei denen die Negativkontrolle negativ war oder solche, bei denen die Negativkontrolle erst nach dem 30. Zyklus eine Amplifikationskurve aufwies und die untersuchten Proben vor dem 25. Zyklus positiv wurden. Die Normierung der nachgewiesenen Transkripte erfolgte, wenn nicht anders angegeben, auf die extrahierte Menge an DNA bzw. RNA in dem jeweiligen Well.

Die genomische DNA wurde, wie in den Kapiteln 3.3.7 und 4.3.2 beschrieben, aus einem Aliquot der lysierten Zellen, aus denen die RNA präpariert wurde, gewonnen. Anschließend wurde auf die Gesamt-Well-Menge zurückgerechnet, die durch Nano-Drop Messung bestimmt wurde. So konnte die Anzahl der Mycoplasmen bestimmt werden, wodurch sich der Wert der Genomäquivalente ausrechnen ließ. Dieser sollte bei qPCRs an genomischer DNA für die verschiedenen Gene gleich sein, da es sich bei den Genen des *opp* Operons um single copy-Gene handelte. Durch den Bezug der jeweiligen Transkriptmenge auf die Genomäquivalente ließ sich nachweisen, wie viele Transkripte eines Gens pro Zelle exprimiert wurden, und ob diese Transkriptionsrate von *oppA* signifikant höher war als von *oppBCDF*.

#### 4.4 Charakterisierung der *opp* Expression in *M. hominis* auf mRNA-Ebene

Die folgenden qPCR Versuche wurden mit Proben durchgeführt, die aus dem von mir etablierten Infektionsassay stammten (s. Kapitel 3.2 und 4.3). In der qPCR wurde für jede Probe cDNA auch die entsprechende RNA gemessen, die dann als Hintergrund von der cDNA abgezogen wurde. Alle Proben wurden, soweit nicht anders angegeben, auf die Gesamtmenge RNA bzw. DNA pro 6Well bezogen. In jeder qPCR Analyse wurden Quantifizierungs-standards eingesetzt und eine Negativkontrolle mitgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse aus einem solchen, als Doppelansatz durchgeführten Infektionsassay beschrieben. Die qPCR Analysen wurden in mindestens zwei voneinander unabhängigen Läufen, jeweils in Doppelbestimmung, ausgeführt.

Im Folgenden konnten nun erste qPCR Analysen durchgeführt werden, um auf eine Unabhängigkeit der *oppA* Transkription von *oppABCD* schließen zu können.

#### 4.4.1 Analyse von genomischer DNA in der qPCR

Wie zu erwarten war, ließen sich bei der qPCR Analyse für *oppA* und *oppC*, das hier stellvertretend für *oppABCD* angesehen wurde, sowie für das Referenzgen *gap* an genomischer DNA nahezu identische Genomäquivalentmengen nachweisen (Abb. 13). Dieses Ergebnis stimmte sowohl mit der Southern Blot-Analyse von *oppA* überein (siehe Kapitel 4.2), als auch mit der Entschlüsselung des gesamten *M. hominis* Genoms (Pereyre et.al. 2009), da diese Gene single-copy Gene sind.

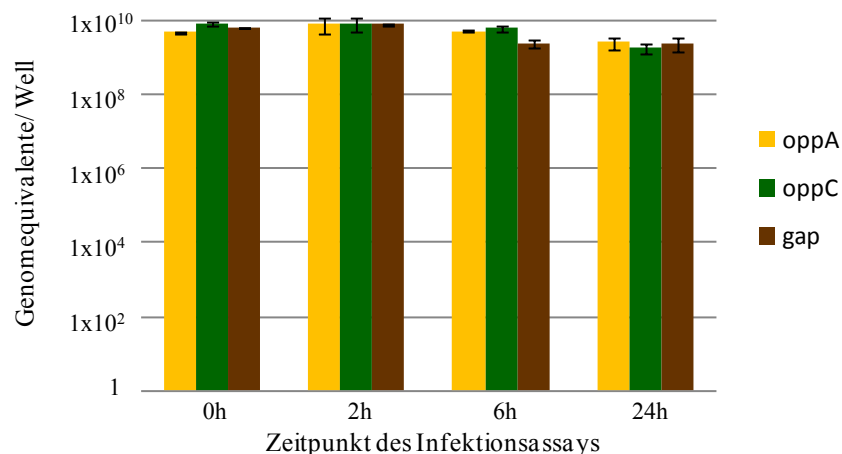


Abbildung 13: Quantifizierung der Genomäquivalente in Abhängigkeit von der qPCR.

Der Infektionsassay wurde wie in Kap.4.3.1 beschrieben durchgeführt. Die genomische DNA wurde aus einem Aliquot der lysierten Zellen mit Hilfe des Bio-Roboters EZ1 nach 0, 2, 6 und 24h Infektionsdauer präpariert und in der *oppA*, *oppC* und *gap*.qPCR quantifiziert. Die Werte wurden auf die jeweilige Gesamtmenge pro 6Well bezogen.

Die Anzahl an Genomäquivalenten blieb über den Infektionszeitraum (0 bis 24 Stunden) nahezu konstant, was darauf hindeutet, dass die Mycoplasmen unter den gegebenen Bedingungen nicht proliferieren (Abb. 13).

#### 4.4.2 Unterschiede in der *opp*ABCD<sub>F</sub> Expression und Verhalten im zeitlichen Verlauf

In der Analyse der fünf *opp*-Gene A, B, C, D und F und des Referenzgens *gap* sollten zum einen die *opp* Gene zu einem Zeitpunkt verglichen werden, zum anderen aber auch die Veränderungen im zeitlichen Verlauf des Infektionsassays beurteilt werden.

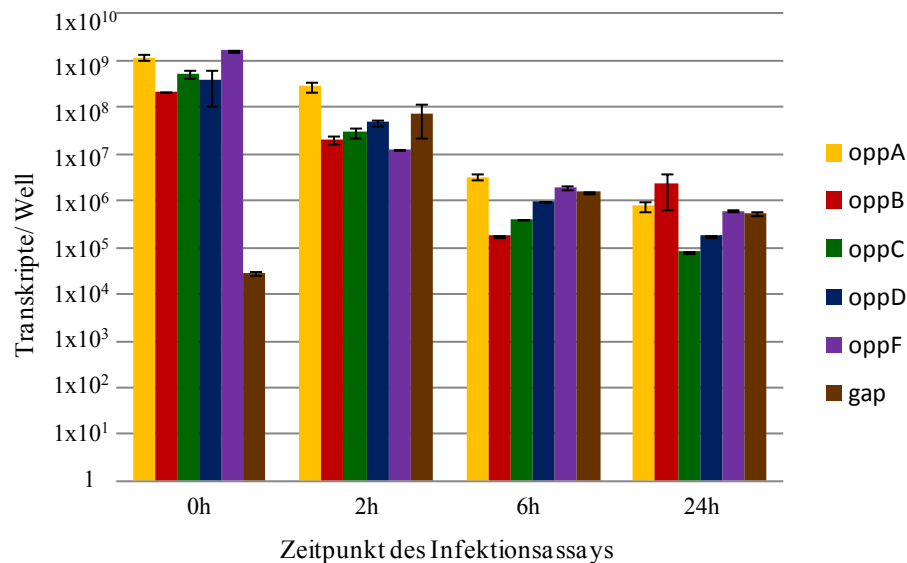


Abbildung 14: Analyse der Transkriptionsstärke der *opp*-Gene im zeitlichen Verlauf der Infektion. Der Infektionsassay wurde wie in Kap. 4.3.1 beschrieben durchgeführt. Die mRNA wurde mit RNeasy (Qiagen) präpariert und vor dem Umschreiben in cDNA mittels RT-PCR mit DNase I (Roche) behandelt. cDNA und mRNA wurden mittels der in Kap. 3.3.3 beschriebenen qPCRs jeweils in Doppelbestimmung in mindestens zwei verschiedenen Versuchen analysiert. Von den Werten der cDNA wurden die der mRNA als Hintergrund abgezogen. Die Daten wurden jeweils auf die gewonnenen RNA Mengen pro Well normiert.

Wie Abbildung 14 verdeutlicht, war die Transkriptmenge von *oppA* nach zwei ( $2,81 \times 10^8$  Transkripte/Well) und sechs ( $3,26 \times 10^6$  Transkripte/Well) Stunden Infektion höher als die von *oppBCDF* (z.B. *oppF*: nach 2h  $1,26 \times 10^7$ , nach 6h  $1,99 \times 10^6$  Transkripte/Well). Nach 24 Stunden Inkubationszeit war *oppA* ( $7,79 \times 10^5$  Transkripte/Well) zwar immer noch höher als *oppCDEF* (z.B. *oppF*:  $6,17 \times 10^5$ ), die meisten Transkripte gab es aber für *oppB* ( $2,25 \times 10^6$  Transkripte/Well). Beachtenswert war hier jedoch eine höhere Standardabweichung, die diese Messung unsicherer erscheinen lässt. Beim Ausgangspunkt von 0 h gab es etwa gleich viel *oppF* ( $1,63 \times 10^9$  Transkripte/Well) wie *oppA* ( $1,21 \times 10^9$  Transkripte/Well) Transkripte. Hier ist es also noch nicht zu einer vermehrten Transkription von *oppA* gekommen. Das weist darauf hin, dass *oppA* erst während der Inkubation der HeLa-Zellen vermehrt exprimiert wird.

Betrachtet man die *oppABCDF* Transkripte im zeitlichen Verlauf, fällt auf, dass die Transkriptmenge bei allen abnimmt. Das steht in deutlichem Kontrast zu den Analysen an genomischer DNA. Die *oppA*-basierten Keimzahlen sind mit  $4,63 \times 10^9$  bei 0h und  $2,43 \times 10^9$  Zellen/Well nach 24 h Infektion nur leicht gesunken, die *oppA* Transkriptmenge pro Well von  $1,21 \times 10^9$  auf  $7,79 \times 10^5$  jedoch sehr stark abgefallen (s. Abb. 13 und 14). Das deutet auf eine stark reduzierte *oppABCDF* Transkription hin, die während der Inkubation der HeLa-Zellen immer weiter abnimmt. Die Transkriptmenge des Referenzgens *gap* nimmt vom Ausgangswert bei 0 h ( $2,87 \times 10^4$  Transkripte/Well) in den ersten beiden Stunden der Inkubation erst deutlich zu (bei 2 h Inkubation:  $1,35 \times 10^7$  Transkripte/Well) und anschließend wieder ab (bei 24 h:  $5,56 \times 10^5$  Transkripte/Well). Die *gap*-basierten Genomäquivalente blieben wie auch bei *oppA* während des Infektionsassays relativ konstant (0 h:  $6,04 \times 10^9$ ; 2 h:  $7,49 \times 10^9$ ; 6 h:  $2,34 \times 10^9$ ; 24 h:  $2,32 \times 10^9$  Zellen/Well). Das lässt jedoch eher eine Regulation von *gap* vermuten, die für ein Referenzgen unerwünscht ist.

Zusammenfassend lieferten diese Analysen weitere Hinweise darauf, dass *oppA* zusätzlich zur polycistronischen Transkription auch monocistronisch exprimiert werden kann. Die vermehrte *oppA* Transkription scheint erst bei Inkubation der HeLa-Zellen stattzufinden, was auf eine infektionsinduzierte Expression von *oppA* hindeutet. Außerdem weisen die hier dargestellten Ergebnisse auf eine Herunterregulation von *oppABCDF* im zeitlichen Verlauf des Infektionsassays hin.

#### 4.4.3 Relative Quantifizierung durch die „Delta-Delta-Methode“

Die relative Quantifizierung der Daten aus allen Versuchen wurde mit einer leicht modifizierten  $\Delta\Delta\text{CP}$  Methode (s. Kapitel 4.3.4) durchgeführt.

Wie in Tabelle 4 ersichtlich, liegt die Ratio für *oppA* bei dem Referenzgen *gap*, beim Elongationsfaktor Tu (*tuf*) Gen und beim adhärenzbeteiligten *hitA* Gen nach 2 und 6 Stunden Infektion über 1, das bedeutet, sie wurden hochreguliert. Nach 24 Stunden Infektion liegen die Werte bei der Normierung mit *hitA* immer noch knapp über 1, mit *gap* und *tuf* aber knapp darunter, sie wurden also herunterreguliert. Auffällig ist jedoch, dass es zwischen den Ratio der drei Referenzgene einige Unterschiede gibt: Während bei der Normierung mit *gap* die Hochregulierung nach 6 Stunden (2,88) größer ist als nach 2 Stunden (1,52), ist es bei den beiden anderen umgekehrt; und der Wert nach 2 Stunden ist höher (*tuf*: 22,24, *hitA*: 18,03) als nach 6 Stunden (*tuf*: 4,41, *hitA*: 5,16). Auch liegen die Werte nach der Normierung auf *tuf*

und *hitA* insgesamt deutlich höher als bei *gap*. Der 24 Stunden Wert liegt bei der Ratio aller drei Referenzgene am niedrigsten.

