

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Hadding

**Charakterisierung der Adhärenzeigenschaften
eines konservierten 60kDa-Membranproteins
von *Mycoplasma hominis***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Mike C. Papenhoff

2001

Für meine Eltern,
die mir dies ermöglicht haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. U. Hadding für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Dissertation im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Besonders danke ich Frau Priv. Doz. Dr. rer. nat. Birgit Henrich für die Betreuung dieser Arbeit und für die ständige Hilfe und Unterstützung. Außerdem danke ich Frau Dr. rer. nat. Annette Kitzerow für alle hilfreichen Anregungen bei der Erstellung dieser Dissertation. Frau Marzena Czarna danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz und die ununterbrochene Bereitschaft zur Unterstützung.

Desweiteren geht mein Dank an alle Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für ihre Ratschläge und ihre Hilfestellung.

Außerdem danke ich allen außerhalb dieses Institutes, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit zur Seite standen, insbesondere meinen Freunden, die mich immer unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Systematik und Biologie der Mycoplasmen	1
1.2	Relevanz der Mycoplasmen für die Humanmedizin	2
1.3	Oberflächenstrukturen von <i>Mycoplasma hominis</i>	5
1.4	Ziel der Arbeit	7
2.	Materialien	8
2.1	Chemikalien	8
2.2	Enzyme	9
2.3	<i>E. coli</i> -Bakterienstämme und Plasmide	9
2.4	Puffer und Stammlösungen	9
2.5	Membranen, Säulenmatrizes, Säulen	11
2.6	Molekulargewichtsmarker	11
3.	Methoden	12
3.1	Bakteriologische Methoden	12
3.1.1	Kultivierung von <i>Mycoplasma hominis</i>	12
3.1.2	Kultivierung von <i>E. coli</i>	12
3.1.3	Keimzahlbestimmung	13
3.2	Proteinbiochemische Methoden	13
3.2.1	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	13
3.2.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen aus <i>M. hominis</i>	14
3.2.3	Aufreinigung Histidin-tragender rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	14
3.2.4	Affinitätschromatographische Aufreinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	15
3.2.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierten Bedingungen	16
3.2.6	Western-Blot und Immunfärbung	16
3.2.7	Osmotische Lyse und Separation von Membran- und zytoplasmatischen Proteinen	17

3.2.8	ELISA (Enzyme-Linked-Immuno <u>s</u> orbent- <u>A</u> ssay)	18
3.2.8.1	Adhärenzassay	18
3.2.8.2	Inhibitionsassay	19
3.2.8.3	Kompetitionsassay	19
3.2.8.4	Membranpräparation	20
4.	Ergebnisse	21
4.1	Charakterisierung des nativen P60/P80-Komplexes aus <i>M. hominis</i>	21
4.1.1	Affinitätschromatographische Aufreinigung	22
4.1.2	Adhärenzverhalten von P60/P80	23
4.2	Auswahl verschiedener Mycoplasmenisolate	25
4.3	Charakterisierung des rekombinanten Fusionsproteins P60*	29
4.3.1	Native Aufreinigung	29
4.3.2	Kompetitive Inhibition der Mycoplasmenadhärenz durch Zugabe von P60*	33
4.4	Charakterisierung des rekombinanten P60 ^r aus dem Expressionsklon MA2	35
4.4.1	Bestimmung der zellulären Lokalisation von P60 ^r	35
4.4.2	Affinitätschromatographische Aufreinigung von P60 ^r	37
4.4.3	Adhärenzeigenschaften von P60 ^r	39
5.	Diskussion	44
6.	Zusammenfassung	48
7.	Literatur	49
8.	Abkürzungsverzeichnis	55
9.	Lebenslauf	56

1. Einleitung

1.1 Systematik und Biologie der Mycoplasmen

Mycoplasmen sind Prokaryonten, die erstmals 1898 von Mocard und Roux aus pleuropneumoniekranken Rindern isoliert wurden (Brandis et al., 1984). Später isolierte Spezies wurden aus diesem Grund als „Pleuro-Pneumonia-Like-Organisms“ (PPLO) bezeichnet. Die heute übliche Gattungsbezeichnung „Mycoplasma“ kam durch die fakultativ pilzfadenartige Erscheinungsform bei mikroskopischer Betrachtung zustande.

1937 wurden erstmals Mycoplasmen vom Menschen aus dem Abszeß einer Bartholinischen Drüse isoliert (Dienes und Edsall, 1937), jedoch gelang erst 1962 die Zuordnung einer Mycoplasmen-Art (*M. pneumoniae*) zu einer bestimmten Erkrankung, hier der atypischen Pneumonie (Brandis et al., 1984). Während Mycoplasmen seit langer Zeit als Seuchenerreger in der Tierwelt bekannt sind, gewinnen sie seit einiger Zeit als Kontaminante von Zellkulturen, sowie im Bereich der Insekten- und Pflanzenpathologie an Bedeutung (Brandis et al., 1984).

Zusammen mit den Ureaplasmen bilden Mycoplasmen die Familie der *Mycoplasmataceae*, welche wiederum zur Klasse der *Mollicutes* gehört. *Mollicutes* sind zellwandlos und mit einer Größe von nur 300 - 1000 nm sehr klein. Im allgemeinen werden alle Vertreter der *Mollicutes* als Mycoplasmen bezeichnet, nicht nur die Gattung *Mycoplasma*, die über 80 durch Membranantigene und biochemische StoffwechsellLeistungen zu differenzierende Arten enthält (Hahn et al., 1991). Sie sind zur Vermehrung außerhalb künstlicher Nährmedien auf das Vorhandensein eines Wirtsorganismus angewiesen, auf dessen Schleimhäuten sie meist als extrazelluläre Parasiten leben (Brandis et al., 1984).

Von diesem Wirtsorganismus beziehen *Mycoplasmataceae* Cholesterin, Fettsäuren sowie Aminosäuren und Nukleotide (Tully & Whitcomb, 1979). Durch das Fehlen einer Zellwand ähneln Mycoplasmen den L-Formen von Bakterien, lassen sich von ihnen jedoch dadurch abgrenzen, dass L-Formen in ihrem Genom und ihren biochemischen Eigenschaften ihren Eltern-Bakterien gleichen, während Mycoplasmen als Vertreter der Klasse *Mollicutes* eine eigene Gruppe repräsentieren.

Das Genom von Mycoplasmen ist das kleinste bisher bekannte Genom eines sich selbst replizierenden Organismus (Razin, 1987) mit einem ungewöhnlich niedrigen Cytosin- und Guaningehalt, welcher bei nur 25 bis 33% liegt und der weiteren Besonderheit, dass das Codon UGA bei Mycoplasmen eine Translation in die Aminosäure Tryptophan bewirkt, während es bei anderen Prokaryonten ein Stopcodon darstellt (Inamine et al., 1990; Christiansen, 1997). Mycoplasmen enthalten in ihrer Zellmembran Cholesterin, welches sonst nur in der Membran von Eukaryonten vorkommt. Desweiteren besitzen sie nur ein für Wachstum und Replikation notwendiges Minimum an Zellorganellen. So fehlen Mesosomen, Geißeln und Pili und auch die Enzymausstattung ist reduziert. Aufgrund des Fehlens von Cytochromen kommt es in der Atmungskette zur Anreicherung von H_2O_2 , was als Hämolytin einen Pathogenitätsfaktor einiger Mycoplasmen darstellt (Almagor et al., 1986). Durch das die Klasse der Mollicutes definierende Fehlen einer Zellwand sind Mycoplasmen zum einen in der Lage, sich mikroskopisch in verschiedener Gestalt zu präsentieren (wodurch auch die heutige Bezeichnung zustande kam, s.o.), zum anderen passieren sie durch die resultierende starke Verformbarkeit auch Bakterienfilter mit einer mittleren Porenweite von 0,2 μm , wodurch sie, früher oft für Viren gehalten, als Kontaminante von Zellkulturen auftreten (Hahn et al., 1991).

Mycoplasmen gewinnen die zum Leben nötige Energie durch Glycolyse, Aminosäureabbau oder Fettsäureoxidation (Brandis et al., 1984). So sind die meisten Mycoplasmen entweder auf Glucose oder Arginin als Energiequelle angewiesen, einige können auch beide Substrate verstoffwechseln.

1.2 Relevanz der Mycoplasmen für die Humanmedizin

Mycoplasmen besitzen eine relativ ausgeprägte Wirtsspezifität, was sowohl durch den hohen Grad an Anpassung an den jeweiligen Wirt, als auch durch ihre Empfindlichkeit gegenüber externen Faktoren bei längeren Übertragungswegen, wie z.B. Austrocknung, bedingt ist. Die Übertragung findet entweder durch eine „Tröpfcheninfektion“ statt, so bei den im Respirationstrakt angesiedelten Mycoplasmen oder durch direkten Kontakt, was vorwiegend bei der Übertragung der genitalen Mycoplasmen der Fall ist. Mit Ausnahme von *M. pneumoniae* können

Mycoplasmen auch als Teil der normalen Keimflora gefunden werden und sind nur fakultativ pathogen (Brandis et al., 1984). Die von Mycoplasmen verursachten Erkrankungen sind oftmals multifaktoriellen Ursprungs. Das Krankheitsbild ist abhängig von äußeren Einflüssen, dem Immunstatus und der genetischen Prädisposition des Wirtes (Cassell & Cole, 1981).

Der klinisch relevanteste Krankheitserreger unter den Mycoplasmen ist *M. pneumoniae*, ein obligat pathogener Erreger der primär atypischen Pneumonie. Im Gegensatz zu den meisten anderen Mycoplasmen besitzt *M. pneumoniae* eine definierte Zellform, die neben dem Zellkörper eine Spitzenstruktur (engl. „Tip-structure“) aufweist. Die Proteine dieser Tip-Struktur sind an der Anheftung an die Wirtszelle beteiligt, Mutanten ohne eines der Hauptadhäsine sind in erheblich geringerem Maße virulent als Wildformen (Romero-Arroyo et al., 1999). *M. pneumoniae* besiedelt Epithelzellen von Trachea, Bronchien und Bronchiolen, unterbricht durch die Besiedlung die Zilienfunktion und zerstört letztendlich die Epithelzellen durch Produktion von H₂O₂ und anderen Superoxiden (Razin, 1985, 1986; Almagor et al., 1986). Die Infektion kann klinisch inapparent verlaufen; das Vollbild einer interstitiellen Pneumonie entwickelt sich lediglich bei 3 bis 10% der Infizierten (Cassell & Cole, 1981), wobei Kinder zwischen 5 und 15 Jahren am häufigsten erkranken (Brandis et al., 1984). Seltener treten auch extrapulmonale Komplikationen der Erkrankung auf, beispielsweise kann die Infektion mit *M. pneumoniae* die Bildung von Kälteagglutininen gegen Erythrozyten anregen (bei 33% bis 76% der Patienten). Bei bis zu 4,5% der Krankheitsmanifestationen kann es zu myokardialen Störungen kommen. Ebenfalls ist bei etwa 0,1% aller Erkrankungen mit einer Beteiligung sowohl des zentralen als auch des peripheren Nervensystems zu rechnen (Cassell & Cole, 1981).

Auch *Mycoplasma hominis* kann in seltenen Fällen Epithelzellen des oberen Respirationstraktes besiedeln und Formen einer Laryngitis verursachen; unter besonderen Bedingungen, wie bei neonataler Pneumonie, kann auch eine Pathogenität für den unteren Respirationstrakt gezeigt werden. Die Tatsache, dass *M. hominis* in höherer Anzahl aus dem Respirationstrakt von Personen isoliert werden kann, die oral-genitale Sexualpraktiken durchführen (Mufson, 1983), zeigt, dass diese Mycoplasmenart gewöhnlich im Genitalbereich angesiedelt ist.

Mycoplasma hominis wird durch direkten Kontakt übertragen und ist ein fakultativ pathogener Vertreter der normalen Genitalflora, kann jedoch an einer Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder beteiligt sein.

M. hominis ist zusammen mit anderen Bakterien Teil einer pathologisch veränderten Vaginalflora, im allgemeinen als bakterielle Vaginosis (abgekürzt: BV) bezeichnet, welche in Zusammenhang mit Entzündungen des kleinen Beckens („pelvic inflammatory disease“, abgekürzt PID) steht (Mardh, 1983; Taylor-Robinson & Furr, 1997). Dabei kann die Gattung der genitalen Mycoplasmen eher bei nulliparen Frauen isoliert werden, während bei Frauen, die bereits geboren haben, *Ureaplasma urealyticum* häufiger gefunden wird (Nunez-Troconis, 1999). In der Perinatalperiode ist die BV verantwortlich für Infektionserkrankungen von Mutter und Neugeborenem (Meyer und Clough, 1993); das Risiko für Geburtskomplikationen wie vorzeitige Wehentätigkeit, vorzeitige Ruptur der fetalen Membranen und Frühgeburt ist signifikant erhöht (Hill, 1998).

Ebenfalls in der Postpartalperiode ist *M. hominis* als Erreger einer septischen Arthritis verantwortlich, eine seltene Krankheitsmanifestation, die hauptsächlich bei Immunsupprimierten oder bei Patienten nach Manipulationen an den Harnwegen beobachtet wird (Luttrell et al., 1994). Auch ein Teil von Patienten mit rheumatoider Arthritis weist eine systemische Infektion mit Mycoplasmen auf, hier konnten neben *M. hominis* auch *M. fermentans*, *M. pneumoniae* und *M. penetrans* isoliert werden. Die Rolle der Mycoplasmeninfektion als Cofaktor der Erkrankung wird daher diskutiert (Haier et al., 1999). Sehr selten kann *M. hominis* als Erreger einer akuten Pyelonephritis auftreten oder zur Exazerbation einer chronischen Pyelonephritis führen (Thomsen, 1983; Küchle et al., 1997). In den letzten Jahren wurde mehrfach beschrieben, dass *M. hominis* bei kardiovaskulärchirurgischen Patienten sowohl Wundinfektionen als auch eine akute Mediastinitis verursachen kann (Mossad et al., 1996; Sielaff et al., 1996). Auch Fälle von Perikarditis, die auf *M. hominis* zurückzuführen sind, wurden beschrieben (Kenney et al., 1993). Eine mögliche Korrelation von genitaler Mycoplasmosen mit der Entstehung von cervicalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) konnte in jüngeren Untersuchungen nicht bestätigt werden (Nunez-Tronconis, 1999).

Die Rolle von Mycoplasmen bei Infektionen mit dem Human Immunodeficiency Virus Typ 1 (HIV-1) scheint weiterhin nicht vollständig geklärt, so wird *M. hominis* als mögliche Quelle eines aus cervicovaginaler Lavage isolierten sogenannten „HIV-

inducing-factor“ (HIF) angesehen. Dieser HIF kann zu verstärkter Virustranskription und -replikation führen, was eine vermehrte genitale Übertragung von HIV-1 zur Folge hat (Al-Harhi et al., 1999).

Neben *M. hominis* wurden auch andere Mycoplasmenarten in Zusammenhang mit HIV-Infektionen gebracht, so wurden *M. fermentans*, *M. pirum* und *M. penetrans* als Cofaktoren der Infektion diskutiert (Blanchard & Montagnier, 1994), für *M. penetrans* konnte eine Aktivierung verschiedener Funktionen des Immunsystems aufgezeigt werden (Blanchard, 1997).

Während Mycoplasmeninfektionen *in vivo* meist mit ausreichender Wirksamkeit mit Tetracyclinen oder mit Erythromycin behandelt werden, konnte eine erheblich höhere *in vitro*-Aktivität von Levofloxacin sowohl gegen *M. hominis* als auch gegen *U. urealyticum* nachgewiesen werden (Ullmann et al., 1999), was bei der zunehmenden Resistenzentwicklung gegen Erythromycin möglicherweise zukünftig von Bedeutung sein kann.

1.3 Oberflächenstrukturen von *Mycoplasma hominis*

Die Adhärenz an Wirtszellen stellt einen entscheidenden Schritt einer Infektion dar. Viele Prokaryonten vollziehen diesen Schritt über ihre Zellwand oder spezielle Zellausläufer. Die zellwandlosen Mycoplasmen besitzen z.T. spezielle Strukturen, die für die Zellanheftung unerlässlich sind. So besitzt *M. pneumoniae* eine „Anheftungs-Organelle“ („attachment organelle“) mit einem Proteinkomplex, dessen morphologische Alteration zu einer verminderten Zelladhärenz und damit zu einem Pathogenitätsverlust führen kann (Romero-Arroyo et al., 1999).

M. hominis hingegen besitzt keine definierte Anheftungsorganelle. Die Adhäsion an Wirtszellen kann somit nur über membranständige Strukturen erfolgen, deren Proteincharakter aufgrund der Sensibilität gegenüber proteolytischen Enzymen, Hitze und Formalin nahe lag (Razin, 1985). 1993 konnten aus unserem Labor zwei Oberflächenproteine des *M. hominis*-Isolates FBG als Zelladhäsine identifiziert werden: P50 und P100.

In einem Zell-ELISA konnte durch Vorinkubation von Mycoplasmen mit monoklonalen Antikörpern gegen ein 50 kDa-Membranprotein, P50, und gegen

P100, ein 100kDa-Membranprotein, die Mycoplasmenadhärenz an humane Cervixcarcinomzellen (HeLa-Zellen) signifikant verringert werden (Henrich et al., 1993). Beide Proteine wurden daraufhin affinitätschromatographisch aufgereinigt und in weiteren Adhärenzassays eingesetzt, wobei eine Vorinkubation mit dem entsprechenden monoklonalen Antikörper bei P50 zu einem vollständigen Verlust der Proteinbindung an die HeLa-Zellen führte. Der Einsatz von aufgereinigtem P50 zusammen mit Mycoplasmen im Zell-ELISA zeigte eine kompetitive Reduktion der Mycoplasmenadhärenz, so dass P50 als Adhäsion von *M. hominis* anzusehen war. Wurde P100 zusammen mit Mycoplasmen an HeLa-Zellen eingesetzt, resultierte eine geringere Unterdrückung der Zytadhärenz, woraus geschlossen werden konnte, dass P100 gegenüber P50 eine untergeordnete Rolle bei der Zellanheftung spielt (Henrich et al., 1993).

