

Untersuchung zur kohlenstoffabhängigen  
Wasserstoffperoxidproduktion und Virulenz  
in *Mycoplasma pneumoniae* und  
*Mycoplasma genitalium*

Dissertation  
zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen  
Doktorgrades  
"Doctor rerum naturalium"  
der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Biologie  
der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von  
Arne Gunnar Schmeisky

aus  
Witzenhausen

Göttingen, 2013

### **Betreuungsausschuss**

Prof. Dr. Jörg Stülke, Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und

PD. Dr. Boris Görke, Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

### **Mitglieder der Prüfungskommission**

**Referent:** Prof. Dr. Jörg Stülke, Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

**Korreferent:** . PD. Dr. Boris Görke, Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

### **Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:**

Dr. Fabian Commichau, Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Prof. Dr. Rolf Daniel, Genomische und Angewandte Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Prof Dr. Ralf Ficner, Molekulare Strukturbiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

PD. Dr. Michael Hoppert, Allgemeine Mikrobiologie, Institut für Mikrobiologie und Genetik

Tag der mündlichen Prüfung: 18.04 2013

„Ernst zu nehmende Forschung erkennt man daran,  
dass plötzlich zwei Probleme existieren,  
wo es vorher nur eines gegeben hat.“  
Thorstein Bunde Veblen (1857-1929)

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich ganz besonders bei Prof. Dr. Jörg Stülke bedanken, dass ich sowohl meine Diplomarbeit als auch meine Dissertation in seiner Abteilung anfertigen durfte und er mich dabei stets unterstützt und ermutigt hat. Neben der Arbeit mit den faszinierenden Mycoplasmen bin ich mehrfach in den Genuss des „Reisebüros Stülke“ gekommen und konnte so meine Fachkenntnisse u.a. in Tromsø, Barcelona und Toulouse vertiefen. PD. Dr. Boris Görke danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats, das stetige Interesse und die Aufnahme als „Ehrenmitglied“ in seiner AG. Bei Dr. Petra Neumann-Staubitz bedanke ich mich für die interessanten Einblicke in die Welt der Salmonellen.

Ein großer Dank gebührt Julia für ihre großartige Hilfe im Labor und die netten Gespräche. Ihr unermüdlicher Einsatz, besonders bei undankbaren Aufgaben wie screenen und der RNA-Isolation, waren eine unglaubliche Erleichterung des Laboralltags. Unserer guten Laborfee Bärbel gilt ein großer Dank, sie hat nicht nur dafür gesorgt, dass überhaupt gearbeitet werden konnte, sondern ihr Kaffee macht auch müde Doktoranden munter. Katrin danke ich für viele hilfreiche und auch lustige Gespräche und die zahlreichen, unschätzbar wertvollen Ideen und Anregungen.

Sebastian und Hinnerk danke ich für die Einarbeitung und viele nützliche Tipps für das Arbeiten mit Mycoplasmen. Meinen Masterstudenten Steffi und Daniel möchte ich für die schöne Zeit in und außerhalb des Labors danken. Bei den umfangreichen Diskussionen unterschiedlicher Probleme sind neue Lösungsansätze und Ideen entstanden. Christina danke ich für die hilfreichen Kommentare gegenüber meiner Arbeit und meinem äußeren Erscheinungsbild. Bei meinen Kollegen Frothe, Lorena, Ivy, Anne, Repel, Chris, Fuchs, Fredo, Raphael, Jan und Felix bedanke ich mich für die Unterstützung und die schöne Zeit. Maria, Alicia, Luis1, Luis2 und Jaume danke ich für eine tolle Zeit in Spanien und in Toulouse. Ebenfalls möchte ich mich bei den ehemaligen Doktoranden der Abteilung Hübi, Tini, Claudine, Denise Falk, Martin, Christoph, Nico und unserem ehemaligen und neuen Ag-Mitglied Fabian für die vielen spannenden Abenteuer, die wir in Göttingen erlebt haben, bedanken.

Auch bei dem Werkstattteam Jarek, Olaf und Gerd möchte ich mich für die nette und bei

Patrick für die „scharfe“ Zusammenarbeit bedanken.

Darüber hinaus gilt mein Dank der ganzen Abteilung. Ihr wart alle immer hilfreich bei fachlichen und nicht-fachlichen Fragen. Ich hoffe, dass die großartige Arbeitsatmosphäre auch weiterhin bestehen bleibt.

Bei meinen Eltern und bei meinen Großeltern möchte ich mich für die finanzielle und moralische Unterstützung während meines Studiums bedanken und dafür, dass sie mir stets in allen Situationen ein so starker Rückhalt waren.



## Inhaltsverzeichnis

|   |     |
|---|-----|
| Abkürzungsverzeichnis: .....  | III |
| <b>1. EINLEITUNG</b> .....  | 1   |
| 1.1 Die Klasse der Mollicutes .....   | 1   |
| 1.2 Die Organismen <i>Mycoplasma pneumoniae</i> und <i>Mycoplasma genitalium</i> .....          | 1   |
| 1.3 Pathogenität in Bakterien .....   | 4   |
| 1.3.1 Pathogenität in Mycoplasmen .....   | 4   |
| 1.3.2 Adhärenz als Pathogenitätsfaktor .....  | 5   |
| 1.3.3 Wasserstoffperoxid als Pathogenitätsfaktor .....  | 6   |
| 1.4 Kohlenstoffverwertung in Mycoplasmen .....  | 6   |
| 1.4.1 Der Fruktose- und Glukosestoffwechsel .....   | 8   |
| 1.4.2 Der Glyzerinstoffwechselweg .....   | 8   |
| 1.4.3 Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Peroxidbildung .....                               | 9   |
| 1.5 Regulation in Bakterien .....   | 9   |
| 1.5.1 Regulation auf Transkriptionsebene .....  | 10  |
| 1.5.2 Regulation auf post-translationaler Ebene .....   | 11  |
| 1.6 Zyklisches di-Adenosinmonophosphat in Bakterien .....                                       | 13  |
| 1.7 Ziele der Arbeit .....  | 16  |
| <b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....   | 17  |
| 2.1 Bakterienstämme und Plasmide .....  | 17  |
| 2.2 Medien .....  | 17  |
| 2.3 Methoden .....  | 19  |
| 2.3.1 Allgemeine Methoden .....   | 19  |
| 2.3.2 Anzucht von Bakterien .....   | 20  |
| 2.3.3 Genetische Methoden .....   | 23  |
| 2.3.4 Arbeiten mit RNA .....  | 30  |
| 2.3.5 Arbeiten mit Proteinen .....  | 34  |
| 2.3.6 Bestimmung von zyklischem di-Adenosinmonophosphat .....                                   | 40  |
| 2.3.7 Bestimmung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion <i>in vivo</i> .....             | 41  |
| 2.3.8 Infektion von HeLa-Zellen mit Mycoplasmen .....   | 42  |
| <b>3. ERGEBNISSE</b> .....  | 44  |
| 3.1 Können in <i>M. genitalium</i> Mutanten mittels LFH konstruiert werden? .....               | 44  |
| 3.2 Peroxidproduktion und Wachstum von <i>M. genitalium</i> G37 .....                           | 44  |
| 3.3 Isolation und Charakterisierung von Acetyltransferasemutanten in <i>M. pneumoniae</i> ..... | 49  |

---

|   |     |
|---|-----|
| 3.4 Untersuchung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion in <i>M. pneumoniae</i> und <i>M. genitalium</i> mit verschiedenen Bedingungen .....               | 53  |
| 3.5 Untersuchungen der Transkription in verschiedenen Mutanten von <i>M. pneumoniae</i> M129.....   | 60  |
| 3.6 Wachstum und Wasserstoffperoxidproduktion in weiteren <i>M. pneumoniae</i> Stämmen.....   | 66  |
| 3.7 Sequenzierung des klinischen Isolats 2: Einfluss von Mutationen im Chromosom auf den Phänotyp .....   | 71  |
| 3.8 Isolation und Charakterisierung einer <i>recA</i> -Mutante .....  | 75  |
| 3.9 Welche Rolle spielt zyklisches-di-AMP in <i>M. pneumoniae</i> M129?.....  | 77  |
| <b>4. DISKUSSION</b> .....  | 82  |
| 4.1 Können in <i>M. genitalium</i> Mutanten mittels LFH konstruiert werden?.....  | 82  |
| 4.2 Wachstum und Peroxidbildung von <i>M. genitalium</i> G37.....   | 82  |
| 4.3 Charakterisierung der Acetyltransferasemutanten <i>mpn027</i> und <i>mpn114</i> .....   | 84  |
| 4.4 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Messungen unter verschiedenen Bedingungen mit unterschiedlichen Stämmen von <i>M. genitalium</i> und <i>M. pneumoniae</i> ..... | 85  |
| 4.5 Untersuchungen der Transkription in verschiedenen Mutanten von <i>M. pneumoniae</i> M129.....   | 88  |
| 4.6 Charakterisierung weiterer <i>M. pneumoniae</i> -Stämme .....   | 92  |
| 4.7 Das Genom des klinischen Isolats 2.....   | 93  |
| 4.8 Welche Rolle spielt Zyklisches-di-AMP in <i>M. pneumoniae</i> M129? .....   | 97  |
| 4.9 Ausblick .....  | 99  |
| <b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....   | 101 |
| <b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....  | 102 |
| <b>7. ANHANG</b> .....  | 119 |
| 7.1 Materialien .....   | 119 |
| 7.1.1 Chemikalien.....  | 119 |
| 7.1.2 Hilfsmittel.....  | 119 |
| 7.1.3 Geräte und Apparaturen .....  | 120 |
| 7.1.4 Kommerziell erhältliche Systeme .....   | 121 |
| 7.1.5 Antikörper und Enzyme .....   | 121 |
| 7.2. Oligonukleotide .....  | 121 |
| 7.3. Plasmide .....   | 131 |
| 7.4. Stämme.....  | 133 |
| 7.5. Verwendete Internetangebote und Computerprogramme .....  | 134 |



**Abkürzungsverzeichnis:**

|                 |   |
|-----------------|---|
| % (v/v)         | % (volume/volume) (Volumenprozent)      |
| % (w/v)         | % (weight/volume) (Massenprozent)       |
| °C              | Grad Celsius                            |
| Abb.            | Abbildung                               |
| ABC-Transporter | ATP-Binding-Cassette-Transporter        |
| ATP             | Adenosintriphosphat                     |
| APS             | Ammoniumperoxidsulfat                   |
| AS              | Aminosäure                              |
| <i>B.</i>       | <i>Bacillus</i>                         |
| BSA             | Rinderserumalbumin                      |
| bzw.            | beziehungsweise                         |
| C               | Kohlenstoff                             |
| c               | chromosomal                             |
| ca.             | cirka                                   |
| cAMP            | zyklisches Adenosinmonophosphat         |
| c-di-AMP        | zyklisches-di-Adenosinmonophosphat      |
| c-di-GMP        | zyklisches-di-Guanosinmonophosphat      |
| cGAMP           | zyklisches Guanosinadenosinmonophosphat |
| cGMP            | zyklisches Guanosinmonophosphat         |
| DAC             | Diadenylatzyklase                       |
| deion.          | deionisiert                             |
| DHAP            | Dihydroxyacetonphosphat                 |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid                        |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure                  |
| <i>E.</i>       | <i>Escherichia</i>                      |
| EDTA            | Ethylendiamintetraacetat                |
| <i>et al.</i>   | et altera                               |
| etc.            | et cetera                               |
| EtOH            | Ethanol                                 |

|                       |  |
|-----------------------|--|
| Frk                   | Fruktose   |
| g                     | Gramm  |
| G3P                   | Glyzerin-3-Phosphat                                |
| Glc                   | Glukose  |
| Gly                   | Glyzerin   |
| GPC                   | Glyzerinphosphorylcholin                           |
| h                     | Stunde(n)  |
| kV                    | Kilovolt   |
| l                     | Liter  |
| LFH                   | Long Flanking Homolgy (PCR)                        |
| <i>M.</i>             | <i>Mycoplasma</i>                                  |
| max.                  | maximal  |
| MB                    | Megabasen  |
| Mbp                   | Megabasenpaare                                     |
| MGE                   | <i>Mycoplasma genitalium</i>                       |
| min                   | Minuten  |
| μF                    | MikroFahrenheit                                    |
| ml                    | Milliliter   |
| μm                    | Mikrometer   |
| MMR                   | Multiple Mutations Reaktion                        |
| MPN                   | <i>Mycoplasma pneumoniae</i>                       |
| mRNA                  | messenger RNA                                      |
| ms                    | Millisekunden                                      |
| N                     | normal   |
| NADH/NAD <sup>+</sup> | Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert/oxidiert)  |
| nm                    | Nanometer  |
| Ω                     | Ohm (elektrischer Widerstand)                      |
| OD <sub>x</sub>       | optische Dichte, gemessen bei Wellenlänge λ = x nm |
| PTS                   | Phosphotransferasesystem                           |
| PCR                   | Polymerasekettenreaktion                           |
| PEP                   | Phosphoenolpyruvat                                 |

|          |                                 |
|----------|---------------------------------|
| (p)ppGpp | Guanosin(penta/tetra)phosphat   |
| PPLO     | pleuropneumoniae like organisms |
| Rib      | Ribose                          |
| RNA      | Ribonukleinsäure                |
| rpm      | Umdrehungen pro Minute          |
| RT       | Raumtemperatur                  |
| SDS      | Natriumdodecylsulfat            |
| sek.     | Sekunde                         |
| Tab.     | Tabelle                         |
| Tn       | Transposon                      |
| tRNA     | transfer RNA                    |
| U        | Units (Einheiten)               |
| ÜN       | über Nacht                      |
| UV       | ultraviolett                    |
| WT       | Wildtyp                         |
| z.B.     | zum Beispiel                    |



## 1. Einleitung

### 1.1 Die Klasse der Mollicutes

Die Mollicutes sind eine Klasse von Bakterien mit niedrigem G+C-Gehalt. Sie gehören phylogenetisch zu den grampositiven Firmicutes. Der Name Mollicutes bedeutet „weiche Haut“ und rührt daher, dass die Vertreter dieser Klasse keine Zellwand besitzen (Carstensen *et al.*, 1971).

Neben den Mycoplasmen gehören weitere Gattungen wie *Acholeplasma*, *Anaeroplasma*, *Asteroleplasma*, *Mesoplasma*, *Phytoplasma*, *Spiroplasma* und *Ureaplasma* zu den Mollicutes (Woese *et al.*, 1980). Sie alle zeichnen sich durch eine parasitäre Lebensweise aus und können je nach Gattung Pflanzen, Tiere oder Menschen befallen. Bedeutende Human- bzw. Tierpathogene sind Vertreter der Gattungen *Mycoplasma* und *Ureaplasma*. Relevante Phythopathogene, die Getreide und andere Nutzpflanzen befallen können, sind beispielsweise Acholeplasmen, Phytoplasmen oder Spiroplasmen (Taheri *et al.*, 2011; Lastrebova *et al.*, 2010; Gasparich, 2010; Pollack *et al.*, 1996).

Eine Besonderheit im Reich der Bakterien stellen die Mycoplasmen dar, da sie ein besonders kleines Genom besitzen. Die Genomgrößen in dieser Gattung variieren zwischen 0,58 Mb bei *Mycoplasma genitalium* und 1,36 Mb bei *M. penetrans* (Fraser *et al.*, 1995; Sasaki *et al.*, 2002). Somit gehören diese Organismen zu denen mit den kleinsten bekannten Genomen, wodurch sie interessant für die Minimalgenomforschung sind (Fadiel *et al.*, 2007). Die Ursache hierfür liegt nicht darin begründet, dass es sich um sehr ursprüngliche Bakterien handelt, sondern darin, dass die Mollicutes eine regressive Evolution durchlaufen haben. Es ist davon auszugehen, dass die Mollicutes einen gemeinsamen Vorfahren mit Streptococcen, Staphylococcen und Bacilli haben (Ciccarelli *et al.*, 2006).

### 1.2 Die Organismen *Mycoplasma pneumoniae* und *Mycoplasma genitalium*

*M. pneumoniae* und *M. genitalium* sind zwei direkt verwandte Humanpathogene

(Thompson *et al.*, 2011). Sie sind die Erreger von atypischer Lungenentzündung und Harnwegsinfektionen. Aufgrund der fehlenden Zellwand lassen sich die Krankheitserreger nicht mit  $\beta$ -Lactam-Antibiotika behandeln, da diese die Synthese der Zellwand blockieren (Suzaki, 1979). Als klinisches Therapeutikum werden Makrolidantibiotika verwendet, in der Forschung können beispielsweise Tetracyclin und Gentamycin als Resistenzmarker verwendet werden (Blanchard und B  b  ar, 2011). Die Zellen besitzen eine pleomorphe Zellform, sind jedoch häufig flaschenf  rmig. Dabei unterscheidet man zwischen dem Zellkörper („body“) und der terminellen Organelle. In dieser Organelle befindet sich die sogenannte Tip-Struktur (Feldner *et al.*, 1982). Die einzelnen Zellen haben eine Länge von 2  $\mu\text{m}$  und sind 0,1-0,2  $\mu\text{m}$  breit (Waites und Talkington, 2004). In Flüssigmedium wachsen Mycoplasmen adheriert an Oberflächen, auf Agarplatten bilden sie charakteristische, spiegeleif  rmige Kolonien (Knudson und MacLeod, 1970).

*M. genitalium* besitzt das kleinste Genom in der Klasse der Mollicutes, das Genom von *M. pneumoniae* ist mit 0,82 Mbp jedoch nicht sehr viel größer. Dabei besitzt *M. pneumoniae* Homologe aller Gene, die in *M. genitalium* vorkommen (Herrmann und Reiner, 1998). *M. genitalium* besitzt ca. 480 proteinkodierende Gene. Mittels einer Transposonmutagenese konnte herausgefunden werden, dass von diesen Proteinen zwischen ~250 und ~380 eine essentielle Funktion besitzen (Juh  s *et al.*, 2011).

Das Genom von *Mycoplasma pneumoniae* kodiert für 693 Proteine, 41 ribosomale RNAs, 35 tRNAs und vier weitere funktionale RNAs. Bisher konnten 620 Proteine experimentell nachgewiesen werden und 117 nicht kodierende Transkripte, deren Funktion bisher nicht bekannt ist. Aufgrund von Sequenzhomologien konnten 437 Proteinen Funktionen zugewiesen werden (Güell *et al.*, 2009).

Aufgrund der regressiven Evolution haben sowohl *M. pneumoniae* als auch *M. genitalium* eine Reihe metabolischer Fähigkeiten verloren. Beide besitzen keinen Zitratzyklus und auch die Enzyme zur Aminosäuresynthese sind nicht vorhanden (Liu *et al.*, 2012). Die lebenswichtigen Metabolite werden über Transportsysteme in die Zelle befördert (Großhennig *et al.*, 2012). Dies spiegelt die parasitäre Lebensweise wider, da Wirtszellen geschädigt werden müssen, um an essentielle Zellbausteine zu gelangen. Hierin ist auch die aufwendige Zusammensetzung der Mycoplasmenn  hrmedien

begründet (Stanbridge *et al.*, 1971). Die Medien für die beiden Stämme enthalten Serum, darin sind verschiedene Aminosäuren und weitere Bausteine für die Mycoplasmen enthalten. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung der Seren ist es schwierig, ein definiertes Medium zur Anzucht zu nutzen (Razin und Knight, 1960). Es ist jedoch möglich, die Bakterienzellen in verschiedenen Puffern stabil zu halten, so dass Experimente in einer definierten Umgebung stattfinden können.

Sowohl von *M. pneumoniae* als auch von *M. genitalium* wurden verschiedene Laborstämme sequenziert (Himmelreich *et al.*, 1996, Kenri *et al.*, 2012, Glass *et al.*, 2006). Hierbei werden die Stämme *M. pneumoniae* M129, *M. pneumoniae* FH und *M. genitalium* am häufigsten in der Forschung genutzt. Interessant ist, dass *M. genitalium* zur homologen Rekombination befähigt ist (Sluijter *et al.*, 2010). Auch für den FH-Stamm von *M. pneumoniae* konnte eine geringe Rate für die Rekombination gezeigt werden (Krishnakumar *et al.*, 2010). *M. pneumoniae* besitzt zwar eine Rekombinase (RecA), kann diese aber scheinbar nur für Rekombination in Zusammenhang mit der Antigenvariation nutzen (Burgos *et al.*, 2012). Die homologe Rekombination kann man sich im Labor gut zunutze machen, besonders bei der Herstellung verschiedener Mutanten. Die Abwesenheit in *M. pneumoniae* bedeutet eine starke Restriktion der Laborprotokolle. Zur genetischen Manipulation können jedoch beispielsweise Transposons genutzt werden und dadurch zusätzliche Gene eingefügt oder vorhandene inaktiviert werden (Halbedel und Stülke, 2007).

Als „omic“ wird in der Biologie die Gesamtheit eines bestimmten Bereichs bezeichnet, wie z.B. Genomics die Erforschung der gesamten Gene eines Organismus bezeichnet. In Mycoplasmen gibt es eine ganze Reihe globaler Studien. Mittlerweile wurden neben dem Genom auch das Transkriptom, das Minimalgenom, das Methylom, das Proteom, das Phosphoproteom, das Acetylom und das Interaktom von *M. pneumoniae* und teilweise auch von *M. genitalium* bestimmt (Himmelreich *et al.*, 1996; Glass *et al.*, 2006; Kühner *et al.*, 2009; Lluch-Senar *et al.*, 2013; Schmidl *et al.*, 2012; Güell *et al.*, 2009; van Noort *et al.*, 2012). Dank dieser Studien steht eine große Datenmenge über die Organismen zur Verfügung. Jedoch sind derartige Studien fehleranfällig und es entstehen eine Menge Artefakte. Außerdem ist es unerlässlich, Studien auf kleineren Ebenen durchzuführen, wie z.B. die Aufklärung von einzelnen Metabolons (siehe 1.5.2), um die Fülle an Daten richtig zu interpretieren.

### 1.3 Pathogenität in Bakterien

Ein pathogenes Bakterium kann eine Infektionskrankheit verursachen. Dabei ist entscheidend, ob der Organismus in der Lage ist, ein Toxin zu produzieren, Wirtszellen zu befallen oder zu besiedeln und sich von Wirt zu Wirt zu übertragen. Manche Bakterien nutzen zur Verbreitung Zwischenwirte. Ein prominentes Beispiel ist der Pesterreger *Yersinia pestis*, der mit Hilfe von Flöhen von Ratten auf den Menschen übertragen werden kann (Hinnebusch, 2012). Andere Krankheitserreger wie Salmonellen oder Listerien werden über kontaminierte Nahrung aufgenommen (Jones und Falkow, 1996; Li *et al.*, 2013).

Der Keuchhustenerreger *Bordetella pertussis* ist ein bekanntes Beispiel für ein toxinproduzierendes Pathogen, und auch das stärkste bekannte Nervengift, das Botulinumtoxin, wird von Bakterien der Gattung *Clostridium botulinum* produziert. Früher als Verursacher der gefährlichen Lebensmittelvergiftung gefürchtet, kann das Toxin mittlerweile sogar als Medikament eingesetzt werden (Adkins *et al.*, 2012; Chen, 2012).

#### 1.3.1 Pathogenität in Mycoplasmen

Mycoplasmen haben es geschafft, sich ubiquitär zu verbreiten. Wie oben erwähnt, gibt es Mycoplasmen, die Tiere und die Pflanzen befallen können. Dabei kann die Wirtsspezifität stark variieren. *Mycoplasma gallisepticum* beispielsweise kann viele unterschiedliche Vogelarten infizieren, wohingegen *M. pneumoniae* in der Natur nur den Menschen befällt (Kleven, 2008; Dumke *et al.*, 2004). *Spiroplasma citri* hingegen befällt Nutzpflanzen und kann über Heuschrecken verbreitet werden; *M. mobile* befällt die Kiemen von Fischen (Bové *et al.*, 2003; Adan-Kuno *et al.*, 2012). Auch Reptilien können von Mycoplasmen befallen sein, bekannte Vertreter sind hier *M. crocodyli* und *M. alligatoris* (Brown *et al.*, 2012).

*M. pneumoniae* und *M. penetrans* besitzen ein Gen, das für ein Toxin kodiert. Das sogenannte CARDS-Toxin (Community-acquired respiratory distress syndrom) verursacht eine Entzündungsantwort in Mäusen und ist daher wichtig für die Pathogenität der



Bakterien. Das Toxin selbst weist eine gewisse Homologie zu dem bereits erwähnten Pertussistoxin auf (Medina *et al.*, 2012). Ureaplasmen hingegen sind in der Lage, mit Hilfe der Urease Ammoniak aus Harnstoff zu synthetisieren (Razin *et al.*, 1998). Dieser Stoff schädigt das umliegende Gewebe.

Die Motilität der Mycoplasmen hat ebenfalls einen Einfluss auf die Pathogenität. *M. pneumoniae* und *M. genitalium* bewegen sich mit einer Gleitbewegung über glatte Oberflächen. *M. mobile* hat hier jedoch eine andere Art der Fortbewegung entwickelt, die einer Laufbewegung ähnelt (Miyata, 2008). Auch die Adhärenz und die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion spielen für die Pathogenität von Mycoplasmen eine wichtige Rolle (Razin *et al.*, 1998). Auf diese Faktoren wird im Folgenden genauer eingegangen.

### 1.3.2 Adhärenz als Pathogenitätsfaktor

Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *M. pneumoniae* ist die Zytoadhärenz, also das Anheften an Zellen des Lungenepithels. Dieser Schritt ist essentiell für die Kolonisierung des Gewebes. Stämme, die die Fähigkeit zum Anheften verloren haben, sind avirulent (Schmidl *et al.*, 2008). Die Tip-Struktur spielt eine ausschlaggebende Rolle bei der Adhärenz (Krause, 1996; Krause und Balish, 2001). Diese Struktur befindet sich am Zellpol und besteht aus vielen unterschiedlichen Proteinen (Krause, 1998). Sie ermöglicht es den Mycoplasmen, sich an Wirtszellen anzulagern und somit die Infektion auszulösen. Außerdem spielt sie eine wichtige Rolle bei der Fortbewegung und der Zellteilung (Baseman, 1993; Miyata, 2008).

An der Adhärenz ist eine Reihe von Enzymen beteiligt, was auch experimentell nachgewiesen werden konnte. Einige davon sind P1, P30, Proteine A, B und C, HMW1 und HMW2. Die HMW-Proteine sind hierbei nicht direkt an der Bindung beteiligt, werden aber für die Gruppierung der Adhäsine in der Tip-Struktur benötigt (Razin *et al.*, 1998). Auch die Phosphorylierung durch eine Kinase ist für die Adhärenz wichtig (siehe 1.5.2) (Schmidl *et al.*, 2010). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass der Elongationsfaktor TU und die Pyruvatdehydrogenase, die an der Zelloberfläche der Mycoplasmen exprimiert wird, in die Bindung an Fibronectin involviert sind (Thomas *et al.*, 2013; Dallo *et al.*, 2002).

### 1.3.3 Wasserstoffperoxid als Pathogenitätsfaktor

Viele - jedoch nicht alle - Mycoplasmaarten sind in der Lage, Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) zu produzieren (Razin *et al.*, 1998).  $H_2O_2$  ist eine schwache Säure und gegenüber vielen Stoffen ein starkes Oxidationsmittel, wodurch es ebenfalls zytotoxisch wirkt. Bisher ist nicht bekannt, wie das Zellgift die Mycoplasmenzellen verlässt. Es sind verschiedene Peroxidtransporter beispielsweise in Pflanzen bekannt, in Mycoplasmen jedoch gibt es keine solchen Transportproteine (Jang *et al.*, 2012).

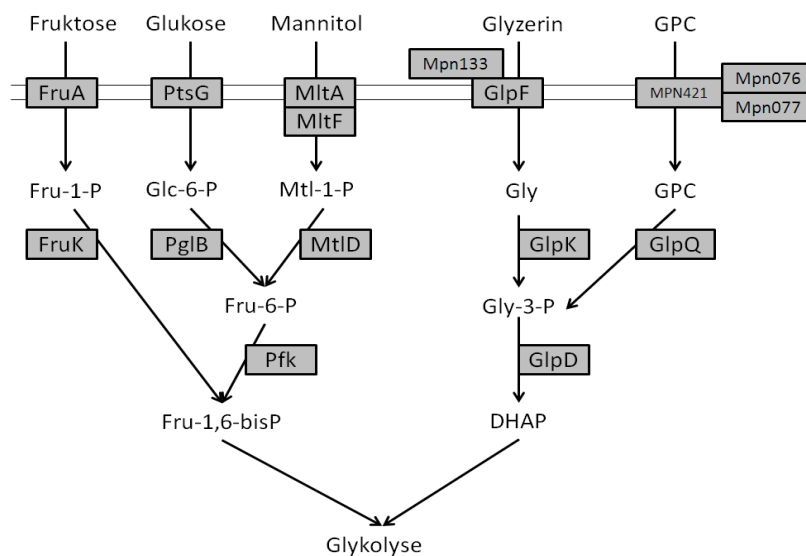
Für viele Mycoplasmen-Arten ist der Entgiftungsmechanismus ebenfalls unbekannt. Denn auch die Bakterien müssen sich selbst vor dem reaktiven Peroxid schützen. Bis heute ist nur *M. lowae* bekannt, die ein Gen besitzt, das für eine aktive Katalase kodiert (Balish, persönliche Mitteilung). In keiner anderen Art konnte man dieses Enzym oder andere Entgiftungsenzyme wie die Superoxiddismutase finden.

Sowohl *M. pneumoniae* als auch *M. genitalium* können  $H_2O_2$  produzieren. Der genaue Mechanismus für die Entstehung wird im folgenden Kapitel genauer beschrieben. Durch die Freisetzung des Giftes werden Zellen (Lungenepithel oder Gewebe des Urogenitaltraktes) im Wirt zerstört, wodurch Ressourcen für die Mycoplasmen freigesetzt werden. Dabei verlieren die Wirtszellen reduziertes Gluthation, Hämoglobin wird denaturiert und Erythrozyten werden oxidiert (Razin *et al.*, 1998). Auch für andere Mycoplasmaarten konnte gezeigt werden, dass  $H_2O_2$  ein wichtiger Pathogenitätsfaktor ist (Khan *et al.*, 2005; Bischof *et al.*, 2008). Doch nicht nur Mycoplasmen nutzen Peroxid, um den Wirt zu schädigen, ein ähnlicher Mechanismus konnte auch für andere Bakterien gezeigt werden (Moy *et al.*, 2004; Bolm *et al.*, 2004; Jansen *et al.*, 2002).

## 1.4 Kohlenstoffverwertung in Mycoplasmen

Alle Mycoplasmen haben ein eingeschränktes Atmungssystem und besitzen keinen vollständigen Zitratzyklus. Außerdem besitzen sie weder Chinone noch Cytochrome, so dass es nicht zu einer oxidativen Phosphorylierung kommen kann. Dies wiederum bedeutet, dass die Bakterien wenig Energie im Verhältnis zu den metabolischen

Endprodukten produzieren. Mycoplasmen sind in der Lage, eine Reihe von Kohlenstoffquellen zu nutzen und je nach Fähigkeiten werden sie in fermentative und nicht-fermentative Organismen eingeteilt (Razin *et al.*, 1998). *M. pneumoniae* und *M. genitalium* setzen Kohlenhydrate zu Säuren um, wodurch der pH-Wert des umgebenden Mediums sinkt. Dabei wird Pyruvat aus der Glykolyse entweder zu Laktat oder in mehreren Schritten zu Acetat umgesetzt (Halbedel *et al.*, 2007). Die Gene der ATPasen aus *M. genitalium*, *M. pneumoniae* und *M. gallisepticum* stimmen in der Reihenfolge und Anzahl mit denen von *E. coli* und *B. subtilis* überein. Sie besitzen in den Mycoplasmen jedoch noch die charakteristischen Eigenschaften eines Lipoproteins, wodurch sie in der Membran verankert sind, eine Besonderheit, die es nur in Mycoplasmen gibt (Razin *et al.*, 1998).



**Abb.1.1. Systeme für die Aufnahme und Verwertung unterschiedlicher C-Quellen:** Fructose und Glucose werden über ein PTS aufgenommen und auch die Gene für die Mannitolverwertung sind vorhanden. Die drei Zucker werden durch unterschiedliche Phosphotransferasen phosphoryliert und zu Fructose 1,6-bisphosphat umgewandelt und können somit in der Glykolyse verwertet werden. Glycerin und GPC werden durch spezielle Aufnahmesysteme in die Zelle transportiert und in mehreren Schritten zu Dihydroxyacetonphosphat verarbeitet, welches ebenfalls in die Glykolyse einfließen kann. (Halbedel *et al.*, 2007; Großhennig *et al.*, 2012)

Experimentell konnte gezeigt werden, dass *M. genitalium* und *M. pneumoniae* Fructose, Glucose und Glycerin verwerten können. Die vorherrschende Kohlenstoffquelle im Wirt

sind jedoch Phospholipide. Als ein solcher Vertreter eignet sich Glyzerylphosphorylcholin (GPC) in Experimenten. Glycerin-3-Phosphat (G3P) kann jedoch nicht aufgenommen und verwertet werden. Außerdem sind Enzyme für die Mannitolverwertung vorhanden, eine Aktivität konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden (Halbedel *et al.*, 2007). In Abbildung 1.1 ist eine Übersicht der vorhandenen Aufnahmesysteme dargestellt.

#### **1.4.1 Der Fruktose- und Glukosestoffwechsel**

Beide Kohlenhydrate werden über das Phosphoenolpyruvat:Zucker Phosphotransferase System (PTS) in die Zelle transportiert. Das PTS besteht aus drei Enzymen: Enzym I, Enzym II und HPr. Bei dem Transport durch die Membran werden die Zucker von EII phosphoryliert. In vorherigen Schritten wird ein Phosphat von Phosphoenolpyruvat auf EI übertragen. Dieses Enzym dient wiederum als Phosphatdonor für HPr, das am Histidin15 phosphoryliert wird und wiederum die Phosphatgruppe auf das EII überträgt. Durch die Phosphorylierung bleiben die Zucker in der Zelle und sind für die weitere Verwertung aktiviert. Sowohl Glukose als auch Fruktose werden in der Glykolyse abgebaut und zur ATP-Gewinnung genutzt. Also ist die Substratkettenphosphorylierung die einzige Möglichkeit zur Energiegewinnung in *M. pneumoniae* und *M. genitalium*. Glukose dient den Mycoplasmen als beste Kohlenstoffquelle, das Wachstum ist deutlich stärker als mit Glycerin oder Fruktose (Halbedel *et al.*, 2007).

#### **1.4.2 Der Glycerinstoffwechselweg**

Glycerin kann den Zellen ebenfalls als Kohlenstoffquelle dienen, es wird jedoch nicht über ein PTS aufgenommen. Der Transport in die Zelle findet über das Enzym GlpF statt. Eine neue Studie hat gezeigt, dass am Transport zwei weitere Proteine Mpn133 und Mpn284 beteiligt sind. Untersuchungen an Knockoutmutanten haben gezeigt, dass diese beiden Proteine essentiell für die Glycerinaufnahmen sind (Großhennig *et al.*, 2012). Auch bei dieser Kohlenstoffquelle erfolgt eine Phosphorylierung. Dabei überträgt GlpK ein Phosphat von ATP auf das Glycerin, so dass G3P entsteht. In einem weiteren Schritt wird das G3P zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) umgewandelt (siehe 1.4.1), welches

in der Glykolyse weiterverwertet werden kann. Auch GPC wird über ein ähnliches System in die Zelle aufgenommen. GlpU (Mpn421), Mpn076 und Mpn077 bilden das Aufnahmesystem für diese Kohlenstoffquelle. Dabei ist GlpU essentiell für den Transport, Mpn076 und Mpn077 steigern die Aufnahmen, sind aber einzeln deletierbar, ohne dass der Transport ganz ausgeschaltet wird (Großhennig *et al.*, 2012). Nach der Aufnahme von GPC erfolgt eine Abspaltung von Cholin durch das Enzym GlpQ. Auf diese Weise entsteht G3P, das in den Glyzerinstoffwechselweg einfließt (Schmidl *et al.*, 2011).

### 1.4.3 Einfluss der Kohlenstoffquelle auf die Peroxidbildung

Wie bereits erwähnt, wird G3P zu DHAP umgewandelt. In diesem Schritt, der durch GlpD katalysiert wird, entsteht  $H_2O_2$ . Homologe von GlpD sind in der Bakterienwelt weit verbreitet, jedoch produziert nur ein Teil der Bakterien mit diesem Protein Wasserstoffperoxid (Ding *et al.*, 20012). GlpD ist als Dehydrogenase annotiert, das Enzym zeigt jedoch Oxidaseaktivität, d.h., es verwendet Sauerstoff als Elektronenakzeptor. In anderen Bakterien wird  $NAD^+$  als Elektronenakzeptor genutzt. Eine *glpD*-Mutante zeigt verringerte Zytotoxizität und ist nicht mehr in der Lage, Wasserstoffperoxid zu produzieren, wenn Glyzerin oder GPC als Kohlenstoffquelle supplementiert werden. Dies konnte bisher für *M. pneumoniae* und *M. gallisepticum* gezeigt werden und auch *M. genitalium* besitzt ein Homolog von GlpD (Hames *et al.*, 2009; Razin *et al.*, 1998).

## 1.5 Regulation in Bakterien

Im Laufe der Evolution haben Bakterien unterschiedliche Mechanismen entwickelt, um sich verschiedenen Umwelteinflüssen anzupassen. Viele Bakterien, wie z.B. das Bodenbakterium *Bacillus subtilis*, müssen sich an schwankende Bedingungen wie Temperaturunterschiede, osmotischen Stress und wechselnde UV-Strahlung anpassen (Hoffmann und Bremer, 2011; Ismail und Nochal, 1970). Doch auch Pathogene können in ihrem Wirt auf unterschiedliche Lebensbedingungen, wie einen schwankenden pH-Wert oder unterschiedliche Sauerstoffgehalte, treffen (Garren *et al.*, 1998). Unterschiedliche

Lebensweisen, wie der Übergang in die Sporulation, müssen ebenfalls reguliert werden (Higgins und Dworkin, 2012). Eine wichtige Rolle bei der Wahrnehmung äußerer Einflüsse spielen sogenannte Zweikomponentensysteme. Diese sind aus einer Sensorkinase und einem Responseregulator aufgebaut, durch die Signale ins Zellinnere weitergeleitet werden können (Jung *et al.*, 2012). Solche Systeme sind jedoch bei Mycoplasmen nicht bekannt. Dabei kann die Regulation sowohl über die Expression der Gene, als auch über Modifikationen an existierenden Proteinen geschehen.

### **1.5.1 Regulation auf Transkriptionsebene**

Die Transkription bestimmter Gene kann unterschiedlich reguliert sein. Eine Möglichkeit der Regulation bieten Aktivator- oder Repressorproteine (Lee *et al.*, 2012). Diese können durch Bindung an die Promotorregion der DNA das Übersetzen der Gene fördern oder unterdrücken. Für eine solche Regulation gibt es nur wenige Beispiele in Mycoplasmen. Eines ist der Repressor der Hitzeschockantwort in *Mycoplasma hyopneumoniae* HrcA. Dieser kann mit einem perfekten, invertierten Repeat (dem sogenannten CIRCE-Element) vor dem DnaK-Gen interagieren. Sowohl der Repressor als auch das CIRCE-Element sind in Mycoplasmen konserviert (Chang *et al.*, 2007).

*B. subtilis* besitzt 19 verschiedene Sigmafaktoren. Diese Proteine können an die Promotorregion (-35 und -10 Region eines Gens) ihrer Zielgene binden und die Transkription initiieren. Dabei können unterschiedliche Sigmafaktoren genutzt werden, um sich neuen Umwelteinflüssen anzupassen (Kroos und Yu, 2000). Die Stressantwort oder die Sporulation werden beispielsweise über eigene Sigmafaktoren gesteuert (Kroos *et al.*, 1999; Zuber, 2009). Mycoplasmen besitzen im Gegensatz dazu nur einen Sigmafaktor und es existiert keine konservierte -35-Region (Halbedel *et al.*, 2007). Transkriptomanalysen haben jedoch gezeigt, dass *M. pneumoniae* nicht alle Gene konstitutiv exprimiert, sondern auf externe Stimuli wie erhöhte Temperatur, oxidativen Stress oder Hungerstress mit einer veränderten Transkription der entsprechenden Gene reagieren kann (Güell *et al.*, 2009).

Eine andere Möglichkeit der Regulation auf RNA-Ebene sind sogenannte RNA-Schalter. Hierbei bilden sich Strukturen in der RNA aus, die durch Bindung von Metaboliten, RNAs oder Proteinen begünstigt oder aufgelöst werden. Dadurch kann die Translation der

mRNA aktiviert oder reprimiert werden (Roth und Breaker 2009). Beispiele für solche RNA-Schalter sind in Mollicutes bisher jedoch wenig erforscht (Kim *et al.*, 2007). Allerdings wurden in einer neueren Studie 117 bisher unbeschriebene RNAs gefunden, von denen viele für kein Protein kodieren und von denen 89 in einer „antisense“ Konfiguration zu bekannten Genen liegen. Dies spricht für eine regulatorische Funktion dieser RNAs (Güell *et al.*, 2009). Eine neue Studie gibt Hinweise darauf, dass Methylierungsmuster der DNA eine mögliche Rolle bei der Transkriptionsregulation von *M. pneumoniae* und *M. genitalium* spielen könnten (Lluch-Senar *et al.*, 2013).

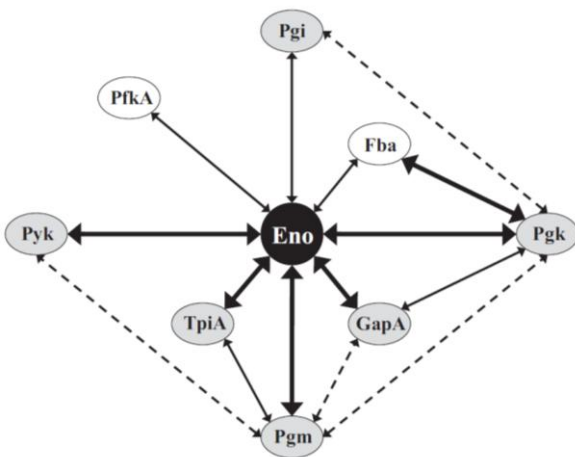
### 1.5.2 Regulation auf post-translationaler Ebene

Neben der Regulation auf Ebene der Transkription gibt es auch Modifikationen an fertigen Proteinen, die beispielsweise zu deren Aktivität beitragen. Einige Enzyme besitzen neben einem aktiven Zentrum auch noch ein allosterisches Zentrum. An diese können Effektormoleküle binden und die Aktivität des Enzyms herauf- oder herabsetzen. Ein weiteres Beispiel für eine posttranslationale Modifikation ist die Abspaltung des ersten Methionins durch eine Methioninaminopeptidase. Außerdem können ganze Signalpeptide von Proteinen abgespalten oder Vorläuferproteine in kleinere Untereinheiten gespalten werden (Pyrowolakis *et al.*, 1998; Catrein *et al.*, 2005).

Proteine können jedoch nicht nur durch Abspaltung, sondern beispielsweise auch durch Phosphorylierungen, Acetylierungen, Glycosylierungen etc. modifiziert werden (Whitmore und Lamont, 2012; Thao und Escalante-Semerena, 2012; Calo *et al.*, 2010). In *Mycoplasma pneumoniae* sind bisher 68 phosphorylierte Proteine bekannt und bei 15 von diesen kennt man die genaue Aminosäure, die das Phosphat trägt. In der entsprechenden Studie konnten zwei Kinasen, Mpn223 (HprK) und Mpn248 (PrkC, Serin/Threonine-Kinase), und eine Phosphatase, Mpn247 (PrpC), entdeckt werden. HprK zeigt jedoch eine hohe Spezifität und phosphoryliert nur das Hpr-Protein und auch für PrkC konnten nur vier Zielproteine ermittelt werden (Mpn256, Mpn311, Mpn452 und Mpn474). Diese Entdeckungen legen nahe, dass es noch mindesten eine weitere Kinase in *M. pneumoniae* geben muss. Die wichtige Rolle von Phosphorylierungen zeigt sich in der Motilität und der Zytoadhärenz. Eine Transposonmutante der Phosphatase zeigte

eine verringerte Motilität und die Mpn248-Mutante wies eine verringerte Zytoadhärenz auf. Hinzu kommt, dass alle Proteine aus der Glykolyse phosphoryliert sind, was ebenfalls auf die Wichtigkeit dieser Modifikation schließen lässt. Die Phosphorylierungen können eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Halbwertszeit von Proteinen spielen, aber auch deren Aktivität beeinflussen. Zusätzlich sind viele Proteine der Translationsmaschinerie wie ribosomale Proteine, Chaperone oder tRNA-Synthetasen Teil des Phosphorylierungsnetzwerkes (Schmidl et al., 2010; Su et al., 2007; Gupta et al., 2007).

