

Untersuchungen von Cytoskelett-Komponenten
und Motilität bei *Mycoplasma pneumoniae*

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

Der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jan Hegermann

aus Göttingen

Göttingen 2003

D7

Referent: Prof. Dr. F. Mayer

Korreferent: Prof. Dr. W. Liebl

Tag der mündlichen Prüfung:

Wer wissen will, wie das Wetter ist,
soll aus dem Fenster sehen.

Wer wissen will, wie das Wetter morgen sein wird,
der möge morgen aus dem Fenster sehen.

(Max Goldt)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	<u>VII</u>
Abbildungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Mycoplasmen und Mollicutes	1
1.2 <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1
1.3 Hinweise auf Cytoskelettelemente bei Bakterien	2
1.4 Cytoskelettkomponenten in <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	3
1.5 Ziel dieser Arbeit	4
2. Material und Methoden	6
2.1 Verwendete Organismen	6
2.2 Verwendete Plasmide / Cosmide	6
2.3 Verwendete Oligonukleotide	7
2.4 Kulturmedien	8
2.4.1 Kulturmedium für <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	8
2.4.2 LB-Medium für die Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	9
2.4.3 Medium A zur Herstellung kompetenter Zellen	9
2.5 Zellanzucht und Ernte	9
2.5.1 Anzucht und Ernte von <i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129 (Wildtyp)	9
2.5.2 Anzucht von <i>E. coli</i>	10
2.6 Lichtmikroskopie	11
2.6.1 Präparation von <i>M. pneumoniae</i> -Zellen für die Lichtmikroskopie	11
2.6.1.1 Präparation für die Lebendbeobachtung	11
2.6.1.2 Präparation für die Fluoreszenzmikroskopie (SETO et al., 2001, mod.)	12
2.6.2 Immunfluoreszenzmarkierungen (SETO et al., 2001, mod.)	12
2.6.3 Lichtmikroskopische Untersuchung der <i>M. pneumoniae</i> -Präparate	13

Inhaltsverzeichnis

2.6.4	Mikrophotographie am Lichtmikroskop	14
2.7	Elektronenmikroskopie	14
2.7.1	Trägernetze (Grids)	14
2.7.2	Trägerfolien	15
2.7.2.1.	Herstellung von Kunststoffolie (MAHL und MÖLDNER, 1973; mod.)	15
2.7.2.2	Kohlebedampfung von formvarbeschichteten Grids	16
2.7.3	Präparation ganzer Zellen („whole-mount-Technik“)	17
2.7.4	Konventionelle Ultramikrotomie	17
2.7.4.1.	Tiefemperatur-Einbettung von Zellsuspensionen in Lowicryl-K4M-Harz (ROTH et al., 1981; CARLEMALM et al., 1982)	17
2.7.4.2	Trimmen der Proben	18
2.7.4.3	Herstellung von Glasmessern	18
2.7.4.4	Herstellung und Kontrastierung von Ultradünnschnitten	18
2.7.5	Kryoultramikrotomie	19
2.7.5.1	Einbettung in Gelatine und Nachfixierung	19
2.7.5.2	Vorbereitung der Proben für den Einfriervorgang	20
2.7.5.3	Einfriervorgang	20
2.5.5.4	Herstellung von Glasmessern für die Kryoultramikrotomie	20
2.7.5.5	Herstellung von Kryoultradünnschnitten	21
2.7.6	"Whole-mount"-Immun-Gold-Markierungen an ganzen Zellen	21
2.7.7	Immun-Goldmarkierungen an Ultradünnschnitten	22
2.8	TX-100-Behandlungen	23
2.8.1	TX-100-Behandlungen für die Elektronenmikroskopie	23
2.8.1.1	TX-100-Behandlung an unfixierten Zellen (REGULA, 1999, mod.)	23
2.8.1.2	TX-100-Behandlung an fixierten Zellen (HEGERMANN et al., 2002)	25
2.8.2	TX-100-Behandlungen für die Fluoreszenzmikroskopie	25
2.8.3	TX-100-Behandlungen für die Elektrophorese	25
2.9	Molekularbiologische Methoden	26
2.9.1	Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion	26

Inhaltsverzeichnis

2.9.2	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	27
2.9.3	Ligation von DNA-Fragmenten	28
2.9.4	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	28
2.9.5	Transformation von <i>E. coli</i> (HANAHAN, 1983)	29
2.9.6	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	30
2.9.6.1	Analytische Isolierung (BIRNBOIM & DOLY, 1979, mod.)	30
2.9.6.2	Quantitative Isolierung	31
2.10	Elektrophoretische Methoden	31
2.10.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LAEMMLI, 1970)	31
2.10.2	Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau (WEBER & OSBORN, 1996; mod.)	34
2.10.3	Western-Transfer (TOWBIN et al., 1979)	34
2.10.4	Doppelimmunpräzipitation mit Alkalische-Phosphatase- gekoppelten Sekundäantikörpern (BLAKE et al., 1984, mod.)	36
2.10.5	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.11	Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme	38
3.	Experimente und Ergebnisse	39
3.1	Lichtmikroskopische Betrachtung lebender <i>M. pneumoniae</i> -Kulturen	39
3.1.1	Definition: Zellkörper, Filament, Bindefilament, Zellausläufer, Einzelzelle, Zellverband, Kolonie, Zellaggregat	39
3.1.2	<i>M. pneumoniae</i> breitet sich auf Glasoberflächen aus und bildet einen Zellrasen	40
3.1.3	Auf Glasoberflächen adhärierte Zellaggregate breiten sich aus	41
3.1.4	Aus Zellverbänden lösen sich Einzelzellen heraus und bewegen sich entlang ihrer Längsachse	41
3.1.5	Mobile Einzelzellen stoppen ihre Bewegung, wenn sie auf unbewegte Zellen treffen	42
3.1.6	Auch Zellverbände sind zum Positionswechsel fähig	43
3.1.7	Zellverbände entstehen aus Einzelzellen, verbinden sich miteinander und entsenden Einzelzellen an benachbarte Zellverbände	44
3.1.8	Nicht nur Einzelzellen können sich aus Zellverbänden lösen	46

Inhaltsverzeichnis

3.1.9	Der Kontakt bewegter Einzelzellen zur Glasoberfläche ist am in Bewegungsrichtung vorderen Ende gegeben	47
3.1.10	Einzelzellen mit Zellkörper bewegen sich langsamer als Einzelzellen ohne Zellkörper	47
3.1.11	Zusammenfassung der beobachteten Charakteristika in der Bewegung von <i>M. pneumoniae</i>	48
3.2	Immun-Fluoreszenzmikroskopie	60
3.2.1	Definition: Tip	61
3.2.2	Immunfluoreszenzmarkierung mit Antiserum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion von <i>M. pneumoniae</i>	62
3.2.3	Immunfluoreszenzmarkierungen: Positive Reaktionen am Tip	63
3.2.4	Immunfluoreszenzmarkierung mit Serum gegen P01_orf1033	64
3.3	Elektronenmikroskopie	68
3.3.1	Die Zellhülle von <i>M. pneumoniae</i>	68
3.3.1.1	Die Cytoplasmamembran von <i>M. pneumoniae</i>	68
3.3.1.2	Triton X-100-Behandlung an fixierten <i>M. pneumoniae</i> -Zellen: Einblicke in die unter der Cytoplasmamembran gelegene Schicht	71
3.3.1.3	Die Schicht unter der Cytoplasmamembran zeigt ein hexagonales Muster	72
3.3.1.4	Auf der Oberfläche fixierter und TX-behandelter <i>M. pneumoniae</i> -Zellen sitzen hexagonal angeordnete Noppen, welche in den Bereich hineinragen, in welchem die Cytoplasmamembran ursprünglich lag	74
3.3.1.5	Zellkörper von fixierten, TX-100-behandelten Zellen erscheinen nach Trocknung am Rand erhöht, mittig abgeflacht	75
3.3.1.6	Modell für ein peripheres Cytoskelett	76
3.3.2	Der Rod	77
3.3.2.1	Der Rod ist im Tip von <i>M. pneumoniae</i> lokalisiert	78
3.3.2.2	Der Rod kann durch konventionelle TX-100-Behandlung freipräpariert werden	79
3.3.2.3	Der Rod ist abgeflacht, biegsam und verdrehbar	79
3.3.2.4	Die Anwesenheit von NaCl sowie die Art des elektronenmikroskopischen Trägermaterials spielen eine Rolle	

Inhaltsverzeichnis

	bei der Präparation der Rods	81
3.3.2.5	Der Rod weist ein charakteristisches Querlinienmuster auf	82
3.3.2.6	Der Rod kann eine Längsspaltung durchmachen, welche stets am distalen Ende beginnt	83
3.3.2.7	Aufgrund der Längsspaltung können bei freipräparierten Rods das distale und proximale Ende am Querlinienmuster unterschieden werden	84
3.3.2.8	Der Rod erscheint als ein Gebilde aus parallelen Längsfasern, welche Verdickungen zeigen, die nebeneinanderliegend die Querlinien des Rod bilden	85
3.3.2.9	Der Rod ist am proximalen Ende an eine Rad-ähnliche Struktur assoziiert	86
3.3.2.10	Lateral befinden sich am Rod periodisch angeordnete Linker zum peripheren Cytoskelett	87
3.3.2.11	Der Rod ist mit Filamenten assoziiert	88
3.3.2.12	Am äußersten Ende des Tip befinden sich periodisch angeordnete Massen	89
3.3.2.13	Modell des Rod	90
3.3.3	Immunelektronenmikroskopie	91
3.3.3.1	Markierungen mit Serum gegen HMW1	91
3.3.3.2	Markierungen mit Serum gegen HMW2	93
3.3.3.3	Markierungen mit Serum gegen P01_orf1033	93
3.3.3.4	Markierungen mit Serum gegen FtsZ	94
3.3.3.5	Markierungen mit Serum gegen EF-Tu	95
3.3.3.6	Markierungen mit Serum gegen TX-100-unlösliche Fraktion	96
3.3.3.7	Markierungen mit Serum gegen P1	97
3.4	Charakterisierung der vom Serum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion erkannten Proteine	136
3.5	Klonierung von P01_orf1033 mit mRFP	138
3.5.1	Amplifikation von P01_orf1033 über PCR	138
3.5.2	Klonierung des Fragmentes P01_orf1033 in pKVmRFP	140
3.5.3	Nachweis des P01_orf1033-Proteins in den transformierten <i>E. coli</i> -Zellen mittels Western-Blot	141

Inhaltsverzeichnis

3.5.4	Sequenzierung der Fusionsstelle P01_orf1033 mit mRFP	142
3.5.5	Zusammenfassung der Klonierung von P01_orf1033	143
4.	Diskussion	144
4.1	Adhäsion und Bewegung von <i>M. pneumoniae</i>	144
4.2	Die „Zellteilung“ bei <i>M. pneumoniae</i>	152
4.3	FtsZ	
4.4	Das periphere Cytoskelett von <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	155
4.5	Stabilisierung der Zellform bei Bakterien	157
4.6	Immun-Gold- und Immun-Fluoreszenzmarkierungen: Vor- und Nachteile	159
4.7	Das P01_orf1033-Protein	161
4.8	EF-Tu	161
4.9	HMW1 – als Linker mit dem Rod verbunden?	163
4.10	HMW2 – Bestandteil des Rod?	165
4.11	HMW3	166
4.12	Das P1-Protein	167
4.13	Modell der Anordnung von HMW1, P1 und P01_orf1033	168
4.14	DnaK	169
4.15	Modell des Tip: Kombination der Daten aus dieser und vorangegangenen Arbeiten	169
4.16	Modell des Rod	170
4.17	Klonierung von P01_orf1033	172
5.	Zusammenfassung	178
6.	Literatur	180

Abkürzungsverzeichnis

(v/v)	volume per volume
(w/v)	weight per volume
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
A	Adenin
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserum- Albumin
C	Cytosin
cm	Centimeter
CT	C-terminus
EDTA	Etylendiamin-tetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-tetraacetat
et al.	und Mitarbeiter
Fa.	Firma
FW	Forward
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
GARG	Goat-Anti-Rabbit-Gold
h	Stunde(n)
kb	Kilobasen
l	Liter
M	Molar
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Milimeter
mM	Milimolar
mod.	modifiziert
mRFP	monomeres rotfluoreszierendes Protein
N	normal
NT	N-terminus
Pa	Pascal
PBS	phosphate buffered saline
PEG	Polyethylenglycol
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PWS	Phosphorwolframsäure
RT	Raumtemperatur
RV	Reverse
sec	Sekunden
T	Thymin
TX-100	Triton X-100
U	Unit
ÜN	über Nacht

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1.1	Seite 50	Abb. 3.3.32	Seite 128
3.1.2	51	3.3.33	129
3.1.3	52	3.3.34	130
3.1.4	53	3.3.35	131
3.1.5	54	3.3.36	132
3.1.6	55 / 56	3.3.37	133
3.1.7	57	3.3.38	134
3.1.8	58	3.3.39	135
3.1.9	59	3.4	137
Zeichenlegende	59	3.5.1	139
3.2.1	65	3.5.2	140
3.2.2	66	3.5.3	141
3.2.3	67	4.1	173
3.3.1	98	4.2	174
3.3.2	99	4.3	175
3.3.3	100	4.4	176
3.3.4	101	4.5	177
3.3.5	102		
3.3.6	103		
3.3.7	104		
3.3.8	105		
3.3.9	106		
3.3.10	107		
3.3.11	108		
3.3.12	109		
3.3.13	110		
3.3.14	111		
3.3.15	112		
3.3.16	113		
3.3.17	113		
3.3.18	114		
3.3.19	115		
3.3.20	116		
3.3.21	117		
3.3.22	118		
3.3.23	119		
3.3.24	120		
3.3.25	121		
3.3.26	122		
3.3.27	123		
3.3.28	124		
3.3.29	125		
3.3.30	126		
3.3.31	127		

1. Einleitung

1.1 Mycoplasmen und Mollicutes

Die Bezeichnung „Mycoplasmen“ ist ein Trivialname, der für alle Spezies der *Mollicutes* verwendet wird (RAZIN & HERRMANN, 2002). Die *Mollicutes* setzen sich taxonomisch aus vier Ordnungen zusammen. Der Genus *Mycoplasma* beinhaltet die meisten beschriebenen Spezies und Subspezies der Mollicutes, er gehört zur Familie der *Mycoplasmataceae* und zur Ordnung *Mycoplasmatales*. *Mycoplasma pneumoniae* ist ein Taxon des Genus *Mycoplasma* (JOHANSSON & PETTERSSON, 2002).

Mollicutes bedeutet „Weichhäuter“. Ihnen gemein ist neben der geringen Größe des Genoms und dessen geringen G+C-Gehalts laut bisheriger Kenntnis das völlige Fehlen einer Zellwand. Durch diese Charakteristika unterscheiden sich die Mollicutes deutlich von anderen Bakterien. Das Genom von *M. pneumoniae* umfasst 816 kb (HIMMELREICH et al., 1996), das von *M. genitalium* 580 kb (FRASER et al., 1995). Phylogenetisch stammen die Mollicutes nach heutiger Sicht von Gram-positiven Bakterien mit geringem G+C-Gehalt ab (MANILOFF, 2002).

1.2 *Mycoplasma pneumoniae*

M. pneumoniae gehört mit *M. hominis*, *M. genitalium* und *M. penetrans* zu den prominentesten humanpathogenen Mycoplasmen (BLANCHARD & BÉBÉAR, 2002). *M. pneumoniae* befällt den oberen und unteren Respirationstrakt und ist der Erreger der atypischen Pneumonie und anderer Atemwegserkrankungen. Die Übertragung erfolgt über Tröpfcheninfektion, es folgt die Adhäsion an das Epithel der Atemwege und die aktive Bewegung der *M. pneumoniae*-Zellen zur Basis der Atemwegs-Cilien, wo sie sich weiter verbreiten (JACOBS, 2002). Die Fähigkeit zur Adhäsion sowie zur aktiven Bewegung sind damit Pathogenitätsfaktoren.

In der Natur ist *M. pneumoniae* immer mit einer Wirtszelle vergesellschaftet. Die Anzucht im Labor gelingt in zellfreiem Vollmedium mit Serum. Die parasitische Lebensweise ist in dem Verlust der genetischen Information für die Synthese einiger

Einleitung

essentieller Zellbestandteile begründet (MANILOFF, 2002). Das Genom von *M. pneumoniae* wurde komplett sequenziert, das Ergebnis wurde 1996 veröffentlicht (HIMMELREICH et al., 1996). Es codiert nicht für die Synthese von Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Fettsäuren, Geißeln und Bestandteilen einer bakteriellen Zellwand. *M. pneumoniae* ist nur von einer Cytoplasmamembran umgeben, welche Cholesterin als wichtigen Bestandteil enthält und dadurch stabilisiert ist (RAZIN et al., 1998). Die Lebensweise ist in der Natur stets parasitisch.

1.3 Hinweise auf Cytoskelettelemente bei Bakterien

Das eukaryotische Cytoskelett besteht aus drei Typen von Proteinfilamenten: Aktinfilamenten, intermediären Filamenten und Mikrotubuli (DREWES et al., 1998). Aktinfilamente können unter der Plasmamembran ein Netzwerk ausbilden (PUMPLIN & BLOCH, 1993). Im Zusammenhang mit Myosin ermöglichen sie aktive Bewegungen der Zelle. Mikrotubuli bestehen aus polymerisiertem Tubulin. Sie haben einen Durchmesser von ~24 nm und eine variable Länge (AMOS, 1978).

Bakterien besitzen kein aus diesen Komponenten aufgebautes Cytoskelett. Dennoch weisen die meisten Bakterien eine asymmetrische Zellform auf. Der Erhalt von z. B. der Form eines Stäbchens erfordert Stützmechanismen, die dem Zellturgor entgegenwirken und somit das Abkugeln der Zellen verhindern. Eine solche Funktion wird der bakteriellen Zellwand zugeschrieben. ANTRANIKIAN et al. (1987) konnten jedoch zeigen, daß Zellen von *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* ihre typische Stäbchenform auch bei Verlust der surface layer und der Peptidoglycanschicht beibehielten. Daraus wurde geschlossen, daß zusätzlich zur beschriebenen Peptidoglycanschicht ein weiteres System zur Erhalt der Asymmetrie der Zellen vorhanden sein muß.

1996 wurde die These vom "Enzoskelett" bei *Escherichia coli* präsentiert (NORRIS et al., 1996), wonach *E. coli*-Zellen von einem hochmolekularen Netzwerk aus Multienzymkomplexen, Nucleinsäuren und cytoskelettartigen Proteinen wie MukB, FtsA, FtsZ und MreB durchzogen sind. FtsA und MreB zeigen strukturelle Ähnlichkeiten und Sequenzähnlichkeiten zu eukaryotischem Aktin (BORK et al., 1992; JONES et al., 2001; CARBALLIDO-LOPEZ & ERRINGTON, 2003). MukB spielt eine Rolle bei der Verteilung von Tochterchromosomen bei der Zellteilung

Einleitung

(NIKI et al., 1991) und bildet dabei einen Komplex mit MukE und MukF (OHSUMI et al., 2001), aber nicht mit FtsZ (BLAAUWEN et al., 2001).

FtsZ kommt bei allen Prokaryonten vor (LUTKENHAUS, 1993) und weist strukturelle Ähnlichkeit zum eukaryotischen Tubulin auf (LÖWE & AMOS, 1998). Es ist während der Zellteilung in der Teilungsebene lokalisiert, wo es ein ringförmiges Septum formt (ADDINALL et al., 1996; BAUMANN und JACKSON, 1996; RUEDA et al., 2003). Das im Ring vorhandene FtsZ steht in ständigem Austausch mit cytosolischem FtsZ (ERRINGTON, 2003).

Im Jahr 2001 erschienen Arbeiten über bakterielle Cytoskelettkomponenten bei *Spiroplasma melliferum* und *Bacillus subtilis*. Spiroplasmen sind aktive Schwimmer (KIRCHHOFF, 1992). Bei *Spiroplasma melliferum* konnten elektronenmikroskopisch nach Detergensbehandlung Fibrillen abgebildet werden, welche die Tendenz zu parallelen Anordnung aufwiesen. Eine Anordnung dieser Fibrillen zu einem „Ribbon“, welches die Zellen von *S. melliferum* längs durchzieht und kontraktil wirkt, konnte von TRACHTENBERG & GILAD (2001) nachgewiesen werden.

In *Bacillus subtilis* konnten helical gewundene Filamente beobachtet werden, welche dicht an der Zelloberfläche angeordnet sind und aus MreB und Mbl aufgebaut sind (JONES et al., 2001).

Neue Studien postulieren die maßgebliche Beteiligung von Elongationsfaktor Tu an einem bakteriellen Cytoskelett (MAYER, 2003 a; MAYER, 2003 b).

1.4 Cytoskelettkomponenten in *Mycoplasma pneumoniae*

Mycoplasmen sind wegen der Abwesenheit einer klassischen Zellwand bei gleichzeitiger Stabilisierung einer asymmetrischen Zellform geeignete Modellorganismen zur Untersuchung von bakteriellen Cytoskelettkomponenten. *M. pneumoniae* weist eine Membranausstülpung auf, welche in der Literatur als „attachment-organelle“ oder „terminal organelle“ oder „tip-structure“ bezeichnet wird. In dieser Arbeit soll der Begriff „Tip“ für diesen Zellbereich gelten. Einige Proteine, welche am Aufbau des Tip beteiligt sind, konnten identifiziert werden (KRAUSE, 1996; KRAUSE, 1998; KRAUSE & BALISH, 2001; BALISH et al., 2003). Viele der identifizierten Proteine sind unlöslich im Detergens Triton X-100. Ihnen wird daher eine Beteiligung am Aufbau eines Cytoskelettes zugeschrieben.

Einleitung

Eukaryotische Cytoskelettkomponenten können mit diesem Detergens von anderen Zellkomponenten freipräpariert werden (HERRMANN & WICHE, 1983).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen an *M. pneumoniae* brachten schon vor langem eine elektronendichte Struktur im Tip zum Vorschein, einen länglichen, längs im Tip lokalisierten Kern, welcher von einem elektronendurchscheinenden Raum flankiert ist (BIBERFELD & BIBERFELD, 1970; WILSON & COLLIER, 1976). Diese Struktur, in der Literatur oft als „electron-dense core“, in dieser Arbeit als „Rod“ bezeichnet, konnte durch Triton-X-100-Behandlung von *M. pneumoniae*-Zellen für die Elektronenmikroskopie dargestellt werden (MENG & PFISTER, 1980; GÖBEL et al., 1981; REGULA et al., 2001; HEGERMANN et al., 2002). Sie ist maßgeblich an der Cytadhärenz und damit der Pathogenität von *M. pneumoniae* beteiligt; es konnte elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden, daß sie in Adhärenz-negativen Mutanten fehlt oder verändert erscheint (SETO & MIYATA, 2003).

1.5 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, Cytoskelettkomponenten des Bakteriums *Mycoplasma pneumoniae* zu charakterisieren. Hierzu sollten elektronenmikroskopische sowie lichtmikroskopische Untersuchungen durchgeführt werden. Durch lichtmikroskopische Beobachtung lebender *M. pneumoniae*-Zellen sollte deren Verhalten während der Besiedlung einer Glasoberfläche untersucht werden.

Durch Immunfluoreszenzfärbungen sollte eine Auswahl an Antiseren ermittelt werden, welche an *M. pneumoniae*-Zellen in dem Bereich binden, der als Tip bezeichnet wird. Über Immunelektronenmikroskopie sollte dann eine genauere Lokalisation einzelner Proteine erfolgen.

Eine im Tip von *M. pneumoniae* lokalisierte, im Detergens Triton X-100 unlösliche Struktur, die in dieser Arbeit als „Rod“ bezeichnet wird, sollte in Bezug auf ihre Ausmaße, ihr Erscheinungsbild, ihre Symmetrie sowie ihre Lokalisation und Verankerung in der Zelle näher beschrieben werden. Hierzu sollten elektronenmikroskopische Untersuchungen an Triton X-100-Präparationen von *M. pneumoniae* durchgeführt werden.

Einleitung

Durch konventionelle Ultramikrotomie sowie Kryoultramikrotomie sollten die genaue Lage dieser Struktur in der Zelle sowie die strukturelle Organisation ihrer unmittelbaren Umgebung ermittelt werden.

Da Mycoplasmen bisher als zellwandlose, nur von einer Cytoplasmamembran umgebene Bakterien beschrieben wurden, sollte ermittelt werden, ob und, falls ja, in welcher Form strukturgebende Komponenten in *M. pneumoniae* vorhanden sind, die die asymmetrische Zellform stabilisieren. Zur Klärung dieser Frage sollten elektronenmikroskopische Untersuchungen der Zellhülle und insbesondere der unmittelbar unter der Cytoplasmamembran gelegenen Schicht durchgeführt werden.

Das P01_orf1033-Protein von *M. pneumoniae* sollte rekombinant als Konstrukt mit einem rotfluoreszierenden Protein kloniert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Organismen

Mycoplasma pneumoniae M129 B18 ATCC 29342

Escherichia coli TOP 10

2.2 Verwendete Plasmide / Cosmide

Zur Klonierung von P01_orf1033 wurde der Vektor pKV*mRFP* verwendet. Dieser wurde von Carl-Ulrich Zimmermann, Zentrum für molekulare Biologie Heidelberg (ZMBH) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Er beinhaltet die DNA-Sequenz für monomeres rotfluoreszierendes Protein (mRFP) (CAMPBELL et al., 2002).

Im Vektor pKV befindet sich das Transposon Tn4001, in welches die Sequenz für mRFP zwischen zwei von HAHN et al. (1999) zugefügten Schnittstellen für EcoRI und BamHI integriert ist. Abb. 2.1 zeigt eine Schemazeichnung vom Tn 4001.

Das Cosmid pcos MPP1 (WENZEL & HERRMANN, 1989) enthält die Sequenz für P01_orf1033 und wurde als Template-DNA in der PCR eingesetzt.

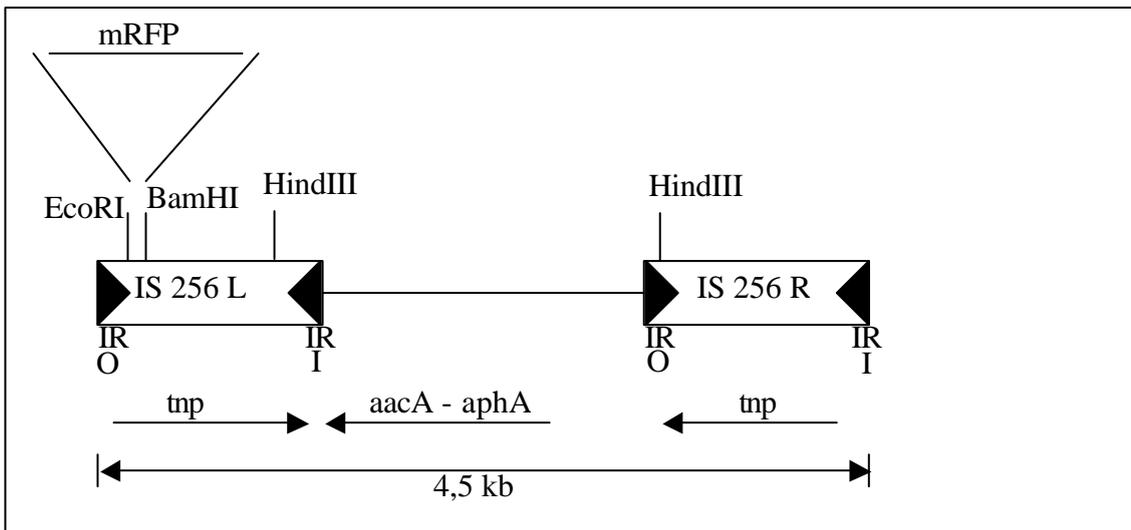


Abb. 2.1: Schemazeichnung des Transposons Tn 4001. Die zwei Kästen stellen die beiden IS-Elemente da (IS 256 L und R), die jeweils für die Transposase (tnp) codieren. O, I: äußeres und inneres Ende der beiden Elemente; IR: inverted repeats. Zwischen den beiden IS-Elementen liegt ein Bereich (aacA – aphA), welcher für die Resistenz gegen Gentamycin, Kanamycin und Tobramycin codiert.

2.3 Verwendete Oligonukleotide

Es wurden die in Tabelle 1. aufgeführten Oligonukleotide eingesetzt.

Tab. 1: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Anwendung
P01-FW <i>EcoRI</i> -NT	5' - CGG AAT TCT CAA GTC CAA AAA TGC ACG GA -3'	P01_orf1033- Amplifizierung Forward
P01-RV <i>ApaI</i> -CT	3' - GA TTC TAG TTA CCG TTC GTC CCC GGG GTG TCG -5'	P01_orf1033- Amplifizierung Reverse
mRFP-RV	3' - TAG GAC AGG GGA GTC AAG -5'	P01-mRFP- Sequenzierung

2.4 Kulturmedien

2.4.1 Kulturmedium für *Mycoplasma pneumoniae*

Mycoplasma pneumoniae wurde in modifiziertem Hayflick Medium (HAYFLICK, 1965) angezogen. Das Medium besteht aus zwei Komponenten: der Basis- und der Zusatzkomponente. Die Basiskomponente wird nach dem Ansetzen autoklaviert. Die Bestandteile der Zusatzkomponente (Glucoselösung wird autoklaviert; Penicillinlösung wird steril filtriert) werden zusammengegeben und bei -20 °C gelagert. Das Komplettmedium wird durch Vermischen der Basiskomponente mit der aufgetauten Zusatzkomponente hergestellt und ist ungefähr 4 Wochen bei 4 °C haltbar.

Basiskomponente

PPLO Broth w/o –CV, Difco	7,3 g
Phenolrot (0,5 %)	2,0 ml
HEPES	11,9 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 400 ml

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7,6 – 7,8 eingestellt.

Zusatzkomponente

Pferdeserum (steril)	100 ml
50 % Glucose (steril)	10 ml
Penicillin G (100.000 U/ml, steril)	5 ml

Das Komplettmedium hat ein Endvolumen von 515 ml.

Herstellung der Phenolrotlösung:

1 g Phenolrot wird im Mörser unter langsamer Zugabe von 30 ml 0,1 N NaOH zerrieben. Die Suspension wird mit H₂O_{bidest.} auf 200 ml aufgefüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Lösung wird dann durch einen Glasfaserfilter (200 S) filtriert und auf pH 7,5 eingestellt. Nach dem Autoklavieren ist die Lösung mehrere Monate bei 4 °C haltbar.

2.4.2 LB-Medium für die Anzucht von *Escherichia coli*

(SAMBROOK et al., 1989)

Hefeextrakt	5,0 g
Trypton	10,0 g
NaCl	10,0 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
(Ampicillin 50 µg / ml)	

Eine Einstellung des pH-Wertes war nicht erforderlich. Zur Herstellung von Agarplatten wurden 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

2.4.3 Medium A zur Herstellung kompetenter Zellen (siehe Kap. 2.9.4)

Hefeextrakt	5,0 g
Trypton	10,0 g
NaCl	10,0 g
Glucose	20,0 g
MgSO ₄ X 7 H ₂ O	2,0 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml

2.5. Zellanzucht und Ernte

2.5.1 Anzucht und Ernte von *Mycoplasma pneumoniae* M129 (Wildtyp)

Es wurden je 90 ml *Mycoplasma*-Kulturmedium mit 10 ml Zellmaterial in 450 ml-Kulturflaschen beimpft. Die Ernte erfolgte nach drei Tagen Inkubation bei 37 °C. Das Wachstum der Kultur wurde durch einen Farbumschlag des im Medium vorhandenen Phenolrots nach Gelb angezeigt (Anreicherung von sauren Stoffwechselprodukten). Nach Absaugen des Mediums wurden die am Flaschenboden adhärennten Zellen zweimal durch Übergießen mit PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS mit einem Zellschaber abgelöst, resuspendiert und der Flasche entnommen, um auf diese

Material und Methoden

weise je Kulturflasche 1 ml Zellsuspension zu erhalten. Bei gleichzeitiger Anzucht mehrerer Kulturflaschen können die jeweils erhaltenen Portionen vereinigt werden. Zellen welche für Immun-Gold- oder Immunfluoreszenzmarkierungen an Grids oder Deckgläser adhären sollten, wurden nicht mit PBS gewaschen sondern nach Abnahme des Mediums in 1 ml frischem, auf 37 °C vorgewärmtem Medium abgeschabt und darin resuspendiert und der Flasche entnommen.

Vereinzelung von *M. pneumoniae*-Zellen in einer Zellsuspension

Zur Auflösung größerer Zellaggregate in einer Zellsuspension wurde die Suspension mehrfach in einer Glaspipette aufgezogen. Die Pipettengröße wurde dabei so gewählt, daß mindestens die Hälfte des Volumens an Suspension von der Pipette aufgenommen werden konnte. Es wurde solange vereinzelt, bis eine makroskopisch homogene Suspension entstanden war.

PBS (phosphat buffered saline) (10 X)

Lösung A:

K ₂ HPO ₄	57 g
NaCl	45 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 500 ml

Lösung B:

KH ₂ PO ₄	34 g
NaCl	45 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 500 ml

Lösung A und B werden gegeneinander titriert bis ein pH-Wert von 6,8 erreicht ist.

2.5.2 Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte in Reagenzgläsern, Erlenmeyer- oder Schikanekolben. Das Kulturvolumen betrug 10-20 % des Füllvolumens der Anzuchtgefäße. Für die analytische Plasmidisolierung (siehe Kap. 2.6.9) wurden 1,5 ml fassende Reaktionsgefäße beimpft. Die Kulturen wurden unter Schütteln bei 37 °C ÜN inkubiert.

Stammkulturen

Die *E. coli*-Stämme konnten über kürzere Zeiträume auf LB-Platten bei 4 °C gelagert werden. Stammkulturen wurden bei 37 °C in LB-Medium angezogen. Während der logarithmischen Wachstumsphase wurden 0,5 ml Zellsuspension steril entnommen,

Material und Methoden

mit 0,5 ml Glycerin (87 % [v/v]) versetzt und sofort vermischt. Die Lagerung erfolgte bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Bestimmung der optischen Dichte

Für die Bestimmung der optischen Dichte einer Kultur wurden 1 ml-Proben entnommen die Extinktion gegenüber unbeimpfter Nährlösung bei 600 nm bestimmt. Die Messung erfolgte im Photometer (Ultrospec 3000, Amersham Pharmacia, Cambridge, England) bei einer Wellenlänge von 600 nm in Plastikküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm.

2.6 Lichtmikroskopie

2.6.1 Präparation von *M. pneumoniae*-Zellen für die Lichtmikroskopie

M. pneumoniae-Zellen wurden wie Kap. 2.5.1 beschrieben angezogen und geerntet. Das Abschaben der Zellen erfolgte nicht in PBS, sondern in 2 ml frischem, auf RT vorgewärmtem Wachstumsmedium. Nach Vereinzelung der Zellen (siehe Kap. 2.5.1) wurden je 200 μl Zellsuspension so auf ein Standard-Deckgläschen für die Lichtmikroskopie aufgetragen, daß keine Flüssigkeit über den Rand des Deckgläschens hinauslief. Auf diese Art benetzte Deckgläschen wurden in einer geschlossenen Petrischale 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Die Deckgläschen wurden dann in der Petrischale 2 x durch Überschichten mit PBS und kurzes Schwenken gewaschen. Hierbei wurde darauf geachtet, daß keine deutlich makroskopisch sichtbare Masse von Zellmaterial auf den Deckgläschen haften blieb. Anschließend wurden die adhärirten Zellen entweder für die Fluoreszenzmikroskopie fixiert (siehe Kap. 2.6.1.2) oder für die Lebendbeobachtung weiterverwendet (siehe Kap. 2.6.1.1).

2.6.1.1 Präparation für die Lebendbeobachtung

Die wie in Kap. 2.6.1 präparierten Deckgläschen wurden mit einer flachen Pinzette aus der Petrischale entnommen und mit fussselfreiem Filterpapier an der unteren, nicht

Material und Methoden

mit Zellsuspension benetzt gewesenen Seite trockengewischt. Das Deckglas wurde dann mit dem Zellrasen nach unten orientiert auf einen Glasobjektträger gelegt. Es wurde dann frisches Wachstumsmedium an einer Seite des Deckgläschens zupipettiert, während auf der gegenüberliegenden Seite Flüssigkeit mit Filterpapier abgesaugt wurde. Auf diese Weise wurde der zwischen Deckglas und Objektträger befindliche Puffer vollständig durch frisches Medium ersetzt.

2.6.1.2 Präparation für die Fluoreszenzmikroskopie (SETO et al., 2001, mod.)

Die wie in Kap. 2.6.1 präparierten Deckgläschen wurden zur Fixierung der Zellen mit einer Lösung von 0,25 % Glutaraldehyd (v/v) und 3,7 % Formaldehyd (w/v) in PBS überschichtet und 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Fixierlösung wurde abgenommen und die Deckgläschen wurden 3 mal für 5 min in PBS unter leichtem Schwenken bei RT gewaschen. Optional erfolgte anschließend ein Permeabilisierungsschritt durch Überschichten der Deckgläschen mit 0,1 % TX-100 in PBS und Inkubation für 5 min bei RT unter leichtem Schwenken und anschließenden dreimaligem Waschen in PBS bei RT. Die Deckgläschen wurden anschließend entweder sofort für Immunmarkierungen verwendet oder getrocknet und trocken aufbewahrt.

2.6.2 Immunfluoreszenzmarkierungen (SETO et al., 2001, mod.)

Wie in Kap. 2.6.1 beschrieben präparierte Deckgläschen wurden in einer Petrischale so hingelegt, daß die mit Zellen bewachsene Seite nach oben zeigte. Auf die Deckgläschen wurden dann 200 µl des in PBS-BSA (2% BSA in PBS) verdünnten Primärantikörpers pipettiert und bis zum Rand des Deckgläschens ausgestrichen, sofern die Antikörperlösung das Deckgläschen nicht selbständig benetzte. Es wurde hierbei darauf geachtet, daß keine Antikörperlösung über den Rand des Deckgläschens und unter das Deckgläschen gelangen konnte. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte in geschlossener Petrischale bei RT 2 h. Anschließend wurden die Deckgläschen in der Petrischale mit PBS überschichtet und kurz geschwenkt, die Waschlösung wurde dann gegen frische ersetzt und die Schale unter

Material und Methoden

leichtem Schwenken 10 min bei RT inkubiert. Der Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Deckgläschen mit einer flachen Pinzette aus der Petrischale herausgenommen und an der Unterseite (der nicht bewachsenen Seite) mit fussselfreiem Zellstoff trockengewischt und in eine trockene Petrischale gelegt. Die Sekundärantikörperlösung (anti-Rabbit-IgG) wurde auf gleiche Weise auf die Deckgläschen gegeben wie die Primärantikörperlösung. Der Sekundärantikörper war wahlweise mit FITC oder Alexa 546 gekoppelt. Die Verdünnung des Sekundärantikörpers erfolgte in PBS-BSA und betrug 1 : 1000. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte 30 min bei RT unter Lichtabschluß. Anschließend wurden die Deckgläschen auf die gleiche Art wie nach der Inkubation mit dem Primärantikörper gewaschen und sofort mit der bewachsenen Seite nach unten weisend auf einen Glasobjektträger gelegt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Präparate konnten anschließend getrocknet und unter Lichtabschluß aufbewahrt werden.

2.6.3 Lichtmikroskopische Untersuchung der *M. pneumoniae*-Präparate

Wie Kap. 2.6.1 beschrieben hergestellte Deckgläschen wurden mit der bewachsenen Seite nach unten weisend auf Glasobjektträger gelegt. Bei Trockenpräparaten wurde zuvor ein Tropfen PBS auf den Glasobjektträger pipettiert; bei frischen Präparaten war dies in der Regel nicht notwendig. Die Präparate wurden an einem Zeiss Axiophot-Mikroskop unter Verwendung eines Phasenkontrast-Ölimmersionsobjektivs von 100-facher und Okularen von 10-facher Vergrößerung betrachtet; die Gesamtvergrößerung war demnach 1000-fach. Die Fokusebene war auf die Unterseite des Deckgläschens gerichtet, wo sich ein einschichtiger Zellrasen befand. Die Schärfentiefe entsprach hierbei in etwa der Dicke des Zellrasens, sodaß losgelöste Anteile von partiell losgelösten Zellen aus der Fokusebene herausragten und somit als losgelöst erkannt werden konnten. Nicht adhärierte Zellen befanden sich nicht in der Fokusebene.

Für Fluoreszenzaufnahmen wurde der entsprechende Filtersatz (Filtersatz 09 für FITC-markierte Präparate; Filtersatz 43 für Alexa-markierte Präparate) eingelegt und das Präparat über eine am Mikroskop angebrachte UV-Beleuchtungseinheit angeregt. Hierbei wurde das Durchlicht für schwach fluoreszierende Präparate ganz

ausgeschaltet; bei stark fluoreszierenden Präparaten konnten Mischbilder aus Fluoreszenzsignal und Phasenkontrast direkt aufgenommen werden.

2.6.4 Mikrophotographie am Lichtmikroskop

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden entweder mit einer am Mikroskop angeflanschten Digitalkamera „Canon Powershot G2“ unter Verwendung einer hierzu von der Firma Zeiss in Göttingen mitgelieferten passenden Zusatzoptik, oder mit einer „Jendigital C 1.3“ –Digitalkamera der Firma Jenoptik unter Verwendung eines Stativs durch das Okular angefertigt. Die Bedienung der Kameras erfolgte hierbei jeweils unter Beachtung der Herstellerangaben mit der größtmöglichen Bildauflösung.

Die Aufnahmen wurden anschließend unter Verwendung der vom Hersteller mitgelieferten Software auf Standardrechner übertragen. Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm Photoshop 6.0. Verwendete Filter waren ausschließlich Kontrastkorrektur, Farbkorrektur und Hochpassfilterung. Für Mischbilder aus reinem Phasenkontrast und reinem Fluoreszenzsignal wurde das Fluoreszenzbild auf 50 % Transparenz eingestellt und über das Phasenkontrastbild gelegt. Die beiden Ebenen wurden dann auf Hintergrund reduziert und anschließend gegebenenfalls nochmals kontrastkorrigiert.

2.7 Elektronenmikroskopie

Die beschriebenen Präparationen beziehen sich auf die Transmissions-Elektronenmikroskopie. Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Dr. M. Rohde, GBF Braunschweig, angefertigt.

2.7.1 Trägernetze (Grids)

Es wurden Grids der Typen G300 und G400 aus Nickel mit quadratischen Fenstern (Fa. Plano, W. Plannet GmbH, Wetzlar) verwendet.

2.7.2 Trägerfolien

Alle Grids wurden zunächst mit Formvarfolie befilmt. Grids für die Aufnahme von Ultradünnschnitten wurden direkt verwendet, Grids für die "On-Grid-Zellanzucht", die Negativkontrastierung und für die Aufnahme von Kryoultradünnschnitten wurde zusätzlich eine Kohleschicht aufgedampft. Diese diente der Stabilisierung der Trägerfolie und der besseren Adsorption der Zellen.

2.7.2.1. Herstellung von Kunststoffolie (MAHL und MÖLDNER, 1973; mod.)

Es wurde eine Lösung von 0,5 % (w/v) Formvar (Polyvinylformaldehyd) in wasserfreiem Chloroform hergestellt. Die Lösung wurde durch ein Papierfilter in einen Tropftrichter gegeben. Ein Glasobjektträger wurde zum Entfernen von Staub mit Zellstoff trocken abgewischt und in den Tropftrichter gestellt. Die Füllhöhe im Tropftrichter wurde so gewählt, daß der Objektträger zu ca. 2/3 mit Formvarlösung bedeckt war. Die Formvarlösung wurde dann abgelassen, der Objektträger aus dem Tropftrichter entnommen und ca. 1 min zum Trocknen in ein staubfreies Becherglas gestellt, welches während der Trocknungszeit abgedeckt wurde. Nach dem Verdunsten des Chloroforms blieb ein dünner Film aus Formvar auf dem Objektträger haften. Die Dicke des Films konnte durch die Ablaufgeschwindigkeit der Formvarlösung gesteuert werden. Ein 2 l-Becherglas wurde bis zum Rand mit destilliertem Wasser gefüllt und die Oberfläche des Wassers mit einem Filterpapier von schwimmenden Schmutzpartikeln befreit. Der Objektträger wurde ohne vorheriges Anritzen der Kanten senkrecht in das Wasser abgetaucht, wobei sich der Formvarfilm von dem Objektträger löste und auf die Wasseroberfläche abflottierte. Schwimmende Formvarfilme wurden dann möglichst dicht mit Nickelgrids belegt, wobei die Arbeitsseite der Grids nach unten, zur Folie hin orientiert war. Vollständig belegte Folien wurden mit einem Stück Parafilm-Deckpapier bedeckt. Das Papier wurde dann mitsamt der Formvarfolie und den Grids von der Wasseroberfläche abgenommen und mit den Grids nach oben zeigend auf ein Filterpapier gelegt, dort getrocknet und in einer Petrischale staubfrei verwahrt.

2.7.2.2 Kohlebedampfung von formvarbeschichteten Grids

Formvarbeschichtete Grids wurden direkt durch Verdampfung angespitzter Kohlestäbe (Spektralkohle höchster Reinheit, Ringsdorff, Bonn-Bad Godesberg) in einer Hochvakuum-Bedampfungsanlage (E 306, Edwards High Vacuum Ltd., Crawley, Sussex, UK) mit einer dünnen Kohleschicht bedampft. Hierzu wurden zwei bis drei Parafilm-Deckpapierstreifen mit daran heftenden formvarbeschichteten Grids mit den Grids nach oben weisend in die Bedampfungsanlage gelegt, seitlich mit Klebeband fixiert und bei einem Vakuum von 5×10^{-5} Pa für 5-10 Sekunden bei ca. 60 relativen Stromstärkeeinheiten bedampft.

2.7.3 Präparation ganzer Zellen („whole-mount-Technik“)

Mit Kohle bedampfte Formvar-Nickelgrids wurden bei Raumtemperatur mit der Arbeitsseite nach unten weisend zunächst für 1 min auf Tropfen einer fixierten Zellsuspension und anschließend 3 mal für 5 min auf Tropfen mit PBS gelegt. Die Flüssigkeit wurde nach jedem Tropfen mit Filterpapier möglichst vollständig von den Grids abgesaugt. Grids, die für Immun-Goldmarkierungen oder TX-100-Behandlung bestimmt waren, wurden anschließend sofort weiterverwendet, die restlichen Grids wurden zunächst für 5 min bei Raumtemperatur auf Tropfen mit H₂O_{bidest.} gelegt und anschließend kontrastiert.

2.7.4 Konventionelle Ultramikrotomie

2.7.4.1. Tieftemperatur-Einbettung von Zellsuspensionen in Lowicryl-K4M-Harz (ROTH et al., 1981; CARLEMALM et al., 1982)

Es wurden Zellen direkt nach der Ernte in 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS aufgenommen und in dieser Lösung mindestens 1 h bei 4 °C fixiert.

1 ml fixierter Zellsuspension wurde im Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (7000 × g, 5 min, Biofuge 13, Heraeus) und das Pellet in ca. 100 µl PBS

Material und Methoden

resuspendiert. Es wurden dann 150 µl 2 %iger, ca. 50 °C warmer Agar mit abgeschnittener Pipettenspitze zügig zugegeben, die Suspension zur gründlichen Vermischung 3 × in der Pipette aufgezogen und anschließend auf Eis gestellt. Nach Erstarren des Zell-Agar-Gemisches wurde der Agarblock aus dem Eppendorf-Reaktionsgefäß herausgelöst und in Würfel von 1-2 mm Kantenlänge geschnitten. Es wurden dann in einige Schnappdeckelgläschen je ca. 15 Würfel gegeben. In diesen wurde den Agarwürfeln zunächst durch sukzessiven Austausch gegen Methanol das Wasser entzogen. Das Methanol wurde dann gegen flüssiges Harz ausgetauscht. Entwässerung und Harzinfiltration erfolgten nach dem in Tabelle 2 beschriebenen Schema.

Tabelle 2: Schema zur Entwässerung und Harzinfiltration

Flüssigkeit	Temperatur [°C]	Inkubationszeit
15 % Methanol	0	15 min
30 % Methanol	0	30 min
50 % Methanol	-20	30 min
70 % Methanol	-35	30 min
95 % Methanol	-35	60 min
100 % Methanol	-35	60 min
Methanol / Harz 1:1	-35	60 min
Methanol / Harz 1:2	-35	60 min
100 % Harz	-35	2 h
100 % Harz	-35	1 mal kurz wechseln, dann über Nacht

Die Agarblöckchen wurden dann in mit frischem Harz gefüllte Gelatinekapseln (BEEM-Kapseln, Plano, W. Plannet GmbH, Wetzlar) überführt. Die Polymerisation erfolgte zunächst 24 h bei -35 °C und dann 24 h bei Raumtemperatur (UV-Lichtschrank RTP 010, Balzers Union, Liechtenstein), jeweils unter UV-Licht (366 nm). Die Inkubationen bei -35 °C wurden in einer Tiefkühltruhe mit Kühlfalle (TPP 010, Balzers Union, Liechtenstein) durchgeführt.

Komponenten des Lowicryl-K4M-Harzes:

Crosslinker A	6,75 g
Monomer B	43,30 g
Initiator C	0,25 g

Die einzelnen Komponenten wurden bei Raumtemperatur gelagert. Das unter dem Abzug angerührte Harz wurde bei -35 °C aufbewahrt.

2.7.4.2 Trimmen der Proben

Fertig auspolymerisierte Harzblöcke wurden in einer Diamantfräse (TM 60, Reichert, Wien, Österreich) angespitzt. Es wurde eine Pyramide geformt, deren Spitze waagrecht zur Längsachse des Harzblocks so abgeflacht wurde, daß eine quadratische Fläche von ca. 1 mm² entstand. Die im Harzblock eingebettete Probe wurde dabei teilweise freigelegt, so daß sie in dieser Fläche zum Vorschein kam.

2.7.4.3 Herstellung von Glasmessern

Für die Herstellung von Glasmessern wurden von 25 mm breiten und 6,5 mm dicken Tafelglasstreifen (LKB, Broma, Schweden) Quadrate mit Hilfe eines Messerbrechers (Knifemaker II, LKB, Broma, Schweden) abgebrochen. Aus diesen Glasquadraten konnten im Idealfall durch diagonales Anritzen (45 °-Winkel) und Brechen zwei Messer gewonnen werden, deren Schnittfläche einen realen Winkel von 55 ° bei einem Gegenstück von ca. 0,5 mm aufwies.

Die verwendbaren Glasmesser wurden mit einem Kunststofftrog (Plano, W. Plannet GmbH, Wetzlar) versehen, welcher mit flüssigem Dentalwachs an die Messer geklebt und abgedichtet wurde. Auf diese Weise fertiggestellte Glasmesser wurden bis zu ihrer Benutzung staubfrei verwahrt. Die Benutzung erfolgte spätestens eine Woche nach Herstellung der Messer.

2.7.4.4 Herstellung und Kontrastierung von Ultradünnschnitten

Nach Einspannen eines Glasmessers und einer getrimmten Probe in das Ultramikrotom (FC 4, Reichert-Jung, Österreich) wurden Schnittfläche und Messerkante parallel zueinander ausgerichtet. Der Trog des Messers wurde mit filtriertem bidestilliertem Wasser aufgefüllt. An der Messerkante ergab sich dabei eine konkave Oberfläche. Es wurden dann zunächst einige Semidünnschnitte angefertigt. Sobald diese regelmäßig auf die Wasseroberfläche abflottierten, wurde die Schnittdicke auf 70 nm eingestellt. Die entstehenden Ultradünnschnitte wurden anhand ihrer Interferenzfarbe beurteilt. Schnitte mit grauer Färbung wurden mit einer

Material und Methoden

Wimper auf der Wasseroberfläche zusammengetrieben und mit einem formvarbeschichteten Nickelgrid von der Wasseroberfläche so abgenommen, daß die Schnitte auf der beschichteten Seite des Grids lagen. Überschüssiges Wasser wurde mit Filterpapier vom Grid abgesaugt. Grids mit Schnitten, an denen Immun-Goldmarkierungen durchgeführt werden sollten, wurden bis dahin mit den Schnitten nach unten weisend auf PBS schwimmend aufbewahrt. Sonstige Grids wurden sofort kontrastiert. Die Kontrastierung erfolgte in der Regel durch Inkubation der Grids mit nach unten weisender Arbeitsseite auf Tropfen von 3% iger Phosphorwolframsäure (pH 7) für 30 sec. Die Grids wurden anschließend nicht gespült sondern die Flüssigkeit gleich auf Filterpapier ablaufen gelassen und die Grids auf dem Filterpapier getrocknet.

Für die Kontrastierung mit Bleicitrat / Uranylacetat wurden die Grids zunächst auf Tropfen einer 0,1 M EDTA-Lösung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelegt. Nach Absaugen überschüssiger Flüssigkeit mit Filterpapier wurden die Grids für 3 min auf Tropfen einer 4 %igen (w/v) Uranylacetat-Lösung (in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$) gelegt. Überschüssige Flüssigkeit wurde mit Filterpapier abgesaugt und die Grids anschließend für 4 min auf Tropfen einer 10 %igen (w/v) Lösung von Bleicitrat in 0,1 N NaOH gelegt. Die Inkubation erfolgte zwecks CO_2 -Ausschluss in einer geschlossenen Petrischale mit einem offenen Gefäß mit angefeuchtetem NaOH-Granulat. Die Grids wurden anschließend in zuvor abgekochtem und unter Luftabschluss abgekühltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gespült.

2.7.5 Kryoultramikrotomie

2.7.5.1 Einbettung in Gelatine und Nachfixierung

Eine 1 ml-Portion der gewaschenen und fixierten Zellsuspension wurde abzentrifugiert ($7000 \times g$, 5 min, Eppendorf-Zentrifuge) und das Pellet in 500 μl auf 37°C gehaltener 10 %-iger (w/v) Gelatine in 50 mM KP-Puffer resuspendiert. Ein Tropfen dieses Gemisches wurde in eine Petrischale gegeben, welche bis zum Erstarren der Gelatine bei 0°C gehalten wurde. Der erstarrte Tropfen wurde dann durch Übergießen mit einer Lösung von 0,3 % (v/v) Glutaraldehyd und 0,2 % (v/v) Formaldehyd in 50 mM KP-Puffer und 30 min Inkubation bei 0°C erneut fixiert.

Material und Methoden

Nach Waschen des fixierten Tropfens durch Übergießen mit 50 mM KP-Puffer wurden mit einer Rasierklinge Würfel von ca. 2 mm Kantenlänge ausgeschnitten.

2.7.5.2 Vorbereitung der Proben für den Einfriervorgang

Die Gelatinewürfel wurden über Nacht in einer Mischung aus 1,6 M Saccharose in 0,4 M NaP-Puffer und 25 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP; MG 10000) bei 4 °C inkubiert (TOKUYASU, 1986). Anschließend wurde je ein Würfel mit 2,4 M Saccharose als Klebstoff auf einen Aluminiumträger aufgebracht. Hierbei war darauf zu achten, daß eine Seite des Würfels möglichst parallel zur Trägerfläche lag. Hierdurch wurde das spätere Trimmen der Probe erleichtert.

2.7.5.3 Einfriervorgang

Die Aluminiumträger wurden mitsamt den durch Saccharoselösung darauf festsitzenden Gelatinewürfeln in flüssigen Stickstoff eingetaucht, im flüssigen Stickstoff in an Drähten hängende Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und dort bis zum Schneidevorgang verwahrt.

2.7.5.4 Herstellung von Glasmessern für die Kryoultramikrotomie

Die Herstellung der Glasmesser erfolgte wie unter 2.7.4.3. beschrieben.

2.7.5.5 Herstellung von Kryoultradünnschnitten

Die Proben wurden mit Hilfe der Eppendorf-Reaktionsgefäße in flüssigem Stickstoff in die gekühlte Schneidekammer des Ultramikrotoms überführt. Nach Einspannen von Messer und Aluminiumträger in das Ultramikrotom wurde die Probe getrimmt. Die

Material und Methoden

Ausmaße der Probenblöckchen waren gering genug gewählt, so daß das Trimmen der Probe nicht mit dem dafür vorgesehenen Metallmesser, sondern gleich mit dem Glasmesser durchgeführt werden konnte. Der Probenarm wurde hierbei manuell sehr langsam bewegt, um eine glatte Anschnittfläche zu schaffen. Das Messer wurde anschließend mit einer vorher in flüssigen Stickstoff getauchten Wimper von Spänen befreit.

Zur Herstellung der Ultradünnschnitte wurde dann der Probenarm manuell mit hoher Schnittgeschwindigkeit so lange bewegt, bis eine deutliche Anhäufung von Schnitten auf dem Messer lag. Mit einem in einer Drahtöse hängenden Tropfen einer 4 M Saccharoselösung wurden nacheinander mehrere solcher Schnittanhäufungen vom Messer abgenommen und anschließend gesammelt auf ein kohlebedampftes Formvar-Grid überführt. Hierzu wurde das Grid mit der Arbeitsseite nach oben weisend dem noch in der Drahtöse hängenden Tropfen aus Saccharose-Lösung von unten angenähert und der Saccharose-Tropfen mit den am unteren Pol hängenden Schnitten mit dem Grid aufgetupft. Auf solche Weise mit Schnitten belegte Grids wurden dann zur Ablösung der Saccharose nacheinander 3 mal für 5 min auf $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ in Petrischalen gelegt und anschließend entweder gleich kontrastiert oder sofort für Immun-Goldmarkierungen verwendet.

2.7.6 "Whole-mount"-Immun-Goldmarkierungen an ganzen Zellen

Es wurden Zellen nach der „whole-mount“-Technik (siehe Kap. 2.7.3) auf Grids aufgebracht. Optional erfolgte hiernach eine TX-100-Behandlung (siehe Kap. 2.8.1.2). Die Grids wurden anschließend für 3 h bei Raumtemperatur auf Tropfen einer Verdünnungsreihe des Primärantikörpers gelegt. Nach einem Waschschrift (3 mal für 5 min auf Tropfen mit PBS) erfolgte eine einstündige Inkubation der Grids auf Tropfen des goldgekoppelten Sekundärantikörpers (GARG, 1:60 in PBS-PEG [0,2 mg/ml]). Nach einem weiteren Waschschrift (3 mal für 5 min auf Tropfen mit PBS, 1 mal für 5 min auf einem Tropfen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$) wurden die Grids kontrastiert. Das Volumen der Tropfen betrug jeweils ~40 μl .

2.7.7 Immun-Goldmarkierungen an Ultradünnschnitten

Die Ultradünnschnitte wurden zunächst mit H_2O_2 angeätzt, um das im Schnitt enthaltene biologische Material und dessen Antikörper-Bindungsstellen etwas vom umgebenden Harz freizulegen. Es wurden dann jeweils spezifisch gegen das zu untersuchende Protein gerichtete, in Kaninchen hergestellte Antikörper (Primärantikörper) an den Schnitt gebunden. An diese wurden im nächsten Schritt in Ziege hergestellte Antikörper gebunden (Sekundärantikörper), welche gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet waren. Der Sekundärantikörper war mit kolloidalen Goldpartikeln gekoppelt (Goat-anti-Rabbit-Gold, GARG). Diese konnten im elektronenmikroskopischen Bild als elektronendichte Punkte erkannt werden.

Die Markierung wurde folgendermaßen durchgeführt (HOPPERT und MAYER, 1995; variiert):

1. Es wurden Ultradünnschnitte von in Lowicryl-K4M eingebetteten Zellen hergestellt. Diese wurden mit formvarbeschichteten Nickelgrids aufgenommen und bis zur Verwendung auf PBS-Tropfen aufbewahrt. Die Lagerungsdauer betrug höchstens einen Tag.
2. Die Grids wurden 5 min auf ~40 μl große Tropfen 10 % (v/v) H_2O_2 -Lösung gelegt.
3. Die Flüssigkeit wurde mit Filterpapier abgesaugt, und die Grids wurden für 10 min auf ~40 μl große Tropfen von 3 % (w/v) Caseinhydrolysat gelegt.
4. Die Grids wurden mit einer Spritzflasche mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ~15 sec lang gewaschen ("Jet-Wash").
5. Die Flüssigkeit wurde mit Filterpapier möglichst komplett abgesaugt, und die Grids wurden anschließend für 3 h auf Tropfen einer Verdünnungsreihe des primären Antikörpers gelegt. Die Verdünnung des primären Antikörpers erfolgte in PBS.
6. Die Grids wurden zweimal für je 10 sec mit PBS-Tween20 (0,05 % [v/v]) mit einer Spritzflasche wie bei 4. gewaschen.
7. Die Grids wurden zweimal hintereinander für je 5 min auf Tropfen mit PBS-Tween und anschließend für 5 min auf Tropfen mit PBS gelegt. Die Flüssigkeit wurde mit Filterpapier möglichst komplett abgesaugt, und die Grids wurden anschließend für 1 h

Material und Methoden

auf 40 µl große Tropfen von goldgekoppeltem Sekundärantikörper (GARG) gelegt. GARG wurde 1:60 in PBS-PEG (0,2 mg/ml) verdünnt.

8. Die Grids wurden wie unter 6. beschrieben gewaschen.

9. Die Grids wurden zweimal hintereinander für je 5 min auf Tropfen mit PBS-Tween, anschließend für 5 min auf Tropfen mit PBS und dann für 5 min auf Tropfen mit H₂O_{bidest.} gelegt.

10. Die Flüssigkeit wurde mit Filterpapier möglichst komplett abgesaugt; abschließend wurden die Grids mit PWS kontrastiert.

Es wurden jeweils als Negativkontrolle Grids mit Ultradünnschnitten auf PBS anstelle vom Primärantikörper inkubiert und ansonsten genauso behandelt wie die anderen Grids.

2.8 TX-100-Behandlungen

2.8.1 TX-100-Behandlungen für die Elektronenmikroskopie

2.8.1.1 TX-100-Behandlung an unfixierten Zellen (REGULA, 1999, mod.)

Die von REGULA (1999) zur Fraktionierung von *M. pneumoniae*-Zellen in TX-100-lösliche und -unlösliche Fraktionen verwendete Methode wurde auf die Präparation von TX-100-unlöslichen Zellbestandteilen für die Elektronenmikroskopie übertragen. Die Behandlung erfolgte in einer Petrischale, deren Boden mit Parafilm ausgelegt war. *M. pneumoniae*-Zellen wurden wie unter Kap. 2.5.1 beschrieben angezogen und geerntet. Von der erhaltenen, in frischem Medium vorliegenden Zellsuspension wurden je 20 µl auf die nach oben weisende Arbeitsseite eines kohlebedampften Formvar-Nickelgrids mit 300-er Maschenweite pipettiert. Das Grid wurde zuvor mit der Arbeitsseite nach obenweisend auf den am Boden der Petrischale zuvor fixierten Parafilm gelegt und an drei Punkten mit einer spitzen Pinzette so fest angedrückt, daß es durch die folgenden Arbeitsschritte nicht von Parafilm abgelöst wurde. Es wurden bis zu 50 Grids gleichzeitig in einer Petrischale behandelt.

Material und Methoden

Nachdem die Zellsuspension auf die Grids gegeben war, wurde zusätzlich ein mit Wasser angefeuchtetes Stück Filterpapier seitlich in die Petrischale gelegt, um die Austrocknung der Tropfen zu vermeiden. Die Petrischale wurde geschlossen und mit den Grids zur Anheftung der Zellen 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Grids in der Schale dreimal durch Übergießen mit PBS gewaschen. Hierbei war darauf zu achten, daß die Flüssigkeit nicht direkt auf die Grids gegossen wurde. Die einzelnen Waschschriffe wurden jeweils für 30 sec unter leichtem Schwenken der Schale ausgeführt. Die Puffermenge war je nach Schalengröße so gewählt, daß die Grids mindestens in einer Höhe von 5 mm überschichtet waren. Nach dem dritten Waschschriff wurden die Grids mit dem Puffer „Low Triton“ überschichtet. Es folgte eine Inkubation bei RT für 3 min unter leichtem Schwenken. Der Puffer wurde abgegossen und durch den Puffer „High Triton“ ersetzt. Dieser war zuvor auf Eis gestellt. Die Schale wurde auf Eis 5 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde der Puffer abgegossen und die Grids dreimal wie oben beschrieben in PBS gewaschen. Grids, welche für Immungolmarkierungen verwendet werden sollten, wurden anschließend in eine Lösung von 0,25 % Glutaraldehyd gelegt und in dieser Lösung bis zur Verwendung bei 4 °C unter Luftabschluß verwahrt. Andere Grids wurden sofort mit 3 %iger neutralisierter Phosphorwolframsäure kontrastiert.