Ratio *gap*

|     | <i>oppA</i> | <i>oppB</i> | <i>oppC</i> | <i>oppD</i> | <i>oppF</i> |
|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 2h  | 1,52        | 0,89        | 0,45        | 0,43        | 0,05        |
| 6h  | 2,88        | 1,15        | 0,83        | 1,14        | 1,08        |
| 24h | 0,94        | 3,65        | 0,47        | 0,56        | 0,96        |

Ratio *tuf*

|     | <i>oppA</i> | <i>oppB</i> | <i>oppC</i> | <i>oppD</i> | <i>oppF</i> |
|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 2h  | 22,24       | 12,95       | 6,59        | 6,30        | 0,79        |
| 6h  | 4,41        | 1,76        | 1,27        | 1,75        | 1,66        |
| 24h | 0,95        | 3,67        | 0,47        | 0,57        | 0,96        |

Ratio *hitA*

|     | <i>oppA</i> | <i>oppB</i> | <i>oppC</i> | <i>oppD</i> | <i>oppF</i> |
|-----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 2h  | 18,03       | 10,50       | 5,34        | 5,11        | 0,64        |
| 6h  | 5,16        | 2,06        | 1,48        | 2,05        | 1,94        |
| 24h | 1,53        | 5,93        | 0,76        | 0,91        | 1,55        |

Tabelle 4: Relative Quantifizierung der *opp*-Expression.

In den Tabellen sind die Werte der relativen Quantifizierung durch die  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode, nach Pfaffl, 2001, dargestellt. Dabei wurde jeweils entweder auf das Referenzgen *gap*, das Elongationsfaktor Tu (*tuf*) Gen oder auf das an der Adhärenz beteiligte *hitA* Gen normiert. Für jedes Gen wurden dabei die Mittelwerte aus 4 bis 12 Bestimmungen in qPCR-Analysen ermittelt. Werte über 1 (in blau dargestellt) bedeuten eine Hochregulation des Gens, Werte unter 1 (schwarz) eine Herunterregulation.

Auch die *opp* Operon-Gene werden zunächst hochreguliert, bei der Normierung auf *tuf* und *hitA* zeigt sich, wie zu erwarten, bei *oppB*, C und D ein ähnliches Bild. Der 2 Stunden Wert ist am höchsten und fällt dann ab, bei *oppB* steigt er aber zum 24 Stunden Wert wieder an, während er bei *oppC* und D weiter fällt und sogar unter 1 sinkt. Mit Ausnahme der 24 Stunden Werte von *oppB* ist die Hochregulierung von *oppA* aber höher als von *oppBCDF*. *oppF* hingegen steigt nach der Normierung mit *tuf* und *hitA* vom 2 Stunden Wert, der unter 1 liegt, zum 6 Stunden Wert hin an, der bei knapp unter 2 liegt. Der 24 Stunden Wert ist wiederum niedriger, wobei er bei *tuf* knapp unter und bei *hitA* noch über 1 liegt.

Ganz anders sieht das Bild jedoch nach der Normierung auf *gap* aus. Die 2 Stunden Werte sind bei *oppBCD* und F unter 1, was für eine Herunterregulation spräche. Bei den 6 Stunden Daten liegen die Werte von *oppBD* und F immerhin knapp über 1, bei *oppC* bleibt der Wert aber darunter. Nach 24 Stunden liegen, außer *oppB*, wieder alle unter 1. *oppB* ist hier, wie

auch nach der Normierung mit *tuf* und *P80* unverhältnismäßig hoch bei 3,65 und damit sogar höher als die Werte von *oppA*.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die *oppA*-Transkription bei der Infektion von HeLa-Zellen mit *M. hominis* zunächst hochreguliert wird, nach 24 Stunden aber bereits wieder herunter-, bzw. nur noch gering hochreguliert wird. Auch *oppB*, C und D werden in ähnlicher Weise reguliert, jedoch liegt die Ratio niedriger als bei *oppA*. Das bekräftigt unsere These, dass *M. hominis*, nach Infektion von HeLa-Zellen, die polycistronisch organisierten *oppABCDF* Gene vermehrt synthetisiert, *oppA* darüber hinaus auch noch monocistronisch exprimiert wird und deshalb noch deutlicher hochreguliert erscheint. Nicht dazu passt allerdings die Ratio von *oppF*, die deutlich niedriger und auch nach 2 Stunden Infektion noch unter 1 liegt. Möglicherweise ist das mit einer Degradation der RNA bzw. cDNA zu erklären, die aufgrund seiner 3'-Lage bei *oppF* beginnen könnte.

Auffällig sind auch die Unterschiede der Ratio bei Normierung mit *gap* im Vergleich zur Normierung mit *tuf* und *hitA*, die Zweifel daran aufkommen lassen, ob *gap* tatsächlich ein nicht reguliertes Housekeeping Gen ist. Dazu würden auch die Erkenntnisse aus Kapitel 4.4.2 passen, die belegen, dass die Expression von *gap* nach Beginn der Infektion (vom 0 Stunden auf den 2 Stunden Wert) zunächst stark steigt und danach langsam wieder abfällt.

## 5. Diskussion

Für *Mycoplasma hominis* ist der Import von Cholesterin, Fettsäuren, Purinen, Pyrimidinen und einigen Aminosäuren überlebenswichtig, da *M. hominis* diese Stoffe aufgrund seines kleinen Genoms nicht selbst synthetisieren kann (Razin, 1993). Diese essentiellen Substanzen werden mit Hilfe von ABC-Transportern in die Organismen eingeschleust (Himmelreich *et al.*, 1996). Im ersten Teil meiner Arbeit habe ich die substratbindende Domäne, OppA eines solchen Oligopeptidimporters in den *M. hominis* Isolaten 64 und 66 im Vergleich zu dem *M. hominis* Stamm FBG untersucht. Bekannt war bereits, dass das OppA von *M. hominis* ein multifunktionelles Protein ist, das neben seiner Peptidbindung als substratbindende Domäne der Oligopeptidpermease (Henrich *et al.*, 1999) zytadhäsive Eigenschaften aufweist (Henrich *et al.*, 1999) und als ectoATPase von *M. hominis* fungiert (Hopfe und Henrich, 2003). Die OppA<sup>64</sup>-Variante des Isolates 64 ist nicht mit dem OppA-spezifischen Antikörper TF6 nachzuweisen und die OppA<sup>66</sup>-Variante des Isolates 66 zeigt in Western Blot Analysen ein höheres Molekulargewicht als in allen anderen Isolaten (Hopfe, 2001). Zuerst wurden die *oppA*<sup>64</sup> und *oppA*<sup>66</sup>-Gene von mir mittels PCR amplifiziert und im BMFZ anschließend sequenziert. Nachfolgend wurden die abgeleiteten Proteinsequenzen dann mit der von OppA<sup>FBG</sup> verglichen. Hierbei zeigten sich nur geringe Unterschiede im Sinne von Punktmutationen. Eine solche zeigte sich ausreichend für den Verlust des TF6 Epitops in der OppA<sup>64</sup>-Variante. Wie die Arbeitsgruppe von Di Marzo Veronese schon 1993 zeigte, können bereits bei geringen Abweichungen durch Punktmutationen Konformationsänderungen entstehen, die dann zum Wegfall eines Epitops führen (Di Marzo Veronese *et al.*, 1993). Daraus resultieren z.T. Veränderungen der Oberflächenstruktur (Pease *et al.*, 1993), durch die manche Pathogene, wie z.B. das bovine Coronavirus, der Entdeckung durch das Immunsystem entgehen können (Yoo und Dereg, 2001).

Keine Mutationen fanden sich in der hoch konservierten Walker A Sequenz, die für die ATPase Aktivität essentiell ist (Hopfe *et al.*, 2011). Sie ist bei *oppA*<sup>FBG</sup>, *oppA*<sup>64</sup> und *oppA*<sup>66</sup> identisch, was die Wichtigkeit ihrer strukturellen Integrität unterstreicht. In der Walker B Region und auch in den konservierten Regionen CS1, CS2 und CS3 (Allard und Wadell, 1988) gab es hingegen einzelne Punktmutationen. Da diese Regionen in substratbindenden Domänen von Oligopeptidpermeasen konserviert sind und nicht nur für die ATPase Aktivität von OppA (CS3), sondern auch für die bestmögliche Zytadhärenz von *M. hominis* (CS1) wichtig sind (Hopfe *et al.*, 2011), könnten die Punktmutationen zu leicht divergenten pathophysiologischen Effekten dieser drei Isolate führen.

Durch die Sequenzierung ließ sich der Größenunterschied von OppA<sup>66</sup> im Vergleich mit OppA<sup>FBG</sup> und OppA<sup>64</sup> nicht erklären. Für viele Proteine, z.B. für die Oberflächenproteine Lmp1 (Ladefoged, 2000) und P50/Vaa (Henrich *et al.*, 1996; Zhang und Wise, 1996) von *M. hominis*, konnten repetitive Sequenzen innerhalb der Gene gefunden werden, durch deren unterschiedliche Anzahl es zu Größenvariationen der Proteine kommt. Auch bei dem lipidmodifizierten Membranprotein MAA2 von *M. arthritidis* fehlt bei der 10 kDa leichteren Variante ein 264 bp Repeat (Washburn *et al.*, 1998). Solche repetitiven Sequenzelemente wurden für *oppA*<sup>66</sup> jedoch nicht gefunden. In der Sequenz von *oppA*<sup>66</sup> konnten auch keine zusätzlichen Trinukleotide detektiert werden, wie es sie z.B. für das Oberflächenprotein pMGA von *M. gallisepticum* gibt. Dieses Protein gewinnt bei *in vivo* Infektionen ein zusätzliches Trinukleotid (GAA) am 5' Ende, wodurch der Phänotyp variiert und *M. gallisepticum* dem Immunsystem des Wirtes entgehen kann (Glew *et al.*, 2000). Das Größen- und Phasenvariationen von Proteinen aber nicht mit dem klinischen Status korrelieren müssen, konnten Tortschanoff und Mitarbeiter 2005 zeigen. Sie wiesen drei Membranproteine (pST17, pST42 und pET45) von *M. subdolum* bzw. *M. equigenitalium* nach, die durch Wirtantikörper detektiert werden und in unterschiedlichen Formen vorliegen können. Dabei konnte kein Zusammenhang zwischen der Proteinvariante und dem Krankheitsstatus des Pferdes hergestellt werden (Tortschanoff *et al.*, 2005).

Auch posttranslationale Modifikationen können die Proteingröße beeinflussen. Das humane Y-box Protein 1, ein Kälteschockprotein, hat eine molekulare Masse von 52 kDa. Bei Induktion von Stress, z.B. durch UV-Licht, verändert sich seine Masse scheinbar auf 60 kDa. Als Ursachen hierfür konnten posttranslationale Modifikationen im Sinne von Acetylierung und Phosphorylierung nachgewiesen werden (Knott, 2008). Auch in OppA sind posttranslationale Modifikationen wahrscheinlich. Der Gewinn an Masse durch einzelne Modifikationen ist jedoch gering. So wird durch Phosphorylierung ein Protein 80 Dalton schwerer, durch Acetylierung nur 42 Dalton (Miesbauer *et al.*, 1994; Eysers und Gaskell, 2007). Durch internetbasierte Softwareprogramme konnten zudem für OppA<sup>66</sup> nicht mehr Phosphorylierungs- und Acetylierungsstellen gefunden werden als für OppA<sup>FBG</sup> (s. Tab. 2 und 3, Kap. 4.1.3). Die möglichen Phosphorylierungsstellen wurden durch das Programm NetPhos von CBS (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>), entwickelt von Blom und Mitarbeitern 1999, angegeben (Blom *et al.*, 1999). Dieses Programm gibt allerdings viele falsch positive Resultate an, wenn ein niedriger Score gewählt wird. Andererseits werden aber auch mögliche Phosphorylierungsstellen, die erst durch Bildung der Sekundärstruktur entstehen, übersehen (Poon, 2004). Es gibt für OppA<sup>66</sup>, aber auch für OppA<sup>64</sup>, zwei Myristoylierungsstellen mehr

als für OppA<sup>FBG</sup>. Doch auch durch die mögliche Bindung von Myristinsäure mit 14 Kohlenstoffatomen und einer molaren Masse von 228,38 Dalton (GESTIS Stoffdatenbank) lässt sich die Größenveränderung von >10 kDa nicht erklären, wenn die posttranslationale Modifikation nicht auch mit einer Veränderung der Sekundärstruktur einhergeht.