Auch die Acetylierung von Proteinen spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse (Hu et al., 2010). Die Bedeutsamkeit zeigt sich darin, dass in *Mycoplasma* dreimal so viele Acetylierungen nachgewiesen werden konnten wie in Bakterien, die ein sehr viel größeres Genom besitzen, wie zum Beispiel *E. coli*. Praktisch alle zellulären Prozesse sind von Phosphorylierung oder Acetylierung betroffen (van Noort et al., 20012).



**Abb. 1.2: Das Glykosom im *M. pneumoniae*:** Die Enzyme aus der Glykolyse interagieren miteinander, dabei bildet die Enolase den Kern des Glykosoms, mit dem alle weiteren Enzyme interagieren. Zusätzlich kommt es noch zu weiteren Interaktionen zwischen den außen liegenden Proteinen, wie z.B. GapA und Pgm. (Abb. aus Dutow et al., 2010)

Eine weitere Möglichkeit der Regulation besteht nicht nur in der Modifikation einzelner Proteine, sondern in der Art und Weise, wie Proteine miteinander interagieren. Dabei können allerdings Proteinmodifikationen die Fähigkeit zur Interaktion beeinflussen. Für *B. subtilis* konnte eine Reihe von Interaktionen nachgewiesen werden; meist handelt es sich um Enzyme aus einem metabolischen Pfad, die miteinander interagieren, man spricht hierbei von einem Metabolon (Meyer et al., 2011). Dadurch kommt es zu einem sogenannten „substrate channeling“. Dabei gelangen die Intermediate nicht ins Zytosol,

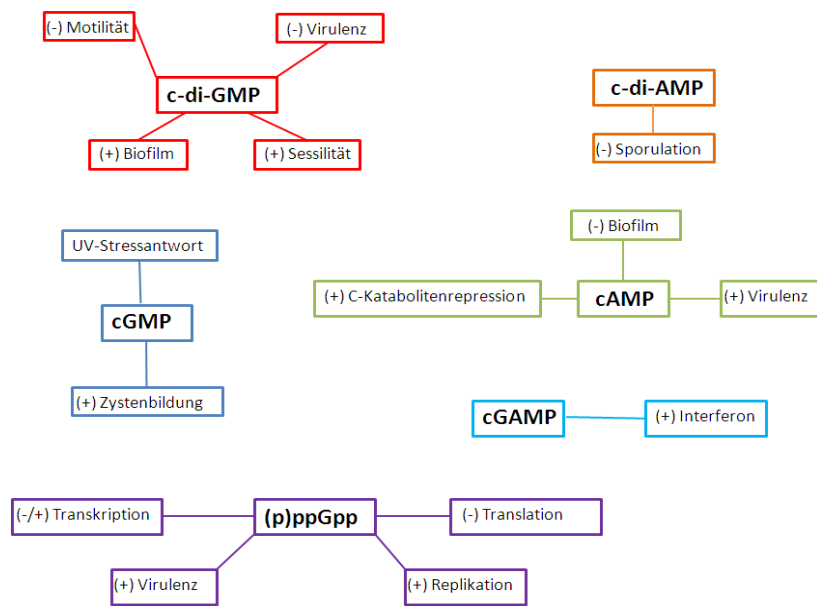


sondern bleiben in dem entsprechenden Metabolon, dies erhöht die Effizienz der Umsetzung einzelner Intermediate (Huang *et al.*, 2011). Auch für *M. pneumoniae* konnte gezeigt werden, dass die Enzyme aus der Glykolyse miteinander interagieren und ein Metabolon bilden (siehe Abb. 1.2) (Dutow *et al.*, 2010).

Besonders bei Bakterien mit reduziertem Genom konnte gezeigt werden, dass die vorhandenen Proteine mit mehr Partnern interagieren als ihre Orthologe in komplexeren Bakterien. Durch Interaktionen können teilweise sogar neue enzymatische Aktivitäten entstehen. Dieses Phänomen tritt häufig bei Pathogenen auf und spielt in Mycoplasmen eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Adhärenz von bzw. an Wirtszellen. Auf diese Weise können Eigenschaften, die durch die degenerative Evolution verloren gegangen sind, kompensiert werden (Kelkar und Ochman, 2013).

## 1.6 Zyklisches di-Adenosinmonophosphat in Bakterien

Bakterien besitzen eine Reihe kleinerer Signalmoleküle, sogenannte Nukleotidmessenger, wie cAMP, cGMP, cGAMP, c-di-AMP und (p)ppGpp (Beres und Lucas-Lenard, 1975; Gancedo, 2013; Linder, 2010; Sun, 2013; Mehne *et al.*, 2013). Welche Rolle diese Botenstoffe in Bakterien im Allgemeinen spielen können, ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Die Nukleotidmessenger können Einfluss auf viele unterschiedliche Prozesse in der Zelle nehmen (Kalia *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2012). Bisher konnte in verschiedenen Pathogenen ein Einfluss verschiedener Nukleotidmessenger auf die Virulenz gezeigt werden, in Mycoplasmen ist bisher jedoch keine derartige Regulation bekannt.



**Abb. 1.3: Nucleotidmessenger und ihre Funktionen:** Die Botenstoffe können unterschiedliche Einflüsse auf verschiedenste Zellprozesse ausüben. Dabei können sie sowohl aktivierend (+) als auch reprimierend (-) wirken. Auffällig ist, dass viele der Messenger in Pathogenen an der Virulenz beteiligt sind (Kalia *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2012).

In *Pseudomonas aeruginosa* trägt beispielsweise c-di-GMP zur Abwehr von antimikrobiellen Peptiden bei (Chua *et al.*, 2013). C-di-GMP spielt außerdem eine wichtige Rolle bei unterschiedlichen Effektorproteinen und bei der Bindung von RNA-Schaltern (Furukawa *et al.*, 2012). Der Botenstoff kann neben der Virulenz auch die Sessilität, die Motilität oder die Biofilmbildung beeinflussen (Sisti *et al.*, 2013).

Andere Nucleotidmessenger wie (p)ppGpp sind nicht nur für die Virulenz in Bakterien mitverantwortlich, sondern können sich auch auf essentielle Prozesse wie die Transkription, Translation oder sogar die Replikation auswirken (Geiger *et al.*, 20120; Denapoli *et al.*, 2013). Ein anderes Signalmolekül – cAMP – kann durch ein spezielles cAMP-Rezeptorprotein gebunden werden. Dieses Protein fungiert als Transkriptionsregulator und kann beispielsweise in *E. coli* die Kohlenstoff-katabolitenrepression steuern (Shimada *et al.*, 2013; Redfield *et al.*, 2002).

Neben c-di-GMP wurde ein weiterer „second messenger“ entdeckt, das zyklische di-Adenosinmonophosphat (c-di-AMP). Beide Signalmoleküle werden durch spezifische Enzyme synthetisiert und abgebaut (Oppenheimer-Shaanan *et al.*, 2011; Mehne *et al.*,

2013) In vielen Organismen spielt c-di-AMP eine essentielle Rolle, dabei kommt es sowohl in Bakterien, als auch in Archeen vor (Römling, 2008). In verschiedenen Organismen konnten bisher unterschiedliche Funktionen für diesen sekundären Botenstoff nachgewiesen werden. In *Staphylococcus aureus* wird die Zellgröße durch c-di-AMP kontrolliert. Durch die Veränderung der Bakteriengröße kann extremer Zellwand- und Zellmembranstress vermindert werden (Corrigan *et al.*, 2011). In *Listeria monocytogenes* konnte nachgewiesen werden, dass c-di-AMP aus der Zelle geschleust wird und eine wichtige Rolle bei der Wirtsantwort spielt (Woodward *et al.*, 2010). Auch für *B. subtilis* konnte nachgewiesen werden, dass jeweils mindestens eine der drei Diadenylatzyklasen (DACs) essentiell für den Organismus ist. Das c-di-AMP scheint hier sowohl bei der Zellwandsynthese als auch bei der Sporulation benötigt zu werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl ein zu hoher Level als auch ein zu niedriger schädlich für das Bakterium ist (Luo und Helman, 2012; Mehne *et al.*, 2012). Es gibt jedoch auch Bakterien wie *Escherichia coli*, die völlig ohne DACs und somit auch ohne den Botenstoff c-di-AMP auskommen.

Die drei DACs in *B. subtilis* besitzen zwar alle eine Diadenylatzyklasedomäne, unterscheiden sich aber im weiteren Aufbau voneinander. DisA besitzt eine DNA-Bindedomäne, CdaA ist als ein Membranprotein vorhergesagt und CdaS befindet sich im Zytosol. Auf Grund des unterschiedlichen Aufbaus und der unterschiedlichen Lokalisation lässt sich auf verschiedene Funktionen der Enzyme schließen. Hinzu kommt, dass DisA durch den Sigmafaktor SigM reguliert wird, der zur Regulation der Salzstressantwort dient, CdaA wird jedoch konstitutiv exprimiert (Jervis *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2002). CdaS hingegen ist Teil der sporulationsabhängigen Regulation. Die diverse Regulation lässt ebenfalls auf unterschiedliche Rollen für den Botenstoff in Abhängigkeit von verschiedenen Umwelteinflüssen schließen.

DisA steht für „DNA integrity scanning protein“ und ist in die Erkennung von DNA-Schäden involviert, die kurz vor der Sporulation behoben werden sollen (Oppenheimer-Shaanan *et al.*, 2011). In einer neuen Studie konnte gezeigt werden, dass CdaA an der Zellwandsynthese beteiligt ist und dass CdaS c-di-AMP für Sporen bereitstellt. Außerdem konnte bewiesen werden, dass eine strikte Regulation der DACs für *B. subtilis* notwendig ist (Mehne *et al.*, 2013).

In *M. pneumoniae* besitzt das Protein Mpn244 eine DAC-Domäne. Da Mycoplasmen jedoch ebenfalls auf DACs angewiesen, aber nicht zur Sporulation befähigt sind und keine Zellwand besitzen, muss c-di-AMP auch eine wichtige Rolle in anderen Prozessen spielen. Das *M. pneumoniae* Protein Mpn244 wurde mit einer Transmembrandomäne annotiert und befindet sich daher vermutlich ebenfalls an der Membran. Sowohl Mpn244 als auch das Homolog aus *M. genitalium* sind essentiell (Glass *et al.*, 2006).

## 1.7 Ziele der Arbeit

Thema dieser Arbeit ist die Verwertung unterschiedlicher C-Quellen und die damit verbundene Wasserstoffperoxidproduktion. Die bisherigen Arbeiten beschränkten sich auf die Verwertung einzelner Kohlenstoffquellen. Daher sollen in dieser Arbeit Wechselwirkungen verschiedener C-Quellen auf die Peroxidproduktion untersucht werden.

Dazu sollten vorhandene Transposonmutanten mit einer verringerten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion und somit eingeschränkter Zytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen untersucht werden. Eine weitere Aufgabe bestand in der Isolierung und Charakterisierung neuer Mutanten mit einem ähnlichen Phänotyp.

Außerdem sollten neben dem Laborstamm M129 weitere *M. pneumoniae* Stämme (FH und klinische Isolate) auf ihre Kohlenstoffverwertung untersucht werden. Der Laborstamm *M. genitalium* G37 und eine Knockoutmutante des *glpD*-Gens in diesem Stamm sollten ebenfalls in dieser Hinsicht charakterisiert werden.

In einem weiteren Ansatz sollte geklärt werden, ob Mycoplasmen c-di-AMP herstellen können und welches die Funktion dieses Nukleotidmessengers ist.

## 2. Material und Methoden

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

### 2.1 Bakterienstämme und Plasmide

Siehe Anhang dieser Arbeit.

### 2.2 Medien

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

|                          |                     |
|--------------------------|---------------------|
| <b>LB Medium (1l):</b>   | 5 g Hefeextrakt     |
|                          | 10 g NaCl           |
|                          | 10 g Trypton        |
| <b>MP-Medium (500ml)</b> | 7,35 PPLO broth     |
|                          | 11,92 g HEPES       |
|                          | 2 ml Phenolrot 0,5% |
|                          | 14 ml 2 N NaOH      |

ad. 400 ml deion. Wasser

pH 7,6 – 7,8

20 min autoklavieren

Abkühlen auf 56°C

anschließend Zugabe von: 100 ml Pferdeserum  
(hitzeinaktiviert)  
5 ml Penicillin 100.000 U/ml  
c-Quellen wurden mit einer  
Endkonzentration von 1% eingesetzt

|                   |          |  |
|-------------------|----------|--|
| <b>SP4 medium</b> | 1.75 g   | PPLO broth                             |
|                   | 5 g      | Trypton                                |
|                   | 2.65 g   | Pepton                                 |
|                   | 300.5 ml | deion. H <sub>2</sub> O                |
|                   |          | 20 min autoklavieren                   |
|                   |          | Nach Abkühlen auf ca. 50°C Zugabe von: |
|                   | 17.5 ml  | Hefeextrakt, 25%                       |
|                   | 50 ml    | Yeastolate (2%)                        |
|                   | 6 ml     | Phenolrot (0.1%, pH 7)                 |
|                   | 25 ml    | CMRL                                   |
|                   | 85 ml    | Fötale Rinderserum (FBS)               |
|                   | 1.71 ml  | Glutamin (50 mg/ml)                    |
|                   | 500 µl   | Ampicillin (100 mg/ml)                 |
|                   |          | C-Quelle auf 0.5% Endkonzentration     |
|                   |          | pH 7.8 mit 2 N NaOH einstellen         |

### Antibiotika

Die verwendeten Antibiotika wurden als 1000-fach konzentrierte Stammlösungen angesetzt. Ampicillin, Kanamycin, Penicillin und Gentamycin löste man dazu in deionisiertem Wasser, Tetrazyklin in 70% EtOH. Alle Lösungen wurden sterilfiltriert und bei -20°C aufbewahrt. Nach Abkühlung der Medien auf ca. 50°C erfolgte die Zugabe der Antibiotika in den entsprechenden Endkonzentrationen.

**Selektionskonzentration für *E. coli*:**Ampicillin 100 µg ml<sup>-1</sup>Kanamycin 50 µg ml<sup>-1</sup>**Selektionskonzentration für *M. genitalium* bzw. *M. pneumoniae*:**Gentamycin 160 µg ml<sup>-1</sup>Tetrazyklin 2 µg ml<sup>-1</sup>**2.3 Methoden****2.3.1 Allgemeine Methoden**

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

**Tab. 3.1. Allgemeine Methoden**

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

### 2.3.2 Anzucht von Bakterien

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

Soweit nicht anders angegeben, wurde *E. coli* in LB-Medium bei 37°C und 200 U min<sup>-1</sup> in Reagenzgläsern oder Schikanekolben angezogen. Beimpft wurde von frischen Vereinzlungsplatten bzw. aus Übernachtskulturen. Das Wachstum verfolgte man durch Messung der optischen Dichte bei  $\lambda = 600$  nm (Hames, 2008).

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

Eine Übernachtskultur in 4 ml bzw. 10 ml LB-Medium wurde bei 37°C angezogen, um am nächsten Tag eine Kultur (250 ml SOB-Medium) mit 250  $\mu$ l (bei *E. coli* DH5 $\alpha$  und BTH101) bzw. mit 8 ml (bei *E. coli* XL1 blue) anzupfen. Diese Hauptkultur wurde für 20-24 h bei 18°C bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5-0,9 bei 200 U min<sup>-1</sup> angezogen. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min mit 5000 U min<sup>-1</sup> bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden die Zellen erneut zentrifugiert (10 min, 5000 U min<sup>-1</sup>, 4°C) und in 20 ml TB-Puffer resuspendiert. Vorsichtig gab man 1,4 ml DMSO hinzu, bevor Aliquots von 200  $\mu$ l in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C eingelagert wurden.

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

Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Es wurden 200  $\mu$ l der Zellsuspension zu 10-100 ng DNA gegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis gestellt. Danach wurde das Reaktionsgefäß 1 min auf 42°C erwärmt, für 5 min auf Eis gestellt und nach Zugabe von 900  $\mu$ l LB-Medium für 1 h bei 37°C im Brutraum inkubiert. Von den Transformationsansätzen wurden jeweils 100  $\mu$ l und der abzentrifugierte Rest auf LB-Selektionsplatten (mit Ampicillin oder Kanamycin) ausplattiert. Das Bebrüten der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C (Hames, 2008).



**Anzucht von *M. pneumoniae* und *M. genitalium***

Zu 100 ml MP-Medium wurde 1 ml aus einer Stammkultur hinzugegeben und in 150 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bei 37°C inkubiert. Bei Wachstumskurven wurde definiert mit 2,5 mg Nassgewicht angeimpft. Die Kulturen wuchsen 48 h, 96 h oder 144 h. Mutanten wurden mit einer Endkonzentration von 160 µg/ml Gentamycin inkubiert. Das gleiche Verfahren fand für *M. genitalium* mit SP4 Anwendung. Mutanten dieses Organismus wurden mit 2 µg/ml Tetrazyklin selektiert.

**Stammhaltung von *M. pneumoniae* und *M. genitalium***

Der Überstand einer 100 ml Kultur wurde nach 96 h Inkubation bei 37°C weggeschüttet. Anschließend gab man 20 ml frisches MP-Medium auf die Zellen und schabte diese von der Oberfläche der Zellkulturflasche. Je 10 ml dieser Suspension wurden in sterile Vorkulturröhrchen gegeben und bei – 70°C weggefroren (Hames, 2008). Das gleiche Verfahren wurde für *M. genitalium* mit SP4 angewendet.

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

Der Überstand von 100 ml Kulturen wurde aus der Kulturflasche abgegossen und die adhärennten Zellen wurden zweimal mit 1 x PBS-Puffer gewaschen. Anschließend folgte die Abschabung der Zellen mit Hilfe eines Zellspatels und 1,5 ml 1 x PBS. Die Zellen wurden mit einer Pasteurpipette in ein zuvor abgewogenes Eppendorfggefäß überführt und abzentrifugiert (10000 x g, 4°C). Der Überstand wurde vollständig mit der Pipette abgenommen und das Pellet in dem Eppendorfggefäß auf der Feinwaage abgewogen. Das Nassgewicht ergab sich aus der Differenz der Gewichte des Eppendorfggefäßes mit und ohne Zellen. Zum Erstellen einer Wachstumskurve wurde das Nassgewicht jeweils einer 100 ml Kultur nach 2, 4, 6 und 8 Tagen bestimmt (Hames, 2008).

**Transformation von *Mycoplasma* Zellen via Elektroporation**

Von *M. pneumoniae* und *M. genitalium* wurden 100 ml Kulturen zweimal mit Elektroporationspuffer gewaschen und anschließend in 1,5 ml des eiskalten Puffers geschabt. Sie wurden 5 min bei 10.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 150 µl kaltem Puffer resuspendiert. Zur Elektroporation mischte man 50 µl

Zellsuspension, 10 µg Plasmid DNA und 1 µl Hefe tRNA und füllte auf 80 µl mit Puffer auf. Anschließend wurde das Gemisch in einer Elektroporationsküvette (Biorad  $\phi = 0.2$  cm) 15 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2.5 kV, 25 µF und 100  $\Omega$ . Danach folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 15 min auf Eis. Die Zellen wurden 5 min bei 4.500 rpm abzentrifugiert. Mittels einer Kanüle ( $\phi = 0.55$  mm) wurde eine Verdünnungsreihe in dem entsprechenden Medium angefertigt. Anschließend wurden von jeder Verdünnung 200 µl auf Platten des entsprechenden Mediums mit dem gewünschten Antibiotikum ausplattiert und über 14 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> (nur *M. genitalium*) inkubiert.

|                                     |         |                         |
|-------------------------------------|---------|-------------------------|
| <b>Elektroporationspuffer (1l):</b> | 1.91 g  | HEPES                   |
|                                     | 93.11 g | Sucrose                 |
|                                     | ad. 1 l | deion. H <sub>2</sub> O |
|                                     |         | pH 7.4                  |

### Anzucht von HeLa-Zellen

Der Überstand einer konfluent bewachsenen 25 ml Kultur nahm man nach 4 Tagen Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> mit einer sterilen Pasteurpipette ab. Nach der Zugabe von 5 ml frischem DMEM-Medium (mit 10% FBS) wurden die adhärenierten Zellen mit dem Zellschaber abgeschabt. Die HeLa-Zellen wurden in einem spitzen 50 ml Falcon tube bei 1400 Upm für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml frischem DMEM-Medium aufgenommen und die Zellen hat man durch Resuspendieren vereinzelt. Man gab 100 - 200 µl der Zellsuspension in eine Kulturflasche mit 25 ml frischem DMEM-Medium. Die Inkubation erfolgte wieder für 4 Tage bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> (Hames 2008).

### Zellzahlbestimmung von HeLa-Zellen

Eine Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,1 mm, Fläche 0,0025 mm<sup>2</sup>) diente zur Bestimmung der Zellzahl. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermischt und 10 µl dieser Lösung zwischen Deckglas und Kammer pipettiert. Das Trypanblau ermöglicht das Unterscheiden zwischen lebenden und toten Zellen, da diese blau angefärbt werden. Ausgezählt wurden nur lebende Zellen; dafür wurden immer 4 Großquadrate à 16

Quadraten verwendet. Die Zellzahl pro ml Zellsuspension hat man aus dem Mittelwert der ausgezählten Zellen pro Großquadrat berechnet und mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Volumenfaktor  $1 \times 10^4$  multipliziert (Hames, 2008).

### **2.3.3 Genetische Methoden**

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

Der Überstand einer 100 ml *M. pneumoniae* Kultur wurde abgenommen und die Zellen hat man dreimal mit 1 x PBS gewaschen. Das Abschaben der Zellen erfolgte mit 1,5 ml 1x PBS. Anschließend wurden die Zellen in einem Eppendorfgefäß abzentrifugiert (10000 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 750 µl 50 mM Tris-HCl pH 8,0 und 25 mM EDTA resuspendiert. Nach der Zugabe von 19 µl RNaseA (1 mg/ml) sind die Zellen für 15 Minuten bei 37°C inkubiert worden. Dann wurden 50 µl Proteinase K (25 mg/ml) und 75 µl 10% SDS hinzugegeben und der Ansatz wurde erneut für die Dauer von 2 h bei 50°C inkubiert. Nach der Zugabe von 300 µl 5 M NaCl wurde der Ansatz gemischt und für 5 Minuten auf Eis gestellt. Die Suspension wurde dann für 25 Minuten bei 10000 x g (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml eiskaltem Isopropanol gemischt und über Nacht bei - 20°C gelagert. Die Lösung wurde am nächsten Tag für 15 Minuten bei 10000 x g (4°C) abzentrifugiert, das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen und wieder zentrifugiert (10000 x g, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde bei RT unter der Sterilbank getrocknet. Anschließend löste man die DNA in 300 µl sterilem H<sub>2</sub>O (Hames, 2008).

#### **Bestimmung der DNA/RNA Konzentration**

DNA- oder RNA-Konzentrationen wurden mittels NanoDrop 1000 Spektrophotometer (PeqLab, Erlangen, Deutschland) bestimmt. Dazu gab man 1-2 µl der Lösung auf die Messplatte des Photometers und maß die Absorption bei 260 nm.

#### **DNA-Gelelektrophorese**

Die Größenbestimmung und die präparative Auftrennung von DNA-Restriktionsfragmenten erfolgte durch eine Gelelektrophorese mit 1%-igen Agarosegelen. Die Proben wurden mit DNA-Farbmarker versetzt und auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf

erfolgte bei 100-150 V, bis die Bromphenolblaubande das untere Drittel des Gels erreicht hatte. Danach wurden die Gele in einer Ethidiumbromid-haltigen Lösung (0,5 µg/ml) 10 min gefärbt, kurz in Wasser entfärbt und anschließend unter UV-Licht (254 nm) fotografiert. Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten verwendete man *EcoRI* und *HindIII* verdaute λ-DNA. Bei  $\lambda = 366$  nm konnte präparativ verdaute DNA aus Gelen ausgeschnitten und mit Hilfe des Gelextraktionskits von Qiagen nach Anleitung des Herstellers eluiert werden (Hames, 2008).

### **Southern Blot**

Die chromosomale DNA wurde mit einem oder zwei Restriktionsenzymen über Nacht bei 37°C verdaut. Am nächsten Tag konnten die verdaute DNA sowie ein DIG-markierter DNA-Marker (DNA molecular weight marker III DIG-labeled, Roche) auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen werden. Nach dem Gellauf wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-haltigen Lösung gefärbt, in Wasser entfärbt und unter UV-Licht fotografiert.

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

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

Beim Wechsel der Lösungen wurden Reste der vorherigen Lösung durch Abkippen entfernt. Die DNA fixierte man mittels UV-Licht (90 sek) an der Membran. Bis zur Hybridisierung wurde die Membran bei RT trocken und vor Staub geschützt gelagert (Hames, 2008).

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

Die Nylonmembran, die die UV-fixierte DNA trägt, wurde mit 20 ml Prähybridisierungslösung in Hybridisierungsröhrchen transferiert und bei 68°C eine Stunde im Hybridisierungssofen inkubiert. Anschließend wurde die Prähybridisierungslösung durch die Sonde ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte ÜN bei 68°C. Am nächsten Tag konnte die Sonde entfernt und bis zum weiteren Gebrauch bei – 20°C aufbewahrt werden. Die Membran wurde zweimal für 15 min bei RT in 50 ml 2 x SSC und 0,1% SDS Waschlösung sowie zweimal 15 min bei 68°C in 50 ml 0,1 x SSC und 0,1% SDS Waschlösung inkubiert, um unspezifisch gebundene RNA-Sonden zu entfernen. Anschließend konnte die Membran zur Detektion der DIG-markierten DNA-RNA Hybride eingesetzt werden (Hames, 2008).

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

Der Nachweis der DNA schloss sich direkt an die Hybridisierung an. Zunächst wurde die Membran für 5 min in 1 x Puffer I, danach für weitere 30 min in Puffer II inkubiert. Es folgte die Detektion der hybridisierten Sonden mittels Anti-DIG-Antikörper gekoppelt mit Alkalischer Phosphatase (30 min), die im Verhältnis 1:10000 in Puffer II gelöst waren. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min in Puffer I und danach 5 min in Puffer III gewaschen. Im letzten Schritt wurde die Membran zwischen eine Klarsichtfolie gelegt und mit 1 ml Puffer III, der 5 µl des Substrats CDP\* enthielt, 5 min im Dunkeln inkubiert. Nach Überführung der Membran in eine frische Folie wurde diese sofort in die Belichtungskassette gelegt. Abschließend erfolgte die Belichtung von Filmen, wobei je nach Bandenintensität unterschiedliche Belichtungszeiten (15 - 45 min) angewandt werden mussten. Dabei wurde die Chemilumineszenz detektiert, die bei der enzymatischen Spaltung von CDP\* durch die Alkalische Phosphatase entsteht (Hames, 2008).

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

Die Restriktionen mit Endonukleasen wurden in den vom Hersteller empfohlenen Puffern durchgeführt. Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase unter Verwendung des vom Hersteller mitgelieferten Puffers durchgeführt. Es wurden zwischen

10 und 100 ng Vektor-DNA und ein fünffacher Überschuss an Fragment eingesetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur (Hames, 2008).

### **Dephosphorylierung von DNA**

Die Dephosphorylierung des 5'-Endes von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe von Calf-Intestinal Alkalischer Phosphatase (CIAP) unter Einsatz des vom Hersteller mitgelieferten Puffers durchgeführt. Einem Ansatz mit einer DNA-Endkonzentration von ca. 3-10 ng/ $\mu$ l setzte man 1  $\mu$ l CIAP (1000 Units/ $\mu$ l) zu. Anschließend wurde 30 min bei 37°C inkubiert und danach erneut 1  $\mu$ l CIAP zugegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubation bei 37°C für 30 min. Anschließend wurde das Enzym 30 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Danach konnte der Ansatz direkt für eine Ligation verwendet werden (Hames, 2008).

### **Polymerasekettenreaktion (PCR)**

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

#### Reaktionsansatz für die *Pfu*-Polymerase (100 $\mu$ l) :

1  $\mu$ l Primer forward (100  $\mu$ M)

1  $\mu$ l Primer reverse complement (100  $\mu$ M)

3  $\mu$ l Matrizen-DNA (ca. 100 ng)

10  $\mu$ l 10 x *Pfu*-Polymerase Puffer

1  $\mu$ l *Pfu*-Polymerase (2,5 U  $\mu$ l<sup>-1</sup>)

4  $\mu$ l dNTPs (12,5  $\mu$ mol ml<sup>-1</sup>)

80  $\mu$ l deionisiertes Wasser

#### Reaktionsansatz für die *Taq*-Polymerase (100 $\mu$ l):

1  $\mu$ l Primer forward (100  $\mu$ M)

1  $\mu$ l Primer reverse complement (100  $\mu$ M)

3  $\mu$ l Matrizen-DNA (ca. 100 ng)

10  $\mu$ l 10 x *Taq*-Polymerase Puffer

10  $\mu$ l 10 x MgCl<sub>2</sub>

1  $\mu\text{l}$  *Taq*-Polymerase (5 U  $\mu\text{l}^{-1}$ )

4  $\mu\text{l}$  dNTPs (12,5  $\mu\text{mol ml}^{-1}$ )

70  $\mu\text{l}$  deionisiertes Wasser

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

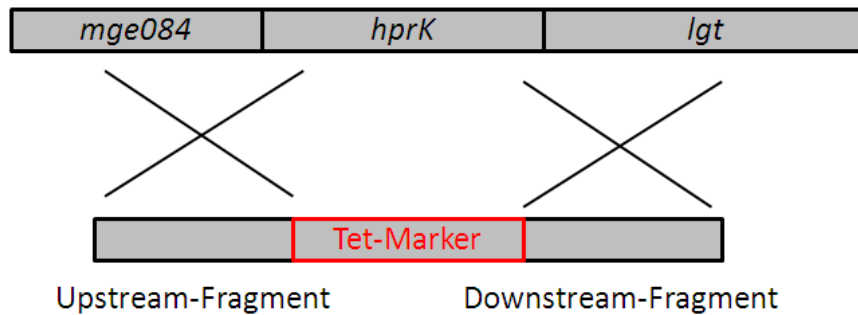
| Reaktion      | Temperatur | Dauer der Reaktion | Anzahl der Zyklen |
|---------------|------------|--------------------|-------------------|
| Vorlauf       | 95°C       | 5 min              | 1                 |
| Denaturierung | 95°C       | 1 min              | 30                |
| Anlagerung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

(Hames, 2008)

### Long-Flanking-Homology PCR (LFH-PCR)

Die Long Flanking Homology (LFH)-PCR dient der Herstellung linearer DNA-Fragmente zur Konstruktion von Deletionsmutanten mittels sogenannter Allelic-Replacement-Mutagenese. Die Herstellung einer *hprK*-Deletionsmutante ist in Abb. 2.1. schematisch dargestellt. Für die Konstruktion einer *hprK*-Deletionsmutante von *M. genitalium* wurde zunächst eine Tetrazyklin-Resistenzkassette vom Vektor pMT85 amplifiziert mittels der Primer AS36/37. Des Weiteren wurden zwei Primerpaare abgeleitet, mit denen die flankierenden Bereiche des *hprK*-Gens amplifiziert werden konnten (AS32/33 für das upstream-Fragment und AS34/AS35 für das downstream-Fragment). Diese Fragmente mit einer Größe von ca. 1000 bp mussten so gewählt werden, dass die Expression der angrenzenden Gene nicht beeinflusst wurde. An das strangaufwärts und an das strangabwärts liegende DNA-Fragment wurde mit dem reverse Primer bzw. forward Primer jeweils eine 25 Nukleotide lange Sequenz angehängt. Diese Sequenz ist komplementär zum 5'- bzw. 3'-Ende der Resistenzkassette. Die PCR-Fragmente wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. In einer zweiten PCR wurden die strangaufwärts und strangabwärts liegenden DNA-Fragmente und die Resistenzkassette über die 25 Nukleotide lange Sequenz miteinander verbunden und amplifiziert. Die eingesetzte DNA-Menge des oberen und unteren Fragmentes betrug jeweils 150 ng, die

der Resistenzkassette etwa 300 ng. Die Amplifikation der einzelnen Fragmente erfolgte mit Hilfe der *Phusion*-DNA-Polymerase (NEB). Zur Elektroporation wurde das PCR-Produkt mittels QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt (nach Diethmaier, 2008).



**Abb. 2.1.:** Konstruktion einer *hprK*-Deletionsmutante mit Hilfe der LFH-PCR. Durch doppelt homologe Rekombination sollte das *hprK*-Gen durch eine Resistenzkassette ersetzt werden.

### Isolierung von *M. pneumoniae* Transposonmutanten

Die Isolierung der Transposonmutanten erfolgte aus einer Transposonmutantenbank mit Hilfe der sogenannten Haystack-Methode (Halbedel *et al.*, 2006). Die Pools der Mutantenbank wurden verwendet, um Mutanten zu finden, in denen ein bestimmtes Gen durch ein Transposon unterbrochen wurde. Dazu wurde eine PCR durchgeführt mit einem Primer, der sich in dem vorderen Bereich des Genes und einem reversen Primer, der sich in dem vorderen Bereich des Transposons anlagert. Ein PCR-Produkt in einem der Pools gab einen Hinweis darauf, dass hier eine Mutante enthalten sein könnte. Die PCR wurde dann noch einmal mit jedem Klon dieses Pools durchgeführt und der Klon, der ein PCR-Produkt lieferte, konnte isoliert und in flüssigem Medium angezogen werden. Die Überprüfung der Mutante auf ihre Reinheit fand mit einem Southern Blot statt (Hames, 2008).

### Lösungen für das Arbeiten mit DNA

**Agarosegel 1%**

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

für DNA-Gelelektrophorese



---

|  |   |
|--|---|
| <b>Denaturierungspuffer</b>                              | 1,5 M NaCl<br>0,5 M NaOH<br>ad. 1 l mit deion. Wasser   |
| <b>Depurinisierungslösung</b>                            | 250 mM HCl  |
| <b>DNA-Probenpuffer 5 x</b><br>für DNA-Gelelektrophorese | 5 ml Glycerin<br>200 µl 50 x TAE<br>10 mg Bromphenolblau 10 mg Xylencyanol<br>4,5 ml deion. Wasser  |
| <b>OB-Medium (1 l):</b>                                  | 20 g Trypton<br>5 g Hefeextrakt<br>0,584 g NaCl<br>0,188 g KCl<br>ad. 1 l deion. H <sub>2</sub> O<br>10 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> einzeln autoklaviert<br>10 ml 1 M MgSO <sub>4</sub> einzeln autoklaviert |
| <b>TB-Puffer (500 ml):</b>                               | (pH 6,7) 1,51 g PIPES<br>1,1 g CaCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O<br>9,32 g KCl<br>ad. 472,5 ml deion. H <sub>2</sub> O<br>27,5 ml 1 M MnCl <sub>2</sub> einzeln autoklaviert                           |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| <b>MMR-Puffer:</b>               | 20 mM Tris-HCl pH 8,5   |
|                                  | 3 mM MgCl <sub>2</sub>  |
|                                  | 50 mM KCl   |
|                                  | 0,5 mM NAD  |
| <b>Neutralisierungspuffer:</b>   | 1 M Tris-HCl pH 7,5   |
|                                  | 1,5 M NaCl  |
|                                  | ad. 1 l mit deion. Wasser                                     |
| <b>PBS 10x:</b>                  | 2 g KCl   |
|                                  | 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                           |
|                                  | 14,24 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O |
|                                  | 80 g NaCl   |
|                                  | ad. 1 l mit deion. Wasser                                     |
|                                  | auf pH 7,4 einstellen   |
| <b>TAE-Puffer 50 x</b>           | 242 g Tris  |
| <b>für DNA-Gelelektrophorese</b> | 57,1 ml Essigsäure  |
|                                  | 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0                                      |
|                                  | ad. 1l mit deion. Wasser                                      |

### 2.3.4 Arbeiten mit RNA

#### Isolation von RNA aus Mycoplasmen

Zur Isolation von RNA aus Mycoplasmen diente das Qiagen Kit RNeasy® Midi Kit. Das Protokoll wurde jedoch modifiziert: Bei 4 Tage alten Kulturen wurde das Medium abgegossen und die Zellen wurden 2x mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte das

Abschaben der Zellen in 2ml RLT Puffer und das Wiederholen des Schrittes mit 3 ml. 5 ml unvergällter EtOH (96%) wurden unter Vortexen langsam hinzugegossen. Anschließend wurde eine Säule aus dem Kit mit max. 4 ml beladen und bis 4000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis die gesamte Lösung aufgetragen war, der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden 4 ml RW1 Puffer auf die Säule gegeben und bis 4000 rpm/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 2,5 ml RPE Puffer. Daraufhin wurde die Säule in ein neues Falcontube überführt. Es wurden 400µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und diese für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde 5 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem Durchfluss wiederholt und die RNA wurde mit Fälllösung ÜN bei -80°C gefällt. Am nächsten Tag wurde die RNA 30 min bei 13.000 rpm/min abzentrifugiert, mit 70%igem EtOH gewaschen, getrocknet und in 50 µl RNase-freiem Wasser für 1h bei 37°C gelöst. (Hames, 2008)

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

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

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

Die *in-vitro*-Transkription erfolgte während einer zweistündigen Inkubation bei 37°C. Die Reaktion wurde nach Ablauf der Inkubationszeit durch Zugabe von 1 µl 0,5 M EDTA pH 8,0 abgestoppt und die markierte RNA-Sonde durch Zugabe von 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl eiskaltem 96% (v/v) Ethanol ÜN bei -20°C präzipitiert. Durch Zentrifugation (10000 x g, 4°C, 15 min) wurde die markierte RNA pelletiert und der Überstand konnte abgenommen werden. Das gewonnene Pellet wurde mit 50 µl eiskaltem 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 10000 x g wurde der Überstand abgenommen und das restliche Ethanol bei RT abgedampft. Das erhaltene Pellet wurde in 100 µl sterilem deionisiertem Wasser durch Inkubation für 30 min bei 37°C nach Zugabe von 1 µl RNase Inhibitor gelöst und die so hergestellte Sondenstammlösung bei -80°C aufbewahrt (Hames, 2008).

### **RNA-Slot-Blot**

Zur Überprüfung von Expressionsleveln wurde RNA in einer Verdünnungsreihe auf eine positiv geladene Nylonmembran geblottet. Dazu wurden 0,25 µg, 0,5 µg, 1 µg und 2 µg RNA jeder zu untersuchenden Probe mit 10x SSC Puffer auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und in jeweils einen Slot der Apparatur gegeben. Als Negativ- und Positivkontrolle dienten Hefe tRNA und chromosomale DNA von *M. pneumoniae*. Ein Vakuum von 80-100 mbar wurde angelegt und es wurde geblottet, bis die gesamte Flüssigkeit die Membran passiert hatte. Anschließend wurde der Blot auf Whatman Papier getrocknet und die Membran für 90 sek mit der RNA-Seite zum UV-Licht kreuzvernetzt. Es folgte ein Inkubationsschritt für 1 h bei 68°C in ~20 ml Prähybridisierungslösung. Die RNA-Sonde (15 µl RNA-Sonde in 5 ml Prähybridisierungslösung) wurde für 10 min gekocht und kurz auf Eis abgekühlt. Die Membran wurde in der Sondenlösung ÜN bei 68°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran erst zweimal in Puffer P1 für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Darauf folgten zwei Waschschrte in Puffer P2 für 15 min bei 68°C. Anschließend wurde die Membran 5 min in 1x DigP1 Puffer bei Raumtemperatur und 30 min in Puffer Px (1x DigP1 und 1% Blocking Reagenz) ebenfalls bei Raumtemperatur gewaschen. Der Anti-Digoxigenin Antikörper (5 µl) wurde mit 5 ml 10x Blocking Reagenz und 45 ml 1x DigP1 Puffer gemischt und die Membran darin für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min in 1x DigP1 Puffer und

einmal 10 min in Puffer 2 gewaschen. Diese Schritte erfolgten ebenfalls bei Raumtemperatur. Abschließend wurden 10 µl CDP-*star*<sup>®</sup>-Chemolumineszenz Substrat in 1 ml Puffer P3 gegeben und auf der Membran verteilt. Die Detektion erfolgte in einem Chemolumineszenz Imager (Intas, Göttingen, Deutschland)

### Lösungen für das Arbeiten mit RNA

|                                  |            |                            |
|----------------------------------|------------|----------------------------|
| <b>Natriumacetat 3M, pH 5.2</b>  | 0.246 g    | Natriumacetat              |
|                                  | ad. 1 ml   | deion. H <sub>2</sub> O    |
| <b>SSC, 20x, pH 7.0</b>          | 175.3 g    | NaCl                       |
|                                  | 88 g       | Tri-Sodium Zitrat dehydrat |
|                                  | ad. 1 l    | deion. H <sub>2</sub> O    |
|                                  |            | pH 7.0                     |
| <b>Prähybridisierungs-Lösung</b> | 200 ml     | Formamid                   |
|                                  | 100 ml     | 20x SSC Puffer             |
|                                  | 4 ml       | 10% N-Laurosy sarcosin     |
|                                  | 8 g        | Blocking Reagenz           |
|                                  | 28 g       | SDS                        |
|                                  | ad. 400 ml | deion. H <sub>2</sub> O    |
| <b>P1 Puffer</b>                 | 100 ml     | 20x SSC                    |
|                                  | 10 ml      | 10% SDS                    |
|                                  | add. 1 l   | deion. H <sub>2</sub> O    |
| <b>P2 Puffer</b>                 | 5 ml       | 20x SSC                    |
|                                  | 10 ml      | 10% SDS                    |
|                                  | add. 1 l   | deion. H <sub>2</sub> O    |

|                              |            |                         |
|------------------------------|------------|-------------------------|
| <b>P3 Puffer</b>             | 12.1 g     | Tris                    |
|                              | 5.8 g      | NaCl                    |
|                              | add. 1 l   | deion. H <sub>2</sub> O |
|                              |            | adjust pH 9.5           |
| <b>DigP1 Puffer, 5x</b>      | 58.04 g    | Maleinsäure             |
|                              | 43.83 g    | NaCl                    |
|                              | add. 1 l   | deion. H <sub>2</sub> O |
|                              |            | pH 9.5                  |
| <b>Blocking Reagenz, 10%</b> | 5 g        | Blocking Reagenz        |
|                              | add. 50 ml | 1x DigP1 Puffer         |

### Lösungen für RNA Präparation

|                                      |   |
|--------------------------------------|---|
| <b>RLT Puffer (1ml):</b>             | 10µl β-Mercaptoethanol<br>Ad. 1ml RLT-Buffer Qiagen             |
| <b>Fälllösung (auf 400µl Eluat):</b> | 40 µl 3M Natriumacetat pH 5,2<br>1000 µl Ethanol (96%, eiskalt) |

### 2.3.5 Arbeiten mit Proteinen

#### Überproduktion von Proteinen

Zur Überexpression von Proteinen wurden 800 ml LB/Ampicillin-Medium mit 20 ml einer Übernachtskultur von einem *E. coli*-Stamm, der das entsprechende Überexpressionsplasmid trug, angeimpft und bei 37°C geschüttelt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert. Zur Überprüfung der Überproduktion wurde vor der Induktion und

vor der Zellernte je eine Probe entnommen. Die Kultur wurde 2 h nach der Induktion zur Ernte für 10 min bei 9000 x g abzentrifugiert.

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

Die Überexpression und der Zellaufschluss mittels French Press bzw. One Shot wurden, wie oben beschrieben, durchgeführt. Für die Aufreinigung des Proteins wurde eine *Strep-Tactin Sepharose® Säule* (IBA) mit einem Matrixvolumen von 1ml verwendet. Diese Matrix bindet spezifisch eine Sequenz von acht Aminosäuren (WSHPQFEK). Die Bindung kann durch eine Verdrängungsreaktion mit D-Desthiobiotin wieder aufgehoben werden. Dadurch können Proteine, die mit dieser Aminosäuresequenz versehen sind, aus einem Proteingemisch isoliert werden. Zuerst wurde die Säule mit 5 ml Puffer W äquilibriert. Dann konnte die Säule mit 10 ml Proteinrohextrakt beladen werden. Zum Waschen der Säule wurden 4 mal 1,5 ml Puffer W verwendet. Das gebundene Protein konnte dann mit 3 ml Puffer E in Fraktionen von je 500 µl eluiert werden. Die bei der Elution erhaltenen Fraktionen wurden, wie oben beschrieben, überprüft (Hübner, 2008).

