

# Glycerolmetabolismus und Pathogenität

von

*Mycoplasma pneumoniae*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

Vorgelegt von:  
Claudine Hames  
aus Luxemburg/Luxemburg

Göttingen 2008

D7

Referent: Prof. Dr. Jörg Stülke

Korreferent: PD Dr. Michael Hoppert

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2008

## **Danksagung**

Zu allererst möchte ich Prof. Jörg Stülke danken, dass ich bei ihm sowohl meine Diplomarbeit als auch meine Doktorarbeit in seiner Abteilung anfertigen durfte, für die schöne und leider zu kurze Stadtführung durch London und für einige gesellige Feierabendbierrunden. Auch möchte ich PD Dr. Michael Hoppert dafür danken, dass er Korreferent dieser Arbeit ist und für die Hilfe und die Tipps bei der Elektronenmikroskopie. Wolfgang Bohne und Diana Hippe danke ich für die gute Einführung in die Zellkultur.

Auch Sven möchte ich danken, dass er mir die Welt der Mykoplasmen näher gebracht hat und immer für Fragen jeglicher Art zur Verfügung stand. Ein großer Dank gilt auch den Praktikanten, Cécilia, Spencer und Meike, die zu dieser Arbeit beigetragen haben. Meinem Diplomanden Sebastian S. danke ich für die erfolgreiche und nette Zusammenarbeit, auch wenn wir in Sachen Fußball nicht immer der gleichen Meinung sind (Und der HSV wird doch Meister!☺). Der lieben Julia danke ich für die sehr gute Unterstützung im Labor und für unterhaltsame Gespräche. Unserer fleißigen guten Fee Bärbel gebührt auch ein großer Dank.

Allen Abteilungsmitgliedern danke ich für die gute Stimmung im Labor und für die lustigen Freitagnachmittage. Hierbei möchte ich Nico für die Einführung der Bloodhoundgangfreitagsmusiktradition danken, die jedem immer die Vorfreude auf das Wochenende versüßt. Auch möchte ich Katrin und Christoph danken, mit denen man immer lustige und interessante Gespräche führen kann. Falk und Sina möchte ich vor allem für die spaßigen Veteranentreffen beim Thailänder oder Mexikaner danken. Kalpana danke ich, dass sie immer mit mir zum Sport gegangen ist und wir uns gegenseitig motiviert haben. Maria, unserer spanischen Austauschdotorandin, danke ich, dass sie mir Spanien näher gebracht hat und dafür, dass ihre immerwährende gute Laune so ansteckend war. Josef danke ich für die interessanten Gespräche. Fabian danke ich für die netten musikalischen Einlagen mit dem Laborschweinchen. Hinnerk danke ich auch für lustige Geschichten und für das näher bringen seines etwas anderen Musikgeschmacks. Oli danke ich, dass er mir immer meine Fragen beantwortet hat, obwohl er jetzt immer sehr beschäftigt ist. Auch ehemaligen Kollegen, darunter Matthias, Matti, Sarah und Eva danke ich zum einen für die nette Aufnahme im Stülke-Lab und zum anderen für unterhaltsame Gespräche. Den TAs Christina und Sabine

danke ich, dass sie immer gute Tipps auf Lager hatten, wenn etwas mal nicht geklappt hat.

Jörn und Judith möchte ich für die lustigen Kneipen- und Partyabende während des Studiums und der Doktorarbeit danken. Bärbel und Peter danke ich, dass sie mich immer herzlich aufgenommen haben und mir den Norden Deutschlands näher gebracht haben.

E grousse Merci gebührt meine lieben Eltern und meiner Familie in Luxemburg. Sie haben mir mein Studium finanziert und mich in meinen Entscheidungen immer unterstützt. Vielen Dank!

Zum Schluss möchte ich Sebastian H., dem wichtigsten Menschen in meinem Leben, danken, dass er mich immer auf andere Gedanken gebracht hat, wenn es im Labor mal nicht so gut lief und dabei oftmals meine schlechte Laune ertragen musste. Danke, dass du immer für mich da bist.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	V
<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>2</b>
2.1 Die Klasse der <i>Mollicutes</i> .....	2
2.2 Der Organismus <i>M. pneumoniae</i> .....	2
2.3 Das PTS in Gram-positiven Bakterien.....	4
2.3.1 Das PTS in <i>M. pneumoniae</i> .....	5
2.4 Glycerolstoffwechsel in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien.....	6
2.4.1 Die Rolle der Glycerol-3-phosphat-Oxidase bei der Pathogenität.....	7
2.4.2 Glycerolstoffwechsel in <i>M. pneumoniae</i> .....	9
2.5 Pathogenitätsmechanismen von Bakterien .....	10
2.5.1 Pathogenitätsmechanismen von Mykoplasmen .....	12
2.6 Regulation in Bakterien.....	14
2.6.1 Phosphorylierungen in Bakterien und deren Funktion.....	15
2.6.2 Die Ser/Thr/Tyr-Kinasen und deren Funktion .....	16
2.7 Ziele der Arbeit .....	17
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
3.1 Bakterienstämme und Plasmide .....	18
3.2 Medien.....	18
3.3 Methoden .....	21
3.3.1 Allgemeine Methoden.....	21
3.3.2 Anzucht von Bakterien.....	22

---

3.3.3	Genetische Methoden.....	23
3.3.4	Arbeiten mit RNA.....	33
3.3.5	Arbeiten mit Proteinen.....	34
3.3.6	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	40
3.3.7	Messung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion von <i>M. pneumoniae in vivo</i> .....	43
3.3.8	Immun-Fluoreszenz-Mikroskopie.....	44
3.3.9	Elektronenmikroskopie.....	44
3.3.10	Radioaktive <i>in vitro</i> Phosphorylierung von Enzymen.....	45
3.3.11	Infektion von HeLa-Zellen mit <i>M. pneumoniae</i> Mutanten.....	48
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchung der Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase aus</b>	
	<b><i>M. pneumoniae</i>.....</b>	<b>50</b>
4.1.1	Expression der Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase bei verschiedenen Kohlenstoffquellen.....	50
4.1.2	Kann die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase NAD <sup>+</sup> reduzieren?.....	51
4.1.3	Ist <i>glpD</i> aus <i>M. pneumoniae</i> eine Glycerol-3-phosphat-Oxidase?.....	52
4.1.4	Charakterisierung der GlpO aus <i>M. pneumoniae</i> in <i>B. subtilis</i> .....	54
4.1.5	Lokalisierung der Glycerol-3-Phosphat-Oxidase.....	56
4.1.6	Wachstumsversuche mit der <i>glpD::tn</i> -Mutante GPM52.....	61
4.1.7	Untersuchung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion in <i>M. pneumoniae</i> .....	62
4.1.8	Zytotoxizität der <i>glpD::tn</i> -Mutante gegenüber HeLa-Zellen.....	63
4.1.9	Ist die NADH/H <sup>+</sup> -Oxidase in der Lage Wasserstoffperoxid freizusetzen?.....	65
<b>4.2</b>	<b>Untersuchung der Zytotoxizität von verschiedenen Transposonmutanten</b>	
	<b>von <i>M. pneumoniae</i>.....</b>	<b>68</b>
4.2.1	Isolierung der <i>mpn372::tn</i> -Mutante.....	68
4.2.2	Zytotoxischer Effekt der <i>mpn372::tn</i> -Mutante (GPM8).....	70
4.2.3	Zytotoxischer Effekt der <i>mpn474::tn</i> -Mutante (GPM70) und der <i>ldh::tn</i> -Mutante (GPM69).....	71
4.2.4	Isolierung der <i>thyA::tn</i> -Mutante.....	73
4.2.5	Zytotoxischer Effekt der <i>thyA::tn</i> -Mutante (GPM9).....	74
4.2.6	Isolierung der <i>mpn358::tn</i> -Mutante.....	75

---

4.2.7	Zytotoxischer Effekt der <i>mpn358::tn</i> -Mutante (GPM10) .....	77
4.2.8	Zytotoxischer Effekt der <i>hprK::tn</i> -Mutante (GPM51).....	78
4.2.9	Zytotoxischer Effekt der <i>prpC::tn</i> -Mutante (GPM68).....	79
4.2.10	Isolierung der <i>mpn248::tn</i> -Mutante .....	80
4.2.11	Zytotoxischer Effekt der <i>mpn248::tn</i> -Mutante .....	82
<b>4.3</b>	<b>Regulatorische Phosphorylierungen in <i>M. pneumoniae</i> .....</b>	<b>83</b>
4.3.1	Wird der Glycerolstoffwechsel durch die HPrK reguliert?.....	83
4.3.2	Ist MPN248 eine Serin/Threonin-Kinase.....	85
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>87</b>
<b>5.1</b>	<b>Die Verbindung von Kohlenstoffmetabolismus und Pathogenität in <i>M. pneumoniae</i>.....</b>	<b>87</b>
<b>5.2</b>	<b>Der Glycerolstoffwechsel und seine Rolle bei der Virulenz .....</b>	<b>87</b>
<b>5.3</b>	<b>Die NADH<sub>2</sub>-Oxidase von <i>M. pneumoniae</i> .....</b>	<b>92</b>
<b>5.4</b>	<b>Proteinphosphorylierung: ein wichtiger Regulationsmechanismus in <i>M. pneumoniae</i>?.....</b>	<b>95</b>
<b>5.5</b>	<b>Das PTS und die Virulenz .....</b>	<b>100</b>
<b>5.6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>101</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>123</b>
<b>7.1</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>123</b>
7.1.1	Chemikalien .....	123
7.1.2	Hilfsmittel .....	124
7.1.3	Geräte und Apparaturen .....	124
7.1.4	Kommerziell erhältliche Systeme .....	125
7.1.5	Antikörper und Enzyme .....	126
<b>7.2</b>	<b>Oligonukleotide .....</b>	<b>126</b>
<b>7.3</b>	<b>Plasmide .....</b>	<b>129</b>
<b>7.4</b>	<b>Stämme.....</b>	<b>131</b>

---

<b>7.5</b>	<b>Proteine .....</b>	<b>132</b>
<b>7.6</b>	<b>Verwendete Internetangebote und Computerprogramme.....</b>	<b>133</b>



**Abkürzungsverzeichnis**

% (v/v)	% (volume/volume) (Volumenprozent)
% (w/v)	% (weight/volume) (Massenprozent)
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CcpA	Catabolite control protein A
CCR	Kohlenstoff-Katabolitenrepression
CDP*	2-Chlor-5-(4-Methoxyspiro{1,2-Dioxetan-3,2'-(5'-Chlor)Tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]Decan}-4-yl)-1-Phenylphosphat, Dinatriumsalz
Chrom.	chromosomal
cre	Catabolite responsive element
Deion.	Deionisiert
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EI	Enzym I
EII	Enzym II
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Glc	Glukose
HABA	2-(4'-hydroxybenzenazo)benzolsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HPr	Hitzestabiles Protein
HPrK/P	HPr-Kinase/Phosphorylase
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktosid
kb	Kilobasenpaare
LB	Luria Bertani (Medium)
MCS	Multiple cloning site
Mbp	Megabasenpaare
MMR	Multiple mutation reaction
MOI	Multiplicity of infection
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenindinucleotid
NADH <sub>2</sub>	Nicotinamid-adenindinucleotid (reduzierte Form)
Ni <sup>2+</sup> -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte, gemessen bei Wellenlänge $\lambda = x$ nm
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PPLO	pleuropneumoniae like organisms
PTS	Phosphoenolpyruvat:Zucker Phosphotransferasesystem
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec./sek.	Sekunde
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp

## 1. Zusammenfassung

*Mycoplasma pneumoniae*, der Erreger der atypischen Pneumonie, kann neben Glukose und Fruktose auch Glycerol als Kohlenstoffquelle nutzen. Das Glycerol wird über erleichterte Diffusion in die Zelle geschleust und anschließend durch die Glycerol-Kinase phosphoryliert. Das Glycerol-3-phosphat wird dann zu Dihydroxyacetonphosphat umgewandelt, welches in der Glykolyse zur Gewinnung von Energie in Form von ATP weiter umgesetzt wird.

In dieser Arbeit sollte das Enzym, das für die Oxidation von Glycerol-3-phosphat zuständig ist (annotiert als GlpD), in *M. pneumoniae* näher untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass dieses Protein keine Dehydrogenase-, sondern eine Oxidase-Aktivität besitzt, d.h. Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwendet. Hierbei wird dann Wasserstoffperoxid freigesetzt, welches als Virulenzfaktor die Wirtszellen nachweislich schädigen kann. Eine *glpD*-Mutante ist weniger zytotoxisch gegenüber HeLa-Zellen als der Wildtyp. Die Glycerol-3-phosphat-Oxidase ist demnach der Produzent eines primären Virulenzfaktors in *M. pneumoniae*.

Neben der *glpD*-Mutante wurden noch weitere Mutanten auf ihre Zytotoxizität untersucht. Es stellte sich heraus, dass die HPr-Kinase und eine Ser/Thr-Kinase (PrkC) wie GlpD einen Einfluss auf die Etablierung der Pathogenität von *M. pneumoniae* haben. Die Mutanten dieser Gene waren alle weniger zytotoxisch als der Wildtyp. Dies zeigt, dass Phosphorylierungen offensichtlich eine wichtige regulatorische Rolle für die Pathogenität in *M. pneumoniae* spielen.

Eine nähere Untersuchung der Kinase PrkC hat gezeigt, dass sie Ähnlichkeiten zu einer Ser/Thr-Kinase, die in vielen Gram-positiven Organismen zu finden ist, aufweist. Diese Kinase übernimmt wichtige regulatorische Funktionen in den Zellen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PrkC eine wichtige Eigenschaft, nämlich die Autophosphorylierung, mit den bereits beschriebenen PrkCs gemeinsam hat. Es war jedoch nicht möglich, Substrate der Kinase zu identifizieren. Aber die Isolierung einer *prkC*-Mutante war erfolgreich, die nicht mehr in der Lage ist, adhäsiv an Oberflächen zu wachsen und sich deshalb nicht mehr an die Wirtszellen anhaften kann. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass PrkC eine wichtige Rolle bei dem Aufbau der so genannten Tipstruktur, dem Anhaftungsorganell von *M. pneumoniae*, spielen könnte.

## 2. Einleitung

### 2.1 Die Klasse der *Mollicutes*

Pathogene Bakterien können Pflanzen, Tiere und auch Menschen befallen und Krankheiten auslösen. Die Mykoplasmen werden der Klasse der *Mollicutes*, was übersetzt weiche Haut bedeutet, zugeordnet. Die *Mollicutes* gehören zu den Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt, obwohl sie keine echte Zellwand besitzen. Zu dieser Klasse gehören neben der Gattung *Mycoplasma* noch die Gattungen *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*, *Spiroplasma*, *Mesoplasma*, *Phytoplasma* und *Ureaplasma* (Woese *et al.*, 1980).

Die Bakterien der Gattungen *Acholeplasma*, *Phytoplasma* und *Spiroplasma* sind Phytopathogene, welche die Pflanzen befallen und schädigen können. Die für die Human- und Veterinärmedizin relevanten *Mollicutes* gehören zu den Gattungen *Mycoplasma* und *Ureaplasma*.

Die Mykoplasmen gehören zu den Krankheitserregern mit den kleinsten Genomen. Die Genomgröße kann zwischen 0,58 Mbp bei *Mycoplasma genitalium* und 1,36 Mbp bei *M. penetrans* variieren (Su und Baseman, 1990; Fraser *et al.*, 1995; Sasaki *et al.*, 2002). Die kleine Genomgröße der Mykoplasmen rührt von einer regressiven Evolution mit einer graduellen Verkleinerung des Genoms her (Maniloff, 1992). Obwohl Woese *et al.* beschrieben haben, dass die *Mollicutes* vor etwa 605 Millionen Jahren von dem Streptococcen-Zweig der Gram-positiven Bakterien abzweigten, konnte ein neuer Stammbaum anhand von sequenzierten Genomen dies widerlegen (Woese *et al.*, 1980). Der Stammbaum zeigt, dass die *Mollicutes*, die *Lactobacilli*, die *Streptococcen*, die *Staphylococcen*, die *Listerien* und die *Bacilli* aus einem gemeinsamen Vorfahren entstanden sind. Von diesem Vorfahren haben sich zwei unabhängige Zweige entwickelt: die *Mollicutes* und die anderen vorher genannten Organismen (Ciccarelli *et al.*, 2006).

### 2.2 Der Organismus *M. pneumoniae*

*M. pneumoniae* wurde erstmals im Jahre 1944 entdeckt und beschrieben (Meiklejohn *et al.*, 1944). Die Krankheitserreger wurden aus dem Sputum eines Patienten mit einer primären atypischen Lungenentzündung isoliert. Mykoplasmen befallen einen Wirt

durch Tröpfcheninfektion und siedeln sie sich dann an dem unteren respiratorischen Trakt der Lunge an. Vor allem Kinder, ältere oder immungeschwächte Menschen sind von diesen Infektionen betroffen (Chanock *et al.*, 1963). Neben dem klassischen Krankheitsbild, der Lungenentzündung, können noch erhebliche Komplikationen auftreten, wie zum Beispiel Meningoencephalitis, Myocarditis, hämolytische Anämie und rheumatische Arthritis (Taylor *et al.*, 1967; Mackay *et al.*, 1975; Ramirez *et al.*, 2005, Wilson *et al.*, 2007).

Der parasitäre Lebensstil von *M. pneumoniae* wird vor allem durch die Fähigkeit, adhäsiv an glatten Oberflächen zu wachsen, ermöglicht (Somerson *et al.*, 1967). Die Anhaftung findet mit Hilfe eines Organells statt, der so genannten Tipstruktur. Diese Struktur befindet sich an einem Pol der Zelle und besteht aus vielen verschiedenen Proteinen wie zum Beispiel dem P1-Protein und den HMW-Proteinen (Leith und Baseman, 1984; Krause, 1996; Balish *et al.*, 2003). Die Tipstruktur ermöglicht es den Mykoplasmen, sich an Epithelzellen anzulagern und somit eine Infektion auszulösen (Wilson und Collier, 1976). Des Weiteren ist die Tipstruktur an der Zellteilung und der Gleitbewegung beteiligt (Krause und Balish, 2001).

Im Jahr 1996 wurde die vollständige Genomsequenz von *M. pneumoniae* veröffentlicht und ermöglichte die Untersuchung einer minimalen Genausstattung (Himmelreich *et al.*, 1996; Dandekar *et al.*, 2000). Bei einer Größe von 816 kb wurden 688 offene Leserahmen identifiziert. Die parasitäre Lebensweise spiegelt sich auch darin wieder, dass der Organismus nicht zur Aminosäuresynthese befähigt ist und Gene für spezifische Transportsysteme für die Aufnahme von Aminosäuren und Kofaktoren vorhanden sind (Miles, 1992). Auch die Gene für die Nukleotidsynthese sind nicht vollständig vorhanden. Hier scheint jedoch die Funktion der Nukleosiddiphosphatkinase (*ndk*) von Enzymen aus der Glykolyse übernommen zu werden (Pollack *et al.*, 2002).

Für die Aufnahme von Glukose, Fruktose und Mannitol besitzt *M. pneumoniae* ein Phosphotransferasesystem (PTS). Dieses System dient der aktiven Aufnahme und gleichzeitigen Phosphorylierung der Zucker. Das PTS besteht aus EI, HPr sowie den zuckerspezifischen Permeasen für Glukose, Fruktose und Mannitol (Himmelreich *et al.*, 1996). Es stellte sich jedoch später heraus, dass *M. pneumoniae* nicht in der Lage ist, mit Mannitol als C-Quelle zu wachsen (Halbedel *et al.*, 2004). Die Aufnahme des Glycerols erfolgt nicht über ein aktives Aufnahmesystem, sondern mit Hilfe eines Facilitators. Die Zucker werden allesamt an die Glykolyse zur Gewinnung von ATP und

Pyruvat weitergeleitet. Der Pentose-Phosphat-Weg ist nur noch rudimentär vorhanden. Die Ribulose-5-phosphat-3-Epimerase und die Transketolase sind von diesem Weg noch in *M. pneumoniae* zu finden. Der ATP-Bedarf der Zelle kann nur durch Substratkettenphosphorylierung abgedeckt werden, da die Enzyme für den Zitronensäurezyklus sowie Chinone und Cytochrome fehlen (Razin *et al.*, 1998)

Eine weitere Besonderheit der Mykoplasmen ist, dass UGA nicht für ein Stopcodon, sondern für ein Tryptophan kodiert (Schaper *et al.*, 1987; Renaudin *et al.*, 1987).

### 2.3 Das PTS in Gram-positiven Bakterien

In Gram-positiven Bakterien ist das Phosphotransferasesystem für die aktive Aufnahme sowie die Phosphorylierung von verschiedenen Zuckern zuständig. Dieses System bildet eine Phosphorylierungskaskade, die mit der Autophosphorylierung von EI durch PEP beginnt. Das EI gibt das Phosphat dann an das Histidin-15 von HPr weiter, welches in der Lage ist, die Permease EII zu phosphorylieren. In *B. subtilis* wie in anderen Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt besitzt das HPr neben der Histidin- auch eine Serin-Phosphorylierungsstelle (Reizer *et al.*, 1989; Reizer *et al.*, 1998). Während das am Histidin-15 phosphorylierte HPr für die Aufnahme PTS-abhängiger Kohlenhydrate benötigt wird, hat das am Serin-46, durch die HPr-Kinase/Phosphorylase (HPrK/P), phosphorylierte HPr eine regulatorische Funktion (Reizer *et al.*, 1998; Kravanja *et al.*, 1999). Die zuckerspezifische Permease EII wird durch HPr(His~P) phosphoryliert und ermöglicht so die Aufnahme und Phosphorylierung der PTS-Zucker (Stülke und Hillen, 1999; Titgemeyer und Hillen, 2002).

Die HPrK/P phosphoryliert HPr am Serin-46. Die Kinaseaktivität der HPrK/P wird durch ATP und Fruktose-1,6-bisphosphat stimuliert (Jault *et al.*, 2000). Das so von der HPrK/P generierte HPr(Ser-P) bildet mit CcpA (Catabolite Control Protein A) einen Komplex und dieser inhibiert oder aktiviert die Transkription von katabolen Operons, die eine so genannte *cre*-Sequenz in der Promotorregion besitzen (Catabolite Responsive Element) (Fujita *et al.*, 1995). Das HPr(Ser-P) spielt eine wesentliche Rolle bei der Kohlenstoffkatabolitenrepression (CCR). Eine Zusammenfassung des PTS und der CCR sind in Abb. 2.1. dargestellt.

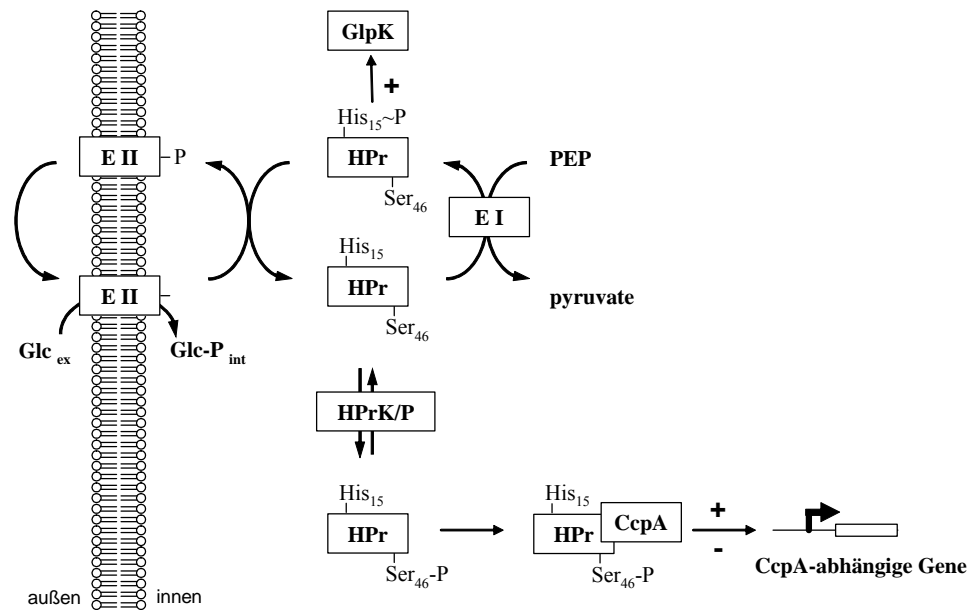


Abb. 2.1.: Schematische Darstellung des PTS und der CCR in *B. subtilis*.

### 2.3.1 Das PTS in *M. pneumoniae*

*M. pneumoniae* kann nur die Kohlenstoffquellen Glukose und Fruktose über das PTS aufnehmen (Halbedel *et al.*, 2004). Die Komponenten des PTS EI, HPr, EIIABC und HPrK/P sind in den Mykoplasmen vorhanden. Die Regulation durch diese Komponenten unterscheidet sich jedoch stark von der, die in *B. subtilis* zu finden ist. Bisher konnte in *M. pneumoniae* kein CcpA oder ein CcpA-homologes Gen identifiziert werden (Himmelreich *et al.*, 1996). Auch *cre*-Sequenzen wurden noch nicht in Mykoplasmen entdeckt.

*In vitro*-Untersuchungen der HPrK/P von *M. pneumoniae* haben gezeigt, dass die HPrK/P bereits bei niedrigen ATP-Konzentrationen als Kinase aktiv ist. Die HPrK/P von *B. subtilis* hingegen benötigt für ihre Aktivität neben hohen ATP-Konzentrationen noch die Anwesenheit von Fruktose-1,6-bisphosphat. Man geht davon aus, dass dies auf die unterschiedlichen Lebensräume dieser Organismen zurückzuführen ist (Steinhauer *et al.*, 2002). Die HPrK/P in *B. subtilis* zeigt vorrangig eine Phosphatase-Aktivität und verhindert so die CCR.

Das *in vivo*-Phosphorylierungsmuster von HPr in *M. pneumoniae* wurde ebenfalls untersucht. In der Anwesenheit von Glukose oder Fruktose wurde nur HPr(His~P) gebildet. Durch die Zugabe von Glycerol ins Medium traten zu jeweils einem Drittel

HPr(His~P), HPr(Ser-P) und HPr(His~P)(Ser-P) auf. Die Kinase-Aktivität der HPrK ist am höchsten, wenn Glycerol im Medium vorhanden ist (Halbedel *et al.*, 2004). Die C-Quelle Glycerol hat demnach einen Einfluss auf das PTS, obwohl dieser Zucker nicht über dieses System aufgenommen wird. Eine allosterische Aktivierung der Kinaseaktivität beziehungsweise eine Inhibierung der Phosphorylaseaktivität durch Glycerol oder Glycerol-3-phosphat konnte bereits ausgeschlossen werden (Halbedel, Doktorarbeit). Die heterologe Expression von der HPrK und HPr aus *M. pneumoniae* in *B. subtilis* hat gezeigt, dass die Kinase unabhängig von der angebotenen C-Quelle konstitutiv aktiv ist (Schmidl, Diplomarbeit). Die Annahme, dass die Glycerolkinase einen Einfluss auf die HPrK-Aktivität haben könnte, konnte nicht bestätigt werden. Die Koexpression von HPrK, HPr und GlpK in *B. subtilis* hatte keinen Einfluss auf die Kinaseaktivität (Schmidl, Diplomarbeit). Der Zusammenhang zwischen PTS und Glycerolstoffwechsel in *M. pneumoniae* konnte bisher nicht geklärt werden.

## 2.4 Glycerolstoffwechsel in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien

In Gram-positiven wie auch in Gram-negativen Bakterien erfolgt die Aufnahme von Glycerol durch erleichterte Diffusion mit Hilfe des Facilitators GlpF (Lin, 1976; Heller *et al.*, 1980). Der Glycerolstoffwechsel unterliegt einer strengen Regulation. Hierbei wird die Aktivität der Glycerolkinase über Komponenten des PTS kontrolliert. Die Mechanismen der Regulation unterscheiden sich jedoch.

Die Glycerolkinase in *E. coli* wird durch EIIA und durch Fruktose-1,6-bisphosphat inhibiert und kann so Glycerol nicht mehr zu Glycerol-3-phosphat umsetzen (Berman und Lin, 1971; DeBoer *et al.*, 1986; Hurley *et al.*, 1993; Pettigrew *et al.*, 1996).

In Gram-positiven Bakterien wird die Aktivität der Glycerolkinase ebenfalls durch Fruktose-1,6-bisphosphat inhibiert (Deutscher und Sauerwald, 1986). Im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien kann hier die Aktivität der Glycerolkinase jedoch auch erhöht werden. Hierbei spielt das PTS eine wichtige Rolle (Reizer *et al.*, 1984). Das HPr(His~P) hat einen aktivierenden Effekt auf die Glycerolkinase. Sie wird von HPr(His~P) phosphoryliert und zeigt eine zehnfach höhere Aktivität als die unphosphorylierte Glycerolkinase in *Enterococcus faecalis* (Deutscher und Sauerwald, 1986). Dies scheint aber nicht für alle Glycerolkinasen der Fall zu sein. In *Thermus*

*flavus* hat die Phosphorylierung der Kinase nur einen geringen Effekt auf die Aktivität (Darbon *et al.*, 1999).

Mit Hilfe von Aminosäuresequenzen der Glycerolkinasen konnte die Phosphorylierungsstelle am Histidin an der Position 232 identifiziert werden (Charrier *et al.*, 1997). Dieses Histidin sowie die umliegenden Aminosäuren sind in Gram-positiven Bakterien stark konserviert und es konnte folgende Konsensussequenz ermittelt werden: (Y/F)HF(Y/F)G. Wie erwartet, ist diese Phosphorylierungsstelle nicht in Gram-negativen Organismen zu finden.

Bei *B. subtilis* wird der Glycerolstoffwechsel auch noch auf Transkriptionsebene durch die Kohlenstoffkatabolitenrepression (CCR) sowie durch einen so genannten Riboswitch reguliert. Ein Inverted Repeat vor der Leadersequenz von *glpD* bildet einen Transkriptionsterminator aus und verhindert die vollständige Transkription dieses Gens (Holmberg und Rutberg, 1991; Holmberg und Rutberg, 1992; Glatz *et al.*, 1998). Bei Anwesenheit von Glycerol bindet das aufgenommene und phosphorylierte Glycerol-3-phosphat an den Antiterminator GlpP und aktiviert diesen, damit er an die Leadersequenz binden kann (Glatz *et al.*, 1996; Glatz *et al.*, 1998; Rutberg, 1997). Dies führt dann zur Antitermination, das heißt zur vollständigen Transkription des Gens. Außerdem spielt GlpP noch eine Rolle bei der Stabilisierung der *glpD* mRNA (Glatz *et al.*, 1996). Man findet die Regulation durch GlpP auch am *glpFK*-Operon, welches zusätzlich durch die CCR bei Anwesenheit durch Glukose reguliert wird (Darbon *et al.*, 2002). Die Bindung des HPr(Ser-P) + CcpA-Komplexes an der *cre*-Sequenz bewirkt eine Repression dieses Operons. Damit wird die Aufnahme des Glycerols verhindert, wenn Glukose verfügbar ist.

Bei den Mykoplasmen wurde bisher noch keine Regulation des Glycerolstoffwechsels beschrieben. In *M. capricolum*, einem der wenigen Gram-positiven Organismen, der lösliches EIIA<sup>Glc</sup> besitzt, wird die Aktivität der Glycerolkinase nicht durch dieses PTS-Protein inhibiert (Zhu *et al.*, 1997).

#### **2.4.1 Die Rolle der Glycerol-3-phosphat-Oxidase bei der Pathogenität**

Die Umsetzung von Glycerol-3-phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat, einem Substrat für die Glykolyse, erfolgt in vielen Bakterien und Säugerzellen durch eine Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (Burton und Kaplan, 1953; Wiame *et al.*, 1954; Kormann *et*



*al.*, 1972). Dieses Enzym verwendet  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor und setzt bei der Reaktion  $\text{NADH}_2$  frei (Asnis und Brodie, 1953).

Jedoch gibt es auch Bakterien, die ein anderes Enzym für diese Reaktion verwenden, eine so genannte Glycerol-3-phosphat-Oxidase. Es ist in der Lage, statt  $\text{NAD}^+$  Sauerstoff als Elektronenakzeptor zu verwenden. Bei dieser Reaktion wird Wasserstoffperoxid freigesetzt. Bisher wurde dieses Protein in *E. faecium* (Gunsalus und Umbreit, 1945; Esders und Michrina, 1979), *Lactobacillus casei* (Strittmatter, 1959), *M. sp. bovine* (Djordjevic *et al.*, 2003) und *M. mycoides* subsp. *mycoides* (Wadher *et al.*, 1990; Pilo *et al.*, 2005) beschrieben. Hierbei fällt auf, dass alle Organismen, bis auf *L. casei*, zu den pathogenen Bakterien gehören.

*E. faecium*, dem, wie den Mykoplasmen, die bekannten Virulenzfaktoren fehlen, kann mit Glycerol als alleinige C-Quelle wachsen und dabei große Mengen an Wasserstoffperoxid freisetzen. Dabei kann *E. faecium* den Nematoden *Caenorhabditis elegans*, welcher als Modellorganismus zur Untersuchung der Virulenzfaktoren verwendet wird, töten (Moy *et al.*, 2004).

Auch in *M. mycoides* subsp. *mycoides* konnte gezeigt werden, dass der Glycerolstoffwechsel eine große Rolle bei der Pathogenität spielt. Bei diesen Mykoplasmen gibt es einen hochvirulenten afrikanischen Stamm, welcher neben dem Facilitator noch über ein aktives Transportsystem (ABC-Transporter) für die Aufnahme von Glycerol verfügt. Dadurch ist der Stamm auch in der Lage, mehr Glycerol zu verwerten und auch mehr Wasserstoffperoxid freizusetzen (Vilei und Frey, 2001). Der europäische Stamm, der nur einen Facilitator zur Aufnahme von Glycerol verwendet, ruft hingegen nur ein schwaches Krankheitsbild bei den Rindern hervor.

Mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte gezeigt werden, dass die Glycerol-3-phosphat Oxidase an der Oberfläche der Zelle lokalisiert ist. Durch die Inhibierung der GlpO mit Hilfe von Antikörpern konnte die Zytotoxizität der Mykoplasmen gegenüber Epithelzellen von Rindern unterbunden werden (Pilo *et al.*, 2005). Dies zeigt, dass GlpO für die Produktion des primären Virulenzfaktors Wasserstoffperoxid zuständig ist und diesen gleich an die Wirtszelle weiterleitet, um ihr Schaden zuzufügen.

### 2.4.2 Glycerolstoffwechsel in *M. pneumoniae*

Glycerol ist neben Glukose und Fruktose eine der wenigen Kohlenstoffquellen, die *M. pneumoniae* verwerten kann (Halbedel *et al.*, 2004). Die Aufnahme von Glycerol erfolgt über einen Facilitator, der eine erleichterte Diffusion ermöglicht. Anschließend phosphoryliert die Glycerolkinase das Glycerol, damit es nicht wieder aus der Zelle diffundieren kann. Glycerol-3-phosphat wird dann von der Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) umgewandelt (Abb. 2.2.). Das DHAP wird in die Glykolyse eingeschleust und weiter verwertet, um ATP zu gewinnen. Neben der Energiegewinnung wird Glycerol-3-phosphat für den Phospholipidmetabolismus benötigt.

Die Regulationsmechanismen, wie sie bei Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien beschrieben sind, konnten bisher nicht in Mykoplasmen nachgewiesen werden. Die Glycerolkinase wird in *M. pneumoniae* konstitutiv exprimiert (Hames, 2005). Die Phosphorylierungsstelle, das Histidin an der Position 232, die in vielen Gram-positiven Organismen zu finden ist, ist auch in *M. pneumoniae* vorhanden. Jedoch sind die umliegenden Aminosäuren bei den Mykoplasmen nicht konserviert und stimmen nicht mit der Konsensussequenz überein. Die Aktivität der Glycerolkinase in Anwesenheit von HPr(His~P) zeigte keinen Unterschied zu der normalen Enzymaktivität (Hames, Diplomarbeit). Es konnte bisher nicht gezeigt werden, dass die Glycerolkinase von *M. pneumoniae* am His-232 phosphoryliert wird. Es bleibt noch zu erwähnen, dass es in der Transposonbank keine *glpK::tn*-Mutante und keine *glpF::tn*-Mutante gibt (Halbedel, 2006). Dies ist sehr verwunderlich, da die Transposonmutanten auf Platten mit Glukose angezogen wurden und die Gene für die Aufnahme und Phosphorylierung von Glycerol unter diesen Bedingungen nicht essentiell sein sollten. Die beiden Proteine GlpF und GlpK scheinen demnach noch andere Funktionen in der Zelle zu übernehmen.

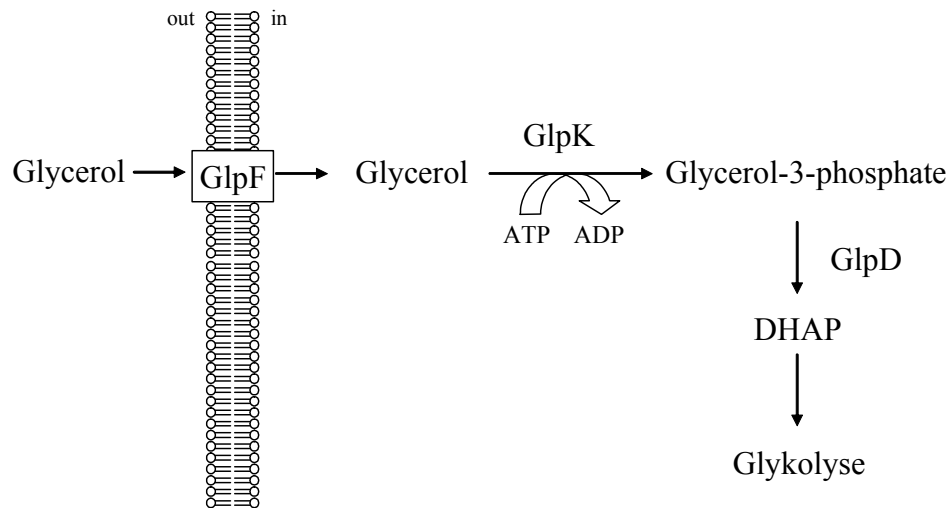


Abb. 2.2. Schematische Darstellung der Aufnahme und der Verwertung von Glycerol in *M. pneumoniae*

Die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase spielt wie bereits erwähnt, eine wichtige Rolle bei der Pathogenität in *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC. Die Rolle dieses Enzyms in *M. pneumoniae* ist bisher nicht untersucht worden. Dieses Gen ist im Gegensatz zu *glpF* und *glpK* nicht essentiell, da es gelungen ist, eine Mutante zu isolieren, welche ein Transposoninsertion in *glpD* trägt.

Der Glycerolstoffwechsel scheint auch in *M. pneumoniae* eine wichtige Rolle bei der Pathogenität zu spielen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in Anwesenheit von Glycerol die Wasserstoffperoxid-Produktion sehr stark ansteigt (Low, 1971).

## 2.5 Pathogenitätsmechanismen von Bakterien

Im Laufe der Zeit haben die pathogenen Bakterien unterschiedliche Mechanismen zur Schädigung des Wirtsorganismus entwickelt, wie z.B. *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium diphtheriae* und *Pseudomonas aeruginosa*. Die Organismen *S. aureus* und *C. diphtheriae* verwenden Toxine und *P. aeruginosa* ein spezielles Sekretionssystem als Virulenzfaktoren.

Es gibt eine Vielzahl an Toxinen, die unterschiedliche Wirkungsweisen haben. Die poren-bildenden Toxine sind sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien beschrieben worden. In *S. aureus* greift das so genannte  $\alpha$ -Toxin viele verschiedene Zelltypen des Menschen an, wie zum Beispiel Erythrocyten, Endothelzellen, Plättchen usw. (Bhakdi und Tranum-Jensen, 1991; Suttorp *et al.*, 1985; Bhakdi *et al.*, 1988). Das Toxin bindet an die Wirtszellmembran, bildet eine Pore und

bewirkt einen irreparablen Riss in der Membran, aus dem Ionen und kleine Moleküle austreten (Bhakdi und Trantum-Jensen, 1988). Das Gram-negative Bakterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* bildet das porenformende Leukotoxin, welches die Apoptose bei Monocyten und polymorphonuklearen Neutrophilen auslöst (Tsai *et al.*, 1979; Taichman *et al.*, 1980; Mangan *et al.*, 1991; Welch, 1991). Auch das Hämolysin aus *E. coli* ist in der Lage, Poren in viele kernhaltige Zellen einzufügen und den Zelltod herbeizuführen (Welch, 1991).

*S. aureus* produziert neben dem  $\alpha$ -Toxin auch noch ein sehr stabiles Enterotoxin B, welches nicht von den Enzymen des Magens oder des Dünndarms abgebaut werden kann. Dieses Toxin ist verantwortlich für Lebensmittelvergiftungen und für das toxische Schock Syndrom (Marples und Wieneke, 1993). Es bindet an die  $V_{\beta}$  T-Zellrezeptoren und stimuliert dabei die T-Zellproliferation (White *et al.*, 1989; Kappler *et al.*, 1989). Bei unreifen Thymocyten induziert die Bindung an  $V_{\beta}$ -Elemente die Apoptose, also den Zelltod (Jenkinson *et al.*, 1989; Lin *et al.*, 1992).

Eine weitere Art der Toxine wirkt inhibierend auf die Translation der eukaryotischen Zellen. *C. diphtheriae* produziert das Diphtherietoxin, das den Elongationsfaktor eEF-2 durch ADP-Ribosylierung in seiner Funktion inhibiert und damit die Translation neuer Proteine verhindert (Choe *et al.*, 1992). Dies führt meist zu einer massiven Zelllyse (Morimoto und Bonavida, 1992). Das Exotoxin A von *P. aeruginosa* und das Shiga Toxin von *Shigella dysenteriae* sind weitere Beispiele für ADP-ribosylierende Toxine (Tesh und O'Brien, 1991; Morimoto und Bonavida, 1992).

Bei Gram-negativen Bakterien haben sich spezielle Sekretionssysteme entwickelt, die eine Rolle bei der Pathogenität spielen. Ein Beispiel hierfür ist das Typ III Sekretionssystem (TTSS). Mit dessen Hilfe können die Toxine direkt in die Wirtszelle injiziert werden (Rosqvist *et al.*, 1994). Dieses System hat eine sehr komplexe Struktur mit über 20 verschiedenen Proteinen und bildet eine Nadel aus, die direkt in die Wirtszelle eindringt (Aizawa, 2001; Kubori *et al.*, 2000). Das Typ IV Sekretionssystem, welches vor allem durch die Rolle bei der Konjugation bekannt ist, kann neben DNA auch Toxine sekretieren (Winans *et al.*, 1996; Christie, 1997). Hierbei wird ein so genannter Pilus ausgebildet, der den Kontakt zwischen dem pathogenen Organismus und dem Wirt herstellt. Das Pertussistoxin bildet dabei eine Ausnahme, weil es von dem Typ IV Sekretionssystem in das extrazelluläre Milieu abgegeben wird (Farizo *et al.*, 2002; Burns, 2003). Vor kurzem hat man noch ein weiteres Sekretionssystem, Typ VI,

in *P. aeruginosa* und *Vibrio cholerae* beschrieben, welches Ähnlichkeiten zu dem Injektionsapparat des *E. coli* Bakteriophagen T4 aufweist (Mougous *et al.*, 2006; Pukatzki *et al.*, 2006). Hier wird ebenfalls vermutet, dass die Effektorproteine direkt über dieses „Zellpunktierungssystem“ in die Wirtszelle gelangen (Pukatzki *et al.*, 2007).

In Mycobakterien konnte erstmals in einem Gram-positiven Organismus ein Sekretionssystem beschrieben werden, das Typ VII Sekretionssystem, welches Ähnlichkeiten zu dem T4SS aufweist (Pallen, 2002; Abdallah *et al.*, 2007). Das T7SS wurde auch in weiteren Gram-positiven Bakterien gefunden, es spielt jedoch nicht immer eine Rolle bei der Virulenz wie zum Beispiel bei *Listeria monocytogenes* (Gey van Pittius *et al.*, 2001; Way und Wilson, 2005). Dem Impfstamm *Mycobacterium bovis* BCG fehlen dieses Sekretionssystem sowie das Toxin. Dies gab schon sehr früh einen Hinweis darauf, dass das T7SS eine wichtige Rolle in der Virulenz von Mycobakterien spielt (Pym *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 2003; Majlessi *et al.*, 2005).