Da sich die in SDS-PAGE gesehene Größenvariation von OppA<sup>66</sup> also weder durch eine veränderte Anzahl an Nukleotiden in der Gensequenz, noch durch posttranslationale Modifikationen erklären lässt, muss der Unterschied im veränderten Laufverhalten im Polyacrylamidgel liegen. Dieses sollte normalerweise nur durch das Molekulargewicht bestimmt werden. Durch den Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken und durch das Erhitzen der Proben Wasserstoffbrücken gespalten. Dadurch soll gewährleistet werden, dass unterschiedliche Sekundär- oder Tertiärstrukturen egalisiert werden und alle Proteine in ellipsoider Form vorliegen. Unterschiedliche Ladungen von Proteinen sollen durch Zugabe von SDS überdeckt werden, durch das eine stark negative Ladung aufgebaut wird (Laemmli, 1970). Es gibt jedoch Proteine, die sich als stabil gegen SDS erwiesen haben und deshalb ein verändertes Laufverhalten aufweisen. Manning und Colón konnten 2004 nachweisen, dass viele dieser Proteine bereits als kinetisch stabile Proteine bekannt waren, dazu gehört auch das Membranprotein OmpA von *Escherichia coli* (Ohnishi und Kameyama, 2001). Neu war, dass die oligomere  $\beta$ -Faltblattstruktur, die die meisten dieser Proteine besitzen, anscheinend die Basis für die kinetische Stabilität bildet (Manning und Colón, 2004). In der internetbasierten Softwareanalyse der drei von mir untersuchten OppA Proteine konnten in den Sekundärstrukturen jedoch nur wenige  $\beta$ -Faltblattregionen gefunden werden (s. Abb. 4, Kapitel 4.1.3), so dass sich daraus ergebene SDS-Resistenz wohl kein Grund für das abweichende Laufverhalten von OppA<sup>66</sup> sein wird. Auch durch eine hohe Anzahl von negativ geladenen Glutamatresten kann es zu einem divergierenden Laufverhalten kommen, wie Körschen und Mitarbeiter 1995 für das 240 kDa Glutamat-reiche Protein (GARP), das von den Sehstäbchen exprimiert wird, belegen konnten (Körschen *et al.*, 1995). Da OppA<sup>66</sup> aber nicht mehr Glutamatreste besitzt als OppA<sup>FBG</sup>, scheidet auch dies als Ursache aus. Durch den Verlust von  $\alpha$ -Helices kommt es beim bovinen Serumalbumin (BSA) zu einer leichten Größenzunahme, und umgekehrt (Gayen *et al.*, 2008). Diese Änderungen wurden allerdings nicht durch SDS-PAGE, sondern durch dynamische Lichtstreuung (DLS) nachgewiesen. In OppA<sup>66</sup> fanden sich jedoch zwei  $\alpha$ -Helices mehr als in OppA<sup>FBG</sup>, so dass auch diese Änderung der Sekundärstruktur nicht die Ursache der Größenvariation sein kann. Wei und Mitarbeiter untersuchten 2007 die Auswirkungen von Punktmutationen auf die Arginin Deiminase (ADI). Dieses Enzym hydrolysiert irreversibel Arginin zu Citrullin und

Ammoniak und ist essentiell für viele Prokaryonten, wie z.B. *M. hominis*. Die Mutationen hatten nur geringe Auswirkungen auf die Tertiärstruktur, bei der Sekundärstruktur konnte man nur eine leichte Zunahme der  $\beta$ -Faltblätter und Schleifen feststellen. Dadurch wurde jedoch bereits die Stabilität des Enzyms vermindert, die Resistenz gegen Harnstoff-induzierte Entfaltung und Trypsin-Verdau war bei den Mutanten deutlich verringert. Auch die enzymatische Aktivität wurde durch die Punktmutationen negativ beeinflusst und war zum Teil vollständig aufgehoben (Wei *et al.*, 2007). In OppA<sup>66</sup> und OppA<sup>64</sup> gibt es ebenfalls, verglichen mit OppA<sup>FBG</sup>, Punktmutationen, die leicht divergierende Sekundärstrukturen verursachen und in OppA<sup>64</sup> eine Änderung der Antigenität begründen. Es könnten auch Unterschiede in der Stabilität der Proteine entstehen, die bei OppA<sup>66</sup> zu der beobachteten Variation im Laufverhalten in SDS-PAGE führen. Ebenfalls denkbar ist, dass die Aktivität und Pathogenität der drei Proteine sich voneinander unterscheiden. Dies ist zukünftig durch den von mir in dieser Arbeit etablierten Infektionsassay zu klären.

Dass die Ursache von Größenvariation auch in Genduplikationen liegen kann, konnten Markham und Mitarbeiter 1994 für pMGA von *M. gallisepticum* zeigen (Markham *et al.*, 1994). Nach der Duplikation entstehen durch Selektionsdruck neue Varianten, andere gehen wieder verloren, wie vom Odorant-bindenden Protein aus *Drosophila melanogaster* bekannt ist (Sánchez-Gracia und Rozas, 2008). *M. hominis oppA* gehört zu keiner Multigenfamilie oder besitzt Genduplikate. Durch Southern Blot Analyse konnte ich nachweisen, dass es ein single-copy Gen ist. Für *oppA* konnten bei verschiedenen Spezies unterschiedliche Anzahlen an Genen festgestellt werden. Bei *Lactococcus lactis* und *Listeria monocytogenes* wurde ebenfalls nur ein Genlokus für *oppA* gefunden (Tynkkynen *et al.*, 1993, Borezee *et al.*, 2000). Dagegen wurden bei *E. coli* zwei (Park *et al.*, 1998), bei *Streptococcus thermophilus* drei (Garault *et al.*, 2002) und bei *Borrelia burgdorferi* fünf (Kornacki und Oliver, 1998) verschiedene *oppA* Gene gefunden. Hannay und Mitarbeiter zeigten 2008, dass Genduplikate bei den meisten Organismen die Überlebenschance bei Verlust eines der Gene um durchschnittlich 13% erhöhen (Hannay *et al.*, 2008).

Im Rahmen der dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente konnte ich zeigen, dass sich die Herkunft der zusätzlichen *oppA* Bande im Northern Blot (Henrich *et al.*, 1999) nicht durch einen weiteren Genlokus erklären lässt. Die These, dass *oppA* monocistronisch und polycistronisch als *oppABCDF* transkribiert wird, wurde dadurch bestärkt. Zur Klärung wurde ein Infektionsassay entwickelt, bei dem HeLa-Zellen *in vitro* mit *M. hominis* infiziert

wurden, um die *oppA*(BCDF) Expression zu induzieren. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde dann RNA und DNA isoliert und in qPCR Analysen gemessen. Die qPCR hat sich vor allem zur quantitativen Messung von mRNA inzwischen als Goldstandard etabliert (Higuchi *et al.*, 1992; Wittwer *et al.*, 1997). Bereits geringste Nukleinsäuremengen können schnell und mit hoher Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden (Bustin, 2000; Kubista *et al.*, 2006). Durch den Einsatz von Kalibratoren, auch als Standards bekannt, ist es möglich, die Nukleinsäuremenge quantitativ genau zu bestimmen. Zur Bestätigung der These, dass *OppA* im Rahmen einer Infektion für Funktionen wie Zytadhärenz oder Apoptoseinduktion monocistronisch exprimiert wird, hätte *oppA* in deutlich höheren Mengen nachweisbar sein müssen als *oppBCDF*.

Für die Etablierung des Infektionsassays habe ich zunächst mehrere RNA-Präparationsmethoden getestet, da intakte, nicht degradierte RNA für die Qualität, Validität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in weiteren Versuchen entscheidend ist (Raeymaekers, 1993; Imbeaud *et al.*, 2005). Diese kann sich sogar bei der Verwendung ähnlicher Methoden, z.B. bei der Nutzung von TRIzol (Gibco BRL) oder TriFast (peqLab) deutlich unterscheiden (Fleige *et al.*, 2006). Zur Gewinnung von RNA steht heutzutage eine Vielfalt an Möglichkeiten bereit: Zusätzlich zu zeit- und arbeitsintensiven Methoden, z.B. durch den Guanidin-Cäsiumchlorid-Gradienten (nach Ceske *et al.*, 2004), gibt es sogenannte Single-Step Methoden (nach Chomczynski und Sacchi, 1987), bei denen mit Hilfe eines speziellen Reagens, z.B. TRIzol Reagent von Gibco BRL, RNA Isolation Kit von Fluka oder TriFast von peqLab, RNA aus Zellen extrahiert wird. Außerdem bieten verschiedene Hersteller kommerzielle Kits an, bei denen die Extraktion über spezifische Bindung der RNA an Säulen erfolgt (z.B. RNeasy Mini Kit von Qiagen oder PrepEase mRNA MiniSpin Kit von Affymix/USB).

In meinen Versuchen habe ich vier verschiedene Methoden der RNA-Extraktion geprüft, drei davon kommerzielle Kits:

- RNeasy (Qiagen),
- Phenol-Chloroform (Fluka) und
- TRIzol (Gibco BRL),

sowie den nicht kommerziellen Guanidin-Cäsiumchlorid-Gradienten. Die Qualität der RNA war nach Präparation mit RNeasy am besten.

Die Integrität der RNA wird klassischerweise durch Messung der optischen Densität (OD) bei 260 und 280 nm und dem daraus errechenbaren Quotienten (260/280) bestimmt, der über 1,8 liegen sollte (Manchester, 1996; Sambrook und Russell, 2001). Diese Messungen werden inzwischen durch technische Geräte, wie den NanoDrop (PeQLab), erleichtert. Ein großer Vorteil dieser Geräte liegt in der sehr geringen benötigten RNA-Menge von nur 1 µl. Außerdem werden gleichzeitig Messungen bei weiteren Wellenlängen vorgenommen, wodurch zusätzliche Information über die RNA Integrität generiert wird (NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual). Eine weitere Möglichkeit der Qualitätsüberprüfung stellt die Gelelektrophorese dar, mit der die 16S und 23S rRNA Banden (bei Prokaryonten) bzw. die 18S und 28S rRNA Banden (bei Eukaryonten) dargestellt werden können. Eine neue Methode stellen hier die Lab-On-A-Chip-Technologien dar, z.B. der Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) oder Experion (Bio-Rad Laboratories). Diese Geräte können in automatisierten Verfahren die elektrophoretische Auftrennung von Proben sowie durchflusszytometrische Analysen vornehmen. Der Bioanalyzer berechnet zusätzlich die RNA-Integritäts-Nummer (RIN), die zwischen 1 und 10 liegt, wobei 1 degradierte RNA und 10 intakte RNA bedeutet (Lightfoot, 2002; Schröder *et al.*, 2006). Für nachfolgende Versuche bedeutet RIN >5 eine gut zu nutzende RNA und RIN >8 eine RNA in perfekter Qualität (Fleige und Pfaffl, 2006).

Nach der RNA-Präparation mit dem RNeasy Kit zeigte sich sowohl im 260/280 Quotienten, wie auch in der gelelektrophoretischen Auftrennung und in der Analyse mit dem Bioanalyzer 2100 intakte RNA. Durch den Bioanalyzer wurde die RIN nach Präparation mit Phenol-Chloroform und dem RNeasy Kit bestimmt. Bei der ersteren Methode war die RIN 2,5. Dieser Wert zeigt eine hochgradig degradierte RNA an. Im Gegensatz dazu war die RIN nach Präparation mit RNeasy 9,5 und erreichte damit fast den höchsten Wert von 10, die RNA war also intakt. Vor allem bei Analysen von langen PCR Produkten über 400 bp ist die Amplifikation von der RNA Integrität abhängig. Bei der Analyse von kurzen Amplikons unter 250 bp, wie sie von mir durchgeführt wurden, ist die RNA Integrität nicht ganz so wichtig (Fleige und Pfaffl, 2006). Allerdings kann auch hier teilweise degradierte RNA die nachgewiesene Genexpression verfälschen (Wang, 2005). Zudem kann degradierte RNA einen inhibitorischen Effekt auf die qPCR haben (Fleige und Pfaffl, 2006), so dass auch bei den kurzen PCR Produkten intakte RNA von entscheidender Bedeutung ist. Die Vorzüge des RNeasy Kits konnten auch Rump und Mitarbeiter 2010 zeigen. Sie prüften verschiedene kommerzielle Kits zur RNA- Präparation an *Salmonella enterica*. Abgesehen vom RNeasy Mini Kit (Qiagen) waren das:

- RiboPure Bacteria Kit (Ambion),
- PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen),
- UltraClean Microbial RNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, CA) und
- MasterPure RNA Purification Kit (EPICENTRE).

Als die besten Methoden haben sich hier das PureLink RNA Mini Kit und ebenfalls das RNeasy Mini Kit erwiesen (Rump *et al.*, 2010). Die optimale RNA-Präparationsmethode ist auch von der Art des jeweiligen Materials abhängig. Bei Knorpelproben ist RNAqueous Midi Kit (Ambion) deutlich besser als das RNeasy Mini Kit (Qiagen) (Ruettinger *et al.*, 2010).

Ein Nachteil bei der Präparation mit dem RNeasy Mini Kit war die Verunreinigung durch DNA. Diese Komplikation trat auch bei Rump und Mitarbeitern 2010 auf. Die Lösung lag in der Inkubation der RNA Proben mit DNase I (Rump *et al.*, 2010), wie auch ich sie durchgeführt habe, damit die Ergebnisse der qPCR Versuche auswertbar waren. DNA Kontamination scheint ein häufiges Problem bei der RNA Präparation mit dem RNeasy Kit zu sein. Bustin und Mitarbeiter wiesen 2002 einen DNA Anteil an den gesamten Nukleinsäuren von 20 bis 50% nach, durch den die Ergebnisse der nachfolgenden Versuchen verfälscht wurden (Bustin *et al.*, 2002).