	<u>Puffer „Low Triton“</u>	<u>Puffer „High Triton“</u>
PBS	1 -fach	1 -fach
EGTA	1 mM	-
MgCl ₂	10 mM	10 mM
Triton X-100	0,2 %	1 %
PMSF	1 mM	1 mM
DNase I	-	0,05 mg/ml
NaCl (zusätzlich zum PBS)	-	1 M

2.8.1.2 TX-100-Behandlung an fixierten Zellen (HEGERMANN et al., 2002)

Die TX-100-Behandlung an fixierten Zellen wurde für die „whole-mount“-Technik an auf Kohle-Formvar-Grids adhären *M. pneumoniae*-Zellen durchgeführt, für die Einbettung in Lowicryl-K4M an Zellen in Suspension. Es wurden Zellen direkt nach der Ernte in 2,5 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS aufgenommen und in dieser Lösung mindestens 1 h bei 4 °C fixiert.

Für die TX-100-Behandlung auf Grids wurden die Zellen nach der „whole-mount“-Technik (siehe Kap. 2.7.3) auf Grids aufgebracht. Die Grids wurden anschließend schwimmend auf einer Lösung von 2 % (v/v) TX-100 / 1 M NaCl für 10 min bei RT inkubiert. Die Arbeitsseite der Grids wies dabei nach unten. Anschließend wurden die Grids schwimmend auf PBS dreimal je 1 min inkubiert und hiernach entweder für Immun-Goldmarkierungen weiterverwendet oder sofort kontrastiert.

Für die TX-100-Behandlung in Suspension wurde 1 ml fixierte Zellsuspension zunächst milde abzentrifugiert und dreimal in PBS gewaschen (Zentrifugation jeweils 1000 × g; Tischzentrifuge, RT). Das Pellet wurde anschließend in 1 ml einer Lösung von 2 % (v/v) TX-100 / 1 M NaCl resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Es folgten wiederum drei Waschschrte, anschließend wurden die Zellen in Lowicryl-K4M eingebettet (siehe Kap. 2.7.4.1)

2.8.2 TX-100-Behandlungen für die Fluoreszenzmikroskopie

Deckgläschen, welche wie unter 2.6.1.2 für die Fluoreszenzmikroskopie präpariert wurden, wurden vor Einsatz des Primärantikörpers mit einer Lösung von 2 % (v/v) TX-100 / 1 M NaCl für 10 min bei RT überschichtet und anschließend dreimal in PBS für je 1 min gespült.

2.8.3 TX-100-Behandlungen für die Elektrophorese

M. pneumoniae-Zellen wurden nach der Ernte ohne Fixierung in einer Lösung von 2 % (v/v) TX-100 / 1 M NaCl aufgenommen und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die

unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert ($10000 \times g$, Tischzentrifuge, RT) und die Extraktion noch zweimal wiederholt. Das Sediment wurde in Denaturierungspuffer aufgenommen und für SDS-PAGE (siehe Kap. 2.10.1) und Western-Transfer (siehe Kap. 2.10.3) eingesetzt.

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Amplifizierung von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion

Mittels der Technik der PCR (Polymerase-Kettenreaktion, Polymerase-Chain-Reaction) wurden Schnittstellen für Restriktionsenzyme am Beginn und am Ende der zu amplifizierenden DNA-Zielsequenz eingeführt.

Für einen PCR-Ansatz von 50 μ l wurden standardmäßig folgende Komponenten verwendet:

DMSO	10 %
Oligo FW	40 pmol
Oligo RW	40 pmol
Template-DNA	0,05 bis 0,5 μ g
PWO-Polymerase	1-5 U
MgSO ₄	4 mM
dNTP-Mix	0,2 mM

Eine optimale Amplifizierung war gewährleistet, wenn beide Oligonukleotide etwa den gleichen Schmelzpunkt (T_m) hatten. Die Annealingtemperatur wurde den Schmelzpunkten der verwendeten Oligonukleotide soweit wie möglich angepaßt. Hierbei wurde die Temperatur aus $T_m + 5 \text{ }^\circ\text{C}$ errechnet.

Zur Amplifizierung wurden folgende Reaktionsbedingungen gewählt:

Material und Methoden

Denaturierung	2 min	94 °C	} 30 Zyklen
Denaturierung	15 sec	94 °C	
Annealing	30 sec	variabel	
Elongation	variabel	71 °C	
Elongation	10 min	71 °C	
Pause	?	4 °C	

Das PCR-Produkt wurde anschließend gereinigt (Jetquick DNA Clean-up spin kit 50, Firma Genomed, Bad Oeynhausen, Verwendung nach Herstellerangaben).

2.9.2 Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Durch die Spaltung mit Restriktionsendonukleasen können je nach Enzym glatte (stumpfe, *blunt ends*) DNA-Enden oder Fragmente mit 3'- oder 5'-überhängenden (kohäsiven, *sticky ends*) Enden entstehen, wobei am 3'-Ende die Hydroxyl- und am 5'-Ende die Phosphatgruppe erhalten bleibt (ROBERTS, 1984).

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden nach den jeweiligen Angaben der Hersteller und in den entsprechenden Pufferlösungen eingesetzt. Dabei richtete sich die Wahl der zugegebenen Menge an Enzym nach der zu spaltenden DNA-Menge im Reaktionsansatz. Die Inkubation fand in der Regel bei 37 °C statt (siehe Empfehlung des Herstellers) und dauerte 1,5 bis 12 h. Je nach Kombination der geeigneten Bedingungen für die jeweiligen Restriktionsenzyme (Inkubationstemperatur, Puffer) wurden für den Verdau mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen beide Enzyme zusammen oder aber getrennt in den Restriktionsansatz gegeben. Im letzteren Fall wurde der Restriktionsansatz vor dem zweiten Verdau-Schritt mit Hilfe des JETquick PCR Purification Spin Kit (Genomed GmbH, Bad Oeynhausen) gereinigt. Das Volumen der Restriktionsverdauansätze lag zwischen 10 und 40 µl. Die benötigte Enzymmenge betrug 1-3 Units pro µg DNA. Dabei ist eine Unit definiert als die Menge an Enzym, die erforderlich ist, um 1 µg lambda-DNA in 60 min bei angegebener Inkubationstemperatur vollständig zu verdauen.

Die Restriktionsspaltung von DNA diente der Herstellung von DNA-Fragmenten, die für die Ligation (siehe Kapitel 2.9.3) eingesetzt werden konnten, oder der Kontrolle von rekombinanten Plasmiden.

2.9.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Linearisierte DNA-Moleküle können durch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen miteinander verbunden werden. Diese Reaktion wird durch das Enzym T4-DNA-Ligase unter ATP-Hydrolyse katalysiert. DNA-Fragmente mit komplementären 5'-überhängenden Enden werden dabei effizienter verknüpft als DNA-Fragmente mit glatten Enden.

In dem Ligationsansatz wurde das zu integrierende DNA-Fragment in dreifachem molarem Überschuß zu der linearisierten Vektor-DNA hinzugegeben.

In einem Restriktionsansatz von 20 µl wurden 2 µl 10 X Ligasepuffer und 2 U T4-DNA-Ligase eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde 12 bis 15 h bei 16 °C inkubiert.

Das Fragment P01_orf1033 und der Vektor pKVmRFP wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* geschnitten. Die Verdauansätze wurden aufgereinigt und anschließend im Verhältnis 3 : 1 (Insert : Vektor) vermischt und für die Ligation eingesetzt.

2.9.4 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente *E. coli*-Zellen können mit rekombinanter Plasmid-DNA transformiert werden (COHEN et al., 1973). Zur Herstellung von kompetenten Zellen nach NISHIMURA et al. (1990) wurden 50 ml Medium A mit 0,5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur beimpft und bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,3$ bis 0,5 bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen 10 min auf Eis gestellt und durch 10minütige Zentrifugation bei 1500 X g geerntet. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 0,5 ml eiskaltem Medium A resuspendiert und nach Zugabe von 2,5 ml Lösung B vorsichtig gemischt. Das gesamte Volumen der Zellsuspension wurde in Aliquots von 100 µl aufgeteilt und bei -70 °C gelagert.

Material und Methoden

<u>Medium A</u>		<u>Lösung B</u>	
Hefeextrakt	5,0 g	Glycerin	36 % (v/v)
Trypton	10,0 g	PEG 8000	12 % (w/v)
NaCl	10,0 g	MgSO ₄	12 mM
Glucose	20,0 g	In LB-Medium	
MgSO ₄ X 7 H ₂ O	2,0 g	Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt und die Lösung sterilfiltriert.	
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml		

2.9.5 Transformation von *E. coli* (HANAHAN, 1983)

Es wurden 100 µl der tiefgefrorenen Suspension von kompetenten *E. coli*-Zellen (siehe Kap. 2.9.4) auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Ligationsansatz (siehe Kap. 2.9.3) versetzt. Der Transformationsansatz wurde 20 min unter gelegentlichem vorsichtigem Schütteln auf Eis inkubiert. Es folgte dann der Hitzeschock durch Inkubation für 30 sec bei 42 °C. Der Ansatz wurde dann wieder auf Eis gestellt. Nach einigen Minuten wurden 250 µl LB-Medium (RT) zugegeben und der Ansatz 30 min unter Schwenken bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden pro Ansatz 20 µl, 70 µl und der komplette Rest jeweils auf einer LB-Amp-Platte ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Von den erhaltenen Kolonien wurde mit sterilen Pipettenspitzen etwas Material entnommen und damit je eine 1 ml-Kultur für die analytische Plasmidpräparation (siehe Kap. 2.9.6) und eine Masterplatte beimpft. Die Kulturen und die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.9.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.9.6.1 Analytische Isolierung (BIRNBOIM und DOLY, 1979, mod.)

Es wurden 1 ml-Übernachtskulturen von *E. coli* in Eppendorf-Reaktionsgefäßen angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 13000 X g für 5 min bei Raumtemperatur geerntet (13000 X g, Biofuge 13, Heraeus Instruments, Osterode). Das Medium wurde sorgfältig entfernt und das Pellet in 100 µl P1-Puffer resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 100 µl P2-Puffer zugefügt und das Gefäß vorsichtig geschwenkt. Die einsetzende Lyse der Zellen war am Aufklaren der Lösung zu erkennen. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100 µl eiskalter P3-Puffer zugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde sofort vorsichtig geschwenkt und anschließend 15 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 22000 X g und 4°C (15000 Upm, Rotor 12053, Sigma 3 MK, Sigma Laborzentrifugen, Osterode) für 15 min wurden Zelltrümmer und ausgefallene Proteine abzentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 22000 ? g und 4 °C (15000 Upm, Rotor 12053, Sigma 3 MK, Sigma Laborzentrifugen, Osterode) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem (v/v) Ethanol gewaschen, anschließend getrocknet und in 10 bis 20 µl H₂O_{bidest.} aufgenommen. Die so hergestellten DNA-Lösungen konnten direkt für Restriktionsanalysen (siehe Kap. 2.9.2) verwendet werden.

P1-Puffer:

Tris-HCL (pH 8,0)	50 mM
EDTA	10 mM
Rnase A	100 µg/ml

P2-Puffer:

SDS	1 % (w/v)
NaOH	200 mM

P3-Puffer:

K-Acetat	3M
----------	----

Der pH-Wert wurde auf 5,5 eingestellt.

2.9.6.2 Quantitative Isolierung

Die quantitative Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem Kit „Jetstar 2.0“ (Firma Genomed. Bad Oeynhausen) nach Herstellerangaben.

2.10 Elektrophoretische Methoden

2.10.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LAEMMLI, 1970)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach LAEMMLI (1970) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen im elektrischen Feld.

Die Denaturierung der Proteine erfolgte in Denaturierungspuffer durch das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) und 2-Mercaptoethanol.

Zur Auftrennung von Proteinen von ca. 50 bis ca. 200 kDa wurde ein 7,5 %iges Polyacrylamid-Gel (Trenngel) gewählt. Die SDS-PAGE wurde als diskontinuierliche Gelelektrophorese mit Flachbettgelen (STUDIER, 1973) durchgeführt. Die Gele wurden im Gießstand „Hoefler Mighty Small multiple gel caster“ der Firma Hoefler unter Verwendung der zugehörigen 10 X 12 cm Glas- und Keramikplatten gegossen. Es wurden jeweils vier oder fünf Gele gleichzeitig gegossen. Hierzu wurden folgende Lösungen verwendet:

30 % Acrylamidlösung:

Acrylamid	30 % (w/v)
Bisacrylamid	0,8 % (w/v)

Ammoniumpersulfatlösung (APS):

APS	10 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml

Ammoniumpersulfatlösung (APS):

APS	10 g
H ₂ O _{bidest.}	ad 100 ml

Sammelgelpuffer:

Tris-HCl (pH 6,8)	0,5 M
SDS	0,4 %

Material und Methoden

Trenngelpuffer:

Tris-HCl (pH 8,8)	1,5 M
SDS	0,4 %

Für vier bis fünf Gele (ein Gießstand) wurden Trenn- und Sammelgel wie folgt zusammengestellt:

	Trenngel (7,5 %)	Sammelgel
30 % Acrylamid	11,25 ml	2 ml
Trenngelpuffer	11,25 ml	-
Sammelgelpuffer	-	5 ml
H ₂ O _{bidest.}	22,5 ml	13 ml

Das Sammelgel wurde zunächst luftdicht verschlossen und auf Eis gestellt. Zum Trenngel wurden dann 500 µl APS-Lösung und 50 µl TEMED gegeben. Das Gel wurde mit einem Glasstab gründlich verrührt und sofort in den Gießstand gegossen. Bei 5 Gelen reichte die Menge genau aus, um eine Füllhöhe bis ca. 2 cm unter der Oberkante der Platten zu erreichen, bei 4 Gelen wurde die gleiche Füllhöhe gewählt und etwas von der Mischung zurückbehalten. Die Gelflüssigkeit im Gießstand wurde anschließend sofort mit Wasser überschichtet. Da die einzelnen Gelkammern im Gießstand miteinander kommunizieren, wurde das Wasser möglichst gleichmäßig in alle Kammern gegeben und soweit aufgefüllt, daß ein gemeinsamer Meniskus über den Kammern entstand. Andernfalls wurden die Gele in der Höhe ungleichmäßig.

Nach ca. 1 h Polymerisation bei RT waren die Gele erhärtet und das Wasser konnte abgegossen werden. Der Gießstand mit den Gelen wurde anschließend für ca. 10 min umgekehrt auf Zellstoff gestellt, um das Wasser möglichst vollständig zu entfernen.

Dann wurden zum Sammelgel 200 µl APS und 20 µl TEMED gegeben, das Gel gut verrührt und auf die Trenngele gegossen, wobei darauf zu achten war, daß das Sammelgel in jede einzelne Kammer geriet, da die Kammern nach Polymerisation des Trenngels nicht mehr kommunizierten. Nach Befüllen jeder Kammer mit Sammelgel wurden sofort die Kämmen (10 oder 15 Taschen) eingesetzt. Die Polymerisation des Sammelgels und gleichzeitige Nachpolymerisation des Trenngels erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Gele dem Gießstand entnommen und mit eingesetzten Kämmen in einer verschließbaren Dose mit etwas feuchtem Zellstoff bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt, sofern sie nicht sofort eingesetzt wurden.

Material und Methoden

Es wurde ein Gel in eine passende Elektrophoresekammer eingesetzt. Die Elektroden tanks wurden mit Elektrodenpuffer gefüllt; erst dann wurde der Kamm vorsichtig entnommen. Überstehende Gelreste überhalb der Taschen wurden mit einer Rasierklinge entfernt und die Stege zwischen den Taschen, wenn nötig, mit einer sterilen Kanüle begradigt.

Zur Elektrophorese wurden die Proben in Denaturierungspuffer (Endkonzentration des Denaturierungspuffers 1 -fach) aufgenommen und 10 min bei 95 oder 100 °C inkubiert. Die Auftragsmenge pro Gel-Tasche betrug bei Gelen mit 10 Taschen bis 20 µl, bei Gelen mit 15 Taschen bis 15 µl. Bei Aufnahme von Bakterienpellets in Denaturierungspuffer wurde die Probe in einigen Fällen nach der Hitzeinkubation durch freiwerdende DNA viskos und konnte daher nicht auf das Gel aufgetragen werden. In diesem Fall wurde im Volumen 1 : 1 nochmals Denaturierungspuffer (2 -fach) zugegeben und die Probe erneut 10 min auf 95 °C oder 100 °C inkubiert, hiernach war ein problemloses Auftragen aller Proben möglich.

Elektrodenpuffer (10 -fach)

Glycin	144 g
Tris	30,28 g
SDS	0,1 %

Denaturierungspuffer (2 -fach):

Tris-HCl (pH 6,8)	125 mM
SDS	4 %
2-Mercaptoethanol	10 %
Glycin	10 %
Bromphenolblau	0,02 %

Der obere Tank der Elektrophoresekammer wurde an die Kathode, der untere Tank an die Anode eines Elektrophorese-Powersupplies (Pherostab. 500, Biotec-Fischer, Reiskirchen) angeschlossen. Nach Auftrag der Proben wurde die Elektrophorese zunächst bei 15 mA gestartet. Sobald die Lauffront in das Trenngel eingewandert war, konnte die Spannung soweit erhöht werden, daß ein Stromfluß von 30 mA erreicht wurde. Wenn die Lauffront die untere Gelkante knapp erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt, wenn nicht ein kontrolliertes Auslaufen der Lauffront erwünscht war. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel der Elektrophoresekammer entnommen. Die Gelplatten wurden durch leichtes Verkanten eines der Spacer auseinandergehoben und das Sammelgel entfernt. Das Trenngel wurde dann entweder gefärbt (siehe Kap. 2.10.2), oder für Western-Transfer eingesetzt (2.10.3).

2.10.2 Färbung von Polyacrylamid-Gelen mit Coomassie-Blau (WEBER & OSBORN, 1996; mod.)

Die Gele wurden sofort nach Beendigung der Elektrophorese und Entnahme aus den Platten in einer verschließbaren Schale mit Coomassie-Färbelösung bedeckt und unter leichtem Schwenken 1 Stunde bei RT inkubiert. Durch Essig und Methanol erfolgte hierbei die Fixierung der Proteine bei gleichzeitiger Färbung. Die Färbelösung wurde anschließend abgenommen, sie konnte mehrmals wiederverwendet werden. Das Gel wurde dann in der Schale mit Entfärbelösung überschichtet und solange unter mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung unter Schwenken bei RT inkubiert bis deutliche Banden vor transparentem Hintergrund sichtbar waren. Die Entfärbelösung konnte über einen Aktivkohlefilter regeneriert und wiederverwendet werden. Das Gel wurde mit einem Durchlichtscanner dokumentiert.

<u>Färbelösung</u>		<u>Entfärbelösung</u>	
Serva Blau G	2,5 g	Methanol	330 ml
Methanol	254 ml	Eisessig	110 ml
Eisessig	92 ml	H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml
H ₂ O _{bidest.}	ad 1000 ml		

2.10.3 Western-Transfer (TOWBIN et al., 1979)

Mittels Western-Transfer konnten Proteine aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und somit immobilisiert werden. Die Nitrocellulosemembran konnte dann für die Doppelimmunpräzipitation verwendet werden.

Während der Elektrophorese wurde die Transferapparatur vorbereitet. Es wurden sechs Stücke Whatman-Papier und ein Stück Nitrocellulosemembran jeweils in einer dem Trenngel entsprechenden Größe ausgeschnitten. Drei Lagen Whatman-Papier wurden sukzessive auf die untere Elektrode der Apparatur gelegt und mit Transferpuffer komplett durchtränkt. Eventuelle Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen wurden durch Rollen mit einer Pasteurpipette oder einem Glasstab entfernt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel den Platten entnommen und sofort auf die vorbereiteten drei Lagen durchfeuchteten Whatman-Papiers gelegt. Das

Material und Methoden

Gel wurde mit Transferpuffer befeuchtet und auf das Gel wurde das ausgeschnittene Stück Nitrocellulosemembran gelegt. Die Membran wurde mit Transferpuffer reichlich befeuchtet; eventuelle Luftblasen wurden entfernt. Die Membran wurde dann mit drei weiteren Lagen Whatman-Papier belegt, wobei jede Lage einzeln aufgelegt und vor Auflage des nächsten Papiers mit Transferpuffer befeuchtet wurde. Nach nochmaligem Entfernen eventueller Luftblasen aus dem fertigen Sandwich wurde überschüssiger Transferpuffer neben dem Sandwich von der unteren Elektrode entfernt. Die obere Elektrode wurde aufgesetzt und die Apparatur mit einem Gewicht von ca. 1 kg beschwert.

Die untere Elektrode der Apparatur wurde an die Kathode, die obere an die Anode eines Power-Supplys angeschlossen. Der Transfer erfolgte bei $5 \text{ mA} / \text{cm}^2$ Gel für 1 h. Nach Beendigung des Transfers wurde das Sandwich auseinandergenommen. Die Nitrocellulosemembran wurde in einer Schale so hingelegt, daß die Seite mit den Proteinbanden nach oben zeigte. Dies ist die Seite, welche während des Transfers direkt mit dem Gel in Berührung war, also die in der Apparatur nach unten zeigende Seite. Die Membran wurde 5 min in Ponceaurotlösung geschwenkt. Die Ponceaurotlösung wurde abgossen (konnte wiederverwendet werden) und das Gel unter fließendem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ solange gespült, bis rote Banden vor weißem Hintergrund sichtbar waren. Es wurde darauf geachtet daß alle Banden des verwendeten Proteinmarkers auf der Membran deutlich zu sehen waren. Die Membran konnte dann entweder getrocknet und trocken aufbewahrt oder sofort für die Immunpräzipitation eingesetzt werden. Das sichtbare Bandenmuster entsprach spiegelbildlich dem des Gels. Die Markerbanden wurden mit einem wasserunlöslichen Stift nachgezeichnet und die einzelnen Bahnen gekennzeichnet.

<u>Transfer-Puffer</u>		<u>Ponceaurot-Lösung</u>	
Glycin	39 mM	Essigsäure	5 % (v/v)
Tris	48 mM	Ponceaurot	0,1 % (w/v)
Methanol	20 %		
SDS	0,04 %		

2.10.4 Doppelimmunpräzipitation mit Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpern (BLAKE et al., 1984, mod.)

Durch die Doppelimmunpräzipitation mit Alkalische-Phosphatase-gekoppelten Sekundärantikörpern und anschließender Färbungsreaktion konnten Reaktionen von

Material und Methoden

Proteinbanden auf Nitrocellulosemembranen mit verschiedenen Primärantikörpern sichtbar gemacht werden.

Während der gesamten folgenden Prozedur war die Orientierung der Membran in der Schale stets so, daß die Seite, welche die Proteinbanden trägt, nach oben zeigte. Die mit Ponceaurot gefärbte Membran (siehe Kap. 2.10.3) wurde in einer Schale mit Blockingpuffer überschichtet und 1 Stunde bei RT unter Schwenken inkubiert. Die Färbung der Banden auf der Membran verschwand hierbei, der Blocking-Puffer färbte sich von weiß nach rosa. Der Puffer wurde entfernt und die Membran mit der Primärantikörper-Lösung überschichtet. Die Verdünnung des Primärantikörpers betrug hierbei zwischen 1 : 500 und 1 : 5000 und wurde in Blockingpuffer vorgenommen. Die Membran wurde dann für 2 Stunden mit Primärantikörper bei RT unter Schwenken inkubiert. Anschließend folgten drei Waschschrte in TBST für je 10 min. Der Sekundärantikörper wurde in Blockingpuffer 1:10000 verdünnt, die Inkubation der Membran in der Sekundärantikörper-Lösung erfolgte für 45 min unter Schwenken bei RT. Anschließend folgten die gleichen Waschschrte wie nach dem Primärantikörper. Die Waschlösung wurde möglichst vollständig entfernt und die Membran mit Färbelösung benetzt. Die Membran wurde solange, mit der Färbelösung benetzt, unter leichtem Schwenken inkubiert, bis die ersten Banden sichtbar wurden. In dem Moment wurde die Färbereaktion sofort durch gründliches Spülen mit H₂O_{bidest.} gestoppt und die Membran auf Filterpapier getrocknet.

<u>TBST (Tris buffered saline + Tween / 10 - fach):</u>		<u>Färbelösung:</u>
Tris-HCl (pH 9,5)	1 M	BCIP/NBT-Blue Liquid Substrate
NaCl	1,5 M	System for Membranes, SIGMA,
Tween 20	0,5 % (v/v)	B-3804

Blocking-Puffer:

5 % (w/v) Skim milk in 1 -fach TBST

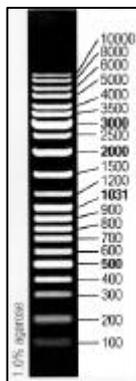
2.10.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung und Identifizierung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten benutzt. Im elektrischen Feld wandern DNA-Moleküle aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen zur Anode. Die

Material und Methoden

Wanderungsgeschwindigkeit von linearer, doppelsträngiger DNA in der Agarose-Gelmatrix ist umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts (HELLING et al., 1974).

Durch den Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard konnte die Größe der aufgetrennten DNA-Fragmente bestimmt werden. Verwendet wurde folgender Größenstandard:



Zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarose-Flachbettgele benutzt. Es wurde eine 0,8 %ige Agaroselösung in E-Puffer hergestellt und aufgeköcht, bis sich die Agarose komplett gelöst hatte. Die noch heiße Lösung wurde dann in die Gelkammer gegossen und zur Formung von Taschen wurden Kämme eingesetzt. Nach Verfestigung des Gels wurde das Gel in der Kammer mit E-Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Die DNA-Probe wurde mit 1/5 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Es wurden jeweils 5 µl und 1 µl des DNA-Standards mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 160 mA 30 min. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele zur Anfärbung der DNA in einem Ethidiumbromidbad ca. 15 min inkubiert. Die Entfärbung des Hintergrundes erfolgte 15 min in einem Wasserbad. Das Gel wurde anschließend in einem UV-Transilluminator (Fa. Intas, Göttingen) betrachtet und mit einer Videokamera (Mitsubishi P78E, Fa. Intas, Göttingen) mit angeschlossenem Drucker (Video Graphic Printer UP-890CE, Sony, Tokio, Japan) dokumentiert.

E-Puffer

Tris	40 mM
Natriumacetat	40 mM
EDTA	2 mM

DNA-Probenpuffer

Sucrose	50 %
Bromphenolblau	0,1 %

2.11 Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme

Für die Herstellung von Puffern und Nährmedien wurden Chemikalien des höchsten handelsüblichen Reinheitsgrades verwendet. Diese stammten, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Roth GmbH Co (Karlsruhe).

Außerdem wurden Chemikalien, Biochemikalien, Enzyme und Kits folgender Firmen verwendet:

Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg	Ampicillin
Difco Laboratories, Detroit, USA	Agar
Genomed, Bad Oeynhausen	JETquick PCR Purification Spin Kit
Gibco BRL GmbH, Eggenstein	Agarose, Hefeextrakt
MBI Fermentas GmbH, St. Leon Rot	Restriktionsenzyme, DNA- Größens tandard, dNTP-Mix (10 mM); T4-DNA-Ligase
Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase
Roche Boehringer, Mannheim	ATP, DNase I, RNase A
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	Proteinstandard
Serva Feinbiochemika GmbH & Co., Heidelberg	Acrylamid, APS, Bisacrylamid, Bromphenolblau, Ethidiumbromid, , BSA, Serva Blau, Tris, SDS
Metabion GmbH, Planegg	Oligonukleotide

3. Experimente und Ergebnisse

3.1 Lichtmikroskopische Betrachtung lebender

M. pneumoniae-Kulturen

M. pneumoniae wurde in Kulturflaschen angezogen und geerntet (siehe Kap. 2.5.1). Die Zellen wurden in wenig frischem Medium resuspendiert und darin auf Deckgläschen aufgetropft. Nach ca. 30 min Inkubation bei 37 °C hatte sich auf den Deckgläschen ein Zellrasen von geeigneter Dichte gebildet. Die Mikroskopie erfolgte wie in Kap. 2.6.3 beschrieben.

Der Abstand des Deckgläschens vom Objektträger betrug ein Vielfaches der Dicke des Zellrasens; dies konnte durch Durchfokussierung von der Unterseite des Deckgläschens bis zur Oberseite des Objektträgers erkannt werden.

Da nicht in einer Feuchtekammer gearbeitet wurde, war es bei mehrstündiger Beobachtung wichtig, die Ionenkonzentration des unter dem Deckgläschen befindlichen Mediums konstant zu halten. Dies wurde durch regelmäßiges Absaugen der Flüssigkeit unter dem Deckgläschen bei gleichzeitiger Zugabe frischen Mediums an der entgegengesetzten Seite des Deckgläschens erreicht.

3.1.1 Definition: Zellkörper, Filament, Bindefilament, Zellausläufer, Einzelzelle, Zellverband, Kolonie, Zellaggregat

Zellen von *M. pneumoniae* bestehen lichtmikroskopisch betrachtet aus zwei verschiedenen Bereichen, den dickeren Zellkörpern und den dünneren, langgestreckten Filamenten, die sich in unterschiedlichen Positionen zu den Zellkörpern befinden können.

Ein Filament kann a) einzeln liegen (siehe Einzelzelle), b) als Verbindung zwischen zwei Zellkörpern liegen; in dem Fall wird es in dieser Arbeit als Bindefilament bezeichnet, oder c) an einem Zellkörper ansitzen, ohne an einen weiteren Zellkörper anzugrenzen; in dem Fall wird es in dieser Arbeit als Zellausläufer bezeichnet.

Eine adhärierend wachsende *M. pneumoniae*-Kultur besteht aus Einzelzellen und verschieden großen Zellverbänden. Einzelzellen bestehen entweder a) nur aus einem

Experimente und Ergebnisse

Filament ohne Zellkörper oder b) aus einem Zellkörper mit anhängendem Zellausläufer oder c) aus einem einzelnen Zellkörper ohne Zellausläufer.

Zellverbände bestehen entweder aus einem langgestreckten Filament mit mehr als einem Zellkörper oder aus einem oder mehreren Zellkörpern und mehreren Filamenten, die miteinander verbunden sind; hierbei können Verzweigungen vorliegen. Am Verzweigungspunkt liegt meist ein Zellkörper, an welchem dann zwei oder mehr Zellausläufer oder weitere Bindefilamente ansitzen. Die Größe eines Zellverbandes ist variabel. Der gesamte Zellrasen besteht aus vielen Zellverbänden. Zellverbände, innerhalb welcher Zellkörper und Filamente so dicht liegen, daß sie lichtmikroskopisch nicht mehr unterscheidbar sind, werden als Kolonien bezeichnet.

Zellhaufen, die direkt nach der Zellernte in der Zellsuspension lichtmikroskopisch erkennbar waren, rühren vom mit dem Zellschaber losgelösten mehrschichtigen Zellrasen aus der Kulturflasche her. Diese zumeist großen Zellhaufen werden als Zellaggregate bezeichnet. Zellaggregate und Kolonien können ähnliche Ausmaße zeigen und sind nur daran zu unterscheiden, daß sich echte Kolonien erst langsam bilden, während Zellaggregate auch schon nach kurzer Adhäsionszeit der Zellsuspension an das Deckgläschen sichtbar sind.

3.1.2 *M. pneumoniae* breitet sich auf Glasoberflächen aus und bildet einen Zellrasen

Zellverbände wachsen in fortgeschrittenem Wachstumsstadium einer Kultur zu Kolonien aus. In **Abb. 3.1.1** sind Stadien der Entwicklung eines Zellrasens auf mit Zellsuspension benetzten Deckgläschen nach verschiedenen Adhäsionszeiten dargestellt. Von den Deckgläschen wurde nach 5, 15 und 30 min Adhäsionszeit die Zellsuspension abgewaschen. Man erkennt in Bild **a** (5 min Adhäsionszeit) Einzelzellen ohne Zellkörper (schwarze Pfeilspitzen), Einzelzellen, die nur aus einem Zellkörper bestehen (graue Pfeilspitzen), sowie kleine Zellverbände mit zwei durch ein Bindefilament verbundenen Zellkörpern (weiße Pfeilspitzen). In Bild **b** (15 min Adhäsionszeit) erkennt man mehrere größere Zellverbände (einfach umkreist), welche zum Teil Verzweigungen aufweisen. Die Verzweigungspunkte (schwarze Pfeile) sind Zellkörper, an welchen mehrere Filamente ansitzen. Dies sind entweder Bindefilamente (BF) oder Zellausläufer (ZA). In Bild **c** (30 min Adhäsionszeit) sind

mehrere Kolonien zu erkennen (doppelt umkreist), in welchen Filamente und Zellkörper nicht mehr unterscheidbar sind.

In den Bildern **a-c** sind jeweils die Bereiche dargestellt, die den dichtesten Bewuchs des verwendeten Deckgläschens zeigten. Auch nach 30 min Adhäsionszeit waren stets Bereiche zu finden, die im Erscheinungsbild Bild **b** entsprachen, entsprechend verhielt es sich mit 15 und 5 min Adhäsionszeit (**b** und **a**).

3.1.3 Auf Glasoberflächen adhärierte Zellaggregate breiten sich aus

Zellsuspensionen von *M. pneumoniae*, die durch Ernte aus einer Kulturflasche (siehe Kap. 2.3.1) gewonnen wurden, bestehen stets aus einem Gemisch von Einzelzellen und Zellaggregaten verschiedener Größe. Diese Aggregate können durch verschiedene Methoden teilweise gelöst werden (siehe Kap. 2.5.1). Eine vollständige Vereinzelung sämtlicher Zellen in einer Zellsuspension war nicht möglich. Somit finden sich an bewachsenen Deckgläsern neben Einzelzellen stets auch Zellaggregate von unterschiedlicher Größe. Es konnte beobachtet werden, daß sich am Rand solcher Aggregate mit der Zeit einzelne Zellen deutlich verlängerten. Die Richtung, in welcher diese Verlängerung stattfand, war stets sternförmig vom Aggregat wegweisend. Eine solche Beobachtung ist in **Abb. 3.1.2** dargestellt. Die Bilder sind im zeitlichen Abstand von je 5 min entstanden. Die Elongation einzelner filamentöser Zellbereiche war direkt verfolgbar. Die Längenzunahme betrug bis zu 1 µm in 5 min.

3.1.4 Aus Zellverbänden lösen sich Einzelzellen heraus und bewegen sich entlang ihrer Längsachse

Von Zellverbänden können sich während des Wachstums der Kultur Einzelzellen herauslösen (s. u.). Einzelzellen sind beweglich, sie können sich vom Zellverband entfernen, sich entlang der Glasoberfläche bewegen und an anderer Stelle wieder festsetzen. Die Bewegung erfolgt hierbei stets parallel zur Längsachse der Zelle.

Das Loslösen von Einzelzellen geschah stets nach deutlicher, schnell ablaufender Verlängerung eines Zellausläufers. Der Zellausläufer wurde stark gestreckt und riß

dann wie unter Zug plötzlich ab. Der Kontakt zur Glasoberfläche blieb dabei stets am in Bezug zum Zellverband distalen Ende der entstandenen Einzelzelle bestehen, sodaß gefolgert werden kann, daß von hier aus eine Zugkraft vermittelt wurde, die zur Dehnung des Zellausläufers und schließlich zu dessen Abriß vom Zellverband führte. Nach dem Abreißen blieb der Kontakt zur Glasoberfläche weiterhin am äußeren Ende der vom Zellverband losgelösten Einzelzelle bestehen. Dies konnte deutlich daran erkannt werden, daß dieser Bereich in der Focusebene verblieb, während der übrige Bereich von der Glasoberfläche manchmal losgelöst war und sich außerhalb der Focusebene in wirbelnder Bewegung befand. Eine solche Ablösung vom Zellverband ist in **Abb. 3.1.3** dargestellt:

Der in Bild **a** eingekreiste Zellverband besteht aus drei über Bindefilamente zusammenhängenden Zellkörpern (weiße Pfeilspitzen) und drei Zellausläufern (schwarze Pfeile). Zellausläufer I verlängert sich von Bild **a** bis **c**. In Bild **d** trennt er sich (grauer Pfeil) als Einzelzelle (schwarze Pfeilspitze) vom Zellverband, um sich dann in den Bildern **d** bis **f** vom Zellverband zu entfernen. Währenddessen verlängert sich Zellausläufer II in den Bildern **b** bis **f** (jeweils schwarzer Pfeil).

3.1.5 Mobile Einzelzellen stoppen ihre Bewegung, wenn sie auf unbewegte Zellen treffen

Bei der Bewegung von Einzelzellen entlang der Glasoberfläche konnte beobachtet werden, daß Einzelzellen, die sich von einem Zellverband ablösten, um sich dann von ihm zu entfernen, ihre Fortbewegung dann beendeten, wenn sie auf eine andere, nur aus einem Zellkörper bestehende Einzelzelle trafen. Dies ist in **Abb. 3.1.4** dargestellt. Der in Bild **a** eingekreiste Zellverband besteht aus zwei durch ein Bindefilament verbundenen Zellkörpern (weiße Pfeilspitzen) sowie einem Zellausläufer (schwarzer Pfeil). Der Zellausläufer löst sich in Bild **b** vom Zellverband und wird dadurch zu einer Einzelzelle (schwarze Pfeilspitze). Diese bewegt sich in den Bildern **b-d** vom Zellverband weg. In Bild **d** kommt es zur Anheftung (weißer Pfeil) an einen einzeln liegenden Zellkörper (weiße Pfeilspitze).

3.1.6 Auch Zellverbände sind zum Positionswechsel fähig

Auch Zellverbände sind in sich dynamisch, aber im Gegensatz zu Einzelzellen führen sie keine Fortbewegung über längere Strecken durch, sondern zeigen nur Formveränderung und geringe Positionsveränderung durch Bewegung einzelner Zellausläufer des Zellverbandes. Hierbei kann es zur teilweisen Ablösung des Zellverbandes von der Glasoberfläche kommen; der Kontakt zum Glas bleibt in diesem Fall an der Spitze des / der anderen Zellausläufer bestehen. Eine solche Formänderung mit Positionsänderung eines Zellverbandes ist in **Abb. 3.1.5** dargestellt. Der in Bild **a** eingekreiste Zellverband besteht aus drei Zellausläufern (schwarze Pfeile I-III) sowie einem Zellkörper (weiße Pfeilspitze) mit anhängendem kurzem Zellausläufer (schwarzer Pfeil mit Stern). In den Bildern **a-c** ist zunächst eine Verlängerung der Zellausläufer I und II zu beobachten. In Bild **d** ist ein Bindefilament (Rautenpfeil) zu einem benachbarten Zellverband (eingekreist in d) entstanden, wodurch eine Vergrößerung des in **a** eingekreisten Zellverbandes resultiert. Zellausläufer III löst sich in Bild **d** von der Glasoberfläche. In den Bildern **d-l** kann man beobachten, daß dieser Zellausläufer schleudernde Bewegungen durchführt, während er von der Glasoberfläche weg und in das Medium hineinragt. Ob es sich um eine aktive Bewegung („Suchbewegung“?) des Zellausläufers oder eine passive Bewegung durch Brown'sche Molekularbewegung handelt, kann hier nicht erkannt werden. Die schleudernde Bewegung hört in Bild **m** auf, der Zellausläufer III (Pfeil in m) hat sich an anderer Stelle wieder an der Glasoberfläche festgesetzt und ändert seine Position in den folgenden Bildern nicht weiter.

Zellausläufer I (siehe Bild a-e) bildet in Bild **f** an seinem äußeren Ende einen neuen Zellkörper aus (weiße Pfeilspitze). An der dem Zellverband abgewandten Seite dieses neuen Zellkörpers ist ein kurzer Zellausläufer als kleine Auswölbung zu erkennen (Pfeil mit Stern). Dieser verlängert sich in den Bildern **m-o** zu einem gut erkennbaren Zellausläufer (schwarzer Pfeil ohne Beschriftung in m-o).

Der hier betrachtete Zellverband hat durch Loslösen und erneutes Festsetzen eines Zellausläufers, sowie in gleicher Richtung erfolgter Verlängerung anderer Zellausläufer, insgesamt über den Beobachtungszeitraum in konzertierter Aktion seiner Zellausläufer eine **gerichtete** Bewegung über eine kurze Distanz durchgeführt. Sie resultiert in der **Abb. 3.1.5** in einer Verschiebung der Position des Zellverbandes von links unten nach rechts oben.

3.1.7 Zellverbände entstehen aus Einzelzellen, verbinden sich miteinander und entsenden Einzelzellen an benachbarte Zellverbände

Die **Abb. 3.1.6** zeigt verschiedene Charakteristika der Bewegung von *M. pneumoniae*. Die Bilder **a-h** zeigen die Entstehung eines Zellverbandes. Der in Bild **a** eingekreiste kleine Zellverband zeigt zunächst wenig Differenzierung. Er besteht aus einigen dicht aneinanderliegenden Zellkörpern (weiße Pfeilspitzen) und einem erkennbaren Zellausläufer (schwarzer Pfeil). In Bild **b** haben sich mehrere Zellausläufer gebildet. Die schon in Bild **a** erkennbaren Zellkörper heben sich deutlicher voneinander ab. In Bild **c** ist nur noch der für die weitere Entwicklung des in **a** markierten Zellverbandes interessante Zellausläufer markiert (schwarzer Pfeil). Der in **c** markierte einzelne Zellkörper (graue Pfeilspitze) zeigt bis dahin keine Veränderung seiner Form (siehe auch **a** und **b**). In Bild **d** ist der in **c** markierte einzelne Zellkörper in kurzer Zeit zu einem zunächst noch undifferenzierten kleinen Zellverband herangewachsen. Dieser ähnelt zu diesem Zeitpunkt in seinem Differenzierungsgrad dem in **a** markierten Zellverband. In den Bildern **d-g** kann nun beobachtet werden, wie sich an beiden bisher beschriebenen nebeneinanderliegenden Zellverbänden je ein Zellausläufer in sich gegenseitig annähernder Weise verlängert. In Bild **h** kommt es zur Berührung (weißer Pfeil) der beiden in **d-g** markierten Zellausläufer. Diese Berührung wird während des gesamten weiteren Beobachtungszeitraumes nicht wieder gelöst, es scheint sich daher um eine feste Verbindung der beiden Zellverbände zu einem größeren Zellverband (eingekreist in Bild **h**) zu handeln.

Die Entstehung eines einzelnen Zellkörpers aus einem schon bestehenden Zellverband ist in der **Abb. 3.1.6 c-g** zu beobachten. Der in Bild **c** eingekreiste Zellverband hat in Bild **d** einen neuen Zellkörper (weiße Pfeilspitze) mit daran anhängendem Zellausläufer (schwarzer Pfeil) gebildet. Diese Einheit aus Zellkörper und Zellausläufer entfernt sich in Bild **e** unter Elongation eines Bindefilamentes (Rautenpfeil) vom Zellverband. In Bild **f** kommt es zum Abriß (grauer Pfeil) der Einheit vom Zellverband. Bindefilament und Zellausläufer bilden sich zurück, in Bild **g** ist nur noch der einzelne Zellkörper sichtbar (graue Pfeilspitze). Dieser ändert seine Position in den folgenden Bildern nicht weiter.

Abb. 3.1.6 i-t zeigt die Bildung einer neuen Einzelzelle und deren Migration zu einem benachbarten Zellverband. Der in Bild **i** markierte Zellkörper (einzelne weiße

Experimente und Ergebnisse

Pfeilspitze) zeigt im Vergleich mit anderen Zellkörpern einen relativ großen Durchmesser. Er ist über ein Bindefilament (Rautenpfeil) mit einem anderen Zellkörper zu einem Zellverband zusammengeschlossen. Dieses Bindefilament wird in Bild **j-k** aufgelöst. In Bild **j** teilt sich der große Zellkörper in zwei kleinere (weiße Pfeilspitzen). In Bild **j-n** entfernt sich der neu entstandene Zellkörper vom ursprünglichen, unter Elongation eines dazwischen liegenden Bindefilamentes (Rautenpfeil Bild **k-n**). In Bild **o** kommt es zum Abriß (grauer Pfeil) des Bindefilamentes vom ursprünglichen Zellkörper, welcher seine Position und Form in den weiteren Bildern beibehält. Die durch den Abriß in Bild **o** entstandene Einzelzelle besteht aus einem Zellkörper mit Zellausläufer. Dies ist in Bild **p** markiert (Zellkörper: weiße Pfeilspitze, Zellausläufer: schwarzer Pfeil). In Bild **p-s** bewegt sich diese Einzelzelle auf einen benachbarten Zellverband zu. Die Bewegung erfolgt hierbei mit dem Zellkörper voran. An der in Bezug zur Bewegungsrichtung der Einzelzelle vorne liegenden Seite des Zellkörpers ist in Bild **j-s** stets eine leichte Auswölbung zu erkennen (siehe Markierung in Bild **r**; Pfeil mit Stern). In Bild **t** kommt es zur Anheftung (weißer Pfeil) der Einzelzelle an den benachbarten Zellverband. Der hierbei entstandene größere Zellverband (eingekreist in Bild **t**) verändert seine Position und Form hiernach während des Beobachtungszeitraumes nicht weiter.

In **Abb. 3.1.6** ist außerdem zu beobachten, wie sich zwei Zellkörper aus unterschiedlichen Zellverbänden zusammenlagern, dann eine Weile dicht aneinandergelagert verharren, um sich dann wieder voneinander zu entfernen, dabei aber über ein sich zwischen ihnen bildendes Bindefilament miteinander verbunden bleiben. Dieser Vorgang erstreckt sich über die Bilder **a-x** und ist in der jeweils unteren rechten Bildecke zu beobachten. Der in Bild **a** markierte Zellverband (dünn eingekreist) besteht aus zwei über ein Bindefilament verbundenen Zellkörpern und einem Zellausläufer. Direkt rechts benachbart liegt ein Zellkörper eines weiteren, im Bild nur teilweise sichtbaren Zellverbandes. Dieser Zellkörper weist an der dem eingekreisten Zellverband zugewandten Seite eine leichte Wölbung auf (Pfeil mit Stern). In Bild **b** kommt es an dieser Stelle zur Anheftung der beiden Zellverbände aneinander (weißer Pfeil). Der im Bild nach oben orientierte Zellkörper des in Bild **a** dünn eingekreisten Zellverbandes bleibt in Bild **c** am rechten Zellverband haften, während das Bindefilament zum nach unten orientierten Zellkörper in Bild **c** abreißt (grauer Pfeil). In **d-i** ist zu beobachten, wie sich die beiden nun aneinanderhängenden

Zellkörper (zwei weiße Pfeilspitzen in der unteren rechten Bildecke) soweit annähern, daß sie in **j** und **k** nicht mehr als zwei Zellkörper zu unterscheiden sind (jeweils einzelne weiße Pfeilspitze). In den Bildern **l-n** sind wieder zwei sehr dicht aneinanderliegende Zellkörper erkennbar, die sich dann in den Bildern **o-u** unter Bildung und Elongation eines zwischen ihnen liegenden Bindefilamentes voneinander entfernen. Die Bewegung geht dabei nur von dem im Bild nach oben orientierten Zellkörper aus. Die Bewegung ist in diesem Fall nicht geradlinig, sondern wird in einem engen Bogen vollzogen. In Bild **u** kommt es zur Berührung (weißer Pfeil) des bewegten Zellkörpers mit einer benachbart liegenden Einzelzelle. Diese Position bleibt bis Bild **w** in unveränderter Form erhalten. In Bild **x** bewegt sich der Zellkörper, an welchem in Bild **u** die Berührung stattgefunden hatte, weiter auf seiner zuvor eingeschlagenen gebogenen Bahn, der Kontakt zur zuvor berührten Einzelzelle bleibt über ein Bindefilament (Bild **x**; Rautenpfeil) jedoch bestehen.

3.1.8 Nicht nur Einzelzellen können sich aus Zellverbänden lösen

Ein Abtrennungsvorgang von einem Zellverband resultiert nicht grundsätzlich in der Entstehung von Einzelzellen. Auch Bereiche, die mehrere Zellkörper enthalten, können sich von Zellverbänden lösen, wobei dann ein neuer, kleinerer Zellverband entsteht. Ein solcher Fall ist in der **Abb. 3.1.7** dargestellt:

Der in Bild **a** eingekreiste Zellverband besteht aus mehreren durch Bindefilamente reihenförmig verbundenen Zellkörpern (weiße Pfeilspitzen). Das Bindefilament zwischen den beiden rechten markierten Zellkörpern verlängert sich in den Bildern **a-c**. In Bild **c** verdoppelt sich der linke der beiden schon in **a** und **b** markierten Zellkörper (doppelte weiße Pfeilspitze). Die beiden aus der Verdopplung resultierenden Zellkörper entfernen sich in den Bildern **d-e** voneinander durch Bildung und Verlängerung eines Bindefilamentes zwischen ihnen (Rautenpfeil in **d** und **e**). In Bild **f** kommt es zum Abriß (grauer Pfeil) dieses Bindefilamentes. Es verbleibt dabei am ursprünglichen, in **a** eingekreisten Zellverband an der Stelle des Abrisses ein kurzer Zellausläufer (Pfeil mit Stern in **f**). Der neu entstandene Zellverband bewegt sich in den Bildern **f-i** vom ursprünglichen Zellverband weg. Er besteht aus zwei durch ein Bindefilament miteinander verbundenen Zellkörpern (weiße Pfeile). In Bild **i** löst sich der in Bewegungsrichtung hintere der beiden

Zellkörper von der Glasoberfläche ab und befindet sich außerhalb der Focusebene. Der Kontakt zur Glasoberfläche bleibt über den vorderen Zellkörper und den daran ansitzenden Zellausläufer (schwarzer Pfeil) bestehen.

3.1.9 Der Kontakt bewegter Einzelzellen zur Glasoberfläche ist am in Bewegungsrichtung vorderen Ende gegeben

Die Bewegung einer Einzelzelle über eine größere Distanz ist in **Abb. 3.1.8** dargestellt. Der zurückgelegte Weg der Zelle ist dabei durch eine gestrichelte Linie verdeutlicht. Die Zelle bewegt sich zunächst eine bestimmte Strecke konstant in eine Richtung, um dann einen Richtungswechsel vorzunehmen und in nahezu entgegengesetzter Richtung ihren Weg fortzusetzen. Der Richtungswechsel wird nicht durch Umkehr der Bewegungsrichtung der Zelle vollzogen, sondern durch eine Kehrtwende. Das in Bewegungsrichtung vordere Zellende bleibt daher vor und nach der Richtungsänderung dasselbe Zellende. Hier ist auch der Kontakt zur Glasoberfläche gegeben, was daran deutlich wird, daß das in Bewegungsrichtung vordere Ende stets in der Focusebene bleibt, während das in Bewegungsrichtung hintere Ende der Zelle nur in Bild **f** im Focus liegt, während es in den übrigen Bildern stets leicht aus der Focusebene herausragt und damit verschwommener erscheint als das in Bewegungsrichtung vordere Ende.

Die Geschwindigkeit der Einzelzelle ohne Zellkörper beträgt ca. $0,5 \mu\text{m} / \text{min}$.

3.1.10 Einzelzellen mit Zellkörper bewegen sich langsamer als Einzelzellen ohne Zellkörper

Einzelzellen ohne Zellkörper sind in der Lage, sich wesentlich schneller und über weitere Distanzen zu bewegen als Einzelzellen mit Zellkörper. Eine Bewegung einer Einzelzelle in der Geschwindigkeit, wie sie in der **Abb. 3.1.8** dargestellt ist, konnte an Einzelzellen mit Zellkörper nicht beobachtet werden.

Die **Abb. 3.1.9** zeigt eine Einzelzelle mit Zellkörper (weiße Pfeilspitze) in Bewegung. Die Zelle verfügt über zwei an entgegengesetzten Seiten am Zellkörper ansitzende kurze Zellausläufer und zeigt damit eine längliche Form. Die Bewegung der Zelle

erfolgt wie bei Einzelzellen ohne Zellkörper (siehe Kap. 3.1.9) in Richtung der Längsachse der Zelle. Der in Bewegungsrichtung vorne liegende Zellausläufer ist markiert (Pfeil mit Stern). In Bild **h** ist die im Beobachtungszeitraum zurückgelegte Strecke durch eine gestrichelte Linie verdeutlicht. Die Geschwindigkeit der Einzelzelle mit Zellkörper beträgt ca. $0,14 \mu\text{m} / \text{min}$.

3.1.11 Zusammenfassung der beobachteten Charakteristika in der Bewegung von *M. pneumoniae*

M. pneumoniae bildet auf Glasoberflächen einen Zellrasen. Dieser besteht aus Einzelzellen und Zellverbänden. Einzelzellen können sich zu Zellverbänden entwickeln. Benachbarte Zellverbände können sich durch gegenseitig annähernde Elongation von Zellausläufern miteinander verbinden.

Von Zellverbänden können sich Einzelzellen lösen und sich anschließend vom Zellverband entfernen. Das Loslösen einer Einzelzelle vom Zellverband geschieht ruckartig als Abriß nach vorhergehender deutlicher Verlängerung des sich anschließend ablösenden Bereiches. Der verlängerte Bereich scheint dabei eine Dehnung zu erfahren, da er bis zum Loslösen stets gerade gestreckt erscheint. Vom im Bezug zum Zellverband äußeren Ende des sich ablösenden Bereiches scheint eine Zugkraft ausgeübt zu werden. Nach dem Loslösen ist hier stets der Kontakt der entstandenen Einzelzelle zur Glasoberfläche gegeben.

Bewegliche Einzelzellen bestehen entweder aus einem Zellkörper mit Zellausläufer oder nur aus einem Zellausläufer. Einzelzellen, die nur aus einem Zellkörper bestehen, sind unbeweglich. Einzelzellen, die aus Zellkörper und Zellausläufer bestehen, können ihre(n) Zellausläufer zurückbilden. Sie sind dann nicht mehr beweglich.

Bewegte Einzelzellen beenden ihre Bewegung, wenn sie auf andere Einzelzellen oder Zellverbände stoßen und verbinden sich mit diesen.

Die Bewegung von Einzelzellen geschieht ausschließlich entlang der Längsachse der Zelle. Hierbei bildet immer ein Zellausläufer das in Bewegungsrichtung vordere Ende der Zelle. Hier ist auch der Kontakt zur Glasoberfläche gegeben. Die übrigen Bereiche der Zelle können während der Bewegung von der Glasoberfläche abstehen.

Experimente und Ergebnisse

Die Bewegung von Einzelzellen mit Zellkörper ist langsamer als die von Einzelzellen ohne Zellkörper. Vorhandene Zellkörper scheinen die Bewegung demnach zu behindern.

Aus den Beobachtungen kann geschlossen werden, daß für die Fortbewegung stets ein Zellausläufer benötigt wird, von dessen Spitze sowohl die Kraft zur Fortbewegung ausgeht als auch der Kontakt zur Glasoberfläche hergestellt ist. Bewegte *M. pneumoniae*-Zellen werden demnach von der Spitze eines Zellausläufers gezogen.

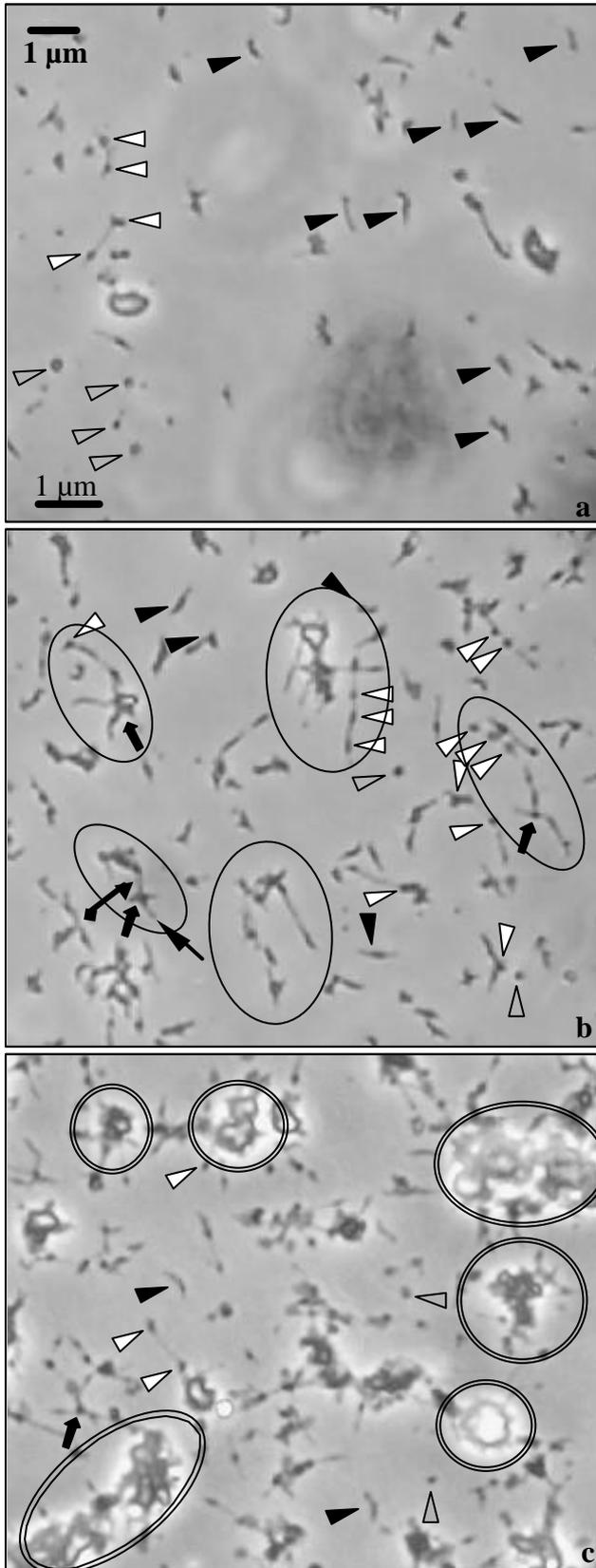


Abb. 3.1.1: Bewuchs eines mit *M. pneumoniae* beimpften Deckgläschens nach 5, 15 und 30 min. Erläuterungen siehe Kap. 3.1.2

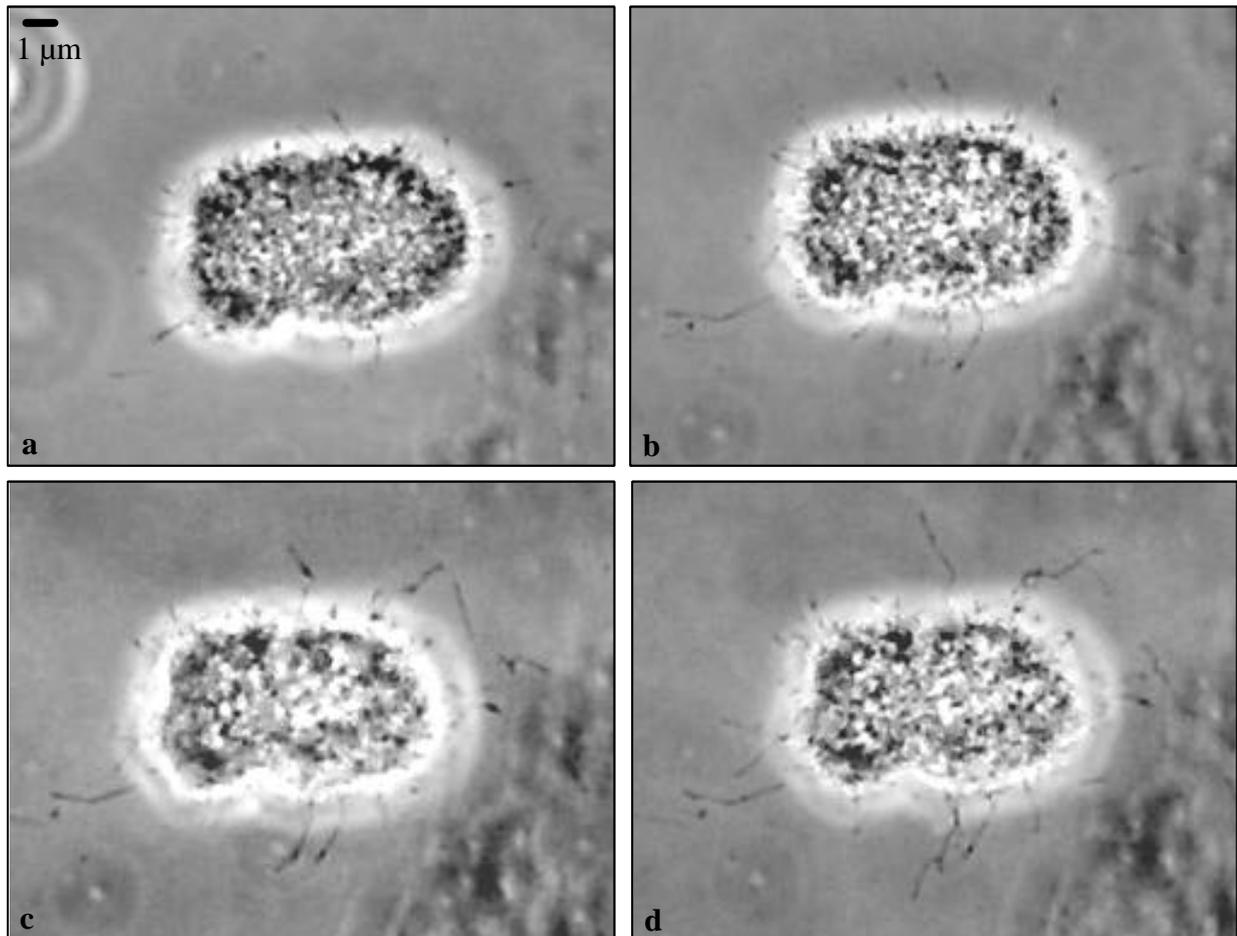


Abb. 3.1.2: Elongation einzelner filamentöser Zellbereiche am Rand eines Zellaggregates im zeitlichen Abstand je 5 min von a-d. Erläuterungen siehe Kap. 3.1.3

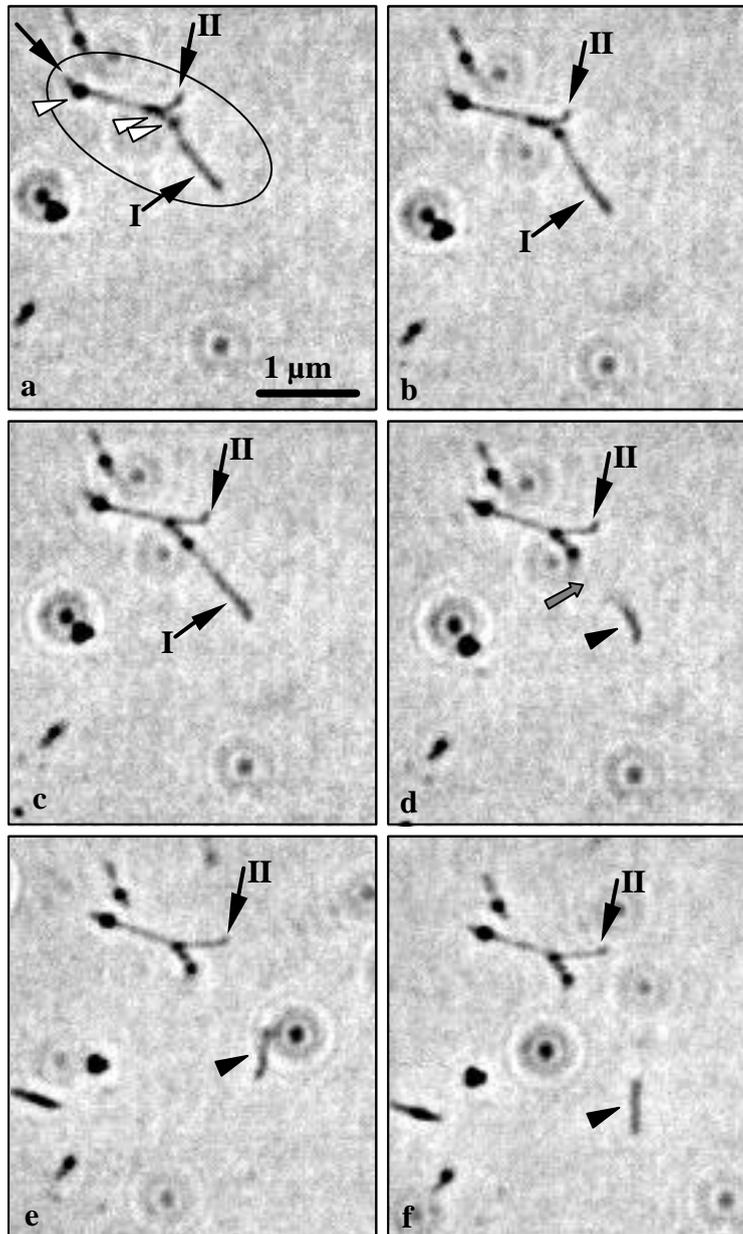


Abb. 3.1.3: Loslösen einer Einzelzelle aus einem Zellverband. Zeitlicher Abstand der Bilder a-f je 1 min. Erläuterungen siehe Kap. 3.1.4

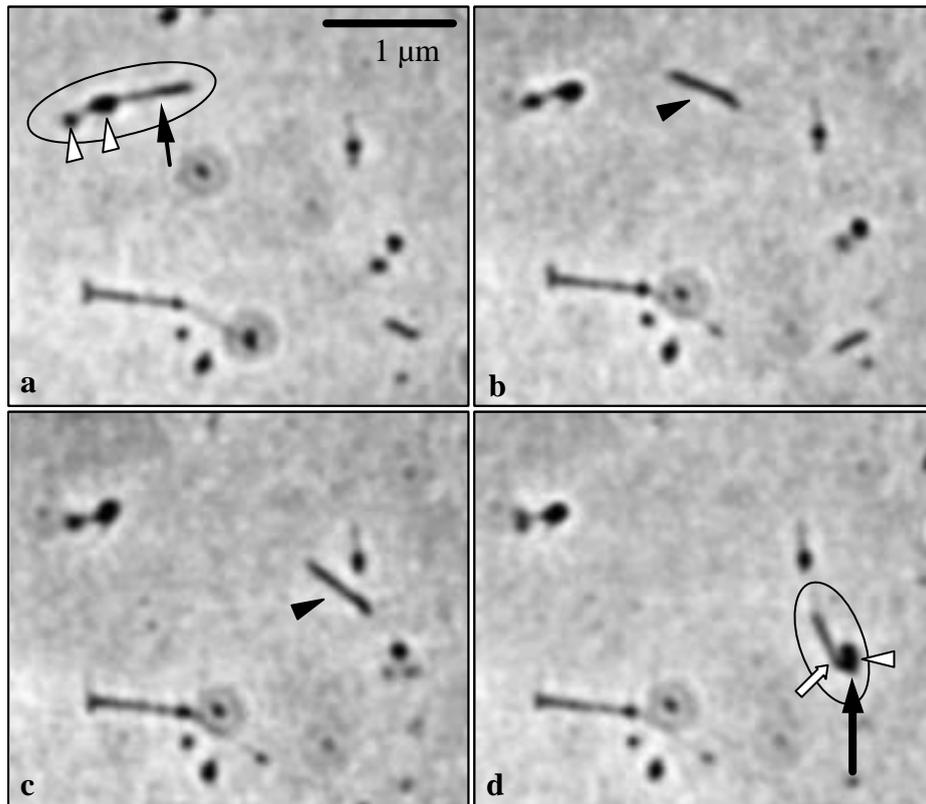


Abb. 3.1.4: Loslösen und Entfernen einer Einzelzelle von einem Zellverband. Die Zelle stoppt ihre Bewegung beim Auftreffen auf eine andere Zelle. Zeitlicher Abstand der Bilder je 1 min von a-d. Erläuterungen siehe Kap. 3.1.5

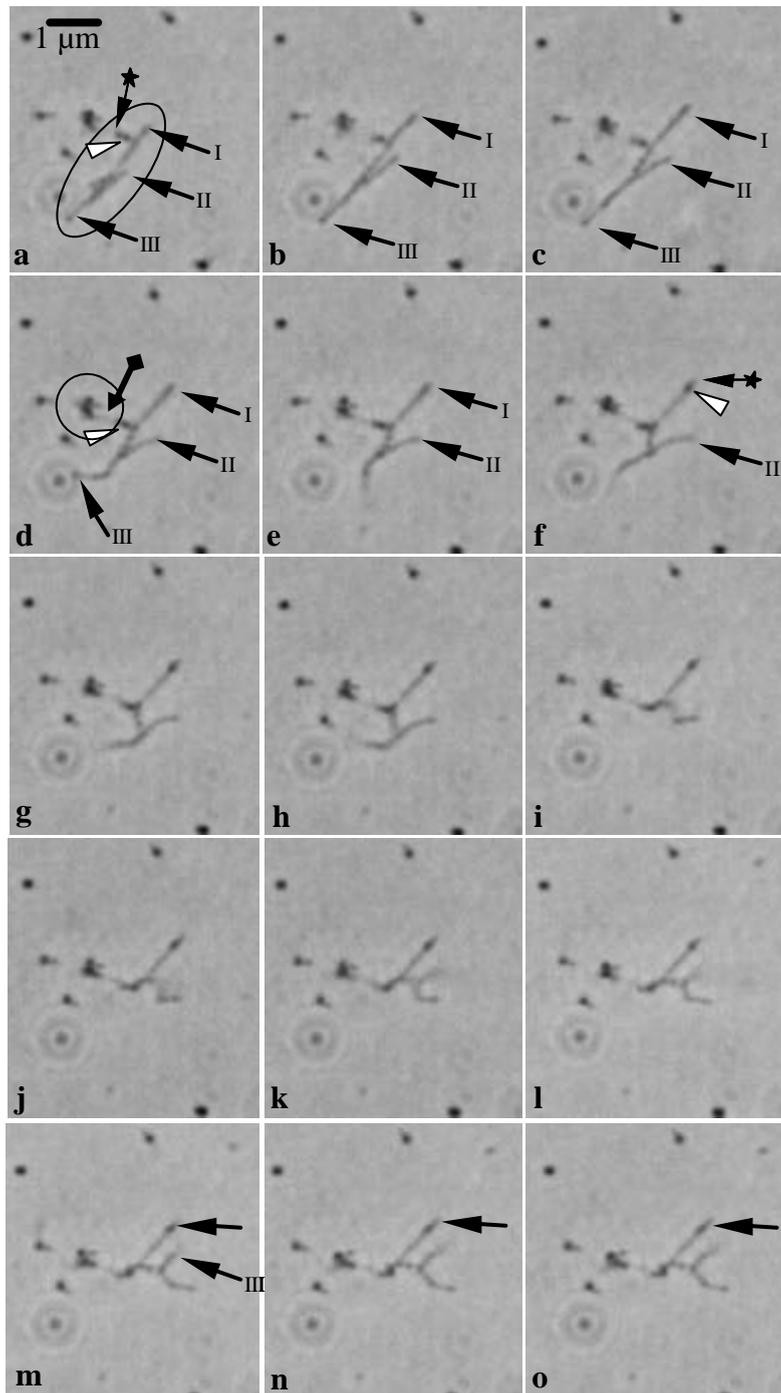


Abb. 3.1.5: Fortbewegung eines Zellverbandes durch Bewegung seiner Zellausläufer. Zeitlicher Abstand der Bilder a-o je 1 min. Erläuterungen siehe Kap. 3.1.6.