Das Wasserstoffperoxid wird von manchen Bakterien auch genutzt, um bei den Wirtszellen oxidativen Stress auszulösen. Auf diesen Virulenzfaktor wurde bereits in dem Kapitel 2.4.1 eingegangen. Das Wasserstoffperoxid reagiert mit den Zellmembranen der Wirtszellen und löst dann den programmierten Zelltod, die Apoptose, in tracheobronchalen Epithelzellen aus (Goldkorn *et al.*, 1998).

Die pathogenen Bakterien haben außerdem noch Mechanismen entwickelt, um einem Angriff des Immunsystems des Menschen zu entgehen. Dies gelingt ihnen zum Beispiel durch die so genannte Antigenvariation. Die Oberflächenproteine werden dabei durch Neuordnung der DNA verändert, damit die Immunzellen die Bakterien nicht mehr erkennen und nicht mehr angreifen können (Dybvig, 1993). Andere pathogene Organismen können dem Immunsystem entfliehen, indem sie in die Wirtszelle eindringen und sich dort auch weiter vermehren. Diesen Mechanismus verwendet zum Beispiel *Mycobacterium tuberculosis*, der sich in den Phagosomen der Makrophagen einnistet oder *L. monocytogenes*, der sich im Cytosol der Wirtszelle verbreitet (Armstrong und Hart, 1971; Gaillard *et al.*, 1987).

### **2.5.1 Pathogenitätsmechanismen von Mykoplasmen**

Die Antigenvariation von Oberflächenproteinen, meist Lipoproteine, ist auch in Mykoplasmen weit verbreitet. Sie wurde bereits in *M. pulmonis*, *M. gallisepticum*, *M. hyorhinis*, *M. bovis* und vielen anderen beschrieben (Watson *et al.*, 1988; Thomas

und Sharp, 1988; Boyer und Wise, 1989; Behrens *et al.*, 1994). Auch das P1 Protein aus *M. pneumoniae*, ein wichtiges Zytadhärenzprotein, weist Variationen auf, die dazu führen, dass es von Immunzellen nicht mehr erkannt wird (Kenri *et al.*, 1999).

Einige Mykoplasmen, darunter *M. pulmonis*, *M. pneumoniae* und *M. mycoides* sind in der Lage, Wasserstoffperoxid als Virulenzfaktor zu produzieren (Cohen und Somerson, 1967; Brennan und Feinstein, 1968; Cherry und Taylor-Robinson, 1970). Am besten ist dieser Mechanismus in *M. mycoides* untersucht. Hier ist die Glycerol-3-phosphat-Oxidase, die in der Membran verankert ist, für die Produktion von Wasserstoffperoxid zuständig und gibt dieses in die Umgebung ab (Pilo *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ein enger Kontakt zu den Wirtszellen wichtig ist, damit Wasserstoffperoxid die Zellen schädigen kann (Bischof *et al.*, 2008).

Überhaupt spielen Adhäsionsproteine eine wichtige Rolle bei den Mykoplasmen. Die Tipstruktur kann mit spezifischen Antikörpern behandelt werden, die verhindern, dass die *M. pneumoniae*-Zellen an Wirtszellen binden. Dies bewirkt, dass die Lungenläsionen in Hamstern weniger ausgeprägt sind als bei der Infektion mit Wildtyp *M. pneumoniae* (Brunner *et al.*, 1984). Auch bei *M. genitalium* und *M. gallisepticum* führt das Fehlen von Zytadhärenzproteinen zu einer verringerten Virulenz (Dhandayuthapani *et al.*, 2001; Papazisi *et al.*, 2002).

Bei manchen Mykoplasmen konnte ein intrazelluläres Wachstum nachgewiesen werden. Die Invasion von unterschiedlichen Zellkulturen, darunter auch HeLa-Zellen, wurde in *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. fermentans*, *M. gallisepticum*, *M. penetrans* und *M. hominis* gezeigt (Taylor-Robinson *et al.*, 1991; Jensen *et al.*, 1994; Andreev *et al.*, 1995; Dallo und Baseman, 2000; Winner *et al.*, 2000; Meseguer *et al.*, 2003; Yavlovich *et al.*, 2004). Die genauen Mechanismen, die Mykoplasmen verwenden, um in die Wirtszelle zu gelangen, sind jedoch weitestgehend unbekannt. Man hat festgestellt, dass die Bindung von Plasminogen an *M. fermentans* im Gegensatz zu anderen extrazellulären Matrixproteinen der Wirtszelle, die Adhärenz und die Invasionsrate erhöht (Yavlovich *et al.*, 2001; Yavlovich und Rottem, 2007). Es bleibt jedoch unklar, ob die Mykoplasmen diesen Mechanismus auch *in vivo* verwenden und ob sie diesen zur Virulenz benötigen oder als Schutz vor dem Immunsystem nutzen. Für *M. gallisepticum* konnte vor kurzem gezeigt werden, dass das invasive Wachstum auch *in vivo* genutzt wird (Vogl *et al.*, 2008). Die degenerative Evolution der Genome der Mykoplasmen gibt jedoch ein Hinweis auf die parasitäre Lebensweise, wie sie auch bei

anderen invasiv wachsenden Bakterien zu finden ist. *M. hominis* scheint diese Fähigkeit zu nutzen, um an seinen Wirkungsort zu gelangen. Er kann in *Trichomonas vaginalis*, einen parasitischen Einzeller, eindringen, ihn als Vektor nutzen und verlässt ihn wieder bei der Ankunft am Ziel, um den Urogenitaltrakt zu besiedeln (Vancini und Benchimol, 2008).

In *M. pneumoniae* konnte erstmals ein Zytotoxin identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um ein so genanntes ADP-ribosylierendes Toxin, welches Homologien zum Pertussistoxin aufweist. Diese Toxine haben einen massiven Einfluss auf die Translation und regulatorische Proteine der eukaryotischen Zellen und lösen dadurch die Apoptose aus (Honjo et al., 1968; Iglewski und Kabat, 1975; Krueger und Barbieri, 1995). Das Toxin aus *M. pneumoniae*, MPN372, weist 3 Motive auf, die für diese Toxine spezifisch sind. An der Position 10 befindet sich ein konserviertes Arginin, das für die NAD-Bindung in vielen ADP-ribosylierenden Toxinen benötigt wird. Das Serin-Threonin-Serin Motif (STS) befindet sich an der Position 49-51 und gewährleistet die strukturelle Integrität der NAD-Bindestelle. Außerdem findet man noch an der Position 132 ein potentiell katalytisches Glutamat (Kannan und Baseman, 2006).

Das aufgereinigte Protein MPN372 weist ADP-ribosylierende Aktivität auf und hat einen zytotoxischen Effekt auf Zellkulturen. Jedoch konnte nicht gezeigt werden, dass dieses Toxin von den Mykoplasmen sekretiert wird. Der Großteil des Proteins scheint im Zytoplasma vorzuliegen und nur 7% sind an der Membran lokalisiert. In Patientenisolaten konnte die Anwesenheit von MPN372 mit Antikörpern nachgewiesen werden (Kannan und Baseman, 2006). Es bleibt unklar, wie die Mykoplasmen dieses Toxin in die Wirtszelle bringen und diese damit schädigen können.

## 2.6 Regulation in Bakterien

Bakterien haben unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um auf ihre Umwelt zu reagieren und sich anzupassen. Sehr weit verbreitet ist die Regulation auf Ebene der Transkription, die anhand des *lac*-Operons erstmals beschrieben wurde (Beckwith, 1967). In Mykoplasmen ist nur wenig über diese Art der Regulation bekannt. Vor kurzem konnte jedoch gezeigt werden, dass HrcA, ein Repressor der Hitzeschockgene, mit CIRCE-Elementen in *M. hyopneumoniae* interagieren kann (Chang et al., 2007). Die Expression von *ackA* und *ldh* ist invers und scheint auch reguliert zu sein, jedoch

konnte der Mechanismus dieser Regulation bisher nicht aufgeklärt werden (Halbedel *et al.*, 2007).

Eine weitere Möglichkeit ist die Regulation auf Ebene der RNA. Hier sind die so genannten Riboswitches zu nennen, bei denen Metabolite oder Proteine die Transkription verhindern oder ermöglichen können. Ein Beispiel wurde bereits im Kapitel 2.4 anhand des Glycerolstoffwechsels in *B. subtilis* beschrieben.

Auch die Enzymaktivität kann reguliert werden. Manche Enzyme besitzen neben dem aktiven Zentrum noch ein allosterisches Zentrum an das Effektormoleküle binden können, die einen Einfluss auf die Aktivität haben. Die Bindung des Effektors kann die Aktivität hemmen oder aktivieren. In *B. subtilis* inhibieren aromatische Aminosäuren die Enzyme, die am Anfang des Syntheseweges stehen (Nester *et al.*, 1966). Somit wird verhindert, dass die Zellen keine Energie zur Synthese von Aminosäuren aufwenden, die ausreichend vorhanden sind. Die Kinaseaktivität der HPrK/P aus dem PTS wird hingegen in Anwesenheit des Effektors Fruktose-1,6-Bisphosphat stimuliert (Jault *et al.*, 2000). In *M. pneumoniae* hat die Anwesenheit von FBP nur einen sehr schwachen Effekt auf die HPrK (Merzbacher *et al.*, 2004).

Enzyme können außerdem noch posttranslational durch Adenylierung, Methylierung oder Phosphorylierung modifiziert werden, was dann einen Einfluss auf die Aktivität hat.

### 2.6.1 Phosphorylierungen in Bakterien und deren Funktion

Phosphorylierte Proteine können unterschiedliche Funktionen in Bakterien übernehmen. Das HPr kann an zwei Stellen phosphoryliert werden und führt je nach Phosphorylierung andere Aufgaben durch. Das HPr(His~P) ist wichtig für die Aufnahme und Phosphorylierung von Zuckern, während HPr(Ser-P) zusammen mit CcpA an der Regulation der Genexpression beteiligt ist (Reizer *et al.*, 1998; Kravanja *et al.*, 1999). Die Enzymaktivität der Isocitratdehydrogenase (IDH) aus *E. coli* wird durch Phosphorylierung gehemmt, während die phosphorylierte GlpK aus *E. faecalis* aktiviert wird (Garnak und Reeves, 1979; Deutscher und Sauerwald, 1986).

Das PTS für die Aufnahme von Zuckern ist auch in Mykoplasmen weit verbreitet (Cirillo und Razin, 1973). Die Tipstruktur in *M. pneumoniae* spielt eine wichtige Rolle bei der Adhärenz und hat einen komplexen Aufbau. Es konnte gezeigt werden, dass viele von den Proteinen, die das Zytoskelett bilden, phosphoryliert werden (Dirksen *et*



*al.*, 1994; Krebs *et al.*, 1995). Eine globale Studie der phosphorylierten Proteine in *M. genitalium* und *M. pneumoniae* hat gezeigt, dass neben vielen Zytadhärenzproteinen auch Transkriptionsfaktoren, Hitzeschockproteine und die Laktatdehydrogenase phosphoryliert werden (Su *et al.*, 2007). Bisher wurde nur die HPr-Kinase aus *M. pneumoniae* näher charakterisiert. Eine weitere Kinase, die regulatorische Funktionen übernehmen könnte, wurde bisher nicht beschrieben (Steinhauer *et al.*, 2002; Halbedel *et al.*, 2004).

### 2.6.2 Die Ser/Thr/Tyr-Kinasen und deren Funktion

In Eukaryoten wie auch in Bakterien findet man Kinasen, die die Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin phosphorylieren können (de Verdier, 1952; Deutscher und Saier, 2005). Diese Phosphorylierungen sind im Gegensatz zu Histidinphosphorylierungen sehr stabil. Die Ser/Thr/Tyr-Kinasen und die dazugehörenden Phosphatasen wurden zuerst in Eukaryoten beschrieben (Ben-David *et al.*, 1991; Rossomando *et al.*, 1992). In *B. subtilis* konnte eine Proteinphosphatase (PrpC) isoliert werden, die Ähnlichkeit zu der menschlichen Proteinphosphatase PP2C aufweist. Hinter dem Gen für die Phosphatase konnte noch eine Kinase (PrkC) identifiziert werden, die in ihrer phosphorylierten Form ein Substrat für die Phosphatase ist (Obuchowski *et al.*, 2000). Sequenzalignments haben gezeigt, dass diese Phosphatasen auch in anderen Bakterien zu finden sind, darunter auch *M. genitalium* (Bork *et al.*, 1996; Fraser *et al.*, 1995) und *M. pneumoniae* (Halbedel, 2006).

Über die Rolle von PrkC und PrpC ist bisher nur wenig bekannt. In *B. subtilis* hat eine *prpC*-Mutante in der späten stationären Phase eine sehr hohe Zelldichte, während die Zellmasse bei der *prkC*-Mutante im Gegensatz zum Wildtyp stark abnimmt. Außerdem konnte ein Substrat für die Kinase und die Phosphatase identifiziert werden. Es handelt sich hierbei um den Elongationsfaktor EF-G. Wahrscheinlich wird durch die Phosphorylierung von EF-G dessen Aktivität herabgesetzt und somit auch die Translationsrate (Gaidenko *et al.*, 2002). PrkC und PrpC haben auch einen Einfluss auf die Sporen- und Biofilmbildung (Madec *et al.*, 2002).

Die Kinase wurde auch in einem pathogenen Organismus, *E. faecalis*, gefunden und untersucht. Es stellte sich heraus, dass eine *prkC*-Mutante empfindlicher auf Antibiotika reagiert, die die Zellwand angreifen. Die Persistenz in Darm von Mäusen war ebenfalls herabgesetzt. PrkC reguliert demnach wichtige physiologische Prozesse,

die *E. faecalis* zu einem erfolgreichen nosokomialen Erreger macht (Kristich *et al.*, 2007).

In *M. pneumoniae* sowie in *B. subtilis* wurde HPr(Ser-P) als Substrat für die Phosphatase identifiziert (Halbedel *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2007). Bei den Bacillen spielt diese Dephosphorylierung jedoch *in vivo* keine Rolle.

## 2.7 Ziele der Arbeit

Die Untersuchung des Glycerolstoffwechsels aus *M. pneumoniae* beschränkte sich bisher auf die Bestimmung der Enzymaktivität der Glycerolkinase und den Zusammenhang mit dem PTS. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Glycerolkinase durch Komponenten des PTS phosphoryliert werden kann. Außerdem sollte die Rolle der Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase in der Pathogenität näher betrachtet werden.

Es sollten auch Transposonmutanten von *M. pneumoniae* isoliert und untersucht werden, die eventuell einen Einfluss auf die Zytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen aufweisen. Hierzu sollte ein Test entwickelt werden, der es ermöglicht, die Zytotoxizität der Mykoplasmen gegenüber Wirtszellen zu bestimmen.

Nachdem PrpC in *M. pneumoniae* identifiziert worden ist, sollte untersucht werden, ob es sich bei dem dahinter liegenden Gen um PrkC handelt. Hierzu sollte eine Mutante dieses Gens isoliert werden. Des Weiteren sollte die PrkC rekombinant exprimiert werden und für *in vitro* Phosphorylierungen eingesetzt werden. Dabei sollten Substrate für die Kinase identifiziert werden.

### 3. Material und Methoden

**Materialien:** Chemikalien, Hilfsmittel, Geräte, Apparaturen, kommerziell erhältliche Systeme sowie Proteine, Antikörper, Enzyme und Oligonukleotide (Tab. 7.1.) sind im Anhang aufgeführt.

#### 3.1 Bakterienstämme und Plasmide

Siehe Anhang dieser Arbeit

#### 3.2 Medien

Puffer, Lösungen und Medien wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt und 20 min im Dampfdrucktopf bei 121°C und 2 bar autoklaviert. Thermolabile Substanzen wurden gelöst und steril filtriert. Alle Angaben beziehen sich auf Wasser, andere Lösungsmittel sind angegeben. Dem LB-Medium wurde zur Verfestigung bei Herstellung von Platten 15 g/l Agar zugesetzt.

#### Bakterienmedien und fakultative Zusätze

LB-Medium (1l)	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
MP-Medium (400ml)	7,35 g PPLO broth
	11,92 g HEPES
	2 ml Phenolrot 0,5%
	14 ml 2 N NaOH
	ad. 400 ml deionisiertes Wasser
	pH 7,6 – 7,8
	20 min. autoklavieren
	Abkühlen auf 56°C
	anschließend Zugabe von:
	100 ml Pferdeserum (hitzeinaktiviert)

---

	5 ml Penicillin 100 000 U/ml
	C-Quellen wurden mit einer Endkonzentration von 1% eingesetzt
	5 g Agar für Platten
5 x C-Salze (1l)	20 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 80 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ 16,5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
III'-Salze (1l)	0,232 g $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ 12,3 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
1x C-Minimalmedium	100 ml 1 x C-Salze 1 ml Tryptophan ( $5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) 1 ml Ammoniumeisencitrat ( $2,2 \text{ mg ml}^{-1}$ ) 1 ml III'-Salze
1x CSE-Medium	100 ml 1 x C-Salze 1 ml Tryptophan ( $5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) 1 ml Ammoniumeisencitrat ( $2,2 \text{ mg ml}^{-1}$ ) 1 ml III'-Salze 2 ml Kaliumglutamat (40%) 2 ml Natriumsuccinat (30%)
SP-Medium (1l)	8 g Nutrient Broth 0,25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 1 g KCl ad. 1000 ml deion. Wasser anschließende Zugabe von: 1 ml $\text{CaCl}_2$ (0,5 M)

	1 ml $\text{MnCl}_2$ (10 mM)
	2 ml Ammoniumeisencitrat (2,2 mg ml <sup>-1</sup> )
MNGE (10 ml)	9,2 ml 1x MN-Medium
	1 ml Glukose (20%)
	50 µl Kaliumglutamat (40%)
	50 µl Ammoniumeisencitrat (2,2 mg ml <sup>-1</sup> )
	100 µl Tryptophan (5 mg ml <sup>-1</sup> )
	30 µl $\text{MgSO}_4$ (1 M)
	+/- 100 µl CAA (10%)
10 × MN-Medium (1l)	136 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$
	60 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$
	10 g Natriumcitrat x 2 $\text{H}_2\text{O}$
DMEM	500 ml DMEM
	50 ml FCS
	5 ml 1% nicht essentielle Aminosäuren
	5 ml 1% Na-Pyruvat
	500 µl Penicillin (100000 U)

### Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Ampicillin, Kanamycin, Spectinomycin, Lincomycin, Penicillin und Gentamycin wurden dazu in deionisiertem Wasser gelöst, Erythromycin in 70% EtOH. Alle Lösungen wurden steril filtriert und bei -20°C aufbewahrt. Nach Abkühlung der Medien auf ca. 50°C wurden die Antibiotika in den entsprechenden Endkonzentrationen zugegeben.

Selektionskonzentration für *E. coli*:

Ampicillin	100 µg ml <sup>-1</sup>
Kanamycin	50 µg ml <sup>-1</sup>

Selektionskonzentration für *M. pneumoniae*:

Penicillin	1000 U ml <sup>-1</sup>
Gentamycin	80 µg ml <sup>-1</sup>

Selektionskonzentration für *B. subtilis*:

Kanamycin	5 µg ml <sup>-1</sup>
Erythromycin <sup>1</sup>	2 µg ml <sup>-1</sup>
Lincomycin <sup>1</sup>	25 µg ml <sup>-1</sup>
Spectinomycin	100 µg ml <sup>-1</sup>

<sup>1</sup>Zur Selektion auf *ermC* wurde eine Mischung aus Erythromycin und Lincomycin in den oben angegebenen Konzentrationen verwendet.

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Allgemeine Methoden

Eine Zusammenfassung der allgemeinen Methoden, die in der Literatur beschrieben sind und in dieser Arbeit angewendet wurden, ist in Tab. 3.1. aufgeführt.

**Tab. 3.1. Allgemeine Methoden**

<b>Methode</b>	<b>Referenz</b>
Absorptionsmessung	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Ethidiumbromidfärbung von DNA	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Gelelektrophorese von Proteinen (denaturierend)	Laemmli, 1970
Proteinmengenbestimmung	Bradford, 1976
Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
Sequenzierung nach der Kettenabbruchmethode	Sanger <i>et al.</i> , 1977

### 3.3.2 Anzucht von Bakterien

#### **Anzucht von *E. coli***

Soweit nicht anders angegeben, wurde *E. coli* in LB-Medium bei 37°C und 180 U min<sup>-1</sup> in Reagenzgläsern oder Schikanekolben angezogen. Beimpft wurde von frischen Vereinzlungsplatten bzw. aus Übernachtskulturen. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei  $\lambda = 600$  nm verfolgt.

#### **Anzucht von *M. pneumoniae***

Zu 500 ml MP-Medium wurden 10 ml einer *M. pneumoniae* Stammkultur hinzugegeben. Je 100 ml werden auf 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verteilt und für 96 h bei 37°C inkubiert.

#### **Stammhaltung von *M. pneumoniae***

Der Überstand einer 100 ml Kultur wurde nach 96 h Inkubation bei 37°C weggeschüttet. Anschließend gab man 20 ml frisches MP-Medium auf die Zellen und schabte diese von der Oberfläche der Zellkulturflasche. Je 10 ml dieser Suspension wurde in sterile Vorkulturröhrchen gegeben und bei – 70°C weggefroren.

#### **Nassgewichtbestimmung von *M. pneumoniae* Kulturen**

Der Überstand von 100 ml Kulturen wurde aus der Kulturflasche abgegossen und die adhärennten Zellen zweimal mit 1 x PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellspatels und 1,5 ml 1 x PBS abgeschabt. Die Zellen wurden mit einer Pasteurpipette in ein zuvor abgewogenes Eppendorfgefäß überführt und abzentrifugiert (10000 x g, 4°C). Der Überstand wurde vollständig mit der Pipette abgenommen und das Pellet in dem Eppendorfgefäß auf der Feinwaage abgewogen. Das Nassgewicht ergab sich aus der Differenz der Gewichte des Eppendorfgefäßes mit und ohne Zellen. Zum Erstellen einer Wachstumskurve wurde das Nassgewicht jeweils einer 100 ml Kultur nach 2, 4, 6 und 8 Tagen bestimmt.

#### **Anzucht von *B. subtilis***

*B. subtilis* wuchs in LB-Medium, CSE-Medium oder MNGE-Medium bei 37°C oder 28°C in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben. Beimpft wurde von frischen

Vereinzelungsplatten bzw. aus Übernachtskulturen. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei  $\lambda = 600 \text{ nm}$  verfolgt.

### **Anzucht von HeLa-Zellen**

Der Überstand einer konfluent bewachsenen 25 ml Kultur wurde nach 4 Tagen Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen. Nach der Zugabe von 5 ml frischem DMEM-Medium wurden die adhärenierten Zellen mit dem Zellschaber abgeschabt. Die HeLa-Zellen wurden in einem spitzen 50 ml Falcon tube bei 1400 Upm für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml frischem DMEM-Medium aufgenommen und die Zellen durch Resuspendieren vereinzelt. Man gab 100 - 200 µl der Zellsuspension in eine Kulturflasche mit 25 ml frischem DMEM-Medium. Die Inkubation erfolgte wieder für 4 Tage bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### **Zellzahlbestimmung von HeLa-Zellen**

Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, Fläche 0,0025 mm<sup>2</sup>) wurde die Zellzahl bestimmt. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt und 10 µl dieser Lösung zwischen Deckglas und Kammer pipettiert. Das Trypanblau ermöglicht das Unterscheiden zwischen lebenden und toten Zellen, da diese blau angefärbt werden. Ausgezählt wurden nur lebende Zellen. Es wurden immer 4 Großquadrate à 16 Quadraten ausgezählt. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension wurde aus dem Mittelwert der ausgezählten Zellen pro Großquadrat berechnet, mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Volumenfaktor  $1 \times 10^4$  multipliziert.

### **3.3.3 Genetische Methoden**

#### **Präparation chromosomaler DNA aus *M. pneumoniae***

Der Überstand einer 100 ml *M. pneumoniae* Kultur wurde abgenommen und die Zellen wurden dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Das Abschaben der Zellen erfolgte mit 1,5 ml 1x PBS. Anschließend wurden die Zellen in einem Eppendorfgesäß abzentrifugiert (10000 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 750 µl 50 mM Tris-HCl pH 8,0 und 25 mM EDTA resuspendiert. Nach der Zugabe von 19 µl RNaseA (1 mg/ml) wurden die Zellen für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurden 50 µl Proteinase K (25 mg/ml) und 75 µl 10% SDS hinzugegeben und der Ansatz für



2 h bei 50°C inkubiert. Nach der Zugabe von 300 µl 5 M NaCl wurde der Ansatz gemischt und für 5 Minuten auf Eis gestellt. Die Suspension wurde dann für 25 Minuten bei 10000 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml eiskaltem Isopropanol gemischt und über Nacht bei - 20°C gelagert. Die Lösung wurde am nächsten Tag für 15 Minuten bei 10000 x g (4°C) abzentrifugiert, das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und wieder zentrifugiert (10000 x g, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde bei RT unter der Sterilbank getrocknet. Anschließend löste man die DNA in 300 µl sterilem H<sub>2</sub>O.

### **Isolierung von chromosomaler DNA aus *B. subtilis***

Die Isolation der chromosomalen DNA aus *B. subtilis* erfolgte mit Hilfe des QIAamp Tissue Kits. Hierzu wurden 1,5 ml einer in LB-Medium gewachsenen Übernachtskultur 2 min bei 13000 U min<sup>-1</sup> abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 180 µl Lyse-Puffer resuspendiert und 60 min bei 37°C inkubiert. Die weiteren Schritte zur Isolation der chromosomalen DNA erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

### **DNA-Gelelektrophorese**

Zur Größenbestimmung und zur präparativen Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten wurde eine Gelelektrophorese mit 1%-igen Agarosegelen durchgeführt. Die Proben wurden mit DNA-Farbmarker versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei 100-150 V, bis die Bromphenolblaubande das untere Drittel des Gels erreicht hatte. Danach wurden die Gele in einer Ethidiumbromid-haltigen Lösung (0,5 µg/ml) 10 min gefärbt, kurz in Wasser entfärbt und anschließend unter UV-Licht (254 nm) fotografiert. Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten wurde *EcoRI* und *HindIII* verdaute λ-DNA verwendet. Bei λ = 366 nm konnte präparativ verdaute DNA aus Gelen ausgeschnitten und mit Hilfe des Gelextraktionskits von Qiagen nach Anleitung des Herstellers eluiert werden.

### **Southern Blot**

Die chromosomale DNA wurde mit einem oder zwei Restriktionsenzymen über Nacht bei 37°C verdaut. Am nächsten Tag wurden die verdaute DNA sowie ein DIG-markierter DNA-Marker (DNA molecular weight marker III DIG-labeled, Roche) auf ein 1%-iges Agarose-Gel aufgetragen. Nach dem Gellauf wurde das Gel in einer

Ethidiumbromid-haltigen Lösung gefärbt, in Wasser entfärbt und unter UV-Licht fotografiert.

Der Transfer der DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran wurde mit einer Vakuum-Blot-Anlage (VacuGene<sup>TM</sup>XI) durchgeführt. Die positiv geladene Nylonmembran (Roche) mit einer Größe von 12 x 11 cm wurde zunächst mit sterilem deion. Wasser getränkt. Anschließend wurde die Membran möglichst luftblasenfrei auf die gut mit deion. Wasser durchfeuchtete poröse Trägerplatte aufgelegt. Mit einer Plastikmaske wurde der Blot abgedichtet und das Agarosegel luftdicht abschließend auf die Membran und die Plastikmaske aufgelegt. Ein Vakuum von 80 mbar wurde an die Vakuum-Kammer angelegt und das Gel nacheinander mit den folgenden Lösungen überschichtet:

1. Depurinisierungspuffer 15 min
2. Denaturierungspuffer 20 min
3. Neutralisierungspuffer 20 min
4. 20 x SSPE 4-5 h

Beim Wechsel der Lösungen wurden Reste der vorherigen Lösung durch Abkippen entfernt. Die DNA wurde mittels UV-Licht (90 sek) an der Membran fixiert. Bis zur Hybridisierung wurde die Membran bei RT trocken und vor Staub geschützt gelagert.

### **Hybridisierung membrangebundener DNA mit DIG-markierten RNA-Sonden**

Die Nylonmembran, die die UV-fixierte DNA trägt, wurde mit 20 ml Prähybridisierungslösung in Hybridisierungsröhrchen transferiert und bei 68°C eine Stunde im Hybridisierungsofen inkubiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung durch die Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 68°C. Am nächsten Tag wurde die Sonde entfernt und bis zum weiteren Gebrauch bei –20°C aufbewahrt. Die Membran wurde zweimal für 15 min bei RT in 50 ml 2 x SSC und 0,1% SDS Waschlösung sowie zweimal 15 min bei 68°C in 50 ml 0,1 x SSC und 0,1% SDS Waschlösung inkubiert, um unspezifisch gebundene RNA-Sonden zu entfernen. Anschließend konnte die Membran zur Detektion der DIG-markierten DNA-RNA Hybride eingesetzt werden.

### **Detektion von DNA-RNA-Hybriden**

Der Nachweis der DNA schloss sich direkt an die Hybridisierung an. Zunächst wurde die Membran für 5 min in 1 x Puffer I, danach für weitere 30 min in Puffer II inkubiert. Es folgte die Detektion der hybridisierten Sonden mittels Anti-DIG-Antikörper gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase (30 min), die im Verhältnis 1:10000 in Puffer II gelöst waren. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min in Puffer I und danach 5 min in Puffer III gewaschen. Im letzten Schritt wurde die Membran zwischen eine Klarsichtfolie gelegt und mit 1 ml Puffer III, der 5 µl des Substrats CDP\* enthielt, 5 min im Dunkeln inkubiert. Nach Überführung der Membran in eine frische Folie, wurde diese sofort in die Belichtungskassette gelegt. Abschließend erfolgte die Belichtung von Filmen, wobei je nach Bandenintensität unterschiedliche Belichtungszeiten (15 - 45 min) angewandt wurden. Dabei wurde die Chemilumineszenz detektiert, die bei der enzymatischen Spaltung von CDP\* durch die Alkalische Phosphatase entsteht.

### **Restriktion und Ligation von DNA**

Die Restriktionen mit Endonukleasen wurden in den vom Hersteller empfohlenen Puffern durchgeführt. Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase unter Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten Puffers durchgeführt. Es wurden zwischen 10 und 100 ng Vektor-DNA und ein fünffacher Überschuss an Fragment eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur.

### **Dephosphorylierung von DNA**

Die Dephosphorylierung des 5'-Endes von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe von Calf-Intestinal Alkalischer-Phosphatase (CIAP) unter Einsatz des vom Hersteller mitgelieferten Puffers durchgeführt. Einem Ansatz mit einer DNA-Endkonzentration von ca. 3-10 ng/µl wurde 1 µl CIAP (1000 Units/µl) zugesetzt. Anschließend wurde 30 min bei 37°C inkubiert und danach erneut 1 µl CIAP zugegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C für 30 min. Anschließend wurde das Enzym 30 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Danach konnte der Ansatz direkt für eine Ligation verwendet werden.

**Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion wurde stets mit chromosomaler DNA oder zirkulärer Plasmid-DNA als Matrize durchgeführt.


Reaktionsansatz für die *Pfu*-Polymerase (100 µl) :

- 1 µl Primer forward (100 µM)
- 1 µl Primer reverse complement (100 µM)
- 3 µl Matrizen-DNA (ca. 100 ng)
- 10 µl 10 x *Pfu*-Polymerase Puffer
- 1 µl *Pfu*-Polymerase (2,5 U µl<sup>-1</sup>)
- 4 µl dNTPs (12,5 µmol ml<sup>-1</sup>)
- 80 µl deionisiertes Wasser

Reaktionsansatz für die *Taq*-Polymerase (100 µl):

- 1 µl Primer forward (100 µM)
- 1 µl Primer reverse complement (100 µM)
- 3 µl Matrizen-DNA (ca. 100 ng)
- 10 µl 10 x *Taq*-Polymerase Puffer
- 10 µl 10 x MgCl<sub>2</sub>
- 1 µl *Taq*-Polymerase (5 U µl<sup>-1</sup>)
- 4 µl dNTPs (12,5 µmol ml<sup>-1</sup>)
- 70 µl deionisiertes Wasser

Der Ansatz wurde gemischt und die Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer der Reaktion
1	Vorlauf	95°C	5 min
30		Denaturierung	95°C
		Anlagerung	49-60°C
		Elongation	72°C
			1 min
			1 min
			1-4 min

Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz auf 15°C abgekühlt.


### Multiple Mutation Reaction (MMR)

Die Multiple Mutation Reaction ist eine Weiterentwicklung der „Kombinierten Kettenreaktion“ (CCR) (Bi und Stambrook, 1998) zur simultanen Einführung von mehreren Punktmutationen (Hames *et al.*, 2005). Da bei dieser Methode die Einführung der Mutationen und die Amplifikation des mutagenisierten Fragments in nur einem Schritt erfolgt, entfallen dazwischenliegende Aufreinigungsschritte. Es erfolgt sowohl eine Polymerasekettenreaktion als auch eine Ligation. Zur Ligrationsreaktion werden am 5'-Ende phosphorylierte Oligonukleotide und eine thermostabile Ligase (Ampligase, Biozym) benötigt.

#### Reaktionsansatz (50 µl) :

- 2 µl Primer CH9 (5 µM)
- 2 µl Primer CH10 (5 µM)
- je 3 µl 5'-phosphorylierte Mutageneseprimer (CH11-CH19) (3,3 µM)
- 1 µl Matrizen-DNA (ca. 100 ng)
- 5 µl 10 x MMR-Polymerase Puffer
- 1 µl Pfu-Polymerase (2,5 U µl<sup>-1</sup>)
- 3 µl Ampligase
- 1 µl dNTPs (12,5 µmol ml<sup>-1</sup>)
- 2 µl BSA (10 mg ml<sup>-1</sup>)
- 30 µl deionisiertes Wasser

Der Ansatz wurde gemischt und die Reaktion im Thermocycler mit folgendem Programm durchgeführt:

Anzahl der Zyklen	Reaktion	Temperatur	Dauer der Reaktion
1	Vorlauf	95°C	5 min
35	 Denaturierung Anlagerung Elongation	95°C	30 s
		57°C	30 s
		65°C	6 min
1	Endlauf	65°C	10 min

Nach Abschluss des Programms wurde der Reaktionsansatz auf 15°C abgekühlt.

### **Long Flanking Homolgy PCR (LFH-PCR)**

Für die Konstruktion einer *glpD*-Deletionsmutante von *B. subtilis* wurde die LFH-PCR angewandt. Zunächst wurde eine Spec-Resistenzkassette vom Vektor pDG1727 amplifiziert. Des Weiteren wurden zwei Primerpaare abgeleitet, mit denen die flankierenden Bereiche des zu *glpD*-Gens amplifiziert werden konnten. Diese Fragmente mit einer Größe von circa 1000 bp mussten so gewählt werden, dass die Expression der angrenzenden Gene nicht beeinflusst wurde. An das strangaufwärts und an das strangabwärts liegende DNA-Fragment wurde mit dem reverse Primer bzw. forward Primer jeweils eine 25 Nukleotide lange Sequenz angehängt. Diese Sequenz ist komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende der Resistenzkassette. Die PCR-Fragmente wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. In einer zweiten PCR wurden die strangaufwärts und strangabwärts liegenden DNA-Fragmente und die Resistenzkassette über die 25 Nukleotide lange Sequenz miteinander verbunden und amplifiziert. Die eingesetzte DNA-Menge des oberen und unteren Fragmentes betrug jeweils 150 ng, die der Resistenzkassette etwa 300 ng. Die Amplifikation der einzelnen Fragmente erfolgte mit Hilfe der *Pfu*-DNA-Polymerase (MBI Fermentas). Der TripleMaster Polymerase Mix (Eppendorf) wurde für die Verbindung der einzelnen Fragmente verwendet. Der Wildtypstamm von *B. subtilis* wurde direkt mit den erhaltenen PCR-Produkten transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden mittels PCR überprüft. Um sicherzustellen, dass bei den beiden PCR-Schritten keine Mutationen eingebaut wurden, wurden die bei den Kontroll-PCRs erhaltenen DNA-Fragmente sequenziert.

### **Isolierung von *M. pneumoniae* Transposonmutanten**

Die Isolierung der Transposonmutanten erfolgte aus einer Transposonmutantenbank mit Hilfe der so genannten Haystack-Methode (Halbedel *et al.*, 2006). Die Pools der Mutantenbank wurden verwendet, um Mutanten zu finden, in denen ein bestimmtes Gen durch ein Transposon unterbrochen wurde. Dazu wurde eine PCR durchgeführt mit einem Primer der sich in dem vorderen Bereich des Genes anlagert und ein reverser Primer, der sich im vorderen Bereich des Transposons anlagert. Ein PCR-Produkt in einem der Pools gab einen Hinweis darauf, dass hier eine Mutante enthalten sein könnte. Die PCR wurde dann noch mal mit jedem Klon dieses Pools durchgeführt und

der Klon, der ein PCR-Produkt lieferte, wurde isoliert und in flüssigem Medium angezogen. Die Überprüfung der Mutante auf ihre Reinheit fand mit einem Southern Blot statt.

### **Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen**

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde über Nacht eine 4 ml Kultur angezogen. Am nächsten Tag wurden 100 ml LB-Medium mit 2 ml der Übernachtskultur beimpft. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 geschüttelt und für 10 min bei 9000 x g abzentrifugiert (4°C). Das Pellet wurde in 20 ml Lösung 1 resuspendiert und wieder für 10 min bei 4°C abzentrifugiert. Dann wurde das Pellet in 20 ml Lösung 2 resuspendiert und 30 min bei 4°C inkubiert. Es folgte wieder eine Zentrifugation für 10 min bei 4°C. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml Lösung 2 und 1,3 ml 50% Glycerin aufgenommen. Die Suspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 70°C gelagert.

### **Transformation von *E. coli***

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Es wurden 200 µl der Zellsuspension zu 10-100 ng DNA gegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis gestellt. Danach wurde das Reaktionsgefäß 1 min auf 42°C erwärmt, für 5 min auf Eis gestellt und nach Zugabe von 900 µl LB-Medium für 1 h bei 37°C im Brutraum inkubiert. Von den Transformationsansätzen wurden jeweils 100 µl und der abzentrifugierte Rest auf LB-Selektionsplatten (mit Ampicillin oder Kanamycin) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet.

### **Herstellung kompetenter *B. subtilis* Zellen**

In 10 ml MNGE-Medium (mit CAA) wurde mit einer Übernachtskultur eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messung der OD<sub>600</sub> verfolgt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 1,3 wurden die Zellen mit gleicher Menge an MNGE-Medium ohne CAA verdünnt. Danach wurden die Zellen für eine weitere Stunde bei 37°C geschüttelt. Die anschließende Zentrifugation der Zellen erfolgte bei 5000 U min<sup>-1</sup> und RT für 5 min. Der Überstand wurde in ein steriles Greinergefäß dekantiert. Das Pellet wurde in 1/8 des Überstandes resuspendiert und eine

Glycerinkonzentration von 10% eingestellt. Aliquots von 300 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

### **Transformation von *B. subtilis***

Die zu 300 µl aliquotierten Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und mit folgender vorpipettierter Lösung versetzt:

1,7 ml 1 x MN

43 µl 20% Glukose

34 µl 1 M MgSO<sub>4</sub>

Zu 400 µl dieser Zellsuspension wurde 0,1-1 µg DNA gegeben und 30 min bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden 100 µl Expressionslösung (500 µl Hefeextrakt (5%), 250 µl CAA (10%), 250 µl deion. Wasser, 50 µl Tryptophan (5mg/ml)) zupipettiert und für weitere 60 min bei 37°C geschüttelt. Dann wurden die Zellen auf Selektionsmedium mit Antibiotika ausplattiert.

### **Lösungen für das Arbeiten mit DNA**

**Agarosegel 1%** 1% (w/v) Agarose in 1 x TAE

für DNA-Gelelektrophorese

**Denaturierungspuffer** 1,5 M NaCl

0,5 M NaOH

ad. 1 l mit deionisiertem Wasser

**Depurinisierungslösung** 250 mM HCl

**DNA-Probenpuffer 5 x** 5 ml Glycerin

für DNA-Gelelektrophorese 200 µl 50 x TAE

10 mg Bromphenolblau

10 mg Xylencyanol

4,5 ml deionisiertes Wasser

**Lösung 1** 10 mM MOPS

für kompetente Zellen 10 mM RbCl



---

<b>Lösung 2</b>	100 mM MOPS pH 6,5
für kompetente Zellen	10 mM RbCl
	50 mM CaCl <sub>2</sub>
<b>Lyse-Puffer</b>	50 mg Lysozym
für Isolation chromosomaler DNA	50 µl Tris-HCl pH 8,0 (1 M)
aus <i>B. subtilis</i>	10 µl EDTA pH 8,0 (0,5 M)
	2,5 ml Millipore-Wasser
<b>MMR-Puffer</b>	20 mM Tris-HCl pH 8,5
	3 mM MgCl <sub>2</sub>
	50 mM KCl
	0,5 mM NAD
<b>Neutralisierungspuffer</b>	1 M Tris-HCl pH 7,5
	1,5 M NaCl
	ad. 1 l mit deionisiertem Wasser
<b>PBS 10x</b>	2 g KCl
	2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	14,24 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O
	80 g NaCl
	ad. 1 l mit deionisiertem Wasser
	auf pH 7,4 einstellen
<b>SSPE 20 x</b>	3 M NaCl
	0,2 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	0,02 M EDTA
	pH 7,4 mit 10N NaOH einstellen

<b>TAE-Puffer 50 x</b>	242 g Tris
für DNA-Gelelektrophorese	57,1 ml Essigsäure
	100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
	ad. 1l mit deionisiertem Wasser

### 3.3.4 Arbeiten mit RNA

#### ***In-vitro* Transkription zur Herstellung von RNA-Sonden**

Als Matrize für die Herstellung von Digoxigenin-markierten Transkripten dienten PCR-Produkte (als template-DNA für die PCR wurde genomische DNA von *M. pneumoniae* M129 eingesetzt), welche ca. 500 bis 800 bp lange, interne Bereiche der interessierenden Gene abdeckten. Durch entsprechendes Primerdesign besaßen diese PCR-Produkte am 5'-Ende des nicht-kodierenden Stranges eine Erkennungsstelle für die T7-RNA-Polymerase. Dadurch war die synthetische Herstellung von *antisense*-Transkripten möglich.

Folgende Komponenten wurden dazu auf Eis in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zusammen pipettiert:

- 1 µg DNA
- 2 µl 10 x DIG RNA labeling Mix (Roche Diagnostics)
- 2 µl 10 x Transkriptionspuffer
- Ad. 18 µl steriles deionisiertes Wasser
- 2 µl T7-RNA-Polymerase (Roche Diagnostics)
- 1 µl RNase Inhibitor (Amersham)

Die *in-vitro*-Transkription erfolgte während einer zweistündigen Inkubation bei 37°C. Die Reaktion wurde nach Ablauf der Inkubationszeit durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 abgestoppt und die markierte RNA-Sonde durch Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl eiskaltem 96% (v/v) Ethanol ÜN bei -20°C präzipitiert. Durch Zentrifugation (10000 x g, 4°C, 15 min) wurde die markierte RNA pelletiert und der Überstand konnte abgenommen werden. Das gewonnene Pellet wurde mit 50 µl eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 10000 x g wurde der Überstand abgenommen und das restliche Ethanol bei RT abgedampft. Das erhaltene Pellet wurde in 100 µl sterilem deionisiertem Wasser durch

Inkubation für 30 min bei 37°C nach Zugabe von 1 µl RNase Inhibitor gelöst und die so hergestellte Sondenstammlösung bei – 80°C aufbewahrt.

### 3.3.5 Arbeiten mit Proteinen

#### Überproduktion von Proteinen und Zellaufschluss mit der French Press

Zur Überexpression von Proteinen wurden 800 ml LB/Ampicillin-Medium mit 20 ml einer Übernachtskultur von einem *E. coli*-Stamm, der das entsprechende Überexpressionsplasmid trug, angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Zur Überprüfung der Überproduktion wurde vor der Induktion und vor der Zellernte je eine Probe entnommen. Die Kultur wurde 2 h nach der Induktion zur Ernte für 10 min bei 9000 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden mit Hilfe der French Press aufgeschlossen. Der Aufschluss erfolgte bei einem Zellinnendruck von 1400 bar (20000 psi) und wurde viermal durchgeführt. Die Suspension wurde für 10 min bei 10800 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde zum Abtrennen der Zelltrümmer in der Ultrazentrifuge für 1h bei 4°C und 15000 x g zentrifugiert.

#### Zellaufschluss durch Ultraschall

Bakterienkulturen wurden für 5 min bei 16000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Zellaufschlusspuffer resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte mit einer Ultraschallsonde bei 60 W sechsmal für je 10 Sekunden. In den Pausen wurde die Probe auf Eis gekühlt. Das Gemisch wurde anschließend zum Abtrennen der Zelltrümmer abzentrifugiert (16000 x g, 30 min, 4 °C).