In den letzten Jahren konnte mehrfach gezeigt werden, dass P50 aufgrund genetischer Mechanismen ein Größen- und Antigen-variables Protein ist. Dies ist für seine Funktion als Adhärenzvermittler von großem Nutzen, um durch die Antigenvariation die Immunantwort des Wirtes zu umgehen und somit die Zellanheftung trotz vorhandener Antikörper des Wirtes sichern zu können (Zhang und Wise, 1996, 1997; Boesen et al., 1998; Henrich et al., 1998).

Für P100 konnte dargelegt werden, dass es neben seinen adhäsiven Eigenschaften als oligopeptidbindende Domäne eines Oligopeptid-Transportsystems bei *M. hominis* fungiert (Henrich et al., 1999).

Der Einsatz des monoklonalen Antikörpers (mAk) CG4 (gegen P60, ein speziesspezifisches 64kDa Oberflächenprotein, sowie der mAk BE4, LF8 und NB12, die ein 80kDa Membranprotein detektierten, führte im Zell-ELISA zu einer erheblich geringeren Inhibition der Mycoplasmenadhärenz. Dies spiegelt entweder ihre untergeordnete Rolle bei der Zellanheftung wider, oder ist durch die geringere Expressionsrate und Präsentation dieser Proteine auf der Zelloberfläche zu erklären. Die affinitätschromatographische Aufreinigung beider Proteine aus *M. hominis* gelang bislang nicht, da beide Proteine co-eluierten, was auf einen möglichen funktionellen Komplex beider Proteine hindeutete (Henrich et al., 1993).

1.4 Ziel der Arbeit

Da die Aufreinigung des nativen Proteins P60 aus der Mycoplasmenmembran in früheren Untersuchungen nicht gelang (vgl. Kap. 1.3), war P60 im Vorfeld rekombinant hergestellt worden. Dazu war die Sequenz des P60-Gens aus zwei Isolaten ermittelt worden (Berns, 1996). Um eine Expression in *E. coli* zu ermöglichen, wurde P60 als rekombinantes Fusionsprotein mit der Dihydrofolatreduktase (DHFR) und einem 6xHistidinrest (als rekombinantes Fusionsprotein P60* bezeichnet) in *E. coli* exprimiert (Weinhold, 1998). Der Einsatz dieses Fusionsproteins in Zell-ELISAs ließ aufgrund fehlender Nachweismethoden für den DHFR- und Histidinteil bislang keine eindeutige Interpretation zu, ob die beobachtete Adhärenz ausschließlich durch den P60-Anteil oder auch durch die Fusionspartner zustande kam.

Es war daher Ziel dieser Arbeit, das Adhärenzverhalten des nativen P60/P80-Komplexes aus *M. hominis* zu untersuchen. Die Ergebnisse sollten verglichen werden mit dem Adhärenzverhalten des bereits vorhandenen Fusionsproteins P60*, sowie dem Adhärenzverhalten eines weiteren, zeitgleich mit dieser Arbeit synthetisierten rekombinanten Proteins. Dieses Protein trägt neben dem P60-Anteil nur eine Membranverankerungs-Signalsequenz und somit keine potentiell interferierenden Fremdproteine und wird im folgenden als P60^r bezeichnet. Aus der Beobachtung der Adhärenz dieser drei Proteine bzw. des Proteinkomplexes sollte die Frage beantwortet werden, ob das in Größe und Antigenität konservierte P60-Protein zu der Adhärenz von *Mycoplasma hominis* beiträgt.

2. Materialien

2.1 Chemikalien

6-Aminohexan	Merck-Schuchart
Ampicillin	Roche
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Arginin (L-Arginin)	Merck
β -Mercaptoethanol	Merck
Bromphenolblau	Merck
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma
DMEM (Dulbecco's Mod. Eagle Medium)	Gibco BRL
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck
Eisessig	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
FCS (Fetal-Calf-Serum)	Roche
HCl	Merck
Glyzerin	Merck
IPTG (Isopropyl- β -Thiogalactopyranosid)	Roche
Kanamycin	Serva
KH_2PO_4	Merck
LB-Broth-Medium	Gibco BRL
Luminol (ECL)	Amersham LIFE SCIENCE
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Merck
Milchpulver (Skim Milk Powder)	Oxoid
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumphosphat	Merck
Natriumthiocyanat	Merck
NP-40 (Igepal CA-630)	Sigma
OPD (O-Phenylendiamin)	Sigma
Pefabloc SC	Roche

Pferdeserum	Gibco
Phenolrot	Merck
Phosphorsäure	Merck
PPLO-Broth	Difco
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva
Sucrose (Fructose)	Merck
TEMED (<u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min)	Merck
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck

2.2 Enzyme

DNase I (100 U/ml)	Roche
Lysozym (48 U/mg)	Sigma
RNAse A (50 U/ml)	Pharmacia Biotech

2.3 E. coli-Bakterienstämme und Plasmide

DH5 α F'	Life Technologies
DH5 α F'IQ	Life Technologies
M15	Qiagen
Klon 3.2 (P60*: kodierender Bereich des reifen P60 in Fusion mit der DHFR im Vektor pQE-41 (Qiagen))	(Weinhold, 1998)
Klon MA2 (P60 ^r : kodierender Bereich des P60-Vorläufers im Vektor pQE-60 (Qiagen))	(Institut für Med. Mikrobiologie, HHU)

2.4 Puffer und Stammlösungen

Anodenpuffer I	30 mM Tris Base 20% (v/v) Methanol
Anodenpuffer II	300 mM Tris Base

	20% (v/v) Methanol
Argininmedium	2,1% (w/v) PPLO-Broth 10% (v/v) hitzeinaktiviertes Pferdeserum 0,002% (w/v) Phenolrot 1% (w/v) L-Arginin pH 6,5
Bradford-Proteinreagenz	0,07% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 32% Ethanol 57% Phosphorsäure
Kathodenpuffer	25 mM Tris Base 40 mM 6-Aminohexansäure 20 % (v/v) Methanol
PBS-Puffer	137 mM NaCl 4,6 mM Na ₂ PO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
Sonication-Puffer	50 mM Na-Phosphat 300 mM NaCl pH 8,0
SDS-PAGE Probenpuffer	5% β-Mercaptoethanol 10% SDS 0,1% Bromphenolblau 25% Glyzerin 0,4 M Tris/HCl, pH 6.8
Wash-Puffer	50 mM Na-Phosphat, pH 6,0

300 mM NaCl
10% (v/v) Glyzerin

2.5 Membranen, Säulenmatrizes, Säulen

Ni-NTA
Nitrozellulose-Membran 0,45 µm
PD-10-Säule (Material: Sephadex G-25 M)

Qiagen
Schleicher und Schüll
Pharmacia Biotech

2.6 Molekulargewichtsmarker

M1: SDS-PAGE-Standards, Low Range
97,4 kDa Phosphorylase B
66,2 kDa Serumalbumin
45,0 kDa Ovalbumin
31,0 kDa Carboanhydrase
21,5 kDa Sojabohnen Trypsin-Inhibitor
14,4 kDa Lysozym

Biorad

M2: Prestained SDS-PAGE-Standards,
Low Range
104,0 kDa Phosphorylase B
80,0 kDa Bovines Serum Albumin
46,9 kDa Ovalbumin
33,5 kDa Carboanhydrase
28,3 kDa Sojabohnen Trypsin-Inhibitor
19,8 kDa Lysozym

Biorad

3. Methoden

3.1 Bakteriologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von *Mycoplasma hominis*

Bei -70°C gelagerte Gefrierkulturen von *M. hominis* wurden langsam auf Eis aufgetaut und in 1:10-Verdünnungsschritten bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} in sterilem Arginin-Medium ausverdünnt. Die Kulturen wurden bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase bei 37°C anaerob bebrütet. Der Beginn dieser Phase war durch das Umschlagen des Farbindikators von Gelb nach Rot angezeigt, wobei eine leichte Trübung des Kulturmediums auftrat.

Für ELISA-Tests wurden Mycoplasmen direkt aus der in logarithmischem Wachstum befindlichen Flüssigkultur verwendet, jedoch nicht aus der ersten Verdünnungsstufe, um Testinterferenzen durch nicht vitale Mycoplasmen, die noch der Gefrierkultur entstammen, zu vermeiden.

3.1.2 Kultivierung von *E.coli*

Die zur heterologen Proteinexpression verwendeten *E. coli*-Stämme M15 und DH5 α F'IQ wurden in LB-Flüssigmedium kultiviert.

Zur Anzucht wurden 20 μl Bakteriensuspension eines zuvor langsam auf Eis aufgetauten Glycerinstocks in 10 ml LB-Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 10 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin bei den verwendeten Klonen 3.2 und pQE-41 (die eine Kanamycin-Resistenz über das pQE-41-Plasmid besitzen) oder 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin bei Expression des Klons MA2 ohne Kanamycin-Resistenz überimpft.

Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

Zur Herstellung eines Glycerinstocks wurden die entsprechenden Bakterienkulturen mit Glycerin versetzt ($C_{\text{end}}=20\%$ (v/v)) und bei -20°C gelagert.

3.1.3 Keimzahlbestimmung

Die Keimzahlbestimmung der in den ELISA eingesetzten Mycoplasmenisolate erfolgte nach dem Prinzip der „Color Changing Units“ (CCU).

Auf einer sterilen 96-well-Microtiterplatte wurden Mycoplasmen in einer Vierfachbestimmung in 10er-Schritten in sterilem Arginin-Medium ausverdünnt.

Die Platte wurde mit einer speziellen Folie abgedichtet und bis zu 7 Tagen in einer feuchten Kammer anaerob bei 37°C bebrütet. Nach Ablauf dieser Zeit wurde abgelesen, bei welcher Verdünnungsstufe noch ein Mycoplasmen-Wachstum stattgefunden hat, d.h. noch ein Farbumschlag zu beobachten war.

Unter der Annahme, dass sich in dieser letzten bewachsenen Kultur bei Einsaat ein Keim befunden hatte, wurde hieraus die Keimzahl der Ausgangskultur berechnet und der Mittelwert der Vierfachbestimmung als Keimzahl der unverdünnten Flüssigkultur angegeben.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Um zu vermeiden, dass das heterolog exprimierte Protein während des *E. coli*-Wachstums degradiert wird, wurden hauptsächlich Expressionssysteme eingesetzt, deren Proteinproduktion über IPTG induzierbar war.

Zur Expression und Aufreinigung größerer Mengen Protein wurden 10 ml-Kulturen, die über Nacht gewachsen waren, in jeweils 2 l LB-Medium mit Ampicillin (Klon MA2) oder Ampicillin/Kanamycin (Klone 3.2 und pQE-41, vgl. Kap. 3.1.2), überimpft und ca. 5 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert bis die optische Dichte der Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm zwischen 0,4 und 0,6 lag. Bei entsprechender Dichte der Kultur wurde nun IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt und für weitere 60 bis 180 min kultiviert. Danach wurde die Bakteriensuspension 20 min bei 5000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und das Bakteriensediment auf Eis in 20 ml kaltem PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (20 min bei 5000 x g, 4°C) und Abgießen des Überstands wurden die pelletierten Bakterien bis zur Proteinaufreinigung bei -70°C gelagert.

3.2.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung von Proteinen aus *M. hominis*

Lysat von *M. hominis* Isolat FBG (3 mg/ml) wurde mit dem zwanzigfachen Überschuss (w/v) Nonident-P40 (NP-40) versetzt und mit PBS auf eine Proteinkonzentration von 2 mg/ml verdünnt. Die Probe wurde nach 30 min Inkubation im Wasserbad bei 37°C anschließend 15 min bei 10000 x g zentrifugiert.

Der Überstand wurde anschließend mit PBS auf 0,5% NP-40 verdünnt und bei RT 90 min mit Sepharose-gekoppeltem CG4-Antikörper bei langsamer Rotation inkubiert, der zuvor mit 0,5% NP40-haltigem (w/v) PBS-Puffer equilibriert worden war. Nach Überführung des Sepharose-gekoppelten CG4 in eine Säule und Auffangen des Durchlaufs zur späteren Analyse wurde die Säulenmatrix mit 50 ml PBS-0,2% NP40 (w/v) gewaschen.

Die Elution der CG4-gebundenen Proteine erfolgte in 3 M Natriumthiocyanat-0,2 % NP40 (w/v) in PBS, wobei 7 Fraktionen zu je 2 ml, die jeweils einem Säulenvolumen entsprachen, gesammelt wurden.

Nach gelelektrophoretischer Analyse von je 20 µl der Eluate wurden die proteinhaltigen Eluate über eine PD-10-Säule nach Vorschrift des Herstellers in PBS umgepuffert. Es blieb zu beachten, dass die Probe anschließend nicht detergentfrei sein konnte, da NP-40 aufgrund der stabilen Mizellenbildung in nur sehr geringem Maße durch Dialysieren entfernbar ist.

3.2.3 Aufreinigung Histidin-tragender rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Die Aufreinigung des Fusionsproteins P60+DHFR (P60*, mittels Klon 3.2) bzw. der DHFR (mittels pQE-41) als Negativkontrolle aus *E. coli* erfolgte in Anlehnung an das Protokoll zur nativen Aufreinigung von Proteinen aus dem Handbuch der Firma Qiagen (*The QIAexpressionist*, Third Edition, March 1997) wie folgt:

Das Sediment aus 250 ml *E. coli*-Flüssigkultur des jeweiligen Klons (vgl. Kap. 3.2.1) wurde vorsichtig auf Eis aufgetaut, in 10 ml Sonication-Puffer resuspendiert (Zusammensetzung siehe Kap. 2.4) und mit 150 µl Lysozym (100 mg/ml) versetzt. Nach 45 min Inkubation auf Eis wurde der nun zähflüssig gewordenen Suspension 30 µl DNase I und 5 µl RNase A hinzugefügt und zur nukleolytischen Verdauung weitere 30 min inkubiert, woraufhin die Lösung wieder dünnflüssig wurde.

Die Probe wurde 10 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der die löslichen Proteine enthaltende Überstand abgenommen und 60 min bei 4°C auf dem Drehrad mit 600 µl vorher mit Sonication-Puffer equilibriertem Ni-NTA-Material inkubiert. Die Ni-NTA-Suspension wurde dann in eine von der Firma Qiagen mitgelieferte Säule überführt, in der das Ni-NTA-Material über eine Fritte zurückgehalten wurde. Der Durchlauf wurde aufgefangen. Das proteingebundene Ni-NTA wurde nun mit dem 5- bis 10fachen Säulenvolumen Sonication-Puffer gewaschen, dabei wurde die optische Dichte (OD) bei 280 nm kontrolliert: Nach weitestgehender Entfernung von kontaminierenden Fremdproteinen sollte dieser Wert unter 0,01 OD liegen. Zum Erreichen dieses Wertes wurden durchschnittlich 7 bis 10 ml Sonication-Puffer benötigt. Anschließend wurde der Waschvorgang mit Wash-Puffer wiederholt, bis auch hier die Extinktion des Durchflusses unter 0,01 OD lag. Das dazu benötigte Volumen lag ebenfalls im Bereich von 7 bis 10 ml. Die Elution der histidintragenden Proteine erfolgte durch ein Absenken des pH-Wertes des Wash-Puffers. Hierfür wurde Wash-Puffer auf die pH-Werte 5,5; 4,5 und 3,5 eingestellt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte durch Zugabe von zweimal je einem Säulenvolumen Puffer des entsprechenden Wertes, wobei die Eluate einzeln aufgefangen wurden. Die maximale Elution des rekombinanten Proteins erfolgte bei pH 4,5. Die Eluate sowie die Proben, die bei den Zwischenschritten entnommen worden waren, wurden anschließend einer Gelelektrophorese und eines Immunoblots unterzogen (s.u.), die proteinhaltigen Eluate auf pH 7 titriert und bei -70°C gelagert.

3.2.4 Affinitätschromatographische Aufreinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Das rekombinante P60^r aus dem Klon MA2 wurde analog zum rekombinanten P60* (P60+DHFR) aus *E. coli* gewonnen (vgl. Kap. 3.2.3), da es, trotz der N-terminalen Membranverankerungs-Signalsequenz, zum großen Teil in gelöster Form im Zytosol vorlag. Die Aufreinigung aus dem Zytosol erfolgte affinitätschromatographisch über den Sepharose-gekoppelten CG4-Antikörper, wie für das native P60-Protein aus *M. hominis* in Kap. 3.2.2 beschrieben, wobei der Probe kein NP-40 zugefügt werden musste, da das zytoplasmatische P60^r keinen Lipidanker tragen sollte. Um das Ausmaß einer Proteindegradation während der Aufreinigung bestimmen zu können,

wurde eine Hälfte des Probenvolumens mit dem Proteaseinhibitor Pefabloc SC versetzt (0,5 mg/ml), die andere Hälfte wurde als Kontrolle ohne Zusätze aufgereinigt.

Die Bindung an die CG4-Sepharose erfolgte wiederum im sog. „Batch“-Verfahren (vgl. Kap. 3.2.2.). Unspezifisch gebundene Fremdproteine wurden durch Waschen mit 100 ml PBS entfernt. Auch die Elution verlief analog der Aufreinigung des nativen P60-Proteins aus *M. hominis*. Dem Elutionspuffer war ebenfalls kein NP-40 zugesetzt, so dass nach Umpuffern der Eluate keine Detergenzien enthalten waren.

3.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierten Bedingungen

Die Analyse von Proteinproben erfolgte nach der Methode von Laemmli (1970). Nach 5 min Denaturierung der Proteine in SDS-Probenauftragspuffer bei 95°C wurden die Proben in einem 12%-Polyacrylamidgel, welches 0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS) enthielt, über Nacht bei einer angelegten Spannung von 40 V aufgetrennt. Entweder wurden die bandierten Proteine im Gel mit Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung gefärbt, oder für einen Western-Blot auf Nitrozellulose-Membran transferiert.