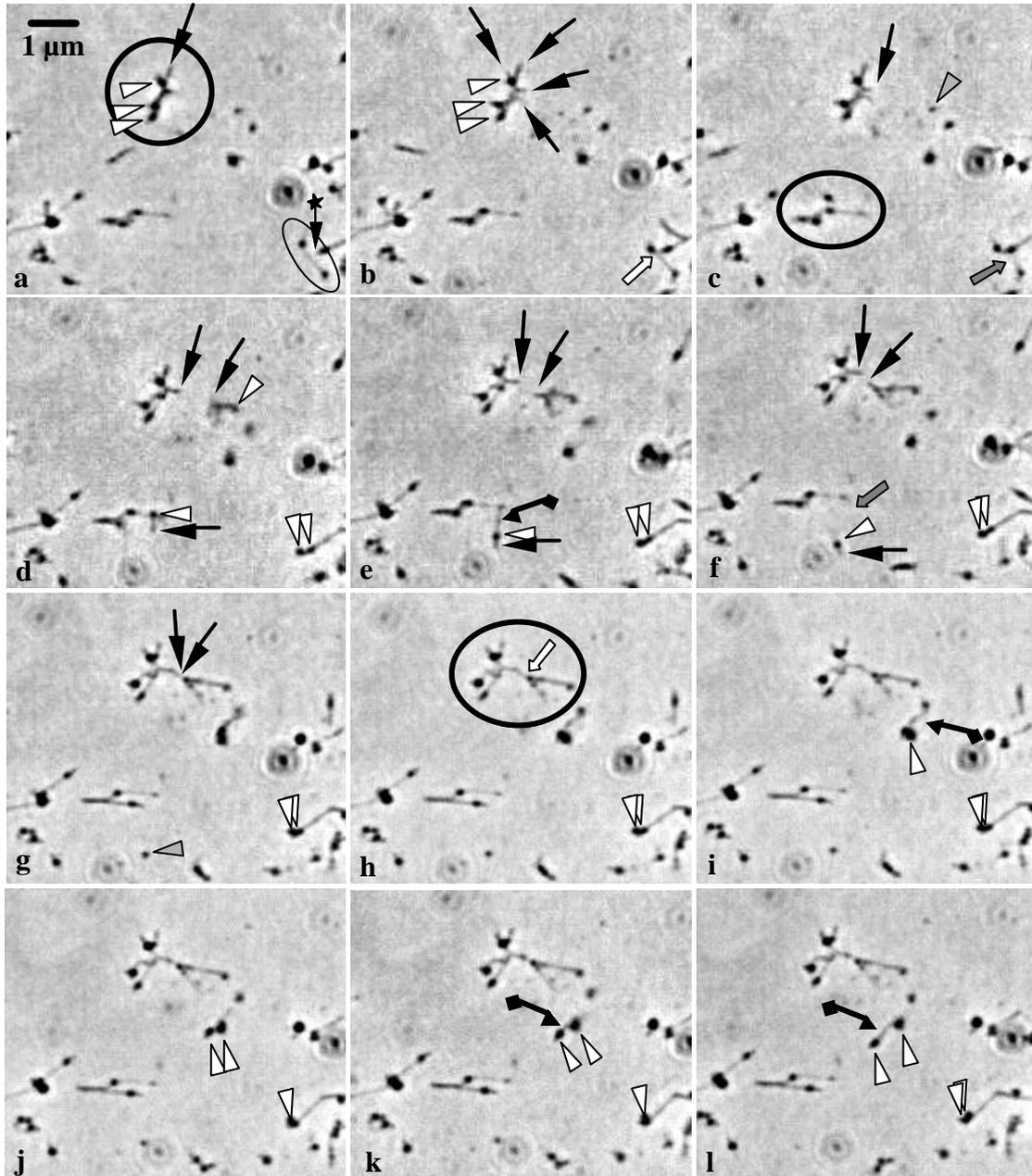


Abb. 3.1.6 (a-l): Vereinigung von Zellverbänden und Wanderung von Einzelzellen zwischen Zellverbänden. Zeitlicher Abstand der Bilder je 1 min. Erläuterungen: Siehe Kap. 3.1.7.

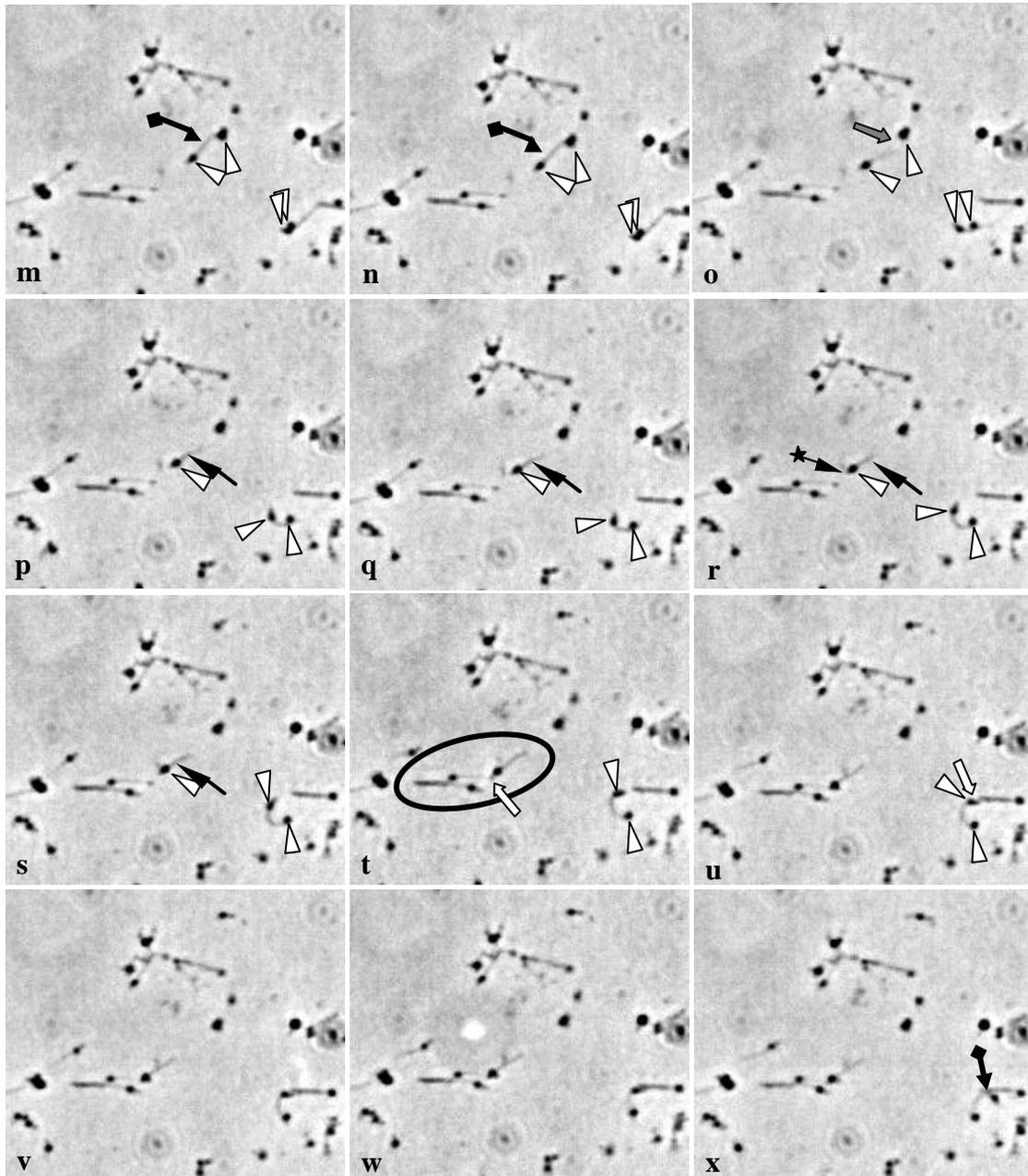


Abb. 3.1.6 (m-x): Vereinigung von Zellverbänden und Wanderung von Einzelzellen zwischen Zellverbänden. Zeitlicher Abstand der Bilder je 1 min. Erläuterungen: Siehe Kap. 3.1.7.

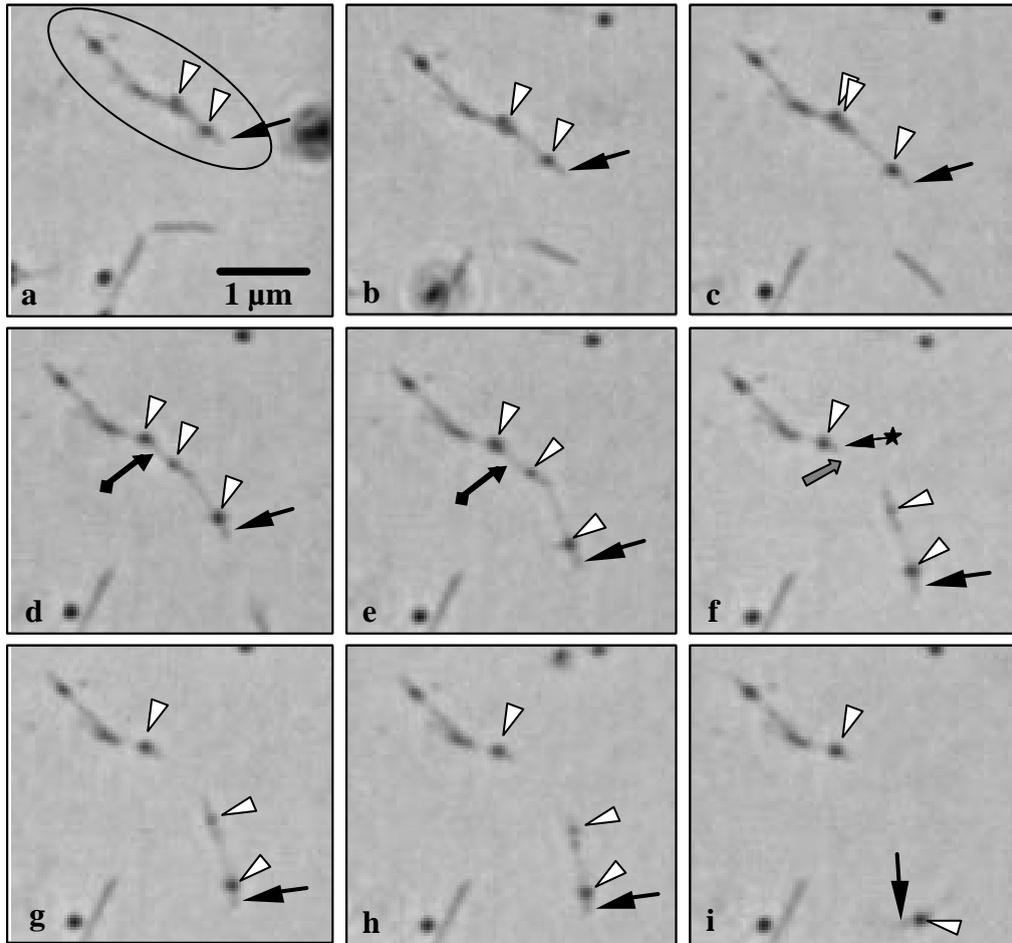


Abb. 3.1.7: Loslösen und Abwandern eines kleinen Zellverbandes von einem Zellverband. Zeitlicher Abstand der Bilder je 1 min. Erläuterungen siehe Kap. 3.1.8.

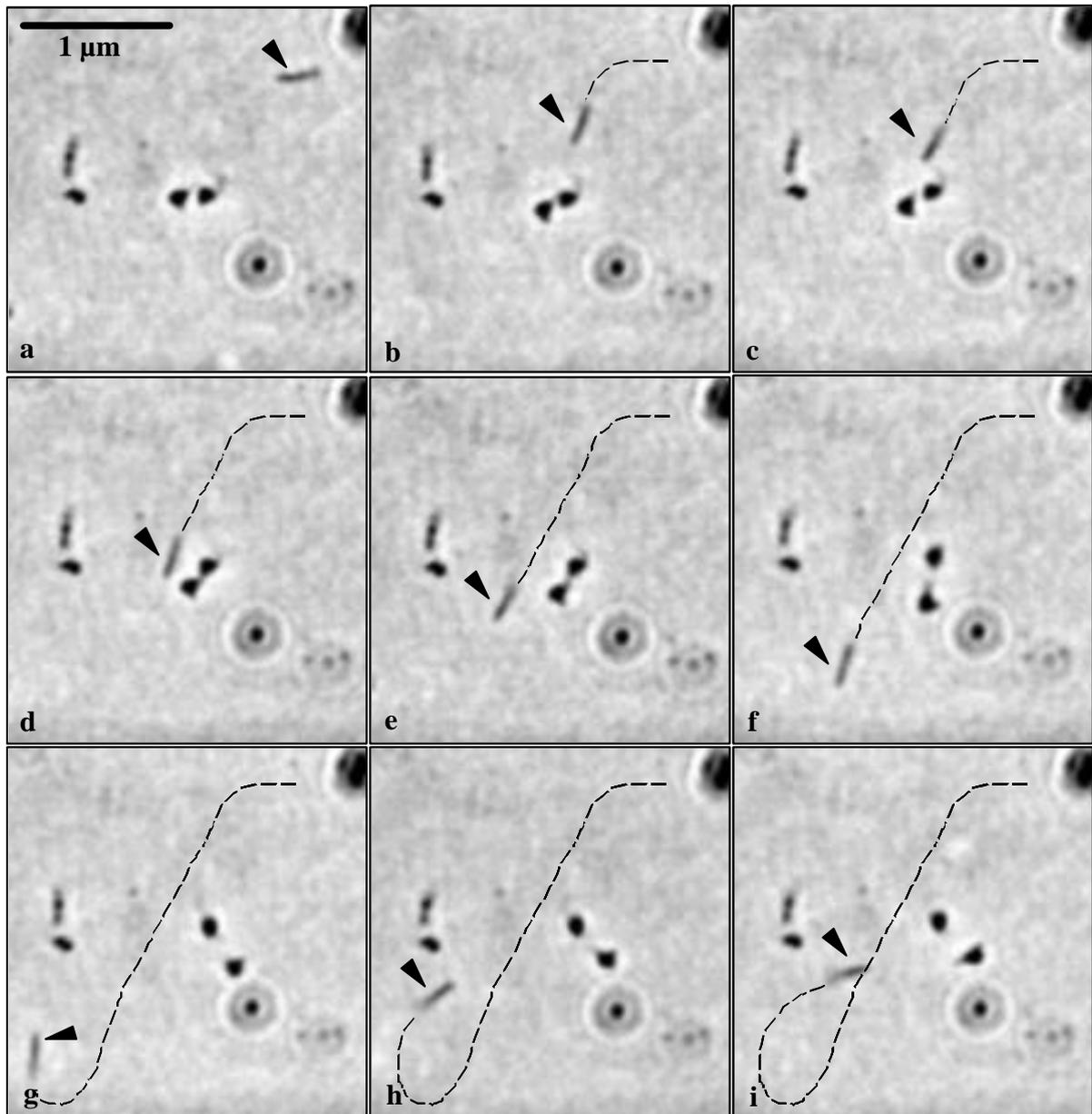


Abb. 3.1.8: Wanderung einer Einzelzelle ohne Zellkörper. Zeitlicher Abstand der Bilder je 1 min. Erläuterungen siehe Kap. 3.1.9.

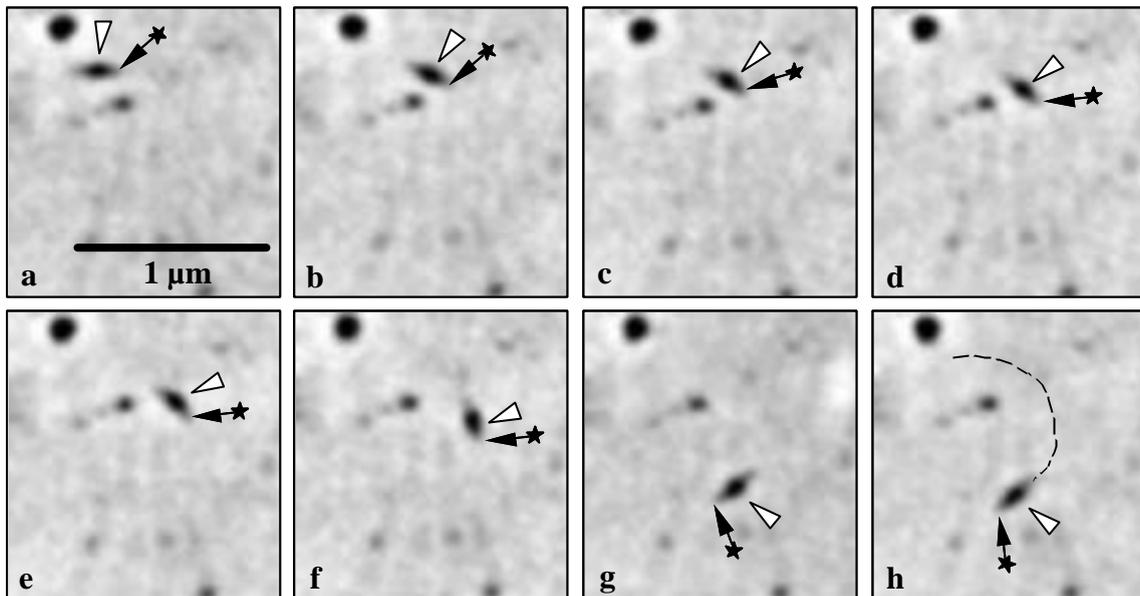


Abb. 3.1.9: Wanderung einer Einzelzelle mit Zellkörper. Zeitlicher Abstand der Bilder je 1 min. Erläuterungen siehe Kap. 3.1.10.

Zeichenlegende

-  Abriss
-  Zellkörper im Zellverband oder zu einer Einzelzelle mit Zellausläufer gehörend
-  Zellkörper als Einzelzelle, ohne Zellausläufer
-  Filament als Einzelzelle ohne Zellkörper
-  Zellausläufer
-  Sehr kurzer Zellausläufer, erkennbar als Auswölbung am Zellkörper
-  Bindefilament
-  Verzweigungspunkt im Zellverband
-  Anheftung

3.2 Immun-Fluoreszenzmikroskopie

Aus einer Anzahl Antiseren gegen verschiedene *M. pneumoniae*-Proteine sollten diejenigen ermittelt werden, welche bei Immun-Fluoreszenzmarkierungen eine positive Reaktion am Tip von *M. pneumoniae* zeigten.

Der Zellrasen auf einem Deckgläschen wurde chemisch mittels Formaldehyd und Glutaraldehyd fixiert (siehe Kap. 2.6.1.2). Anschließend wurde durch milde TX-100-Behandlung die Cytoplasmamembran permeabilisiert. So präparierte Deckgläschen wurden mit den verdünnten Antiseren inkubiert. Gebundenes IgG konnte mit Sekundärantikörpern, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren, für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden (siehe Kap. 2.6.2). Vergleichend wurden Präparate ohne den Permeabilisierungsschritt hergestellt und für die Immunmarkierung eingesetzt. Ein Unterschied zwischen permeabilisierten und nicht permeabilisierten Präparaten zeigte sich im Fluoreszenzbild nur beim Serum gegen P01_orf1033 (siehe Kap. 3.2.3). Die Antiseren und der Sekundärantikörper wurden zur Erhöhung der Spezifität jeweils in BSA-Lösung verdünnt. Exemplarisch wurden mit einigen Seren Markierungen unter Verwendung von reinem PBS ohne BSA als Serumverdünnung durchgeführt. Die Fluoreszenzsignale unterschieden sich nur bei dem Serum gegen P01_orf1033 (siehe Kap. 3.2.3). Bei sonstigen Markierungen ohne Verwendung von BSA war lediglich ein verstärktes Hintergrundsignal an der Glasoberfläche des Deckgläschens zu beobachten. Unspezifische Bindung an Zellen konnte auch ohne Verwendung von BSA erst bei Serumkonzentrationen über 1/100 beobachtet werden (nicht gezeigt).

Vom selben Bereich des jeweiligen Präparates wurde jeweils einmal das Fluoreszenzsignal aufgenommen und anschließend eine Aufnahme des selben Bereiches im Phasenkontrast angefertigt. Die so erhaltenen Bilder wurden übereinander projiziert und zu einem Mischbild verarbeitet (siehe Kap. 2.6.4). Die hier eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe waren FITC und Alexa 546. Alexa-markierte Präparate zeigten gegenüber FITC-markierten Präparaten stets eine deutlichere Färbung.

3.2.1 Definition: Tip

Der Tip bei *M. pneumoniae* ist der Bereich der Zelle, an dem die Anheftung an Oberflächen stattfindet. Der Tip ist stets die Spitze eines Zellausläufers, aber nicht jeder Zellausläufer ist ein Tip. Bei bewegten Zellen gehen die Zugkraft und der Kontakt zur Glasoberfläche (siehe Kap. 3.1) vom Tip aus. Bewegte Einzelzellen, die nur aus einem Filament bestehen, besitzen zwar zwei Enden, aber nur das in Bewegungsrichtung vordere Ende ist ein Tip. Zellverbände mit mehreren Zellausläufern können mehrere Tips enthalten.

Elektronenmikroskopisch läßt sich der Tip von *M. pneumoniae* eindeutig daran erkennen, daß der Rod darin enthalten ist (siehe Kap. 3.3.2.1). In immunelektronenmikroskopischen Tests reagierte ein Antiserum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion von *M. pneumoniae* spezifisch mit dem Rod. Dieses Serum wurde auch in Immun-Fluoreszenztests eingesetzt und reagierte positiv an den Spitzen von Zellausläufern, die von ihrer Lage her als Tip bezeichnet werden können (siehe Kap. 3.2.2). Der Rod ist lichtmikroskopisch aufgrund seiner geringen Größe nicht abzubilden. Eine positive Reaktion in der Immun-Fluoreszenz kann jedoch erkannt werden. Aus der positiven Reaktion bei immunelektronenmikroskopischen Tests kann auf eine spezifische Reaktion mit dem Tip in der Immun-Fluoreszenzmikroskopie geschlossen werden.

Aus Beobachtungen an lebenden *M. pneumoniae*-Kulturen (siehe Kap. 3.1) ist bekannt, daß bewegte *M. pneumoniae*-Zellen stets am in Bewegungsrichtung vorderen Ende an der Glasoberfläche haften (siehe Kap. 3.1.9). Weiter konnte festgestellt werden, daß von diesem Ende eine Zugkraft ausgeht (siehe Kap. 3.1.11).

Da bei Immun-Fluoreszenzmarkierungen stets nur fixierte Zellen betrachtet werden können, also keine Bewegung zu beobachten ist, muß bei der Beurteilung der jeweils betrachteten Zellenden die Einbindung in den Zellverband oder die Umgebung der Einzelzelle beachtet werden. Bei Filamenten, die gerade gestreckt von Zellverbänden abgehen, kann am äußeren Ende ein Tip vermutet werden. Ebenso verhält es sich mit Einzelzellen, die sich von Kolonien oder Zellaggregaten ausgehend radial ausbreiten (siehe Kap. 3.1.3). Da bekannt ist, daß die Bewegung hierbei vom Aggregat wegweist, kann am vom Aggregat wegweisenden Ende ein Tip vermutet werden. Bei kurzen Einzelzellen ohne Zellkörper, die von ihrer Lage her nicht mehr einem Zellverband, einem Aggregat oder einer Kolonie zugeordnet werden können, kann der

Tip auch bei fixierten Präparaten oft daran erkannt werden, daß ein Ende der Zelle leicht aus der Focusebene herausragt und daher verschwommener erscheint als das Ende, an welchem der Kontakt zur Glasoberfläche gegeben ist.

Generell sind Präparate von *M. pneumoniae*, an welchen eine Immunmarkierung durchgeführt wurde, im Phasenkontrast nicht in der Qualität abbildbar wie Lebendpräparate.

3.2.2 Immun-Fluoreszenzmarkierung mit Antiserum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion von *M. pneumoniae*

Da das Serum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion in immunelektronenmikroskopischen Tests spezifisch mit dem Rod reagierte, können die hiermit durch Immun-Fluoreszenz markierten Zellausläufer als Tip bezeichnet werden.

Die **Abb. 3.2.1** zeigt die Reaktion des Serums gegen die TX-100-unlösliche Fraktion von *M. pneumoniae* im Immun-Fluoreszenztest. Es sind Kolonien abgebildet, von welchen sich Einzelzellen radial wegbewegen. Die Bewegung der Einzelzellen erfolgt dabei mit dem Tip voran. Die Bilder **a-c** zeigen den selben Ausschnitt, in Bild **a** ist nur der Phasenkontrast dargestellt, Bild **b** zeigt nur das Fluoreszenzsignal. In Bild **c** sind Phasenkontrast und Fluoreszenzsignal übereinanderprojiziert.

Der Tip zeigt ein deutliches Fluoreszenzsignal (siehe **b** und **c**). Die radiale Abwanderung der Einzelzellen von den Kolonien ist in Bild **d** als Modell mit der Markierung der jeweiligen Bewegungsrichtung der Einzelzellen wiedergegeben. Die Interpretation der Bewegungsrichtung beruht auf Lebendbetrachtungen, nach denen sich Zellen von Kolonien oder Aggregaten aus radial wegbewegen (siehe. Kap. 3.1.3 ff).

3.2.3 Immun-Fluoreszenzmarkierungen: Positive Reaktionen am Tip

Es konnte zwischen positiver Reaktion am Tip oder an der gesamten Zelle und insgesamt negativer Reaktion unterschieden werden. Antiseren, die eine positive Reaktion ausschließlich am Tip zeigten, sind in Tab. 3 zusammengestellt. **Abb. 3.2.2** zeigt das jeweilige Mischbild aus Fluoreszenzsignal und Phasenkontrastabbildung. Dargestellt ist jeweils das Resultat der Markierung mit durchgeführtem Permeabilisierungsschritt, aber ohne zusätzliche TX-100-Behandlung (siehe Kap. 2.8.2). Ein Unterschied zwischen Markierung mit und ohne durchgeführtem Permeabilisierungsschritt sowie mit und ohne durchgeführter TX-100-Behandlung konnte bei keinem der aufgeführten Seren erkannt werden.

Tab. 3: Antiseren, die bei Immun-Fluoreszenzmarkierungen eine positive Reaktion am Tip zeigten (Siehe Abb. 3.2.2).

Serum	Nummer	Verdünnung
anti -A19	GAED	1:100
anti -P1	45790	1:1000
anti -FtsZ	41832	1:500
anti -P90	43558	1:100
anti -P65 rep DPNAY	66578	1:100
anti -HMW1	84267	1:1000
anti -P170	85910	1:100
anti -TX-100 unlösl. Fraktion	60631	1:100
anti -GST Mpn 297	MX 95	1:100
anti -HMW 3	65376	1:100
anti -P200	65020	1:100
anti -GT9	24674	1:100
anti -40 kDa ++ 130 k-1	42328	1:100
anti -Rep 30 N	26140	1:100
anti -200 b RNA	118	1:100
anti -P30	123	1:100

3.2.4 Immun-Fluoreszenzmarkierung mit Serum gegen P01_orf1033

Das Serum gegen P01_orf1033 reagierte in immunelektronenmikroskopischen Tests stark mit der gesamten Zelloberfläche. Nach Entfernen der cytoplasmatischen Membran durch modifizierte TX-100-Behandlung war in Vorversuchen keine oder nur noch eine stark abgeschwächte Reaktion festzustellen (siehe auch Kap. 3.3.3.3, in welchem eine entsprechende EM-Versuchsreihe beschrieben wird).

Diese Beobachtung konnte durch Immun-Fluoreszenzmarkierungen bestätigt werden. Die **Abb. 3.2.3** zeigt die Reaktion des Serums mit *M. pneumoniae*-Zellen mit und ohne Einsatz von TX-100. Ohne TX-100-Behandlung reagiert das Serum gleichermaßen mit Zellkörpern (weiße Pfeilspitzen) und Zellausläufern (schwarze Pfeile). Dies ist in **Abb. 3.2.3 a** und **b** dargestellt. Bild **a** zeigt den Ausschnitt im Phasenkontrast, Bild **b** das Fluoreszenzsignal des selben Ausschnitts wie in **a**.

Parallel wurden Markierungen an Präparaten durchgeführt, die vor der Inkubation mit dem Primärserum mit TX-100 behandelt worden waren. TX-100-behandelte Präparate zeigten keine Reaktion mit dem Serum gegen P01_orf1033. Dies ist in der **Abb. 12 c** und **d** dargestellt. Bild **c** zeigt den Ausschnitt im Phasenkontrast, Bild **d** das Fluoreszenzsignal des selben Ausschnitts wie in **c**.

Der Verlust der Cytoplasmamembran durch die TX-100-Behandlung kann direkt nur elektronenmikroskopisch erkannt werden. Beim Einsatz von Tween-20 bei der Verdünnung der Seren kann mit dem Serum gegen P01_orf1033 ebenfalls kein positives Signal in Immunmarkierungen erhalten werden, weder bei Immun-Fluoreszenztests noch bei Immun-elektronenmikroskopischen Tests an ganzen Zellen. Auch die Verwendung von 2%-iger BSA-Lösung zur Verdünnung des Primärserums führte zu einer deutlichen Abschwächung des erhaltenen Fluoreszenzsignals. In elektronenmikroskopischen Tests konnte erkannt werden, daß eine 2%-ige BSA-Lösung einen ähnlichen Effekt auf die Cytoplasmamembran hat wie TX-100; dies gilt auch für Tween. Die Markierungsexperimente mit dem Serum gegen P01_orf1033 wurden daher ohne Einsatz von BSA zur Serumverdünnung durchgeführt. Das Serum wurde in reinem PBS ohne Zusätze verdünnt.

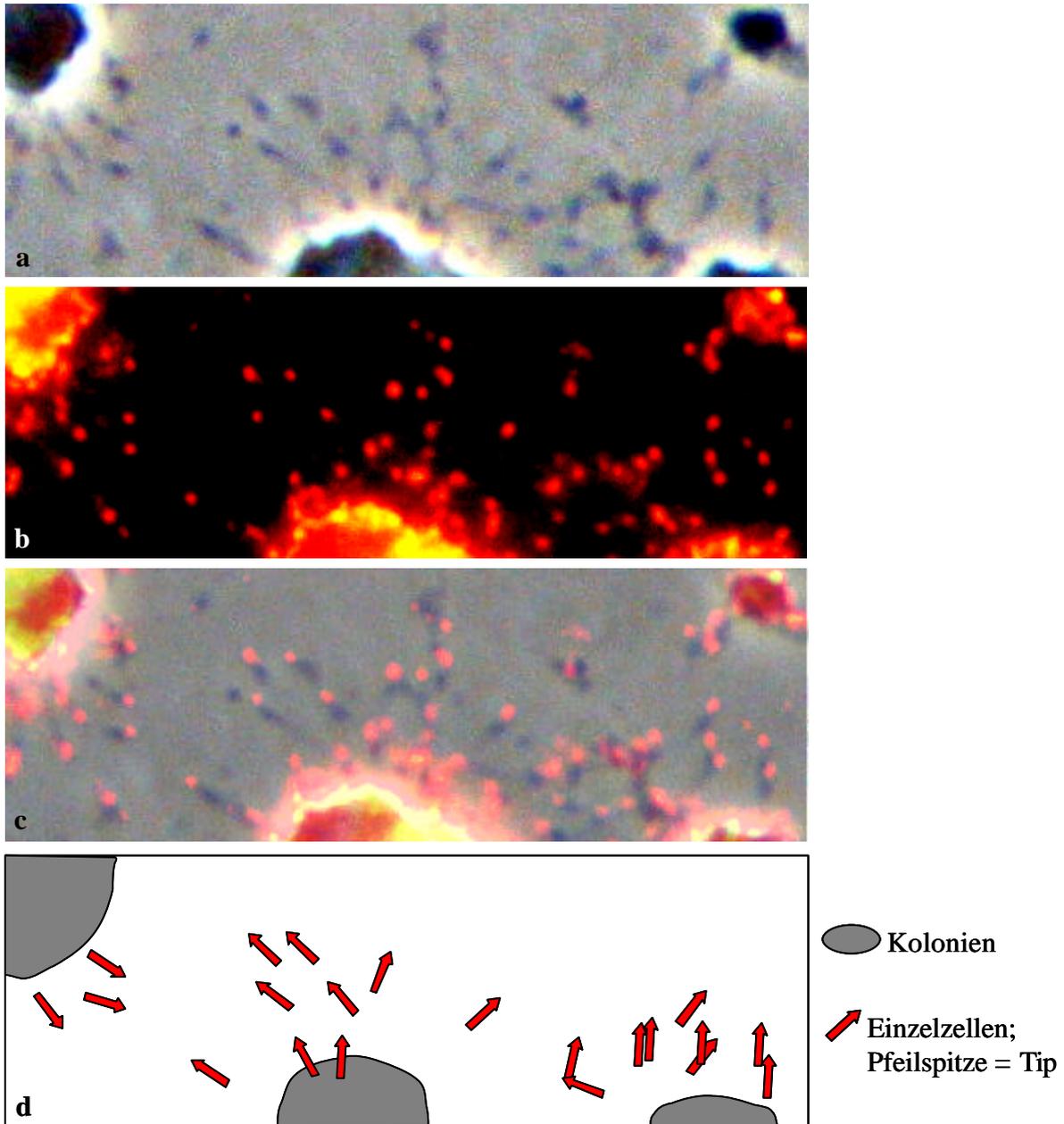


Abb. 3.2.1: Immun-Fluoreszenzmarkierung mit Serum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion von *M. pneumoniae*, a-c gleicher Ausschnitt.

a: Phasenkontrast;

b: Fluoreszenzsignal;

c: Mischbild aus a und b;

d: Modell der abgebildeten Kolonien und Einzelzellen, die sich radial von den Kolonien wegbewegen

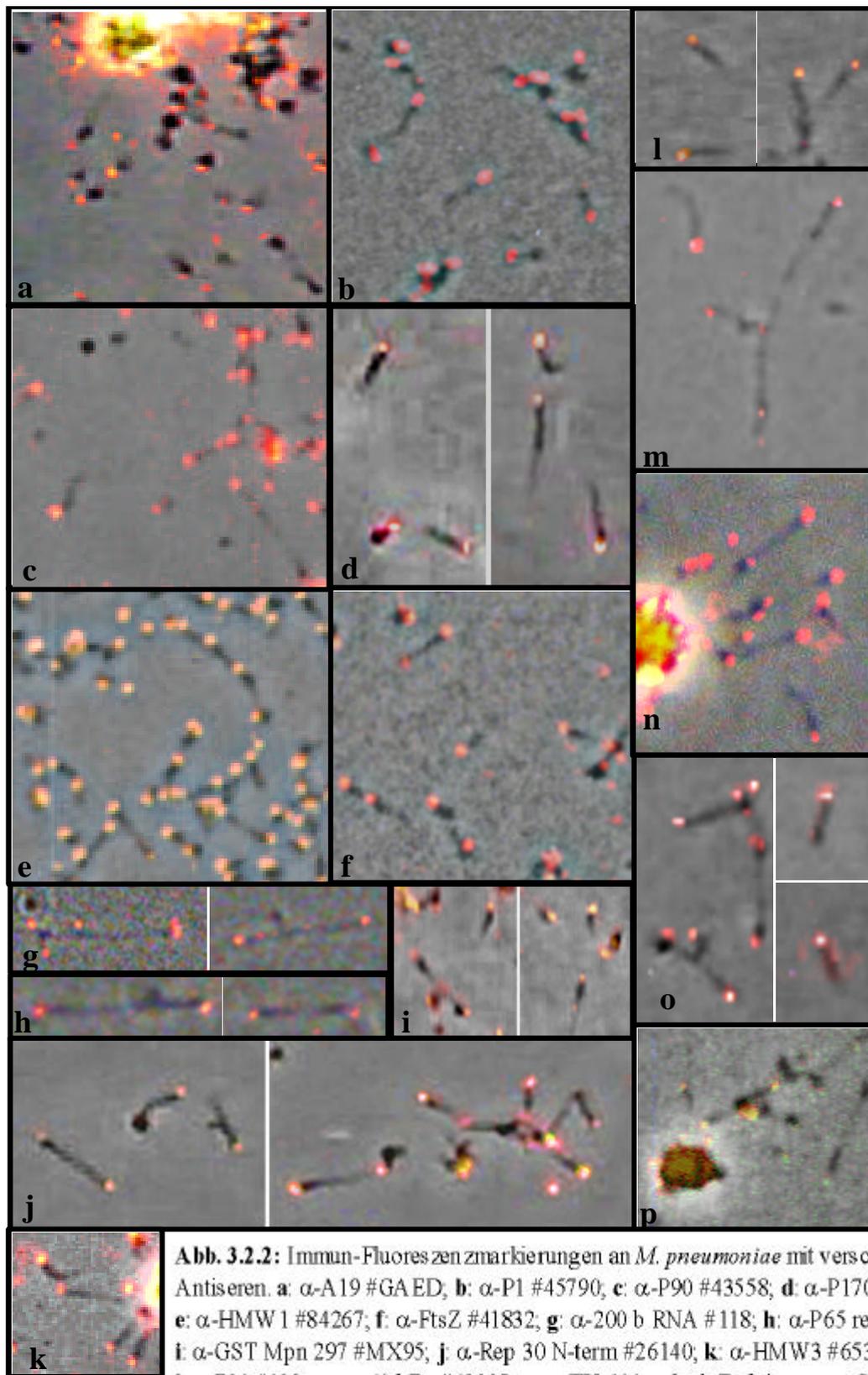


Abb. 3.2.2: Immun-Fluoreszenzmarkierungen an *M. pneumoniae* mit verschiedenen Antisera. **a:** α -A19 #GAED; **b:** α -P1 #45790; **c:** α -P90 #43558; **d:** α -P170 #85910; **e:** α -HMW1 #84267; **f:** α -FtsZ #41832; **g:** α -200 b RNA #118; **h:** α -P65 rep #66578; **i:** α -GST Mpn 297 #MX95; **j:** α -Rep 30 N-term #26140; **k:** α -HMW3 #65376; **l:** α -P30 #123; **m:** α -40 kDa #42328; **n:** α -TX-100-unlös. Fraktion; **o:** α -GT9 #24674; **p:** α -P200 #65020

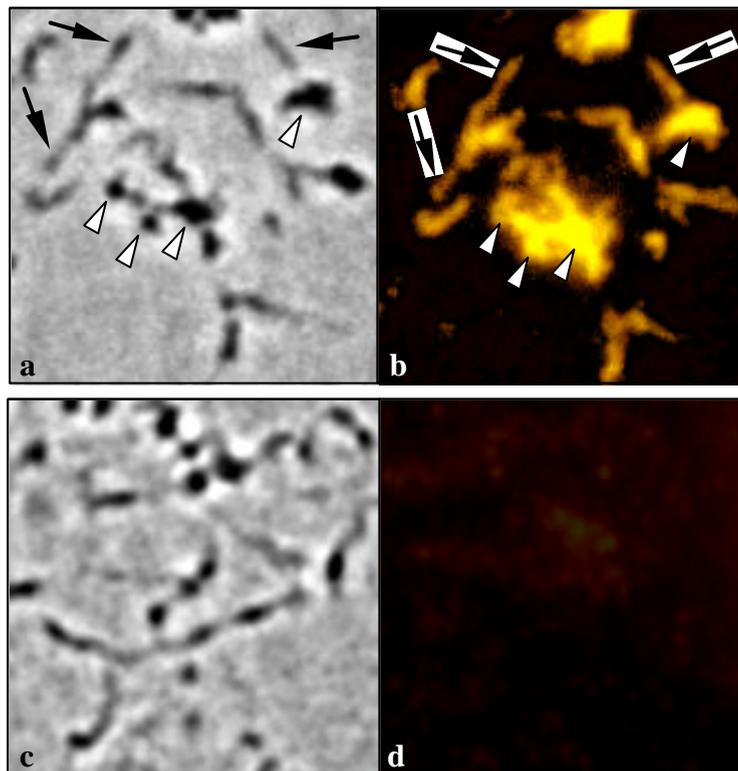


Abb. 3.2.3: Immun-Fluoreszenzmarkierung mit Serum gegen P01_orf1033

a, b: Ohne TX-100-Behandlung, gleicher Ausschnitt.

a: Phasenkontrast, b: Fluoreszenzsignal

c, d: Mit TX-100-Behandlung, gleicher Ausschnitt.

c: Phasenkontrast, d: Fluoreszenzsignal

3.3 Elektronenmikroskopie

Mittels Elektronenmikroskopie sollten Einblicke in die Ultrastruktur von *M. pneumoniae* erhalten werden. Ziel der Untersuchungen war hierbei zunächst eine cytoskelettartige Struktur, die im Tip lokalisiert ist und über welche bereits seit Jahrzehnten in der Literatur berichtet wurde (WILSON & COLLIER, 1976; MENG & PFISTER, 1980). Desweiteren sollte die Organisation der Zellhülle von *M. pneumoniae* untersucht werden. Die Zellhülle besteht nach bisherigem Kenntnisstand nur aus einer Cytoplasmamembran (RAZIN et al., 1998). Durch TX-100-Behandlung zuvor chemisch fixierter *M. pneumoniae*-Zellen konnte die Cytoplasmamembran von den Zellen abgelöst werden, ohne dabei die restliche Zelle zu lysieren. Hierdurch war es möglich, die direkt unter der Cytoplasmamembran liegende Schicht mittels Negativkontrastierung abzubilden.

Es wurden für TEM Ultradünnschnitte sowie Kryo-Ultradünnschnitte angefertigt und verschiedene Präparationen von *M. pneumoniae* durch Negativkontrastierung dargestellt. Durch Behandlung mit dem Detergens Triton X-100 wurde die im Tip lokalisierte cytoskelettartige Struktur von TX-100-löslichen Zellbestandteilen freipräpariert und konnte durch Negativkontrastierung dargestellt werden. Auf diese Art hergestellte Präparate wurden auch durch SEM abgebildet.

In diesem Kapitel soll zunächst die Ultrastruktur der Zellen von *M. pneumoniae* von außen nach innen, d.h. von der Cytoplasmamembran über die darunter liegende Schicht bis hin zu im Zellinneren gelegenen Cytoskelettkomponenten, erläutert werden.

3.3.1 Die Zellhülle von *M. pneumoniae*

3.3.1.1 Die Cytoplasmamembran von *M. pneumoniae*

M. pneumoniae-Zellen besitzen keine Zellwand, sie sind nur von einer Cytoplasmamembran umgeben (RAZIN et al., 1998). Diese ist nach außen exponiert. Die Cytoplasmamembran konnte in dieser Arbeit durch Negativkontrastierung an whole-mount-Präparationen sowie durch Ultradünnschnittechnik dargestellt werden.

Experimente und Ergebnisse

Sie umschließt die Zellen von *M. pneumoniae* vollständig, sowohl Zellausläufer als auch Zellkörper.

Abb. 3.3.1 zeigt *M. pneumoniae*-Zellen im Negativkontrast. Es wurden mit Glutaraldehyd/Formaldehyd fixierte Zellen an Kohlefolie adhärert und mit neutralisierter Phosphorwolframsäure negativ kontrastiert (siehe Kap. 2.7.3). Das Kontrastmittel ist von der Cytoplasmamembran abgeflossen, diese ist daher im Bild als heller Bereich zu erkennen, der die Zellen vollständig umschließt (CM).

In Ultradünnschnitten ist die Cytoplasmamembran oft als Doppellinie an der Zellperipherie zu erkennen. Die Doppellinie rührt von der Lipiddoppelschicht her. Sie umschließt die Zellen oft nicht vollständig. Insbesondere an Zellausläufern ist sie meistens nicht sichtbar. Dies erklärt sich durch den Ansnittwinkel der Cytoplasmamembran. Die angefertigten Ultradünnschnitte haben eine Dicke von ~70 nm. Die Zellausläufer haben einen Durchmesser von ~100 nm. Im elektronenoptischen Bild eines Schnittes ist alles biologische Material abgebildet, welches sich innerhalb des Schnittes befindet. **Abb. 3.3.2** verdeutlicht schematisch die Situationen bei verschiedenen Ansnittwinkeln von Zellkörpern und Zellausläufern, **Abb. 3.3.3** zeigt entsprechende TEM-Aufnahmen von Ultradünnschnitten (s.u.). **Abb. 3.3.2 a** zeigt mögliche Schnittebenen durch einen Zellkörper von ~500 nm Durchmesser. Die Querstriche stellen Schnittebenen im Abstand von 70 nm dar, jeweils zwischen zwei Querlinien befindet sich ein Schnitt von 70 nm Dicke. Die den Zellkörper umschließende Cytoplasmamembran ist als Doppellinie dargestellt, wobei jede Linie einem Monolayer der Lipiddoppelschicht entspricht. Der in Bild **a** links grau hinterlegte Schnitt ist in der Mitte in Schrägansicht gezeigt. Rechts ist die Aufsicht auf den Schnitt dargestellt. Diese Projektion entspricht dem Bild im TEM. Die angeschnittene Cytoplasmamembran steht im Schnitt längs zur Richtung des Elektronenstrahles, womit sich die Wirkung des in die Cytoplasmamembran eingedrungenen Kontrastmittels beim Durchtritt des Elektronenstrahles durch den Schnitt im Bereich der Cytoplasmamembran aufsummiert. Liegt die Cytoplasmamembran schräg im Schnitt, so ist sie im TEM auch schräg zur Richtung des Elektronenstrahls orientiert. Eine Verstärkung des Kontrastes durch Aufsummierung beim Durchtritt des Elektronenstrahles durch den Schnitt ist in dieser Position nicht möglich.

Betrachtet man Zellausläufer von *M. pneumoniae* im Längsschnitt, so wird man nur in seltenen Fällen die Cytoplasmamembran als Doppellinie erkennen. Die Situation bei

Experimente und Ergebnisse

Längsschnitten durch Zellausläufer ist in Bild **b** dargestellt. Links ist eine Folge von Schnitten durch zufällig verteilt liegende, längs zur Schnittebene orientierte Zellausläufer dargestellt. Nur in dem grau hinterlegten Schnitt ist ein Zellausläufer (links im Schnitt) in der Art angeschnitten, daß die Cytoplasmamembran in der Aufsicht-Projektion (rechtes Bild in Bild **b**) als längs zur Strahlrichtung orientierter Anschnitt zu liegen kommt. Nur in dem Fall ist eine Aufsummierung des Kontrastes beim Durchtritt des Elektronenstrahls durch den Schnitt möglich. In allen anderen Anschnitten der Zellausläufer ist die Cytoplasmamembran schräg zur Schnittebene und damit schräg zum Elektronenstrahl orientiert, sodaß sie im TEM-Bild nicht als Doppellinie erkannt werden kann. Ein solcher Fall ist bei dem im dargestellten Schnitt rechts liegenden Zellausläufer dargestellt. Je geringer die Krümmung des im Schnitt liegenden Membranstückes ist, desto schärfer können die beiden Einzellinien abgebildet werden.

Bild **c** verdeutlicht die Situation bei Quer- und Schrägschnitten durch zufällig angeordnete Zellausläufer. Der im Schnitt links dargestellte Zellausläufer ist genau quer zur Schnittebene orientiert. Hier erscheint die Cytoplasmamembran bei Durchstrahlung des Schnittes als scharfe Doppellinie. Der im Schnitt mittig orientierte Zellausläufer liegt zur Schnittebene leicht gekippt, der sich zwischen Cytoplasmamembran und Strahlrichtung ergebende Winkel läßt eine Abbildung der Cytoplasmamembran nur noch an den Flanken des Anschnittes zu, da sich hier durch die Verkippung des Zellausläufers zur Schnittebene nur eine Verdrehung der Cytoplasmamembran parallel zur Strahlrichtung ergibt und somit die beiden Lipideinzelschichten übereinander projiziert werden können.

Der im Schnitt rechts liegende Zellausläufer liegt so schräg zur Schnittebene, daß er nur als Oval ohne umlaufende Doppellinie abgebildet werden kann.

Abb. 3.3.3 zeigt die in **Abb. 3.3.2** schematisch dargestellten Anschnittsituationen im TEM-Bild. Bild **a** zeigt einen mittig angeschnittenen Zellkörper, bei welchem die Cytoplasmamembran als den Zellkörper umspannende Doppellinie sichtbar ist. Ein Ausschnitt aus der Cytoplasmamembran ist in Bild **b** vergrößert dargestellt. Am Zellkörper befindet sich im Anschnitt ein Zellausläufer. Dieser ist nicht mittig angeschnitten, sodaß die Cytoplasmamembran nicht als Linie sichtbar ist. Bild **c** zeigt einen mittigen Längsschnitt durch einen Zellausläufer, die Cytoplasmamembran ist als Doppellinie sichtbar (Pfeil). In Bild **d** ist ein leicht schräg angeschnittener Zellausläufer mit an den Flanken sichtbarer Cytoplasmamembran (Pfeile) dargestellt.

3.3.1.2 Triton X-100-Behandlung an fixierten *M. pneumoniae*-Zellen: Einblicke in die unter der Cytoplasmamembran gelegene Schicht

Durch TX-100-Behandlung von zuvor mit Glutaraldehyd fixierten *M. pneumoniae*-Zellen konnte die Cytoplasmamembran von den Zellen abgelöst werden. Hierbei waren die Zellen durch die chemische Fixierung vor einer vollständigen Lyse durch das Detergens geschützt. Die Zellform blieb somit erhalten. Glutaraldehyd wirkt vernetzend auf biologisches Material. Diese Wirkung betrifft in erster Linie Proteine. Lipide werden nicht oder nur schwach vernetzt (HOPPERT, 2003). Die Cytoplasmamembran ist zwar proteinhaltig, besteht jedoch im wesentlichen aus einer Lipiddoppelschicht. Der durch Glutaraldehyd bewirkte Vernetzungseffekt ist somit in der Cytoplasmamembran schwächer als in der restlichen Zelle, wo die Packungsdichte der Proteinmoleküle höher ist als in der Cytoplasmamembran. Dieser Unterschied im Vernetzungsgrad wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Cytoplasmamembran durch Einsatz von Detergens von der Zelle zu lösen. Der Verlust der Cytoplasmamembran wurde elektronenmikroskopisch an verschiedenen Präparationen nachgewiesen (siehe unten). Die Fixierung der Zellen erfolgte in 2,5 %-iger (v/v) Glutaraldehyd-Lösung, die Ablösung der Cytoplasmamembran mit 2 % TX-100 (v/v) (siehe Kap. 2.8.1.2).

Nachweis des Verlustes der Cytoplasmamembran mittels Ultradünnschnitt-Technik

Es wurden Glutaraldehyd-fixierte Zellen von *M. pneumoniae* mit TX-100 behandelt (siehe Kap. 2.8.1.2). Als Negativkontrolle wurde ein Aliquot derselben Zellsuspension in PBS anstelle von TX-100 inkubiert. Beide Proben wurden in Lowicryl-K4M-Harz eingebettet (siehe Kap. 2.7.4.1). Von beiden Proben wurden Ultradünnschnitte angefertigt und diese mit Bleicitrat / Uranylacetat kontrastiert (siehe Kap. 2.7.4.4). Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.3.4** dargestellt. Bild **a** zeigt die Negativkontrolle. Hier ist die Cytoplasmamembran deutlich als Doppellinie zu erkennen (Pfeile). Bild **b** zeigt die TX-100-behandelte Probe. Es wird deutlich, daß die Zellen noch ihre ursprüngliche Form aufweisen. Da die Cytoplasmamembran in **b** nicht vorhanden ist, erscheint die Umrandung der Zellen rauh.

Nachweis des Verlustes der Cytoplasmamembran mittels Negativkontrastierung

An negativ kontrastierten Präparaten von *M. pneumoniae* ist die Cytoplasmamembran an Zellen, die nicht mit Detergenzien behandelt wurden, als helle Linie zu erkennen, welche die Zelle komplett umschließt (siehe Kap. 3.3.1.1). An mit TX-100 behandelten Präparaten ist die Cytoplasmamembran mit der gleichen Kontrastierungsmethode sowie nach beliebigen Variationen der Kontrastierung (Flottierdauer, Art und Konzentration des Kontrastmittels) nicht abbildbar. Die Zellen erscheinen rau und es sind keine die Zellen umspannenden hellen Linien zu erkennen. Dies ist in **Abb. 3.3.5** dargestellt. Bild **a** zeigt Zellen ohne TX-100-Behandlung, die Cytoplasmamembran (CM) ist sichtbar. Bild **b** zeigt mit TX-100 behandelte Zellen. Die Cytoplasmamembran ist nicht mehr vorhanden.

3.3.1.3 Die Schicht unter der Cytoplasmamembran zeigt ein hexagonales Muster

Nach der bisherigen Vorstellung von der Struktur von *M. pneumoniae* umschließt die Cytoplasmamembran direkt das Cytoplasma. Die Verteilung von Proteinen im Cytoplasma ist bisher wenig bekannt, durch Fluoreszenz- und immunelektronenmikroskopische Untersuchungen erfolgten lediglich Zuordnungen einzelner Proteine zum Tip-Bereich.

Glutaraldehyd vernetzt Proteine. Geht man davon aus, daß das Cytoplasma durchgehend gleichartig proteinhaltig ist, so wäre als Wirkung einer Glutaraldehyd-Behandlung zunächst eine irreversible, zu Strukturartefakten führende Verklumpung des Cytoplasmas zu erwarten, da gelöste Proteinmoleküle nach dem Zufallsprinzip vercrosslinkt würden. Nach TX-100-Behandlung wäre demnach zwar eine Ablösung der Cytoplasmamembran vom verklumpten Zellinneren vorstellbar, das Erkennen von wiederkehrenden Strukturelementen jedoch wäre bei einer im Moment der Fixierung statistischen Verteilung der Proteine nicht denkbar.

Wenn aber die Verteilung von Proteinen im Cytoplasma lebender *M. pneumoniae*-Zellen geordnet ist, wodurch lokale Konzentrationsunterschiede von Proteinen im Cytoplasma bestehen würden, wäre eine geordnete Vernetzung durch Glutaraldehyd möglich.

Experimente und Ergebnisse

Fixierte Zellen, die anschließend mit TX-100 behandelt wurden, erscheinen im elektronenmikroskopischen Bild zunächst rauh. Der Rand der Zellen bildet keine definierte Linie. Die Oberfläche erscheint körnig. Diese Körnung zeigt eine einheitliche Partikelgröße, was in **Abb. 3.3.6** sichtbar wird. Dargestellt ist hier ein Ausschnitt aus einem Zellausläufer in hoher Vergrößerung. Der Durchmesser des Zellausläufers beträgt im im Bild nach oben orientierten Bereich ca. 100 nm, nach unten nimmt der Durchmesser etwas zu.

Bei genauerer Betrachtung der **Abb. 3.3.6** fällt eine Strukturierung der Oberfläche der Zelle auf. Es ist eine Streifung erkennbar, welche schräg zur Längsachse der Zelle verläuft. Die Richtung dieser Streifung ist im Bild durch parallele, jeweils seitlich der Zelle angeordnete Striche verdeutlicht. Das Muster erstreckt sich über den gesamten Bildausschnitt. Es ist im dünneren Bereich des Zellausläufers deutlicher sichtbar als im dickeren Bereich. Die Anordnung der Streifung ist gleichmäßig, der Abstand der Streifen erscheint konstant.

Der in der **Abb. 3.3.6** nach oben orientierte Teil des Zellausläufers ist in **Abb. 3.3.7 a** in höherer Vergrößerung dargestellt. Die Streifung ist durch Pfeile verdeutlicht. Da hier außer einer Streifung auch eine bienenwabenähnliche Musterung zu erahnen ist, wurde das Bild fünffach mit einer jeweiligen Verschiebung um eine Periodizität der erkennbaren Schrägstreifung transparent übereinanderprojiziert. Bei Vorhandensein von Periodizitäten sollten sich hierbei über weite Bereiche des Bildes jeweils helle mit hellen und dunkle mit dunklen Bereichen übereinanderlagern und dadurch gegenseitig verstärken, wodurch ein vorhandenes Muster insgesamt deutlicher hervortreten sollte. Das im Originalbild sichtbare Rauschen wurde hierbei durch Gauß'sches Weichzeichnen unterdrückt. Das Ergebnis dieser Überlagerung ist in Bild **b** dargestellt. Es ergibt sich eine Verstärkung eines hexagonalen Musters mit einer Periodizität von ca. 10 nm Abstand. Dieses Muster ist in Bild **c** schematisch wiedergegeben.

3.3.1.4 Auf der Oberfläche fixierter und TX-behandelter *M. pneumoniae*-Zellen sitzen hexagonal angeordnete Noppen, welche in den Bereich hineinragen, in welchem die Cytoplasmamembran ursprünglich lag

Die Abb. 3.3.8. a zeigt eine Einzelzelle und einen Ausschnitt eines zu einem Zellverband gehörenden Zellkörpers. Die Cytoplasmamembran ist durch TX-Behandlung nach Fixierung entfernt. Es ist insbesondere an der Einzelzelle (im Bild oben) eine zur Längsachse der Zelle schräg verlaufende Streifung zu erkennen. Deren Richtung ist oberhalb der Zelle durch parallele Linien verdeutlicht.