#### Aufreinigung von Proteinen über Ni<sup>2+</sup>-NTA Säule

Zur Aufreinigung der Proteine mit einer N-terminalen Hexahistidin-Sequenz wurden Poly-Prep-Chromatographie-Säulen (BIO-RAD) verwendet. Dabei wurde die Säule zunächst mit 4 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA Superflow (QIAGEN) beladen und dann mit 10 ml ZAP äquilibriert. 20 ml Proteinrohlysat wurde zweimal über die Matrix gegeben. Dann wurde sechsmal mit je 5 ml ZAP gewaschen. Mit steigender Imidazolkonzentration im Puffer (10 mM, 20 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM und 500 mM Imidazol) wurden mit je 5 ml zunächst unspezifisch bindende Proteine abgewaschen und danach das *His*<sub>6</sub>-tag-

tragende Protein eluiert. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden auf einem SDS-PAA-Gel mit anschließender Färbung mit Coomassie-Brilliantblau auf Zusammensetzung und Reinheit überprüft. Die Fraktionen, die aufgereinigtes Protein enthielten, wurden über Nacht in ZAP dialysiert und anschließend mittels Bradford-Reagenz auf ihre Proteinkonzentration getestet.

### **Aufreinigung über Strep-Tactin-Sepharose® Säule**

Die Überexpression und der Zellaufschluss mittels French Press wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Für die Aufreinigung des Proteins wurde eine *Strep*-Tactin Sepharose® Säule (IBA) mit einem Matrixvolumen von 1 ml verwendet. Diese Matrix bindet spezifisch eine Sequenz von acht Aminosäuren (WSHPQFEK). Die Bindung kann durch eine Verdrängungsreaktion mit D-Desthiobiotin wieder aufgehoben werden. Dadurch können Proteine, die mit dieser Aminosäuresequenz versehen sind, aus einem Proteingemisch getrennt werden. Zuerst wurde die Säule mit 3 ml Puffer W äquilibriert. Dann konnte die Säule mit 10 ml Proteinrohextrakt beladen werden. Zum Waschen der Säule wurden 5 x 1 ml Puffer W verwendet. Das gebundene Protein konnte dann mit 3 ml Puffer E in Fraktionen von je 500 µl eluiert werden. Zur Regeneration der Säulenmatrix wurden dreimal 5 ml Puffer R und zweimal mit 4 ml Puffer W auf die Säule gegeben. Die bei der Elution erhaltenen Fraktionen wurden wie oben beschrieben überprüft.

### **Dialyse von Proteinen**

Bei der Aufreinigung eines Proteins über eine N-terminale Hexahistidin-Sequenz oder *Strep*-TagII-Sequenz ist zum Ablösen des an die Säule gebundenen Proteins Imidazol bzw. Desthiobiotin notwendig, welches weitere Versuche negativ beeinflussen kann. Um das Imidazol bzw. das Desthiobiotin aus der Proteinpräparation zu entfernen, wurden die Elutionsfraktionen in einem Dialyseschlauch (Ausschlussgröße: 12-14 kDa für die Glycerolkinase und 3,5 kDa für HPr) gegen Zellaufschlusspuffer dialysiert. Das Volumen des Dialysepuffers betrug das 1000-fache der zu dialysierenden Proteinlösung.

### **Herstellung von Proteinextrakten aus *Mycoplasma pneumoniae***

Zellen aus einer 100 ml Kultur wurden zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend gab man 1,5 ml 1 x PBS zu den Zellen und löste diese mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturflasche ab. Die Zellen wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und für 4 min bei 16000 x g (4°C) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 600 mM NaCl resuspendiert. Die Zellen wurden mit der Ultraschallsonde aufgeschlossen (3 x 10 s, 4°C, 50 W) und die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (10 min, 16000 x g, 4°C).

### **Herstellung von Cytoplasma- und Membran-Fraktion aus Proteinextrakten von *M. pneumoniae***

Von einer 100 ml Kultur wurde der Überstand entnommen und die Zellen wurden 3 x mit kaltem PBS gewaschen. Die adhärenierten Zellen wurden mit 1,5 ml PBS abgeschabt und für 5 min bei 10000 x g (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 ml 0,5 % TritonX-114 in PBS resuspendiert. Der Ansatz wurde für 1 Stunde auf Eis inkubiert und alle 15 min mehrmals geschwenkt. Anschließend wurde der Ansatz wieder für 5 min bei 10000 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig auf 0,5 ml Saccharose Puffer (20 ml PBS, 1,2 g Saccharose, 100 µl TritonX-114) pipettiert und für 4 min bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 3 min bei 10000 x g (RT). Danach wurden Überstand und Pellet getrennt behandelt.

Das Pellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert, bei 37°C 4 min inkubiert und 3 min bei RT und 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet noch zwei weitere Male wie gerade beschrieben behandelt. Zum Schluss wurde das Pelletvolumen abgeschätzt und in dem dreifachen Pelletvolumen mit PBS resuspendiert. Dies war dann die Membran-Fraktion.

Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 150 µl 11,4% TritonX-114 gemischt. Der Ansatz wurde für 4 min bei 37°C inkubiert und dann bei 10000 x g (RT) für 3 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde wieder in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Prozedur wurde noch zwei Mal wiederholt. Dies war die Cytoplasma-Fraktion.

## Westernblot

Der Transfer von Proteinen auf die PVDF-Membran erfolgte in einer Semi-Dry Blot Apparatur. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol (100%) aktiviert und anschließend für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Nach einem einstündigen Transfer bei  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  wurde die PVDF-Membran über Nacht in Blotto geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der GIpK-Antikörper wurde 1:1000 in Blotto verdünnt eingesetzt und für 3 h mit der PVDF-Membran inkubiert. Nach drei Waschschritten von je 30 min mit Blotto erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG, Alkalische Phosphatase gekoppelt), der 1:100000 in Blotto verdünnt zum Einsatz kam. Nach drei weiteren 30-minütigen Waschschritten mit Blotto wurde die Membran in deion. Wasser gespült und anschließend zur Erhöhung des pH-Wertes 5 min in Puffer III inkubiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte unter Verwendung des Chemilumineszenz-Substrates CDP\* (1:100 verdünnt in Puffer III). Das Chemilumineszenz-System ChemiSmart (peqlab) wurde zur Dokumentation der Signale verwendet.

## Lösungen zum Arbeiten mit Proteinen

<b>Blotto</b> für Westernblot	100 ml 10 x TBS 25 g Magermilchpulver 1 ml Tween 20 ad. 1000 ml mit deionisiertem Wasser
<b>Entfärbelösung</b> für Proteingelektrophorese	10% Essigsäure
<b>Färbelösung</b> für Proteingelektrophorese	0,2% Coomassie Brilliant Blue R250 10%(v/v) Essigsäure 45%(v/v) Methanol ad 1 l mit deionisiertem Wasser

---

<b>Proteinlaufpuffer 10x</b> für SDS-PAGE	1,92 M Glycerin 0,5 M Tris 10% SDS
<b>Puffer III</b> für Westernblot	0,1 M Tris 0,1 M NaCl ad. 1 l mit deionisiertem Wasser pH 9,5 mit HCl eingestellt
<b>Puffer E</b>	100 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 2,5 mM Desthiobiotin
<b>Puffer R</b>	100 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM HABA
<b>Puffer W</b>	100 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA
<b>Probenpuffer 5 x</b> für native Proteingelektrophorese	50% Glycerin 0,25% Bromphenolblau

---

<b>Sammelgel</b> für denaturierende Proteingelelektrophorese	1,3 ml 30% Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1) 0,87 ml 1,5 M Tris-HCl pH 6,8 6,83 ml deionisiertes Wasser 50 µl 20% SDS 100 µl 10% APS 20 µl TEMED
<b>SDS-Probenpuffer 2 x</b> für denaturierende Proteingelelektrophorese	1,4 ml 1 M Tris-HCl pH 7,0 3 ml Glycerin 2 ml 20% SDS 1,6 ml 100% β-Mercaptoethanol 0,01 g Bromphenolblau 2 ml deionisiertes Wasser
<b>TBS 10 x</b>	60 g Tris 90 g NaCl pH 7,6 mit HCl einstellen ad 1 l mit deionisiertem Wasser
<b>Trenngel (12%)</b> für denaturierende Proteingelelektrophorese	4 ml 30% Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1) 2,6 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 3,3 ml deionisiertes Wasser 50 µl 20% SDS 100 µl 10% APS 10 µl TEMED

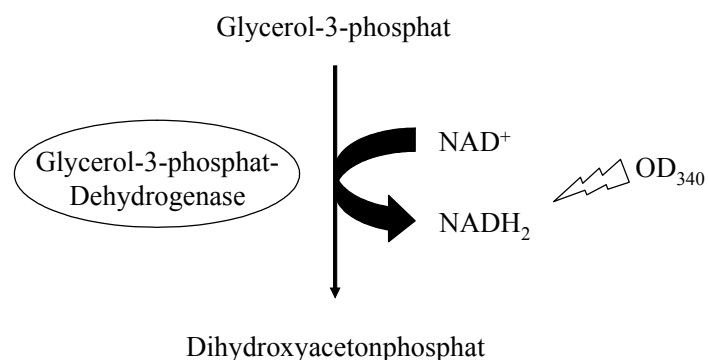


<b>Transferpuffer</b> für Westernblot auf PVDF-Membran	15,1 g Tris 72,1 g Glycin 750 ml Methanol ad 5 l mit deionisiertem Wasser
<b>Waschlösung</b> für Proteingelektrophorese	45%(v/v) Methanol 10%(v/v) Essigsäure
<b>Zellaufschlusspuffer ZAP</b>	10 mM Tris-HCl pH 7,5 200 mM NaCl

### 3.3.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten

#### Messung der $\text{NAD}^+$ -abhängigen Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase-Aktivität

Die Aktivität der Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase wurde nach der Methode von Deutscher und Sauerwald (1986) bestimmt. Die Messung beruht auf der Umsetzung von Glycerol-3-Phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat. Die Zunahme von  $\text{NADH}_2$ , welches dabei gebildet wird, kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm bestimmt werden (siehe Abb. 3.1.).



**Abb. 3.1. Schematische Darstellung des Enzymassays für die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase**

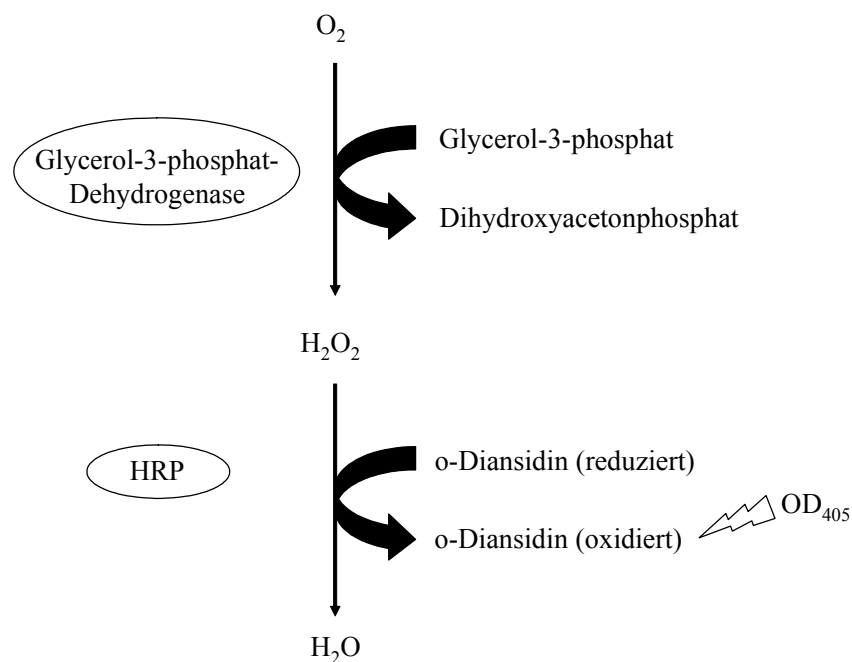
Nach der Aufreinigung der Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase konnte die Enzymaktivität bestimmt werden. In einer Küvette wurden 3 mM *sn*-Glycerol-3-phosphat, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{NAD}^+$  mit einem 100 mM Glycin-Hydrazin Puffer

vermischt. Die Aktivitätsmessung wurde durch die Zugabe von 4  $\mu\text{g}$  Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase in einem Endvolumen von 1000  $\mu\text{l}$  gestartet. Die Absorptionszunahme wurde für 2 min bei 340 nm aufgezeichnet.

### Messung der $\text{O}_2$ -abhängigen $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion durch die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase

Die Messung der Entstehung von Wasserstoffperoxid durch die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase kann photometrisch bei  $\lambda = 405 \text{ nm}$  mit Hilfe der Meerrettichperoxidase (HRP) und dem Chromogen o-Diansidin erfolgen. Die HRP ist unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid in der Lage, das farblose o-Diansidin zu einem braunen Farbstoff zu oxidieren (siehe Abb. 3.2.).

Zur Bestimmung der Menge an Wasserstoffperoxid wurde eine Standardkurve erstellt. Hierzu wurde die Absorption definierter Wasserstoffperoxidmengen gemessen und daraus die Steigung abgeleitet. In einem Ansatz wurden 0,5 mM o-Diansidin, 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (bzw. 10, 50, 100, 200, 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und 10 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 gut gemischt und nach der Zugabe von 2,5 U HRP konnte die Absorption bei  $\lambda = 405 \text{ nm}$  bestimmt werden.

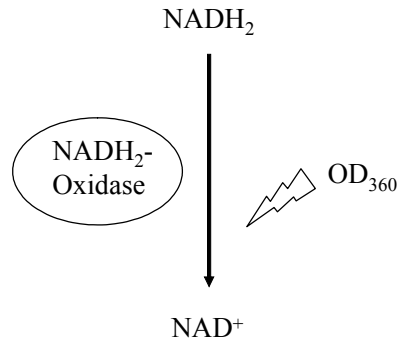


**Abb. 3.2.** Schematische Darstellung des Enzymassays zur Bestimmung der gebildeten Wasserstoffperoxidmenge

Die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase setzt Glycerol-3-phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat um und überträgt dabei die Elektronen auf den Sauerstoff. Hierbei entsteht dann Wasserstoffperoxid. Um die Menge an freigesetztem Wasserstoffperoxid bei dieser Reaktion zu ermitteln, wurden erstmal  $1\ \mu\text{g}$  Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase,  $10\ \text{mM}$  Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 und  $0,1\ \text{mM}$  Glycerol-3-phosphat in einem Gesamtvolumen von  $1000\ \mu\text{l}$  für 1 Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden  $0,5\ \text{mM}$  o-Diansidin und  $2,5\ \text{U}$  HRP zugesetzt und die Absorption bei  $\lambda = 405\ \text{nm}$  gemessen. Anhand der Standardkurve konnte die entstandene Wasserstoffperoxidmenge abgelesen werden.

### Messung der $\text{NADH}_2$ -Oxidase-Aktivität

Die Enzymaktivität der  $\text{NADH}_2$ -Oxidase wurde nach der Methode von Hummel und Riebel (2003) bestimmt. Hierbei wird der Umsatz von  $\text{NADH}_2$  zu  $\text{NAD}^+$  durch die  $\text{NADH}_2$ -Oxidase gemessen. Die Abnahme der Absorption bei der Bildung von  $\text{NAD}^+$  kann photometrisch bei einer Wellenlänge von  $360\ \text{nm}$  ermittelt werden (siehe Abb. 3.3.).



**Abb. 3.3. Schematische Darstellung des Enzymassays für die  $\text{NADH}_2$ -Oxidase**

Nach der Aufreinigung der  $\text{NADH}_2$ -Oxidase konnte die Enzymaktivität bestimmt werden. In einer Küvette wurden  $0,1\ \text{mM}$   $\text{NADH}_2$  und  $100\ \text{mM}$  Kalium-Phosphat-Puffer pH7,5 gemischt und der Enzymassay durch die Zugabe von  $5\ \mu\text{g}$   $\text{NADH}_2$ -Oxidase in einem Endvolumen von  $1000\ \mu\text{l}$  gestartet. Die Absorptionzunahme wurde für 2 min bei  $360\ \text{nm}$  aufgezeichnet.

**Lösungen für Enzymaktivitätsmessungen**

<b>100 mM <i>sn</i>-Glycerol-3-phosphat</b>	in 50 mM Tris geben und bis zum Erreichen des pH 4,0 mit 1N HCl titrieren
<b>100 mM Glycin-Hydrazin-Puffer</b>	7,507 g Glycin 5,1 g Hydrazin ad. 100 ml deionisiertes Wasser
<b>100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5</b>	16 ml 0,2 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 84 ml 0,2 M $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 ml deionisiertes Wasser

**3.3.7 Messung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion von *M. pneumoniae* in vivo**

Der Überstand einer 100 ml Kultur wurde abgegossen und die Zellen zweimal mit Puffer (67,6 mM HEPES pH 7,3, 140 mM NaCl, 7 mM  $\text{MgCl}_2$ ) gewaschen. Die adhärennten Zellen wurden mit 1,5 ml Puffer von der Oberfläche geschabt und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 10000 x g bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde noch mal mit 1 ml Puffer gewaschen. Die Zellen wurden noch mal für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml Puffer resuspendiert und 1 ml dieser Lösung wurde zur Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm eingesetzt. Für die Messung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion wurden je 1,0  $\text{OD}_{550}$ -Einheiten in einem Gesamtvolumen von 1 ml eingesetzt. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  100 mM Glycerol oder Glucose. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion wurde zum Zeitpunkt der Zugabe der Kohlenstoffquelle gestartet (Zeitpunkt 0) und nach 1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 20 min und 120 min. Dabei wurden Analytestäbchen (Peroxid-Test, Merck) 1 sek in die Lösung eingetaucht und nach 15 sek wurde die Farbe der Reaktionszone mit dem Farbfeld verglichen. Anhand des Farbfeldes konnte die entstandene Menge an  $\text{H}_2\text{O}_2$  bestimmt werden.

### 3.3.8 Immun-Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Zellen einer 100 ml Kultur wurden mit 2 ml frischem Medium abgeschabt und anschließend mit einer 0,4 x 20 mm Kanüle vereinzelt. Von der Zellsuspension wurden 200 µl auf ein Deckgläschen getropft, wobei beachtet wurde, dass keine Flüssigkeit über den Rand läuft. Das Deckgläschen wurde in einer geschlossenen Petrischale für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden das Deckgläschen zwei Mal mit PBS überschichtet und geschwenkt. Darauf folgte die Fixierung der Zellen mit 0,25% Glutaraldehyd und 3,7% Formaldehyd in PBS. Das Deckgläschen wurden mit dieser Lösung überschichtet und 30 min bei 4°C inkubiert. Die fixierten Zellen wurden anschließend 3 x 5 min mit PBS bei RT leicht geschwenkt.

Der primäre Antikörper  $\alpha$ -GlpD wurde in PBS-BSA (2% BSA in PBS) 1:1000 verdünnt und 200 µl der Lösung wurden auf dem Deckgläschen verteilt. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei RT in einer geschlossenen Petrischale.

Danach wurde das Deckgläschen 3 x 10 min mit PBS bei RT leicht geschwenkt. Das Deckgläschen wurde mit einer Pinzette herausgenommen und die Unterseite wurde mit einem fusselfreien Tuch abgewischt. In einer neuen Petrischale wurden die Zellen dann mit dem sekundären Antikörper  $\alpha$ -Rabbit IgG-FITC (1:1000) 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Das Deckgläschen wurde wieder 3 x 10 min mit PBS geschwenkt, die Unterseite trocken gewischt und auf einen Objektträger gelegt.

Die Zellen wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert.

### 3.3.9 Elektronenmikroskopie

Der Überstand einer 100 ml Kultur wurde abgenommen, die Zellen wurden mit 3 x mit kaltem PBS gewaschen und mit 1,5 ml kaltem PBS abgeschabt. Die Zellen wurden 5 min bei 10000 x g (4°C) abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Fixierung der Zellen erfolgte für 1 Stunde mit 2,5% Glutaraldehyd. Dann wurden sie 2 x mit PBS gewaschen und für 3 min bei 10000 x g (4°C) abzentrifugiert. Die fixierten Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert und ein Tropfen dieser Lösung wurde auf Parafilm pipettiert. Ein Grid wurde für 3 min auf dem Tropfen inkubiert und kurz auf einem Filterpapier getrocknet. Der primäre Antikörper,  $\alpha$ -P01 oder  $\alpha$ -GlpD, wurde 1:100 verdünnt, ein Tropfen dieser Lösung auf Parafilm pipettiert und das Grid für 1 Stunde aufgelegt. Anschließend wurde das Grid 3 x 5 min mit PBS gewaschen, in dem man das

Grid auf die Tropfen gelegt hat und danach mit Filterpapier getrocknet hat. Der sekundäre Antikörper  $\alpha$ -Rabbit IgG-5nmGold (1:100) wurde 30 min mit dem Grid inkubiert. Danach wurde das Grid 2 x 5 min auf PBS-Tropfen gewaschen und zum Schluss kurz auf deionisiertes Wasser gelegt. Das Grid wurde mit der Unterseite nach oben auf dem Filterpapier trocknen gelassen.

Die fixierten und markierten Zellen wurden unter einem Elektronenmikroskop betrachtet und fotografiert.

### 3.3.10 Radioaktive *in vitro* Phosphorylierung von Enzymen

#### Herstellung von radioaktivem $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-Phosphoenolpyruvat (PEP)

Für die Herstellung von radioaktivem  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP wurden folgende Komponenten pipettiert:

100  $\mu$ l 250 mM Triethylamine/HCl pH 7,6

25  $\mu$ l 150 mM KCl

25  $\mu$ l 30 mM MgCl<sub>2</sub>

12,5  $\mu$ l 3,3 mM PEP

25  $\mu$ l 10 mM Pyruvat

25  $\mu$ l Pyruvatkinase (400 U/ml)

12,5  $\mu$ l 100  $\mu$ M ATP

25  $\mu$ l <sup>32</sup>P-ATP (3000 Ci/mmol)

Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 30°C inkubiert. Zu den Phosphorylierungsansätzen wurde jeweils 1  $\mu$ l der Lösung zugegeben. Das radioaktive  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-PEP wurde bei -20°C aufbewahrt.

#### Herstellung von HPr-Ser46-P

Zur Herstellung von HPr(His15~P)(Ser46-P) musste vorab das HPr-Ser46-P *in vitro* synthetisiert werden. Hierzu wurden 4,5  $\mu$ g HPr, 0,3  $\mu$ g HPrK, 2  $\mu$ l Master Mix Puffer 10 x und 2  $\mu$ l 10 mM ATP in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Für die Phosphorylierungsansätze wurden je 4  $\mu$ l dieser Lösung eingesetzt.

***In vitro* Phosphorylierung der aufgereinigten Glycerolkinase aus *M. pneumoniae***

Für die Phosphorylierungsexperimente wurden aus *E. coli* aufgereinigte Proteine von *M. pneumoniae* verwendet. Einzige Ausnahme war das Enzym I (EI) welches von *B. subtilis* stammte. Die Ansätze wurden wie folgt zusammen pipettiert:

1. Phosphorylierungsansatz von GlpK mit HPr-Ser46-P:

100 pmol HPr  
100 pmol HPrK  
100 pmol GlpK  
2 µl Master Mix Puffer 10 x  
ad. 19 µl deionisiertes Wasser

2. Phosphorylierungsansatz von GlpK mit HPr-His15~P:

100 pmol HPr  
80 pmol EI  
100 pmol GlpK  
2 µl Master Mix Puffer 10 x  
ad. 19 µl deionisiertes Wasser

3. Phosphorylierungsansatz von GlpK mit HPr(His15~P)(Ser46-P):

100 pmol HPr-Ser46-P  
80 pmol EI  
100 pmol GlpK  
2 µl Master Mix Puffer 10 x  
ad. 19 µl deionisiertes Wasser

Die Ansätze wurden im Labor pipettiert und anschließend auf 4°C gehalten. Im Isotopenlabor erfolgte die Zugabe von 1 µl ATP-Gemisch (~0,4 mM) zu den Ansätzen, in denen HPr am Ser46 phosphoryliert werden sollte (Ansatz 1). Das ATP-Gemisch bestand aus nicht-radioaktiv markiertem ATP („kalt“) und dem radioaktiv markierten  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP (6000 Ci/mmol). Es wurden 11,5 µl „kaltes“ ATP (10 mM), zur Absättigung von unspezifischen Phosphorylierungsstellen, mit 1 µl  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATP und 7,5 µl H<sub>2</sub>O

gemischt. Zu den Ansätzen (Ansatz 2 und 3), in denen HPr am His15 phosphoryliert werden sollte, wurde 1 µl radioaktiv markiertes  $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]-PEP gegeben.

Nach der ATP bzw. PEP-Zugabe wurden die Ansätze 30 und 60 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer wurden die Phosphorylierungsansätze auf ein 12% SDS-PAA-Gel aufgetragen.

<b>Master Mix Puffer 10 x</b>	250 mM Tris-HCl pH 7,5
	100 mM MgCl <sub>2</sub>
	10 mM DTT

### ***In vitro* Phosphorylierung der Laktatdehydrogenase durch eine Serin/Threonin-Kinase aus *M. pneumoniae***

Für die Untersuchung der Phosphorylierung wurden die Laktatdehydrogenase (Ldh) und die Serin/Threonin-Kinase (PrkC) von *M. pneumoniae* aus *E. coli* aufgereinigt. Die Ansätze wurden wie folgt zusammen pipettiert:

45 pmol PrkC  
295 pmol Ldh  
2 µl Master Mix 10 x  
ad. 19 µl deionisiertes Wasser

Im Isotopenlabor wurde 1 µl von dem ATP-Gemisch zu dem Ansatz pipettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer wurden die Phosphorylierungsansätze auf ein 12% SDS-PAA-Gel aufgetragen.

### **Identifizierung von $^{32}\text{P}$ -markierten Proteinen**

Nach dem Gellauf wurden die Gele auf Whatman®-Papier überführt und mit durchsichtiger, hitzebeständiger Folie abgedeckt und für 2 Stunden auf dem Gel Dryer 583 (Bio-Rad) bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Es erfolgte die Exposition auf einem Schirm („Screen“) für mindestens 18 h. Der Schirm ist mit BaFBrEu-Kristallen beschichtet. Bei der Exposition mit radioaktiven Isotopen werden die Kristalle der ionisierenden Strahlung ausgesetzt, wodurch das Eu zum stabileren  $\text{Eu}^{2+}$  angeregt wird. Nach der Exposition wurde der hybridisierte Schirm im PhosphorImager™ (Molecular Dynamics) durch einen Laserstrahl abgelesen. Beim Auftreffen der Lichtenergie auf



$\text{Eu}^{2+}$  wird dieses zu instabilem  $\text{Eu}^{3+}$  überführt, woraufhin die Elektronen in ihren Grundzustand zurückfallen und ein Lichtsignal abgeben, das vom Gerät detektiert wird. Das Vorhandensein von  $^{32}\text{P}$  an bestimmten Positionen im Gel, war als Schwärzung auf dem Bildschirm erkennbar. Die Proteingrößen konnten mit Hilfe des Größenmarkers auf dem Coomassie-Blau-Bild, den Signalen im Autoradiogramm zugeordnet werden.

### 3.3.11 Infektion von HeLa-Zellen mit *M. pneumoniae* Mutanten

#### Vorbereitung der HeLa-Zellen

Die Versuche wurden in 24 Well Titerplatten durchgeführt. Hierzu wurden die geernteten HeLa-Zellen erst mal mit einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Um die gewünschte Menge an Zellen pro Well ( $2,5 \times 10^4$ ) für den Versuch einsetzen zu können, wurde folgende Formel verwendet:

$$x \text{ ml} = \frac{\text{Zellzahl} \times 1 \text{ ml}}{2,5 \times 10^4}$$

Die berechnete Menge an Zellen wurden in die Wells pipettiert und mit frischem DMEM auf 700  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurden die Titerplatten für 24 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert.

#### Infektion der HeLa-Zellen

Die *M. pneumoniae* Kulturen wurden für 96 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Der Überstand der Kulturen wurde abgeschüttet und die adhärrierenden Zellen dreimal mit 67,6 mM HEPES, 140 mM NaCl und 7 mM  $\text{MgCl}_2$  gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 1,5 ml von diesem Puffer abgeschabt und bei  $4^\circ\text{C}$  und  $10000 \times g$  für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer mit einer 0,4 x 20 mm Kanüle resuspendiert. Je nach Größe des Pellet wurde es mit 5-8 ml Puffer verdünnt. Anschließend wurde 1 ml dieser Suspension zur Bestimmung der optischen Dichte bei  $\lambda = 550 \text{ nm}$  verwendet.

Die entsprechende Menge von 0,1  $\text{OD}_{550}$ -Einheiten wurde der Suspension entnommen und bei  $4^\circ\text{C}$  und  $10000 \times g$  für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 125  $\mu\text{l}$  frischem MP-Medium mit einer 0,4 x 20 mm Kanüle resuspendiert. Die Zellen

wurden dann zu den HeLa-Zellen pipettiert und die Titerplatte für 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und durch 700 µl frisches DMEM ersetzt. Der Versuch wurde über 6 Tage verfolgt.

Zur Bestimmung der MOI (multiplicity of infection) wurden Verdünnungsreihen der von 0,1 OD<sub>550</sub>-Einheiten vor der Infektion und der Überstand 2h nach der Infektion auf MP-Platten ausplattiert und für 14 Tage bei 37°C inkubiert. Der MOI entsprach 1000000 *M. pneumoniae*-Zellen pro HeLa-Zelle.

### **Anfärben und fotografieren der HeLa-Zellen**

Das Medium wurde aus den Wells entnommen, die HeLa-Zellen wurden mit 100 µl Kristallviolett-Lösung überschichtet und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch zweimalige Zugabe von 600 µl sterilem deionisiertem Wasser gewaschen, um Reste der Kristallviolett-Lösung zu entfernen. Die Färbelösung fixiert die Zellen und färbt diese blau an. In diesem Zustand wurden die Zellen mit einer Digital-Kamera fotografiert (Belichtungszeit 15 ms).

### **Kristallviolett-Lösung**

0,75 % Kristallviolett  
0,25 % NaCl  
1,75 % Formaldehyd  
50 % Ethanol

## 4. Ergebnisse

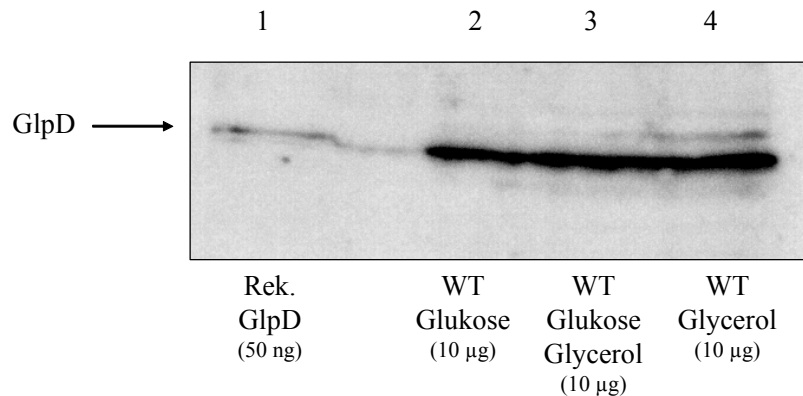
### 4.1 Untersuchung der Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase aus *M. pneumoniae*

#### 4.1.1 Expression der Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase bei verschiedenen Kohlenstoffquellen

In den meisten Prokaryoten ist die Aufnahme von Zuckern streng reguliert. Bei Gram-positiven Bakterien wird die Expression der Gene, die für die Aufnahme und Verwertung alternativer Zucker zuständig sind, reprimiert, sobald die am besten verwertbare Kohlenstoffquelle Glukose verfügbar ist. Diese Form der Regulation wird Kohlenstoffkatabolitenrepression genannt (Stülke und Hillen, 1999; Brückner und Titgemeyer, 2002; Warner und Lolkema, 2003). Somit wird gewährleistet, dass nur die Enzyme gebildet werden, die zu dem Zeitpunkt gerade benötigt werden. Da *M. pneumoniae* ebenfalls in der Lage ist, verschiedene Kohlenstoffquellen zu verwerten, sollte mittels Western Blot untersucht werden, ob die Expression der Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase (GlpD) unter verschiedenen Bedingungen reguliert wird.

Für die Herstellung eines Antikörpers gegen die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase wurde das Protein in den Überexpressionsvektor pWH844 kloniert, der es ermöglicht, die GlpD mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag aufzureinigen. Mit Hilfe der MMR wurden die vier UGA-Codons in UGG-Codons umgewandelt, um eine vollständige Translation des Proteins in *E. coli* zu gewährleisten. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pGP266 und *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde mit diesem transformiert. Nach der Überexpression wurde die rekombinante GlpD mit einer Ni<sup>+2</sup>-NTA-Säule aufgereinigt und 1  $\mu$ g wurde für die Immunisierung eines Kaninchens verwendet (Institut für Veterinär-Bakteriologie, Universität Bern). Nach Erhalt des Antikörpers  $\alpha$ -GlpD wurden die Mykoplasmen mit verschiedenen Kohlenstoffquellen, Glukose, Glycerol und Glukose und Glycerol angezogen. Aus diesen Kulturen wurden die Proteinextrakte gewonnen, welche für die Western Blot Untersuchung (Abb. 4.1.) eingesetzt werden konnten. In der Abbildung 4.1. ist in der ersten Spur rekombinante GlpD aufgetragen. Die Spuren 2, 3 und 4 stellen die Proteinextrakte mit Glukose, Glycerol und Glukose und Glycerol da. Die Menge an Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase ist unter allen

Bedingungen gleich. Dies zeigt, dass keine Regulation der Expression von *glpD* auf der Transkriptions- und Translationsebene stattfindet. Somit ist höchstens eine Regulation durch Proteinmodifikation wie zum Beispiel Phosphorylierung denkbar. Es konnte in vorherigen Experimenten bereits gezeigt werden, dass auch im Fall der Glycerolkinase die Proteinmenge unter verschiedenen Kohlenstoffbedingungen konstant ist (Hames, 2005).



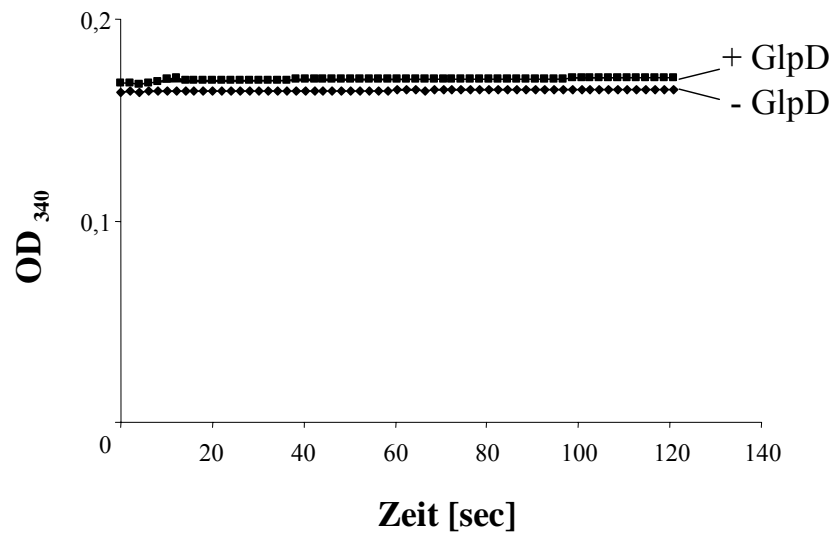
**Abb. 4.1. Western Blot mit Proteinextrakten aus *M. pneumoniae***

Zur Kontrolle wurden 50 ng rekombinante GlpD aufgetragen (Spur 1). In Spur 2 wurde 10 µg Proteinextrakt von WT mit Glukose, in Spur 3 WT mit Glukose und Glycerol und in Spur 4 WT mit Glycerol aufgetragen und in einem 12% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zur Detektion der Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase wurde ein  $\alpha$ -GlpD-Antikörper verwendet.

#### 4.1.2 Kann die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase $\text{NAD}^+$ reduzieren?

Mit Hilfe eines Enzymassays sollte die Aktivität des rekombinanten Enzyms His<sub>6</sub>-GlpD überprüft werden. Hierzu wurde eine Methode verwendet, die von Deutscher und Sauerwald (1986) beschrieben wurde. Dabei wird die Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}_2$  photometrisch ( $\lambda=340\text{nm}$ ) verfolgt, wenn die GlpD Glycerol-3-phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat umsetzt.

Bei der Negativkontrolle ohne Zugabe der Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase konnte wie erwartet keine Absorptionsänderung festgestellt werden (Abb. 4.2.). Die Zugabe von 4 µg GlpD sollte die Umsetzung des Substrats auslösen, wenn  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}_2$  reduziert wird. Hierbei wäre eine Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm zu erwarten gewesen. Jedoch konnte bei der photometrischen Messung keine Absorptionsänderung festgestellt werden.



**Abb. 4.2. Graphische Darstellung der Messung der Enzymaktivität der Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase**

Die Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von 340 nm wurde über 2 Minuten verfolgt. Der Enzymassay wurde durch die Zugabe von 4 µg Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase gestartet. Als Negativkontrolle wurde kein Enzym zu dem Assay hinzugegeben.

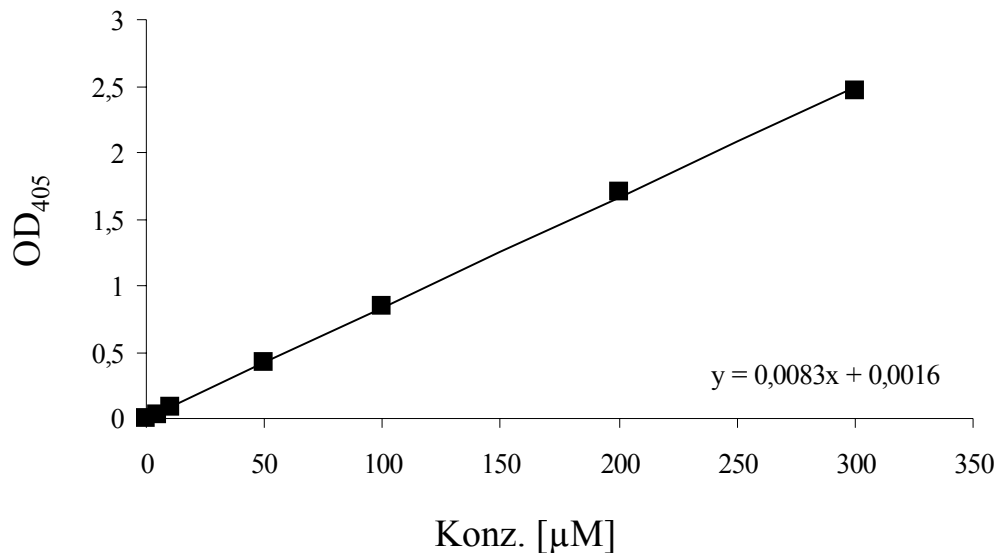
Eine mögliche Erklärung wäre, dass das rekombinante Protein durch den angehängten Tag nicht mehr richtig gefaltet ist und damit die Enzymreaktion nicht mehr ablaufen kann. Die andere Möglichkeit wäre, dass das Enzym keine Dehydrogenase sondern eine Oxidase ist, bei der nicht  $\text{NAD}^+$  sondern Sauerstoff als Elektronenakzeptor fungiert. Eine Glycerol-3-phosphat-Oxidase konnte bereits in *M. mycoides* subsp. *mycoides* nachgewiesen werden (Pilo *et al.*, 2005).

#### **4.1.3 Ist *glpD* aus *M. pneumoniae* eine Glycerol-3-phosphat-Oxidase?**

Bei der Umsetzung des Substrats Glycerol-3-phosphat durch die Glycerol-3-phosphat-Oxidase wird Sauerstoff reduziert und es entsteht Wasserstoffperoxid (Wadher *et al.*, 1990). Das Wasserstoffperoxid kann mit Hilfe eines Enzymassays bestimmt werden.

In diesem Fall wurde die rekombinante His<sub>6</sub>-GlpD zusammen mit dem Substrat Glycerol-3-phosphat für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dann gab man die Meerrettich-Peroxidase und das Chromogen o-Dianisidin zu dem Ansatz und verfolgte die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm über die Zeit. Anschließend konnte die

Menge an entstandenem Wasserstoffperoxid ermittelt werden, in dem man die Werte anhand einer Standardkurve abgeglichen hat. Die Standardkurve ist in Abbildung 4.3. dargestellt.



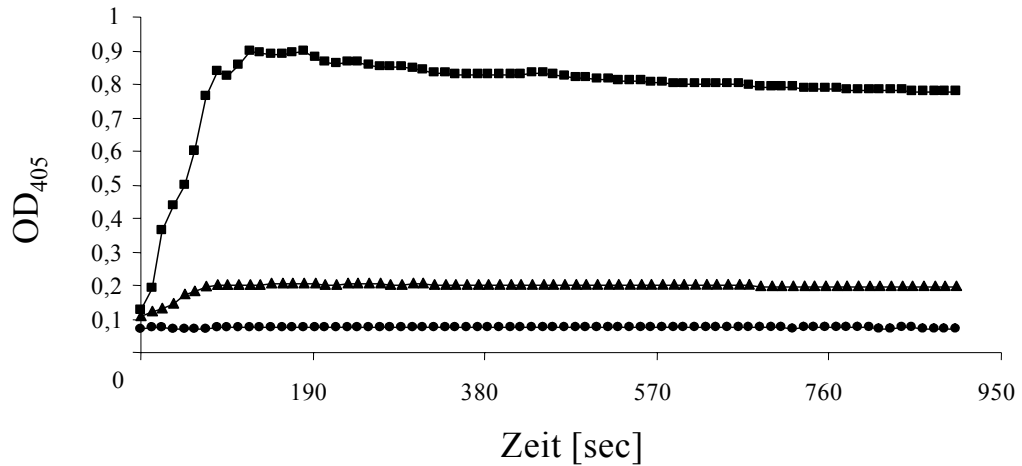
**Abb. 4.3. Standardkurve zur photometrischen Bestimmung der Wasserstoffperoxidmenge**

Die Umsetzung von bestimmten Mengen Wasserstoffperoxid durch die Meerrettich-Peroxidase konnte mit dem Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm durch die Farbreaktion des Chromogens o-Dianisidin bestimmt werden. Es wurde die Absorption von 0, 5, 10, 50, 100, 200 und 300  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (■) gemessen. Die  $\text{OD}_{405}$  wurde gegen die Konzentration des  $\text{H}_2\text{O}_2$  aufgetragen und mit Hilfe einer Trendlinie konnte die Geradengleichung bestimmt werden.

Die Standardkurve wurde mit definierten Mengen  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5, 10, 50, 100, 200, 300  $\mu\text{M}$ ) bestimmt. Die gemessene Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm wurde gegen die eingesetzte Konzentration von  $\text{H}_2\text{O}_2$  aufgetragen und es konnte eine Geradengleichung anhand der Ausgleichsgeraden ermittelt werden. Man konnte nun mit Hilfe der Gleichung ( $x = (y - 0,0016) / 0,0083$ ) das entstandene  $\text{H}_2\text{O}_2$  (x) berechnen, welches bei Einsatz unterschiedlicher Mengen Substrat nach einer Stunde Inkubation bei 37°C entstanden ist. Hierzu wurde bei y in der Gleichung die gemessene Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm eingesetzt und x berechnet.

Die Messungen der Absorption bei Zugabe von 0,1 und 0,5 mM Glycerol-3-phosphat zu der Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase ist in der Abbildung 4.4. dargestellt. Ohne die Zugabe von Substrat verändert sich die Absorption nicht und bleibt konstant (●). Bei der Zugabe von 0,1 mM Glycerol-3-phosphat (▲) steigt die gemessene  $\text{OD}_{405}$  leicht an und erreicht einen Wert von 0,15 nach 5 Minuten. Dies

entspricht einer freigesetzten Wasserstoffperoxidmenge von  $17,7 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ . Die Zugabe von  $0,5 \text{ mM}$  Substrat (■) bewirkt einen Anstieg der Absorption von  $0,8$  nach  $5$  Minuten. Hier wurden  $90,1 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  Wasserstoffperoxid freigesetzt.