Die Färbung (0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250, 10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol) erfolgte für 4 h schüttelnd, der proteinfreie Hintergrund des Gels wurde durch Schwenken des Gels in mehrfach erneuerter Entfärbelösung (7% (v/v) Essigsäure, 5% (v/v) Methanol) entfärbt.

Anschließend wurden die Gele auf Whatman-Papier in einem kommerziellen Geltrockner getrocknet.

3.2.6 Western-Blot und Immunfärbung

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte in einer Semitrockenblotkammer (Phase, Mölln) für 40 min bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² (Towbin et al., 1979, modifiziert durch Burnette, 1981). Zur Immunfärbung der Proteinbanden wurde die Membran zuerst für 30 min in

5 % (w/v) Milchpulver in PBS inkubiert, um die proteinfreien Bindungsstellen der Nitrozellulose zu blockieren. Die Membran wurde für 60 min in einer 1:2-verdünnten CG4-Antikörperlösung in 1% (w/v) Milchpulver inkubiert und anschließend dreimal für 5 min in PBS gewaschen. Gebundener CG4-Antikörper wurde durch eine 60 min Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppelten Ziege-Anti-Maus-Antikörper (1:5000 in 1% Milchpulver/PBS) markiert und nach erneutem Waschen mit PBS durch Zugabe von Luminol und Belichtung eines Röntgenfilms nach Angaben des Herstellers sichtbar gemacht. Alle Schritte der Immunfärbung wurden bei RT durchgeführt.

3.2.7 Osmotische Lyse und Separation von Membran- und zytoplasmatischen Proteinen

Die Firma Qiagen bietet in dem Handbuch „QIAexpress“ Protokolle an, mit deren Hilfe die Lokalisation des im *E. coli* exprimierten Fremdproteins innerhalb der Zelle bestimmt werden kann.

Hierbei wird eine Methode beschrieben zur Unterscheidung von membranständigen oder zytoplasmatischen Proteinen, wobei letztere als löslich oder unlöslich identifiziert werden können. Eine zweite Methode dient zur Identifizierung periplasmatischer Proteine. Nach dem verwendeten Qiagen-Protokoll wurden der das rekombinante P60^r exprimierende *E. coli* DH5 α F' in 10 ml Kultur bei 37°C schüttelnd über Nacht angezogen. Die Kultur wurde in 2x 5 ml aufgeteilt und je 10 min bei 4000 x g zentrifugiert. Ein Pellet wurde in 500 μ l Sonication-Puffer resuspendiert, davon eine 20 μ l Probe für die gelelektrophoretische Auftrennung abgenommen und die Suspension in Trockeneis/Ethanol eingefroren und in kaltem H₂O wieder aufgetaut, um die Zellen zu lysieren. Nach weiterer Zentrifugation (10000 x g, 10 min) befand sich das im Zytoplasma löslich vorliegende Protein im Überstand, von dem eine weitere Probe entsprechend dem Ausgangsvolumen genommen wurde (Extrakt A). Das Sediment, das in 500 μ l Sonication-Puffer resuspendiert wurde, beinhaltete unlösliches, zytoplasmatisches Protein, Membranbestandteile sowie unlysierte Bakterien (Extrakt B).

Zur Bestimmung der periplasmatischen Proteine wurde das zweite Pellet der ursprünglichen 10 ml Kultur in 900 μ l Sucrozelösung (30 mM Tris/HCl, 20% Sucrose, pH 8,0) resuspendiert, auf 1mM EDTA gebracht und 10 min bei RT schüttelnd

inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation (8000 x g, 4°C), anschließendem Resuspendieren des Sediments in 900 µl kaltem 5 mM Magnesiumsulfat und Inkubation in einem Eis/Wasserbad (10 min, schüttelnd), wurde wiederum 10 min bei 8000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die periplasmatischen Proteine (Extrakt C).

3.2.8 ELISA (Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay)

3.2.8.1 Adhärenzassay

Nach Anzucht und Fixierung von ca. 10^6 HeLa-Zellen je Vertiefung einer sterilen 96-Well-Microtiterplatte (Immunosorb, Fa. Nunc) wurden zum Absättigen des nicht zellbesetzten Plastikmaterials zunächst 200µl des Mediums DMEM+1% (v/v) FCS je Vertiefung auf die Platte gegeben und 60 min bei 37°C inkubiert.

Das auf seine adhäsiven Eigenschaften zu testende rekombinante Protein wurde anschließend in einer Mehrfachbestimmung in verschiedenen Verdünnungsstufen in DMEM bei jeweils gleichen 100 µl Volumen/Vertiefung auf die HeLa-Zellen gegeben und 2 h bei 37°C inkubiert. Die Proteinkonzentration lag zwischen 0,25 µg und 0,016 ng P60/10⁶ HeLa-Zellen, die Verdünnung erfolgte in 5er-Schritten. Als Negativkontrollen wurden Ansätze ohne Proteinzugabe mit DMEM als Trägersubstanz durchgeführt. Der Nachweis zellgebundener Proteine erfolgte nach mehrmaligem Waschen der Proben mit PBS durch zweistündige Inkubation des Ansatzes bei 37°C mit dem P60-spezifischen monoklonalen Antikörper CG4, bei Einsatz von nativem P60/P80-Gemisch mit den mAk CG4 oder NB12 (Anti-P80) oder mit beiden Antikörper CG4 + NB12. Die gebundenen Antikörper wurden nach mehrmaligem Waschen der Vertiefungen mit DMEM eine weitere Stunde mit 100 µl eines 1:5000 verdünnten, Peroxidase-gekoppelten Ziege-Anti-Maus-Antikörpers bei 37°C inkubiert. Dieser wurde nach nochmaligem Waschen der Proben mit PBS durch Peroxidase-vermittelten Umsatz von 100 µl Orthophenyldiamin-Lösung (OPD) je Vertiefung nach Stoppen der Reaktion mit 1M HCl photometrisch bei 492 nm nachgewiesen.

3.2.8.2 Inhibitionsassay

Der Inhibitionsassay entsprach in den meisten Schritten dem in Kap. 3.2.8.1 beschriebenen Adhärenzassay. Die Differenz zum Adhärenztest bestand darin, dass das Protein in den oben angeführten verschiedenen Verdünnungsstufen vor Zugabe auf die HeLa-Zellen für 2 h mit den spezifischen monoklonalen Antikörpern vorinkubiert wurde. Diese Protein-Antikörper-Lösung wurde anschließend auf die HeLa-Zellen gegeben und bei 37°C 2 h inkubiert. Der Nachweis des mAk-gebundenen Proteins erfolgte wie im Adhärenzassay durch photometrische Messung des OPD-Umsatzes.

3.2.8.3 Kompetitionsassay

Auch der Aufbau des Kompetitions-ELISA entsprach größtenteils dem des bereits beschriebenen Adhärenzassays (vgl. Kap. 3.2.8.1).

Nach 60 min Absättigen der freien Bindungsstellen des Kunststoffmaterials mit 200 µl DMEM+1% (v/v) FCS je Vertiefung wurden in logarithmischem Wachstum befindliche *M. hominis*-Isolate in 5er-Verdünnungsstufen bei stets gleichem Volumen von 100 µl auf HeLa-Zellen gegeben. In einer „Schachbretttitration“ wurde bei jeder Mycoplasmenverdünnungsstufe Protein mit der höchsten Konzentration von 1,5 µg/Vertiefung (1,8 µg bei P60+DHFR, 0,6 µg bei DHFR) in 5er-Schritten ausverdünnt, so dass jede Mycoplasmenverdünnungsstufe mit jeder Proteinverdünnungsstufe angesetzt wurde. Anschließend wurden die Platten 2 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurde in einzelnen Ansätzen die Mycoplasmenadhärenz ohne Proteinzugabe getestet, bei Einsatz des rekombinanten Proteins P60+DHFR wurde als Negativkontrolle nur DHFR ohne P60-Anteil eingesetzt. Der Nachweis der Competition erfolgte ausschließlich über die Detektion der HeLa-Zell-gebundenen Mycoplasmen durch die spezifischen Antikörper DC10, LG3 (Anti-P100), NB12, LF8 (Anti-P80), je nach eingesetzter Proteinprobe, so dass nur die Mycoplasmen und nicht die zugesetzten Proteine nachgewiesen wurden. Die Antikörper wurden unverdünnt aus Hybridomzellüberstand (100 µl je Vertiefung; ca 5-10 µg mAk/ml) eingesetzt und 2 h bei 37°C inkubiert. Der Nachweis der mAk-markierten, HeLa-Zell-

gebundenen Mycoplasmen und die photometrische Auswertung erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.8.4 Membranpräparation

Zur Membranpräparation nach osmotischer Lyse wurde Mycoplasmenlysate mittels Bradford-Bestimmung auf seinen Proteingehalt hin untersucht. Die Lysate wurden, mit je 200 µl ¼ PBS (entsprechend einem Teil PBS mit drei Teilen A. dest.) versetzt, in je 10 ml autoklaviertes A. dest. aufgenommen und 45 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Proben wurden anschließend 30 min bei 4 °C mit 34.000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Die sedimentierten Membranbestandteile wurden in 10 ml A. dest. resuspendiert und parallel mit dem Überstand der ersten Zentrifugation, entsprechend der Zytoplasmafraktion) erneut zentrifugiert. Die Zytoplasmafraktion wurde mittels Vakuumzentrifugation auf eine relative Proteinkonzentration von 2 µg/µl, bezogen auf die Ausgangsmenge, gebracht, die Pellets der Membranfraktion wurden mit A. dest. so resuspendiert, dass ebenfalls eine relative Konzentration von 2 µg/µl resultierte.

Alle Proben, d.h. Gesamtlysate, Membranfraktion und Zytoplasmafraktion, wurden mit PBS auf eine Konzentration von 8 µg in 20 µl gebracht und mit je 5 µl 5-fach-Probenpuffer versetzt auf einem 9,5%-SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und entweder Coomassie gefärbt oder auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Immunfärbung erfolgte mit den P100-spezifischen Antikörpern DC10, LG3 und BG11, dem P80-spezifischen mAk NB12, dem mAk CG4 (P60), dem mAk KD2 (EF-Tu), sowie mit einem im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität hergestellten polyklonalen Kaninchenserum, das das Membranprotein P50 markiert.

4. Ergebnisse

Am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wird schon seit einigen Jahren an der Charakterisierung von Oberflächenstrukturen bei *Mycoplasma hominis* gearbeitet.

Die Rolle eines speziesspezifischen 60 kDa-Lipoproteins von *M. hominis* in der Adhärenzvermittlung konnte zu Beginn der hier vorgestellten Arbeiten nicht eindeutig interpretiert werden. Auch der Versuch einer affinitätschromatographischen Aufreinigung des Proteins gelang nur unzureichend, da P60 mit P80, einem weiteren Oberflächenprotein, co-eluierte und somit eine getrennte Beurteilung der Adhärenzeigenschaften beider Proteine verhinderte.

Die dieser Dissertation zugrundeliegenden Arbeiten basieren u.a. auf folgenden Vorarbeiten, deren letzte die Expression eines rekombinanten P60-Fusionsproteins in *E. coli* beschreibt:

Die Gen-, sowie die abzuleitende Proteinsequenz von P60 waren aus zwei *M. hominis*-Stämmen vollständig entschlüsselt worden (Berns, 1996).

Um die heterologe Expression in *E. coli* zu ermöglichen, wurden die in Mycoplasmen für Tryptophan codierenden TGA-Codons in TGG-Codons umgeschrieben, um auch in *E. coli* eine Vollängenexpression zu gewährleisten. Das rekombinante P60 wurde letztendlich als Fusionsprotein des P60-Gens mit der Dihydrofolatreduktase (DHFR) und 6 Histidinen als Fusionspartner, bezeichnet als P60*, exprimiert.

Aufgrund fehlender Nachweismethoden für die reine DHFR und den Histidinbereich konnten bis zum Beginn der hier beschriebenen Arbeiten keine eindeutigen Aussagen über das Adhärenzverhalten des P60-Anteils im P60*-Fusionspeptid getroffen werden (Weinhold, 1998).

4.1 Charakterisierung des nativen P60/P80-Komplexes aus *M. hominis*

Bevor weitere Untersuchungen zum Adhärenzverhalten des rekombinanten P60* durchgeführt wurden, sollten die adhäsiven Eigenschaften des nativen P60-Proteins aus *M. hominis* charakterisiert werden.

4.1.1 Affinitätschromatographische Aufreinigung

Wie oben beschrieben, gelang die affinitätschromatographische Aufreinigung nur insofern, als dass bei „herkömmlicher“ Proteinisolierung P60 und P80 co-eluiert wurden. Dies führte zu der Annahme, dass beide Proteine einen Komplex bilden, eine Theorie, die Gegenstand weiterer Untersuchungen in der Mycoplasmen-Arbeitsgruppe am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität war und kürzlich bestätigt werden konnte (Kitzerow und Henrich, 2001). Der aus der Mycoplasmenmembran aufgereinigte P60/P80-Proteinkomplex wurde bisher nicht in Zell-ELISAs eingesetzt, so dass im Rahmen meiner Arbeiten auch Untersuchungen mit dem P60/P80-Proteinkomplex durchgeführt werden sollten, um die Ergebnisse im Rahmen der Untersuchungen mit dem rekombinanten Fusionsprotein P60* vergleichend bewerten zu können.

Das Detergenz NP-40 (Nonident-P40, Igepal) war zwar nur in sehr geringem Maße durch Dialyse aus den Proteinpräparationen zu entfernen, jedoch zeigte sich zum damaligen Zeitpunkt kein anderes Detergenz geeignet zur Aufreinigung von P60 und P80, und hatte bis dato auch zu keinen artifiziellen Ergebnissen geführt (Henrich et al., 1993). So wurde, wie in Abschnitt 3.2.2 beschrieben, eine einstufige Affinitätschromatographie mit Sepharose-gekoppeltem CG4-Antikörper durchgeführt.

Wie aus Abbildung 1 deutlich wird, gelang es, den nativen Proteinkomplex P60/P80 aufzureinigen, allerdings ist zu vermerken, dass dies gemessen am eingesetzten Protein, mit nur relativ geringer Ausbeute gelang. Dies deckte sich mit der Beobachtung, dass ein Großteil des Proteins nach Solubilisierung des Mycoplasmenlysats mit NP40 nicht gelöst vorlag (Abb. 1, Spur 3) und auch nicht alles im Überstand befindliche Protein an das Säulenmaterial gebunden hatte (Abb. 1, Spur 5). Innerhalb der ersten 6 ml der Elution wurde die höchste Proteinkonzentration erzielt. Im Western-Blot ist gut zu erkennen, dass die aufgereinigten Proteine einer Degradation unterworfen sind. Insgesamt konnte genug von dem nativen P60/P80-Proteinkomplex isoliert werden, um ihn in Zell-ELISAs einsetzen und auf seinen adhäsiven Charakter hin überprüfen zu können.

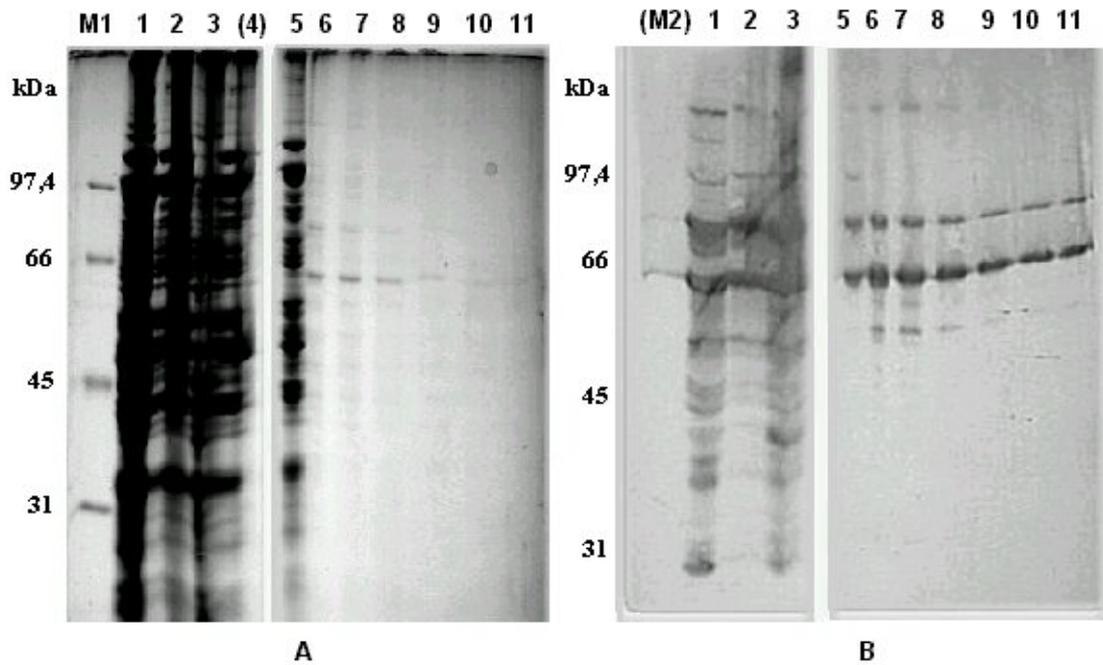


Abb. 1: Affinitätschromatographische Aufreinigung des nativen P60/P80 Komplexes aus Lysat von *Mycoplasma hominis* FBG

Abb. **1A**: Coomassiegefärbtes 12%-SDS-Gel, Abb. **1B**: Immunfärbung mit den mAk CG4 (P60) und NB12 (P80). Es wurden entsprechend des in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Aufreinigungsverfahrens zu verschiedenen Zeitpunkten jeweils 50 µl Probevolumen von unterschiedlichen Gesamtvolumina genommen, mit 10 µl 5xProbenpuffer versetzt und davon nach Denaturieren 20 µl je Spur aufgetragen. Spur 1: FBG-Lysat, Spur 2: Überstand nach Solubilisierung mit NP-40, Spur 3: NP40-unlösliches Protein, Spur 5: Durchlauf der CG4-gekoppelten Säule. In Spur 6-11: Eluate. M1: LMWM (Biorad); M2: Prestained-LMWM (Biorad)

4.1.2 Adhärenzverhalten von P60/P80

Die aufgereinigten P60/P80-Proben wurden gegen PBS dialysiert und sowohl in Adhärenz und Inhibitionstests als auch in Kompetitionsassays eingesetzt, um ihre zytadhäsiven Eigenschaften bestimmen zu können. Spätere Untersuchungen zeigten, dass die Proteine aufgrund der hohen Ionenstärke des Elutionspuffers, der in der Affinitätschromatographie benutzt wurde, auch nach Dialyse gegen PBS nur zu einem geringen Anteil komplexiert vorlagen.

