

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Klaus Pfeffer

**Charakterisierung des heterolog in *E. coli* exprimierten
Membranproteins P60 von *Mycoplasma hominis*:
P60, ein sezerniertes Protein!**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
vorgelegt von

Ricarda Hoffmann

2007

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan
Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Birgit Henrich
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Karl Köhrer

Ich danke Frau PD Dr. rer. nat. Birgit Henrich für die Vergabe des Themas, die Betreuung bei dieser Arbeit sowie für zahlreiche hilfreiche Anregungen und konstruktive Kritik.

Des weiteren danke ich Frau Dr. Miriam Hopfe, Frau Dr. Anja Giese, Frau Marzena Czarna und allen weiteren beteiligten Mitarbeitern des Instituts für medizinische Mikrobiologie für Ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Roman Riesch für sein stetes Motivieren sowie für seine Hilfe bei der Bändigung benutzerunfreundlicher Computerprogramme.

Besonders danke ich meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Zuspruch die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

1.	Einleitung	1
1.1	Pathogenität von Bakterien	1
1.2	Die Rolle der äußeren Bakterienmembran für Adhäsion und Proteinsekretion	2
1.3	Bekannte sezernierte Proteine und ihre Funktion	5
1.4	Adhäsion und Proteinsekretion bei zellwandlosen Bakterien	5
1.5	Themenstellung	7
2.	Material	9
2.1	Chemikalien	9
2.2	Puffer und Stammlösungen	10
2.3	Bakterien	13
2.4	Plasmide	13
2.5	Antikörper	14
2.6	Molekulargewichtsmarker	14
2.7	Enzyme	14
2.8	Geräte und Hilfsmittel	15
3.	Methoden	16
3.1	Bakteriologische Methoden	16
3.1.1	Kultivierung von <i>Mycoplasma hominis</i>	16
3.1.2	Kultivierung von <i>E. coli</i>	16
3.1.3	Keimzahlbestimmung	17
3.2	Molekularbiologische Methoden	17
3.2.1	Präparation transformationskompetenter Bakterien	17
3.2.2	Plasmid DNA Präparation	18
3.2.3	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration in einer Lösung	18
3.2.4	Transformation von Bakterien	19
3.2.5	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	19
3.3	Proteinbiochemische Methoden	19
3.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung	19
3.3.2	Proteinauftrennung unter denaturierenden Bedingungen	19

	Coomassie Blau Färbung von Proteinen in Polyacrylamid-	20
	gelen	
	Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen	20
3.3.3	Blot-Verfahren	21
	Western Blot-Verfahren	21
	Dot Blot-Verfahren	21
3.3.4	Fraktionierung und Aufreinigung von bakteriellen Proteinen	22
	Präparation von Membran und Zytoplasma	22
	Präzipitation von Proteinen aus dem Kulturüberstand von	23
	Bakterien	
3.3.5	Limitierte Proteolyse mit Trypsin	23
3.3.6	Test der Proteinstabilität in <i>Mycoplasma hominis</i>	23
3.4	Immunologische Methoden	24
3.4.1	Immunologische Detektion von Antigenen	24
3.4.2	Schachbrett-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent As-	25
	say)	
3.4.3	FACS (Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer)-Analyse von <i>E.</i>	25
	<i>coli</i> Klonen	
4.	Ergebnisse	27
4.1	Ausgangssituation	27
4.2	Expression der verschiedenen rekombinanten P60 Kon-	28
	strukte	
4.3	Die rekombinanten P60 Konstrukte liegen in <i>E. coli</i> löslich	31
	und unlöslich vor	
4.4	Keine der P60 Varianten wird bei <i>E. coli</i> oberflächen-	33
	exponiert präsentiert	
4.5	Die P60 Varianten werden in den Kulturüberstand abgege-	36
	ben	
4.6	<i>Mycoplasma hominis</i> sezerniert Proteine	38
	Membranproteine	38
	Zytoplasmatische Proteine	39
	Proteinstabilität	42

5.	Diskussion	45
6.	Zusammenfassung	49
7.	Literaturverzeichnis	50
8.	Abkürzungen	57

1. Einleitung

1.1 Pathogenität von Bakterien

Über 120 Jahre nach Formulierung der Koch'schen Postulate (Koch, 1884) und über 70 Jahre nach Entdeckung des Penicillins (Fleming, 1929) sind durch Bakterien ausgelöste Krankheiten weltweit immer noch eine der häufigsten Todesursachen. Was macht Organismen, die nur aus einer einzigen Zelle bestehen, so gefährlich?

Prinzipiell kann ein Bakterium auf zwei Wegen einen anderen Organismus schädigen: Entweder über den direkten Kontakt durch strukturgebende Bestandteile, wie zum Beispiel Membranproteine, oder über toxische Stoffwechselprodukte.

Im Normalfall ist die Kolonisierung mit einem bestimmten Bakterium erste Voraussetzung für eine mögliche Schädigung des Organismus. Lediglich bei einigen Toxinbildnern, wie z.B. *Staphylococcus aureus* oder *Clostridium botulinum* ist eine Vergiftung von Mensch und Tier mit dem Toxin – meist durch Aufnahme von kontaminierten Nahrungsmitteln – ohne direkte Besiedlung mit dem jeweiligen Bakterium möglich (Holečková et al. 2002, McLaughlin et al. 2004). Bedingung für eine Kolonisation mit Bakterien ist das Vorhandensein von Adhäsinen, die das Anheften an die Oberfläche von Haut oder Schleimhaut möglich machen. Der Verlust dieser Adhäsine, zum Beispiel durch Mutation, bewirkt eine Verminderung bzw. einen Verlust an Infektiosität. Umgekehrt bedeutet eine Rückgewinnung der adhäsiven Eigenschaften erneut Infektiosität und Virulenz (Razin et al., 1998).

Zahlreiche Bakterien besitzen neben Adhäsinen auch Invasine. Diese machen ein Eindringen des Bakteriums in den Wirtsorganismus möglich. Zu den Invasinen zählen Enzyme wie die Hyaluronidase, aber auch Proteasen, Lipasen und DNAsen, darüber hinaus Phagozytose induzierende Stoffe und Organellen, die eine aktive Beweglichkeit des Bakteriums ermöglichen (Li et al. 2003). Unter Impedinen oder Etablinen versteht man Faktoren, welche die Wirtsabwehr herabsetzen, also beispielsweise Antikörper inaktivieren oder eine Barriere um den Erreger bauen, wie dies bei *Staphylococcus aureus* charakterisiert ist (Sawai et al, 1997). Dieser Erreger kann mit Hilfe der von ihm sezere-

nierten Koagulase Fibrinogen zu Fibrin umwandeln und so eine schwer durchdringbare Fibrinschicht um sich herum aufbauen. Andere Bakterien besitzen Kapseln als Phagozytoseschutz oder zerstören mit sezernierten Produkten wie Hämolyisin oder Leukozidin direkt körpereigene Abwehrzellen.

Chlamydien und Shigellen vermehren sich intrazellulär und schädigen durch Lyse der Wirtszellen. Toxine, die aktiv sezerniert, nach Lyse des Erregers freigesetzt oder an der Oberfläche des Bakteriums fixiert bleiben, können lokal oder systemisch zu einer Wirtsschädigung führen. Insgesamt haben Bakterien also – obwohl sie nur aus einer einzigen Zelle bestehen - mannigfaltige Möglichkeiten, im Wirtsorganismus zu persistieren als auch ihn zu schädigen.

1.2 Die Rolle der äußeren Bakterienmembran für Adhäsion und Proteinsekretion

Der äußeren Membran eines Bakteriums kommt bei der Beeinflussung von Wirtszellprozessen eine entscheidende Bedeutung zu. Sie ist am ersten Schritt der Interaktion von Bakterium und Wirtsorganismus, der Adhäsion, beteiligt. Darüber hinaus enthält sie Transportsysteme für den Import und Export von Stoffen, die für das Bakterium lebensnotwendig, jedoch für den Wirt schädigend sein können.

Die Adhäsion von Bakterien kann in unspezifische und spezifische Adhäsionsvorgänge unterteilt werden. Zur unspezifischen Adhäsion gehören als erste Stufe physikalisch-chemische Wechselwirkungen, wie van der Waals Kräfte und die elektrische Anziehung gegensätzlicher Ladungen. Zahlreiche Bakterien besitzen mit Fibrillen oder Fimbrien meist in der äußeren Membran verankerte adhäsive Strukturen. Die hauptsächlich bei gram-positiven Bakterien vorhandenen Fibrillen sind im Gegensatz zu den Fimbrien der gram-negativen Bakterien eher amorph und weisen nicht deren filamentöse Form auf (Phillips et al., 1981). Sie zählen ebenso zu den eher unspezifischen Adhärenzfaktoren wie hydrophobe Adhäsine, die potentiell mit jedem hydrophoben Rezeptor interagieren (Doyle & Rosenberg, 1990).

Viele Adhäsine sind jedoch hochspezifisch in Bezug auf Wirt und Zielgewebe. Fehlen ihre spezifischen Rezeptoren, so kommt es nicht zu einer Anheftung. Dieser Umstand erklärt, warum zahlreiche Bakterien, die bei Tieren schwere

Krankheiten auslösen, für Menschen völlig ungefährlich sind, andere wiederum nur beim Menschen Infektionen hervorrufen. *Neisseria gonorrhoeae* ist ein Beispiel für einen extrem wirtsgebundenen Keim, der praktisch nur beim Menschen Infektionen verursacht. Er siedelt sich dort auf den Schleimhäuten an und ist Erreger der Gonorrhoe, der gonorrhoeischen Säuglingskonjunktivitis, eitriger Gonarthritiden und aufsteigender Genitalinfektionen (Rytönen et al., 2001).

Bakterien, die die Fähigkeit haben, mehrere Adhäsine zu exprimieren, scheinen dies nicht immer gleichzeitig zu tun, sondern die einzelnen Adhäsine kontrolliert zur Expression zu bringen. Sie sind so in der Lage, ihr Adhärenzprofil zu verändern (Klemm & Schembri, 2000). Für fimbrientragende *E. coli*-Stämme konnte gezeigt werden, dass die Anheftung an abiotische Oberflächen zu einer veränderten Zusammensetzung der oberflächenlokalisierten Membranproteine führt. So konnte nachgewiesen werden, dass die Adhäsion des Bakteriums zu einer Verminderung der Menge von vier oberflächenlokalisierten Membranproteinen führte (Otto et al., 2001).

Für die Abgabe (Sekretion) und Aufnahme von Stoffen sowie für den Transport von Adhäsinen an die Bakterienoberfläche sind verschiedene Mechanismen verantwortlich. Einer der wichtigsten Faktoren für die Translokation von Stoffen über die Membran sind ABC-Transporter, aktive Transportsysteme der Zelle, die in Pro- und Eukaryonten weit verbreitet sind. Zu den bekannten Funktionen der ABC-Transporter zählen unter anderem der Transport von Glycerol-3-phosphat, Maltose oder Maltodextrin, Sulfat oder Thiosulfat, Phosphat, Vitamin B12 usw. (Tomii & Kanehisa, 1998).

Für gram-negative Bakterien wie *E. coli* zählen OmpA, OmpX, die Phospholipase A, unspezifische Porine wie OmpF und PhoE, substratspezifische Proteine wie LamB- und TonB- abhängige Rezeptoren zu den bekanntesten oberflächenlokalisierten Membranproteinen. Für diese ist eine zylinderförmige antiparallele β -Faltblattstruktur, („ β -barrel“) charakteristisch, die sich durch die Doppellipidschicht zieht. OmpA spielt eine strukturelle Rolle für die Integrität der bakteriellen Zelloberfläche. Es scheint eine physikalische Verbindung zwischen Außenmembran und Peptidoglykanschicht herzustellen. Ein durchgängiger transmembranöser Kanal konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. OmpX gehört zu den hochkonservierten Proteinen, die eine Rolle in der Her-

absetzung der Wirtsabwehr spielen. Ein OmpX-Protein von *Yersinia enterocolitica* bewirkt eine Adhäsion an und eine Invasion in eukaryonte Gewebekulturzellen, zwei weitere OmpX-Proteine von *Salmonella typhimurium* sind von Bedeutung für das Überleben in Makrophagen und können Teile des Komplementsystems inhibieren (Heffernan et al., 1994).

Porine erlauben die Diffusion von kleinen hydrophilen Molekülen und scheinen abgesehen von einer Selektivität für Kationen oder Anionen keine besondere Substratspezifität zu haben. Bei den substratspezifischen Porinen wurde von Luckey und Nikaido 1980 nachgewiesen, dass LamB von *E. coli* spezifisch Maltose und Maltodextrin aufnimmt, aber kaum Sucrose. Die Arbeitsgruppe von Hardesty zeigte dagegen 1991 für ScrY, ein Protein von *S. typhimurium*, dass es spezifisch Sucrose aufnimmt.

Die TonB abhängigen Rezeptoren, die in allen gram-negativen Bakterien vorkommen, sind hochmolekulare Membranproteine, die energieabhängig in die Aufnahme großer Substrate wie Eisensiderophore-Komplexe oder Vitamin B 12 involviert sind. Einige dieser Rezeptoren sind in der Lage, zusammen mit einem Protein der inneren Membran, dem Zytoplasma die Anwesenheit von Substraten an der Zelloberfläche zu signalisieren (Koebnik et al., 2000).

Die bekanntesten Sekretionssysteme bei gram-negativen Bakterien werden in die Typen I, II und III unterteilt. Das Typ I Sekretionssystem besteht aus drei Proteinen, die einen Kanal durch innere und äußere Membran bilden. Proteine können auf diesem Weg in einem Schritt durch beide Membranen befördert werden. Bei *E. coli* wird beispielsweise Hämolyisin auf diese Weise sezerniert. Beim Typ II System werden Proteine unter Abspaltung einer aminoterminalen Signalsequenz mit Hilfe des Sec-Systems durch die innere Membran geschleust, um dann durch eine Pore in der Außenmembran nach außen zu gelangen. Das Typ III System dient zum Transport von Proteinen direkt vom Zytoplasma des Bakteriums in das einer eukaryonten Zielzelle (China & Goffaux, 1999; Folders et al., 2001).

Für die Exposition von Adhäsinen an der Oberfläche, aber auch für die Sekretion von Proteinen, gibt es neben Chaperon-Transportsystemen in gram-negativen Bakterien auch Autotransporter. Hier enthält das zu translozierende Protein selbst die nötigen Informationen, um die Bakterienoberfläche zu errei-

chen (Klemm & Schembri, 2000). Das AIDA-I Adhäsion von *E. coli* beispielsweise passiert unter Abspaltung eines Signalpeptides die innere Membran und enthält noch zwei weitere Domänen, die N-terminale α -Domäne und die C-terminale β -Domäne. Letztere dringt in die Außenmembran ein und bildet eine β -Faltblatt Struktur, durch welche die α -Domäne zur Bakterienoberfläche geschleust wird. Durch Autokatalyse wird die adhäsive α -Domäne abgespalten, bleibt aber durch Interaktion mit der β -Domäne mit der Zelloberfläche assoziiert (Suhr et al., 1996).

1.3 Bekannte sezernierte Proteine und ihre Funktion

Die Liste bekannter sezernierter Proteine ist schier endlos, und täglich kommen neue hinzu. Allein für *Helicobacter pylori* wurden unter proteinfreien Kultivierungsbedingungen 26 sezernierte Proteine identifiziert, unter ihnen putative Oxidoreduktasen, Flagellarproteine, Fragmente des Toxins VacA, eine Serinprotease und zahlreiche Proteine noch unbekannter Funktion (Bumann et al., 2002). Sehr virulente *Streptococcus pyogenes* Stämme sezernieren in großen Mengen SIC, einen Komplementinhibitor. Dieser bindet SLPI („Secretory leukocyte proteinase inhibitor“) und Lysozym und ist in der Lage, deren antibakterielle Aktivität zu blocken (Fernie-King et al., 2002). Die Serinprotease A, ein Autotransporter von *Neisseria meningitidis* ist ein oberflächenexponiertes Membranprotein, das nach Abspaltung eines Signalpeptides sezerniert werden kann (Turner et al., 2002). Diese Auswahl sezernierter Proteine macht deutlich, wie vielfältig die Funktionen sekretierter Proteine sind.