### **Dialyse von Proteinen**

Bei der Aufreinigung eines Proteins über eine N-terminale Hexahistidin-Sequenz oder *Strep-tag*-Sequenz ist zum Ablösen des an die Säule gebundenen Proteins Imidazol bzw. Desthiobiotin notwendig, welches weitere Versuche mit dem aufgereinigten Protein negativ beeinflussen kann. Um das Imidazol bzw. das Desthiobiotin aus der Proteinpräparation zu entfernen, wurden die Elutionsfraktionen in einem Dialyseschlauch (Ausschlussgröße: 12-14 kDa) gegen 1 x ZAP bzw. Dialyse-Puffer dialysiert. Die Dialyse wurde zweimal für 24 h bei 4°C durchgeführt. Das Volumen des Dialysepuffers betrug das 1000-fache der zu dialysierenden Proteinlösung (Hübner, 2008).

### **Denaturierende Polyacrylamid-Proteingelelektrophorese**

Denaturierende Polyacrylamid-Gele wurden nach der Methode von Laemmli *et al.*, 1970, hergestellt. Die Gele bestehen aus Trenn- und Sammelgel und wurden mit einer Dicke von

1 mm gegossen. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer (2x) versetzt und vor der Auftrennung 10 min auf 95°C erhitzt. Die Gelläufe erfolgen bei 100 V. Bei der Hoefer SE-400-Apparatur erfolgte der Gellauf entweder im Sammelgel bei maximal 90 V und im Trenngel bei maximal 180 V oder über Nacht bei 45 V. Die Elektrophorese wurde beendet, wenn das Bromphenolblau den unteren Gelrand erreicht hatte.

### **Coomassiefärbung von Polyacrylamid-Gelen**

Die zu färbenden Polyacrylamid-Gele wurden zunächst für 15 min in Fixierlösung inkubiert. Daraufhin wurden sie für 5 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt und anschließend in der Entfärbelösung entfärbt, bis ein optimaler Kontrast zwischen Proteinbanden und Gelhintergrund erreicht war. Die Durchführung aller Schritte erfolgte unter leichtem Schütteln.

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

Zellen aus einer 100 ml Kultur wurden zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend gab man 1,5 ml 1 x PBS zu den Zellen und löste diese mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Zellkulturflasche ab. Die Zellen wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und für 4 min bei 16000 x g (4°C) abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 600 mM NaCl resuspendiert. Die Zellen wurden mit der Ultraschallsonde aufgeschlossen (3 x 10 s, 4°C, 50 W) und die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (10 min, 16000 x g, 4°C) (Hames, 2008).

### **Western-Blot**

Der Transfer von Proteinen auf die PVDF-Membran erfolgte in einer Semi-Dry Blot Apparatur. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol (100%) aktiviert und anschließend für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Nach einem einstündigen Transfer bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> schwenkte man die PVDF-Membran über Nacht in Blotto, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der GlpK-Antikörper wurde 1:1000 in Blotto verdünnt eingesetzt und für 3 h mit der PVDF-Membran inkubiert. Nach drei Waschschritten von je 30 min mit Blotto erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG, Alkalische Phosphatase gekoppelt), der 1:100000 in Blotto verdünnt zum Einsatz kam.



Nach drei weiteren 30-minütigen Waschschritten mit Blotto wurde die Membran in deion. Wasser gespült und anschließend zur Erhöhung des pH-Wertes 5 min in Puffer III inkubiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte unter Verwendung des Chemilumineszenz-Substrates CDP\* (1:100 verdünnt in Puffer III). Das Chemilumineszenz-System ChemiSmart (peqlab) wurde zur Dokumentation der Signale verwendet (Hames, 2008).

### Lösungen zum Arbeiten mit Proteinen

|   |  |
|---|--|
| <b>Blotto</b> für Western-Blot                      | 100 ml 10 x TBS<br>25 g Magermilchpulver<br>1 ml Tween 20<br>ad. 1000 ml mit deion. Wasser |
| <b>Entfärbelösung</b><br>für Proteingelektrophorese | 10% Essigsäure   |
| <b>Fixierlösung</b><br>für Proteingelektrophorese   | 10% Essigsäure<br>25% Methanol   |
| <b>Proteinlaufpuffer 10x</b><br>für SDS-PAGE        | 1,92 M Glycerin<br>0,5 M Tris<br>10% SDS   |
| <b>Puffer III für Western-Blot</b>                  | 0,1 M Tris<br>0,1 M NaCl<br>ad. 1 l mit deion. Wasser<br>pH 9,5 mit HCl eingestellt        |

|  |  |
|--|--|
| <b>Puffer E</b>  | 100 mM Tris-HCl pH 8,0<br>150 mM NaCl<br>1 mM EDTA<br>2,5 mM Desthiobiotin   |
| <b>Puffer R</b>  | 100 mM Tris-HCl pH 8,0<br>150 mM NaCl<br>1 mM EDTA<br>1 mM HABA  |
| <b>Puffer W</b>  | 100 mM Tris-HCl pH 8,0<br>150 mM NaCl<br>1 mM EDTA   |
| <b>Probenpuffer 5 x für native<br/>Proteingelelektrophorese</b>  | 50% Glyzerin<br>0,25% Bromphenolblau   |
| <b>Sammelgel für denaturierende<br/>Proteingelelektrophorese</b> | 1,3 ml 30% Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1)<br>0,87 ml 1,5 M Tris-HCl pH 6,8<br>6,83 ml deion. Wasser<br>50 µl 20% SDS<br>100 µl 10% APS<br>20 µl TEMED |

---

|   |  |
|---|--|
| <b>SDS-Probenpuffer 2 x für<br/>denaturierende<br/>Proteingelelektrophorese</b> | 1,4 ml 1 M Tris-HCl pH 7,0               |
|   | 3 ml Glycerin                            |
|   | 2 ml 20% SDS                             |
|   | 1,6 ml 100% $\beta$ -Mercaptoethanol     |
|   | 0,01 g Bromphenolblau                    |
|   | 2 ml deion. Wasser                       |
| <b>TBS 10 x</b>   | 60 g Tris                                |
|   | 90 g NaCl                                |
|   | pH 7,6 mit HCl einstellen                |
|   | ad 1 l mit deion. Wasser                 |
| <b>Trenngel (12%) für denaturierende<br/>Proteingelelektrophorese</b>           | 4 ml 30% Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1) |
|   | 2,6 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8             |
|   | 3,3 ml deion. Wasser                     |
|   | 50 $\mu$ l 20% SDS                       |
|   | 100 $\mu$ l 10% APS                      |
|   | 10 $\mu$ l TEMED                         |
| <b>Transferpuffer für Westernblot auf<br/>PVDF-Membran</b>                      | 5,1 g Tris                               |
|   | 72,1 g Glycin                            |
|   | 750 ml Methanol                          |
|   | ad 5 l mit deion. Wasser                 |

|  |  |
|--|--|
| <b>Waschlösung für</b>                   | 45%(v/v) Methanol  |
| <b>Proteingelelektrophorese</b>          | 10%(v/v) Essigsäure  |
| <b>Zellaufschlusspuffer ZAP</b>          | 10 mM Tris-HCl pH 7,5<br>200 mM NaCl                                   |
| <b>Dialyse-Puffer (pH7,5 bzw. pH8,5)</b> | 20 mM Tris<br>100 mM KCl<br>2 mM DTT<br>ad 1 l deion. H <sub>2</sub> O |

### 2.3.6 Bestimmung von zyklischem di-Adenosinmonophosphat

Zur Bestimmung der intrazellulären c-di-AMP Konzentration wurde *E. coli* mit einem Überexpressionsvektor, der das Gen für die Diadenylatzyklase enthält, transformiert. Es erfolgte eine Induktion mit IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,5. Die Induktion lief über einen Zeitraum von 3h. Anschließend wurden 5 ml bzw. 15 ml der Kultur abgenommen. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (20 min, 4°C, 8000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 2 x 500 µl Medium in ein 1,5 ml Schraubdeckel-Eppendorfgefäß überführt und erneut 20 min bei 4°C und 8.000 rpm abzentrifugiert. Es folgte ein Extraktionsschritt mit 300 µl Extraktionslösung. Das gelöste Pellet wurde 15 min auf Eis inkubiert, 10 min auf 95°C erhitzt, wieder auf Eis abgekühlt und für 10 min bei 4 °C bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Extraktionsschritt wurde zweimal mit je 200 µl Extraktionslösung wiederholt unter Auslassung des Erhitzungsschrittes. Die Überstände der drei Extraktionsschritte wurden vereinigt und ÜN bei -20°C gelagert. Dabei ausgefallenes Protein wurde durch erneutes Zentrifugieren beseitigt. Der Überstand wurde in einer SppedVac® getrocknet. Die LC-MS/MS-Messung von c-di-GMP/c-di-AMP wurde im Massenspektrometrie-Labor für niedermolekulare bakterielle und eukaryotische Metabolite an der Medizinischen Hochschule Hannover durchgeführt nach Spangler (Spangler *et al.*, 2010).

Zur Quantifizierung von c-di-GMP/AMP nach Analyse per LC-MS/MS musste eine Proteinbestimmung aus einem Milliliter Flüssigkultur mit derjenigen OD durchgeführt werden, bei der auch die Extraktion gestartet wurde. Hierfür wurde den Kulturen jeweils 1 ml entnommen und bei 13.000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 800 µl 0,1 N NaOH gelöst, 15 min bei 95°C erhitzt und anschließend für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford durchgeführt.

Die gemessenen Konzentrationen an c-di-AMP wurden in nM angegeben, daher war es wichtig, die Konzentration auf die Proteinmenge in der Zelle zu beziehen (Proteinbestimmung), aber auch das geerntete Probenvolumen (15ml) in die Messung mit einzubeziehen (Diethmaier, 2011).

Zur c-di-AMP-Bestimmung in *M. pneumoniae in vivo* wurden Zellen für 4 Tage angezogen. Es wurden 15 OD<sub>550</sub> – Einheiten geerntet und nach dem gleichen Verfahren wie die *E. coli* Proben behandelt. Die Proteinbestimmung erfolgte mit 1ml Zellen mit einer OD<sub>550</sub> von 1. Dazu schloss man die Zellen via Ultraschall auf und es erfolgte eine Proteinbestimmung nach Bradford.

**Extraktionslösung:**  
(2/2/1)

8 ml Acetonitril  
8 ml Methanol  
4 ml H<sub>2</sub>O

### 2.3.7 Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion *in vivo*

Der Überstand einer 100 ml Kultur wurde abgegossen und die Zellen zweimal mit Puffer (67,6 mM HEPES pH 7,3, 140 mM NaCl, 7 mM MgCl<sub>2</sub>) gewaschen. Die adhärenierten Zellen wurden mit 1,5 ml Puffer von der Oberfläche geschabt und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Es folgte eine Zentrifugation von 10 min bei 10.000 x g bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde noch einmal mit 1 ml Puffer gewaschen. Die Zellen zentrifugierte man erneut für 10 min ab. Das Pellet wurde in 4 ml Puffer resuspendiert und 1 ml dieser Lösung wurde zur Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm eingesetzt. Für die Messung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion setzte man je

1,0 OD<sub>550</sub>-Einheiten in einem Gesamtvolumen von 1 ml ein. Der Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µl 100 mM Glycerin oder Glukose. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion wurde zum Zeitpunkt der Zugabe der Kohlenstoffquelle gestartet (Zeitpunkt 0) und nach 1 min, 2 min, 5 min, 10 min, 20 min und 120 min. Dabei wurden Analysestäbchen (Peroxid-Test, Merck) 1 sek in die Lösung eingetaucht und nach 15 sek verglich man die Farbe der Reaktionszone mit dem Farbfeld. Anhand des Farbfeldes konnte die entstandene Menge an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bestimmt werden (Hames, 2008).

### 2.3.8 Infektion von HeLa-Zellen mit Mycoplasmen

#### Vorbereitung der HeLa-Zellen

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

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

Die berechnete Menge an Zellen wurde in die Wells pipettiert und mit frischem DMEM auf 700 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurden die Titerplatten für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. (Hames, 2008)

#### Infektion der HeLa-Zellen

Die *M. pneumoniae* Kulturen wurden für 96 h bei 37°C inkubiert. Der Überstand der Kulturen wurde abgeschüttet und die adhärierenden Zellen dreimal mit 67,6 mM HEPES, 140 mM NaCl und 7 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 1,5 ml von diesem Puffer abgeschabt und bei 4°C und 10000 x g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Puffer mit einer 0,4 x 20 mm Kanüle resuspendiert. Je nach Größe des Pellet wurde es mit 5-8 ml Puffer verdünnt. Anschließend wurde 1 ml dieser Suspension zur Bestimmung der optischen Dichte bei  $\lambda = 550 \text{ nm}$  verwendet.

Die entsprechende Menge von 0,1 OD<sub>550</sub>-Einheiten wurde der Suspension entnommen und bei 4°C und 10000 x g für 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 125 µl frischem MP-Medium mit einer 0,4 x 20 mm Kanüle resuspendiert. Die Zellen wurden dann zu den HeLa-Zellen pipettiert und die Titerplatte für 2 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und durch 700 µl frisches DMEM ersetzt. Der Versuch wurde über 6 Tage verfolgt.

Zur Bestimmung der MOI (multiplicity of infection) wurden Verdünnungsreihen von 0,1 OD<sub>550</sub> Einheiten vor der Infektion und der Überstand 2h nach der Infektion auf MP-Platten ausplattiert und für 14 Tage bei 37°C inkubiert. Der MOI entsprach 1.000.000 *M. pneumoniae*-Zellen pro HeLa-Zelle (Hames, 2008).

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

Das Medium wurde aus den Wells entnommen, die HeLa-Zellen wurden mit 100 µl Kristallviolett-Lösung überschichtet und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch zweimalige Zugabe von 600 µl sterilem deionisiertem Wasser gewaschen, um Reste der Kristallviolett-Lösung zu entfernen. Die Färbelösung fixiert die Zellen und färbt sie blau an. In diesem Zustand wurden die Zellen mit einer Digital-Kamera fotografiert (Belichtungszeit 15 ms) (Hames, 2008).

Das gebundene Kristallviolett wurde anschließend gelöst. Dazu wurden die Zellen mit einer 4% Formaldehydlösung fixiert, mit 1 ml 0,5%iger SDS Lösung lysiert und anschließend hat man die optische Dichte bei 595 nm bestimmt. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte HeLa-Zellen. Die Menge an gelöstem Kristallviolett wurde in Relation zur Negativkontrolle gesetzt.

|                               |                        |
|-------------------------------|------------------------|
| <b>Kristallviolett-Lösung</b> | 0,75 % Kristallviolett |
|                               | 0,25 % NaCl            |
|                               | 1,75 % Formaldehyd     |
|                               | 50 % Ethanol           |

### 3. Ergebnisse

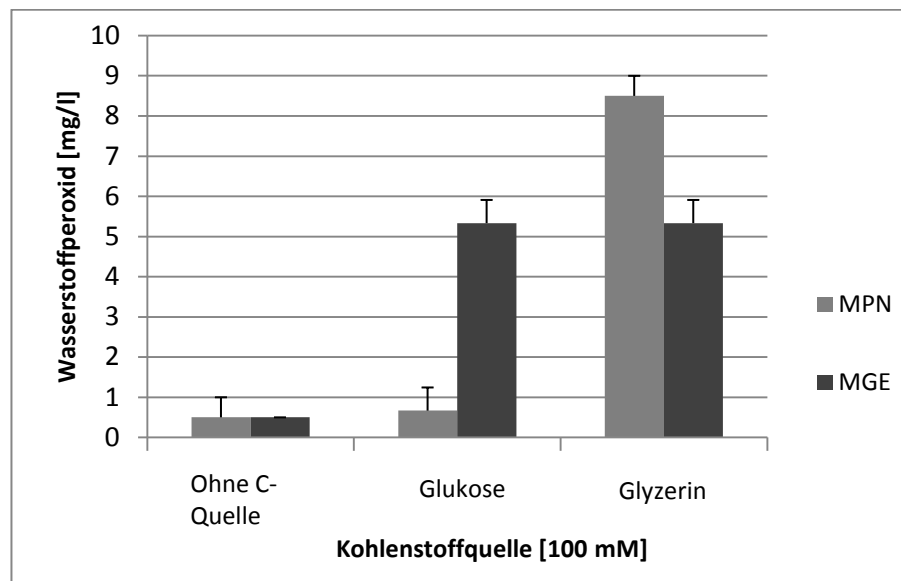
#### 3.1 Können in *M. genitalium* Mutanten mittels LFH konstruiert werden?

Es sollte eine *hprK*-Mutante in *M. genitalium* erzeugt werden, dazu sollte die Technik der LFH genutzt werden. Von diesem Gen ist bekannt, dass es nicht essentiell ist, da eine Transposonmutante existiert. Daher eignet sich dieses Gen um herauszufinden, ob eine LFH-Deletion möglich ist. Da es in Mycoplasmen zu Genüberlagerungen kommen kann und die Promotorregionen schlecht charakterisiert sind, wurden zwei ca. 1000 bp lange Fragmente „upstream“ und „downstream“ des *hprK*-Gens amplifiziert. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass sie sich innerhalb des auszuschaltenden Gens anlagerten. Dadurch kann sichergestellt werden, dass eventuelle Überlagerungen des vorherigen und des folgenden Gens erhalten bleiben und deren Funktion nicht beeinträchtigt wird. Zusätzlich kann es sein, dass sich an diesen Stellen Promotorregionen oder wichtige Strukturelemente befinden. Weiterhin wurde eine Tetrazyklinresistenzkassette amplifiziert. In der eigentlichen LFH-PCR wurden die drei PCR-Fragmente miteinander verbunden (siehe Abb. 2.1). Anschließend wurde das aufgereinigte PCR-Produkt mittels Elektroporation in die Mycoplasmen eingebracht. Auf Selektionsplatten konnte kein Wachstum nachgewiesen werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Deletion über eine LFH-PCR nicht möglich ist.

#### 3.2 Peroxidproduktion und Wachstum von *M. genitalium* G37

Der Glycerinmetabolismus und die Kohlenstoffverwertung in *M. pneumoniae* sind bereits gut charakterisiert (Halbedel *et al.*, 2007; Hames *et al.*, 2009). Um herauszufinden, ob sich die Kohlenstoffverwertung und die damit verbundene Wasserstoffperoxidproduktion in *M. genitalium* ähnlich verhalten, wurden verschiedene Experimente durchgeführt. Dazu wurde zunächst die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion gemessen (siehe Abb. 3.1).





**Abb.3.1:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in *M. pneumoniae* (MPN) und *M. genitalium* (MGE): Die Messung der Peroxidproduktion wurde für beide Stämme ohne Kohlenstoffquelle, mit Glukose und mit Glyzerin durchgeführt.

Bei beiden Wildtypstämmen zeigte sich nur ein geringer Hintergrund bei der Messung ohne Kohlenstoffquelle. Auch bei Glyzerin als C-Quelle konnten die Ergebnisse aus vorherigen Studien für *M. pneumoniae* reproduziert werden. Erwartungsgemäß zeigte sich auch bei *M. genitalium* mit gleicher Bedingung eine erhöhte Peroxidproduktion. Allerdings konnte auch bei der Messung mit Glukose Wasserstoffperoxid bei *M. genitalium* nachgewiesen werden. Eine Produktion von Peroxid mit Glukose findet in *M. pneumoniae* nicht statt.

Neben der Bestimmung der Peroxidproduktion wurde auch das Wachstum von *M. genitalium* mit unterschiedlichen C-Quellen untersucht. Dazu wurde das Feuchtgewicht von 100 ml Kulturen nach jeweils dem zweiten, vierten und sechsten Tag bestimmt. Als Kohlenstoffquellen dienten Glyzerin und Glukose. Mit beiden C-Quellen zeigte sich eine charakteristische Wachstumskurve (siehe Abb. 3.2). Das Wachstum in beiden Messungen unterscheidet sich nur geringfügig voneinander.

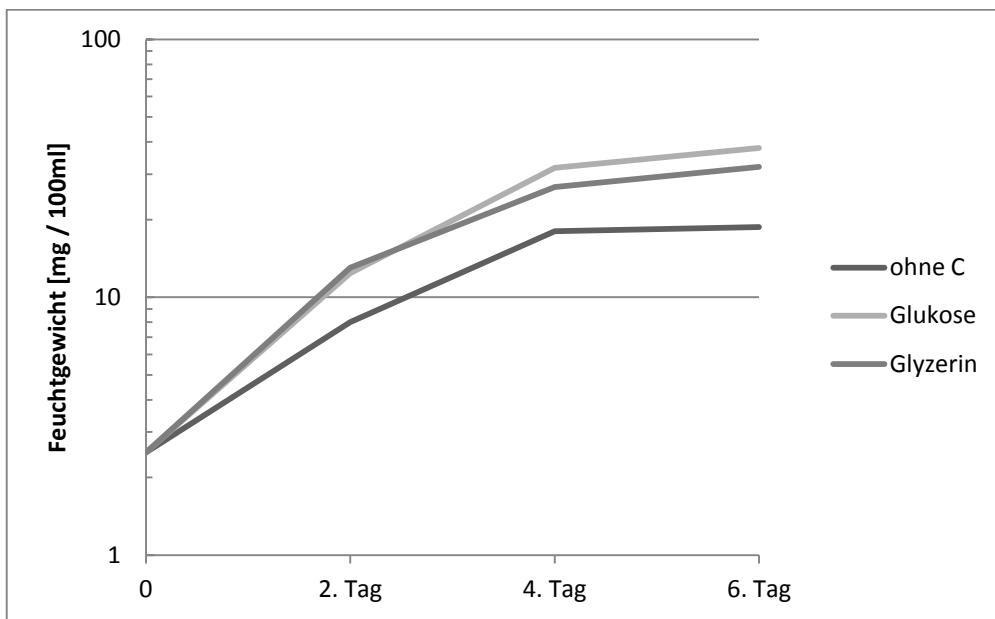
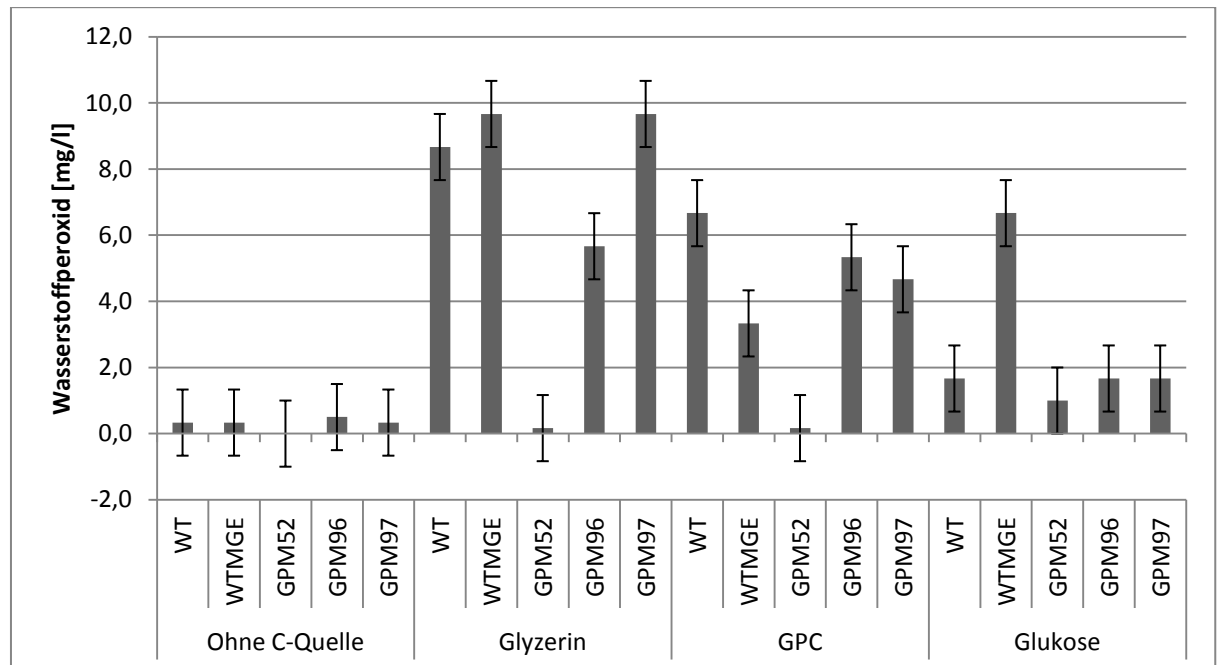


Abb. 3.2: Wachstumskurven von *M. genitalium* G37 mit Glukose, Glyzerin und ohne C-Quelle

Zusätzlich wurden für *M. genitalium* Infektionsversuche mit HeLa-Zellen durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Der Stamm verhält sich wie der *M. pneumoniae* Wildtyp. Bereits nach zwei Tagen sind beinahe alle HeLa-Zellen zerstört.

In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass GlpD für die Peroxidproduktion in *M. pneumoniae* verantwortlich ist. Eine Mutante dieses Gens ist nicht mehr dazu in der Lage, Glyzerin zu verwerten und damit  $H_2O_2$  zu produzieren. Es sollte untersucht werden, ob das Homolog dieses Gens in *M. genitalium* die gleiche Funktion ausübt. Zusätzlich sollte überprüft werden, ob die Peroxidproduktion mit Glukose ebenfalls durch dieses Protein katalysiert wird. Dazu wurde eine *M. pneumoniae* *glpD*::Tn Mutante GPG02 (Hames, 2009) mit dem entsprechenden Gen aus *M. genitalium* komplementiert. Hierfür wurde das *glpD*-Gen aus *M. genitalium* mit den Primern AS67 und AS68 amplifiziert. Es folgte eine Klonierung in den Vektor pMTn401tet. Dieser enthält ein Minitransposon, welches eine Tetrazyklinresistenzkassette enthält. Das Minitransposon zeichnet sich weiterhin dadurch aus, dass die Transposase außerhalb des Transposons auf dem Plasmid liegt. Dies ermöglicht eine einmalige, stabile Integration in das Chromosom. Die Klonierung erfolgte mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Sall. Der auf diese Weise konstruierte Vektor pGP2035 wurde über Elektroporation in eine *M. pneumoniae*

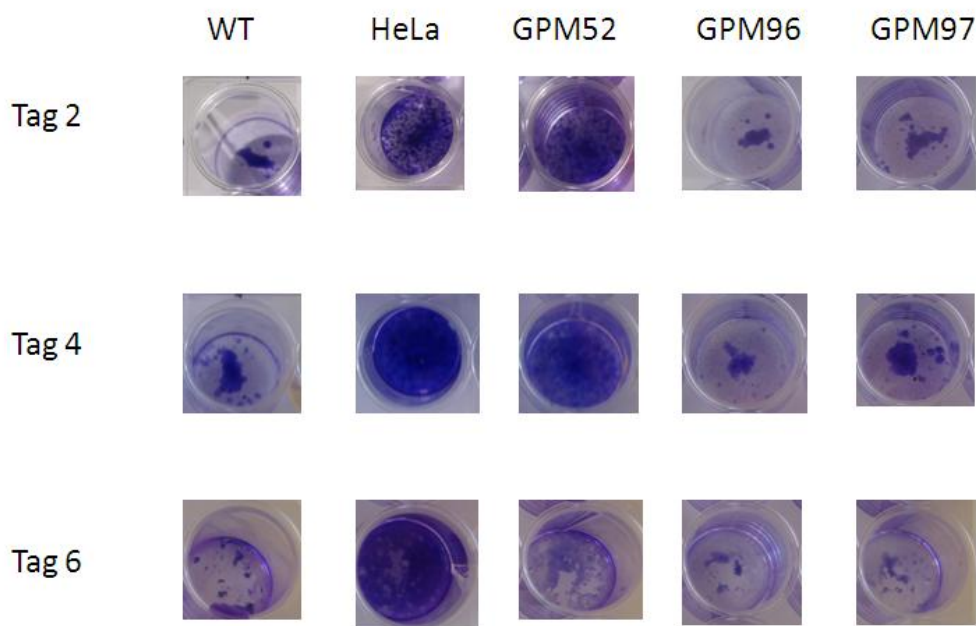
Mutante von *glpD* (GPM52) eingebracht. Die Selektion erfolgte über MP-Platten mit Tetrazyklin und Gentamycin.



**Abb. 3.3: Peroxidproduktion in komplementierter *M. pneumoniae glpD*-Mutante (GPM52):** Die  $H_2O_2$ -Messungen erfolgten ohne C-Quelle und mit Glycerin, Glukose oder GPC. Als Kontrollen dienten der *M. pneumoniae* Wildtyp (WT), der *M. genitalium* Wildtyp (WTMGE) und die Transposonmutante von *M. pneumoniae* (GPM52). Untersucht wurden zwei unabhängige, komplementierte Klone GPM96 und GPM97. Die produzierte Menge an Wasserstoffperoxid wurde in mg/l gemessen.

Da das Minitransposon zufällig im Genom inseriert war, wurden zwei unabhängige Klone untersucht, um sicherzustellen, dass kein Gen durch die Insertion beeinträchtigt wurde, welches Einfluss auf die  $H_2O_2$ -Produktion nehmen könnte (siehe Abb. 3.3). Beide Klone waren in der Lage, mit Glycerin und GPC Wasserstoffperoxid zu produzieren. Es konnte jedoch keine Produktion mit Glukose als C-Quelle nachgewiesen werden. Durch die Komplementation konnte der Phänotyp von *M. pneumoniae* wiederhergestellt werden, jedoch nicht die für *M. genitalium* charakteristische  $H_2O_2$ -Produktion mit Glukose. Daraus lässt sich schließen, dass GlpD auch in *M. genitalium* zur Peroxidproduktion führt, jedoch nicht an der Produktion des reaktiven Moleküls mit Glukose beteiligt ist, bzw. nicht im *M. pneumoniae* Hintergrund dazu in der Lage ist.

Neben den Peroxidmessungen wurden Infektionsversuche durchgeführt. Dazu wurden HeLa-Zellen mit *M. pneumoniae* Wildtyp, den beiden komplementierten Stämmen und der *glpD*-Mutante (GPM52) infiziert und nach 2, 4 und 6 Tagen fotografiert (siehe Abb. 3.4).

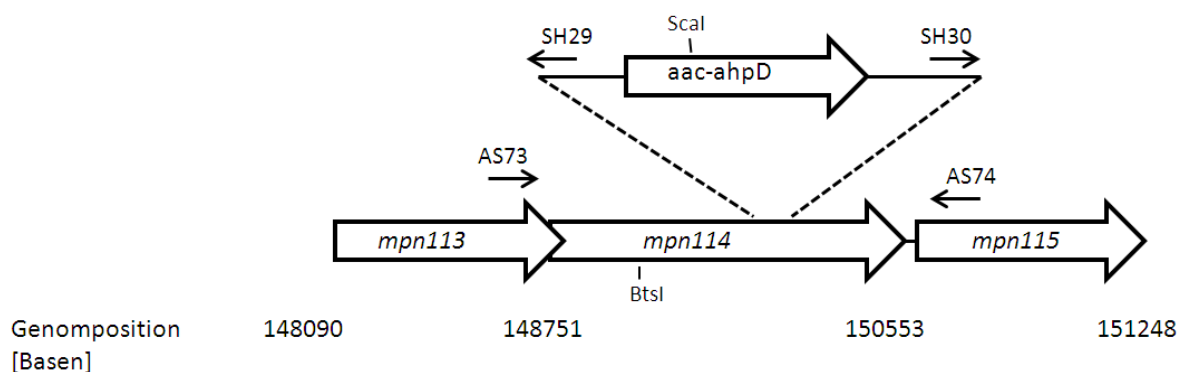


**Abb. 3.4: HeLa-Infektionsversuch mit komplementierten Stämmen:** HeLa Zellen wurden in 24-Well Platten ausgesät und mit *M. pneumoniae* Wildtyp (WT), den zwei unabhängigen komplementierten Klonen GPM96 und GPM97 und der Transposonmutante von *M. pneumoniae* (GPM52) infiziert und nach 2, 4 und 6 Tagen fotografiert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte HeLa-Zellen.

In dem Infektionsversuch zeigt sich deutlich, dass der *M. pneumoniae* Wildtyp bereits nach zwei Tagen einen Großteil der HeLa-Zellen lysiert hat. Sind die HeLa-Zellen nicht infiziert, so kommt es zu einer Vermehrung der Zellen bis zum vierten Tag. Am sechsten Tag nimmt die Dichte wieder leicht ab, da vermutlich einige der Zellen absterben. Die *glpD*-Mutante (GPM52) hingegen weist nur eine geringe Zytotoxizität auf. Erst an Tag 6 zeigt sich ein Unterschied zur Negativkontrolle. Für K1 und K2 zeigt sich ein ähnlicher Phänotyp wie im WT. Bei allen drei Stämmen ist auch nach Tag 4 und Tag 6 nur noch eine geringe HeLa-Zellzahl festzustellen.

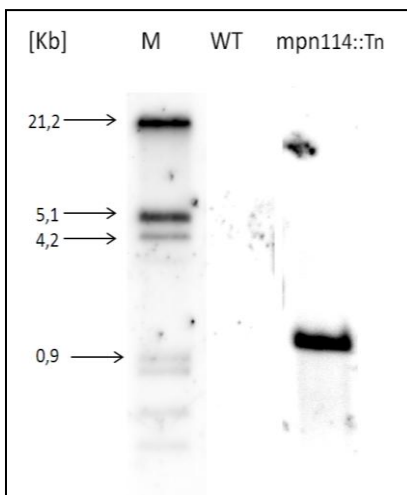
### 3.3 Isolation und Charakterisierung von Acetyltransferasemutanten in *M. pneumoniae*

Eine *mpn114*-Mutante (GPM95), in der dieses Gen durch ein Minitransposon unterbrochen ist, sollte aus der vorhandenen Transposonbank isoliert werden. Anschließend sollte untersucht werden, ob sich die Unterbrechung dieses Gens auf das Wachstum, die Zytoadhärenz oder die Peroxidproduktion auswirkt. Die gleichen Untersuchungen sollten für eine weitere Acetyltransferase (Mpn027, siehe unten) durchgeführt werden. Dadurch kann ein Zusammenhang zwischen Acetylierungen und diesen Prozessen hergestellt oder ausgeschlossen werden. Mpn114 ist als Carnitin O-Acetyltransferase annotiert und katalysiert vermutlich die Übertragung der Acetylgruppe von Acetyl-CoenzymA auf Proteine. Für den PCR-basierten Screen wurden die Primer AS73 und AS74 verwendet. Mittels Sequenzierung konnte nachgewiesen werden, dass sich die Insertion des Transposons an der 1183. Base des Gens *mpn114* befindet. Dafür wurde chromosomale DNA der Mutante mit den Primerpaaren SH29/AS73 und SH30/AS74 amplifiziert und die PCR Fragmente wurden sequenziert (siehe Abb. 3.5). Damit ist das Schlüsselkriterium für eine erfolgreiche Mutation des Gens erfüllt. Dieses besagt, dass das Transposon nicht innerhalb des letzten Drittels des Gens erfolgen sollte.



**Abb. 3.5: Schematische Darstellung der Transposoninsertion in *mpn114*:** Die Screeningprimer AS73 und AS74 liegen etwas außerhalb von *mpn114* und mit zwei weiteren Primern, die innerhalb des Transposons liegen (SH29/SH30), konnte ein Screen durchgeführt werden. Für einen Southern Blot wurde chromosomale DNA mit BtsI und Scal verdaut.

Nach der Isolierung der Mutante musste sichergestellt werden, dass das Transposon nur einmal ins Genom inseriert ist. Deshalb wurde ein Southern Blot mit chromosomaler DNA durchgeführt (siehe Abb. 3.6). Es wurde eine Sonde gewählt, die an den Anfangsbereich des Transposons bindet. Als Kontrolle diente cDNA des Wildtyps. Beide cDNAs wurden mit den Enzymen BtsI und Scal geschnitten (siehe Abb. 3.5). BtsI schneidet nach 725 Basen in *mpn114*, Scal nach 664 Basen innerhalb des Transposons. Daher sollte sich nur eine Bande bei 1121 Basen auf dem Blot zeigen, wenn nur eine Transposonkopie innerhalb des Genoms vorliegt (siehe Abb. 3.6).

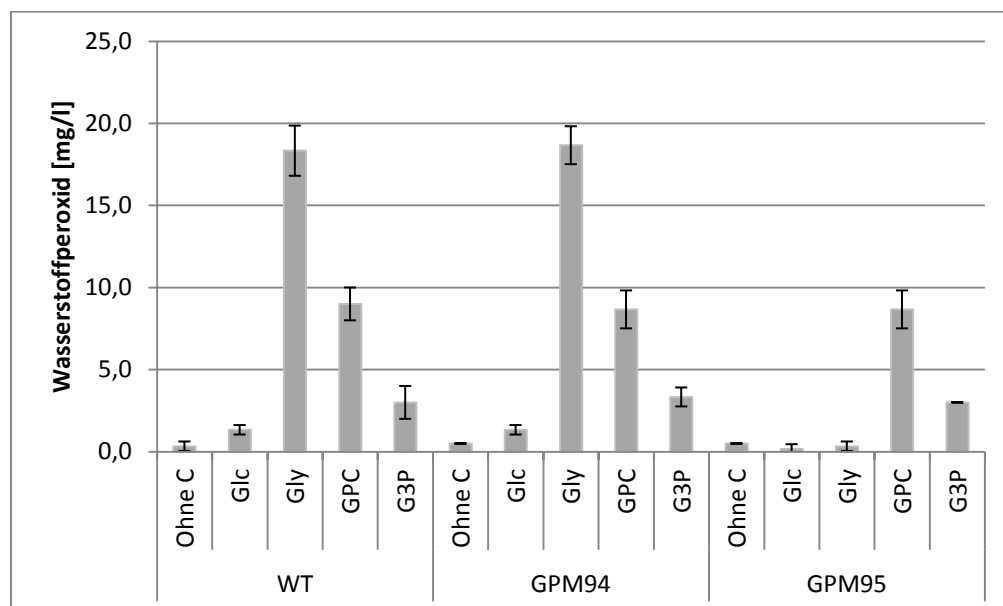


**Abb. 3.6: Southern Blot mit GPM95 (*mpn114::Tn*):** Mit einer Sonde gegen die Gentamycin-Kassette konnte nachgewiesen werden, dass sich das Transposon nur einmal im Genom der Mutante befindet. Im Wildtyp kann die Sonde nicht binden, da die Resistenz in diesem Stamm nicht vorliegt. Die Bande liegt auf der erwarteten Höhe.

Um sicherzustellen, dass es sich um eine Reinkultur der *mpn114*-Mutante (GPM95) handelt, in der keine Wildtyp-Zellen vorhanden sind, wurden während der Isolierung und anschließenden Passagierung PCRs mit den Primern AS73 und AS74 durchgeführt. Als Positivkontrolle dienten Wildtyp-Zellen. Bei diesen erhält man ein PCR-Produkt, das in etwa die Größe des Gens *mpn114* hat (etwas größer, da die Screening Primer etwas vor und hinter dem Gen liegen). In der Mutante erhält man kein PCR-Produkt, da durch das Transposon innerhalb des Gens der Bereich zwischen den Primern zu groß wird. Durch Sequenzieren der chromosomalen DNA ließ sich der genaue Insertionsort bestimmen.

Nach dem gleichen Schema erfolgte die Isolation einer *mpn027*-Mutante (GPM94). Auch dieses Protein wurde *in silico* als Acetyltransferase annotiert. Für den Screen wurden die Primer AS79 und AS80 verwendet. Auch hier konnte die Reinheit über Kontroll-PCRs und die einfache Insertion des Transposons über Southern Blot verifiziert werden.

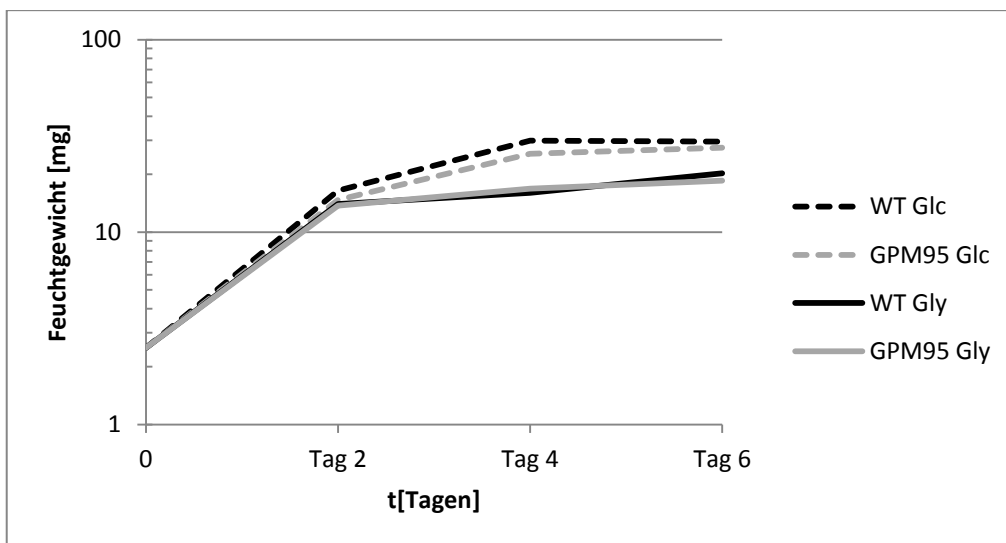
Zur weiteren Charakterisierung erfolgten Wasserstoffperoxidmessungen mit den Mutanten und dem Wildtypstamm von *M. pneumoniae* als Vergleich (siehe Abb. 3.7). Dazu wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Konzentration mit verschiedenen Bedingungen gemessen. Sowohl der Wildtyp als auch GPM94 (*mpn027::Tn*) zeigen das gleiche Bild. Ohne Kohlenstoffquelle gibt es einen leichten Hintergrund und mit Glukose kommt es zu einer minimalen Erhöhung der Peroxidkonzentration. Beide Stämme zeigen das Maximum an Peroxidproduktion mit Glyzerin als zugesetzter C-Quelle. Mit GPC können ebenfalls beide Stämme das Zytotoxin vermindert produzieren und mit G3P kommt es ebenso zu einer geringen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion. Ein anderes Bild zeigt sich bei der Mutante von *mpn114* (GPM95). Der Stamm kann nur noch mit Glyzerinphosphorylcholin und Glyzerin-3-Phosphat Wasserstoffperoxid produzieren. Daraus lässt sich schließen, dass Mpn114 einen Einfluss auf die Peroxidproduktion hat. Dieser Phänotyp kann beispielsweise durch Acetylierungen von Enzymen der Glyzerinverwertung verursacht werden. Es ist jedoch auch möglich, dass es einen indirekten Einfluss gibt, z.B. durch Acetylierung von Transkriptionsregulatoren. Möglicherweise handelt es sich auch bei Mpn114 selbst um einen solchen Regulator.



**Abb. 3.7: Wasserstoffperoxidmessungen mit den Acetyltransferasemutanten:** Für den *M. pneumoniae* Wildtyp (WT) und die beiden Mutanten der Gene *mpn027* (GPM94) und *mpn114* (GPM95) wurde die Peroxidproduktion mit den Kohlenstoffquellen Glukose (Glc), Glyzerin (Gly), GPC und Glyzerin-3-Phosphat (G3P) bestimmt.

Anschließend wurden Wachstumskurven von GPM95 (*mpn114::Tn*) bestimmt. Dazu nahm man das Feuchtgewicht der Stämme an drei Zeitpunkten. Untersucht wurde das Wachstum mit Glukose und Glycerin (siehe Abb 3.8).

Da die Mutante des Gens *mpn027* (GPM94) keinen Phänotyp bei der Wasserstoffperoxidproduktion zeigte, wurde auf weitere Untersuchungen verzichtet.