Am Rand der Einzelzelle sind Massen zu erkennen, welche periodisch angeordnet sind und von der Zelle nach außen hin abstehen und hier als „Noppen“ bezeichnet werden. Sie erscheinen aufgrund der Negativkontrastierung hell vor dunklem Hintergrund und sind durch Pfeilspitzen markiert. Die Zelloberfläche erscheint am Rand in seitlicher Projektion und somit erscheinen die Noppen hier ebenfalls in Seitenansicht. Sie ragen nach außen und damit in den Bereich, in dem sich vor der TX-100-Behandlung die Cytoplasmamembran befand. Am äußeren Ende sind die Noppen in Seitenansicht teilweise verdickt. Bild b zeigt den in Bild a durch einen schwarz gestrichelten Kasten markierten Ausschnitt in höherer Vergrößerung und mit umgekehrtem Kontrast, sodaß die Noppen dunkel vor hellem Hintergrund erscheinen. Eben solche Noppen sind in Aufsicht in mittleren Bereichen der Zelle als helle Punkte vor dunklem Hintergrund sichtbar (weiße Pfeile). Der Abstand der gezeigten Noppen zueinander beträgt ca. 10 nm. Dies entspricht der Periodizität der beobachteten Schrägstreifung und des hexagonalen Musters (vergleiche Abb. 3.3.7). Auch die Anordnung der Noppen erscheint hexagonal, was in Abb. 3.3.9 verdeutlicht ist. Der in Abb. 3.3.8 durch einen weißen, gestrichelten Kasten markierte Bereich ist in Abb. 3.3.9 dargestellt. Bild a zeigt zunächst den markierten Bereich unbearbeitet. An diesem Bereich konnte durch Rauschunterdrückung (a_2), Kontrastverstärkung (a_3) und Kontrastumkehr (a_4) ein Muster aus einzelnen Punkten hervorgehoben werden. Diese stellen die hellsten Punkte im Originalbild dar. Im Originalbild erscheinen Massen aufgrund der Negativkontrastierung hell, auf dem bearbeiteten Bild entsprechen die dunklen Punkte den massivsten Bereichen im Präparat.

Die Punkte sind so angeordnet, daß sie auf ein hexagonales Netzwerk projiziert werden können, wenn auf dem Netzwerk jeweils eine Masse pro Hexagon vorkommt

und damit die Ecken des Netzwerkes alternierend mit und ohne Masse vorliegen. Dies ist als Modell in Abb. 3.3.11 a dargestellt. Es ergibt sich eine regelmäßige hexagonale Verteilung der Noppen. Bei einer Besetzung des zu Grunde liegenden hexagonalen Netzwerkes mit einer Noppe pro Ecke ergäbe sich kein hexagonales Muster der Noppen (nicht gezeigt).

Das hexagonale Muster erscheint parallel zum Rand der Zelle rundungsbedingt gestaucht. In Abb. 3.3.9 wurden die einzelnen Punkte des durch die oben beschriebene Bearbeitung hervorgehobenen Musters durch Linien verbunden, welche auch im Modell zur Verbindung der Punkte angelegt wurden. In Bild b_1 wurde das Bild a_4 vergrößert dargestellt. Es wurden gerade Linien angelegt, die jeweils mehrere Punkte miteinander verbinden. Diese Linien entsprechen denen, die man auch an ein leicht gestauchtes hexagonales Muster anlegen kann. Dies ist in Bild b_2 dargestellt. Es wurden drei Hauptlinien angelegt, die den drei möglichen Reihen mit den kürzesten Punktabständen entsprechen. Daneben ergeben sich die gestrichelt dargestellten Linien. Alle in Bild b_2 dargestellten Linien sind auf Bild b_1 übertragbar. Daß sich ein gestauchtes hexagonales Muster ergibt, entspricht der Erwartung, da der untersuchte Bereich am Zellrand liegt und sich die Zellhülle hier in gebogenem Zustand befindet. Ein Beispiel eines unverzerrten hexagonalen Musters zeigt die Abb. 3.3.10. Hier wurde ein Bildausschnitt auf die gleiche Art bearbeitet wie in Abb. 3.3.9. Der gezeigte Bereich befand sich in diesem Fall im mittleren Bereich einer Zelle, wo demnach keine krümmungsbedingte Verzerrung zu erwarten ist. Bild **a** zeigt das original EM-Bild, Bild **b** das daraus wie oben beschrieben rekonstruierte Punktmuster. In Bild **c** ist die hexagonale Verteilung der Massen durch Linien verdeutlicht.

3.3.1.5 Zellkörper von fixierten, TX-100-behandelten Zellen erscheinen nach Trocknung am Rand erhöht, mittig abgeflacht

In Abb. 3.3.8 wird deutlich, daß der gezeigte Zellkörper in der Mitte dunkler erscheint als am Rand. Bild **c** zeigt den in Bild **a** teilweise gezeigten Zellkörper in geringerer Vergrößerung in Gesamtansicht. Hier wird deutlich, daß sich der hellere äußere Bereich um den gesamten Zellkörper zieht.

Durch Negativkontrastierung erscheinen alle die Bereiche im Bild dunkel, welche viel Kontrastmittel enthalten. Das Kontrastmittel kann von aufrechten Strukturen besonders gut ablaufen, sie erscheinen im Bild hell. In Vertiefungen und in Bereichen direkt neben aufrechten Strukturen sammelt sich dagegen Kontrastmittel an, diese Bereiche erscheinen daher dunkel. Die Mitte des Zellkörpers ist demnach im Gegensatz zu den Randbereichen vertieft. Genau mittig erscheint der Zellkörper wiederum etwas heller. Die hellste Region des den Zellkörper umschließenden hellen Bereiches liegt nicht ganz am Rand des Zellkörpers, zum Rand hin nimmt die Helligkeit hingegen wieder etwas ab.

Die Beobachtungen der Helligkeitsverteilung lassen insgesamt auf eine mittige Abflachung des Zellkörpers schließen. Dies rührt von der Trocknung des Präparates her. Die äußeren Bereiche erheben sich hingegen vom Untergrund mit einem Höhenmaximum, welches nicht ganz außen am Zellkörper liegt. Eine solche Position nimmt jede Struktur an, die einen von einer begrenzt biegsamen Hüllschicht umgebenen Innenraum darstellt und kollabiert ist. Die Verteilung des Kontrastmittels ist in Bild d schematisch in Seitenansicht der kollabierten Zelle auf dem Trägerfilm wiedergegeben.

Es kann hieraus gefolgert werden, daß *M. pneumoniae*-Zellen von einer Hülle umgeben sind, welche nicht die Cytoplasmamembran ist, sondern sich unter dieser befindet. Die Hülle zeigt begrenzte Biegsamkeit. Es kann daher vermutet werden, daß es sich um eine feste Schicht handelt, welcher demnach höchstwahrscheinlich ein Stützfunktion zukommt.

3.3.1.6 Modell für ein peripheres Cytoskelett

Aus dem Kapitel 3.3.1 kann zusammenfassend ein Modell für eine unter der Cytoplasmamembran gelegene Stützschrift entworfen werden. Diese Schicht ist elektronenmikroskopisch im Negativkontrast-Verfahren abbildbar, wenn die Cytoplasmamembran entfernt wurde. Die Schicht weist eine periodische, hexagonale Musterung auf. In gleicher Periodizität befinden sich Massen auf dieser Schicht, welche mit der Cytoplasmamembran interagieren könnten, da sie in den Bereich ragen, in welchem sich diese in intakten Zellen befindet.

Experimente und Ergebnisse

Zellkörper von Zellen, deren Cytoplasmamembran entfernt wurde, können beim Trocknen kollabieren. Hierbei bleibt der Bereich, der nahe dem Rand des Zellkörpers liegt, aufgewölbt, während der Zellkörper zur Mitte hin vollständig abflacht. Dies zeigt, daß der Zellkörper ohne Cytoplasmamembran kein homogenes Aggregat von fixiertem Protein darstellt, sondern eine Hülle mit begrenzter Biegsamkeit aufweist, die einen Innenraum umschließt, welcher entweder hohl oder wesentlich weniger dicht ist als der Hüllbereich. Die Zellkörper sind also von einer peripheren Stüttschicht umgeben. Auf dieser Stüttschicht kann elektronenmikroskopisch ein regelmäßiges Muster abgebildet werden; dieses Muster findet sich auch in gleicher Periodizität an den Zellausläufern. Es kann daher angenommen werden, daß es sich um eine einheitliche Schicht handelt, die sowohl Zellkörper wie Zellausläufer umschließt. Zellausläufer kollabieren beim Trocknen nicht wie Zellkörper. Die Biegsamkeit der Stüttschicht reicht offenbar bei einem Durchmesser des von der Stüttschicht umgebenen Hohlraumes von ca. 100 nm nicht aus, um den Hohlraum durch Trocknung kollabieren zu lassen.

Ein Modell für ein peripheres Cytoskelett, welches die hier gewonnenen Erkenntnisse berücksichtigt, ist in Abb. 3.3.11 dargestellt. Bild a zeigt die Aufsicht auf das Cytoskelett von außerhalb der Zelle. Auf einem hexagonalen Netzwerk befinden sich Noppen, welche regelmäßig in einem Abstand von ca. 10 nm zueinander angeordnet sind. Bild b zeigt eine Schrägansicht mit Blickrichtung von außerhalb der Zelle, die nach außen abstehenden Noppen sind zur Verdeutlichung nur im rechten Bereich dargestellt. Bild c zeigt die Seitenansicht auf das Cytoskelett-Modell. Der Abstand der einzelnen Noppen zueinander beträgt ca. 10 nm. Das Netzwerk aus hexagonalen Maschen kann flach oder bis zu einem begrenzten Grad gebogen vorliegen.

3.3.2 Der Rod

Im Tip von *M. pneumoniae* ist eine cytoskelettartige Struktur lokalisiert, über welche bereits verschiedene elektronenmikroskopische Untersuchungen vorliegen (BIBERFELD & BIBERFELD, 1970; MENG & PFISTER, 1980; GÖBEL et al., 1981). Sie wird in der Literatur oft als „electron dense core“ bezeichnet, da sie bei der Betrachtung von kontrastierten Ultradünnschnitten stets dunkel erscheint. In dieser Arbeit wird diese Struktur aufgrund ihrer Form als „Rod“ bezeichnet.

Der Rod kann durch Behandlung von *M. pneumoniae*-Zellen mit Triton X-100 für die Elektronenmikroskopie von übrigen Zellbestandteilen freipräpariert werden (MENG & PFISTER, 1980; GÖBEL et al., 1981; REGULA et al., 2001). Diese Methode nutzt die unterschiedlichen Löslichkeiten verschiedener Zellbestandteile in dem nichtionischen Detergens. Allgemein gelten Komponenten von Cytoskeletten als Triton-unlöslich (HERRMANN & WICHE, 1983). Dem Rod wird daher auch eine Cytoskelettfunktion zugeschrieben.

In dieser Arbeit wurde die konventionelle TX-100-Behandlung genutzt, um den Rod elektronenmikroskopisch abzubilden. Desweiteren wurde die schon in Kap. 3.3.1 vorgestellte modifizierte TX-100-Behandlung zur Darstellung des Rod in seiner natürlichen Lage in der Zelle herangezogen. Über Ultramikrotomie und Kryo-Ultramikrotomie konnten schließlich Einblicke ins Innere des Tips von *M. pneumoniae* und damit auf die Ultrastruktur des Rod und weitere mit dem Rod assoziierte Strukturen erlangt werden.

In diesem Kapitel wird der Rod sukzessive von seiner Lage in der Zelle über seine Form und Struktur bis zu mit ihm assoziierten Substrukturen dargestellt.

3.3.2.1 Der Rod ist im Tip von *M. pneumoniae* lokalisiert

Mittels Ultramikrotomie und einer modifizierten TX-100-Behandlung (HEGERMANN et al., 2002) ist es möglich, den Rod in der Zelle abzubilden. Die modifizierte TX-100-Behandlung läßt die Zellen von *M. pneumoniae* für den Elektronenstrahl durchscheinend werden und erlaubt daher eine Lokalisierung des Rod in der in ihrer ursprünglichen Form vorliegenden Zelle.

Der Rod ist stets im äußersten Ende eines Zellausläufers lokalisiert, welches dann als „Tip“ bezeichnet werden kann. Er ist ca. 300 nm lang und liegt stets in Längsrichtung zum Zellausläufer. Nicht jeder Zellausläufer trägt einen Rod und nur Zellausläufer mit Rod werden als Tip bezeichnet.

Abb. 3.3.12 zeigt das typische Erscheinungsbild des Rod in Ultradünnschnitten und modifizierten TX-100-Behandlungen. Es wird deutlich, daß der Rod eine konstante Länge aufweist, in der Breite jedoch im Erscheinungsbild variiert. Wie noch erläutert wird, ist dies auf verschiedene Projektionen zurückzuführen (siehe Kap. 3.3.2.3).

3.3.2.2 Der Rod kann durch konventionelle TX-100-Behandlung freipräpariert werden

Läßt man *M. pneumoniae*-Zellen auf befilmte elektronenmikroskopische Trägernetze (Grids) adhären und inkubiert diese Grids dann in wässriger Lösung von TX-100, so werden TX-100-lösliche Bestandteile der Zellen vom Grid abgewaschen und die unlöslichen Bestandteile bleiben auf dem Grid zurück. Nach dieser Methode wurden erstmals von MENG und PFISTER (1981) Rods und Filamente aus *M. pneumoniae* für die Elektronenmikroskopie präpariert. Es wurde hierbei eine Lösung von 0,5 % TX-100 verwendet. In dieser Arbeit wurde mit 1 % TX-100 gearbeitet, mit einem vorgeschalteten Schritt mit 0,2 % TX-100 (siehe Kap. 2.8.1.1). Die Präparationen zeigten stets einen unterschiedlichen Grad an Sauberkeit, wobei die Präparationen als besonders sauber bezeichnet werden, bei welchen die Rods möglichst frei von restlichem Zellmaterial sind.

Abb. 3.3.13 zeigt eine durchschnittlich saubere Präparation. Detailansichten werden in kommenden Kapiteln präsentiert. Die Dimensionen des Rod sind erkennbar, sie liegen hier bei ca. 80 nm Breite und knapp 300 nm Länge.

3.3.2.3 Der Rod ist abgeflacht, biegsam und verdrehbar

Der Rod erscheint in allen in dieser Arbeit angefertigten Präparationen in konstanter Länge von ca. 300 nm. Die Breite des Rod differiert hingegen zwischen ca. 20 und 80 nm. Die schmale Form tritt besonders häufig in Längs-Ultradünnschnitten auf, während die breite Form bei freipräparierten Rods vorherrscht. In der schmalen Form erscheint der Rod in der Regel gebogen, während die breite Form stets gerade gestreckt erscheint. In Längs-Ultradünnschnitten sowie an freipräparierten Rods kann auch eine Mischform mit einem breiten und einem schmalen Ende beobachtet werden, welche insgesamt selten auftritt, jedoch in Ultradünnschnitten häufiger als bei freipräparierten Rods. In Quer-Ultradünnschnitten erscheint der Rod stets flach. Abb. 3.3.14 zeigt Längs- und Querschnitte durch den Tip von *M. pneumoniae* mit darinliegendem Rod. In Bild a und b sind Längsschnitte dargestellt, in Bild c und d Querschnitte. Die Bilder a und c zeigen jeweils konventionelle Ultradünnschnitte von in Lowicryl K4M eingebetteten Zellen, Bild b und d zeigen jeweils Kryo-

Experimente und Ergebnisse

Ultradünnschnitte. In Querschnitten ist deutlich die abgeflachte Form des Rod zu erkennen. In Längsschnitten variiert die Breite des Rod, in Bild a sind ein schmaler Abschnitt (oben), ein breiter Abschnitt (unten) und ein Abschnitt mit breitem und schmalen Bereich (Mitte) abgebildet. Die breite und gemischte Projektion sind deutlich seltener als die schmale. In längsgeführten Kryo-Ultradünnschnitten konnten ebenfalls Rods in verdrehter Position angeschnitten werden. Bild b zeigt hierzu zwei Beispiele, im oberen Bild erscheint der Rod zum distalen Ende (rechts) verbreitert, im unteren Bild zum proximalen Ende (links). Quergeführte Kryo-Ultradünnschnitte (Bild d) lassen, ebenso wie konventionelle (Bild c) die abgeflachte Natur des Rod erkennen. Weiterhin sind deutlich massearme Bereiche zwischen den breiten Seiten des Rod und der Zellhülle erkennbar.

An Rods, welche mittels TX-100-Behandlungen an unfixierten Zellen präpariert und durch Negativkontrastierung dargestellt wurden, kann die These untermauert werden, daß der Rod abgeflacht ist. Es lassen sich hier hauptsächlich breit erscheinende Exemplare des Rod finden, während deutlich weniger Exemplare schmal oder mit unterschiedlichen Enden, mit Übergang zwischen schmal und breit erscheinen. Bei der Negativkontrastierung bildet sich der Kontrast durch Eintrocknen von Mikropfüten, welche nach Ablaufen der Kontrastierungslösung um auf der Trägerfolie liegenden Objekten zurückbleiben. Die Menge Kontrastmittel, die um eine Struktur haften bleibt, ist abhängig von der Höhe der Struktur. Um höhere Strukturen entsteht eine stärkere Schwärzung als um niedrigere Strukturen, da sich hier „tiefere“ Mikropfüten bilden können. Abb. 3.3.15 zeigt nach der Methode von REGULA präparierte Rods im Negativkontrast. In der linken Bildhälfte sind drei Exemplare der breit erscheinenden Form des Rod zu sehen (1). In der Bildmitte ist ein als Mischform erscheinender (2) und rechts im Bild ein durchgehend schmal erscheinender Rod (3) abgebildet. Die die Strukturen umschließende, durch das Kontrastmittel hervorgerufene Schwärzung ist generell in den breiten Bereichen weniger intensiv als an den schmalen. Die breit erscheinenden Rods sind von einer gleichmäßig schwachen dunklen Zone umrandet (An den Enden der Rods befindet sich restliches Zellmaterial, hier ist die Schwärzung intensiver, dieses Material scheint demnach stärker in die Höhe zu ragen). Der schmal erscheinende Rod (3) ist von einer intensiv geschwärzten Zone umgeben, bei der Mischform (2) ist die Schwärzung neben dem schmalen Bereich intensiv und neben dem breiten schwach. Die Bereiche starker Schwärzung sind bei der Misch- und schmalen Form durch Sterne

gekennzeichnet. Der in der Bildmitte zu sehende Rod ist nach der dargelegten Deutung der Schwärzungsintensität verdreht, er steht an der linken Seite aufrecht auf der schmalen Kante, während er an der rechten Seite flach auf der Trägerfolie aufliegt. Diese Position kann in diesem Fall durch die im Bild erkennbaren Reste von am Rod anhaftenden Zellmaterials stabilisiert sein: Am aufrecht stehenden Ende ist eine größere Menge Material erkennbar, welches die aufrechte Position stabilisieren kann, während am flach liegenden Ende kein anhaftendes Material sichtbar ist und der Rod demnach hier flach auf der Trägerfolie liegt. Die Torsion kann während der Präparation oder während des Trocknungsprozesses entstanden sein oder bereits in der Zelle vorgelegen haben.

Es wurden ebenso durchgeführte Präparationen des Rod durch Scanning-Elektronenmikroskopie abgebildet. Die hierfür hergestellten Präparate wurden einer Kritischer-Punkt-Trocknung unterzogen. Hierdurch wird ein Zusammenfallen von Strukturen während des Trocknungsprozesses verhindert. Die abgebildeten Rods erscheinen hier ebenfalls abgeflacht. Dies ist in Abb. 3.3.16 dargestellt.

Es kann aus den beschriebenen Beobachtungen gefolgert werden, daß der Rod abgeflacht ist, mit einer Höhe von ca. 20 nm und einer Breite von ca. 80 nm. Der Rod kann gebogen sein, die Biegung erfolgt stets entlang der schmalen Kante. Es ist eine Verdrehung des Rod um ca. 90° möglich. Abb. 3.3.17 verdeutlicht die möglichen Verbiegungen und Verdrehungen an einer Schemazeichnung.

3.3.2.4 Die Anwesenheit von NaCl sowie die Art des elektronenmikroskopischen Trägermaterials spielen eine Rolle bei der Präparation der Rods

Bei der Präparation von Rods für die Elektronenmikroskopie wurde der 1 %igen TX-100-Lösung NaCl in einer Endkonzentration von 1 M zugegeben. Die Präparationen erfolgten standardmäßig auf kohlebedampften Formvar-Nickelgrids. Die Methode war der TX-100-Fraktionierung angelehnt, nach welcher J. Regula Zellextrakte von *M. pneumoniae* aufgrund unterschiedlicher TX-100-Löslichkeit der Komponenten fraktionierte (REGULA, 1999). Hiernach wurden zwei Präparationsschritte nacheinandergeschaltet. Der erste Schritt war eine „Low-Triton“-Behandlung mit 0,2 % TX-100, welchem ein zweiter Schritt mit 1 % TX-100 / 1 M NaCl

Experimente und Ergebnisse

nachgeschaltet war (siehe Kap. 2.8.1.1). Um den Einfluß von Gridoberfläche und NaCl-Anwesenheit in der TX-100-Lösung zu testen, wurden vergleichend Präparationen auf reinen Formvar-Grids sowie ohne Zugabe von NaCl durchgeführt und untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 3.3.18 dargestellt. Bild a zeigt ein dicht bewachsenes Kohle-Formvar-Grid vor der TX-100-Behandlung. In Bild b ist das Ergebnis der „Low-Triton“-Behandlung gezeigt. Die Rods sind hier schon teilweise erkennbar (Pfeile), jedoch ist noch viel sonstiges Zellmaterial vorhanden. Bild c zeigt das Ergebnis der TX-100-Behandlung ohne Zusatz von NaCl, für Bild d wurde die TX-100-Behandlung mit Zusatz von 1 M NaCl durchgeführt. Das Inset in Bild c zeigt den eingerahmten Bereich aus Bild c in Detaillansicht. Eine Detaillansicht von Rods, welche mit Zusatz von 1 M NaCl präpariert wurden, ist in Bild f gezeigt. Im Vergleich des Insets aus Bild c mit Bild f wird der Effekt des NaCl bei der TX-100-Behandlung deutlich: Die Rods welche unter Zusatz von NaCl präpariert wurden, weisen deutlich weniger anhaftendes Zellmaterial auf, die Negativkontrastierungslösung konnte besser in die Konturen eindringen.

Die TX-100-Behandlung mit Zusatz von 1 M NaCl wurde in gleicher Weise auf Formvar-Grids durchgeführt, welche nicht kohlebedampft waren. Das Ergebnis dieser TX-100-Behandlung ist in Bild e dargestellt. Es sind Rods erkennbar (Pfeile), diese sind jedoch noch stark mit restlichem Zellmaterial behaftet. Insgesamt ist deutlich weniger Material bei der TX-100-Behandlung haften geblieben, sowohl Rods als auch sonstige Zellreste betreffend.

Die saubersten und effektivsten Rod-Präparationen wurden auf kohlebedampften Formvar-Grids unter Zugabe von 1 M NaCl in der TX-100-Lösung erzielt.

Bei der Präparation von Cytoskelettkomponenten aus Spiroplasma konnte eine ähnliche Abhängigkeit der Sauberkeit der Präparation von der Anwesenheit von 1 M Kochsalz im Lysepuffer beobachtet werden (TOWNSEND et al., 1980).

3.3.2.5 Der Rod weist ein charakteristisches Querlinienmuster auf

Rods, welche angelehnt an die Zellfraktionierungsmethode von REGULA (1999) präpariert wurden und somit sehr effektiv von anhaftendem Zellmaterial befreit sind, weisen ein wiederkehrendes Querstreifenmuster auf. Abb. 3.3.19 zeigt einen Vergleich von mehreren auf diese Weise präparierten Rods. Links im Bild sind sechs

Experimente und Ergebnisse

Abbildungen des Rod so untereinander montiert, daß bei allen Exemplaren erkennbare Querlinien untereinander zu liegen kommen. Das in der Abbildung nach links orientierte Ende unterscheidet sich zunächst bei allen Rods in einer Hinsicht deutlich vom rechten Ende: Es erscheint glatt, während das rechte Ende stets faserig ist und keine wiederkehrenden Charakteristika erkennen läßt. Die 6 Bilder wurden demnach nach der Orientierung der Enden des Rod gleich ausgerichtet. Das Querlinienmuster kann nun verglichen werden. Es zeigen sich Linien, die in allen gezeigten Exemplaren des Rod vorkommen. Über und rechts neben den einzelnen Bildern sind die im jeweiligen Exemplar deutlichen Linien schematisch wiedergegeben. In der rechten Bildhälfte sind diese Linienmuster so übereinander montiert, daß die linken Linien, welche den jeweiligen äußeren linken Ende des jeweiligen Rod entsprechen, übereinander liegen. Es wird hierbei deutlich, daß die in der Abfolge nach rechts nächsten zwei Linien in fast allen gezeigten Rods als Doppellinie vorkommen. Weiter rechts ist ein Bereich, in welchem bei den meisten Rods ebenfalls eine deutliche Linie erkennbar ist. Durch Verzug der elektronenmikroskopischen Trägerfolie bei Einwirkung des Elektronenstrahls kann es zu Dehnungen von Objekten kommen. Daher ist es möglich, daß ein im Objekt konstantes Linienmuster nicht über den gesamten Bereich der Abbildungen übereinstimmt. Die Linien, welche bei dem Vergleich der einzelnen erhaltenen Muster als charakteristisch beurteilt wurden, sind in der Abbildung rot wiedergegeben. Eine Zuordnung der Enden auf diese Weise freipräparierter Rods in distales und proximales Ende sind aufgrund dieses Musters nicht direkt möglich, kann aber aus weiteren Erkenntnissen abgeleitet werden (s.u.).

3.3.2.6 Der Rod kann eine Längsspaltung durchmachen, welche stets am distalen Ende beginnt

An fixierten Zellen, welche anschließend mit TX-100 behandelt wurden, sowie an Ultradünnschnitten kann der Rod in seiner natürlichen Lage in der Zelle abgebildet werden (s.o.). Eine Sonderform des Rod, welche in beiden genannten Präparationen vereinzelt beobachtet werden konnte, soll hier beschrieben werden.

Abb. 3.3.20 zeigt Tips von *M. pneumoniae*; die Zellen wurden fixiert und anschließend mit TX-100 behandelt. Durch die Behandlung wurden die Zellen für den

Elektronenstrahl durchscheinend, und der Rod ist damit im Tip sichtbar. Es sind hier einige Exemplare der beobachteten Sonderform des Rod abgebildet. Der Rod liegt in Längsrichtung gespalten vor, wobei die Spaltung stets am distalen Ende des Rod beginnt und die beiden entstandenen Hälften des Rod am proximalen Ende zusammenhängen. Bild a zeigt zwei nebeneinanderliegende Tips, von denen einer einen gespaltenen Rod und einer einen nicht gespaltenen Rod aufweist. Bild b und c zeigen jeweils einen Tip mit einem gespaltenen Rod.

Die beobachteten Sonderformen des Rod lassen sich in jeder Probe vereinzelt beobachten, wobei sie grundsätzlich seltener vorkommen als die ungespaltene Form. Die Spaltung liegt immer nur in der hier beschriebenen Orientierung vor, eine Spaltung mit Öffnung am proximalen Ende konnte nicht beobachtet werden.

3.3.2.7 Aufgrund der Längsspaltung können bei freipräparierten Rods das distale und proximale Ende am Querlinienmuster unterschieden werden

Gespaltene Exemplare des Rod können nicht nur an Proben beobachtet werden, welche nach der modifiziert TX-100-Behandlung präpariert wurden, sondern auch in Präparationen nach der Methode von J. Regula, bei welcher der TX-100-Behandlung keine chemische Fixierung vorausgeht (REGULA, 1999). Abb. 3.3.21 zeigt zwei gespaltene Rods aus einer solchen Präparation. Die Rods sind im Bild zur rechten Seite hin gespalten, an der linken Seite sind die beiden Hälften jeweils miteinander verbunden. Die roten Linien verdeutlichen diejenigen Querlinien, welche sich bei auf die gleiche Art präparierten Rods im Vergleich mehrerer Exemplare als charakteristisch herausgestellt haben (siehe Abb. 3.3.19). Die Linien sind auch an den gespaltenen Rods wiederzufinden. Auch können die beiden Enden des Rod unterschieden werden: Es sind deutlich ein glattes und ein faseriges Ende erkennbar. Dies ist auch bei ungespaltenen Rods der Fall. Die Ausrichtung des charakteristischen Querlinienmusters stimmt mit der Orientierung der verschiedenen Enden überein.

Aufgrund der Erkenntnis, daß eine Spaltung des Rod in der Zelle grundsätzlich am distalen Ende beginnt, können hier aufgrund des Querlinienmusters und der Unterschiedlichkeit der Enden das proximale und das distale Ende bei freipräparierten Rods erkannt werden. Das proximale Ende ist demnach in der Abbildung jeweils nach

links orientiert, das distale Ende nach rechts. Voraussetzung für die Unterscheidung der Enden ist ein Erkennen der Unterschiedlichkeit der Enden und /oder des Querlinienmusters.

3.3.2.8 Der Rod erscheint als ein Gebilde aus parallelen Längsfasern, welche Verdickungen zeigen, die nebeneinanderliegend die Querlinien des Rod bilden

Der Rod kann eine Längsspaltung erfahren (s.o.). Dies impliziert einen Aufbau des Rod aus längsorientierten parallelen Einheiten, welche sich voneinander trennen können. In Präparationen nach REGULA (1999), bei welchen wenig Zellmaterial an den Rods haften blieb, können in negativkontrastierten Proben Rods beobachtet werden, bei welchen eine Längsfaserung erkennbar ist. Abb. 3.3.22 zeigt solche Exemplare des Rod. In Bild a sind parallele Fasern entlang der Längsachse des Rod sichtbar (Pfeile). Diese Fasern weisen jeweils Verdickungen auf, welche innerhalb des Rod nebeneinanderliegen (schwarzer Kasten) und somit den Eindruck einer Querlinie hervorrufen.

Das proximale Ende des Rod kann anhand der beiden charakteristischen Querlinien (schwarze Pfeile) und seiner glatten Erscheinung vom distalen Ende unterschieden werden. Es ist im Bild nach links orientiert. Bild b zeigt eine partielle Spaltung des Rod. Die Zuordnung von proximalem und distalem Ende erfolgte hier in erster Linie anhand der Beschaffenheit der Enden: Das glattere Ende (proximal) ist nach links orientiert. Die in Bild a erkennbaren Querlinien (schwarze Pfeile) sind in Bild b weniger deutlich, aber doch erkennbar (schwarze Pfeile). Vom linken (proximalen) Ende des Rod hat sich hier in Längsrichtung ein Anteil des Rod bis ca. zur Mitte des Rod hin abgespalten. Diese Abspaltung erfolgte in diesem Fall nicht, wie bei den zuvor beschriebenen Längsspaltungen (siehe Kap. 3.3.2.7) des Rod, vom distalen Ende her, sondern vom proximalen Ende. Ein weiterer Unterschied zu den zuvor beschriebenen Längsspaltungen ist, daß die Spaltung nicht entlang des gesamten Rod verläuft und daß es sich nicht um eine Spaltung in gleiche Hälften handelt. Es ist hier nur ein Anteil des Rod abgespalten, welcher deutlich schmaler erscheint als der übrige Teil des Rod. Solche Fälle konnten bei Längsspaltungen des Rod in der Zelle (siehe Kap. 3.3.2.6) nicht beobachtet werden. Demnach ist davon auszugehen, daß es sich in

diesem Fall um einen präparationsbedingten Zerfall des Rod in seine längsorientierten Bestandteile handelt.

3.3.2.9 Der Rod ist am proximalen Ende an eine Rad-ähnliche Struktur assoziiert

Am proximalen Ende des Rod ist in verschiedenen Präparationen eine definierte Struktur zu erkennen. Sie erscheint als Aneinanderreihung von Massen. An Kryo-Ultradünnschnitten sowie TX-100-Präparationen kann die Struktur als radförmig erkannt werden. Abb. 3.3.23 zeigt eine Einzelzelle, welche nach Fixierung mit TX-100 behandelt wurde. Die Zelle wurde durch die Behandlung transparent für den Elektronenstrahl, und der Rod ist im Tip erkennbar. Am proximalen Ende des Rod sieht man eine gebogene Reihe von Massen, welche aufgrund der Negativkontrastierung hell vor dunklem Hintergrund erscheinen. Dieser Bereich ist im Inset in höherer Vergrößerung dargestellt. Man erkennt zwei nebeneinanderliegende Reihen von Massen. Die Lage dieser Doppelreihe ist im Bild durch Pfeile verdeutlicht.

Durch Kryo-Ultradünnschnitt-Technik konnten entsprechende Ansichten auf den Rod und mit ihm assoziierte Strukturen gewonnen werden. Kryo-Ultradünnschnitt-Technik erlaubt einen Einblick in das Innere von Zellen bei größtmöglichem Strukturerehalt, da keine Entwässerung der Proben erfolgt, welche bei herkömmlicher Ultradünnschnitt-Technik zu Artefakten führen kann. In Abb. 3.3.24 a ist am proximalen Ende des Rod eine Doppelreihe von Massen zu erkennen, welche der in fixierten und anschließend TX-100-behandelten Zellen abgebildeten Struktur ähnelt (siehe Abb. 3.3.23). Der Kontrast erscheint hier umgekehrt als bei der Negativkontrastierungs-Methode, die Massen erscheinen dunkel vor hellem Hintergrund, während es sich in der Abb. 3.3.23 umgekehrt verhält. Dies rührt daher, daß die Kontrastierungslösung bei der Kontrastierung von Dünnschnitten den Schnitt infiltriert und sich am biologischen Material anlagert, wobei Stellen mit weniger oder keinem biologischem Material weniger Kontrastmittel annehmen. In Dünnschnitten erscheinen Objekte daher im Positivkontrast mit dunklen Massen vor hellem Hintergrund.

Abb. 3.3.25 zeigt Beispiele von Rods, welche nach REGULA (1999) präpariert wurden. Diese Präparationen unterschieden sich, trotz gleichartiger Behandlung, stets

in der Menge noch an den Rods haften gebliebenen Zellmaterials. In Präparationen, bei welchen relativ viel Zellmaterial an den Rods zurückgeblieben war, konnte an einem Ende der Rods eine radähnliche Struktur abgebildet werden, welche in ihren Ausmaßen der auch in Kryo-Ultradünnschnitten (s.u.) und TX-100-Präparationen mit vorheriger Fixierung der Zellen beobachteten Struktur ähnelt. Diese Struktur erschien in verschiedenen Formen, welche bei Annahme eines geschlossenen Rades durch verschiedene Projektionen zustande kommen können. Die Abbildung zeigt zunächst exemplarisch ein Original-EM-Foto, auf welchem ein gespaltener Rod zu sehen ist. Anhand der Spaltung sind proximales und distales Ende unterscheidbar, das proximale Ende ist im Bild nach links orientiert. An diesem Ende ist ein geschlossener ovaler Ring zu erkennen, welcher mit dem Ende des Rod verbunden zu sein scheint. Dies ist die Form, die sich bei einer Schrägansicht auf eine radähnliche Struktur ergibt. Links neben dem original-EM-Foto ist der darin markierte Bereich in bearbeiteter Form dargestellt. Es wurden hier durch Weichzeichnung, Hochpaßfilterung und starke Kontrasterhöhung Bereiche ab einer bestimmten Helligkeitsstufe vor dunklem Hintergrund abgebildet. Hierbei wurden alle Filterungen gleichsam auf den gesamten gezeigten Bildausschnitt angewendet, sodaß keine selektive Zufügung oder Kaschierung von einzelnen Bildelementen zustande kommen konnte. Auf ebensolche Art bearbeitete Ausschnitte aus ähnlichen Bildern sind unten in der Abbildung dargestellt. Man erkennt hier verschiedene Projektionen der radähnlichen Struktur. Bilder 1 und 2 stellen Schrägansichten dar, während die Bilder 3 bis 6 jeweils Seitenansichten zeigen.

3.3.2.10 Lateral befinden sich am Rod periodisch angeordnete Linker zum peripheren Cytoskelett

Der Rod ist stets im äußersten Ende eines Zellausläufers lokalisiert. Dies legt die Vermutung nahe, daß der Rod in dieser Position in irgendeiner Weise mechanisch stabilisiert ist. Diese Stabilisierung könnte durch eine Verbindung zum peripheren Cytoskelett gewährleistet sein. Durch verschiedene Präparationstechniken konnten in dieser Arbeit seitlich am Rod periodisch parallel angeordnete Massen abgebildet werden, welche Linker zwischen dem Rod und dem peripheren Cytoskelett darstellen könnten. Abb. 3.3.26 zeigt einen längs durch den Tip mit darinliegendem Rod

geführten Ultradünnschnitt. Die Cytoplasmamembran wurde vor der Einbettung durch modifizierte TX-100-Behandlung (siehe Kap. 2.8.1.2) von den Zellen entfernt. Der Rod ist im Tip erkennbar. Um den Rod ist eine Hüllschicht sichtbar, welche das periphere Cytoskelett darstellen könnte, da die Cytoplasmamembran entfernt wurde. Zwischen dem Rod und der Hüllschicht sind periodisch angeordnete Linker zu sehen, welche den ansonsten leer erscheinenden Raum zwischen Rod und Hüllschicht durchspannen. Zur Hervorhebung von Strukturen wurde hier der Kontrast des in Bild a dargestellten EM-Fotos soweit erhöht, daß die dunkelsten (=massivsten) Bereiche allein vor hellem Hintergrund abgebildet wurden; dies ist in Bild b dargestellt. Bild c zeigt die Projektion von b auf a, um die hervorgehobenen Strukturen aus b in den Zusammenhang des Originalbildes einzufügen. Man erkennt in Bild c lateral am Rod (R) periodisch angeordnete, vom Rod abstehende Massen, welche bis an die Zellhülle heranragen (Pfeile). Diese Massen sind auch in Abb. 3.3.24 dargestellt. Bild b zeigt Bild a nach ebensolcher Bearbeitung wie sie für Abb. 3.3.26 beschrieben wurde. Lateral am Rod sind parallele längliche Massen zu sehen, die den Raum zwischen Rod und Zellhülle durchspannen (Pfeile).

In längsgeführten Kryo-Ultradünnschnitten kann man periodisch angeordnete Massen neben dem Rod insbesondere dort erkennen, wo der Rod in breitem Anschnitt erscheint. Dies wird in Abb. 3.3.14 deutlich. In Querschnitten durch den Tip mit darinliegendem Rod können diese Massen ebenfalls abgebildet werden. Sie erscheinen auch im Querschnitt in periodischer Anordnung und sind um den Rod herum angeordnet. Sie ragen an den schmalen Seiten des Rod bis an die Innenseite der Zellhülle, wo sie demnach eine Verbindung zwischen Rod und peripherem Cytoskelett darstellen könnten.

3.3.2.11 Der Rod ist mit Filamenten assoziiert

In TX-100-Präparationen konnten Filamente abgebildet werden, welche mit Rods verbunden waren. Die Filamente (Pfeile) unterscheiden sich untereinander vom Erscheinungsbild nicht. Sie entspringen zumeist zu mehreren an einem Ende eines Rod, vereinzelt auch zusätzlich seitlich und am gegenüberliegenden Ende des Rod. Abb. 3.3.27 zeigt hierzu einige Beispiele. In Bild a sieht man am im Bild rechten Ende des Rod einige parallele Filamente entspringen, am linken Ende ist ein Filament

erkennbar (Pfeile). Ein Filament scheint seitlich vom Rod zu entspringen (Sternchen), es liegt zunächst parallel zum Rod und verläuft dann in gebogener Form vom Rod wegweisend (Ende des Filaments: rechter unterer Pfeil). In Bild b sieht man ein deutlich dem im Bild linken Ende des Rod zugehöriges und mehrere seitlich am Rod ansitzende Filamente. Bild c zeigt zwei Rods, an welchen deutlich eine größere Zahl Filamente an einem Ende entspringen. Das am im Bild rechten Rod anhaftende Material (eingekreist) könnte aus vielen gehäuft liegenden Filamenten bestehen, da hier einige der sichtbaren Filamente zu entspringen scheinen.

3.3.2.12 Am äußersten Ende des Tip befinden sich periodisch angeordnete Massen

M. pneumoniae-Zellen, welche nicht mit Glutaraldehyd, sondern stattdessen mit Formaldehyd fixiert wurden, zeigen nach einigen Tagen bis Wochen der Lagerung in der Fixierlösung bei 4 °C Zerfallserscheinungen, welche bei glutaraldehydfixierten Zellen nicht zu beobachten sind. Die Cytoplasmamembran ist bei reiner Formaldehydfixierung nicht stabil, sie kann elektronenmikroskopisch nur noch bedingt abgebildet werden. Im Bereich des Tip zeigen sich bei formaldehydfixierten Zellen nach Lagerung periodisch angeordnete Massen am distalen Ende des Tip. Diese liegen im Bereich der Cytoplasmamembran. Eine direkte Verbindung mit dem Rod kann nicht erkannt werden. Vereinzelt können vergleichbare Massen an Ultradünnschnitten von Zellen, deren Cytoplasmamembran durch TX-100-Behandlung nach Glutaraldehydfixierung entfernt wurde, beobachtet werden. Abb. 3.3.28 zeigt Tips von für zwei Wochen bei 4 °C in 3,7%-iger Formaldehydlösung gelagerten *M. pneumoniae*-Zellen (Bilder a-d), sowie einen längsgeführten Ultradünnschnitt durch den Tip einer glutaraldehydfixierten und anschließend TX-100-behandelten Zelle (Bild e). Bild c ist eine Ausschnittsvergrößerung aus a, die Bilder b und d zeigen den gleichen Bereich bei anderen Zellen. Die außen an der Spitze des Tip ansitzenden, periodisch angeordneten Massen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

3.3.2.13 Modell des Rod

Abb. 3.3.29 verdeutlicht die bisher beschriebenen Beobachtungen zur Struktur des Rod in einer Schemazeichnung. Bild a zeigt eine Gesamtansicht des Tip mit darinliegendem Rod. Der Rod (grün) ist abgeflacht und hier in Aufsicht auf die breite Seite dargestellt. Der Rod ist umgeben von an ihm ansitzenden periodisch angeordneten länglichen Massen (grau), welche an den schmalen Kanten des Rod bis an die Innenseite der Zellhülle ragen und hier als Linker zwischen Rod und peripherem Cytoskelett fungieren. Der Rod weist am distalen Ende eine deutliche Verdickung auf (orange). Am proximalen Ende des Rod befindet sich ein aus periodisch angeordneten Untereinheiten aufgebautes Rad (gelb). In diesem Bereich entspringen Filamente (blau), die zum Zellkörper (nicht gezeigt) hin orientiert liegen. Bild b zeigt links den Rod ohne weitere in a dargestellte Elemente. Er ist abgeflacht und besteht aus parallel angeordneten Längsfasern. Der Rod zeigt an seiner breiten Seite ein Querlinienmuster. Dieses entsteht durch Verdickungen entlang der Längsfasern. Diese Verdickungen kommen an jeder Längsfaser in gleicher Abfolge vor und kommen daher entlang des Rod jeweils nebeneinander zu liegen und bilden somit optisch Querlinien. Rechts im Bild sind einzelne Längsfasern mit Verdickungen dargestellt. Es sind hier nur diejenigen Verdickungen gezeigt, welche den besonders charakteristisch erscheinenden Querlinien entsprechen; die Darstellung der Verdickungen erhebt damit keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Bild c zeigt das Erscheinungsbild eines Längsschnittes durch den Tip mit schmalen Anschnitt des Rod, Bild d das eines Längsschnittes mit breitem Anschnitt des Rod. Das Rad am proximalen Ende erscheint in beiden Schnitten jeweils als Teilanschnitt, da sein Durchmesser ca. der Schnittdicke entspricht. Beim schmalen Anschnitt des Rod sind seitlich des Rod deutlich masselose Bereiche zwischen Rod und Zellhülle erkennbar. In Bild e ist das nach diesem Modell zu erwartende Erscheinungsbild von Querschnitten durch den Tip in Höhe des Rods dargestellt. Der Schnitt kann wie bei Längsschnitten auch hier in verschiedenen Richtungen bezüglich der schmalen und breiten Kante des Rod erfolgen, führt aber in allen Fällen zum gleichen Erscheinungsbild. Der Rod erscheint flach mit einem Ring aus ihn umgebenden Massen, welche an den schmalen Kanten des Rod bis zur Zellhülle ragen. An den breiten Seiten des Rod befindet sich zur Zellhülle hin jeweils ein masseloser Bereich.

3.3.3 Immunelektronenmikroskopie

Über Immun-Goldmarkierungen sollten mittels Einsatzes verschiedener Antiseren gegen Proteine von *M. pneumoniae* Aussagen über die Lokalisation von Proteinen in den Zellen getroffen werden. Es wurden Markierungsexperimente mit verschiedenen Präparationen von *M. pneumoniae*-Zellen durchgeführt. Die verwendeten Antiseren sind in Tabelle 4. aufgeführt.

Tabelle 4: Für die Immunelektronenmikroskopie verwendete Antiseren

Serum	Nummer #
anti-P1	45790
anti -HMW 1	84267
anti -HMW 2	MX 94
anti -P01_orf1033	41804
anti -FtsZ	28084
anti -EF-Tu	AIR8
anti -TX-100	60631
unlösl. Fraktion	

3.3.3.1 Markierungen mit Serum gegen HMW1

Mit Serum gegen HMW1 konnten Markierungen an Ultradünnschnitten an Enden von Zellausläufern erzielt werden. Die Goldpartikel waren hierbei zum Teil in Linien angeordnet (siehe Abb. 3.3.30). An TX-100-Präparationen nach REGULA (1999) konnten Signale an Rods beobachtet werden. Dies war nur der Fall, wenn nach der Präparation noch Zellmaterial an den Rods zurückgeblieben war. Besonders sauber präparierte Rods konnten mit Serum gegen HMW1 nicht markiert werden. Abb. 3.3.31 zeigt Markierungen an TX-100-Präparationen. In Bild a erkennt man seitlich am Rod anhaftendes Material, welches mit Goldpartikeln dekoriert ist. Diese sind in parallelen Reihen angeordnet. Bild b zeigt beidseitig am Rod anhaftendes, mit Goldpartikeln dekoriertes Material (eingekreist). In Bild c kann am im Bild nach unten orientierten Ende des Rod die radartige Struktur erkannt werden, welche vereinzelt bei TX-100-Präparationen am Rod beobachtet werden konnte (siehe Kap. 3.3.2). Der Rod selbst ist stark mit Zellmaterial behaftet und deutlich mit

Experimente und Ergebnisse

Goldpartikeln markiert, am Rod ist hingegen keine Markierung sichtbar. Bild d zeigt reihenförmig über die Rods verlaufende Signale.

Die Qualität der TX-100-Präparationen war trotz vermeintlich konstanter Bedingungen von Präparation zu Präparation uneinheitlich, was die Menge von an den Rods anhaftendem Zellmaterial betrifft. So ergaben sich auch in Präparationen mit viel anhaftendem Zellmaterial stets einige saubere Bereiche. Abb. 3.3.32 zeigt eine Übersicht eines Markierungsexperimentes an einer TX-100-Präparation, bei welcher Zellmaterial an den Rods haften geblieben ist. An den Rods anhaftendes Material ist markiert, die Markierungen verlaufen auch hier teilweise reihenförmig (Pfeile). Der im Bild eingekreiste Bereich ist besonders sauber, die Rods sind kaum mit Material behaftet. In diesem Bereich ergibt sich keine Markierung mit Goldpartikeln.

Insgesamt weisen die erzielten Ergebnisse aus den Markierungsexperimenten mit Serum gegen HMW1 darauf hin, daß weder der Rod selber, noch die radartige, am proximalen Ende des Rod beobachtete Struktur HMW1 beinhaltet. HMW1 scheint jedoch mit dem Rod eng benachbart zu liegen, da anhaftendes Zellmaterial an den Rods markiert werden konnte. Die reihenförmigen, teilweise in parallelen Linien verlaufenden Signale weisen auf eine dementsprechende Verteilung von HMW1 hin. Durch die TX-100-Behandlung entspricht die Lage von noch an den Rods anhaftenden Zellbestandteilen nicht mehr der originalen Lage dieser Bestandteile in der Zelle; Substrukturen wie Filamente können noch erhalten sein (MENG & PFISTER, 1980). Dementsprechend könnten sich die in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Linker, welche am Rod ansitzen, nach der TX-100-Behandlung teilweise noch am Rod befinden, aber sich in ihrer Position und Ausrichtung von der ursprünglichen Lage in der Zelle unterscheiden. Auf diese Weise könnten schräg über den Rod verlaufende Signale zustande kommen, wenn Linker bei der Präparation in Schräglage auf dem Rod zu liegen kommen und das HMW1-Antiserum mit diesen reagiert. Lateral vom Rod wegweisende linienförmige Signale könnten von Linkern herrühren, welche noch ungefähr in ihrer ursprünglichen Lage verblieben sind.

3.3.3.2 Markierungen mit Serum gegen HMW2

HMW2 wird aufgrund der vorhergesagten ausgedehnten coiled-coil-Bereiche und der Fähigkeit zur Dimerisierung eine strukturelle Funktion zugeschrieben (KRAUSE et al., 1997). Die Expression von HMW2 als Fusionsprotein mit GFP ergab Signale im Tip-Bereich (BALISH et al., 2003).

In dieser Arbeit konnte bei Markierungsexperimenten mit Serum gegen HMW2 an Ultradünnschnitten eine Reaktion im proximalen Bereich des Rods beobachtet werden, was in Abb. 3.3.33 dargestellt ist. An whole-mount-Präparationen konnten keine Signale mit HMW2-Antiseren beobachtet werden, weder bei Zellen mit intakter Cytoplasmamembran, noch an Zellen, deren Cytoplasmamembran entfernt wurde. Dies läßt vermuten, daß HMW2 nicht nach außen exponiert ist und auch nicht Teil des peripheren Cytoskeletts ist.

Die positive Reaktion ausschließlich im proximalen Bereich des Rod läßt eine teilweise Beteiligung von HMW2 am Aufbau des Rod vermuten oder aber eine Beteiligung am Aufbau der radähnlichen Struktur am proximalen Ende des Rod.

Bei Markierungsexperimenten an freipräparierten Rods konnte mit Serum gegen HMW2 keine positive Reaktion beobachtet werden. Dies spricht gegen HMW2 als Hauptkomponente des Rod, wie von BALISH et al. (2003) vorgeschlagen.

3.3.3.3 Markierungen mit Serum gegen P01_orf1033

Mit Serum gegen P01_orf1033 konnten Signale über die gesamte Zelloberfläche erzielt werden. Markierungen an Ultradünnschnitten zeigten kein Signal im Inneren der Zellen, lediglich deutliche Signale an der Zellperipherie. An Zellen, welche nach chemischer Fixierung mit TX-100 behandelt worden waren, konnte kein Signal erhalten werden. Es wurden Ultradünnschnitte von fixierten und anschließend mit TX-100 behandelten Zellen hergestellt und für Markierungen eingesetzt; bei diesen Präparaten konnte kein Signal an der Zellperipherie erzielt werden. Die Markierungen sind in Abb. 3.3.34 dargestellt. Die Bilder a-c zeigen Markierungen an whole-mount-Präparaten von fixierten, nicht mit TX-100 behandelten Zellen. Bild a und b zeigen jeweils Zellausläufer, in a ist der Rod im Ende des Zellausläufers zu sehen. Bild c zeigt eine aus einem Zellkörper mit einem Zellausläufer bestehende Einzelzelle. Es

sind jeweils Signale an der gesamten Zelloberfläche sichtbar. In Bild d ist das Ergebnis einer parallel durchgeführten Markierung an Zellen, welche nach der chemischen Fixierung mit TX-100 behandelt wurden, dargestellt. Es sind nur sehr vereinzelt Goldpartikel an den Zellen zu sehen; dieses Signal hebt sich nicht von dem des Hintergrundes ab. Es gibt demnach keine Reaktion von P01-Antiserum mit Zellen, von welchen die Cytoplasmamembran zuvor entfernt wurde.

Bild e-h zeigen jeweils Ultradünnschnitte. Bild f zeigt ein Präparat, bei welchem die Cytoplasmamembran von den Zellen vor der Einbettung durch oben genannte Methode entfernt wurde, die Bilder e, g und h zeigen Zellen mit intakter Cytoplasmamembran. In Bild f ist kein Signal an der Zellperipherie zu erkennen, während in den Bildern e, g und h die Reaktion des Serums mit der Zellperipherie deutlich wird. Das Serum reagiert ausschließlich mit der Zellperipherie, nicht mit dem Cytoplasma.

3.3.3.4 Markierungen mit Serum gegen FtsZ

FtsZ ist als Zellteilungsprotein bei Prokaryonten an der Septumbildung beteiligt und kann zu Protofilamenten und Ringen polymerisieren (ERICKSON et al., 1996, ERICKSON, 1997). In dieser Arbeit konnten an Ultradünnschnitten von *M. pneumoniae* vereinzelt ringförmig im Cytoplasma verlaufende Strukturen beobachtet werden, welche in Markierungsexperimenten eine Reaktion mit Serum gegen FtsZ zeigten. Auffällig sind häufig zu beobachtende, in kurzen, teilweise gebogenen Linien verlaufende Signale im Bereich der Zellperipherie und im Cytoplasma. Interessanterweise traten Signale im Cytoplasma nur in Zusammenhang mit einem zusätzlichen Signal an der Zellperipherie auf. Die Ergebnisse der Markierungsexperimente sind in Abb. 3.3.35 dargestellt. Die Bilder a-f zeigen die am häufigsten beobachtete Form von Signalen. Markiert wurden hier kurze Bereiche an der Zellperipherie, die Signale sind linienförmig und reichen teilweise von der Zellperipherie ins Cytoplasma. Die Bilder g-i zeigen Zellen, bei welchen ebenso wie in a-f lokal begrenzte Signale an der Zellperipherie sichtbar sind. Zusätzlich treten hier lokale Signale im Cytoplasma auf. Die cytoplasmatischen Signale sind in den Bildern g-i gekennzeichnet. Die Bilder j-k zeigen Zellen, bei welchen ein ringförmiger Bereich markiert wurde, welcher teilweise an die Zellperipherie angrenzt und ansonsten im cytoplasmatischen Bereich der Zelle verläuft.

Insgesamt lassen die beobachteten Signale den Schluß zu, daß FtsZ in *M. pneumoniae* nicht statistisch in der Zelle verteilt vorliegt. Die an Ultradünnschnitten beobachteten, in Zusammenhang mit einzelnen lokalen Signalen im Cytoplasma vorkommenden lokalen Signale an der Zellperipherie können durch eine ringförmige Anordnung von FtsZ in der Zelle zustande kommen. Ein möglicher FtsZ-Ring wäre demnach im Zellkörper lokalisiert und wäre zum Teil in Kontakt mit der Zellperipherie. Der Durchmesser eines solchen Ringes wäre bei den markierten Zellen stets kleiner als der Durchmesser des Zellkörpers.

Abb. 3.3.36 zeigt drei der in Abb. 3.3.35 dargestellten Ultradünnschnitte zur Verdeutlichung nochmals mit dazugehörigen Schemazeichnungen von der Lage eines möglichen angeschnittenen Ringes. Die Bilder a und b (siehe Abb. 3.3.35 g und h) zeigen die Lage von quergeschnittenen Ringen, Bild c die eines schräg angeschnittenen Ringes.

3.3.3.5 Markierungen mit Serum gegen EF-Tu

Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) ist an der Proteinbiosynthese beteiligt, indem es die Bindung von Aminoacyl-tRNA an Ribosomen katalysiert. Zudem konnten *in vitro* Polymerisationen von EF-Tu zu verschiedenenförmigen Filamenten beobachtet werden, was eine zusätzliche strukturelle Funktion von EF-Tu impliziert (Beck et al., 1978).

In Immun-Goldmarkierungen konnte in dieser Arbeit eine Abhängigkeit der Bindung von EF-Tu-Antiserum an *M. pneumoniae*-Zellen von der An- und Abwesenheit der Cytoplasmamembran nachgewiesen werden. So reagierte das Serum mit der Oberfläche von *M. pneumoniae*-Zellen im whole-mount-Präparat nur dann, wenn die Cytoplasmamembran vor der Markierung durch modifizierte TX-100-Behandlung (siehe Kap. 2.8.1.2) von den Zellen entfernt wurde. Serum gegen EF-Tu zeigt somit ein Bindeverhalten, welches in Bezug auf die An- und Abwesenheit der Cytoplasmamembran dem vom Serum gegen P01_orf1033 genau gegensätzlich ist. An Ultradünnschnitten konnte eine Bindung von Serum gegen EF-Tu sowohl im Cytoplasma als auch an der Zellperipherie beobachtet werden, unabhängig von der An- und Abwesenheit der Cytoplasmamembran. Auch konnte eine Bindung im Bereich des Tip an die Zellperipherie beobachtet werden.

Abb. 3.3.37 zeigt die Ergebnisse der Markierungsexperimente. In der oberen Hälfte der Abbildung (Bild a-f) sind Ultradünnschnitte dargestellt, unten (Bild g-j) whole-mount-Präparationen. Die Bilder a-c zeigen Zellen, deren Cytoplasmamembran vor der EM-Einbettung durch modifizierte TX-100-Behandlung entfernt wurde. In Bild a ist die Reaktion von EF-Tu-Antiserum mit der Zellperipherie im Bereich des Tip dargestellt (Pfeil). Die Bindung erfolgte hier an der nach der modifizierten TX-100-Behandlung neben dem Rod am Tip noch erkennbaren Zellhülle. In Bild b und c wird deutlich, daß die Bindung des Serums sowohl im Cytoplasma als auch an der Zellperipherie stattfindet. In den Bildern d-f sind Zellen ohne TX-100-Behandlung abgebildet. Die Bindung des Serums gegen EF-Tu erfolgt hier ebenfalls sowohl an der Zellperipherie als auch im Cytoplasma.

Die Bilder g-j zeigen jeweils whole-mount-Präparate. In Bild g ist eine Präparation ohne Einsatz von TX-100 dargestellt. Die Cytoplasmamembran ist als helle, die Zelle umgebende Linie zu erkennen. Es erfolgte keine Reaktion des Serums mit der Zelloberfläche. Nach Entfernen der Cytoplasmamembran durch modifizierte TX-100-Behandlung bindet das Serum gegen EF-Tu an den Zellen. Dies ist in den Bildern h-j dargestellt. Auffällig ist hier die teilweise reihenförmige Anordnung der Goldpartikel (Pfeile). Eine solche Form der Markierung konnte ansonsten nur bei Markierungsexperimenten an Rods mit Serum gegen HMW1 beobachtet werden.

3.3.3.6 Markierungen mit Serum gegen TX-100-unlösliche Fraktion

M. pneumoniae-Zellen wurden in 2% TX-100 gelöst und zentrifugiert, das Sediment diente als Antigen für die Herstellung des hier verwendeten Serums (PROFT, 1994).

Das Serum reagierte in Markierungsexperimenten mit dem Rod. An Ultradünnschnitten ergaben sich Signale an Längs- und Querschnitten des Rod. Nach der Methode von REGULA (1999) freipräparierte Rods wurden ebenfalls von dem Serum erkannt. Abb. 3.3.38 zeigt Ergebnisse der Markierungsexperimente. Bild a und b zeigen Rods, welche nach der Methode von REGULA (1999) präpariert wurden. Es sind Signale entlang des Rod erkennbar. Bild c-f zeigen längs durch den Tip mit darin liegendem Rod geführte Ultradünnschnitte. In Bild f ist der Anschnitt eines Zellkörpers (ZK) mit Tip und darinliegendem Rod gezeigt, sowie ein weiterer Anschnitt eines Zellkörpers. In Bild c-f sind jeweils Signale am Rod sichtbar. Bild f

verdeutlicht die Spezifität der Bindung des Serums an den Rod: Die Zellkörper weisen nur vereinzelte Signale an der Zellperipherie auf, während der Rod deutlich markiert ist. Die Bilder g-j zeigen jeweils quergeführte Ultradünnschnitte durch den Tip mit darinliegendem, markiertem Rod.

Es existiert somit ein Antiserum, welches den Rod sowohl im Schnitt als auch im freipräparierten Zustand erkennt. Um herauszufinden, welche Proteine dieses Serum in der TX-100-unlöslichen Fraktion bevorzugt erkennt, wurden Western-Blotanalysen durchgeführt (siehe Kapitel 3.4).

3.3.3.7 Markierungen mit Serum gegen P1

Das 169 kDa große P1-Protein ist beschreiben als am Tip lokalisiertes Hauptadhäsion von *M. pneumoniae* (Hu et al., 1982; BASEMAN et al., 1982; FELDNER et al., 1982). Mutanten, welche dieses Protein nicht exprimieren oder nicht am Tip lokalisieren können, sind Adhärenz-negativ (BASEMAN et al, 1982, KRAUSE et al, 1982).

Markierungen mit Serum gegen P1 ergaben Signale im Tip-Bereich. Die Signale wurden gleichermaßen bei Zellen mit und ohne Cytoplasmamembran beobachtet. Die Markierungen sind in Abb. 3.3.39 dargestellt. Bild a zeigt den Tip einer nicht mit TX-100 behandelten Zelle, Bild b den einer behandelten Zelle.

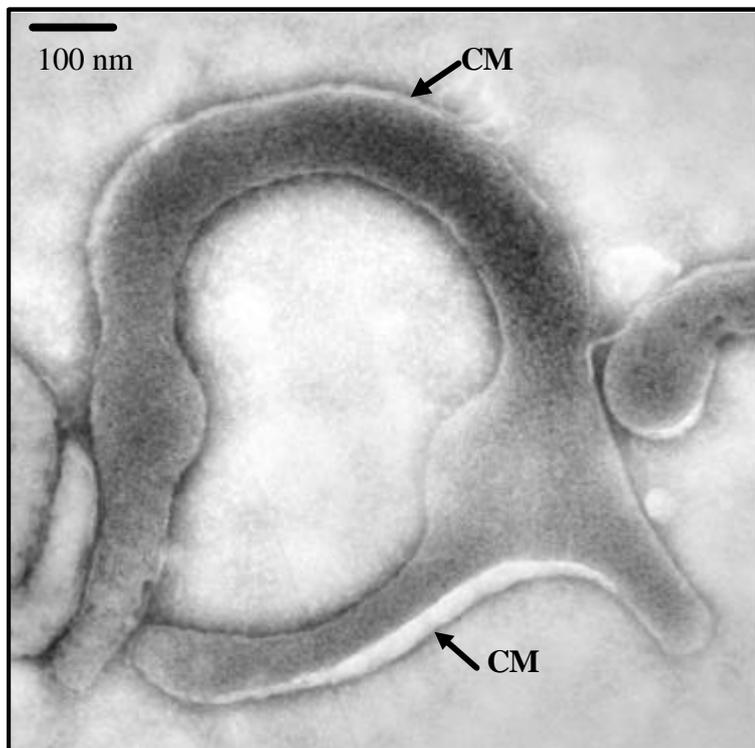


Abb. 3.3.1: *M. pneumoniae*-Zellen im Negativkontrast mit PWS. Die Cytoplasmamembran (CM) ist als helle, die Zellen umschließende Linie zu erkennen.