Abbildung 2 zeigt die graphische Auswertung eines repräsentativen Adhärenz- und Inhibitionstests, der mit dem aufgereinigtem P60/P80-Gemisch durchgeführt wurde. P60/P80 wurde dabei im Adhärenztest in steigenden Konzentrationen zu HeLa-Zellen gegeben, im Inhibitionstest wurde das Proteingemisch für dieselbe Zeit mit

entweder dem P60-spezifischen Antikörper CG4, dem Anti-P80-Antikörper NB12 oder einem Gemisch aus beiden Antikörpern vorinkubiert und auf die HeLa-Zellen gegeben. Im Adhärenztest wurden die entsprechenden mAk nach der Proteininkubation und einem folgenden Waschschrift auf die HeLa-Zellen gegeben. Die höchste eingesetzte Proteinkonzentration betrug bei beiden Tests 250 ng Proteingemisch pro 10^6 HeLa-Zellen, die Verdünnung erfolgte in 1:5-Schritten. Die monoklonalen Ak wurden stets im Überschuß eingesetzt, um Unterschiede aufgrund mangelnder Antikörperkonzentration zu vermeiden. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz ohne Zugabe des Proteingemisches mitgeführt, bei dem lediglich Puffer (DMEM + 1% FCS) eingesetzt wurde.

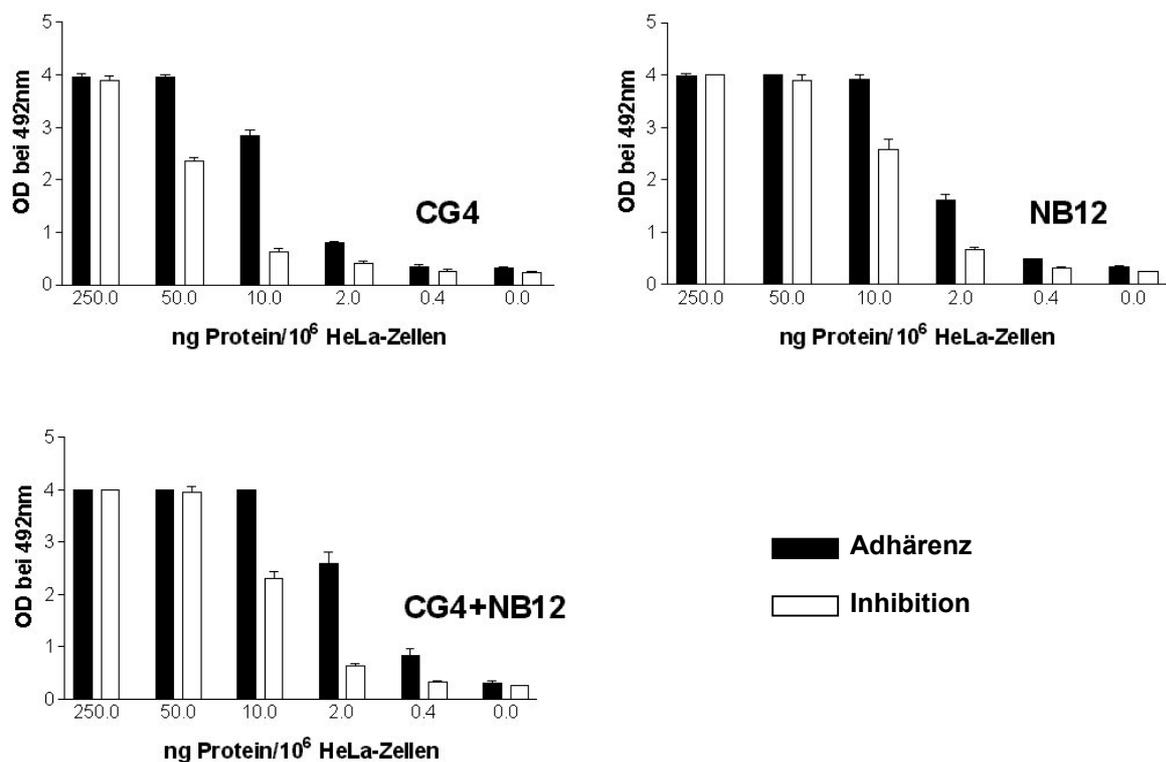


Abb. 2: Adhärenz- und Inhibitionstests mit aufgereinigtem P60/P80

Die Vorinkubation, bzw. der Nachweis erfolgte durch den Einsatz unverdünnter Antikörperlösung (ca. 10µg mAk/ml). Der Nachweis der zytadhäsiven Proteine erfolgte mit dem P60-spezifischen mAk CG4, dem P80-spezifischen mAk NB12 und einer Mischung beider mAk. Die Standardabweichung entspricht der Schwankungsbreite von vier Einzelmessungen.

Wie aus Abbildung 2 zu erkennen ist, adhärierte das P60/P80-Proteingemisch an HeLa-Zellen, wobei eine Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge deutlich wird. In den höheren Proteinkonzentrationen (ab 10 ng Protein/10⁶ Zellen) trat ein

Sättigungszustand ein, d.h. eine höhere Proteinkonzentration führte zu keiner höheren Adhärenz. Bei Vorinkubation mit dem Antikörper CG4 fand zwischen 2 ng und 50 ng Protein eine deutliche Minderung der Adhärenz statt. Durch Vorinkubation des Proteingemisches mit dem P60-spezifischen mAk CG4 konnte die Adhärenz um 48% (2 ng Protein) bis 78% (10 ng Protein) des ohne Vorinkubation gemessenen Wertes vermindert werden. Die Abnahme der gemessenen Extinktionen war bei Vorinkubation mit dem P80-spezifischen mAk NB12 geringer. Hier war eine Abnahme zwischen 3% und 59% zu beobachten. Bei Einsatz beider Antikörper nahm die Adhärenz um einen Wert von 1% bis 76% ab. Ab 0,4 ng unterschieden sich Adhärenz und Inhibition nicht mehr signifikant von dem Leerwert ohne Proteineinsatz.

Bei der höchsten P60/P80-Konzentration von 250 ng fand sich keine nennenswerte Minderung der Adhärenz durch Vorinkubation des Proteins mit dem P60-spezifischen mAk CG4, was dadurch bedingt sein könnte, dass die AK-Konzentration nicht hoch genug war, um alle Bindungsstellen des Proteins abzusättigen. Ähnlich verhielt es sich bei Einsatz des P80-spezifischen Antikörpers NB12, sowie des Gemisches beider Antikörper. Es fällt auf, dass die Reduktion der Adhärenz bei Vorinkubation mit CG4 am größten war, was auf einen größeren Beitrag des P60 Proteins an der Zytadhärenzvermittlung schließen ließ. Ein geringerer Einfluß fand sich bei NB12, die Adhärenzverminderung in Gegenwart beider Antikörper lag, wie durch die resultierende Verdünnung der jeweiligen Antikörper zu erwarten war, im Bereich zwischen den Messungen der einzelnen Antikörpern.

Nachdem das zytadhäsive Verhalten des nativen P60/P80 Proteingemisches gezeigt war, sollte das P60/P80-Proteingemisch aus der gleichen Aufreinigung zur kompetitiven Inhibition verschiedener *M. hominis* Isolate eingesetzt werden (vgl. Kap. 3.2.7.3).

4.2 Auswahl verschiedener Mycoplasmenisolate

Die Auswahl der in die Competitionstests einzusetzenden Mycoplasmen erfolgte aufgrund der unterschiedlichen Expression von P50-Varianten. Eine Theorie war, dass im *M. hominis* Isolat FBG die postulierte P60-vermittelte Mycoplasmenadhärenz vom Effekt des stärker exprimierten P50 Proteins überdeckt sein könnte. Verglichen

werden konnte zwischen Isolaten, wie sie der FBG-Stamm darstellt, der stets nachweisbares membranständiges P50 exprimiert und P50-Mangelmutanten wie dem Isolat 2539, das kein antigenes P50 aufweist (siehe Abb. 3) und aufgrund einer Punktmutation im N-terminal codierenden P50-Genbereich auch nicht exprimiert. Weitere Isolate, die andere P50-Varianten exprimierten, wie die Isolate 6876 und 8958, sollten ebenfalls untersucht werden, hier zeigte in vielen Fällen erst die Sequenzierung des Gens den Variantenreichtum des P50-Adhäsins (siehe Abb. 4). Das P50-Adhäsins konnte mit dem eingesetzten Kaninchenserum nur bei Isolat FBG nachgewiesen werden.

Die durchgeführte osmotische Lyse und Membranpräparation der verschiedenen *M. hominis* Isolate zeigte, dass P80 und P60 bei allen getesteten Isolaten stets nachweisbar waren und sich in der Membranfraktion befanden.

Abbildung 3 zeigt die Präparation verschiedener Isolate und Auftrennung in Gesamtlysat, Membran- und Zytoplasmafraktion mit anschließender Coomassie-, sowie Immunfärbung.

Zu erkennen ist, dass bei allen getesteten Isolaten im Gesamtlysat und in der Membranfraktion P60 und P80 nachweisbar waren (Abb. 3A, Spuren 1-10). Im Zytoplasma konnte nur beim Isolat FBG P60 detektiert werden (Spur 11), was durch eine Kontamination mit der Probe aus der Nachbarspur (Spur 10, Isolat 2539) erklärt werden konnte. Es fiel auf, dass mit dem hier verwendeten mAk BG11 ebenfalls nur bei dem Isolat FBG das P100-Protein detektiert wurde. Unter nicht vollständig denaturierenden Bedingungen wurde P100 bei allen getesteten Isolaten im Gesamtlysat und in der Membranfraktion mit den mAk DC10 und LG3 erkannt (hier nicht abgebildet).

Die Zytoplasmafraktion wurde mit dem mAk KD2, der sich gegen den zytoplasmatischen Elongationsfaktor Tu richtet, immungefärbt und zeigte bei allen Isolaten eine Bande im entsprechenden Bereich (hier nicht abgebildet). Die Immunfärbung mit einem P50-spezifischen Kaninchenserum konnte nur das Isolat FBG in Gesamtlysat und Membranfraktion erkennen. Auffällig war hier eine zusätzliche Bande im Bereich oberhalb von 106 kDa.

Für die Competitionstests wurden Isolate ausgewählt, die sich zwar im Immunfärbungsmuster nicht deutlich unterschieden, jedoch unterschiedliche P50-Varianten exprimierten (siehe Abb.4). So exprimierte das Isolat FBG volles P50-

Protein, die Isolate 6876 und 8958 nur verkürzte Varianten, wobei das Isolat 6876 mit den im Institut vorhandenen Antikörpern nicht detektiert werden konnte. Isolat 2539 zeigte aufgrund einer Punktmutation kein membranständiges P50 (Henrich et al., 1998).

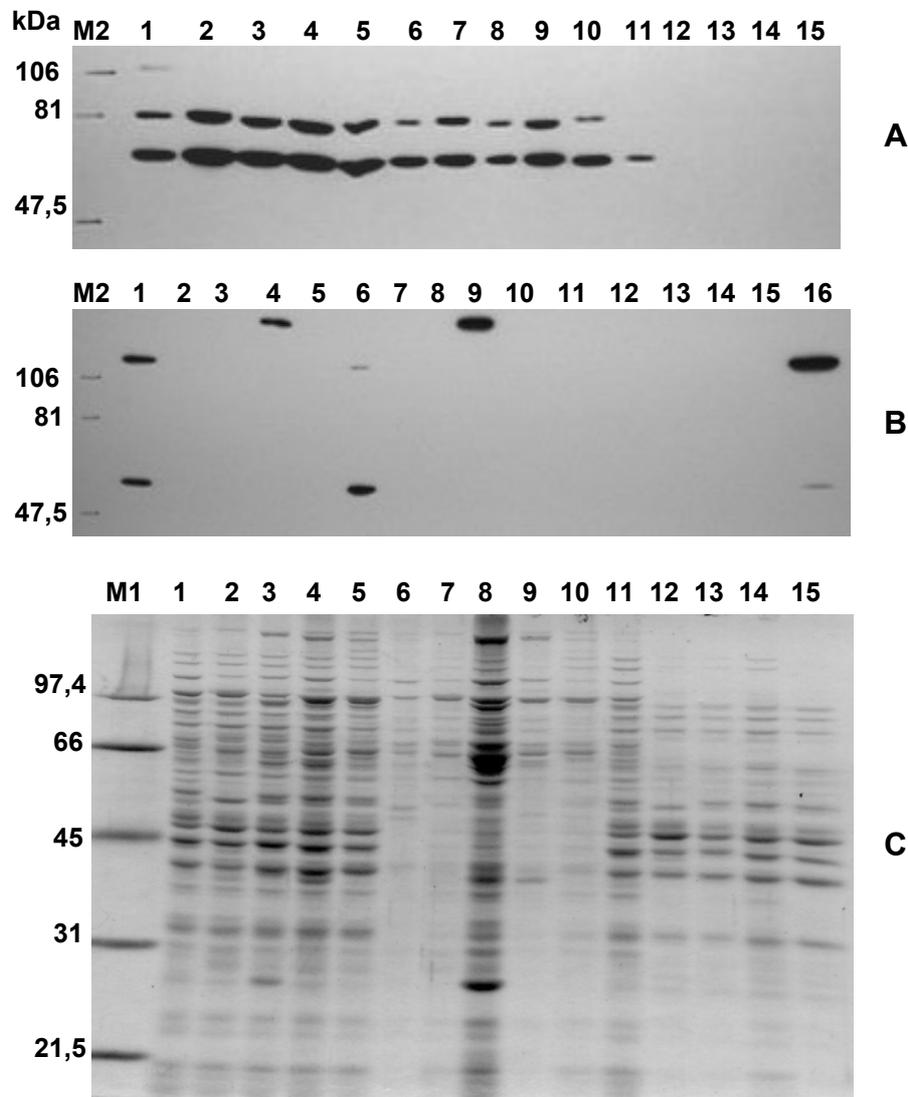


Abb.3: Osmotische Lyse und Membranpräparation verschiedener Mycoplasmenisolate

Je Spur wurden auf ein 9,5%-SDS-Gel 8µg Probe pro 20µl aufgetragen und nach Elektrophorese auf Nitrozellulose übertragen und mit verschiedenen Antikörpern immungefärbt. In den Spuren 1-5 wurde Gesamtlysat der Isolate aufgetragen, dabei zeigt Spur 1 das Isolat FBG, Spur 2 das Isolat 8958, Spur 3 das Isolat 6876, Spur 4 Isolat 10540 und Spur 5 Isolat 2539. Die Spuren 6-10 entsprechen der Verteilung in 1-5, zeigen jedoch die Membranfraktionen der Isolate, die Spuren 11-15 zeigen entsprechend die Zytoplasmafraktion der Isolate. Spur 16 (nur in 1B) zeigt als Positivkontrolle 8µg FBG-Gesamtlysat. **A** zeigt die gleichzeitige Immunfärbung mit den monoklonalen Antikörpern BG11 (P100), NB12 (P80) und CG4 (P60). **B** zeigt die Immunfärbung mit einem P50-spezifischen Kaninchenserum, **C** zeigt die Coomassiefärbung der aufgetragenen Isolate.

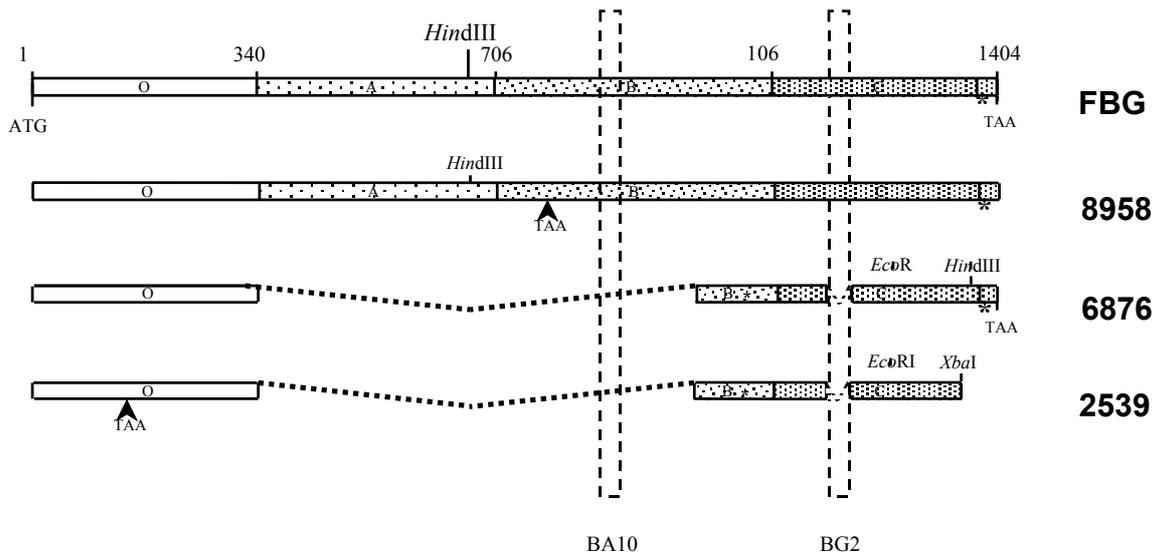


Abb. 4: Schematische Darstellung der P50-Gene in verschiedenen *M. hominis* Isolaten (aus: Henrich et al., 1998) Angegeben sind die proteincodierenden P50-Genbereiche vom ATG bis zum Stop-Codon TAA, wobei sich an einen N-terminal kodierenden Bereich O die drei untereinander homologen Domänen A, B und C anreihen. Größere Deletionen sind gestrichelt eingezeichnet, die Epitope der Antikörper BA10 und BG2 als gestrichelte Balken markiert.