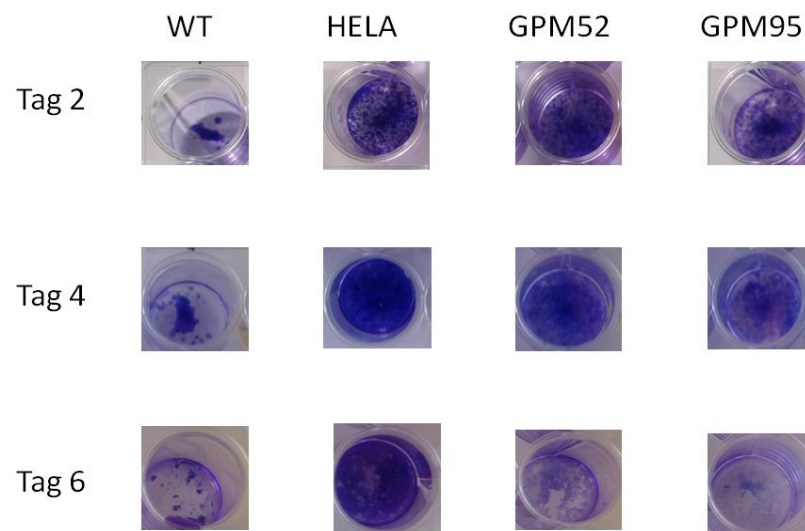
**Abb. 3.8: Wachstum von GPM95 (*mpn114::Tn*) und *M. pneumoniae* WT:** Das Wachstum wurde sowohl mit Glukose als auch mit Glycerin bestimmt.

Die *mpn114*-Mutante (GPM95) zeigte keine Wachstumsdefekte oder –vorteile im Vergleich zum Wildtyp. Beide Kohlenstoffe können zum Wachstum genutzt werden. Sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante ist das Wachstum mit Glukose stärker als das Wachstum mit Glycerin.

Da die Peroxidproduktion in dieser Mutante mit Glycerin nicht stattfindet (siehe Abb. 3.7), sollte in einem Infektionsversuch herausgefunden werden, ob sich diese Eigenschaft auch auf die Zytotoxizität und damit auf die Virulenz auswirkt. Dazu wurden HeLa Zellen mit der Mutante infiziert (siehe Abb. 3.9). Als Kontrolle dienten nicht infizierte HeLa Zellen und zum Vergleich wurden HeLas mit WT-Zellen und GPM52. Die *M. pneumoniae* Mutante des *glpD* Gens zeigt eine verminderte Zytotoxizität gegenüber HeLa Zellen (Hames *et al.*, 2009). Dieses Ergebnis konnte hier reproduziert werden. Der Wildtyp weist eine starke Zytotoxizität gegenüber den HeLa-Zellen auf, bereits nach zwei



Tagen ist ein Großteil lysiert. Die *glpD*-Mutante (GPM52) zeigt erst nach vier Tagen, dass sie noch zytotoxisch ist, und auch bei GPM95 (*mpn114::Tn*) zeigt sich deutlich, dass es zu einer Reduktion der Zytotoxizität kommt. Der Versuch beweist, dass Mpn114 einen Einfluss auf die Zytotoxizität ausübt. In einer *glpD*-Mutante (GPM52) ist die Zytotoxizität verringert, dieser Phänotyp basiert wahrscheinlich auf der gestörten Peroxidproduktion. Wahrscheinlich kommt es in der *mpn114*-Mutante (GPM95) ebenfalls durch die verringerte Peroxidproduktion zu einer verminderten Toxizität gegenüber den HeLa-Zellen.

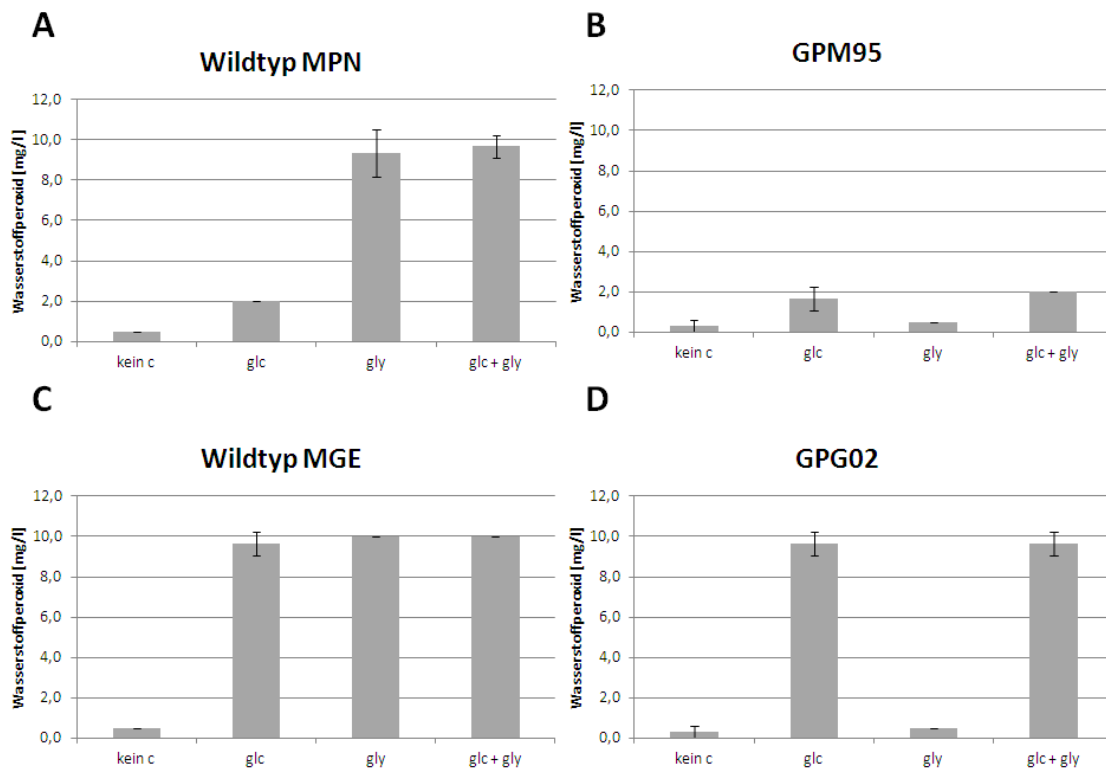


**Abb. 3.9: Infektionsversuch mit GPM95 (*mpn114::Tn*):** HeLa Zellen wurden mit WT, GPM52 (*glpD::Tn*) und GPM95 (*mpn114::Tn*) infiziert und nach zwei, vier und sechs Tagen gefärbt und fotografiert. Als Negativkontrolle dienten nicht infizierte Zellen.

### 3.4 Untersuchung der $H_2O_2$ -Produktion in *M. pneumoniae* und *M. genitalium* mit verschiedenen Bedingungen

In einem weiteren Versuch wurde ermittelt, wie sich die Wasserstoffperoxidproduktion verhält, wenn mehrere C-Quellen gleichzeitig vorhanden sind. Dazu wurden zunächst die beiden Wildtypstämme von *M. pneumoniae* und *M. genitalium* untersucht und zusätzlich Mutanten der *glpD*-Gene aus beiden Stämmen. Es wurde die Peroxidproduktion ohne C-

Quelle, mit Glukose, mit Glycerin und mit Glycerin und Glukose bestimmt. Die Messung mit beiden C-Quellen in einem Ansatz erfolgte mit gleichen Anteilen an Glukose und Glycerin. Dadurch war die Gesamtmenge an C-Quelle doppelt so hoch wie in den einfachen Ansätzen (siehe Abb.3.10).

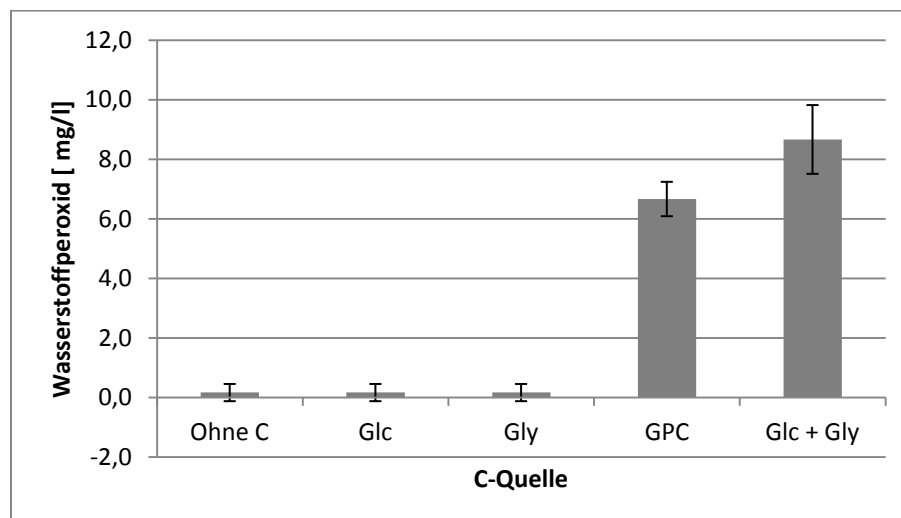


**Abb. 3.10: Peroxidmessungen mit verschiedenen Stämmen:** Es erfolgten Messungen ohne C-Quelle, mit Glukose, mit Glycerin und mit Glukose und Glycerin kombiniert. Dargestellt sind die Ergebnisse für die Messungen des *M. pneumoniae* Wildtyps (A), der *M. pneumoniae glpD*-Mutante (GPM52) (B), des *M. genitalium* Wildtyps (C) und der  $\Delta glpD$ -Mutante aus *M. genitalium* (GPG02) (D).

Der Wildtyp von *M. pneumoniae* zeigt eine charakteristische Produktion mit einem geringen Hintergrund bei der Messung ohne C-Quelle. Mit Glukose erkennt man eine sehr geringe und mit Glycerin eine starke  $H_2O_2$ -Produktion. Sind beide C-Quellen vorhanden, so unterscheidet sich die Messung nicht von der mit Glycerin als einziger C-Quelle. Auch die *glpD*-Mutante von *M. pneumoniae* (GPM52) zeigte erwartungsgemäß nur eine leicht erhöhte Produktion mit Glukose, die auch in der Messung mit beiden C-Quellen nachweisbar ist.

Eine leichte Veränderung findet man in den Messungen mit *M. genitalium*. Bei diesem Organismus kann auch eine  $H_2O_2$ -Produktion mit Glukose als einziger C-Quelle nachgewiesen werden. Für diese Messung und für die Werte mit Glycerin und beiden C-Quellen im Ansatz ist die Menge an Peroxid genau so hoch wie im Wildtyp von *M. pneumoniae* mit Glycerin. Wie im WT konnte auch in der *glpD*-Mutante von *M. genitalium* (GPG02) ebenfalls Peroxid in den Ansätzen mit Glukose und beiden C-Quellen nachgewiesen werden. Auch hier waren die Werte vergleichbar mit denen der Glycerin-Messungen der Wildtypen. Allerdings zeigte sich weder in *M. genitalium* Wildtyp noch in der *glpD*-Mutante (GPG02) dieses Stammes eine Erhöhung mit beiden C-Quellen, obwohl die Gesamtmenge an verfügbarem Kohlenstoff doppelt so hoch war.

Da der Stamm GPM95 (*mpn114::Tn*) nicht mehr dazu in der Lage ist, mit Glycerin  $H_2O_2$  zu produzieren, dies aber mit GPC kann, wurde dieser Stamm ebenfalls mit Glycerin und Glukose in einem Ansatz getestet.

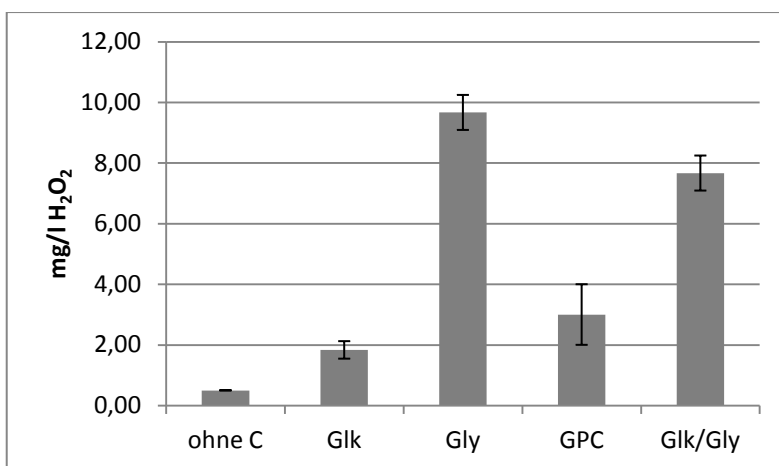


**Abb. 3.11: Peroxidmessung mit GPM95 (*mpn114::Tn*):** Die Mutante zeigt keine Peroxidproduktion ohne C-Quelle, mit Glukose und mit Glycerin. Mit GPC und mit beiden C-Quellen kommt es zu einer  $H_2O_2$ -Bildung.

Erstaunlicherweise zeigte sich auch in der *mpn114*-Mutante (GPM95) eine deutliche Peroxid-Produktion mit beiden Kohlenstoffquellen. Interessanterweise kommt es bei der Mutante nicht zu einer leicht erhöhten Produktion mit Glukose (siehe Abb.3.11).

Das Transposon, das in *mpn114* liegt, besitzt einen zusätzlichen Promotor. Dieser liegt in

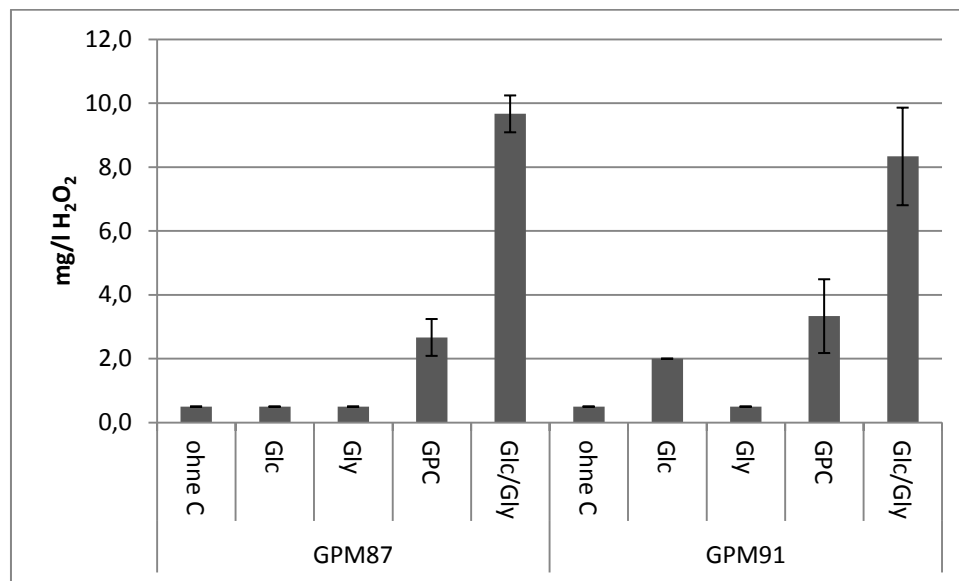
diesem Fall in Leserichtung des antisense Strangs. Um auszuschließen, dass der Effekt in der Peroxidproduktion auf Nebeneffekten beruht - wie z.B. der verstärkten Transkription einer antisense RNA – wurden auch Peroxidmessungen mit einer weiteren Mutante durchgeführt. Das Gen *mpn113* liegt direkt vor *mpn114* und ist als G3P-Transporter annotiert. Die Untersuchung einer Mutante zeigte jedoch keinen Phänotyp in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion mit G3P (Großhennig, 2011). Diese Mutante wurde als Kontrolle in weiteren Peroxidmessungen verwendet (siehe Abb. 3.12).



**Abb. 3.12: Messung der Peroxidbildung von *mpn113::Tn* mit verschiedenen C-Quellen**

Die Mutante zeigte keinerlei Abweichungen in der Peroxidmessung, verglichen mit dem Wildtyp. Auch hier erweist sich die stärkste Bildung mit Glyzerin und beiden C-Quellen, aber auch mit GPC kommt es zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion. Daraus lässt sich schließen, dass eine Mutation dieses Gens keine Auswirkung auf die Peroxidproduktion hat. Die Ergebnisse schließen einen polaren Effekt der *mpn114*-Mutante aus (GPM95).

In weiteren Messungen sollte untersucht werden, ob in Mutanten von Genen bzw. Proteinen, die an der Aufnahme von Glyzerin beteiligt sind, ähnliche Phänotypen auftreten. Eine vorhergehende Studie hat gezeigt, dass neben GlpF die beiden Proteine Mpn113 und Mpn284 an der Aufnahme von Glyzerin beteiligt sind (Großhennig *et al.*, 2013). Hier wurde ebenfalls die Wasserstoffperoxidproduktion mit den entsprechenden C-Quellen gemessen um herauszufinden, ob auch hier mit mehreren kombinierten C-Quellen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entsteht (siehe Abb. 3.13).



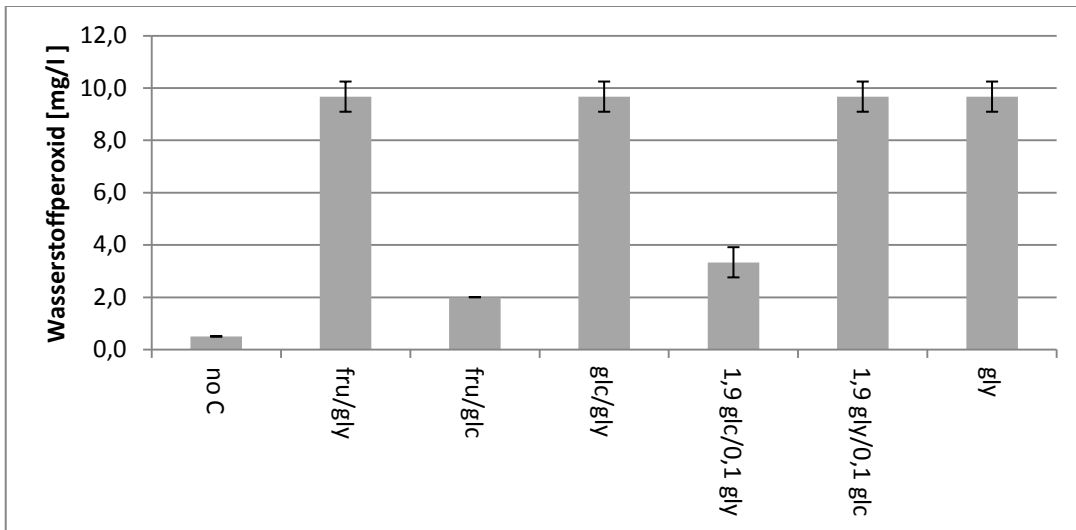
**Abb. 3.13: Peroxidmessungen mit den Stämmen GPM87 (*mpn284::Tn*) und GPM91 (*mpn133::Tn*)**

Beide Mutanten zeigen den gleichen Phänotyp wie GPM95 (*mpn114::Tn*). Es fällt jedoch auf, dass GPM95 (*mpn114::Tn*) auch mit Glukose nicht die leicht erhöhte Produktion an Peroxid aufweist, wie es im Wildtyp der Fall ist. Das gleiche gilt für GPM87 (*mpn284::Tn*). Um herauszufinden, ob in Anwesenheit beider C-Quellen nur Glukose, nur Glycerin oder beide C-Quellen zur Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führen, wurden weitere Messungen durchgeführt. Dazu wurden sowohl der Wildtyp als auch GPM95 (*mpn114::Tn*) mit unterschiedlichen Mengen beider C-Quellen gemessen. Zusätzlich wurde als zweite C-Quelle neben Glycerin auch noch Fruktose verwendet.

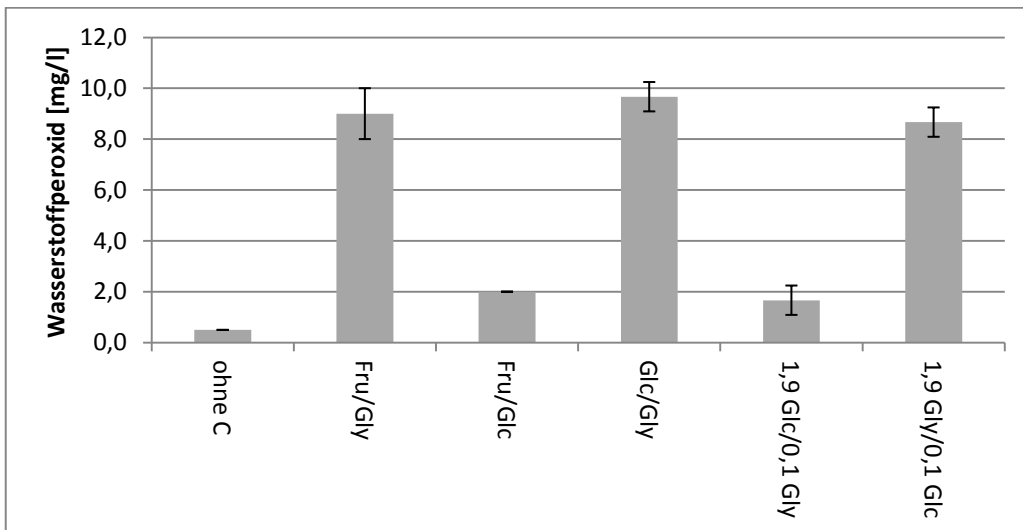
Die Peroxid-Messungen erfolgten standardmäßig mit 1 µl einer 100 mM Lösung der jeweiligen C-Quelle. Um herauszufinden, welche der Kohlenstoffquellen für die Produktion des Peroxids verantwortlich ist, wurden die Mengen der einzelnen Lösungen variiert (siehe Abb. 3.14). Außerdem wurden die Kombinationen Fruktose/Glycerin und Fruktose/Glukose verwendet. Auf diese Weise sollte gezeigt werden, ob der Effekt der Peroxidproduktion in GPM95 (*mpn114::Tn*) mit Glukose/Fruktose auch durch Fruktose als zweite C-Quelle erzielt werden kann. Hierbei wurden jeweils 1 µl jeder C-Quelle zugesetzt. Erwartungsgemäß zeigt sich beim WT eine starke Produktion an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wenn mindestens 1 µl Glycerin zugesetzt wird. Sind nur Fruktose und Glukose für die Zellen verfügbar, so zeigt sich eine stark verminderte Menge an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Befinden sich Glukose und Glycerin im Verhältnis 1,9:0,1 in der Lösung, so ist auch hier die

Wasserstoffperoxidproduktion vermindert.

**A**



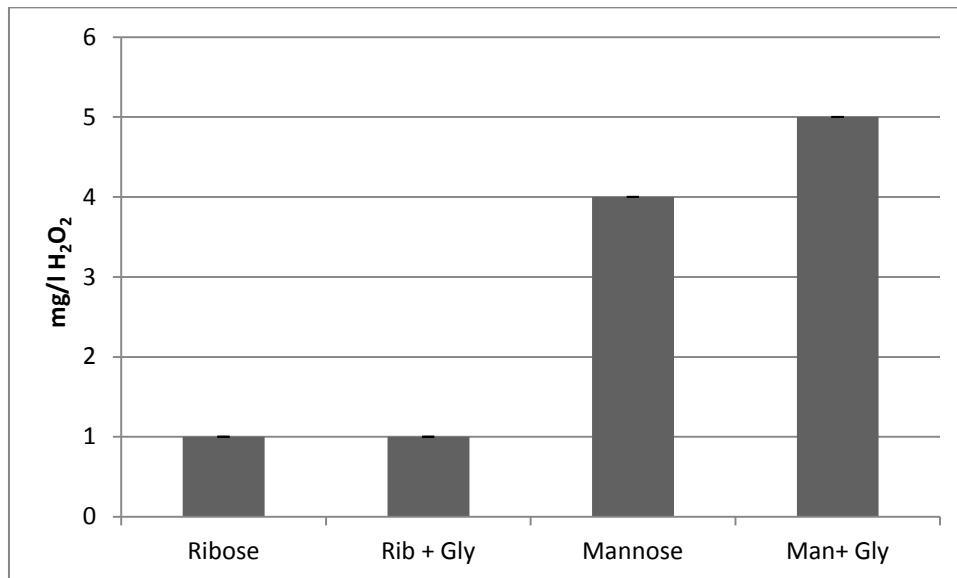
**B**



**Abb. 3.14: Messungen mit unterschiedlichen Mengen an C-Quellen:** Es wurden Messungen mit unterschiedlichen Konzentrationen und mit jeweils zwei verschiedenen C-Quellen in einem Ansatz gemessen. Dies erfolgte sowohl für den *M. pneumoniae* WT (A) als auch für GPM95 (*mpn114::Tn*) (B). Außerdem wurden die Messungen mit unterschiedlichen Mengen von Glukose und Glycerin durchgeführt.

Das gleiche Bild ist bei der *mpn114*-Mutante (GPM95) erkennbar. Auch hier zeigt sich der Effekt der Peroxidproduktion mit Glycerin, sobald Glukose oder Fruktose zur Verfügung

stehen und auch hier ist der Effekt stärker, wenn viel Glycerin und wenig Glukose vorhanden sind. Fruktose selbst führt weder in der Mutante noch im WT zu einer verstärkten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion (Daten nicht gezeigt).

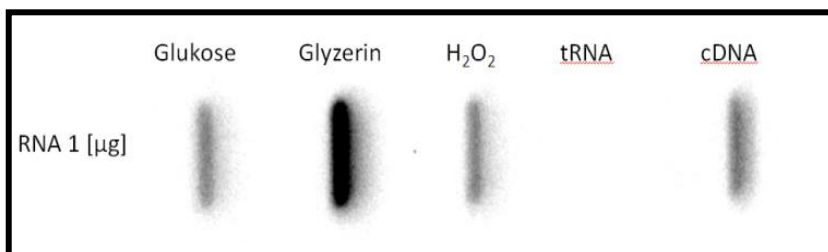


**Abb.3.15: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Messung mit GPM95 (*mpn114::Tn*) mit weiteren C-Quellen:** Die Peroxidproduktion wurde in der *mpn114*-Mutante (GPM95) mit Ribose und Mannose gemessen und mit beiden Zuckern und Glycerin

In einer weiteren Messung konnte gezeigt werden, dass GPM95 (*mpn114::Tn*) auch mit Mannose und mit Mannose und Glycerin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produziert. Die Menge ist geringer als nur mit Glycerin. Ist Ribose als C-Quelle vorhanden, so wird weder mit einer C-Quelle noch mit Ribose und Glycerin Peroxid gebildet (siehe Abb. 3.15). Da der WT bereits mit Glycerin als einziger C-Quelle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzieren kann, sind Messungen mit zwei C-Quellen in diesem Stamm nicht sinnvoll, da ein Effekt der zweiten C-Quelle nicht zu einer Veränderung der Peroxidmenge führt. Die Messungen zeigen, dass die *mpn114*-Mutante (GPM95) kein Peroxid mit Glycerin als alleiniger C-Quelle produzieren kann. Jedoch ist der Stamm in der Lage Peroxid zu produzieren, sobald eine zweite C-Quelle vorhanden ist. Bei der zweiten C-Quelle muss es sich jedoch um einen PTS-Zucker handeln, mit Ribose beispielsweise wird Glycerin nicht umgesetzt. Möglicherweise handelt es sich um eine PTS-abhängige Regulation der metabolischen Stoffwechselwege.

### 3.5 Untersuchungen der Transkription in verschiedenen Mutanten von *M. pneumoniae* M129

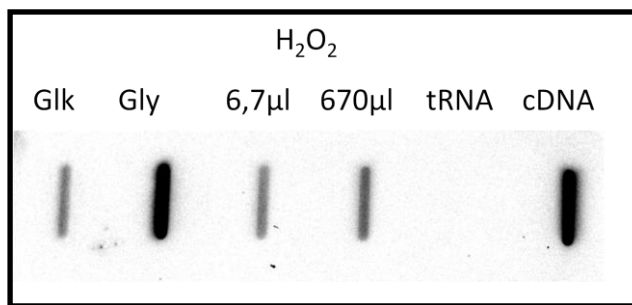
Nun sollte untersucht werden, ob die unterschiedlichen C-Quellen einen Einfluss auf die Transkription von *mpn114* haben. Da die Peroxidproduktion C-Quellen abhängig ist und Mpn114 sich darauf auswirkt, war es von Interesse zu sehen, ob es zu einer C-Quellen abhängigen Expression dieses Gens kommt. Dazu wurden Slot-Blot-Analysen durchgeführt. Zunächst wurde die Expression des Gens mit Glukose und Glyzerin untersucht. Außerdem wurden Mycoplasma-Zellen mit Glukose für vier Tage angezogen und durch Zugabe von 6,7 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung /100 ml Kulturmedium gestresst. Diese Menge entspricht 10 mg/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, was wiederum dem maximal gemessenen Wert in den Peroxidmessungen entspricht. In späteren Versuchen wurde auch das 10- bzw. 100-fache dieser Menge als Stressbedingung gewählt. Die Zellen wurden dazu für 30 min mit dem Peroxid im Medium inkubiert und danach gewaschen. Anschließend erfolgte die RNA-Isolierung nach Protokoll (siehe Material und Methoden). Für den Slot-Blot wurde eine Sonde gegen *mpn114* verwendet (siehe Abb. 3.16).



**Abb.3.16: Slot-Blot mit *mpn114*-Sonde:** Für den Slot-Blot wurde RNA aus *M. pneumoniae* WT-Kulturen genutzt, die mit Glukose, Glyzerin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt worden waren.

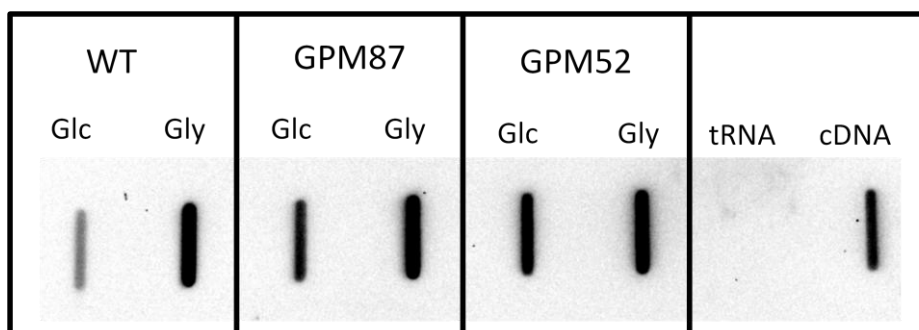
Die Analyse ergab, dass beim Wachstum mit Glyzerin *mpn114* stärker exprimiert wird als unter Glukoseeinfluss. Auch die Zugabe von externem Wasserstoffperoxid führte nicht zu einer verstärkten Expression des Gens. In einem weiteren Slot-Blot sollte gezeigt werden, dass auch mit höheren Stressbedingungen das Gen *mpn114* nicht stärker transkribiert wird (siehe Abb. 3.17).





**Abb.3.17: Slot-Blot mit *mpn114*-Sonde und verschiedenen Peroxidmengen:** Für den Slot-Blot wurde RNA aus *M. pneumoniae* WT-Kulturen genutzt, die mit Glukose, Glycerin und verschiedenen Mengen  $H_2O_2$  behandelt wurden. Gezeigt ist die Bindung der Sonde an jeweils 4  $\mu g$  RNA pro Slot.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass auch starker  $H_2O_2$ -Stress keinen Einfluss auf die Transkription des Gens hat. In weiteren Slot-Blots sollte nun die verstärkte Expression des Gens mit Glycerin nachgewiesen werden (siehe Abb.3.18).

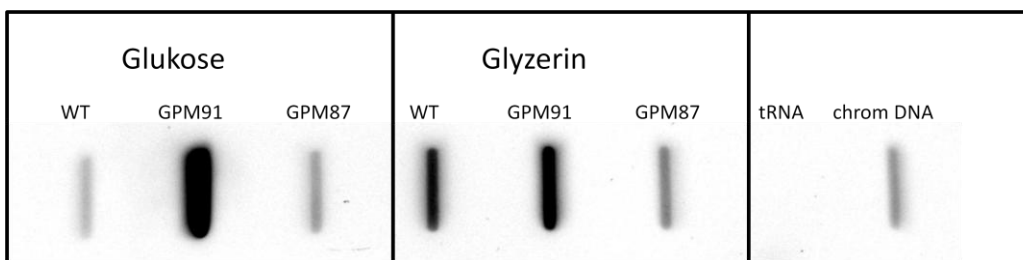


**Abb.3.18: Slot-Blot mit *mpn114*-Sonde:** Die Expression von *mpn114* wurde im WT und in Mutanten der Gene *mpn284* (GPM82) und *glpD* (GPM52) untersucht, dabei wurden die Bakterien jeweils mit Glukose und Glycerin angezogen und jeweils 4  $\mu g$  RNA aufgetragen.

Der Slot-Blot zeigt, dass *mpn114* im Wachstum mit Glycerin generell stärker exprimiert wird als mit Glukose. Dies geschieht auch GPM87 (*mpn284::Tn*), obwohl dieser Stamm nicht mehr in der Lage ist, mit Glycerin Peroxid zu bilden. Auch in der *glpD*-Mutante (GPM52) zeigt sich eine verstärkte Expression beim Wachstum mit Glycerin. In beiden Mutanten ist jedoch die Expression unter Glukose ebenfalls stärker als im WT mit Glukose. Die Slot-Blots zeigen, dass *mpn114* durch Glycerin verstärkt exprimiert wird,  $H_2O_2$  hat keinen Einfluss auf die Regulation der Expression dieses Gens. Sind Gene aus

der Glycerinverwertung beschädigt, so führt dies auch beim Wachstum mit Glukose zu einer erhöhten Expression. Möglicherweise sind die Enzyme dieses metabolischen Pfades an der Regulation verschiedener Gene beteiligt. Es ist jedoch auch möglich, dass eine Anhäufung an einzelnen oder verschiedenen Intermediaten zu einer verstärkten Expression von *mpn114* führt.

Zur näheren Charakterisierung der Transkription wurde eine weitere Slot-Blot-Analyse mit GPM91 (*mpn133::Tn*) durchgeführt (siehe Abb.3.19).

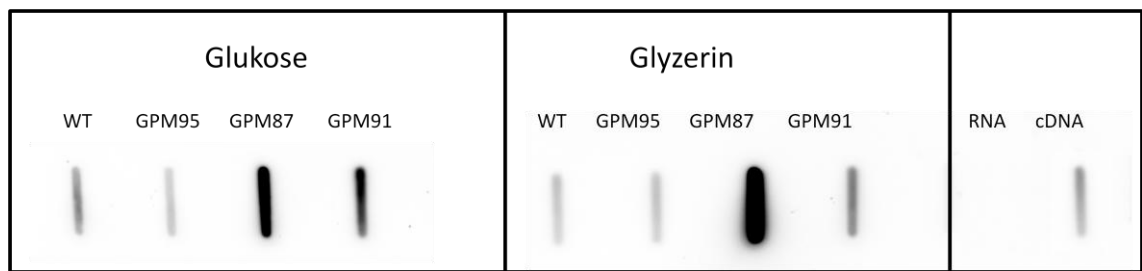


**Abb.3.19: Slot-Blot mit *mpn114*-Sonde**

Auch in dem zweiten Slot-Blot wird deutlich, dass die Expression von *mpn114* im WT mit Glyzerin stärker abläuft als mit Glukose. Auch für GPM87 (*mpn284::Tn*) zeigt sich eine leicht erhöhte Expression mit Glyzerin. In dem GPM91-Stamm (*mpn133::Tn*) ist insgesamt eine deutlich stärkere Expression erkennbar als in den anderen Stämmen. Hier ist die Expression mit Glyzerin jedoch schwächer als mit Glukose.

Da die Mutante einen Defekt in der Produktion von Wasserstoffperoxid mit Glyzerin aufweist, sollte gezeigt werden, ob die Expressionslevel von Proteinen, die an der Verwertung dieser C-Quelle beteiligt sind, beeinträchtigt sind. Dazu wurden weitere Slot-Blot-Analysen durchgeführt.

Mpn284 ist an der Aufnahme von Glyzerin beteiligt (Großhennig *et al.*, 2013), daher war eine Untersuchung der Expression dieses Gens in GPM95 (*mpn114::Tn*) interessant. In der Slot-Blot-Analyse zeigte sich jedoch keinerlei Unterschied in der Transkription - weder mit Glukose noch mit Glyzerin. In der Mutante von *mpn284* (GPM87) scheint es zu einer verstärkten Expression des Gens selbst zu kommen, dies ist jedoch ein polarer Effekt des inserierten Transposons, das einen zusätzlichen Promotor ins Genom einfügt (siehe Abb. 3.20).



**Abb. 3.20: Expression von *mpn284* in verschiedenen Stämmen mit Glyzerin und Glukose:** Es wurden GPM95, GPM87 und GPM91 (Transposonmutanten von *mpn114*, *mpn284* und *mpn133*) vier Tage mit Glukose und Glyzerin angezogen, anschließend wurde mit einer Sonde gegen *mpn284* die Expression des Gens untersucht.

Dies könnte bedeuten, dass Mpn133 eine wichtige Rolle bei der Regulation von *mpn114* spielt. Hierüber konnte eine C-Quellen abhängige Regulation gesteuert werden. Die Mutation von *mpn133* führt zu einer starken Expression von *mpn114* mit Glukose, dies ist im WT nicht der Fall. In der *mpn284*-Mutante (GPM87) kommt es ebenfalls zu einer verstärkten Expression. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass über die Aufnahme von Glyzerin die Expression von *mpn114* gesteuert wird. Es lässt sich jedoch keine Aussage treffen, ob der Phänotyp der Mutanten durch die mutierten Gene selbst verursacht wird oder ob es sich um eine indirekte Regulation handelt.

In einem weiteren Slot-Blot wurde die Expression von *glpF* in verschiedenen Mutanten untersucht (siehe 3.21). Hierbei handelt es sich um den Haupttransporter für Glyzerin.



**Abb. 3.21: Untersuchung der *glpF*-Expression in verschiedenen Mutanten:** Mit einer Sonde gegen *glpF* wurde die Expression des Gens im WT und in GPM95, GPM87, GPM91 und GPM52 (Mutanten von *mpn114*, *mpn284*, *mpn133* und *glpD*) durchgeführt.

Die Expression von *glpF* ist generell erhöht in Kulturen, die mit Glycerin angezogen wurden. Einzige Ausnahme bildet das Expressionsprofil von GPM52 (*glpD*-Mutante), hier ist die Expression beim Wachstum mit Glukose stärker. Ansonsten zeigt sich im Glukoseprofil kein deutlicher Unterschied zwischen der Expression im WT und in GPM95 (*mpn114::Tn*). In den Mutanten von *mpn284* und *mpn133* (GPM87 und GPM91) ist eine leicht erhöhte Expression von *glpF* mit Glukose erkennbar und in GPM52 (*glpD*-Mutante) ist die Expression deutlich erhöht. Im Vergleich zum Wildtyp zeigt sich mit Glycerin eine leicht abgeschwächte Expression in GPM95 (*mpn114::Tn*) und eine deutliche Reduzierung in der *glpD*-Mutante (GPM52). In den beiden Mutanten von *mpn284* und *mpn133* (GPM87 und GPM91) findet man auch mit Glycerin eine verstärkte Expression im Vergleich zum Wildtyp.

Zur weiteren Charakterisierung wurde ein Slot-Blot mit einer Sonde gegen *glpQ* durchgeführt (siehe Abb. 3.22). *GlpQ* ist an der Verwertung von GPC beteiligt und somit an einem Seitenweg der Glycerinverwertung.



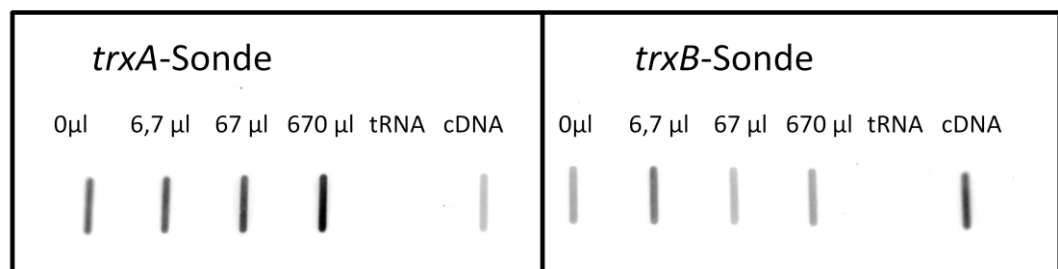
**Abb.3.22: Slot-Blot mit *glpQ*-Sonde und verschiedenen Mutanten**

Beim Wachstum mit Glukose zeigt sich in allen Mutanten eine verstärkte Expression verglichen mit dem Wildtyp. Ist Glycerin als einzige C-Quelle im Medium vorhanden, so befindet sich die Expression in den Mutanten auf dem gleichen Level wie im WT. Eine Ausnahme bildet jedoch GPM52 (*glpD::Tn*). In diesem Stamm ist die Expression abgeschwächt.

Die Ergebnisse zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen der Expression der Gene der Glycerin- und der GPC-Verwertung und der zugesetzten C-Quelle gibt. Störungen des Stoffwechsels führen dabei zu einer verstärkten Expression auch mit Glukose. Ist jedoch die Verbindung der Stoffwechselwege mit der Glykolyse betroffen, so werden die Gene

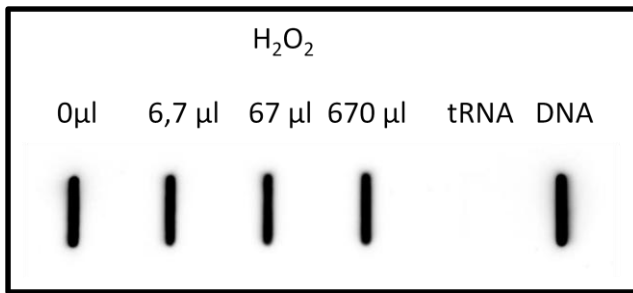
dieser Wege verringert exprimiert. Auf diese Weise können Mycoplasmen wahrscheinlich Energie sparen. Da in einer *glpD*-Mutante (GPM52) Glycerin und GPC nicht mehr zur Energiegewinnung genutzt werden können, ist die Aufnahme dieser C-Quellen für die Zellen nicht mehr von Nutzen. Auch hier kann jedoch keine Aussage getroffen werden, ob die beobachteten Änderungen der Expression durch die Enzyme direkt oder durch Metabolite erfolgen.

In einer vorhergehenden Studie konnte gezeigt werden, dass mit  $H_2O_2$ -Stress das Gen *trxA* verstärkt exprimiert wird (Reuß, 2012). Bei diesem Gen (*mpn263*) handelt es sich um Thioredoxin, welches durch ein zweites Gen *trxB* (*mpn240*) - die Thioredoxinreduktase - reduziert werden kann. Der Autor geht von einer möglichen Rolle in der Entgiftung von Wasserstoffperoxid aus. Zur näheren Charakterisierung der Genexpression der beiden Gene wurde erst einmal die Expression des Gens mit verschiedenen Peroxidmengen bestimmt (siehe Abb.3.23).



**Abb3.23: Expression von *trxA* und *trxB* mit verschiedenen Mengen  $H_2O_2$ :** *M. pneumoniae* WT Zellen wurden mit Glukose 4 Tage angezogen und mit verschiedenen Mengen an Peroxid behandelt. Anschließend wurden Blots mit Sonden gegen *trxA* und *trxB* durchgeführt. Es wurden jeweils 4 µg RNA aufgetragen.

In den Slot-Blots zeigt sich eine verstärkte Expression von *trxA* mit aufsteigender  $H_2O_2$ -Menge, dieses Bild zeigt sich jedoch nicht für *trxB*. Da GPM95 (*mpn114::Tn*) nicht mehr in der Lage ist, mit Glycerin als einziger Kohlenstoffquelle Wasserstoffperoxid zu produzieren, sollte nun die Expression von *trxA* in der Mutante untersucht werden (siehe Abb. 3.24).



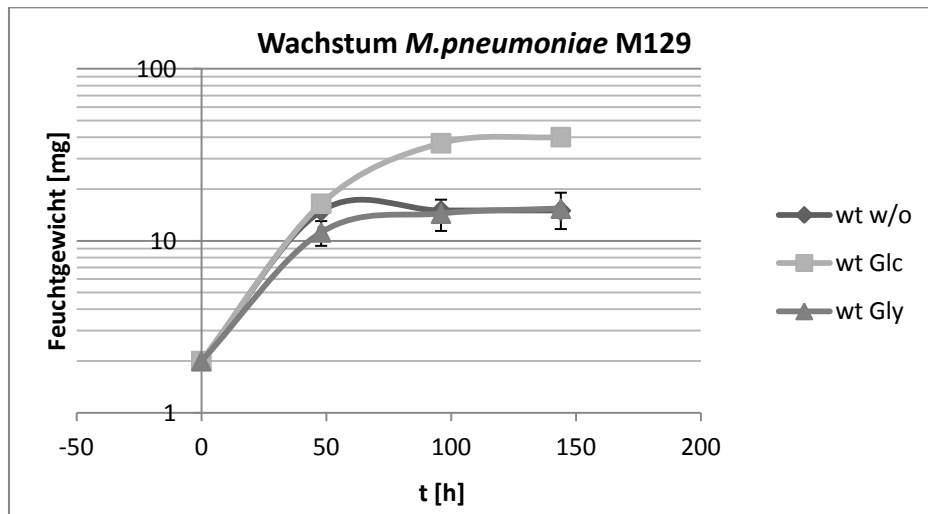
**Abb.3.24: Expression von *trxA* in GPM95 (*mpn114::Tn*) mit aufsteigender Peroxidmenge:** *M. pneumoniae* WT Zellen wurden 4 Tage mit Glukose angezogen und mit verschiedenen Mengen  $H_2O_2$  behandelt. Anschließend wurde ein Slot-Blot mit Sonde gegen *trxA* durchgeführt. Aufgetragen wurden jeweils 4  $\mu$ g RNA.