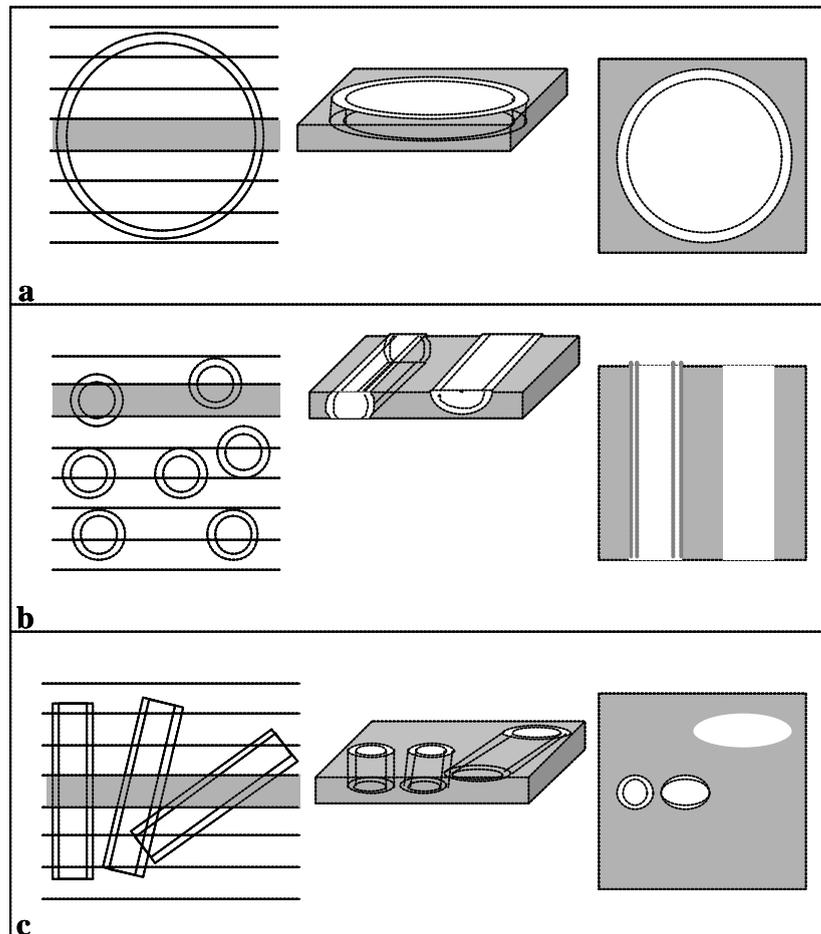


Abb. 3.3.2: Schematische Darstellung möglicher Anschnittrichtungen der Cytoplasmamembran. Jeweils links: theoretische Seitenansicht auf einen Schnittstapel bei ungefährender Schnittstärke von 70 nm, der grau hinterlegte Schnitt entspricht dem in der Mitte und rechts dargestellten. Jeweils Mitte: Theoretische Schräg-Aufsicht auf den links grau hinterlegten Schnitt. Jeweils rechts: Zu erwartendes Erscheinungsbild des in der Mitte dargestellten Schnittes im TEM. Die Doppellinien stellen die beiden Lipidschichten der Cytoplasmamembran dar. In den Darstellungen rechts ist die Doppellinie dort gezeigt, wo sie in der jeweiligen Anschnitt-Situation im TEM theoretisch sichtbar ist.

a: mittig angeschnittener Zellkörper, **b:** längsgeschnittene Zellausläufer, **c:** quer- und schräggeschnittene Zellausläufer.

Die Cytoplasmamembran ist nur dann im TEM als Doppellinie sichtbar, wenn die Lipiddoppelschicht längs zur Strahlrichtung orientiert ist.

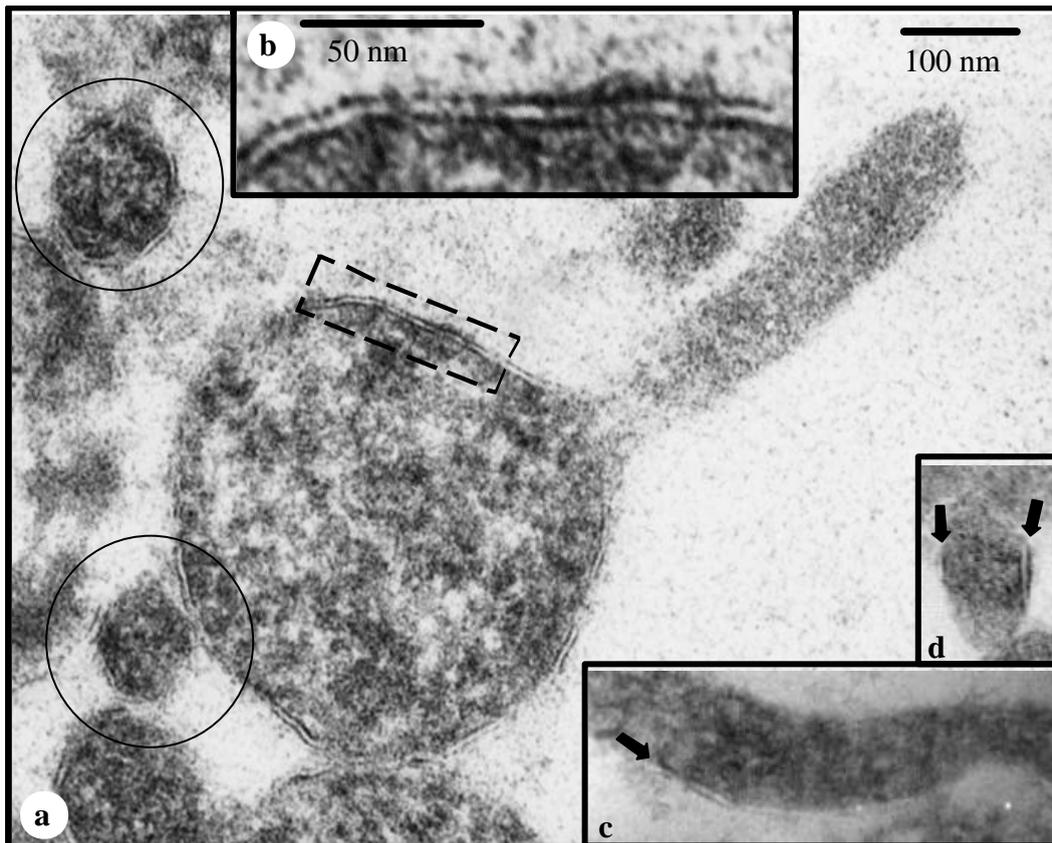


Abb. 3.3.3: Verschiedene Anschnittsituationen der Cytoplasmamembran von *Mycoplasma pneumoniae* im Ultradünnschnitt.

a: Mittig angeschnittener Zellkörper mit seitlich angeschnittenem Zellausläufer. Die Cytoplasmamembran ist nur am Zellkörper sichtbar.

Der gestrichelte Kasten ist in b in höherer Vergrößerung dargestellt. Eingezeichnet: Querschnittete Zellausläufer mit sichtbarer Cytoplasmamembran.

b: Vergrößerter Ausschnitt aus a.

c: Mittig längsgeschnittener Zellausläufer. Die Cytoplasmamembran ist in einigen Bereichen sichtbar (Pfeil).

d: Schräg angeschnittener Zellausläufer. Die Cytoplasmamembran ist nur an den Längsseiten sichtbar (Pfeile).

Der Größenstandard aus a gilt auch für d und c.

Erklärungen siehe Kap. 3.3.1

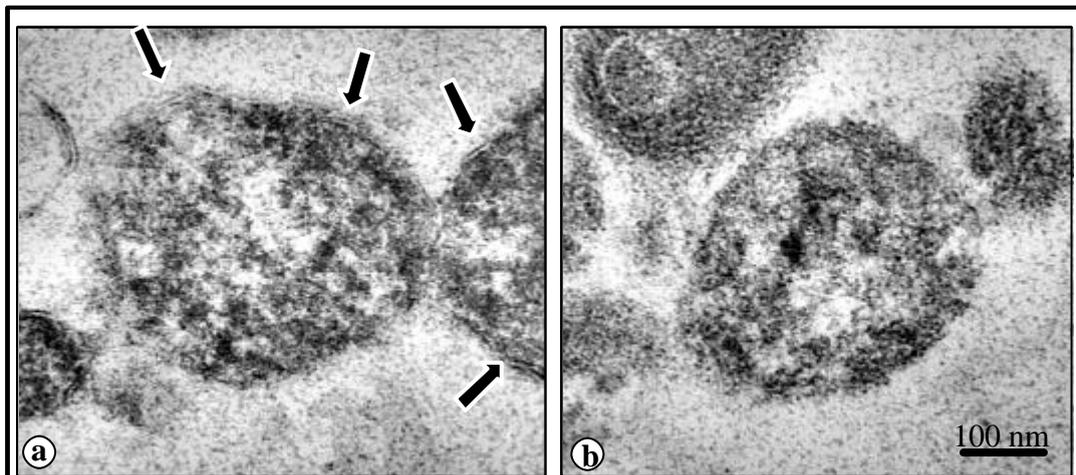


Abb. 3.3.4: Ablösung der Cytoplasmamembran von fixierten *M. pneumoniae*-Zellen durch TX-100-Behandlung, Ultradünnschnitte kontrastiert mit Bleicitrat / Uranylacetat. **a:** Kontrolle ohne TX-Behandlung. Die Cytoplasmamembran ist als Doppellinie erkennbar (Pfeile). **b:** TX-100-behandelte Zellen. Die Cytoplasmamembran fehlt.

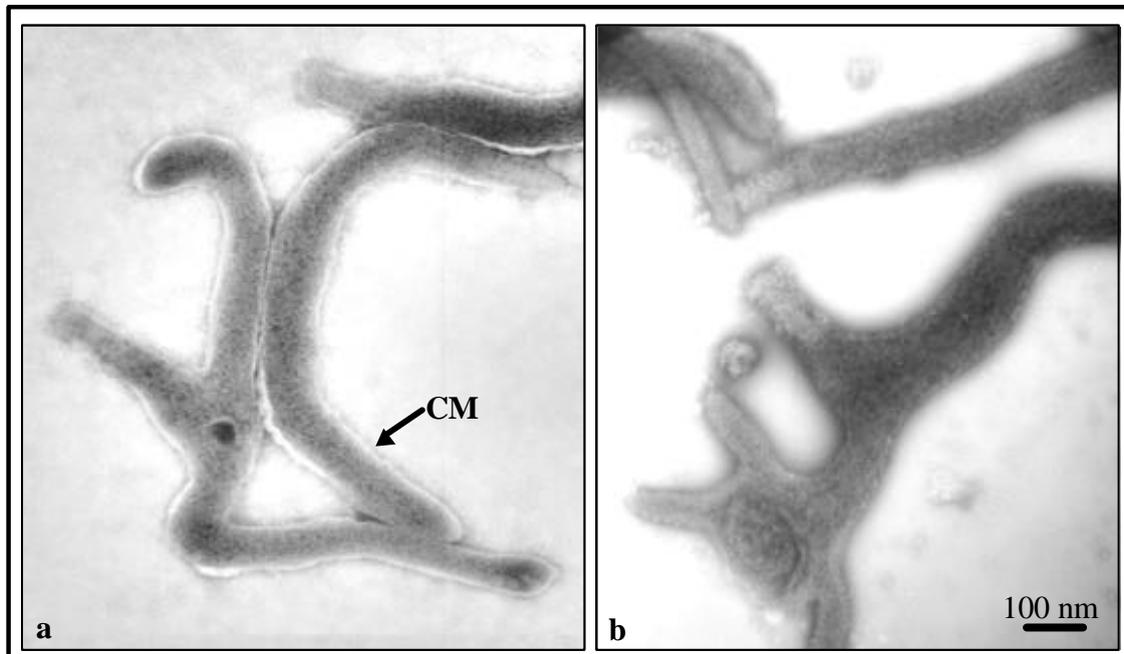


Abb. 3.3.5: *M. pneumoniae*-Zellen im Negativkontrast mit PWS. **a:** Zellen ohne TX-100-Behandlung, CM: Cytoplasmamembran. **b:** Zellen nach TX-100-Behandlung. Die Cytoplasmamembran ist nach TX-100-Behandlung nicht mehr vorhanden.

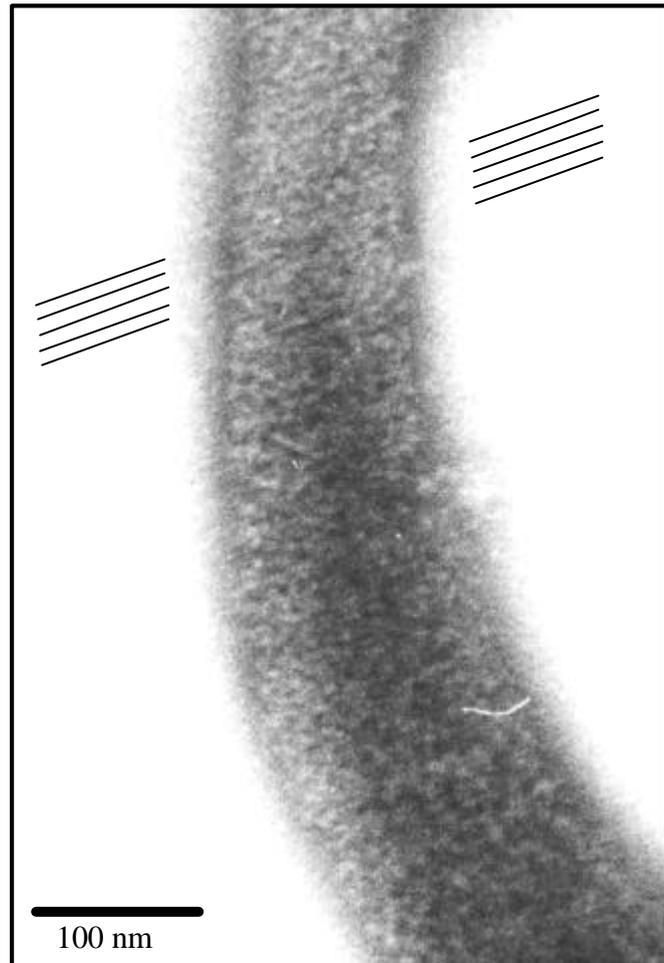


Abb. 3.3.6: Ausschnitt aus einem Zellausläufer einer fixierten und anschließend mit TX-100 behandelten *M. pneumoniae*-Zelle. Die Cytoplasmamembran ist nicht mehr vorhanden, dargestellt ist der direkte Blick auf die unter der Cytoplasmamembran gelegene Zellschicht. Es ist eine Schrägstreifung zu erkennen. Die Richtung der Streifung ist durch Linien verdeutlicht.

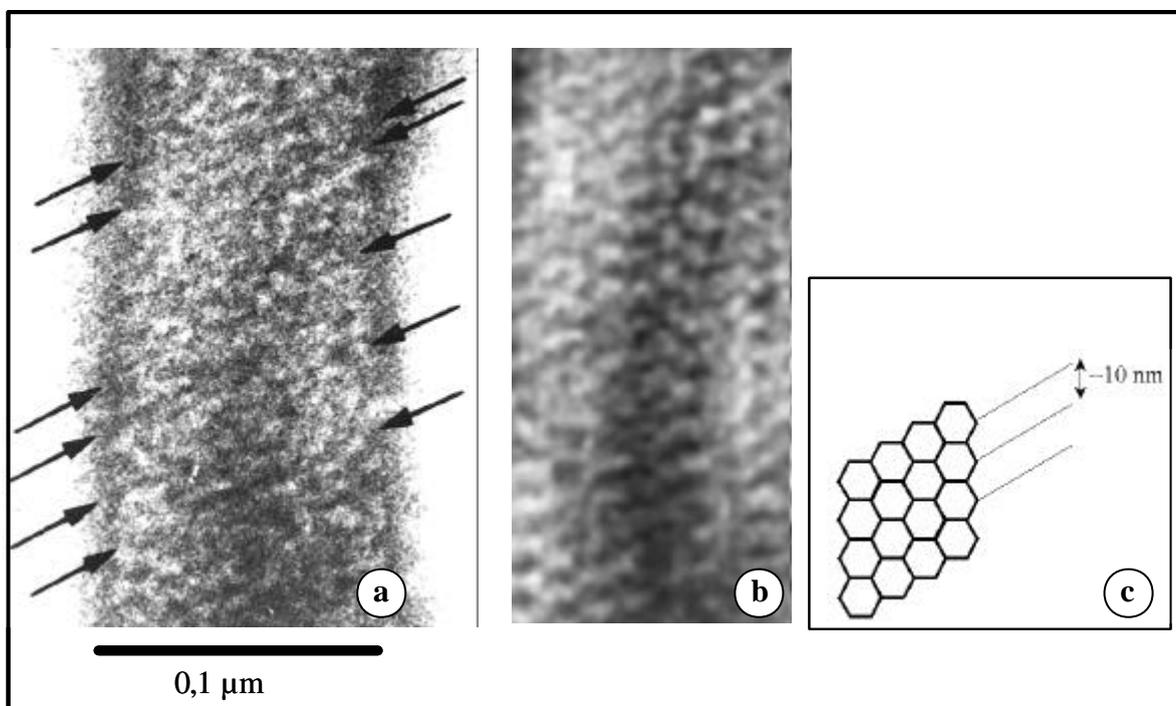


Abb. 3.3.7: Zellausläufer einer fixierten und anschließend mit TX-100 behandelten *M. pneumoniae*-Zelle. Vergrößerte Darstellung des oberen Bereichs aus Abb. 3.3.6.
a: Original-EM-Bild des mit PWS negativkontrastierten Präparates. Die Pfeile verdeutlichen die Richtung der Streifung.
b: 5-fache Überlagerung des in a gezeigten Ausschnittes nach Rauschunterdrückung.
c: schematische Darstellung der hexagonalen Gitterstruktur.

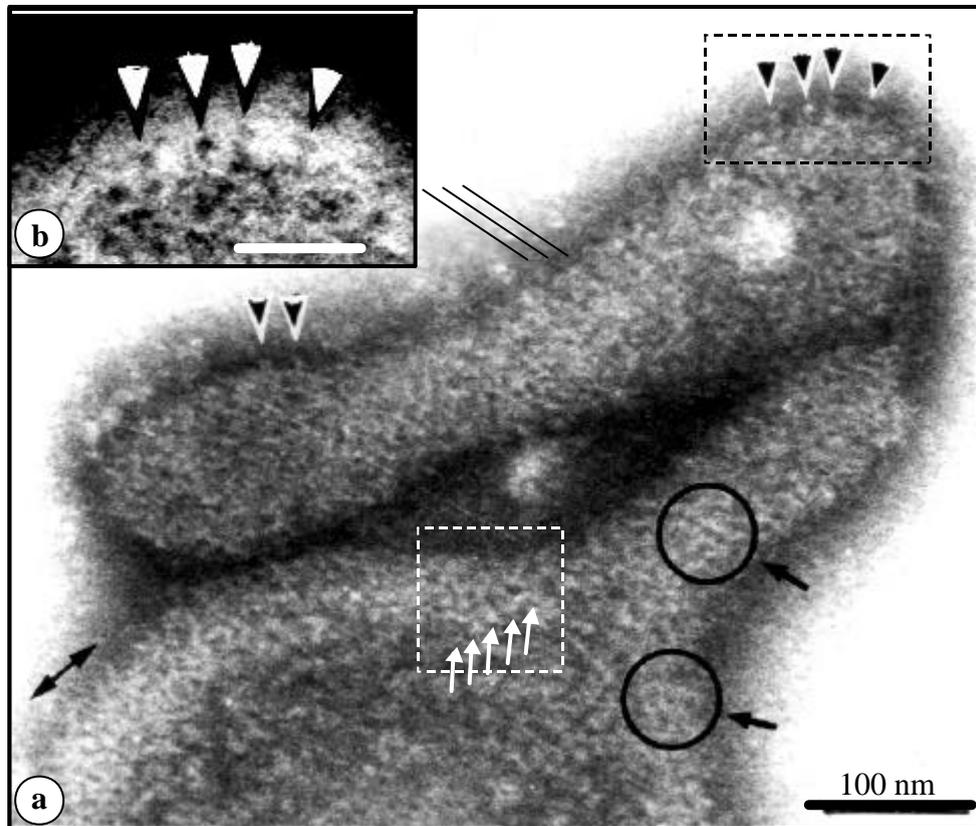


Abb. 3.3.8: Fixierte und anschließend mit TX-100 behandelte *M. pneumoniae*-Zellen. **a:** Eine schräg zur Längsachse der Filamente verlaufende Streifung ist erkennbar, die Richtung dieser Streifung ist durch die parallelen Linien am oberen Bildrand verdeutlicht. Am Rand der Zellen sind teilweise Massen sichtbar welche von der Zelle abstehen (Pfeilspitzen), der markierte Bereich oben rechts ist in **b** im Umkehrkontrast höher vergrößert dargestellt. In einigen Bereichen ist in **a** ein hexagonales Muster sichtbar (Kreise, weiß gestrichelter Kasten, dieser siehe Abb. 3.3.9). Der Doppelpfeil verdeutlicht die ehemalige Lage der hier entfernten Cytoplasmamembran. **c:** Der in **a** ausschnittsweise gezeigte Zellkörper in Gesamtansicht in geringer Vergrößerung. **d:** Schematische Darstellung der Verteilung des Kontrastmittels bei einem kollabierten Hohlkörper mit begrenzt biegsamer Hülle (Seitenansicht; grau: Kontrastmittel; untere Linie: Trägerfolie; gebogene Linie: Hülle des kollabierten Hohlkörpers).

Balken in **b** 50 nm; in **c** 100 nm.

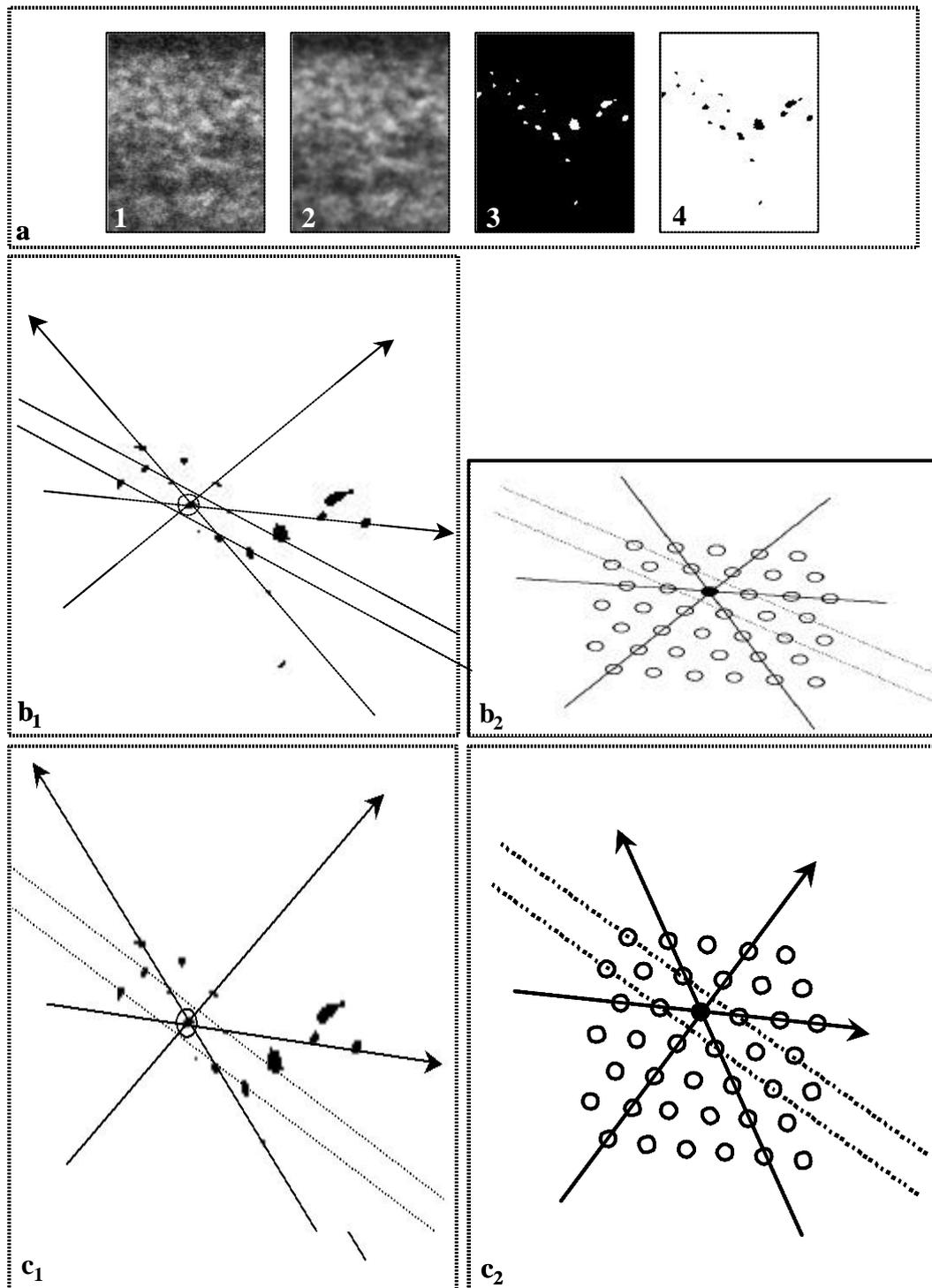


Abb. 3.3.9: Verdeutlichung der hexagonalen Verteilung von Massen am peripheren Cytoskelett. Dargestellt ist der in Abb. 3.3.8 durch einen gestrichelten Kasten markierte Bereich. Erklärungen siehe Kap. 3.3.1.

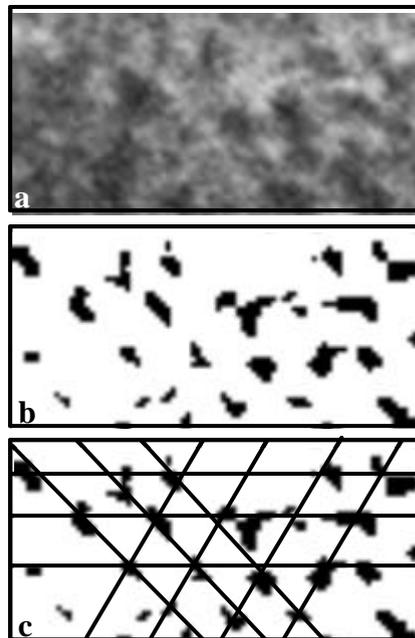


Abb. 3.3.10: Verdeutlichung der hexagonalen Verteilung von Massen am peripheren Cytoskelett. **a:** Original EM-Bild; **b:** Punktmuster aus den massivsten Bereichen des Objektes (Kontrastumkehr); **c:** Verdeutlichung der hexagonalen Anordnung der Massen durch Linien.
Erklärungen siehe Kap. 3.3.1

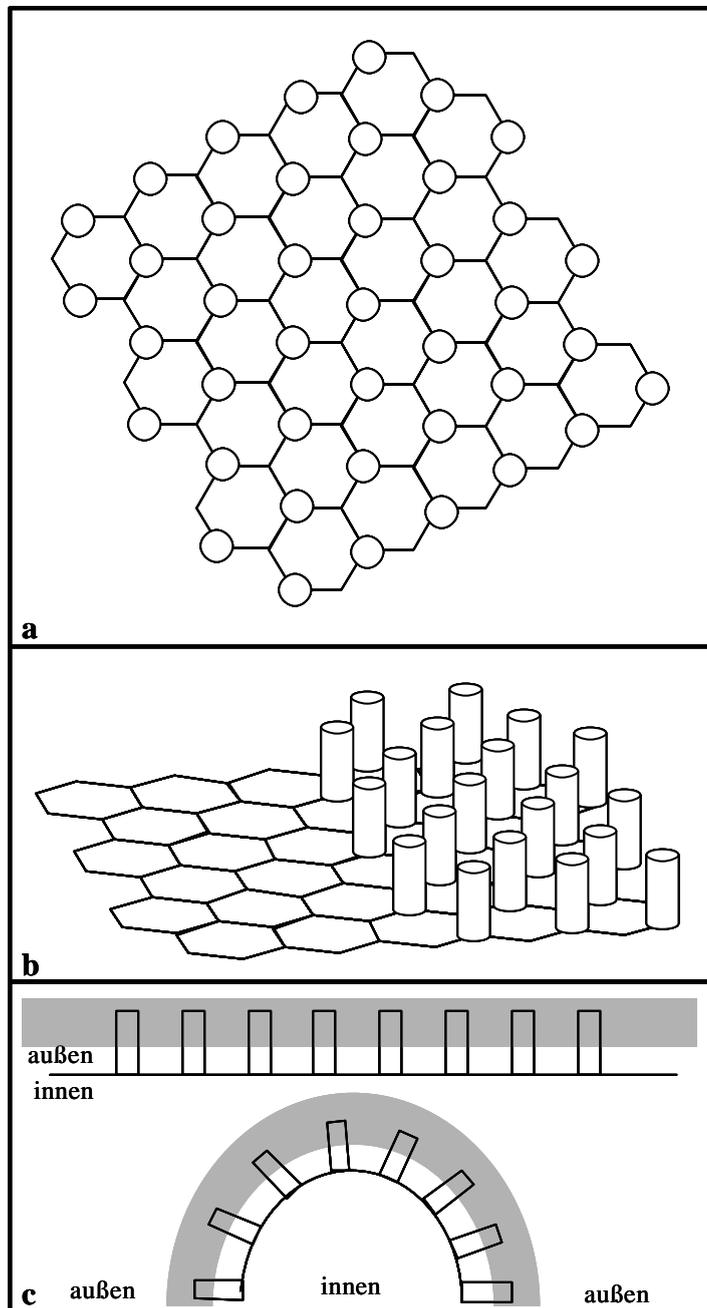


Abb. 3.3.11: Modell des peripheren Cytoskeletts von *M. pneumoniae*. Das Grundgerüst besteht aus einem hexagonalen Netzwerk. Hierauf befinden sich Massen, welche in den Bereich ragen, in welchem sich die Cytoplasmamembran befindet.

a: Aufsicht von außen; **b:** Schrägansicht von außen; **c:** Seitenansicht (oben gestreckt, unten gebogen). In **c** ist die ungefähre Lage der Cytoplasmamembran durch grau hinterlegte Bereiche gekennzeichnet.

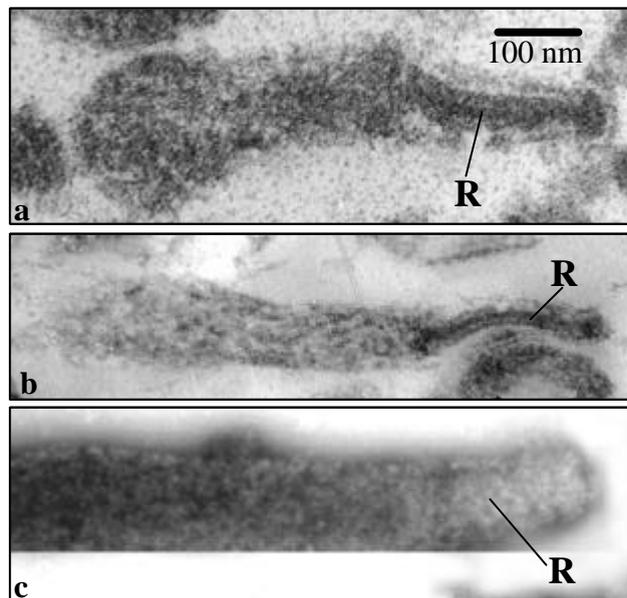


Abb. 3.3.12: Ansichten des Rod im Tip von *M. pneumoniae*.
a, b: Ultradünnschnitte; **c:** TX-100-Behandlung nach Fixierung,
Negativkontrastierung. Der Rod (R) erscheint in
unterschiedlicher Breite zwischen ~20 und 80 nm, und
konstanter Länge von ~300 nm.

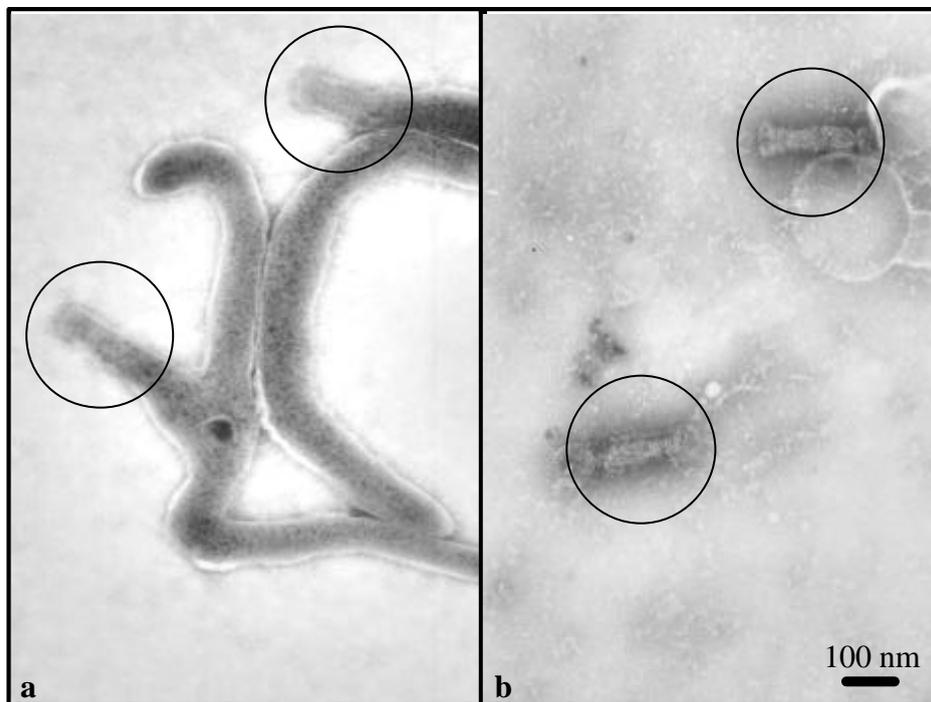


Abb. 3.3.13: Wirkung von TX-100 auf unfixierte *M. pneumoniae*-Zellen. **a:** Zellen vor der TX-100-Behandlung; **b:** Ergebnis der TX-100-Behandlung.

Die eingekreisten Bereiche zeigen in a jeweils einen Tip, in b den im Tip lokalisierten Rod, welcher nach der TX-100-Behandlung auf der Trägerfolie zurückbleibt.

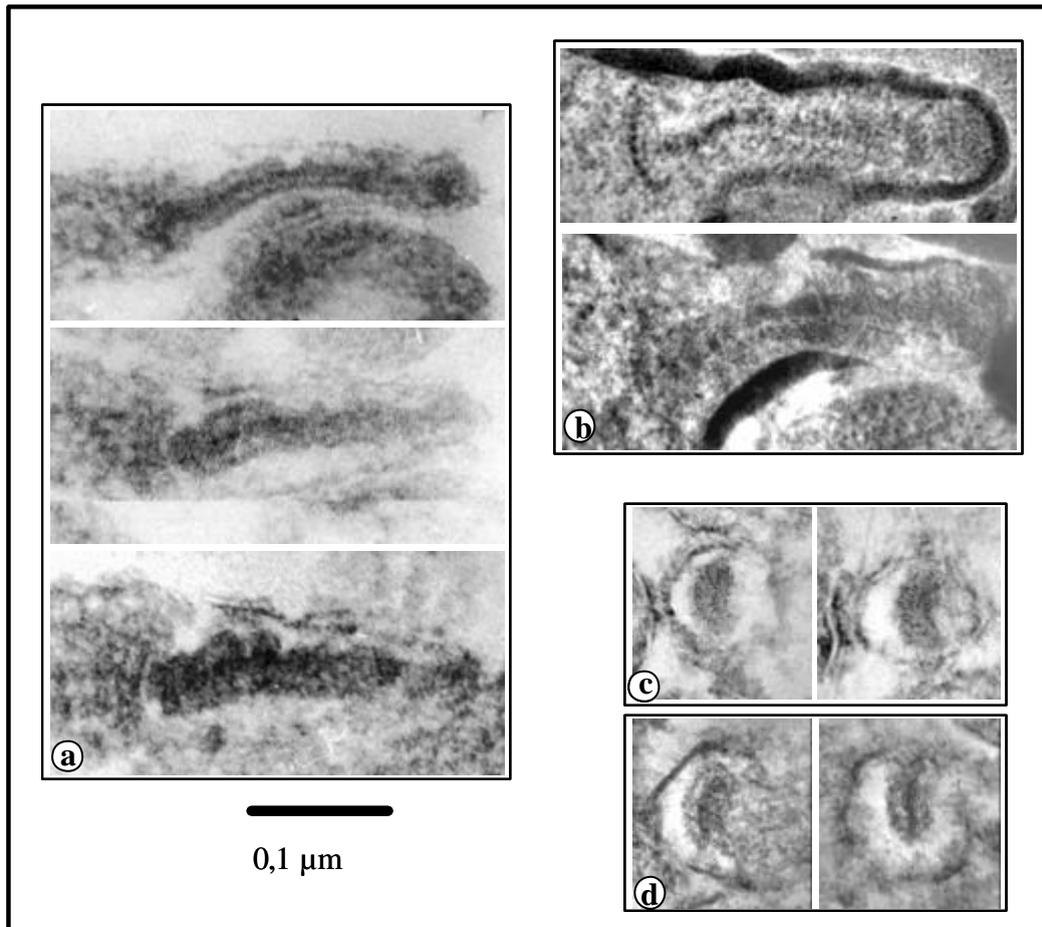


Abb. 3.3.14: Längs- und Querschnitte durch den Tip von *M. pneumoniae* mit darinliegendem Rod. **a, b:** Längsschnitte (proximales Ende nach links orientiert); **c, d:** Querschnitte; **a, c:** konventionelle Ultradünnschnitte nach Einbettung in Lowicryl K4M; **b, d:** Kryo-Ultradünnschnitte.

An Querschnitten wird deutlich, daß der Rod abgeflacht ist. Die Längsschnitte zeigen verschiedene Anschnittrichtungen des Rod, dieser erscheint hier daher in unterschiedlicher Breite. Erklärungen siehe Kap. 3.3.2.

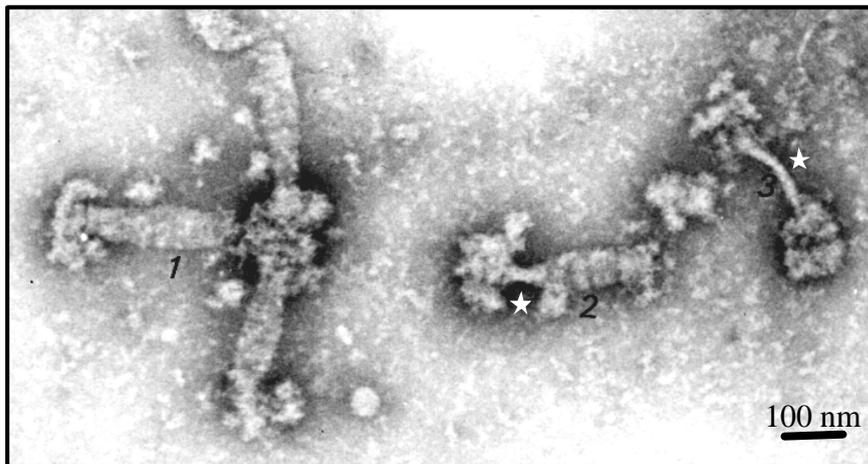


Abb. 3.3.15: TX-100-Präparation nach REGULA (1999), Negativkontrastierung mit PWS. Es sind Rods in verschiedenen Projektionen sichtbar. **1:** Drei Exemplare von flach auf der Trägerfolie liegenden und daher breit erscheinenden Rods; **2:** Ein Rod welcher in sich um 90° verdreht ist und daher teilweise flach und teilweise aufrecht positioniert ist; **3:** Ein auf der schmalen Kante stehender Rod. Die Höhe der jeweiligen Strukturen korreliert hier mit der Intensität der Schwärzung: Neben höheren Bereichen (durch Sterne gekennzeichnet) befindet sich mehr Kontrastierungssalz als neben flachen Bereichen.

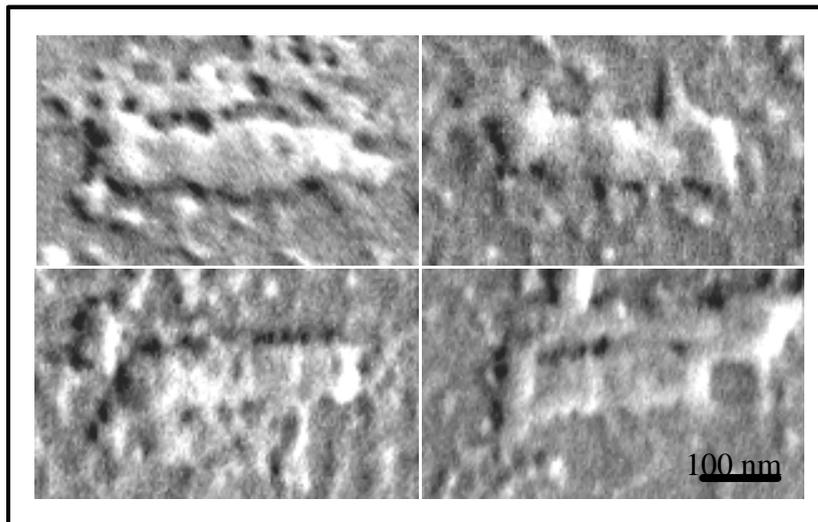


Abb. 3.3.16: Scanning-Elektronenmikroskopische Aufnahmen von freipräparierten Rods nach REGULA (1999), Kritischer-Punkt-Trocknung. Die Rods erscheinen abgeflacht.

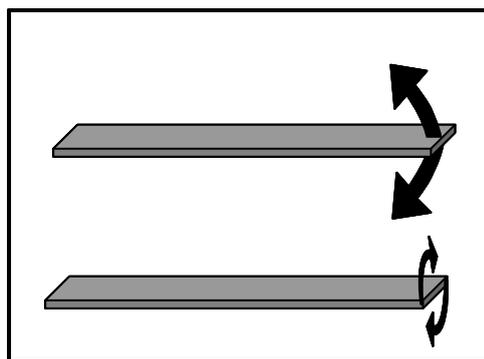


Abb. 3.3.17: Mögliche Biegung und Torsion des Rod. Erklärungen siehe Kap. 3.3.2

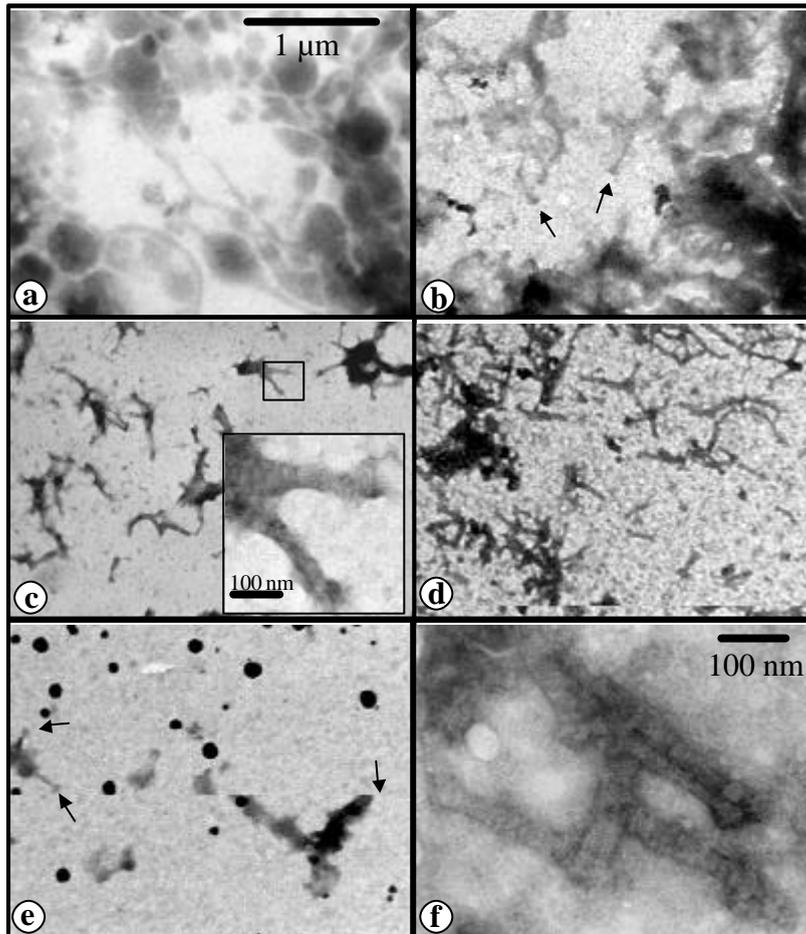


Abb. 3.3.18: Vergleich verschiedener TX-100-Präparationen an *M. pneumoniae*. **a:** Zellrasen vor der Behandlung; **b:** Effekt der „Low-Triton“-Behandlung (Pfeile: Rods); **c:** TX-100-Behandlung ohne NaCl (Inset: höhere Vergrößerung); **d:** TX-100-Behandlung mit Zugabe von NaCl; **e:** Effekt der Präparation wie in d, auf Formvar-Grid ohne Kohlebedampfung; **f:** Präparation wie in d, höhere Vergrößerung.

Standard in a gilt für a bis e.

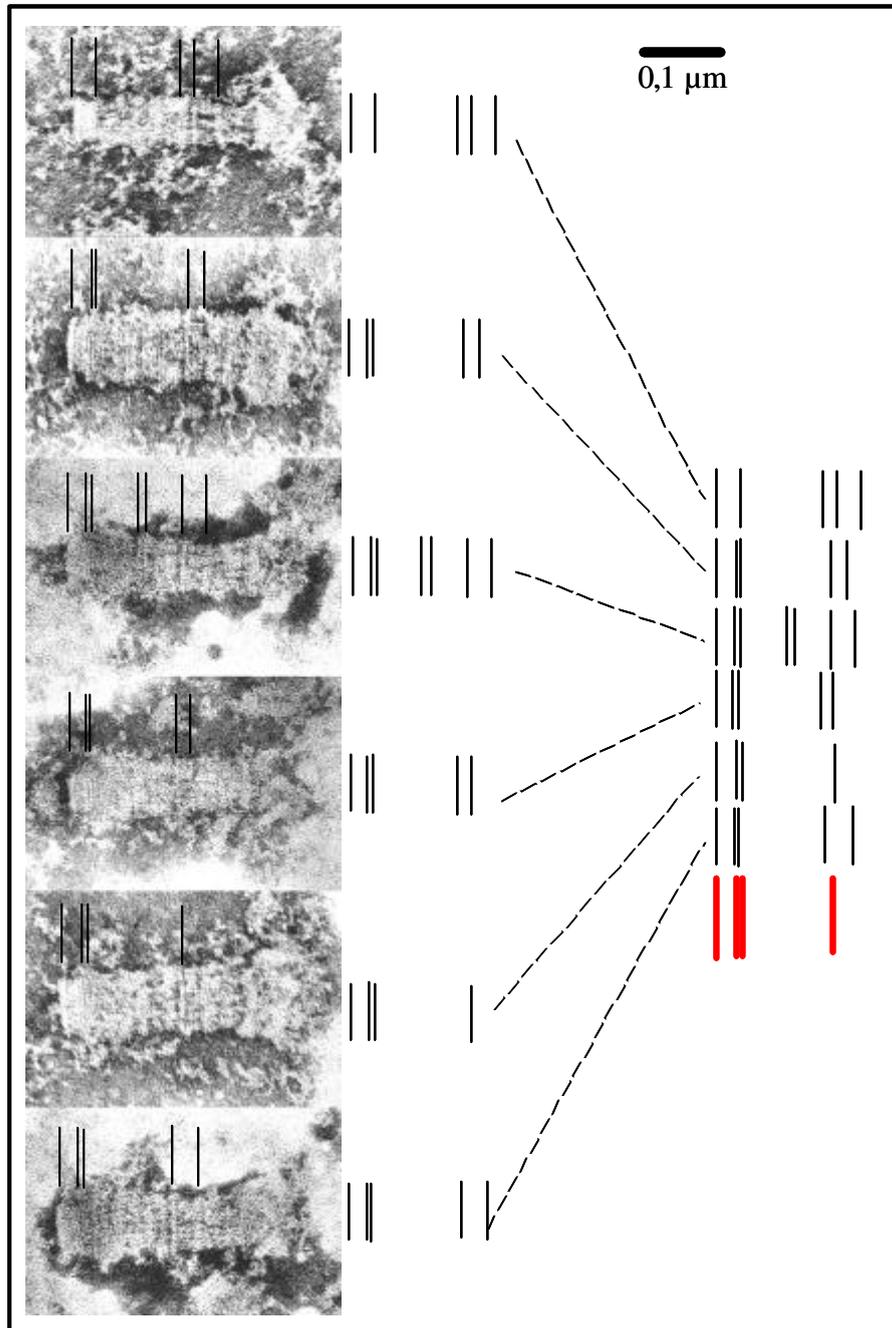


Abb. 3.3.19: Vergleich des Querlinienmusters der Rods. Links sind sechs Beispiele des Rod in gleicher Orientierung übereinander montiert. Jeweils überhalb des Rod sind die hervorstechenden Querlinien durch schwarze Striche verdeutlicht und dieses Strichmuster jeweils rechts neben dem Rod nochmals dargestellt. Rechts im Bild sind die entstandenen Muster aneinandergelegt. In Rot sind die Linien wiedergegeben, die bei den meisten Rods erkennbar waren.

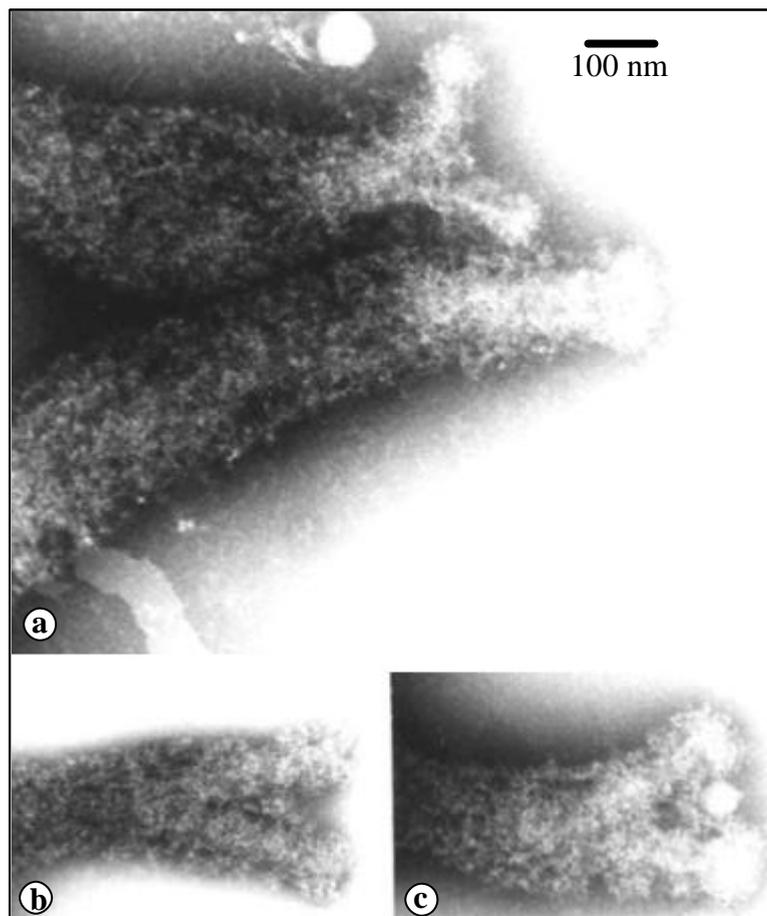


Abb. 3.3.20: Fixierte und anschließend mit TX-100 behandelte Zellen von *M. pneumoniae*. Gezeigt ist jeweils der Tip.

a: zwei nebeneinander liegende Tips; im oberen ein gespaltener Rod, im unteren ein nicht gespaltener. **b** und **c:** jeweils ein Tip mit einem gespaltenen Rod.

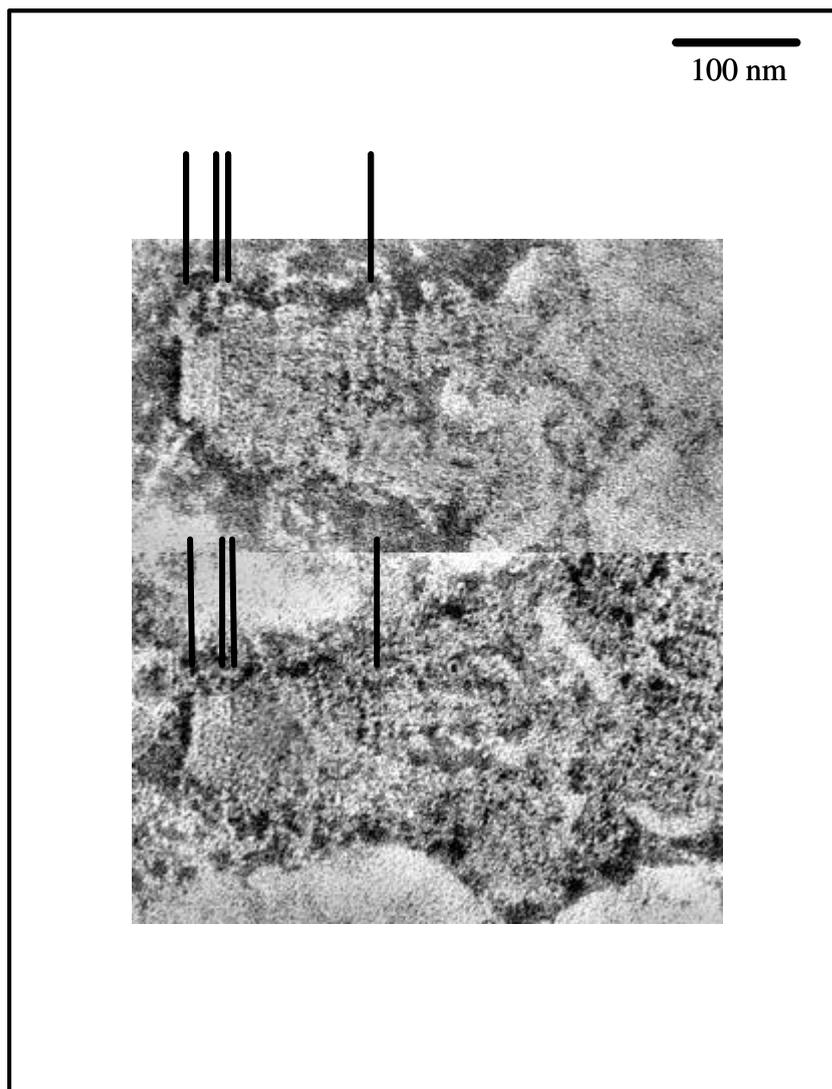


Abb. 3.3.21: Gespaltene Form des Rod in TX-100-Präparation nach REGULA (1999). Es sind die Querlinien verdeutlicht, die sich beim Vergleich mehrerer ungespaltener Exemplare des Rod als besonders charakteristisch erwiesen haben (siehe Abb. 3.3.19).

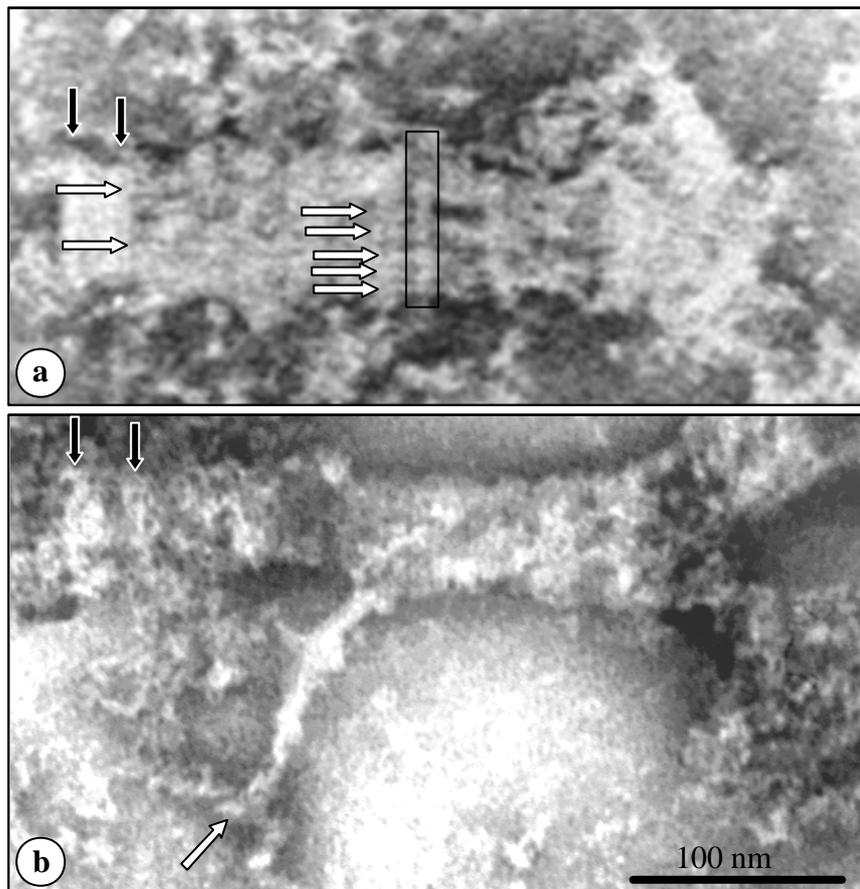


Abb. 3.3.22: Aufbau des Rod aus Längsfasern. TX-100-Preparation nach REGULA (1999), Negativkontrastierung mit PWS. Das proximale Ende des Rod (links) kann anhand seiner glatten Erscheinung, sowie der markierten Querlinien (schwarze Pfeile) erkannt werden. **a:** Parallele Längsfasern sind entlang des Rod sichtbar (weiße Pfeile), diese weisen Verdickungen auf, die im Rod nebeneinander liegen (schwarzer Kasten); **b:** Vom Rod ist in Längsrichtung ein Anteil abgespalten (weißer Pfeil).

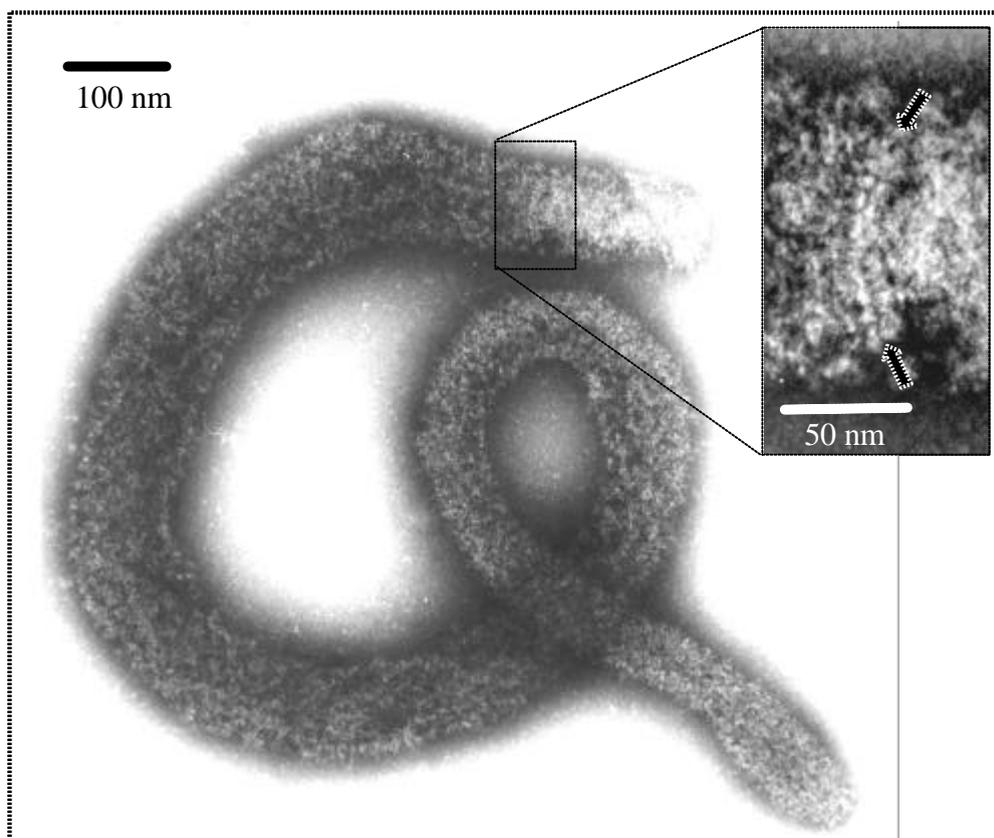


Abb. 3.3.23: *M. pneumoniae*-Zelle nach Entfernen der Cytoplasmamembran. Im Tip (oben im Bild) ist der Rod zu erkennen. Am proximalen Ende des Rod befindet sich eine gebogene Reihe von periodisch angeordneten Massen. Dieser Bereich ist im Inset in höherer Vergrößerung dargestellt, der Verlauf der Reihe ist durch Pfeile gekennzeichnet.

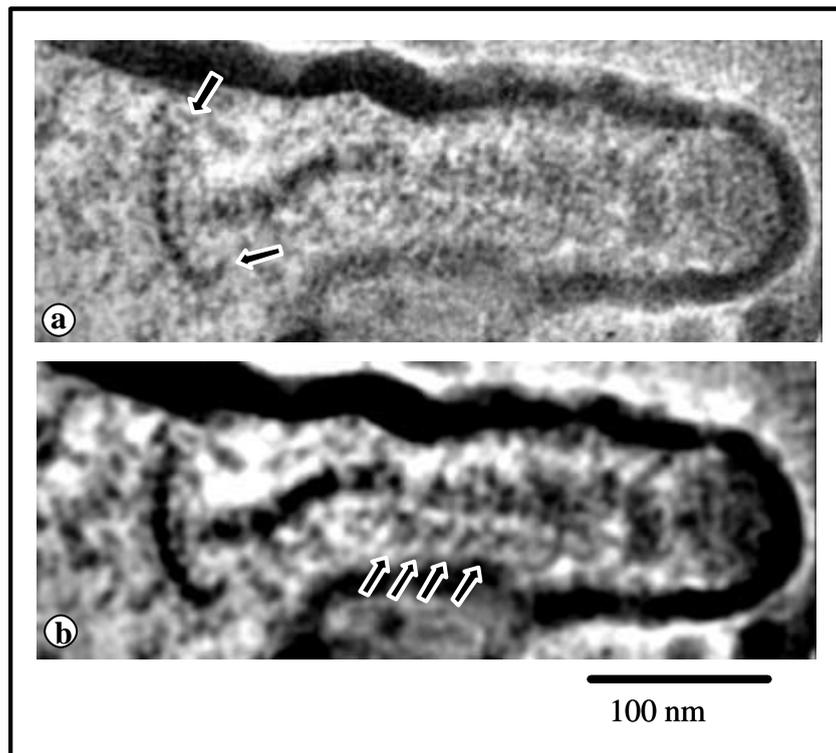


Abb. 3.3.24: Kryoultradünnschnitt durch den Tip von *M. pneumoniae* (Längsschnitt). **a.** unbearbeitetes EM-Foto, **b:** gleiches Bild wie in a, Hervorhebung von Strukturen durch Rauschunterdrückung und Kontrastverstärkung.

Am proximalen Ende des Rod ist eine radartige Struktur zu erkennen, welche in Schrägansicht abgebildet ist und aus periodisch angeordneten Massen besteht (Pfeile in a). Seitlich am Rod befinden sich periodisch angeordnete längliche Massen, welche sich zwischen Rod und Innenseite der Zellhülle erstrecken (Pfeile in b).

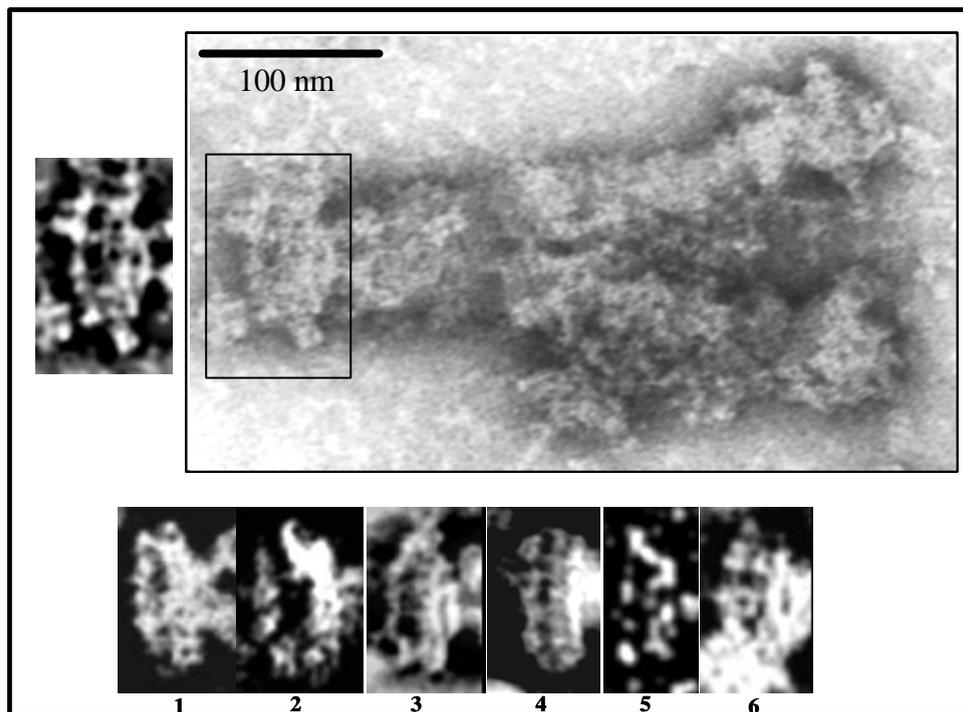


Abb. 3.3.25: Ergebnis einer TX-100-Behandlung bei welcher relativ viel Zellmaterial an den Rods haften blieb. Am proximalen Ende des Rod ist in einigen Fällen eine radähnliche Struktur zu erkennen, welche in ihren Ausmaßen den auch in Kryo-Ultradünnschnitten und TX-100-Präparationen mit vorheriger Fixierung der Zellen beobachteten Struktur ähnelt.