1.4 Adhäsion und Proteinsekretion bei zellwandlosen Bakterien

Mycoplasmen sind zellwandlose Bakterien und die kleinsten sich selbst replizierenden Organismen. Sie besitzen nur eine einzige Membran, die das Zytoplasma von der Außenwelt abtrennt. Durch das sehr kleine Genom und die daraus bedingte minimierte Zellausstattung haben sie einen umfangreichen Bedarf an Nährstoffen, der nur durch ein parasitäres Verhalten mit Anbindung an die Wirtszelle und Aufnahme von externen Nährstoffen gedeckt werden kann. Die bisher am intensivsten untersuchten mycoplasmalen

Adhäsine sind die von *Mycoplasma pneumoniae*, einem Erreger der primär atypischen Pneumonie. Dieses Bakterium besitzt eine „Tip“-Struktur, die an die Oberfläche von Wirtszellen bindet (Collier & Clyde 1971, 1974) und neben P1, dem Hauptadhäsin von *M. pneumoniae* weitere Adhäsions-vermittelnde Proteine in der „Tip“-Struktur trägt (Kahane et al., 1985; Stevens & Krause, 1990, 1991). *Mycoplasma genitalium*, die Spezies mit der bislang kleinsten bekannten Genomgröße von nur 580 kbp, zeigt starke Homologien zu *M. pneumoniae* (Inamine et al., 1989) und bildet ebenfalls eine Anheftungsorganelle aus.

Es besitzen jedoch nicht alle zytadhäsiven Mycoplasmen eine „Tip“-Struktur. Für *Mycoplasma hominis* konnten mit P50, P60, P80 und P100 vier Membranproteine charakterisiert werden, die als Adhäsine fungieren (Henrich et al., 1993). In Adhärenztests von *Mycoplasma hominis* an HeLa-Zellen führte jeweils die Zugabe eines monoklonalen Antikörpers gegen eines der genannten Proteine zu einer Abnahme der Zytadhäsion. Diese Abnahme war bei Zugabe von Antikörpern gegen P60 und P80 geringer als bei P50 und P100, was den geringeren Anteil dieser Proteine in der Mycoplasmenmembran reflektiert oder auch auf die eventuell geringeren adhäsiven Eigenschaften dieser Proteine hinweist. Während P50 eine Antigenvariation aufweist, sind P60 und P80 hochkonserviert in Bezug auf Größe und Antigenität (Henrich et al., 1993). P50 und P100 konnten affinitätschromatographisch aufgereinigt werden und in Adhärenztests an HeLa-Zellen isoliert untersucht werden. Für P60 und P80 war eine derartige Untersuchung lange Zeit nicht möglich, da bei dem Versuch, P60 aufzureinigen, P80 koeluierte. 2001 konnten Kitzerow und Henrich zeigen, dass P60 und P80 einen Komplex in der Mycoplasmenmembran bilden und über den P80-Teil mit einem zytoplasmatischen Protein interagieren.

Für Mycoplasmen wurden zwar in der Vergangenheit eine Reihe zytadhäsiver Proteine beschrieben, bisher ist jedoch wenig über sezernierte Mycoplasmenproteine bekannt. P37, ein Protein von *Mycoplasma hyorhinis*, wurde auf Fibrosarkomzellen von Mäusen gefunden. Diese Mäusezelllinie zeichnete sich durch eine starke Invasivität aus, die durch Zugabe eines P37-spezifischen Antikörpers inhibiert werden konnte. Eine Infektion von P37-freien Zellen mit *M. hyorhinis* resultierte in P37-haltigen Zellen. Dudler und Mitarbeiter stellten

die Hypothese auf, dass es sich bei P37 um einen Bestandteil eines hochaffinen Transportsystems in *M. hyorhina* handelt, und dass dieser N-terminal in der Membran verankert ist. P37 besitzt darüber hinaus einen Sequenzabschnitt, der typische Merkmale eines Signalpeptides für den Proteinexport trägt (Dudler et al., 1988). Für *M. fermentans* konnten Davis und Wise 2002 zeigen, dass das oberflächenlokalisierte Lipoprotein MALP posttranslational prozessiert wird und somit in verschiedenen Lipid-tragenden Varianten vorkommt: in voller Länge von etwa 41kDa (MALP-404) und mit einer Größe von etwa 2kDa (MALP-2). Dem MALP-2 Protein fehlt unter anderem das im MALP-404 vorkommende SLA (selective lipoprotein associated) Motiv. Der als RF (released fragment) bezeichnete, stabile, etwa 39kDa große Abschnitt wird vom reifen Protein (MALP-404) - vermutlich erst extrazellulär - abgespalten und in den Kulturüberstand abgegeben. Die gezielte Abspaltung eines Fragmentes bietet *M. fermentans* die Möglichkeit einer Veränderung seines Phänotyps, und weist auf einen neuen Weg in Mycoplasmen hin, wie strukturbildende Oberflächenantigene – unter noch nicht näher charakterisierten Bedingungen – zu sekretierten Proteinen werden können.

1.5 Themenstellung

Das Membranprotein P60 von *Mycoplasma hominis*, dessen weitergehende Charakterisierung Gegenstand dieser Arbeit war, wurde ehemals aufgrund fehlender Aufreinigungsverfahren des nativen Proteins rekombinant als Fusionsprotein in *E. coli* hergestellt (Klon 3.2). Das mit der Dihydrofolatreduktase und sechs Histidinen fusionierte rekombinante P60 zeigte Adhäsion an HeLa-Zellen, die mit dem P60-spezifischen monoklonalen Antikörper CG4 zu inhibieren war (Weinhold, 1998). Da zum damaligen Zeitpunkt nicht völlig ausgeschlossen werden konnte, dass auch die Dihydrofolatreduktase und die sechs Histidine einen Einfluss auf die Adhäsion haben, und sich isolierte Adhäsine möglicherweise anders verhalten als membrangebundene, sollte versucht werden, in *E. coli* exprimiertes P60 oberflächenexponiert zu verankern, um in diesen P60-präsentierenden *E. coli* Mutanten die P60-vermittelte Adhäsion eines Bakteriums isoliert betrachten zu können.

Um einen Einbau in die äußere Membran von *E. coli* zu erreichen, wurde P60 mit Abschnitten von TraT, einem oberflächenlokalisierten Membranprotein von *E. coli* gekoppelt. Taylor und Mitarbeiter hatten 1990 TraT als geeignetes Vehikel zum Transport von Fremdan antigenen an die Oberfläche von *E. coli* beschrieben. TraT, ein nicht essentielles Protein von *E. coli*, bewirkt eine Verstärkung der Phagozytoseresistenz und eine „plasmid surface exclusion“ (Achtmann et al., 1977), die die unproduktive, auf den Plasmidaustausch ausgerichtete Verbindung zweier Bakterien, die bereits das gleiche Plasmid tragen, verhindert. Im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Universität Düsseldorf wurden neben dem eingangs beschriebenen Klon 3.2, der P60 in Fusion mit Dihydrofolatreduktase exprimiert, und einem *E. coli* Klon, der den mycoplasmalen P60-Vorläufer exprimiert und möglicherweise auch prozessiert, drei weitere *E. coli* Klone hergestellt, die statt der mycoplasmalen Signalsequenz des P60 verschieden lange Teilstücke von TraT dem Progen vorge-schaltet exprimieren. Ziel dieser Arbeit stellte die Charakterisierung von P60 in diesen *E. coli* Mutanten dar, speziell in Hinblick auf die Frage, ob sich in diesen *E. coli* Mutanten P60 tatsächlich oberflächenexponiert zeigt.

2. Material

2.1 Chemikalien

6-Aminohexansäure	Merck
Ampicillin	Sigma
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Merck
Arginin	Sigma
β -Mercaptoethanol	Merck
Bacto Tryptone	Difco (Becton Dickinson)
Bromphenolblau	Merck
BSA (Bovines Serum-Albumin)	Sigma
CaCl_2 (Calciumchlorid)	Merck
4-Chloro-1-naphthol	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R 250	Merck
ECL (Luminol)	Pierce
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
FCS (fetal calf serum)	Cytogen
Formaldehydlösung	Merck
Glucose	Merck
Glycerin	Merck
Glycin	ICN
H_2O_2 (Wasserstoffperoxid)	Merck
HCl (Salzsäure)	Merck
Hefeextrakt	Gibco BRL
IPTG (Isopropyl- β -Thiogalactopyranosid)	ICN
Kaliumacetat	Merck
Kanamycin	Serva
KCl (Kaliumchlorid)	Merck
KH_2PO_4 (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck
LB-Broth-Base	Invitrogen
Malachitgrün	Sigma
Methanol	Merck
MgCl_2 (Magnesiumchlorid)	Merck

Milchpulver	Oxoid
MnCl ₂ (Mangan(II)chlorid)	Merck
MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure)	Sigma
NaCl (Natriumchlorid)	Merck
NaH ₂ PO ₄ (Natriumdihydrogenphosphat)	Merck
Na ₂ HPO ₄ (di-Natriumhydrogenphosphat)	Merck
Na ₂ CO ₃ (Natriumcarbonat)	Merck
NaN ₃ (Natriumazid)	Merck
Na ₂ S ₂ O ₃ (Natriumthiosulfat)	Merck
Pefabloc SC PLUS	Roche
Pferdeserum	Gibco BRL
Phenolrot	Merck
Phosphorsäure	Merck
PPLO-Broth	Difco (Becton Dickinson)
RbCl (Rubidiumchlorid)	Sigma
Röntgenfilmentwickler	Kodak
Röntgenfilmfixierer	Kodak
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck
Silbernitrat	Merck
TCA (Trichloressigsäure)	Merck
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Sigma
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck

2.2 Puffer und Stammlösungen

Anode-I-Puffer	30mM Tris-Base 20% (v/v) Methanol
Anode-II-Puffer	300mM Tris-Base 20% (v/v) Methanol

Argininmedium pH 6,5	2,1% (w/v) PPLO-Broth 10% (v/v) Pferdeserum 10% (v/v) Hefeextrakt (10% [w/v]) 5% (v/v) Argininlösung (20% [w/v])
Bradford-Proteinreagenz	66% (v/v) Phosphorsäure 33% (v/v) Ethanol 0,067% (w/v) Coomassie Blue
4-Chloro-1-naphtholfärbelösung	79,92% (v/v) PBS 19,98% (v/v) Methanol 0,1% (v/v) H ₂ O ₂ (30%) 3,4mM 4-Chloro-1-naphthol
Coomassie-Entfärbelösung	20% (v/v) Ethanol 7,5% (v/v) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	50% (v/v) Ethanol 7,5% (v/v) Essigsäure 0,1% (w/v) Coomassie Blue R250
Elektrophoresepuffer für Polyacrylamidgele pH 8,5	384mM Glycin 50mM Tris-Base 0,1% (w/v) SDS
Entwicklerlösung für Silberfärbung	6% (w/v) Natriumcarbonat 0,0185% (v/v) Formaldehyd(37%) 0,004% (w/v) Natriumthiosulfat
FACS-Puffer	137mM NaCl 7,6mM Na ₂ PO ₄ 1,8mM KH ₂ PO ₄ 2,7mM KCl 5% (v/v) FCS 0,1% (w/v) NaN ₃

Färbelösung für Silberfärbung	0,2% (w/v) Silbernitrat 0,028% (v/v) Formaldehyd(37%)
Fixierlösung I für Silberfärbung	50% (v/v) Methanol 12% (v/v) Essigsäure 0,0185% (v/v) Formaldehyd(37%)
Fixierlösung II für Silberfärbung	25% (v/v) Methanol 12% (v/v) Essigsäure
Kathodenpuffer	40mM 6-Aminohexansäure 25mM Tris-Base 20% (v/v) Methanol
Malachitgrünfärbelösung	0,4M Tris/HCl pH 6,8 45% (v/v) Glycerin 0,2% (w/v) Malachitgrün
PBS-Puffer pH 7,3	137mM NaCl 7,6mM Na ₂ PO ₄ 2,7mM KCl 1,8mM KH ₂ PO ₄
RF1-Lösung pH 5,8	100mM RbCl 50mM MnCl ₂ 30mM Kaliumacetat 10mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerin
RF2-Lösung pH 6,8	10mM MOPS 10mM RbCl 75mM CaCl ₂ 15% (v/v) Glycerin

SDS-PAGE- Probenpuffer	60mM Tris/HCl pH 6,8 9% (v/v) Glycerin 5% (v/v) β -Mercaptoethanol 2% (w/v) SDS 0,03% (w/v) Bromphenolblau
SOC-Medium pH 7,0	20% (w/v) Bacto Tryptone 5% (w/v) Hefeextrakt 8,6mM NaCl 2,5mM KCl 10mM $MgCl_2$ 20mM Glucose
Sonication-Puffer	300mM NaCl 50mM Na-phosphat pH 7,8
Western Blot Stripping Puffer	100mM β -Mercaptoethanol 62,5mM Tris/HCl pH 6,8 2% (w/v) SDS

2.3 Bakterien

M. hominis

FBG	Patientenisolat aus Freiburg
-----	------------------------------

E. coli

DH5 α F'IQ	Life Technologies
SG13009	QIAGEN

2.4 Plasmide

pQE 41	QIAGEN
pQE 60	QIAGEN

2.5 Antikörper

Antikörper-haltige Hybridomzellkulturüberstände aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf:

<u>Monoklonaler Antikörper</u>	<u>Antigen</u>	<u>Eingesetzte Verdünnung</u>
FB4	P45	pur
BA10	P50	1:10
AH10	P55	pur
CG4	P60	1:10
LD7	P68	pur
BE4, LF8, NB12	P80	1:5
TF6	P100/OppA	pur
ME3 (Aszites)	EF-Tu	1:2000

Der Antikörpergehalt bei Hybridomzellkulturüberständen betrug 20-50µg/ml, bei Aszites 0,9-9mg/ml.

Weitere Antikörper

S21-31 (α -LPS)	Prof. H. Brade, Forschungszentrum Borstel (Brade et al., 1996)
α -Maus Peroxidase IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories
α -Maus FITC IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories

2.6 Molekulargewichtsmarker

Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range	Bio-Rad
SDS-PAGE Standards, Low Range	Bio-Rad

2.7 Enzyme

Trypsin T-1426; 11,6 units/mg	Sigma
Trypsin-Inhibitor T-9003	Sigma

2.8 Geräte und Hilfsmittel

3MM-Papier	Whatman
Dot Blot Kammer	Schleicher & Schuell
FACS	Becton Dickinson
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson
High Pure Plasmid Isolation Kit	Boehringer Mannheim
Microtiterplatten	Nunc
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell
Objektträger	Engelbrecht
PAGE-Kammer	BRL
Photometer	Pharmacia
Plattenphotometer Tecan Rainbow	SLT Lab Instruments
Reaktionsgefäße	Eppendorf
Röntgenfilme	Kodak
Semitrockenblot-Kammer	Phase
Ultraschallgerät mit Nadelsonde 40T (4mm Durchmesser)	B. Braun Diessel Biotech
Zentrifugen: Biofuge 13 MR22i Rotanta 46 RC	Heraeus Sepatech Jouan Hettich

3. Methoden

3.1 Bakteriologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von *Mycoplasma hominis*

Mycoplasma hominis wurde in sterilem Argininmedium kultiviert. Hierzu wurde eine bei -20°C gelagerte Mycoplasmenkultur aufgetaut und in Zehnerschritten bis zu einer Konzentration von $1:10^5$ in Argininmedium verdünnt. Die Verdünnungsreihe wurde bei 37°C anaerob bebrütet, bis die 1:10 Verdünnung rot und wieder klar war (stationäre Phase). Die Kultur in logarithmischer Wachstumsphase liess sich durch einen Farbumschlag des Mediums von gelb nach orange-rot und eine leichte Trübung erkennen.

3.1.2 Kultivierung von *E. coli*

Die zur Transformation und Expression verwendeten *E. coli* Stämme DH5 α F'IQ und SG13009 wurden in LB-Flüssigmedium kultiviert. Hierzu wurden ca. 30 μ l Bakterienkultur aus einem Glycerinstock zu 5ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C schüttelnd inkubiert. Diese „Über Nacht“-Kultur wurde dann am folgenden Tag 1:10 mit frischem LB-Medium verdünnt und nochmals – je nach gewünschter Wachstumsphase – eine bis drei Stunden schüttelnd bei 37°C inkubiert. Das LB-Medium war entsprechend der plasmidvermittelten Resistenz der Bakterien mit 50 μ g/ml Ampicillin und 25 μ g/ml Kanamycin versetzt. Die *E. coli* Stämme DH5 α F'IQ und SG13009 sind resistent gegen Kanamycin, die verwendeten Plasmide pQE41 und pQE60 vermitteln die Ampicillinresistenz. Dies reduzierte einerseits die Kontamination mit anderen Bakterien, andererseits waren nur plasmidtragende *E. coli* Bakterien in diesem Medium überlebensfähig.

Zur Lagerung der Bakterien wurde die Bakterienkultur mit 20% (v/v) Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert. Dieser Glycerinstock wurde zum Animpfen von Bakterienkulturen aufgetaut und anschließend wieder bei -20°C gelagert.

Zur Kultivierung von *E. coli* auf Agarplatten wurde mit Ampicillin (50µg/ml) und Kanamycin (25µg/ml) versetzter LB-Agar verwendet, auf dem die Bakterien ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert wurden.