Im Gegensatz zum WT zeigt sich in der Mutante keinerlei Anstieg im Expressionslevel von *trxA*, wenn der Peroxidspiegel extern erhöht wird. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass es zu einer peroxidabhängigen Regulation von *trxA* kommt, dies unterstützt die Hypothese, dass *trxA* an einem Entgiftungs- bzw. Reparaturmechanismus beteiligt ist. Weiterhin zeigen die Ergebnisse, dass die Regulation für *trxB* nicht zutrifft. Möglicherweise reicht ein Grundspiegel dieser Reduktase aus, um TrxA zu regenerieren, oder die Aktivität des Enzyms ist über einen anderen Mechanismus reguliert oder es findet keine Regulation statt. Scheinbar ist Mpn114 für die peroxidabhängige Regulation von *trxA* nötig, da in Abwesenheit dieses Proteins keine Veränderung der Expression mit verschiedenen  $H_2O_2$ -Konzentrationen auftritt.

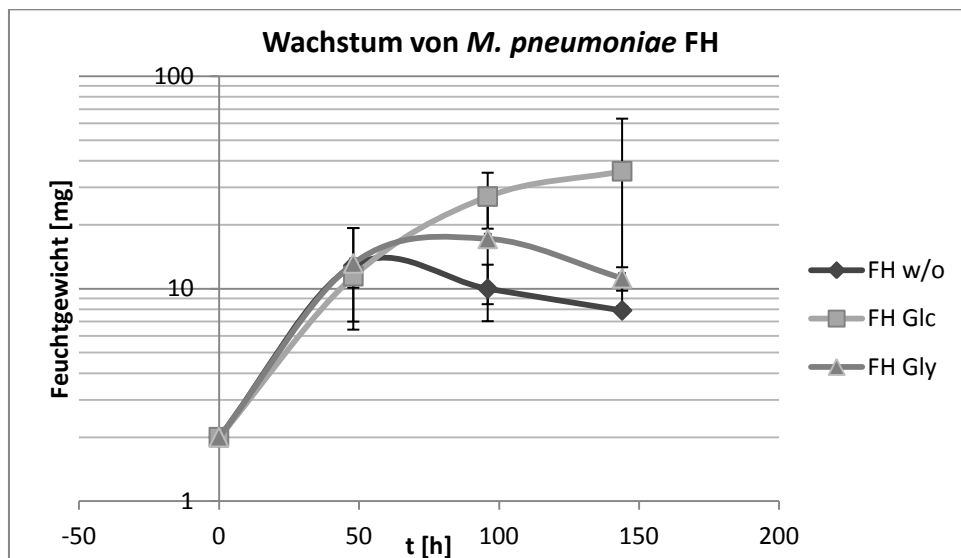
### 3.6 Wachstum und Wasserstoffperoxidproduktion in weiteren *M. pneumoniae* Stämmen

Um herauszufinden, ob verschiedene Phänotypen in der Peroxidproduktion oder beim Wachstum in anderen Stämmen von *M. pneumoniae* nachzuweisen sind, wurden unterschiedliche Stämme charakterisiert. Dazu wurden verschiedene Experimente mit einem weiteren Laborstamm *M. pneumoniae* FH (ATCC 15531) und drei verschiedenen klinischen Isolaten (KI1-KI3) durchgeführt. Zunächst sollten dazu Wachstumskurven angefertigt werden. KI3 konnte jedoch nicht in SP4 Medium wachsen, so dass keine ausreichende Menge an Zellmaterial für weitere Experimente gewonnen werden konnte.

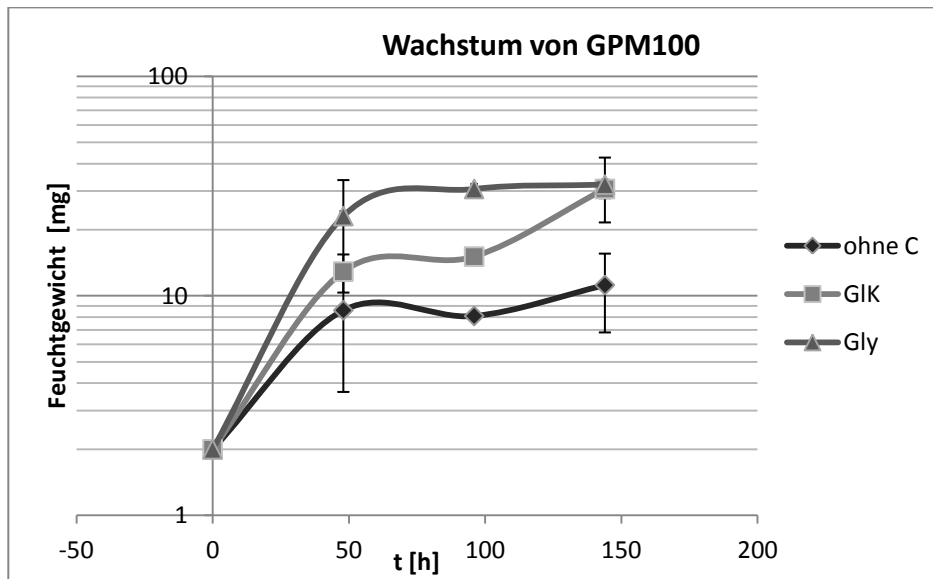
A



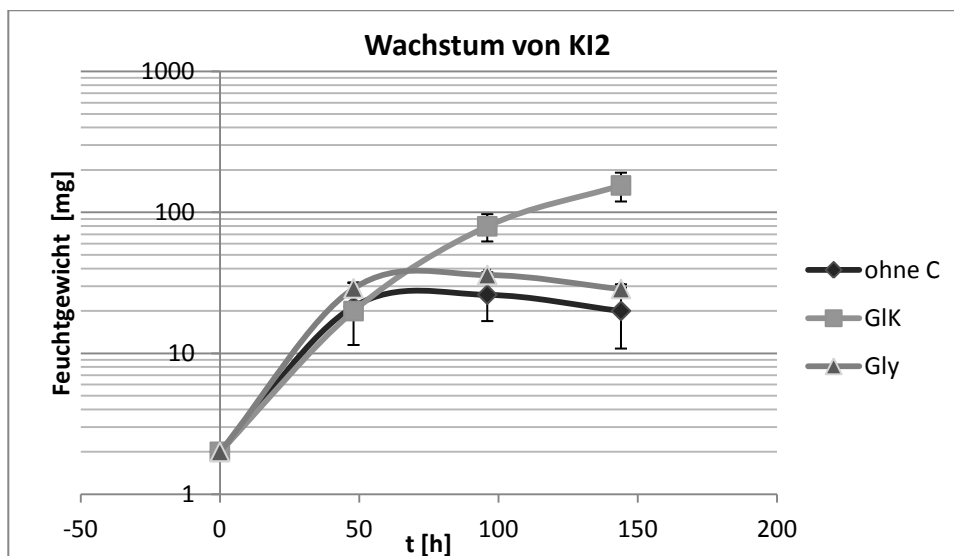
B



C



D



**Abb. 3.25: Wachstumskurven verschiedener *M. pneumoniae* Stämme:** Das Wachstum von vier Stämmen wurde über 6 Tage beobachtet. Die Zellen wurden ohne C-Quelle (ohne C), mit Glukose (Glk) und mit Glyzerin (Gly) angezogen und das Feuchtgewicht wurde bestimmt. Untersucht wurden der *M. pneumoniae* M129 WT, die beiden klinischen Isolate GPM100 und GPM101 (KI1 und KI2) und der ATCC 15531 (FH Laborstamm). Die Zeit wurde in Stunden angegeben.



Das Wachstum des WT-Stammes ist mit Glukose als C-Quelle deutlich besser als mit Glycerin. Ist nur Glycerin im Medium vorhanden, unterscheidet sich das Wachstum nur geringfügig vom Wachstum ohne C-Quelle. Im klinischen Isolat ist das Wachstum insgesamt etwas schlechter als bei *M. pneumoniae* M129. Jedoch ist es mit Glycerin in diesem Stamm fast so gut wie mit Glukose als C-Quelle. Auch hier ist nur ein geringes Wachstum ohne zusätzliche C-Quelle im Medium zu verzeichnen. Der ATCC 15531 (FH-Stamm) weist ein ähnliches Wachstum auf wie der M129-Stamm, das Wachstum mit Glukose ist besser als mit Glycerin; Glycerin und Abwesenheit einer C-Quelle sind ähnlich ausgeprägt (siehe Abb. 3.25).

Ein interessantes Wachstum weist GPM101 (KI2) auf. Dieser zeigt zwar auch nur geringes Wachstum mit Glycerin, jedoch wächst er sehr stark mit Glukose im Medium. Dabei weist das gemessene Maximum an Feuchtwicht am sechsten Tag fast die vierfache Menge an Material auf, die bei dem Laborwildtyp M129 gemessen wurde. Auffällig bei diesem Stamm ist auch, dass ein Großteil der Zellen planktonisch im Medium vorhanden ist. Zusätzlich lösen sich viele der Zellen durch Waschschriffe von den Zellkulturflaschen ab. Diese Beobachtungen wurden nicht für M129 gemacht.

Damit die Stämme weiter charakterisiert werden konnten, wurden Wasserstoffperoxid-Messungen durchgeführt (siehe Abb.3.25).

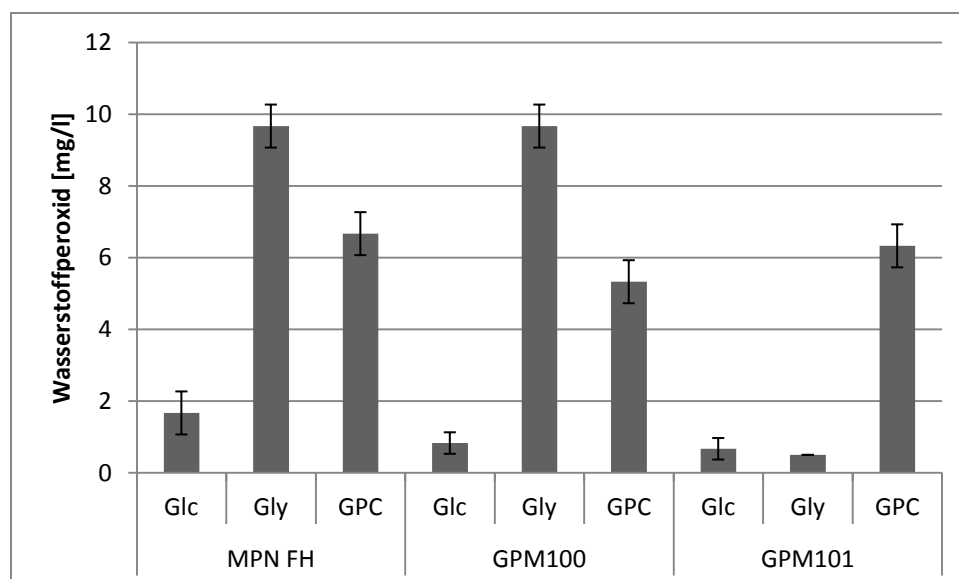
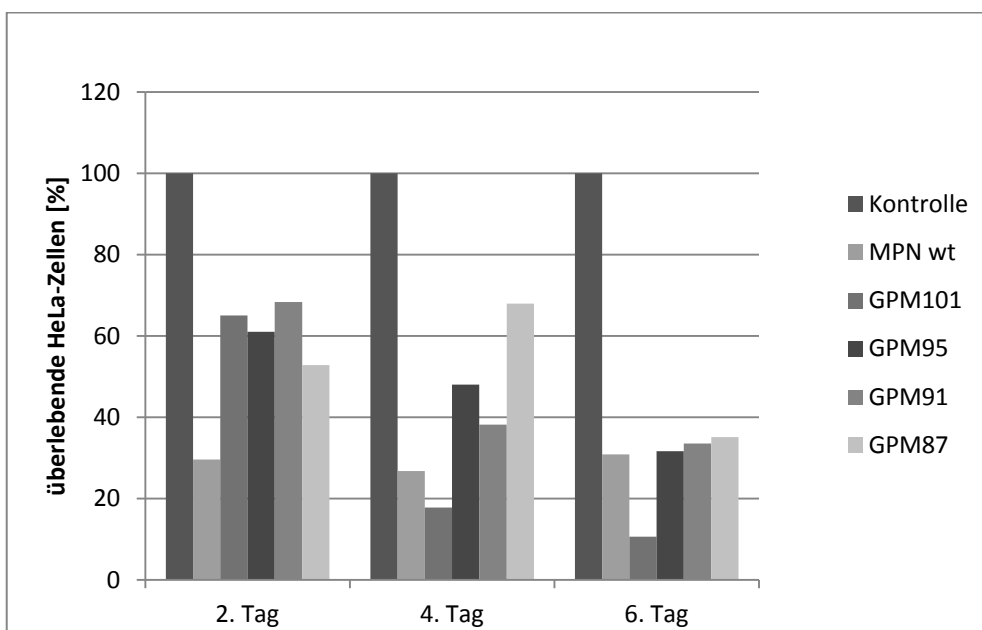


Abb.3.26: Peroxidmessungen mit unterschiedlichen *M. pneumoniae* Stämmen

Bei der Wasserstoffperoxidproduktion zeigt sich in ATCC 15531 (FH-Stamm) das gleiche Bild wie im Laborwildtyp M129. Es kommt zu einer minimalen Produktion mit Glukose, zur stärksten Peroxidbildung mit Glycerin und auch GPC trägt zur Bildung des Toxins bei. Ähnliche Werte zeigen sich auch bei dem klinischen Isolat 1. Ein anderes Bild ergibt sich jedoch im zweiten klinischen Isolat. Dieser Stamm bildet nur noch mit GPC Wasserstoffperoxid. Damit hat er den gleichen Phänotyp wie die *mpn114*-Mutante (GPM95).

Nun sollte herausgefunden werden, ob sich die verringerte Peroxidproduktion in einem Infektionsversuch auf die Pathogenität gegenüber HeLa-Zellen auswirkt (siehe Abb.3.27).



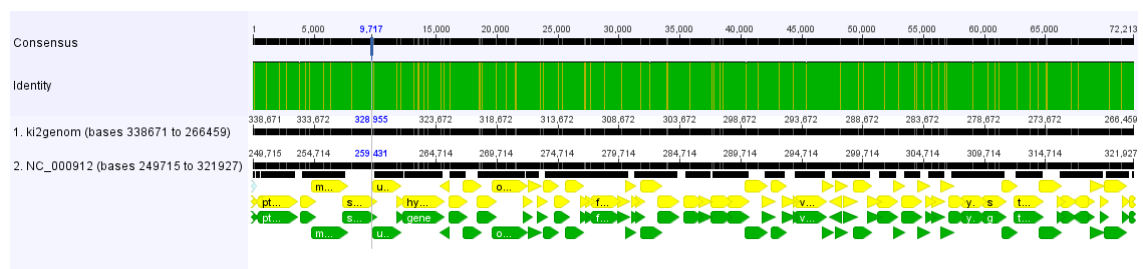
**Abb. 3.27: HeLa-Infektionsversuch mit GPM101 (KI2):** HeLa Zellen wurden mit *M. pneumoniae* M129 und GPM101 (KI2) infiziert. Zum Vergleich dienten weitere Stämme mit dem gleichen Phänotyp GPM95, GPM91 und GPM87 (*mpn114::Tn*, *mpn133::Tn*, und *mpn284::Tn*) und nicht infizierte HeLa-Zellen.

Die Mutanten zeigen in dem Versuch am zweiten Tag alle eine verringerte Zytotoxizität gegenüber den HeLa-Zellen im Vergleich zum WT. Am vierten Tag jedoch weist GPM101 (KI2) eine höhere Toxizität auf als der Wildtyp, dies gilt auch für den sechsten Tag. Die Mutante von *mpn284* (GPM87) führt zu der geringsten Zelllyse am vierten Tag, die

beiden anderen Mutanten sind jedoch auch weniger zytotoxisch als der WT. Am sechsten Tag zeigt sich ein ähnliches Bild für alle Mutanten und den WT.

### 3.7 Sequenzierung des klinischen Isolats 2: Einfluss von Mutationen im Chromosom auf den Phänotyp

Aufgrund des Phänotyps wurde der Stamm GPM101 (KI2) im Göttingen Genomics Laboratory sequenziert. Dort erfolgten neben der Sequenzierung auch Sequenzvergleiche mit den Laborstämmen M129 und ATCC 15531 (FH). Zusätzlich konnte die erhaltene Sequenz mit den Sequenzen der Wildtypstämme verglichen werden (siehe Abb.3.28).



**Abb. 3.28: Ausschnitt des Genom Alignments von GPM101 (KI2) mit *M. pneumoniae* M129 WT:** Die Abbildung zeigt schematisch das Alignment der beiden Sequenzen. Im obersten Bereich ist die Konsenssequenz beider Sequenzen dargestellt. Darunter ist die Übereinstimmung beider Sequenzen zu sehen, hierbei sind durch gelbe Linien Unterschiede kenntlich gemacht. Darunter befinden sich die beiden Original- Sequenzen und die Annotation der Gene.

Zum Sequenzvergleich wurde das Programm „Geneious“ verwendet. Dieses ermöglicht ein direktes Alignment der beiden Sequenzen und befähigt den Betrachter, sowohl die Mutationen in der DNA zu erkennen als auch zu sehen, ob eine Mutation zu einem Basenaustausch oder zu einem Frameshift führt (siehe Tabelle 3.1). Bei Betrachtung der Genomgröße fällt auf, dass das klinische Isolat ein deutlich größeres Genom (~859.500 Basen) besitzt als die beiden Referenzstämme (M129: 816.400 Basen; ATCC 15531 (FH): 811.100 Basen).

**Tabelle 3.1: Mutationen im GPM101-Genom (KI2):** Die Sequenz wurde mit dem *M. pneumoniae* FH-Stamm (ATCC 15531 ) verglichen. Bei allen Mutationen sind einzelne Basen ausgetauscht, die Position dieser Basenaustausche im Referenzgenom ist angegeben. Zusätzlich ist die Ursprungsbase (FH) und die neue Base in GPM101 angegeben (KI2), dabei steht „-“ für eine Deletion der Base. Die betroffenen Sequenzen wurden gegen *M. pneumoniae* M129 geblastet und somit konnten die Homologe (Mpn Nr.) in diesem Stamm und ihre Synonyme (Synonym) benannt werden. In einer weiteren Blastanalyse wurde die Homologe aus dem nahen Verwandten *B. subtilis* (*B. subtilis*) bestimmt. In der Tabelle ist außerdem angegeben, ob der Basenaustausch in der Sequenz zu einer Mutation in einem der beiden Referenz-Stämme führt (Mutation M129, Mutation FH). In der letzten Spalte ist angegeben, ob das betroffene Gen in *M. pneumoniae* M129 essentiell ist (E). Dabei steht „f“ für Fitness und bedeutet, dass das Gen unter einer bestimmten, unbekanntem Bedingung nicht essentiell ist (Lluch-Senar, pers. Mitteilung).

| Position in FH | FH | KI2 | Mpn Nr | Synonym | <i>B.subtilis</i> | Unterschied zu M129 | Unterschied zu FH | E |
|----------------|----|-----|--------|---------|-------------------|---------------------|-------------------|---|
| 45954          | T  | -   | Mpn037 |         | -                 | Frameshift          | Frameshift        | - |
| 62222          | G  | A   | Mpn050 | glpK    | GlpK              | Ser-423-->Phe       | Ser-423-->Phe     | + |
| 63342          | A  | C   | Mpn050 | glpK    | GlpK              | -                   | Tyr-50-->Asp      | + |
| 88588          | A  | G   | Mpn075 | ywdF    | EpsE              | Ala-89-->Gly        | Ala-89-->Gly      | - |
| 108521         | C  | A   | Mpn085 |         | -                 | Tyr426-->Stopp      | Tyr424-->Stopp    | - |
| 111990         | C  | T   | Mpn089 | hsdS    | YomM              | Arg137-->Cys        | Arg181-->Cys      | - |
| 148103         | A  | G   | Mpn113 |         | -                 | Thr12-->Ala         | Thr201-->Ala      | - |
| 240908         | G  | A   | Mpn200 |         | -                 | -                   | Ser-->Asn         | - |
| 261564         | C  | T   | Mpn213 |         | -                 | Ser373-->Phe        | Ser373-->Phe      | + |
| 285898         | A  | G   | Mpn236 |         | -                 | -                   | Ile65-->Met       | f |
| 286547         | G  | A   | Mpn236 |         | -                 | Glu282-->Lys        | Glu282-->Lys      | f |
| 312747         | T  | G   | Mpn262 |         | -                 | -                   | Leu17-->Trp       | f |
| 340481         | C  | T   | Mpn286 |         | -                 | Ala177-->Val        | Ala-->Val         | - |
| 348948         | -  | T   | Mpn294 |         | YraA              | Frameshift          | Frameshift        | - |
| 354200         | G  | T   | Mpn302 | pfkA    | PfkA              | Leu66-->Phe         | Leu66-->Phe       | + |
| 354471         | G  | A   | Mpn302 | pfkA    | PfkA              | Ala157-->Thr        | Ala157-->Thr      | + |
| 375626         | A  | C   | Mpn318 |         | YfnA              | -                   | Met33-->Leu       | f |
| 376166         | T  | C   | Mpn318 |         | YfnA              | Phe213-->Leu        | Phe213-->Leu      | f |
| 471474         | G  | A   | Mpn395 | apt     | Apt               | Arg63-->Cys         | Arg63-->Cys       | + |
| 471526         | C  | T   | Mpn395 | apt     | Apt               | Met45-->Ile         | Met45-->Ile       | + |
| 533765         | -  | T   | Mpn441 |         |                   | Frameshift          | Frameshift        | - |
| 582078         | G  | T   | Mpn483 | yibD    | EpsJ              | Val197-->Leu        | Val197-->Leu      | - |

| Position in FH | FH | KI2 | Mpn Nr  | Synonym | <i>B.subtilis</i> | Unterschied zu M129 | Unterschied zu FH | E |
|----------------|----|-----|---------|---------|-------------------|---------------------|-------------------|---|
| 645135         | C  | A   | Mpn528a | recU    | RecU              | Thr17-->Lys         | Thr17-->Lys       | - |
| 662265         | C  | T   | Mpn547  |         | YloV              | Met227-->Ile        | Met129-->Ile      | f |
| 752342         | G  | T   | Mpn630  | yfiB    | YitT              | Leu40-->Ile         | Leu40-->Ile       | f |
| 768041         | A  | G   | Mpn648  |         | -                 | Ser130-->Pro        | Ser130-->Pro      | - |

Der Sequenzvergleich mit *M. pneumoniae* M129 ergab ca. 1300 Mutationen in der GPM101 Sequenz (KI2). Im Vergleich einzelner Proteine mit M129 und FH (ATCC 15531) fiel jedoch auf, dass ein Großteil der Mutationen nicht auftritt, wenn man nur GPM101 (KI2) und FH (ATCC 15531) betrachtet. Daher wurde ein Sequenzvergleich mit FH als Referenzstamm im G<sub>2</sub>L durchgeführt. Anschließend wurden die Rohdaten bereinigt. Es wurden nur Mutationen betrachtet, die in der Sequenzierung mindestens 25 „Reads“ und eine Zuverlässigkeit von mindestens 80% aufwiesen. Das bedeutet, dass jede Mutation durch mindestens 25 Einzelsequenzen bestätigt wurde, von denen in wenigstens 80% die Mutation auftrat.

Durch den Vergleich war es möglich, die genaue Position anzugeben, an der eine Mutation auftritt. Dadurch konnte die Mutationsliste weiter bereinigt werden. Mittels der Position konnten die Auswirkungen der Mutationen bestimmt und Mutationen, die in beiden Referenzstämmen stumm waren, aus der Liste gelöscht werden.

Nach der Bereinigung bleiben 26 Mutationen in 21 verschiedenen Genen übrig. Hierbei sind zwei Basendeletionen und eine Baseninsertion vorhanden, diese führen sowohl im Vergleich zu M129 als auch zu FH (ATCC 15531) zu einer Verschiebung des Leserasters (Frameshift). In M129 ist jedoch keines dieser Gene (*mpn037*, *mpn294* und *mpn441*) essentiell und es ist nur die Funktion von *mpn294* bekannt (Protease). In fünf Fällen führen Basenaustausche nur im Vergleich zum FH-Stamm (ATCC 15531) zu einer Mutation, in diesen Fällen kommt es zu einem Aminosäureaustausch (AS-Austausch) im Protein des klinischen Isolats. Dieser Fall trifft auf die Gene *mpn050* (*glpK*), *mpn200*, *mpn236*, *mpn262* und *mpn318* zu. Dabei handelt es sich um die Glycerinkinase (*glpK*), ein Gen mit unbekannter Funktion (*mpn200*), eine tRNA-Amidotransferase (*mpn236*), ein Retikulozytenbindeprotein (*mpn262*) und um einen AS-Transporter (*mpn318*).

Alle weiteren Mutationen treten sowohl im Vergleich zum FH-Stamm (ATCC 15531) als

auch zu M129 in der Sequenz des klinischen Isolats auf. In allen Fällen handelt es sich um AS-Austausche. Dabei sind zwei Besonderheiten aufgetreten: In *mpn085* (einem Adhäsion) führt der Basenaustausch zu einem Einbau eines Stopp-Codons. Dieser erfolgt an der Position Tyr424 und führt somit zu einer Verkürzung des 440 AS langen Proteins in GPM101 (K12). Eine weitere Besonderheit tritt in der Dihydroacetonkinase Mpn547 auf. Bei allen AS-Austauschen sind die gleichen Positionen im Vergleich zum FH-Stamm (ATCC 15531) als auch zu M129 betroffen, in diesem Protein jedoch ist die Position Met227 in M129 und Met129 in FH (ATCC 15531) betroffen.

Insgesamt enthalten sieben Proteine des klinischen Isolats, deren Funktion in *M. pneumoniae* M129 nicht bekannt ist, Mutationen. Neben dem AS-Transporter *mpn318*, der zwei Mutationen im Vergleich zu FH (ATCC 15531) und eine im Vergleich zu M129 beinhaltet, ist ein weiterer Transporter *mpn113* (sowohl im Vergleich zu FH als auch zu M129) von einer Mutation betroffen. Laut Annotation handelt es sich hierbei in *M. pneumoniae* M129 um einen G3P-Transporter, dies konnte jedoch nicht experimentell bestätigt werden (Schmidl, pers. Mitteilung).

Vier der Gene, die Mutationen enthalten, sind in M129 essentiell (Lluch-Senar, pers. Mitteilung). Hierbei handelt es sich um die oben erwähnte Glyzerinkinase, die neben einer Mutation, die nur im Vergleich zum FH-Stamm (ATCC 15531) auftritt, noch eine zweite Mutation beinhaltet, die zu einem AS-Austausch im Vergleich zu beiden Referenzstämmen führt. Neben GlpK ist ein weiteres Enzym aus der C-Verwertung von zwei Mutationen (in beiden Referenzstämmen) betroffen; die Phosphofruktokinase PfkA ist Teil der Glykolyse. Die essentielle Adeninphosphoribosyltransferase Apt ist ebenfalls von zwei Mutationen (auch in Bezug auf beide Referenzstämmen) betroffen. Bei dem vierten betroffenen, essentiellen Gen handelt es sich um *mpn213*. Die Funktion des Proteins ist bisher nicht bekannt.

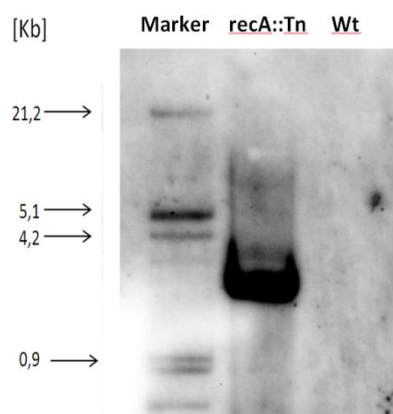
Unter den betroffenen Genen befinden sich außerdem noch sechs sogenannte „fitness“-Gene in *M. pneumoniae* M129 (Lluch-Senar, pers. Mitteilung). Diese Gene sind unter bestimmten Voraussetzungen nicht essentiell. Zu diesen gehören *mpn236*, *mpn262*, *mpn318*, *apt*, *mpn547* und *mpn630*. Bis auf diese und die oben genannten essentiellen Gene ist *M. pneumoniae* M129 auf keines der anderen Gene angewiesen.

Auch wenn die meisten Mutationen innerhalb intergenischer Bereiche bei der

Auswertung nicht betrachtet wurden, so werden im Folgenden fünf Ausnahmen genannt. Die intergenischen Bereiche kodieren nicht für Gene, in diesen kann sich jedoch die Promotorstruktur vorheriger oder nachfolgender Gene befinden. Innerhalb der -35 Region der Gene *apt*, *mpn491* (Nuklease), *mpn341* (Helikase), *mpn364* und *mpn161* befinden sich Mutationen in GPM101 (KI2).

### 3.8 Isolation und Charakterisierung einer *recA*-Mutante

Eine Mutante des *recA*-Gens (*mpn490*) wurde aus der Transposonbank isoliert (GPM100). Dieses Gen codiert für eine Rekombinase. Dazu wurden die Primerpaare SH29/SH30 und AS112/AS113 verwendet. Mittels Southern Blot konnte verifiziert werden, dass das Transposon nur einmal innerhalb des Chromosoms vorliegt und durch Ansequenzieren der chromosomalen DNA der Mutante konnte sichergestellt werden, dass das Transposon innerhalb von *recA* liegt (siehe Abb.3.29).

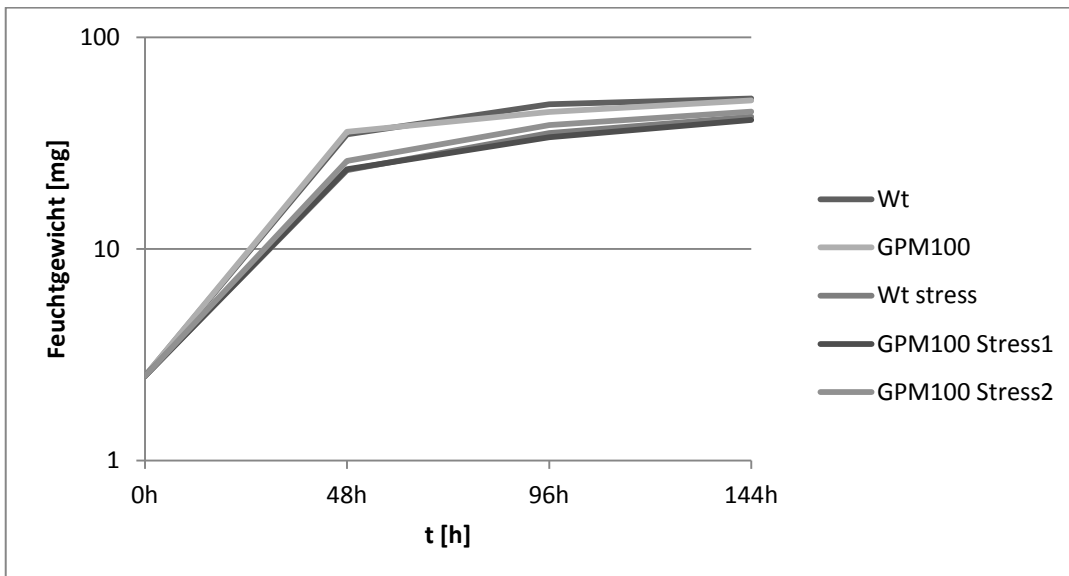


**Abb. 3.29: Southern-Blot *recA*:** Es wurde ein Slot-Blot mit einer Sonde gegen die Gentamycinresistenzkassette durchgeführt. Die cDNA wurde mit *Scal* verdaut. Als Negativkontrolle diente cDNA des *M.pneumoniae* WT.

Für den Southern-Blot wurde chromosomale DNA der Mutante mit dem Restriktionsenzym *Scal* verdaut. Das Enzym schneidet sowohl am Anfang des Gens als auch innerhalb des Transposons. Auch wenn die Schnittstelle innerhalb der Resistenzkassette liegt, so befindet sie sich hinter der Bindestelle der Sonde. Daher war eine Bande bei ca. 3,1 KB zu erwarten. Auf dieser Höhe ist eine starke Bande zu sehen und erwartungsgemäß tritt keine Bande innerhalb der Wildtypspur auf.

In einem Wachstumsversuch sollte nun herausgefunden werden, ob eine *recA*-Mutante

(GPM100) sensitiver gegenüber DNA-Schäden ist. Dazu wurde die Mutante in mehreren Schritten passagiert, so dass genügend Zellmaterial vorhanden war. Anschließend wurde eine gesättigte Mitomycin C Lösung (nach Herstellerangaben, Sigma) angesetzt. Mitomycin ist ein DNA-schädigendes Antibiotikum. Kulturen, die vier Tage gewachsen sind, wurden mit der Antibiotikallösung versetzt (0,1 ml gesättigte Lösung / 100 ml Kultur). Die Zellen wurden für 1h bei 37°C inkubiert und anschließend geerntet. Mit den so erhaltenen Zellen wurden Wachstumskurven angeimpft. Zwei unabhängige Kulturen der Mutante wurden so behandelt und verwendet, als Kontrolle diente eine ebenfalls behandelte WT Kultur. Zusätzlich wurden Wachstumskurven mit unbehandelten WT und Mutanten-Kulturen durchgeführt (siehe Abb. 3.30).



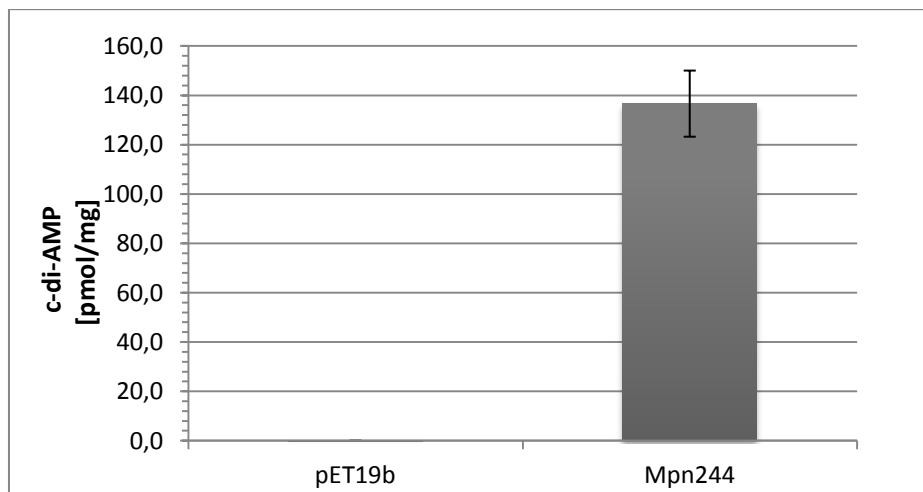
**Abb. 3.30: Wachstumskurven mit Mitomycin C-Stress:** Mit Mitomycin C behandelte Zellen dienten als Ausgangsmaterial für mehrere Wachstumskurven. Unbehandelte Zellen (WT und GPM100) dienten als Kontrollen.

Die Kontrollstämme zeigen ein normales Wachstum, dabei gibt es keinen Unterschied zwischen dem WT und der *recA*-Mutante (GPM100). Die Zellen, die mit Mitomycin C behandelt wurden, weisen ein leicht verringertes Wachstum auf, jedoch zeigt sich auch hier kein Wachstumsnachteil durch die Mutation des *recA*-Gens.



### 3.9 Welche Rolle spielt zyklisches-di-AMP in *M. pneumoniae* M129?

Um herauszufinden, ob es sich bei dem Gen *mpn244* tatsächlich um eine Diadenylatzyklase (DAC) handelt, wurde das Gen mit den Primern AS94/95 über BamHI und NdeI in den Überexpressionsvektor pET19b kloniert. Anschließend erfolgte eine Überexpression des Proteins und eine c-di-AMP-Extraktion aus *E.coli*. Die LC-MS/MS-Messung von c-di-GMP/c-di-AMP wurde im Massenspektrometrie-Labor für niedermolekulare bakterielle und eukaryotische Metabolite an der Medizinischen Hochschule Hannover nach Spangler (Spangler *et al.*, 2010) durchgeführt. Anschließend wurden die Messwerte auf die Proteinmenge bezogen (siehe Abb. 3.31).

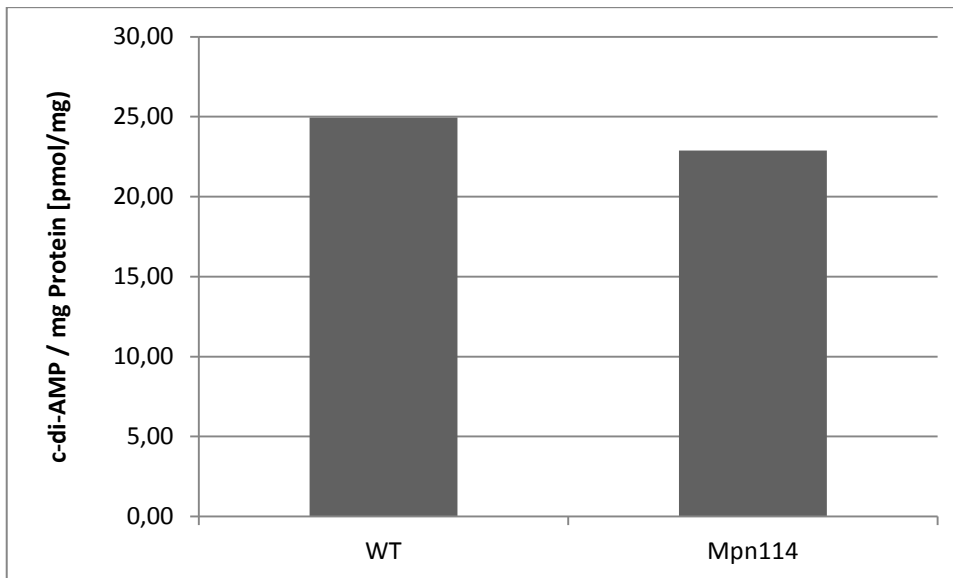


**Abb. 3.31: C-di-AMP-Messung in *E.coli*:** Die Messung ergab keinerlei c-di-AMP-Produktion für den Leervektor und ca. 140 pmol c-di-AMP pro mg Protein.

In der Messung konnte gezeigt werden, dass im gemessenen Leervektor kein c-di-AMP entsteht. In der Probe, die den Vektor mit *mpn244* erhielt, konnten ca. 140 pmol c-di-AMP pro mg Protein gemessen werden.

In einem weiteren Versuch sollte die c-di-AMP Konzentration *in vivo* gemessen werden. Dazu wurden der *M. pneumoniae* M129 WT und GPM95 (*mpn114::Tn*) vier Tage angezogen und anschließend der Nukleotidmessenger extrahiert. Dadurch sollte herausgefunden werden, ob die durch Mpn114 vermittelten Acetylierungen einen Einfluss auf den c-di-AMP-Spiegel in der Zelle haben. Die Messung der Konzentration

erfolgte ebenfalls in Hannover und die Werte wurden auf die Proteinmenge bezogen (siehe Abb. 3.32).



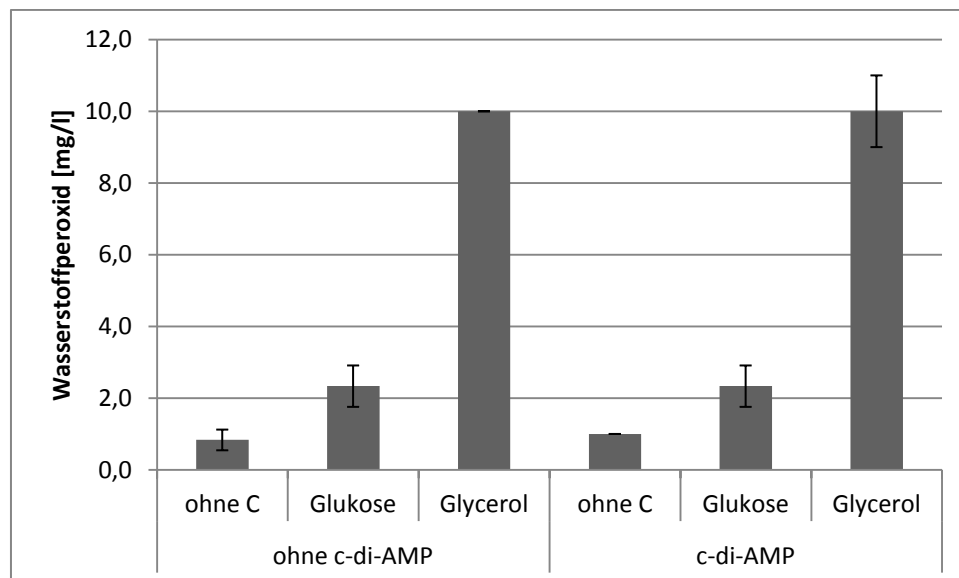
**Abb. 3.32: In vivo Messung der c-di-AMP-Konzentration:** Es wurde der c-di-AMP-Spiegel im WT und in GPM95 (*mpn114::Tn*) bestimmt.

In weiteren Experimenten wurden verschiedene Bedingungen und Mutanten untersucht. *M. pneumoniae* WT wurde mit Glycerin angezogen, außerdem wurden weitere Zellen des Stammes mit Glukose angezogen und nach vier Tagen Wachstum mit Mitomycin-Lösung versetzt (0,1 ml gesättigte Lösung / 100 ml Kultur). Die Zellen wurden 1h bei 37°C inkubiert und anschließend geerntet. Zusätzlich wurden weitere Stressbedingungen getestet. Dazu inkubierte man vier Tage alte Zellen einer Glukose-Kultur eine Stunde bei 37°C und pH5,5. Außerdem wurde eine weitere Kultur eine Stunde mit 0,5 M NaCl gestresst. Neben diesen drei unterschiedlichen Stressbedingungen wurden verschiedene Mutanten-Stämme angezogen. Eine Mutante der Proteinkinase C (PrkC), eine *whiA::Tn*-Mutante, eine *relA::Tn*-Mutante und eine Mutante von *mpn026* wurden ebenfalls vier Tage mit Glukose angezogen und anschließend wurde eine c-di-AMP-Extraktion durchgeführt. Keine der untersuchten Stressbedingungen und keine der untersuchten Mutanten zeigte jedoch eine Abweichung von der gemessenen c-di-AMP-Konzentration im Vergleich zum M129-Referenzstamm.

In einem weiteren Ansatz sollte getestet werden, ob durch die Zugabe von externen c-di-

AMP eine Veränderung des Phänotyps in der  $H_2O_2$ -Produktion oder der Zytotoxizität auftritt. Dazu wurde zunächst *E. coli* BL21 mit einem Überexpressionsplasmid (pGP172) transformiert. Auf diesem befand sich eine mutierte DAC aus *B. subtilis*. Diese *cdaS*-Mutante (zur Verfügung gestellt von Felix Mehne) weist eine erhöhte Produktion von c-di-AMP in *E. coli* auf. Parallel wurde *E. coli* mit dem Leervektor transformiert und eine Überexpression in beiden Stämmen durchgeführt. Anschließend wurde eine Extraktion durchgeführt und jeweils ein Aliquot nach Hannover zur MS-Analyse geschickt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich - wie erwartet - kein c-di-AMP in der Kontrolle mit dem Leervektor befand. Die Konzentration der zweiten Probe lag bei  $\sim 11$  mM c-di-AMP. Daraus wurde eine 10 mM Stammlösung hergestellt, die in den folgenden Versuchen verwendet wurde.

In einer Wasserstoffperoxidmessung wurden 100  $\mu$ l der c-di-AMP-Stammlösung eingesetzt (entsprechend weniger Puffer). Für die Messung wurden *M. pneumoniae* M129 Zellen 4 Tage mit Glukose angezogen und die Messung erfolgte entsprechend dem Protokoll (siehe Abb. 3. 33).