Nicht nur die RNA Extraktionsmethode ist aber für die Qualität der folgenden qPCR Versuche wichtig, auch der Umgang mit den Proben ist für die Intaktheit der RNA entscheidend. Zunächst einmal müssen die Zellen oder das Gewebe vor der Präparation gelagert werden, wobei die kurze Aufbewahrung auf Eis der RNA nicht zu schaden scheint (Micke *et al.*, 2006). Auch die Lagerung der extrahierten RNA wirkt sich auf ihre Qualität aus (Perez-Novo *et al.*, 2005; Bustin *et al.*, 2005; Palmirotta *et al.*, 2012). Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass die adäquate Präparationsmethode wesentlich wichtiger ist (Kim *et al.*, 2007).

Nachdem man sich von der Qualität der RNA überzeugt hat, ist der nächste Schritt die reverse Transkription der RNA in cDNA, da in der qPCR nur DNA bzw. cDNA gemessen werden kann. Es gibt verschiedene Primer, die man zur reversen Transkription nutzen kann: Random Hexamer, oligo(dt) und Gen-spezifische Primer. Die Resultate der nachfolgend durchgeführten qPCR Analysen unterscheiden sich deutlich in Abhängigkeit von den zur RT-PCR benutzten Primern und auch von der eingesetzten RNA Menge (Stahlberg *et al.*, 2004a). Zur Gewährleistung der Wiederholbarkeit und Vergleichbarkeit ist es deshalb wichtig, immer dieselben Primer und die gleiche RNA-Menge einzusetzen und die RT-PCR am besten in doppelter oder dreifacher Wiederholung durchzuführen (Stahlberg *et al.*, 2004b).

Der Auswahl der Primer für die qPCR kommt eine besondere Bedeutung zu, da die Effizienz

der qPCR von ihnen abhängt (Bustin *et al.*, 2009). Die Primer kann man entweder bei kommerziellen Anbietern kaufen oder mit Hilfe von öffentlichen Datenbanken, z.B. der RTprimerDB (Pattyn *et al.*, 2003; Lefever *et al.*, 2009), oder kommerziellen Datenbanken, z.B. PrimerSelect von Lasergene, selbst entwickeln. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Primer spezifisch an das gewünschte Ziel binden und möglichst keine Dimere untereinander bilden (Ririe *et al.*, 1997). Auch auf die annealing Temperaturen ( $T_m$ ) der Primer ist zu achten. Sie sollte sich für die forward und reverse Primer und auch für Primer verschiedener Amplikons ähneln. In jedem Falle sollten die  $T_m$ -Werte in der jeweiligen qPCR experimentell verifiziert werden (Nolan *et al.*, 2006).

Die Normalisierung der qPCR ist ein wichtiger Bestandteil jeder Analyse. Dabei ist die Verwendung von Referenzgenen, zum Teil auch Housekeeping Gene genannt, die gebräuchlichste Methode. Diese Gene sollten stabil exprimiert werden, so dass ihre Konzentration mit der der Zielgene verglichen werden kann und sich Aussagen über die Regulation der Zielgene treffen lassen. (Huggett *et al.*, 2005). Ein Referenzgen ist dabei meistens nicht ausreichend (Bustin *et al.*, 2009). In dieser Arbeit habe ich als Referenzgene den Elongationsfaktor Tu (*tuf*) und die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gap*) verwendet. In der Literatur sind diese Gene bereits mehrfach als Housekeeping Gene mit stabiler Expression beschrieben worden und auch ihr Einsatz als Referenzgene ist schon etabliert (Yogev *et al.*, 1990; Ladefoged und Christiansen, 1991; Sogaard *et al.*, 1999; Baczynska *et al.*, 2004; Hallamaa *et al.*, 2008; Brattelid *et al.*, 2010). Für *gap* wurde allerdings eine hohe Variabilität der Sequenz zwischen verschiedenen Isolaten beschrieben (Sogaard *et al.*, 1999; Mygind *et al.*, 2000), wodurch die Sensitivität des Nachweises leiden kann (Férandon *et al.*, 2011). Das *gap* Unterschiede in der Expression zeigt, wiesen McCurdy und Mitarbeiter 2008 bei Fibroblasten nach (McCurdy *et al.*, 2008). Hruz und Mitarbeiter zeigten 2011, dass alle Gene einer gewissen Regulierung unterliegen und dass viele der etablierten Referenzgene im Vergleich mit dem ganzen Transkriptom eine hohe Transkriptrate haben. Sie empfahlen daher, für jede Studie neue Referenzgene zu bestimmen, was z.B. mit Hilfe der RefGene Datenbank ([www.genevestigator.com](http://www.genevestigator.com)) möglich ist (Hruz *et al.*, 2011). Auch in dieser Arbeit war die Expression von *gap* nicht unreguliert, im zeitlichen Verlauf der Infektion von HeLa-Zellen stieg die Transkriptionsrate erst an, um später wieder abzufallen. Diese Beobachtungen lassen Zweifel an der Benutzung von *gap* als Referenzgen aufkommen. Zusätzlich zu *gap* und *tuf* wurde die Expression von *oppABCDF* mit der von *hitA* verglichen. *hitA* kodiert für das Membranprotein P80, das im Komplex mit P60 (durch *hitB* kodiert) vorliegt und mit dem zytosolischen Histidintriade-Nukleotid-bindenden (HinT)

Protein, kodiert durch *hitL*, interagiert (Kitzerow und Henrich, 2001). Der P60/P80-Membrankomplex ist, wie OppA, an der Zytadhärenz beteiligt (Hopfe *et al.*, 2004). Die *hitABL* Gene sind auch schon als hoch konservierte Housekeeping Gene beschrieben worden (Boesen *et al.*, 2004), tatsächlich konnte die *hitABL* Operonstruktur in vielen Mycoplasmen nachgewiesen werden (Hopfe *et al.*, 2004). Beim Nachweis von Referenzgenen ist ebenfalls eine intakte RNA von großer Bedeutung, da Degradation die Stabilität der Referenzgene beeinflusst und zu Abweichungen der Messergebnisse führen kann (Pérez-Novo *et al.*, 2005; Vermeulen *et al.*, 2011). Durch die Referenzgene ist die relative Quantifizierung der RNA Expression der Zielgene möglich. Hierzu werden mathematische Modelle benötigt, mit deren Hilfe sich die Genregulation berechnen lässt. Die einfachste Methode für einen schnellen Überblick ist die „Delta-Delta-Methode“ ( $\text{Ratio} = 2^{-(\Delta C_q \text{ Behandlung} - \Delta C_q \text{ Kontrolle})}$ ;  $C_q$  = Quantifizierungszyklus, Punkt an dem die Fluoreszenz des untersuchten Gens die Hintergrundfluoreszenz übersteigt;  $\Delta C_q = C_q \text{ Zielgen} - C_q \text{ Referenzgen}$ ), entwickelt von PE Applied Biosystems, Perkin Elmer. Hier geht man davon aus, dass die optimale Effizienz ( $E=2$ ) immer erreicht wird. In dieser Arbeit wurde ein abgewandeltes Modell verwendet, mit dem zuerst die Mittelwerte der Gruppen bestimmt werden, so dass der mittlere Expressionsunterschied bestimmt wurde. Ein genaueres Modell hat Pfaffl 2001 entwickelt, bei dem die Unterschiede der PCR Effizienzen zwischen einzelnen Proben berücksichtigt wurden ( $\text{Ratio} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_q \text{ Zielgen (Kontrolle - Behandlung)}} / (E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_q \text{ Referenzgen (Kontrolle - Behandlung)}}$ ;  $E$  = qPCR Effizienz;  $\Delta C_q = C_q \text{ Zielgen} - C_q \text{ Referenzgen}$ ) (Pfaffl, 2001).

Als neue und sichere Methode der Normalisierung gelten artifizielle RNAs. Diese werden *in vitro* hergestellt und bei der RNA Extraktion der Probe in immer gleicher Konzentration zugesetzt. Dadurch können die Probleme der Referenzgene, z.B. deren Regulation, umgangen werden. Allerdings werden diese artifiziellen RNAs noch nicht kommerziell angeboten und ihre Herstellung ist in kleinen Laboren kaum möglich (Cronin *et al.*, 2004).

Zur absoluten Quantifizierung der Proben ist die Verwendung von Kalibratoren als Quantifizierungsstandards am besten geeignet (Fu *et al.* 2009). Hierzu wird deren Konzentration zuvor ermittelt und definierte Kopienzahlen mehrerer Verdünnungsstufen in der qPCR gemessen. Dadurch kann, mit Hilfe der Software der qPCR-Geräte, eine Kalibrierungskurve erstellt und die Konzentration der zu untersuchenden Proben bestimmt werden. Als Quantifizierungsstandards eignen sich z.B. Plasmid-klonierte DNA und PCR-Produkte, die das gesamte gewünschte PCR-Amplikon umfassen, oder auch international anerkannte biologische Standards (Bustin *et al.*, 2009). Wie die Studie von Dhanasekaran und

Mitarbeitern 2010 zeigte, sind Quantifizierungsstandards am stabilsten, wenn das gewünschte Fragment in einen Vector (in diesem Fall TOPO TA 2.1) eingesetzt, und dieser ringförmig belassen wird. Um der Degradation möglichst lange vorzubeugen, sollten die Standards möglichst gering verdünnt bei -20°C eingefroren werden. Allerdings wurden in der Studie nur die ersten 14 Tage nach Herstellung analysiert (Dhanasekaran *et al.*, 2010). Auch in dem von mir entwickelten Infektionsassay wurden Standards zur absoluten Quantifizierung verwendet, bei denen die zu untersuchenden PCR Produkte in den Vektor pGemT eingesetzt waren. Die Dilutionen wurden bei -20°C eingefroren und regelmäßig, etwa alle zwei bis drei Monate, aus der Stammlösung neu verdünnt und auf ihre Linearität überprüft.

Auch die Normalisierung der Expression der Zielgene durch genomische DNA ist möglich (Talaat *et al.*, 2002). Die große Fehlerquelle der reversen Transkription kann man so umgehen. Allerdings ist zu bedenken, dass bei sich replizierenden Bakterien oft bestimmte Gene in bis zu achtmal höherer Anzahl vorliegen als bei nicht replizierenden Bakterien (Rocha, 2004). Ein anderes Problem ist die simultane Extraktion von RNA und DNA, die mit vielen Präparationsmethoden nicht möglich ist (Huggett *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde dieses Problem durch die Gewinnung der DNA aus einem Aliquot der lysierten Zellen gelöst, so dass die RNA- und DNA- Extraktion aus Zellen desselben Wells erfolgte. Die RNA- und DNA-Proben, die ich in den Versuchen verwendet habe, wurden also durch unterschiedliche Methoden gewonnen. Dadurch könnte es zu einer unterschiedlichen Extraktionsrate gekommen sein, die man als Fehlerquelle bei der Auswertung bedenken sollte.

Durch die Normalisierung der Proben lässt sich die Expressionsrate der untersuchten Gene bestimmen.

Die *opp* Expression eines *opp-lacZ* Fusionsgens in *Salmonella typhimurium* wurde 1984 von Jamieson und Higgins als konstitutiv beschrieben (Jamieson und Higgins, 1984). Andrews und Short konnten aber bereits 1986 die Regulation eines *opp-lacZ* Fusionsgen in *E. coli* beschreiben, die durch Zugabe von L-Leucin oder L-Alanin zum Medium induziert wurde, und diese These somit widerlegen (Andrews und Short, 1986). In *M. pneumoniae* konnte die Hochregulation einer Oligopeptidpermease nach Inkubation der humanen Lungenzelllinie A549 nachgewiesen werden (Hallamaa *et al.*, 2008). Auch im *M. gallisepticum* Stamm R (Cecchini *et al.*, 2007) und in *M. hyopneumoniae* (Madsen *et al.*, 2008) wurden Oligopeptidpermeasen nach Infektion von Lungenfibroblasten bzw. bei *in vivo* Infektion hoch reguliert. In dieser Arbeit konnte ich Hinweise darauf liefern, dass die Expression von *M. hominis oppA* bei Infektion von HeLa-Zellen deutlich mehr ansteigt, als die von *oppBCDF*.