3.1.3 Keimzahlbestimmung

Um die Anzahl von Bakterien in einer Suspension zu bestimmen, wurden mehrere Verdünnungsstufen dieser Suspension angesetzt und auf Agarplatten ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Platte mit der am besten zählbaren Kolonienzahl wurde ausgezählt. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass aus einer Bakterienzelle eine Kolonie entstanden war. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Verdünnung und ausgestrichenen Menge konnte die Bakterienzahl in der Ausgangslösung berechnet werden.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Präparation transformationskompetenter Bakterien

3ml LB-Medium wurden mit 30µl Bakterienkultur aus einem Glycerinstock angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Zu 50ml LB-Medium wurden 500µl der „Über Nacht“-Kultur gegeben und bis zu einer OD_{600nm} von 0,4-0,6 schüttelnd bei 37°C inkubiert. Diese Kultur wurde in sterile Zentrifugenröhrchen überführt, 10 Minuten auf Eis gestellt und bei 4°C und 5000 x g 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Bakterien-sediment aus je 25ml Kultur in je 20ml kalter RF1-Lösung (siehe Kapitel 2.2) aufgenommen. Nach ein- bis zweistündiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation wurde das Sediment in 4ml kalter RF2-Lösung (Kapitel 2.2) aufgenommen, in 500µl Portionen aliquotiert und bei -70°C eingefroren.

3.2.2 Plasmid DNA Präparation

Die Plasmid DNA Präparation erfolgte mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit von Boehringer Mannheim nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim & Doly (1979) und Ish-Horowitz & Burke (1981). Hierbei wurden 1,5ml einer *E.coli* „Über Nacht“-Kultur 10 min bei 15.000 x g zentrifugiert, das Sediment in 250µl Suspensionspuffer (50mM Tris/HCl pH8,0; 10mM EDTA; 400µg/ml RNase A [50U/ml]) resuspendiert und 250µl Lysepuffer (0,2M NaOH; 1%[w/v] SDS) zugefügt. Der Ansatz wurde gemischt und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 350µl eisgekühlter Bindepuffer (4M Guanidiniumhydrochlorid, 0,5M Kaliumacetat pH 4,2) zugegeben und die Probe 10 Minuten bei 15.000 x g zentrifugiert, um ausgefallene Proteine und genomische DNA zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein Filtrationsgefäß überführt, das im unteren Teil von einer permeablen, DNA-bindenden Fritte begrenzt war, und das in ein 2ml Auffanggefäß gestellt wurde. Die Probe wurde anschließend eine Minute bei 15.000 x g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die an die Fritte gebundene DNA wurden nun mit 500µl Waschpuffer I (5M Guanidiniumhydrochlorid, 20mM Tris-HCl, pH 6,6) gewaschen. Nach Zugabe von 700µl Waschpuffer II (20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7,5), einminütiger Zentrifugation bei 15.000 x g und Verwerfen des Durchlaufs, wurde das Filtrationsgefäß in ein steriles Reaktionsgefäß eingesetzt. Anschließend wurden 100µl Elutionspuffer (10mM Tris-HCl, pH 8,5) auf die Fritte gegeben und 30 sec bei 15.000 x g zentrifugiert. Die eluierte Plasmid-DNA befand sich nun im Reaktionsgefäß.

3.2.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration in einer Lösung

Die Nukleinsäurekonzentration einer Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Eine optische Dichte von 1OD bei 260nm entsprach einer Konzentration von 50µg DNA/ml. Zusätzlich wurde als Qualitätskontrolle die optische Dichte der Lösung bei 280nm bestimmt. Der Quotient der OD von 260nm zu 280nm sollte für DNA zwischen 1,8 und 2,1 liegen.

3.2.4 Transformation von Bakterien

Modifiziert nach der Methode von Hanahan (1983) wurden Plasmide in kompetente Bakterien eingebracht. Hierfür wurden 10-100µg Plasmid zu 100µl transformationskompetenten Bakterien gegeben und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zweiminütiger Erhitzung bei 42°C wurden 400µl SOC-Medium zugegeben und die Bakterien 90 Minuten schüttelnd bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle des Transformationsergebnisses wurden 100µl des Bakterienansatzes auf LB-Platten ausgestrichen (mit Ampicillin und Kanamycin versetzt) und bei 37°C bebrütet. Zur restlichen Bakteriensuspension wurden 4ml LB-Medium (mit Ampicillin und Kanamycin versetzt) gegeben, um diesen Ansatz ebenfalls bei 37°C schüttelnd zu inkubieren.

3.2.5 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die *E. coli* Stämme DH5αF'IQ und SG13009 stehen unter der Kontrolle des lac-Repressors, so dass für die Expression der heterologen Proteine eine Induktion mit IPTG erforderlich ist. Hierfür wurde eine „Über Nacht“-Kultur 1:10 verdünnt, mit IPTG versetzt (1µM - 1mM) und bei 37°C schüttelnd für maximal zwei Stunden weiter kultiviert und das Bakteriensediment weiter analysiert.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Lösung

Die Konzentration von Proteinen in Lösungen wurde nach der Methode von Bradford ermittelt (Bradford, 1976).

3.3.2 Proteinauftrennung unter denaturierenden Bedingungen

Nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) wurden die Proteinproben in SDS-Probenpuffer aufgenommen und für fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Die

nun denaturierten Proteine wurden anschließend auf Polyacrylamidgelen nach ihrer Größe aufgetrennt, die je nach Größe des interessierenden Proteins zwischen 7,5 und 13,5% Polyacrylamid enthielten. In der Regel erfolgte die Elektrophorese über Nacht bei einer angelegten Spannung von 30 bis 40 Volt. Um die Größe der Proteine auf dem Gel bestimmen zu können, wurden jeweils Standard-Marker mit auf das Gel aufgetragen, die für ein anschließendes Western Blot-Verfahren vorgefärbt (Prestained SDS-PAGE Standards), oder für Coomassie-Färbungen nicht gefärbt waren (SDS-PAGE Standards).

Coomassie Blau Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Polyacrylamidgele über Nacht, mindestens jedoch für drei Stunden in Coomassiefärbelösung geschwenkt. Die Färbelösung wurde anschließend durch Entfärbelösung ersetzt, die so oft ausgetauscht wurde, bis die Proteinbanden blau und die restlichen Gelflächen entfärbt waren.

Silberfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen

Sollten geringe Proteinmengen visualisiert werden, wurde eine Silberfärbung durchgeführt, die wesentlich sensitiver ist als eine Coomassiefärbung. Die Nachweisgrenze bei dieser Methode liegt bei 2 bis 5ng Protein. Hierfür wurde das Gel nach der Elektrophorese über Nacht in Fixierlösung I geschwenkt, anschließend zweimal für 10 Minuten in 50% Methanol und einmal für 10 Minuten in 30% Ethanol gewaschen. Zur Verstärkung der Färbung wurde das Gel eine Minute in 0,02% (w/v) Natriumthiosulfatlösung inkubiert und dreimal jeweils 20 Sekunden mit A. dest. gewässert. Danach wurde es 20 Minuten in der Färbelösung gefärbt, für 10 Sekunden in A. dest. gewässert und bis zur gewünschten Farbtintensität in Entwicklerlösung geschwenkt. Der Entwicklungsvorgang wurde durch zehnminütiges Schwenken in Fixierlösung II gestoppt.

Gefärbte Polyacrylamidgele wurden fotografiert und durch Vakuumtrocknung auf Whatmanpapier konserviert.

3.3.3 Blot-Verfahren

Western Blot-Verfahren

Zum immunologischen Nachweis einzelner Antigene wurden die Proteine nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung nach dem Verfahren von Burnette (1981) aus dem Acrylamidgel auf Nitrozellulosemembran transferiert. Hierfür wurden auf die Kathodenplatte einer Semitrockenblotkammer drei Lagen in Kathodenpuffer getränktes 3MM Whatmanpapier gelegt und luftblasenfrei glattgestrichen. Auf das Papier wurde spiegelverkehrt das Gel gelegt und mit einem der Gelgröße entsprechenden, in Anode I Puffer getränkten Stück Nitrozellulosemembran bedeckt. Es folgten drei Lagen in Anode I Puffer und drei Lagen in Anode II Puffer getränktes 3MM Whatmanpapier. Um sämtliche Luftblasen zu entfernen, wurde der gesamte Aufbau nochmals glattgestrichen, mit der Anodenplatte der Blotkammer verschlossen und beschwert. Die Proteine wurden bei einer Stromstärke von $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$ über 45 Minuten auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

Dot Blot-Verfahren

Mit Hilfe des Dot Blot-Verfahrens konnte vergleichsweise schnell die Eignung eines Antikörpers zur Detektion von nicht, teilweise oder vollständig denaturierten Proteinen in unterschiedlichen Konzentrationen und Puffern ermittelt werden. Hierfür wurden von der zu untersuchenden Proteinprobe Verdünnungsreihen in Puffern angelegt, die die Proteine nicht, teilweise oder vollständig denaturierten. Diese Verdünnungsreihen wurden mit Hilfe einer Dot Blot Kammer (Schleicher & Schuell) direkt auf eine in PBS getränkte, auf zwei Lagen in PBS getränktem 3MM Whatmanpapier befindliche, Nitrozellulosemembran aufgetragen.

3.3.4 Fraktionierung und Aufreinigung von bakteriellen Proteinen

Präparation von Membran und Zytoplasma

Diese Methode wurde modifiziert nach einem Protokoll von QIAGEN für die Detektion von Proteinen im Zytoplasma. Eine IPTG induzierte *E. coli*-Kultur (siehe Kapitel 3.2.5) wurde bis zu einer OD_{600nm} von ca. 0,8 bis 0,9 schüttelnd bei 37°C inkubiert. 1ml der Kultur wurde 10 Minuten bei 15.000 x g zentrifugiert, das Sediment in Sonicationpuffer gewaschen und in 500µl Sonicationpuffer resuspendiert. Die Probe wurde alternierend zehnmal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im 37°C Wasserbad aufgetaut und anschließend fünfmal jeweils 10 Sekunden auf Eis mit der Ultraschallsonde behandelt. Nach einstündiger Zentrifugation bei 4°C und 23.500 x g wurde der Überstand, der die löslichen zytoplasmatischen Proteine enthielt, abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Sediment, in dem sich unlösliche und membrangebundene Proteine befanden, wurde in 500µl Sonicationpuffer resuspendiert. Beide Proben wurden erneut 10 mal in flüssigem Stickstoff eingefroren, im 37°C Wasserbad aufgetaut, fünfmal 10 Sekunden mit der Ultraschallsonde auf Eis beschallt und eine Stunde bei 4°C und 23.500 x g zentrifugiert. Von der Probe mit den zytoplasmatischen Proteinen wurde der Überstand abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, das Sediment wurde verworfen. Von der Probe mit den membrangebundenen Proteinen wurde der Überstand verworfen und das Präzipitat in 500µl Sonicationpuffer aufgenommen. Diese Proben wurden ein drittes mal alternierend zehnmal eingefroren und aufgetaut, fünfmal beschallt und eine Stunde bei 4°C und 23.500 x g zentrifugiert. Erneut wurde von der Probe mit den zytoplasmatischen Proteinen der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Sediment der Probe, in der sich membrangebundene Bestandteile befanden, in 500µl Sonicationpuffer resuspendiert.

Präzipitation von Proteinen aus dem Kulturüberstand von Bakterien

E. coli oder *M. hominis* Kulturen verschiedener Wachstumsstadien wurden zentrifugiert, der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Dieser Überstand wurde erneut in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, auf 10% (w/v) TCA (Trichloressigsäure) eingestellt und der Ansatz 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Präzipitat zweimal mit 70% Ethanol gewaschen. Nach dem zweiten Waschschriff wurde die ethanolische Lösung abgenommen und das Präzipitat etwa 40 Minuten luftgetrocknet. Die Analyse der aus dem Kulturüberstand präzipitierten Proteine erfolgte nach Lösung in SDS-Probenpuffer auf 7,5 – 9,5% Polyacrylamidgelen.

3.3.5 Limitierte Proteolyse mit Trypsin

Eine Bakterienkultur mit einer OD_{600nm} zwischen 0,8 und 0,9 wurde zentrifugiert, das Sediment in PBS gewaschen und resuspendiert, auf vier Reaktionsgefäße verteilt und auf Konzentrationen von 4mg/ml, 0,4mg/ml und 0,1mg/ml Trypsin eingestellt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Trypsinaktivität durch Einstellung der Proben auf 2,8mg/ml, 0,28mg/ml und 0,059mg/ml Trypsininhibitor gestoppt. Nach Angabe des Herstellers genügt 1mg Trypsininhibitor, um 2,1mg Trypsin mit einer Aktivität von 10 units/mg zu inhibieren. Die vierte Probe blieb Trypsin-frei und diente als Kontrolle.

3.3.6 Test der Proteinstabilität in *Mycoplasma hominis*

Je 3ml einer Mycoplasmenkultur aus der logarithmischen Wachstumsphase (orangerot) wurden zentrifugiert, das Sediment in PBS gewaschen, in Reaktionsgefäße überführt und in 100µl A. dest. aufgenommen. Eine Probe wurde direkt bei –20°C gelagert, eine Probe bei 37°C für 6 Tage inkubiert und die dritte Probe nach Herstellerangabe mit dem Proteaseinhibitor Pefabloc versetzt und ebenfalls 6 Tage bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die drei Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und im Westernblot-Verfahren analysiert. Die bei –20°C gelagerte Probe diente als Kontrolle.

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 Immunologische Detektion von Antigenen

Für die Immunfärbung wurde die Nitrozellulosemembran, auf welche die Proteine im Western Blot- oder Dot Blot-Verfahren transferiert wurden, zunächst 30 Minuten in 5% Milchlösung inkubiert, um nicht proteinbeladene Stellen abzublocken. Anschließend wurde ein proteinspezifischer Antikörper, je nach Konzentration des Antikörpers pur oder in 5% Milchlösung verdünnt, auf die Membran gegeben und eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde Peroxidase-gekoppelter Ziege anti-Maus Antikörper für eine weitere Stunde auf die Membran gegeben. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde die Membran fünf Minuten im Dunkeln mit Luminol inkubiert. Dies bewirkte eine Lumineszenz der antikörpergebundenen Stellen. Die Membran wurde dann auf Whatmanpapier kurz abgeblockt und mit Klarsichtfolie abgedeckt. Das Auflegen von Röntgenfilmen auf die so behandelte Membran führte zu einer Schwärzung der Filme an den Stellen, an denen das untersuchte Antigen auf der Membran vorhanden war. Auf diese Weise konnten die Ergebnisse auf Röntgenfilm festgehalten werden.

Alternativ zur Chemilumineszenz konnten die nitrozellulosefixierten Proteine mit 4-Chloro-1-naphthol sichtbar gemacht werden mit dem Vorteil, dass Unterschiede in Antigenmengen besser dargestellt werden konnten als in der Chemilumineszenz. Hierfür wurde die mit Erst- und Zweitantikörper behandelte Nitrozellulosemembran 30 Minuten bis zwei Stunden im Dunkeln in einer 4-Chloro-1-naphthollösung gefärbt und bei Bedarf zur Verstärkung nochmals in einer 1:50 Verdünnung dieser Lösung über Nacht inkubiert.

3.4.2 Schachbrett-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Von den zu untersuchenden Bakterien oder Bakterienbestandteilen (Membran- und Zytoplasmafraktion) wurden Verdünnungsreihen angelegt (1000ng, 500ng, 250ng usw.) und diese in einer 96 Well Microtiterplatte eine Stunde (Bakterien) oder über Nacht (Bakterienlysate) angelagert. Zur Verdünnung und als Negativkontrolle wurde PBS verwendet. Nach der Anlagerung wurde das nicht gebundene Antigen durch Waschen mit PBS entfernt und die nicht proteinbesetzten Stellen mit 1% Milchpulver abgeblockt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde der jeweilige Antikörper in serieller Verdünnung zugegeben und eine Stunde schüttelnd inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde mit PBS ausgewaschen und die angelagerten Proben mit Peroxidase konjugiertem α -Maus Antikörper für eine weitere Stunde schüttelnd inkubiert. Die Platte wurde daraufhin gründlich mit PBS gewaschen und TMB Substratlösung zugegeben. Nach 20 minütiger Inkubation im Dunkeln und Stoppen der Farbreaktion durch Einstellen auf 1M HCl wurde die Extinktion bei 450nm im Plattenphotometer gemessen.