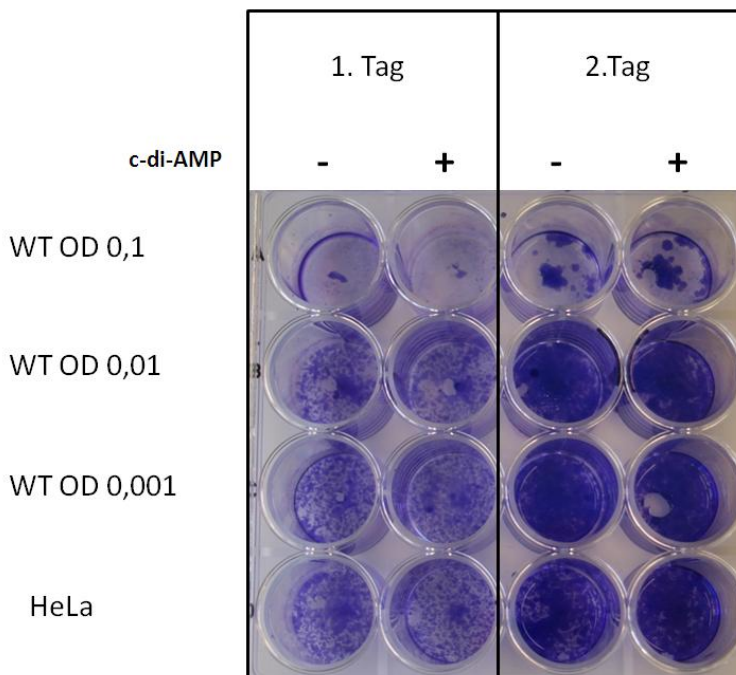


**Abb. 3.33: Peroxidmessung mit c-di-AMP:** Die Messung erfolgte mit WT-Zellen mit unterschiedlichen C-Quellen jeweils mit und ohne c-di-AMP-Stammlösung (10 mM).

In der Messung zeigte sich das gewohnte Bild mit einer minimalen Erhöhung in der  $H_2O_2$ -Produktion mit Glukose und eine starke Produktion mit Glycerin als C-Quelle. Die Zugabe

externen c-di-AMPs führte zu keiner Veränderung, weder mit Glukose noch mit Glyzerin zeigte sich eine Abweichung.

Mittels eines HeLa-Infektionsversuches sollte herausgefunden werden, ob sich c-di-AMP unabhängig von der  $H_2O_2$ -Produktion auf die Pathogenität auswirkt. Dazu wurden HeLa-Zellen nach Protokoll angezogen und mit vier Tage gewachsenen *M. pneumoniae* M129-Zellen infiziert (siehe Abb. 3.34). In dem Versuch wurden HeLa-Zellen mit unterschiedlichen Mengen Bakterien infiziert. Da Mycoplasmen in kurzer Zeit in der Lage sind, alle HeLa-Zellen in einem solchen Versuch zu lysieren, wurde das Experiment auf 2 Tage ausgelegt, um eine mögliche Verstärkung durch c-di-AMP kenntlich zu machen. Es wurden jeweils Infektionen mit und ohne c-di-AMP durchgeführt. Dabei wurden 100  $\mu$ l der Stammlösung (10 mM) während der zwei Stunden Infektionsphase zugesetzt und anschließend wieder entfernt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte HeLa-Zellen.



**Abb.3.34: HeLa-Infektionsversuch mit c-di-AMP:** Die Infektion der HeLa-Zellen mit und ohne c-di-Amp wurde über 2 Tage verfolgt.

Während der Infektion zeigt sich, dass bei einer AusgangsOD von 0,1 (1 ml Zellsuspension mit einer  $OD_{550}$  von 0,1) die HeLa-Zellen bereits am ersten Tag fast vollständig lysiert sind, dies gilt natürlich auch für den zweiten Tag. In 10facher und

100facher Verdünnung ist kein deutlicher Unterschied zur HeLa-Kontrolle erkennbar. Für alle Verdünnungen an beiden Tagen gilt, dass die Zugabe von externen c-di-AMP keine Auswirkung auf die Pathogenität von *M. pneumoniae* gegenüber den HeLa-Zellen hat.

## 4. Diskussion

### 4.1 Können in *M. genitalium* Mutanten mittels LFH konstruiert werden?

Die Long Flanking Homology PCR hat sich als ein nützliches Werkzeug in der Gentechnik erwiesen. Mit dieser Methode können in verschiedenen Organismen schnell und einfach Mutationen in das Genom eingeführt werden, da lineare DNA in den Organismus eingebracht wird und durch doppelt homologe Rekombination ins Chromosom integriert wird (Wach, 1996; Krawchuck und Wahls, 1999; de Hoogt *et al.*, 2000). In dem nahen Verwandten der Mycoplasmen *B. subtilis* ist diese Methode ebenfalls gut etabliert (Wach, 1996). *M. genitalium* kann ebenfalls doppelt homologe Rekombination durchführen (Dhandayuthapani *et al.*, 1999). Auch für *M. pneumoniae* konnte dieser zelluläre Prozess nachgewiesen werden (Kirishnakumar *et al.*, 2010). In den genannten Studien wurde bisher jedoch nur zirkuläre DNA in die Mycoplasmen transformiert. Nach Transformation mit einem linearen LFH-Produkt zeigte sich jedoch kein Wachstum auf Selektionsplatten. Mycoplasmen besitzen, wie die meisten Bakterien, ein zirkuläres Chromosom, einzige Ausnahme unter den Mycoplasmen bildet *Candidatus Phytoplasma mali* (Kube *et al.*, 2008). Es ist möglich, dass das lineare PCR-Fragment durch Exonukleasen abgebaut wird, vor denen das Chromosom geschützt ist. Ein weiterer Unterschied zu der chromosomalen DNA besteht in der Methylierung. In *M. pneumoniae* ist die cDNA methyliert (Lluch-Senar *et al.*, 2013), während der LFH-PCR findet keine Methylierung statt. Möglicherweise kann das Bakterium auf diese Weise Fremd-DNA erkennen und diese abbauen. Der Versuch deutet darauf hin, dass es nur möglich ist, zirkuläre DNA zur Mutantengeneration zu nutzen. Die LFH kann somit nicht als Werkzeug zur Herstellung von Deletionsmutanten in *M. genitalium* genutzt werden.

### 4.2 Wachstum und Peroxidbildung von *M. genitalium* G37

*M. genitalium* besitzt ein kleineres Genom als *M. pneumoniae* (Herrmann und Rainer, 1998). Daher ist es erstaunlich, dass sich in der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Messung zeigt, dass *M. genitalium* mit Glukose Peroxid produziert. Es konnte zwar auch in jeder Messung eine minimal

erhöhte Peroxidproduktion für *M. pneumoniae* gezeigt werden, jedoch ist die Produktion in *M. genitalium* deutlich höher. Dies ist ein erster Hinweis auf einen Unterschied in der Verwertung der C-Quellen.

Im Wachstum unterscheidet sich *M. genitalium* ebenfalls von *M. pneumoniae*. Während sich das Wachstum von *M. pneumoniae* mit Glukose und Glycerin deutlich unterscheidet und Glukose besser verwertet werden kann, zeigt sich in *M. genitalium* kein deutlicher Unterschied beim Wachstum mit den verschiedenen C-Quellen. Dies ist ein weiterer Hinweis auf einen Unterschied in der Verwertung der C-Quellen. Bei der Zytotoxizität unterscheiden sich die beiden Stämme nicht voneinander.

Mittels einer Komplementation einer *glpD*-Mutante (GPM52) in *M. pneumoniae* mit dem *glpD* aus *M. genitalium* konnte der Ursprungstyp von *M. pneumoniae* WT wiederhergestellt werden. Die komplementierten Klone konnten sowohl mit Glycerin als auch mit GPC Wasserstoffperoxid produzieren. Auch die verringerte Zytotoxizität der Mutante ließ sich durch die Komplementation ausgleichen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass GlpD zur Wasserstoffperoxidproduktion genutzt wird. Jedoch sind auch die zwei unabhängigen, komplementierten Klone nicht in der Lage, mit Glukose Wasserstoffperoxid zu produzieren. Der Versuch bestätigt die Funktion von GlpD in *M. genitalium*, die bereits für *M. pneumoniae* nachgewiesen werden konnte (Hames *et al.*, 2009) und zeigt, dass es möglich ist, das Enzym in *M. pneumoniae* zu exprimieren, und dass dabei die Aktivität erhalten bleibt. In einem ähnlichen Versuch konnte eine solche Komplementation für das P30 Protein gezeigt werden (Relich und Balish, 2011). Mit diesem Versuch ließ sich zwar bestätigen, dass GlpD aus *M. genitalium* an der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion beteiligt ist, jedoch ließ sich nicht zeigen oder ausschließen, dass es auch an der Glukose-Verwertung beteiligt ist. Es ist immer noch möglich, dass das Enzym auf Grund von Interaktionen mit anderen Enzymen eine „moonlighting“-Aktivität besitzt (Kelkar und Ochmann, 2013). Dies konnte jedoch mit den Versuchen mit GPG02 ( $\Delta glpD$ ) aus *M. genitalium* ausgeschlossen werden (siehe unten).

### 4.3 Charakterisierung der Acetyltransferasemutanten *mpn027* und *mpn114*

Mpn027 ist als Acetyltransferase annotiert, Mpn114 als Carnitin-O-Acetyltransferase. Das bedeutet, dass das Enzym die Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf Carnitin übertragen kann. Carnitin dient in Mitochondrien zur Aufnahme langkettiger Fettsäuren und kann von einigen Bakterien als C-Quelle genutzt werden, außerdem ist eine Rolle als Osmoprotektant in *E. coli* vorgeschlagen worden (Bremer, 1963; Fritz und Yue, 1963; Bieber, 1988). Die Annotation erfolgte jedoch *in silico* und wurde bereits in vorherigen Studien angezweifelt (Yus *et al.*, 2009). Gegen eine Funktion als Carnitinacetyltransferase spricht auch die Tatsache, dass Mycoplasmen nicht über die geeigneten Enzyme verfügen, um diesen Stoff als C-Quelle nutzen zu können. Interessanterweise kommt das Enzym nur in sehr wenigen Bakterien vor. Ein Vergleich mit allen Bakterien aus der JCVI-Datenbank zeigt, dass nur eine weitere Mycoplasmaart ein ähnliches Protein besitzt. In anderen Firmicutes wie z.B. *B. subtilis* gibt es kein Homolog (siehe Tab. 4.1).

**Tabelle 4.1: Sequenzvergleich von *mpn114* mit den Organismen der JCVI-Datenbank** (Quelle: <http://cmr.jcvi.org/>)

| Organismus                                   | % Identität | % Ähnlichkeit |
|--|-------------|---------------|
| <i>Mycoplasma pulmonis</i> UAB CTIP          | 45.2%       | 65.2%         |
| <i>Shewanella sediminis</i> HAW-EB3          | 24.2%       | 42.5%         |
| <i>Salinispora tropica</i> CNB-440           | 24.5%       | 42.8%         |
| <i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338 | 21.5%       | 38.8%         |
| <i>Photobacterium profundum</i> SS9          | 22.7%       | 42.9%         |
| <i>Frankia</i> sp. EAN1pec                   | 22.3%       | 37.1%         |
| <i>Salinispora arenicola</i> CNS-205         | 21.3%       | 40.4%         |
| <i>Frankia alni</i> ACN14a                   | 23.1%       | 38.8%         |
| <i>Nocardia farcinica</i> IFM10152           | 22.4%       | 40.2%         |
| <i>Frankia</i> sp. Ccl3                      | 24.0%       | 41.7%         |
| <i>Dichelobacter nodosus</i> VCS1703A        | 23.8%       | 46.0%         |
| <i>Cellvibrio japonicus</i> Ueda107          | 22.1%       | 41.4%         |



Außerdem ist auffällig, dass es kein Homolog von *mpn114* in *M. genitalium* gibt. Generell handelt es sich bei Acetylierungen um eine wichtige posttranslationale Modifikation, was auch für *M. pneumoniae* gezeigt werden konnte (van Noort *et al.*, 2012; Soufi *et al.*, 2012). Da jedoch außer Mpn027 nur Mpn114 als potentielle Acetyltransferase annotiert ist, ist es durchaus wahrscheinlich, dass es sich bei diesem Protein ebenfalls um ein solches Enzym handelt. Möglicherweise ist es jedoch nicht eine Carnitin-spezifische Acetyltransferase, sondern ein Enzym, das Lysine in Proteinen acetylieren kann.

Von beiden Genen konnte eine Transposonmutante isoliert werden. Dabei zeigten sich keine Auffälligkeiten bezüglich der Peroxidproduktion oder des Wachstums bei GPM94 (*mpn027::Tn*). Auch GPM95 (*mpn114::Tn*) zeigte im Wachstum mit Glukose und Glycerin keinen Unterschied zu Wildtyp-Zellen.

In GPM95 (*mpn114::Tn*) wird kein Peroxid mit Glycerin gebildet, jedoch ist der Stamm noch in der Lage, mit GPC  $H_2O_2$  zu produzieren. Daraus lässt sich schließen, dass GlpD in der Mutante aktiv ist. Vorherige Studien haben gezeigt, dass in *M. pneumoniae* GlpD essentiell für die Peroxidbildung ist (Hames *et al.*, 2009). Die Ergebnisse konnten in dieser Studie bestätigt werden. Die Produktion von Peroxid mit GPC lässt darauf schließen, dass der Phänotyp einen Einfluss auf die Aufnahme bzw. Phosphorylierung von Glycerin hat und der GPC-Weg der Peroxidbildung nicht beeinträchtigt ist (siehe Einleitung). Vermutlich auf Grund der verminderten Peroxidbildung zeigt die Mutante eine verringerte Zytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen. Dabei ist wiederum der Phänotyp vergleichbar zu einer *glpD*-Mutante (GPM52). Zur genaueren Analyse wurden weitere Peroxidmessungen unter verschiedenen Bedingungen und mit weiteren Mutanten durchgeführt. Auf die Ergebnisse dieser Experimente wird im folgenden Kapitel eingegangen.

#### **4.4 $H_2O_2$ Messungen unter verschiedenen Bedingungen mit unterschiedlichen Stämmen von *M. genitalium* und *M. pneumoniae***

Um einen genaueren Einblick in die Peroxidproduktion zu erhalten, wurden zunächst Wildtyp-Zellen von *M. pneumoniae* und *M. genitalium* mit verschiedenen C-Quellen untersucht. Wie zu erwarten, produziert *Mycoplasma pneumoniae* mit Glycerin und mit

Glyzerin und Glukose Wasserstoffperoxid. Da jedoch nur mit Glukose keine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion stattfindet, kann man daraus schließen, dass - auch wenn beide C-Quellen vorhanden sind - nur Glyzerin zur Peroxidbildung beiträgt. Dies wird durch das gleiche Experiment mit dem Stamm GPM52 (*glpD::Tn*) bestätigt, der nur noch geringe Mengen an Peroxid produziert, wenn Glukose oder Glukose und Glyzerin im Medium vorhanden sind. Wie bereits erwähnt, kann *M. genitalium* mit Glukose ebenfalls Peroxid bilden; dies geschieht auch, wenn Glukose und Glyzerin im Medium vorhanden sind. In GPG02 (*ΔglpD M.genitalium*) (zur Verfügung gestellt von J. Piñol, Barcelona) zeigt sich nur mit Glukose und mit Glukose und Glyzerin die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Glyzerin allein führt in der Mutante nicht mehr zur Peroxidproduktion. Anhand dieser Ergebnisse und anhand der oben genannten Komplementation lässt sich schließen, dass es in *M. genitalium* noch ein weiteres Enzym geben muss, das *glpD*-unabhängig zur Peroxidproduktion führt.

Die *mpn114*-Mutante (GPM95) wurde ebenfalls mit Glukose und Glyzerin in einer Peroxidmessung untersucht. Erstaunlicherweise entsteht, wenn beide C-Quellen vorhanden sind, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Das Gen befindet sich in einem Operon mit verschiedenen weiteren Genen. Da eine Mutante von *mpn113* diesen Phänotyp nicht aufweist, lässt sich ein polarer Effekt, beispielsweise durch die verstärkte Expression einer antisense RNA, ausschließen. Mpn113 ist als G3P-Transporter annotiert, der WT zeigt jedoch keine Peroxidbildung, wenn G3P als C-Quelle vorhanden ist (Großhennig, 2011). Da die annotierte Funktion nicht bestätigt werden konnte, ließ sich durch die Messungen aus dieser Studie ausschließen, dass Mpn113 an der Glyzerinverwertung bzw. -aufnahme beteiligt ist. Neben *mpn113* befinden sich auch noch *mpn115 (infC)*, *mpn116 (rpmI)* und *mpn117 (rplT)* in dem gleichen Operon wie *mpn114*. Bei diesen Proteinen handelt es sich um einen Translationsfaktor bzw. um ribosomale Proteine (Himmelreich et al., 1996). Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Mutation in *mpn114* zu einer metabolischen Veränderung auf Grund polarer Effekte auf diese Gene führt.

Das gleiche Bild wie bei GPM95 (*mpn114::Tn*) zeigte sich auch in den Peroxidmessungen mit den Mutanten von *mpn284* (GPM87) und *mpn133* (GPM91). In einer vorherigen Studie konnte gezeigt werden, dass diese beiden Proteine eine wichtige Rolle bei der Aufnahme von Glyzerin spielen (Großhennig et al., 2013). Daher ist es nicht weiter verwunderlich, dass Glyzerin nicht mehr zu einer Wasserstoffperoxidproduktion führt. Jedoch lässt sich nicht erklären, wieso auch diese beiden Mutanten mit Glukose und

Glyzerin wieder  $H_2O_2$  produzieren können.

In einem weiteren Versuch stellte sich heraus, dass neben Glukose auch Fruktose zur Peroxidproduktion in GPM95 (*mpn114::Tn*) führt, wenn Glyzerin vorhanden ist. Des Weiteren konnte keine deutlich erhöhte Produktion von  $H_2O_2$  nachgewiesen werden, wenn Fruktose und Glukose verwendet wurden. Außerdem führt ein hoher Anteil von Glyzerin bei Anwesenheit von wenig Glukose zu einer stärkeren Peroxidbildung als viel Glukose mit wenig Glyzerin. Daraus lässt sich schließen, dass in der Mutante immer noch das Glyzerin die C-Quelle ist, die zur Peroxidbildung benötigt wird. In einer weiteren Messung konnte gezeigt werden, dass auch Mannose sowie Mannose und Glyzerin zur Peroxidbildung in GPM95 (*mpn114::Tn*) führen, während dies für Ribose bzw. Ribose und Glyzerin nicht der Fall ist. Glukose und Fruktose werden beide über Phosphotransferasesysteme in die Zelle aufgenommen und auch Mannose wird über das Fruktose-PTS transportiert (Halbedel *et al.*, 2007). Ribose hingegen wird über ein PTS-unabhängiges System aufgenommen. *M. pneumoniae* kann mit allen der genannten C-Quellen wachsen, auch wenn das Wachstum in Hayflick Medium mit Ribose deutlich schwächer ist als mit Glukose (Yus *et al.*, 2009).

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, spielt das Protein HPr eine wichtige Rolle im PTS. Neben der Phosphorylierung am Histidin-15 kann das Protein ebenfalls am Serin46 phosphoryliert werden, wenn Glyzerin vorhanden ist. Diese Modifikation wird durch HPrK katalysiert und kann sowohl von diesem Enzym als auch von einem weiteren PrpC rückgängig gemacht werden (Halbedel *et al.*, 2006). Um herauszufinden, ob in einer *hprK*- bzw. einer *prpC*-Mutante ein Phänotyp in der Peroxidproduktion auftritt, wurden weitere Messungen durchgeführt, die jedoch weder mit PTS-Zuckern noch mit Ribose (auch in Kombination mit Glyzerin) zu einer Abweichung im Vergleich zum Wildtyp geführt haben (Daten nicht gezeigt). Allerdings ist für *B. subtilis* eine kohlenstoffabhängige Regulation des Glyzerinaufnahmesystems beschrieben worden (Darbon *et al.*, 2002). Dieser Organismus ist zur Kohlenstoffkatabolitenrepression befähigt. Hierbei handelt es sich um einen Mechanismus, der sicherstellt, dass die bevorzugte C-Quelle aufgenommen und verwertet wird (Rojo *et al.*, 2010; Fujita, 2009). Bei dieser Kontrolle des zentralen Kohlenstoffstoffwechsels erfolgt ein Großteil der Regulation über den Schlüsselregulator CcpA (Warner und Lolkema, 2003). Ein Homolog dieses Proteins ist in *M. pneumoniae* jedoch nicht vorhanden.

Auf Grund der Peroxidmessungen lässt sich nicht erklären, wieso es mit PTS-Zuckern zu einer Peroxidproduktion mit Glycerin in den verschiedenen Stämmen kommt. Es scheint jedoch, dass die HPr-Kinase keinen Einfluss auf dieses Phänomen ausübt. Möglicherweise gibt es jedoch einen Mechanismus, der der Kohlenstoffkatabolitenrepression ähnlich ist. Auch in *B. subtilis* gibt es eine CcpA-unabhängige Katabolitenrepression (Dahl, 2002). Hierbei könnten Antiterminatoren direkt durch Phosphorylierung einen Einfluss auf die Expression nehmen. Solche Mechanismen sind beispielsweise ebenfalls in *B. subtilis* bekannt (Stülke, 2002). Eine Beteiligung von HPr an einem solchen Mechanismus in *M. pneumoniae* lässt sich mit den durchgeführten Experimenten nicht ausschließen.

Zwei Enzyme aus der Glycerolverwertung – GlpK und GlpD – werden acetyliert (van Noort *et al.*, 2012). Dies könnte für eine Funktion als Acetyltransferase von Mpn114 sprechen. Möglicherweise erfolgt die Acetylierung eines (oder beider) dieser Enzyme durch Mpn114. Ist diese Modifikation für eine PTS-Zucker-unabhängige Verwertung von Glycerin nötig, ließe sich der Phänotyp der *mpn114*-Mutante erklären. Weitere Hinweise, die für eine Beteiligung von *mpn114* an der C-Quellenverwertung sprechen, lassen sich auch aus der Transkriptionsanalyse schließen. Diese wird im folgenden Kapitel diskutiert.

#### **4.5 Untersuchungen der Transkription in verschiedenen Mutanten von *M. pneumoniae* M129**

In der ersten Slot-Blot-Analyse zeigt sich, dass *mpn114* mit Glycerin stärker exprimiert wird als mit Glukose. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass das Protein eine wichtige Rolle bei der Verwertung dieser C-Quelle spielt. Die Zugabe von externem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt zu keiner erhöhten Expression von *mpn114*. Auch bei Zugabe der 100fachen Menge Peroxid wird das Gen nicht stärker exprimiert. Die Zugabe externen Wasserstoffperoxids kann zur verstärkten Expression bestimmter Gene führen (siehe unten), da dies nicht der Fall für *mpn114* ist, kann man davon ausgehen, dass die verstärkte Induktion der Transkription allein durch die C-Quelle gesteuert wird. Dies konnte auch durch Slot-Blot-Analysen mit verschiedenen Mutanten bestätigt werden. Auch in GPM87 (*mpn284::Tn*) und GPM52 (*glpD::Tn*) ist die Expression stärker, wenn die Zellen mit Glycerin angezogen werden. Auch hier spricht die erhöhte Transkriptmenge in der *glpD*-Mutante (GPM52) für eine

peroxidunabhängige Regulation des Gens. Interessanterweise zeigt sich in der zweiten Mutante des Glyzerinaufnahmesystems GPM91 (*mpn133::Tn*) eine deutlich verstärkte Expression bereits mit Glukose. In dieser Mutante ist dafür jedoch die Expression mit Glyzerin geringer als mit Glukose. Daraus lässt sich folgern, dass Mpn133 einen Einfluss auf die Transkription von *mpn114* hat. Bisher konnte die Rolle von Mpn133 nicht eindeutig geklärt werden. Es konnte eine Nukleaseaktivität nachgewiesen werden, die darauf schließen lässt, dass das Protein eine Rolle bei der Bindung und möglicherweise beim Eindringen in Wirtszellen eine Rolle spielt (Somarajan *et al.*, 2010). In einer anderen Studie wird jedoch vorgeschlagen, dass es sich bei Mpn133 um ein akzessorisches Protein der Glyzerinaufnahme handelt (Großhennig *et al.*, 2013). Diese Studie bestätigt die Hypothese, dass Mpn133 eine wichtige Rolle bei der Verwertung von Glyzerin spielt, dies entspricht auch der Annotation aus KEGG. Das Model von Großhennig basiert auf der Struktur des Lipoproteins. Dabei gehen die Autoren davon aus, dass das Protein an der Außenseite der Zellmembran sitzt. Dies wiederum führt zu der Annahme, dass Mpn133 keinen direkten Einfluss auf die Transkription von *mpn114* nimmt. Dass jedoch auch die Mutation von *mpn133* dazu führt, dass kein Peroxid nur mit Glyzerin als C-Quelle gebildet wird, scheint die Theorie zu bestärken, dass dieses Protein wichtig für die Aufnahme der C-Quelle ist.

Die Expression von *mpn114* in der *mpn284*-Mutante (GPM87) ähnelt der des Wildtyps. Auch hierbei handelt es sich um ein Lipoprotein, das scheinbar eine ähnliche Rolle hat wie Mpn133. Auch hier führt die Mutation zu einem Abfall der Peroxidproduktion mit Glyzerin. Allerdings zeigt sich in dieser Mutante keine Veränderung der Expression von *mpn114*. In einer weiteren Transkriptionsanalyse wurde die Expression von *mpn284* untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass nur in einer Mutante von *mpn133* (GPM91) eine erhöhte Expression dieses Gens abläuft. Die verstärkte Expression von *mpn284* in GPM87 (*mpn284::Tn*) lässt sich dadurch erklären, dass das Transposon, das in *mpn284* inseriert hat, einen zusätzlichen Promotor besitzt. Die Sonde, die für diesen Slot-Blot verwendet wurde, bindet hinter diesem Promotor; dadurch erscheint das Gen verstärkt exprimiert, ist jedoch nicht mehr funktional. Es ist erstaunlich, dass die Expression von *mpn133* mit Glyzerin nicht stärker ist als mit Glukose. Da dieses Gen an der Glyzerinaufnahme beteiligt ist (Großhennig *et al.*, 2013), würde man eine verstärkte Expression unter dieser Bedingung erwarten. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass das

Zusammenspiel von Genen aus der Glyzerinaufnahme und *mpn114* ein wichtiger Bestandteil der Glyzerinverwertung ist.

Die wichtigste Rolle in der Glyzerinaufnahme scheint jedoch der Transporter GlpF zu spielen. Auch wenn dieses Protein in anderen Organismen als nicht essentiell beschrieben wurde, konnte bisher keine Mutante aus *M. pneumoniae* isoliert werden (Großhennig *et al.*, 2013; Glass *et al.*, 2006). Jedoch konnte die Expression dieser Gene über Slot-Blot-Analysen untersucht werden (siehe oben). Die verstärkte Expression des Transporters in den Mutanten von *mpn284* (GPM87) und *mpn133* (GPM91) könnte darauf schließen lassen, dass ein Verlust dieser Enzyme teilweise über eine verstärkte Expression von GlpF ausgeglichen werden kann. Jedoch sprechen die Ergebnisse der Peroxidmessung dafür, dass der Verlust der akzessorischen Proteine auch zu einem Verlust der Aufnahmefähigkeit führt, wenn keine Glukose vorhanden ist. Sowohl im Wildtyp als auch in den Mutanten ist die Expression verstärkt, dies lässt darauf schließen, dass Glyzerin selbst zu einer verstärkten Aufnahme führt. Dies wiederum spricht für einen Mechanismus, der zur Wahrnehmung der Kohlenstoffquellen in der Umgebung dient, bzw. dazu, dass Metaboliten aus den verschiedenen Stoffwechselwegen einen Einfluss auf die Expression unterschiedlicher Gene haben können. Auch dies könnte ein Hinweis auf eine katabolitenrepressionsähnliche C-Quellenverwertung sein. Dadurch kann *M. pneumoniae* sicherstellen, dass keine Energie aufgewandt wird, um Transporter zu generieren, die nicht benötigt werden. Diese Hypothese wird durch die stark verringerte *glpF*-Transkription in GPM52 (*glpD*-Mutante) mit Glyzerin unterstützt. Wie in der Einleitung beschrieben, handelt es sich dabei um das Enzym, das sowohl die Glyzerin- als auch die GPC-Verwertung mit der Glykolyse und somit dem zentralen Kohlenstoffstoffwechsel verbindet. Der Verlust dieses Gens führt zu einer Anhäufung von G3P. Glyzerin kann immer noch aufgenommen und phosphoryliert werden und auch das GPC-Aufnahmesystem sollte noch aktiv sein. Da für die Phosphorylierung von Glyzerin ATP benötigt wird, ist es also durchaus sinnvoll, wenn die Zelle die Aufnahme von Glyzerin verhindert, falls es zu einem Stau von G3P kommt. Unter dieser Bedingung kann kein ATP mehr in der Glykolyse gewonnen werden und die Energiebilanz fällt negativ aus, wenn Glyzerin weiterhin aufgenommen wird. Auch in *B. subtilis* wird die Expression des *glpFK*-Operons über G3P gesteuert, hierbei hat jedoch das G3P eine aktivierende Funktion (Darbon *et al.*, 2002). Auch wenn der genaue

Mechanismus weiterhin ungeklärt bleibt, so erscheint die verminderte Aufnahme in einer *glpD*- Mutante sinnvoll und logisch.

Die Ergebnisse der Slot-Blot-Analysen mit einer *glpQ*-Sonde zeigen ein ähnliches Bild. Erstaunlicherweise ist auch dieses Gen verstärkt mit Glycerin exprimiert. GlpQ wird nicht zur Verwertung von Glycerin benötigt, es liegt jedoch in einem Operon mit GlpU (Großhennig *et al.*, 2013). Hierbei handelt es sich um den Transporter für GPC, das nach der Aufnahme von GlpQ prozessiert wird. Es ist möglich, dass auch dieses Operon durch einen Anstau von G3P reguliert wird. Da es sich bei der Phospholipidverwertung um einen Seitenarm der Glycerinverwertung handelt, würde auch hier eine Feedbackinhibierung Sinn ergeben. Die Tatsache, dass auch *glpQ* in GPM52 (*glpD::Tn*) mit Glycerin nicht mehr verstärkt transkribiert wird, untermauert diese Hypothese. Es scheint, dass die Expression der verschiedenen Transportsysteme C-Quellen-abhängig reguliert wird. Dabei ist auch zu beachten, dass in den Mutanten der Gene *mpn114* (GPM95), *mpn284* (GPM87), *mpn133* (GPM91) und *glpD* (GPM95) mit Glukose sowohl *glpF*, als auch *glpQ* verstärkt exprimiert werden im Vergleich zum Wildtyp. Weder die mutierten Gene noch die Gene, auf deren Expression sich die Mutationen auswirken, werden für die Glukoseverwertung benötigt. Doch auch diese Ergebnisse deuten auf eine C-Quellen-abhängige Kohlenstoffaufnahme hin. An dieser scheinen Mpn114, Mpn284 und auch Mpn133 beteiligt zu sein; welche Rolle sie jedoch genau spielen, bleibt auch nach diesen Transkriptionsanalysen weiterhin ungeklärt. Die verstärkte Expression der Gene mit Glukose könnte auch einen Hinweis darauf geben, wieso es in den Peroxidmessungen der Mutanten zu einer Peroxidbildung kommt, wenn neben Glycerin auch Glukose vorhanden ist. Da die Peroxidbildung ein wichtiger Bestandteil der Virulenz von *M. pneumoniae* ist, erscheint es sinnvoll, diese C-Quellen-abhängig zu regulieren (Halbedel *et al.*, 2007).

In einer neueren Studie wird berichtet, dass das Gen *trxA* peroxidabhängig exprimiert wird (Reuß, 2012). Die Ergebnisse dieser Studie konnten diese Ergebnisse bestätigen und zusätzlich zeigen, dass mit steigender Konzentration von externen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auch die Expression des Gens verstärkt abläuft. Das untermauert Reuß' Hypothese, dass dieses Protein an der Entgiftung von Peroxid beteiligt ist. Ein Mechanismus, über den - durch Peroxid gebildete - Disulfidbrücken mittels Thioredoxin aufgelöst werden können, ist bereits beschrieben (Carmel-Harel und Storz, 2000). Dies führt zwar nicht direkt zu einer

Entgiftung von Wasserstoffperoxid, jedoch können Schäden, die hierdurch verursacht werden, behoben werden. Da *M. pneumoniae* und auch *M. genitalium* Peroxid für ihre Virulenz benötigen, würde ein vollständiger Abbau dieses Stoffes zu einer verringerten Pathogenität führen (Miles *et al.*, 1996). Neben *trxA*, das für Thioredoxin kodiert, wird noch eine entsprechende Thioredoxinreduktase für die Reparatur von Peroxidschäden benötigt (Ben-Menachem *et al.*, 1997). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das entsprechende Gen (*trxB*) im Gegensatz zu *trxA* nicht wasserstoffperoxidabhängig exprimiert wird. Möglicherweise unterliegt dieses Gen keinerlei Regulation, da beispielsweise die Grundaktivität hoch genug ist, um auch bei hohen Peroxidkonzentrationen das Thioredoxin zu regenerieren.

#### 4.6 Charakterisierung weiterer *M. pneumoniae*-Stämme

*M. genitalium* kann Glukose zu  $H_2O_2$  umsetzen, der Laborstamm *M. pneumoniae* M129 ist dazu jedoch nicht in der Lage. Dies ist erstaunlich, da Homologe aller Gene von *M. genitalium* in *M. pneumoniae* konserviert sind (Herrmann und Reiner, 1998). Durch die Charakterisierung weiterer *M. pneumoniae* Stämme konnte gezeigt werden, dass dieser Phänotyp nicht nur auf *M. pneumoniae* zutrifft, sondern auch auf andere Stämme dieser Art. Die zuerst durchgeführten Wachstumsversuche mit den verschiedenen Stämmen demonstrieren, dass GPM100 (KI1) und der ATCC 15531 (FH-Stamm) ein ähnliches Wachstum zeigen wie der Laborwildtyp M129. Auffällig ist allerdings, dass GPM100 (KI1) scheinbar Glycerin ähnlich gut verwerten kann wie Glukose. Sowohl der FH-Stamm (ATCC 15531) als auch M129 weisen ein geringes Wachstum mit dieser C-Quelle auf. In vielen Bakterien ist Glukose die bevorzugte C-Quelle und kann besser verwertet werden als beispielsweise Glycerin (Deutscher, 2008; Görke und Stülke, 2008). Dies scheint in dem klinischen Isolat nicht der Fall zu sein. Da der Stamm bisher jedoch nicht sequenziert oder in vorherigen Studien untersucht wurde, lässt sich diese Beobachtung nicht näher erklären. Allerdings ist das Wachstum von M129 mit Glukose höher als bei GPM100 (KI1); dies kann ein Hinweis sein, dass Glukose immer noch die bevorzugte C-Quelle ist, jedoch schlechter genutzt wird, als es in M129 der Fall ist.

Das Wachstum von GPM101 (KI2) weicht von dem der anderen Stämme deutlich ab.



Zwar ist das Wachstum mit Glycerin vergleichbar mit allen anderen Stämmen, allerdings wächst dieses klinische Isolat deutlich besser. Für das verstärkte Wachstum könnte es mehrere mögliche Ursachen geben. Die erhöhte Wachstumsrate ließe sich sowohl durch einen verstärkten Ablauf metabolischer Prozesse (z.B. in der Glykolyse) als auch durch einen verbesserten Transport der C-Quelle in die Zelle erklären.

In den Peroxidmessungen verhalten sich sowohl der FH-Stamm (ATCC 15531) als auch GPM100 (KI1) wie M129. Keiner der Stämme weist eine Peroxidproduktion mit Glukose auf. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion mit dieser C-Quelle scheint nur in *M. genitalium* aufzutreten(siehe oben). Daraus lässt sich schließen, dass das vorhergesagte Enzym in *M. pneumoniae* nicht aktiv ist oder nur eine minimale Aktivität besitzt.

#### 4.7 Das Genom des klinischen Isolats 2

Vergleicht man die erhaltenen Sequenzen des GPM101-Stammes (KI2) mit bereits bekannten *M. pneumoniae* Genomen, so zeigt sich, dass dieser Stamm genetisch eine große Ähnlichkeit zu *M. pneumoniae* FH (ATCC 15531) besitzt. Während es über 1000 Unterschiede im Vergleich zu M129 gibt, sind es nur 26 Basen, die sich von der FH-Sequenz unterscheiden. Phylogenetisch ist das Isolat also näher mit dem FH-Laborstamm (ATCC 15531) verwandt als mit *M. pneumoniae* M129. Da keine vollständige Annotation erfolgte, kann keine Aussage über die veränderte Größe des Genoms gemacht werden. Es kann sich hierbei sowohl um Artefakte aufgrund von Sequenzwiederholungen im Genom handeln als auch um zusätzliche Gene, die nicht in den Referenzstämmen vorhanden sind. Im Folgenden wird also nur auf Unterschiede in Genen im Vergleich zu den Referenzstämmen *M. pneumoniae* FH (ATCC 15531) und *M. pneumoniae* M129 eingegangen (Krishnakumar *et al.*, 2010).

Die Sequenzierung zeigte eine Reihe interessanter Mutationen im Chromosom des klinischen Isolats. Viele dieser Mutationen befinden sich in Genen, deren Funktion nicht bekannt ist, daher kann keine Aussage über eine mögliche Veränderung der Struktur oder Funktion dieser Gene getroffen werden. Dies trifft auf Mutationen in *glpK*, *mpn200*, *mpn236* und *mpn262* zu. Interessanterweise befindet sich in *glpK* eine zweite Mutation, die einen Unterschied zu beiden Referenzstämmen bildet. Der Basenaustausch führt zu

einer Veränderung der Aminosäuresequenz an der Position 423. Ein Serin wird durch ein Phenylalanin ausgetauscht. Diese Position befindet sich in der Nähe des aktiven Zentrums des Enzyms bzw. der ATP-Bindestelle (*in silico* Daten, KEGG). GlpK ist sowohl in *M. genitalium* als auch in *M. pneumoniae* essentiell (Glass *et al.*, 2006; Lluch-Senar pers. Mitteilung; Juhas *et al.*, 2011). Wenn man das Modell der Glycerinverwertung betrachtet (siehe Einleitung), kann man davon ausgehen, dass GlpK nicht benötigt wird, wenn Glukose als C-Quelle vorhanden ist. Daher ist es möglich, dass GlpK eine weitere unbekannte „moonlighting“-Aktivität besitzt, die auch mit Glukose essentiell ist. Da der GPM101-Stamm (KI2) kein Peroxid mit Glycerin produziert, ist es sehr wahrscheinlich, dass dieser Phänotyp durch die Mutation in *glpK* hervorgerufen wird. Möglicherweise ist die Kinaseaktivität beeinträchtigt (Hames *et al.*, 2009), eine zweite, unbekannte und essentielle Funktion jedoch nicht. Es ist außer *glpK* kein Gen der Glycerinverwertung betroffen, daher ist diese Theorie wahrscheinlich, jedoch könnten auch Mutationen anderer Gene zu diesem Phänotyp führen.

GlpK ist jedoch nicht das einzige essentielle Gen, das von einer Mutation betroffen ist. Neben der Glycerinkinase sind auch *mpn213*, *mpn302* (*pfkA*) und *mpn395* (*apt*) mutiert. Die Funktion von *mpn213* ist nicht bekannt und es gibt kein Homolog in *B. subtilis*. Ähnliche Proteine gibt es nur in *M. genitalium* und *M. gallisepticum*, doch auch hier ist die Funktion nicht bekannt. Daher kann keine Aussage getroffen werden, ob diese Mutation einen Einfluss auf die Funktion des entsprechenden Proteins ausübt.

*Mpn302* kodiert für die Phosphofruktokinase, ein Enzym aus der Glykolyse (Ludwig *et al.*, 2001). In *B. subtilis* ist dieses Enzym nicht essentiell (Muñoz-Márquez und Ponce-Rivas, 2010), allerdings konnte das Gen in *M. genitalium* nicht ausgeschaltet werden (Glass *et al.*, 2005). Es ist also sehr wahrscheinlich, dass dieses Gen auch für *M. pneumoniae* essentiell ist, somit hätten die beiden Mutationen in *pfkA* keinen negativen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms. Allerdings zeigt GPM101 (KI2) ein deutlich besseres Wachstum mit Glukose als die beiden Referenzstämme *M. pneumoniae* M129 und *M. pneumoniae* FH (ATCC 15531). Die Mutationen könnten also einen positiven Effekt auf die Glukoseverwertung ausüben. Dabei ist jedoch zu beachten, dass eine gesteigerte Enzymaktivität nur zu einer besseren Verwertung führen würde, wenn die durch PfkA katalysierte Reaktion der limitierende Faktor in der Glykolyse ist. Außerdem müssten in diesem Fall die nachfolgenden glykolytischen Enzyme dazu in der Lage sein, die

verstärkte Produktion von Fruktose-1,6-Bisphosphat verarbeiten zu können. Es ist auch möglich, dass durch die Mutationen ein verbessertes „substrate-channeling“ erfolgt, da die Enzyme der Glykolyse miteinander interagieren (Malaisse *et al.*, 2004; Dutow *et al.*, 2010). Eine weitere Ursache für ein besseres Wachstum könnten die Mutationen in den Transportern Mpn113 und Mpn318 sein. Mpn113 ist als G3P-Transporter *in silico* annotiert worden, diese Funktion konnte jedoch experimentell nicht bestätigt werden (KEGG; Großhennig, 2011). Mpn318 ist als ein Aminosäuretransporter annotiert (*in silico* Daten, KEGG). Mutationen in diesen beiden Transportern könnten zu einer verbesserten Aufnahme von Nährstoffen dienen und dadurch zu einem verstärkten Wachstum führen. Das vierte essentielle Gen, das in GPM101 (KI2) eine Mutation trägt, ist *apt*. Die Adeninphospho-ribosyltransferase ist nicht essentiell in *B. subtilis* (Saxild und Nygaard, 1987). Es konnte jedoch auch für dieses Enzym gezeigt werden, dass es in *M. genitalium* essentiell ist (Glass *et al.*, 2006). Auch hier lässt sich ein Einfluss auf das Wachstum nicht ausschließen.

Ein weiteres betroffenes Gen ist *mpn528a*, hierbei handelt es sich um eine Rekombinase. Es ist nicht bekannt, ob GPM101 (KI2) homolog rekombinieren kann. Interessanterweise ist *M. pneumoniae* M129 nicht zur homologen Rekombination fähig, jedoch konnte nachgewiesen werden, dass *M. pneumoniae* FH (ATCC 15531) diesen Prozess durchführen kann (Estevão *et al.*, 2011; Krishnakumar *et al.*, 2010). Außerdem ist auch der nahe Verwandte *M. genitalium* in der Lage, homolog zu rekombinieren (Dhandayuthapani *et al.*, 1999). Es wurde bereits erkannt, dass die Funktion von RecU eine wichtige Rolle bei der Rekombination spielt und dass es Unterschiede zwischen den RecU-Proteinen aus *M. pneumoniae* und *M. genitalium* gibt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass RecU aus *M. pneumoniae* nicht funktional ist (Sluijter *et al.*, 2011). In weiteren Versuchen könnte man herausfinden, ob diese Mutation zu einem Verlust der homologen Rekombination geführt hat.