Die These, dass *oppA* sowohl polycistronisch, gemeinsam mit *oppBCDF*, aber auch monocistronisch exprimiert wird, wird dadurch unterstützt. Insgesamt scheinen die fünf *opp*-Gene im Laufe der Infektion jedoch herunter reguliert zu werden. Das *oppABCDF* nicht nur polycistronisch exprimiert wird, zeigt sich auch in *B. burgdorferi*. Hier findet man fünf *oppA* Gene, zwei davon befinden sich auf Plasmiden und drei auf Chromosomen. Die drei chromosomalen *oppA* Gene und *oppBCDF* haben jeweils eigene Promotoren, so dass ihre Expression unabhängig voneinander stattfinden kann (Wang *et al.*, 2002). Für die drei *oppA* Gene wurde aber nicht nur eine mono-, sondern auch eine gemeinsame, bi- und tricistronische Transkription beschrieben (Bono *et al.*, 1998). Die Expression dieser Gene variiert je nach Wirt von *B. burgdorferi* (infizierte Maus, gefütterte und nicht gefütterte Zecke) sehr stark (Wang *et al.*, 2002). Auch die Regulationsmechanismen sind für die fünf Gene verschieden, so wird *oppA5* durch die alternativen Sigmafaktoren RpoS und RpoN reguliert, die anderen vier *oppA* aber nicht (Medrano *et al.*, 2007). In *Staphylococcus aureus* gibt es insgesamt vier polycistronisch transkribierte *opp*-Operons, sowie ein monocistronisch transkribiertes *oppA*-Operon, die alle in unterschiedlicher Menge exprimiert werden (Hiron *et al.*, 2007). Das *oppA* mono- und polycistronisch exprimiert wird, konnte bereits für *Salmonella typhimurium* (Gallagher *et al.*, 1989; Pearce *et al.*, 1992) und für *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Peltoniemi *et al.*, 2002) gezeigt werden. Beim Letzteren war die Expression von *oppA* ca. 14-mal höher als die des ganzen Operons. Das bedeutet, dass es eine signifikant höhere Menge OppA Protein zu OppBCDF gibt. Auch bei *Listeria monocytogenes* wird *oppA* mono- und polycistronisch transkribiert. Zwischen *oppA* und *oppB* konnte eine Haarnadelstruktur gefunden werden (Borezee *et al.*, 2000), wie es sie auch bei *M. hominis* gibt (Henrich *et al.*, 1999). Borezee und Mitarbeiter wiesen zusätzlich zum monocistronischen 2,7 kb *oppA* Transkript und zum polycistronischen 7 kb *oppABCDF* Transkript ein 4 kb Transkript nach, dass sie auf eine zusätzliche polycistronische Transkription von *oppBCDF* ohne *oppA* schließen ließ (Borezee *et al.*, 2000). Ein solches Transkript wurde für *M. hominis* bislang nicht beschrieben.

Mit dem im Rahmen meiner Arbeit entwickelten Infektionsassay lässt sich in der Zukunft die genaue Expressionsrate von *oppABCDF* bestimmen. So kann man, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit sowohl bestätigen, dass *oppA* tatsächlich mono- und polycistronisch exprimiert wird, als auch näher charakterisieren, unter welchen pathophysiologischen Bedingungen die monocistronische OppA-Expression passiert. Es bleibt aufzuklären, ob *oppABCDF* der Isolate 64 und 66 ebenso exprimiert werden wie die

des Stammes FBG. Wie Peltoniemi und Mitarbeiter 2002 für *oppA2* von *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* zeigen konnten, können bereits Punktmutationen eine ineffiziente Translation bewirken (Peltoniemi *et al.*, 2002). Ich konnte zeigen, dass es in *oppA*<sup>64</sup> und *oppA*<sup>66</sup> solche Punktmutationen gibt, die Auswirkungen auf die Transkription und Translation sind aber noch unbekannt.

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen meiner Dissertation habe ich zunächst zwei OppA-Varianten der Oligopeptidpermease von *Mycoplasma hominis* Isolaten untersucht. Eine davon, OppA<sup>64</sup>, wies Unterschiede in der Antigenität, die andere, OppA<sup>66</sup>, Unterschiede in der apparenten Größe im Vergleich zum bereits gut charakterisierten OppA<sup>FBG</sup> auf. Durch Sequenzierung der *oppA*<sup>64</sup>- und *oppA*<sup>66</sup>-Gene konnte der Grund für den Verlust des TF6-Epitops bei OppA<sup>64</sup> gefunden werden, der durch eine Punktmutation (<sup>E176V</sup>) entsteht. Der apparente Größenunterschied von OppA<sup>66</sup> zu den OppA-Proteinen aller anderen Isolate hat seine Ursache nicht in Geninsertionen. Mit Hilfe von internetbasierten Softwareprogrammen wurde die OppA<sup>66</sup> Proteinsequenz auf zusätzliche posttranslationale Modifikationen und Unterschiede der Sekundärstruktur untersucht. Hier ließen sich geringe Unterschiede zu OppA<sup>FBG</sup> feststellen, so dass für den apparenten Größenunterschied im SDS-PAGE ein verändertes Laufverhalten von OppA<sup>66</sup> verantwortlich sein wird, das durch diese detektierten Veränderungen in der Sekundärstruktur bedingt sein kann.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Grund für die zusätzliche 3,3 kb *oppA* Bande zu der polycistronischen 9,5 kb *oppABCDF*-Bande, im Northern Blot (Henrich *et al.*, 1999) untersucht. Mittels Southern Blot Analyse konnte ich nachweisen, dass *oppA* ein single-copy Gen ist und somit einen zweiten Genlokus als Ursache für die 3,3 kb Bande ausschließen. Zur Analyse, unter welchen patho-physiologischen Bedingungen *oppA* nicht nur polycistronisch mit *oppBCDF*, sondern auch monocistronisch exprimiert wird, habe ich einen Infektionsassay etabliert, bei dem HeLa-Zellen mit *M. hominis* FBG inkubiert, und anschließend RNA und DNA präpariert und in qPCR Analysen gemessen werden. Bei der Testung verschiedener RNA-Präparationsmethoden stellte sich die Extraktion mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen als die Beste heraus. Es erwies sich allerdings als nötig, die RNA vor der reversen Transkription mit DNase I zu behandeln, da die Kontamination mit DNA sehr hoch war. Durch die DNA Präparation aus einem Aliquot der lysierten Zellen mit dem Bio-Roboter EZ1 konnte die Transkriptmenge (RNA) auf die Genomäquivalente (DNA) bezogen werden. Dank der Plasmid-klonierten PCR Amplikons als Quantifizierungsstandards konnten die Zielgene absolut quantifiziert werden und durch den Einsatz von Referenzgenen war die Bestimmung der mittleren Expression der Zielgene möglich.

So wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *in vitro* Infektionsmodell für *M. hominis* etabliert und in ersten Analysen die These bestätigt, dass *oppA* besonders zu Beginn der Infektion monocistronisch und polycistronisch als *oppABCDF* transkribiert wird.

## 7. Literaturverzeichnis

- Abrahams, J. P.; Leslie, A. G.; Lutter, R.; Walker, J. E. (1994): Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. In: *Nature* 370 (6491), S. 621–628.
- Allard, A.; Wadell, G. (1988): Physical organization of the enteric adenovirus type 41 early region 1A. In: *Virology* 164 (1), S. 220–229.
- Andrews, J. C.; Short, S. A. (1986): opp-lac Operon fusions and transcriptional regulation of the Escherichia coli trp-linked oligopeptide permease. In: *J. Bacteriol* 165 (2), S. 434–442.
- Baczynska, Agata; Svenstrup, Helle F.; Fedder, Jens; Birkelund, Svend; Christiansen, Gunna (2004): Development of real-time PCR for detection of Mycoplasma hominis. In: *BMC Microbiol* 4, S. 35.
- Behrens, A.; Heller, M.; Kirchhoff, H.; Yogev, D.; Rosengarten, R. (1994): A family of phase- and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (Vsps) of Mycoplasma bovis. In: *Infect. Immun* 62 (11), S. 5075–5084.
- Berchtold, H.; Reshetnikova, L.; Reiser, C. O.; Schirmer, N. K.; Sprinzl, M.; Hilgenfeld, R. (1993): Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. In: *Nature* 365 (6442), S. 126–132.
- 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. In: *J. Immunol. Methods* 131 (2), S. 203–212.
- Blom, N.; Gammeltoft, S.; Brunak, S. (1999): Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. In: *J. Mol. Biol* 294 (5), S. 1351–1362.
- Boesen, Thomas; Emmersen, Jeppe; Baczynska, Agata; Birkelund, Svend; Christiansen, Gunna (2004): The vaa locus of Mycoplasma hominis contains a divergent genetic islet encoding a putative membrane protein. In: *BMC Microbiol* 4, S. 37.
- Boguslavsky, S.; Menaker, D.; Lysnyansky, I.; Liu, T.; Levisohn, S.; Rosengarten, R. et al. (2000): Molecular characterization of the Mycoplasma gallisepticum pvpA gene which encodes a putative variable cytoadhesin protein. In: *Infect. Immun* 68 (7), S. 3956–3964.
- Bono, J. L.; Tilly, K.; Stevenson, B.; Hogan, D.; Rosa, P. (1998): Oligopeptide permease in Borrelia burgdorferi: putative peptide-binding components encoded by both chromosomal and plasmid loci. In: *Microbiology (Reading, Engl.)* 144 (Pt 4), S. 1033–1044.
- Borezee, E.; Pellegrini, E.; Berche, P. (2000): OppA of Listeria monocytogenes, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. In: *Infect. Immun* 68 (12), S. 7069–7077.
- Boyer, M. J.; Wise, K. S. (1989): Lipid-modified surface protein antigens expressing size variation within the species Mycoplasma hyorhinis. In: *Infect. Immun* 57 (1), S. 245–254.
- Brattelid, Trond; Winer, Lisbeth H.; Levy, Finn Olav; Liestøl, Knut; Sejersted, Ole M.; Andersson, Kristin B. (2010): Reference gene alternatives to Gapdh in rodent and human heart failure gene expression studies. In: *BMC Mol. Biol* 11, S. 22.
- Bustin, S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. In: *J. Mol. Endocrinol* 25 (2), S. 169–193.
- Bustin, S. (2002): Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. In: *Journal of Molecular Endocrinology* 29 (1), S. 23–39.

- Bustin, S. A.; Benes, V.; Nolan, T.; Pfaffl, M. W. (2005): Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. In: *J. Mol. Endocrinol* 34 (3), S. 597–601.
- Bustin, Stephen A.; Benes, Vladimir; Garson, Jeremy A.; Hellems, Jan; Huggett, Jim; Kubista, Mikael et al. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. In: *Clin. Chem* 55 (4), S. 611–622.
- Bustin, Stephen A.; Mueller, Reinhold (2005): Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. In: *Clin. Sci* 109 (4), S. 365–379.
- Calcutt, M. J.; Kim, M. F.; Karpas, A. B.; Mührladt, P. F.; Wise, K. S. (1999): Differential posttranslational processing confers intraspecies variation of a major surface lipoprotein and a macrophage-activating lipopeptide of *Mycoplasma fermentans*. In: *Infect. Immun* 67 (2), S. 760–771.
- Cecchini, Katharine R.; Gorton, Timothy S.; Geary, Steven J. (2007): Transcriptional responses of *Mycoplasma gallisepticum* strain R in association with eukaryotic cells. In: *J. Bacteriol* 189 (16), S. 5803–5807.
- Chang, How-Yi; Prince, Oliver A.; Sheppard, Edward S.; Krause, Duncan C. (2011): Processing is Required for a Fully Functional Protein P30 in *Mycoplasma pneumoniae* Gliding and Cytadherence. In: *J. Bacteriol* 193(20), S. 5841–5846.
- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Anal. Biochem* 162 (1), S. 156–159.
- Citti, C.; Rosengarten, R. (1997): *Mycoplasma* genetic variation and its implication for pathogenesis. In: *Wien. Klin. Wochenschr* 109 (14-15), S. 562–568.
- Citti, C.; Watson-McKown, R.; Drosse, M.; Wise, K. S. (2000): Gene families encoding phase- and size-variable surface lipoproteins of *Mycoplasma hyorhinis*. In: *J. Bacteriol* 182 (5), S. 1356–1363.
- Citti, Christine; Nouvel, Laurent-Xavier; Baranowski, Eric (2010): Phase and antigenic variation in mycoplasmas. In: *Future Microbiol* 5 (7), S. 1073–1085.
- Clyde WA, R. Chanock JG TullyM, JR (1990): Mycoplasmas. In: R. Dulbecco HN Eisen HS Ginsberg Davis BD (Hg.): *Microbiology* 4th edition, S. 707–716.
- Collins, R. Eric; Merz, Hugh; Higgs, Paul G. (2011): Origin and evolution of gene families in Bacteria and Archaea. In: *BMC Bioinformatics* 12 Suppl 9, S. S14.
- Crimmins, Gregory T.; Mohammadi, Sina; Green, Erin R.; Bergman, Molly A.; Isberg, Ralph R.; Mecsas, Joan (2012): Identification of MrtAB, an ABC Transporter Specifically Required for *Yersinia pseudotuberculosis* to Colonize the Mesenteric Lymph Nodes. In: *PLoS Pathog* 8 (8), S. e1002828.
- Cronin, M. (2004): Universal RNA Reference Materials for Gene Expression. In: *Clinical Chemistry* 50 (8), S. 1464–1471.
- Cseke, L.J. P.B Kaufman G.K Podila C. Tsai (2004): *Handbook of molecular and cellular methods in biology and medicine*. 2nd. London ;, New-York ;, Washington: CRC Press.
- Dallo, S. F.; Baseman, J. B. (1991): Adhesin gene of *Mycoplasma genitalium* exists as multiple copies. In: *Microb. Pathog* 10 (6), S. 475–480.
- Davis, Kelley L.; Wise, Kim S. (2002): Site-specific proteolysis of the MALP-404 lipoprotein determines the release of a soluble selective lipoprotein-associated motif-