**Abb. 4.4. Enzymassay zur Bestimmung der freigesetzten Wasserstoffperoxidmenge durch die rekombinante Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase**

Die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase wurde mit dem Substrat Glycerol-3-phosphat für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend konnte durch die Zugabe von der Meerrettich-Peroxidase und dem Chromogen o-Dianisidin die entstandene Menge Wasserstoffperoxid photometrisch bei einer Wellenlänge von  $405 \text{ nm}$  bestimmt werden. In der Graphik sind die Daten der Kontrolle ohne Zugabe des Proteins (●), der Zugabe von  $0,1 \text{ mM}$  Glycerol-3-phosphat (▲) und der Zugabe von  $0,5 \text{ mM}$  Glycerol-3-phosphat (■) dargestellt.

Der Vergleich der entstandenen Wasserstoffperoxidmengen zeigt, dass die freigesetzten Mengen von der eingesetzten Menge Substrat, Glycerol-3-phosphat, abhängig ist. Die Zugabe von  $0,5 \text{ mM}$  Substrat bewirkt einen ungefähr 5-fach höheren Anstieg der Absorption beziehungsweise der Wasserstoffperoxidmenge gegenüber der Zugabe von  $0,1 \text{ mM}$  Substrat. Mit Hilfe dieses Versuches konnte gezeigt werden, dass das Gen *glpD* für eine Glycerol-3-phosphat-Oxidase kodiert.

#### 4.1.4 Charakterisierung der GlpO aus *M. pneumoniae* in *B. subtilis*

Es gibt nur sehr wenige genetische Werkzeuge zur Manipulation von *M. pneumoniae*. Es gibt zum Beispiel keine replikativen Plasmide für diesen Organismus mit welchen man Mutanten komplementieren oder Enzyme näher charakterisieren könnte. Daher

sollten die Versuche zur Charakterisierung der GlpO aus *M. pneumoniae* in dem gut untersuchten Gram-positiven Modellorganismus *B. subtilis* durchgeführt werden.

Die Glycerol-3-phosphat-Oxidase wurde mit den Primern CH59 und CH60 aus dem Plasmid pGP266 amplifiziert. In diesem Plasmid war das Gen *glpD* enthalten, bei welchem die UGA-Codons in UGG-Codons mutiert wurden, um eine vollständige Synthese des Proteins in *B. subtilis* zu gewährleisten. Außerdem wurde mit dem Primer CH59 die Ribosomenbindestelle von *gluC* aus *B. subtilis* eingeführt, welche eine Translation des rekombinanten Proteins ermöglicht. Für die Klonierung wurde der Vektor pBQ200 verwendet, ein replikatives Plasmid, welches einen starken Promotor besitzt und somit eine hohe Expression des Gens ermöglicht. Mit den Primern wurden die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I eingeführt, um das PCR-Fragment mit dem geschnittenen Vektor pBQ200 ligieren zu können. Mit dem Ligationsansatz konnte *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert werden und die Selektion fand auf LB-Platten mit Kanamycin statt. Das fertige Plasmid bekam nach der Sequenzierung die Bezeichnung pGP267.

Die Versuche sollten in einer  $\Delta$ *glpD*-Mutante von *B. subtilis* durchgeführt werden. Hierzu wurde die LFH-PCR-Methode verwendet. Dabei wird das ganze Gen, in diesem Fall *glpD*, durch eine Resistenzkassette ersetzt. Daher wurden erstmal strangauf- und strangabwärts je 1000 bp des flankierenden Bereichs mit den Primern CH64/CH65 und CH66/CH67 amplifiziert. Den Primern CH65 und CH66 war eine 25 Nukleotide lange Sequenz angehängt, welche komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende der Resistenzkassette ist. Für die Amplifizierung der Spectinomycin-Resistenzkassette wurden die Primer TM0141 und TM0142 und das Plasmid pDG1727 als Template verwendet. Alle drei PCR-Fragmente wurden dann mit Hilfe einer PCR-Reaktion zusammengefügt. Dieses Fragment wurde dann eingesetzt, um den Wildtyp Stamm *B. subtilis* 168 zu transformieren. Die  $\Delta$ *glpD*-Mutante bekam nach der Sequenzierung der flankierenden Bereiche die Bezeichnung GP60.

Der Wildtyp 168 und die  $\Delta$ *glpD*-Mutante von *B. subtilis* sollten nun mit dem Plasmid pGP267 transformiert werden, welches ihnen eine Erythromycin/Lincomycin-Resistenz verleihen sollte. Jedoch war es nicht möglich, Transformanten zu isolieren. Zur Kontrolle wurden der Wildtyp und die  $\Delta$ *glpD*-Mutante mit dem Plasmid pBQ200 (Vektor ohne *glpD*) transformiert. Hierbei wurden immer Transformanten erhalten. Das Einbringen des Gens *glpD* aus *M. pneumoniae* hatte demnach eine letale Wirkung auf

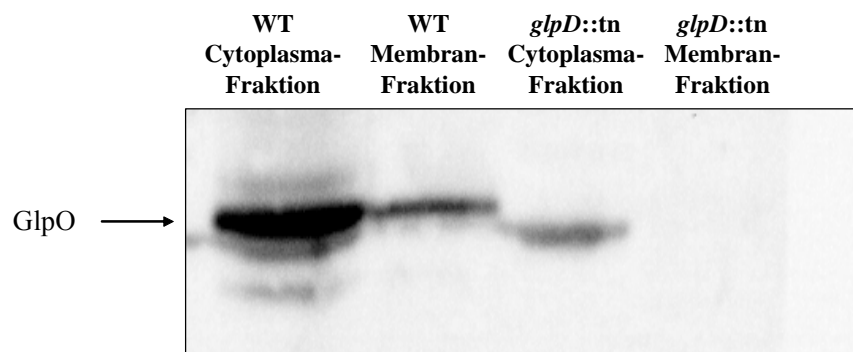


den Rezeptorstamm *B. subtilis*. Obwohl den Platten kein Glycerol zugesetzt wurde, ist es möglich, dass dem Enzym Glycerol-3-phosphat zur Verfügung stand und somit Wasserstoffperoxid freigesetzt wurde. Das entstandene Wasserstoffperoxid könnte die letale Wirkung auf die Bacillen gehabt haben. Somit konnte die Domäne, welche für die  $H_2O_2$ -Produktion wichtig ist, nicht identifiziert werden.

#### 4.1.5 Lokalisierung der Glycerol-3-phosphat-Oxidase

Bei *M. mycoides* konnte gezeigt werden, dass die Glycerol-3-phosphat-Oxidase (GlpO) an der Cytoplasmamembran lokalisiert ist (Pilo *et al.*, 2005). Die Glycerol-3-phosphat-Oxidase aus *M. pneumoniae* übernimmt die gleiche Funktion wie GlpO, nämlich die Umwandlung von Glycerol-3-phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat. Es stellte sich die Frage, ob sich das Protein GlpO ebenfalls in der Membran befindet oder ob es im Cytoplasma anzutreffen ist.

Hierzu wurden die Proteinextrakte von *M. pneumoniae* Wildtyp und einer *glpD::tn*-Mutante (GPM52) in die Cytoplasma-Fraktion und die Membran-Fraktion getrennt. Die gewonnenen Fraktionen wurden mittels Western Blot mit einem  $\alpha$ -GlpD-Antikörper untersucht (Abb. 4.5.).

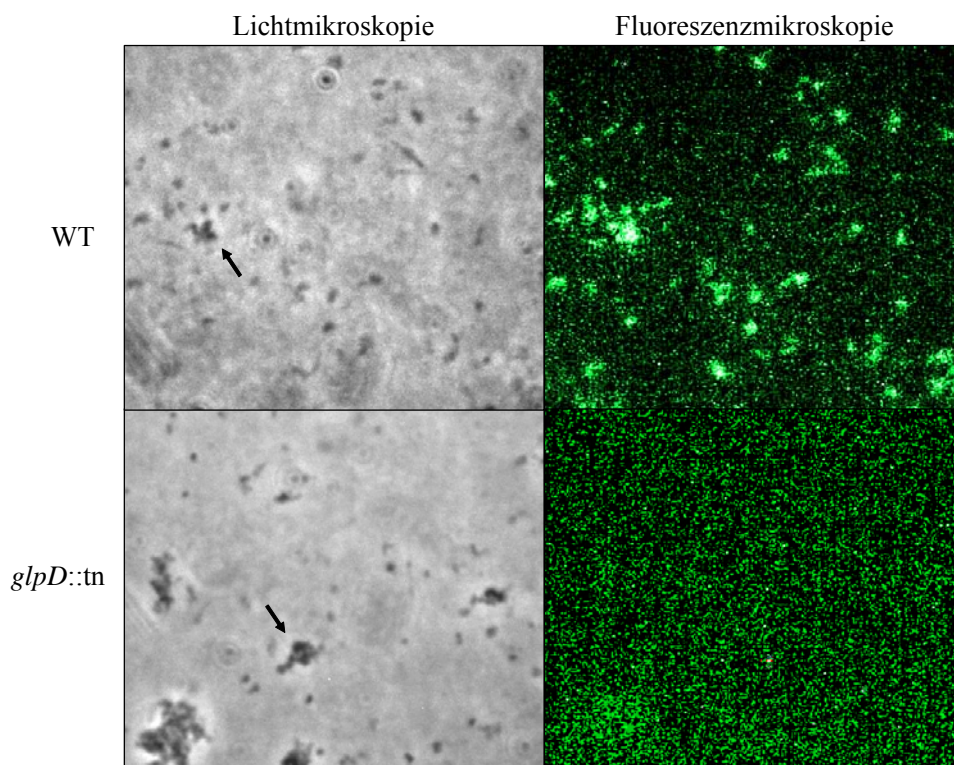


**Abb. 4.5. Western Blot von Cytoplasma- und Membran-Fractionen aus *M. pneumoniae* WT und einer *glpD::tn*-Mutante**

Das 12% Polyacrylamidgel wurde wie folgt von links nach rechts beladen: 1. WT Cytoplasma-Fraktion, 2. WT Membran-Fraktion, 3. *glpD::tn*-Mutante Cytoplasma-Fraktion, 4. *glpD::tn*-Mutante Membran-Fraktion. Der Western Blot wurde mit einem  $\alpha$ -GlpD-Antikörper durchgeführt.

In *M. pneumoniae* befindet sich der Großteil der Glycerol-3-phosphat-Oxidase im Cytoplasma und nur wenig Protein kann in der Membran detektiert werden. Mit der Immunfluoreszenzmikroskopie sollte noch mal bestätigt werden, dass die GlpO auch auf

der Membran zu finden ist. Hierzu wurden der Wildtyp und die *glpD::tn*-Mutante auf Deckgläschen für eine halbe Stunde inkubiert, damit sie sich anheften können. Anschließend wurden ein  $\alpha$ -GlpD-Antikörper und danach ein sekundärer FITC-gekoppelter Antikörper zu den Zellen gegeben. Im Anschluss konnten die markierten Zellen im Fluoreszenzmikroskop angesehen werden (Abb. 4.6.). Die Pfeile auf den Lichtmikroskopiebildern zeigen auf die Mykoplasmen. Daneben sieht man den gleichen Bildausschnitt in der Fluoreszenzmikroskopie. An den Wildtyp-Zellen hat der  $\alpha$ -GlpD-Antikörper an die Membran gebunden und der sekundäre FITC-gekoppelte Antikörper fluoresziert grün. Man sieht, dass die Fluoreszenz nur dort zu finden ist, wo sich auch Mykoplasmen befinden. Zur Kontrolle wurde der Versuch mit einer *glpD::tn*-Mutante durchgeführt. Das Protein wird nicht exprimiert und der Antikörper kann demnach nicht binden. Die Auflösung des Mikroskops war zu gering, um eine Aussage darüber zu treffen, wo genau die Antikörper an der Membran gebunden hatten. Für die exakte Lokalisierung des Proteins sollte die Elektronenmikroskopie eingesetzt werden.



**Abb. 4.6. Immunfluoreszenzmikroskopie mit *M. pneumoniae* WT und *glpD::tn*-Mutante**

In der linken Spalte sind jeweils die Lichtmikroskopieausschnitte gezeigt. In der rechten Spalte sind die gleichen Ausschnitte zu sehen. Hier wurde der Laser eingeschaltet, um das FITC des sekundären

Antikörpers anzuregen, damit dieses mit in Grün fluoresziert. In der oberen Spalte sind die Ergebnisse des Wildtyps und in der unteren Spalte sind die Ergebnisse der *glpD::tn*-Mutante dargestellt. Die Pfeile zeigen auf Mykoplasmen.

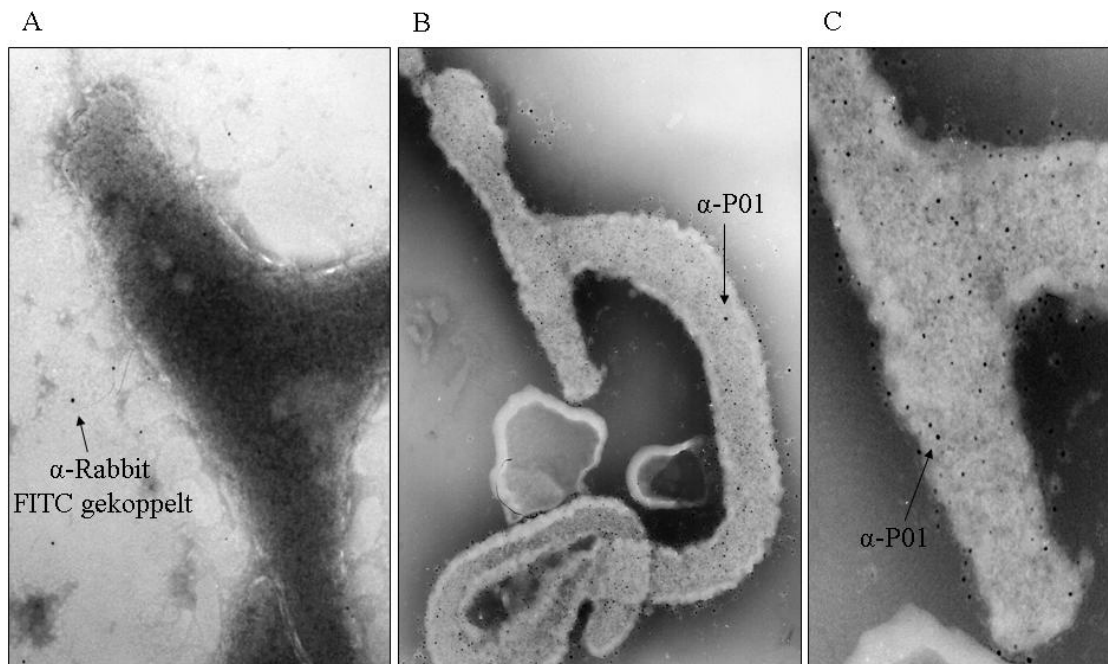
Die Ergebnisse des Western Blots zeigen, dass die GlpO von *M. pneumoniae* sowohl im Cytoplasma als auch an der Membran vorhanden ist. Daraus kann man schließen, dass die GlpO von *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC zwar die gleiche Funktion hat jedoch andere Eigenschaften besitzt, da man dieses Enzym nur in der Membran detektieren kann (Pilo *et al.*, 2005).

Die GlpO von *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC produziert während ihrer katabolen Funktion Wasserstoffperoxid und ist somit ein primärer Pathogenitätsfaktor (Pilo *et al.*, 2005). In Kapitel 4.1.7. wird näher auf die Wasserstoffperoxidproduktion von *M. pneumoniae* eingegangen. Im Gegensatz zu *M. mycoides* besitzt *M. pneumoniae* die so genannte Tip-Struktur, welche diesen Bakterien eine flaschenartige Form verleiht. Mit dieser Struktur, welche aus vielen Adhäsionsproteinen besteht, steht *M. pneumoniae* in Kontakt mit der eukaryotischen Wirtszelle und kann sich an diesen festsetzen (Wilson und Collier, 1976). Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie sollte der Frage nachgegangen werden, ob die GlpO an dieser Tip-Struktur lokalisiert ist und somit das Wasserstoffperoxid direkt an die Wirtszelle abgeben kann.

Bevor mit diesem Versuch begonnen werden konnte, wurden erstmal Kontrollen durchgeführt. Diese sind in Abb. 4.7. aufgeführt. In der Elektronenmikroskopie werden jeweils zwei Antikörper verwendet, ein spezifischer primärer Antikörper für das Protein und ein sekundärer Antikörper, an den ein 5 nm großer Goldpartikel gekoppelt ist.

Als Negativkontrolle (Abb. 4.7.A) wurde nur der sekundäre Antikörper ( $\alpha$ -Rabbit IgG 5 nm Gold) eingesetzt, um zu sehen, ob dieser unspezifisch an die Mykoplasmen binden kann. Die Antikörper sind nur vereinzelt in der Umgebung der Zelle zu erkennen und binden somit nicht unspezifisch an diese.

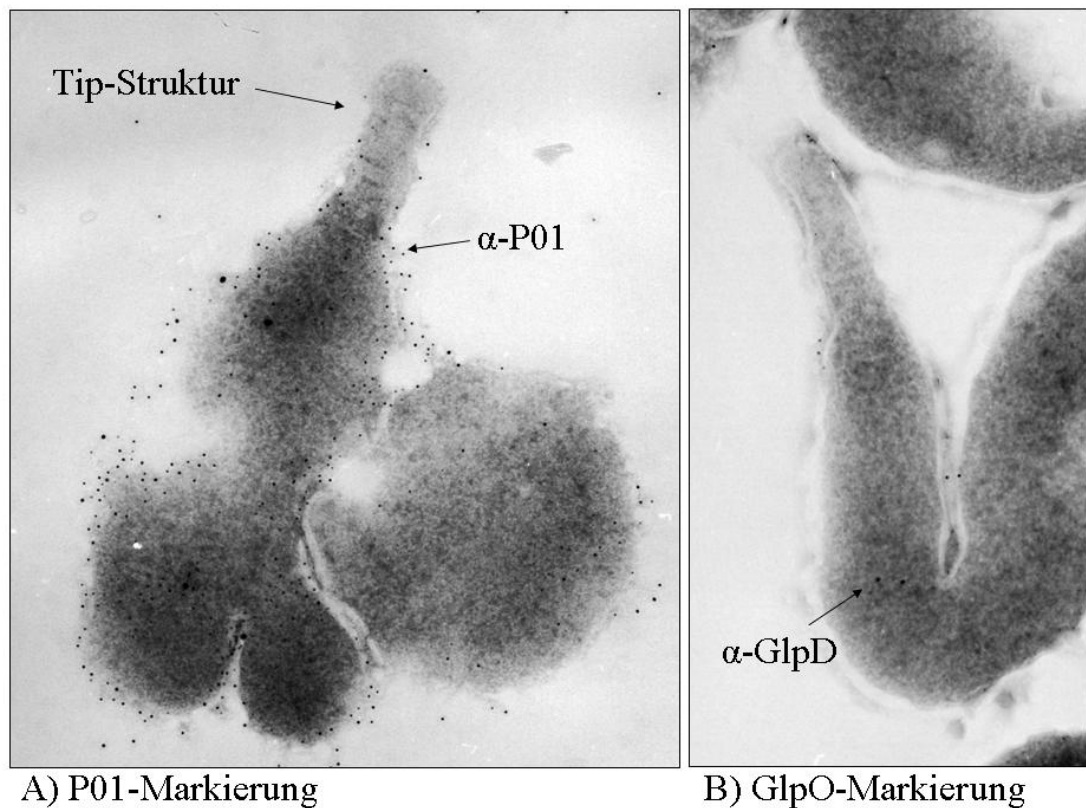
Anschließend wurde Positivkontrolle mit dem  $\alpha$ -P01-Antikörper durchgeführt. P01 ist ein Oberflächenprotein, welches stark exprimiert wird. In den Abbildungen B) und C) ist zu erkennen, dass der Antikörper das Protein spezifisch erkennt und auf der ganzen Zelloberfläche vorhanden ist. Die Abbildung C) ist ein vergrößerter Ausschnitt der Abbildung B), damit man die Goldpartikel besser sehen kann. Da die Negativ- und die Positivkontrollen die erwarteten Ergebnisse geliefert hatten, konnte nun mit der GlpO-Markierung begonnen werden.



**Abb. 4.7. Elektronenmikroskopiebilder von *M. pneumoniae* mit A) der Negativkontrolle und B), C) der Positivkontrolle**

In der Abbildung A), der Negativkontrolle, wurden die Mykoplasmen nur mit den sekundären  $\alpha$ -Rabbit 5 nm Gold gekoppelten Antikörpern inkubiert. Ein ungebundener Antikörper wurde mit einem Pfeil markiert. Die Positivkontrollen sind in den Abbildungen B) und C) dargestellt. Hier wurden  $\alpha$ -P01-Antikörper verwendet, welche ein prominentes Oberflächenprotein erkennen. Die spezifisch gebundenen Antikörper wurden mit einem Pfeil markiert. Die Abbildung C) zeigt noch mal einen vergrößerten Ausschnitt aus der Abbildung B).

In der Abbildung 4.8. ist das Ergebnis der GlpO-Markierung zu sehen. Zum Vergleich wurde noch mal die Positivkontrolle mit dem  $\alpha$ -P01-Antikörper durchgeführt (Abb. 4.8. A). Auf diesem Bild kann man die Tip-Struktur sehr gut erkennen. Der  $\alpha$ -P01-Antikörper ist wie erwartet über der ganzen Zelle verteilt. Die Markierung der Glycerol-3-phosphat-Oxidase ist in der Abbildung 4.8. B zu sehen.



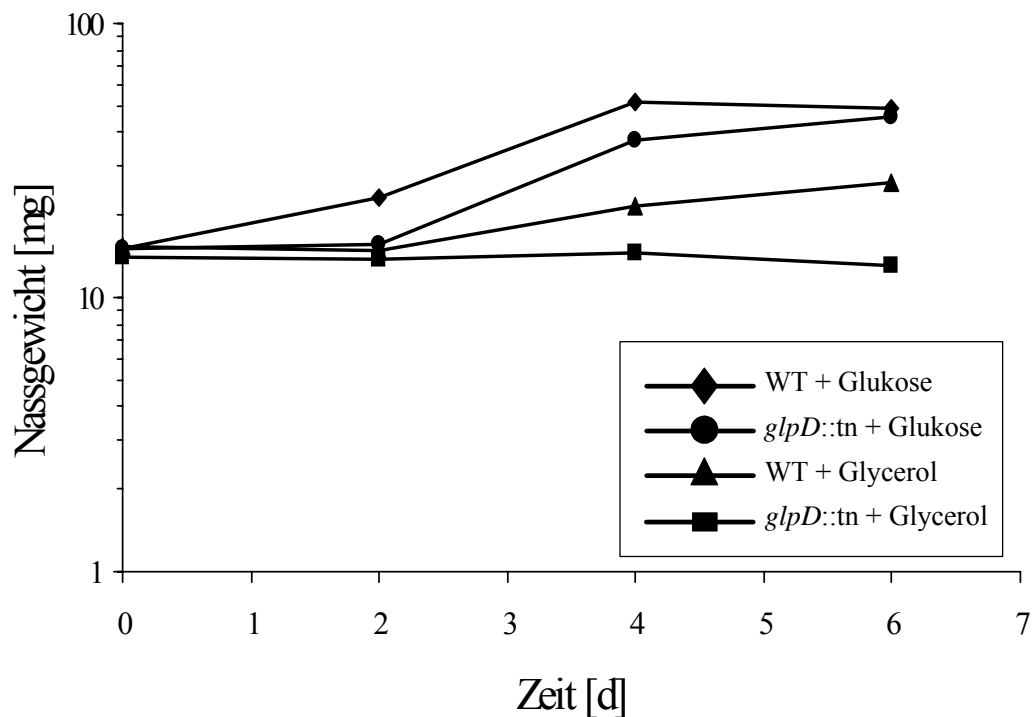
**Abb. 4.8. Die Abbildungen A) und B) stellen die P01-Markierung, die Positivkontrolle, und die GlpO-Markierung dar.**

In der Abbildung A) wurden die Zellen mit einem  $\alpha$ -P01-Antikörper (Positivkontrolle) markiert. Zum einen wurde die Tipstruktur, zum anderen ein gebundener  $\alpha$ -P01-Antikörper, welcher von einem 5 nm Gold gekoppelten sekundären Antikörper erkannt wurde, mit einem Pfeil hervorgehoben. In der Abbildung B) wurden die Zellen mit einem  $\alpha$ -GlpD-Antikörper inkubiert und der Pfeil zeigt auf einen gebundenen Antikörper, an dem ein 5 nm Gold gekoppelter sekundärer Antikörper hängt.

Man erkennt nur sehr wenig gebundene Goldpartikel, was darauf hindeutet, dass nur wenig Enzym an der Oberfläche zu finden ist. Dieses Ergebnis stimmt mit der Western Blot Untersuchung überein, wo auch nur wenig Protein in der Membranfraktion detektiert werden konnte. Offensichtlich befindet sich der Großteil der GlpO im Cytoplasma. Die Proteine, die sich in der Membran befinden, sind über die ganze Zelle verteilt. Die Hypothese, dass die Glycerol-3-phosphat-Oxidase an der Tipstruktur konzentriert ist, konnte nicht bestätigt werden.

#### 4.1.6 Wachstumsversuche mit der *glpD::tn*-Mutante GPM52

Die Isolierung einer *glpD::tn*-Mutante aus einer Transposon-Bank war erfolgreich. Die Transposonmutanten wurden auf MP-Platten mit Glukose und Gentamycin selektiert. Dies zeigt, dass GlpO unter diesen Bedingungen nicht essentiell ist. Die *glpD::tn*-Mutante sollte auf ihr Wachstumsverhalten bei Anwesenheit verschiedener Kohlenstoffquellen untersucht werden. Hierzu wurde die Mutante in Gegenwart von Glukose und Glycerol angezogen.



**Abb. 4.9. Wachstumskurve des Wildtyps und der *glpD::tn*-Mutante bei Anwesenheit von Glukose und Glycerol**

Der Wildtyp und die *glpD::tn*-Mutante wurden mit 1% Glukose oder 1% Glycerol angezogen. Nach 2, 4 und 6 Tagen wurden die Zellen einer 100 ml Kulturflasche abgeschabt und das Nassgewicht bestimmt. Das Nassgewicht in mg wurde gegen die Zeit in Tagen aufgetragen.

Die Ergebnisse der Wachstumskurve sind in der Abbildung 4.9. dargestellt. In Anwesenheit von Glukose wachsen der Wildtyp und die *glpD::tn*-Mutante gleich gut und erreichen die größte Zellmasse. Wie bereits beschrieben wurde, stellt Glukose die beste verwertbare Kohlenstoffquelle dar (Halbedel *et al.*, 2004). Bei der Zugabe von Glycerol in das Medium wächst der Wildtyp nur noch halb so schnell wie bei der Zugabe von Glukose. Glycerol kann im Gegensatz zur Glukose, die aktiv über das PTS

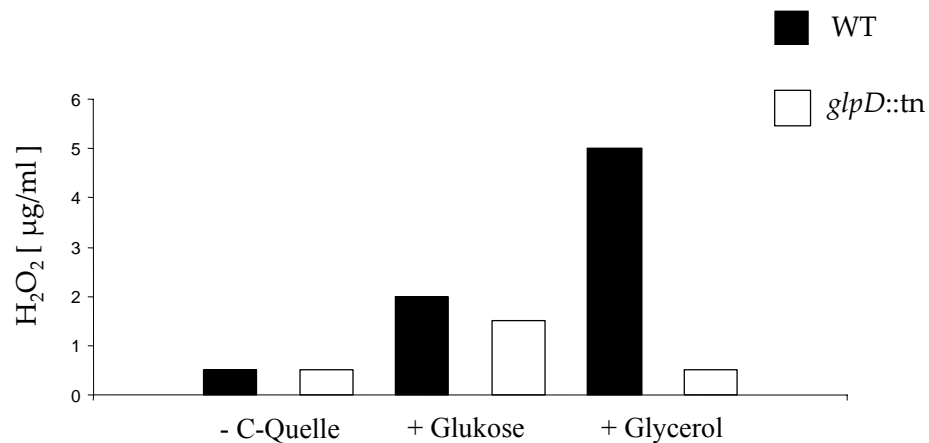
aufgenommen wird, nur durch erleichterte Diffusion in die Zelle gelangen. Dies erklärt, wieso die Zellen mit Glycerol langsamer wachsen. Die *glpD::tn*-Mutante kann mit Glycerol als C-Quelle nicht mehr wachsen. In Abbildung 4.9. kann man sehen, dass das Nassgewicht sich nach dem Animpfen nicht mehr verändert. Dies zeigt, dass die Transposoninsertion die Funktion der Glycerol-3-phosphat-Oxidase unterbindet. Das Glycerol, welches durch die Glycerol-Kinase zu Glycerol-3-phosphat umgesetzt wird, kann von der GlpO nicht mehr zu Dihydroxyacetonphosphat umgewandelt werden. Somit kann dieses nicht in die Glykolyse weitergeleitet werden, um ATP zu gewinnen.

#### 4.1.7 Untersuchung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in *M. pneumoniae*

In *M. mycoides* konnte ein Zusammenhang zwischen dem Glycerolstoffwechsel und der Wasserstoffperoxid-Produktion hergestellt werden (Vilei und Frey, 2001). Der hochvirulente *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC Stamm Afadé ist in der Lage, bis zu 6,5 µg/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> freizusetzen und somit auch die Wirtszellen zu schädigen (Vilei und Frey, 2001; Pilo *et al.*, 2005). Des Weiteren konnte man die Glycerol-3-phosphat-Oxidase als Wasserstoffperoxid produzierendes Enzym identifizieren.

Es sollte nun in *M. pneumoniae* überprüft werden, ob die Glycerol-3-phosphat-Oxidase ebenfalls in der Lage ist, Wasserstoffperoxid frei zu setzen. Hierzu wurde die freigesetzte Menge an Wasserstoffperoxid mit Hilfe von Indikatorstäben in Kulturen gemessen, denen man Glukose oder Glycerol zugesetzt hatte. Zur Kontrolle wurde einer Kultur keine Kohlenstoffquelle zugegeben. Die Versuche wurden mit dem Wildtyp und dem Stamm GPM52 (*glpD::tn*) durchgeführt.

Die Ergebnisse der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Messungen sind in Abbildung 4.10. dargestellt. Ohne C-Quelle werden nur 0,5 µg/ml Wasserstoffperoxid von den beiden Stämmen freigesetzt. Die Zugabe von 100 µM Glukose zu den Zellen bewirkt einen Anstieg der Wasserstoffperoxidmenge auf 1,5-2 µg/ml. Dieses wird wahrscheinlich von der NADH<sub>2</sub>-Oxidase freigesetzt, wenn NADH<sub>2</sub> zu NAD<sup>+</sup> umgesetzt wird (Low und Zimkus, 1973). In Kapitel 4.1.9. wird näher auf dieses Enzym eingegangen.



**Abb. 4.10. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bestimmung beim Wildtyp und der *glpD::tn*-Mutante bei Anwesenheit verschiedener C-Quellen**

Die schwarzen Balken stellen die Wasserstoffperoxidmenge in µg/ml da, welche vom Wildtyp freigesetzt wird. Die weißen Balken stellen die freigesetzte Wasserstoffperoxidmenge der *glpD::tn*-Mutante da. Links wurde den Zellen keine Kohlenstoffquelle, in der Mitte 100 µM Glukose und rechts 100 µM Glycerol zugesetzt.

Die Zugabe von 100 µM Glycerol zu den Wildtyp-Zellen bewirkt einen hohen Anstieg des Wasserstoffperoxids. Hier konnten 5 µg/ml gemessen werden. Dieser Wert kommt sehr nah an die 6,5 µg/ml des hochvirulenten *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC Afadé Stamms heran.

Der Stamm GPM52 kann nach der Zugabe von Glycerol nur noch sehr wenig H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzieren. Der Wert ist mit der Kontrolle ohne Kohlenstoffquelle zu vergleichen und liegt bei 0,5 µg/ml. Der Versuch zeigt, dass das Transposon die Funktion der Glycerol-3-phosphat-Oxidase unterbindet. Des Weiteren konnte bewiesen werden, dass die Glycerol-3-phosphat-Oxidase in Anwesenheit von Glycerol für die hohe Wasserstoffperoxidfreisetzung in den Überstand zuständig ist. Der Glycerolstoffwechsel scheint demnach auch in *M. pneumoniae* eng mit der Produktion eines Virulenzfaktors zusammen zu hängen.

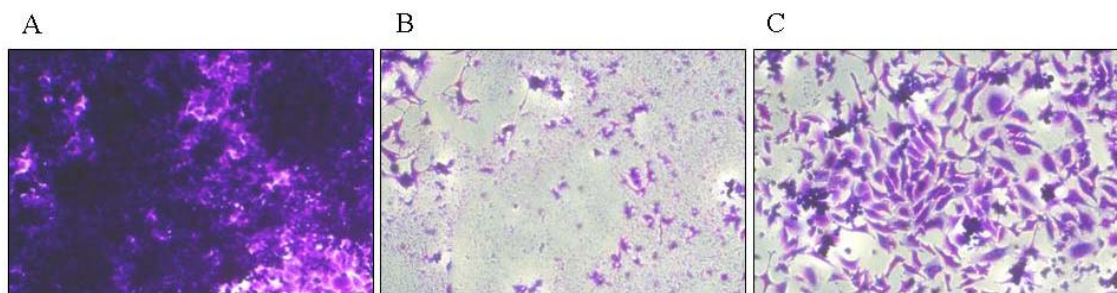
#### 4.1.8 Zytotoxizität der *glpD::tn*-Mutante gegenüber HeLa-Zellen

Bei *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC wird die Zytotoxizität herabgesetzt, wenn man mit α-GlpO-Antikörpern die Funktion dieses Enzyms inhibiert (Pilo *et al.*, 2005). Mit Hilfe



von HeLa-Zellkulturen sollte untersucht werden, ob die Transposoninsertion im *glpD*-Gen von *M. pneumoniae* ebenfalls einen Einfluss auf die Zytotoxizität hat.

Die HeLa-Zellen ( $2,5 \times 10^4$ ) wurden mit 1 000 000 Mykoplasmen pro HeLa-Zelle inkubiert beziehungsweise infiziert und das Wachstum der HeLa-Zellen wurde über mehrere Tage verfolgt. Die HeLa-Zellen wurden mit einer Kristallviolettlösung fixiert und angefärbt. Anschließend konnte man diese mittels eines inversen Mikroskops fotografieren.



**Abb. 4.11. Zytotoxizität von *M. pneumoniae* gegenüber HeLa-Zellen: A) HeLa-Zellen ohne *M. pneumoniae*; B) HeLa-Zellen mit Wildtyp *M. pneumoniae*; C) HeLa-Zellen mit *glpD*::tn-Mutante**

Die HeLa-Zellen wurden am Tag 6 nach der Infektion mit Mykoplasmen mit Kristallviolett angefärbt und fotografiert. In Abbildung A) wurden die Zellen zur Kontrolle ohne Mykoplasmen inkubiert. In Abbildung B) wurden die Zellen mit Wildtyp *M. pneumoniae* inkubiert und in Abbildung C) wurde die *glpD*::tn-Mutante von *M. pneumoniae* hinzugegeben.

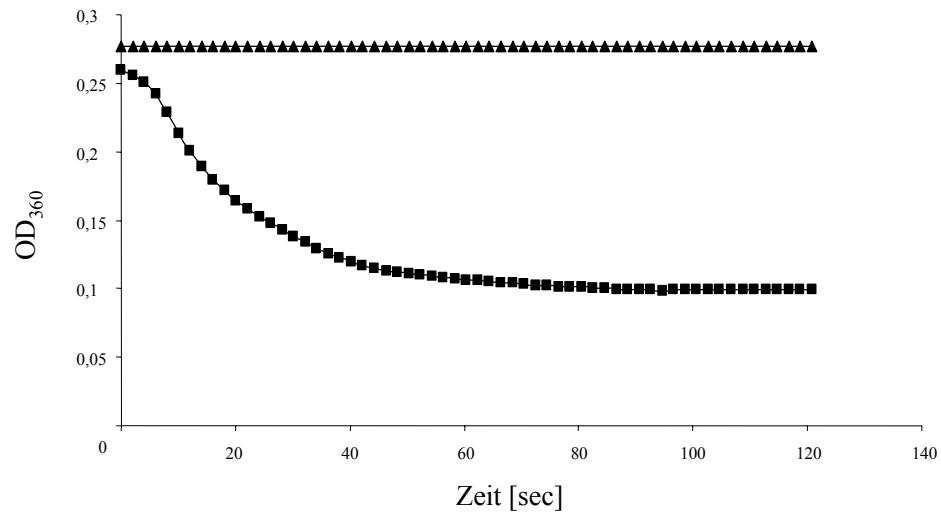
In der Abbildung 4.11. sind die HeLa-Zellen am Tag 6 nach der Infektion dargestellt. Die Positivkontrolle, das heißt HeLa-Zellen die ohne Mykoplasmen inkubiert wurden, wachsen wie erwartet sehr gut und zu einem dichten Rasen an (Abb. 4.11. A). Die Inkubation der Zellen mit Wildtyp *M. pneumoniae* bewirkt ein massives Absterben der Wirtszellen (Abb. 4.11. B). Es gibt keine lebenden HeLa-Zellen mehr und es werden nur noch Zellüberreste angefärbt. Dies zeigt, dass die Anwesenheit von Mykoplasmen einen zytotoxischen Effekt auf die eukaryotischen Wirtszellen hat. Die Zytotoxizität gegenüber den HeLa-Zellen nimmt jedoch ab, wenn man diese zusammen mit der *glpD*::tn-Mutante inkubiert (Abb. 4.11. C). Diese Mutante ist, wie bereits erwähnt, nicht mehr in der Lage, in Anwesenheit von Glycerol Wasserstoffperoxid freizusetzen. Dies bedeutet, dass einer der primären Virulenzfaktoren, die Glycerol-3-phosphat-Oxidase, nicht mehr aktiv ist und somit den HeLa-Zellen weniger Schaden zugefügt werden kann. Obwohl die Zytotoxizität des GPM52 herabgesetzt ist, wachsen

die HeLa-Zellen nicht so dicht wie bei der Positivkontrolle. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass noch andere Virulenzfaktoren für die Zytotoxizität der Mykoplasmen zuständig sind.

#### 4.1.9 Ist die NADH/H<sup>+</sup>-Oxidase in der Lage Wasserstoffperoxid freizusetzen?

Die Messungen des freigesetzten Wasserstoffperoxids bei der Zugabe von Glukose zu dem Wildtyp und der *glpD::tn*-Mutante in Kapitel 4.1.7 haben gezeigt, dass noch ein anderes Enzym an in der Lage sein muss, geringe Mengen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu produzieren. Als möglicher Kandidat kam die NADH/H<sup>+</sup>-Oxidase in Frage, die für die Regeneration von NAD<sup>+</sup> zuständig ist und dabei eventuell Wasserstoffperoxid freisetzen kann. Hierzu wurde das Gen *nox* mit den Primern CH54 und CH58 aus der chromosomalen DNA amplifiziert. Mit Hilfe der MMR wurden die drei internen UGA-Codons mit den Primern CH55, CH56 und CH57 in UGG-Codons mutiert, um eine vollständige Translation des Proteins in *E. coli* DH5 $\alpha$  zu gewährleisten. Das mutierte PCR-Fragment wurde mit den Schnittstellen *SalI* und *HindIII* in den IPTG-induzierbaren Überexpressionsvektor pWH844 kloniert, welcher dem rekombinanten Protein einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag verleiht. Das Protein Nox konnte schließlich über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Säule aufgereinigt werden und für einen Enzymassay eingesetzt werden. Dieser sollte zeigen, ob das rekombinante Nox enzymatisch aktiv ist.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität NADH<sub>2</sub>-Oxidase wurde die Methode von Hummel und Riebel (2003) verwendet. Hierbei wird der Umsatz von NADH<sub>2</sub> zu NAD<sup>+</sup> durch die NADH<sub>2</sub>-Oxidase gemessen. Die Abnahme der Absorption bei der Bildung von NAD<sup>+</sup> kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 360 nm bestimmt werden. In einer Küvette wurden 0,1 mM NADH<sub>2</sub> und 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH7,5 gemischt und der Enzymassay durch die Zugabe von 5  $\mu$ g NADH<sub>2</sub>-Oxidase in einem Endvolumen von 1000  $\mu$ l gestartet. Anschließend wurde die Absorptionsänderung für 2 min bei 360 nm gemessen (Abb. 4.12.).



**Abb. 4.12. Graphische Darstellung der photometrischen Bestimmung der Enzymaktivität der NADH<sub>2</sub>-Oxidase**

Die Absorptionsänderung bei einer Wellenlänge von 360 nm wurde über 2 Minuten verfolgt. Der Enzymassay wurde durch die Zugabe von 5 µg NADH<sub>2</sub>-Oxidase zu 0,1 mM NADH<sub>2</sub> und 100 mM Kalium-Phosphat-Puffer pH7,5 gestartet (■). Als Negativkontrolle wurde kein Enzym zu dem Assay hinzugegeben (▲).

Mit Hilfe der Absorptionsänderung konnte die spezifische Aktivität 4,7 U/mg des Enzyms Nox bestimmt werden. Der Enzymassay hat gezeigt, dass das rekombinante Protein aktiv ist. Es sollte nun, wie auch schon für die GlpO, gezeigt werden, dass die NADH<sub>2</sub>-Oxidase ebenfalls in der Lage ist, in Anwesenheit von Glukose Wasserstoffperoxid freizusetzen.

Hierzu wurde wieder der gleiche Assay verwendet wie bereits in Kapitel 4.1.3. beschrieben. Die NADH<sub>2</sub>-Oxidase wurde für eine Stunde bei 37°C mit dem Substrat NADH<sub>2</sub> inkubiert und die Messung erfolgte nach der Zugabe der Meerrettich-Peroxidase und des Chromogens o-Dianisidin. Es konnte jedoch keine Absorptionsänderung gemessen werden, was bedeutet, dass unter diesen Bedingungen kein Wasserstoffperoxid entstanden ist. Dies könnte daran liegen, dass die Nox nicht wie erwartet Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid sondern zu Wasser reduziert. Man kann jedoch das Wasser, welches bei der Reduktion von Sauerstoff entsteht, nicht im Assay nachweisen. Da das Enzym Nox unter den oben genannten Bedingungen enzymatisch aktiv ist, kann eigentlich ausgeschlossen werden, dass der Assay zum Nachweis von Wasserstoffperoxid unter diesen Bedingungen nicht funktioniert.

Folglich kann die gemessene Menge Wasserstoffperoxid nach der Zugabe von Glukose eventuell von einem anderen, bisher nicht charakterisierten Enzym freigesetzt werden.

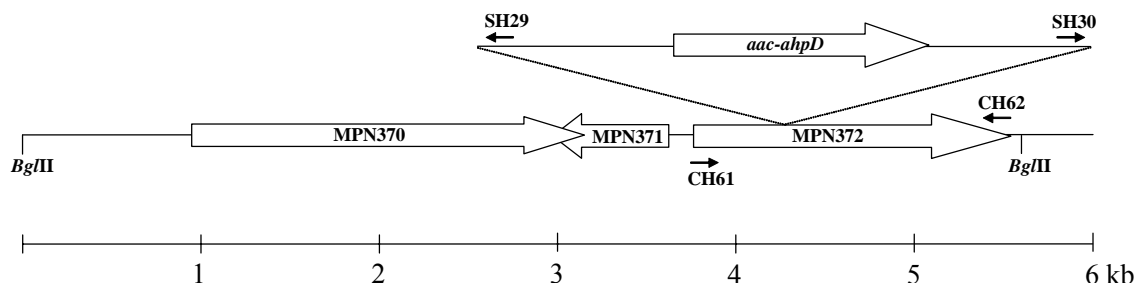
Um die Frage zu klären, ob *Nox* aus *M. pneumoniae* für die Wasserstoffperoxidproduktion in Anwesenheit von Glukose zuständig ist, sollte eine Mutante isoliert werden. Hierzu wurde die Transposonmutantenbank (Halbedel *et al.*, 2006) mit spezifischen Primern für *nox* gescreent (Halbedel, Doktorarbeit). Es konnte jedoch keine Transposoninsertion in diesem Gen gefunden werden, was darauf hindeutet, dass dieses Gen in *M. pneumoniae* essentiell ist.

## 4.2 Untersuchung der Zytotoxizität von verschiedenen Transposonmutanten von *M. pneumoniae*

### 4.2.1 Isolierung der *mpn372::tn*-Mutante

Das Gen *mpn372* kodiert für ein ADP-ribosylierendes und vakuolisierendes Zytotoxin (Kannan und Baseman, 2006). Es konnte gezeigt werden, dass das rekombinante Protein einen zytotoxischen Effekt auf CHO-Zellen (Zellen aus den Ovarien chinesischer Hamster) und das Trachealepithelium von Pavianen hat.