3.4.3 FACS (Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer)-Analyse von *E.coli* Klonen

Aus IPTG induzierten, sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Bakterienkulturen der verschiedenen *E. coli* Klone wurden je 10 μ l in FACS-Röhrchen überführt, 10 Minuten bei 4500 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment zweimal mit je 1ml kaltem FACS-Puffer gewaschen. Die Sedimente wurden nun in 200 μ l Antikörperlösung aufgenommen und eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Proben wurden erneut 10 Minuten bei 4500 x g und 4°C zentrifugiert, die Präzipitate zweimal in je 1ml kaltem FACS-Puffer gewaschen, anschließend in 20 μ l FITC markiertem Ziege-anti-Maus Antikörper aufgenommen und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in je 1ml kaltem FACS-Puffer wurden die Sedimente in je 1,5ml kaltem FACS-Puffer aufgenommen und im FACS gemessen. Als Negativkontrolle und zur Einstellung des Geräts (Gate: G1, Gated Events: 100000, Y Parameter: FL2-H FL2-Height (Log)) wurde eine Probe verwendet, die nur mit dem FITC-markierten Antikörper ohne Erstantikörper

inkubiert worden war. Als Positivkontrolle diente eine Probe, die mit einem Erstantikörper gegen LPS (Brade et al., 1996) und einem FITC konjugierten Antikörper markiert war, da LPS oberflächenlokalisiert ist. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms CellQuest der Firma Becton Dickinson.

4. Ergebnisse

4.1 Ausgangssituation

Im Institut für Medizinische Mikrobiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurden verschiedene *E. coli* Expressionsklone hergestellt mit dem Ziel, das Membranprotein P60 von *Mycoplasma hominis* in *E. coli* zu exprimieren und oberflächenexponiert zu verankern, um dann die Adhärenz dieser *E. coli*-Varianten mit und ohne P60 vergleichen zu können. Zu diesem Zweck wurde das P60-Protein nicht nur als Vorläufer in *E. coli* exprimiert (Klon MA2), also inklusive seiner mykoplasmalen Signalsequenz, die zum Transport durch die Membran und Verankerung an ein Lipid bei *M. hominis* erforderlich ist, sondern ebenfalls Konstrukte generiert, bei denen drei verschieden lange Fragmente des TraT-N-Terminus vor die Sequenz des reifen P60-Proteins kloniert wurden. TraT ist ein oberflächenlokalisiertes Membranprotein von *E. coli*, das dort in großer Zahl vorkommt und eine „plasmid surface exclusion“ und eine Phagozytoseresistenz bewirkt. Wie von Taylor und Mitarbeitern 1990 und der Arbeitsgruppe Chang 1999 beschrieben, zeigte sich eine Fusion mit TraT gut geeignet für die Oberflächenexposition rekombinanter Proteine in *E. coli*. Die Länge der TraT Fragmente wurde nach Untersuchungen der hydrophilen und hydrophoben Bereiche von TraT (mit Hilfe des Protean Programms von DNASTar) so gewählt, dass sie mit hydrophilen Proteinabschnitten endeten, die oberflächenlokalisiert, also extrazellulär auf der Membranoberfläche gelegen waren. Für potentiell geeignet wurden die N-terminalen Abschnitte des TraT von 13 (MA3), 61 (MA4) und 200 (MA5) Aminosäuren zuzüglich der P60-eigenen Signalsequenz befunden (siehe Abb. 4.1). Als Negativkontrolle wurde ein weiterer Klon (Klon 3.2) mitgeführt, der statt der Signalsequenz die Dihydrofolatreduktase exprimiert.

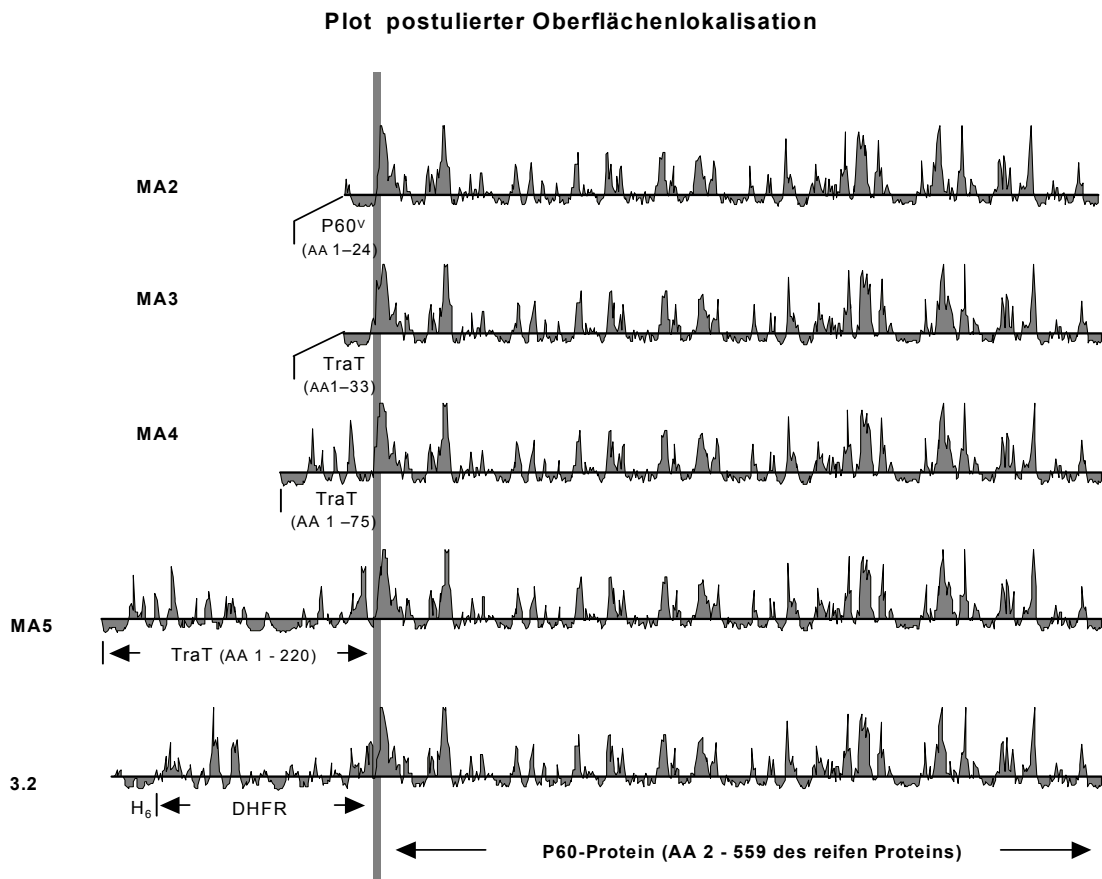


Abb.4.1: Darstellung der Hydropathieprofile der einzelnen P60-Varianten: (Bereiche oberhalb der Abszisse entsprechen hydrophilen Sequenzabschnitten; die unterhalb hydrophoben) P60^V: mycoplasmales Signalpeptid, H₆: 6 Histidine, DHFR: Dihydrofolatreductase, AA: Aminosäure.

4.2 Expression der verschiedenen rekombinanten P60 Konstrukte

Die verschiedenen P60 Plasmide waren in den *E. coli* Stamm DH5 α F'IQ eingebracht worden, der überraschenderweise auch ohne IPTG Induktion P60 produzierte. Im *E. coli* Stamm SG13009 liess sich die heterologe Expression der P60-Varianten wesentlich besser durch IPTG regulieren. Die verschiedenen Klone zeigten unterschiedlich starke Expressionen (siehe Abbildung 4.2). Der Klon 3.2 exprimierte auch in diesem *E. coli* Stamm ohne IPTG Induktion massiv (Abb. 4.2, Immunfärbung, vorletzte Spur). Er wurde in den weiteren Experimenten ohne IPTG-Zugabe exprimiert. Der Klon MA2 exprimierte P60 ebenfalls ohne IPTG Induktion (Abb. 4.2., Spur 1 MA2). Unterschiedliche Kultivierungstemperaturen zeigten hierbei keinen Einfluss auf die Expressionsin-

tensität (Daten nicht gezeigt). Die Klone MA2, MA3, MA4 und MA5 wurden mit drei verschiedenen IPTG Konzentrationen (1µM, 100µM und 1mM) versetzt, und die Proteinprofile mit einer nicht induzierten Kultur verglichen (Abbildung 4.2). Für den Klon MA2 zeigte sich eine IPTG Konzentration von 1µM optimal, jede höhere Konzentration war mit einer massiven Zunahme von Abbauprodukten verbunden, wie in den Spuren (1 bis 4; MA2) deutlich zu sehen ist. MA3 exprimierte P60 von allen Klonen am schwächsten (Abb. 4.2, Spuren 1 bis 4; MA3). Da in einigen Experimenten das P60-Konstrukt dieses Klons mit 100µM IPTG kaum zu detektieren war, wurde er im Folgenden mit 1mM IPTG induziert. Die Klone MA4 und MA5 zeigten bei 100µM eine gute Expression (Abb. 4.2, jeweils Spur 3 bei MA4 und MA5), sie wurden für weitere Experimente mit dieser IPTG Konzentration kultiviert. Zu erwähnen ist noch, dass der eingesetzte anti-P60-Antikörper CG4 eine Kreuzreaktivität mit einem 35kDa großen Protein von *E. coli* aufweist. Wie in der Coomassiefärbung ersichtlich, wurde beim MA5 in den Spuren 3 und 4 weniger Protein aufgetragen, was die schwache Expression des kreuzreaktiven 35kDa *E. coli* Proteins erklärt. Die P60 Banden sind hier entsprechend schwächer ausgeprägt.

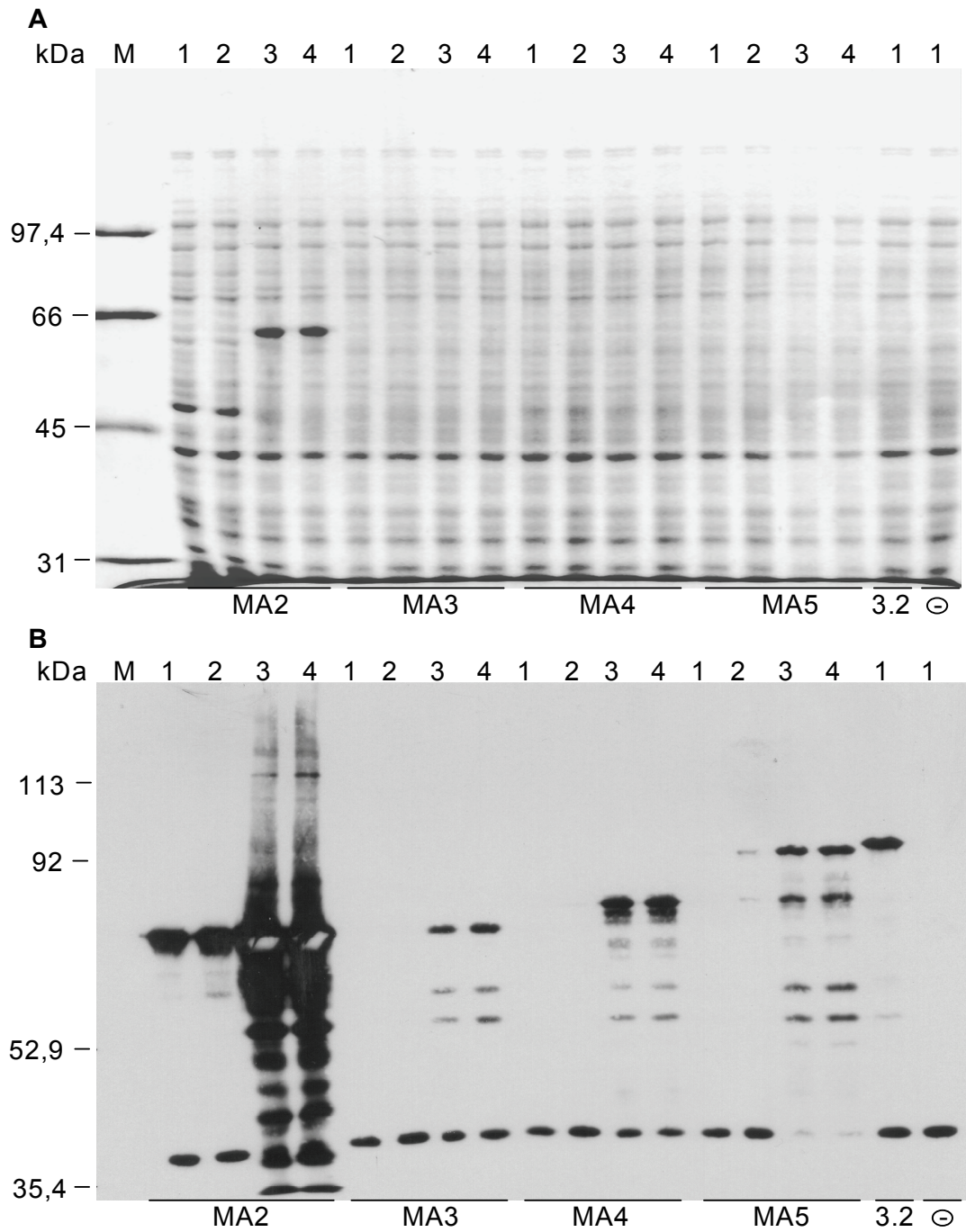


Abb. 4.2: Induktion der P60-Expression in den MA-Klonen in Abhängigkeit von der IPTG Konzentration

M = Marker, 1 = ohne IPTG, 2 = 1µM IPTG, 3 = 100µM IPTG, 4 = 1mM IPTG, - = *E. coli* mit Plasmid pQE60 ohne Insert. A: Coomassiefärbung, B: Immunfärbung

Die Induktion mit IPTG erfolgte wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben. Die Immunfärbung für die Chemilumineszenz (siehe 3.4.1) wurde mit dem P60 Antikörper CG4 durchgeführt.

4.3 Die rekombinanten P60 Konstrukte liegen in *E. coli* löslich und unlöslich vor

Um herauszufinden, ob eines der P60 Konstrukte wie erwartet in die Membran eingebaut wird, wurden die Membran-haltigen Fraktionen der verschiedenen *E. coli* Mutanten isoliert. Die hierfür nötige Lyse der *E. coli* Bakterien gestaltete sich schwierig. Für eine saubere Präparation von löslichen und unlöslichen Proteinen waren Modifikationen des Protokolls aus „The QIAexpressionist“ (QIAGEN) nötig (siehe Kapitel 3.3.3). Als Positivkontrolle für die Membran-haltige Fraktion wurde in der Immunfärbung ein LPS spezifischer Antikörper verwendet, der von Prof. Brade (Brade et al., 1996) zur Verfügung gestellt wurde. Zum Nachweis zytoplasmatischer Proteine wurde ein monoklonaler Antikörper gegen den Elongationsfaktor Tu eingesetzt (siehe Abb. 4.3.1).

P60 fand sich bei allen Klonen (MA2, MA3, MA4, MA5 und 3.2) sowohl im Zytoplasma als auch in der Membran-haltigen Fraktion, wobei der größere Anteil im Zytoplasma detektiert wurde (siehe Abbildung 4.3.1). Der MA2-Klon wies von allen Klonen die größte Menge P60 in der Fraktion unlöslicher Proteine auf. Zu berücksichtigen blieb hier allerdings, dass der Klon insgesamt sehr viel P60-Protein exprimiert und auch hier die Menge an P60 in der Zytoplasmakfraktion am größten war. Darüber hinaus konnte auch in der Membranfraktion eine geringe Menge EF-Tu detektiert werden. Dies war bei den übrigen Klonen erst bei Belichtungszeiten von mehr als 10 Minuten der Fall. Bei diesen Belichtungszeiten wurden auch die Banden für LPS kräftiger, was allerdings mit einer starken Hintergrundschwärzung verbunden war. Hervorzuheben ist, dass beim Klon 3.2, der keine Signalsequenz für Translokation und Einbau in die Membran trägt, P60 jedoch in der Membran-haltigen Fraktion detektierbar war. Dies wies darauf hin, dass die P60-Konstrukte bevorzugt in unlöslichen „Inclusion bodies“ vorlagen, und die Fusion von P60 mit verschiedenen langen Bereichen des TraT-N-Terminus den Transport in die Membran im Vergleich mit dem reifen P60-Protein nicht begünstigte.