Das Isolat 10540 zeigte ebenfalls kein antigenes P50-Protein, jedoch wurde das codierende Gen dieses Isolats nicht sequenziert, so dass nicht endgültig geklärt werden konnte, ob nicht eine verkürzte Variante, die mit unseren mAk nicht nachweisbar war, exprimiert wurde.

Die ersten Kompetitionsversuche wurden mit den *M. hominis*-Isolaten 2539 und 10540 durchgeführt. Das mycoplasmale P60/P80-Proteingemisch wurde in einer höchsten Konzentration von 1,25 µg eingesetzt und schrittweise in 5er-Stufen verdünnt. Diese Proteinproben wurden parallel mit verschiedenen Mycoplasmenverdünnungen inkubiert, so dass jede Proteinverdünnungsstufe auch mit jeder Mycoplasmenverdünnungsstufe kombiniert wurde. Um den Einfluß des Detergenz NP-40 auf die Adhärenz beurteilen zu können, wurden Tests mit Zugabe von 1%- NP-40-Lösung zu den Proben der hohen Mycoplasmenverdünnungen durchgeführt. Adhärenz Mycoplasmen wurden anschließend in einer Immunfärbung mit dem monoklonalen Anti-P100-Antikörper LG3 nachgewiesen, der beide Isolate erkennt (Feldmann et al., 1992).

Die Zugabe des P60/P80-Proteingemisches schien die Adhärenz von Mycoplasmen unabhängig vom eingesetzten *M. hominis*-Isolat **nicht** zu verringern, sondern im Gegenteil zu steigern. In allen Mycoplasmenverdünnungen wurden die höchsten

Extinktionen bei Zugabe von unverdünntem Protein (1,25 µg/10⁶ HeLa-Zellen) gemessen. Ab einer Proteinmenge von weniger als 50 ng änderte sich das Adhärenzverhalten der Mycoplasmen nicht mehr. Auch die Zugabe von einprozentiger NP-40-Lösung schien einen putativ „adhärenzvermittelnden“ Effekt zu haben, wenn auch weniger ausgeprägt als bei Zusatz von P60/P80.

Dieser unerwartete Effekt könnte zum einen dadurch bedingt sein, dass das Detergenz NP-40 die Mycoplasmenadhäsion begünstigte, statt sich neutral zu verhalten; zum anderen könnte auch das P60/P80-Proteingemisch selbst eine nicht-kompetitive Wirkung haben. Weiterhin wäre ein solches Ergebnis erklärlich, wenn die P60/P80-Probe P100 enthalten hätte. Dies war aufgrund der affinitätschromatographischen Aufreinigung unwahrscheinlich und wurde mittels gelelektrophoretischer Analyse der Proteinprobe überprüft.

Dieser Testaufbau unter Zugabe von NP-40 wurde aufgrund der artifiziellen Adhäsion nicht weitergeführt und ist daher hier auch nicht abgebildet. Um eine definitive Interpretation der Ergebnisse zuzulassen, hätten zur Bestätigung weitere Tests mit dem Detergenz NP-40 ohne Zusatz von Mycoplasmen durchgeführt werden müssen, um klären zu können, ob der beobachtete Effekt auch auf die Wirkungsweise des P60/P80-Proteingemisches zurückzuführen ist.

Nachdem die Adhäsions- und Inhibitionsversuche mit der P60/P80 Proteinpräparation aus der Membran von *M. hominis* FBG gezeigt hatten, dass das Proteingemisch an HeLa-Zellen adhäriert, und das P60-Protein den scheinbar größeren Beitrag zur Adhärenz zu liefern schien, war das Ziel der folgenden Arbeiten die umfassende Charakterisierung der Adhäsion des reinen P60-Proteins ohne seinen Komplexpartner. Hierzu dienten verschiedene rekombinante P60-Proteinkonstrukte.

4.3 Charakterisierung des rekombinanten Fusionsproteins P60*

4.3.1 Native Aufreinigung

Das rekombinante P60* wurde in Fusion mit der Dihydrofolatreduktase (DHFR), sowie sechs N-terminalen Histidinresten exprimiert.

Die Expression des Fusionsproteins P60* erfolgte, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben, mit einem kommerziellen System der Firma Qiagen. In von dieser Firma durchgeführten Tests wurde bereits beschrieben, dass der 6xHistidinrest der Fusionsproteine offenbar keinen interferierenden Einfluß auf das Verhalten der Proteine hat (The QIAexpressionist, Third Edition, March 1997). Es sollte jedoch als Negativkontrolle auch die vom Vektor pQE-41 exprimierte Dihydrofolatreduktase (DHFR) mit 6xHistidinrest aufgereinigt und in folgenden Tests eingesetzt werden, um einen Einfluß des Fusionspartners DHFR auf die Adhärenz bestimmen zu können. Dazu wurde sowohl das P60*-Fusionsprotein als auch der Fusionspartner (DHFR + 6 Histidine) in *E. coli* exprimiert und wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben über den Histidinrest aufgereinigt.

Abbildung 5 zeigt die Aufreinigung beider Proteine.

Es erwies sich, dass die Expression der reinen DHFR in größerem Maße stattfand, als die Produktion von P60*, erkennbar an der erheblich dickeren Bande im Bereich von ca. 30 kDa (Spuren 1-6). Wie in Spur 5 zu sehen ist, hatte das Histidin-gekoppelte Protein nicht vollständig an das Säulenmaterial gebunden, die Bindungskapazität der Säule war sehr wahrscheinlich überschritten. Bei Betrachtung des Elutionsverlaufs wird ersichtlich, dass sich das Protein von Beginn der Elution mit pH 5,5 aus der Chelatbindung löste, die höchste Proteinkonzentration im Eluat allerdings erst bei pH 3,5 erreicht war (Spuren 7-12 (P60*) und 13-18 (DHFR)). Desweiteren schien entweder eine Dissoziation des rekombinanten Proteins oder ein primärer Syntheseabbruch stattzufinden, da auch in den P60-Eluaten Protein von der Größe der DHFR isoliert (ca. 30 kDa) wurde. In den Spuren 13-18 ist die Elution der DHFR dargestellt, die im Gegensatz zum Fusionsprotein P60* kontaminationsärmer, d.h. mit weniger Abbauprodukten oder kontaminierenden Fremdproteinen, sichtbar an weiteren Proteinbanden, gelang.

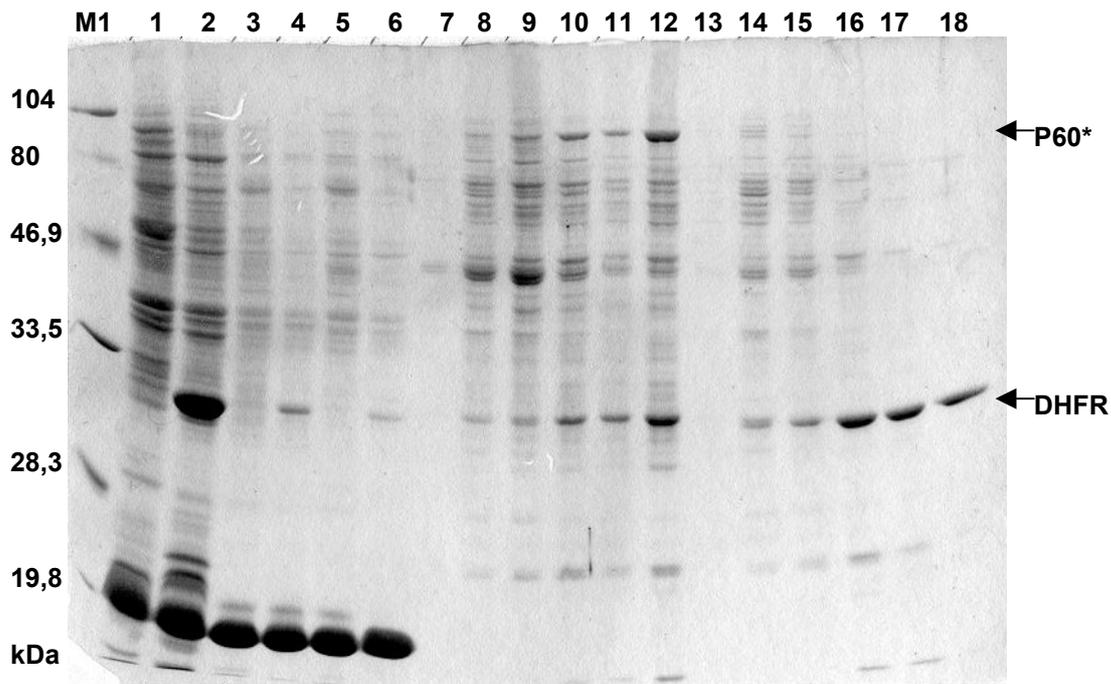


Abb. 5: Aufreinigung des Fusionsproteins P60* und des reinen Fusionspartners DHFR

Dargestellt ist ein coomassiegefärbtes 12%-Acrylamidgel mit einzelnen Schritten der Aufreinigung beider Proteine. Es wurden jeweils 10 µl der während der Aufreinigung entnommenen Proben je Spur aufgetragen, wobei in den Spuren 1-6 alternierend die Proben von P60* und DHFR aufgetragen wurden. Spur 1: resuspendiertes Pellet des P60* exprimierenden Klon 3.2 nach Inkubation mit Lysozym, DNase und RNase. Spur 2 zeigt analog dazu, wie auch im folgenden, den Klon pQE-41, der nur DHFR exprimiert. In den Spuren 3 und 4 ist der Überstand nach Zentrifugation dargestellt. Die Spuren 5 und 6 zeigen den Durchlauf der Ni-NTA-Säule. Die Elution von P60* ist in den Spuren 7 bis 12 dargestellt, hierbei wurde je zweimal mit Wash-Puffer pH 5,5 (Spuren 7 u. 8), pH 4,5 (9 und 10) und zuletzt mit pH 3,5 (11 u. 12) eluiert. Parallel dazu zeigen die Spuren 13 bis 18 die Elution der DHFR.

In Abbildung 6 ist die Western-Blot-Analyse gezeigt, in der mit dem P60-spezifischen mAk CG4 neben dem rekombinanten P60* die Epitop tragenden Abbauprodukte visualisiert werden konnten. Ein von Qiagen zu erwerbender Histidin-spezifischer Antikörper zeigte in früheren Tests keine reproduzierbare Reaktivität (Weinhold, 1998), weswegen auf den immunologischen Nachweis der DHFR verzichtet werden musste.

Wie in Spur 3 zu erkennen ist, hat nicht die gesamte Menge des gelösten P60* an die Ni-NTA gebunden. Deutlich zu sehen ist, welcher starkem Abbau das Epitop-tragende Fusionsprotein unterworfen war. Während die größte zu erkennende Bande das intakte P60* mit einer Größe von ca. 90 kDa darstellt, finden sich darunter zahlreiche Banden mit Abbauprodukten.

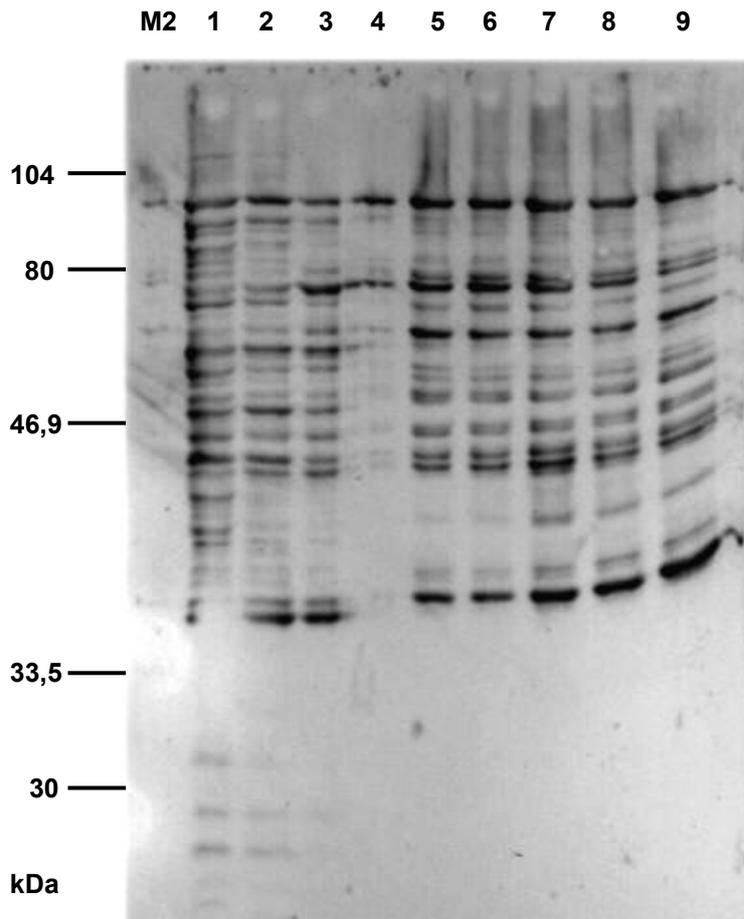


Abb. 6: Immunfärbung des rekombinanten Fusionsproteins P60* mit dem mAk CG4

Die auf einem 12%-pAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert, mit dem mAk CG4 immungefärbt und mittels Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm abgebildet. Die einzelnen Proben entsprechen den P60*-Proben aus Abbildung 4 mit identischem Auftragsvolumen und -konzentration. Spur 1 zeigt das resuspendierte Pellet des Klons 3.2 nach Inkubation mit Lysozym, DNase und RNase. In der Spur 2 ist der Überstand nach Zentrifugation dargestellt. Die Spur 3 zeigt den Durchlauf der Ni-NTA-Säule. Die Elution von P60* ist in den Spuren 4 bis 9 dargestellt.

Es bleibt zu beachten, dass die abgebildete Immunfärbung aufgrund der durchgeführten Chemilumineszenz keine quantitative Verteilung der einzelnen P60-Peptide zulässt. Die Beurteilung der Mengenverteilung des intakten P60* im Vergleich zu seinen Abbauprodukten war jedoch sehr gut in dem Coomassiegefärbten Gel möglich und zeigte, dass die Abbauprodukte des P60* im Unterschuss vorlagen.

Die in der Coomassiefärbung ebenfalls zu erkennende Bande von ca. 30 kDa, die dem reinen Fusionspartner DHFR entspricht, war aufgrund der P60-spezifischen Immunfärbung in Abbildung 6 natürlich nicht zu erkennen. Da die native Aufreinigung des P60*-Fusionsproteins auch unter Einsatz von Proteaseinhibitoren nicht mit

weniger Abbauprodukten gelang, wurde diese Proteinprobe in die verschiedenen Versuche eingesetzt.

4.3.2 Kompetitive Inhibition der Mycoplasmenadhärenz durch Zugabe von P60*

Nach Aufreinigung des in *E. coli* löslich vorliegenden P60-Fusionsproteins wurde dieses in verschiedenen Konzentrationen zusammen mit den beiden *M. hominis*-Isolaten FBG und 10540 auf HeLa-Zellen gegeben (vgl. Kap. 4.1.2). Als Negativkontrolle wurde in einem Parallelansatz equimolare Mengen der DHFR eingesetzt. Die höchste Konzentration für P60* (mit einer Größe von ca. 90 kDa) lag bei $1,8 \mu\text{g}/10^6$ HeLa-Zellen, die für DHFR (Größe ca. 30kDa) entsprechend bei $0,6 \mu\text{g}/10^6$ HeLa-Zellen. Die Detektion der zytadhärenten Mycoplasmen erfolgte nach 2 h Inkubation bei 37°C , gefolgt von drei Waschschritten, durch Immunfärbung der *M. hominis*-spezifischen Oberflächenantigene P80 (mAk NB12) und P100 (mAk DC10). So wurden nur die adhärenenten Mycoplasmen, nicht jedoch das hinzugegebene Protein detektiert.

Abbildung 7 zeigt einen solchen Competitionstest, bei dem sich deutlich eine Verringerung der Mycoplasmenadhärenz durch Zugabe von P60* darstellte. Die höchste Adhärenz wurde, wie zu erwarten, ohne Zugabe von Protein gemessen. Eine kompetitive Verringerung der Mycoplasmenadhärenz schien zwar ebenfalls durch Zugabe der reinen DHFR stattzufinden, jedoch war diese Reduktion der Adhärenz stets geringer als bei Zugabe von P60*. Mit diesen Experimenten konnte somit der Nachweis erbracht werden, dass das P60*-Protein zytadhäsive Eigenschaften besitzt.

Signifikante Unterschiede in der Competition zwischen den beiden getesteten Isolaten waren trotz des unterschiedlichen Gehalts an P50 insgesamt nicht zu erkennen. Lediglich bei Zugabe der höchsten Konzentration von Fremdprotein schien die Adhärenz des Isolats FBG stärker reduzierbar zu sein. Bei weiteren Proteinverdünnungsstufen hob sich dieser Effekt jedoch wieder auf. Insgesamt war eine Competition bis zu einer Mycoplasmen-Vedünnungsstufe von 1:25 der eingesetzten Höchstkonzentration nachweisbar. Auch bei anderen durchgeführten Tests, bei denen die kompetitive Reduzierung der Mycoplasmenadhärenz durch

P60* reproduziert wurde, konnte kein quantitativer Unterschied in der Adhärenz der verschiedenen Isolate festgestellt werden. Eine Konkurrenz durch das rekombinante P60*-Protein war bis zu einer Proteinzugabe von $0,072 \mu\text{g}/10^6$ HeLa-Zellen nachweisbar (Ergebnisse nicht dargestellt).