Es sollte nun untersucht werden, ob bei einer *mpn372::tn*-Mutante der zytotoxische Effekt gegenüber HeLa-Zellen verloren geht. Hierzu musste erstmal die Mutante aus der Transposonbank isoliert werden. Die Primer CH61/SH29 und CH62/SH30 wurden zum Screening der Transposonbank mittels PCR verwendet. Es konnte eine Mutante isoliert werden, welche ein Transposon an der Position 522 bp integriert hat. Die schematische Darstellung der Transposoninsertion ist in Abb. 4.13. dargestellt.

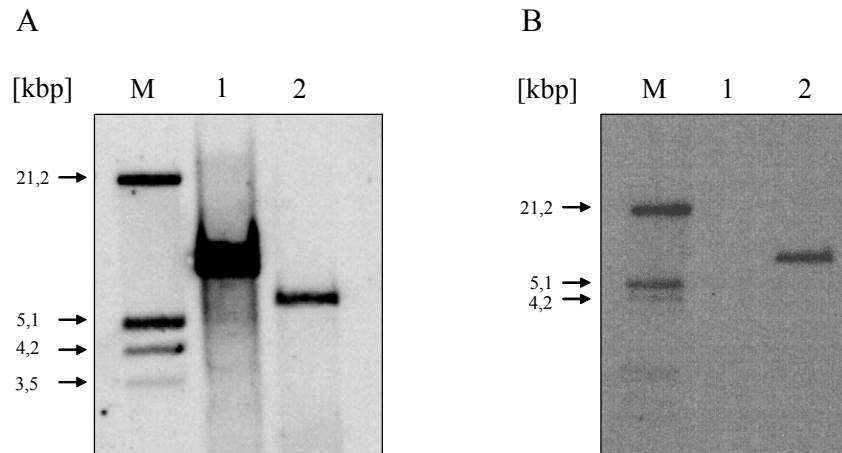


**Abb. 4.13. Schematische Darstellung der Transposoninsertion in *mpn372* im genetischen Hintergrund**

Die Darstellung der Transposoninsertion ist maßstabsgetreu. Die für das Screening verwendeten Primer sind abgebildet sowie die Restriktionsstellen für das Enzym *BglII*, welche für den Verdau der chromosomalen DNA für den Southern Blot verwendet wurden.

Nach der Isolierung der Mutante musste überprüft werden, ob es sich um eine reine Kultur handelt und ob das Transposon nur einmal im Genom vorhanden ist. Dazu musste die chromosomale DNA nach geeigneten Schnittstellen durchsucht werden, um beim Southern Blot einen Unterschied zwischen WT und Mutante feststellen zu können. Das Restriktionsenzym *BglII* wurde für den Verdau der DNA eingesetzt (Abb. 4.13.).

Beim Southern Blot wurden zwei unterschiedliche Sonden verwendet, zum einen eine Sonde gegen die Gentamycin-Kassette, zum anderen eine Sonde gegen *mpn372*. Das Ergebnis des Southern Blots ist in der Abbildung 4.14. dargestellt.



**Abb. 4.14. Southern Blot mit einer Sonde gegen *mpn372* (A) und gegen die Gentamycin-Kassette (B)**

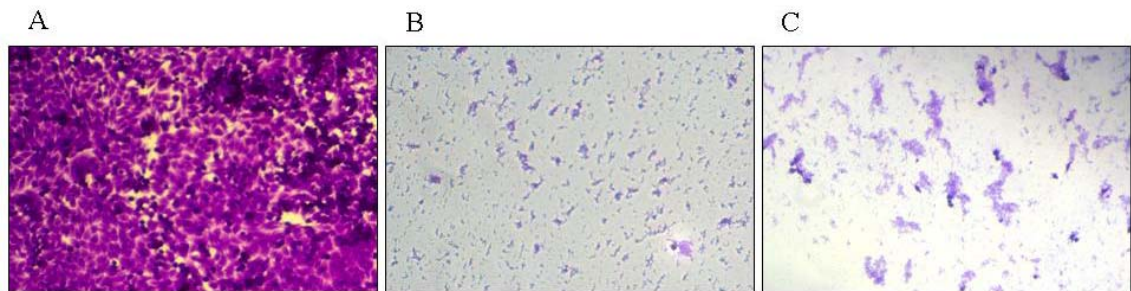
In der Abb. A wurde in Spur 1 die *Bgl*II-geschnittene chrom. DNA der Mutante und in Spur 2 des Wildtyps aufgetragen. Hier wurde die Sonde gegen *mpn372* verwendet. Das detektierte Fragment in der Mutante ist durch die Integration des Transposons um 3,5 kb größer als das Fragment des Wildtyps. In der Abb. B wurde in Spur 1 die *Bgl*II-geschnittene chrom. DNA des Wildtyps und in Spur 2 der Mutante aufgetragen. Es wurde eine Sonde gegen die Gentamycin-Kassette verwendet. In Spur 1 konnte kein Signal detektiert werden und in Spur 2 wurde nur eine Bande sichtbar.

Mit der *mpn372*-Sonde konnte gezeigt werden, dass die Integration des Transposons in das Gen *mpn372* erfolgreich war. Sie bewirkt einen Bandenshift im Southern Blot, da sich durch das Transposon die Größe des DNA-Fragmentes um ungefähr 3,5 kb verändert (Abb. 4.14. A Spur 1). Außerdem konnte mit der Sonde gegen die Gentamycin-Kassette gezeigt werden, dass das Transposon nur einmal in das Genom integriert wurde (Abb. 4.14. B Spur 2). Die *mpn372::tn*-Mutante erhielt die Bezeichnung GPM8.

#### 4.2.2 Zytotoxischer Effekt der *mpn372::tn*-Mutante (GPM8)

Nach der erfolgreichen Isolierung einer Mutante, welche das Gen *mpn372* nicht mehr vollständig exprimieren kann, konnte nun der zytotoxische Effekt auf HeLa-Zellen untersucht werden.

Zuerst wurden die HeLa-Zellen mit  $2,5 \times 10^4$  Zellen pro Well in eine 24-Well-Platte in 700  $\mu$ l DMEM-Medium pipettiert. Die Platte wurde dann für 24 Stunden in dem CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Mykoplasmen (WT und GPM8) geerntet und durch Waschen mit einem Puffer von dem MP-Medium befreit. Anschließend wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt. Die HeLa-Zellen wurden dann mit 0,1 OD-Einheiten infiziert. Nach zwei Stunden Inkubation wurde der Überstand aus den Wells entnommen und somit auch alle Mykoplasmen, die sich nicht angehaftet haben. Den Zellen wurde daraufhin frisches DMEM-Medium zugegeben und für maximal sieben Tage im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C inkubiert. Ab dem zweiten Tag nach der Infektion wurden die HeLa-Zellen jeweils eines Wells mit Kristallviolett fixiert und unter einem Mikroskop fotografiert. Zu jeder Versuchsreihe wurden als Kontrolle nicht infizierte sowie mit dem *M. pneumoniae* Wildtyp infizierte HeLa-Zellen mitgeführt.



**Abb. 4.15. Zytotoxizität von *M. pneumoniae* gegenüber HeLa-Zellen: A) HeLa-Zellen ohne *M. pneumoniae*; B) HeLa-Zellen mit Wildtyp *M. pneumoniae*; C) HeLa-Zellen mit der *mpn372::tn*-Mutante**

In der Abb. 4.15. sind die fixierten Zellen nach 6 Tagen Inkubation mit den Mykoplasmen zu sehen. Es wird deutlich, dass der zytotoxische Effekt gegenüber dem Wildtyp nicht vermindert ist. Die HeLa-Zellen sind sowohl bei Anwesenheit des Wildtyps als auch bei Anwesenheit der Mutante GPM8 vollständig lysiert (Abb. 4.15. B

und C). Man sieht nur noch vereinzelt Zelltrümmer. Die Kontrolle hingegen ist wie erwartet zu einem dichten Zellrasen gewachsen (Abb. 4.15. A).

Dieser Versuch lieferte nicht das erwartete Ergebnis. Die Unterbrechung des Gens *mpn372* ab der Base 522 führt zu keinem verminderten zytotoxischen Effekt der Mutante GPM8 gegenüber den HeLa-Zellen. Es könnte demnach sein, dass die ersten 500 Basen des Proteins vor dem Transposon ausreichen, um die Funktionalität beziehungsweise die Zytotoxizität zu gewährleisten.

Es besteht auch die Möglichkeit, dass es ein weiteres Cytotoxin gibt oder der Effekt des Wasserstoffperoxids zu stark ist und daher kaum ein Unterschied zu dem Wildtyp festzustellen ist.

#### 4.2.3 Zytotoxischer Effekt der *mpn474::tn*-Mutante (GPM70) und der *ldh::tn*-Mutante (GPM69)

Da die Mutanten des Gens *mpn474* und der Laktatdehydrogenase zur Verfügung standen, sollten sie ebenfalls auf ihre Zytotoxizität untersucht werden.

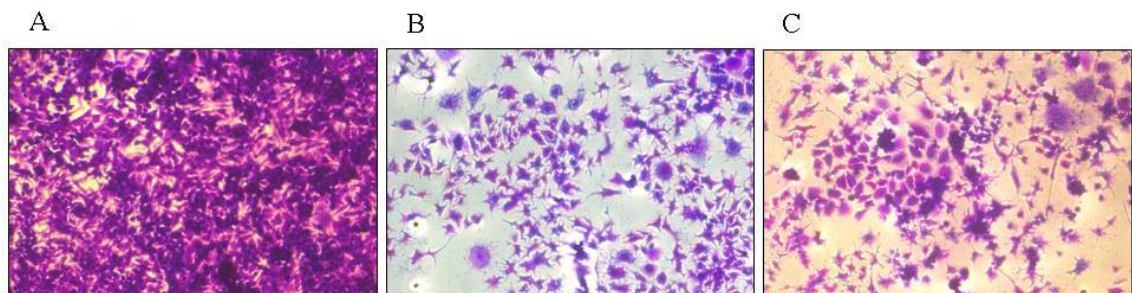


Abb. 4.16. Zytotoxizität von *M. pneumoniae* gegenüber HeLa-Zellen: A) HeLa-Zellen ohne *M. pneumoniae*; B) HeLa-Zellen mit Wildtyp *M. pneumoniae*; C) HeLa-Zellen mit der *mpn474::tn*-Mutante

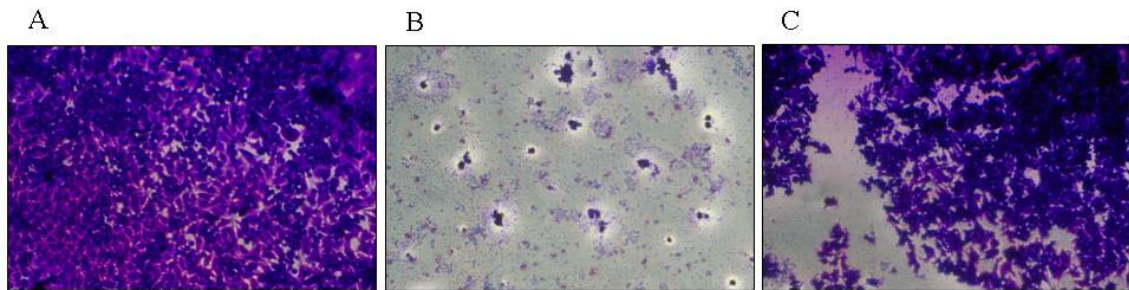
Das Gen *mpn474* kodiert für ein putatives Strukturgen und ist bisher nicht untersucht. Die Abbildung 4.16. zeigt die Ergebnisse des Versuches und man kann feststellen, dass die Transposoninsertion in *mpn474* keinen Einfluss auf die Zytotoxizität hat. Dieser Stamm GPM70 verhält sich genauso wie der Wildtyp.

Dies gibt einen Hinweis darauf, dass das Protein MPN474 nicht notwendig ist, um den Kontakt zwischen der Wirtszelle und den Mykoplasmen herzustellen. Man kann daher nicht voraussagen, welche Rolle MPN474 in *M. pneumoniae* spielt.



Die Laktatdehydrogenase ermöglicht den Mykoplasmen bei Anwesenheit von Glycerol durch die Reduktion von Pyruvat Laktat zu gewinnen und dabei wieder den  $\text{NAD}^+$ -Pool für die Glykolyse neu aufzufüllen (Neimark und Lemecke, 1972). In Anwesenheit von Glukose wird das Pyruvat zu Acetat abgebaut, wobei noch zwei weitere ATP-Moleküle gewonnen werden können. In dem Fall wird  $\text{NAD}^+$  durch die  $\text{NADH}_2$ -Oxidase zurück gewonnen.

Es sollte untersucht werden, ob eine Transposoninsertion in *ldh*, einem Stoffwechselgen, einen Einfluss auf die Zytotoxizität hat. In der Abbildung 4.17. sind die Ergebnisse dargestellt.



**Abb. 4.17. Zytotoxizität von *M. pneumoniae* gegenüber HeLa-Zellen: A) HeLa-Zellen ohne *M. pneumoniae*; B) HeLa-Zellen mit Wildtyp *M. pneumoniae*; C) HeLa-Zellen mit der *ldh::tn*-Mutante**

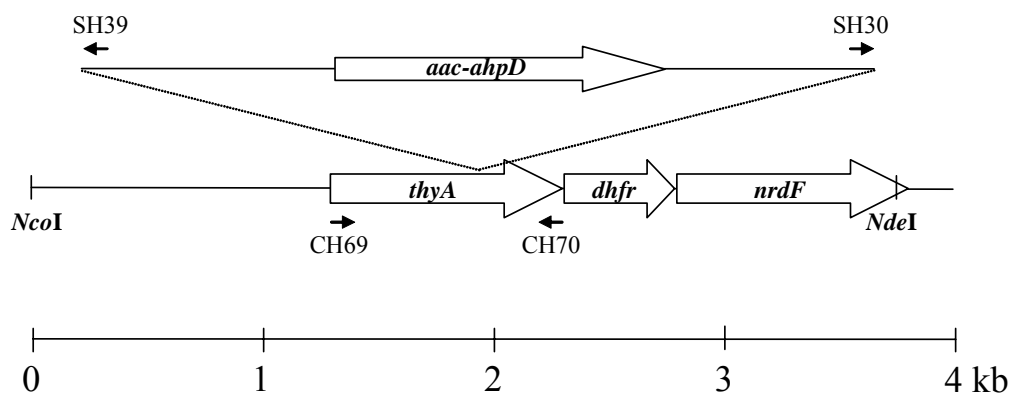
Wenn man die Ergebnisse der Inkubation mit dem Wildtyp und mit der *ldh::tn*-Mutante vergleicht, wird deutlich, dass die Zytotoxizität der Mutante deutlich herabgesetzt ist. Beim Wildtyp sind die HeLa-Zellen abgestorben (Abb. 4.17. B) wohingegen bei Anwesenheit der Mutante die HeLa-Zellen (Abb. 4.17. C) noch ein deutlicher Wachstum zu vermerken ist. Jedoch ist die Zahl der HeLa-Zellen geringer als bei den Kontrollzellen (Abb. 4.17. A).

Die Unterschiede in der Zytotoxizität rühren wahrscheinlich daher, dass die Mutante in ihrem Wachstum beeinträchtigt ist und sich deshalb der Effekt auf die HeLa-Zellen verzögert. Man kann schon erkennen, dass die Lyse der HeLa-Zellen langsam anfängt (Abb. 4.17. C). Es ist eher unwahrscheinlich, dass die Laktatdehydrogenase ein Pathogenitätsfaktor ist oder dass sie eine regulatorische Funktion übernimmt.

#### 4.2.4 Isolierung der *thyA::tn*-Mutante

Bei *M. pneumoniae* fehlen viele Gene für die Nukleotidsynthese. Sie verhalten sich wie Parasiten und erhalten die Nukleotide oder deren Vorstufen von den Wirtszellen beziehungsweise aus dem Medium. Die Desoxythymidin 5'-monophosphat (dTMP) Synthese erfolgt in Bakterien entweder de novo über eine Thymidylatsynthase-abhängige Methylierung von dUMP oder mit Hilfe der Thymidinkinase, welche Thymidinkomponenten aus dem Medium verwendet (Neuhard und Kelln, 1996).

Die Sequenzierung des Genoms von *M. pneumoniae* ermöglichte die Identifizierung einer Thymidylatsynthase *thyA*. Die Transposonmutantenbank wurde nach einer *thyA::tn*-Mutante durchsucht. Hierzu wurden die Primer CH69/SH29 und CH70/SH30 verwendet (Abb. 4.18.).

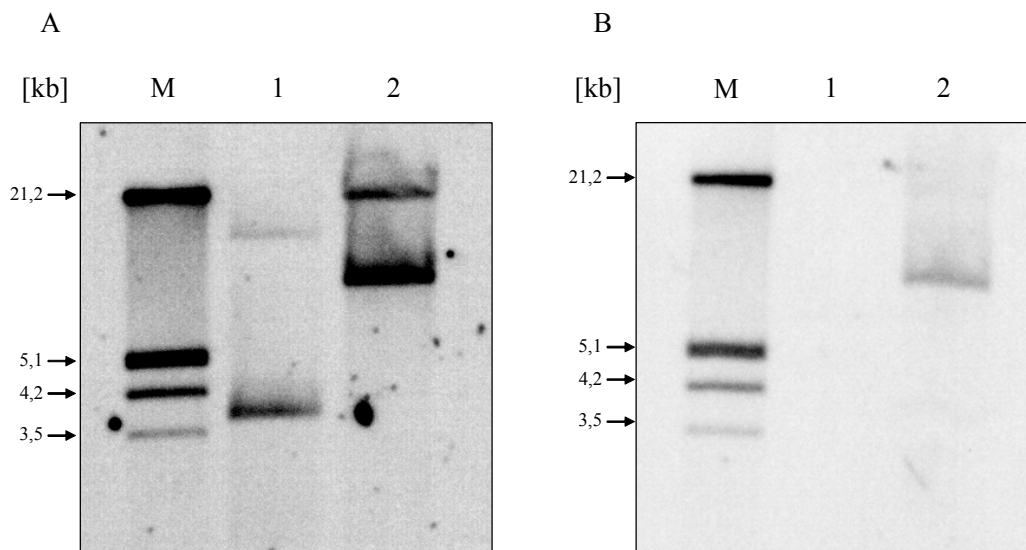


**Abb. 4.18. Schematische Darstellung der Transposoninsertion in *thyA* im genetischen Hintergrund**

Die Darstellung der Transposoninsertion ist maßstabsgetreu. Die für das Screening verwendeten Primer sind abgebildet sowie die Restriktionsstellen für die Enzyme *NcoI* und *NdeI*, welche für den Verdau der chromosomalen DNA für den Southern Blot verwendet wurden.

Nach der erfolgreichen Isolierung der Mutante wurde durch Sequenzierung die Position des Transposons bestimmt. Die Insertion erfolgte an der Base 653. Dies sollte gewährleisten, dass die Funktion der Thymidylatsynthase beeinträchtigt ist.

Anschließend wurde ein Southern Blot durchgeführt mit einer Sonde gegen *thyA* und gegen die Gentamycin-Kassette (*aac-ahpD*). Hierzu wurde die chromosomale DNA mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *NdeI* verdaut (Abb. 4.18.). Der Southern Blot ist in Abbildung 4.19. dargestellt.



**Abb. 4.19. Southern Blot mit einer Sonde gegen *thyA* (A) und gegen die Gentamycin-Kassette (B)**

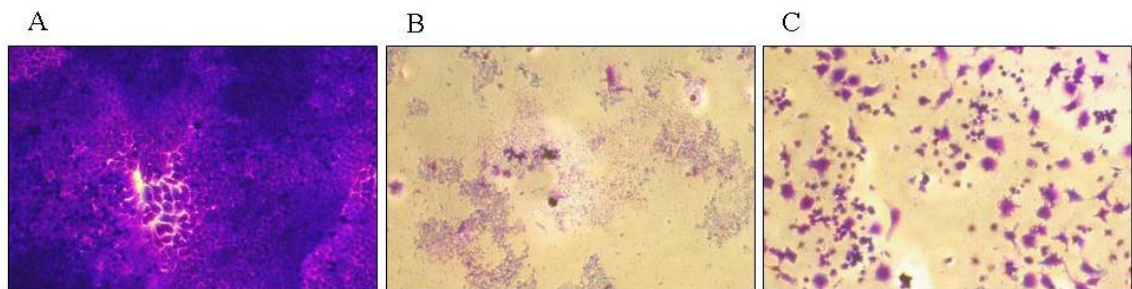
In der Abb. A wurde in Spur 1 die *NcoI-NdeI*-geschnittene chrom. DNA des Wildtyps und in Spur 2 der Mutante aufgetragen. Hier wurde die Sonde gegen MPN372 verwendet. Das detektierte Fragment in der Mutante ist durch die Integration des Transposons um 3,5 kb größer als das Fragment des Wildtyps. In der Abb. B wurde in Spur 1 die *NcoI-NdeI*-geschnittene chrom. DNA des Wildtyps und in Spur 2 der Mutante aufgetragen. Es wurde eine Sonde gegen die Gentamycin-Kassette verwendet. In Spur 1 konnte kein Signal detektiert werden und in Spur 2 wurde nur eine Bande sichtbar.

Mit der *thyA*-Sonde konnte gezeigt werden, dass die Integration des Transposons in das Gen *thyA* erfolgreich war. Sie bewirkt einen Bandenshift im Southern Blot, da sich durch das Transposon die Größe des DNA-Fragmentes um ungefähr 3,5 kb verändert (Abb. 4.19. A Spur 2). Die oberste Bande stellt ungeschnittene DNA dar. Die Bande von etwa 3,9 kb entspricht der erwarteten Größe des Wildtyp-Fragments (Abb. 4.19. A Spur 1). Des Weiteren konnte mit der Sonde gegen die Gentamycin-Kassette gezeigt werden, dass das Transposon nur einmal in das Genom der Mutante integriert wurde (Abb. 4.19. B Spur 2). Mit der chromosomalen DNA des Wildtyps erhält man wie erwartet kein Signal, wenn man die Gentamycin-Sonde verwendet. Die *thyA::tn*-Mutante erhielt die Bezeichnung GPM9.

#### 4.2.5 Zytotoxischer Effekt der *thyA::tn*-Mutante (GPM9)

Die Thymidylatsynthase ist ein wichtiges Enzym für die de novo Synthese des Thymidins (dTMP). Darum sollte untersucht werden, ob eine Mutante, in welcher das Gen *thyA* durch ein Transposon unterbrochen wurde, noch zytotoxisch gegenüber

HeLa-Zellen ist. In der Abbildung 4.20. sind die Ergebnisse dieses Versuches zusammengefasst.



**Abb. 4.20. Zytotoxizität von *M. pneumoniae* gegenüber HeLa-Zellen: A) HeLa-Zellen ohne *M. pneumoniae*; B) HeLa-Zellen mit Wildtyp *M. pneumoniae*; C) HeLa-Zellen mit der *thyA::tn*-Mutante**

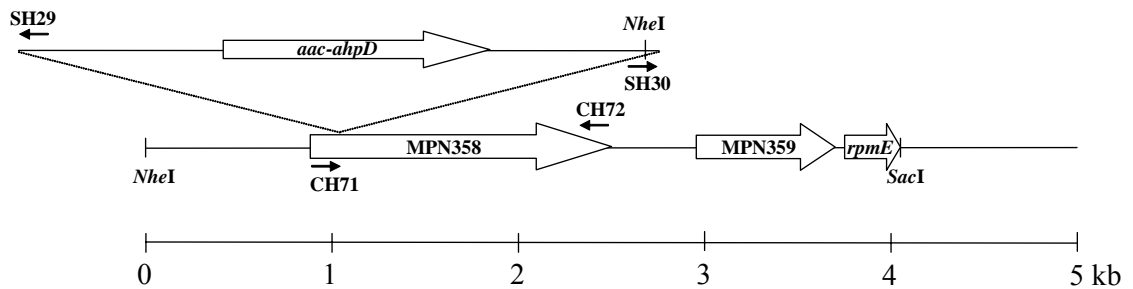
Man kann klar erkennen, dass der Wildtyp von *M. pneumoniae* einen starken zytotoxischen Effekt zeigt, wenn man die Abbildungen 4.20. A und B vergleicht. Die Mutante GPM9 ist ebenfalls nicht in ihrer Zytotoxizität vermindert. Sie verhält sich ebenso wie der Wildtyp. Somit hat die Transposoninsertion in das Gen, welches für die Thymidylatsynthase kodiert, keinen Einfluss auf die Zytotoxizität.

Man hätte eventuell erwarten können, dass diese Mutanten in ihrem Wachstum beeinträchtigt sind, weil nicht mehr so viel dTMP gebildet werden kann. Jedoch haben Wachstumskurven bei Anwesenheit verschiedener C-Quellen im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede gezeigt. Der Stamm GPM9 wächst genauso wie der Wildtyp. Wahrscheinlich kann ein anderes Enzym die Funktion der Thymidylatsynthase übernehmen.

#### 4.2.6 Isolierung der *mpn358::tn*-Mutante

Viele Prokaryoten, vor allem pathogene Organismen, besitzen keine ThyA, aber dafür eine Thymidylat-Synthase (ThyX), die einen völlig anderen Reaktionsmechanismus hat. ThyX ist eine Flavin-abhängige Thymidylatsynthase (Myllykallio *et al.*, 2002). In *Ureaplasma* und in *M. mycoides* konnten bereits Flavin-abhängige Thymidylat-Synthasen identifiziert werden (persönliche Mitteilung, Wang L.). Ein Homolog dieses Enzyms wurde auch in *M. pneumoniae* gefunden, es handelt sich dabei um das Gen *mpn358*.

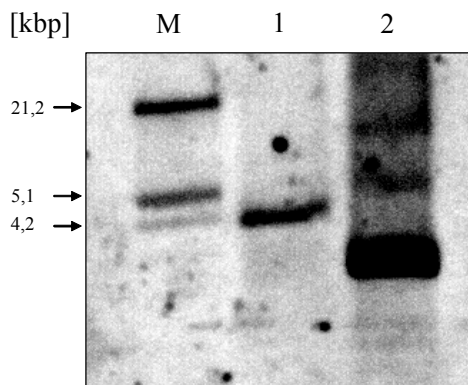
Dieses Gen sollte nun näher untersucht werden und es wurde nach einer Transposonmutante gesucht, welche eine Insertion einer Gentamycinkassette in *mpn358* trägt. Die Suche war auch erfolgreich und die Mutante wurde sequenziert, um den genauen Insertionsort des Transposons herauszufinden. Die Transposoninsertion erfolgte nach 158 Basen (Abb. 4.21.).



**Abb. 4.21. Schematische Darstellung der Transposoninsertion in *mpn358* im genetischen Hintergrund**

Die Darstellung der Transposoninsertion ist maßstabsgetreu. Die für das Screening verwendeten Primer sind abgebildet sowie die Restriktionsstellen für die Enzyme *NheI* und *SacI*, welche für den Verdau der chromosomalen DNA für den Southern Blot verwendet wurden.

Nach der erfolgreichen Isolierung der Mutante erfolgte ein Southern Blot. Hierzu wurde die chromosomale DNA mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *SacI* geschnitten. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit der Sonde gegen *mpn358*.



**Abb. 4.22. Southern Blot mit einer Sonde gegen *mpn358***

In der Spur 1 wurde die *NheI-SacI*-geschnittene chrom. DNA des Wildtyps und in Spur 2 die chrom. DNA der Mutante aufgetragen. Hier wurde die Sonde gegen *mpn358* verwendet. Die Bande in Spur 1 entspricht dem Wildtypfragment von etwa 4 kb. Mit der chromosomalen DNA der Mutante erhält man 3 verschiedene Banden. Die Bande von etwa 7,5 kb welche die DNA zwischen der *NheI*-Schnittstelle vor *mpn358* und der *SacI*-Schnittstelle umfasst. Die mittlere Bande hat eine Größe von 4,4 kb und ist somit

das Fragment zwischen den beiden *NheI*-Schnittstellen. Die unterste Bande hat eine Größe von etwa 3 kb und entspricht dem Fragment zwischen der zweiten *NheI*-Schnittstelle (innerhalb des Transposons) und der *SacI*-Schnittstelle.

Das Ergebnis des Southern Blot ist in Abbildung 4.22. zu sehen. Die DNA des Wildtyps wurde mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *SacI* geschnitten und im Blot taucht wie erwartet eine Fragmentgröße von 4 kb auf (Abb. 4.21. und Abb. 4.22. Spur 1). Die DNA der *mpn358::tn*-Mutante wurde mit den gleichen Enzymen verdaut und es konnten drei verschiedene Banden detektiert werden (Abb. 4.22. Spur 2). Dieses Bandenmuster entsteht, weil es zwei *NheI*-Schnittstellen gibt, nämlich eine vor dem Gen *mpn358* und eine innerhalb des Transposons. Die größte Bande von 7,5 kb entsteht, wenn die DNA an der ersten *NheI*-Schnittstelle und an der *SacI*-Schnittstelle verdaut wird. Die mittlere Bande entspricht dem DNA-Fragment zwischen den beiden *NheI*-Schnittstellen und hat eine Größe von etwa 4,4 kb. Das kleinste Fragment von 3 kb wird gebildet, wenn die zweite *NheI*-Schnittstelle und die *SacI*-Schnittstelle von den entsprechenden Enzymen verdaut werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die *mpn358::tn*-Mutante nicht mit Wildtyp-Zellen kontaminiert ist. Der Stamm, welcher eine Transposoninsertion im Gen *mpn358* enthielt, erhielt die Bezeichnung GPM10.

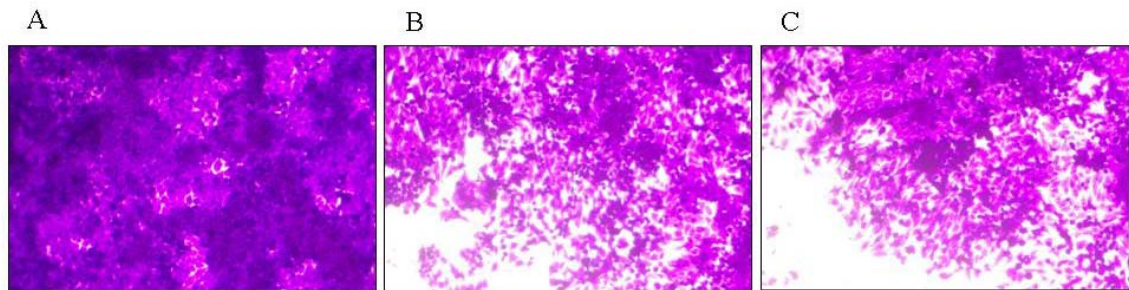
#### 4.2.7 Zytotoxischer Effekt der *mpn358::tn*-Mutante (GPM10)

Die Funktion des Genes *mpn358* ist bisher noch nicht ganz klar. Wie schon bereits in dem vorherigen Kapitel erwähnt, besteht eine Homologie zu einer neuartigen Thymidylat-Synthase. Demnach würde *M. pneumoniae* zwei Enzyme besitzen, welche die gleiche Funktion übernehmen, nämlich die Synthese von dTMP. Dies ist umso erstaunlicher wenn man davon ausgeht, dass Mykoplasmen nur sehr kleine Genome besitzen und daher mit einem minimalen Set an Genen auskommen müssen.

Es sollte nun untersucht werden, ob die Transposoninsertion in dieses Gen einen Einfluss auf die Zytotoxizität hat. Hierzu wurden HeLa-Zellen sowohl mit dem Wildtyp als auch mit dem Stamm GPM10 inkubiert und die Zytotoxizität dokumentiert (Abb. 4.23.).

Das Ergebnis dieses Versuches zeigt, dass es zwischen dem Wildtyp und der *mpn358::tn*-Mutante keinen Unterschied in der Zytotoxizität gibt (Abb. 4.23. B und C). Der Wildtyp und der Stamm GPM10 bewirken, dass die HeLa-Zellen lysiert werden

und gegenüber der Kontrolle, in welcher nur HeLa-Zellen vorhanden sind, keinen dichten Zellrasen mehr bilden können.



**Abb. 4.23. Zytotoxizität von *M. pneumoniae* gegenüber HeLa-Zellen: A) HeLa-Zellen ohne *M. pneumoniae*; B) HeLa-Zellen mit Wildtyp *M. pneumoniae*; C) HeLa-Zellen mit der *mpn358::tn*-Mutante**

Somit bleibt unklar, welche Funktion das Gen *mpn358* in *M. pneumoniae* übernimmt. Es kann durchaus sein, dass ThyA die Funktion übernimmt, wenn MPN358 nicht mehr funktionsfähig ist und andersrum. Dies würde auch erklären, wieso die Mutanten GPM9 und GPM10 keine Unterschiede aufweisen sowie keinen Wachstumsdefekt zeigen.

#### 4.2.8 Zytotoxischer Effekt der *hprK::tn*-Mutante (GPM51)

Die HPr-Kinase spielt in Gram-positiven Bakterien eine wichtige Rolle in der Regulation. Sie phosphoryliert das HPr aus dem PTS am Serin46, welches zusammen mit CcpA einen Komplex bildet. Dieser Komplex ist an der Kohlenstoffkatabolitenrepression beteiligt.

In *M. pneumoniae* konnte der HPrK beziehungsweise dem HPr(Ser-P) bisher keine konkrete Rolle zugewiesen werden. Daher sollte untersucht werden, ob eine *hprK::*Mutante einen Einfluss auf die Zytotoxizität hat. Hierzu wurden HeLa-Zellen sowohl mit dem Wildtyp als auch mit dem Stamm GPM51 inkubiert und die Zytotoxizität dokumentiert (Abb. 4.24.).

Der Versuch macht deutlich, dass die *hprK::*Mutante nicht mehr zytotoxisch ist. Der Vergleich zwischen den Kontrollzellen (Abb. 4.24. A) und den HeLa-Zellen (Abb. 4.24. C), die mit der Mutante inkubiert wurden, zeigt keinen Wachstumsunterschied. In Anwesenheit des Wildtyps sind wie erwartet die HeLa-Zellen größtenteils lysiert.



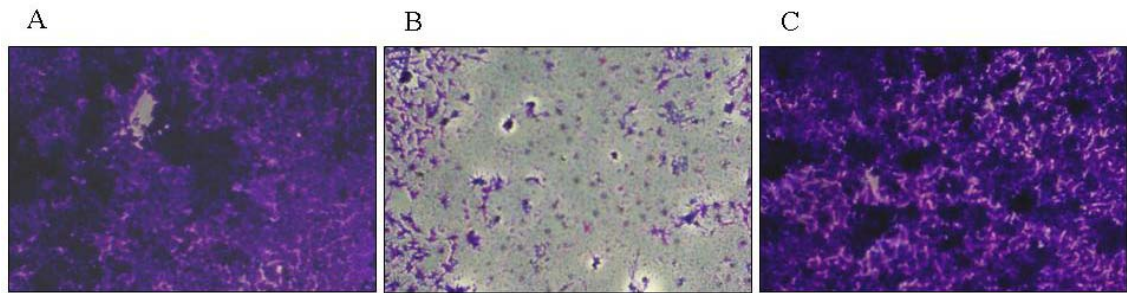


Abb. 4.24. Zytotoxizität von *M. pneumoniae* gegenüber HeLa-Zellen: A) HeLa-Zellen ohne *M. pneumoniae*; B) HeLa-Zellen mit Wildtyp *M. pneumoniae*; C) HeLa-Zellen mit der *hprK::tn*-Mutante

Dieses Ergebnis gibt einen Hinweis darauf, dass die HPr-Kinase auch in *M. pneumoniae* eine wichtige Rolle spielt. Es bleibt jedoch unklar, ob das Fehlen der Kinase Probleme im Stoffwechsel hervorruft oder ob sie an der Regulierung von Pathogenitätsmechanismen beteiligt ist.

#### 4.2.9 Zytotoxischer Effekt der *prpC::tn*-Mutante (GPM68)

Das Gen *prpC* kodiert für eine Phosphatase, die der PP2C Familie angehört, zu der auch viele eukaryotische Phosphatasen gezählt werden. In *M. pneumoniae* ist PrpC in der Lage, das HPr(Ser-P) zu dephosphorylieren.

Es sollte untersucht werden, ob eine *prpC::tn*-Mutante noch zytotoxisch auf HeLa-Zellen wirken kann. Die HeLa-Zellen wurden zusammen mit dem Wildtyp oder der *prpC::tn*-Mutante von *M. pneumoniae* inkubiert und dokumentiert. (Abb. 4.25.)

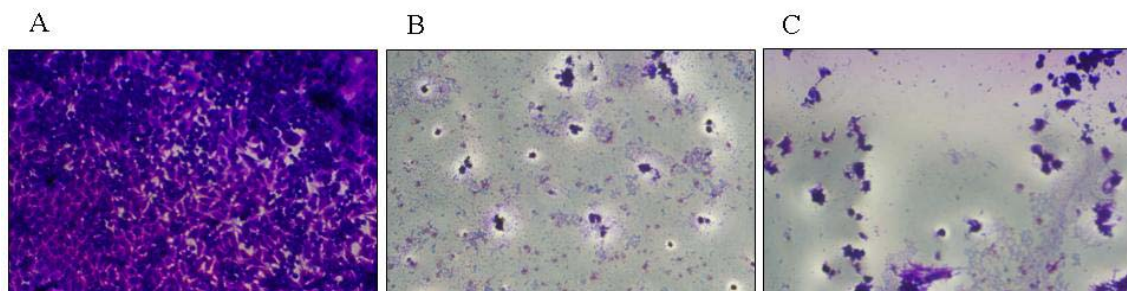


Abb. 4.25. Zytotoxizität von *M. pneumoniae* gegenüber HeLa-Zellen: A) HeLa-Zellen ohne *M. pneumoniae*; B) HeLa-Zellen mit Wildtyp *M. pneumoniae*; C) HeLa-Zellen mit der *prpC::tn*-Mutante



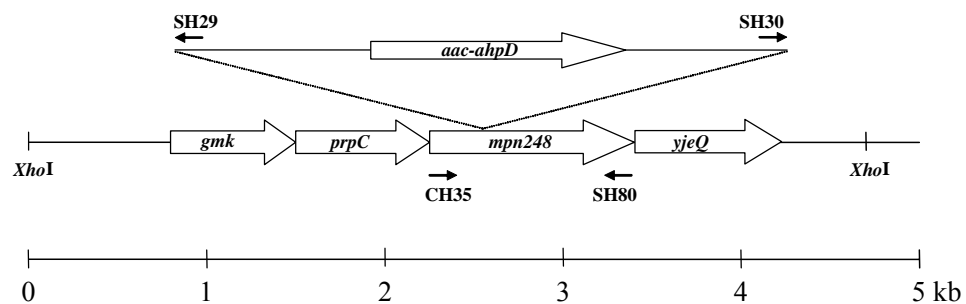
Es wird deutlich, dass die *prpC*::Mutante (Abb. 4.25. C) noch genauso zytotoxisch auf die HeLa-Zellen wirkt wie der Wildtyp (Abb. 4.25. B). Demnach hat die Phosphatase keinen direkten Einfluss auf die Pathogenität von *M. pneumoniae*.

#### 4.2.10 Isolierung der *mpn248*::tn-Mutante

Das Gen *mpn248* (*prkC*) liegt hinter dem *prpC*-Gen und wird wahrscheinlich zusammen mit dieser transkribiert. Diese Genorganisation findet man in vielen Gram-positiven Organismen (Iwanicki *et al.*, 2005). Üblicherweise befindet sich hinter der Phosphatase ein Gen, welches für eine Serin/Threonin Kinase kodiert. Es sollte untersucht werden, ob es sich bei *mpn248* ebenfalls um eine Kinase handelt.

Um das Gen *mpn248* näher zu charakterisieren, wurde die Transposonbank nach einer Mutante durchsucht, welche eine Insertion in dem Gen trägt. Es konnte eine Mutante isoliert werden und der Insertionsort wurde durch Sequenzierung bestimmt. Das Transposon befindet sich hinter der Base 313 (Abb. 4.26.).

Anschließend wurde die chromosomale DNA des Wildtyps und der *mpn248*::tn-Mutante isoliert und mit dem Restriktionsenzym *XhoI* geschnitten. Diese DNA wurde für einen Southern Blot eingesetzt. Die Detektion wurde mit einer Sonde gegen *mpn248* und einer Sonde gegen die Gentamycin-Kassette durchgeführt.

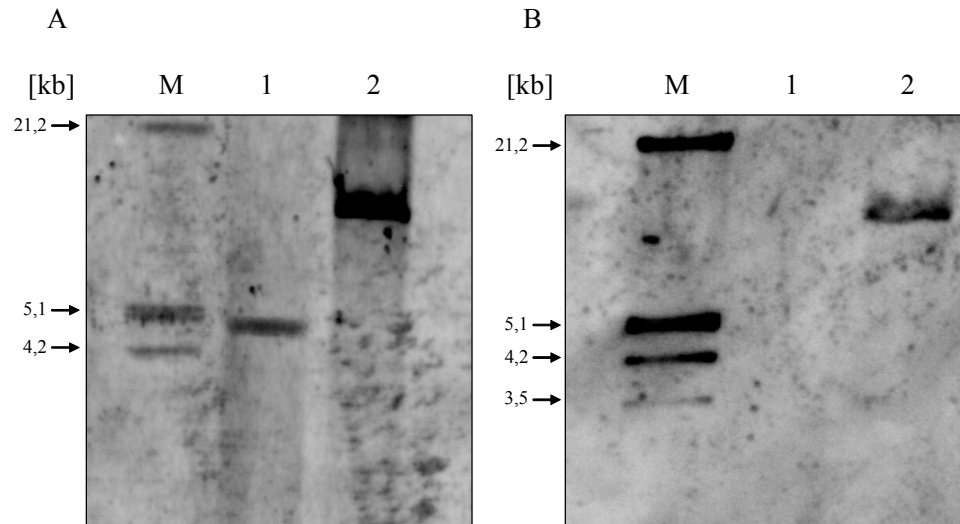


**Abb. 4.26. Schematische Darstellung der Transposoninsertion in *mpn248* im genetischen Hintergrund**

Die Darstellung der Transposoninsertion ist maßstabsgetreu. Die für das Screening verwendeten Primer sind abgebildet sowie die Restriktionsstellen für das Enzym *XhoI*, welches für den Verdau der chromosomalen DNA für den Southern Blot verwendet wurde.

In der Abbildung 4.27. A ist der Southern Blot mit einer Sonde gegen *mpn248* zu sehen. Die *XhoI* geschnittene chromosomale DNA des Wildtyps zeigt ein Signal bei der

Größe von etwa 4,8 kb (Abb. 4.27. A Spur 1). Das DNA-Fragment, welches bei dem Verdau der chromosomalen DNA der Mutante entsteht, ist durch die Transposoninsertion etwa 3,5 kb größer und hat eine Länge von 8,3 kb (Abb. 4.27. A Spur 2).



**Abb. 4.27. Southern Blot mit einer Sonde gegen *mpn248* (A) und gegen die Gentamycin-Kassette (B)**

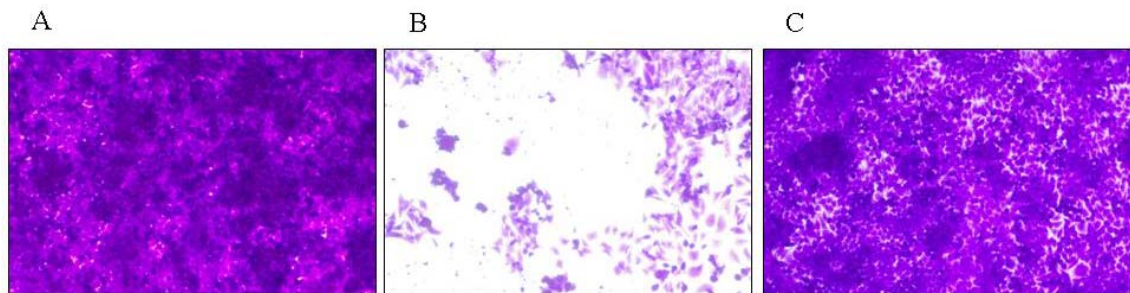
In der Abb. A wurde in Spur 1 die *XhoI*-geschnittene chrom. DNA des Wildtyps und in Spur 2 der Mutante aufgetragen. Hier wurde die Sonde gegen *mpn248* verwendet. Das detektierte Fragment in der Mutante ist durch die Integration des Transposons um 3,5 kb größer als das Fragment des Wildtyps. In der Abb. B wurde in Spur 1 die *XhoI*-geschnittene chrom. DNA des Wildtyps und in Spur 2 der Mutante aufgetragen. Es wurde eine Sonde gegen die Gentamycin-Kassette verwendet. In Spur 1 konnte kein Signal detektiert werden und in Spur 2 wurde wie erwartet eine Bande sichtbar.