- containing fragment and alteration of the surface phenotype of *Mycoplasma fermentans*. In: *Infect. Immun* 70 (3), S. 1129–1135.
- Davis BD, R. Dulbecco HN Eisen HS Ginsberg (Hg.) (1990): Microbiology 4th edition.
  - Demina, I. A.; Serebryakova, M. V.; Ladygina, V. G.; Rogova, M. A.; Zgoda, V. G.; Korzhenevskiy, D. A.; Govorun, V. M. (2009): Proteome of the bacterium *Mycoplasma gallisepticum*. In: *Biochemistry Mosc* 74 (2), S. 165–174.
  - Dhanasekaran, S.; Doherty, T. Mark; Kenneth, John (2010): Comparison of different standards for real-time PCR-based absolute quantification. In: *J. Immunol. Methods* 354 (1-2), S. 34–39.
  - Di Marzo Veronese, F.; Reitz, M. S.; Gupta, G.; Robert-Guroff, M.; Boyer-Thompson, C.; Louie, A. et al. (1993): Loss of a neutralizing epitope by a spontaneous point mutation in the V3 loop of HIV-1 isolated from an infected laboratory worker. In: *J. Biol. Chem* 268 (34), S. 25894–25901.
  - Djordjevic, Steven P.; Cordwell, Stuart J.; Djordjevic, Michael A.; Wilton, Jody; Minion, F. Chris (2004): Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. In: *Infect. Immun* 72 (5), S. 2791–2802.
  - Dorigo-Zetsma, J. W.; Dankert, J.; Zaat, S. A. (2000): Genotyping of *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates reveals eight P1 subtypes within two genomic groups. In: *J. Clin. Microbiol* 38 (3), S. 965–970.
  - Dorigo-Zetsma, J. W.; Wilbrink, B.; Dankert, J.; Zaat, S. A. (2001): *Mycoplasma pneumoniae* P1 type 1- and type 2-specific sequences within the P1 cytoadhesin gene of individual strains. In: *Infect. Immun* 69 (9), S. 5612–5618.
  - Earl, Stephen T. H.; Birrell, Geoff W.; Wallis, Tristan P.; St Pierre, Liam D.; Masci, Paul P.; Jersey, John de et al. (2006): Post-translational modification accounts for the presence of varied forms of nerve growth factor in Australian elapid snake venoms. In: *Proteomics* 6 (24), S. 6554–6565.
  - Evers, Claire E.; Gaskell, Simon J. (2007): Mass Spectrometry to Identify Posttranslational Modifications. In: Tadhg P. Begley (Hg.): Wiley Encyclopedia of Chemical Biology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc, S. 1–34.
  - Feldmann, R. C.; Henrich, B.; Kolb-Bachofen, V.; Hadding, U. (1992): Decreased metabolism and viability of *Mycoplasma hominis* induced by monoclonal antibody-mediated agglutination. In: *Infect. Immun* 60 (1), S. 166–174.
  - Férandon, C.; Peuchant, O.; Janis, C.; Benard, A.; Renaudin, H.; Pereyre, S.; Bébéar, C. (2011): Development of a real-time PCR targeting the *yidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative culture. In: *Clin. Microbiol. Infect* 17 (2), S. 155–159.
  - Fleige, Simone; Pfaffl, Michael W. (2006): RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. In: *Molecular Aspects of Medicine* 27 (2-3), S. 126–139.
  - Fleige, Simone; Walf, Vanessa; Huch, Silvia; Prgomet, Christian; Sehm, Julia; Pfaffl, Michael W. (2006): Comparison of relative mRNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative real-time RT-PCR. In: *Biotechnol. Lett* 28 (19), S. 1601–1613.
  - Fu, Jie; Li, Ding; Xia, Shaoyou; Song, Haifeng; Dong, Zengxiang; Chen, Fang et al. (2009): Absolute quantification of plasmid DNA by real-time PCR with genomic DNA as external

- standard and its application to a biodistribution study of an HIV DNA vaccine. In: *Anal Sci* 25 (5), S. 675–680.
- Gallagher, M. P.; Pearce, S. R.; Higgins, C. F. (1989): Identification and localization of the membrane-associated, ATP-binding subunit of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. In: *Eur. J. Biochem* 180 (1), S. 133–141.
  - Garault, Peggy; Le Bars, Dominique; Besset, Colette; Monnet, Veronique (2002): Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. In: *J. Biol. Chem* 277 (1), S. 32–39.
  - Gayen, Anindita; Chatterjee, Chiradip; Mukhopadhyay, Chaitali (2008): GM1-induced structural changes of bovine serum albumin after chemical and thermal disruption of the secondary structure: a spectroscopic comparison. In: *Biomacromolecules* 9 (3), S. 974–983.
  - Gerstein, Mark; Zheng, Deyou (2006): The real life of pseudogenes. In: *Sci. Am* 295 (2), S. 48–55.
  - Glew, M. D.; Browning, G. F.; Markham, P. F.; Walker, I. D. (2000): pMGA phenotypic variation in *Mycoplasma gallisepticum* occurs in vivo and is mediated by trinucleotide repeat length variation. In: *Infect. Immun* 68 (10), S. 6027–6033.
  - Habu, Y.; Peyachoknagul, S.; Sakata, Y.; Fukasawa, K.; Ohno, T. (1997): Evolution of a multigene family that encodes the Kunitz chymotrypsin inhibitor in winged bean: a possible intermediate in the generation of a new gene with a distinct pattern of expression. In: *Mol. Gen. Genet* 254 (1), S. 73–80.
  - Hallamaa, Katri M.; Tang, Sen-Lin; Ficorilli, Nino; Browning, Glenn F. (2008): Differential expression of lipoprotein genes in *Mycoplasma pneumoniae* after contact with human lung epithelial cells, and under oxidative and acidic stress. In: *BMC Microbiol* 8 (1), S. 124.
  - Hanahan D. (1996): Techniques for transformation of *E. coli*. In: B.D Hames D.M Glover (Hg.): DNA cloning: A practical approach Volume 1: Core techniques, Volume 1. New York: IRL.
  - Hannay, Kevin; Marcotte, Edward M.; Vogel, Christine (2008): Buffering by gene duplicates: an analysis of molecular correlates and evolutionary conservation. In: *BMC Genomics* 9, S. 609.
  - 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*. In: *J. Bacteriol* 181 (16), S. 4873–4878.
  - 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. In: *Infect. Immun* 64 (10), S. 4027–4034.
  - Higgins, C. F. (1992): ABC transporters: from microorganisms to man. In: *Annu. Rev. Cell Biol* 8, S. 67–113.
  - Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P. S.; Griffith, R. (1992): Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. In: *Biotechnology (N.Y.)* 10 (4), S. 413–417.
  - Himmelreich, R.; Hilbert, H.; Plagens, H.; Pirkel, E.; Li, B. C.; Herrmann, R. (1996): Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. In: *Nucleic Acids Res* 24 (22), S. 4420–4449.

- Hiron, Aurelia; Borezée-Durant, Elise; Piard, Jean-Christophe; Juillard, Vincent (2007): Only one of four oligopeptide transport systems mediates nitrogen nutrition in *Staphylococcus aureus*. In: *J. Bacteriol* 189 (14), S. 5119–5129.
- Holland, I. B. (2003): ABC proteins. From bacteria to man. 1st. Amsterdam ;, Boston: Academic Press.
- Holland, I. B.; Blight, M. A. (1999): ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. In: *J. Mol. Biol* 293 (2), S. 381–399.
- Hopfe, M.; Henrich, B. (2008): OppA, the ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis* induces ATP release and cell death in HeLa cells. In: *BMC Microbiology* 8, S. 55.
- Hopfe, Miriam (2001): Charakterisierung der Oligopeptidpermease von *Mycoplasma hominis*. Düsseldorf, Univ, Diss., 2002. urn:nbn:de:hbz:061-20020123-000234-1.
- Hopfe, Miriam; Dahlmanns, Theresa; Henrich, Birgit (2011): In *Mycoplasma hominis* the OppA-mediated cytoadhesion depends on its ATPase activity. In: *BMC Microbiol* 11 (1), S. 185.
- Hopfe, Miriam; Henrich, Birgit (2004): OppA, the substrate-binding subunit of the oligopeptide permease, is the major Ecto-ATPase of *Mycoplasma hominis*. In: *J. Bacteriol* 186 (4), S. 1021–1028.
- Hopfe, Miriam; Hoffmann, Ricarda; Henrich, Birgit (2004): P80, the HinT interacting membrane protein, is a secreted antigen of *Mycoplasma hominis*. In: *BMC Microbiol* 4, S. 46.
- Hruz, Tomas; Wyss, Markus; Docquier, Mylene; Pfaffl, Michael W.; Masanetz, Sabine; Borghi, Lorenzo et al. (2011): RefGenes: identification of reliable and condition specific reference genes for RT-qPCR data normalization. In: *BMC Genomics* 12, S. 156.
- Huggett, J.; Dheda, K.; Bustin, S.; Zumla, A. (2005): Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. In: *Genes Immun* 6 (4), S. 279–284.
- Imbeaud, Sandrine; Graudens, Esther; Boulanger, Virginie; Barlet, Xavier; Zaborski, Patrick; Eveno, Eric et al. (2005): Towards standardization of RNA quality assessment using user-independent classifiers of microcapillary electrophoresis traces. In: *Nucleic Acids Res* 33 (6), S. e56.
- Jahn, Courtney E.; Charkowski, Amy O.; Willis, David K. (2008): Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. In: *J. Microbiol. Methods* 75 (2), S. 318–324.
- Jamieson, D. J.; Higgins, C. F. (1984): Anaerobic and leucine-dependent expression of a peptide transport gene in *Salmonella typhimurium*. In: *J. Bacteriol* 160 (1), S. 131–136.
- Jensen, L. T.; Thorsen, P.; Møller, B.; Birkelund, S.; Christiansen, G. (1998): Antigenic and genomic homogeneity of successive *Mycoplasma hominis* isolates. In: *J. Med. Microbiol* 47 (8), S. 659–666.
- Kenney, R. T.; Li, J. S.; Clyde, W. A.; Wall, T. C.; O'Connor, C. M.; Campbell, P. T. et al. (1993): Mycoplasmal pericarditis: evidence of invasive disease. In: *Clin. Infect. Dis* 17 Suppl 1, S. S58–62.
- Kenri, T.; Taniguchi, R.; Sasaki, Y.; Okazaki, N.; Narita, M.; Izumikawa, K. et al. (1999): Identification of a new variable sequence in the P1 cytoadhesin gene of *Mycoplasma*

- pneumoniae: evidence for the generation of antigenic variation by DNA recombination between repetitive sequences. In: *Infect. Immun* 67 (9), S. 4557–4562.
- Kim, Sung Jae; Dix, David J.; Thompson, Kary E.; Murrell, Rachel N.; Schmid, Judith E.; Gallagher, Jane E.; Rockett, John C. (2007): Effects of storage, RNA extraction, genechip type, and donor sex on gene expression profiling of human whole blood. In: *Clin. Chem* 53 (6), S. 1038–1045.
  - Kitzerow, A.; Henrich, B. (2001): The cytosolic HinT protein of *Mycoplasma hominis* interacts with two membrane proteins. In: *Mol. Microbiol* 41 (1), S. 279–287.
  - Knott, Hanna (2008): Stress-induzierte posttranslationale Modifikationen des Y-box Proteins-1 (YB-1) beinhalten Acetylierung und Phosphorylierung. Aachen, Techn. Hochsch, Aachen. URN: urn:nbn:de:hbz:82-opus-24275.
  - Kokotovic, B.; Friis, N. F.; Jensen, J. S.; Ahrens, P. (1999): Amplified-fragment length polymorphism fingerprinting of *Mycoplasma* species. In: *J. Clin. Microbiol* 37 (10), S. 3300–3307.
  - Kornacki, J. A.; Oliver, D. B. (1998): Lyme disease-causing *Borrelia* species encode multiple lipoproteins homologous to peptide-binding proteins of ABC-type transporters. In: *Infect. Immun* 66 (9), S. 4115–4122.
  - Körschen, H. G.; Illing, M.; Seifert, R.; Sesti, F.; Williams, A.; Gotzes, S. et al. (1995): A 240 kDa protein represents the complete beta subunit of the cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptor. In: *Neuron* 15 (3), S. 627–636.
  - Krüger; Seidler (2007). In: Michael Rolle, Anton Mayr und Mathias Büttner (Hg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 127 Tabellen. 8., überarb. Stuttgart: Enke, S. 358.
  - Kubista, Mikael; Andrade, José Manuel; Bengtsson, Martin; Forootan, Amin; Jonák, Jiri; Lind, Kristina et al. (2006): The real-time polymerase chain reaction. In: *Mol. Aspects Med* 27 (2-3), S. 95–125.
  - Ladefoged, S. A. (2000): Molecular dissection of *Mycoplasma hominis*. In: *APMIS Suppl* 97, S. 1–45.
  - Ladefoged, S. A.; Christiansen, G. (1991): Analysis of the nucleotide sequence of the *Mycoplasma hominis* tuf gene and its flanking region. In: *FEMS Microbiol. Lett* 63 (2-3), S. 133–139.
  - Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
  - Lefever, Steve; Vandesompele, Jo; Speleman, Frank; Pattyn, Filip (2009): RTPrimerDB: the portal for real-time PCR primers and probes. In: *Nucleic Acids Res* 37 (Database issue), S. D942-5.
  - Lightfoot, Samar (2002): Quantitation comparison of total RNA using the Agilent 2100 bioanalyzer, ribo- green analysis and UV spectrometry. In: *Agilent Application Note* 2002.
  - Linton, Kenneth J.; Higgins, Christopher F. (2007): Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. In: *Pflugers Arch* 453 (5), S. 555–567.
  - Lynch, Michael; Katju, Vaishali (2004): The altered evolutionary trajectories of gene duplicates. In: *Trends Genet* 20 (11), S. 544–549.