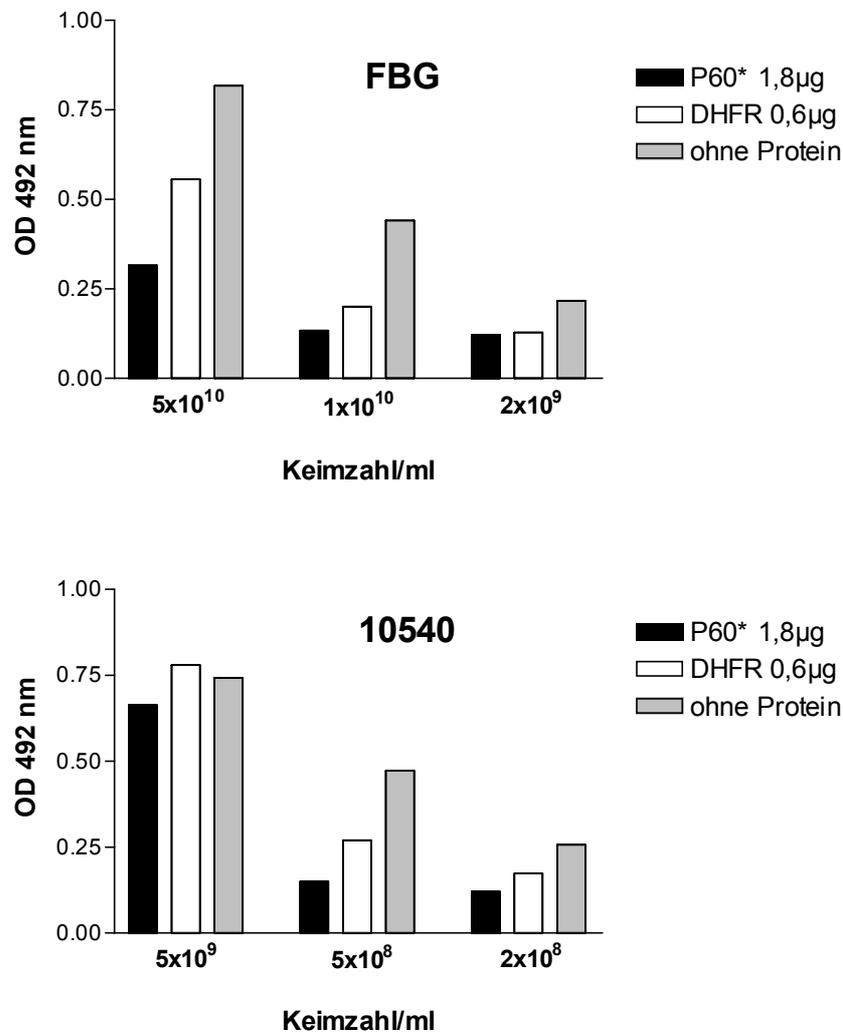


Abb. 7: Konkurrenz der *M. hominis*-Isolate FBG und 10540 durch P60* und DHFR

Eingesetzt wurde in equimolaren Mengen P60*, das (wie zuvor beschrieben) aufgereinigt wurde, und als Kontrolle reine DHFR zu den verschiedenen Einsaaten an Mycoplasmen (Keimzahl/ml). **Oben:** Konkurrenz des Adhärenz des Isolats FBG, **unten:** Konkurrenz des Isolats 10540.

Adhärenz und Inhibitionstests mit dem aufgereinigtem P60*-Protein und der DHFR wurden nicht durchgeführt, da diese Versuche schon Gegenstand einer früheren Dissertation waren, in der sich der adhäsive Charakter von P60 bereits abgezeichnet hatte (Weinhold, 1998). In jenen Adhärenz-/Inhibitionsassays hatte sich allerdings bereits eine deutliche Zytadhärenz des aufgereinigten P60* gezeigt, die durch

Vorinkubation mit dem mAk CG4 aufgehoben werden konnte. Hierbei konnte jedoch nicht zweifelsfrei bewiesen werden, dass die Adhärenz nur über den P60-Anteil des Fusionsproteins stattfand, da die Analyse des Kontrollansatzes, in dem nur der Fusionspartner (DHFR+ 6 Histidine) auf HeLa-Zellen gegeben wurde, an dem Fehlen eines geeigneten Nachweisantikörpers für den 6xHistidinrest bzw. die DHFR scheiterte (Weinhold, 1998). Zur weiteren Absicherung der zytadhäsiven Eigenschaften des P60-Proteins sollte im folgenden versucht werden, eine P60-Variante zu exprimieren und zu analysieren, die keine potentiell Adhärenz-interferierenden Fusionspartner enthielt.

4.4 Charakterisierung des rekombinanten P60^r aus dem Expressionsklon MA2

Im Rahmen einer zeitgleich am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität angefertigten Dissertation wurde versucht, das P60-Protein kodierende Gen inklusive der für die Membranverankerung verantwortlichen N-terminalen Signalsequenz in *E. coli* zu exprimieren und zu untersuchen, inwieweit es in *E. coli* ebenfalls prozessiert wird. Nach Klonierung des P60-Gens inklusive seiner Membranverankerungs-Signalsequenz konnte beobachtet werden, dass P60 zwar nicht zweifelsfrei an die Zelloberfläche transportiert wurde, jedoch nach Lyse der Bakterien nachweisbar war und somit exprimiert wurde (Dissertation von Mehmet Akbas, in Vorbereitung). Für weitere Adhärenzversuche sollte nun von mir dieses rekombinante Protein, im folgenden P60^r genannt, isoliert, aufgereinigt und auf seine adhäsiven Eigenschaften hin untersucht werden.

4.4.1 Bestimmung der zellulären Lokalisation von P60^r

Einem Protokoll der Firma Qiagen folgend (vgl. Kap. 3.2.7), wurde P60^r auf seine zelluläre Lokalisation in *E. coli* hin untersucht und die gewonnen Proben aus Zytoplasma, Membranfraktion und Periplasma nebeneinander gelektrophoretisch aufgetrennt.

Abbildung 8 zeigt verschiedene Proben dieser Lokalisationsbestimmung. Es ist zu erkennen, dass der größte Anteil des exprimierten Proteins in unlöslicher Form im Zytoplasma vorlag (Spur 3), eine weitaus geringere Menge fand sich in löslicher Form im Zytoplasma (Spur 2), was einerseits dadurch bedingt sein könnte, dass P60 als Fremdprotein in *E. coli* unlösliche Einschlusskörper (sog. „inclusion bodies“) bildete. Andererseits könnte die große Menge an scheinbar unlöslichem Protein auch durch einen unvollständigen Aufschluß der Bakterien bedingt sein.

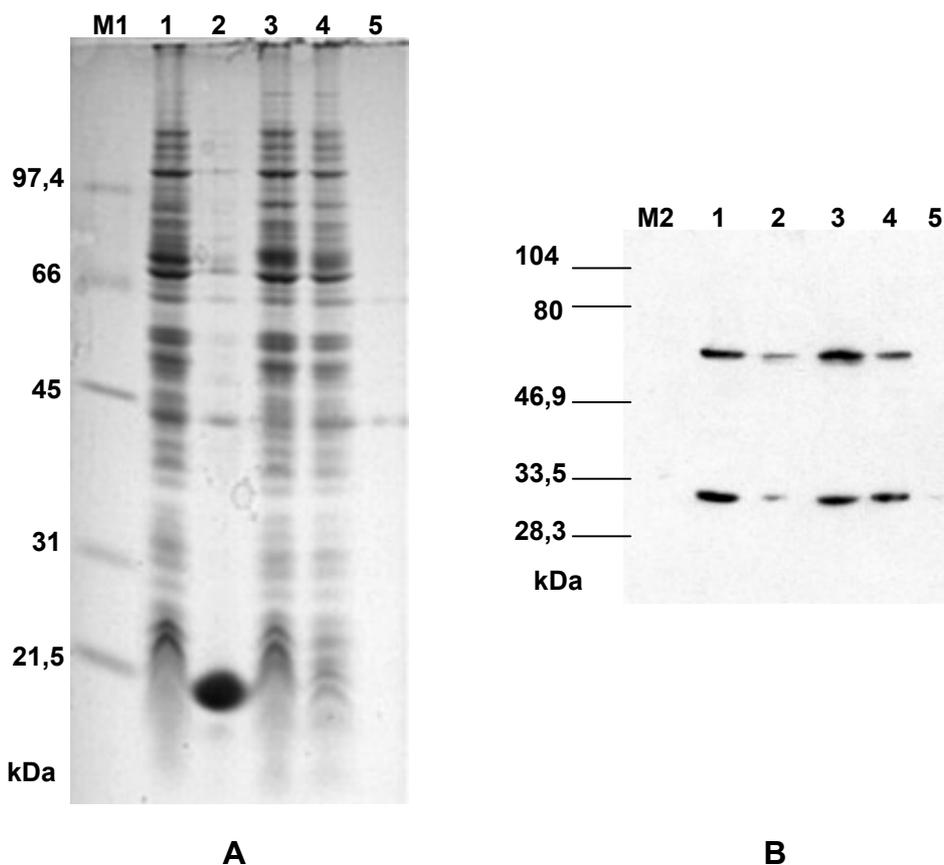


Abb. 8: Zelluläre Lokalisation des rekombinanten Proteins P60^f

Spuren 1 und 4: FBG-Gesamtlysate, 100 µl Kultur entsprechend. Nach Trennung der zytoplasmatischen Proteine (Spur 2) von den Membranproteinen (Spur 3), bzw. der Isolierung der periplasmatischen Proteine (Spur 5) aus jeweils 5 ml Kultur des konstitutiv exprimierenden *E. coli* DH5αF', wurden von jeder Probe der 100 µl Ausgangskultur entsprechende Teil auf einem 9,5%-pAA-SDS-Gel aufgetrennt und entweder Coomassie-gefärbt (A), oder mit dem P60-spezifischen mAk CG4 immungefärbt (B).

Die Präparation der periplasmatischen Proteine enthielt nur geringe Proteinkonzentrationen (Spur 5). Die Immunfärbung mit dem P60-spezifischen mAk CG4 weist in dieser Fraktion kein P60^f nach, hier ist nur ein schwacher Nachweis von dem CG4-kreuzreagierenden 30 kDa-Protein von *E. coli* zu beobachten.

Als Kontrolle der Präparation wurde parallel die Lokalisation des Fusionsproteins P60* ermittelt, da das rekombinante P60* aufgrund des Fehlens der zur Membranverankerung notwendigen Sequenz zytoplasmatisch lokalisiert sein sollte (Daten nicht abgebildet). Hier verteilte sich ein ebenso großer Anteil des Proteins auf Membran- und Zytoplasmafraktion wie bei P60^f. Die Immunfärbung mit dem Antikörper CG4 zeigte jedoch, dass P60^f einem erheblich geringeren Abbau unterlag als das Fusionsprotein P60* (P60+DHFR) (vgl. Abb. 5) und dies, obwohl es in diesem Versuch konstitutiv und nicht IPTG-induziert exprimiert wurde. Zusammenfassend konnte dieser Versuchsreihe entnommen werden, dass das P60^f-Protein zwar hauptsächlich in der Membranfraktion zu detektieren war, jedoch auch ausreichende Mengen von P60^f löslich im Zytoplasma von *E. coli* vorlagen, um es analog zur Aufreinigung von P60*, allerdings mit dem Vorteil der geringeren Degradation, in löslicher Form von dort isolieren zu können.

4.4.2 Affinitätschromatographische Aufreinigung von P60^f

Wie oben erwähnt, erfolgte der Aufschluß des P60^f exprimierenden *E. coli*-Klons analog zur Aufreinigung von P60*. Die anschließende affinitätschromatographische Aufreinigung ähnelte jedoch der Aufreinigung des P60/P80-Komplexes aus *M. hominis*, da das Protein nicht über einen Histidinrest verfügte und nur über sein CG4-Epitop zu isolieren war. Allerdings konnte durch die Verwendung des gelösten P60^f aus dem Zytoplasma auf den Zusatz des schlecht dialysierbaren Detergenz NP-40 verzichtet werden, so dass nach Umpuffern des von der CG4-Säule eluierten Proteins in PBS (zur Entfernung des Elutionspuffers Natriumisothiocyanat) keine störenden Detergenzien mehr in der Proteinlösung vorhanden waren.

Abbildung 9 zeigt die während der Aufreinigung von P60^f entnommenen Proben nach Coomassie-Färbung des pAA-Gels (A) und nach Auftrennung auf Nitrozellulose und Immunfärbung mit CG4 (B).

Wie in der Coomassiefärbung (A) in der Spur 1 zu sehen ist, wurde bereits vor IPTG-Induktion rekombinantes Protein exprimiert. Der Vergleich mit dem Proteinprofil nach IPTG-Induktion (Spur 2) verdeutlicht, dass kein quantitativer Unterschied nach Induktion offensichtlich wird. Lösliches Protein fand sich zwar im Überstand,

allerdings verblieb, wie schon in Abb. 8 gezeigt, die größere Menge an rekombinantem P60^r im membranhaltigen Pellet und stand so für die weitere Aufreinigung nicht zur Verfügung. Die Abnahme der Proteinkonzentration zwischen Spur 7 und Spur 8 entspricht der Verdünnung der Probe von 4 ml auf 7 ml nach Umpuffern der Eluate.

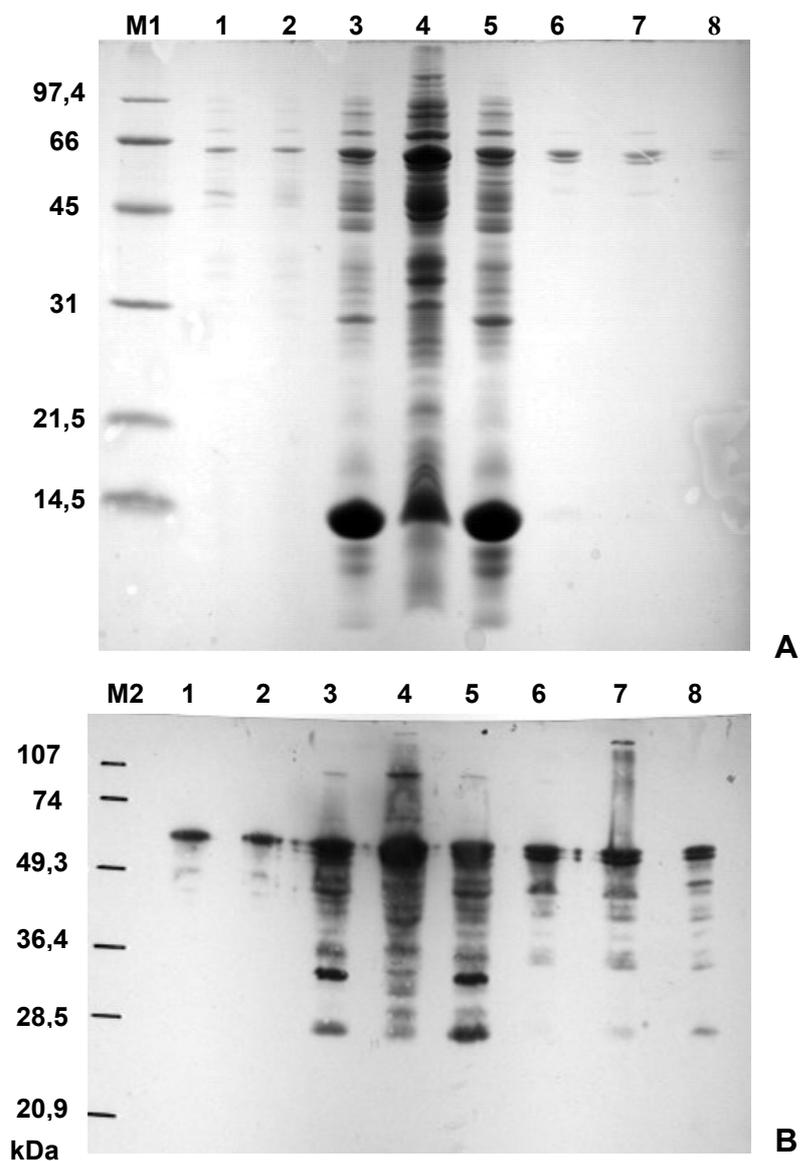


Abb. 9: Affinitätschromatographische Aufreinigung des rekombinanten P60^r

Während der Aufreinigung entnommene Proben wurden auf ein 12%-pAA-Gel gelelektrophoretisch getrennt (je 10 µl/Spur). (A) zeigt das Coomassie-gefärbte Gel, (B) die entsprechende Immunfärbung mit dem mAk CG4 nach Transfer auf Nitrozellulose.

Spur 1: *E. coli*-Flüssigkultur vor Induktion der Proteinexpression mit IPTG, Spur 2: eine Probe gleichen Volumens nach Induktion. In Spur 3 ist der lösliche Überstand nach Lyse der Kultur dargestellt; das zugehörige unlösliche Material zeigt Spur 4. Nach Binden von P60^r an CG4-gekoppeltes Säulenmaterial ist in Spur 5 der Durchlauf aufgetragen. Die folgenden Spuren 6 und 7 zeigen die Eluate des Proteins, die 3.5 M Natriumisothiocyanat enthalten. Spur 8 zeigt das Protein nach Umpuffern der Eluate in PBS.

In Abb. 9 ist auffällig, dass das Protein P60^r in Form von Doppelbanden nachweisbar war, die ausgemessen eine Größendifferenz von ca. 3 kDa hatten. Dies entspricht exakt der Größe der N-terminalen Signalsequenz und spricht dafür, dass bei der Proteinexpression die Signalsequenz zum Teil erkannt und abgespalten wurde und ein Proteingemisch mit und ohne Signalsequenz vorlag.

CG4-reaktive Abbauprodukte von P60^r waren ebenfalls nachweisbar. Zwar waren es weniger als bei Aufreinigung von P60*, jedoch unerwarteterweise mehr, als nach der konstitutiven Expression im Rahmen des P60^r-Lokalisationsexperiments zu erwarten gewesen war (vgl. Kap. 4.3.1).

Der in Kap. 3.2.4 beschriebene Zusatz des Proteaseinhibitors Pefabloc SC wurde bei dieser Aufreinigung nicht durchgeführt, da dies bei früheren Aufreinigungen zu keinem erkennbaren Unterschied im Ausmaß der Proteindegradation geführt hat (hier nicht abgebildet). Nach Dialyse und anschließender Konzentrationsbestimmung stand genug Proteinlösung zur Verfügung, um die folgenden Tests durchführen zu können.