Der Southern Blot in Abbildung 4.27. B wurde mit einer Sonde gegen die Gentamycin-Kassette durchgeführt, um zu zeigen, dass das Transposon nur einmal in das Genom integriert wurde. Die geschnittene chromosomale DNA des Wildtyps gibt wie erwartet kein Signal (Abb. 4.27. B Spur 1) wohingegen bei der Mutante wieder ein Signal bei 8,3 kb detektiert werden kann (Abb. 4.27. B Spur 2).

Die Mutante erhielt die Bezeichnung GPM11. Diese Transposoninsertion in das Gen *mpn248* bewirkt, dass die Mykoplasmen nicht mehr adhäsiv an Oberflächen wachsen können. Es ist die erste isolierte Mutante, welche einen Phänotyp aufweist. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass MPN248 eine wichtige Rolle bei der Adhäsion spielt.

#### 4.2.11 Zytotoxischer Effekt der *mpn248::tn*-Mutante (GPM11)

Nachdem die Mutante erfolgreich isoliert werden konnte, sollte der zytotoxische Effekt auf HeLa-Zellen untersucht werden. Hierzu wurden die HeLa-Zellen für mehrere Tage zusammen mit der *mpn248::tn*-Mutante inkubiert. Mit der Hilfe mikroskopischer Aufnahmen konnte man feststellen, ob die Mutante sich anders verhält als der Wildtyp. 4.28.



**Abb. 4.28. Zytotoxizität von *M. pneumoniae* gegenüber HeLa-Zellen: A) HeLa-Zellen ohne *M. pneumoniae*; B) HeLa-Zellen mit Wildtyp *M. pneumoniae*; C) HeLa-Zellen mit der *prkC::tn*-Mutante**

Dieser Versuch zeigt, dass die *prkC::tn*-Mutante im Gegensatz zu dem Wildtyp keine Zytotoxizität mehr gegenüber den HeLa-Zellen aufweist (Abb. 4.28. B und C). Offensichtlich ist diese Kinase an wichtigen regulatorischen Prozessen beteiligt. Möglicherweise ist die PrkC an der direkten oder indirekten Phosphorylierung der Adhäsionsproteine beteiligt und ihr Fehlen bewirkt, dass die Zellen nicht mehr an den Wirtszellen anhaften können.

### 4.3 Regulatorische Phosphorylierungen in *M. pneumoniae*

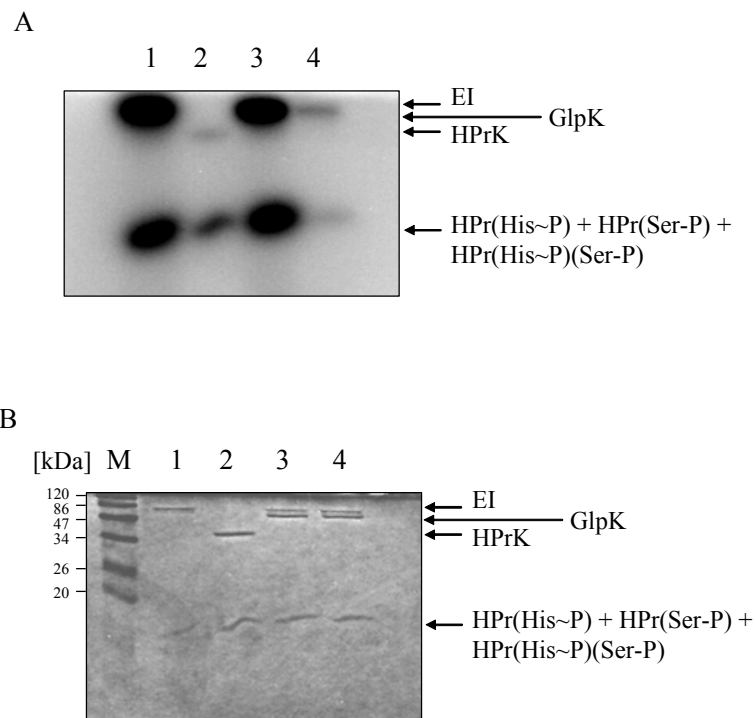
#### 4.3.1 Wird der Glycerolstoffwechsel durch die HPrK reguliert?

Der Glycerolstoffwechsel und das Phosphotransferase-System scheinen in *M. pneumoniae* miteinander verknüpft zu sein. In Anwesenheit von Glycerol entsteht neben dem HPr(His~P), welches für die Aufnahme von Glukose notwendig ist, ebenfalls HPr(His~P)(Ser-P). Die Rolle des doppelt phosphorylierten HPr in *M. pneumoniae* ist bisher völlig unklar. In anderen Firmicutes spielen HPr(Ser-P) beziehungsweise HPr(His~P)(Ser-P) eine wichtige Rolle in der Kohlenstoffkatabolitenrepression.

Das PTS nimmt in Gram-positiven Bakterien ebenfalls Einfluss auf den Glycerolstoffwechsel, obwohl die Aufnahme dieser C-Quelle unabhängig von diesem System ist (Darbon *et al.*, 2002). In *E. faecalis* stimuliert HPr(His~P) durch die Phosphorylierung der Glycerolkinase deren Aktivität um das zehnfache (Deutscher und Sauerwald, 1986).

Es sollte nun die Frage geklärt werden, ob die phosphorylierten Formen des HPr als Phosphatdonor für die Glycerolkinase dienen können. Für diesen Versuch mussten zuerst alle Komponenten des PTS (EI, HPr, HPrK) sowie die Glycerolkinase rekombinant aufgereinigt werden. In vorherigen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass diese rekombinanten Proteine enzymatisch aktiv sind. Die Phosphorylierungskaskade des PTS konnte mit Hilfe des radioaktiven Phosphoenolpyruvats oder des radioaktiven ATPs durchgeführt werden.

In der Abbildung 4.29. sind die Ergebnisse dieses Versuchs dargestellt. In der ersten Spur wurden EI, HPr und radioaktives PEP zusammen inkubiert. Hierbei entstehen zwei Phosphorylierungen, zum einen wird EI autophosphoryliert, zum anderen kann dieses wiederum HPr am Histidin phosphorylieren. Die Spur 2 zeigt die Phosphorylierung wenn HPr zusammen mit HPrK und radioaktivem ATP inkubiert wird. Die Phosphorylierung der HPrK ist nur sehr schwach, wohingegen man ein starkes Signal für HPr(Ser-P) erhält. Diese beiden Spuren wurden zur Kontrolle mitgeführt.



**Abb. 4.29. Radioaktive Phosphorylierung der Glycerolkinase durch PTS-Komponenten**

In der Spur 1 wurden EI, HPr und  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-PEP zusammen inkubiert. Bei diesem Ansatz wird EI auto- und HPr am Histidinrest phosphoryliert. In Spur 2 wurden die HPrK, HPr und  $^{32}$ P-ATP inkubiert und man erhielt eine schwache Phosphorylierung der HPrK und ein stärkeres Signal, welches HPr(Ser-P) darstellt. Die Spur 3 enthält EI, HPr, GlpK und  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-PEP und zeigt keine zusätzliche Bande gegenüber Spur 1. In der Spur 4 wurden HPr(Ser-P), EI, GlpK und  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-PEP zusammen inkubiert. Die Autophosphorylierung von EI sowie die Phosphorylierung von HPr(Ser-P)(His~P) sind zu sehen.

In der Spur 3 wurde zu den Komponenten des PTS, EI, HPr und  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-PEP, zusätzlich die Glycerolkinase hinzugegeben. Die Glycerolkinase (56 kDa) hat ein geringeres Molekulargewicht als EI (61 kDa) und man hätte erwartet, dass unterhalb des phosphorylierten EI eine zweite Bande auftaucht beziehungsweise, dass sich das Signal gegenüber der Spur 1 verstärkt. Dies ist jedoch nicht der Fall, so dass eine Phosphorylierung von GlpK durch HPr(His~P) ausgeschlossen werden kann.

In der Spur 4 wurden EI, HPr(Ser-P), GlpK und  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-PEP eingesetzt. Auch hier sieht man nur die Autophosphorylierung von EI sowie die Phosphorylierung der HPr(SerP) am Histidin. Bei diesem Ansatz wird das Phosphat nicht vom Histidinrest des HPr auf die Glycerolkinase übertragen.

Somit kann ausgeschlossen werden, dass das PTS, durch die Phosphorylierung der Glycerolkinase, einen Einfluss auf den Glycerolstoffwechsel nehmen kann.

### 4.3.2 Ist MPN248 eine Serin/Threonin Kinase?

Der Stamm GPM11 zeigte bei seiner Isolierung einen für Mykoplasmen besonderen Phänotyp. Die Mutanten sind nicht mehr in der Lage, adhäsiv auf der Oberfläche zu wachsen und schwimmen im Medium.

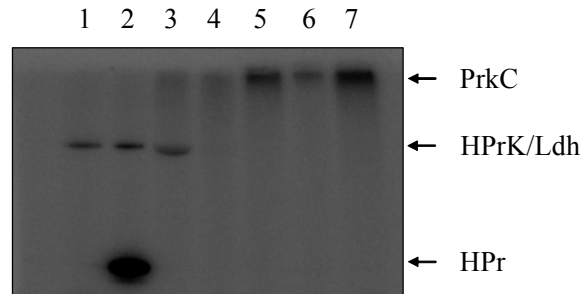
Damit die Mykoplasmen adhärent wachsen können, sind sie auf die Bildung der Tipstruktur angewiesen. Diese Struktur besteht aus vielen verschiedenen Proteinen, die sehr gut untersucht sind, wie zum Beispiel das P1-Protein und die HMW-Proteine. Eine globale Studie der Phosphoproteine von *M. pneumoniae* hat gezeigt, dass viele dieser Proteine an Serin- oder Threonin-Resten phosphoryliert werden (Su *et al.*, 2007). Außerdem hat man in dieser Studie festgestellt, dass die Laktatdehydrogenase phosphoryliert wird.

Diese Ergebnisse gaben einen Hinweis darauf, dass es neben der HPr-Kinase noch eine weitere Kinase geben muss, welche Serin- und Threonin-Reste phosphorylieren kann. Da vor *mpn248* ein Gen für eine Phosphatase (*prpC*) vorhanden ist, gab dies einen Hinweis darauf, dass es sich bei diesem Gen um *prkC* handelt. In anderen Gram-positiven Bakterien liegen die Phosphatase und die Serin/Threonin Kinase immer in einem Operon (Iwanicki *et al.*, 2005). Des Weiteren kann PrkC sich autophosphorylieren wenn ATP vorhanden ist (Obuchowski *et al.*, 2000).

Um der Frage nachzugehen, ob MPN248 eine Serin/Threonin Kinase ist, wurde das Gen in den Überexpressionsvektor pGP172, welcher dem Protein einen Strep-Tag verleiht, kloniert. Damit die Überexpression des Proteins in *E. coli* durchgeführt werden konnte, musste mit Hilfe der MMR ein UGA-Codon in ein UGG-Codon mutiert werden. Das fertige Plasmid erhielt die Bezeichnung pGP271.

Die Phosphorylierungen wurden wieder mit radioaktivem ATP durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.30. zu sehen. In der ersten Spur wurde HPrK mit  $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert und man sieht die Autophosphorylierung dieses Proteins. Die Zugabe von HPr zu der HPr-Kinase und dem  $^{32}\text{P}$ -ATP führt zu einem weiteren Signal, welches HPr(Ser-P) darstellt (Abb. 4.30. Spur 2). Inkubiert man die HPrK und die Laktatdehydrogenase zusammen mit dem radioaktiven ATP, taucht nur eine Phosphorylierungsbande auf. Die beiden Proteine laufen auf der gleichen Höhe in dem SDS-Gel und es ist daher nicht möglich eine Aussage darüber zu treffen, ob die Laktatdehydrogenase durch die HPr-Kinase phosphoryliert werden kann (Abb. 4.30.

Spur 3). In der Spur 4 wurde die Laktatdehydrogenase mit  $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Dies sollte eine Autophosphorylierung des Enzyms ausschließen.



**Abb. 4.30. Phosphorylierungsexperimente mit PrkC und putativen Phosphorylierungskandidaten**

Allen Phosphorylierungsansätzen wurde  $^{32}\text{P}$ -ATP zugegeben und es folgte eine Inkubation von 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$ . In der Spur 1 ist die Autophosphorylierung von HPrK zu sehen. In der Spur 2 wurden HPrK und HPr aufgetragen und in Spur 3 wurde noch zusätzlich Ldh hinzugegeben. In der vierten Spur wurde zur Kontrolle Ldh mit  $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert. Die Spur 5 zeigt die Inkubation von PrkC mit HPr. In der Spur 6 wurde nur PrkC aufgetragen. Das Ergebnis der Inkubation von PrkC und Ldh ist in Spur 7 zu sehen.

Nun wurden PrkC und HPr zusammen mit  $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert (Abb. 4.30. Spur 5). Im Gegensatz zu PrkC aus *B. subtilis* ist PrkC aus *M. pneumoniae* nicht in der Lage HPr zu phosphorylieren (Nico Pietack, 2007). Man sieht jedoch deutlich, dass die Kinase autophosphoryliert wird. Dieses Ergebnis wird noch mal in Spur 6 bestätigt, in der PrkC mit  $^{32}\text{P}$ -ATP inkubiert wurde. In der letzten Spur wurden PrkC und die Laktatdehydrogenase zusammen mit radioaktivem ATP inkubiert. Auch hier sieht man nur die Autophosphorylierung der Kinase.

Es konnte gezeigt werden, dass MPN248 sich wie eine Serin/Threonin Kinase verhält. Jedoch konnte noch kein Substrat für diese Kinase identifiziert werden. Des Weiteren bleibt unklar, ob die HPr-Kinase an der Phosphorylierung der Laktatdehydrogenase beteiligt ist.

## 5. Diskussion

### 5.1 Die Verbindung von Kohlenstoffmetabolismus und Pathogenität in *M. pneumoniae*

Die Pathogenitätsmechanismen und die Virulenzfaktoren sind bisher in *M. pneumoniae* kaum untersucht worden. In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Kohlenstoffmetabolismus und Pathogenität gibt. In vorherigen Experimenten wurde bereits eine Verbindung zwischen dem Glycerolstoffwechsel und dem Phosphotransferasesystem festgestellt (Halbedel, 2006). Die Anwesenheit von Glycerol hat einen Einfluss auf die HPr-Kinase-Aktivität und somit auf den Phosphorylierungszustand des HPr. Das HPr(Ser-P) entsteht nur, wenn Glycerol im Medium ist. Diese C-Quelle scheint ein wichtiges Signal für die Zelle zu sein. In diesem Zusammenhang sollte nun die Zytotoxizität einer *hprK*-Mutante näher untersucht werden.

Des Weiteren sollte die Rolle des Glycerolmetabolismus von *M. pneumoniae* näher charakterisiert werden. Hierbei sollte gezeigt werden, dass ein Enzym des Glycerolstoffwechsels maßgeblich an der Produktion des Virulenzfaktors Wasserstoffperoxid beteiligt ist und welchen Einfluss das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf eukaryotische Wirtszellen hat.

### 5.2 Der Glycerolstoffwechsel und seine Rolle bei der Virulenz

Glycerol ist eine der wenigen Kohlenstoffquellen, die *M. pneumoniae* verwerten kann (Halbedel *et al.*, 2004). Es scheint auch ein wichtiges Signal für die HPr-Kinase zu sein, da nur in Anwesenheit von Glycerol HPr(Ser-P) gebildet wird (Halbedel *et al.*, 2004). Das HPr(His~P) hat in *E. faecalis* einen aktivierenden Effekt auf die Glycerolkinase. Sie wird von HPr(His~P) phosphoryliert und zeigt eine zehnfach höhere Aktivität als die unphosphorylierte Glycerolkinase (Deutscher und Sauerwald, 1986).

In *M. pneumoniae* konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivität der Glycerolkinase weder durch HPr(His~P) noch durch HPr(His~P)(Ser-P) beeinflusst wird (Hames, 2006). Es wurde jedoch auch schon ein Fall beschrieben, in dem die Glycerolkinase phosphoryliert wird, wobei diese Phosphorylierung kaum Einfluss auf



die Aktivität hat ((Darbon *et al.*, 1999). Daher wurde untersucht, ob die Glycerolkinase aus *M. pneumoniae* von HPr phosphoryliert werden kann. Es stellte sich jedoch heraus, dass weder HPr(His~P), HPr(Ser-P) noch HPr(His~P)(Ser-P) in der Lage sind, die Kinase am Histidin zu phosphorylieren (Kapitel 4.3.1). Die Glycerolkinase wird weder auf Transkriptionsebene noch auf posttranslationaler Ebene reguliert. Auch in anderen Mykoplasmen scheint die Glycerolkinaseaktivität nicht reguliert zu sein.

*M. capricolum* besitzt als einziger unter den Mykoplasmen ein lösliches EIIA, wie es auch bei Gram-negativen Bakterien vorkommt. Hier wird jedoch die Glycerolkinase nicht durch EIIA inhibiert, wie es in *E. coli* der Fall ist (Zhu, 1997). Die Regulation der Glycerolkinaseaktivität scheint also in Mykoplasmen nicht so verbreitet zu sein wie in Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien.

Da bei *B. subtilis* die Expression der Glyceroldehydrogenase reguliert wird, sollte untersucht werden, ob dies auch bei *M. pneumoniae* der Fall ist. Ein Western Blot hat jedoch gezeigt, dass unter verschiedenen Nährstoffbedingungen die Menge an dem Enzym GlpD nicht variiert und demnach nicht reguliert wird. Dies ist verwunderlich, da in *B. subtilis* durch die Regulation verhindert wird, dass unnötig Enzyme für den Abbau von C-Quellen synthetisiert werden, wenn diese gar nicht im Medium vorhanden sind. Eine Proteomanalyse von *M. pneumoniae* hat gezeigt, dass alle Enzyme für die Aufnahme und den Abbau der C-Quellen, die dieser Organismus verwerten kann, also Glukose, Fruktose und Glycerol, detektiert werden können (Jaffe *et al.*, 2004). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass den Mykoplasmen in ihrem natürlichen Lebensraum verschiedene Kohlenstoffquellen ständig zur Verfügung stehen und sie deshalb auf eine Kohlenstoffkatabolitenrepression verzichten.

Glycerol scheint neben seiner Rolle als Energielieferant auch eine wichtige Rolle in der Pathogenität von *M. pneumoniae* zu spielen. In der Anwesenheit von Glycerol im Medium werden bis zu 5 µg/ml Wasserstoffperoxid freigesetzt, während bei der Zugabe von Glukose nur 2 µg/ml produziert werden (Kapitel 4.1.7). Der hochvirulente *M. mycoides* subsp. *mycoides* SC Afadé Stamm, der in Afrika weit verbreitet ist und in Rindern die Lungenseuche hervorruft, kann bis zu 6,5 µg/ml Wasserstoffperoxid bei der Verwertung von Glycerol in das Medium abgeben (Vilei und Frey, 2001). *M. pneumoniae* setzt, wie *M. mycoides*, große Mengen Wasserstoffperoxid frei, wenn Glycerol als C-Quelle zur Verfügung steht. Wahrscheinlich ist dies auch in *M. pneumoniae* ein primärer Virulenzfaktor.

In *M. mycoides* ist die Glycerol-3-phosphat-Oxidase, welche Glycerol-3-phosphat zu Dihydroxyacetonphosphat umsetzt, für die Produktion von Wasserstoffperoxid zuständig. Dieses Enzym nutzt dabei Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Bei der Sequenzierung des Genoms von *M. pneumoniae* wurde eine Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase annotiert (Himmelreich *et al.*, 1996). Dehydrogenasen nutzen im Gegensatz zu Oxidasen  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor. Die Wasserstoffperoxidmessung von *M. pneumoniae* in Gegenwart von Glycerol gab bereits einen Hinweis darauf, dass *glpD* eventuell doch für eine Oxidase kodieren könnte (Kapitel 4.1.7).

Es stellte sich heraus, dass die rekombinante Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenase  $\text{NAD}^+$  nicht als Elektronenakzeptor verwenden kann und auch kein Wasserstoffperoxid bilden kann (Kapitel 4.1.2). Wenn man jedoch das Enzym für eine Stunde mit dem Substrat Glycerol-3-phosphat inkubiert hat, war es möglich Wasserstoffperoxid zu messen (Kapitel 4.1.3). Dies zeigt, dass *glpD* aus *M. pneumoniae* für eine Glycerol-3-phosphat-Oxidase kodiert.

Glycerol-3-phosphat-Oxidasen scheinen unter den Milchsäurebakterien weit verbreitet zu sein. Sie wurden bereits in *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium* und *Lactobacillus* beschrieben und liegen als lösliches Protein im Cytoplasma vor (Esders und Michrin, 1979; Ince *et al.*, 1987; Suchová *et al.*, 1992, Parsonage *et al.*, 1998). Somit ist auch die Fähigkeit, Wasserstoffperoxid zu produzieren, in Milchsäurebakterien weit verbreitet (Anders *et al.*, 1970). Die Glycerol-3-phosphat-Dehydrogenasen scheinen hingegen bei den anderen Bakterien verbreitet zu sein. Viele, darunter *E. coli*, *B. subtilis*, *Streptomyces coelicolor* und *Staphylococcus aureus*, besitzen eine membrangebundene Dehydrogenase (Mindich, 1968; Lascelles, 1978; Seno und Chater, 1983; Schweizer und Larson, 1987; Walz *et al.*, 2002). In Mykoplasmen wurde der Glycerolstoffwechsel bisher nur in *M. sp. bovine group 7* (Djordjevic *et al.*, 2003) und in *M. mycoides* näher untersucht, wo zum ersten Mal eine Glycerol-3-phosphat-Oxidase beschrieben wurde (Wadher *et al.*, 1990; Pilo *et al.*, 2005). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *M. pneumoniae* ein solches Enzym exprimiert. Da Mykoplasmen und die Milchsäurebakterien einem gemeinsamen Vorfahren entstammen, scheinen sie die Glycerol-3-phosphat-Oxidase und somit die Wasserstoffperoxidproduktion von diesem beibehalten zu haben (Ciccarelli *et al.*, 2006).

Obwohl die beschriebenen Glycerol-3-phosphat-Oxidasen löslich sind und sich im Zytoplasma befinden, scheint die Oxidase von *M. mycoides* eine Ausnahme zu bilden (Pilo *et al.*, 2005). Dieses Enzym ist in der Membran verankert und gibt das Wasserstoffperoxid direkt in die Umgebung ab. Bei *M. pneumoniae* ist dies jedoch nicht der Fall. Es konnte mit elektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden, dass nur wenige Proteinmoleküle an der Oberfläche zu detektieren sind (Kapitel 4.1.5). Ein Western Blot hat bestätigt, dass die Glycerol-3-phosphat-Oxidase von *M. pneumoniae* größtenteils im Cytoplasma vorliegt und nur wenig Protein in der Membran verankert ist (Kapitel 4.1.5). Hier muss das gebildete Wasserstoffperoxid wohl erst durch die Zellmembran diffundieren, um an die Wirtszellen zu gelangen und diese zu schädigen.

*M. mycoides* setzt das Wasserstoffperoxid als Virulenzfaktor gegen die Wirtszellen ein. Die Blockierung der GlpO mit Antikörpern an der Zelloberfläche inhibiert die Zytotoxizität der Mykoplasmen gegenüber den nasalen Epithelzellen aus Kälbern (Pilo *et al.*, 2005; Bischof *et al.*, 2008). Obwohl die Glycerol-3-phosphat-Oxidase von *M. pneumoniae* größtenteils intrazellulär ist, konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym auch in diesem Organismus eine wichtige Rolle bei der Virulenz spielt. Eine *glpD::tn*-Mutante ist weniger zytotoxisch als die Wildtypzellen (Kapitel 4.1.8). Wie bereits bei *E. faecium* beschrieben, hat der Glycerolstoffwechsel bzw. das von der Glycerol-3-phosphat-Oxidase produzierte Wasserstoffperoxid einen toxischen Effekt (Moy *et al.*, 2004).

Bei den Milchsäurebakterien wird das gebildete Wasserstoffperoxid als Waffe eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass viele *Streptococcus*-Arten durch die Produktion von Wasserstoffperoxid in der Lage sind, *C. elegans* zu töten (Bolm *et al.*, 2004). Die pathogenen Milchsäurebakterien verfolgen dabei die Strategie, die konkurrierenden Krankheitserreger von dem gleichen Standort zu verdrängen. In der Mundhöhle kommen bis zu 500 verschiedene mikrobielle Arten vor (Kroes *et al.*, 1999; Paster *et al.*, 2001). Hier herrscht ein hoher Konkurrenzdruck. *S. mutans* bildet zur Abwehr von anderen Mikroorganismen Milchsäure, wodurch der pH-Wert in der Umgebung absinkt und die Konkurrenten schädigt. *S. oligofermentans*, der sich in der gleichen Nische wie *S. mutans* aufhält, hat eine Strategie entwickelt, die es ihm ermöglicht dem zu entgehen. Er setzt das Laktat mit Hilfe einer Laktat-Oxidase um und bildet dabei Wasserstoffperoxid. Das Wasserstoffperoxid hat dann eine inhibierende Wirkung auf *S. mutans* (Tong *et al.*, 2007). Streptococci, die im Urogenitaltrakt

vorkommen, sind mit Hilfe dieses Virulenzfaktors in der Lage, das Wachstum von *Neisseria gonorrhoeae* zu inhibieren (Dubreuil *et al.*, 1984).

Auch *S. pneumoniae* nutzt Wasserstoffperoxid, um das Wachstum anderer pathogener Erreger zu unterbinden. Dieser Organismus kommt vor allem in der Nase und im Pharynx vor. *S. aureus* fühlt sich ebenfalls in der Nase sehr wohl und ist somit der Hauptkonkurrent von *S. pneumoniae*. Die Streptococci bilden mit Hilfe der Pyruvat-Oxidase Wasserstoffperoxid und können somit das Wachstum von den Staphylococci inhibieren (Spellerberg *et al.*, 1996; Regev-Yochay *et al.*, 2006). Bei den Milchsäurebakterien sind wie bei *M. pneumoniae* auch Enzyme des Kohlenstoffwechsels für die Produktion von Wasserstoffperoxid zuständig. Womöglich kann dieser Virulenzfaktor auch von *M. pneumoniae* zum Bekämpfen von konkurrierenden pathogenen Organismen genutzt werden, wie dies bei *S. pneumoniae* der Fall ist. Dies könnte vor allem den Mykoplasmen das Überleben im Wirt erleichtern, da sie doch recht langsam wachsen und eine lange Latenzzeit haben.

Jedoch nutzen nicht nur die pathogenen Milchsäurebakterien Wasserstoffperoxid zu ihrem Vorteil. Auch die Milchsäurebakterien, die in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt werden, setzen  $H_2O_2$  frei und sind dabei in der Lage das Wachstum von Bakterien, die Lebensmittelvergiftungen hervorrufen können, zu inhibieren (Batdorj *et al.*, 2007). Da sie oft als Starterkulturen für die Käse- und Joghurtherstellung verwendet werden, müssen sie ihre Nische vor anderen Bakterien verteidigen. Dies hat dann auch einen positiven Effekt für den Menschen, weil dabei die Kontamination mit pathogenen Bakterien verhindert wird.

Neben dem toxischen Effekt auf andere Bakterien bewirkt das Wasserstoffperoxid von *S. pneumoniae* bei alveolaren Epithelzellen von Ratten die Autolyse (Duane *et al.*, 1993). Auch die bewimperten Epithelzellen der Lunge werden geschädigt, in dem die Schlagfrequenz herabgesetzt wird und es zur Lyse dieser Zellen kommt (Yoshitsugu *et al.*, 1995; Feldman *et al.*, 2002). Dies passt zu dem Krankheitsbild, welches *S. pneumoniae* hervorruft, nämlich der schweren Lungenentzündung. Wahrscheinlich hat der Virulenzfaktor von *M. pneumoniae* den gleichen Effekt auf die Lungenepithelzellen wie dies bei *S. pneumoniae* zu beobachten ist. Die Freisetzung von Wasserstoffperoxid durch die Mykoplasmen führt dann ebenfalls zu der Entstehung einer Lungenentzündung.

Wenn die Lungenentzündung, welche von *S. pneumoniae* hervorgerufen wird, nicht behandelt wird, kommt es oft zu weiteren Entzündungen und vor allem zu einer Hirnhautentzündung, die bei Kindern meist tödlich verläuft oder schwere Hirnschäden verursacht (Bohr *et al.*, 1984; Quagliariello und Scheld, 1992; deGans *et al.*, 2002). Auch bei der Meningitis spielt das Wasserstoffperoxid eine wichtige Rolle. Es bewirkt eine Blutgefäßerweiterung im Gehirn, der Blutfluss wird erhöht und es kommt zu einer zerebralen Hyperämie, einem übermäßigen Blutangebot (Hoffmann *et al.*, 2007). Auch die Ependymzellen, welche die Hirnflüssigkeit von dem eigentlichen Hirngewebe abtrennen werden massiv geschädigt. Diese Zellen besitzen, wie die Zellen in der Lunge, Flimmerhärchen. Das Wasserstoffperoxid inhibiert die Schlagfrequenz dieser Härchen und es kommt zur Lyse der Zellen (Hirst *et al.*, 2000). Die Freisetzung von  $H_2O_2$  durch *E. faecalis* bewirkt Schäden der DNA in Darmepithelzellen und kann somit die Entstehung von Darmkrebs fördern (Huycke *et al.*, 2002). Auch eine Infektion mit *M. pneumoniae* ruft oftmals neben der Lungenentzündung weitere Komplikationen bei den Patienten hervor. Unter anderem treten bei Mykoplasmeninfektionen auch Hirnhautentzündungen auf (Taylor *et al.*, 1967). Wie bei *S. pneumoniae* könnte auch hier die Wasserstoffperoxidproduktion von *M. pneumoniae* einen negativen Einfluss auf das Hirngewebe haben und zur Entstehung der Meningitis beitragen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Zellextrakte von *M. pneumoniae* einen inhibierenden Effekt auf die Wimpernaktivität von Trachealzellen haben, was wahrscheinlich auf die  $H_2O_2$ -Produktion zurückzuführen ist (Chandler und Barile, 1980).

Diese Beispiele zeigen, dass Wasserstoffperoxid ein vielseitiger Virulenzfaktor ist, der auch von anderen Organismen genutzt wird. Es entsteht immer als Nebenprodukt wichtiger Stoffwechsellzyme, die oftmals am Abbau von Kohlenstoffquellen beteiligt sind. Wie genau *M. pneumoniae* das gebildete Wasserstoffperoxid einsetzt, bleibt noch unklar. Der lysierende Effekt der Mykoplasmen auf die HeLa-Zellen konnte jedoch klar gezeigt werden (Kapitel 4.1.8).

### 5.3 Die NADH<sub>2</sub>-Oxidase von *M. pneumoniae*

Eine NADH<sub>2</sub>-Oxidase (Nox) ist in allen *Mollicutes* vorhanden und befindet sich fast ausschließlich im Cytoplasma (Pollack, 1975; Pollack, 1986; Pollack *et al.*, 1989; Pollack *et al.*, 1996). Die Ausnahme bilden hierbei die *Acholeplasma* Arten, bei denen

dieses Enzym in der Membran verankert ist (Pollack, 1975). In Bakterien wurden zwei verschiedene NADH<sub>2</sub>-Oxidasen beschrieben. Die Nox von *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus pyogenes* oder *E. faecalis* sind Beispiele für H<sub>2</sub>O-bildende Oxidasen, während *Thermus thermophilus*, *Amphibacillus xylanus* oder *Salmonella thyphimurium* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bildende NADH<sub>2</sub>-Oxidasen besitzen (Koike *et al.*, 1985; Ross und Claiborne, 1992; Park *et al.*, 1992; Niimura *et al.*, 1993; Niimura *et al.*, 1995; Gibson *et al.*, 2000). Sequenzvergleiche haben gezeigt, dass die NADH<sub>2</sub>-Oxidase von *M. pneumoniae* am meisten Ähnlichkeit mit den H<sub>2</sub>O-bildenden Oxidasen von *E. faecalis* und *S. pyogenes* besitzt (Schmidt *et al.*, 1986; Gibson *et al.*, 2000).

In der Anwesenheit von Glukose ist *M. pneumoniae* in der Lage, Wasserstoffperoxid freizusetzen (Cohen und Somerson, 1969). Es konnte ebenfalls in dieser Arbeit gezeigt werden, dass dieser Organismus bis zu 2 µg/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> freisetzt, wenn man Glukose zu den Zellen gibt (Kapitel 4.1.7). Jedoch war bisher nicht klar, welches Enzym hierfür zuständig ist. In *M. gallisepticum* ist die NADH<sub>2</sub>-Oxidase in der Lage, Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid zu reduzieren (Smith *et al.*, 1963). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob auch in *M. pneumoniae* die Nox diese Reaktion katalysieren kann. Das Protein wurde aufgereinigt und in einem Enzymassay näher charakterisiert, wobei sich herausstellte, dass die Nox enzymatisch aktiv ist (Kapitel 4.1.9). Es war jedoch nicht möglich, die Freisetzung von Wasserstoffperoxid zu messen. Dies könnte zum einen daran liegen, dass der Assay für die Messung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht geeignet war. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass *M. pneumoniae* zwei verschiedene NADH<sub>2</sub>-Oxidasen besitzt, nämlich eine die Wasser und eine die Wasserstoffperoxid produziert, obwohl in dem Genom nur eine Nox annotiert wurde. Erste Hinweise auf die Anwesenheit von zwei Oxidasen in Zellextrakten von *M. pneumoniae* wurden bereits veröffentlicht (Low und Zimkus, 1973).

Eine phylogenetische Studie der H<sub>2</sub>O-bildenden Nox aus *S. pneumoniae* zeigt, dass die Nox aus *M. pneumoniae* nah mit diesem Enzym verwandt ist (Auzat *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2001). Demnach könnte es sich bei der aufgereinigten NADH<sub>2</sub>-Oxidase um eine wasserbildende Oxidase handeln.

Bereits in *S. mutans*, die wie *M. pneumoniae* ebenfalls keine Katalase besitzen, konnte gezeigt werden, dass zwei verschiedene NADH<sub>2</sub>-Oxidasen exprimiert werden (Higuchi *et al.*, 1993). Die Oxidase Nox-2, welche Sauerstoff zu Wasser reduziert, wird für die Regenerierung des NAD<sup>+</sup> für die Glykolyse verwendet (Higuchi, 1992). Bei

oxidativem Stress hingegen scheint die Oxidase Nox-1 eine wichtige Rolle zu spielen. Dieses Protein ist homolog zu der Flavoproteinkomponente AhpF der Alkylhydroperoxidreduktase (AhpR), welche aus AhpF und AhpC besteht. Die Nox-1 kann mit einem AhpC-Homolog bei Anwesenheit von Sauerstoff Wasserstoffperoxid zu Wasser umwandeln und ist damit ein Zweikomponenten Peroxidasesystem in *S. mutans* (Poole *et al.*, 2000).

Die wasserbildende NADH<sub>2</sub>-Oxidase Nox-2 spielt in *S. agalactiae* eine wichtige Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass eine Nox-2 Mutante Defekte in der Fettsäurebiosynthese aufweist und in Mäusen eine schwächere Virulenz aufweist (Yamamoto *et al.*, 2006). Auch *nox*-Mutanten von *S. pneumoniae*, *E. faecium* und dem Spirochet *Brachyspira hyodysenteriae* sind weniger pathogen als die Wildtyp-Zellen (Stanton *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2001; Moy *et al.*, 2004). Bei dem fakultativ anaeroben Humanpathogen *S. pneumoniae* wird die Kompetenz durch eine Deletion der NADH<sub>2</sub>-Oxidase stark reduziert und man nimmt an, dass die Oxidase in diesem Organismus als Sauerstoffsensordient und dieses Signal weiterleitet (Auzat *et al.*, 1999). In *S. pyogenes* sind *nox*-Mutanten nicht mehr in der Lage, in Anwesenheit von hohen Sauerstoffkonzentrationen zu wachsen (Gibson *et al.*, 2000).

Zur näheren Charakterisierung der NADH<sub>2</sub>-Oxidase aus *M. pneumoniae* wäre die Isolierung einer *nox*-Mutante sehr hilfreich. Es stellte sich jedoch heraus, dass es keine Mutante in der Transposonbank gibt und das Gen demnach wohl, im Gegensatz zu anderen Organismen, essentiell ist. In einer *nox*-Mutante hätte man sehen können, ob das Wasserstoffperoxid bei Zugabe von Glukose von diesem Enzym produziert wird. Des Weiteren hätte man untersuchen können, ob eine solche Mutante, wie bereits in anderen Organismen beschrieben, weniger pathogen ist.

Obwohl die Möglichkeit besteht, dass in *M. pneumoniae* zwei verschiedene NADH<sub>2</sub>-Oxidasen vorhanden sind, lässt sich dies bisher nicht beweisen. Es nicht möglich eine *nox*-Mutante zu isolieren und es wurde keine weitere NADH<sub>2</sub>-Oxidase im Genom annotiert. Sequenzuntersuchungen konnten ebenfalls keine weitere NADH<sub>2</sub>-Oxidase, die Ähnlichkeiten mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bildenden NADH<sub>2</sub>-Oxidasen aufweist, identifizieren. Auch gibt es offensichtlich kein Protein, welches ähnlich zu AhpF von *S. mutans* ist. Daher kann es auch sein, dass ein anderes Enzym in Anwesenheit von Glukose im Medium Wasserstoffperoxid produziert.

#### 5.4 Proteinphosphorylierung: ein wichtiger Regulationsmechanismus in *M. pneumoniae*?

Die Proteinphosphorylierung ist eine weit verbreitete posttranslationale Modifikation, die sowohl bei Eukaryoten als auch bei Prokaryoten weit verbreitet ist. Die Ser/Thr/Tyr-Kinasen und die dazugehörenden Phosphatasen wurden zuerst in Eukaryoten beschrieben (Ben-David *et al.*, 1991; Rossomando *et al.*, 1992).

Der MAP-Kinase Signalweg ist von den Hefezellen bis zum Menschen hochkonserviert und besteht aus mehreren Kinasen und inaktivierenden Phosphatasen (Ferrell, 1996; Morrison und Davis, 2003). Bei den Hefen regulieren die MAP-Kinasen die Bildung von diploiden Zellen (Choi *et al.*, 1994), das filamentöse Wachstum (Gagiano *et al.*, 2002), den High Osmolarity Glycerol (HOG) Weg (Han *et al.*, 1994), die Translation, die Transkription und viele andere wichtige Prozesse in der Zelle (Chen *et al.*, 2001; Kyriakis und Avruch, 2001). Die MAP-Kinasen und Phosphatasen kommen jedoch nicht in Prokaryoten vor.

In Bakterien wurde vor kurzem die Phosphatase PrpC, welche Ähnlichkeiten zu PP2C, einer Phosphatase aus dem Menschen, aufweist, beschrieben (Obuchowski *et al.*, 2000). Die Phosphatase wird in Hefen und Säugerzellen bei Umweltstress aktiviert und bewirkt die Umkehrung der Proteinkinasekaskade (Gaits *et al.*, 1997; Hanada *et al.*, 1998). Auch in Mykoplasmen wurde diese Phosphatase beschrieben (Bork *et al.*, 1996; Fraser *et al.*, 1995). Interessanterweise ist diese Phosphatase in *M. pneumoniae* in der Lage, das HPr(Ser-P) zu dephosphorylieren. Diese Aufgabe wird in anderen Bakterien, wie zum Beispiel in *B. subtilis*, von der HPrK/P übernommen (Halbedel *et al.*, 2006). Es bleibt unklar, welche weiteren Prozesse die Phosphatase in Bakterien reguliert.

Eine Untersuchung der Operonstruktur in *B. subtilis* hat gezeigt, dass hinter dem Gen für die Phosphatase eine Kinase kodiert wird (Obuchowski *et al.*, 2000; Iwanicki *et al.*, 2005). Diese Kinase weist Ähnlichkeiten zu der Hanks-Kinase-Familie aus Eukaryoten auf (Hanks und Hunter, 1995). Die Phosphatase und die Kinase findet man in vielen anderen Bakterien und sie bilden immer ein Operon (Abb. 5.1.). Über die Funktion der Phosphatase und der Kinase ist bisher jedoch nur wenig bekannt.



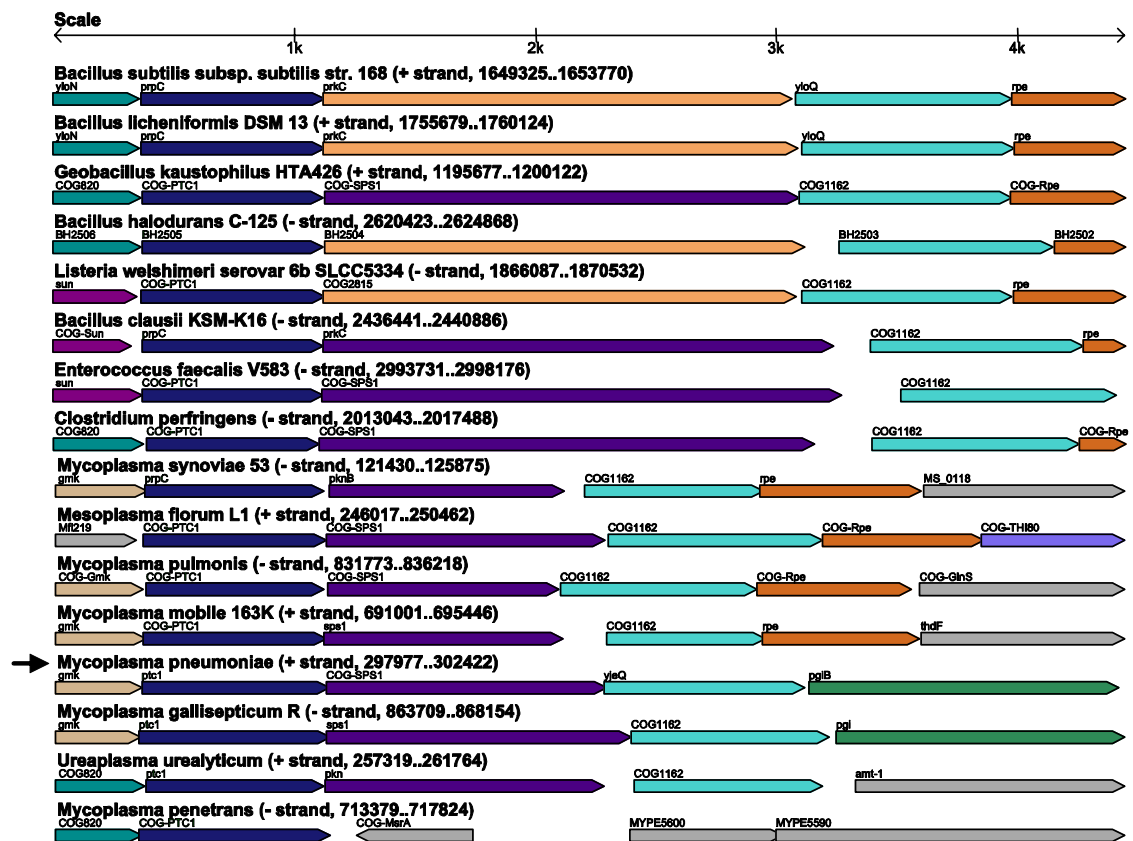
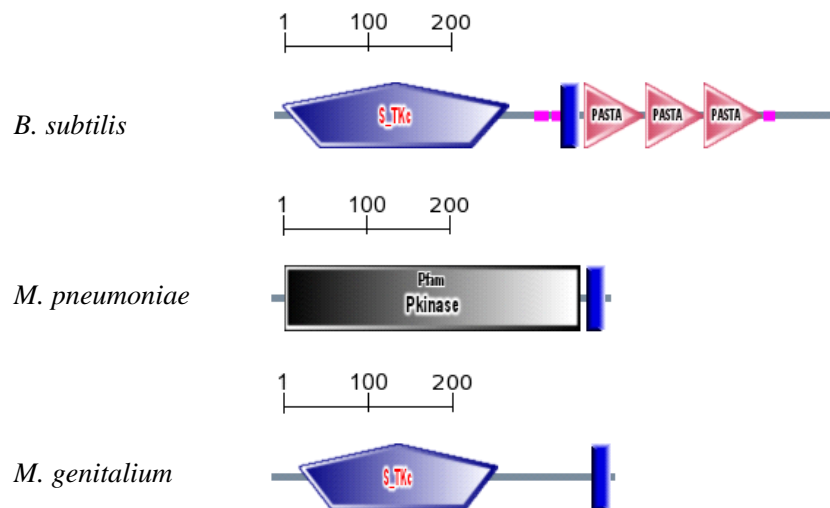


Abb. 5.1. Alignment des *prpC-prkC*-Operons (dunkelblau und lila) in verschiedenen Bakterien

Es fällt auf, dass die Gene für die Phosphatase und die Kinase nur in Gram-positiven Bakterien zu finden sind. Nur *M. penetrans* bildet hier eine Ausnahme (Abb. 5.1). Man sieht auch, dass die Gene der Kinase bei den Mykoplasmen deutlich kleiner sind als bei den anderen Organismen. Die Mykoplasmen haben im Gegensatz zu allen anderen Gram-positiven Bakterien keine Zellwand. Schaut man sich nun in Abb. 5.2. die Domänen von *prkC* in *B. subtilis*, *M. pneumoniae* und *M. genitalium* genauer an, so wird klar, dass es einen Zusammenhang zwischen Zellwand und Genlänge gibt.