Oben: Ein original-EM-Foto (großes Bild), links daneben der eingerahmte Bereich in bearbeiteter Form. Unten: Ebenso bearbeitete Ausschnitte aus ähnlichen Bildern, verschiedene Projektionen der radähnlichen Struktur: Schrägansichten (1 und 2) und Seitenansichten (3-6).

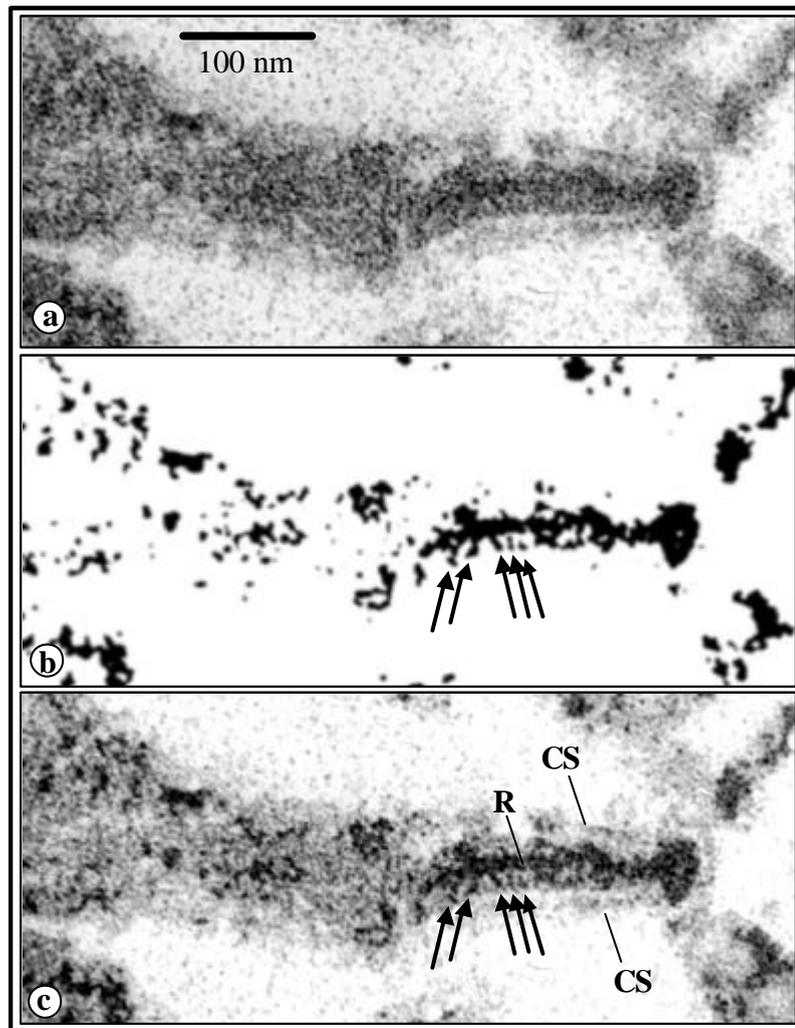


Abb. 3.3.26: Tip von *M. pneumoniae* mit darinliegendem Rod, Längs-Ultradünnschnitt, kontrastiert mit Uranylacetat und Bleicitrat. Die Cytoplasmamembran wurde vor der Einbettung durch modifizierte TX-100-Behandlung entfernt. **a:** original EM-Foto; **b:** alleinige Darstellung der Bildbereiche ab bestimmtem Schwärzungsgrad; **c:** Übereinanderprojektion von a und b. Lateral am Rod (R) sind periodisch angeordnete Massen zu erkennen (Pfeile), welche sich zwischen Rod und peripherem Cytoskelett (CS) erstrecken.

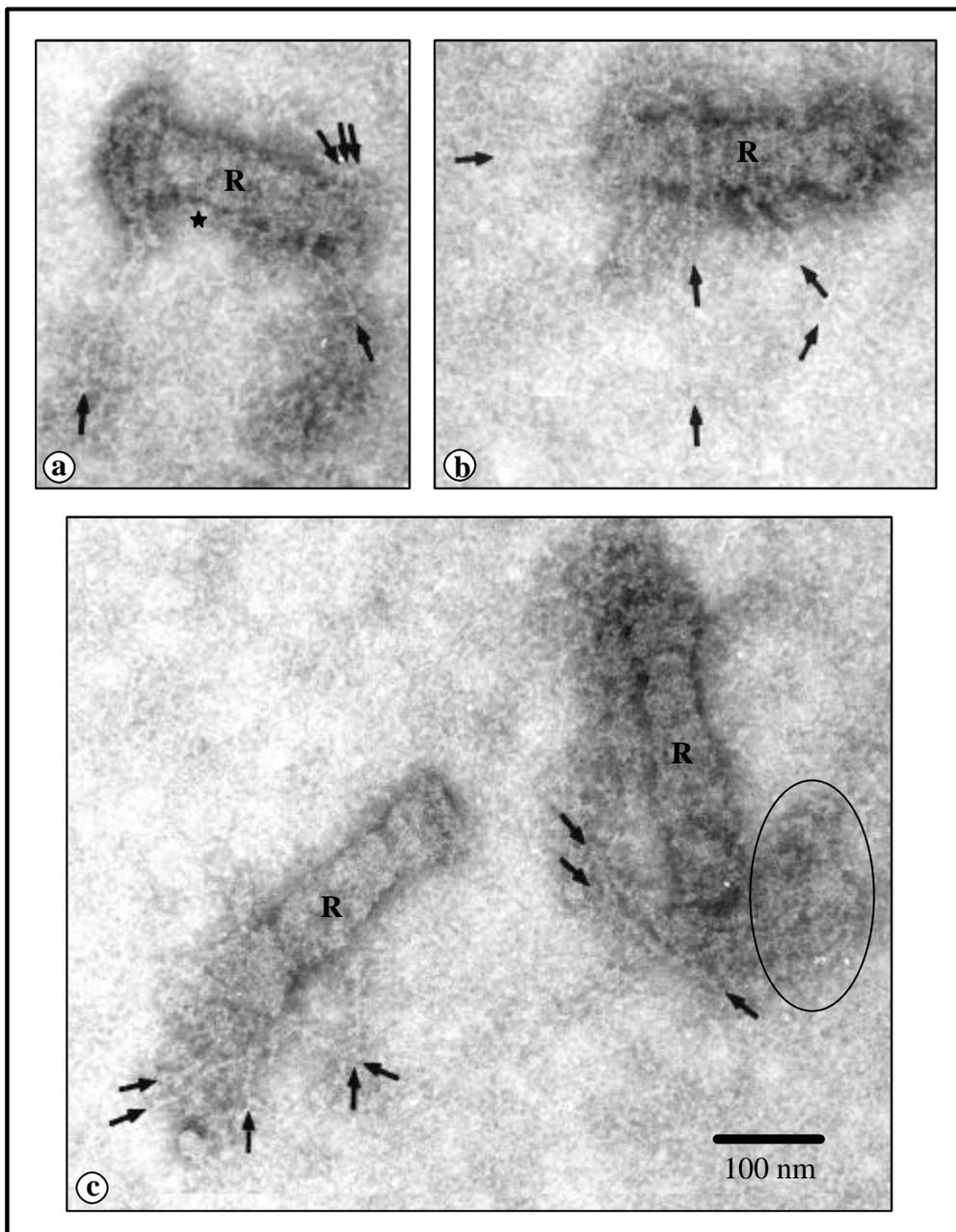


Abb. 3.3.27: TX-100-Präparation nach REGULA (1999); Negativkontrastierung mit PWS. Es sind Rods (R) sichtbar, an welchen Filamente (Pfeile) anhaften. Erklärungen: siehe Kap. 3.3.2.11

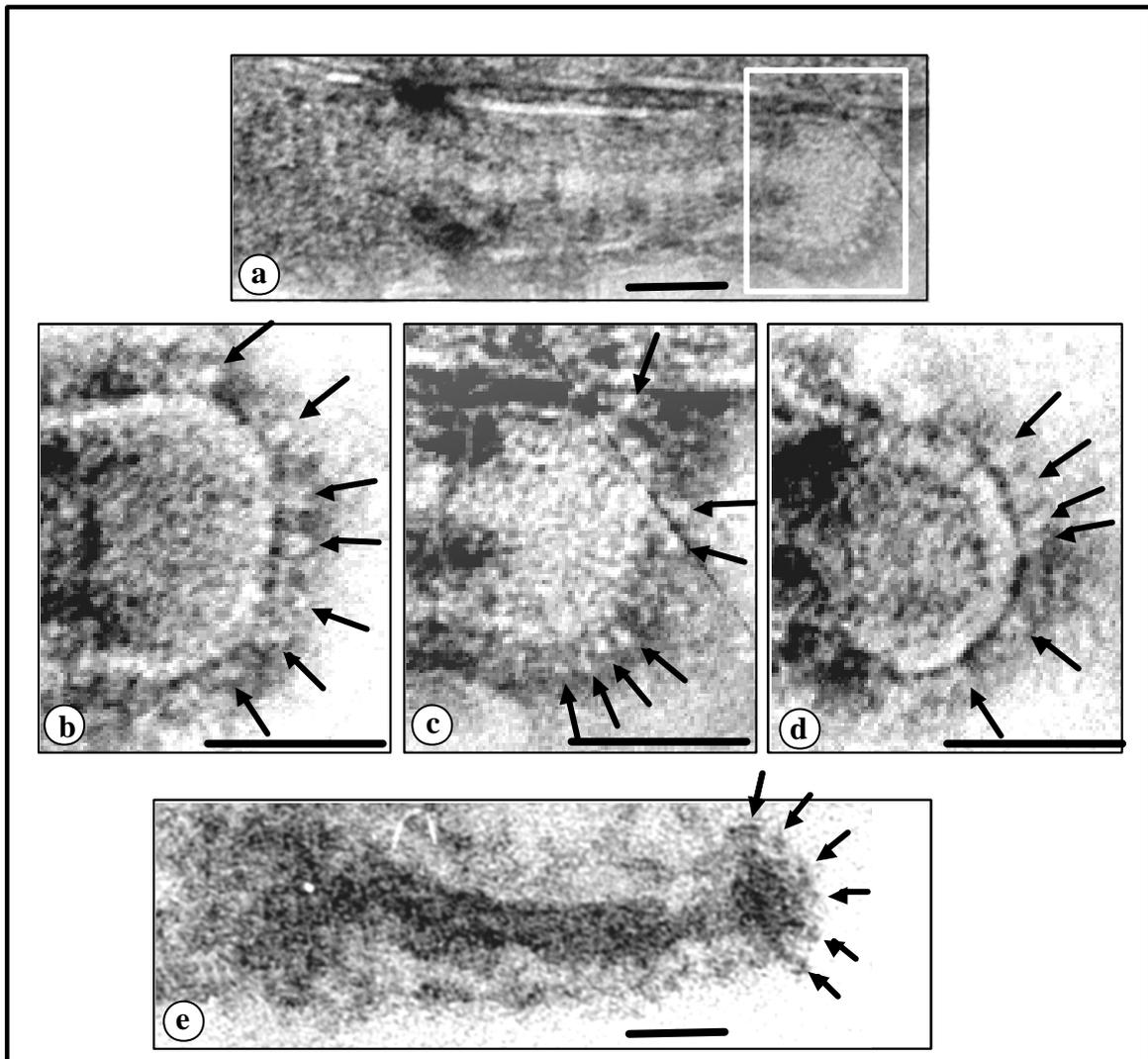


Abb. 3.3.28: Am äußersten Ende des Tip von *M. pneumoniae* liegen periodisch angeordnete Massen im Bereich der Cytoplasmamembran. Diese können bei reiner Formaldehyd-Fixierung ohne Einsatz von Detergenzien nach längerer Lagerung der Zellen bei 4 °C durch Negativkontrastierung abgebildet werden (a-d).

a: Tip mit darinliegendem Rod; **b-d:** äußerste Enden von Tips, in c der in a gekennzeichnete Ausschnitt, b und d der gleiche Bereich bei anderen Zellen. **e:** Ultradünnschnitt von glutaraldehydfixierter und anschließend mit TX-100 behandelter Zelle, Längsschnitt durch den Tip mit darinliegendem Rod. Am distalen Ende (rechts) sind ähnliche Strukturen wie in a – d erkennbar (Pfeile). Balken: je 50 nm.

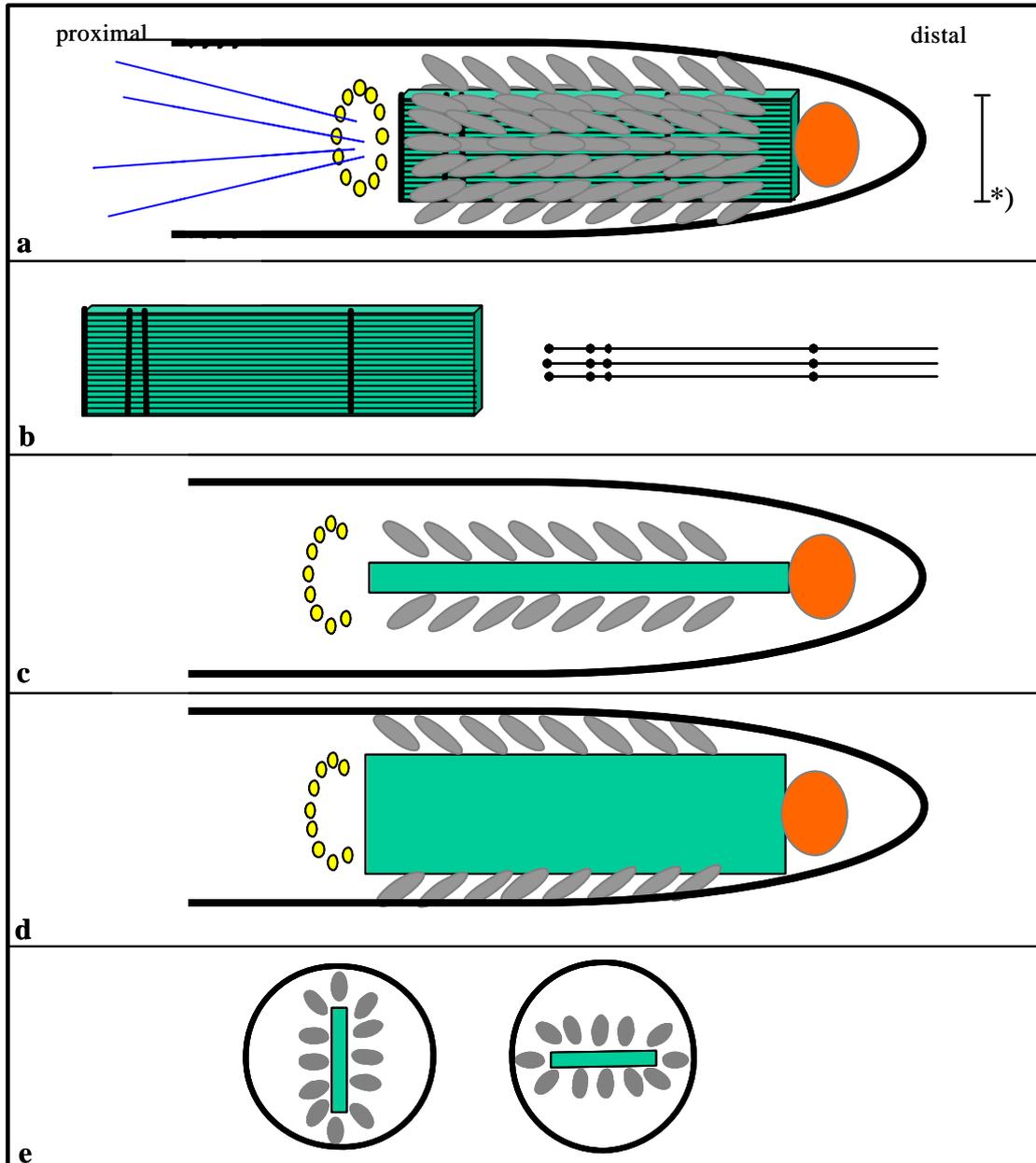


Abb. 3.3.29: Modell des Rod im Tip von *M. pneumoniae*. **a:** Gesamtansicht. Grün: Rod; Grau: Linker; Gelb: Rad; orange: distales verdicktes Ende des Rod; blau: vom proximalen Ende des Rod entspringende Filamente; *) ungefähre Dicke eines Ultradünnschnitts. **b:** links alleinige Darstellung des Rod; rechts einzelne Längsfasern mit Verdickungen. **c,d:** Längsschnitte durch den Tip mit schmalem (c) und breitem (d) Abschnitt des Rod, die ungefähre Schnittdicke ist in a angegeben, das am proximalen Ende des Rod gelegene Rad paßt knapp in einen Schnitt, es erscheint aber nur als Teilanschnitt. **e:** Querschnitte durch den Tip in verschiedenen Richtungen, jeweils im Bereich der Linker; sie erscheinen gleichartig.

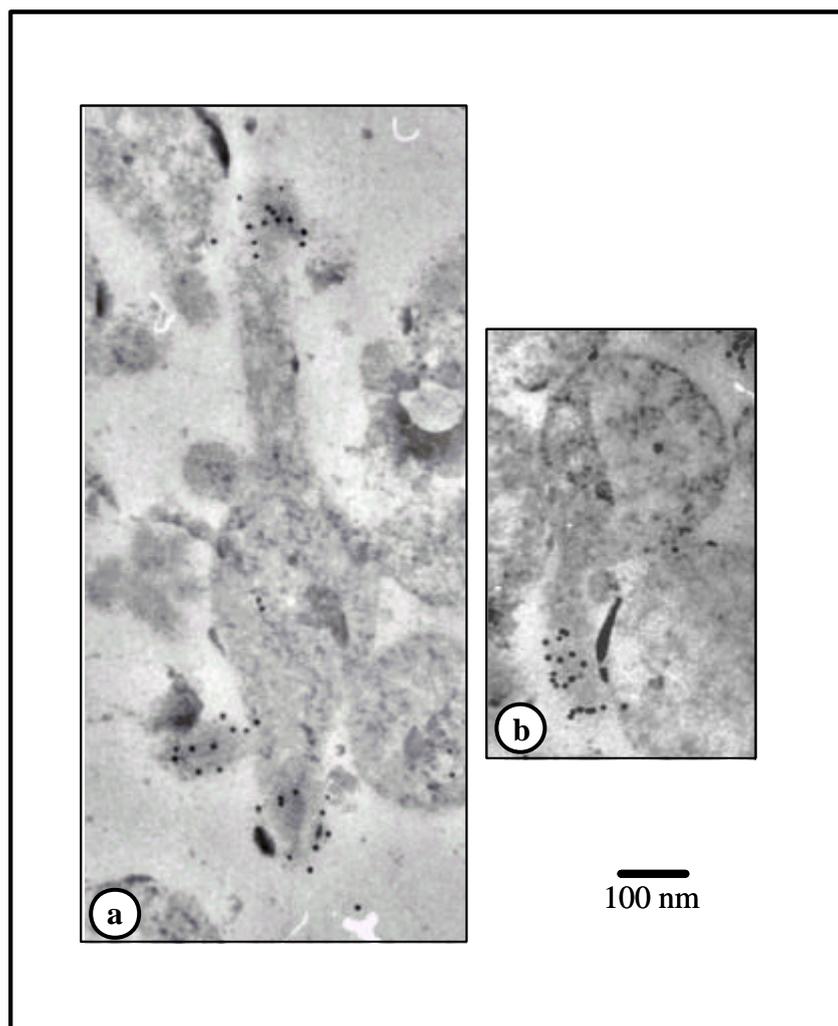


Abb. 3.3.30: Immun-Goldmarkierung mit Serum gegen HMW1, Ultradünnschnitte.

Es sind Signale am Ende von Zellausläufern zu erkennen (a und b); diese verlaufen teilweise linienförmig (b).

Erklärungen: siehe Kap. 3.3.3.1

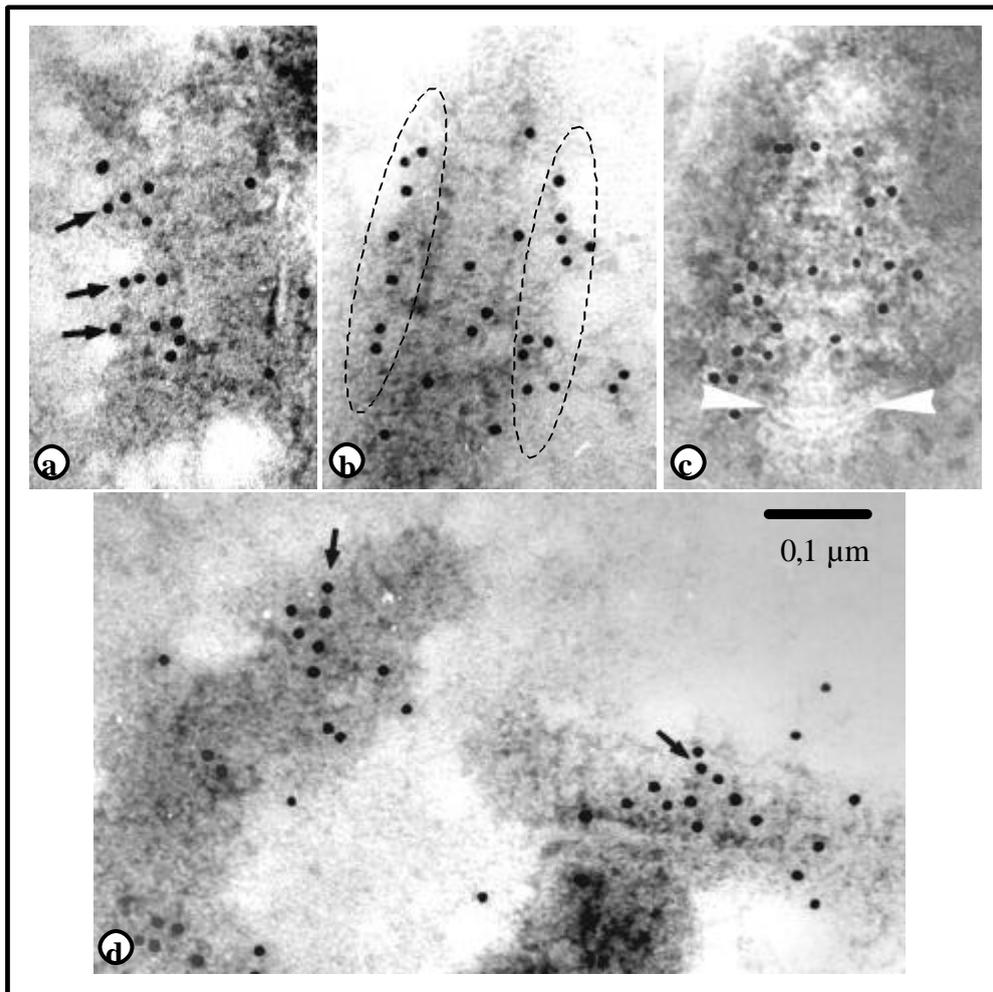


Abb. 3.3.31: Immun-Goldmarkierung mit Serum gegen HMW1, TX-100-Präparation nach REGULA (1999). Bei der Präparation ist Zellmaterial an den Rods haften geblieben. **a:** Reihenförmige Markierungen am Rande des Rod (Pfeile) weisen auf parallele, gestreckte Anordnung des Antigens hin. **b:** Am Rand des Rod ist beidseitig Material erkennbar, welches markiert wurde. **c:** Es ist eine Markierung seitlich am Rod und über den Rod verteilt sichtbar. Das proximale Ende des Rod kann das Rad erkannt werden (weiße Pfeilspitzen), dieses trägt keinerlei Markierung. **d:** Es sind schräg über den Rod verlaufende reihenförmige Markierungen sichtbar.
Erklärungen: siehe Kap. 3.3.3.1



Abb. 3.3.32: Immun-Goldmarkierung mit Serum gegen HMW1, TX-100-Präparation nach REGULA (1999). Bei der Präparation ist Zellmaterial an den Rods haften geblieben. Dieses konnte markiert werden. Die Signale verlaufen teilweise reihenförmig (Pfeile). In Bereichen ohne an den Rods anhaftendes Zellmaterial ergibt sich auch kein Signal an den Rods (eingekreister Bereich).
Erklärungen: siehe Kap. 3.3.1

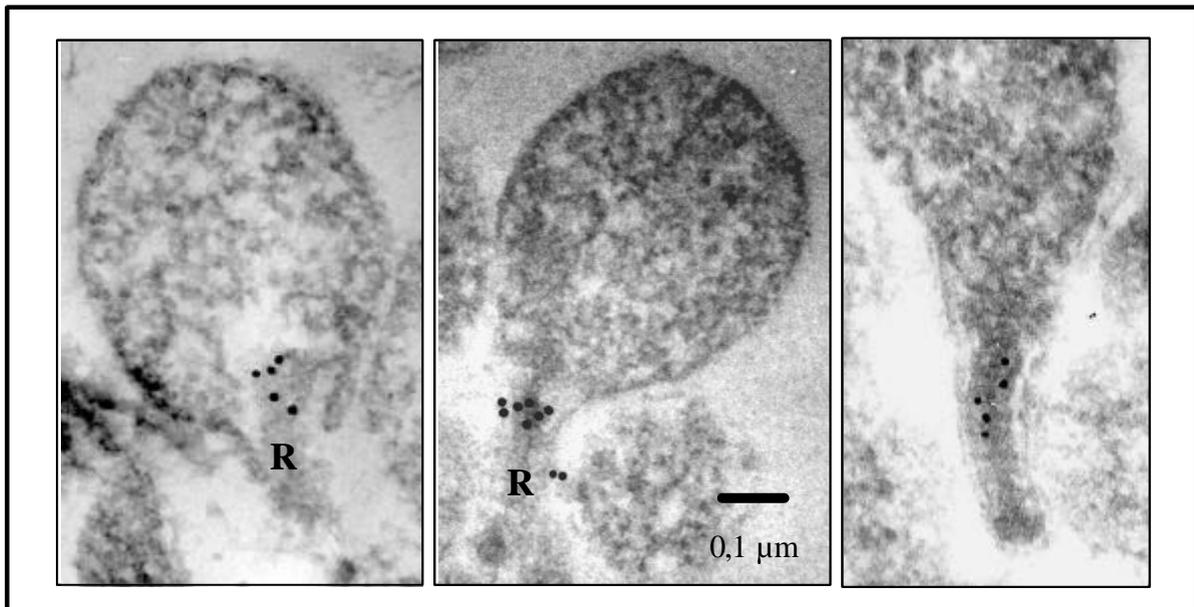


Abb. 3.3.33: Immun-Goldmarkierung mit Serum gegen HMW2 an Ultradünnschnitten von *M. pneumoniae*. R: Rod. Es sind Signale im proximalen Bereich des Rod zu erkennen.

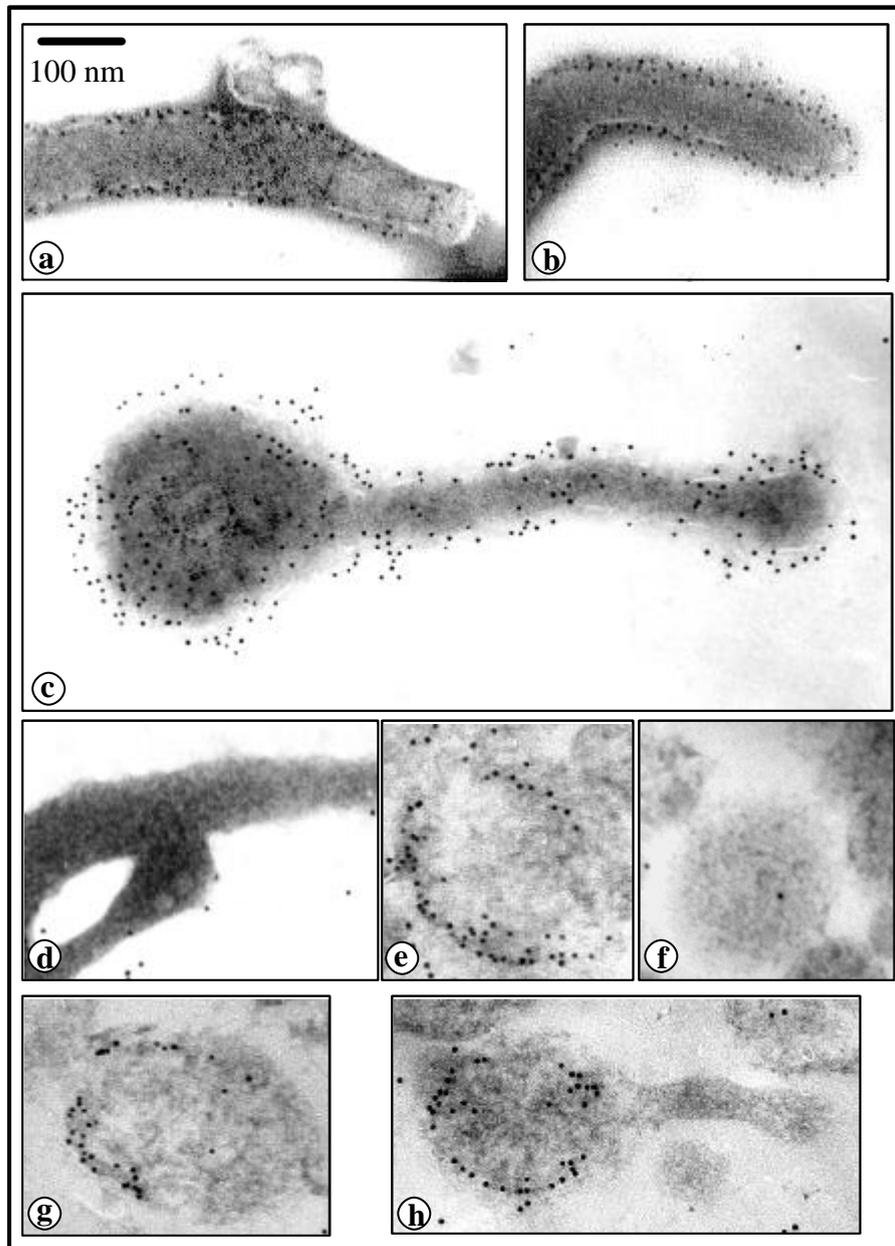


Abb. 3.3.34 Immun-Goldmarkierungen mit Serum gegen P01_orf 1033.
a-d: whole-mount-Präparationen, **d:** fixierte und dann TX-100-behandelte Zellen. **e-h:** Ultradünnschnitte; **f:** vor der Einbettung wie in **d** behandelte Zellen

Es sind jeweils keine Signale bei fixierten und anschließend TX-100-behandelten Zellen sichtbar. Bei unbehandelten Zellen erhält man bei whole-mount-Präparationen Signale über den gesamten Zellbereich, an Ultradünnschnitten wird deutlich, daß die Reaktion des Serums nur an der Zellperipherie und nicht im Cytoplasma erfolgt.

Der Standard in a gilt für alle Bilder. Erklärungen: siehe Kap. 3.3.3.3

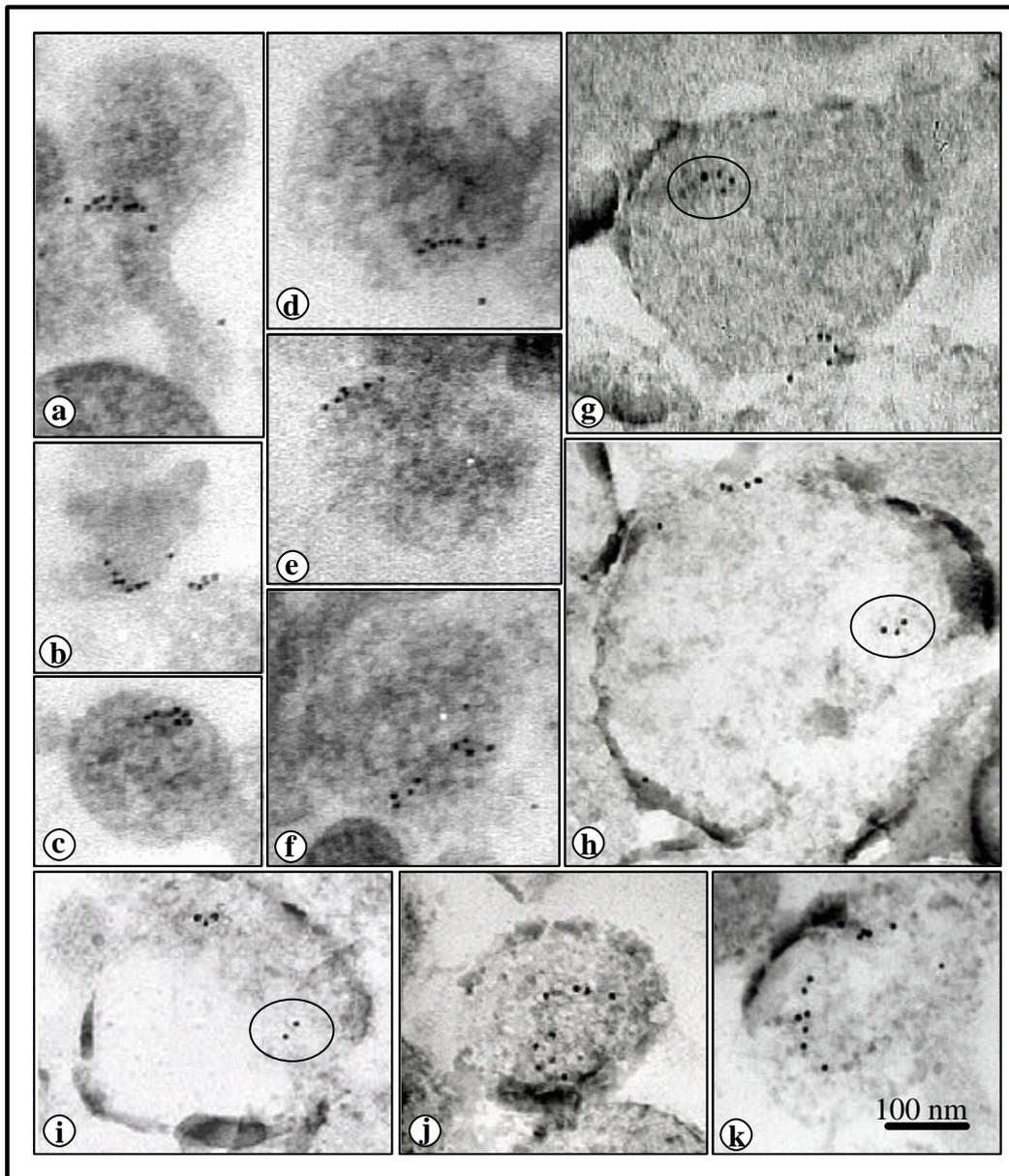


Abb. 3.3.35: Immun-Goldmarkierungen an Ultradünnschnitten von *M. pneumoniae* mit Serum gegen FtsZ. **a-f:** periphere Signale welche ins Cytoplasma ragen, **g-i:** zusätzlich zu peripheren Signalen lokale Signale im Cytoplasma (eingekreist), **j-k:** ringförmige Signale im Cytoplasma.
Balken: 100 nm. Erklärungen: Siehe Kap. 3.3.3.4

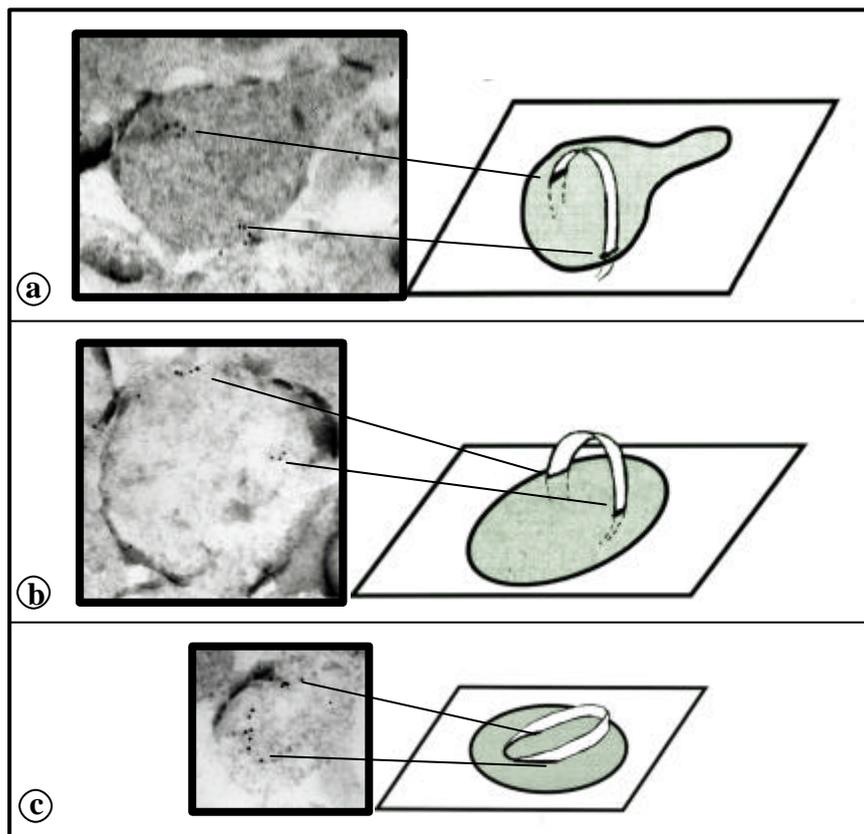


Abb. 3.3.36: Verdeutlichung von verschiedenen Anschnittrichtungen eines möglichen FtsZ-Ringes im Zellkörper von *M. pneumoniae*.

a-b: Querschnitte durch den Ring (vgl. Abb. 3.3.35 g, h),

c: Schrägschnitt am Ring entlang (vgl. Abb. 3.3.35 k)

Dargestellt ist jeweils links das EM-Bild einer Immun-Goldmarkierung am Ultradünnschnitt von *M. pneumoniae* mit Serum gegen FtsZ; rechts als Schemazeichnung die Verdeutlichung eines möglichen Ringanschnittes, welcher zur entsprechenden Markierung führen würde.

Erklärungen: Siehe Kap. 3.3.3.4

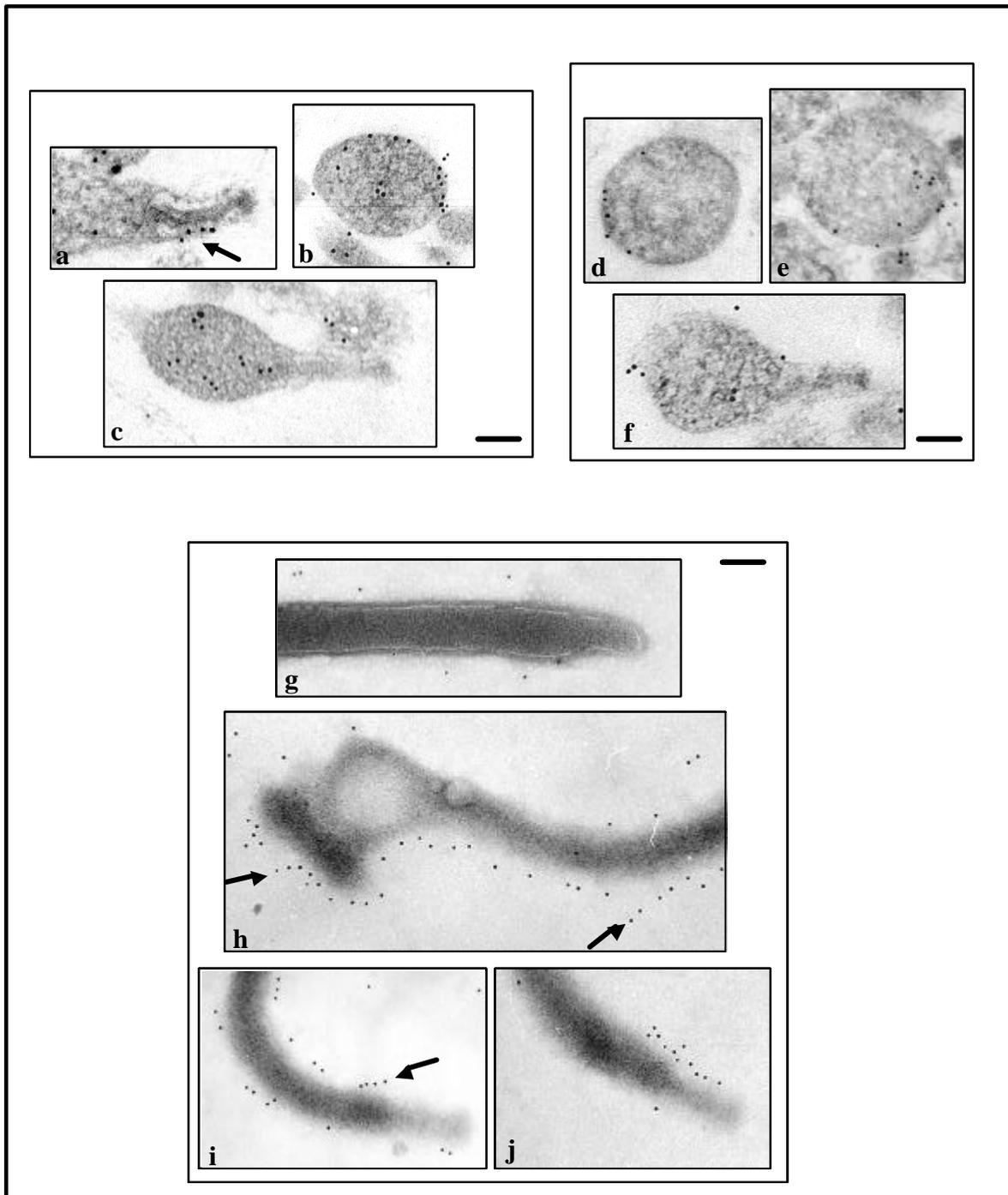


Abb. 3.3.37: Immun-Goldmarkierung mit Serum gegen EF-Tu. **a-c:** Ultradünnschnitte von fixierten und anschließend mit TX-100 behandelten Zellen; **d-f:** Ultradünnschnitte von fixierten, nicht mit TX-100 behandelten Zellen; **g-j:** Whole-mount-Präparationen; **g:** ohne TX-100-Behandlung; **h-j:** TX-100-Behandlung nach Fixierung. Erklärungen siehe Kap. 3.3.3.5. Balken je 100 nm.

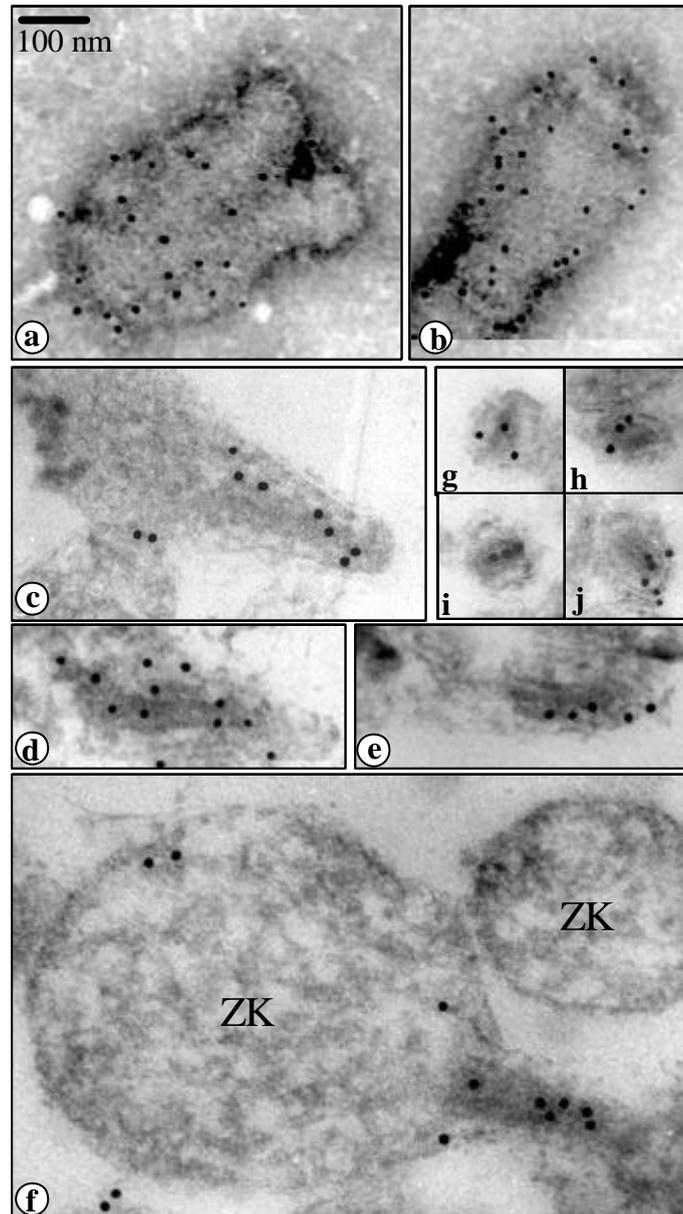


Abb. 3.3.38: Immun-Goldmarkierungen mit Serum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion von *M. pneumoniae*. **a, b:** TX-100-Präparation nach REGULA (1999); **c-j:** Ultradünnschnitte; **c-f:** Längsschnitte des Rod; **g-j:** Querschnitte des Rod. ZK: Zellkörper. Erklärungen: siehe Kap. 3.3.3.6

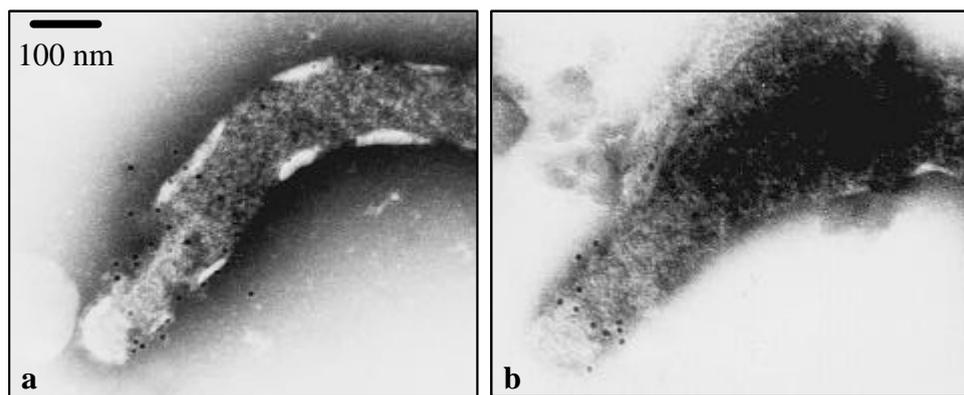


Abb. 3.3.39: Immun-Goldmarkierung mit Serum gegen P1. Es sind Signale am Tip erkennbar. Die Reaktion des Serums im Tip-Bereich ist unabhängig von einer TX-100-Behandlung.

a: unbehandelte Zelle, **b:** TX-100-behandelte Zelle.

Erklärungen: siehe Kap. 3.3.3.7

3.4 Charakterisierung der vom Serum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion erkannten Proteine

Es konnte durch Immun-Elektronenmikroskopie eine Reaktion des Serums gegen die TX-100-unlösliche Fraktion mit dem im Tip von *M. pneumoniae* lokalisierten Rod festgestellt werden. Dieses Serum reagiert mit verschiedenen Proteinen. Es wurde zunächst im Western-Blot (siehe Kap. 2.10.3) getestet, welche Banden der TX-100-unlöslichen Fraktion von *M. pneumoniae* mit diesem Serum bevorzugt kreuzreagieren. In vergleichenden Western-Blots unter Einsatz anderer Seren konnten HMW1, HMW2, HMW3 und DnaK als Hauptkandidaten ermittelt werden.

M. pneumoniae-Zellen wurden in 2% TX-100 / 1 M NaCl suspendiert und extrahiert (siehe Kap. 2.8.3). Die TX-100-UF wurde mittels SDS-PAGE (siehe Kap. 2.10.1) aufgetrennt und per Western-Transfer auf Nitrocellulosemembran übertragen (siehe Kap. 2.10.3). Es wurde zunächst die Reaktion des TX-100-UF-Serums getestet. Hierbei ergab sich eine hervorstechende Reaktion mit drei Banden, welche bei ca. 60, 120 und 240 kDa laufen. Vergleichend wurden dann die Reaktionen anderer Seren mit ebenso präparierten Nitrocellulosemembranen getestet. Es ergab sich eine Übereinstimmung der Höhe der positiven Banden zwischen TX-100-UF-Serum und HMW1, HMW2, HMW3 und DnaK. Dies ist in **Abb. 3.4** dargestellt. Auf der linken Seite sieht man neben dem Protein-Größenstandard einen Gelstreifen, wie er auch für die Western-Transfers eingesetzt wurde, nach Coomassie-Färbung. Rechts sind Streifen von Nitrocellulosemembran dargestellt, auf welche jeweils die Proteinbanden aus einem ebensolchen Gelstreifen transferiert wurden und welche dann für die Doppelimmunpräzipitation eingesetzt wurden. Die jeweils verwendeten Antiseren sind über dem jeweils verwendeten Streifen angegeben.

Die beim Einsatz von Serum gegen HMW1 und HMW2 auf den Nitrocellulosestreifen angefärbten Banden sind in ihrer Höhe hier nicht unterscheidbar, sie liegen beide bei ca. 200 kDa. Serum gegen HMW3 ergibt eine Bande bei ca. 120 kDa, welche der mittleren der drei mit dem Serum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion angefärbten Banden entspricht. Die untere vom Serum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion erkannte Bande liegt in der Höhe der vom Serum gegen DnaK erkannten Bande, bei ca. 65 kDa.

Nach dieser Analyse stellen HMW1, HMW2, HMW3 und DnaK Kandidaten für eine Beteiligung am Aufbau des Rod dar.

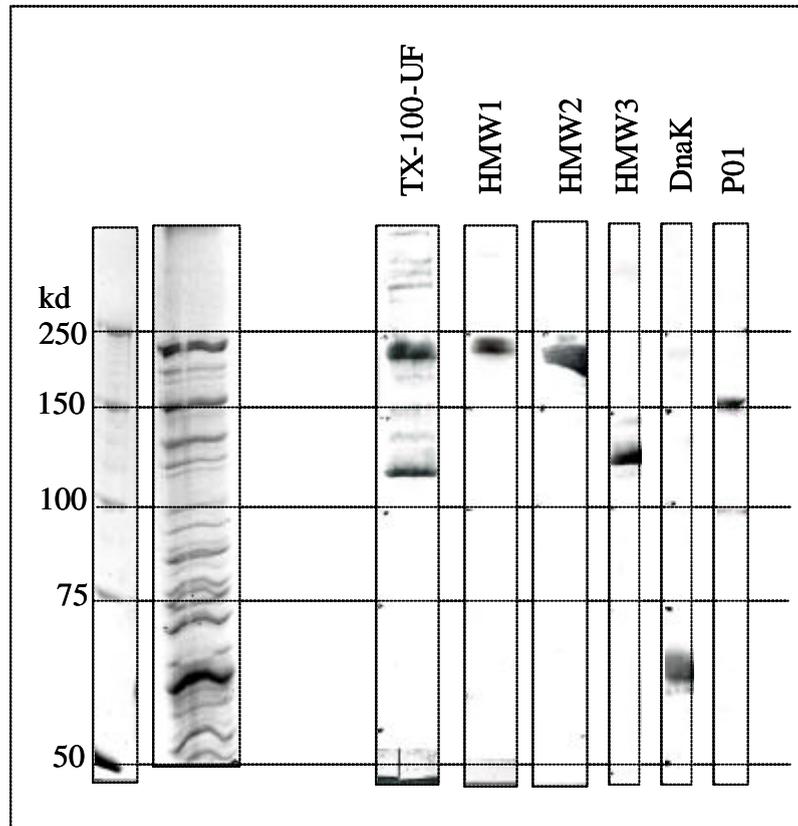


Abb. 3.4: Western-Blot der TX-100-unlöslichen Fraktion von *M. pneumoniae*, markiert mit Serum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion und im Vergleich hierzu mit Seren gegen HMW1-3, DnaK und P01. Linke Seite: Proteinstandard, Coomassie-gefärbtes SDS-Acrylamid-Gel (7,5 %) der TX-100-unlöslichen Fraktion; rechte Seite: Nitrocellulosemembran-Streifen nach Western-Transfer von Gelen wie links dargestellt und Doppelimmunpräzipitation mit alkalischer Phosphatase unter Einsatz der angegebenen Primärsere.

Die vom Serum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion erkannten Hauptbanden entsprechen in der Höhe am ehesten HMW1, HMW2, HMW3 und DnaK.

3.5 Klonierung von P01_orf1033 mit mRFP

Proteine können durch Fusion mit fluoreszierenden Proteinen für die Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Die Tendenz zur Multimerisierung solcher fluoreszierender Proteine stellt ein Problem bei der Lokalisierung der Fusionsproteine dar. So kann es zur Bildung intrazellulärer Aggregate kommen (MIZUNO et al., 2001).

CAMPBELL et al. (2002) berichteten erstmals über ein monomeres rot fluoreszierendes Protein (mRFP). Dieses wurde in dieser Arbeit als Tag für das Protein P01_orf1033 eingesetzt. P01_orf1033 wurde in den Vektor pKV kloniert, in welchem mRFP integriert war. mRFP war in pKV von den Schnittstellen für *EcoRI* und *SmaI* am 5'-Ende und *BamHI* am 3'-Ende ingeramt. Die Insertion von P01_orf1033 erfolgte zwischen der *EcoRI* und der *SmaI*-Schnittstelle, am 5'-Ende von mRFP.

3.5.1 Amplifikation von P01_orf1033 über PCR

Entsprechend der DNA-Sequenz des P01_orf1033 wurden Oligonucleotide ausgewählt (siehe Kap. 2.3). Diese enthielten in einem Fall die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *ApaI* bzw im anderen Fall die Schnittstelle für *EcoRI* und ein glattes Ende. Mittels der Technik der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde das P01_orf1033-Fragment wie in Kap. 2.9.1 beschrieben mit diesen Oligonukleotiden amplifiziert. Als Matrizen-DNA wurde das Cosmid pcos MPP1 (WENZEL & HERRMANN, 1989) (siehe Kap. 2.2) eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen, das Gel ist in **Abb. 3.5.1** dargestellt.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

PCR-Ansatz:

PWO-Polymerase	1 U
Template-DNA (100 µg/ml)	0,5 µl
DMSO	5 µl

Experimente und Ergebnisse

Oligo P01 FW (10 pmol/μl)	4 μl
Oligo P01 RV (10 pmol/μl)	4 μl
dNTP (10 mM)	1 μl
MgSO ₄ (25 mM)	8 μl
PWO-Reaktionspuffer (10 ×)	5 μl
H ₂ O _{bidest.}	ad 50 μl

Programm:

Denaturierung	94 °C	2 min
Denaturierung	94 °C	30 sec
Annealing	53 °C	30 sec
Elongation	72 °C	6,5 min
Endelongation	72 °C	8 min
Ende	4 °C	üN

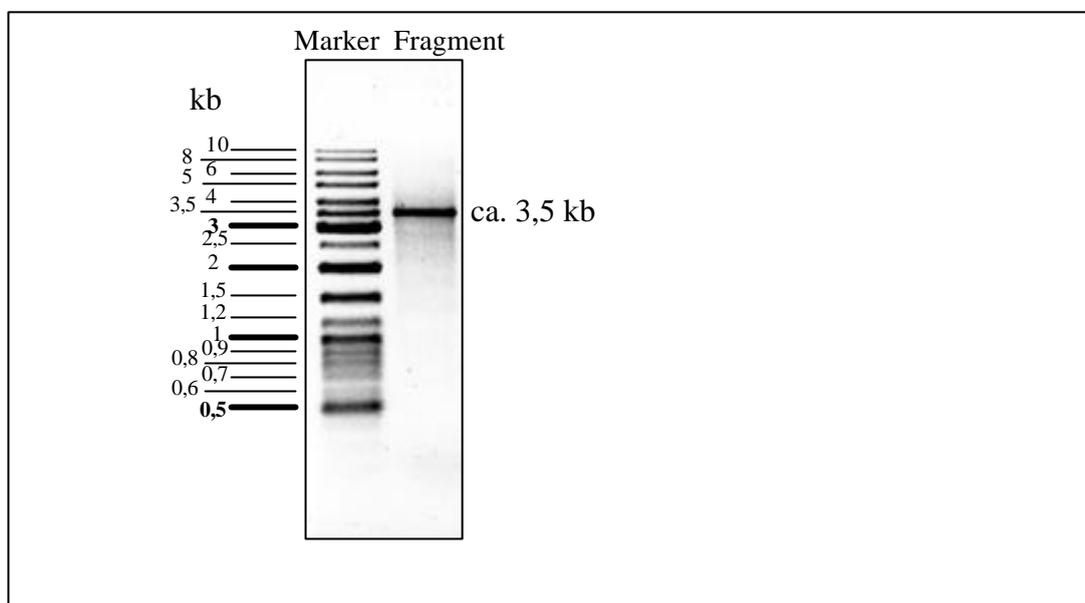


Abb. 3.5.1: Ergebnis der Amplifizierung des P01_orf1033-Fragments durch PCR

Es wurden 5 μl des PCR-Ansatzes auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Die PCR mit den Oligonucleotiden P01-FW-*Eco*RI und P01-RV-*Apa*I ergab ein Fragment von ca. 3,5 kb.

3.5.2 Klonierung des Fragmentes P01_orf1033 in pKVmRFP

Der Vektor pKVmRFP und das PCR-Produkt P01_orf 1033 wurden zunächst mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI geschnitten und nach der Ligation (siehe Kap. 2.9.3) für die Transformation von *E. coli* Top 10-Zellen eingesetzt (siehe Kap. 2.9.5). pKVmRFP codiert für eine Ampicillin-Resistenz. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Amp-Platten ausgestrichen. Die Plasmid-DNA der erhaltenen Kolonien wurde gemäß Kapitel 2.9.6.1 präpariert und ungeschnitten auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. Als Referenz diente der ungeschnittene Vektor pKVmRFP. Klone, deren Plasmid-DNA im Gel ein höheres Molekulargewicht aufwies als pKVmRFP, wurden für die Restriktionsanalyse ausgewählt. In **Abb. 3.5.2** ist exemplarisch eines dieser Plasmide im Gel dargestellt. Zum Vergleich ist daneben der ungeschnittene Vektor dargestellt. Die weiteren im Vergleich zu pKVmRFP größeren Plasmide liefen im Gel alle in gleicher Höhe. Die Zellen aller zugehörigen Klone zeigten rote Fluoreszenz bei Anregung mit UV-Licht unter Verwendung des Filtersatzes 43 (siehe Kap. 2.6.3).

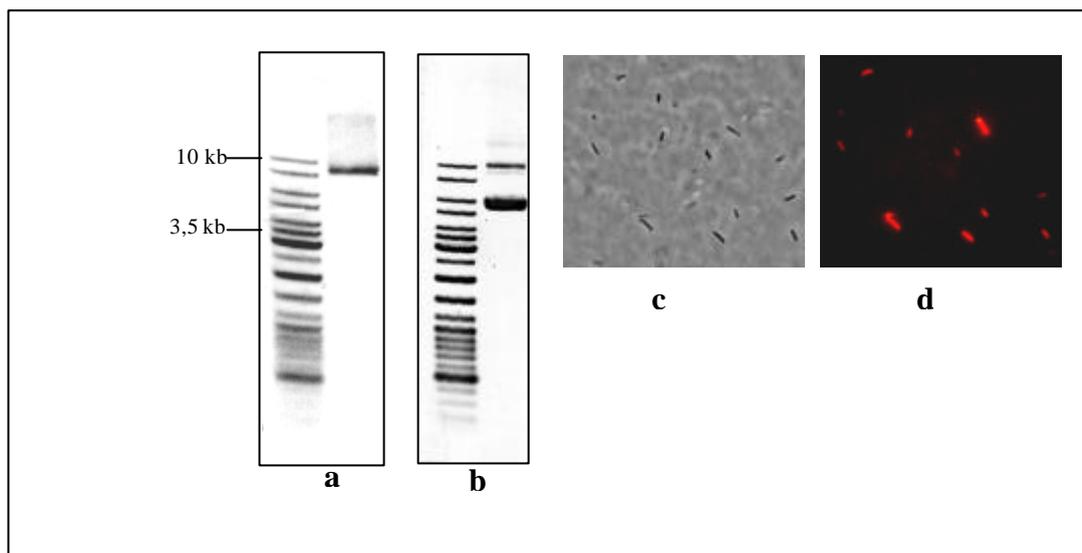


Abb. 3.5.2: Aus der Transformation mit dem mit P01_orf1033 ligierten Vektor pKVmRFP erhaltenes Plasmid und Zellen des zugehörigen Klons im Fluoreszenztest

Es wurden 2 μ l der Plasmidpräparation bzw der Vektor-Arbeitslösung auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen. In a ist exemplarisch eines der erhaltenen Plasmide dargestellt, in b der ungeschnittene Vektor pKVmRFP. Zellen des Klons wurden auf Platte angezogen. Etwas Zellmaterial wurde von der Platte auf einen Objektträger überführt und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. In c ist das Phasenkontrastbild dargestellt, in d das Fluoreszenzsignal des selben Ausschnittes wie in c.

3.5.3 Nachweis des P01_orf1033-Proteins in den transformierten *E. coli*-Zellen mittels Western-Blot

Die erhaltenen fluoreszierenden Klone wurden mittels Western-Blot auf die Expression des P01_orf1033-Proteins getestet. Es wurde Zellextrakt unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (siehe Kap. 2.10.3). Als Kontrolle wurden auf dem Gel zusätzlich ein fluoreszenznegativer Klon sowie *M. pneumoniae*-Zellextrakt aufgetragen. Die mit dem Serum reagierenden Banden wurden durch Alkalische-Phosphatase-Reaktion sichtbar gemacht (siehe Kap. 2.10.4). Die gefärbte Nitrocellulosemembran ist in **Abb. 3.5.3** dargestellt. Der *M. pneumoniae*-Zellextrakt zeigt eine Hauptbande bei ca 150 kDa und schwächere kleinere Banden, die wahrscheinlich von Protein-Abbauprodukten herrühren. Das P01_orf1033-Protein hat laut Vorhersage ein relatives Molekulargewicht von 118000, läuft aber im Gel bei höherem Molekulargewicht (ca 150 kDa) und bildet Dimere (REGULA, 1999). Die hier mit *M. pneumoniae*-Zellextrakt erhaltene Bande bei ca 150 kDa entspricht der erwarteten Monomer-Bande. Die positiven *E. coli*-Klone zeigen eine Bande bei ca 180 kDa. Das Molekulargewicht von mRFP beträgt ca 30 kDa (CAMPBELL et al., 2002). Die Bande bei ca 180 kDa entspricht demnach wahrscheinlich dem Fusionsprotein P01_orf1033 mit mRFP.

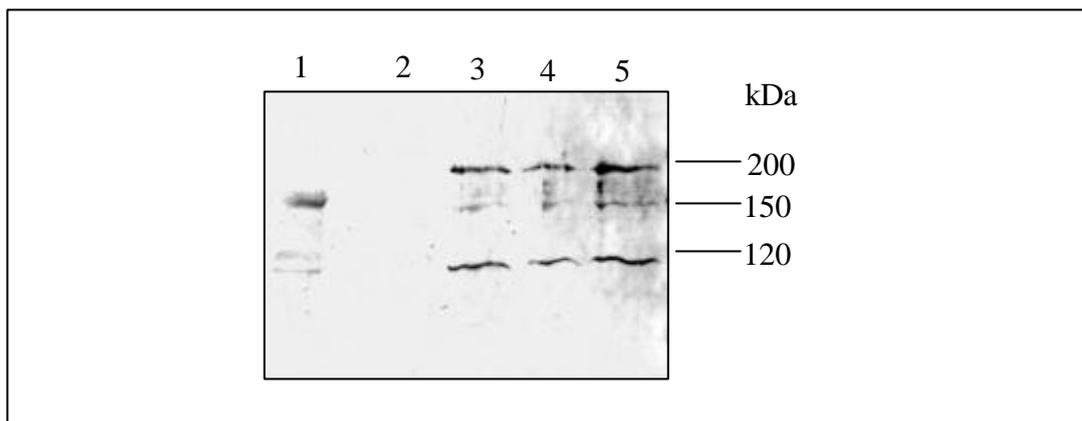


Abb. 3.5.3: Western-Blot von drei der erhaltenen fluoreszierenden *E. coli*-Klone.