4.4.3 Adhärenzeigenschaften von P60^r

Analog zum Vorgehen bei den bisher getesteten P60-Proben wurde auch das neu zur Verfügung stehende Protein P60^r in Adhärenz-/Inhibitionstests, sowie in Kompetitionsassays eingesetzt.

Abbildung 10 zeigt die graphische Darstellung eines Adhärenz- bzw. Inhibitions-ELISA: HeLa-Zellen wurden mit P60^r in einer Konzentration von 0,16 ng bis zu 2,5 µg je 10⁶ HeLa-Zellen inkubiert. In Inhibitionsversuchen wurde das Protein mit dem spezifischen Antikörper CG4 vorinkubiert, als Negativkontrolle wurde reiner Puffer (ohne Proteinzugabe) eingesetzt. Hierbei zeigte sich, dass das rekombinante P60^r an HeLa-Zellen adhärert: Die höchste Extinktion wurde bei Zugabe von 2,5 µg Protein/10⁶ HeLa-Zellen gemessen. Bis zu einer Konzentration von 20 ng/10⁶ HeLa-Zellen nahm die Adhärenz schrittweise ab und blieb dann auf dem Hintergrundniveau.

Die Vorinkubation mit dem spezifischen mAk CG4 führte bei jeder Proteinkonzentration zu einer verminderten Bindung des Proteins an die HeLa-

Zellen. Dieser Effekt war bei der Negativkontrolle nicht zu beobachten, hier war jedoch ein hoher Hintergrund von 0,7 OD zu beobachten (LW). Dies war ein Befund, der bei den meisten Zell-ELISA zu beobachten war und auf die Verwendung des DMEM-Mediums zurückgeführt wurde.

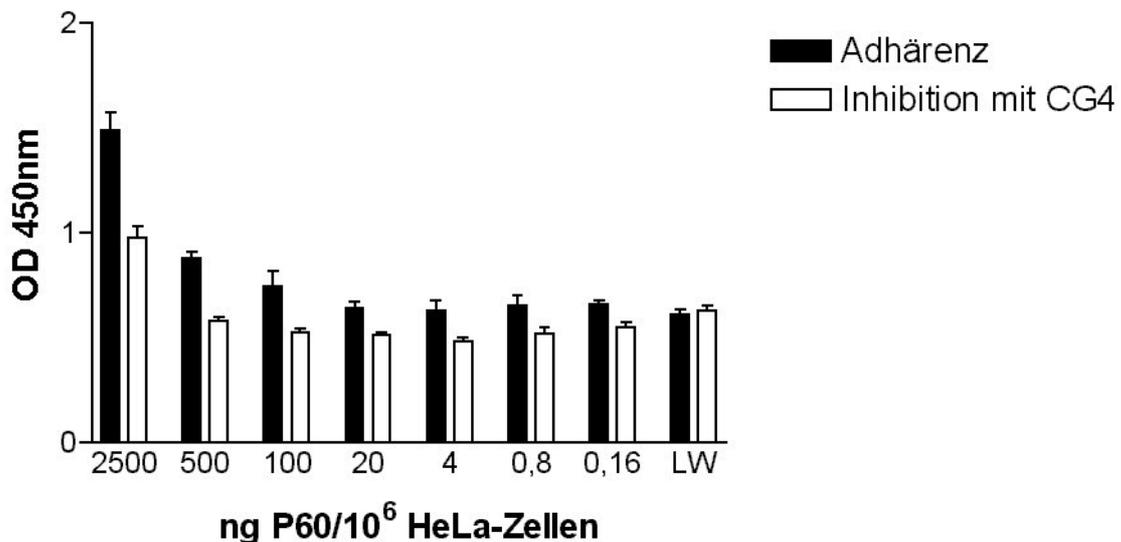


Abb. 10: Adhärenz und Inhibition der Adhärenz des rekombinanten P60^f an HeLa-Zellen
 Zum Nachweis der P60^f-Adhärenz und zur Inhibition der Adhärenz wurde der mAk CG4 eingesetzt. LW = Leerwert ohne Proteinzugabe (Negativkontrolle), die Abweichung entspricht der Standardabweichung.

Die Reduktion der Hintergrundreaktion bei geringer P60^f-Zugabe wurde auf ein Verdünnen der Medienbestandteile des DMEM zurückgeführt. So zeigte sich erst bei Zugabe von mehr als 100 ng P60^f/ 10⁶ HeLa-Zellen eine deutliche Bindung des rekombinanten Proteins an die HeLa-Zellen, wobei andererseits bis zur geringsten Proteinzugabe von 0,16 ng/10⁶ HeLa-Zellen eine Reduktion der P60^f-Zytadhärenz bei Vorinkubation des Proteins mit dem mAk CG4 zu beobachten war.

Auch die durchgeführten Competitionstests zeigten, dass das rekombinante P60^f an HeLa-Zellen adhärert, da die Bindung hinzugegebener Mycoplasmen durch P60^f-Zugabe (je nach Menge) kompetitiv inhibiert wurde. Die Tests wurden wie in Kapitel

3.3.8.3 beschrieben durchgeführt, als Nachweisantikörper bei dem hier dargestellten Kompetitionsassay dienten die mAk LG3 (Anti-P100) und LF8 (Anti-P80), die jeweils im Überschuß eingesetzt wurden und nur die adhärennten Mycoplasmen, nicht jedoch das zugesetzte rekombinante P60^r-Protein detektierten.

Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse eines Competitionstests, bei dem das *M. hominis*-Isolat FBG, das das P50-Adhäsionsexpressiert, und das Isolat 2539, das aufgrund einer Mutation kein P50 exprimiert, eingesetzt wurden. Aus der Darstellung wird ersichtlich, dass beide Isolate in Abhängigkeit von der Keimeinsaat an HeLa-Zellen adhärten.

Es wurde den Mycoplasmen das rekombinante P60^r-Protein in einer Konzentration von 1,5 µg bis 2,4 ng zugesetzt. Als Negativkontrolle wurde in einem Ansatz nur Lysozym in einer Konzentration von 30 µg/ml eingesetzt, da dieses zum Aufschluß der P60^r exprimierenden *E. coli* zugesetzt worden war und nach Elution und Umpuffern des rekombinanten Proteins in der Proteinpräparation noch nachweisbar war. Desweiteren wurden Ansätze ohne Zugabe von P60^r-Protein, Lysozym, sowie Mycoplasmen mitgeführt.

Abb. 11A zeigt die Ergebnisse bei Zugabe verschiedener Einsaaten des Isolats FBG ($3,875 \times 10^9$, $7,75 \times 10^8$ und $1,55 \times 10^8$ Mycoplasmen) pro 10^6 HeLa-Zellen. Die Mycoplasmenadhärenz an HeLa-Zellen nahm mit steigender P60^r-Proteinzugabe ab. Wie zu erwarten war, wurde die höchste Adhärenz ohne Proteinzugabe erreicht. Die Zugabe von Lysozym minderte zwar ebenfalls die gemessene Mycoplasmenadhärenz, jedoch nur in geringem Maße; so reduzierte der Einsatz von nur 2,4 ng P60^r die Mycoplasmenanheftung an die HeLa-Zellen stärker als die eingesetzten 30 µg/ml Lysozym. Auffällig war die starke Abnahme der Adhärenz in den beiden höchsten Einsaaten des FBG-Isolats, ein Effekt, der bei dem Isolat 2539 nicht zu beobachten war (s.u.). Weiterhin fiel auf, dass die Mycoplasmenadhärenz bei Zugabe von geringeren P60^r-Mengen teilweise unter dem hohen Leerwert ohne Mycoplasmenzugabe lag. Dies wurde, wie bereits oben ausgeführt, durch die Verdünnung des kreuzreaktiven Mediums erklärt.

Wie in Abb. 11B dargestellt, zeigte das Isolat 2539 in höchster Konzentration niedrigere Extinktionen und damit geringere Mycoplasmenadhärenz als das Isolat

FBG. Hier fiel bei Verdünnung der Mycoplasmen die Adhärenz weniger stark ab als bei dem Isolat FBG, auch wurden in allen Verdünnungsstufen keine Werte erreicht, die unterhalb des Leerwertes ohne Mycoplasmenzugabe lagen.

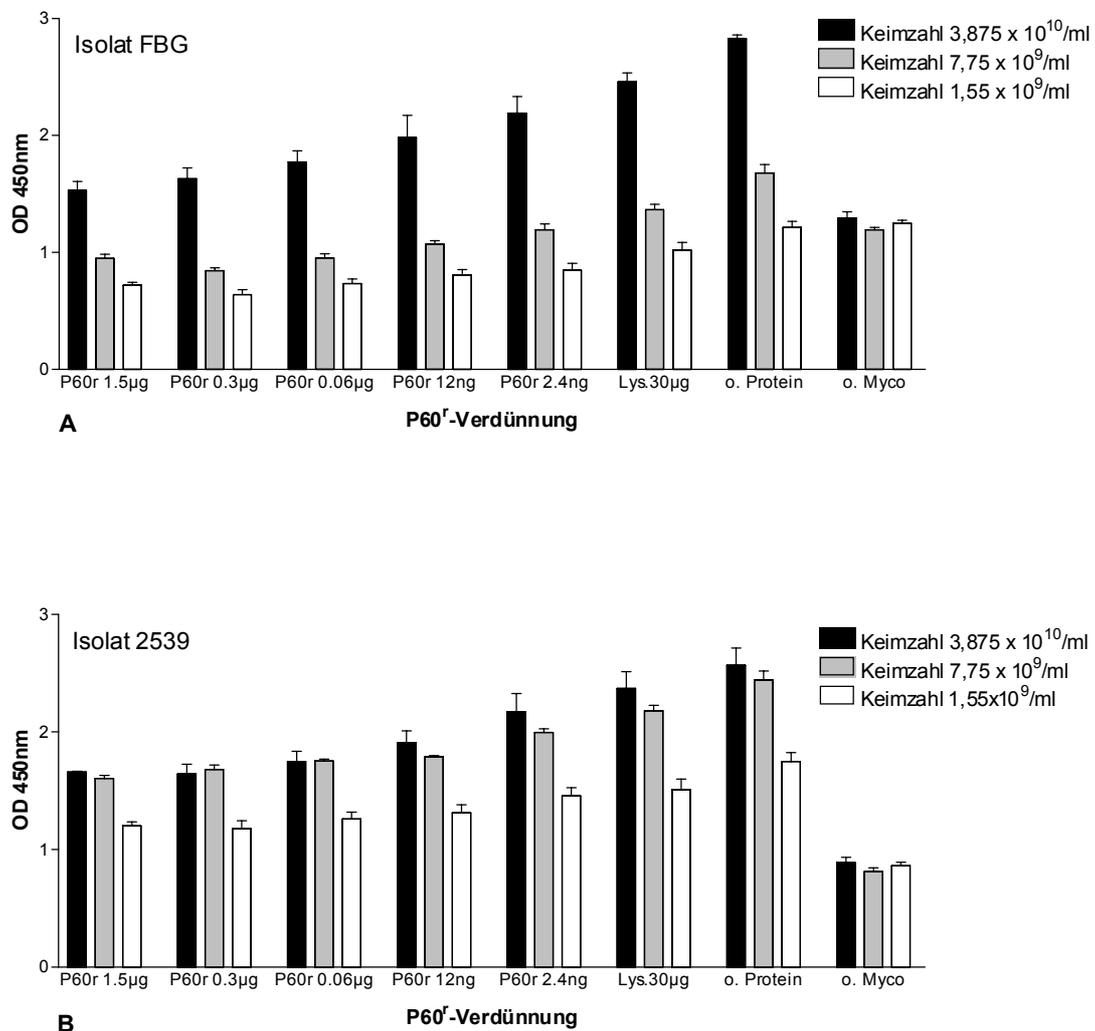


Abb. 11: Konkurrenz der Mycoplasmenadhärenz an HeLa-Zellen durch P60^r
A: Konkurrenz der Zytadhärenz des Isolats FBG, **B:** Konkurrenz der Zytadhärenz des Isolats 2539. Dargestellt sind in beiden Graphiken drei Mycoplasmenkonzentrationen. Die Nachweisantikörper der adhärenz Mycoplasmen waren der mAk LF8 (P80), sowie der mAk LG3 (P100).

Da die Keimzahlen der beiden eingesetzten Isolate in dem dargestellten Versuch identisch waren, lassen sich die Ergebnisse gut vergleichen:

In der höchsten Mycoplasmenkonzentration, die hier bei $3,875 \times 10^9$ Keimen je 10^6 HeLa-Zellen lag, adhärenz FBG bei gleicher Proteinkonzentration und damit gleicher Konkurrenz stärker an HeLa-Zellen als 2539. Bei der 1:5-Verdünnung der

Mycoplasmen hingegen war die Adhärenz beider Isolate vergleichbar, wohingegen das Isolat 2539 bei einer 1:25-Verdünnung höhere Extinktionen erreicht.

Dieses unterschiedliche Verhalten der beiden Isolate bestätigte sich jedoch nicht bei allen weiteren Versuchen. Zwar adhärierte das Isolat FBG unter Wettbewerbsbedingungen mehrfach besser als das Isolat 2539, allerdings zeigten auch einige Versuche eine gleichstarke Adhärenz der beiden Isolate an HeLa-Zellen bei gleicher eingesetzter Keimzahl.

Zusammenfassend haben die dieser Arbeit zugrundeliegenden Adhärenzversuche mit den verschiedenen P60-Proteinvarianten zweifelsfrei zeigen können, dass das *M. hominis*-spezifische Oberflächenantigen P60 zytadhäsive Eigenschaften besitzt, die stärker zu sein scheinen, als die des Proteinkomplexpartners P80.

5. Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Fragestellung beantwortet werden, welche Rolle das Membranprotein P60 bei der Zytadhärenz von *Mycoplasma hominis* darstellt. Dazu sollten sowohl die heterolog in *E. coli* exprimierten Proteine P60* und P60^r, als auch der aus Mycoplasmen isolierte Proteinkomplex P60/P80 (Kitzerow & Henrich, 2001) eingesetzt werden.

Während in einer 1998 verfassten Dissertation aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Virologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf die Synthese und Expression des rekombinanten Fusionsproteins P60* (P60 + DHFR + 6 Histidinreste) beschrieben wurden (Weinhold, 1998), konnten die zytadhäsiven Eigenschaften dieses Proteins bis zu Beginn der hier präsentierten Arbeiten nicht zweifelsfrei bewiesen werden. Obwohl es wahrscheinlich erschien, dass die beschriebene Adhärenz des rekombinanten P60-Fusionsproteins an HeLa-Zellen durch den P60-Anteil des Proteins vermittelt wurde, konnte aufgrund fehlender Nachweismethoden nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass auch der DHFR-Anteil einen Einfluß auf das Adhärenzverhalten hatte (Weinhold, 1998).

In der hier vorliegenden Dissertation konnte mittels Wettbewerbsversuchen unter Einsatz des Fusionsproteins P60* gezeigt werden, dass die Mycoplasmenadhärenz durch das rekombinante P60*-Fusionsprotein stärker reduziert wurde als durch alleinige Zugabe des Fusionspartners DHFR + 6 Histidine bei gleicher Molekülzahl. Daraus ließ sich schließen, dass der beobachtete Wettbewerbseffekt nicht auf einer rein räumlichen Behinderung der Mycoplasmenadhärenz beruhte, sondern die Reduktion der Mycoplasmenadhärenz auf den P60-Anteil zurückzuführen war. Dies wies schon zu diesem Zeitpunkt meiner Untersuchungen auf die adhärenzvermittelnde Funktion dieses Proteins hin. Die früher durchgeführten Versuche hatten gezeigt, dass das rekombinante Fusionsprotein P60* stärker an HeLa-Zellen zu binden schien als das native P50-Adhäsion von *M. hominis* (Weinhold, 1998). Die Zugabe des P60-spezifischen mAk CG4 reduzierte die Mycoplasmenadhärenz an HeLa-Zellen nur schwach, was dadurch zu erklären war, dass P60 in geringerem Maße als P50 auf der Membranoberfläche exprimiert wird (Henrich et al., 1993).

Die hier vorgestellten Experimente unter Einsatz von Isolaten, die verschiedene Varianten des P50-Adhäsins auf der Membranoberfläche exprimierten, wiesen ebenfalls auf keinen großen Einfluß bezüglich der Gesamtadhärenz von *M. hominis* hin, was auf den ersten Blick verwunderlich schien, da gerade die Varianz des Hauptadhäsins die variable Zellanheftung bewirken könnte. Die Größen- und Antigen-Variabilität des P50-Antigens, von anderen Autoren teilweise als Vaa (variable adherence-associated)-Antigen bezeichnet, mag die Adaptation des menschlichen Wirtes verhindern und eine Antikörper-vermittelte Immunantwort erschweren (Zhang & Wise, 1996; Kitzerow et al., 1999). Betrachtet man diese Variabilität des Hauptadhäsins P50, könnte man auf eine untergeordnete Rolle von P60 schließen: P60, das bei bislang allen getesteten Isolaten mit dem mAk CG4 nachgewiesen werden konnte, stellte sich als konserviert in Größe und Antigenität dar (Henrich et al., 1998). Es scheint somit nicht im selben Maße wie P50 an der Vielgestaltigkeit von *M. hominis* beteiligt zu sein, zumal P60 darüber hinaus in erheblich geringerem Ausmaß auf der Membran exprimiert wird (Henrich et al., 1998).

Dass die aus *M. hominis* aufgereinigten Membranproteine P60 und P80, unabhängig von der Art des bei der Affinitätschromatographischen Aufreinigung verwendeten Antikörpers, P60- oder P80-spezifisch, co-eluieren, war bereits bekannt (Henrich et al., 1993). Der aufgereinigte Proteinkomplex war bis zu Beginn der hier vorgestellten Arbeiten noch nicht Gegenstand weiterer Untersuchungen. Erst in diesem Jahr konnte die Komplexbildung der beiden Proteine P60 und P80 in der Mycoplasmenmembran bewiesen werden (Kitzerow & Henrich, 2001).