Ein weiterer interessanter Aspekt ist die verminderte Adhärenz des klinischen Isolats verglichen mit *M. pneumoniae* FH (ATCC 15531) und *M. pneumoniae* M129. Auch dieser Phänotyp lässt sich möglicherweise auf die nachgewiesenen Mutationen zurückführen. Hierfür könnte die Mutation in *mpn085* verantwortlich sein. Es handelt sich um ein Zytoadhärenzprotein (Himmelreich *et al.*, 1996). Die Mutation führt zu einer Verkürzung

des Proteins um 16 Aminosäuren, da der Basenaustausch innerhalb des Gens zum Einbau eines Stoppcodons führt (siehe Tabelle 3.1). Dadurch wird eine Transmembrandomäne geschädigt (*in silico* Daten, KEGG). Eine solche Schädigung könnte zu einer fehlerhaften Integration in die Membran führen, wodurch die Zytoadhärenz beeinträchtigt werden könnte. Dies ist jedoch nicht die einzige Mutation, die einen Einfluss auf diese Fähigkeit nehmen könnte. Besonders auffällig ist, dass sich die Zellen durch mechanischen Einfluss (Waschen mit Puffer und Erschütterungen) schnell von Zellkulturflaschen lösen. Mycoplasmen können - wie viele andere Bakterien auch - einen Biofilm ausbilden (Simmons und Dybvig, 2009; Chen *et al.*, 2012; Simmons *et al.*, 2013; Abee *et al.*, 2011). Die Ausbildung eines solchen Biofilms erhöht die Resistenz gegenüber Antibiotika und auch gegenüber der Immunantwort (Bolland *et al.*, 2012; Simmons und Dybvig, 2007). Für die Bildung von Biofilmen sind Exopolysaccharide mitverantwortlich (Daubenspeck *et al.*, 2009; Marvasi *et al.*, 2009). In *B. subtilis* sind die Gene *epsE* und *epsJ* an der Exopolysaccharidsynthese bzw. an der Biofilmbildung beteiligt (Guttenplan *et al.*, 2010; Nagorska *et al.*, 2010). In dem klinischen Isolat 2 sind die Homologe dieser beiden Proteine von Mutationen betroffen. Dies könnte einen Einfluss auf die Bildung des Biofilms haben. Eine Beeinträchtigung dieser Struktur könnte eine Schicht von Mycoplasmen an einer Oberfläche wie der von Zellkulturflaschen anfälliger gegenüber mechanischen Einflüssen machen. Ohne weitere Experimente lässt sich nicht folgern, ob die verringerte Zytoadhärenz durch die Mutation des Zytoadhäsins Mpn085 oder durch eine Störung der Biofilmbildung verursacht wird. Es lässt sich bisher auch nicht ausschließen, dass dieser Phänotyp durch ein Zusammenspiel aller drei Mutationen ausgelöst wird.

Die Funktion der weiteren Gene, die Mutationen tragen (siehe Tab.3.1), ist nicht bekannt. Daher kann man hier nicht über einen möglichen Einfluss der Mutationen auf die unterschiedlichen Phänotypen (Peroxidproduktion, Wachstum und Zytoadhärenz) - verglichen mit den Referenzstämmen - spekulieren. Potentiell kann natürlich jede dieser Mutationen einen Einfluss haben, da es sich sowohl um regulatorische Proteine als auch um Enzyme mit bisher unbekannter metabolischer Funktion handelt. Interessanterweise kommt es in mehreren Genen zu einer Verschiebung des Leserasters (*mpn037*, *mpn294*, und *mpn441*). Durch eine solche Mutation ändert sich die Aminosäuresequenz des Proteins und die Funktion geht dadurch mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit verloren.

Keines dieser Gene ist essentiell (Lluch-Senar, persönliche Mitteilung). Dieser Stamm zeigt durch natürliche Mutationen, dass es möglich ist, diese drei Gene parallel zu beschädigen, ohne dass das Wachstum dadurch negativ beeinflusst wird.

Neben den Mutationen innerhalb von Genen treten im klinischen Isolat auch Mutationen in intergenischen Bereichen auf. Es lässt sich nicht ausschließen, dass auch diese Mutationen einen Einfluss auf nicht annotierte Gene, kleine RNAs oder DNA-Strukturelemente haben. Hierbei ist zu beachten, dass sich fünf Mutationen innerhalb der sogenannten -35-Promotorregion verschiedener Gene befinden (siehe 3.7). Bakterielle Promotoren sind DNA-Sequenzen, über die die Transkription des nachfolgenden Gens reguliert werden kann. Dies kann beispielsweise über Bindung aktivierender oder reprimierender Proteine geschehen. Über sogenannte Regulons kann dabei die Transkription ganzer Gruppen von Genen beeinflusst werden (Zhang *et al.*, 2012). Dabei spielen zwei Regionen vor den Genen eine wichtige Rolle, die -10- und die -35-Region (Hawley und McClure, 1983; Ross *et al.*, 1993). Bei Mycoplasmen jedoch scheint die -35-Region eine untergeordnete Rolle zu spielen (Halbedel *et al.*, 2007). Ein Einfluss der Mutationen in diesen Regionen ließe sich nur durch weitere Analysen bestätigen oder verwerfen. Dies könnte beispielsweise über Slot-Blot-Analysen geschehen.

#### **4.8 Welche Rolle spielt Zyklisches-di-AMP in *M. pneumoniae* M129?**

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, handelt es sich bei c-di-AMP um einen wichtigen Botenstoff, der Einfluss auf verschiedene zelluläre Prozesse nehmen kann (Römling, 2008).

Die Ergebnisse der c-di-AMP-Messung zeigen, dass *M. pneumoniae* tatsächlich c-di-AMP *in vivo* produziert. Weiterhin konnte durch die Überexpression von *mpn244* nachgewiesen werden, dass das Produkt dieses Gens für die Synthese dieses Botenstoffs verantwortlich ist. Eine Abweichung des c-di-AMP-Spiegels konnte in der *mpn114*-Mutante (GPM95) nicht gezeigt werden. Es besteht also kein Zusammenhang zwischen der Acetyltransferase Mpn114 und der Produktion von c-di-AMP. Auf diese Weise konnte gezeigt werden, dass die Acetylierungen, die durch Mpn114 vermittelt werden,

keinen Einfluss auf die Produktion von c-di-AMP haben. Die *in vivo* Messungen zeigen außerdem, dass der intrazelluläre Spiegel an c-di-AMP in *M. pneumoniae* ähnlich hoch ist wie in dem nahen Verwandten *B. subtilis*. Die DAC CdaA hat eine ähnlich starke Aktivität wie Mpn244, die Aktivität von CdaS ist im Vergleich höher. Da CdaS in *B. subtilis* für die Sporulation benötigt wird, kann man davon ausgehen, dass Mpn244 eine ähnliche Funktion hat wie CdaA, dafür spricht auch die ähnliche Aktivität (Mehne *et al.*, 2013). In diesem Organismus spielt c-di-AMP eine essentielle Rolle, dies konnte auch für weitere Organismen gezeigt werden (Luo und Helmann, 2012; Corrigan *et al.*, 2011). Auch die einzige DAC Mpn244 in *M. pneumoniae* und das entsprechende Homolog MG105 aus *M. genitalium* sind essentiell (Glass *et al.*, 2006; Lluch-Senar, pers. Mitteilung). Die Zugabe von externem c-di-AMP führt in *M. pneumoniae* nicht zu einer erhöhten Wasserstoffperoxidproduktion und auch nicht zu einer verstärkten Zytotoxizität (siehe 3.9). Ein Einfluss auf diese Prozesse kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Es ist nicht bekannt, ob *M. pneumoniae* c-di-AMP aus der Umgebung aufnehmen kann, es kann also durchaus zu einem intrazellulären Einfluss des Botenstoffs kommen. Es ist außerdem möglich, dass eine Ausschüttung von c-di-AMP einen Einfluss auf die Immunantwort im Wirt nehmen kann. Eine solche Rolle konnte für c-di-AMP in Listerien gezeigt werden (Woodward *et al.*, 2010; Yamamoto *et al.*, 2012; Parvatiyar *et al.*, 2012). Für diese Studie wurden jedoch nicht HeLa-Zellen, sondern Makrophagen eingesetzt. In weiteren Versuchen könnte eine solche Rolle für c-di-AMP in Mycoplasmen untersucht werden (siehe unten). Jedoch sind weder die Peroxidproduktion noch die Verstärkung der Immunantwort essentiell für das Wachstum von *M. pneumoniae* unter Laborbedingungen, unter denen auch die essentiellen Gene bestimmt wurden (Glass *et al.*, 2006; Lluch-Senar, pers. Mitteilung). In *B. subtilis* konnte außerdem gezeigt werden, dass c-di-AMP an der Sporulation, dem Wachstum und auch an der Zellwandsynthese beteiligt ist (Mehne *et al.*, 2013; Oppenheimer-Shaanan *et al.*, 2011; Luo und Helmann, 2012). Da Mycoplasmen jedoch keine Zellwand besitzen und auch nicht sporulieren können, ist eine Rolle an diesen Prozessen ausgeschlossen.

In dieser Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass es unter Stressbedingungen nicht zu einer Veränderung des c-di-AMP-Spiegels kommt. Die DAC DisA aus *B. subtilis* dient der Erkennung von DNA-Schäden und ist somit an einem Reparaturmechanismus beteiligt (Oppenheimer-Shaanan *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu DisA besitzt Mpn244

keine DNA-Bindedomäne, wodurch eine Beteiligung an einem ähnlichen Reparaturmechanismus bereits unwahrscheinlich ist. Die Versuche dieser Arbeit bestätigen diese Vermutung und lassen den Schluss zu, dass c-di-AMP auch nicht an anderen Reparaturvorgängen beteiligt ist.

Diese Studie konnte nicht abschließend die Funktion des Botenstoffes für *M. pneumoniae* klären. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Mpn244 tatsächlich eine DAC-Funktion besitzt und dass *M. pneumoniae* auch *in vivo* c-di-AMP produziert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die externe Zugabe dieses Signalmoleküls keinen Einfluss auf den Pathomechanismus - bezüglich der Peroxidproduktion oder der Zytotoxizität gegenüber HeLa-Zellen - ausübt.

## 4.9 Ausblick

Diese Studie zeigt, dass es nicht möglich ist, mittels einer LFH Mutanten in *M. genitalium* zu erzeugen. Als Alternativen bleiben die Möglichkeiten, Mutanten über homologe Rekombination mittels plasmidischer DNA und die Unterbrechung von Genen mit Hilfe von Transposons zu nutzen.

In weiteren Experimenten könnte der Einfluss von PTS-Zuckern auf die Peroxidproduktion geklärt werden. Dazu könnten weitere Slot-Blot-Analysen mit Sonden gegen die verschiedenen Enzyme der Glyzerinverwertung durchgeführt werden. Microarray-Analysen könnten Aufschluss darüber geben, ob die Unterbrechung von *mpn114* auch Einflüsse auf die Expression weiterer Gene (außer *trxA*) hat. Außerdem könnten Doppelmutanten mit einem zweiten Transposon innerhalb der genutzten Mutanten erzeugt werden. Damit dies jedoch praktikabel ist, müsste ein System entwickelt werden, mit dem man nach Mutanten sucht, die auch mit Glukose und Glyzerin im Medium kein Peroxid mehr produzieren können.

Der GPM101-Stamm (KI2) könnte durch eine vollständige, elektronische Annotation näher charakterisiert werden. Durch Komplementation dieses Stammes mit WT *glpK* aus *M. pneumoniae* M129 könnte ein Einfluss der Mutation dieses Gens bestätigt werden. Außerdem könnte durch Transformation mit geeigneten Plasmiden untersucht werden, ob dieser Stamm homolog rekombinieren kann.

Um eindeutig zu zeigen, dass RecA nicht an der DNA-Reparatur beteiligt ist, könnten Vergleichsstudien z.B. mit *uvrA*-Mutanten durchgeführt werden. Mittels PCR-basierten Untersuchungen könnte eine Beteiligung von RecA an der Antigenvariation bestätigt werden (Burgos *et al.*, 2012).

Um eine Rolle von c-di-AMP in der Pathogenität von Mycoplasmen bestätigen zu können, könnte ein Modellsystem mit Makrophagen oder einer Zelllinie aus Lungenepithelzellen genutzt werden, da HeLa-Zellen möglicherweise ein ungeeignetes System für solche Experimente darstellen. Zusätzlich könnte der Überstand von Mycoplasma-Kulturen auf c-di-AMP untersucht und somit gezeigt werden, ob Mycoplasmen c-di-AMP sekretieren können.



## 5. Zusammenfassung

Die beiden Humanpathogene *M. genitalium* und *M. pneumoniae* nutzen als wichtigen Pathogenitätsfaktor die Produktion von reaktivem Wasserstoffperoxid. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Glycerin-3-Phosphat-Oxidase (GlpD) das Schlüsselenzym für die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und die Verbindung von Glycerin- und GPC-Stoffwechsel mit der Glykolyse ist.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss verschiedener C-Quellen auf die Peroxidproduktion untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Mutanten im Glycerinstoffwechselweg dazu in der Lage ist, Glycerin zu verwerten, jedoch nur bei Anwesenheit eines PTS-Zuckers. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass in *M. genitalium* neben GlpD ein weiteres Enzym vorhanden sein muss, welches mit Glukose Wasserstoffperoxid bilden kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Expression verschiedener Gene aus den peroxidproduzierenden Stoffwechselwegen sowohl von der C-Quelle als auch von anderen Enzymen dieser Reaktionsreihen abhängig ist.

Neben *M. genitalium* G37 und *M. pneumoniae* M129 wurde in dieser Studie ein klinisches Isolat näher charakterisiert. Auch dieser Stamm zeigte einen ungewöhnlichen Phänotyp bezüglich der Peroxidproduktion. Eine Analyse der Genomsequenz erwies eine Reihe Mutationen im Vergleich zu einem weiteren Referenzstamm *M. pneumoniae* FH (ATCC 15531), die möglicherweise für diesen Phänotyp verantwortlich sind.

In weiteren Experimenten konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Mpn244 Diadenylatzyklaseaktivität aufweist und der durch dieses Enzym produzierte Botenstoff c-di-AMP auch *in vivo* in *M. pneumoniae* M129 vorkommt. Die genaue Funktion von c-di-AMP muss jedoch in weiteren Studien genauer charakterisiert werden.

## 6. Literaturverzeichnis

**Abee, T.; Kovács, A. T.; Kuipers, O. P. & van der Veen, S. (2011):** Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **22**, 172-179.

**Adan-Kubo, J.; hei Yoshii, S.; Kono, H. & Miyata, M. (2012):** Molecular structure of isolated Mvspl, a variable surface protein of the fish pathogen *Mycoplasma mobile*. *J Bacteriol* **194**, 3050-3057.

**Adkins, I.; Holubova, J.; Kosova, M. & Sadilkova, L. (2012):** Bacteria and their toxins tamed for immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol* **13**, 1446-1473.

**Ayora, S.; Carrasco, B.; Cárdenas, P. P.; César, C. E.; Cañas, C.; et al. (2011):** Double-strand break repair in bacteria: a view from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 1055-1081.

**Baseman, J. B. (1993):** The cytoadhesins of *Mycoplasma pneumoniae* and *M. genitalium*. *Subcell Biochem* **20**, 243-259.

**Ben-Menachem, G.; Himmelreich, R.; Herrmann, R.; Aharonowitz, Y. & Rottem, S. (1997):** The thioredoxin reductase system of mycoplasmas. *Microbiology* **143**, 1933-1940.

**Bieber, L. L. (1988):** Carnitine. *Annu Rev Biochem* **57**, 261-283.

**Bischof, D. F.; Janis, C.; Vilei, E. M.; Bertoni, G. & Frey, J. (2008):** Cytotoxicity of *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* small colony type to bovine epithelial cells. *Infect Immun* **76**, 263-269.

**Blanchard, A. & Bébéar, C. (2011):** The evolution of *Mycoplasma genitalium*. *Ann N Y Acad Sci* **1230**, E61-E64.

**Bolland, J. R.; Simmons, W. L.; Daubenspeck, J. M. & Dybvig, K. (2012):** Mycoplasma polysaccharide protects against complement. *Microbiology* **158**, 1867-1873.

**Bolm, M.; Jansen, W. T. M.; Schnabel, R. & Chhatwal, G. S. (2004):** Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans*: a common feature of different streptococcal species. *Infect Immun* **72**, 1192-1194.

**Bové, J. M.; Renaudin, J.; Saillard, C.; Foissac, X. & Garnier, M. (2003):** *Spiroplasma citri*, a plant pathogenic mollicute: relationships with its two hosts, the plant and the leafhopper vector. *Annu Rev Phytopathol* **41**, 483-500.

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

**Beres, L. & Lucas-Lenard, J. (1975),** Studies on the in vitro synthesis of ppGpp and pppGpp. *Biochim Biophys Acta* **395**, 80-90.

**Bremer, J. (1963):** Carnitine in intermediary metabolism. The biosynthesis of palmitylcarnitine by cell fractions. *J Biol Chem* **238**, 2774-2779.

**Brown, D. R.; Farmerie, W. G.; May, M.; Benders, G. A.; Durkin, A. S.; Hlavinka, K.; et al. (2011):** Genome sequences of *Mycoplasma alligatoris* A21JP2T and *Mycoplasma crocodyli* MP145T. *J Bacteriol* **193**, 2892-2893.

**Burgos, R.; Wood, G. E.; Young, L.; Glass, J. I. & Totten, P. A. (2012):** RecA mediates MgpB and MgpC phase and antigenic variation in *Mycoplasma genitalium*, but plays a minor role in DNA repair. *Mol Microbiol* **85**, 669-683.

**Calo, D.; Kaminski, L. & Eichler, J. (2010):** Protein glycosylation in Archaea: sweet and extreme. *Glycobiology* **20**, 1065-1076.

**Cao, M.; Kobel, P. A.; Morshedi, M. M.; Wu, M. F. W.; Paddon, C. & Helmann, J. D. (2002):** Defining the *Bacillus subtilis* sigma(W) regulon: a comparative analysis of promoter consensus search, run-off transcription/microarray analysis (ROMA), and transcriptional profiling approaches. *J Mol Biol* **316**, 443-457.

**Carmel-Harel, O. & Storz, G. (2000):** Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annu Rev Microbiol* **54**, 439-461.

**Carstensen, E. L.; Maniloff, J. & Einolf, C. W. (1971):** Electrical properties and ultrastructure of *Mycoplasma* membranes. *Biophys J* **11**, 572-581.

**Carvalho, F. M.; Fonseca, M. M.; Medeiros, S. B. D.; Scortecci, K. C.; Blaha, C. A. G. & Agnez-Lima, L. F. (2005):** DNA repair in reduced genome: the *Mycoplasma* model. *Gene* **360**, 111-119.

**Catrein, I.; Herrmann, R.; Bosserhoff, A. & Ruppert, T. (2005):** Experimental proof for a signal peptidase I like activity in *Mycoplasma pneumoniae*, but absence of a gene encoding a conserved bacterial type I SPase. *FEBS J* **272**, 2892-2900.

**Chang, L.-J.; Chen, W.-H.; Minion, F. C. & Shiuan, D. (2008):** Mycoplasmas regulate the expression of heat-shock protein genes through CIRCE-HrcA interactions. *Biochem Biophys Res Commun* **367**, 213-218.

**Chen, H.; Yu, S.; Hu, M.; Han, X.; Chen, D.; Qiu, X. & Ding, C. (2012):** Identification of biofilm formation by *Mycoplasma gallisepticum*. *Vet Microbiol* **161**, 96-103.

**Chen, S. (2012):** Clinical uses of botulinum neurotoxins: current indications, limitations and future developments. *Toxins (Basel)* **4**, 913-939.

**Chen, Z.; Yang, H. & Pavletich, N. P. (2008):** Mechanism of homologous recombination from the RecA-ssDNA/dsDNA structures. *Nature* **453**(7194), 489-484.

**Chua, S. L.; Tan, S. Y.-Y.; Rybtke, M. T.; Chen, Y.; Rice, S. A.; et al. (2013):** C-di-GMP regulates antimicrobial peptide resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*.

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

**Corrigan, R. M.; Abbott, J. C.; Burhenne, H.; Kaefer, V. & Gründling, A. (2011):** c-di-AMP is a new second messenger in *Staphylococcus aureus* with a role in controlling cell size and envelope stress. *PLoS Pathog* **7**, e1002217.

**Cox, M. M. (1999):** Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **63**, 311-366.

**Dahl, M. K. (2002):** CcpA-independent carbon catabolite repression in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 315-321.

**Dallo, S. F.; Kannan, T. R.; Blaylock, M. W. & Baseman, J. B. (2002):** Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **46**, 1041-1051.

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

**Daubenspeck, J. M.; Bolland, J. R.; Luo, W.; Simmons, W. L. & Dybvig, K. (2009):** Identification of exopolysaccharide-deficient mutants of *Mycoplasma pulmonis*. *Mol Microbiol* **72**, 1235-1245.

**Denapoli, J.; Tehranchi, A. K. & Wang, J. D. (2013),** Dose-dependent reduction of replication elongation rate by (p)ppGpp in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*., *Mol Microbiol*.

**Deutscher, J. (2008):** The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **11**, 87-93.

**Dhandayuthapani, S.; Rasmussen, W. G. & Baseman, J. B. (1999):** Disruption of gene *mg218* of *Mycoplasma genitalium* through homologous recombination leads to an adherence-deficient phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5227-5232.

**Ding, H.; Yip, C. B.; Geddes, B. A.; Oresnik, I. J. & Hynes, M. F. (2012):** Glycerol utilization by *Rhizobium leguminosarum* requires an ABC transporter and affects competition for nodulation. *Microbiology* **158**, 1369-1378.

**Diethmaier, C (2011):** Die Rolle von YmdB als Regulator der Zelldifferenzierung in *B. subtilis*

**Dumke, R.; Catrein, I.; Herrmann, R. & Jacobs, E. (2004):** Preference, adaptation and survival of *Mycoplasma pneumoniae* subtypes in an animal model. *Int J Med Microbiol* **294**, 149-155.

**Dutow, P.; Schmidl, S. R.; Ridderbusch, M. & Stülke, J. (2010):** Interactions between glycolytic enzymes of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **19**, 134-139.

**Estevão, S.; Sluijter, M.; Hartwig, N. G.; van Rossum, A. M. C. & Vink, C. (2011):** Functional characterization of the RuvB homologs from *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *J Bacteriol* **193**, 6425-6435.

**Fadiel, A.; Eichenbaum, K. D.; Searny, N. E. & Epperson, B. (2007):** Mycoplasma genomics: tailoring the genome for minimal life requirements through reductive evolution. *Front Biosci* **12**, 2020-2028.

**Feldner, J.; Göbel, U. & Bredt, W. (1982):** *Mycoplasma pneumoniae* adhesin localized to tip structure by monoclonal antibody. *Nature* **298**, 765-767.

**Fraser, C. M.; Gocayne, J. D.; White, O.; Adams, M. D.; Clayton, R. A.; et al. (1995):** The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**(5235), 397-403.

**Fritz, I. B. & Yue, K. T. (1963):** Long-chain carnitine acetyltransferase and the role of acylcarnitine derivatives in the catalytic increase of fatty acid oxidation induced by. *J Lipid Res* **4**, 279-288.

**Fujita, Y. (2009):** Carbon catabolite control of the metabolic network in *Bacillus subtilis*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 245-259.

**Furukawa, K.; Gu, H.; Sudarsan, N.; Hayakawa, Y.; Hyodo, M. & Breaker, R. R. (2012):** Identification of ligand analogues that control c-di-GMP riboswitches. *ACS Chem Biol* **7**, 1436-1443.

**Gancedo, J. M. (2013),** Biological roles of cAMP: variations on a theme in the different kingdoms of life, *Biol Rev Camb Philos Soc*.

**Garren, D. M.; Harrison, M. A. & Russell, S. M. (1998):** Acid tolerance and acid shock response of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates provide cross protection to sodium lactate and sodium chloride. *J Food Prot* **61**, 158-161.

**Gasparich, G. E. (2010):** *Spiroplasmas* and *phytoplasmas*: microbes associated with plant hosts. *Biologicals* **38**(2), 193-203.

**Geiger, T.; Goerke, C.; Fritz, M.; Schäfer, T.; Ohlsen, et al. (2010),** Role of the (p)ppGpp synthase RSH, a RelA/SpoT homolog, in stringent response and virulence of *Staphylococcus aureus*, *Infect Immun* **78**, 1873-1883.

**Glass, J. I.; Assad-Garcia, N.; Alperovich, N.; Yooseph, S.; Lewis, M. R.; et al. (2006):** Essential genes of a minimal bacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(2), 425-430.

**Gomelsky, M. (2011):** cAMP, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: bacteria use them all!, *Mol Microbiol* **79**, 562-565.

**Großhennig, S. (2011):** Implication of transport systems in *Mycoplasma pneumoniae* pathogenicity.

**Großhennig, S.; Schmidl, S. R.; Schmeisky, A. G.; Busse, J. & Stülke, J. (2013):** Glycerol and Phospholipid Transporters in *Mycoplasma pneumoniae*: Implication in Growth and Virulence. *Infect Immun*.

**Gupta, N.; Tanner, S.; Jaitly, N.; Adkins, J. N.; Lipton, M.; et al. (2007):** Whole proteome analysis of post-translational modifications: applications of mass-spectrometry for proteogenomic annotation. *Genome Res* **17**, 1362-1377.

**Guttenplan, S. B.; Blair, K. M. & Kearns, D. B. (2010):** The EpsE flagellar clutch is bifunctional and synergizes with EPS biosynthesis to promote *Bacillus subtilis* biofilm formation. *PLoS Genet* **6**, e1001243.

**Görke, B. & Stülke, J. (2008):** Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* **6**, 613-624.

**Güell, M.; van Noort, V.; Yus, E.; Chen, W.-H.; Leigh-Bell, J.; et al. (2009):** Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. *Science* **326**, 1268-1271.

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

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

**Halbedel, S.; Hames, C. & Stülke, J. (2007):** Regulation of carbon metabolism in the mollicutes and its relation to virulence. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**, 147-154.

**Halbedel, S. & Stülke, J. (2007):** Tools for the genetic analysis of *Mycoplasma*. *Int J Med Microbiol* **297**, 37-44.

**Hames, C. (2008):** Glycerolmetabolismus und Pathogenität von *Mycoplasma pneumoniae*

**Hames, C.; Halbedel, S.; Hoppert, M.; Frey, J. & Stülke, J. (2009):** Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Bacteriol* **191**, 747-753.

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

**Hawley, D. K. & McClure, W. R. (1983):** Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **11**, 2237-2255.

**Herrmann, R. & Reiner, B. (1998):** *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*: a comparison of two closely related bacterial species. *Curr Opin Microbiol* **1**, 572-579.

**Higgins, D. & Dworkin, J. (2012):** Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. *FEMS Microbiol Rev* **36**, 131-148.

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

**Hinnebusch, B. J. (2012):** Biofilm-dependent and biofilm-independent mechanisms of transmission of *Yersinia pestis* by fleas. *Adv Exp Med Biol* **954**, 237-243.

**Hoffmann, T. & Bremer, E. (2011):** Protection of *Bacillus subtilis* against cold stress via compatible-solute acquisition. *J Bacteriol* **193**, 1552-1562.

**de Hoogt, R.; Luyten, W. H.; Contreras, R. & Backer, M. D. D. (2000):** PCR- and ligation-mediated synthesis of split-marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruption in *Candida albicans*. *Biotechniques* **28**, 1112-1116.

**Hu, L. I.; Lima, B. P. & Wolfe, A. J. (2010):** Bacterial protein acetylation: the dawning of a new age. *Mol Microbiol* **77**, 15-21.

**Huang, X.; Holden, H. M. & Raushel, F. M. (2001):** Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* **70**, 149-180.

**Iastrebova, O. V.; Malinovs'ka, L. P. & Korobkova, K. S. (2010):** [Effect of wheat germ agglutinin on *acholeplasma*-the pathogen of phytomycomplasmosis]. *Mikrobiol Z* **72**, 43-45.

**Ismail, I. I. & Nochal, T. H. (1970):** [Thermotolerant bacteria. 1. Adaptation behavior of *Bacillus subtilis* by rising temperature]. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg* **124**, 355-359.

**Jang, J. Y.; Rhee, J. Y.; Chung, G. C. & Kang, H. (2012):** Aquaporin as a membrane transporter of hydrogen peroxide in plant response to stresses. *Plant Signal Behav* **7**, 1180-1181.



**Janion, C. (2008):** Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int J Biol Sci* **4**, 338-344.

**Jansen, W. T. M.; Bolm, M.; Balling, R.; Chhatwal, G. S. & Schnabel, R. (2002):** Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans* by *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **70**, 5202-5207.

**Jervis, A. J.; Thackray, P. D.; Houston, C. W.; Horsburgh, M. J. & Moir, A. (2007):** SigM-responsive genes of *Bacillus subtilis* and their promoters. *J Bacteriol* **189**, 4534-4538.

**Jones, B. D. & Falkow, S. (1996):** Salmonellosis: host immune responses and bacterial virulence determinants. *Annu Rev Immunol* **14**, 533-561.

**Juhas, M.; Eberl, L. & Glass, J. I. (2011):** Essence of life: essential genes of minimal genomes. *Trends Cell Biol* **21**, 562-568.

**Kalia, D.; Merey, G.; Nakayama, S.; Zheng, Y.; Zhou, J.; et al. (2013):** Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem Soc Rev* **42**, 305-341.

**Kelkar, Y. D. & Ochman, H. (2013):** Genome reduction promotes increase in protein functional complexity in bacteria. *Genetics* **193**, 303-307.

**Kenri, T.; Horino, A.; Matsui, M.; Sasaki, Y.; Suzuki, S.; et al. (2012):** Complete genome sequence of *Mycoplasma pneumoniae* type 2a strain 309, isolated in Japan. *J Bacteriol* **194**, 1253-1254.

**Khan, L. A.; Miles, R. J. & Nicholas, R. A. J. (2005):** Hydrogen peroxide production by *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* and effect of in vitro passage on a *Mycoplasma bovis* strain producing high levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Vet Res Commun* **29**, 181-188.

**Kim, J. N.; Roth, A. & Breaker, R. R. (2007):** Guanine riboswitch variants from *Mesoplasma florum* selectively recognize 2'-deoxyguanosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16092-16097.

**Kleven, S. H. (2008):** Control of avian *mycoplasma* infections in commercial poultry. *Avian Dis* **52**, 367-374.

**Knudson, D. L. & MacLeod, R. (1970):** *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma salivarium*: electron microscopy of colony growth in agar. *J Bacteriol* **101**, 609-617.

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

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

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

**Krawchuk, M. D. & Wahls, W. P. (1999):** High-efficiency gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe* using a modular, PCR-based approach with long tracts of flanking homology. *Yeast* **15**, 1419-1427.

**Krishnakumar, R.; Assad-Garcia, N.; Benders, G. A.; Phan, Q.; Montague, M. G. & Glass, J. I. (2010):** Targeted chromosomal knockouts in *Mycoplasma pneumoniae*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 5297-5299.

**Kroos, L. & Yu, Y. T. (2000):** Regulation of sigma factor activity during *Bacillus subtilis* development. *Curr Opin Microbiol* **3**, 553-560.

**Kroos, L.; Zhang, B.; Ichikawa, H. & Yu, Y. T. (1999):** Control of sigma factor activity during *Bacillus subtilis* sporulation. *Mol Microbiol* **31**, 1285-1294.

**Kube, M.; Schneider, B.; Kuhl, H.; Dandekar, T.; Heitmann, et al. (2008):** The linear chromosome of the plant-pathogenic mycoplasma '*Candidatus Phytoplasma mali*'. *BMC Genomics* **9**, 306.

**Kühner, S.; van Noort, V.; Betts, M. J.; Leo-Macias, A.; Batisse, C.; et al. (2009):** Proteome organization in a genome-reduced bacterium. *Science* **326**, 1235-1240.

**Laemmli, U. K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259), 680-685.

**Lee, D. J.; Minchin, S. D. & Busby, S. J. W. (2012):** Activating transcription in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **66**, 125-152.

**Li, M.; Pradhan, A.; Wang, W. & Li, Y. (2013):** Prediction of *Listeria innocua* survival in fully cooked chicken breast products during postpackage thermal treatment. *Poult Sci* **92**, 827-835.

**Lind, K. (1982):** Serological cross-reactions between "*Mycoplasma genitalium*" and *M. pneumoniae*. *Lancet* **2**(8308), 1158-1159.

**Linder, J. U. (2010),** cGMP production in bacteria, *Mol Cell Biochem* **334**, 215-219.

**Liu, W.; Fang, L.; Li, M.; Li, S.; Guo, S.; et al. (2012):** Comparative genomics of *Mycoplasma*: analysis of conserved essential genes and diversity of the pan-genome. *PLoS One* **7**(4), e35698.

**Lluch-Senar, M.; Luong, K.; Lloréns-Rico, V.; Delgado, J.; Fang, G.; et al. (2013):** Comprehensive Methylome Characterization of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae* at Single-Base Resolution. *PLoS Genet* **9**(1), e1003191.

**Ludwig, H.; Homuth, G.; Schmalisch, M.; Dyka, F. M.; Hecker, M. & Stülke, J. (2001):** Transcription of glycolytic genes and operons in *Bacillus subtilis*: evidence for the presence of multiple levels of control of the *gapA* operon. *Mol Microbiol* **41**, 409-422.

**Luo, Y. & Helmann, J. D. (2012):** Analysis of the role of *Bacillus subtilis*  $\sigma$ (M) in  $\beta$ -lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis. *Mol Microbiol* **83**, 623-639.

**Ma, L.; Jensen, J. S.; Myers, L.; Burnett, J.; Welch, M; et al. (2007):** *Mycoplasma genitalium*: an efficient strategy to generate genetic variation from a minimal genome. *Mol Microbiol* **66**, 220-236.

**Malaisse, W. J.; Zhang, Y. & Sener, A. (2004):** Enzyme-to-enzyme channeling in the early steps of glycolysis in rat pancreatic islets. *Endocrine* **24**, 105-109.

**Marvasi, M.; Visscher, P. T. & Martinez, L. C. (2010):** Exopolymeric substances (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis. *FEMS Microbiol Lett* **313**, 1-9.

**Medina, J. L.; Coalson, J. J.; Brooks, E. G.; Winter, V. T.; Chaparro, A.; et al. (2012):** *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin induces pulmonary eosinophilic and lymphocytic inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **46**, 815-822.

**Mehne, F. M. P.; Gunka, K.; Eilers, H.; Herzberg, C.; Kaefer, V. & Stülke, J. (2013):** Cyclic Di-AMP Homeostasis in *Bacillus subtilis*: Both lack and high level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell. *J Biol Chem* **288**, 2004-2017.

**Merzbacher, M.; Detsch, C.; Hillen, W. & Stülke, J. (2004):** *Mycoplasma pneumoniae* HPr kinase/phosphorylase. *Eur J Biochem* **271**, 367-374.

**Meyer, F. M.; Gerwig, J.; Hammer, E.; Herzberg, C.; Commichau, F. M.; Völker, U. & Stülke, J. (2011):** Physical interactions between tricarboxylic acid cycle enzymes in *Bacillus subtilis*: evidence for a metabolon. *Metab Eng* **13**, 18-27.

**Meyer, F. M. & Stülke, J. (2013):** Malate metabolism in *Bacillus subtilis*: distinct roles for three classes of malate-oxidizing enzymes. *FEMS Microbiol Lett* **339**, 17-22.

**Miles, R. J.; Taylor, R. R. & Varsani, H. (1991):** Oxygen uptake and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by fermentative *Mycoplasma* spp. *J Med Microbiol* **34**, 219-223.

**Miyata, M. (2008):** Centipede and inchworm models to explain *Mycoplasma* gliding. *Trends Microbiol* **16**, 6-12.

**Moy, T. I.; Mylonakis, E.; Calderwood, S. B. & Ausubel, F. M. (2004):** Cytotoxicity of hydrogen peroxide produced by *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* **72**, 4512-4520.

**Muñoz-Márquez, M.-E. & Ponce-Rivas, E. (2010):** Effect of *pfkA* chromosomal interruption on growth, sporulation, and production of organic acids in *Bacillus subtilis*. *J Basic Microbiol* **50**, 232-240.

**Nagorska, K.; Ostrowski, A.; Hinc, K.; Holland, I. B. & Obuchowski, M. (2010):** Importance of *eps* genes from *Bacillus subtilis* in biofilm formation and swarming. *J Appl Genet* **51**, 369-381.

**van Noort, V.; Seebacher, J.; Bader, S.; Mohammed, S.; Vonkova, I.; Betts, M. J.; Kühner, S.; Kumar, R.; Maier, T.; O'Flaherty, M.; Rybin, V.; Schmeisky, A.; Yus, E.; Stülke, J.; Serrano, L.; Russell, R. B.; Heck, A. J. R.; Bork, P. & Gavin, A.-C. (2012):** Cross-talk between phosphorylation and lysine acetylation in a genome-reduced bacterium. *Mol Syst Biol* **8**, 571.

**Oppenheimer-Shaanan, Y.; Wexselblatt, E.; Katzhendler, J.; Yavin, E. & Ben-Yehuda, S. (2011):** c-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*. *EMBO Rep* **12**, 594-601.

**Parvatiyar, K.; Zhang, Z.; Teles, R. M.; Ouyang, S.; Jiang, Y.; et al. (2012):** The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nat Immunol* **13**, 1155-1161.

**Pich, O. Q.; Burgos, R.; Planell, R.; Querol, E. & Piñol, J. (2006):** Comparative analysis of antibiotic resistance gene markers in *Mycoplasma genitalium*: application to studies of the minimal gene complement. *Microbiology* **152**, 519-527.

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

**Pyrowolakis, G.; Hofmann, D. & Herrmann, R. (1998):** The subunit b of the FOF1-type ATPase of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* is a lipoprotein. *J Biol Chem* **273**, 24792-24796.

**Razin, S. & Knight, B. C. (1960):** A partially defined medium for the growth of *Mycoplasma*. *J Gen Microbiol* **22**, 492-503.

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

**Redfield, R. J.; Cameron, A. D. S.; Qian, Q.; Hinds, J.; Ali, T. R.; et al. (2005):** A novel CRP-dependent regulon controls expression of competence genes in *Haemophilus influenzae*. *J Mol Biol* **347**, 735-747.

**Relich, R. F. & Balish, M. F. (2011):** Insights into the function of *Mycoplasma pneumoniae* protein P30 from orthologous gene replacement. *Microbiology* **157**, 2862-2870.

**Reuß, D. (2012):** Hydrogen peroxide formation in *M. genitalium*

**Rojo, F. (2010):** Carbon catabolite repression in *Pseudomonas* : optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 658-684.

**Ross, W.; Gosink, K. K.; Salomon, J.; Igarashi, K.; Zou, C.; Ishihama, A.; et al. (1993):** A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* **262**, 1407-1413.

**Roth, A. & Breaker, R. R. (2009):** The structural and functional diversity of metabolite-binding riboswitches. *Annu Rev Biochem* **78**, 305-334.

**Römling, U. (2008):** Great times for small molecules: c-di-AMP, a second messenger candidate in Bacteria and Archaea. *Sci Signal* **1**, pe39.

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

**Sanchez, H.; Kidane, D.; Reed, P.; Curtis, F. A.; Cozar, M. C.; et al. (2005):** The RuvAB branch migration translocase and RecU Holliday junction resolvase are required for double-stranded DNA break repair in *Bacillus subtilis*. *Genetics* **171**, 873-883.

**Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1992):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* **24**, 104-108.

**Sasaki, Y.; Ishikawa, J.; Yamashita, A.; Oshima, K.; Kenri, T.; et al. (2002):** The complete genomic sequence of *Mycoplasma penetrans*, an intracellular bacterial pathogen in humans. *Nucleic Acids Res* **30**, 5293-5300.

**Saxild, H. H. & Nygaard, P. (1987):** Genetic and physiological characterization of *Bacillus subtilis* mutants resistant to purine analogs. *J Bacteriol* **169**, 2977-2983.

**Schmidl, S. R.; Gronau, K.; Pietack, N.; Hecker, M.; Becher, D. & Stülke, J. (2010):** The phosphoproteome of the minimal bacterium *Mycoplasma pneumoniae*: analysis of the complete known Ser/Thr kinome suggests the existence of novel kinases. *Mol Cell Proteomics* **9**, 1228-1242.

**Schmidl, S. R.; Otto, A.; Lluch-Senar, M.; Piñol, J.; Busse, J.; Becher, D. & Stülke, J. (2011):** A trigger enzyme in *Mycoplasma pneumoniae*: impact of the glycerophosphodiesterase GlpQ on virulence and gene expression. *PLoS Pathog*, e1002263.

**Seto, S.; Murata, S. & Miyata, M. (1997):** Characterization of *dnaA* gene expression in *Mycoplasma capricolum*. *FEMS Microbiol Lett* **150**, 239-247.

**Sharma, V.; Sakai, Y.; Smythe, K. A. & Yokobayashi, Y. (2013):** Knockdown of *recA* gene expression by artificial small RNAs in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **430**, 256-259.

**Shimada, T.; Fujita, N.; Yamamoto, K. & Ishihama, A. (2011),** Novel roles of cAMP receptor protein (CRP) in regulation of transport and metabolism of carbon sources., *PLoS One* **6**, e20081.

**Short, J. M.; Fernandez, J. M.; Sorge, J. A. & Huse, W. D. (1988):** Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res* **16**, 7583-7600.

**Simmons, W. L.; Daubenspeck, J. M.; Osborne, J. D.; Balish, M. F.; et al. (2013):** Type 1 and Type 2 Strains of *Mycoplasma pneumoniae* Form Different Biofilms. *Microbiology*.

**Simmons, W. L. & Dybvig, K. (2009):** Mycoplasma biofilms ex vivo and in vivo. *FEMS Microbiol Lett* **295**, 77-81.

**Simmons, W. L. & Dybvig, K. (2007):** Biofilms protect *Mycoplasma pulmonis* cells from lytic effects of complement and gramicidin. *Infect Immun* **75**, 3696-3699.

**Sisti, F.; Ha, D.-G.; O'Toole, G. A.; Hozbor, D. F. & Fernandez, J. (2013),** Cyclic-di-GMP signaling regulates motility and biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*, *Microbiology*.

**Sluijter, M.; Estevão, S.; Hoogenboezem, T.; Hartwig, N. G.; van Rossum, A. M. C. & Vink, C. (2012):** The RuvA homologues from *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae* exhibit unique functional characteristics. *PLoS One* **7**, e38301.

**Sluijter, M.; Hoogenboezem, T.; Hartwig, N. G. & Vink, C. (2008):** The *Mycoplasma pneumoniae* MPN229 gene encodes a protein that selectively binds single-stranded DNA and stimulates Recombinase A-mediated DNA strand exchange. *BMC Microbiol* **8**, 167.

**Sluijter, M.; Kaptein, E.; Spuesens, E. B. M.; Hoogenboezem, T.; Hartwig, N. G.; et al. (2010):** The *Mycoplasma genitalium* MG352-encoded protein is a Holliday junction resolvase that has a non-functional orthologue in *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* **77**, 1261-1277.

**Sluijter, M.; Spuesens, E. B. M.; Hartwig, N. G.; van Rossum, A. M. C. & Vink, C. (2009):** The *Mycoplasma pneumoniae* MPN490 and *Mycoplasma genitalium* MG339 genes encode reca homologs that promote homologous DNA strand exchange. *Infect Immun* **77**, 4905-4911.

**Somarajan, S. R.; Kannan, T. R. & Baseman, J. B. (2010):** *Mycoplasma pneumoniae* Mpn133 is a cytotoxic nuclease with a glutamic acid-, lysine- and serine-rich region essential for binding and internalization but not enzymatic activity. *Cell Microbiol* **12**, 1821-1831.

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

- Soufi, B.; Soares, N. C.; Ravikumar, V. & Macek, B. (2012):** Proteomics reveals evidence of cross-talk between protein modifications in bacteria: focus on acetylation and phosphorylation. *Curr Opin Microbiol* **15**, 357-363.
- Spangler, C.; Böhm, A.; Jenal, U.; Seifert, R. & Kaever, V. (2010):** A liquid chromatography-coupled tandem mass spectrometry method for quantitation of cyclic di-guanosine monophosphate. *J Microbiol Methods* **81**, 226-231.
- Spuesens, E. B. M.; van de Kreeke, N.; Estevão, S.; Hoogenboezem, T.; Sluiter, M.; et al. (2011):** Variation in a surface-exposed region of the *Mycoplasma pneumoniae* P40 protein as a consequence of homologous DNA recombination between RepMP5 elements. *Microbiology* **157**(Pt 2), 473-483.
- Stanbridge, E. J.; Hayflick, L. & Perkins, F. T. (1971):** Modification of amino-acid concentrations induced by mycoplasmas in cell culture medium. *Nat New Biol* **232**, 242-244.
- Stülke, J. (2002):** Control of transcription termination in bacteria by RNA-binding proteins that modulate RNA structures. *Arch Microbiol* **177**, 433-440.
- Su, H.-C.; Hutchison, C. A. & Giddings, M. C. (2007):** Mapping phosphoproteins in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. *BMC Microbiol* **7**, 63.
- Sun, L.; Wu, J.; Du, F.; Chen, X. & Chen, Z. J. (2012):** Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science*.
- Suzaki, K. (1979):** Resistance of *Mycoplasma pneumoniae* to macrolide and analogous antibiotics. *Sci Rep Res Inst Tohoku Univ Med* **26**, 71-91.
- Taheri, F.; Nematzadeh, G.; Zamharir, M. G.; Nekouei, M. K.; Naghavi, M.; et al. (2011):** Proteomic analysis of the Mexican lime tree response to "*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*" infection. *Mol Biosyst* **7**, 3028-3035.
- Thao, S. & Escalante-Semerena, J. C. (2011):** Control of protein function by reversible N $\epsilon$ -lysine acetylation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **14**, 200-204.
- Thomas, C.; Jacobs, E. & Dumke, R. (2013):** Characterization of pyruvate dehydrogenase subunit B and enolase as plasminogen-binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiology* **159**, 352-365.