Spur 1: *M. pneumoniae*-Extrakt; Spur 2: Ein fluoreszenz-negativer Klon, Spur 3-5: Drei fluoreszenz-positive Klone.

3.5.4 Sequenzierung der Fusionsstelle P01_orf1033 mit mRFP

Es wurde ein Oligonukleotid ausgewählt, welches 192 Basenpaare entfernt von der Fusionsstelle P01_orf1033 mit mRFP im Gen für mRFP an den codierenden Strang bindet. Die Sequenzierung erfolgte demnach von der Bindestelle des Oligonukleotides aus in Richtung der Fusionsstelle P01_orf1033 / mRFP und über diese hinaus. Die erhaltene Sequenz entsprach demnach dem nichtcodogenen Strang. Der codogene Strang wurde davon abgeleitet. Die Sequenz wurde geprüft, sie ist auszugsweise im folgenden dargestellt:

CAAACCCACGAAATTAAAACAAAGCAAGACGAAACTGTTAAAGAGGTCATT

ATTGTGGAAAAGGAAATTCCAGTGCCACCCGAAAAGAAACCACGGCTAAAA

AAACGTGATATNGTGATCGAAAACAAGGAAGATGCTTTGGGCAAGTTATCC

AAAAAGGAACGGATCCAAGCGTACGCTGAACGCCTAGCTAAGATCAATGGC

k k e r i q a y a e r l a k i n g

AAGCAG	GGGCCCCACAGCGGG	GCCTCCTCCGAGGACGTCATCAAGGAGTTC
k q	g p h s g	a s s e d v i k e f
P01 3' →		← 5' mRFP

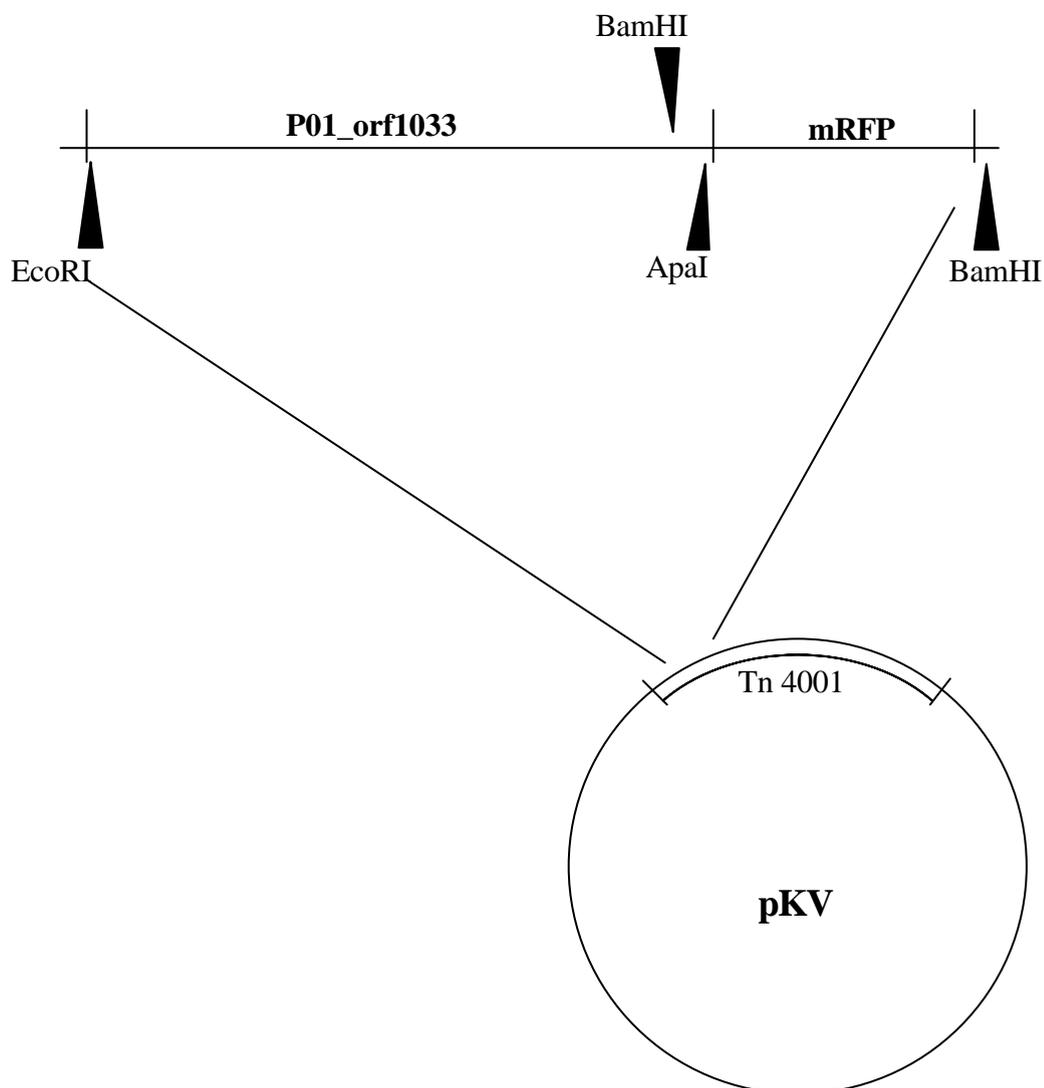
ATGCGATTCATAGNGTGTCGCANCCGAGGGGCTCCGAAAACGAGCCA

m r f

Die Basensequenz ist in 5' nach 3' –Richtung dargestellt. Die Sequenz beginnt innerhalb des P01_orf 1033 und geht über die Fusionsstelle bis in das Gen für mRFP. Das 3'-Ende von P01_orf1033 und das 5'-Ende von mRFP sind gekennzeichnet. Im Bereich des Überganges von P01_orf1033 nach mRPF ist zusätzlich zur Basensequenz die Aminosäuresequenz angegeben.

3.5.5 Zusammenfassung der Klonierung von P01_orf1033

P01_orf1033 wurde so in den Vektor pKVmRFP kloniert, daß sich das Gen für mRFP ohne Unterbrechung des Leserasters am 3'-Ende von P01_orf1033 anschließt. Folgende Skizze verdeutlicht die Lage von P01_orf1033 im Transposon Tn 4001 im Vektor pKV mit den vorhandenen Schnittstellen für die entsprechenden Restriktionsenzyme (siehe auch Kap. 2.2).



4. Diskussion

4.1 Adhäsion und Bewegung von *M. pneumoniae*

Es ist bekannt, daß *M. pneumoniae* sich auf Glasoberflächen gleitend fortbewegt (RADESTOCK & BREDT, 1977), Chemotaxisgene für Che-Proteine konnten jedoch im Genom von *M. pneumoniae* nicht identifiziert werden (HIMMELREICH et al., 1996; DANDEKAR et al., 2000). Alle Mycoplasmen, die zum Gleiten auf Oberflächen fähig sind, zeigen eine flaschenförmige Zellform mit mit einer Membranausstülpung, dem „Tip“ oder „Bleb“, welche für die Bewegung und Adhäsion an der Oberfläche der Wirtszelle verantwortlich ist (KIRCHHOFF & ROSENGARTEN, 1984; KIRCHHOFF, 1992; RAZIN et al., 1998).

Die Bewegung von *M. pneumoniae*-Zellen auf Glasoberfläche wurde auch in dieser Arbeit im Detail dokumentiert. Bewegungen von *M. pneumoniae* konnten beobachtet werden, welche auf eine Kommunikation zwischen Zellen hinweisen; z. B. lösten sich von Zellverbänden einzelne Zellen ab, welche sich anschließend auf der Glasoberfläche in Richtung benachbarter Zellverbände fortbewegten, dort andockten und in den neuen Zellverband integriert wurden. Ob das Cytoplasma solcher gewanderten Zellen mit dem Cytoplasma des neuen Zellverbandes in Verbindung tritt, kann im Lichtmikroskop nicht erkannt werden (siehe Kap. 3.1.7).

Die in dieser Arbeit gemessene Geschwindigkeit, welche gleitende *M. pneumoniae*-Zellen erreichen, wurde mit $\sim 0,5 \mu\text{m} / \text{min}$ deutlich niedriger bestimmt als in der Studie von Radestock und Bredt, wo die durchschnittliche Geschwindigkeit mit $0,3 - 0,5 \mu\text{m} / \text{sec}$ angegeben wird (RADESTOCK & BREDT, 1977). Die hier ermittelten Werte dienen lediglich dem Vergleich zwischen Zellen mit und ohne Zellkörper, die Versuchsbedingungen entsprachen nicht denen von Radestock und Bredt.

Die Geschwindigkeit von Einzelzellen ohne Zellkörper ist laut der in dieser Arbeit gemessenen Geschwindigkeiten deutlich höher als die Geschwindigkeit von Einzelzellen mit Zellkörper. Ein Zellkörper stellt demnach ein Hemmnis für die sich fortbewegende Zelle dar. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß die Kraftübertragung von der Zelle auf die Glasoberfläche ausschließlich am Tip, nicht am Zellkörper stattfindet.

Diskussion

Es sind in einer Kultur stets bewegte und unbewegte Zellen zu beobachten. Die Anzahl unbewegter Zellen nimmt mit dem Alter der Kultur zu (siehe Kap. 3.1). Es stellt sich hier die Frage, woran eine Zelle „erkennt“, daß sie sich bewegen soll oder nicht. Da beobachtet wurde, wie bewegte Zellen ihre Bewegung beenden und unbewegte Zellen anfangen sich zu bewegen, kann ausgeschlossen werden, daß es zwei verschiedene Zelltypen gibt, von denen eine Sorte beweglich und die andere unbeweglich ist. Die Beobachtungen lassen vielmehr darauf schließen, daß von jedem Tip, ob zu einer Einzelzelle oder zu einem Zellverband gehörend, das Potential zur Aufnahme einer Bewegung ausgeht. Der auslösende Reiz hierzu ist nicht erkennbar.

Eine Kultur von *M. pneumoniae* bewächst eine Glasoberfläche gleichmäßig, in der Art wie auch schwärmende Bakterien Agarplatten von einer Kolonie ausgehend mit einem gleichmäßigen Zellrasen bedecken. Es muß demnach eine Wahrnehmung für die vorhandene Zelldichte auf der Glasoberfläche vorhanden sein. Gene für Quorum sensing wurden allerdings im Genom von *M. pneumoniae* nicht identifiziert (HIMMELREICH et al., 1996; DANDEKAR et al., 2000).

Bewegte Einzelzellen können ihre Bewegung beenden und zu einem neuen Zellverband „auskeimen“. Dies scheint der Verbreitungsmechanismus der Zellen auf der Oberfläche zu sein. Wie weiß eine sich bewegende Einzelzelle, ob und wann sie „seßhaft“ werden soll? Die Bewegung von schnellen Einzelzellen, die keinen Zellkörper besitzen, verläuft häufig in gebogenen Linien, wobei plötzliche Richtungswechsel häufig beobachtet werden können (RADESTOCK & BREDT, 1977; persönliche Mitteilung von E. Jacobs; diese Arbeit). Eine Bewegung über eine lange Strecke wird somit unwahrscheinlich. Dies entspricht in Grundzügen dem Prinzip des „random walk“ bei schwimmenden begeißelten Bakterien, welche hierbei auch nur begrenzte Strecken in geradliniger Bewegung durchführen können und dann stets einen Richtungswechsel vollziehen müssen.

Der Mechanismus, der für die Gleitbewegung sorgt, ist bei Mycoplasmen nicht bekannt. Auf eine noch nicht verstandene Art und Weise muß von den Zellen eine Kraft auf den Untergrund, im Experiment die Glasoberfläche, auf der sie gleiten, übertragen werden.

Die äußerste Zellschicht, die Cytoplasmamembran, steht in direktem Kontakt zur Glasoberfläche. Es kann angenommen werden, daß eine Kraftübertragung immer mechanische Vorgänge mit Aktion fester Strukturkomponenten beinhaltet. Die

Diskussion

Cytoplasmamembran allein wäre demnach alleine nicht zu einer Kraftübertragung auf die Glasoberfläche ausreichend.

Wie kann von einer Mycoplasma-Zelle Kraft so auf Glas übertragen werden, daß eine gleitende Bewegung der Zelle hieraus resultiert? Bei *M. pneumoniae* wird diese Kraft vom Tip ausgeübt, und auch bei *Mycoplasma mobile*, welcher ebenfalls zu einer gleitenden Bewegung befähigt ist, geht die Kraft von einer Zellausstülpung aus, die auch das in Bewegungsrichtung vordere Ende der Zelle darstellt (MIYATA & UENOMA, 2002). Eine Ähnlichkeit des Kraftübertragungsmechanismus zwischen *M. mobile* und *M. pneumoniae* ist wahrscheinlich (MIYATA & SETO, 1999). Untersuchungen an Mutanten von *M. mobile* bezogen sich bisher nur auf Koloniformen und Adhäsionsverhalten (MIYATA et al., 2000), eine Aussage über mögliche am Gleitmechanismus von *M. mobile* beteiligte Proteine ist bisher nicht möglich.

Für das schwimmende, unbegeißelte Cyanobakterium *Synechococcus* wurde ein Mechanismus für eine schwimmende Bewegung vorgeschlagen, der auf Kontraktionswellen beruht, die an der Zelle entlanglaufenden (EHLERS et al., 1996). Der Vorschub wird hiernach durch ein Verschieben von Wassermolekülen entlang der Zelle vom vorderen zum hinteren Ende hin bewirkt. Eine nach vorn laufende Kontraktionswelle nähert sich einem in unmittelbarer Zellnähe gelegenen Wassermolekül. Da die Kontraktionswelle an ihrem Mittelpunkt Wasser nach außen abstößt, wird ein auf die Kontraktionswelle hing gerichteter Wasserstrom an der Zelloberfläche erzeugt, welcher das betrachtete einzelne Wassermolekül zunächst anzieht und damit ein Stück weit nach hinten bewegt. Am Mittelpunkt der Kontraktionswelle wird das Wassermolekül etwas von der Zelle abgestoßen, um dann von der nachfolgenden Expansionswelle, welche auf das zellnahe Wasser einen Sog ausübt, wieder angezogen zu werden und damit wieder ein Stück nach hinten entlang der Zelle bewegt zu werden. Durch die resultierende Bewegung des Wassers nach hinten wird die Zelle vorgeschoben. Dieses Prinzip der in Bewegungsrichtung des Organismus nach vorn laufenden Welle wird auch von anderen Organismen genutzt, so z. B. von Ciliaten oder auch gegliederten Insekten mit vielen Beinpaaren.

SAMUEL et al. (2001) konnten bei *Synechococcus* von der Zelle nach außen abstehende filamentöse Strukturen elektronenmikroskopisch abbilden. Diese Strukturen ragen bis ca. 50 nm in das die Zelle umgebende Medium und scheinen durch die Peptidoglycanschicht zur inneren Membran zu reichen. Beim Durchgang

Diskussion

von Kontraktionswellen könnte es bei diesen Strukturen zu einer Bewegung kommen, die vom Prinzip her der des Cilienschlages bei Ciliaten entspricht.

Könnte ein solcher Mechanismus auch von Mycoplasmen genutzt werden? Da *M. pneumoniae* und *M. mobile* nicht schwimmen, sondern gleiten, kann das vorgeschlagene Modell nicht ohne weiteres übertragen werden. Möglicherweise entlang des Tip verlaufende Kontraktionswellen könnten bei *M. pneumoniae* einen Rückstoß auf die Glasoberfläche ausüben. Da die Zugkraft, wie gezeigt werden konnte, hier tatsächlich nur vom Tip ausgeht, und dieser Bereich nur einige hundert Nanometer lang ist, wäre dieser Mechanismus wenig effizient, da die ganze Zelle fortbewegt werden muß und die Kontraktionswellen nur wenige hundert Nanometer weit laufen könnten.

Sollte es bei Mycoplasmen in kleinerem Maßstab ein ähnliches System geben wie bei *Synechococcus*, und die nach außen stehenden Strukturen würden mit Oberflächen in Wechselwirkung treten, so könnte vom Tip eine größere Zugkraft ausgehen als bei Kontraktionswellen ohne nach außen stehende kraftübertragende Strukturen. Das Protein P1 (siehe Kap. 3.3.3.7 / 4.12) könnte eine solche Funktion ausüben. Es besitzt Transmembranbereiche und ist sowohl in An- als auch in Abwesenheit der Cytoplasmamembran nach außen exponiert (siehe Kap. 3.3.3.7). Es bleibt allerdings weiterhin unklar, wie die Adhäsion vonstatten geht.

Myxobakterien können sich durch Gleiten fortbewegen. Sie hinterlassen auf einer Agaroberfläche, auf welcher sie gleiten, Spuren aus Schleim (WOLGEMUTH & OSTER, 2003). Zwischen der Mureinschicht und der äußeren Membran befinden sich bei *Myxococcus fulvus* und *M. xanthus* kontraktile Aggregate aus kettenförmig aneinandergereihten ringförmigen Untereinheiten, denen eine Funktion beim Gleitvorgang zugeschrieben wird (LÜNSDORF & REICHENBACH, 1989; FREESE et al., 1997; Review: SPORMAN, 1999).

Sowohl bei Myxobakterien (WOLGEMUTH et al., 2002) als auch bei Cyanobakterien (HOICZYK & BAUMEISTER, 1995) konnten an den Zellpolen düsenähnliche Komplexe elektronenmikroskopisch abgebildet werden, aus welchen Schleim sezerniert wird. Diese Komplexe durchspannen Peptidoglycan und äußere Membran und stellen eine Pore dar, die nach außen mündet und von welcher aus Schleim abgegeben wird, der bei der Gleitbewegung einzelne, den Poren entsprechende Spuren auf dem Untergrund zurückläßt (WOLGEMUTH et al., 2002).

Diskussion

Die Geschwindigkeit der Gleitbewegung ist unabhängig von der Zelllänge. Dies konnte bei Myxobakterien durch Untersuchungen an gegenüber dem Wildtyp elongierten Mutanten gezeigt werden (SPORMANN, 1999). Eine weitestgehende Konzentration der Kraftübertragung auf die Zellpole ist daher anzunehmen. Weiterhin existieren Hinweise, daß beide Zellpole unabhängig voneinander vor- und rücktreibende Kraft ausüben können (SPORMANN, 1999). Für *Mycoplasma pneumoniae* ist keine mit der Gleitbewegung einhergehende Schleimbildung bekannt. In dieser Arbeit konnten am äußersten Ende des Tip von *M. pneumoniae* reihenförmig angeordnete Partikel abgebildet werden, welche ihrer Lage nach zu urteilen in der Cytoplasmamembran liegen, aber hier nicht frei diffundierbar vorliegen, sondern mit inneren Strukturen, möglicherweise dem peripheren Cytoskelett, verbunden oder eng benachbart sind (siehe Kap. 3.3.2.12). Die Dimensionen dieser Partikel ähneln mit ca. 10 nm denen der in *Myxococcus xanthus* abgebildeten Poren, welche einen Durchmesser von 12-14 nm aufweisen (WOLGEMUTH et al., 2002). Sollte eine Kraftübertragung von der Zelle auf den Untergrund, auf dem sie gleitet, von solchen Strukturen in beiden Richtungen, das hieße schiebender und ziehender Natur möglich sein, so könnten die in dieser Arbeit an *Mycoplasma pneumoniae* am Tip beobachteten Strukturen an der gleitenden Bewegung von *M. pneumoniae* beteiligt sein. Die Frage nach der Herkunft der erforderlichen Schleimmenge, die ein Forttreiben einer Zelle über weite Strecken erfordert, bleibt in der Literatur unbeantwortet. Die Gleitgeschwindigkeit individueller Zellen ist bei *Myxococcus xanthus* abhängig von der Entfernung zur nächsten Zelle, wobei die Geschwindigkeit bei größerem Abstand geringer ist (SPORMANN & KAISER, 1995). Dies könnte auf eine Abhängigkeit der Gleitgeschwindigkeit von bereits vorhandenem, von anderen *M. xanthus*-Zellen sezerniertem Schleim hinweisen. Eine Aufnahme von vorhandenem Schleim am in Bewegungsrichtung vorderen Zellende und Abgabe am hinteren Ende könnte einen Vorschub eines Zellschwarmes über weite Distanzen ermöglichen, da die primäre Produktion von Schleim nur von den im Schwarm vorne gleitenden Zellen ausgeführt werden müßte und die nachfolgenden Zellen den schon vorhandenen Schleim nutzen könnten. Dieses Argument spricht wiederum gegen einen entsprechenden Mechanismus bei Mycoplasmen, da diese nicht in Schwärmen gleiten, sondern sich als Einzelzellen in individuellen Bahnen bewegen.

LÜNSDORF & SCHAIRER (2001) schlugen ein weiteres Modell für einen Gleitmechanismus bei Myxobakterien vor. Hiernach zieht sich entlang der

Diskussion

Längsachse der Zellen eine helicale Falte, welche sich während der Gleitbewegung so auf der Zelle verschiebt, daß eine rückwirkende Kraft auf den Untergrund übertragen wird und die Zelle dadurch vorgeschoben wird. Auch bei diesem Mechanismus wird die optimale Ausnutzung der vorschiebenden Kraft nur erreicht, indem sich die helicale Falte über die gesamte Zelle in ganzer Länge erstreckt. Ein anderer bei *Myxococcus xanthus* beobachteter Bewegungsmechanismus, bei dem die Fortbewegung der Zelle durch Retraktion von Typ IV-Pili hervorgerufen wird (SKERKER & BERG, 2001), wird von *M. pneumoniae* nicht genutzt. Es konnten elektronenmikroskopisch keine Pili abgebildet werden, und im Genom von *M. pneumoniae* sind keine Sequenzen für Pilusproteine enthalten (HIMMELREICH et al., 1996; DANDEKAR et al., 2000).

Generell erfordert die örtliche Limitierung der Kraftübertragung auf den Tip-Bereich bei *Mycoplasma pneumoniae* ein sehr effizientes System zur Kraftübertragung auf den Untergrund.

M. pneumoniae-Zellen adhären über den Tip so fest an Glas, daß sie auch durch starke Strömungen, die zwischen Objektträger und Deckglas entstehen können, nicht vom Glas losgelöst werden. An Lungenepithelzellen, dem natürlichen Habitat von *M. pneumoniae*, könnte die stabile Adhäsion durch Unebenheiten des Untergrundes und Zell-Zell-Wechselwirkungen zustande kommen, Glas hingegen bietet nur eine glatte Oberfläche ohne haltgebende Struktur. Der Adhäsionsmechanismus muß daher unabhängig von der Beschaffenheit des Untergrundes sein. Adhäsion durch spezifische Wechselwirkung von Adhäsinen mit bestimmten Oberflächenkomponenten der Wirtszellen kann daher als alleiniger Mechanismus ausgeschlossen werden, obgleich solche Wechselwirkungen natürlich zusätzlich existieren können. CHIBA et al. (2002) konnten zeigen, daß *M. pneumoniae*-Zellen an Surfactant Protein D (SP-D) binden, einem Bestandteil des aus einer Mischung aus Lipiden und Proteinen bestehenden Schleimes auf der Alveolenoberfläche der menschlichen Lunge. Es konnte gezeigt werden, daß die Bindung über die Cytoplasmamembran von *M. pneumoniae* erfolgt und daß Glycolipide die Bindungspartner für SP-D sind. Hieraus kann geschlossen werden, daß die Adhäsion von *M. pneumoniae* nach verschiedenen Prinzipien erfolgt, bzw. mehrere Typen von Adhäsinen in der Zellmembran von *M. pneumoniae* vorhanden sind (CHIBA et al., 2002; ROTTEM, 2003).

Diskussion

Haftung an glatten Oberflächen kann z. B. durch Kleben, Ansaugen oder elektrostatische Wechselwirkungen erfolgen. Auf der Oberfläche des Tip könnten polymere Substanzen sezerniert werden, die den Kontakt zum Glas stabilisieren. Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) üben eine stabilisierende Funktion bei der Entstehung von Biofilmen aus, allerdings kommt die stabilisierende Wirkung der EPS erst bei Vorhandensein einer größeren Anzahl von Organismen zustande. Es ist umstritten, ob EPS eine Rolle bei der primären Adhäsion von Einzelzellen an Oberflächen zukommt (WOLFAARDT et al., 1999). Gegen das Prinzip der Adhäsion durch EPS spricht bei Mycoplasmen die Fähigkeit zur schnellen Fortbewegung. Eine durch Polymere hergestellte klebende Verbindung wäre nicht flexibel und würde die Bewegung nicht ermöglichen.

Eine Verbindung durch punktuellen Unterdruck, also ein Ansaug-Mechanismus, würde eine Organisation des Tips erfordern, die es ermöglicht, kleine Bereiche der Oberfläche partiell nach innen zu ziehen, um somit zwischen der Oberfläche des Tip und dem Glas einen Unterdruckbereich zu schaffen. Wenn ein solcher Apparat es ermöglichen würde, den Unterdruckbereich erst vorne am Tip anzulegen und diesen dann kontinuierlich nach hinten zu verschieben, könnte hierdurch eine Zugbewegung auf die Zelle ausgeübt werden. Die hierzu erforderliche Einstülpung der Zellhülle müßte von innen her generiert werden. Hierbei könnte der Rod insofern eine Rolle spielen, als er mit der Innenseite der Zellhülle über Linker verbunden zu sein scheint und biegsam ist (siehe Kap. 3.3.2.3 / 10). Gegen dieses Modell spricht die Dimension des Tips. Das Aufrechterhalten eines Unterdrucks wird mit abnehmender Größe des im Unterdruck befindlichen Volumens schwieriger, sodaß ein lokal am Tip erzeugter Unterdruck wahrscheinlich schnell wieder zusammenbrechen würde, und eine Zugbewegung nicht ausgeführt werden könnte.

Eine Adhäsion über elektrostatische Wechselwirkungen müßte, um die Bewegung zu gewährleisten, ebenfalls punktuell an- und abschaltbar sein. Eine Zugkraft könnte dann nach dem gleichen Prinzip wie für die Unterdruckbereiche beschrieben ausgeübt werden.

Durch periodisches Dehnen und Zusammenziehen des Rod könnte eine Bewegung entstehen. Wenn der Tip im vorderen Bereich adhärieren und der Rod sich dann durch Zusammenziehen verkürzen würde, würde die Zelle um die Strecke, um die sich der Rod verkürzt hat, nach vorn gezogen. Durch anschließendes Ablösen des Tip vom Untergrund, Dehnen des Rod und erneutes Adhärieren des Tip im vorderen Bereich

Diskussion

könnte der gesamte Schritt wiederholt werden. Eine hieraus resultierende Bewegung der Zelle wäre nicht kontinuierlich, sondern würde schrittweise erfolgen. Die Adhäsion der Zelle wäre nicht permanent gewährleistet. Ein solcher Bewegungsmechanismus wurde für *M. mobile* diskutiert (WOLGEMUTH et al., 2003).

Voraussetzung hierfür wäre die Fähigkeit des Rod zur Kontraktion entlang der Längsachse. In dieser Arbeit konnte elektronenmikroskopisch erkannt werden, daß der Rod im Tip von *M. pneumoniae* aus parallelen Längsfasern mit periodischen Verdickungen entlang der Fasern besteht. Wenn die Verdickungen kontraktile Elemente als periodische Unterbrecher von langgestreckten coiled-coil-Bereichen des Rod-Proteins darstellen, so könnte durch gleichzeitige Kontraktion aller zur Kontraktion fähigen Abschnitte der Aminosäurekette des Rod-Proteins eine Kontraktion des Rod zustandekommen. Ob die Art der Bewegung bei *M. pneumoniae* schrittweise oder glatt verläuft, konnte lichtmikroskopisch nicht erkannt werden. Die einzelnen Schritte einer schrittweisen Bewegung könnten möglicherweise so schnell verlaufen, daß die Bewegung glatt erscheint. Wenn eine gleitende *M. pneumoniae*-Zelle in sehr kurzen Zeitintervallen fotografiert würde, könnte eine schrittweise Bewegung vielleicht erkannt werden.

Ein ähnlicher Mechanismus wäre denkbar, wenn der Rod nicht kontraktil ist, sondern die Variation des Abstandes vom vorderen zum hinteren Ende durch abwechselndes Biegen und Strecken des Rod zustande kommt. Daß der Rod biegsam ist, konnte elektronenmikroskopisch in dieser Arbeit gezeigt werden (siehe Kap. 3.3.2.3).

Grundsätzlich muß, wenn der auf die Zelle wirkende Vorschub vom Rod vermittelt wird, eine Verbindung des Rod mit der Zellhülle gegeben sein. Mögliche Bewegungsmechanismen als Zusammenspiel des Rod und den in dieser Arbeit dargestellten Linkermolekülen zwischen Rod und Zellhülle (siehe Kap. 3.3.2.10) sind in **Abb. 4.1** dargestellt. Eine schrittweise Verschiebung von Massen würde aus dem in Bild **a** gezeigten Mechanismus resultieren. Hier schieben die Linker durch Vorklappen die Zellhülle nach vorn, nachdem die Adhäsion der Zelloberfläche an den Untergrund vorübergehend gelöst wurde. Als Stator dient der Rod, an dem die Linker beweglich ansitzen. Der Rod könnte hierbei durch am Rod anhaftende, mit der relativ zum Rod großen Masse des Zelleibs verbundene Fibrillen gestützt werden, oder / und durch eine Verankerung mit der bisher undefinierten Masse an seinem distalen Ende. Nach Vorschub der Zellhülle erfolgt eine neue Adhäsion und die Linker klappen

Diskussion

wieder nach hinten, wobei der Rod zusammen mit der Gesamtzelle vorgeschoben wird. Eine permanente Adhäsion des Tip an den Untergrund wäre bei diesem Mechanismus nicht gegeben. In Bild **b** ist ein Mechanismus dargestellt, bei welchem immer eine Seite des Tip adhärirt ist, während die andere Seite durch Vorklappen der Linker vorgeschoben wird. Hieraus würde eine glatte Bewegung mit prinzipiell permanenter Adhäsion des Tip an den Untergrund resultieren. Um die beiden vorgeschlagenen Mechanismen zu untersuchen, wären zahlreiche längs durch den Tip geführte Kryoultradünnschnitte erforderlich, um zu erfahren, ob die einzelnen in **Abb. 4.1** schematisch dargestellten Zustände mit entsprechender Häufigkeit gefunden werden können.

4.2 Die „Zellteilung“ bei *M. pneumoniae*

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an *M. pneumoniae* führten zu der Entwicklung eines Zellteilungsmodells, nach dem der Zellteilung bei *M. pneumoniae* eine Verdopplung des Tip vorausgeht (SETO et al., 2001).

Eine Verdopplung des Tip benötigt einen Reproduktionsmechanismus für den Rod, da der Rod stets im Tip lokalisiert ist. Nach den in dieser Arbeit vorgestellten elektronenmikroskopischen Daten kann der Rod in der lebenden Zelle im Tip eine Längspaltung durchmachen, welche stets am distalen Ende beginnt. Die von SETO et al. (2001) vorgeschlagene Verdopplung des Tip beginnt ebenfalls am distalen Ende. Daraus läßt sich schließen, daß der Teilung und Verdopplung des Tips eine Teilung des Rod vorausgeht.

Nach dem in dieser Arbeit vorgestellten Modell des Rod und nach dem Modell von BALISH et al. (2003) besteht der Rod aus einem Polymer aus mehreren parallel angeordneten Kopien eines fibrillären Proteins. Eine Polymerisation von einzelnen Proteinmolekülen zu einer Struktur von definierter Größe erfordert immer einen Mechanismus zur Regulation, um ein unkontrolliertes Polymersieren zu verhindern. Wenn sich der Rod aufspaltet, könnten die beiden resultierenden Hälften jeweils als Polymerisationskeim und Matrix dienen und damit für eine kontrollierte Rekomplettierung des Rods sorgen.

Der Begriff „Zellteilung“ ist bei *M. pneumoniae* nicht gleichermaßen zu verwenden wie bei anderen Bakterien, bei denen aus genau einer Zelle genau zwei Zellen durch

Diskussion

Teilung entstehen. *M. pneumoniae* verfolgt bei der Vermehrung eine andere Strategie. Ein Zellrasen besteht größtenteils nicht aus einzelnen, zählbaren individuellen Zellen, sondern vielmehr neben einigen Einzelzellen hauptsächlich aus größeren und kleineren Zellverbänden, die aus unterschiedlich vielen, miteinander verwachsenen Zellkörpern und Filamenten bestehen. Die Entstehung von Einzelzellen ist nicht, wie z. B. bei typischen Stäbchenbakterien, das Resultat einer Einschnürung und schließlichen Trennung der Tochterzellen, sondern eher als die Folge vom Abreißen einzelner Teile des Zellverbandes vom Zellverband zu verstehen. Der Mechanismus der Abtrennung ist nicht weiter bekannt. Nach den in dieser Arbeit vorgestellten Daten aus der Lebendbetrachtung wird von einzelnen Tip-Bereichen eines Zellverbandes ein Zug ausgeübt, welcher dann zum Abriß dieses Tips inklusive eines größeren oder kleineren am Tip angrenzenden Anteils des Zellverbandes unter Entstehung einer Einzelzelle oder eines neuen, kleinen Zellverbandes führt. Ob eine aktive Einschnürung diesem Prozeß vorausgeht bzw. ihn begleitet, kann nicht eindeutig erkannt werden. Ein bloßes unkontrolliertes Abreißen erscheint jedoch unwahrscheinlich, da in dem Fall das Cytoplasma auslaufen würde. Es muß daher einen Mechanismus geben, der an der Abtrennungsstelle für ein Verschließen der neu entstandenen Enden sorgt. FtsZ ist in *M. pneumoniae* vorhanden (HIMMELREICH et al., 1996; DANDEKAR et al., 2000) und könnte daher, wie bei anderen Prokaryonten, an der Bildung eines Septums und der Abschnürung zweier Zellen voneinander beteiligt sein (siehe Kap. 3.3.3.4). Dies wird im folgenden Kapitel diskutiert.

4.3 FtsZ

Es konnte in dieser Arbeit durch Immun-Goldmarkierungen an Ultradünnschnitten eine punktförmige Verteilung von FtsZ im Cytoplasma und an der Zellperipherie beobachtet werden. Die Deutung dieser Ergebnisse ist in **Abb. 3.3.36** dargestellt (siehe Kapitel 3.3.3.4).

Es erscheint naheliegend, daß eine ringförmige Verteilung von FtsZ in der Zelle zu den beobachteten Markierungsergebnissen führen würde.

Die Ergebnisse der Immun-Elektronenmikroskopie entsprechen hier nicht den Ergebnissen der Immun-Fluoreszenzmikroskopie, nach denen FtsZ am Tip lokalisiert zu sein scheint.

Diskussion

Grundsätzlich unterscheidet sich die Situation zwischen Ultradünnschnittpräparaten und Fluoreszenzpräparaten darin, daß die Zellen für die Ultramikrotomie von der Unterlage, an welche sie während des Wachstums adhäriert waren, vor der Fixierung abgelöst werden. Präparate für die Fluoreszenzmikroskopie werden in ihrer natürlichen Lage fixiert.

Eine prinzipielle Umverteilung von Proteinen in der Zelle durch die Ablösung wäre für interne, strukturgebende Proteine allerdings schwer vorstellbar.

Eine Abbildung von internen FtsZ-Ringen wäre wiederum durch Fluoreszenzmikroskopie aufgrund der geringen Dimensionen wahrscheinlich nicht möglich. Daß Hinweise auf solche Strukturen nur durch Elektronenmikroskopie gefunden, aber nicht durch Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden, wäre demnach nicht zwingend ein Widerspruch.

Eine Lokalisation am Tip, wie sie durch Fluoreszenzmikroskopie für FtsZ beobachtet wurde, sollte jedoch durch Immun-Elektronenmikroskopie bestätigt werden können.

Die Sensitivität der Immun-Goldmarkierung scheint gegenüber derjenigen von Immun-Fluoreszenzmarkierungen deutlich herabgesetzt zu sein (siehe Kap. 4.6), sodaß möglicherweise eine positive Reaktion am Tip nicht durch Elektronenmikroskopie bestätigt werden kann. Da aber Hinweise auf eine ringförmige Verteilung von FtsZ im Zellkörper per Elektronenmikroskopie gefunden wurden, scheint die Kreuzreaktivität dieser Ringe mit FtsZ-Antikörpern in Ultradünnschnitten deutlich höher zu sein als die Reaktivität des im Tip lokalisierten Antigens, welches in der Immun-Fluoreszenz mit den Antikörpern kreuzreagiert.

Eine Lokalisation von FtsZ am Tip könnte auf eine Rolle von FtsZ bei der Verdopplung des Tip (siehe Kap. 4.2) hinweisen. Wenn sich der Tip teilt, muß es zu einer Einschnürung kommen, die an der Spitze des Tip beginnt und soweit fortschreitet, bis zwei neue Tips aus einem alten entstanden sind. Die Richtung einer solchen Einschnürung wäre nicht die einer gewöhnlichen Querwand, sondern im rechten Winkel dazu. FtsZ könnte diese Einschnürung bewirken. **Abb. 4.2** zeigt mögliche Mechanismen der Zellreproduktion von *M. pneumoniae*. In Bild **a** ist die Verdopplung eines Tips mit darinliegendem Rod dargestellt. Dieses Modell beruht auf fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, nach denen der Tip von *M. pneumoniae* sich durch Teilung repliziert (MIYATA & SETO, 1999), in Kombination mit Daten dieser Arbeit (siehe Kap. 3.3.2.6).

Diskussion

In Bild **b** ist der Vorgang der Elongation eines Zellausläufers mit seiner anschließenden Abtrennung dargestellt, wie er direkt lichtmikroskopisch dokumentiert werden konnte (siehe Kap. 3.1.3 ff). Für die Abtrennung soll hier ein kontrollierter Einschnürvorgang angenommen werden. Wenn die Einschnürung des elongierten Zellausläufers durch einen FtsZ-Ring vonstatten geht, so wären dadurch die bei Immun-Fluoreszenzmarkierungen erhaltenen Signale zu erklären, wenn der FtsZ-Ring nach Ablösen der neuen Einzelzelle noch an der Einschnürungsstelle verbleibt und daher mit Antiserum reagiert.

Es konnte gezeigt werden, daß sich an Zellkörpern auch ohne bereits bestehende Zellausläufer neue Zellausläufer bilden können (siehe Kap. 3.1.7). Diese erfordert demnach einen Mechanismus zur Entstehung neuer Zellausläufer, der sich von dem in **Abb. 4.2. a** unterscheidet. Hier könnte die Funktion der Zellkörper-lokalisierten FtsZ-Ringe liegen, die aufgrund der Ergebnisse der Immun-Goldmarkierungen vorgeschlagen wurden (siehe **Abb. 3.3.35 / 36**). **Abb. 4.3** zeigt schematisch einen möglichen Ablauf der Tip-Bildung ohne vorher existierenden Tip. Demnach bildet FtsZ unmittelbar unter der Cytoplasmamembran einen Ring um den Zellkörper, welcher sich einschnürt und dabei eine Ausstülpung der Zelnhülle bewirkt. Aus dieser bildet sich dann ein Tip. Dieses Modell könnte die bei Immun-Goldmarkierungen erhaltenen Signale erklären.

4.4 Das periphere Cytoskelett von *Mycoplasma pneumoniae*

Es konnte in dieser Arbeit an *M. pneumoniae* erstmals eine unter der Cytoplasmamembran gelegene Schicht abgebildet werden, welche eine hexagonale Strukturierung aufweist (siehe Kap. 3.3.1.3). Diese Schicht konnte elektronenmikroskopisch dann abgebildet werden, wenn die Cytoplasmamembran von den Zellen abgelöst war. Eine Methode zur Ablösung der Cytoplasmamembran von Zellen unter Erhalt der Zellform wurde in dieser Arbeit vorgestellt (siehe Kap. 2.8.1.2). Sie stellt ein Präparationsverfahren für periphere Cytoskelettkomponenten unter weitestgehendem Erhalt ihrer natürlichen Anordnung dar. Das Prinzip der Methode beruht auf unterschiedlicher Wirkung von Glutaraldehyd auf verschiedene Zellbereiche. Die nach außen exponierte Cytoplasmamembran war nach der Fixierung von *M. pneumoniae*-Zellen noch für die Lyse im Detergenz Triton X-100 zugänglich

Diskussion

und konnte somit von den Zellen abgelöst werden. Die darunter gelegene Schicht war durch die Glutaraldehydfixierung stabilisiert und blieb bei der TX-100-Lyse in ihrer Form erhalten.

Für Immun-Fluoreszenzmarkierungen an Mycoplasmen wird eine Behandlung mit TX-100 nach vorheriger chemischer Fixierung zur Permeabilisierung der Membran durchgeführt (SETO et al, 2001; SETO & MIYATA, 2003).

Zur besseren Darstellung von Zellkomponenten von Fibroblasten im SEM wurde von Nakamura eine Formaldehydfixierung mit anschließender Detergenz-Behandlung vorgestellt (NAKAMURA, 2001).

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Methode führte zur Darstellung eines die Zellen von *M. pneumoniae* unter der Cytoplasmamembran umspannenden Netzwerkes, welches hier als peripheres Cytoskelett gedeutet wird. Nach den hier vorgelegten Daten besteht das periphere Cytoskelett aus einem hexagonalen Netzwerk, welches nach außen hin über auf dem Netzwerk regelmäßig angeordnete Noppen mit der Cytoplasmamembran in Verbindung steht.

Dieses Modell ähnelt der Vorstellung vom peripheren Membranskelett bei Erythrocyten. Hier existiert ebenfalls ein unter der Membran lokalisiertes Netzwerk, dieses ist aus Spektrin aufgebaut und über Ankerproteine (Ankyrin) mit membranintegralen Proteinen verbunden (PUMPLIN & BLOCH, 1993).

Periphere Stützapparate sind grundsätzlich bei Bakterien in Form von Peptidoglycan vorhanden, bei Mycoplasmen wurde bisher nur die Cytoplasmamembran als die Zelle umgebende Schicht beschrieben. Ein Erhalt der asymmetrischen Zellform erfordert, zusätzlich zu einer peripheren Stützschicht, interne Komponenten. Das hier beschriebene periphere Cytoskelett ist damit nicht als alleiniges Modell für die Erklärung des Mechanismus der Stabilisierung der Zellform ausreichend.

Im Bereich des Tip konnten interne Linker abgebildet werden, welche die Innenseite der Zellhülle mit dem im Tip gelegenen Rod verbinden. Der Erhalt der Zellform im Bereich des Tip könnte demnach über diese Linker erfolgen.

Der Erhalt einer asymmetrischen Zellform wirft auch bei anderen Prokaryonten trotz vorhandener Zellwand die Frage nach internen Stützfunktionen auf. Das von NORRIS et al. (1996) vorgeschlagene Modell vom Enzoskelett bei *E. coli* kann zur Erklärung des Erhalts der asymmetrischen Zellform bei Mycoplasmen herangezogen werden.

In *Mycoplasma gallisepticum* konnten Mikrotubuli-ähnliche, parallel verlaufende, die Zelle unter der Cytoplasmamembran umspannende Strukturen

Diskussion

elektronenmikroskopisch abgebildet werden. Zellextrakte von *M. gallisepticum* zeigten in Immun-Blots eine Reaktion einer 40 kDa-Bande mit Antikörpern gegen Schweinehirn-Tubulin (KORELEV et al., 1994). Die abgebildeten Strukturen ähneln dem in dieser Arbeit vorgestellten peripheren Cytoskelett insofern, als sie unter der Cytoplasmamembran lokalisiert sind. Die Organisation der Strukturen in *M. gallisepticum* ist nicht die eines Netzwerkes, es handelt sich um parallel die Zelle entlang ihrer Längsachse umspannende Fibrillen. Über ähnliche Strukturen wurde bisher bei keiner anderen Mycoplasmen-Art berichtet.

4.5 Stabilisierung der Zellform bei Bakterien

Bakterien, die nicht kokkoid, sondern z. B. stäbchenförmig sind, müssen ihre Form gegenüber dem Zellturor stabilisieren. Hierfür sind verschiedene Modelle vorstellbar. Es können strukturgebende Ringe oder Helices aus Proteinpolymeren die Zelle an der Zellperipherie umspannen, oder es existiert eine innere Achse entlang der Zelle, von welcher aus Speichen zur Innenseite der Zellwand ragen. Der Durchmesser von Helices oder Ringen müßte entweder durch festgelegtes self-assembly determiniert sein, oder durch vor der Polymerisation existierende Strukturen vorgegeben sein, die als Matrix und Schablone für die Polymerisation dienen (YOUNG, 2003).

FtsZ bildet Ringe (MUKHERJEE & LUTKENHAUS, 1998; LUTKENHAUS, 2002), deren Durchmesser nicht konstant ist (LU et al., 2000). MreB und Mbl bilden Spiralen an der Zellperipherie (JONES et al., 2001). Deren Durchmesser ist ebenfalls nicht konstant, die helicale Windung von Mbl-Polymeren ist dynamisch (CARBALLIDO-LOPEZ & ERRINGTON, 2003), und *in vitro* polymerisierte MreB-Filamente zeigen andere Windungs-Durchmesser als die Bakterienzellen, aus welchen sie stammen (van den ENT et al., 2001).

Mycoplasmen gehören mit Rhizobien, Corynebakterien und Myxobakterien zu den Gruppen von Bakterien, die kein MreB besitzen; hier muß es demnach einen anderen Mechanismus zum Erhalt der Zellform geben. DANIEL & ERRINGTON (2003) stellten u.a. bei Corynebakterien polare Wachstumszonen fest, welche nach der Teilung beibehalten werden. Dies könnte den Erhalt der Stäbchenform erklären, wenn

Diskussion

vom Zellpol während einer apikalen Verlängerung des Zellzylinders der Zelldurchmesser determiniert würde.

Bei *M. pneumoniae* konnten teilweise sehr schnell verlaufende Verlängerungen von filamentösen Bereichen beobachtet werden. Ein apikales Wachstum würde einen sehr schnellen polaren Einbau von Hüll-Komponenten erfordern. DANIEL & ERRINGTON (2003) konnten bei *Bacillus subtilis* und anderen gram-positiven Bakterien durch Färbung mit Vancomycin-Fluorescein nascierendes Peptidoglycan anfärben und konnten ein helicales Muster an wachsenden Zellen abbilden. Die Hüllsynthese erfolgt also hier nicht nur über den gesamten Zellzylinder verteilt (ARCHIBALD et al., 1993), sondern entlang helical um die Zelle verlaufender Bereiche. MENDELSON et al. (1976) berichteten über eine gegenläufige Verdrehung der beiden Zellpole wachsender *B. subtilis*-Zellen.

Ein gleichzeitiger Einbau von Hüllkomponenten an mehreren Bereichen erscheint bei *M. pneumoniae* aufgrund der schnellen Elongation filamentöser Bereiche wahrscheinlicher als ein rein apikales Wachstum.

Einzelne, sich optisch von der Zellhülle abhebende helical gewundene Verstrebungen, wie sie durch MreB und Mbl gebildet werden, konnten bei *M. pneumoniae* nicht gefunden werden. Im Tip-Bereich kann *M. pneumoniae* als ein Beispiel für den Formerhalt mittels innerer Achse und radiärer Speichen aufgeführt werden. Die in dieser Arbeit dargestellten, lateral am Rod ansitzenden Linker können einen Formerhalt des Tip ermöglichen, wenn sie, wie vorgeschlagen, eine Verbindung zwischen dem im Tip-Bereich als Achse fungierenden Rod und der Zellhülle darstellen. Achsiale, sich durch mehrere in Ketten angeordnete Zellen ziehende Filamente, wurden in *E. coli* bei Überexpression von CafA beobachtet (OKADA et al., 1994). Eine strukturell ähnliche Erscheinung konnte bei Mycoplasmen beobachtet werden. Verschiedene aus Ziegen und Rindern isolierte Mycoplasmen bilden bei bestimmten Anzuchtbedingungen eine Sonderform aus: die *rho* Form (PETERSON et al., 1973; RODWELL et al., 1975). Es handelt sich hierbei um lineare Zellketten, in welchen die Zellen durch einen langen, festen, quergestreiften Stab verbunden sind, der sich durch die gesamte Zellkette erstreckt. Die Proteinkomposition dieser Struktur ist nicht bekannt.

NORRIS et al. (1996) stellten für *E. coli* die These des "Enzoskeletts" auf. Hiernach ist die Zelle durchzogen von einem Netzwerk aus polymeren Multienzymkomplexen und DNA. Das gesamte Cytoplasma stellt demnach einen dreidimensionalen,

Diskussion

geordneten Raum dar, in welchem Metabolismus und Strukturgebung von gleichen Komponenten ausgeführt werden. Die DNA ist in demnach in das „Enzoskelett“ integriert und mit der Cytoplasmamembran verbunden.

Ein solches „Enzoskelett“ kann elektronenmikroskopisch nicht unmittelbar im Detail abgebildet werden, das Cytoplasma von ultradünngeschnittenen Bakterienzellen erscheint, abgesehen von bestimmten Einlagerungen, mehr oder weniger homogen.

Allerdings kann die These vom „Enzoskelett“ im Zusammenhang mit dem in dieser Arbeit vorgestellten peripheren Cytoskelett bei *Mycoplasma pneumoniae* zur Erklärung des Formerhalts der Zellen herangezogen werden.

4.6 Immun-Gold- und Immun-Fluoreszenzmarkierungen: Vor- und Nachteile

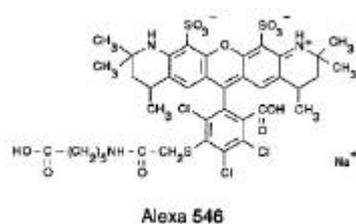
In der vorliegenden Arbeit konnten durch Immun-Fluoreszenzmarkierungen mit insgesamt 16 verschiedenen Seren positive Signale am Tip von *M. pneumoniae* erhalten werden. Durch Immun-Goldmarkierungen konnte nur bei einem Teil dieser Seren die Reaktion am Tip bestätigt werden. Es gibt einige Aspekte, welche zur Erklärung der geringeren Sensitivität von elektronenmikroskopischen Immun-Goldmarkierungen gegenüber Immun-Fluoreszenzmarkierungen herangezogen werden können.

Der Zugang zum Antigen ist für die Antikörper bei Ultradünnschnitten von in Kunstharz eingebetteten Proben durch die Kaschierung der Probe im Harz behindert. Es sind lediglich die Bereiche der Probe für den Antikörper erreichbar, welche in der Anschnittfläche zum Vorschein kommen. Da die Schnittdicke von Ultradünnschnitten in der Regel zwischen 50 und 100 nm liegt und alles im Schnitt enthaltene Material zur Abbildung beiträgt, aber nur das Material mit Antikörpern kreuzreagieren kann, welches exponiert ist, ist das Verhältnis von markierbarem zu sichtbarem Material relativ gering. Um diesem Problem entgegenzuwirken, können Ultradünnschnitte vor der Inkubation mit dem Primärantikörper mit Wasserstoffperoxyd-Lösung angeätzt werden. Hierbei wird das im Kunstharz liegende Material an der Oberfläche stärker freigelegt. Ein Zugang von Antikörpern zur Probe wird damit erleichtert. Die Exposition von Probenmaterial an der Oberfläche bleibt dennoch verhältnismäßig zur Menge im Schnitt vorhandenen Materials gering.

Diskussion

Während der Präparation für die Ultramikrotomie erfahren die Proben mehrere Behandlungen, welche zur Absenkung der Antigenität führen können. Die Fixierung mit Aldehyden führt zur Abschwächung der spezifischen Reaktion mit Antikörpern. Dieser Schritt ist weder bei Immun-Goldmarkierungen noch bei Immun-Fluoreszenzmarkierungen verzichtbar. Die Entwässerung der Probe mit organischen Lösungsmitteln führt zur Denaturierung von Proteinen und damit in der Ultrastruktur u. U. zu Artefakten. Solche Artefakte können z. B. Verklumpungen des Cytoplasmas mit der Folge eines grobkörnigen Erscheinungsbildes sein. In Kryo-Ultradünnschnitten, für welche das Material nicht entwässert wird, kann das Cytoplasma homogener abgebildet werden.

Der Sekundärantikörper ist bei Immun-Goldmarkierungen an eine 10 nm große Gold-„Kugel“ gekoppelt. Das Alexa 546-Molekül, welches bei Immun-Fluoreszenzmarkierungen an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, hat (exclusive der Seitenkette) eine Größe von ca. 1-2 nm. Neben der Größe ist auch die Masse des



Struktur des Alexa 546-Moleküls (aus: PANCHUK-VOLOSHINA et al., 1999)

Goldpartikels aufgrund der hohen Dichte deutlich höher als die des Alexa-Moleküls. Gewicht und Größe des Goldpartikels könnten die Bindung an den Primärantikörper behindern.

Ein weiterer Nachteil der Immun-Goldmarkierungen gegenüber Immun-Fluoreszenzmarkierungen besteht neben der geringeren Sensitivität auch im deutlich höheren Arbeitsaufwand.

Dennoch sind Immun-Goldmarkierungen unverzichtbar, wenn die Sublokalisierung innerhalb der Zellen bestimmt werden soll. Aus Fluoreszenzbildern kann bei so kleinen Objekten wie Mycoplasma-Zellen keine Zuordnung des Fluoreszenzsignals zu Zellinnerem gegenüber Zellperipherie erkannt werden. Bei positiven Signalen am Tip kann keine weitere Differenzierung in bestimmte Bereiche des Tip erfolgen.

Die Fluoreszenzmikroskopie an *M. pneumoniae* stellt damit vor allem eine gute, sensitive Methode für ein relativ schnell durchzuführendes Screening von Antisera

Diskussion

auf positive Reaktion am Tip dar. Immun-Goldmarkierungen können dann im Einzelfall Aufschluß über die jeweilige Sublokalisierung geben, hierzu ist die Fluoreszenzmikroskopie an Mycoplasmen ungeeignet.

4.7 Das P01_orf1033-Protein

Die Expression des P01_orf1033-Proteins wurde von REGULA (1999) nachgewiesen. Das 118 kDa große Protein weist laut Strukturvorhersage eine coiled-coil Region auf. Western-Blot-Untersuchungen ergaben eine Tendenz zur Dimer- und Multimerisierung (REGULA, 1999). Dem Protein könnten demnach strukturgebende Funktionen zukommen. Es ist ca. 25 % Sequenzhomologie zu HMW2 festgestellt worden (REGULA, 1999). In dieser Arbeit konnte immunelektronenmikroskopisch eine Lokalisation des Proteins in oder an der Cytoplasmamembran von *M. pneumoniae* nachgewiesen werden, mit gleichmäßiger Verteilung über die gesamte Zelloberfläche, ohne verstärkte Konzentration am Tip. Bei TX-100-Fraktionierungsexperimenten verteilt sich P01_orf1033 gleichsam auf TX-100-lösliche wie unlösliche Fraktionen (REGULA, 1999). Dies könnte, wie für HMW1 postuliert (BALISH et al., 2001), eine teilweise Assoziation mit Cytoskelettkomponenten bedeuten.

Eine direkte Beteiligung am Aufbau des vorgeschlagenen peripheren Cytoskeletts ist aufgrund der Ergebnisse der Immun-Goldmarkierungen unwahrscheinlich, da das Protein offensichtlich zusammen mit der Cytoplasmamembran von Zellen abgelöst wurde (siehe Kap. 3.3.3.3). Als Membranprotein mit strukturgebenden Eigenschaften wäre für P01_orf1033 eine vermittelnde Funktion zwischen dem peripheren Cytoskelett und der Außenwelt vorstellbar. Die mögliche Anordnung von P01_orf1033 ist in **Abb. 4.4** schematisch dargestellt.

4.8 EF-Tu

EF-Tu zeigt strukturell und funktionell große Ähnlichkeiten zum eukaryotischen EF1alpha: Beide sind GTPasen, katalysieren die Bindung von Aminoacyl-tRNA an

Diskussion

Ribosomen und regulieren die Elongation von Polypeptiden (CONDEELIS, 1995; SPRINZL, 1994). EF1alpha bindet an Aktin und Tubulin, ein Zusammenspiel mit dem Cytoskelett wird daher vermutet (CONDEELIS, 1995).

EF-Tu stellt bei Bakterien einen hohen Anteil am Gesamtprotein dar (5 % bei *E. coli*) und liegt zu EF-Ts, einem mit EF-Tu im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 an der Proteinsynthese beteiligten Protein, in drei- bis fünffachem Überschuß vor (JACOBSON & ROSENBUSCH, 1976). Es stellt sich daher die Frage, ob EF-Tu eine zusätzliche Funktion außer der Beteiligung an der Proteinsynthese zukommt.

EF-Tu polymerisiert unter bestimmten Bedingungen zu Fibrillen und kann an DNase I binden (BECK et al., 1978). Insofern besitzt EF-Tu Ähnlichkeiten zu eukaryotischem Aktin.

EF-Tu ist unter Bakterien und Archaea weit verbreitet. WEBER et al. (1995) testeten Organismen auf Reaktion mit einem monoklonalen Antikörper gegen EF-Tu und erhielten positive Reaktionen mit nahezu allen getesteten Prokaryonten, aber mit keinem Eukaryonten. Bei *E. coli* fanden Jacobsen und Rosenbusch Hinweise auf eine Assoziation von EF-Tu mit der inneren Seite der Cytoplasmamembran (JACOBSON & ROSENBUSCH, 1976).

Die Fähigkeit zur Polymerisation, sowie die Assoziation mit der Innenseite der Cytoplasmamembran bei *E. coli* sind Aspekte, die eine Beteiligung von EF-Tu am in dieser Arbeit vorgeschlagenen peripheren Cytoskelett von *M. pneumoniae* vermuten lassen, da dieses ebenfalls ein Polymer darstellen könnte und an der Innenseite der Cytoplasmamembran lokalisiert ist.

Weitere Hinweise auf eine strukturgebende Funktion von EF-Tu-Polymeren in *E-coli*-Zellen ergaben sich durch Expression von unvollständigem EF-Tu, bei welchem eine Bindungsstelle für die Polymerisation zu Filamenten fehlt (MAYER, 2003, b). Dieses unvollständige EF-Tu-Molekül war noch zur Bindung an zelleigenes, vollständiges EF-Tu fähig, führte aber beim Einbau zum Abbruch der weiteren Polymerisation. Die Störung der Polymerisation von EF-Tu durch Anwesenheit von unvollständigem EF-Tu konnte auch *in vitro* durch elektronenmikroskopische Studien nachgewiesen werden (MAYER, 2002). Die Expression des unvollständigen EF-Tu führte zur Lyse der Zellen. Dies ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß EF-Tu tatsächlich als Polymer eine lebenswichtige Funktion für die Zelle besitzt und nicht nur als Monomer in die Proteinsynthese involviert ist.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit ergaben immunelektronenmikroskopische Tests unter Einsatz von Antiserum gegen EF-Tu Hinweise auf eine Verteilung von EF-Tu in *M. pneumoniae*-Zellen sowohl im Cytoplasma als auch an der Zellperipherie. Die Oberfläche von *M. pneumoniae*-Zellen war erst nach Ablösen der Cytoplasmamembran für EF-Tu-Antikörper zugänglich. EF-Tu scheint hiernach bei *M. pneumoniae* nicht in der Cytoplasmamembran lokalisiert zu sein, jedoch in der unmittelbar unter der Cytoplasmamembran gelegenen Schicht vorzukommen (siehe Kap. 3.3.3.5). Das in dieser Arbeit vorgeschlagene periphere Cytoskelett, welches unter der Cytoplasmamembran liegt, könnte demnach EF-Tu beinhalten. Polymerisationsstudien an EF-Tu ergaben filamentöse Polymere (BECK et al. 1978), deren elektronenmikroskopisches Erscheinungsbild sich von dem des in dieser Arbeit abgebildeten peripheren Cytoskeletts insofern unterscheidet, als bei EF-Tu-Polymeren *in vitro* keine Ausbildung eines hexagonalen Musters beobachtet wurde. Eine Aufreinigung von EF-Tu aus *M. pneumoniae* und Polymerisationsstudien hieran könnten Aufschluß darüber geben, ob *M. pneumoniae*-EF-Tu zu Strukturen mit hexagonalem Muster polymerisieren kann.

Eine Reaktion von anti-EF-Tu-Serum mit während der TX-100-Präparation aus den Zellen ausgetretenem EF-Tu ist insofern unwahrscheinlich, als die Zellen nach der TX-100-Behandlung, vor der Immunmarkierung, mehrmals gewaschen waren und vorher mit Glutaraldehyd fixiert wurden.

Die beobachtete Verteilung der Goldpartikel ist bei mit anti-EF-Tu-Serum markierten Zellen häufig reihenförmig. Sollte bei der Präparation cytosolisches EF-Tu aus den Zellen ausgetreten sein, welches dann mit dem Serum reagiert hätte, so sollte sich eine ungleichmäßigere Verteilung der Signale ergeben. Demnach könnten außerhalb der Zelle zu beobachtende Signale von fibrillärem EF-Tu herrühren, welches von der Zelloberfläche stammt.

4.9 HMW1 – als Linker mit dem Rod verbunden?

HMW1 ist ein 112 kD-Protein, welches laut Strukturvorhersage möglicherweise in drei Domänen unterteilt ist. Für Domäne I wurden beta-Faltblätter mit turns, für Domäne II hauptsächlich alpha-Helices mit einigen turns und für Domäne III eine Mischung aus Faltblättern, Helices und turns postuliert (DIRKSEN et al., 1996).

Diskussion

HMW1 konnte in der vorliegenden Arbeit durch Immun-Fluoreszenzmarkierungen am Tip und durch Immun-Goldmarkierungen am Rod lokalisiert werden. Es gab bei der Beurteilung der erhaltenen Signale Hinweise auf eine Anordnung von HMW1 in kurzen, teilweise schräg verlaufenden Linien. Die an Ultradünnschnitten erhaltenen Signale ähneln sehr stark den von Stevens und Krause beobachteten Signalen (STEVENS & KRAUSE, 1991). Eine solche Anordnung des Proteins würde am ehesten den in dieser Arbeit beschriebenen, den Rod umgebenden Linkern entsprechen. Diese werden im hier vorgestellten Modell des Rod als schräg zwischen Rod und peripherem Cytoskelett angeordnet beschrieben.

Für HMW1 wurde eine Abhängigkeit von HMW2 beschrieben. So liegt HMW1 in Mutanten, welche HMW2 nicht exprimieren, nur teilweise in der TX-100-unlöslichen Fraktion vor und wird in der Zelle abgebaut, eventuell durch zelleigene Proteasen (BALISH et al., 2001). HMW1 ist demnach im Wildtyp durch die Anwesenheit von HMW2 stabilisiert. Die Stabilisierung geschieht wahrscheinlich am C-Terminus von HMW1 (BALISH & KRAUSE, 2003). Sollte der Rod aus HMW2 bestehen und HMW1 die Linker bilden, so wäre eine Stabilisierung von HMW1 gegenüber proteolytischem Abbau durch die Verbindung von HMW1 mit HMW2 vorstellbar, da die Linker laut des hier vorgestellten Rod-Modells mit dem Rod verbunden sind.

Serum gegen HMW1 reagiert mit dem Tip von *M. pneumoniae*-Zellen unabhängig von der An- oder Abwesenheit der Cytoplasmamembran; dies konnte in dieser Arbeit durch Immun-Fluoreszenzmarkierungen an Zellen mit und ohne Cytoplasmamembran gezeigt werden (siehe Kap. 3.2).

HMW1 wird ATP-abhängig phosphoryliert, was für eine zumindest teilweise Exposition im Zellinneren spricht (DIRKSEN et al., 1994).

Zusammengenommen sprechen die verschiedenen Befunde für eine Exposition von HMW1 sowohl zur inneren als auch zur äußeren Seite der Zellhülle. Dies wäre in dem Fall gegeben, wenn HMW1 als Linkermolekül den Rod mit der Zellhülle verbindet und durch die Zellhülle nach außen ragt. Es könnte somit zwischen dem Rod und der Außenwelt oder in der Membran sitzenden Adhäsinen vermitteln (**siehe Abb. 4.4 / 4.5**).