**Abb. 5.2. Domänen von PrkC aus *B. subtilis*, *M. pneumoniae* und *M. genitalium*.**

PrkC von *B. subtilis* besitzt 4 verschiedene Domänen: Das Kästchen gibt die Kinase-Domäne an, die kleinen pinken Kästchen sind Regionen mit niedriger Komplexität, der blaue Balken stellt eine Transmembran-Domäne dar und die Dreiecke sind PASTA-Domänen. Bei *M. pneumoniae* und *M. genitalium* sind die Kinase-Domäne und die Transmembran-Domäne vorhanden.

Bei den Mykoplasmen sind eine Kinase-Domäne und eine Transmembran-Domäne vorhanden. Dies deutet darauf hin, dass das Protein in der Cytoplasmamembran verankert ist. Damit kann die Kinase vielleicht ein Signal aus der Umwelt wahrnehmen und durch Phosphorylierung von Substraten eine Antwort in der Zelle hervorrufen. Bis auf die so genannten PASTA-Domänen sind die Kinasen von *B. subtilis* und den Mykoplasmen gleich. Die PASTA-Domäne steht für Penicillin-bindendes Protein und zugehörige Serin/Threonin Kinase Domäne. Dieser Proteinteil ist wohl in der Lage, nicht vernetztes Peptidoglykan schwach zu binden. Man vermutet, dass die PASTA-Domäne Zellwandschäden detektiert und das Signal an den Zellwand-Biosynthese-Weg weiterleitet (Yeats *et al.*, 2002). Da die Mykoplasmen jedoch keine Zellwand besitzen, benötigen sie auch keine PASTA-Domäne und die Kinase scheint hier eine andere Funktion zu übernehmen. Daher sind die *prkC*-Gene in allen Mykoplasmen kürzer als bei den anderen Gram-positiven Bakterien.

Eine wichtige Eigenschaft von PrkC ist die Autophosphorylierung, die bei *B. subtilis* gezeigt werden konnte (Obuchowski *et al.*, 2000). Die *in-vitro* Phosphorylierung der Kinase aus *M. pneumoniae* hat gezeigt, dass in Anwesenheit von ATP ebenfalls eine Autophosphorylierung stattfindet (Kapitel 4.3.2).

Die Untersuchung des Phosphoproteoms von *M. pneumoniae* hat gezeigt, dass viele Proteine phosphoryliert werden (Su *et al.*, 2007). Darunter waren zum Beispiel die

Laktatdehydrogenase und viele Adhäsionsproteine. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob PrkC in der Lage ist, die Laktatdehydrogenase oder HPr zu phosphorylieren. Es stellte sich heraus, dass keines dieser Proteine durch die Kinase phosphoryliert wird (Kapitel 4.3.2). PrkC aus *B. subtilis* kann im Gegensatz zu dem Protein aus *M. pneumoniae* HPr am Serin12 phosphorylieren (Pietack, 2007). Die Kinasen scheinen demnach unterschiedliche Substratspezifitäten zu haben.

Es bleibt auch unklar, welche Kinase die Phosphorylierung der Laktatdehydrogenase übernimmt und welche Funktion diese hat. Außer PrkC ist bisher nur die HPr-Kinase in *M. pneumoniae* beschrieben worden. Diese wurde ebenfalls bei einem *in-vitro* Assay eingesetzt, um herauszufinden, ob die Kinase Ldh phosphoryliert. Da die HPr-Kinase und die Laktatdehydrogenase die gleiche molekulare Größe haben, kann man nicht sagen, ob man nur die Autophosphorylierung der Kinase sieht oder auch die Phosphorylierung der Ldh (Kapitel 4.3.2). Hier müssten weitere Experimente durchgeführt werden, um die entsprechende Kinase zu finden.

Die Isolierung der *prkC*-Mutante zeigte, dass diese Mutante nicht mehr in der Lage ist, adhäsiv an Oberflächen zu wachsen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Kinase möglicherweise die Phosphorylierung der Adhäsionsproteine direkt oder indirekt steuert (Su *et al.*, 2007). Ein vermindertes Wachstum der *prkC*-Mutante mit Glukose als C-Quelle nicht festgestellt werden. In *B. subtilis* bewirkt die Deletion der Kinase eine stark verminderte Zelldichte in der späten stationären Phase, was eventuell daran liegt, dass die Aktivität des Elongationsfaktors EF-G nicht mehr reguliert wird und die Translationsrate unkontrolliert ansteigt (Gaidenko *et al.*, 2002). Hier scheint PrkC auch an der Sporulation und der Biofilmbildung beteiligt zu sein (Madec *et al.*, 2002). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass PrkC zumindest *in-vitro* Enzyme aus dem Zitratzyklus, dem GOGAT-Zyklus, dem Pentose-Phosphat-Weg und dem Überfluss-Stoffwechsel phosphorylieren kann. Auch in anderen Organismen scheint die Kinase eine wichtige Rolle zu spielen. Vor kurzem hat man herausgefunden, dass eine *prkC*-Mutante von *E. faecalis* wesentlich sensitiver auf Antibiotika reagiert und die Persistenz in Mäusen ist wesentlich herabgesetzt (Kristich *et al.*, 2007). Obwohl PrkC in keinem der bisher untersuchten Organismen essentiell ist, scheint es jedoch in allen wichtige physiologische Prozesse zu regulieren. Vor allem in Mykoplasmen, bei denen bisher nur die Transkriptionsregulation durch HrcA beschrieben wurde, scheint die posttranslationale Modifikation in Form von Phosphorylierung eine wichtige Rolle zu

übernehmen (Fehri *et al.*, 2005; Musatovova *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2008). Offensichtlich wird hier der komplexe Aufbau des Zytoskeletts durch Proteinmodifikation gesteuert.

Da die Transposoninsertion in PrkC bewirkt, dass die Zellen sich nicht mehr auf Oberflächen anlagern, wurde untersucht, ob dies auch einen Effekt auf die Zytotoxizität hat (Kapitel 4.2.11). Es stellte sich heraus, dass die *prkC*-Mutante nicht mehr zytotoxisch auf die HeLa-Zellen wirkt. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Mykoplasmen nicht mehr in der Lage sind, sich an die Wirtszellen anzuheften. Bei *M. mycoides* konnte bereits gezeigt werden, dass der enge Kontakt zu den eukaryotischen Zellen wichtig ist, um die Zellschäden hervorzurufen (Pilo *et al.*, 2005).

Wie bereits erwähnt, spielt die Kinase auch eine wichtige Rolle bei der Persistenz von *E. faecalis* in Mäusen (Kristich *et al.*, 2007). Die Kinase in *S. pyogenes* scheint einen Einfluss auf die Oberflächenproteine zu haben. Zum einen ist die Zellmorphologie verändert und zum anderen sind Mutanten nicht mehr in der Lage, an humane Pharynxzellen zu adhären (Jin und Pancholi, 2006). *S. pneumoniae* und *S. agalactiae* besitzen ebenfalls Homologe zu PrkC und deren Funktion wurde ebenfalls bereits untersucht. Die Kinase aus *S. pneumoniae* hat neben seiner aktivierenden Rolle der Kompetenzgene offensichtlich auch einen Einfluss auf die Etablierung der Virulenz (Echenique *et al.*, 2004). Vor allem die Invasion der Blutbahn, aber auch der Lunge scheinen durch eine Deletion von *prkC* beeinträchtigt zu sein. In *S. agalactiae* bewirkt eine *prkC*-Mutante die Bildung von Ketten, was ein Hinweis darauf ist, dass nach der Teilung die Trennung der Zellen nicht mehr stattfinden kann. Bei diesen Mutanten war ebenfalls die Virulenz herabgesetzt. Jedoch konnte man nicht genau sagen, ob dies ein Effekt der fehlerhaften Trennung der Zellen ist oder ob die Kinase ein unbekanntes Substrat reguliert, welches für die Virulenz wichtig ist (Rajagopal *et al.*, 2003). Man hat später herausgefunden, dass die Kinase einen Regulator phosphoryliert, der dann nicht mehr in der Lage ist, die Expression von Zytotoxinen zu reprimieren (Rajagopal *et al.*, 2006). *In vitro*-Phosphorylierungen haben gezeigt, dass diese Kinase in der Lage ist, eine Mangan-abhängige anorganische Pyrophosphatase zu phosphorylieren (Rajagopal *et al.*, 2003). Diese Pyrophosphatasen sind wohl für die Regulierung des intrazellulären  $PP_i$ -Spiegels zuständig und die Veränderung ihrer Aktivität hat globale Effekte auf den Zellmetabolismus, das Wachstum und die Teilung der Zellen (Lahti, 1983). Ein Homolog dieser Pyrophosphatase ist in *S. gordonii* an der Regulation der Expression

von Adhäsinen beteiligt, die für die Koaggregation zuständig sind (Whittaker *et al.*, 1996).

Die Ser/Thr/Tyr-Kinasen und die entsprechende Phosphatase scheinen in den Gram-positiven Bakterien unterschiedliche Funktionen zu übernehmen. Es wird jedoch deutlich, dass in den pathogenen Bakterien das Fehlen der Kinase immer einen negativen Effekt auf die Virulenz hat. Mal können die Bakterien nicht mehr adhären, mal sind sie sensitiver gegenüber Antibiotika und können nicht im Wirt überleben. Die regulatorische Funktion ist zwar nicht essentiell, da immer Mutanten isoliert werden können, aber das Wachstum und die Morphologie sind sichtbar verändert. Es bleibt herauszufinden, welche Prozesse in *M. pneumoniae* von PrkC beeinflusst werden und welches Signal aus der Umwelt an die Zelle weitergegeben wird.

## 5.5 Das PTS und die Virulenz

Das Phosphotransferasesystem dient den Bakterien zur Aufnahme und gleichzeitigen Phosphorylierung von Zuckern. Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 2.3) beschrieben, kann die HPr-Kinase in diesem System regulatorische Aufgaben übernehmen. In *M. pneumoniae* konnte die Funktion der HPr-Kinase bzw. des HPr(Ser-P) bisher nicht näher charakterisiert werden. Daher wurde die Zytotoxizität einer *hprK*-Mutante untersucht, um herauszufinden, ob die Kinase eine regulatorische Rolle bei der Pathogenität übernimmt (Kapitel 4.2.8). Es stellte sich heraus, dass die *hprK*-Mutante nicht mehr toxisch gegenüber den HeLa-Zellen ist. Auch in anderen pathogenen Bakterien spielt die HPr-Kinase-Aktivität eine wichtige Rolle bei der Etablierung der Pathogenität. Im Gegensatz zu *M. pneumoniae* ist in diesen Organismen die Transkriptionsregulation der Virulenzgene durch den HPr(Ser-P)/CcpA-Komplex von großer Bedeutung für die Expression von Virulenzfaktoren oder Anhaftungsmechanismen.

Bei *S. pyogenes* wird die Expression des Responseregulators Mga durch CcpA aktiviert (Almengor *et al.*, 2007). Der Regulator Mga ist an der Regulation verschiedener Virulenzgene beteiligt, die es den Bakterien ermöglichen, an das Gewebe zu adhären, in die Wirtszellen einzudringen und das Immunsystem zu umgehen. Auch die Expression des Oberflächenproteins M, welches die Phagozytose inhibiert und die Invasion der Wirtszelle erleichtert, wird von Mga aktiviert. Die Proteinproduktion

ist dabei zuckerabhängig (Pine und Reeves, 1978). Man geht davon aus, dass bei der Besiedlung von neuem Gewebe eine gute Kohlenstoffquelle zur Verfügung steht, die es *S. pyogenes* ermöglicht, in die exponentielle Wachstumsphase überzugehen. Dabei tritt die Kohlenstoffkatabolitenrepression ein, die die Expression des Virulenzregulators Mga aktiviert und so die Virulenzgene anschaltet. Der Kohlenstoffwechsel scheint demnach im Zusammenhang mit der Virulenz zu stehen.

In *Clostridium perfringens* wird die Ausbildung der Pili und somit die Gleitbewegung durch Glukose bzw. die Kohlenstoffkatabolitenrepression inhibiert. Interessanterweise wird bei Abwesenheit von Glukose die Expression der Piligene durch den HPr(Ser-P)/CcpA-Komplex induziert (Mendez *et al.*, 2008). In dem Darmlumen des Menschen ist nur wenig Glukose vorhanden (Ferraris *et al.*, 1990). Hier sind die Clostridien also in der Lage, zu gleiten und Toxine freizusetzen.

Eine *ccpA*-Mutante von *S. pneumoniae* ist nicht mehr in der Lage, den Nasopharynx zu besiedeln und Lungenentzündung in Mäusen hervorzurufen (Iyer *et al.*, 2005). In diesem Organismus reguliert HPr(Ser-P)/CcpA-Komplex nicht die Expression von Virulenzgenen, sondern Gene die für die Synthese von Polysacchariden der Kapsel zuständig sind (Giammarinaro und Paton, 2002). Ohne diese Polysaccharide können sich die Streptococcen nicht mehr an die Wirtszellen anlagern.

Demnach zeigen Mutanten des regulatorischen Weges des PTS oftmals eine verringerte Pathogenität. Dies bestätigt die Ergebnisse, die mit der *hprK*-Mutante aus *M. pneumoniae* erhalten wurden. Es bleibt jedoch noch herauszufinden, welche Gene oder Proteine durch die HPr-Kinase bzw. HPr(Ser-P) beeinflusst werden, damit die Mykoplasmen ihre Zytotoxizität entfalten können.

## 5.6 Ausblick

Die posttranslationale Modifikation bzw. Proteinphosphorylierung scheint, im Gegensatz zur Transkriptionsregulation, eine wichtige Rolle in *M. pneumoniae* zu spielen. Es wird daher interessant sein, mit Hilfe von Proteomanalysen die Substrate der PrkC näher zu charakterisieren. Dabei sollte herausgefunden werden, wie die Kinase zum Aufbau der Tipstruktur beiträgt. Auch der Zusammenhang zwischen der HPr-Kinase aus dem PTS und der Zytotoxizität sollte weiter untersucht werden. Hier würde sich ebenfalls eine Proteomanalyse anbieten. Bei dieser Untersuchung könnte auch

geklärt werden, ob die HPr-Kinase auch für die Phosphorylierung der Laktatdehydrogenase zuständig ist.

Des Weiteren können mit Hilfe des etablierten Infektionsmodells weitere Mutanten auf ihre Zytotoxizität untersucht werden. Die Virulenzmechanismen und die Regulation der Virulenz kann somit besser untersucht und in einen Zusammenhang gestellt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

**Abdallah, A.M., Gey van Pittius, N.C., Champion, P.A., Cox, J., Luirink, J., Vandembroucke-Grauls, C.M., Appelmek, B.J. & Bitter, W. (2007):** Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* **5(11)**, 883-891.

**Aizawa, S.I. (2001):** Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol Lett* **202(2)**, 157-164.

**Almengor, A.C., Kinkel, T.L., Day, S.J. & McIver, K.S. (2007):** The catabolite control protein CcpA binds to PmgA and influences expression of the virulence regulator Mga in the Group A streptococcus. *J Bacteriol* **189(23)**, 8405-8416.

**Anders, R.F., Hogg, D.M. & Jago G.R. (1970):** Formation of hydrogen peroxide by group N streptococci and its effect on their growth and metabolism. *Appl Microbiol* **19(4)**, 608-612.

**Andreev, J., Borovsky, Z., Rosenshine, I. & Rottem, S. (1995):** Invasion of HeLa cells by *Mycoplasma penetrans* and the induction of tyrosine phosphorylation of a 145-kDa host cell protein. *FEMS Microbiol Lett* **132(3)**, 189-194.

**Armstrong, J.A. & Hart, P.D. (1971):** Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med* **34**, 713-740.

**Asnis, R.E. & Brodie, A.F. (1953):** A glycerol dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **203(1)**, 153-159.

**Auzat, I., Chapuy-Regaud, S., Le Bras, G., Dos Santos, D., Ogunniyi, A.D., Le Thomas, I., Garel, J.R., Paton, J.C. & Trombe, M.C. (1999):** The NADH oxidase of *Streptococcus pneumoniae*: its involvement in competence and virulence. *Mol Microbiol* **34(5)**, 1018-1028.

**Balish, M.F., Santurri, R.T., Ricci, A.M., Lee, K.K. & Krause, D.C. (2003):** Localization of *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-associated protein HMW2 by fusion with green fluorescent protein: implications for attachment organelle structure. *Mol Microbiol* **47(1)**, 49-60.

**Batdorj, B., Trinetta, V., Dalgarrondo, M., Prévost, H., Dousset, X., Ivanova, I., Haertlé, T. & Chobert, J.M. (2007):** Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. *J Appl Microbiol* **103(3)**, 584-593.

**Beckwith, J.R. (1967):** Regulation of the lac operon. Recent studies on the regulation of lactose metabolism in *Escherichia coli* support the operon model. *Science* **156(3775)**, 597-604.



- Behrens, A., Heller, M., Kirchhoff, H., Yogev, D. & Rosengarten, R. (1994):** A family of phase- and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (Vsps) of *Mycoplasma bovis*. *Infect Immun* **62**(11), 5075-5084.
- Ben-David, Y., Letwin, K., Tannock, L., Bernstein, A. & Pawson, T. (1991):** A mammalian protein kinase with potential for serine/threonine and tyrosine phosphorylation is related to cell cycle regulators. *EMBO J* **10**(2), 317-325.
- Berman, M. & Lin, E. C. (1971).** Glycerol-specific revertants of a phosphoenolpyruvate phosphotransferase mutant: suppression by the desensitization of glycerol kinase to feedback inhibition. *J Bacteriol* **105**, 113-120.
- Bhakdi, S., Muhly, M., Mannhardt, U., Hugo, F., Klapettek, K., Mueller-Eckhardt, C. & Roka, L. (1988):** Staphylococcal alpha toxin promotes blood coagulation via attack on human platelets. *J Exp Med* **168**(2), 527-542.
- Bhakdi, S. & Trandum-Jensen, J. (1988):** Damage to cell membranes by pore-forming bacterial cytolysins. *Prog Allergy* **40**, 1-43.
- Bhakdi, S. & Trandum-Jensen, J. (1991):** Alpha-toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Rev* **55**(4), 733-751.
- Bi, W. & Stambrook, P. J. (1998).** Site-directed mutagenesis by combined chain reaction. *Anal Biochem* **256**, 137-140.
- Bischof, D.F., Janis, C., Vilei, E.M., Bertoni, G. & Frey, J. (2008):** Cytotoxicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type to bovine epithelial cells. *Infect Immun* **76**(1), 263-269.
- Bohr, V., Paulson, O.B. & Rasmussen, N. (1984):** Pneumococcal meningitis. Late neurologic sequelae and features of prognostic impact. *Arch Neurol* **41**(10), 1045-1049.
- Bolm, M., Jansen, W.T., Schnabel, R. & Chhatwal, G.S. (2004):** Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans*: a common feature of different streptococcal species. *Infect Immun* **72**(2), 1192-1194.
- Bork, P., Brown, N.P., Hegyi, H. & Schultz, J. (1996):** The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues. *Protein Sci* **5**(7), 1421-1425.
- Boyer, M.J. & Wise, K.S. (1989):** Lipid-modified surface protein antigens expressing size variation within the species *Mycoplasma hyorhinis*. *Infect Immun* **57**(1), 245-254.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brennan, P.C. & Feinstein, R.N. (1968):** Secretion of hydrogen peroxide as a virulence factor for *Mycoplasma pulmonis*. ANL-7535. *ANL Rep* 181-183.

- Brückner, R. & Titgemeyer, F. (2002):** Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol Lett* **209(2)**:141-8
- Brunner, H., Feldner, J. & Bredt, W. (1984):** Effect of monoclonal antibodies to the attachment-tip on experimental *Mycoplasma pneumoniae* infection of hamsters. A preliminary report. *Isr J Med Sci* **20(9)**, 878-881.
- Burns, D.L. (2003):** Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol* **6(1)**, 29-34.
- Burton, R.M. & Kaplan, N.O. (1953):** A Dpn Specific Glycerol Dehydrogenase from *Aerobacter-Aerogenes*. *J Am Chem Soc* **75(4)**, 1005-1006.
- Chandler, D.K. & Barile, M.F. (1980):** Ciliostatic, hemagglutinating, and proteolytic activities in a cell extract of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* **29(3)**, 1111-1116.
- Chang LJ, Chen WH, Minion FC & Shiuan D. (2008):** Mycoplasmas regulate the expression of heat-shock protein genes through CIRCE-HrcA interactions. *Biochem Biophys Res Commun* **367(1)**, 213-218.
- Chanock, R. M., Mufson, M. A., Somerson, N. L. & Couch, R. B. (1963).** Role of Mycoplasma (Pplo) in Human Respiratory Disease. *Am Rev Respir Dis* **88**, SUPPL 218-39.
- Charrier, V., Buckley, E., Parsonage, D., Galinier, A., Darbon, E., Jaquinod, M., Forest, E., Deutscher, J. & Claiborne, A. (1997).** Cloning and sequencing of two enterococcal glpK genes and regulation of the encoded glycerol kinases by phosphoenolpyruvate-dependent, phosphotransferase system-catalyzed phosphorylation of a single histidyl residue. *J Biol Chem* **272**, 14166-14174.
- Chen, Z., Gibson, T.B., Robinson, F., Silvestro, L., Pearson, G., Xu, B., Wright, A., Vanderbilt, C. & Cobb, M.H. (2001):** MAP kinases. *Chem Rev* **101(8)**, 2449-2476.
- Cherry, J.D. & Taylor-Robinson, D. (1970):** Growth and Pathogenesis of *Mycoplasma mycoides* var. *capri* in Chicken Embryo Tracheal Organ Cultures. *Infect Immun* **2(4)**:431-438.
- Choe, S., Bennett, M.J., Fujii, G., Curmi, P.M., Kantardjieff, K.A., Collier, R.J. & Eisenberg, D. (1992):** The crystal structure of diphtheria toxin. *Nature* **357(6375)**:216-222.
- Choi, K.Y., Satterberg, B., Lyons, D.M. & Elion, E.A. (1994):** Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* **78(3)**, 499-512.

**Christie, P.J. (1997):** *Agrobacterium tumefaciens* T-complex transport apparatus: a paradigm for a new family of multifunctional transporters in eubacteria. *J Bacteriol* **179(10)**, 3085-3094.

**Ciccarelli, F.D., Doerks, T., von Mering, C., Creevey, C.J., Snel, B. & Bork, P. (2006):** Toward automatic reconstruction of a highly resolved tree of life. *Science* **311(5765)**, 1283-1287.

**Cirillo, V.P. & Razin, S. (1973):** Distribution of a phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system in mycoplasmas. *J Bacteriol* **113(1)**, 212-217.

**Cochu, A., Roy, D., Vaillancourt, K., Lemay, J.D., Casabon, I., Frenette, M., Moineau, S. & Vadeboncoeur, C. (2005):** The doubly phosphorylated form of HPr, HPr(Ser~P)(His-P), is abundant in exponentially growing cells of *Streptococcus thermophilus* and phosphorylates the lactose transporter LacS as efficiently as HPr(His~P). *Appl Environ Microbiol* **71(3)**, 1364-1372.

**Cohen, G. & Somerson, N.L. (1967).** *Mycoplasma pneumoniae*: hydrogen peroxide secretion and its possible role in virulence. *Ann N Y Acad Sci* **143**, 85-87.

**Cohen, G. & Somerson, N.L. (1969):** Glucose-dependent secretion and destruction of hydrogen peroxide by *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **98(2)**, 547-551.

**Dallo, S.F. & Baseman, J.B. (2000):** Intracellular DNA replication and long-term survival of pathogenic mycoplasmas. *Microb Pathog* **29(5)**, 301-309.

**Dandekar, T., Huynen, M., Regula, J. T., Ueberle, B., Zimmermann, C. U., Andrade, M. A., Doerks, T., Sanchez-Pulido, L., Snel, B., Suyama, M. et al. (2000).** Re-annotating the *Mycoplasma pneumoniae* genome sequence: adding value, function and reading frames. *Nucleic Acids Res* **28**, 3278-3288.

**Darbon, E., Ito, K., Huang, H. S., Yoshimoto, T., Poncet, S. & Deutscher, J. (1999).** Glycerol transport and phosphoenolpyruvate-dependent enzyme I- and HPr-catalysed phosphorylation of glycerol kinase in *Thermus flavus*. *Microbiology* **145 ( Pt 11)**, 3205-3212.

**Darbon, E., Servant, P., Poncet, S. & Deutscher, J. (2002):** Antitermination by GlpP, catabolite repression via CcpA and inducer exclusion triggered by P-GlpK dephosphorylation control *Bacillus subtilis* glpFK expression. *Mol Microbiol* **43(4)**, 1039-1052.

**de Boer, M., Broekhuizen, C. P. & Postma, P. W. (1986).** Regulation of glycerol kinase by enzyme III<sub>Glc</sub> of the phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system. *J Bacteriol* **167**, 393-395.

**de Gans, J. & van de Beek, D. (2002):** European Dexamethasone in Adulthood Bacterial Meningitis Study Investigators. Dexamethasone in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* **347(20)**, 1549-1556.

**de Verdier, C.H. (1952):** Isolation of phosphothreonine from bovine casein. *Nature* **170(4332)**, 804-805.

**Deutscher, J. & Saier M.H. (2005):** Ser/Thr/Tyr protein phosphorylation in bacteria - for long time neglected, now well established. *J Mol Microbiol Biotechnol* **9(3-4)**, 125-131.

**Deutscher, J. & Sauerwald, H. (1986).** Stimulation of dihydroxyacetone and glycerol kinase activity in *Streptococcus faecalis* by phosphoenolpyruvate-dependent phosphorylation catalyzed by enzyme I and HPr of the phosphotransferase system. *J Bacteriol* **166**, 829-836.

**Dhandayuthapani, S., Blaylock, M.W., Bebear, C.M., Rasmussen, W.G. & Baseman, J.B. (2001):** Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in *Mycoplasma genitalium*. *J Bacteriol* **183(19)**:5645-5650.

**Dirksen, L.B., Krebes, K.A. & Krause, D.C. (1994):** Phosphorylation of cytoadherence-accessory proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **176(24)**:7499-7505.

**Djordjevic, S.P., Vilei, E.M. & Frey, J. (2003):** Characterization of a chromosomal region of *Mycoplasma* sp. bovine group 7 strain PG50 encoding a glycerol transport locus (gtsABC). *Microbiology* **149(Pt 1)**:195-204.

**Duane, P.G., Rubins, J.B., Weisel, H.R. & Janoff, E.N. (1993):** Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect Immun* **61(10)**, 4392-4397.

**Dubreuil, D., Bisailon, J.G. & Beaudet, R. (1984):** Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* growth due to hydrogen peroxide production by urogenital streptococci. *Microbios* **39**, 159-167.

**Dybvig, K. (1993):** DNA rearrangements and phenotypic switching in prokaryotes. *Mol Microbiol* **10(3)**, 465-471.

**Echenique, J., Kadioglu, A., Romao, S., Andrew, P.W. & Trombe, M.C. (2004):** Protein serine/threonine kinase StkP positively controls virulence and competence in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **72(4)**, 2434-2437.

**Esders, T.W. & Michrina, C.A. (1979):** Purification and properties of L-alpha-glycerophosphate oxidase from *Streptococcus faecium* ATCC 12755. *J Biol Chem* **254(8)**, 2710-2715.

**Farizo, K.M., Fiddner, S., Cheung, A.M. & Burns, D.L. (2002):** Membrane localization of the S1 subunit of pertussis toxin in *Bordetella pertussis* and implications for pertussis toxin secretion. *Infect Immun* **70(3)**, 1193-1201.

**Fehri, L.F., Sirand-Pugnet, P., Gourgues, G., Jan, G., Wróblewski, H. & Blanchard, A. (2005):** Resistance to antimicrobial peptides and stress response in *Mycoplasma pulmonis*. *Antimicrob Agents Chemother* **49(10)**, 4154-4165.

**Feldman C, Anderson R, Cockeran R, Mitchell T, Cole P, Wilson R. (2002):** The effects of pneumolysin and hydrogen peroxide, alone and in combination, on human ciliated epithelium in vitro. *Respir Med* **96(8)**, 580-585.

**Ferraris, R.P., Yasharpour, S., Lloyd, K.C., Mirzayan, R. & Diamond, J.M. (1990):** Luminal glucose concentrations in the gut under normal conditions. *Am J Physiol* **259**, G822-837.

**Ferrell, J.E. Jr. (1996):** Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends Biochem Sci* **21(12)**, 460-466.

**Fraser, C. M., Gocayne, J. D., White, O., Adams, M. D., Clayton, R. A., Fleischmann, R. D., Bult, C. J., Kerlavage, A. R., Sutton, G., Kelley, J. M. et al. (1995).** The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**, 397-403.

**Fujita, Y., Miwa, Y., Galinier, A. & Deutscher, J. (1995).** Specific recognition of the *Bacillus subtilis* gnt cis-acting catabolite-responsive element by a protein complex formed between CcpA and seryl-phosphorylated HPr. *Mol Microbiol* **17**, 953-960.

**Gagiano, M., Bauer, F.F. & Pretorius, I.S. (2002):** The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **2(4)**, 433-470.

**Gaidenko, T.A., Kim, T.J. & Price, CW. (2002):** The PrpC serine-threonine phosphatase and PrkC kinase have opposing physiological roles in stationary-phase *Bacillus subtilis* cells. *J Bacteriol* **184(22)**:6109-6114.

**Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S. & Sansonetti, P. (1987):** In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun* **55(11)**, 2822-2829.

**Gaits, F., Shiozaki, K. & Russell, P. (1997):** Protein phosphatase 2C acts independently of stress-activated kinase cascade to regulate the stress response in fission yeast. *J Biol Chem* **272(28)**, 17873-17879.

**Galiner, A., Haiech, J., Kilhoffer, M.C., Jaquinod, M., Stülke, J., Deutscher, J. & Martin-Verstraete, I. (1997):** The *Bacillus subtilis* crh gene encodes a HPr-like protein involved in carbon catabolite repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94(16)**, 8439-8444.

**Garnak, M. & Reeves, H.C. (1979):** Phosphorylation of Isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science* **203(4385)**, 1111-1112.

**Gey Van Pittius, N.C., Gamielien, J., Hide, W., Brown, G.D., Siezen, R.J. & Beyers, A.D. (2001):** The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biol* **2(10)**.

**Giammarinaro, P. & Paton, J.C. (2002):** Role of RegM, a homologue of the catabolite repressor protein CcpA, in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **70(10)**, 5454-5461.

**Gibson, C.M., Mallett, T.C., Claiborne, A. & Caparon, M.G. (2000):** Contribution of NADH oxidase to aerobic metabolism of *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* **182(2)**, 448-455.

**Glatz, E., Nilsson, R.P., Rutberg, L. & Rutberg, B. (1996):** A dual role for the *Bacillus subtilis* glpD leader and the GlpP protein in the regulated expression of glpD: antitermination and control of mRNA stability. *Mol Microbiol* **19(2)**, 319-328.

**Glatz, E., Farewell, A. & Rutberg, B. (1998):** The *Bacillus subtilis* glpD leader and antiterminator protein GlpP provide a target for glucose repression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **162(1)**, 93-96.

**Goldkorn, T., Balaban, N., Shannon, M., Chea, V., Matsukuma, K., Gilchrist, D., Wang, H. & Chan, C. (1998):** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> acts on cellular membranes to generate ceramide signaling and initiate apoptosis in tracheobronchial epithelial cells. *J Cell Sci* **11( Pt 21)**, 3209-3220.

**Guérout-Fleury, A.M., Shazand, K., Frandsen, N. & Stragier, P.(1995):** Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167(1-2)**, 335-336.

**Gunsalus, I.C. & Umbreit, W.W. (1945):** The Oxidation of Glycerol by *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* **49(4)**, 347-357.

**Halbedel, S., Hames, C. & Stülke, J. (2004).** In vivo activity of enzymatic and regulatory components of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **186**, 7936-7943.

**Halbedel, S., Busse, J., Schmidl, S.R. & Stülke, J. (2006):** Regulatory protein phosphorylation in *Mycoplasma pneumoniae*. A PP2C-type phosphatase serves to dephosphorylate HPr(Ser-P). *J Biol Chem* **281(36)**:26253-26259.

**Halbedel, S. (2006):** Regulation of HPr phosphorylation in *Mycoplasma pneumoniae*.

**Halbedel, S., Eilers, H., Jonas, B., Busse, J., Hecker, M., Engelmann, S. & Stülke, J. (2007):** Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*: analysis of the promoters of the *ackA* and *ldh* genes. *J Mol Biol* **371(3)**, 596-607.

**Hames, C. (2005):** Etablierung eines Systems zur ortsgerichteten Mutagenese in *Mycoplasma pneumoniae*.

**Hames, C., Halbedel, S., Schilling, O. & Stülke, J. (2005):** Multiple-mutation reaction: a method for simultaneous introduction of multiple mutations into the *glpK* gene of *Mycoplasma pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* **71**(7), 4097-4100.

**Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L. & Ulevitch, R.J. (1994):** A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* **265**(5173), 808-811.

**Hanada, M., Kobayashi, T., Ohnishi, M., Ikeda, S., Wang, H., Katsura, K., Yanagawa, Y., Hiraga, A., Kanamaru, R. & Tamura S. (1998):** Selective suppression of stress-activated protein kinase pathway by protein phosphatase 2C in mammalian cells. *FEBS Lett* **437**(3); 172-176.

**Hanks, S.K. & Hunter, T. (1995):** Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* **9**(8), 576-596.

**Heller, K.B., Lin, E.C. & Wilson, T.H. (1980).** Substrate specificity and transport properties of the glycerol facilitator of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **144**(1), 274-278.

**Higuchi, M. (1992):** Reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase involvement in defense against oxygen toxicity of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* **7**(5), 309-314.

**Higuchi, M., Shimada, M., Yamamoto, Y., Hayashi, T., Koga, T. & Kamio, Y. (1993):** Identification of two distinct NADH oxidases corresponding to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-forming oxidase and H<sub>2</sub>O-forming oxidase induced in *Streptococcus mutans*. *J Gen Microbiol* **139**(10), 2343-2351.

**Himmelreich, R., Hilbert, H., Plagens, H., Pirkl, E., Li, B. C. & Herrmann, R. (1996).** Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* **24**, 4420-4449.

**Hirst, R.A., Sikand, K.S., Rutman, A., Mitchell, T.J., Andrew, P.W. & O'Callaghan, C. (2000):** Relative roles of pneumolysin and hydrogen peroxide from *Streptococcus pneumoniae* in inhibition of ependymal ciliary beat frequency. *Infect Immun* **68**(3), 1557-1562.

**Hoffmann, O.M., Becker, D. & Weber, J.R. (2007):** Bacterial hydrogen peroxide contributes to cerebral hyperemia during early stages of experimental pneumococcal meningitis. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**(11), 1792-1797.

**Holmberg, C. & Rutberg, B. (1991):** Expression of the gene encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase (*glpD*) in *Bacillus subtilis* is controlled by antitermination. *Mol Microbiol* **5**(12), 2891-2900.

**Holmberg, C. & Rutberg, L. (1992):** An inverted repeat preceding the *Bacillus subtilis glpD* gene is a conditional terminator of transcription. *Mol Microbiol* **6**(20), 2931-2938.

**Honjo, T., Nishizuka, Y. & Hayaishi, O. (1968):** Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis.

*J Biol Chem* **243**(12), 3553-3555.

**Hummel, W. & Riebel, B. (2003):** Isolation and biochemical characterization of a new NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*. *Biotechnol Lett* **25**(1), 51-54.

**Hurley, J.H., Faber, H.R., Worthylake, D., Meadow, N.D., Roseman, S., Pettigrew, D.W. & Remington, S.J. (1993):** Structure of the regulatory complex of *Escherichia coli* III<sub>Glc</sub> with glycerol kinase. *Science* **259**(5095), 673-677.

**Huycke, M.M., Abrams, V. & Moore, D.R. (2002):** *Enterococcus faecalis* produces extracellular superoxide and hydrogen peroxide that damages colonic epithelial cell DNA. *Carcinogenesis* **23**(3), 529-536.

**Iglewski, B.H. & Kabat, D. (1975):** NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(6), 2284-2288.

**Ince, J. E., Macadam, A.M. & Knowles, C.J. (1987):** L-glycerol phosphate oxidase from *Propionibacterium freudenreichii*. *FEMS Microbiol Lett* **44**, 185-191.

**Iwanicki, A., Hinc, K., Seror, S., Wegrzyn, G. & Obuchowski, M. (2005):** Transcription in the *prpC-yloQ* region in *Bacillus subtilis*. *Arch Microbiol* **183**(6), 421-430.

**Iyer, R., Baliga, N.S. & Camilli, A. (2005):** Catabolite control protein A (CcpA) contributes to virulence and regulation of sugar metabolism in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **187**(24), 8340-8349.

**Jaffe, J.D., Stange-Thomann, N., Smith, C., DeCaprio, D., Fisher, S., Butler, J., Calvo, S., Elkins, T., FitzGerald, M.G., Hafez, N., Kodira, C.D., Major, J., Wang, S., Wilkinson, J., Nicol, R., Nusbaum, C., Birren, B., Berg, H.C. & Church, G.M. (2004):** The complete genome and proteome of *Mycoplasma mobile*. *Genome Res* **14**(8), 1447-1461.

**Jault, J. M., Fieulaine, S., Nessler, S., Gonzalo, P., Di Pietro, A., Deutscher, J. & Galinier, A. (2000).** The HPr kinase from *Bacillus subtilis* is a homo-oligomeric enzyme which exhibits strong positive cooperativity for nucleotide and fructose 1,6-bisphosphate binding. *J Biol Chem* **275**, 1773-1780.

**Jenkinson, E.J., Kingston, R., Smith, C.A., Williams, G.T. & Owen J.J. (1989):** Antigen-induced apoptosis in developing T cells: a mechanism for negative selection of the T cell receptor repertoire. *Eur J Immunol* **19**(11), 2175-2177.

**Jensen, J.S., Blom, J. & Lind, K. (1994):** Intracellular location of *Mycoplasma genitalium* in cultured Vero cells as demonstrated by electron microscopy. *Int J Exp Pathol* **75**(2), 91-98.



**Jin, H. & Pancholi, V. (2006):** Identification and biochemical characterization of a eukaryotic-type serine/threonine kinase and its cognate phosphatase in *Streptococcus pyogenes*: their biological functions and substrate identification. *J Mol Biol* **357(5)**, 1351-1372.

**Kannan, T.R. & Baseman, J.B. (2006):** ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103(17)**, 6724-6729.

**Kappler, J., Kotzin, B., Herron, L., Gelfand, E.W., Bigler, R.D., Boylston, A., Carrel, S., Posnett, D.N., Choi, Y. & Marrack, P. (1989):** V beta-specific stimulation of human T cells by staphylococcal toxins. *Science* **244(4906)**: 811-813.

**Kenri, T., Taniguchi, R., Sasaki, Y., Okazaki, N., Narita, M., Izumikawa, K., Umetsu, M. & Sasaki, T. (1999):** Identification of a new variable sequence in the P1 cytoadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*: evidence for the generation of antigenic variation by DNA recombination between repetitive sequences. *Infect Immun* **67(9)**, 4557-4562.

**Koike, K., Kobayashi, T., Ito, S. & Saitoh, M. (1985):** Purification and characterization of NADH oxidase from a strain of *Leuconostoc mesenteroides*. *J Biochem* **97(5)**, 1279-1288.

**Kormann, A.W., Hurst, R.O. & Flynn, T.G. (1972):** Purification and properties of an NADP + -dependent glycerol dehydrogenase from rabbit skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* **258(1)**, 40-55.

**Krause, D.C. (1996):** *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: unravelling the tie that binds. *Mol Microbiol* **20(2)**, 247-253.

**Krause, D.C. & Balish, M.F. (2001):** Structure, function, and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **198(1)**, 1-7.

**Kravanja, M., Engelmann, R., Dossonnet, V., Bluggel, M., Meyer, H. E., Frank, R., Galinier, A., Deutscher, J., Schnell, N. & Hengstenberg, W. (1999).** The *hprK* gene of *Enterococcus faecalis* encodes a novel bifunctional enzyme: the HPr kinase/phosphatase. *Mol Microbiol* **31**, 59-66.

**Krebes, K.A., Dirksen, L.B. & Krause, D.C. (1995):** Phosphorylation of *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-accessory proteins in cell extracts. *J Bacteriol* **177(15)**, 4571-4574.

**Kristich, C.J., Wells, C.L. & Dunny, G.M. (2007):** A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104(9)**, 3508-3513.

- Kroes, I., Lepp, P.W. & Relman, D.A. (1999):** Bacterial diversity within the human subgingival crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96(25)**, 14547-14552.
- Krueger, K.M. & Barbieri, J.T. (1995):** The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins. *Clin Microbiol Rev* **8(1)**, 34-47.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.I. & Galán J.E. (2000):** Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97(18)**, 10225-10230.
- Kyriakis, J.M. & Avruch, J. (2001):** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81(2)**, 807-869.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lahti, R. (1983):** Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiol Rev* **47(2)**, 169-178.
- Lascalles, J. (1978):** sn-Glycerol-3-phosphate dehydrogenase and its interaction with nitrate reductase in wild-type and hem mutant strains of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **133(2)**, 621-625.
- Leith, D. K. & Baseman, J. B. (1984).** Purification of a *Mycoplasma pneumoniae* adhesin by monoclonal antibody affinity chromatography. *J Bacteriol* **157**, 678-680.
- Lewis, K.N., Liao, R., Guinn, K.M., Hickey, M.J., Smith, S., Behr, M.A. & Sherman, D.R. (2003):** Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guérin attenuation. *J Infect Dis* **187(1)**, 117-123.
- Lin, E.C. (1976).** Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **30**, 535-578.
- Lin, Y.S., Lei, H.Y., Low, T.L., Shen, C.L., Chou, L.J. & Jan, M.S. (1992):** In vivo induction of apoptosis in immature thymocytes by staphylococcal enterotoxin B. *J Immunol* **149(4)**, 1156-1163.
- Low, I.E. (1971):** Effect of Medium on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Levels and Peroxidase-Like Activity by *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect Immun* **3(1)**, 80-86.
- Low, I.E. & Zimkus, S.M. (1973):** Reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase activity and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **116(1)**, 346-354.
- Mackay, A. D., Watt, J. B. & Jones, G. R. (1975).** Myocarditis associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Practitioner* **214**, 390-392.
- Madec, E., Laszkiewicz, A., Iwanicki, A., Obuchowski, M. & Séror, S. (2002):** Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in developmental processes. *Mol Microbiol* **46(2)**, 571-586.

- Majlessi, L., Brodin, P., Brosch, R., Rojas, M.J., Khun, H., Huerre, M., Cole, S.T. & Leclerc, C. (2005):** Influence of ESAT-6 secretion system 1 (RD1) of *Mycobacterium tuberculosis* on the interaction between mycobacteria and the host immune system. *J Immunol* **174**(6), 3570-3579.
- Mangan, D.F., Taichman, N.S., Lally, E.T. & Wahl, S.M. (1991):** Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. *Infect Immun* **59**(9), 3267-3272.
- Maniloff, J. (1992).** Phylogeny of mycoplasmas In *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis. American Society for Microbiology, Washington, D.C.*, 549-559.
- Marples, R.R. & Wieneke, A.A. (1993):** Enterotoxins and toxic-shock syndrome toxin-1 in non-enteric staphylococcal disease. *Epidemiol Infect* **110**(3), 477-488.
- Meiklejohn, G., Beck, M.D. & Eaton, M.D. (1944):** Atypical pneumonia caused by psittacosis-like viruses. *J Clin Invest* **23**(2), 167-175.
- Mendez, M., Huang, I.H., Ohtani, K., Grau, R., Shimizu, T. & Sarker, M.R. (2008):** Carbon catabolite repression of type IV pilus-dependent gliding motility in the anaerobic pathogen *Clostridium perfringens*. *J Bacteriol* **190**(1), 48-60.
- Merzbacher, M., Detsch, C., Hillen, W. & Stülke, J. (2004).** *Mycoplasma pneumoniae* HPr kinase/phosphorylase. *Eur J Biochem* **271**, 367-374.
- Meseguer, M.A., Alvarez, A., Rejas, M.T., Sánchez, C., Pérez-Díaz, J.C. & Baquero, F. (2003):** *Mycoplasma pneumoniae*: a reduced-genome intracellular bacterial pathogen. *Infect Genet Evol* **3**(1), 47-55.
- Miles, R.J. (1992).** Catabolism in *mollicutes*. *J Gen Microbiol* **138**, 1773-1783.
- Mindich, L. (1968):** Pathway for oxidative dissimilation of glycerol in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **96**(2), 565-566.
- Morimoto, H. & Bonavida, B. (1992):** Diphtheria toxin- and Pseudomonas A toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* **149**(6), 2089-2094.
- Morrison, D.K. & Davis, R.J. (2003):** Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 91-118.
- Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordoñez, C.L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A. & Mekalanos, J.J. (2006):** A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science* **312**(5779), 1526-1530.