**Thompson, C. C.; Vieira, N. M.; Vicente, A. C. P. & Thompson, F. L. (2011):** Towards a genome based taxonomy of Mycoplasmas. *Infect Genet Evol* **11**, 1798-1804.

**Truglio, J. J.; Croteau, D. L.; Houten, B. V. & Kisker, C. (2006):** Prokaryotic nucleotide excision repair: the UvrABC system. *Chem Rev* **106**, 233-252.

**Wach, A. (1996):** PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast* **12**, 259-265.

**Waites, K. B. & Talkington, D. F. (2004):** *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* **17**, 697-728, table of contents.

**Warner, J. B. & Lolkema, J. S. (2003):** CcpA-dependent carbon catabolite repression in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 475-490.

**Weiner, J.; Zimmerman, C.-U.; Göhlmann, H. W. H. & Herrmann, R. (2003):** Transcription profiles of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* grown at different temperatures. *Nucleic Acids Res* **31**, 6306-6320.

**Whitmore, S. E. & Lamont, R. J. (2012):** Tyrosine phosphorylation and bacterial virulence. *Int J Oral Sci* **4**, 1-6.

**Woese, C. R.; Maniloff, J. & Zablen, L. B. (1980):** Phylogenetic analysis of the mycoplasmas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 494-498.

**Woodward, J. J.; Iavarone, A. T. & Portnoy, D. A. (2010):** c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science* **328**, 1703-1705.

**Yamamoto, T.; Hara, H.; Tsuchiya, K.; Sakai, S.; Fang, R.; et al. (2012):** *Listeria monocytogenes* strain-specific impairment of the TetR regulator underlies the drastic increase in cyclic di-AMP secretion and beta interferon-inducing ability. *Infect Immun* **80**, 2323-2332.

**Yus, E.; Maier, T.; Michalodimitrakis, K.; van Noort, V.; Yamada, T.; et al. (2009):** Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. *Science* **326**, 1263-1268.

**Zhang, H.; Yin, Y.; Oلمان, V. & Xu, Y. (2012):** Genomic arrangement of regulons in bacterial genomes. *PLoS One* **7**, e29496.

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

**Zuber, P. (2009):** Management of oxidative stress in *Bacillus*. *Annu Rev Microbiol* **63**, 575-597.

## 7. Anhang

### 7.1 Materialien

#### 7.1.1 Chemikalien

|                     |                                       |
|---------------------|---------------------------------------|
| Ampicillin          | Sigma, München                        |
| BSA                 | MBI Fermentas, St. Leon-Rot           |
| CDP*                | Roche Diagnostics, Mannheim           |
| DMEM                | Biochrom, Berlin                      |
| Fötales Kälberserum | Biochrom, Berlin                      |
| Gentamycin          | Sigma, München                        |
| IPTG                | Peqlab, Erlangen                      |
| Kanamycin           | Sigma, München                        |
| Penicillin G        | Serva, Heidelberg                     |
| PEP                 | Sigma, München                        |
| Phenolrot           | Roth, Karlsruhe                       |
| Pferdeserum         | Invitrogen, Karlsruhe                 |
| PPLO broth          | Becton, Dickinson and Company, France |
| X-Gal               | Peqlab, Erlangen                      |

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

#### 7.1.2 Hilfsmittel

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)     | Becton Dickinson Drogheda, Irland                               |
| Eppendorfgefäße                  | Greiner, Nürtingen  |
| Gene Amp Reaction Tubes (PCR)    | Perkin Elmer, Weiterstadt                                       |
| Pipettenspitzen                  | Greiner, Nürtingen<br>Eppendorf, Hamburg<br>Sarstedt, Nümbrecht |
| Glaspipetten                     | Brand, Wertheim   |
| Halbmikroküvetten aus Kunststoff | Sarstedt, Nümbrecht   |
| Kanülen (verschiedene)           | B.Braun, Melsungen  |
| Kulturflaschen                   | Renner, Dannstadt<br>Nunc, Wiesbaden                            |

|   |  |
|---|--|
| Kunststoffpetrischalen                        | Greiner, Nürtingen                       |
| Membranfilter NC 45 (0,2µm Porengröße)        | Schleicher und Schüll, Dassel            |
| Mikroliterpipetten (2µl, 20µl, 200µl, 1000µl) | Gilson, Düsseldorf<br>Eppendorf, Hamburg |
| Polyethylenröhrchen                           | Greiner, Nürtingen                       |
| Poly-Prep Chromatography Columns              | Bio-Rad Laboratories GmbH, München       |
| Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF)         | Bio-Rad Laboratories GmbH, München       |
| Quarzküvetten aus Kunststoff                  | Brand, Wertheim                          |
| Zentrifugenbecher                             | Beckmann, München                        |

### 7.1.3 Geräte und Apparaturen

|   |  |
|---|--|
| Autoklav                                | Zirbus, Bad Grund<br>Thermo Scientific, Waltha<br>USA    |
| Biofuge fresco                          | Heraeus Christ, Osterode                                 |
| Chemilumineszenzsystem<br>ChemoCam      | Intas Göttingen  |
| CO <sub>2</sub> -Inkubator              | Labotect, Göttingen                                      |
| Feinwaage Sartorius                     | Sartorius, Göttingen                                     |
| Gelelektrophoreseapparaturen            | EasyCast <sup>TM</sup> Minigelsystem<br>Peqlab, Erlangen |
| Heizblock                               | Waasetec, Göttingen                                      |
| Horizontalschüttler 3006                | GFL, Burgwedel   |
| Kühlzentrifuge PrimoR                   | Heraeus Christ, Osterode                                 |
| Kulturschüttler Innova 2300             | New Brunswick, Neu-Isen                                  |
| Magnetrührer                            | JAK Werk, Staufen  |
| Mikroprozessor pH-Meter<br>Calimatic    | Knick, Berlin  |
| Mikroskop                               | Zeiss, Jena  |
| Spannungsgerät                          | Bio-Rad Laboratories<br>California USA                   |
| Spektralphotometer Ultrospec<br>2100pro | Amersham, Freiburg                                       |
| TE70 SemiPhor Semi-Dry Transfer<br>Unit | Amersham, Freiburg                                       |
| Thermocycler Tpersonal                  | Biometra, Göttingen                                      |
| Ultraschallgerät UP200S                 | Dr. Hielscher GmbH, Telto                                |

|  |   |
|--|---|
| Ultrazentrifuge Optima Max-E                                   | Beckman, München                        |
| Vertikalgelelektrophoreseapparat<br>ur Mini-Protean III System | Bio-Rad Laboratories,<br>California USA |
| Waage Sartorius universal                                      | Sartorius, Göttingen                    |
| Wasservollentsalzungsanlage                                    | Millipore, Schwalbach                   |

#### 7.1.4 Kommerziell erhältliche Systeme

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

#### 7.1.5 Antikörper und Enzyme

|   |   |
|---|---|
| Ampligase                                     | Epicentre, Madison, USA                                       |
| Anti-Digoxigenin-AP, Fab Fragmente            | Roche Diagnostics, Mannheim                                   |
| <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase                    | MBI Fermentas, St. Leon-Rot                                   |
| Restriktionsendonukleasen                     | NEB Biolabs, Frankfurt am Main<br>MBI Fermentas, St. Leon-Rot |
| Sekundärer AK Anti-Kaninchen IgG-AP gekoppelt | Promega, Mannheim   |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase                    | MBI Fermentas, St. Leon-Rot                                   |

## 7.2. Oligonukleotide

Die 5'-phosphorylierten Oligonukleotide und die restlichen Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich, St. Louis USA bezogen.

**Tabelle 7.1 Oligonukleotide**

| Name | Sequenz (5'→3')              | Verwendung                |
|------|------------------------------|---------------------------|
| AS24 | GTCAACCCCAAGCTACTTGC         | FWD Mutantenscreen MPN083 |
| AS25 | CATAGTTATCATGGTACACATC<br>CC | Rev Mutantenscreen MPN083 |

| Name | Sequenz (5'→3')  | Verwendung  |
|------|--|---|
| AS26 | <u>TTTGTGACA</u> ACCACCTTCAAT<br>GCAAGAGTTG  | Primer für homologe Rekombination<br>ΔMGE109 Fwd upstream (Sall)    |
| AS27 | <u>TTTGAATTC</u> ATAGGAATCCATC<br>CCACCCC  | Primer für homologe Rekombination<br>ΔMGE109 rev upstream (EcoRI)   |
| AS28 | <u>TTTGGATCC</u> AGAAGGGCAGGT<br>GGAAATTAGA  | Primer für homologe Rekombination<br>ΔMGE109 fwd downstream (BamHI) |
| AS29 | <u>TTTTCTAGA</u> ACCACCCAGTCAT<br>GTGACC   | Primer für homologe Rekombination<br>ΔMGE109 rev downstream (XbaI)  |
| AS30 | CGCGGTTGGGCACATTTAATA  | FWD Mutantenscreen MPN688   |
| AS31 | GGGGCATGTCCTTAGAAAAGA<br>A   | Rev Mutantenscreen MPN688   |
| AS32 | <u>AAAGCGGCCG</u> CATAGTGAAGTGC<br>ACTAAACTGGAAGTGC                                    | LFH-Primer FWD für ΔMGE085<br>upstream (NotI)                       |
| AS33 | <u>CCTATCACCTCAAATGGTTCGC</u><br><u>TGGCAAACTAATGCTTTGACA</u><br><i>GTTAAATGTTTCAT</i> | LFH-Primer Rev für ΔMGE085 upstream                                 |
| AS34 | <u>CCGAGCGCCTACGAGGAATTT</u><br><u>GTATCGACTATCAGATCCCTAT</u><br>CTCTCAGGTAG           | LFH-Primer FWD für ΔMGE085<br>downstream                            |
| AS35 | <u>TTTGC GGCCG</u> CCATGGATAAACT<br>GGCAATAAAAAATTCCTAAAATA<br>C                       | LFH-Primer Rev für ΔMGE085<br>downstream<br>(NotI)                  |
| AS36 | <u>CAGCGAACCATTTGAGGTGATAG</u><br><u>GATCGAATTCTAGTATTTAGAATT</u><br>AATAAAGTATG       | LFH-Primer FWD für ΔMGE085 Tet-<br>Kassette                         |
| AS37 | <u>CGATACAAATTCCTCGTAGGCG</u><br><u>CTCGGGATCCCTAAGTTATTTT</u><br>ATTGAACATATATC       | LFH-Primer Rev für ΔMGE085 Tet-<br>Kassette (NotI)                  |
| AS38 | 5'AAATCTAGAGATGAAAATT  | B2H fwd für MPN HrcA (XbaI)   |

| Name | Sequenz (5'→3')  | Verwendung  |
|------|--|---|
|      | TA <u>ACTACCCGACAAGCC</u>                                |   |
| AS39 | 5'TTTGGTAC <u>CCG</u> AGTGGAGCT<br>AGTGGTTTTACCAC        | B2H rev für MPN HrcA (KpnI)                               |
| AS40 | AAAGCTAG <u>CG</u> ATGATTTACGCG<br>AAAGAGCAAGC           | B2H fwd für MPN239 (NheI)                                 |
| AS41 | TTTGGTAC <u>CCG</u> AGCATTAAATAA<br>TTTTGATGCGGGGG       | B2H rev für MPN239 (KpnI)                                 |
| AS42 | AAATCTAG <u>AG</u> ATGGTGCTGAA<br>ATCGAAAGGATCC          | B2H fwd für MPN329 (XbaI)                                 |
| AS43 | TTTGGTAC <u>CCG</u> TTGATCATCTTC<br>AAGTGTAACCGC         | B2H rev für MPN329 (KpnI)                                 |
| AS44 | AAATCTAG <u>AG</u> ATGCTTAAACGA<br>CAACTTCTGCTAG         | B2H fwd für MPN GlpQ (XbaI)                               |
| AS45 | TTTGGTAC <u>CCG</u> CACTTCAAACCT<br>TCTTGTTGGCAATTTG     | B2H rev für MPN GlpQ (KpnI)                               |
| AS46 | AAATCTAG <u>AG</u> ATGCCTTTAGT<br>GTTCAGATTAAGCAC        | B2H fwd für MPN241 (XbaI)                                 |
| AS47 | TTTGGTAC <u>CCG</u> ATTTTGGTTTA<br>GTTTTTTAACTTAGCGTTGAG | B2H rev für MPN241 (KpnI)                                 |
| AS48 | AAAGAGCT <u>CG</u> ATGAAAAAATTT<br>CAAGCAGTTATTAAGACCC   | MGE Hpr fwd Überexpression in E.coli<br>(SacI)            |
| AS49 | TTTGGATCCATGAAAAAATTTCA<br>AGCAGTTATTAAGACC              | MGE Hpr rev Überexpression in E.coli<br>(BamHI)           |
| AS50 | TTTCAATTGGCAAAACTAATGC<br>TTTGACAGTTAAATGTTTCAT          | Primer für homologe Rekombination<br>ΔMGE085 rev upstream |
| AS51 | AAAGAGCT <u>CG</u> ATGAAAAAAGT<br>GATTGTGATTGGAATAAATCAC | MGE Nox fwd Überexpression in E.coli<br>(SacI)            |

| Name | Sequenz (5'→3')  | Verwendung   |
|------|--|--|
| AS52 | TTTGGATCCCTATTTTTAGGAAT<br>GTAATAGCTAAAACCAAG                | MGE Nox rev Überexpression in E.coli<br>(BamHI)        |
| AS53 | GGAGCATGGCCTATATGTATG<br>AATGTTGAAAAC                        | MGE Nox MMR1 Überexpression in<br>E.coli (5'-P)        |
| AS54 | AAAGAGCTCGATGGCAGCAAA<br>GAATAGAACCATTAAG                    | MGE Gap fwd Überexpression in E.coli<br>(SacI)         |
| AS55 | TTTGGATCCCTAGATCCATTAATTGCGGAGCA<br>CCTAGCTAACTAC            | MGE Gap fwd Überexpression für MPN HrcA<br>(BamHI)     |
| AS56 | AAAGAGCTCGATGCAAACAATT<br>GACGTTTTAATTGTGGG                  | MGE GlpD fwd Überexpression in E.coli<br>(SacI)        |
| AS57 | TTTGGATCCTTAGATCCATGAT<br>AAGTTGTAATTAGGATTCCAAT<br>TTATCTTC | MGE GlpD rev Überexpression in E.coli<br>(MMR) (BamHI) |
| AS58 | CATCTTAGGGAGAAAAATCTGGA<br>TTGAGGATTGGTTTAAAAAAC             | MGE GlpD MMR1 Überexpression in<br>E.coli (5'-P)       |
| AS59 | GTTGAAGGTAGTTGGCTAATTG<br>ACCCTTTAATTGCAAC                   | MGE GlpD MMR2 Überexpression in<br>E.coli (5'-P)       |
| AS60 | GCAGCTGGTCATTATGCAGATT<br>GGCTAGCA                           | MGE GlpD MMR3 Überexpression in<br>E.coli (5'-P)       |
| AS61 | AAATCTAGAGATGTCATCGCCA<br>AAGAAAAATTTCAAAAAAC                | B2H fwd für MPN352(=sigA=rpoD)<br>(XbaI)               |
| AS62 | TTTGGTACCCGATCCTTCTTTTC<br>ATTTCCCTCATG                      | B2H rev für MPN352(=sigA=rpoD)<br>(KpnI)               |
| AS63 | AAA <u>A</u> CTAGTGATGATTAAGGAT<br>TTTGATCCTAGTGAGTTTG       | B2H fwd für MPN280 (SpeI)                              |



| Name | Sequenz (5'→3')   | Verwendung  |
|------|---|---|
| AS64 | TTTGGTACC <u>CGAACC</u> CAAGACA<br>ATACGGTTGAAATCAAC    | B2H rev für MPN280 (MMR) (KpnI)                           |
| AS65 | AAATCTAGAG <u>GAT</u> GGCTAAAATT<br>AACTTCTTGCCTTCG     | B2H fwd für MPN621 (XbaI)                                 |
| AS66 | TTTGGTACC <u>CGA</u> AATAGAAATAA<br>TAGTTGACAGGATTAGTGG | B2H rev für MPN621 (KpnI)                                 |
| AS67 | AAAGTCGACGAAGTGGTCACTT<br>GTGCAGATG                     | Komplementation Mge glpD in Mpn<br>glpd:Tn fwd (Sall)     |
| AS68 | TTTGAATTCTTAGATCCATGAT<br>AAGTTGTAATTAGGATTC            | Komplementation Mge glpD in Mpn<br>glpd:Tn rev (EcoRI)    |
| AS69 | AAAGAGCTC <u>GAT</u> GAAGAAAGT<br>GATTGTTATCG           | MPN Nox fwd Überexpression in E.coli<br>(pGP172) (SacI)   |
| AS70 | TTTGGATCCCTTATTTATTTTAG<br>GGGTATAGTAAC                 | MPN Nox rev Überexpression in<br>E.coli(pGP172) (BamHI)   |
| AS71 | AAAGAGCTC <u>GAT</u> GGAAACAAG<br>AGATGTTTTAATAG        | MPN GlpD fwd Überexpression in<br>E.coli(pGP172) (SacI)   |
| AS72 | TTTGGATCCTTAGATCCATGGC<br>AGATTG                        | MPN GlpD rev Überexpression in E.coli<br>(pGP172) (BamHI) |
| AS73 | GCGCAAAGTGAAGTATGGCAA<br>AG                             | Screening Primer Fwd. MPN 114<br>(Acetyltransferase)      |
| AS74 | GAAATCTACTTTCACAAACAAA<br>ACAGCC                        | Screening Primer Rev. MPN 114<br>(Acetyltransferase)      |
| AS75 | AAAGTCGACGAAGTGGTCACTT<br>GTGCAGATC                     | LFH-Primer FWD für ΔMGE041 (hpr)<br>upstream (Sall)       |
| AS76 | CCTATCACCTCAAATGGTTCGC                                  | LFH-Primer Rev für ΔMGE041 (hpr)                          |

|             |   |  |
|-------------|---|--|
|             | TGGAATTCGCACAACACTAGTACC<br>GATGA                               | downstream   |
| <b>Name</b> | <b>Sequenz (5'→3')</b>  | <b>Verwendung</b>                                    |
| AS77        | CCGAGCGCCTACGAGGAATTT<br>GTATCGGGATCCGCTAAGAGA<br>GCAGTTGAACTCC | LFH-Primer FWD für ΔMGE041 (hpr)<br>downstream       |
| AS78        | AAATCTAGACACCCGCTACAAA<br>CACACTAC                              | LFH-Primer Rev für ΔMGE041<br>(hpr)downstream (Xbal) |
| AS79        | GACCACAATTGTAAGTGGGAA<br>TAATC                                  | Fwd Screening Primer MPN027<br>(Acetyltransferase)   |
| AS80        | GCCAAAAAGCAGGGCCTGG   | rev Screening Primer MPN027<br>(Acetyltransferase)   |
| AS81        | AAAGTCGACGAATCGCTAGGA<br>CTAGAGGCA                              | Fwd Komplementation MPN114 +<br>1000bp (Sall)        |
| AS82        | TTTGAATTCTTATTTAAGAGTTT<br>TAAGGATTGTTTTCACTG                   | Rev Komplementation MPN114 +<br>1000bp (EcoRI)       |
| AS83        | TGCCAAGTCTAAACATTAATAA<br>TGCC                                  | Fwd RT-PCR glpD MPN                                  |
| AS84        | CTGCAGTTAGCCCTGG  | Rev RT-PCR glpD MPN                                  |
| AS85        | CCTTTAATTGCAACCAAGTGTT<br>TAG                                   | Fwd RT-PCR glpD MGE                                  |
| AS86        | GGTTTTAAATTGTGGTGTTGTT<br>TCATTG                                | Rev RT-PCR glpD MGE                                  |
| AS87        | GAGTGTCTTCGTCCTTTAAGTA<br>AA                                    | Fwd RT-PCR MPN114                                    |
| AS88        | ACTACCCTTTTGCCTAACC   | Rev RT-PCR MPN114                                    |

| Name  | Sequenz (5'→3')   | Verwendung   |
|-------|---|--|
| AS89  | CTGGGTC <del>ACTCGAGGGGG</del>  | Sequenzierprimer Komplementation<br>MPN421 FWD (Reverse Komplementär<br>zum vorderen Transposonbereich –<br>MPN421 Spezifisch)   |
| AS90  | GTTCTAGAGCGGCCGCTTTTAC  | Sequenzierprimer Komplementation<br>MPN421 REV (Komplementär zum<br>hinteren Transposonbereich – kann für<br>alle Komplementations-<br>sequenzierungen benutzt werden) |
| AS91  | AATCAAGGCAAGAAAGTAGAA<br>GGA  | FWD RT-PCR MPN284  |
| AS92  | GATGGCATCTTTCCAGC   | Rev RT-PCR MPN284  |
| AS93  | CCAATTAACCCTTATTTTAGTGC<br>C  | Fwd RT-PCR glpK (MPN050)   |
| AS94  | TACATGCATCTTACCACCCG  | Rev RT-PCR glpK (MPN050)   |
| AS95  | AAACATATGATGACAGTGGAA<br>GTCTTTTCG                                    | FWD MPN244 in pET3c (NdeI)   |
| AS96  | TTTGGATCCTTAACCCGGCTTT<br>ACCGTCAG                                    | Rev MPN244 in pET3c (BamHI)  |
| AS97  | TTTGGATCCACCCGGCTTTACC<br>GTCAGAT                                     | Rev MPN244 in pET3c ohne Stopp-<br>Codon (BamHI)   |
| AS98  | AAAGGATCCCTCACTTATTTAA<br>AGGAGGAAACAATCATGATGA<br>CAGTGGAAAGTCTTTTCG | MPN244 in pBQ200 fwd (BamHI)   |
| AS99  | TTTGTGACTTAACCCGGCTTT<br>ACCGTCAG                                     | MPN244 in pBQ200 rev (Sall)  |
| AS100 | TTTGGATCCTTAACCCGGCCTT<br>ACCGTCAGATA                                 | MPN244 rev mutagenese K200R<br>(BamHI)   |

| Name  | Sequenz (5'→3')   | Verwendung   |
|-------|---|--|
| AS101 | TTT <u>GATCCT</u> TAACCCGGCTCT<br>ACCGTCAGATA                 | MPN244 rev mutagenese K200Q<br>(BamHI)             |
| AS102 | AAAGTCGACTAGTATTTAGAAT<br>TAATAAAGTATGAAGGCTATGC<br>GCTATGAGC | Bacillus YojJ in MPN Fwd + tet-<br>Promotor (Sall) |
| AS103 | TTTGAATTCTTACGTTCTTGGTG<br>AAATTAACGGATATAAT                  | Bacillus YojJ in MPN rev (EcoRI)                   |
| AS104 | GCTTTCCCATATATGACGGTAT<br>TTTAG                               | Mutantenscreen glpD MGE Fwd                        |
| AS105 | CTAAAATACCGTCATATATGGG<br>AAAGC                               | Mutantenscreen glpD MGE rev                        |
| AS106 | GGGAGGATAAGCAAGCTTTAA<br>AAAG                                 | Mutantenscreen MPN glpF fwd                        |
| AS107 | CCGTTTGTAATGTCTGTGGTCA<br>G                                   | Mutantenscreen MPN glpF rev                        |
| AS108 | CCGCCGTCGTGGTTACC   | Mutantenscreen MPN310 fwd1                         |
| AS109 | GCTAAGCGATCCTTCCAATCAC  | Mutantenscreen MPN310 rev1                         |
| AS110 | CAAAGCTTGGAACAACCTCACCG                                       | Mutantenscreen MPN310 fwd2                         |
| AS111 | GTAATCATTAGTCATCTTTCATC<br>TCTTC                              | Mutantenscreen MPN310 rev2                         |
| AS112 | CCACATTGACCTGTTTGCGTAG  | Mutantenscreen MPN490 (recA)fwd                    |
| AS113 | CTATTTTTATATTTACCGGCGCT<br>GTG                                | Mutantenscreen MPN490 (recA)rev                    |
| AS114 | GATTAAGGAGTTGAAGGGTGA<br>TTTG                                 | Mutantenscreen MPNs307 fwd                         |
| AS115 | CGTGCTGTTTCCTCTGTGTTG   | Mutantenscreen MPNs307 rev                         |
| AS116 | CTGAGGATTATGAGGAAGATT   | Mutantenscreen MPN352 (sigA) fwd                   |

|       | TACAG                                       |                                  |
|-------|---|----------------------------------|
| Name  | Sequenz (5'→3')                             | Verwendung                       |
| AS117 | GCTAAATAGCCATGGTCACAAC<br>C                 | Mutantenscreen MPN352 (sigA) rev |
| AS118 | GCTGTTTGGCTAGTTCTTTAGTT<br>G                | Mutantenscreen MPNs233 fwd       |
| AS119 | CAGTTAGTTTCCACTACGGGAG                      | Mutantenscreen MPNs233 rev       |
| AS120 | AAATCTAGAGATGATGACAGT<br>GGAAGTCTTTTCG      | Fwd MPN244 in pGP888 (XbaI)      |
| AS121 | TTTGGTACCTTAACCCGGCTTT<br>ACCGTCAG          | rev MPN244 in pGP888 (KpnI)      |
| AS122 | GGGGCGATTCTTTTGATAATTG<br>TG                | Screen Fwd MPN341                |
| AS123 | CGCCATTACGTTGTTTCAGTACG                     | Screen Rev MPN341                |
| AS124 | GTGTCACAAAGTGGCATAAAG<br>TG                 | Screen Fwd MPN314                |
| AS125 | CAAGTAAGACACTTTTGTGGG<br>G                  | Screen Rev MPN314                |
| AS126 | ATGGCAGTAATTTACAAAACAA<br>CAGCAC            | FWD Sonde MPN668                 |
| AS127 | TTAAAGCTTGGCACCGTTCAAG<br>G                 | REV Sonde MPN668                 |
| AS128 | CTAAAATATTATCTATATTAATT<br>AACATGGCATTGATTT | FWD Sonde MGE454                 |
| AS129 | TTAAAGCTTAATACCATTTAAA<br>GTAAACCAAG        | REV Sonde MGE454                 |

| Name  | Sequenz (5'→3')   | Verwendung        |
|-------|---|-------------------|
| AS130 | GCCAAAATAGCAAAGATACCT<br>GG   | Screen Fwd MPN108 |
| AS131 | CTGATCTTCTAAGTTGCTCTCTC   | Screen Rev MPN108 |
| AS132 | GCCCCGATAGCTTAAAGAGC  | Screen Fwd MPN111 |
| AS133 | CTTTGCCTCTTGAGATCTCGC   | Screen Rev MPN111 |
| AS134 | CAATCTAACTATCATGAGCGGT<br>TC  | Screen fwd MPN427 |
| AS135 | GTGCCAGTGTCAGTGATGTC  | Screen rev MPN427 |
| AS136 | CGAGTTAGCAGCAGCATTGTC   | Fwd Sonde MPN114  |
| AS137 | <u>CTAATACGACTCACTATAGGGA</u><br><u>GATAGGGGTT</u> CATGTCGAATT<br>GCG | Rev Sonde MPN114  |
| AS138 | TGATTTGGTGAAGGCTGTGTAT<br>TAG   | Screen fwd MPN342 |
| AS139 | CTTTGCCTCTTGAGATCTCGC   | Screen rev MPN342 |
| AS140 | GCTTCTCAGCACTGCGGTG   | Screen fwd MPN343 |
| AS141 | GAACGGCTTAATTAGAAATGCC<br>AACAA                                       | Screen rev MPN343 |

Die angefügten Schnittstellen sind unterstrichen, 5'-P steht für eine 5'-Phosphorylierung, Mutationen sind rot hervorgehoben und zusätzliche Basen zur Wiederherstellung des Leserahmens sind blau.

### 7.3. Plasmide

Tab. 7.2. Plasmide

| Plasmid     | Resistenz         | Referenz bzw. Konstruktion      | Verwendung            |
|-------------|-------------------|---------------------------------|-----------------------|
| pGP172      | Amp <sup>R</sup>  | Merzbacher <i>et al.</i> , 2004 | Überexpressionsvektor |
| pMT85       | Gent <sup>R</sup> | Zimmermann und Herrmann, 2005   | Mini-Transposon       |
| pMTnTetM438 | Tet <sup>R</sup>  | Pich <i>et al.</i> , 2007       | Mini-Transposon       |
| pBSKII(+)   | Amp <sup>R</sup>  | Short <i>et al.</i> , 1988      | Kloniervektor         |
| pET3c       | Amp <sup>R</sup>  | Merzbacher <i>et al.</i> , 2004 | Überexpressionsvektor |
| pET15b      | Amp <sup>R</sup>  | Merzbacher <i>et al.</i> , 2004 | Überexpressionsvektor |

In dieser Arbeit konstruiert

| Plasmid | Resistenz        | Konstruktion / Verwendung                       |
|---------|------------------|---|
| pGP2013 | Amp <sup>R</sup> | PCR-Prod. MGE-Hpr / BamHI + SacI in pGP172      |
| pGP2014 | Amp <sup>R</sup> | LFH Produkt für MGEΔglpD /Sall + XbaI in pBSKII |
| pGP2015 | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt nox MGE/ BamHI + SacI in pGP172     |
| pGP2016 | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt glpD MGE/BamHI + SacI in pBSKII     |
| pGP2017 | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt nox MGE/BamHI + SacI in pBSKII      |
| pGP2018 | Amp <sup>R</sup> | PCR-Produkt gap MGE / BamHi + SacI in pGP172    |

| Plasmid | Resistenz                           | Konstruktion / Verwendung  |
|---------|-------------------------------------|--|
| pGP2031 | Amp <sup>R</sup>                    | MMR-Produkt glpD MPN / BamHI + SacI in pGP172                                    |
| pGP2032 | Amp <sup>R</sup>                    | MMR-Produkt MPN nox / BamHI + SacI in pGP172                                     |
| pGP2033 | Amp <sup>R</sup>                    | MMR-Produkt MGE nox / BamHI + SacI in pGP172                                     |
| pGP2035 | Amp <sup>R</sup> / Tet <sup>R</sup> | MGE glpD + 1000bp upstream (Komplementationsvektor) / EcoRI + Sall in pMTn401tet |
| pGP2036 | Amp <sup>R</sup>                    | MMR-Produkt glpD MGE / BamHI + SacI in pGP172                                    |
| pGP2036 | Amp <sup>R</sup>                    | PCR Produkt MPN244 (kein TGA) / NdeI + BamHI in pET3c                            |
| pGP2037 | Amp <sup>R</sup>                    | PCR Produkt MPN244 (keine TGA) / NdeI + BamHI in pET15b                          |
| pGP2039 | Amp <sup>R</sup> / Tet <sup>R</sup> | Mpn114 + 1000bp upstream / EcoRI + Sall in pMTn401tet                            |
| pGP2040 | Amp <sup>R</sup> / Tet <sup>R</sup> | <i>Bacillus subtilis</i> yojj / EcoRI + Sall in pMTn401tet                       |
| pGP2041 | Amp <sup>R</sup>                    | PCR Produkt MPN244 K200R / NdeI + BamHI in pET3c                                 |
| pGP2042 | Amp <sup>R</sup>                    | PCR Produkt MPN244 K200Q / NdeI + BamHI in pET3c                                 |



## 7.4. Stämme

Tab. 7.3. Bakterienstämme

| Stamm                       | relevanter Genotyp  | Referenz bzw.<br><sup>1</sup><br>Konstruktion |
|-----------------------------|---|---|
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17rK- mK+relA1 supE44 <math>\Phi</math>80<math>\Delta</math>lacZ<math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math>(lacZYA-argF)U169</i> | Sambrook <i>et al.</i> , 1989                 |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)   | <i>F<sup>-</sup>lon ompT r<sub>m</sub> hsdS gal (cl<sub>ts857</sub> ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)</i>   | Sambrook <i>et al.</i> , 1989                 |

***Mycoplasma***

| Stamm  | relevanter Genotyp                          | Referenz bzw.<br><sup>1</sup><br>Konstruktion |
|--|---|---|
| M129   | Wildtyp: <i>M. pneumoniae</i> M129          | Somerson <i>et al.</i> , 1963                 |
| FH (ATCC 15531)                                    | Wildtyp: <i>M. pneumoniae</i> FH            | Krishnakumar <i>et al.</i> , 2010             |
| GPM100   | Klinisches Isolat 1                         | Roger Dumke                                   |
| GPM101   | Klinisches Isolat 2                         | Roger Dumke                                   |
| GPG01  | Wildtyp: <i>M. genitalium</i>               | Lind, 1982                                    |
| GPG02  | <i>M. genitalium</i> $\Delta$ 039           | Piñol, 2012                                   |
| GPM52  | <i>glpD</i> ::Tn4001m                       | Halbedel, 2006                                |
| GPM87  | <i>mpn284</i> ::Tn4001m                     | Sebastian Schmidl                             |
| GPM91  | <i>mpn133</i> ::Tn4001m                     | Stephanie Großhennig                          |
| <b>in dieser Arbeit isoliert bzw. konstruiert:</b> |   |   |
| <b><i>M. pneumoniae</i></b>                        |   |   |
| GPM94  | M129 <i>mpn027</i> ::Tn4001m                | pMT85 $\rightarrow$ M129                      |
| GPM95  | M129 <i>mpn114</i> ::Tn4001m                | pMT85 $\rightarrow$ M129                      |
| GPM96  | GPM52 + MGE <i>glpD</i> in pMTn401tet Klon4 | pGP2035 $\rightarrow$ M129                    |

| Stamm  | relevanter Genotyp   | Referenz bzw.<br><sup>1</sup><br>Konstruktion |
|--------|--|---|
| GPM97  | GPM52 + MGE <i>g/pD</i> in pMTn401tet Klon5                | pGP2035 →M129                                 |
| GPM98  | M129 + <i>Bacillus subtilis yojJ</i> in pMTn401tet Klon 1  | pGP2040 →M129                                 |
| GPM99  | M129 + <i>Bacillus subtilis yojJ</i> in pMTn401tet Klon 11 | pGP2040 →M129                                 |
| GPM100 | M129 <i>recA::Tn4001m</i>                                  | pMT85 →M129                                   |

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

## 7.5. Verwendete Internetangebote und Computerprogramme

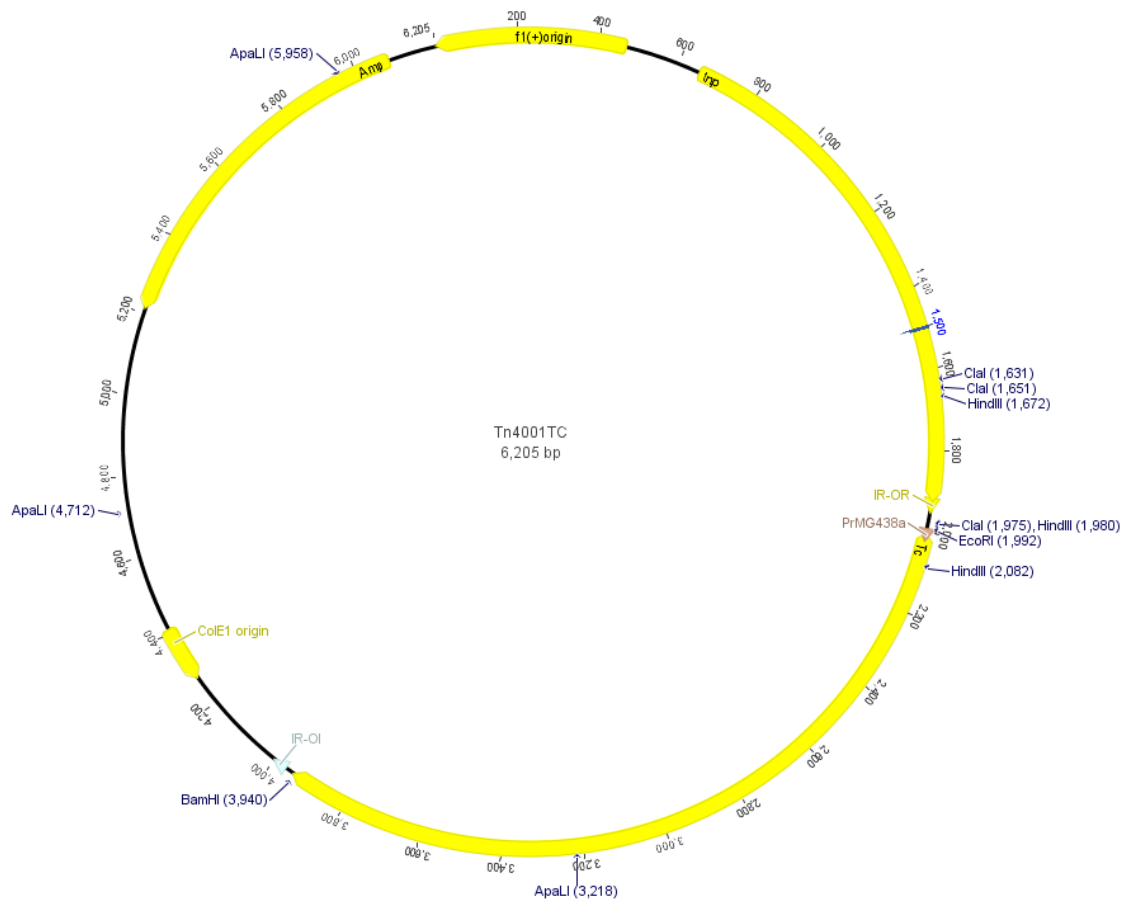
Tab. 7.4. Genutzte Internetangebote

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

Tab. 7.5. Genutzte Computerprogramme

| Programm                     | Hersteller      | Anwendung                             |
|------------------------------|-----------------|---------------------------------------|
| ChemiCapt Version 11.07      | Intas           | Aufnahme von Chemilumineszenzsignalen |
| SeqMan <sup>TM</sup> II 5.07 | DNASTAR         | Auswertung von Sequenzierdateien      |
| Microsoft Office 2007        | Microsoft Inc.  | Text- und Datenverarbeitung           |
| Geneious                     | Biomatters Ltd. | Text- und Datenverarbeitung           |

## Vektorkarte pMTn401tet



**Abb.7.1 Vektorkarte pMTn401tet:** Der vektor besitzt einen f1(+)-Origin und eine Ampicillin-resistenz in *E. coli*. Eine Transposase (trp) ist außerhalb des Minitransposons kodiert. Dieses wird von zwei Repeatregionen (IR-OR) eingerahmt und beinhaltet einen Tet-Resistenzkassette und eine Multiple Klonierungsseite.

## *Curriculum vitae*

---

### **Arne Gunnar Schmeisky**

Weender Str. 93

37073 Göttingen

Tel.: 0176/23322127

E-Mail: aschmei@gwdg.de

**Persönliche Daten** | Geburtsdatum /-ort: 13.06.1984 in Witzenhausen  
 Familienstand: ledig  
 Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Ausbildung**

- Seit 11/2009      **Promotion** „Untersuchung von Einflüssen auf die Wasserstoffperoxidbildung in Mycoplasmen“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Stülke, Abteilung für Allgemeine Mikrobiologie, Georg-August Universität Göttingen
- 03/2009            **Diplomarbeit** „In silico Rekonstruktion von metabolischen Netzwerken in Bacillus subtilis“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörg Stülke, Abteilung für Allgemeine Mikrobiologie, Georg-August Universität Göttingen  
 Diplom (sehr gut)
- 10/2004-09/2009    **Studium** der Biologie an der Georg-August Universität Göttingen  
 Hauptfach: Mikrobiologie  
 Nebenfächer: Genetik und Pathologie
- 2001-2004         **Berufliches Gymnasium**, Berufliche Schulen Witzenhausen  
 Abschluss: Abitur (sehr gut)
- 2000-2001  
 USA                **Auslandsschuljahr** Harrison High School, Farmington Hills, MI
- 1994-2000         **Kooperative Gesamtschule**, Witzenhausen Gymnasialzweig
- 1990-1994         **Grundschule**, Witzenhausen

**Qualifikationen****Sprachen**

Deutsch (Muttersprache)  
 Englisch (verhandlungssicher)  
 Französisch (Grundlagen)

**EDV-Kenntnisse**

Microsoft Office  
 Seqman/Chromas  
 Adobe Photoshop  
 Typo3

**Führerschein**

Führerschein Klasse B

**Methoden**

## Mikrobiologisch

Isolierung und Anreicherung von Bakterien  
 Hellfeld - und Fluoreszenzmikroskopie, Infektionsversuche

## Molekularbiol.

PCR, qRT-PCR  
 Klonierung (Konstruktion von Reportergenfusionen, Vektoren und Proteinfusionen)  
 Arbeiten mit bakterieller chromosomaler DNA, Plasmiden und RNA  
 Genetische Manipulation von Bakterien, Phagentransduktion  
 Mutagenesetechniken (Combined Chain reaction, Error prone PCR, Long Flanking Homology-PCR)  
 Northern Blot, Slot Blot, Southern Blot

## Biochemisch

Überproduktion und Aufreinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie (His-, FLAG- und Strep-Tag)  
 Analyse von Proteinen: chemisches Crosslinking von Proteinen, Co-Purifikation, Western Blot, Bacterial-Two-Hybrid-Analysen  
 Enzymassays und –kinetiken

## Grundkenntnisse

Zellkultur

**Studienbegleitende Praktika**

|                 |   |
|-----------------|---|
| 03/2008-05/2008 | Praktikum an der Universität Tromsø   |
| 09/2010-11/2010 | Aufenthalt an der Universitat Autònoma de Barcelona im Rahmen der Promotion |

### Erfahrungen in Lehre und Betreuung

|           |   |
|-----------|---|
| 2012      | Masterarbeit: Hydrogenperoxid production in <i>M. genitalium</i>                                    |
| 2011      | Masterarbeit: Implication of transport systems in <i>M.pneumoniae</i> pathogenicity                 |
| 2010-2012 | Wissenschaftliches Anleiten von Bachelorstudenten „Methodenkurs: Wissenschaftliches Arbeiten am PC“ |
| Dez 2012  | Wissenschaftliches Anleiten von Masterstudenten „Practical Training“                                |

### Publikationen

Großhennig S, Schmidl SR, **Schmeisky AG**, Busse J, Stülke J; 2013

Glycerol and Phospholipid Transporters in *Mycoplasma pneumoniae*: Implication in Growth and Virulence

*Infect. Immun.* Jan. 7 2013 Epub

Baumbach J, Hoeke H, Weege F, **Schmeisky AG**, Neumann-Staubitz P; 2012

Salmonella enterica Modulates Its Infectivity in Response to Intestinal Stimuli OJMM 2012 Epub

van Noort V, Seebacher J, Bader S, Mohammed S, Vonkova I, Betts MJ, Kühner S, Kumar R, Maier T, O'Flaherty M, Rybin V, **Schmeisky A**, Yus E, Stülke J, Serrano L, Russell RB, Heck AJ, Bork P, Gavin AC; 2012

Cross-talk between phosphorylation and lysine acetylation in a genome-reduced bacterium.

*Mol Syst Biol.* 2012 28;8:571. doi: 10.1038/msb.2012.4.

Mäder U, **Schmeisky AG**, Flórez LA, Stülke J; 2012

SubtiWiki--a comprehensive community resource for the model organism Bacillus

subtilis.

*Nucleic Acids Res.* 40(Database issue):D1278-87.

Lammers CR, Flórez LA, **Schmeisky AG**, Roppel SF, Mäder U, Hamoen L, Stülke J; 2010  
Connecting parts with processes: SubtiWiki and SubtiPathways integrate gene and  
pathway annotation for *Bacillus subtilis*. *Microbiology*. 2010 Mar;156(Pt 3):849-59

Flórez LA, Roppel SF, **Schmeisky AG**, Lammers CR, Stülke J.; 2009

A community-curated consensual annotation that is continuously updated: the  
*Bacillus subtilis* centred wiki SubtiWiki. *Database (Oxford)*. 2009

### Konferenzbeiträge

#### Poster

2010

Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte  
Mikrobiologie, Hannover

#### Vortrag

2013

Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte  
Mikrobiologie, Bremen (eingereicht und angenommen)

### Zusatzqualifikation

Fortbildungsveranstaltung nach § 15 Abs. 4 GenTSV für Projektleiter und Beauftragte  
für die biologische Sicherheit.