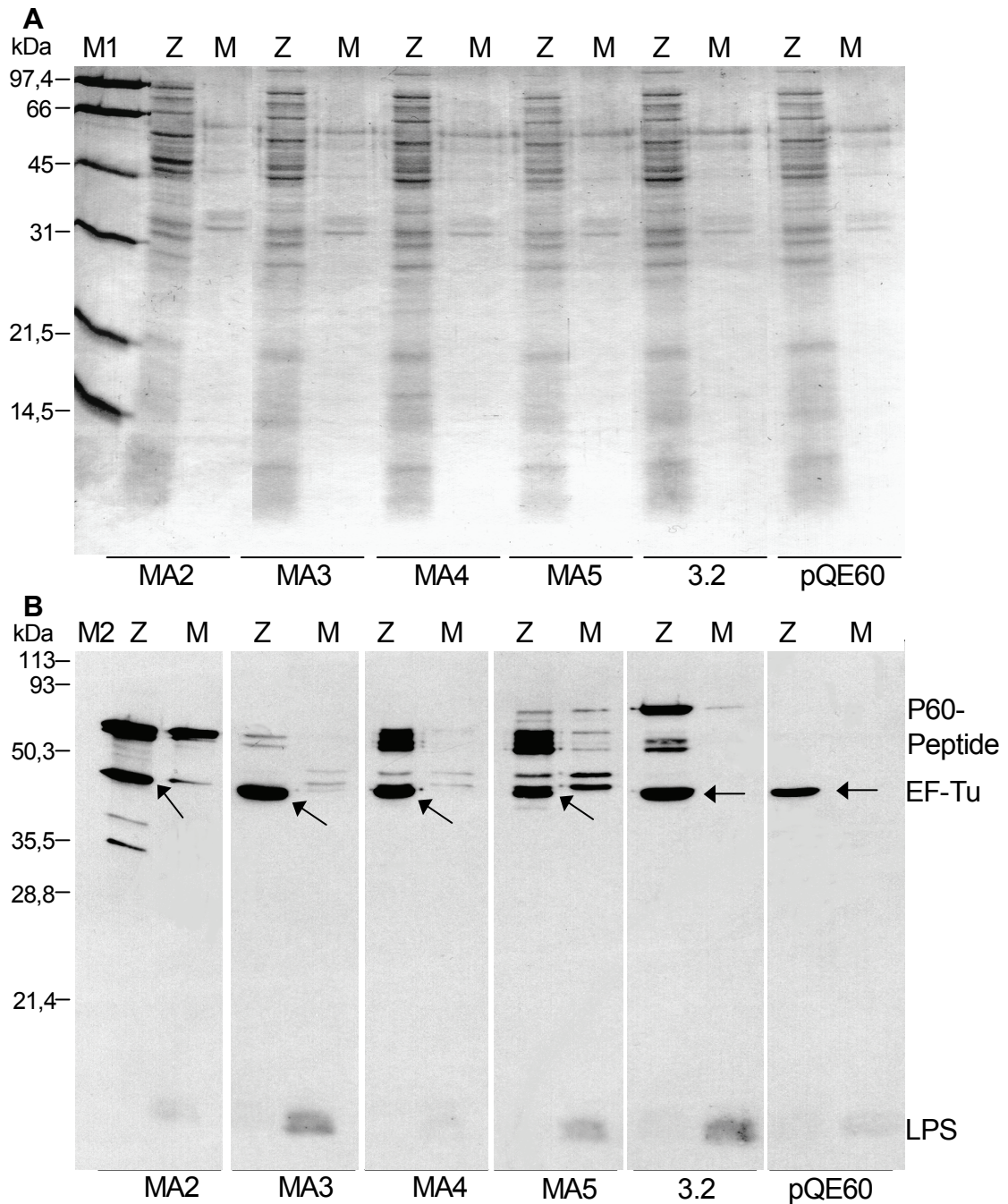


Abb. 4.3.1: Lokalisation der P60-Varianten der Klone MA2, MA3, MA4, MA5 und 3.2.

Membran-haltige Fraktion unlöslicher Proteine (M) und Zytoplasma (Z) wurden - wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben - präpariert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine in einem 12% Polyacrylamidgel wurden diese Coomassie gefärbt (A) oder im Westernblot (siehe 3.4.1) mit Antikörpern gegen EF-Tu (ME3), LPS und P60 (CG4) immungefärbt (B). Die Höhe der Banden für EF-Tu und LPS sind seitlich gekennzeichnet. Die übrigen Banden markieren P60 und dessen Abbauprodukte. K= Kontrolle: SG13009 mit Plasmid pQE60 ohne Insert. M1 = SDS-PAGE Standard, Low Range, M2 = Prestained SDS-PAGE Standard, Low Range.

4.4 Keine der P60 Varianten wird bei *E. coli* oberflächenexponiert präsentiert

Nachdem P60 in der Membran-haltigen Fraktion nachgewiesen werden konnte, stellte sich die Frage, ob es auch oberflächenexponiert vorlag. Um diese Frage zu klären, wurden verschiedene Strategien verfolgt.

Eine limitierte Proteolyse der *E. coli* Klone mit Trypsin, bei der davon auszugehen war, dass zuerst oberflächenexponierte Proteine intakter Zellen abgebaut werden, brachte kein eindeutiges Ergebnis. Eine Abnahme von P60 ging mit einer Abnahme des in erster Linie zytoplasmatischen Proteins EF-Tu einher (Daten nicht gezeigt).

In einem ELISA wurde ermittelt, wie sich lysierte von intakten Bakterien in Bezug auf ihre P60-Detektion unterschieden. Bei Einsatz von gleichen Mengen Bakteriensuspension konnte bei den lysierten Klonen sehr viel mehr P60 nachgewiesen werden als bei den nicht lysierten. Dies wies darauf hin, dass P60 bei intakten *E. coli* Klonen nicht, oder kaum zugänglich ist, wobei eine spontane Lyse der Bakterien auf der Plastikoberfläche nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnte.

Nachdem diese Experimente Daten lieferten, die die Oberflächenexposition von P60 nicht bewiesen, da ebenfalls ein Ausbluten des zytoplasmatischen P60 zu den gemessenen Werten hätte führen können, wurden die Klone schließlich im FACS untersucht. Hier wurde als Negativkontrolle nur der FITC-markierte Antikörper ohne Erstantikörper zu den Proben gegeben. Als Positivkontrolle für einen Oberflächenmarker wurde der gegen LPS gerichtete Antikörper eingesetzt (Brade et al., 1996). Die FACS Analyse bestätigte die Vermutung, die durch die vorangegangenen Experimente aufgekommen war: Das rekombinante P60 war bei keinem der *E. coli* Klone oberflächenlokalisiert zugänglich (siehe Abb. 4.4.1). Es bleibt anzumerken, dass der Nachweis des oberflächenlokalisierten LPS mit nur etwa 6,5% der ausgezählten Bakterien gering ausgefallen war. Dies lag vermutlich an der relativ schwach konzentrierten Antikörperlösung und der generellen Schwierigkeit, Bakterien im FACS zu untersuchen.

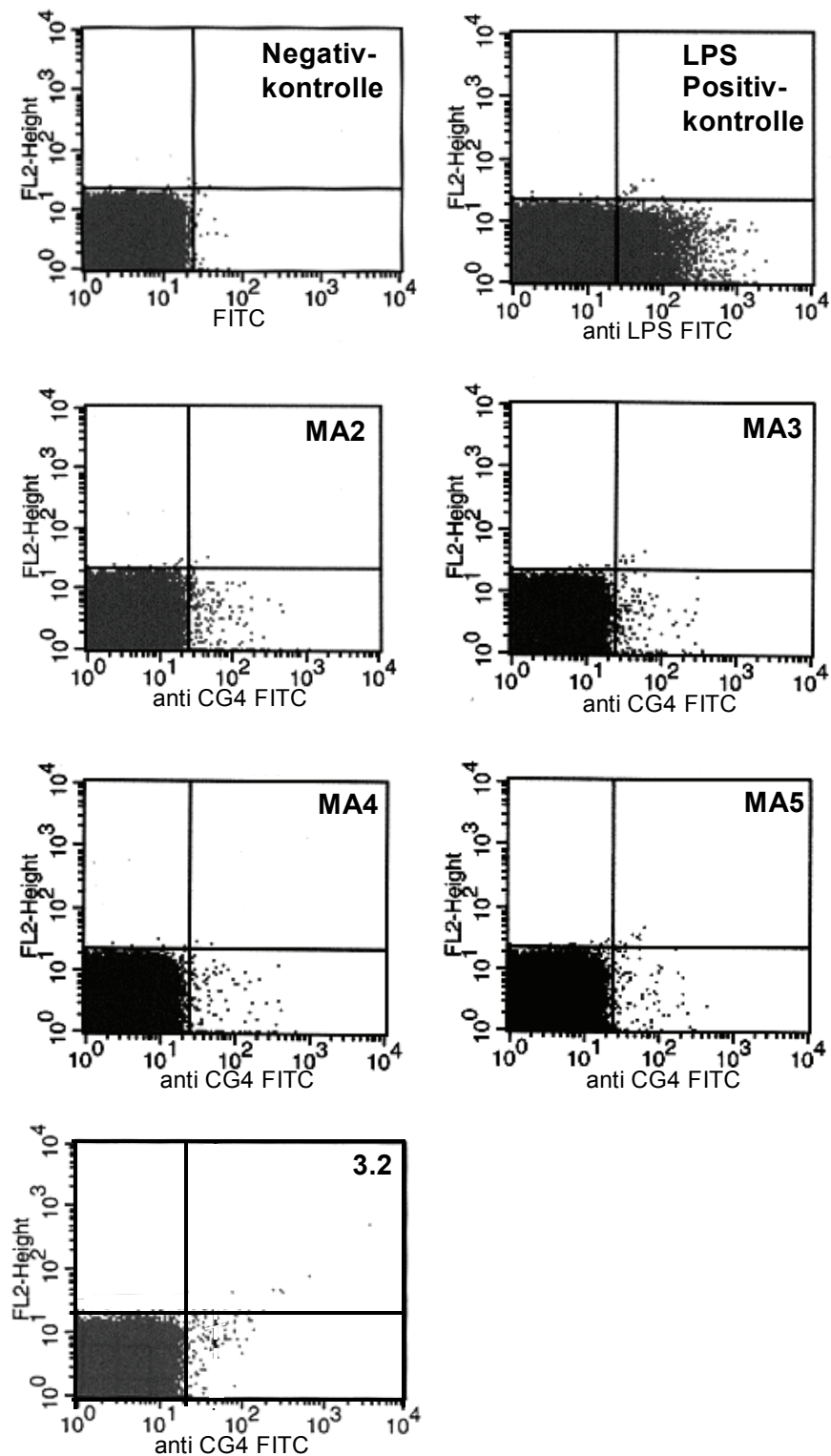


Abb. 4.4.1: FACS Analysen der verschiedenen P60-Klone.

Als Negativkontrolle wurde der Klon MA3 mit dem FITC markierten Antikörper ohne Erstantikörper inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der Klon MA3 mit einem Antikörper gegen oberflächenlokalisiertes LPS inkubiert. Die übrigen Plots zeigen die Populationen der Klone MA2, MA3, MA4, MA5 und 3.2 nach Immunfärbung mit dem P60-Antikörper CG4.

Aus Abbildung 4.4.1 wird ersichtlich, dass es eine deutlich von der Negativkontrolle zu unterscheidende Population bei Inkubation mit anti-LPS Antikörpern gab, die bei den MA-Klonen und Klon 3.2, die mit CG4 inkubiert worden waren, nicht zu finden war.

Um auszuschließen, dass die Konzentration des CG4 Antikörpers zu gering war für die Detektion aller oberflächenexponierter P60 Moleküle und somit Ursache der fehlenden Populationsverschiebung, wurde in einem parallel durchgeführten Schachbrett-ELISA der Antikörper CG4 in verschiedenen Verdünnungen an Bakterienproben, die identisch mit denen der FACS Untersuchung waren, getestet. Die Bakterien wurden lysiert angelagert, um einen möglichst hohen Anteil von P60 zugänglich zu machen. Sowohl das Bakterienlysat als auch der Antikörper wurden in fünfer Schritten ausverdünnt und gegeneinander getestet. Das in Abbildung 4.4.2 beispielhaft gezeigte Diagramm zeigt die Ergebnisse des Schachbrett-ELISAs mit dem MA3-Klon in drei Verdünnungsstufen und vier verschiedenen Konzentrationen des CG4 Antikörpers. Wurde das Lysat pur oder 1:5 verdünnt angelagert, so kam es bei den vier eingesetzten Antikörperkonzentrationen zu keiner Abnahme der Extinktion, d. h. selbst bei einer Verdünnung des Antikörpers von 1:100 wurde noch maximale OD gemessen, was einer vollständigen Detektion aller P60 Moleküle entsprach. Dieses Ergebnis fand sich auch bei den übrigen Klonen und unterstützte, dass der fehlende Nachweis von P60 bei den *E. coli* Mutanten darauf hinweist, dass P60 in den *E. coli* Mutanten nicht oberflächenexponiert ist.

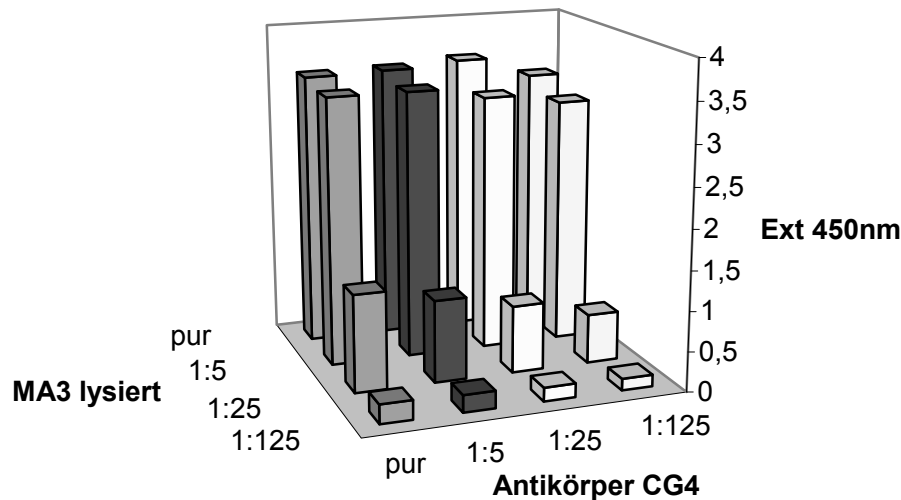


Abb. 4.4.2: Schachbrett-ELISA der im FACS eingesetzten Probe des MA3-Klons. Das Lysat des MA3-Klons aus der logarithmischen Wachstumsphase wurde pur, 1:5, 1:25 und 1:125 verdünnt angelagert. Die Inkubation mit dem P60 spezifischen mAk CG4 erfolgte ebenfalls pur, 1:5, 1:25 und 1:125 verdünnt.

4.5 Die P60 Varianten werden in den Kulturüberstand abgegeben

Nachdem P60 zwar in der Membran-haltigen Fraktion, nicht aber oberflächenexponiert gefunden wurde, blieb die Frage offen, wieso der zu erwartende Transport über die Membran an die Oberfläche nicht stattfand. So entstand die Arbeitshypothese, dass im *E. coli* das rekombinante P60 möglicherweise zwar über die Membran transportiert, hier jedoch nicht verankert, sondern sezerniert wird. Also wurde der Kulturüberstand der verschiedenen *E. coli* Mutanten auf das Vorkommen von P60 hin untersucht. Wie aus Abbildung 4.5 ersichtlich wird, wurde P60 bei allen Klonen im Kulturüberstand detektiert. Zur Kontrolle wurde der Kulturüberstand auch auf das zytoplasmatische Protein EF-Tu getestet, um ausschließen zu können, dass die detektierten Proteine nur von lysierten Bakterien stammten. Bei den Klonen MA2, MA4 und 3.2 waren die P60-Banden sehr viel stärker ausgeprägt als die Banden für EF-Tu, wie in Abbildung 4.5, Spuren MA2, 3.2 und MA4 der Immunfärbung deutlich zu sehen ist. Dies zeigt, dass die Proteine nicht aus lysierten Bakterien stammen.