- Lysnyansky, I.; Ron, Y.; Yogev, D. (2001): Juxtaposition of an active promoter to vsp genes via site-specific DNA inversions generates antigenic variation in *Mycoplasma bovis*. In: *J. Bacteriol* 183 (19), S. 5698–5708.
- Lysnyansky, I.; Sachse, K.; Rosenbusch, R.; Levisohn, S.; Yogev, D. (1999): The vsp locus of *Mycoplasma bovis*: gene organization and structural features. In: *J. Bacteriol* 181 (18), S. 5734–5741.
- Madsen, M. L.; Puttamreddy, S.; Thacker, E. L.; Carruthers, M. D.; Minion, F. C. (2008): Transcriptome Changes in *Mycoplasma hyopneumoniae* during Infection. In: *Infection and Immunity* 76 (2), S. 658–663.
- Majiwa, P. A.; Young, J. R.; Englund, P. T.; Shapiro, S. Z.; Williams, R. O. (1982): Two distinct forms of surface antigen gene rearrangement in *Trypanosoma brucei*. In: *Nature* 297 (5866), S. 514–516.
- Manchester, K. L. (1996): Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. In: *BioTechniques* 20 (6), S. 968–970.
- Maniatis, Thomas; Fritsch, Edward F.; Sambrook, Joseph (1989): Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Manning, Marta; Colón, Wilfredo (2004): Structural basis of protein kinetic stability: resistance to sodium dodecyl sulfate suggests a central role for rigidity and a bias toward beta-sheet structure. In: *Biochemistry* 43 (35), S. 11248–11254.
- Markham, P. F.; Glew, M. D.; Sykes, J. E.; Bowden, T. R.; Pollocks, T. D.; Browning, G. F. et al. (1994): The organisation of the multigene family which encodes the major cell surface protein, pMGA, of *Mycoplasma gallisepticum*. In: *FEBS Lett* 352 (3), S. 347–352.
- McCurdy, Richard D. John J. McGrath<sup>23</sup> Alan Mackay-Sim (2008): Validation of the comparative quantification method of real-time PCR analysis and a cautionary tale of housekeeping gene selection. In: *Gene Therapy and Molecular Biology* Vol 12, p. 15-24.
- Medrano, M. S.; Ding, Y.; Wang, X.-G.; Lu, P.; Coburn, J.; Hu, L. T. (2007): Regulators of Expression of the Oligopeptide Permease A Proteins of *Borrelia burgdorferi*. In: *Journal of Bacteriology* 189 (7), S. 2653–2659.
- Micke, Patrick; Ohshima, Mitsuhiro; Tahmasebpour, Simin; Ren, Zhi-Ping; Ostman, Arne; Pontén, Fredrik; Botling, Johan (2006): Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. In: *Lab. Invest* 86 (2), S. 202–211.
- Miesbauer, L. R.; Zhou, X.; Yang, Z.; Sun, Y.; Smith, D. L.; Smith, J. B. (1994): Post-translational modifications of water-soluble human lens crystallins from young adults. In: *J. Biol. Chem* 269 (17), S. 12494–12502.
- Miles, R. J. (1992): Catabolism in mollicutes. In: *J. Gen. Microbiol* 138 (9), S. 1773–1783.
- Molloy, C.; Cannon, R. D.; Sullivan, P. A.; Shepherd, M. G. (1994): Purification and characterization of two forms of N-acetylglucosaminidase from *Candida albicans* showing widely different outer chain glycosylation. In: *Microbiology (Reading, Engl.)* 140 (Pt 7), S. 1543–1553.
- Montgomery, D. W.; Shen, G. K.; Ulrich, E. D.; Steiner, L. L.; Parrish, P. R.; Zukoski, C. F. (1992): Human thymocytes express a prolactin-like messenger ribonucleic acid and synthesize bioactive prolactin-like proteins. In: *Endocrinology* 131 (6), S. 3019–3026.

- Mygind, T.; Zeuthen Sogaard, I.; Melkova, R.; Boesen, T.; Birkelund, S.; Christiansen, G. (2000): Cloning, sequencing and variability analysis of the gap gene from *Mycoplasma hominis*. In: *FEMS Microbiol. Lett* 183 (1), S. 15–21.
- Nikaido, H.; Hall, J. A. (1998): Overview of bacterial ABC transporters. In: *Meth. Enzymol* 292, S. 3–20.
- Nolan, Tania; Hands, Rebecca E.; Bustin, Stephen A. (2006): Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. In: *Nat Protoc* 1 (3), S. 1559–1582.
- Ohnishi, S.; Kameyama, K. (2001): Escherichia coli OmpA retains a folded structure in the presence of sodium dodecyl sulfate due to a high kinetic barrier to unfolding. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1515 (2), S. 159–166.
- Ohno, Susumu (1970): Evolution by gene duplication. Berlin, New York: Springer-Verlag.
- Palmirotta, Raffaele; Marchis, Maria Laura de; Ludovici, Giorgia; Leone, Barbara; Savonarola, Annalisa; Ialongo, Cristiano et al. (2012): Impact of preanalytical handling and timing for peripheral blood mononuclear cells isolation and RNA studies: the experience of the Interinstitutional Multidisciplinary BioBank (BioBIM). In: *Int. J. Biol. Markers* 27 (2), S. e90-8.
- Park, J. T.; Raychaudhuri, D.; Li, H.; Normark, S.; Mengin-Lecreulx, D. (1998): MppA, a periplasmic binding protein essential for import of the bacterial cell wall peptide L-alanyl-gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelate. In: *J. Bacteriol* 180 (5), S. 1215–1223.
- Pattyn, Filip; Speleman, Frank; Paepe, Anne de; Vandesompele, Jo (2003): RTPrimerDB: the real-time PCR primer and probe database. In: *Nucleic Acids Res* 31 (1), S. 122–123.
- Pearce, S. R.; Mimmack, M. L.; Gallagher, M. P.; Gileadi, U.; Hyde, S. C.; Higgins, C. F. (1992): Membrane topology of the integral membrane components, OppB and OppC, of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. In: *Mol. Microbiol* 6 (1), S. 47–57.
- Pease, L. R.; Horton, R. M.; Pullen, J. K.; Hunt, H. D.; Yun, T. J.; Rohren, E. M. et al. (1993): Amino acid changes in the peptide binding site have structural consequences at the surface of class I glycoproteins. In: *J. Immunol* 150 (8 Pt 1), S. 3375–3381.
- Peltoniemi, Kirsi; Vesanto, Erkki; Palva, Airi (2002): Gene characterization of an oligopeptide transport system from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. In: *Archives of Microbiology* 177 (6), S. 457–467.
- Perego, M.; Higgins, C. F.; Pearce, S. R.; Gallagher, M. P.; Hoch, J. A. (1991): The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. In: *Mol. Microbiol* 5 (1), S. 173–185.
- Pereyre, Sabine; Sirand-Pugnet, Pascal; Beven, Laure; Charron, Alain; Renaudin, Hélène; Barré, Aurélien et al. (2009): Life on arginine for *Mycoplasma hominis*: clues from its minimal genome and comparison with other human urogenital mycoplasmas. In: *PLoS Genet* 5 (10), S. e1000677.
- Pérez-Novo, Claudina Angela; Claeys, Cindy; Speleman, Frank; van Cauwenberge, Paul; Bachert, Claus; Vandesompele, Jo (2005): Impact of RNA quality on reference gene expression stability. In: *BioTechniques* 39 (1), S. 52, 54, 56.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic Acids Res* 29 (9), S. e45.

- Poliseno, Laura; Salmena, Leonardo; Zhang, Jiangwen; Carver, Brett; Haveman, William J.; Pandolfi, Pier Paolo (2010): A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. In: *Nature* 465 (7301), S. 1033–1038.
- Poon A. (2004): Predicting Phosphorylation: A critique of the NetPhos program and potential alternatives. In: *Stanford. Biochem* 218.
- Raeymaekers, L. (1993): Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications. In: *Anal. Biochem* 214 (2), S. 582–585.
- Ramakrishnan, C.; Dani, V. S.; Ramasarma, T. (2002): A conformational analysis of Walker motif A [GXXXXGKT (S)] in nucleotide-binding and other proteins. In: *Protein Eng* 15 (10), S. 783–798.
- Razin, S. (1993): Mycoplasma membranes as models in membrane research. In: *Subcell. Biochem* 20, S. 1–28.
- Razin, S. (1999): Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. In: *Biosci. Rep* 19 (5), S. 367–372.
- Ririe, K. M.; Rasmussen, R. P.; Wittwer, C. T. (1997): Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. In: *Anal. Biochem* 245 (2), S. 154–160.
- Rocha, Eduardo P. C. (2004): The replication-related organization of bacterial genomes. In: *Microbiology (Reading, Engl.)* 150 (Pt 6), S. 1609–1627.
- Rosengarten, R.; Wise, K. S. (1990): Phenotypic switching in mycoplasmas: phase variation of diverse surface lipoproteins. In: *Science* 247 (4940), S. 315–318.
- Ruettinger, Anke; Neumann, Steffi; Wiederanders, Bernd; Huber, René (2010): Comparison of different methods for preparation and characterization of total RNA from cartilage samples to uncover osteoarthritis in vivo. In: *BMC Res Notes* 3, S. 7.
- Rump, Lydia V.; Asamoah, Benedicta; Gonzalez-Escalona, Narjol (2010): Comparison of commercial RNA extraction kits for preparation of DNA-free total RNA from Salmonella cells. In: *BMC Res Notes* 3, S. 211.
- Sachse, Konrad; Frey, Joachim (2003): PCR detection of microbial pathogens. Totowa, N.J: Humana Press.
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T. et al. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In: *Science* 239 (4839), S. 487–491.
- Sambrook, Joseph; Russell, David W. (2001): Molecular cloning. A laboratory manual. 3. Aufl. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Gracia, Alejandro; Rozas, Julio (2008): Divergent evolution and molecular adaptation in the Drosophila odorant-binding protein family: inferences from sequence variation at the OS-E and OS-F genes. In: *BMC Evol. Biol* 8, S. 323.
- Schmidl, Sebastian R.; Gronau, Katrin; Hames, Claudine; Busse, Julia; Becher, Dörte; Hecker, Michael; Stülke, Jörg (2010): The stability of cytoadherence proteins in Mycoplasma pneumoniae requires activity of the protein kinase PrkC. In: *Infect. Immun* 78 (1), S. 184–192.
- Schroeder, Andreas; Mueller, Odilo; Stocker, Susanne; Salowsky, Ruediger; Leiber, Michael; Gassmann, Marcus et al. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements In: *BMC Mol Biol* 7 (1), S. 3.