4.10 HMW2 – Bestandteil des Rod?

HMW2 ist für die Bildung des Tip notwendig (DIRKSEN et al, 1994; FISSEHA et al., 1999). HMW2 ist ein 216-kd Phosphoprotein, welches laut Strukturvorhersage lange, mehrmals unterbrochene coiled-coil-Bereiche ausweist (KRAUSE et al., 1997; BALISH et al., 2003). Es liegt zum Teil *in vivo* als über Disulfidbrücken verbundenes Dimer vor (STEVENS und KRAUSE, 1990). HMW2 kann, wie HMW1, in ATP-abhängiger Weise phosphoryliert werden, was ein Hinweis auf eine dynamische Funktion sein könnte (DIRKSEN et al., 1994; KREBES et al., 1995). Modifikation von Proteinen in Prokaryonten wurde von COZZONE (1988) beschrieben.

HMW2 stabilisiert HMW1 (BALISH et al, 2001) und HMW3 (POPHAM et al, 1997). In dieser Arbeit wurde ein Modell des Rod entworfen. Gemäß dieses Modells ist der Rod aus parallel angeordneten Längsfasern aufgebaut, welche in definierten Abständen Verdickungen aufweisen. Dieses Modell würde mit der Vorstellung eines Aufbaus des Rod aus HMW2 gut korrelieren. Der Rod ist laut der in dieser Arbeit vorgelegten Daten biegsam. Strukturvorhersagen von HMW2 zeigten, daß HMW2 aufgrund der entlang der ausgestreckten coiled-coil-Bereiche sitzenden Verdickungen nicht starr ist, sondern eher eine kettenartige, flexible Konformation besitzt (KRAUSE et al., 1997). Ein Aufbau des Rod aus parallel angeordneten Molekülen von HMW2 würde aufgrund der Verdickungen auch zu scheinbaren, elektronenmikroskopisch abbildbaren Querlinien führen (siehe Kap. 3.3.2.5 / 8).

Von BALISH et al. (2003) wurde ein Modell des Rod vorgeschlagen, welches HMW2 in parallelen Fasern angeordnet als Hauptkomponente des Rod vorsieht. Nach diesem Modell sind die parallelen, aus HMW2 bestehenden Längsfasern jeweils zu Dimeren zusammengefasst, welche an einem Ende durch Quervernetzungen verbunden sind. Dieses Modell würde mit dem Spaltungsverhalten des Rod korrelieren, welches in dieser Arbeit beobachtet werden konnte (siehe Kap. 3.3.2.6). Demnach kann der Rod in Längsrichtung eine Spaltung durchmachen, welche stets am selben Ende beginnt. Das andere (proximale) Ende des Rod würde, nach dem Modell von BALISH et al. (2003) in Kombination mit dem Modell aus dieser Arbeit, das Ende sein, an welchem die Quervernetzungen liegen.

Die Lokalisation von HMW2 am Tip konnte in der gleichen Studie über eine Fusion mit GFP bestätigt werden (BALISH et al., 2003). Dies ist kein zwingender Beweis für eine Beteiligung von HMW2 am Rod, da im Bereich des Tip auch andere

Diskussion

Komponenten als der Rod beschrieben wurden. So kann ein positives Fluoreszenzsignal am Tip auch auf eine Beteiligung von HMW2 an z. B. den beschriebenen Linkern oder dem Rad hinweisen. Die Auflösung von Fluoreszenzaufnahmen ist für eine Zuordnung zu Substrukturen des Tip nicht ausreichend.

4.11 HMW3

HMW3 wurde in der Literatur als Tip-lokalisiert beschrieben (STEVENS & KRAUSE, 1992). Durch Immun-Fluoreszenzmarkierungen konnte dies in dieser Arbeit bestätigt werden. Serum gegen HMW3 reagiert im Western-Blot mit einer Bande, die in der Höhe einer der drei vom Serum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion erkannten Hauptbanden entspricht. Hiernach ist HMW3 ein Kandidat für die Beteiligung am Aufbau des Rod, da das Serum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion in Immun-Goldmarkierungen an Ultradünnschnitten mit dem Rod reagiert.

Nach Strukturvorhersagen ist das 74 kDa große Protein HMW3 aus β -Faltblättern aufgebaut und ist langgestreckt und starr (OGLE et al., 1992).

Bei einer HMW3-negativen Mutante von *M. pneumoniae* wurden vermehrt Spaltungen des Rod beobachtet, welche sich von den beim Wildtyp beobachteten Spaltungen dadurch unterschieden, daß der Rod am proximalen statt am distalen Ende gespalten vorlag. Die Cytadhärenz dieser Mutante war gegenüber dem Wildtyp abgeschwächt, aber noch vorhanden (WILLBY & KRAUSE, 2002). Es kann für HMW3 beim Wildtyp eine stabilisierende Wirkung auf den Rod angenommen werden. HMW3 wird in HMW2-negativen Mutanten postranslational abgebaut (POPHAM et al, 1997). Immunelektronenmikroskopische Tests ergaben an Ultradünnschnitten teilweise parallele, linienförmig quer über den Rod verlaufende Signale (STEVENS & KRAUSE, 1992).

4.12 Das P1-Protein

Die in der Literatur beschriebene Lokalisation des P1-Proteins am Tip konnte in dieser Arbeit elektronenmikroskopisch und fluoreszenzmikroskopisch bestätigt werden. P1 ist sowohl bei Zellen mit Cytoplasmamembran, als auch bei Zellen, von denen die Cytoplasmamembran entfernt wurde, am Tip lokalisiert. Das Protein scheint daher nicht locker in der Cytoplasmamembran zu liegen, wie es für das Protein P01orf_1033 vorgeschlagen wird, sondern stattdessen mit tiefer liegenden Bereichen, eventuell mit dem peripheren Cytoskelett, eng benachbart zu liegen, da es bei der Glutaraldehydfixierung mit diesen Bereichen vernetzt wird.

P1 ist 169 kDa groß und enthält kein Cystein (INAMINE et al., 1988) und damit keine intramolekularen Disulfidbrücken. Es ist deshalb eine hohe Flexibilität der relativ langen Polypeptidkette zu erwarten (RAZIN & JACOBS, 1992). Eine Exposition an der Oberfläche von *M. pneumoniae* konnte für das Protein P1 durch milde Trypsinierung lebender Zellen ebenfalls nachgewiesen werden (HU et al., 1977). Das Protein P1 weist laut Strukturvorhersage mehrere Transmembranbereiche auf (RAZIN & JACOBS, 1992). Es ist damit wahrscheinlich, daß es nach außen ragt, die Membran durchspannt und an der Innenseite verankert ist. Es liegt nahe, für ein maßgeblich an der Cytoadhärenz beteiligtes Protein eine feste Verankerung in der Zelle anzunehmen, die über bloße Membranintegrität hinausgeht.

M. pneumoniae-P1 zeigt Ähnlichkeiten zu dem 153 kDa-Hauptadhäsion von *Mycoplasma genitalium*, dem MgPa. Beide Proteine besitzen kein Cystein und zeigen einen hohen Prolin-Gehalt am C-terminus (RAZIN & JACOBS, 1992; OPITZ & JACOBS, 1992), was auf eine erhöhte Festigkeit in diesem Bereich schließen läßt. P1 und MgPa lösen beide beim Wirt eine starke Immunantwort aus und werden daher als oberflächenexponiert angesehen. Bei *Mycoplasma gallisepticum* konnten einige oberflächenexponierte Proteine als Adhäsine ermittelt werden, für welche noch keine Strukturvorhersagen vorliegen (ATHAMNA et al., 1997).

Eine mögliche Anordnung von P1 ist in Abb. 4.4 schematisch dargestellt. Es ist demnach mit dem peripheren Cytoskelett verbunden und ragt durch die Cytoplasmamembran nach außen.

4.13 Modell der Anordnung von HMW1, P1 und P01_orf1033

Abb. 4.4 zeigt die nach den Daten dieser Arbeit abgeleitete Verteilung von HMW1, P1 und P01_orf1033. Bild **a** zeigt eine aus einem Zellkörper und einem Zellausläufer mit Tip bestehende *M. pneumoniae*-Zelle. Die zwei markierten Bereiche aus der Zellhülle sind in Bild **b** und **c** im Detail dargestellt, jeweils vor (oben) und nach (unten) der Behandlung mit TX-100 mit vorheriger Fixierung. In Bild **b** sieht man den Bereich am Tip, Bild **c** zeigt einen nicht am Tip liegenden Ausschnitt aus der Zellhülle.

Die Zellhülle ist mit drei Linien dargestellt. Die innere Linie symbolisiert das periphere Cytoskelett, von welchem aus Noppen in die Cytoplasmamembran ragen (siehe Kap. 3.3.1.3-6).

HMW1 konnte am Rod in immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen lokalisiert werden (siehe Kap. 3.3.3.1). Eine gegenseitige Stabilisierung von HMW1 und HMW2, dem laut Literatur zur Zeit am ehesten als Haupt-Rodkomponente in Frage kommenden Protein (BALISH et al., 2003), wurde nachgewiesen (BALISH & KRAUSE, 2003).

Aufgrund dieser Daten wäre HMW1 ein Kandidat für die in dieser Arbeit elektronenmikroskopisch abgebildeten Linker zwischen Rod und peripherem Cytoskelett (siehe Kap. 3.3.2.10).

P1 konnte unabhängig von der Cytoplasmamembran am Tip nachgewiesen werden (siehe Kap. 3.3.3.7). Eine Verbindung von P1 zum peripheren Cytoskelett kann daher angenommen werden.

P01_orf1033 kann zusammen mit der Cytoplasmamembran von fixierten Zellen abgelöst werden und ist daher wahrscheinlich nicht mit dem peripheren Cytoskelett verbunden und liegt auch nicht in unmittelbarer Nähe von mit dem peripheren Cytoskelett verbundenen Proteinen, z. B. P1.

Im Modell ist die Verbindung von P1 zum peripheren Cytoskelett dargestellt, die Anordnung von P01_orf1033 als einzeln in der Cytoplasmamembran angeordnetes Protein ist verdeutlicht. HMW1 ragt vom Rod durch die komplette Zellhülle bis nach außen.

4.14 DnaK

In vergleichenden Western-Blots konnte festgestellt werden, daß die vom Serum gegen DnaK erkannte Bande auch vom Serum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion erkannt wird (siehe Kap. 3.4). Da das Serum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion in immunelektronenmikroskopischen Tests auch mit dem Rod kreuzreagiert, könnte DnaK an der Bildung des Rod beteiligt oder im Bereich des Rod lokalisiert sein. Bei Immun-Fluoreszenz-Tests war keine Reaktion des Serums gegen DnaK mit dem Tip von *M. pneumoniae* zu beobachten; die Bindung des Serums erfolgte gleichmäßig an der gesamten Zelle (nicht gezeigt). Dies spricht gegen eine Beteiligung von DnaK am Aufbau des Rod. DnaK fungiert in *E. coli* als Hitzeschockprotein (GRAGEROV et al., 1992). In *M. pneumoniae* wird DnaK in Reaktion auf einen Hitzeschock verstärkt exprimiert (WEINER et al., 2003). Es verteilt sich bei TX-100-Fraktionierungen gleichmäßig auf lösliche wie unlösliche Fraktion (REGULA et al., 2001). DnaK könnte als Chaperon-ähnliches Protein eine Funktion bei der korrekten Faltung naszierender Rod-Proteine erfüllen.

4.15 Modell des Tip: Kombination der Daten aus dieser und vorangegangenen Arbeiten

Abb. 4.5 berücksichtigt zusätzlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit die Literaturdaten über die Lokalisierung von weiteren Tip-Proteinen. Danach sind die ORF6-Genprodukte, P40 und P90, in direkter Nachbarschaft zu P1 in der Cytoplasmamembran lokalisiert. Bei Crosslinkingexperimenten mit einem Crosslinker, der die Cytoplasmamembran aufgrund lipophober Wechselwirkungen nicht passieren kann, konnte ein Crosslink von P1 mit P40 und P90 an intakten Zellen festgestellt werden. Diese Reaktion muß an der Oberfläche der Cytoplasmamembran stattgefunden haben, wo demnach die genannten Proteine eng benachbart exponiert sein müssen (LAYH-SCHMITT & HERRMANN, 1994).

HMW3 konnte in immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen in parallelen, schrägen Linien am Rod lokalisiert werden (STEVENS & KRAUSE, 1992). Eine stabilisierende Wirkung von HMW3 auf den Rod konnte anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen an einer HMW3-negativen Mutante von

Diskussion

M. pneumoniae aufgezeigt werden. Der Rod war in dieser Mutante auffällig oft längs gespalten, aber nicht in der Art, wie die Spaltung auch beim Wildtyp beobachtet werden konnte (siehe diese Arbeit, Kap. 3.3.2.6), sondern am proximalen Ende beginnend (WILLBY & KRAUSE, 2002).

P30 ist ein für die Cytadhärenz und Bildung des Tips notwendiges Protein, wie an P30-negativen Mutanten gezeigt werden konnte (ROMERO-ARROYO et al., 1999). P30 besitzt laut Vorhersage zwei Transmembranbereiche (DALLO et al., 1990), der C-Terminus wurde als nach außen orientiert beschrieben (DALLO et al., 1996). P30 hat eine stabilisierende Wirkung auf das Protein P65 (KRAUSE & BALISH, 2001) und liegt daher wahrscheinlich mit diesem eng benachbart.

P65 besitzt keine vorausgesagten Transmembranbereiche (PROFT & HERRMANN, 1994) und wurde als zumindest teilweise an der Zelloberfläche lokalisiert beschrieben (PROFT & HERRMANN, 1994).

Die am distalen Ende des Rod in elektronenmikroskopischen Untersuchungen stets deutlich sichtbare Verdickung wurde in der Literatur seit langem als „terminal button“ bezeichnet. Sie ist im Modell orange dargestellt. Es gibt bisher keine Hinweise auf ihre Zusammensetzung und Funktion.

4.16 Modell des Rod

Es konnte aus elektronenmikroskopischen Daten ein Modell des Rod entworfen werden, welches einige strukturelle Aspekte beinhaltet, über die in der bisherigen Literatur nicht berichtet wurde (Kap. 3.3.2.13). Demnach ist der Rod biegsam und lateral über Linker mit der Innenseite der Zellhülle verbunden. Ein Aufbau des Rod aus parallelen HMW2-Dimeren wurde von M. Balish vorgeschlagen (BALISH et al., 2003) und wird in dieser Arbeit diskutiert (siehe Kap. 4. 10).

Das in dieser Arbeit vorgestellte Modell sieht einen massiven zentralen Schaft als Rod vor, der von Linkermolekülen umsäumt ist. Da die Längsspaltung des Rod an Zellen beobachtet werden konnte, welche im lebenden Zustand, ohne Detergenzbehandlung, fixiert wurden, kann ausgeschlossen werden, daß es sich bei dieser Spaltung um einen Präparationsartefakt handelt. Eine im Zellzyklus vorgesehene kontrollierte Spaltung des Rod kann entweder durch längsgerichtete Zweiteilung einer massiven Struktur zustandekommen, oder aber durch einen generellen Aufbau des Rod aus zwei aneinanderliegenden Hälften, welche eine Sollbruchstelle zwischen sich aufweisen.

Diskussion

Möglicherweise ändert sich der Zustand des Rod diesbezüglich während des Zellcyclus. So könnte ein massiver Rod, bevor er sich aufspaltet, zunächst verdoppelt, und die beiden Hälften erst dann voneinander getrennt und auf die entstehenden Tochter-Tips verteilt werden. Ein anderer möglicher Zustand des Rod wäre der, daß der Rod prinzipiell im Grundzustand aus zwei Hälften besteht, welche sich bei der Verdopplung des Tip aufspalten und dann jeweils nach der Teilung des Tip verkompliziert würden. Aus den Daten dieser Arbeit kann die Frage nicht letztendlich geklärt werden, ob der Rod im Grundzustand aus einem zentralen massiven Schaft oder aus zwei aneinanderliegenden Hälften besteht.

Die beobachtete Biegsamkeit des Rod könnte eine Rolle bei der gleitenden Bewegung von *M. pneumoniae* auf Oberflächen (RAZIN et al., 1998) spielen (siehe Kap. 4.1).

Am proximalen Ende des Rod konnte ein aus periodisch angeordneten Untereinheiten aufgebautes Rad abgebildet werden (siehe Kap. 3.3.2.9). Dieser Struktur könnten verschiedene Funktionen zukommen. Es könnte von hier eine Drehbewegung auf den Rod übertragen werden. Das Rad erscheint auf einigen Bildern als doppelte Linie von periodisch angeordneten Untereinheiten. Möglicherweise existieren ein innerer und ein äußerer Ring, welche gegeneinander verdreht werden können. Eine entsprechende Modellzeichnung ist in HEGERMANN et al. (2002) dargestellt. Demnach könnte der äußere Ring über Fibrillen mit der Zelle in Verbindung stehen und somit in seiner Position stabilisiert sein, während der innere Ring sich gegen den äußeren verdreht und die Drehbewegung somit auf den Rod überträgt. Der Rod könnte durch Drehung in Kombination mit Biegung eine Ausrichtung des Tip in verschiedene Richtungen bewirken. Dies könnte einen Mechanismus zum Richtungswechsel bei der Gleitbewegung darstellen.

Die Anzahl von Längsfasern, aus denen der Rod besteht, kann nicht genau erkannt werden, die Zahl kann aber aufgrund der Abb. 3.3.22 auf ca 10 geschätzt werden. Wenn in Seitenansicht des Rod nicht alle Fasern erkannt werden können, könnte die Anzahl höher sein, wahrscheinlich jedoch nicht mehr als 20 Fasern. Dies entspricht größenordnungsmäßig der Anzahl Untereinheiten, die an dem abgebildeten Rad erkannt werden können (siehe Abb. 3.3.23-25). Vorstellbar wäre demnach, daß sich der Rod am proximalen Ende auffasert und die einzelnen Untereinheiten des Rades den proximalen Enden der einzelnen Rod-Fasern entsprechen.

4.17 Klonierung von P01_orf1033

Das Gen für P01_orf1033 konnte in den Vektor pKVmRFP kloniert werden, welcher von C. U. Zimmerman hergestellt wurde. Die Expression in *E. coli* konnte über Westernblot und Fluoreszenzuntersuchung nachgewiesen werden, die richtige Orientierung des Gens im Vektor wurde durch Sequenzierung festgestellt. Es steht damit ein Vektor zur Verfügung, welcher P01_orf1033 als Fusion mit dem Gen für monomeres rotfluoreszierendes Protein beinhaltet. Dieser Vektor kann für Transformation mit *M. pneumoniae* eingesetzt werden.

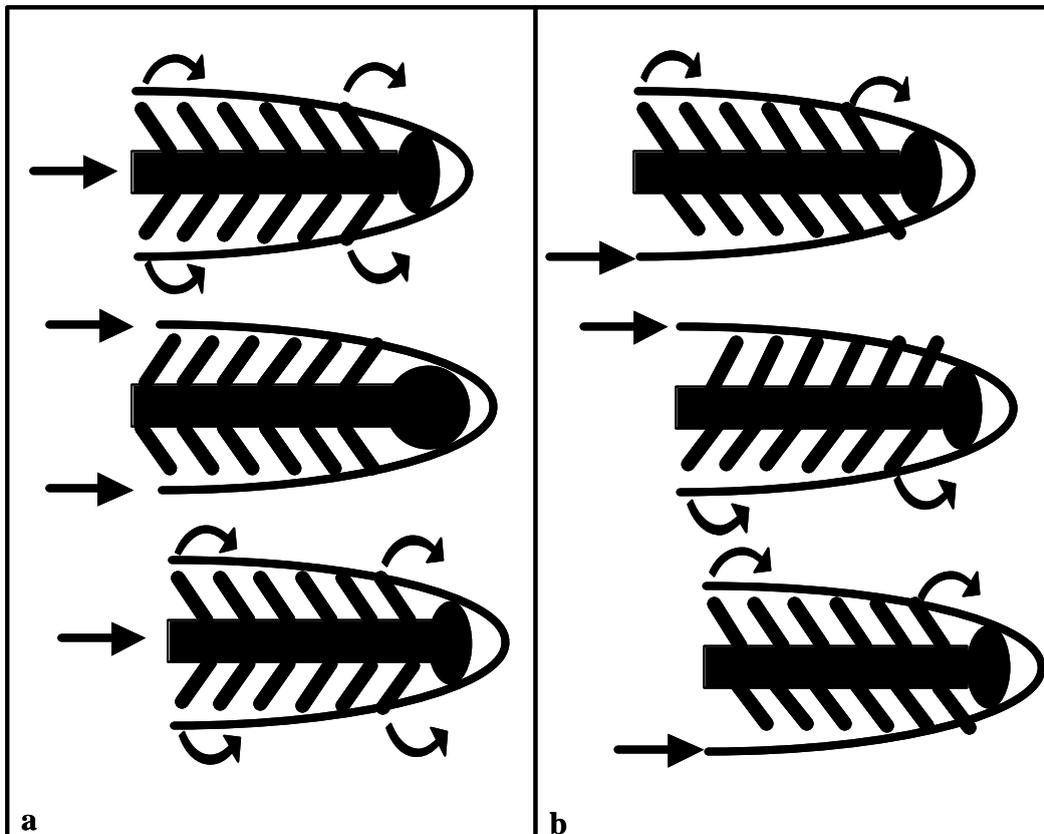


Abb. 4.1: Mögliche Mechanismen für die Erzeugung von Vorschub durch Zusammenspiel von Rod und Linkern.

a: Die Adhäsion der Zelloberfläche an den Untergrund wird gelöst. Die nach hinten gekippten Linker klappen vor und schieben die Zellhülle nach vorne. Es erfolgt eine erneute Adhäsion und der Rod wird durch Rückklappen der Linker im Tip vorgeschoben. Die resultierende Bewegung wäre schrittweise.

b: Es ist jeweils eine Seite des Tip an den Untergrund anhängert. Auf der anderen Seite werden die Linker vorgeklappt und die Zellhülle dadurch vorgeschoben. Der Vorgang wiederholt sich mit Abwechslung der jeweils vorschiebenden und anhängerten Seite. Die resultierende Bewegung wäre glatt.

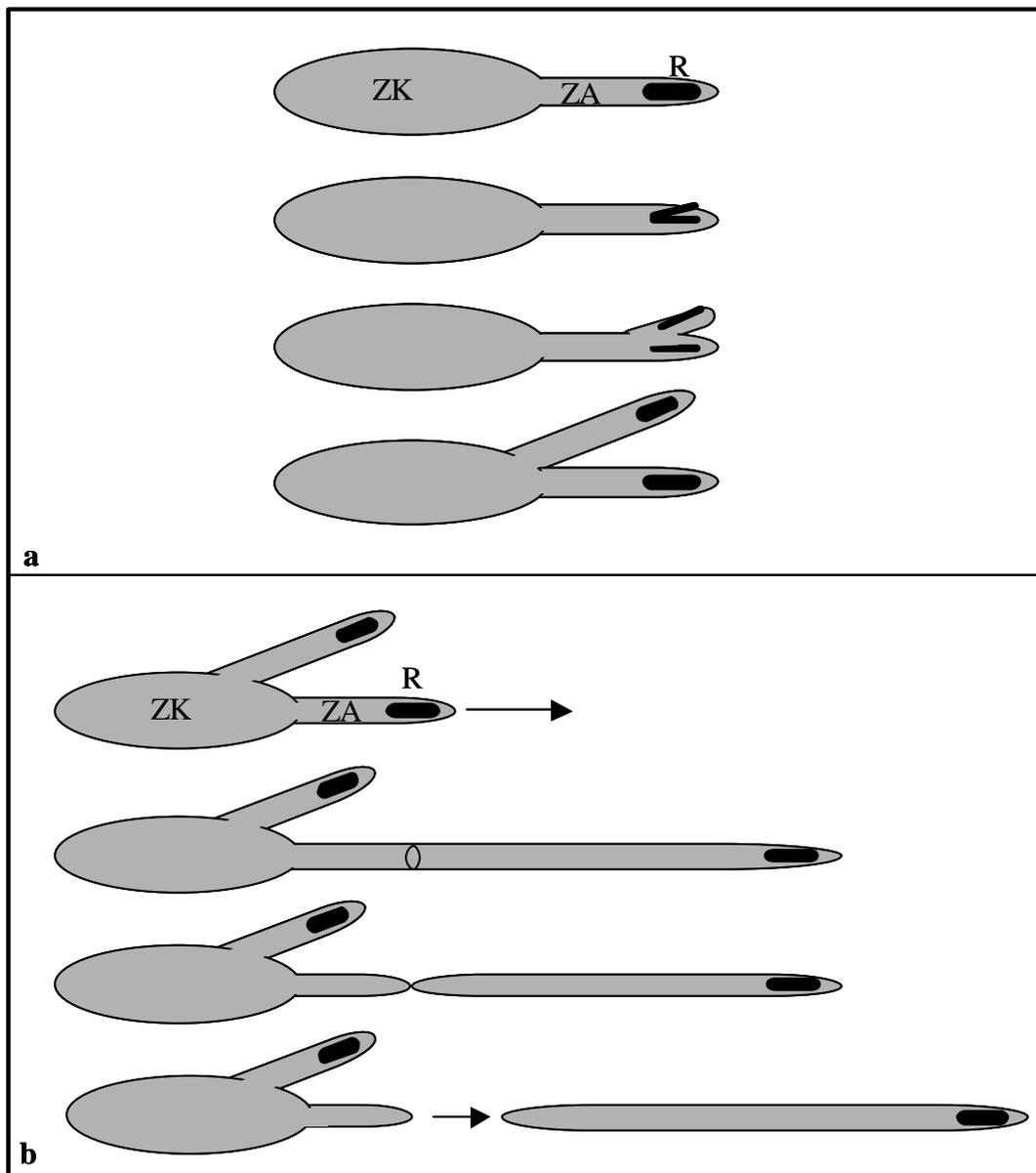


Abb. 4.2: Mögliche Zellreproduktionsmechanismen von *M. pneumoniae*. ZK: Zellkörper; ZA: Zellausläufer; R: Rod.

a: Verdopplung eines Zellausläufers. Der Rod wird gespalten und die Hälften werden auf die beiden Hälften des sich ebenfalls spaltenden Tips verteilt und anschließend jeweils regeneriert.

b: Elongation eines Filamentes und Abschnürung einer filamentösen Einzelzelle. Die Einschnürung erfolgt nach der Elongation eines Zellausläufers.

(Folgerung aus Kap. 3.1).

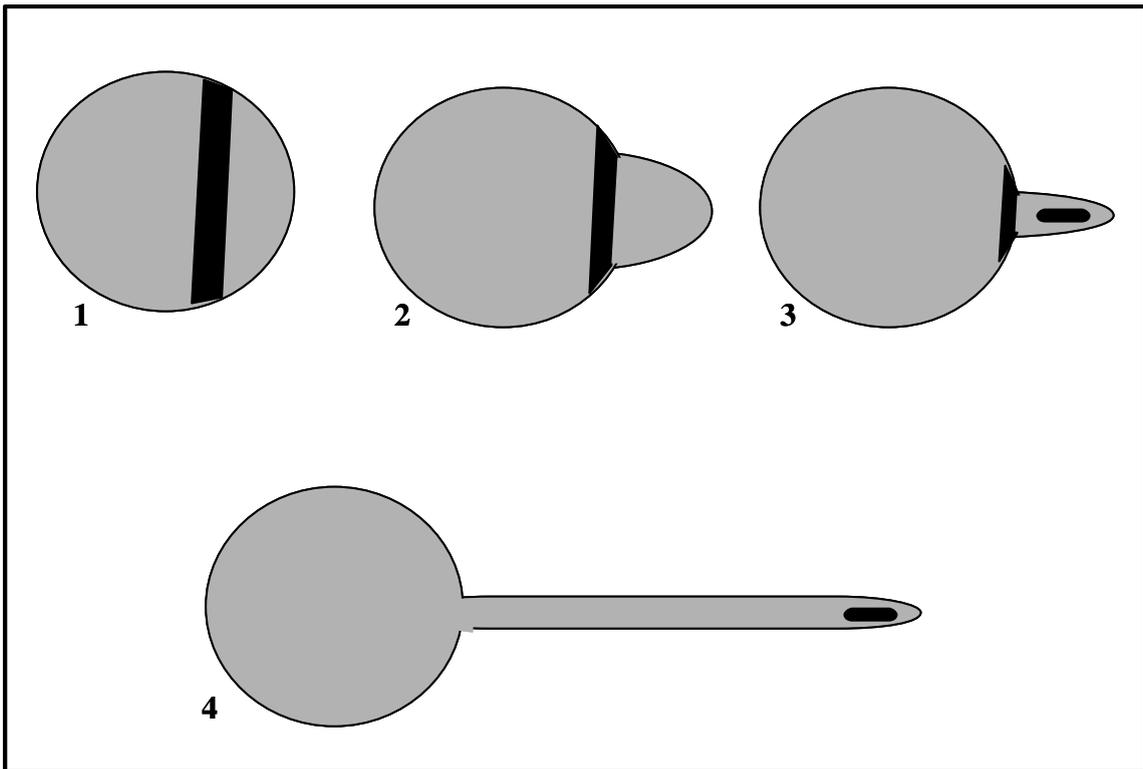


Abb. 4.3: Möglicher Mechanismus für die Entstehung eines Zellausläufers aus einer nur aus einem Zellkörper bestehenden Einzelzelle durch Bildung eines FtsZ-Ringes am Zellkörper (1), der durch Kontraktion (2-3) eine Membranausstülpung schafft, aus der dann ein Zellausläufer entsteht (3-4). Erklärungen siehe Kap. 4.3.

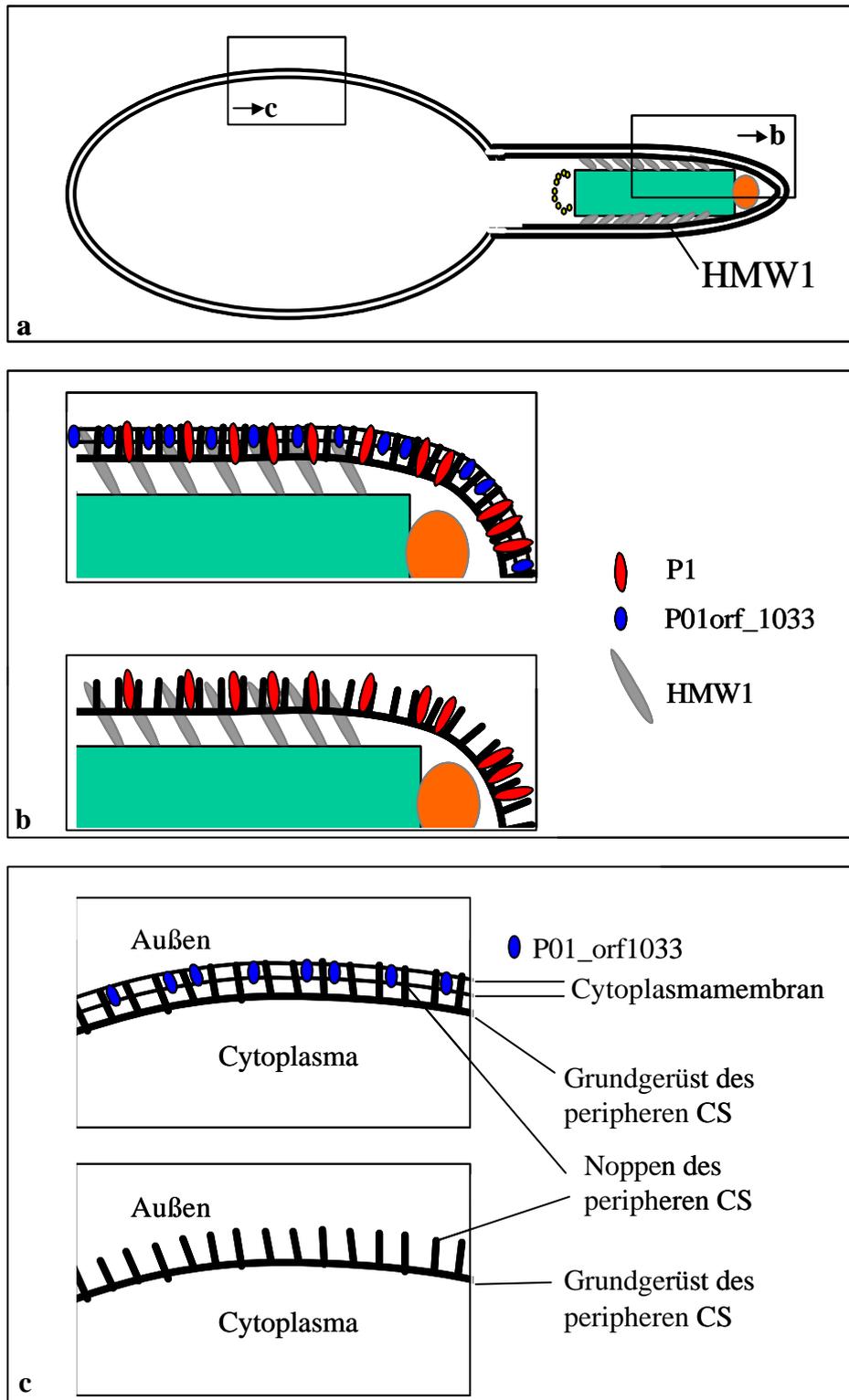
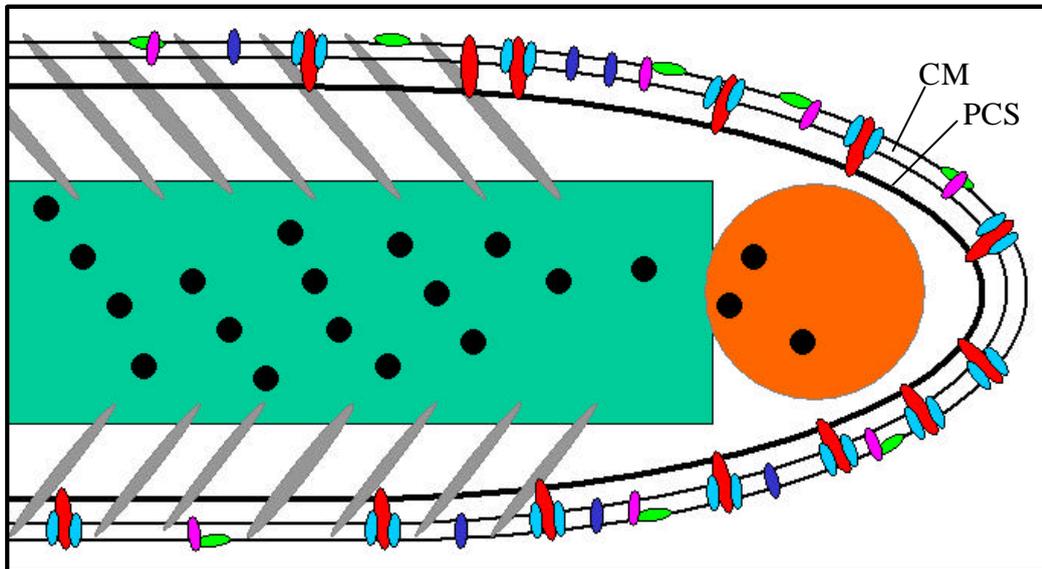


Abb. 4.4: Modell der Anordnung von P1, P01_orf1033 und HMW1. Erklärungen: siehe Kap. 4.13



- P1
- P40/90
- HMW1 ?
- HMW3
- P30
- P65
- P01_orf1033
- ?

Abb. 4.5: Modell zur Anordnung von tiplokalisierten Proteinen, kombiniert aus Literaturdaten und Daten aus dieser Arbeit. CM, Cytoplasmamembran; PCS, peripheres Cytoskelett. Erklärungen: siehe Kap. 4.15

5. Zusammenfassung

Durch lichtmikroskopische Lebendbetrachtungen konnte das Verhalten der Zellen von *Mycoplasma pneumoniae* studiert werden. Demnach breitet sich *M. pneumoniae* auf Glasoberflächen aus und bildet so einen Zellrasen. Der Zellrasen besteht aus Einzelzellen und Zellverbänden. Aus Zellverbänden können sich Einzelzellen abtrennen und sich durch gleitende Bewegung vom Zellverband entfernen. Einzelzellen können wieder zu neuen Zellverbänden auswachsen.

Der Kontakt zur Glasoberfläche, sowie die Kraftübertragung für die gleitende Bewegung, gehen jeweils vom Tip aus. Während des Gleitens wird von hier ein Zug auf die Zelle ausgeübt.

Durch Immun-Fluoreszenzmarkierungen konnten einige Proteine dem Tip zugeordnet werden. Immun-Fluoreszenzmarkierungen zeigen gegenüber Immun-Goldmarkierungen den Vorteil einer deutlich höheren Sensitivität sowie einer einfacheren Handhabung. Für Sublokalisationen innerhalb des Tips oder eine Zuordnung von Proteinen zu Zellperipherie oder Cytoplasma müssen elektronenmikroskopische Immun-Goldmarkierungen herangezogen werden.

Ein Immuneserum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion von *M. pneumoniae* zeigte relativ spezifische Reaktion mit dem im Tip gelegenen Rod. Nach vergleichenden Westernblots mit diesem und anderen Immuneseren konnten die Proteine HMW1, HMW2, HMW3 und DnaK als Kandidaten ermittelt werden, welche mit diesem Serum kreuzreagieren und daher potentielle Kandidaten für am Aufbau des Rod beteiligte Komponenten darstellen.

Es wurde eine Methode zur Ablösung der Cytoplasmamembran von *M. pneumoniae*-Zellen entwickelt, die unter Erhalt der Zellform durchgeführt werden kann. Die Ablösung der Cytoplasmamembran wurde durch verschiedene elektronenmikroskopische Präparationen nachgewiesen. Die direkt unter der Cytoplasmamembran gelegene Schicht konnte somit elektronenmikroskopisch abgebildet werden. Sie zeigt eine hexagonale Strukturierung und stellt ein die Zelle umspannendes Netzwerk dar. Sie wurde daher als peripheres Cytoskelett gedeutet.

Zusammenfassung

An dem im Tip von *M. pneumoniae* lokalisierten Rod konnten Substrukturen elektronenmikroskopisch abgebildet werden. Es handelt sich um laterale Linkermoleküle, die wahrscheinlich die Position des Rod im Tip stabilisieren, sowie eine radartige Struktur am proximalen Ende des Rod.

Das Gen für P01_orf1033 wurde als Fusion mit dem Gen für monomeres rotfluoreszierendes Protein in *E.coli* exprimiert und liegt so auf einem Vektor vor. Dieser kann zur Transformation von *M. pneumoniae* eingesetzt werden.

6. Literatur

AMOS, L. A. (1978). Structure of microtubules, 1-64. In: Roberts, K., Hyams, J. S. (Eds.), *Microtubules*. Academic Press, Ltd., London.

ANTRANIKIAN, G., HERZBERG, C., MAYER, F., GOTTSCHALK, G. (1987). Changes in the cell envelope structure of *Clostridium* sp. strain EM1 during massive production of α -amylase and pullulanase. *FEMS Microbiol. Lett.* **41**, 193-197.

ARCHIBALD, A. R., HANCOCK, I. C., HARWOOD, C. R., (1993). Cell wall structure, synthesis, and turnover. In: SONNENSCHNEIN, A. L., HOCH, J. A., LOSICK, R. (Eds.): *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: Biochemistry, Physiology, and molecular genetics. Washington D.C., ASM, 381-410.

ATHAMNA, A., ROSENGARTEN, R., LEVISOHN, S., KAHANE, I., YOGEV, D. (1997). Adherence of *Mycoplasma gallisepticum* involves variable surface membrane proteins. *Inf. Immun.* **65**, 2468-2471.

BALISH, M. F., HAHN, T. W., POPHAM, P. L., KRAUSE, D. C. (2001). Stability of *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-accessory Protein HMW1 correlates with its association with the Triton shell. *J. Bacteriol.* **183**, 3680-3688.

BALISH, M. F., KRAUSE, D. C. (2003). Cytoadherence and the cytoskeleton. In: RAZIN, S., HERRMANN, R. (Eds.). *Molecular Biology and pathogenicity of Mycoplasmas*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.

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**, 49-60.

BASEMAN, J. B., COLE, R. M., KRAUSE, D. C., LEITH, D. K. (1982). Molecular basis for cytoadsorption of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **151**, 1514-1522.

Literatur

BECK, B. D., ARSCOTT, P. G., JACOBSEN, A. (1978). Novel properties of bacterial elongation factor Tu. Proc. Natl. Acad. Sci. **75**, 1250-1254.

BIBERFELD, G., BIBERFELD, P. (1970). Ultrastructural features of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Bacteriol. **102**, 855-861.

BIRNBOIM, H. C., DOLY, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. **7**, 1513-1523.

BLAAUWEN, T., LINDQVIST, A., LÖWE, A., NANNINGA, N. (2001). Distribution of the *Escherichia coli* structural maintenance of chromosomes (SMC)-like protein MukB in the cell. Mol. Microbiol. **42**, 1179-1188.

BLAKE, M. S., JOHNSTON, K. H., RUSSEL-JONES, G. J., GOTSCHLICH, E. C. (1984). A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphatase-conjugated anti-antibody on western blots. Anal. Biochem. **163**, 175-179.

BLANCHARD, A., BÉBÉAR, C. M. (2003). Mycoplasmas of humans. In: RAZIN, S., HERRMANN, R. (Eds.). Molecular Biology and pathogenicity of Mycoplasmas. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.

BORK, P., SANDER, C., VALENCIA, A. (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. **89**, 7290-7294.

CAMPBELL, R. E., TOUR, O., PALMER, A. E., STEINBACH, P. A., BAIRD, G.S., ZACHARIAS, D. A., TSIEN, R. Y. (2002). A monomeric red fluorescent protein. Proc. Natl. Acad. Sci. **99**, 7877-7882.

CARBALLIDO-LOPEZ, R., ERRINGTON, J. (2003). The bacterial cytoskeleton: in vivo dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. Dev. Cell **4**, 19-28.

Literatur

CARLEMALM, E., GARAVITO, R. M., VILLINGER, W. (1982). Resin development for electron microscopy and an analysis of embedding at low temperature. *J. Bacteriol.* **159**, 138-144.

CHIBA, H., PATTANAJITVILAI, S., EVANS, A. J., HARBECK, R. J., VOELKER, D. R. (2002). Human surfactant protein D (SP-D) binds *Mycoplasma pneumoniae* by high affinity interactions with lipids. *J. Biol. Chem.* **277**, 20379-20385.

COHEN, S. N., CHANG, A. C. Y., HSU, L. (1973). Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **69**, 2110-2114.

CONDEELIS, J. (1995): Elongation factor 1-alpha, translation and the cytoskeleton. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 169-70.

DANIEL, R. A., ERRINGTON, J. (2003). Control of cell morphogenesis in bacteria: two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**, 767-776.

COZZONE, A. J. (1988). Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**, 97-125.

DALLO, S. F., CHAVOYA, A., BASEMAN, J. B. (1990). Characterization of the gene for a 30-kilodalton adhesin-related protein of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect. Immun.* **58**, 4163-4165.

DALLO, S. F., LAZELL, A. L., CHAVOYA, A., REDDY, S. P., BASEMAN, J. B. (1996). Biofunctional domains of the *Mycoplasma pneumoniae* P30 adhesin. *Infect. Immun.* **64**, 2595-2601.

Literatur

DANDEKAR, T., HUYNEN, M., REGULA, J. T., UEBERLE, B., ZIMMERMANN, C. U., ANDRADE, M. A., DOERKS, T., SÁNCHEZ-PULIDO, L., SNEL, B., SUYAMA, M., YUAN, Y. P., HERRMANN, R., BORK, P. (2000). Re-annotating the *Mycoplasma pneumoniae* genome sequence: adding value, function and reading frames. *Nucleic Acid Res.* **28**, 3278-3288.

DIRKSEN, L. B., KREBES, K. A., KRAUSE, D. C. (1994). Phosphorylation of cytoadherence-accessory proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **176**, 7499-7505.

DIRKSEN, L. B., PROFT, T., HILBERT, H., PLAGENS, H., HERRMANN, R., KRAUSE, D. C. (1996). Sequence analysis and characterization of the *hmw* gene cluster of *Mycoplasma pneumoniae*. *Gene* **171**, 19-25.

DREWES, G., EBNETH, A., MANDELKOW, E. M. (1998). MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 307-11.

EHLERS, K. M., SAMUEL, A. D. T., BERG, H. C., MONTGOMERY, R. (1996). Do cyanobacteria swim using traveling surface waves? *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 8340-8343.

ENT (van den), F., AMOS, L. A., LÖWE, J. (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**, 39-44.

ERICKSON, H. P. (1997). FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. *Trends Cell Biol.* **7**, 362-367.

ERICKSON, H. P., TAYLOR, D. W., TAYLOR, K. A., BRAMHILL, D. (1996). Bacterial cell division protein FtsZ assembles into protofilament sheets and minirings, structural homologs of tubulin polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 519-23.

ERRINGTON, J., DANIEL, R. A., SCHEFFERS, D. J. (2003). Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 52-65.

Literatur

FELDNER, J., GÖBEL, U., BREDT, W. (1982). *Mycoplasma pneumoniae* adhesin localized to tip structure by monoclonal antibody. *Nature* **298**, 765-767.

FISSEHA, M., GÖHLMANN, H. W. H., HERRMANN, R., KRAUSE, D. C. (1999). Identification and complementation of frameshift mutations associated with loss of cytodherence in *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **181**, 4404-4410.

FRASER, C. M., GOCAYANE, J. D., WHITE, O., ADAMS, M. D., CLAYTON, R. A., FLEISCHMANN, R. D., BULT, C. J., KERLAVAGE, A. R., SUTTON, G., KELLEY, J. M., FRITCHMAN, J. L., WEIDMAN, J. F., SMALL, K. V., SANDUSKY, M., FUHRMANN, J., NGUYEN, D., UTTERBACK, T. R., SAUDEK, D. M., PHILLIPS, C. A., MERRICK, J. M., TOMB, J. F., DOUGHERTY, B. A., BOTT, K. F., HU, P. C., LUCIER, T. S., PETERSON, S. N., SMITH, H. O., HUTCHISON III, C. A., VENTER, J. C. (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**, 397-403.

FREESE, A., REICHENBACH, H., LÜNSDORF, H. (1997). Further characterization and in situ localization of chain-like aggregates of the gliding bacteria *Myxococcus fulvus* and *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **179**, 1246-1252.

GÖBEL, U., SPETH, V., BREDT, W. (1981). Filamentous structures in adherent *Mycoplasma pneumoniae* cells treated with nonionic detergents. *J. Cell Biol.* **91**, 537-543.

GRAGEROV, A., NUDLER, E., KOMISSAROVA, N., GAITANARIS, G. A., GOTTESMANN, M. E., NIKIFOROV, V. (1992). Cooperation of GroEL / GroES and DnaK / DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 10341-10344.

HAHN, T. W., MOTHERSHED, E. A., WALDO, R., H., 3rd, KRAUSE, D. C. (1999). Construction and analysis of a modified Tn4001 conferring chloramphenicol resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. *Plasmid* **41**, 120-124.

Literatur

HAYFLICK, L. (1965). Tissue cultures and Mycoplasmas. Tex. Rep. Biol. Med. **23**, 285.

HEGERMANN, J., HERRMANN, R., MAYER, F. (2002). Cytoskeletal elements in the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. Naturwissenschaften **89**, 453-458.

HELLING, R. B., GOODMAN, H. M., BOYER, H. W. (1974). Analysis of endonuclease *EcoRI* fragments of DNA from ϕ -bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. J. Virol. **14**, 1235-1244.

HERRMANN, H., WICHE, G. (1983). Specific in situ phosphorylation of plectin in detergent-resistant cytoskeletons from cultured chinese hamster ovary cells. J. Biol. Chem. **258**, 14610-16418.

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 Acis Res. **24**, 4420-4429.

HOPPERT, M. (2003). Microscopic Techniques in Biotechnology. Wiley-VCH, Weinheim.

HU, P. C., COLE, R. M., HUABG, Y. S., GRAHAM, J. A., GARDNER, D. E., COLLIER, A. M., CLYDE, W. A. (1982). *Mycoplasma pneumoniae* infection: role of a surface protein in the attachment organelle. Science **216**, 313-315.

HU, P. C., COLLIER, A. M., BASEMAN, J. B. (1977). Surface parasitism by *Mycoplasma pneumoniae* of respiratory epithelium. J. Exp. Med. **145**, 1328-1343.

INAMINE, J. M., DENNY, T. P., LOECHEL, S., SCHAPER, U., HUANG, C. H., BOTT, K. F., HU, P. C. (1988). Nucleotide sequence of the P1 attachment-protein gene of *Mycoplasma pneumoniae*. Gene **64**, 217-229.

Literatur

JACOBS, E. (2002). *Mycoplasma pneumoniae* disease manifestations and epidemiology. In: RAZIN, S., HERRMANN, R. (Eds.): Molecular Biology and pathogenicity of Mycoplasmas. Kluver Academic / Plenum Publishers, New York.

JACOBSON, G. R., ROSENBUSCH, J. P. (1976): Abundance and membrane association of elongation factor Tu in *E. coli*. *Nature* **261**, 23-26.

JOHANSSON, K. E., PETTERSON, B. (2002). Taxonomy of *Mollicutes*. In: RAZIN, S., HERRMANN, R. (Eds.): Molecular Biology and pathogenicity of Mycoplasmas. Kluver Academic / Plenum Publishers, New York.

JONES, L. J., CARBALLIDO-LOPEZ, R., ERRINGTON, J. (2001). Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**, 913-922.

KIRCHHOFF, H. (1992). Motility, In J. Maniloff, R. N. McElhaney, L. R. Finch, Baseman, J. B. (Hrsg.), *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*. ASM, Washington, D. C.

KIRCHHOFF, H., ROSENGARTEN, R. (1984). Isolation of a motile mycoplasma from fish. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 2439-2445.

KORELEV, E. V., NIKONOV, A. V., BRUDNAYA, M. S., SNIGIREVSKAYA, E. S., SABININ, G. V., KOMISSARCHIK, Y. Y., IVANOV, P. I., BORCHSENIUS, S. N. (1994). Tubular structures of *Mycoplasma gallisepticum* and their possible participation in cell motility. *Microbiology* **140**, 671-681.

KRAUSE, D. C., BALISH, M. (2001). Structure, function and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **198**, 1-7.

KRAUSE, D. C., PROFT, T., HEDREYDA, C. T., HILBERT, H., PLAGENS, H., HERRMANN, R. (1997). Transposon mutagenesis reinforces the correlation between *Mycoplasma pneumoniae* cytoskeletal protein HMW2 and cytoadherence. *J. Bacteriol.* **179**, 2668-77.

Literatur

KRAUSE, D.C. (1996). *Mycoplasma pneumoniae* cytodherence: unravelling the tie that binds. *Mol. Biol.* **20**, 247-253.

KRAUSE, D.C. (1998). *Mycoplasma pneumoniae* cytodherence: organisation and assembly of the attachment organelle. *Trends Microbiol.* **6**, 15-18.

KRAUSE, DC, LEITH, D. K., WILSON, R. M., BASEMAN, J. B. (1982). Identification of *Mycoplasma pneumoniae* proteins associated with hemadsorption and virulence. *Inf. Immun.* **35**, 809-817.

KREBES, K. A., DIRKSEN, L. B., KRAUSE, D. C. (1995). Phosphorylation of *Mycoplasma pneumoniae* Cytodherence-accessory proteins in cell extracts. *J. Bacteriol* **177**, 4571-4574.

LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-658.

LAYH-SCHMITT, G., HERRMANN, R. (1994). Spatial arrangement of gene products of the P1 operon in the membrane of *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect. Immun.* **62**, 974-979.

LÖWE, J., AMOS, L. A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**, 203-206.

LU, C., REEDY, M., ERICKSON, H. P. (2000). Straight and curved conformations of FtsZ are regulated by GTP hydrolysis. *J. Bacteriol.* **182**, 164-170.

LÜNSDORF, H., REICHENBACH, H. (1989). Ultrastructural details of the apparatus of gliding motility of *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). *J. Gen. Microbiol.* **135**, 1633-1641.

LÜNSDORF, H., SCHAIRER, H. U. (2001). Frozen motion of gliding bacteria outlines inherent features of the motility apparatus. *Microbiology* **147**, 939-947.

Literatur

LUTKENHAUS, J. (2002). Dynamic proteins in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **5**, 548-552.

MAHL, H., MÖLDNER, K. (1973). Herstellung von Formvar-Objektträgern nach dem Eintauchverfahren. In: SCHIMMEL, G., VOGELL, W. (Hrsg.): Methodensammlung der Elektronenmikroskopie **1.3.**, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

MANILOFF, J. (2002). Phylogeny and Evolution. In: RAZIN, S., HERRMANN, R. (Eds.): *Molecular Biology and pathogenicity of Mycoplasmas*. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York.

MAYER, F. (2002). Cytoskeletons in eukaryotes and prokaryotes. In: FAHNESTOCK, A., STEINBÜCHEL, A. (Eds.). *Polyamides and complex proteinaceous materials I. Biopolymers*. Wiley-VCH, Weinheim.

MAYER, F. (2003, a). Das bakterielle Cytoskelett – ein aktuelles Problem der Zellbiologie der Prokaryoten. *Naturwissenschaftliche Rundschau* **56**, Heft 10, 1-12.

MAYER, F. (2003, b). Cytoskeletons in Prokaryotes. *Cell Biol. Int.* **27**, 429-38.

MENDELSON, N. H. (1976). Helical growth of *Bacillus subtilis*: a new model of cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **73**, 1740-1744.

MENG, K. E., PFISTER, R. M. (1980). Intracellular structures of *Mycoplasma pneumoniae* revealed after membrane removal. *J. Bacteriol.* **144**, 390-399.

MIYATA, M., SETO., S. (1999). Cell reproduction cycle of mycoplasma. *Biochimie* **81**, 873-878.

MIYATA, M., YAMAMOTO, H., SHIMIZU, T., UENOYAMA, A., CITY, C., ROSENGARTEN, R. (2000). Gliding mutants of *Mycoplasma mobile*: relationship between motility and cell morphology, cell adhesion and microcolony formation. *Microbiology* **146**, 1311-1320.

Literatur

MIYATA, M., UENOYAMA, A. (2002). Movement on the cell surface of the gliding bacterium, *Mycoplasma mobile*, is limited to its head-like structure. FEMS Microbiol. Lett. **215**, 285-289.

MIZUNO, H., SAWANO, A., ELI, P., HAMA, H., MIYAWAKI, A. (2001). Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer. Biochemistry **27**, 2502-2510.

MUKHERJEE, A., LUTKENHAUS, J. (1998). Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. EMBO J. **17**, 462-469.

NIKI, H., JAFFÉ, A., IMAMURA, R., OGURA, T., HIRAGA, S. (1991). The new gene *mukB* codes for a 177 kd protein with coiled-coil domains involved in chromosome partitioning of *E. coli*. EMBO J. **10**, 183-193.

NISHIMURA, A., MORITA, M., NISHIMURA, Y., SUGINO, Y. (1990). A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. Nucl. Acids Res. **18**, 6169.

NORRIS, V., TURNOCK, G., SIGEE, D. (1996). The *Escherichia coli* enzosome. Mol. Microb. **19**, 197-204.

OGLE, K. F., LEE, K. K., KRAUSE, D. C. (1992). Nucleotide sequence analysis reveals novel features of the phase-variable catadherence protein HMW3 of *Mycoplasma pneumoniae*. Infect. Immun. **60**, 1633-1641.

OHSUMI, K., YAMAZOE, M., HIRAGA, S. (2001). Different localization of SeqA-bound nascent DNA clusters and MukF-MukE-MukB complex in *Escherichia coli* cells. Mol. Microbiol. **40**, 835-854.

OKADA, Y., WACHI, M., HIRATA, A., SUZUKI, K., NAGAI, K., MATSUHASHI, M. (1994). Cytoplasmic axial filaments in *Escherichia coli* cells: possible function in the mechanism of chromosome segregation and cell division. J. Bacteriol. **176**, 917-922.

Literatur

OPITZ, O., JACOBS, E. (1992). Adherence epitopes of *Mycoplasma genitalium* adhesin. J. Gen. Microbiol. **138**, 1785-1790.

PANCHUK-VOLOSHINA, N., HAUGLAND, R. P., BISHOP-STEWARD, J., BHARGAVA, M. K., MILLARD, P. J., MAO, F., LEUNG, W. Y., HAUGLAND, R. P. (1999). Alexa dyes, a series of new fluorescent dyes that yield exceptionally bright, photostable conjugates. J. Histochem. Cytochem. **47**, 1179-1188.

PETERSON, J. E., RODWELL, A. W., RODWELL, E. S. (1973). Occurrence and ultrastructure of a variant (*rho*) form of *Mycoplasma*. J. Bacteriol. **115**, 411-25.

POPHAM, P. L., HAHN, T. W., KREBES, K. A., KRAUSE, D. C. (1997). Loss of HMW1 and HMW3 in noncytadhering mutants of *Mycoplasma pneumoniae* occurs posttranslationally. Proc. Natl. Acad. Sci. **94**, 13979-13984.

PROFT, T. (1994). Identifizierung und Charakterisierung von Genprodukten bei *Mycoplasma pneumoniae*. Inaugural-Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

PROFT, T., HERRMANN, R. (1994). Identification and characterization of hitherto unknown *Mycoplasma pneumoniae* proteins. Mol. Microbiol. **13**, 337-348.

PUMPLIN, D. W., BLOCH, R. J. (1993). The membrane skeleton. Trends Cell Biol. **3**, 113-117.

RADESTOCK, U., BREDT, W. (1977). Motility of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Bacteriol. **129**, 1495-1501.

RAZIN, S., JACOBS, E. (1992). Mycoplasma adhesion. J. Gen. Microbiol. **138**, 407-422.

RAZIN, S., YOGEV, D., NAOT, Y. (1998). Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**, 1094-1156.

Literatur

REGULA, J. T. (1999). Auf dem Weg zum Proteom von *Mycoplasma pneumoniae*. Inaugural-Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.

REGULA, J. T., BOGUTH, G., GÖRG, A., HEGERMANN, J., MAYER, F., FRANK, R., HERRMANN, R. (2001). Defining the mycoplasma “cytoskeleton”: the protein composition of the Triton X-100 insoluble fraction of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* determined by 2-D-gelelektrophoresis and mass spectrometry. *Microbiology* **147**, 1045-1057.

ROBERTS, R. J. (1984). Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucl. Acids Res.* **12**, 167-204.

RODWELL, A. W., PETERSON, J. E., RODWELL, E. S. (1975). Striated fibers of the *rho* form of *Mycoplasma*: in vitro reassembly, composition, and structure. *J. Bacteriol.* **122**, 1216-29.

ROMERO-ARROYO, C. E., JORDAN, J., PEACOCK, S., J., WILLBY, M. J., FARMER, M. A., KRAUSE, D. C. (1999). *Mycoplasma pneumoniae* protein P30 is required for cytoadherence and associated with proper cell development. *J. Bacteriol.* **181**, 1079-1087.

ROTH, J., BENDAYAN, M., CARLEMALM, E., VILLINGER, W., GARAVITO, R. M. (1981). Enhancement of structural preservation and immunocytochemical staining in low temperature embedded pancreatis tissue. *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 663-671.

ROTTEM, S. (2002). Interaction of Mycoplasmas with host cells. *Physiol. Rev.* **83**, 417-432.

RUEDA, S., VICENTE, M., MINGORANCE, J. (2003). Concentration and assembly of the division ring proteins FtsZ, FtsA, and ZipA during the *Escherichia coli* cell cycle. *J. Bacteriol* **185**, 3344-3351.

Literatur

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T. (1989). In: Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

SAMUEL, A. D. T., PETERSEN, J. D., REESE, T. S. (2001). Envelope structure of *Synechococcus* sp WH8113, a nonflagellated swimming cyanobacterium. BMC Microbiol. **1**, 4

SETO, S., LAYH-SCHMITT, G., KENRI, T., MIYATA, M. (2001) Visualization of the attachment organelle and cytoadherence proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by immunofluorescence Microscopy. J. Bacteriol. **183**, 1621-1630.

SETO, S., MIYATA, M. (2003). Attachment organelle formation represented by localization of cytoadherence proteins and formation of the electron dense core in wild-type and mutant strains of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Bacteriol. **185**, 1082-1091.

SPORMANN, A. M., KAISER, D. (1995). Gliding movements in *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. **177**, 5846-5852.

SPORMANN, A. M., KAISER, D. (1999). Gliding mutants of *Myxococcus xanthus* with high reversal frequency and small displacements. J. Bacteriol. **181**, 2593-2601.

SPRINZL, M. (1994). Elongation factor Tu: a regulatory GTPase with an integrated effector. Trends Biochem. Sci **19**, 245-250.

STEVENS, M. K., KRAUSE, D. C. (1990). Disulfide-linked protein associated with *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence phase variation. Infect. Immun. **58**: 3430-3433.

STEVEVS, M. K., KRAUSE, D. C. (1991). Localisation of the *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence-accessory proteins HMW1 and HMW4 in the cytoskeletonlike triton shell. J. Bacteriol. **173**, 1041-1050.

Literatur

STEVENS, M. K., KRAUSE, D. C. (1992). *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence phase-variable protein HMW3 is a component of the attachment organelle. J. Bacteriol. **174**, 4265-4274.

STUDIER, F. W. (1973). Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. J. Mol. Biol. **79**, 237-248.

TOKUYASU, K. T. (1986). Cryosections for immunohistochemistry. Proc. XIth Int. Congr. EM, Kyoto, Japan, 42-43.

TOWBIN, H., STAEGELIN, T., GORDON, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. **76**, 4350-4354.

TOWNSEND, R., ARCHER, D. B., PLASKITT, K. A. (1980). Purification and preliminary characterization of *Spiroplasma* fibrils. J. Bacteriol. **142**, 694-700.

TRACHTENBERG, S., GILAD, R. (2001). A bacterial linker motor: cellular and molecular organization of the contractile cytoskeleton of the helical bacterium *Spiroplasma melliferum*. Mol. Microbiol. **41**, 827-848.

WEBER, K., OSBORN, M. (1969). The reliability of the molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis. J. Biol. Chem. **244**, 4406-4412.

WENZEL, R., HERRMANN, R. (1989). Cloning of the complete *Mycoplasma pneumoniae* genome. Nucleic Acid Res. **17**, 7029-7040.

WEINER III, J., ZIMMERMANN, C. U., GÖHLMANN, H. W. H., HERMMANN, R. (2003). Transcription profiles of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* grown at different temperatures. Nucl. Acids Res. **31**, 6303-6320.

Literatur

WILLBY, M. J., KRAUSE, D. C. (2002). Characterization of a *Mycoplasma pneumoniae* HMW3-mutant: implications for attachment-organelle-assembly. J. Bacteriol. **184**, 3061-3068.

WILSON, M. H., COLLIER, A. M. (1976). Ultrastructural study of *Mycoplasma pneumoniae* in organ culture. J. Bacteriol. **125**, 332-339.

WOLFAARDT, G. M., LAWRENCE, J. R., KORBER, D. R. (1999). Function of EPS. In: WINGENDER, J., NEU, T. R., FLEMMING, H. C. (Eds.): Microbial extracellular polymeric substances. Springer, Berlin, Heidelberg.

WOLGEMUTH, C. W., HOICZYK, E., KAISER, D., OSTER, G. (2002). How myxobacteria glide. Curr. Biol. **12**, 369-377.

WOLGEMUTH, C. W., IGOSHIN, O., OSTER, G. (2003). The motility of mollicutes. Biophys. J. **85**, 828-842.

YOUNG, K. D. (2003). Bacterial shape. Mol. Microbiol. **49**, 571-580.

Lebenslauf

- 28.02.1973 geboren in Göttingen
- 19.05.1992 Abitur am Felix-Klein-Gymnasium in Göttingen
- 1992-1994 Zivildienst am Göttinger Universitätsklinikum
- September 1994 Immatrikulation an der Georg-August-Universität Göttingen im
Diplomstudiengang Biologie
- 26.09.2000 Abschluß des Studiums in Göttingen als Diplom-Biologe
- Oktober 2000 bis
Dezember 2003 Durchführung der experimentellen Arbeiten zur
Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen von Cytoskelett-
Komponenten und Motilität bei *Mycoplasma pneumoniae*“
Unter der Leitung von Prof. Dr. F. Mayer und Prof. Dr. R.
Herrmann in Göttingen und Heidelberg