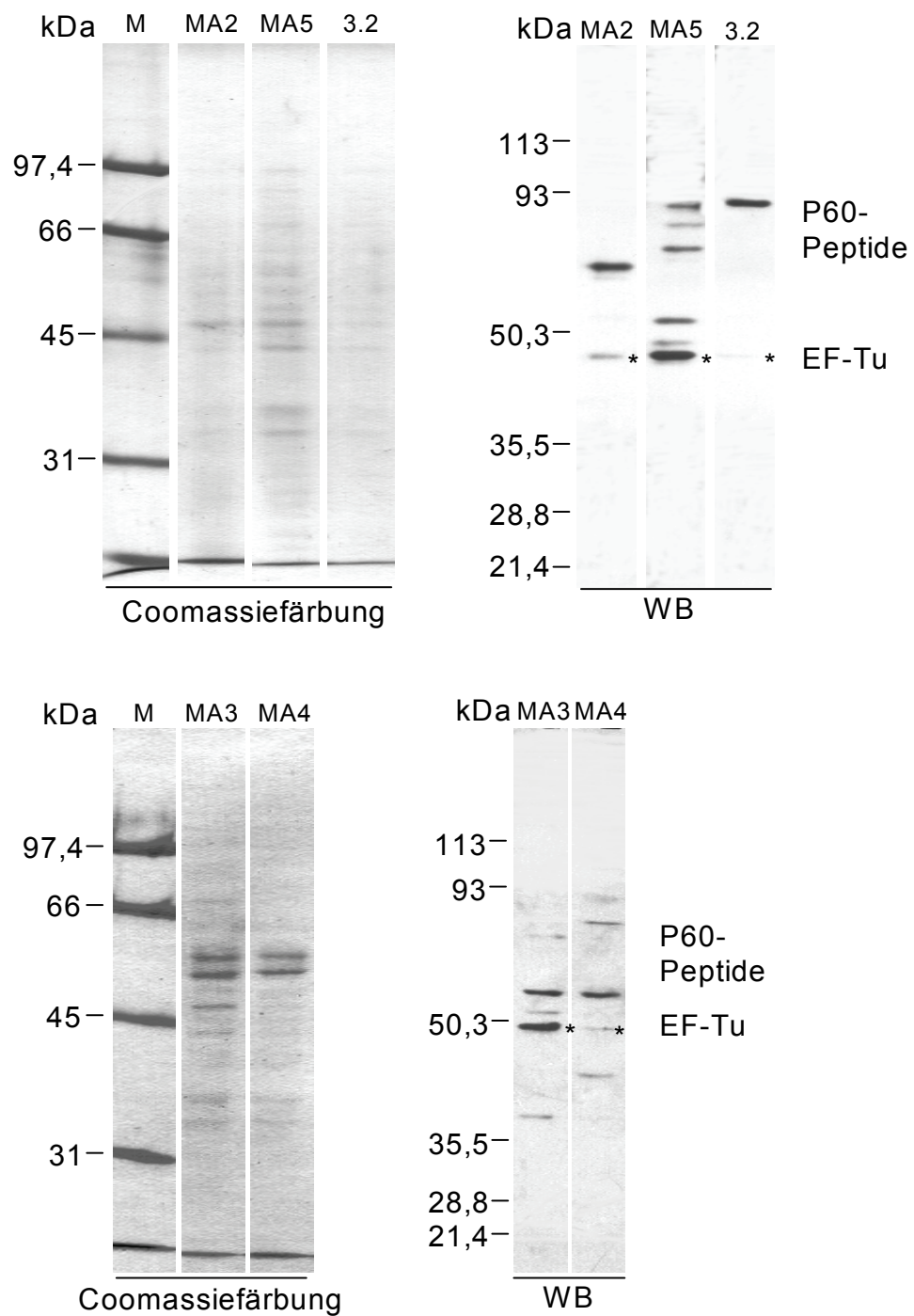


Abb. 4.5: Untersuchung verschiedener *E. coli* Kulturüberstände auf Anwesenheit von P60. M = Marker, WB = Western Blot-Verfahren (Kapitel 3.3.2). Pro Spur wurden die mit TCA präzipitierten Proteine der Überstände von je 2ml Kultur aufgetragen (siehe 3.3.3). Die Immunfärbung erfolgte mit dem P60 Antikörper CG4 und dem EF-Tu –Antikörper ME3 (Verfahren siehe 3.4.1).

Bei den Klonen MA3 und MA5 (Abb. 4.5, Spuren MA5 und MA3 der Immunfärbung) wurde mehr EF-Tu als P60 detektiert. Dies kann zumindest beim Klon MA3 durch die hier generell sehr geringe Expression von P60 bedingt sein, zeigt jedoch, dass je nach Mutante, ebenfalls der EF-Tu in den Überstand abgegeben wird.

4.6 *Mycoplasma hominis* sezerniert Proteine

Nachdem gezeigt werden konnte, dass rekombinantes P60 in den Kulturüberstand der MA-Klone abgegeben wird, wurde auch der Kulturüberstand einer *M. hominis* Kultur auf das Vorhandensein von mycoplasmalen Proteinen hin untersucht. Wie bei *E. coli* wurden die Proteine aus den Kulturüberständen mit TCA präzipitiert (siehe Kapitel 3.3.3) und im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Kontrolle wurden die aus den Kulturen sedimentierten Mycoplasmen aufgetragen (Abb. 4.6.1). Um ausschließen zu können, dass die Proteine nur durch lysierte Mycoplasmen in den Überstand gelangt waren, wurde dieser neben dem Vorhandensein des P60-Proteins sowohl auf weitere Membranproteine als auch auf zytoplasmatische Proteine hin untersucht.

Membranproteine

Der Kulturüberstand wurde auf das Vorhandensein der Membranproteine P50, P60, P80 und P100/OppA untersucht (siehe Abb. 4.6.2). Detektiert werden konnten davon P60 und P80 (siehe Abb. 4.6.2, jeweils Spuren A bis D), die bei *M. hominis* einen oberflächenlokalisierten Membrankomplex bilden. P50 und P100/OppA konnten auch bei Belichtungszeiten von mehr als 30 Minuten nicht im Kulturüberstand nachgewiesen werden (Abb. 4.6.2).

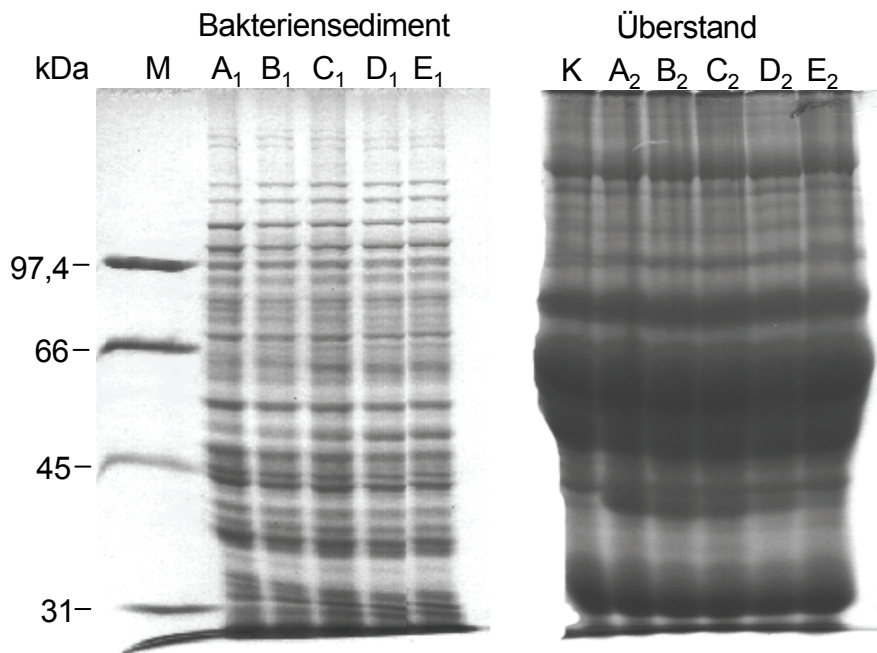


Abb. 4.6.1: Coomassieblaufärbung der Proteine einer *M. hominis* Kultur in Überstand und Bakteriensediment.

A₁-E₁ = Bakterien aus 400µl Kultur als Kontrolle, aufgenommen in SDS-Probenpuffer, A= aus stationärer Phase (Kultur rot und klar), B = aus später logarithmischer Wachstumsphase (rot und trüb), C = aus mittlerer logarithmischer Wachstumsphase (orange-rot und trüb), D = aus beginnender logarithmischer Wachstumsphase (orange), E = vor Eintritt in die logarithmische Phase (gelb), K = mit TCA behandeltes Medium als Negativkontrolle, A₂-E₂= mit TCA präzipitierte Proteine des Kulturüberstandes aus 100µl Kultur.

Zytoplasmatische Proteine

Parallel wurde der Überstand auf die zytoplasmatischen Proteine P45, P55, P68 und EF-Tu untersucht. P45, P55 und P68 konnten nicht (Abb.4.6.3), bzw. P55 nur nach Belichtung von mehr als 20 Minuten nachgewiesen werden. Der Elongationsfaktor Tu wurde nur nicht im Überstand einer Mycoplasmenkultur zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase detektiert (Abb.4.6.2 oben rechts, Spur D), was bei den Membranproteinen P60 und P80 möglich war (siehe Abbildung 4.6.2 oben rechts und unten links, jeweils Spur D). Der fehlende Nachweis des zytoplasmatischen EF-Tu schließt zumindest in dieser Kultur eine Kontamination mit Bestandteilen lysierter Bakterien aus, was uns zu der These veranlasst, dass die im Kulturüberstand nachgewiesenen Proteine P60 und P80 vom Bakterium sezerniert werden.

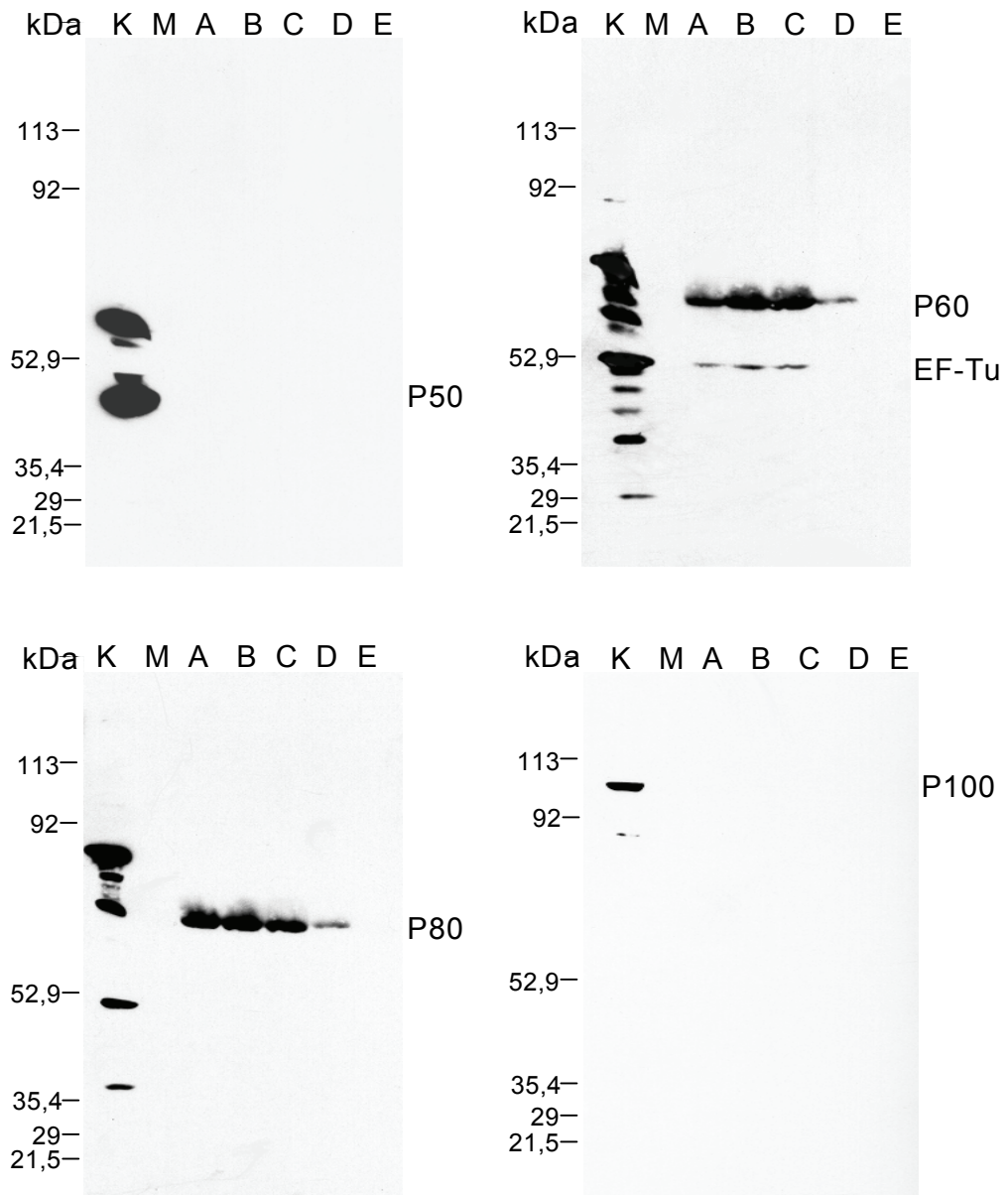


Abb.4.6.2 Immunologischer Nachweis der Membranproteine P50, P60, P80 und P100/OppA in Überstand und Bakteriensediment einer *M. hominis* Kultur.

K = Bakterien aus 400µl Kultur aus der beginnenden logarithmischen Wachstumsphase als Kontrolle, aufgenommen in SDS-Probenpuffer, M = mit TCA behandeltes Medium als Negativkontrolle, A-E = mit TCA präzipitierte Proteine aus 100µl Kulturüberstand: A = aus stationärer Phase (Kultur rot und klar), B = aus später logarithmischer Wachstumsphase (rot und trüb), C = aus mittlerer logarithmischer Wachstumsphase (orange-rot und trüb), D = aus beginnender logarithmischer Wachstumsphase (orange), E = vor Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase (gelb).

Seitlich gekennzeichnet sind die jeweils detektierten Proteine.

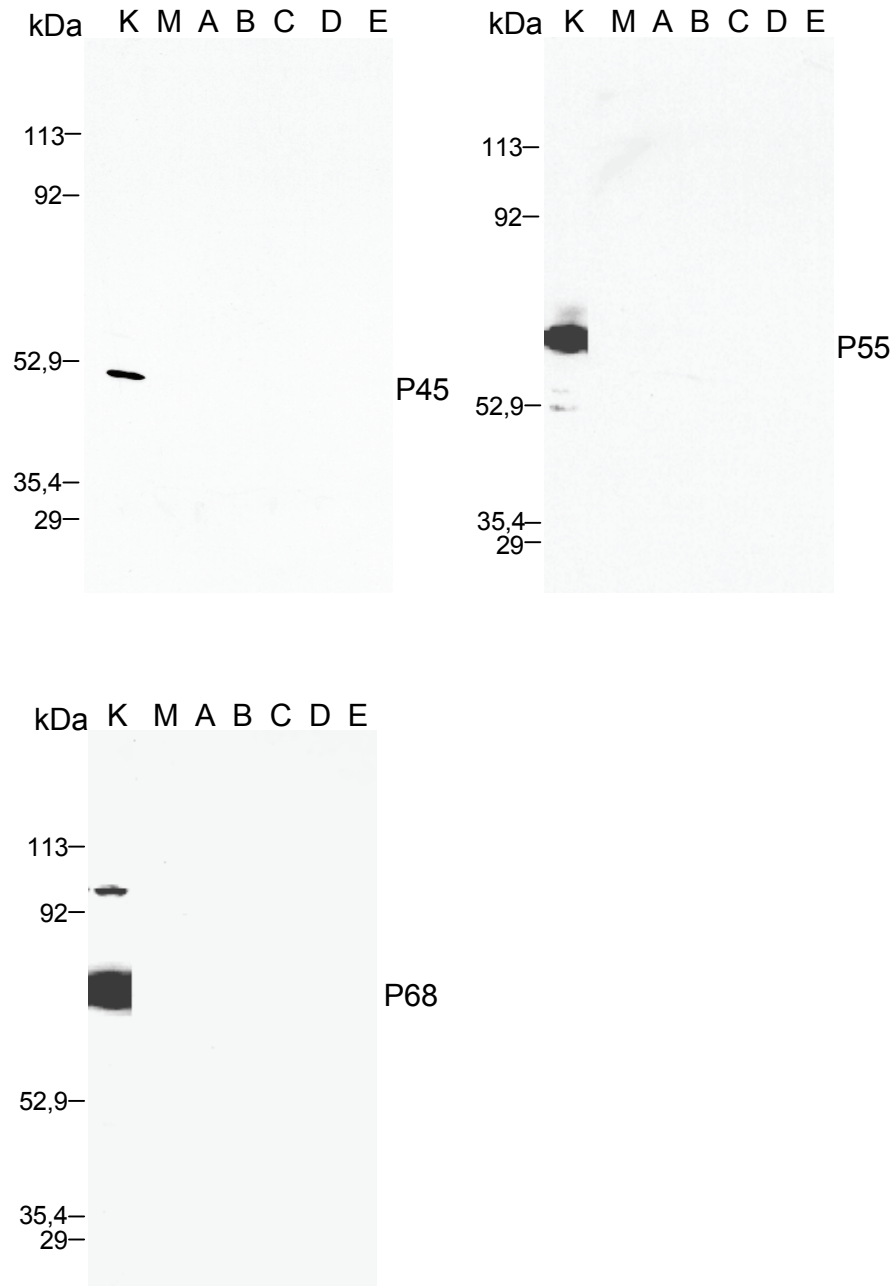


Abb. 4.6.3: Immunologischer Nachweis zytoplasmatischer Proteine in Überstand und Bakteriensediment einer *M. hominis* Kultur K = Bakterien aus 400µl Kultur aus der beginnenden logarithmischen Wachstumsphase als Kontrolle. M = mit TCA behandeltes Medium als Negativkontrolle, A-E = mit TCA präzipitierte Proteine aus 100µl Kulturüberstand: A = aus stationärer Phase (Kultur rot und klar), B = aus später logarithmischer Wachstumsphase (rot und trüb), C = aus mittlerer logarithmischer Wachstumsphase (orange-rot und trüb), D = aus beginnender logarithmischer Wachstumsphase (orange), E = vor Eintritt in die logarithmische Wachstumsphase (gelb). Seitlich gekennzeichnet sind die jeweils detektierten Proteine.