- Moy, T. I., Mylonakis, E., Calderwood, S. B. & Ausubel, F. M. (2004).** Cytotoxicity of hydrogen peroxide produced by *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* **72**, 4512-4520.
- Musatovova, O., Dhandayuthapani, S. & Baseman, J.B. (2006):** Transcriptional heat shock response in the smallest known self-replicating cell, *Mycoplasma genitalium*. *J Bacteriol* **188(8)**, 2845-2855.
- Myllykallio, H., Lipowski, G., Leduc, D., Filee, J., Forterre, P. & Liebl, U. (2002):** An alternative flavin-dependent mechanism for thymidylate synthesis. *Science* **297(5578)**, 105-107.
- Neimark, H. & Lemcke, R.M. (1972):** Occurrence and properties of lactic dehydrogenases of fermentative mycoplasmas. *J Bacteriol* **111(3)**, 633-640.
- Nester, E.W. & Jensen, R.A. (1966):** Control of aromatic acid biosynthesis in *Bacillus subtilis*: sequential feedback inhibition. *J Bacteriol* **91(4)**, 1594-1598.
- Neuhard, J. & Kelln, R.A. (1996):** *Escherichia coli* and *Salmonella*. *American Society for Microbiology, Washington D.C.* 580-599.
- Niimura, Y., Ohnishi, K., Yarita, Y., Hidaka, M., Masaki, H., Uchimura, T., Suzuki, H., Kozaki, M. & Uozumi, T. (1993):** A flavoprotein functional as NADH oxidase from *Amphibacillus xylanus* Ep01: purification and characterization of the enzyme and structural analysis of its gene. *J Bacteriol* **175(24)**, 7945-7950.
- Niimura, Y., Poole, L.B. & Massey, V. (1995):** *Amphibacillus xylanus* NADH oxidase and *Salmonella typhimurium* alkyl-hydroperoxide reductase flavoprotein components show extremely high scavenging activity for both alkyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in the presence of *S. typhimurium* alkyl-hydroperoxide reductase 22-kDa protein component. *J Biol Chem* **270(43)**, 25645-25650.
- Obuchowski M, Madec E, Delattre D, Boël G, Iwanicki A, Foulger D & Séror SJ. (2000):** Characterization of PrpC from *Bacillus subtilis*, a member of the PPM phosphatase family. *J Bacteriol* **182(19)**, 5634-5638.
- Pallen, M.J. (2002):** The ESAT-6/WXG100 superfamily -- and a new Gram-positive secretion system? *Trends Microbiol* **10(5)**, 209-212.
- Papazisi, L., Frasca, S. Jr., Gladd, M., Liao, X., Yogeve, D. & Geary, S.J. (2002):** GapA and CrmA coexpression is essential for *Mycoplasma gallisepticum* cytoadherence and virulence. *Infect Immun* **70(12)**, 6839-6845.
- Park, H.J., Reiser, C.O., Kondruweit, S., Erdmann, H., Schmid, R.D. & Sprinzl, M. (1992):** Purification and characterization of a NADH oxidase from the thermophile *Thermus thermophilus* HB8. *Eur J Biochem* **205(3)**, 881-885.
- Parsonage, D., Luba, J., Mallett, T.C. & Claiborne, A. (1998):** The soluble alpha-glycerophosphate oxidase from *Enterococcus casseliflavus*. Sequence homology with

the membrane-associated dehydrogenase and kinetic analysis of the recombinant enzyme. *J Biol Chem* **273**(37), 23812-23822.

**Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A. & Dewhirst, F.E. (2001):** Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* **183**(12), 3770-3783.

**Pettigrew, D. W., Liu, W. Z., Holmes, C., Meadow, N. D. & Roseman, S. (1996).** A single amino acid change in *Escherichia coli* glycerol kinase abolishes glucose control of glycerol utilization in vivo. *J Bacteriol* **178**, 2846-2852.

**Pietack, N. (2007):** Phosphorylierung von Enzymen des Kohlenstoffmetabolismus von *Bacillus subtilis*.

**Pilo, P., Vilei, E.M., Peterhans, E., Bonvin-Klotz, L., Stoffel, M.H., Dobbelaere, D. & Frey, J. (2005):** A metabolic enzyme as a primary virulence factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony. *J Bacteriol* **187**(19), 6824-6831.

**Pine, L. & Reeves, M.W. (1978):** Regulation of the synthesis of M protein by sugars, Todd Hewitt broth, and horse serum, in growing cells of *Streptococcus pyogenes*. *Microbios* (85-86), 185-212.

**Pollack, J.D. (1975):** Localization of reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase activity in *Acholeplasma* and *Mycoplasma* species. *Int J Syst Bacteriol* **25**, 108-113.

**Pollack, J.D. (1986):** Metabolic distinctiveness of *ureaplasmas*. *Pediatr Infect Dis* **5**, 305-307.

**Pollack, J.D., McElwain, M.C., Desantis, D., Manolukas, J.T., Tully, J.G., Chang, C.-J., Whitcomb, R.F., Hackett, K.J. & Williams, M.V. (1989):** Metabolism of members of the *Spiroplasmataceae*. *Int J Syst Bacteriol* **39**, 406-412.

**Pollack, J.D., Williams, M.V., Banzon, J., Jones, M.A., Harvey, L. & Tully, J.G. (1996):** Comparative metabolism of *Mesoplasma*, *Entomoplasma*, *Mycoplasma*, and *Acholeplasma*. *Int J Syst Bacteriol* **46**(4), 885-890.

**Pollack, J.D., Myers, M.A., Dandekar, T. & Herrmann, R. (2002):** Suspected utility of enzymes with multiple activities in the small genome *Mycoplasma* species: the replacement of the missing "household" nucleoside diphosphate kinase gene and activity by glycolytic kinases. *OMICS* **6**(3), 247-258.

**Poole, L.B., Higuchi, M., Shimada, M., Calzi, M.L. & Kamio, Y. (2000):** *Streptococcus mutans* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-forming NADH oxidase is an alkyl hydroperoxide reductase protein. *Free Radic Biol Med* **28**(1), 108-120.

**Pukatzki, S., Ma, A.T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W.C., Heidelberg, J.F. & Mekalanos, J.J. (2006):** Identification of a conserved bacterial

protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(5), 1528-1533.

**Pukatzki, S., Ma, A.T., Revel, A.T., Sturtevant, D. & Mekalanos, J.J. (2007):** Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(39), 15508-15513.

**Pym, A.S., Brodin, P., Brosch, R., Huerre, M. & Cole, S.T. (2002):** Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* **46**(3), 709-717.

**Quagliarello, V. & Scheld, W.M. (1992):** Bacterial meningitis: pathogenesis, pathophysiology, and progress. *N Engl J Med* **327**(12), 864-872.

**Rajagopal, L., Clancy, A. & Rubens, C.E. (2003):** A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. *J Biol Chem* **278**(16), 14429-14441.

**Rajagopal, L., Vo, A., Silvestroni, A. & Rubens, C.E. (2006):** Regulation of cytotoxin expression by converging eukaryotic-type and two-component signalling mechanisms in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol* **62**(4), 941-957

**Ramirez, A. S., Rosas, A., Hernandez-Beriain, J. A., Orengo, J. C., Saavedra, P., de la Fe, C., Fernandez, A. & Poveda, J. B. (2005).** Relationship between rheumatoid arthritis and *Mycoplasma pneumoniae*: a case-control study. *Rheumatology (Oxford)* **44**(7), 912-914.

**Razin, S., Yogev, D. & Naot, Y. (1998):** Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(4), 1094-1156.

**Regev-Yochay, G., Trzcinski, K., Thompson, C.M., Malley, R. & Lipsitch, M. (2006):** Interference between *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: In vitro hydrogen peroxide-mediated killing by *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* **188**(13), 4996-5001.

**Reizer, J., Novotny, M. J., Stuiver, I. & Saier, M. H., Jr. (1984).** Regulation of glycerol uptake by the phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **159**, 243-250.

**Reizer, J., Sutrina, S. L., Saier, M. H., Stewart, G. C., Peterkofsky, A. & Reddy, P. (1989).** Mechanistic and physiological consequences of HPr(ser) phosphorylation on the activities of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in gram-positive bacteria: studies with site-specific mutants of HPr. *Embo J* **8**, 2111-2120.

**Reizer, J., Hoischen, C., Titgemeyer, F., Rivolta, C., Rabus, R., Stulke, J., Karamata, D., Saier, M. H., Jr. & Hillen, W. (1998).** A novel protein kinase that controls carbon catabolite repression in bacteria. *Mol Microbiol* **27**, 1157-1169.

**Renaudin, J., Pascarel, M. C., Saillard, C., Chevalier, C., Laigret, F. & Bove, J. M. (1987).** Spiroplasmas: gene structure and expression. *Isr J Med Sci* **23**, 676-677.

**Rosqvist, R., Magnusson, K.E. & Wolf-Watz, H. (1994):** Target cell contact triggers expression and polarized transfer of *Yersinia* YopE cytotoxin into mammalian cells. *EMBO J* **13**(4), 964-972.

**Ross, R.P. & Claiborne, A. (1992):** Molecular cloning and analysis of the gene encoding the NADH oxidase from *Streptococcus faecalis* 10C1. Comparison with NADH peroxidase and the flavoprotein disulfide reductases. *J Mol Biol* **227**(3), 658-671.

**Rossomando, A., Wu, J., Weber, M.J. & Sturgill, T.W. (1992):** The phorbol ester-dependent activator of the mitogen-activated protein kinase p42mapk is a kinase with specificity for the threonine and tyrosine regulatory sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(12), 5221-5225.

**Rutberg, B. (1997):** Antitermination of transcription of catabolic operons. *Mol Microbiol* **23**(3), 413-421.

**Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis (1989).** Molecular cloning: A laboratory manual. 2. Edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, Cold Spring Harbor, NY.

**Sasaki, Y., Ishikawa, J., Yamashita, A., Oshima, K., Kenri, T., Furuya, K., Yoshino, C., Horino, A., Shiba, T., Sasaki, T. & Hattori, M. (2002):** The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Res* **30**(23), 5293-5300.

**Schaper, U., Chapman, J. S. & Hu, P. C. (1987).** Preliminary indication of unusual codon usage in the DNA coding sequence of the attachment protein of *Mycoplasma pneumoniae*. *Isr J Med Sci* **23**, 361-7.

**Schmidl, S. (2007):** Kontrolle der HPrK-Aktivität aus *M. pneumoniae*.

**Schmidt, H.L., Stöcklein, W., Danzer, J., Kirch, P. & Limbach, B. (1986):** Isolation and properties of an H<sub>2</sub>O-forming NADH oxidase from *Streptococcus faecalis*. *Eur J Biochem* **156**(1), 149-155.

**Schirmer, F., Ehrt, S. & Hillen, W. (1997).** Expression, inducer spectrum, domain structure, and function of MopR, the regulator of phenol degradation in *Acinetobacter calcoaceticus* NCIB8250. *J Bacteriol* **179**, 1329-1336.

**Schweizer, H. & Larson, T.J. (1987):** Cloning and characterization of the aerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase structural gene *glpD* of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **169**(2), 507-513.

**Seno, E.T. & Chater, K.F. (1983):** Glycerol catabolic enzymes and their regulation in wild-type and mutant strains of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* **129**(5), 1403-1413.

**Singh, K.D., Halbedel, S., Görke, B. & Stülke, J. (2007):** Control of the phosphorylation state of the HPr protein of the phosphotransferase system in *Bacillus subtilis*: implication of the protein phosphatase PrpC. *J Mol Microbiol Biotechnol* **13**(1-3), 165-171.

**Smith, S.L., Vandemark, P.J. & Fabricant, J. (1963):** Respiratory pathways in the *Mycoplasma*. I. Lactate oxidation by *Mycoplasma gallisepticum*. *J Bacteriol* **86**, 893-897.

**Somerson, N. L., Taylor-Robinson, D. & Chanock, R. M. (1963).** Hemolyin production as an aid in the identification and quantitation of Eaton agent (*Mycoplasma pneumoniae*). *Am J Hyg* **77**, 122-128.

**Somerson, N. L., James, W. D., Walls, B. E. & Chanock, R. M. (1967).** Growth of *Mycoplasma pneumoniae* on a glass surface. *Ann N Y Acad Sci* **143**, 384-389.

**Spellerberg, B., Cundell, D.R., Sandros, J., Pearce, B.J., Idanpaan-Heikkila, I., Rosenow, C. & Masure, H.R. (1996):** Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* **19**(4), 803-813.

**Stanton, T.B., Rosey, E.L., Kennedy, M.J., Jensen, N.S. & Bosworth, B.T. (1999):** Isolation, oxygen sensitivity, and virulence of NADH oxidase mutants of the anaerobic spirochete *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, etiologic agent of swine dysentery. *Appl Environ Microbiol* **65**(11), 5028-5034.

**Steinhauer, K., Jepp, T., Hillen, W. & Stülke, J. (2002).** A novel mode of control of *Mycoplasma pneumoniae* HPr kinase/phosphatase activity reflects its parasitic lifestyle. *Microbiology* **148**, 3277-3284.

**Strittmatter, C.F. (1959):** Flavin-linked oxidative enzymes of *Lactobacillus casei*. *J Biol Chem* **234**, 2794-2800.

**Stülke, J. & Hillen, W. (1999).** Carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **2**, 195-201.

**Su, C.J. & Baseman, J.B. (1990):** Genome size of *Mycoplasma genitalium*. *J Bacteriol* **172**(8), 4705-4707.

**Su, H.C., Hutchison, C.A. 3<sup>rd</sup>. & Giddings, M.C. (2007):** Mapping phosphoproteins in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *BMC Microbiol* **7**, 63.

**Suchová, M., Demnerová, K. Valentová, O. & Ruml, T. (1993):** Purification of glycerophosphate oxidase isolated from mutant strain of *Aerococcus viridans*. *Biotechnol Tech* **7**, 435-438.



- Suttorp, N., Seeger, W., Dewein, E., Bhakdi, S. & Roka, L. (1985):** Staphylococcal alpha-toxin-induced PGI<sub>2</sub> production in endothelial cells: role of calcium. *Am J Physiol* **248(1Pt1)**, C127-134.
- Taichman, N.S., Dean, R.T. & Sanderson, C.J. (1980):** Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect Immun* **28(1)**, 258-268.
- Taylor, M. J., Burrow, G. N., Strauch, B. & Horstmann, D. M. (1967).** Meningoencephalitis associated with pneumonitis due to *Mycoplasma pneumoniae*. *Jama* **199**, 813-816.
- Taylor-Robinson, D., Davies, H.A., Sarathchandra, P. & Furr, P.M. (1991):** Intracellular location of mycoplasmas in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. *Int J Exp Pathol* **72(6)**, 705-714.
- Tesh, V.L. & O'Brien, A.D. (1991):** The pathogenic mechanisms of Shiga toxin and the Shiga-like toxins. *Mol Microbiol* **5(8)**, 1817-1822.
- Thomas, C.B. & Sharp, P. (1988):** Detection of antigenic variation among strains of *Mycoplasma gallisepticum* by enzyme-linked immunosorbent inhibition assay (ELISA) and Western blot analysis. *Avian Dis* **32(4)**, 748-756.
- Titgemeyer, F. & Hillen, W. (2002):** Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82(1-4)**, 59-71.
- Tong, H., Chen, W., Merritt, J., Qi, F., Shi, W. & Dong, X. (2007):** *Streptococcus oligofermentans* inhibits *Streptococcus mutans* through conversion of lactic acid into inhibitory H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: a possible counteroffensive strategy for interspecies competition. *Mol Microbiol* **63(3)**, 872-880.
- Tsai, C.C., McArthur, W.P., Baehni, P.C., Hammond, B.F. & Taichman, N.S. (1979):** Extraction and partial characterization of a leukotoxin from a plaque-derived Gram-negative microorganism. *Infect Immun* **25(1)**, 427-439.
- Vancini, R.G., Pereira-Neves, A., Borojevic, R. & Benchimol, M. (2008):** *Trichomonas vaginalis* harboring *Mycoplasma hominis* increases cytopathogenicity in vitro. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*
- Vilei, E. M. & Frey, J. (2001).** Genetic and biochemical characterization of glycerol uptake in *mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC: its impact on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and virulence. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 85-92.
- Vogl, G., Plaickner, A., Szathmary, S., Stipkovits, L., Rosengarten, R. & Szostak, M.P. (2008):** *Mycoplasma gallisepticum* invades chicken erythrocytes during infection. *Infect Immun* **76(1)**, 71-77.

- Wadher, B. J., Henderson, C. L., Miles, R. J. & Varsani, H. (1990).** A mutant of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* lacking the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme L-alpha-glycerophosphate oxidase. *FEMS Microbiol Lett* **60**, 127-130.
- Walz, A.C., Demel, R.A., de Kruijff, B. & Mutzel, R. (2002):** Aerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* binds to the cytoplasmic membrane through an amphipathic alpha-helix. *Biochem J* **365**, 471-479.
- Warner, J. B. & Lolkema, J. S. (2003).** CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 475-490.
- Watson, H.L., McDaniel, L.S., Blalock, D.K., Fallon, M.T. & Cassell, G.H. (1988):** Heterogeneity among strains and a high rate of variation within strains of a major surface antigen of *Mycoplasma pulmonis*. *Infect Immun* **56(5)**, 1358-1363.
- Way, S.S. & Wilson, C.B. (2005):** The *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 homologue in *Listeria monocytogenes* is dispensable for growth in vitro and in vivo. *Infect Immun* **73(9)**, 6151-6153.
- Welch, RA. (1991):** Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **5(3)**:521-528
- Whittaker, C.J., Clemans, D.L. & Kolenbrander, P.E. (1996):** Insertional inactivation of an intragenetic coaggregation-relevant adhesin locus from *Streptococcus gordonii* DL1 (Challis). *Infect Immun* **64(10)**, 4137-4142.
- White, J., Herman, A., Pullen, A.M., Kubo, R., Kappler, J.W. & Marrack, P. (1989):** The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* **56(1)**, 27-35.
- Wiame, J.M., Bourgeois, S. & Lambion, R. (1954):** Oxidative dissimilation of glycerol studied with variants of *Bacillus subtilis*. *Nature* **174(4418)**, 37-38.
- Wilson, M. H. & Collier, A. M. (1976).** Ultrastructural study of *Mycoplasma pneumoniae* in organ culture. *J Bacteriol* **125**, 332-339.
- Wilson, M.L., Menjivar, E., Kalapatapu, V., Hand, A.P., Garber, J. & Ruiz, M.A. (2007):** *Mycoplasma pneumoniae* associated with hemolytic anemia, cold agglutinins, and recurrent arterial thrombosis. *South Med J* **100(2)**, 215-217.
- Winans, S.C., Burns, D.L. & Christie, P.J. (1996):** Adaptation of a conjugal transfer system for the export of pathogenic macromolecules. *Trends Microbiol* **4(2)**, 64-68.
- Winner F, Rosengarten R, Citti C. (2000):** In vitro cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect Immun* **68(7)**, 4238-4244.
- Woese, C.R., Maniloff, J. & Zablen, L.B. (1980):** Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77(1)**, 494-498.

**Yamamoto, Y., Pargade, V., Lamberet, G., Gaudu, P., Thomas, F., Texereau, J., Gruss, A., Trieu-Cuot, P. & Poyart, C. (2006):** The Group B *Streptococcus* NADH oxidase Nox-2 is involved in fatty acid biosynthesis during aerobic growth and contributes to virulence. *Mol Microbiol* **62(3)**, 772-785.

**Yavlovich, A., Higazi, A.A. & Rottem, S. (2001):** Plasminogen binding and activation by *Mycoplasma fermentans*. *Infect Immun* **69(4)**, 1977-1982.

**Yavlovich, A., Katzenell, A., Tarshis, M., Higazi, A.A. & Rottem, S. (2004):** *Mycoplasma fermentans* binds to and invades HeLa cells: involvement of plasminogen and urokinase. *Infect Immun* **72(9)**, 5004-5011.

**Yavlovich, A. & Rottem, S. (2007):** Binding of host extracellular matrix proteins to *Mycoplasma fermentans* and its effect on adherence to, and invasion of HeLa cells. *FEMS Microbiol Lett* **266(2)**, 158-162.

**Yeats, C., Finn, R.D. & Bateman, A. (2002):** The PASTA domain: a beta-lactam-binding domain. *Trends Biochem Sci* **27(9)**, 438-440.

**Yoshitsugu, M., Matsunaga, S., Hanamure, Y., Rautiainen, M., Ueno, K., Miyanojara, T., Furuta, S., Fukuda, K. & Ohyama, M. (1995):** Effects of oxygen radicals on ciliary motility in cultured human respiratory epithelial cells. *Auris Nasus Larynx* **22(3)**, 178-185.

**Yu, J., Bryant, A.P., Marra, A., Lonetto, M.A., Ingraham, K.A., Chalker, A.F., Holmes, D.J., Holden, D., Rosenberg, M. & McDevitt, D. (2001):** Characterization of the *Streptococcus pneumoniae* NADH oxidase that is required for infection. *Microbiology* **147**, 431-438.

**Zhu, P.P., Nosworthy, N., Ginsburg, A., Miyata, M., Seok, Y.J. & Peterkofsky, A. (1997):** Expression, purification, and characterization of enzyme IIA(glc) of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system of *Mycoplasma capricolum*. *Biochemistry* **36(23)**, 6947-6953.

**Zimmerman, C.U. & Herrmann, R. (2005):** Synthesis of a small, cysteine-rich, 29 amino acids long peptide in *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* **253(2)**, 315-321.

## 7. Anhang

### 7.1 Materialien

#### 7.1.1 Chemikalien

Ampicillin	Sigma, München
BSA	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
CDP*	Roche Diagnostics, Mannheim
Desthiobiotin	IBA, Göttingen
DMEM	Biochrom, Berlin
Fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin
$\gamma$ -ATP	Hartmann Analytic GmbH
Gentamycin	Sigma, München
<i>sn</i> -Glycerol-3-Phosphat	Fluka, Buchs
HABA	IBA, Göttingen
Hydrazin	Sigma, München
Imidazol	Serva, Heidelberg
IPTG	Peqlab, Erlangen
Kanamycin	Sigma, München
NAD <sup>+</sup>	Sigma, München
NADH/H <sup>+</sup>	Sigma, München
Na-Pyruvat	Biochrom, Berlin
Nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
Ni <sup>2+</sup> -NTA Superflow	Qiagen, Hilden
Penicillin G	Serva, Heidelberg
PEP	Sigma, München
Phenolrot	Roth, Karlsruhe
Pferdeserum	Invitrogen, Karlsruhe
PPLO broth	Becton, Dickinson and Company, France
<i>Strep</i> -Tactin Sepharose	IBA, Göttingen
X-Gal	Peqlab, Erlangen

Alle sonstigen verwendeten allgemeinen Chemikalien wurden von Merck, Serva, Fluka, Sigma oder Roth in p.a. Qualität bezogen.

**7.1.2 Hilfsmittel**

Dialyseschläuche	Serva, Heidelberg
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson Drogheda, Irland
Eppendorfgefäße	Greiner, Nürtingen
Gene Amp Reaction Tubes (PCR)	Perkin Elmer, Weiterstadt
Pipettenspitzen	Greiner, Nürtingen
	Eppendorf, Hamburg
	Sarstedt, Nümbrecht
Glaspipetten	Brand, Wertheim
Halbmikroküvetten aus Kunststoff	Sarstedt, Nümbrecht
Kulturflaschen	Renner, Dannstadt
	Nunc, Wiesbaden
Kunststoffpetrischalen	Greiner, Nürtingen
Membranfilter NC 45 (0,2µm Porengröße)	Schleicher und Schüll, Dassel
Mikroliterpipetten (2µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Gilson, Düsseldorf
Polyethylenröhrchen	Eppendorf, Hamburg
Poly-Prep Chromatography Columns	Greiner, Nürtingen
Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Quarzküvetten aus Kunststoff	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zentrifugenbecher	Brand, Wertheim
	Beckmann, München

**7.1.3 Geräte und Apparaturen**

Autoklav	Zirbus, Bad Grund
Biofuge fresco	Heraeus Christ, Osterode
Chemilumineszenzsystem	Peqlab, Erlangen
ChemiSmart	
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Labotect, Göttingen
Elektronenmikroskop	Philips, Amsterdam
Feinwaage Sartorius	Sartorius, Göttingen

French Press	Spectonic Unicam, England
Gelelektrophoreseapparaturen	EasyCast™ Minigelsystem, Peqlab, Erlangen
Heizblock	Waasetec, Göttingen
Horizontalschüttler 3006	GFL, Burgwedel
Kühlzentrifuge PrimoR	Heraeus Christ, Osterode
Kulturschüttler Innova 2300	New Brunswick, Neu-Isenburg
Magnetrührer	JAK Werk, Staufen
Mikroprozessor pH-Meter Calimatic	Knick, Berlin
Mikroskop	Zeiss, Jena
Spannungsgerät	Bio-Rad Laboratories California USA
Spektralphotometer Ultrospec 2100pro	Amersham, Freiburg
TE70 SemiPhor Semi-Dry Transfer Unit	Amersham, Freiburg
Thermocycler Tpersonal	Biometra, Göttingen
Ultraschallgerät UP200S	Dr. Hielscher GmbH, Teltow
Ultrazentrifuge Optima Max-E	Beckman, München
Vertikalgelelektrophoreseapparatur Mini-Protean III System	Bio-Rad Laboratories, California USA
Waage Sartorius universal	Sartorius, Göttingen
Wasservollentsalzungsanlage	Millipore, Schwalbach

#### 7.1.4 Kommerziell erhältliche Systeme

Gene Ruler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Nucleospin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
Protein Molecular Weight Marker SM0431	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Prestained Protein Marker	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

### 7.1.5 Antikörper und Enzyme

Ampligase	Epicentre, Madison, USA
Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragmente	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Polyklonaler Antikörper gegen <i>M. pneumoniae</i> Strep-tag-GlpD	Institut für Veterinär-Bakteriologie, Bern
Polyklonaler Antikörper gegen <i>M. pneumoniae</i> Strep-tag-GlpK	Seqlab, Göttingen
Polyklonaler Antikörper gegen <i>M. pneumoniae</i> P01	ZMBH, Heidelberg
Restriktionsendonukleasen	NEB Biolabs, Frankfurt am Main MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Sekundärer AK Anti-Kaninchen IgG-AP gekoppelt	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### 7.2. Oligonukleotide

Die 5'-phosphorylierten Oligonukleotide und die restlichen Oligonukleotide wurden von der Firma Operon Köln bezogen.

**Tab. 7.1. Oligonukleotide**

Name	Sequenz (5'→3') <sup>1</sup>	Verwendung
CH32	GGGCGAAAATTCTTTTTACTAATATG	<i>glpF</i> -Mutantenscreen
CH33	GTA ACTATTAATTAGTTAAGCCTTTAT GG	<i>glpD</i> -Mutantenscreen
CH34	GCAATTTTACTAGCTGAATTTAATTAA TG	Protein Phosphatase 2c homolog ( <i>MPN247</i> )-Mutantenscreen
CH35	GCTCAACTTGATTAATTTAAAACAATG G	Ser/thr/tyr Protein Kinase ( <i>MPN248</i> )-Mutantenscreen
CH36	GCACCTCTATGGTTTTGATGAAG	Sonde für <i>pgi</i> fw

Name	Sequenz (5'→3') <sup>1</sup>	Verwendung
CH37	<b>CTAATACGACTCACTATAGGGAGAG</b> CTAACTCTTGTGGCTGTC	Sonde für <i>pgi</i> rev
CH38	GCCATTTTAACCTCTGGTGGTG	Sonde für <i>pfk</i> fw
CH39	<b>CTAATACGACTCACTATAGGGAGAC</b> AGTGGTTTTGGTGTGCAAGATC	Sonde für <i>pfk</i> rev
CH40	CAACACGCTAAGCAACACCAC	Sonde für <i>fba</i> fw
CH41	<b>CTAATACGACTCACTATAGGGAGAC</b> CACCATGGAGCACTAAGGG	Sonde für <i>fba</i> rev
CH42	GGATTTACACCAAGCGTTGGC	Sonde für <i>tpi</i> fw
CH43	<b>CTAATACGACTCACTATAGGGAGAG</b> CAACCGAACCACCATAGAG	Sonde für <i>tpi</i> rev
CH44	GACTATCCGTGTTGCTATCAATG	Sonde für <i>gap</i> fw
CH45	<b>CTAATACGACTCACTATAGGGAGAC</b> CAGTGGTGGTAGGTACAATG	Sonde für <i>gap</i> rev
CH46	CCCCTGTTGCTTGTGTTGTG	Sonde für <i>eno</i> fw
CH47	<b>CTAATACGACTCACTATAGGGAGAG</b> CTACATCCAGTGCAATCGC	Sonde für <i>eno</i> rev
CH48	<u>AAAAGGATCCATGGAAACAAGAGATG</u> TTTAAATAG	<i>glpD</i> fw ( <i>Bam</i> HI)
CH49	P-GGTAAAAAGCTCTG <b>G</b> TTAAATACC TAC	<i>glpD</i> Mutageneseprimer A219 G
CH50	P-GAAGGTAGCTG <b>G</b> GCAATTGATC	<i>glpD</i> Mutageneseprimer A447G
CH51	P-GGACTTATTTAGTTTG <b>G</b> ACTAACAAC GAAAC	<i>glpD</i> Mutageneseprimer A573G
CH52	P-CTAAAAAGCCGAACTG <b>G</b> AACGGAA AG	<i>glpD</i> Mutageneseprimer A1125G
CH53	<u>TATAATGCATTTAGATCCATGGCAGAT</u> TG	<i>glpD</i> rev ( <i>Ava</i> III/ <i>Mph</i> 1103I/ <i>Nsi</i> I)
CH54	AAAAG <b>T</b> CGACATGAAGAAA GTGATTGTTATCG	<i>nox</i> fw ( <i>Sal</i> I)
CH55	P-CTGGAGCTTG <b>G</b> CCGATTTG	<i>nox</i> Mutageneseprimer A115G
CH56	P-CAGAAGCGGCTTG <b>G</b> CAGTG	<i>nox</i> Mutageneseprimer A187G
CH57	P-CTTTCGTG <b>G</b> AACACCAACCACAG	<i>nox</i> Mutageneseprimer A1257G
CH58	<u>TATAAAGCTTTTATTTATTTT</u> AGGGGT ATAGTAAC	<i>nox</i> rev ( <i>Hind</i> III)



Name	Sequenz (5'→3') <sup>1</sup>	Verwendung
CH59	AAAAGGATCCAGATAGATGGATGTGA GACAAACATGGAAACAAGAGATGTTT TAATAGGC	RBS von Gltc Amplifikation von <i>glpD</i> fw (Expression in <i>B. subtilis</i> ) ( <i>Bam</i> HI)
CH60	TATAGTCGACCTATTAGATCCATGGCA GATTGTA CTTTC	Amplifikation von <i>glpD</i> rev (zusätzliches Stopcodon) ( <i>Sal</i> I)
CH61	ATGCCAAATCCTGT TAGATTTGTTTAC	<i>MPN372</i> Mutantenscreen fw
CH62	CAGTGACGT TAAAGCTTAATCGC	<i>MPN372</i> Mutantenscreen rev
CH63	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAG CCGGGTGGTGAGCATG	<i>MPN372</i> rev (bis 492 bp)
CH64	CCATGCTCCCTGAAGTGAAGCCG	<i>glpK</i> fw intern (1000 bp) für LFH ( $\Delta$ <i>glpD</i> Mutante <i>B. subtilis</i> )
CH65	CCTATCACCTCAAATGGTTCGCTGTAC GTTTCCTCCTTGTTGTCACGG	<i>glpK</i> rev für LFH mit Schwanz für Spec-Kassette (Kan kompatibel) ( $\Delta$ <i>glpD</i> Mutante <i>B. subtilis</i> )
CH66	CGAGCGCCTACGAGGAATTTGTATCGT AAATCATAACGGGCTGTCTGCAGCCC	<i>yhxB</i> fw für LFH mit Schwanz für Spec-Kassette (Kan kompatibel) ( $\Delta$ <i>glpD</i> Mutante <i>B. subtilis</i> )
CH67	CAGGATCTGTCGCGATGAGAATATCTG	<i>yhxB</i> rev intern (1000 bp) für LFH ( $\Delta$ <i>glpD</i> Mutante <i>B. subtilis</i> )
CH68	TATACCCGGGCTATTAGATCCATGGCA GATTGTA CTTTC	Amplifikation von <i>glpD</i> rev (zusätzliches Stopcodon) ( <i>Sma</i> I)
CH69	GGCGTTTAAATGAGCTTTAAAATAACC G	<i>MPN320 thyA</i> Mutantenscreen fw
CH70	TTAAACTGCTACCTCTCCTTTAATTGTA G	<i>MPN320 thyA</i> Mutantenscreen rev
CH71	ATGGAAACGCAAAACCAAATAGAAAC G	<i>MPN358 thyX</i> Mutantenscreen fw
CH72	TTAGTTGAGGTA CTTCAACGCTGC	<i>MPN358 thyX</i> Mutantenscreen rev
CH73	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAC CAGCGCAATTGCAAACACCG	<i>MPN358</i> rev (bis Base 592)
CH74	CTAATACGACTCACTATAGGGAGAG GTGTTCAA AACTGTGGAGG	<i>MPN248</i> rev (bis Base 475)

Name	Sequenz (5'→3') <sup>1</sup>	Verwendung
SH29	ATGAGTGAGCTAACTCACAG	Sequenzierungsprimer für pMT85-Transposanten, ~60 bp vor IR 1 (1-26)
SH30	CAATACGCAAACCGCCTC	Sequenzierungsprimer für pMT85-Transposanten, ~60 bp vor IR 2 (3413-3438)
SH80	<u>ATGGATCCTTACGAATGGACA</u> ACTACC C	MPN248 rev ( <i>Bam</i> HI)
SH81	P-GATTTGGCGCAATG <b>G</b> CAAACCG	MPN248 Mutageneseprimer A969G
SH89	<u>TAGAGCTCGATGGCACTAAATTTAAAG</u> ATTGG	MPN248 fw ( <i>Sac</i> I)
TM0141	CAGCGAACCATTTGAGGTGATAGGGA CTGGCTCGCTAATAACGTAACGTGACT GGCAAGAG	Amplifikation der <i>spec</i> -Kassette fw
TM0142	CGATACAAATTCCTCGTAGGGCGCTCGG CGTAGCGAGGGCAAGGGTTTATTGTTT TCTAAAATCTG	Amplifikation der <i>spec</i> -Kassette rev

<sup>1</sup> Die angefügten Schnittstellen sind unterstrichen, die T7-Promotoren sind **fett**, P steht für eine 5'-Phosphorylierung, wichtige Sequenzen sind **rot** und Mutationen **fett** gedruckt.

### 7.3. Plasmide

Tab. 7.2. Plasmide

Plasmid	Resistenz	Referenz bzw. Konstruktion	Verwendung
pWH844	Amp <sup>R</sup>	Schirmer <i>et al.</i> , 1997	Überexpressionsvektor
pGP172	Amp <sup>R</sup>	Merzbacher <i>et al.</i> , 2004	Überexpressionsvektor
pDG1727	Spc <sup>R</sup>	Guérout-Fleury <i>et al.</i> , 1995	Isolierung der Spc-Resistenzkassette
pMT85	Gent <sup>R</sup>	Zimmermann und Herrmann, 2005	Mini-Transposon
pAG3	Amp <sup>R</sup>	Galinier <i>et al.</i> , 1997	Überexpression von His <sub>6</sub> -EI aus <i>B. subtilis</i>

Plasmid	Resistenz	Referenz bzw. Konstruktion	Verwendung
pGP217	Amp <sup>R</sup>	Steinhauer <i>et al.</i> , 2002	Überexpression von His <sub>6</sub> -HPr aus <i>M. pneumoniae</i>
pGP611	Amp <sup>R</sup>	Merzbacher <i>et al.</i> , 2004	Überexpression von Strep-HPrK aus <i>M. pneumoniae</i>
pGP255	Amp <sup>R</sup>	Claudine Hames, 2005	Überexpression von Strep-GlpK aus <i>M. pneumoniae</i>
<b>In dieser Arbeit konstruiert</b>			
pGP263	Amp <sup>R</sup>	1440 bp PCR-Produkt <i>Nox</i> aus chromosomaler <i>M. pneumoniae</i> DNA (Primer CH54/CH58) über <i>SalI</i> und <i>HindIII</i> in pWH844	Template für die MMR
pGP264	Amp <sup>R</sup>	1440 bp MMR-Produkt <i>nox</i> mit pGP263 (CH54-58) über <i>SalI</i> und <i>HindIII</i> in pWH844	Überexpression von His <sub>6</sub> -Nox aus <i>M. pneumoniae</i>
pGP265	Amp <sup>R</sup>	1155 bp PCR-Produkt <i>glpD</i> aus chromosomaler <i>M. pneumoniae</i> DNA (Primer CH48/CH53) über <i>BamHI</i> und <i>PstI/Mph1103I</i> in pWH844	Template für die MMR
pGP266	Amp <sup>R</sup>	1155 bp MMR-Produkt <i>glpD</i> aus pGP265 (CH48-CH53) über <i>BamHI</i> und <i>PstI/Mph1103I</i> in pWH844	Überexpression von His <sub>6</sub> -GlpD aus <i>M. pneumoniae</i>
pGP267	<i>E. coli</i> : Kan <sup>R</sup> <i>B. subtilis</i> : Erm <sup>R</sup>	1155 bp MMR-Produkt <i>glpD</i> aus pGP266 + RBS von <i>gltC</i> CH59/CH60 über <i>BamHI</i> und <i>SalI</i> in pBQ200	Expression von GlpD aus <i>M. pneumoniae</i> in <i>B. subtilis</i>

Plasmid	Resistenz	Referenz bzw. Konstruktion	Verwendung
pGP268	<i>E. coli</i> : Amp <sup>R</sup> <i>B. subtilis</i> : Cm <sup>R</sup>	1155 bp MMR-Produkt <i>glpD</i> aus pGP267 + RBS von <i>gltC</i> CH59/CH68 über <i>Bam</i> HI und <i>Sma</i> I in pHCMC02	Expression von GlpD aus <i>M. pneumoniae</i> in <i>B. subtilis</i>
pGP269	<i>E. coli</i> : Amp <sup>R</sup> <i>B. subtilis</i> : Cm <sup>R</sup>	1155 bp MMR-Produkt <i>glpD</i> aus pGP267 + RBS von <i>gltC</i> CH59/CH68 über <i>Bam</i> HI und <i>Sma</i> I in pHCMC04	Expression von GlpD aus <i>M. pneumoniae</i> in <i>B. subtilis</i>
pGP270	Amp <sup>R</sup>	1170 bp PCR-Produkt MPN248 ( <i>prkC</i> ) aus chrom. DNA von <i>M.pneumoniae</i> (SH89/SH80) über <i>Bam</i> HI und <i>Sac</i> I in pGP172	Template für die MMR
pGP271	Amp <sup>R</sup>	1170 bp CCR-Produkt MPN248 ( <i>prkC</i> ) aus pGP270 (SH89/SH80/SH81) über <i>Bam</i> HI und <i>Sac</i> I in pGP172	Überexpression von Strep- PrkC aus <i>M. pneumoniae</i>

#### 7.4. Stämme

Tab. 7.3. Bakterienstämme

Stamm	relevanter Genotyp	Referenz bzw. Konstruktion <sup>1</sup>
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17rK<sup>-</sup> mK<sup>+</sup>relA1 supE44 Φ80ΔlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> , <i>lon ompT rBmB hsdS gal (cI<sub>ts857</sub> ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989

<b>Stamm</b>	<b>relevanter Genotyp</b>	<b>Referenz bzw. Konstruktion<sup>1</sup></b>
<b><i>M. pneumoniae</i></b>		
M129	Wildtyp	Somerson <i>et al.</i> , 1963
GPM51	<i>hprK</i> ::Tn4001m	Halbedel <i>et al.</i> , 2006
GPM52	<i>glpD</i> ::Tn4001m	Halbedel, 2006
GPM68	<i>prpC</i> ::Tn4001m	Halbedel, 2006
GPM69	<i>ldh</i> ::Tn4001m	Halbedel, 2006
GPM70	<i>mpn474</i> ::Tn4001m	Halbedel, 2006
<b>in dieser Arbeit isoliert bzw. konstruiert:</b>		
<b><i>M. pneumoniae</i></b>		
GPM8	<i>mpn372</i> ::Tn4001m	pMT85 → M129
GPM9	<i>thyA</i> ::Tn4001m	pMT85 → M129
GPM10	<i>mpn358</i> ::Tn4001m	pMT85 → M129
GPM11	<i>mpn248</i> ::Tn4001m	pMT85 → M129

<sup>1</sup>Der Pfeil (→) steht für eine Transformation

## 7.5. Proteine

**Tab. 7.4. Verwendete Proteine**

<b>Protein</b>	<b>Organismus</b>	<b>Referenz</b>
Enzym I	<i>B. subtilis</i>	pAG3
HPr	<i>M. pneumoniae</i>	pGP217
HPrK	<i>M. pneumoniae</i>	pGP611
GlpK	<i>M. pneumoniae</i>	pGP255
Nox	<i>M. pneumoniae</i>	pGP264
GlpD	<i>M. pneumoniae</i>	pGP266
PrkC	<i>M. pneumoniae</i>	pGP271

## 7.6. Verwendete Internetangebote und Computerprogramme

**Tab. 7.5. Genutzte Internetangebote**

URL	Anbieter	Anwendung
<a href="http://www.zmbh.uni-heidelberg.de/M_pneumoniae/genome/Results.html">http://www.zmbh.uni-heidelberg.de/M_pneumoniae/genome/Results.html</a>	ZMBH, Uni Heidelberg	Recherchen zum Genom von <i>M. pneumoniae</i>
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	National Institutes of Health, Bethesda, USA	Literaturrecherche
<a href="http://www.genome.jp/kegg/kegg.html">http://www.genome.jp/kegg/kegg.html</a>	Kanehisa Laboratories	Sequenzrecherche
<a href="http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi">http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi</a>	The Institute for Genomic Research	Sequenzrecherche
<a href="http://au.expasy.org/tools/">http://au.expasy.org/tools/</a>	Swiss Institute of Bioinformatics	Recherchen zu Proteineigenschaften
<a href="http://smart.embl-heidelberg.de/">http://smart.embl-heidelberg.de/</a>	EMBL	Recherchen zu Proteindomänen
<a href="http://www.microbesonline.org/">http://www.microbesonline.org/</a>	Virtual Institute for Microbial Stress and Survival	Recherche und Vergleiche von Operons
<a href="http://www.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www.ebi.ac.uk/clustalw/</a>	European Bioinformatics Institute	Erstellen von Alignments

**Tab. 7.6. Genutzte Computerprogramme**

Programm	Hersteller	Anwendung
ChemiCapt Version 11.07		Aufnahme von Chemilumineszenzsignalen
SeqMan <sup>TM</sup> II 5.07	DNASTAR	Auswertung von Sequenzierdateien
Swift II Time Drive	Biochrom Ltd.	Enzymmessung

Microsoft Office XP

Microsoft Inc.

Text- und  
Datenverarbeitung

---

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	<u>Claudine</u> Anne Lydia Hames
Geburtsdatum,-ort	03.04.1981, Luxemburg
Staatsangehörigkeit	luxemburgisch
Familienstand	ledig
Eltern	Georgette Hames-Bertemes Dipl. Ing. Alphonse Hames

## Schulbildung

1987-1993	Besuch der Grundschule in Bascharage, Luxemburg
1993-2000	Besuch des Lycée Hubert Clément in Esch/Alzette, Luxemburg

## Studium

2000-2005	Studium der Biologie an der Georg-August Universität Göttingen
2002	Vordiplom
2005	Diplom, Göttingen im Mai 2005
2005-2008	Promotion an der Georg-August Universität Göttingen im Mai 2008