- Seaton, Sarah C.; Elliott, Kathryn T.; Cuff, Laura E.; Laniohan, Nicole S.; Patel, Poonam R.; Neidle, Ellen L. (2012): Genome-wide selection for increased copy number in *Acinetobacter baylyi* ADP1: locus and context-dependent variation in gene amplification. In: *Mol. Microbiol* 83 (3), S. 520–535.
- Søgaaard, I. Z.; Boesen, T.; Mygind, T.; Melkova, R.; Birkelund, S.; Christiansen, G.; Schierup, M. H. (2002): Recombination in *Mycoplasma hominis*. In: *Infect. Genet. Evol* 1 (4), S. 277–285.
- Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. In: *J. Mol. Biol* 98 (3), S. 503–517.
- Ståhlberg, Anders; Håkansson, Joakim; Xian, Xiaojie; Semb, Henrik; Kubista, Mikael (2004a): Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. In: *Clin. Chem* 50 (3), S. 509–515.
- Ståhlberg, Anders; Kubista, Mikael; Pfaffl, Michael (2004b): Comparison of reverse transcriptases in gene expression analysis. In: *Clin. Chem* 50 (9), S. 1678–1680.
- Su, C. J.; Chavoya, A.; Baseman, J. B. (1988): Regions of *Mycoplasma pneumoniae* cytoadhesin P1 structural gene exist as multiple copies. In: *Infect. Immun* 56 (12), S. 3157–3161.
- Su, C. J.; Chavoya, A.; Dallo, S. F.; Baseman, J. B. (1990): Sequence divergency of the cytoadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*. In: *Infect. Immun* 58 (8), S. 2669–2674.
- Su, C. J.; Dallo, S. F.; Chavoya, A.; Baseman, J. B. (1993): Possible origin of sequence divergence in the P1 cytoadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*. In: *Infect. Immun* 61 (3), S. 816–822.
- Swanson, J.; Robbins, K.; Barrera, O.; Koomey, J. M. (1987): Gene conversion variations generate structurally distinct pilin polypeptides in *Neisseria gonorrhoeae*. In: *J. Exp. Med* 165 (4), S. 1016–1025.
- Talaat, Adel M.; Howard, Susan T.; Hale, Walker; Lyons, Rick; Garner, Harold; Johnston, Stephen Albert (2002): Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. In: *Nucleic Acids Res* 30 (20), S. e104.
- Tautz, D. (1992): Redundancies, development and the flow of information. In: *Bioessays* 14 (4), S. 263–266.
- Thermo Fisher Scientific Inc. (Hg.) (2008): NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual.
- Tichopad, Ales; Bar, Tzachi; Pecen, Ladislav; Kitchen, Robert R.; Kubista, Mikael; Pfaffl, Michael W. (2010): Quality control for quantitative PCR based on amplification compatibility test. In: *Methods* 50 (4), S. 308–312.
- Tortschanoff, Magdalena; Aurich, Christine; Rosengarten, Renate; Spergser, Joachim (2005): Phase and size variable surface-exposed proteins in equine genital mycoplasmas. In: *Vet. Microbiol* 110 (3-4), S. 301–306.
- Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 76 (9), S. 4350–4354.
- Tynkkynen, S.; Buist, G.; Kunji, E.; Kok, J.; Poolman, B.; Venema, G.; Haandrikman, A. (1993): Genetic and biochemical characterization of the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. In: *J. Bacteriol* 175 (23), S. 7523–7532.

- van Noort, Vera; Seebacher, Jan; Bader, Samuel; Mohammed, Shabaz; Vonkova, Ivana; Betts, Matthew J. et al. (2012): Cross-talk between phosphorylation and lysine acetylation in a genome-reduced bacterium. In: *Mol. Syst. Biol* 8, S. 571.
- Vandesompele, Jo; Preter, Katleen de; Pattyn, Filip; Poppe, Bruce; van Roy, Nadine; Paepe, Anne de; Speleman, Frank (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. In: *Genome Biol* 3 (7), S. RESEARCH0034.
- Vermeulen, Joëlle; Preter, Katleen de; Lefever, Steve; Nuytens, Justine; Vloed, Fanny de; Derveaux, Stefaan et al. (2011): Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR. In: *Nucleic Acids Res* 39 (9), S. e63.
- Vetter, I. R.; Wittinghofer, A. (1999): Nucleoside triphosphate-binding proteins: different scaffolds to achieve phosphoryl transfer. In: *Q. Rev. Biophys* 32 (1), S. 1–56.
- Vieira, Filipe G.; Sánchez-Gracia, Alejandro; Rozas, Julio (2007): Comparative genomic analysis of the odorant-binding protein family in 12 *Drosophila* genomes: purifying selection and birth-and-death evolution. In: *Genome Biol* 8 (11), S. R235.
- Waites K., Talkington D. (2005): New developments in human diseases due to mycoplasmas. In: Alain Blanchard und Glenn Browning (Hg.): *Mycoplasmas. Molecular biology, pathogenicity and strategies for control*. Wymondham: Horizon Bioscience, S. 289–354.
- Walker, J. E.; Saraste, M.; Runswick, M. J.; Gay, N. J. (1982): Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. In: *EMBO J* 1 (8), S. 945–951.
- Wang, Ena (2005): RNA amplification for successful gene profiling analysis. In: *J Transl Med* 3, S. 28.
- Wang, X.-G; Lin, B.; Kidder, J. M.; Telford, S.; Hu, L. T. (2002): Effects of Environmental Changes on Expression of the Oligopeptide Permease (opp) Genes of *Borrelia burgdorferi*. In: *J. Bacteriol.* 184 (22), S. 6198–6206.
- Washburn, L. R.; Weaver, K. E.; Weaver, E. J.; Donelan, W.; Al-Sheboul, S. (1998): Molecular characterization of *Mycoplasma arthritidis* variable surface protein MAA2. In: *Infect. Immun* 66 (6), S. 2576–2586.
- Wei, Yunzhou; Zhou, Hao; Sun, Yi; He, Yingbo; Luo, Yongzhang (2007): Insight into the catalytic mechanism of arginine deiminase: functional studies on the crucial sites. In: *Proteins* 66 (3), S. 740–750.
- Wilkins, A. S. (1997): Canalization: a molecular genetic perspective. In: *Bioessays* 19 (3), S. 257–262.
- Wise, Kim S.; Foecking, Mark F.; Röske, Kerstin; Lee, Young Jin; Lee, Young Moo; Madan, Anup; Calcutt, Michael J. (2006): Distinctive repertoire of contingency genes conferring mutation- based phase variation and combinatorial expression of surface lipoproteins in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* of the *Mycoplasma mycoides* phylogenetic cluster. In: *J. Bacteriol* 188 (13), S. 4926–4941.
- Wittwer, C. T.; Herrmann, M. G.; Moss, A. A.; Rasmussen, R. P. (1997): Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. In: *BioTechniques* 22 (1), S. 130-1, 134-8.

- Wolfe, Kenneth H.; Li, Wen-Hsiung (2003): Molecular evolution meets the genomics revolution. In: *Nat. Genet* 33 Suppl, S. 255–265.
- Yogeve, D.; Sela, S.; Bercovier, H.; Razin, S. (1990): Nucleotide sequence and codon usage of the elongation factor Tu(EF-Tu) gene from *Mycoplasma pneumoniae*. In: *Mol. Microbiol* 4 (8), S. 1303–1310.
- Yoo, D.; Deregt, D. (2001): A single amino acid change within antigenic domain II of the spike protein of bovine coronavirus confers resistance to virus neutralization. In: *Clin. Diagn. Lab. Immunol* 8 (2), S. 297–302.
- Zhang, Q.; Wise, K. S. (1996): Molecular basis of size and antigenic variation of a *Mycoplasma hominis* adhesin encoded by divergent vaa genes. In: *Infect. Immun* 64 (7), S. 2737–2744.
- Zimmerman, Carl-Ulrich R.; Stiedl, Thomas; Rosengarten, Renate; Spergser, Joachim (2009): Alternate phase variation in expression of two major surface membrane proteins (MBA and UU376) of *Ureaplasma parvum* serovar 3. In: *FEMS Microbiol. Lett* 292 (2), S. 187–193.

## 8. Abkürzungen

|                       |                                                                                                                                 |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ABC                   | ATP-binding-casette                                                                                                             |
| Amp                   | Ampicillin                                                                                                                      |
| AS                    | Aminosäure                                                                                                                      |
| Aqua dest.            | Destilliertes H <sub>2</sub> O                                                                                                  |
| ATP                   | Adenosintriphosphat                                                                                                             |
| <i>B. burgdorferi</i> | <i>Borrelia burgdorferi</i>                                                                                                     |
| BMFZ                  | Biomedizinisches Forschungszentrum der HHU<br>Düsseldorf                                                                        |
| bp                    | Basenpaar                                                                                                                       |
| cDNA                  | complementary DNA                                                                                                               |
| CS                    | conserved sequence                                                                                                              |
| CSPD                  | Dinatrium 3- (4-methoxispiro {1,2-dioxetane-3,2'-(5'-<br>chloro) tricyclo [3.3.1. <sup>3,7</sup> ] decan}-4-yl) phenyl phosphat |
| CTP                   | Cytosintriphospha                                                                                                               |
| C <sub>q</sub>        | quantification cycle                                                                                                            |
| Da                    | Dalton                                                                                                                          |
| DEPC                  | Diethylpyrocarbonat                                                                                                             |
| Dig                   | Digoxigenin                                                                                                                     |
| DMEM                  | Dulbecco's modified Eagle's medium                                                                                              |
| DNA                   | Desoxyribonukleinsäure                                                                                                          |
| DNase                 | Desoxyribonuklease                                                                                                              |
| DTT                   | Dithiothreitol                                                                                                                  |
| <i>E. coli</i>        | <i>Escherichia coli</i>                                                                                                         |
| ECL                   | enhanced chemiluminescent                                                                                                       |
| EDTA                  | Ethylendiamintetraessigsäure                                                                                                    |
| EMBL                  | European Molecular Biology Laboratories<br>und andere                                                                           |
| et al.                |                                                                                                                                 |
| FBG                   | Freiburg                                                                                                                        |
| FCS                   | Fetal calf Serum                                                                                                                |
| g                     | Erdbeschleunigung                                                                                                               |
| <i>gap</i>            | Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase Gen                                                                                      |
| gen                   | genomisch                                                                                                                       |

|                       |                                                     |
|-----------------------|-----------------------------------------------------|
| GTP                   | Guanosintriphosphat                                 |
| h                     | Stunden                                             |
| IPTG                  | Isopropylthiogalaktosid                             |
| kb                    | Kilobasenpaare                                      |
| kDa                   | Kilodalton                                          |
| <i>L. delbrueckii</i> | <i>Lactobacillus delbrueckii</i>                    |
| LB                    | Luria-Bertani-(Medium)                              |
| <i>M.</i>             | <i>Mycoplasma</i>                                   |
| M                     | Mol                                                 |
| min                   | Minute                                              |
| MOPS                  | 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure                   |
| mRNA                  | messenger RNA                                       |
| NBP                   | Nukleotid-bindende Domäne                           |
| NTP                   | Nukleotidtriphosphat                                |
| OD                    | optische Dichte                                     |
| <i>opp</i>            | Oligopeptidpermeasegen                              |
| Opp                   | Oligopeptidpermease                                 |
| PBS                   | Phosphate buffered Saline                           |
| PCR                   | Polymerase Chain Reaction                           |
| PID                   | pelvic inflammatory disease                         |
| PK                    | Proteinase K                                        |
| P-loop                | phosphate-binding-loop                              |
| PPLO                  | pleura-pneumoniae-like organism                     |
| qPCR                  | real-time PCR                                       |
| RIN                   | RNA-Integritätsnummer                               |
| RNA                   | Ribonukleinsäure                                    |
| RNase                 | Ribonuklease                                        |
| rpm                   | revolutions per minute                              |
| RT                    | Raumtemperatur                                      |
| RT-PCR                | reverse Transkriptase PCR                           |
| SDS                   | Natriumdodecylsulfat                                |
| SDS-PAGE              | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| sek                   | Sekunde                                             |
| subsp.                | subspezies                                          |

|            |                                                       |
|------------|-------------------------------------------------------|
| TBE        | Tris-Borat-Puffer                                     |
| TTP        | Tyrosintriphospha                                     |
| Tm         | annealing Temperatur                                  |
| <i>tuf</i> | Elongationsfaktor Tu Gen                              |
| <i>U.</i>  | <i>Ureaplasma</i>                                     |
| V          | Volt                                                  |
| v/v        | Volumenprozent (volume pro volume)                    |
| w/v        | Gewichtsprozent (weight pro volume)                   |
| X-Gal      | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid |
| 2D         | Zweidimensional                                       |

Die Abkürzungen der Puffer AE, AL, ATL, AW, RF, RLT, RPE und RW sind von der Firma Qiagen übernommen. Die genaue Bezeichnung ist nicht bekannt.

## **Danksagung**

Frau Prof. Dr. Birgit Henrich danke ich für die exzellente Betreuung, das Heranführen an wissenschaftliches Arbeiten und viele Diskussionen und Anregungen, die diese Arbeit erst ermöglicht haben.

Besonders danken möchte ich Dr. Miriam Hopfe und Dana Belick. Sie waren mir bei der praktischen Arbeit im Labor eine unermessliche Hilfe, ihr Wissen und ihr Rat standen mir immer zur Verfügung.

Herrn Prof. Dr. Pfeffer danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Institut für Medizinische Mikrobiologie der HHU Düsseldorf.

Desweiteren danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie für das angenehme Arbeitsklima und die Unterstützung.

Zuletzt danke ich meinen Eltern, Beate und Jupp Dahlmanns, für ihre grenzenlose Unterstützung. Meiner Schwester Christina Zindel danke ich für die große Motivationshilfe. Julian Beyer danke ich für seine Geduld und ein immer offenes Ohr.

### Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Theresa Dahlmanns