Proteinstabilität

Da die zytoplasmatischen Proteine P45, P68 überhaupt nicht und P55 nur sehr schwach in den Überständen zu finden waren, liess die Detektion von P60 und P80 im Überstand der Kultur auf eine Sekretion dieser Proteine bei *M. hominis* schließen. Die Tatsache, dass der Elongationsfaktor Tu zu Beginn der logarithmischen Wachstumsphase nicht nachweisbar war, dagegen jedoch P60 und P80 sprach ebenfalls dafür. Um dennoch auszuschließen, dass die Proteine schlicht aufgrund eines frühzeitigen Abbaus im Überstand nicht mehr nachgewiesen werden konnten, wurde versucht, einen Hinweis auf die Stabilität der Proteine zu erhalten. Dafür wurden Mycoplasmen aus einer logarithmisch wachsenden Kultur 6 Tage bei 37°C in A. dest. inkubiert und ihr Proteinprofil anschließend im Westernblot analysiert. Als Kontrolle diente eine identische Probe, die während der Inkubationszeit bei –20°C eingefroren war. Als weitere Kontrolle wurde eine Probe mit Pefabloc, einem Proteaseinhibitor, versetzt (Abb. 4.6.4).

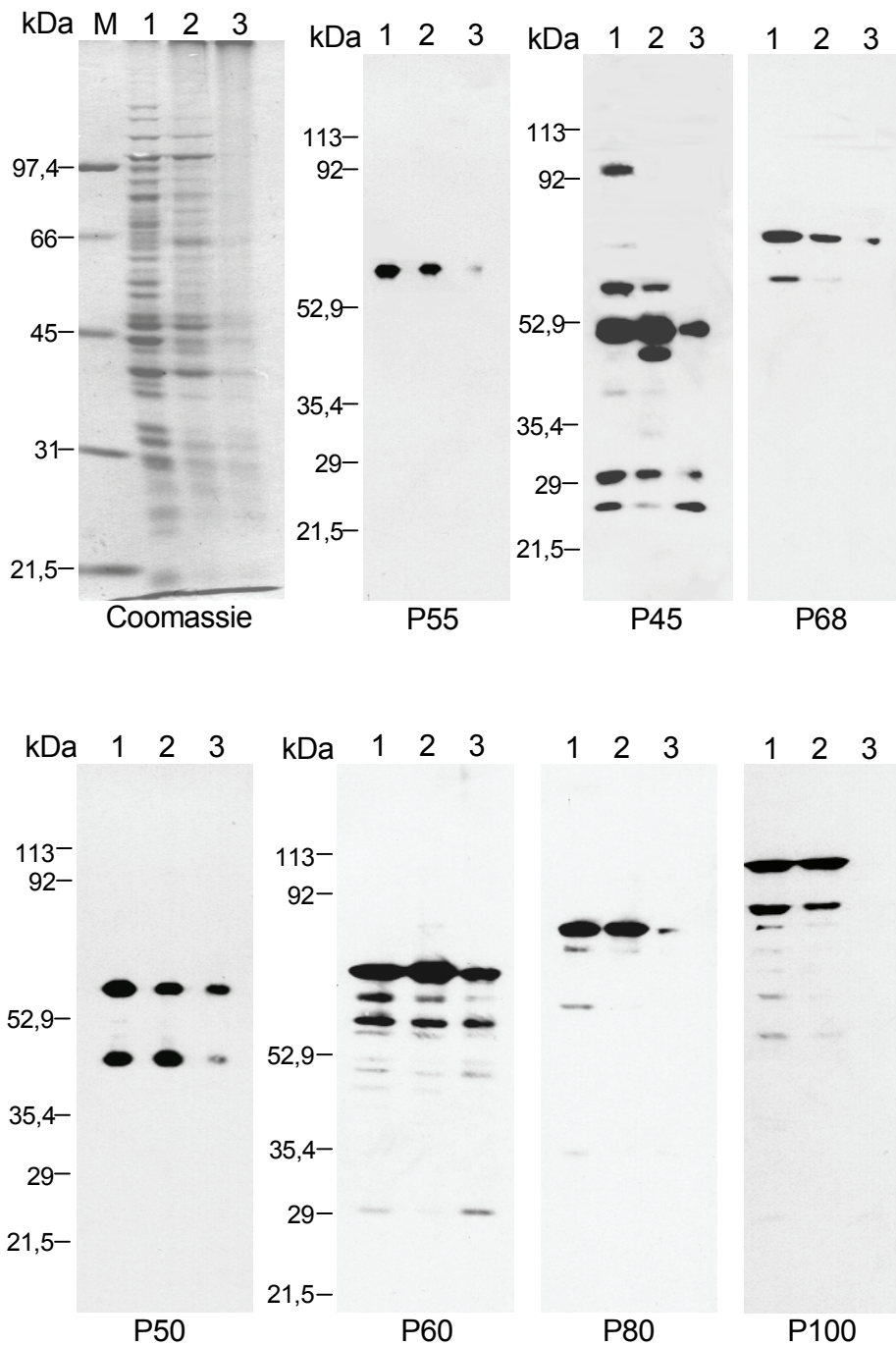


Abb. 4.6.4: Stabilität der Proteine einer lysierten *Mycoplasma hominis*-Kultur

FBG aus je 3ml Kultur wurde in 100µl PBS aufgenommen und nach 6tägiger Inkubation bei -20°C (Spur 1) oder 37°C (ohne Pefabloc: Spur 2; mit Pefabloc: Spur 3) mit 25µl SDS-Probenpuffer versetzt. Je 15µl Probe wurde pro Spur im 12% SDS-PAGE aufgetrennt und entweder coomassie- oder mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine immungefärbt (siehe Kapitel 3.3.2 und 3.4.1). Bei den P50- und P55-spezifischen Immunfärbungen wurden nur 1/10 Vol. je Spur aufgetragen, da die Banden sonst nur schwer zu differenzieren waren. M = Marker

Alle getesteten Proteine, inklusive derer, die nicht im Mycoplasmenkulturüberstand gefunden wurden, waren unter den gegebenen Reaktionsbedingungen gut nachweisbar. Die schwächer ausgeprägten Banden in den Proben mit Pefabloc erklären sich durch die Verdünnung durch dessen Zugabe.

5. Diskussion

Das anfängliche Ziel dieser Arbeit war es, das P60-Protein so modifiziert in *E. coli* zu exprimieren, dass es oberflächenlokalisiert präsentiert wird, um Adhärenzvergleiche zwischen P60-präsentierenden und P60-freien *E. coli* Bakterien anstellen zu können. Dazu lagen Konstrukte vor, bei denen der Proteinsequenz des reifen Proteins entweder keine, die P60-eigene mycoplasmale Signalsequenz vorgeschaltet war oder eines von drei verschiedenen langen Bereichen des *E. coli* TraT-Proteins, die jeweils exakt mit einer oberflächenexponierten Region endeten. Die Charakterisierung dieser Konstrukte zeigte, dass keines der P60-Varianten oberflächenlokalisiert präsentiert wird. Untersuchungen der Kulturüberstände der verschiedenen P60-Klone und *M. hominis* Kultur führten jedoch zu der Entdeckung, dass P60 neben weiteren membranständigen Mycoplasmaproteinen in den Überstand abgegeben wird. Dieses Ergebnis legte den Grundstock für die im Jahre 2004 veröffentlichte Arbeit über ein sekretiertes Antigen von *Mycoplasma hominis* (Hopfe et al., 2004)

Obwohl die Arbeitsgruppe von Taylor bereits 1990 das TraT-Protein als ein geeignetes Vehikel zum Transport von Fremdan antigenen an die Zelloberfläche von *E. coli* beschrieben hatte und dies von Chang und Mitarbeitern 1999 bestätigt wurde, führte die Fusion von TraT Abschnitten mit P60 nicht zu einer Oberflächenexposition dieses Proteins. Offensichtlich ist diese Methode nicht bei allen Proteinen ein Garant für einen erfolgreichen Einbau in die äußere Membran und ihre Präsentation an der Bakterienoberfläche.

P60 wurde in den Varianten mit TraT-Abschnitten (MA3, MA4 und MA5), sowie mit der nativen Signalsequenz in der Membran-haltigen Fraktion der unlöslichen Proteine der entsprechenden *E. coli* Mutante nachgewiesen, dies war sogar bei dem Klon 3.2 zu beobachten, der keinerlei Signalsequenz für den Transport über und eine Verankerung in der Membran enthielt. Da die heterologe Überexpression von Proteinen zur Formation von unlöslichen „Inclusion bodies“ führen kann, und diese nach Trennung von Zytoplasma und Membranfraktion ebenfalls Bestandteil der Membranfraktion sind, ist der Nachweis der P60 Konstrukte in der Membranfraktion nicht zwangsläufig gleichbedeutend mit dem Nachweis ihrer Membranständigkeit.

Bei den Experimenten zur Lokalisation von P60 wurde der Nachweis des Proteins EF-Tu anfänglich als Kontrolle für zytoplasmatische Bestandteile genutzt. Otto und Mitarbeiter haben 2001 in einer Untersuchung über die veränderte Zusammensetzung von Außenmembranproteinen bei Adhäsion von *E. coli* an abiotische Oberflächen auch EF-Tu in der Außenmembran detektieren können und zwar unabhängig von einer Adhäsion. Auch bei Experimenten für diese Arbeit konnte EF-Tu in der Immunfärbung bei langen Belichtungszeiten in der Membranfraktion detektiert werden. Bei Experimenten, die EF-Tu als Kontrolle für das Vorkommen von zytoplasmatischen Bestandteilen vorsehen, sollte deshalb berücksichtigt werden, dass die Detektion des EF-Tu in der Membranfraktion keine Kontamination mit Zytoplasmabestandteilen bedeutet. Vasquez-Laslop und Mitarbeiter zeigten 2001, dass unter anderen der EF-Tu bei osmotisch geschockten, mit EDTA behandelten Bakterien selektiv freigesetzt wird. Da eine Freisetzung auch unter anderen Bedingungen nicht ausgeschlossen werden kann, ist die Detektion des EF-Tu beispielsweise im Kulturüberstand somit auch nicht als Indikator für lysierte Zellen zu deuten. Der Elongationsfaktor Tu stellte also keinen idealen Marker für lysierte Bakterien bzw. die Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile dar.

Als alternatives Markerprotein für zytoplasmatische Proteine könnte bei *E. coli* eventuell das 35kDa Protein herangezogen werden, das ebenfalls das Epitop des CG4-Antikörpers trägt (Kreuzreaktivität) und ausschließlich in der Zytoplasmafraction von *E. coli* zu detektieren war (siehe Kap. 4.3).

Seit 1993 ist bekannt, dass die Membranproteine P50, P60, P80 und P100 als Adhäsine von *Mycoplasma hominis* fungieren (Henrich et al. 1993). Für P60 und P80 konnte gezeigt werden, dass beide Proteine komplexiert in der Membran vorliegen und dass dieser Komplex mit dem zytoplasmatischen HinT Protein durch eine Bindung an P80 interagiert. Des weiteren bilden die Gene, die für P60, P80 und HinT kodieren, ein Operon (Kitzerow & Henrich, 2001). Für die Familie der HinT Proteine war bisher nur bekannt, dass sie an Purine binden und in Eukaryonten Adenosinmonophosphatderivate hydrolysieren (Bieganowski et al. 2002). Ihre genaue Funktion in Prokaryonten ist derzeit noch unbekannt, wobei die Interaktion dieser konservierten HinT Proteine mit membranständigen, sekretierten Proteinen bei Mycoplasmen (Hopfe

et al., 2004) einen ersten Schritt zur Entschlüsselung ihrer Funktion darstellen mag.

Die in dieser Arbeit untersuchten rekombinanten P60 Konstrukte konnten im Kulturmedium von *E. coli* detektiert werden und zwar ohne sichtbaren Größenverlust im Vergleich zu ihrer theoretisch kalkulierten Größe. Da bis auf den MA2 allen Varianten die Signalsequenz zur Sekretion fehlte, liegt der Gedanke nahe, dass die P60-Sekretion durch andere Regionen des Proteins signalisiert wird. In Kulturen von *M. hominis* liess sich ebenfalls P60 im Kulturüberstand nachweisen, darüber hinaus auch das in der Außenmembran mit ihm im Komplex vorliegende Protein P80. Die oberflächenexponierten Membranproteine P50 und P100 konnten unter den in diesen Experimenten gewählten Reaktionsbedingungen nicht im Kulturüberstand dargestellt werden. Zur Kontrolle wurde der Mycoplasmenkulturüberstand auch auf das Vorhandensein von zytoplasmatischen Proteinen getestet, um ausschließen zu können, dass die Proteine von lysierten Bakterien stammten und so in den Überstand gelangt waren. Abgesehen vom Nachweis des EF-Tu und dem bei langen Belichtungszeiten schwach detektierbaren P55, waren verschiedene zytoplasmatische Proteine im Überstand nicht nachweisbar. Weiterführende Experimente der Mycoplasmenarbeitsgruppe zeigten, dass die Menge und der Nachweis der sezernierten Proteine an sich großen Schwankungen unterworfen war, und dass beispielsweise hohe Konzentrationen zweiwertiger Ionen die Sekretion der Proteine von *M. hominis* inhibieren. P80 wies jedoch als einziges der untersuchten Proteine im Überstand einen Größenverlust von 10 kDa auf, was sich durch Abspaltung des N-terminalen Signalpeptides erklären lässt (Hopfe et al. 2004).

Für die Schlussfolgerung, dass die im Überstand einer Bakterienkultur gefundenen Antigene sekretiert wurden, musste die Frage der Proteinstabilität berücksichtigt werden, um sicherzugehen, dass die detektierten Proteine nicht doch von lysierten Bakterien stammten und nur aufgrund einer höheren Stabilität im Kulturüberstand noch nachweisbar waren. Da eine Analyse der Proteinstabilität in Kulturmedium aufgrund der potentiellen Proliferation eines einzigen unlysierten Bakteriums, nicht sinnvoll war, erschien die Bestimmung der

Proteinstabilität nach osmotischer Lyse der Bakterien als bestmögliche Alternative (siehe Kapitel 3.3.5). Alle analysierten Proteine waren unter den gegebenen Versuchsbedingungen gleich gut nachweisbar. Wird zusätzlich die Tatsache betrachtet, dass der Elongationsfaktor Tu in den hier dargestellten Experimenten nicht im Kulturüberstand aller Kultivierungsstufen nachzuweisen war, in denen P60 und P80 detektiert wurden, lässt sich schließen, dass der P60/P80 Komplex von *M. hominis* sezerniert wird. Diese Entdeckung wurde in einem Artikel im BMC Microbiology veröffentlicht (Hopfe et al. 2004). Es handelt sich bei diesen Proteinen somit nicht nur um einen membrangebundenen adhärenzvermittelnden Proteinkomplex, sondern auch um einen sezernierten Proteinkomplex, dessen Interaktion mit dem zytoplasmatischen HinT Protein möglicherweise auf eine Signaltransduktion hinweist. Über sezernierte Proteine ist bei Mycoplasmen bisher erst sehr wenig bekannt (siehe Kapitel 1.4) und die Beschreibung der bisher bekannten sezernierten Proteine trägt kaum zum Verständnis der möglichen Funktion des sezernierten P60/P80 Komplexes bei. Einer der nächsten Schritte zur Funktionsanalyse dieser sekretierten Proteine könnte sein, ihr adhäsives wie auch immunogenes Potential zu charakterisieren. Außerdem sollte eine weitergehende Analyse der Bedingungen, unter denen *M. hominis*-Proteine sezerniert werden, zur Klärung der Frage beitragen, ob durch ein Signal von außen die Abspaltung der membranverankernden P80-Signalsequenz und die des P60-Lipidankers induziert wird, was zur Freisetzung von P60 und P80 in das umliegende Milieu führt und die Interaktion des ins Zytoplasma diffundierenden P80 N-Terminus mit HinT ermöglicht. Denkbar wäre auch eine durch intrazelluläre Vorgänge bedingte Interaktion von HinT mit dem ins Zytoplasma ragenden P80-N-Terminus, welches eine Konformationsänderung von P80 induziert, die letztendlich in der Sekretion des P60/P80-Proteinkomplexes resultiert.