Die Ergebnisse der mit dem P60/P80-Proteingemisch durchgeführten Adhärenz-/Inhibitionsassays deckten sich mit den Ergebnissen der entsprechenden Tests, die im folgenden dann mit den rekombinanten P60-Proteinen durchgeführt wurden. Mit dem neu zur Verfügung stehenden rekombinanten P60-Vorläuferprotein (d.h. inklusive Membranverankerung) P60^r stand ein Protein zur Verfügung, das dem bisher benutzten Fusionsprotein P60* dahingehend überlegen war, dass es keine potentiell interferierenden Fremdproteinanteile wie den DHFR-Anteil mehr enthielt, die zu Artefakten bei der Mycoplasmenkompetition führen konnten. Außerdem war dieses rekombinante Protein, wahrscheinlich durch die Kopplung mit einer Leadersequenz zur Membranverankerung, keinem dramatischen intrazellulären Abbau im *E. coli* mehr unterworfen, wodurch die Proteingewinnung erleichtert wurde.

Die Ergebnisse der mit P60^f durchgeführten Versuche bestärkten die postulierte Adhärenzvermittelnde Wirkung von P60:

Die Adhärenz, die das Protein an HeLa-Zellen zeigte, konnte durch Vorinkubation mit dem spezifischen Antikörper CG4 gemindert, teilweise sogar komplett inhibiert werden. Auch die Kompetitionsassays zeigten reproduzierbar, dass der Einsatz von P60^f die Mycoplasmenadhärenz verminderte. Hierbei war ein dosisabhängiger Effekt zu erkennen, d.h. je höher die zugegebene Proteinmenge war, desto geringer war die Mycoplasmenadhärenz. Allerdings zeigten einige, hier nicht dargestellte Tests zwar eine deutliche Competition, jedoch korrelierte diese nicht direkt mit der Menge des eingesetzten Proteins, sondern zeigte die geringste Mycoplasmenadhärenz im Bereich der Zugabe mittlerer Proteinkonzentrationen. Dies verdeutlicht die Schwierigkeiten, die bei den Tests dadurch entstanden, dass nie gleichbleibende Mengen an Detergenz in den Proteinproben waren, sowie erst im nachhinein die Anzahl der in den Tests eingesetzten Mycoplasmen zu bestimmen war, d.h. nicht immer ein optimales Verhältnis von Mycoplasmen zu Protein und HeLa-Zellen erzielt werden konnte.

Wie schon in den mit P60* durchgeführten Versuchen, konnte auch bei Einsatz von P60^f keine definitive Aussage über einen Unterschied in der Competition verschiedener P50-Varianten exprimierender Isolate von *M. hominis* getroffen werden: In der Regel ließ sich zwar das P50-defiziente Isolat 2539 in seiner Zytadhärenz stärker kompetitiv inhibieren als das P50-exprimierende Isolat FBG, allerdings zeigte sich dies nicht in allen durchgeführten Tests so deutlich wie in Abbildung 11 dargestellt. An dieser Stelle ist außerdem anzumerken, dass eine fehlende Immunfärbung des P50-Proteins mit den P50-spezifischen Antikörpern nicht zwangsläufig mit dem Verlust des Adhäsins einhergeht. Wie in Abb. 4 gezeigt, exprimiert das Isolat 6876 eine P50-Variante, die exakt in den antigenen Bereichen Mutationen aufweist. Der Befund, dass sich Isolat 6876 durch P60 gleichermaßen in seiner Zytadhärenz kompetitiv inhibieren liess wie das P50-exprimierende Isolat FBG, (hier nicht dargestellt), stützt somit doch die These, dass Isolate mit P50-Adhäsins ein ähnliches Adhärenzverhalten aufweisen. (Henrich et al., 1998).

Sowohl die Ergebnisse der durchgeführten Versuche mit dem rekombinanten Fusionsprotein P60* als auch die Untersuchungen mit dem rekombinanten P60^f zeigten, dass eine Adhärenz des Proteins an HeLa-Zellen, bzw. eine Verminderung der Mycoplasmenadhärenz durch den P60-Anteil der Proteine erfolgte und liefern

somit den eindeutigen Beweis der Vermutung von Weinhold (1998), dass das Membranprotein P60 an der Zytadhärenzvermittlung von *Mycoplasma hominis* beteiligt ist.

Bis dato wurden erst zwei Oberflächenproteine von *Mycoplasma hominis*, P50 und P100, als Adhärenz-vermittelnde Faktoren identifiziert. Beide sind in größerer Menge als P60 auf der Zellmembran lokalisiert (Henrich et al., 1993). Während P50 als Hauptadhäsin gilt, welches durch Variation von Größe und antigener Struktur die Immunantwort des Wirtes unterläuft (Zhang & Wise, 1996; Kitzerow et al., 1999), scheint das ebenfalls zytadhäsive P100-Protein größenkonstant zu sein und als substratbindende Domäne eines Peptidtransportsystems bei *M. hominis* zu dienen (Henrich et al., 1999). Lmp, ein weiteres Protein von *M. hominis*, wurde als Faktor charakterisiert, der an der Aggregation von Mycoplasmen, einer anderen Form der Adhärenz, beteiligt sein soll (Ladefoged, 2000).

P60 wurde als weiteres Adhäsion von *M. hominis* identifiziert, jedoch bleibt die Funktion dieses Proteins bei Vermittlung der Zytadhärenz noch ungeklärt. Denkbar wäre, dass es als konserviertes Oberflächenantigen eine Basis-Adhärenz ermöglicht. Darüberhinaus lässt die kürzlich entdeckte Interaktion des P60/P80-Proteinkomplexes mit einem putativ nukleotidbindenden, zytoplasmatischen Protein der HIT-Proteinfamilie eine weitere Funktion dieses Proteins vermuten. Bedingt durch diese neuen Ergebnisse wird das vormals *clp60*-Gen (conserved lipoprotein) genannte P60-Gen inzwischen als *hitB*-Gen bezeichnet (Kitzerow und Henrich, 2001). Da eukaryontische HIT-Proteine an apoptotischen Geschehen sowie Zelldifferenzierungs-relevanten Prozessen über ihre Wechselwirkung mit verschiedensten Kinasen teilhaben, könnte der P60/P80 Komplex der extrazelluläre Partner in einer Signaltransduktionskaskade sein, die zukünftig untersucht werden soll, um die biologische Bedeutung dieser an der Adhärenz beteiligten Proteine besser zu verstehen und deren Kombination und Zusammenspiel in einer Zelle nachvollziehen zu können.

6. Zusammenfassung

Um die Rolle des speziesspezifischen Proteins P60 bei der Zytadhärenz von *Mycoplasma hominis* zu charakterisieren, wurde das bereits früher von unserer Arbeitsgruppe beschriebene rekombinante Fusionsprotein P60* (Weinhold, 1998), bestehend aus dem Bereich des reifen P60-Proteins, sowie der Dihydrofolatreduktase (DHFR) und 6 Histidinen als Fusionspartner, aufgereinigt und in Kompetitionsassays eingesetzt. Es zeigte sich, dass P60* die Mycoplasmenadhärenz an HeLa-Zellen im Vergleich zur reinen DHFR stärker verringerte, und dass dieser Effekt nicht auf eine rein sterische Behinderung der Adhärenz durch den DHFR-Anteil des Fusionsproteins zurückzuführen war.

Der aus Mycoplasmen isolierte native Proteinkomplex, bzw. das Proteingemisch P60/P80 wurde ebenfalls in Tests eingesetzt, wobei die Adhärenz-/Inhibitionsassays eine Zytadhärenz dieser nativen Proteine vermuten ließen. Die Ergebnisse konnten jedoch nicht abgesichert werden, da sich bei den durchgeführten Kompetitionsassays ein adhärenzvermittelnder Effekt des zur Aufreinigung benutzten Detergenz NP-40 zeigte.

Das von unserer Arbeitsgruppe zeitgleich generierte P60^r, das als Vorläuferprotein mit Signalsequenz exprimiert wurde, ließ sich in löslicher Form aus *E. coli* aufreinigen und in Zell-ELISAs einsetzen. Hier zeigte sich sowohl eine Adhärenz des Proteins an Epithelzellen, als auch eine kompetitive Inhibition der Mycoplasmenadhärenz an HeLa-Zellen durch Zugabe des Proteins.

Das oberflächenlokalisierte P60-Protein wurde in den Experimenten dieser Arbeit als weiteres an der Zytadhärenzvermittlung von *M. hominis* beteiligtes Protein identifiziert. Die Analyse der biologischen Bedeutung dieses adhäsiven Proteins, z.B. im Rahmen einer Infektion, sowie die Funktion des P60/P80-Proteinkomplexes in Wechselwirkung mit dem zytoplasmatischen HIT-Protein wird nun Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

7. Literatur

Al-Harhi L., Roebuck K.A., Olinger G.G., Landay A., Sha B.E., Hashemi F.B., Spear G.T. (1999): Bacterial vaginosis-associated microflora isolated from the female genital tract activates HIV-1 expression.

J Acquir Immune Defic Syndr 21: 194-202

Almagor M., Kahane I., Gilon C., Yatziv S. (1986): Protective effects of the glutathione redox cycle and vitamin E on cultured fibroblasts infected by *Mycoplasma pneumoniae*.

Infect Immun 52: 240-44

Berns G. (1996): Charakterisierung eines *Mycoplasma hominis*-spezifischen Membranproteins: Die Variabilität seines Strukturgens in zwei unterschiedlich adhärennten Stämmen.

Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Blanchard A. (1997): Mycoplasmas and HIV infection a possible interaction through immune activation.

Wien Klin Wochenschr 109: 590-593

Blanchard A., Montagnier L. (1994): AIDS-associated mycoplasmas.

Annu Rev Microbiol 48: 687-712

Brandis H. (Hrsg.), Otte H.J. (1984): Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie: Mikroorganismen ohne Zellwand (Mollicutes)

Gustav Fischer Verlag, 5. Aufl.: 497-504

Boesen T., Emmersen J., Jensen L.T., Ladefoged S.A., Thorsen P., Birkelund S., Christiansen G. (1998): The *Mycoplasma hominis* vaa gene displays a mosaic gene structure.

Mol Microbiol 29: 97-110

Burnette W.N. (1981): „Western Blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.

Anal Biochem 112: 195-203

Cassell G.H., Cole B.C. (1981): Mycoplasmas as agents of human disease.

N Engl J Med. 304: 80-89

Christiansen G., Jensen L.T., Boesen T., Emmersen J., Ladefoged S.A., Schiøtz L.K., Birkelund S. (1997): Molecular biology of Mycoplasma.

Wien Klin Wochenschr 109: 557-61

Dienes L., Edsall G. (1937): Observation on the L-organism of Klieneberger.

Proc Soc Exp Biol Med 36: 740-44

Feldmann R.C., Henrich B., Kolb-Bachofen V., Hadding U.: Decreased metabolism and viability of *Mycoplasma hominis* induced by monoclonal antibody-mediated agglutination.

Infect Immun 60: 166-74

Hahn H., Falke D., Klein P. (1991): Mykoplasmen und Ureaplasmen

In: Medizinische Mikrobiologie, Springer Verlag: 485-90

Haier J., Nasralla M., Franco A.R., Nicolson G.L. (1999): Detection of mycoplasmal infections in blood of patients with rheumatoid arthritis.

Rheumatology (Oxford) 38: 504-509

Henrich B., Feldmann R.C., Hadding U. (1993): Cytoadhesins of *Mycoplasma hominis*.

Infect Immun 61: 2945-2951

Henrich B., Lang K., Kitzerow A., MacKenzie C., Hadding U. (1998): Truncation as a novel form of variation of the p50 gene in *Mycoplasma hominis*.

Microbiology 144: 2979-2985

Henrich B., Hopfe M., Kitzerow A., Hadding U. (1999): The adherence-associated lipoprotein P100, encoded by an opp operon structure, functions as the oligopeptide-binding domain OppA of a putative oligopeptide transporting system in *Mycoplasma hominis*.

J Bacteriol 181: 4873-4878

Hill G.B. (1998): Preterm birth: associations with genital and possibly oral microflora. *Ann Periodontol* 3: 222-232

Inamine J.M., Ho K.C., Loechel S., Hu P.C. (1990): Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma gallisepticum*.

J Bacteriol 172: 504-506

Kenney R.T., Li J.S., Clyde W.A. Jr., Wall T.C., O'Connor C.M., Campbell P.T., Van Trigt P., Corey G.R. (1993): Mycoplasmal pericarditis: evidence of invasive disease. *Clin Infect Dis* 17 Suppl 1: 58-62

Kitzerow A., Hadding U., Henrich B. (1999): Cyto-adherence studies of the adhesin P50 of *Mycoplasma hominis*.

J Med Microbiol 48: 485-493

Kitzerow A., Henrich B. (2001): The cytosolic HinT protein of *Mycoplasma hominis* interacts with two membrane proteins.

Molecular Microbiology 41: 279-287

Küchle C., Abele-Horn M., Menninger M., Held E., Heesemann J. (1997): *Mycoplasma hominis*. Ein seltener Erreger der akuten Pyelonephritis.

Dtsch Med Wochenschr 122: 542-544

Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4.

Nature 227: 680-685

Ladefoged S.A. (2000): Molecular dissection of *Mycoplasma hominis*.
APMIS Suppl 97: 1-45

Luttrell L.M., Kanj S.S., Corey G.R., Lins R.E., Spinner R.J., Mallon W.J., Sexton D.J.
(1994): *Mycoplasma hominis* septic arthritis: two case reports and review.
Clin Infect Dis 19: 1067-1070

Mardh P.A. (1983): Mycoplasmal PID: a review of natural and experimental
infections.
Yale J Biol Med 56: 529-536

Meyer R.D., Clough W. (1993): Extragenital *Mycoplasma hominis* infections in adults:
emphasis on immunosuppression.
Clin Infect Dis 17 Suppl 1: 243-249

Mossad S.B., Rehm S.J., Tomford J.W., Isada C.M., Taylor P.C., Rutherford I., Sorg
S., McHenry M.C. (1996): Sternotomy infection with *Mycoplasma hominis* : a cause
of „culture negative“ wound infection.
J Cardiovasc Surg (Torino) 37: 505-509

Mufson M.A. (1983): *Mycoplasma hominis*: a review of its role as a respiratory tract
pathogen of humans.
Sex Transm Dis 10(4Suppl): 335-340

Nunez-Troconis J.T. (1999): [*Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in
different gynecologic diseases]. (Abstract)
Invest Clin 40: 9-24

Razin S. (1985): *Mycoplasma* adherence.
In: *The Mycoplasmas*, vol. 4, *Mycoplasma Pathogenicity*. Edited by S. Razin and
M.F. Barile. Orlando, Fla.: Academic Press: 161-202

Razin S.: Mycoplasmal adhesins and lectins.

In *Microbial Lectins and agglutinins*. Edited by D. Mirelman, New York: John Wiley and Sons: 217-235

Razin S. (1987): Peculiar properties of mycoplasmas: The smallest self-replicating prokaryotes
FEMS Microbiology Letters 100: 423-432

Romero-Arroyo C.E., Jordan J., Peacock S.J., Willby M.J., Farmer M.A., Krause D.C. (1999): Mycoplasma pneumoniae protein P30 is required for cytodherence and associated with proper cell development.
J Bacteriol 181: 1079-1087

Sielaff T.D., Everett J.E., Shumway S.J., Wahoff D.C., Bolmann R.M. 3rd, Dunn D.L. (1996): *Mycoplasma hominis* infections occurring in cardiovascular surgical patients.
Ann Thorac Surg 61: 99-103

Taylor-Robinson D., Furr P.M. (1997): Genital mycoplasma infections.
Wien Klin Wochenschr 109: 578-583

Thomsen A.C. (1983): Occurrence and pathogenicity of *Mycoplasma hominis* in the upper urinary tract: a review.
Sex Transm Dis 10(4 Suppl): 323-326

Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications
Proc Natl Acad Sci 76: 4350-4354

Tully J.G., Whitcomb R.F. (1979): Human and animal mycoplasmas.
In *The Mycoplasmas*. vol.II., New York, Academic Press: 1-509

Ullmann U., Schubert S., Krausse R. (1999): Comparative in-vitro activity of levofloxacin, other fluoroquinolones, doxycycline and erythromycin against *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*.
J Antimicrob Chemother 43 Suppl C: 33-36

Weinhold M. (1998): Expression und Charakterisierung eines rekombinanten 60 kDa Membranproteins von *Mycoplasma hominis*.

Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Zhang Q., Wise K.S. (1996): Molecular basis of size and antigenic variation of a *Mycoplasma hominis* adhesin encoded by divergent vaa genes.

Infect Immun 64: 2737-2744

Zhang Q., Wise K.S. (1997): Localized reversible frameshift mutation in an adhesin gene confers a phase-variable adherence phenotype in mycoplasma.

Mol Microbiol 25: 859-869

8. Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	Aqua destillata
Ak	Antikörper
CCU	Colour Changing Units
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
HIT	“Histidine-Triad“-Protein
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
Lsg.	Lösung
M.	Mycoplasma
mAk	Monoklonaler Antikörper
min	Minute
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
o/n	über Nacht
P60*	P60 + DHFR + 6 Histidine
P60 ^r	P60 + Membranverankerungs- signalsequenz
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Upm	Umdrehungen pro Minute
vaa	variable adherence-associated
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

9. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Mike C. Papenhoff
Adresse	Franklinstr. 44A D-40479 Düsseldorf
Geburtsdatum und -ort	18. Mai 1974, Gelsenkirchen

Schulbildung

1980 – 1984	Wittenbrink-Grundschule, Dorsten
1984 – 1993	St. Ursula Gymnasium, Dorsten
7. Juni 1993	Abitur

Berufsausbildung

1994 - 2000	Medizinstudium, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
März 1996	Ärztliche Vorprüfung
März 1997	Erstes Staatsexamen
April 1999	Zweites Staatsexamen
Mai 2000	Drittes Staatsexamen, Gesamtnote „Gut“

Beruf

Seit 01.07.2000	Arzt im Praktikum, Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Essen
-----------------	---