6. Zusammenfassung

Zur Charakterisierung seiner zytadhäsiven Eigenschaften war das Membranprotein P60 von *M. hominis* in *E. coli* heterolog exprimiert worden (Klon 3.2). Dieses mit sechs Histidinen und der Dihydrofolatreduktase fusionierte P60 zeigte Adhäsion an HeLa-Zellen. Da ein Einfluss der Fusionspartner auf die Adhäsion nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde versucht, rekombinantes P60 in *E. coli* oberflächenexponiert zu exprimieren, um in Adhärenztests mit diesen P60 *E. coli*-Mutanten die Adhäsion dieses Proteins isoliert betrachten zu können. Um den Einbau in die äußere Membran von *E. coli* zu erreichen, wurde P60 in den Konstrukten MA3, MA4 und MA5 mit verschiedenen langen N-Termini des bei *E. coli* oberflächenlokalisierten Membranproteins TraT fusioniert. Zusätzlich wurde mit MA2 ein Klon hergestellt, der den P60-Vorläufer mit seiner intrinsischen mycoplasmalen Signalsequenz exprimiert.

Bei der Charakterisierung der verschiedenen Zellfraktionen (wie Membran-, Zytoplasma- und Periplasmafraktion) dieser Konstrukte konnte P60 bei allen Klonen, inklusive 3.2 und MA2, in der Membran-haltigen Fraktion nachgewiesen werden. In FACS-Analysen der intakten *E. coli*-Konstrukte wurde jedoch deutlich, dass keine P60-Variante oberflächenexponiert vorlag. Die Analyse der Zellkulturüberstände zeigte vielmehr, dass P60 - je nach Variante in unterschiedlichem Ausmaß - in den Überstand der *E. coli* Kulturen abgegeben wurde.

Bei der Analyse des Kulturüberstandes einer *M. hominis*-Kultur auf das Vorkommen der Membranproteine P50, P60, P80 und P100 wurden nur P60 und P80 detektiert, von denen bekannt ist, dass sie in der Mycoplasmenmembran einen Komplex bilden und mit dem zytoplasmatischen HinT-Protein interagieren. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es sich bei P60 und P80 nicht nur um einen an der Adhäsion beteiligten Proteinkomplex handelt, sondern dieser aktiv sezerniert wird, und dessen pathophysiologische Rolle nun zu untersuchen bleibt.

7. Literaturverzeichnis

Achtmann, B., N. Kennedy, R. Skurray 1977. Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: Role of TraT protein in surface exclusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**:5104-5108.

Bieganowski, P., P. N. Garrison, S. C. Hodawadekar, G. Faye, L. D. Barnes, C. Brenner 2002. Adenosine monophosphoramidase activity of Hnt and Hnt1 supports function of Kin28, Ccl1 and Tfb3. *J. Biol. Chem.* **277**:10852-10860.

Birnboim, H. C., J. Doly 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**:1513-1523.

Brade, L., H.-D. Grimmecke, O. Holst, W. Brabetz, A. Zamojski, H. Brade 1996. Specificity of monoclonal antibodies against *Escherichia coli* K-12 lipopolysaccharide. *J. Endotoxin Res.* **3**:39-47.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254

Bumann, D., S. Aksu, M. Wendland, K. Janek, U. Zimny-Arndt, N. Saborth, T. F. Meyer, P. R. Jungblut 2002. Proteome analysis of secreted proteins of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* **70**:3396-3403.

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.

Chang, H.-H., S. Y. Sheu, S. J. Lo 1999. Expression of foreign antigens on the surface of *Escherichia coli* by fusion to the outer membrane protein traT. *J. Biomed. Sci.* **6**:64-70.

China, B., F. Goffaux 1999. Secretion of virulence factors by *Escherichia coli*. *Vet. Res.* **30**:181-202.

Collier, A. M., W. A. Clyde, Jr. 1971. Relationships between *Mycoplasma pneumoniae* and human respiratory epithelium. *Infect. Immun.* **3**:694-701.

Collier, A. M., W. A. Clyde, Jr. 1974. Appearance of *Mycoplasma pneumoniae* in lungs of experimentally infected hamsters and sputum from patients with natural disease. *Am. Rev. Respir. Dis.* **110**:765-773.

Davis, K. L., K. S. Wise 2002. Site-specific proteolysis of the MALP-404 lipoprotein determines the release of a soluble selective lipoprotein-associated motif-containing fragment and alteration of the surface phenotype of *Mycoplasma fermentans*. *Infect. Immun.* **70**:1129-1135.

Doyle, R. J., M. Rosenberg 1990. Microbial Cell Surface Hydrophobicity. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Dudler, R., C. Schmidhauser, R. W. Parish, R. E. Wettenhall, T. Schmidt 1988. A mycoplasma high-affinity transport system and the in vitro invasiveness of mouse sarcoma cells. *EMBO J.* **7**:3963-3970.

Fernie-King, B. A., D. J. Seilly, A. Davies, P. J. Lachmann 2002. Streptococcal inhibitor of complement inhibits two additional components of the mucosal innate immune system: secretory leukocyte proteinase inhibitor and lysozyme. *Infect. Immun.* **70**:4908-4916.

Fjellbirkeland, A., P. G. Kruger, V. Bemanian, B. T. Høgh, J. C. Murrel, H. B. Jensen 2001. The C-terminal part of the surface-associated protein MopE of the methanotroph *Methylococcus capsulatus* (Bath) is secreted into the growth medium. *Arch. Microbiol.* **176**:197-203.

Fleming, A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology* **10**:226-236.

Folders, J., J. Algra, M. S. Roelofs, L. C. van Loon, J. Tommassen, W. Bitter 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* chitinase, a gradually secreted protein. *J. Bacteriol.* **183**:7044-7052.

Hahn, H., D. Falke, S. H. E. Kaufmann, U. Ullmann (Hrsg.) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 3. Auflage 1999, Springer-Verlag.

Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**:557-580.

Hardesty, C., C. Ferran, J. M. DiRienzo 1991. Plasmid-mediated sucrose metabolism in *Escherichia coli*: characterization of *scrY*, the structural gene for a phosphoenolpyruvate-dependent sucrose phosphotransferase system outer membrane porin. *J. Bacteriol.* **173**:449-456.

Heffernan, E. J., L. Wu, J. Louie, S. Okamoto, J. Fierer, D. G. Guiney 1994. Specificity of the complement resistance and cell association phenotypes encoded by the outer membrane protein genes *rck* from *Salmonella typhimurium* and *ail* from *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* **62**:5183-5186.

Henrich, B., R. C. Feldmann, U. Hadding 1993. Cytadhesins of *Mycoplasma hominis*. *Infect. Immun.* **61**:2945-2951.

Henrich, B., G. Berns, M. Weinhold, A. Kitzerow, H. Schaal, U. Hadding 1998. Cloning and expression of P60, a conserved surface-localized protein of *Mycoplasma hominis*, in *Escherichia coli*. *Biol. Chem.* **379**:1143-1150.

Henrich, B., M. Hopfe, A. Kitzerow, and U. Hadding. 1999. The adherence-associated lipoprotein P100, encoded by an *opp* operon structure, functions

as the oligopeptide-binding domain OppA of a putative oligopeptide transport system in *Mycoplasma hominis*. *J. Bacteriol.* **181**:4873-4878.

Holečková, B., E. Holoda, M. Fotta, V. Kalináčová, J. Gondol', J. Grolmus 2002. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. *Ann. Agric. Environ. Med.* **9**:179-182.

Hopfe, M., R. Hoffmann, B. Henrich 2004. P80, the HinT interacting membrane protein, is a secreted antigen of *Mycoplasma hominis*. *BMC Microbiology* **4**:46.

Inamine, J. M., S. Loechel, A. M. Collier, M. Barile, P.-C. Hu 1989. Nucleotide sequence of the *MgPa* (*mgp*) operon of *Mycoplasma genitalium* and comparison to the *P1* (*mpp*) operon of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene* **82**:259-267.

Ish-Horowicz, D., J. F. Burke 1981. Rapid and effective cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.* **9**:2989-2998.

Kahane, I., S. Tucker, D. K. Leith, J. Morrison-Plummer, J. S. Baseman 1985. Detection of the major adhesin P1 in triton shells of virulent *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect. Immun.* **50**:944-946.

Kitzerow, A., B. Henrich 2001. The cytosolic HinT protein of *Mycoplasma hominis* interacts with two membrane proteins. *Mol. Microbiol.* **41**:297-287.

Klemm, P., M. A. Schembri 2000. Bacterial adhesins: function and structure. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**:27-35.

Koch, R. 1884. Die Aetiologie der Tuberkulose. *Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte* **2**:1-88.

- Koebnik, R., K. P. Locher, P. Van Gelder** 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol. Microbiol.* **37**:239-253.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* **227**:680-685.
- Li, Y., H. Sun, X. Ma, A. Lu, R. Lux, D. Zusman, W. Shi** 2003. Extracellular polysaccharides mediate pilus retraction during social motility of *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:5443-5448.
- Luckey, M., H. Nikaido** 1980. Specificity of diffusion channels produced by λ phage receptor protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:167-171.
- McLaughlin, J. B., J. Sobel, T. Lynn, E. Funk, J. P. Muddaugh** 2004. Botulism type E outbreak associated with eating a beached whale, Alaska. *Emerging Infectious Diseases* **10**:1685-1687.
- Otto, K., J. Norbeck, T. Larsson, K. A. Karlsson, M. Hermansson** 2001. Adhesion of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to abiotic surfaces leads to altered composition of outer membrane proteins. *J. Bacteriol.* **183**:2445-2453.
- Phillips, G. N. Jr., P. F. Flicker, C. Cohen, B. N. Manjula, V. A. Fischetti** 1981. Streptococcal M protein: alpha-helical coiled-coil structure and arrangement on the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **78**:4689-4693.
- Razin, S., D. Yogev, Y. Naot** 1998. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and molecular biology reviews* **62**:1094-1156.
- Rytkönen, A., L. Johansson, V. Asp, B. Albiger, A.-B. Jonsson** 2001. Soluble pilin of *Neisseria gonorrhoeae* interacts with human target cells and tissue. *Infect. Immun.* **69**:6419-6426.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, T. Maniatis 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sawai, T., K. Tomono, K. Yanagihara, Y. Yamamoto, M. Kaku, Y. Hirakata, H. Koga, T. Tashiro, S. Kohno 1997. Role of coagulase in a murine model of hematogenous pulmonary infection induced by intravenous injections of *Staphylococcus aureus* enmeshed in agar beads. *Infect. Immun.* **65**:466-471.

Stevens, M. K., D. C. Krause 1990. Disulfid-linked protein associated with *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence phase variation. *Infect. Immun.* **58**:3430-3433.

Stevens, M. K., D. C. Krause 1991. Localization of the *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-accessory proteins HMW1/4 in the cytoskeleton-like triton shell. *J. Bacteriol.* **173**:1041-1050.

Suhr, M., I. Benz, M. A. Schmidt 1996. Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDAc and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Mol. Microbiol.* **22**:31-42.

Taylor, I. M., J. L. Harrison, K. N. Timmis, C. D. O'Connor 1990. The TraT lipoprotein as a vehicle for the transport of foreign antigenic determinants to the cell surface of *Escherichia coli* K12: structure-function relationships in the TraT protein. *Mol. Microbiol.* **4**:1259-1268.

Tomii, K., M. Kanehisa 1998. A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome Res.* **8**:1048-1059.

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

Tully, J. G., S. Razin (ed.). 1996. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology, vol II. Diagnostic Procedures. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.

Turner, D. P., K. G. Wooldridge, D. A. Ala'Aldeen 2002. Autotransported serine protease A of *Neisseria meningitides*: an immunogenic, surface-exposed outer membrane, and secreted protein. *Infect. Immun.* **70**:4447-4461.

Weinhold, M. 1998. Expression und Charakterisierung eines rekombinanten 60 kDa Membranproteins von *Mycoplasma hominis*. Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

8. Abkürzungen

A. dest	Aqua destillata, destilliertes Wasser
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -Thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Laria Bertani Medium
<i>M.</i>	Mycoplasma
mA	Milliampere
min	Minute
OD	Optische Dichte
OppA	Substratbindende Domäne der Oligo-peptidpermease (Henrich et al., 1999)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

Ricarda Hoffmann
An der Rennweide 3
26316 Dangast
24. Juni 1976

AUSBILDUNG

September 2004 – heute	Assistenzärztin der Medizinischen Klinik II, Reinhard-Nieter Krankenhaus Wilhelmshaven
Oktober 1996 – Mai 2004	Studium der Humanmedizin Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
April 2002 – März 2003	Doktorarbeit Medizinische Mikrobiologie, Universität Düsseldorf
Mai 2004	Drittes Staatsexamen
März 2002	Zweites Staatsexamen
August 1999	Erstes Staatsexamen
Juni 1995	Abitur Anna-Schmidt-Schule Frankfurt/Main

PRAXISERFAHRUNG

PJ April 2003 – März 2004	Wahlfach: Neurologie Universitätsklinikum Düsseldorf
Famulaturen	Dermatologie, Universitätsklinikum Düsseldorf Radiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf Medizinische Mikrobiologie, Universität Düsseldorf Unfallchirurgie, Krankenhaus Sanderbusch, Sande
Dezember 1998 – Juni 2001	Studentische Hilfskraft in der Klinik für Hämatologie, Onkologie & klinische Immunologie, Düsseldorf
Februar 1998 – Juli 1999	Studentische Hilfskraft in der Inhalationsabteilung der Mutter- und Kind Kurklinik, Varel-Dangast

SPRACHKENNTNISSE

Englisch	Fließend in Wort und Schrift Sprachkurse in England und den USA, diverse Reisen
Spanisch	Gute Kenntnisse Oktober 1995 – Mai 1996 Universität Malaga, Spanien
Französisch	Gute Kenntnisse mehrere Sprachkurse, zuletzt Sept. – Nov. 2001 in Toulouse

Charakterisierung des heterolog in *E. coli* exprimierten Membranproteins P60 von *Mycoplasma hominis*: P60, ein sezerniertes Protein!
Vorgelegt von Ricarda Hoffmann

Zur Charakterisierung seiner zytadhäsiven Eigenschaften war das Membranprotein P60 von *M. hominis* in *Escherichia coli* heterolog exprimiert worden (Klon 3.2). Dieses mit sechs Histidinen und der Dihydrofolatreduktase fusionierte P60 zeigte Adhäsion an HeLa-Zellen. Da ein Einfluss der Fusionspartner auf die Adhäsion nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde versucht, rekombinantes P60 in *E. coli* oberflächenexponiert zu exprimieren, um in Adhärenztests mit diesen P60 *E. coli*-Mutanten die Adhäsion dieses Proteins isoliert betrachten zu können. Um den Einbau in die äußere Membran von *E. coli* zu erreichen, wurde P60 in den Konstrukten MA3, MA4 und MA5 mit verschiedenen langen N-Termini des bei *E. coli* oberflächenlokalisierten Membranproteins TraT fusioniert. Zusätzlich wurde mit MA2 ein Klon hergestellt, der den P60-Vorläufer mit seiner intrinsischen mycoplasmalen Signalsequenz exprimiert.

Bei der Charakterisierung der verschiedenen Zellfraktionen (wie Membran-, Zytoplasma- und Periplasmafraktion) dieser Konstrukte konnte P60 bei allen Klonen, inklusive 3.2 und MA2, in der Membran-haltigen Fraktion nachgewiesen werden. In FACS(Fluoreszenz aktivierter Zellsortierer)-Analysen der intakten *E. coli*-Konstrukte wurde jedoch deutlich, dass keine P60-Variante oberflächenexponiert vorlag. Die Analyse der Zellkulturüberstände zeigte vielmehr, dass P60 - je nach Variante in unterschiedlichem Ausmaß - in den Überstand der *E. coli* Kulturen abgegeben wurde.

Bei der Analyse des Kulturüberstandes einer *M. hominis*-Kultur auf das Vorkommen der Membranproteine P50, P60, P80 und P100 wurden nur P60 und P80 detektiert, von denen bekannt ist, dass sie in der Mycoplasmenmembran einen Komplex bilden und mit dem zytoplasmatischen HinT-Protein interagieren. So konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es sich bei P60 und P80 nicht nur um einen an der Adhäsion beteiligten Proteinkomplex handelt, sondern dieser aktiv sezerniert wird, und dessen pathophysiologische Rolle nun zu untersuchen bleibt.

Düsteldorf, 14/12/02
Ds. B. Kewitz