

Analyse Hitzeschockprotein-kodierender Gene von Mykoplasmen

**Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover**

**Zur Erlangung des Grades
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
Dr. rer. nat.**

**genehmigte Dissertation von
Dipl. Biochem. Barbara Scherm
geboren am 22. April 1970 in Coburg**

1999

Referent:

PD Dr. W. Müller

Korreferent:

Prof. Dr. H. Kirchhoff

Tag der Promotion:

29.06.99

meinen Eltern

ABSTRAKT

BARBARA SCHERM:

Analyse Hitzeschockprotein-kodierender Gene von Mykoplasmen

Hitzeschockproteine (Hsp) sind konservierte, ubiquitär vorkommende Proteine, die als Reaktion auf einen Hitzeschock oder andere Umweltfaktoren entweder neu oder verstärkt synthetisiert werden. Das Ziel der Arbeit war es (1) Hsp-kodierende Gene verschiedener Mykoplasmenpezies zu identifizieren und charakterisieren, (2) mykoplasmale rekombinante Hsp zu exprimieren und Untersuchungen zur Bedeutung dieser Proteine bei Mykoplasmeninfektionen zu ermöglichen und (3) die Expression von Hsp im Infektionsverlauf darzustellen.

Genabschnitte des *hsp60*-Gens und eines immunologisch wichtigen, 600 bp großen, *hsp70*-Fragmentes von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Diese Daten ermöglichten die Ermittlung des Konservierungsgrades innerhalb der Gattung *Mycoplasma* sowie an anderen Bakterienpezies. Der Konservierungsgrad der *hsp60*-Gene betrug innerhalb der Mykoplasmenpezies 98-99,9%. Eine Ausnahme bildete *M. genitalium* mit 76,5-77,7%. Mit *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli* bestand eine Homologie von 49,2-59,7%. Die Homologien der *hsp70*-Fragmente betrugen 99,8% zwischen *M. arthritidis* und *M. bovis*, 46,8-51,3% zwischen *M. pneumoniae*, *M. genitalium* und *M. capricolum* und 60,5-69,7% innerhalb der weiteren Mykoplasmenpezies. Mit *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli* bestanden Homologien von 50,6-63,1%. Die Ergebnisse des Homologievergleichs der aus den DNA-Sequenzen ermittelten Hsp60-Proteinsequenzen zeigte Werte von 90,4 bis zu 99,9% innerhalb der Mykoplasmenpezies und von 53,2-60,8% im Vergleich mit anderen Bakterienpezies. Die Homologien der Hsp70-Proteinfragmente lagen bei 98,9% zwischen *M. arthritidis* und *M. bovis*, bei 63,2-79,3% innerhalb der weiteren Mykoplasmenpezies und bei 58,7-68,5% im Vergleich mit *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli*. Die Bestimmung der taxonomischen Position der Mykoplasmen- und Bakterienpezies auf der Basis der Hsp60- bzw. Hsp70-DNA- und Proteinteilsequenzen entsprach der taxonomischen Einordnung mittels 16S rRNA-Analysen.

Nach Transformation in *E. coli* JM105 konnten zwei rekombinante GST-Fusionsproteine von Teilstücken des Hsp60 von *M. arthritidis* (57 und 64 kDa) und je ein GST-Fusionsprotein des Hsp70-Fragmentes von *M. arthritidis* und *M. bovis* (42 und 32 kDa) gewonnen werden. Im Immunoblot reagierten alle rekombinanten Hsp60- und Hsp70-GST-Fusionsproteine mit Rekonvaleszentenseren von Rind und Schwein, die im ELISA stark mit *M. bovis*- bzw. *M. hyopneumoniae*-Gesamtantigen reagierten, was die immundominante Rolle von Hsp60 und Hsp70 bestätigt.

Die Charakterisierung der *in vivo* Vorgänge der Hitzeschockantwort von *M. hyopneumoniae* in der Interaktion mit dem Wirt wurde an bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) von *M. hyopneumoniae*-infizierten und -nichtinfizierten Schweinen analysiert. BALFs von *M. hyopneumoniae*-infizierten Tieren bewirkte eine eindeutige und weit intensivere Steigerung der Synthese von Hsp60 in den Mykoplasmen als Hitzeschock, wie der Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen zeigte.

ABSTRACT

BARBARA SCHERM:

Analysis of heat shock protein encoding genes of mycoplasmas

Heat shock proteins (Hsp) are among the most conserved and ubiquitous molecules known. These proteins are produced in response to heat shock and a variety of environmental stresses. On one hand, due to their high conservation, Hsp are discussed as a cause for certain autoimmune diseases, but on the other hand certain bacterial Hsp have been known to induce a protective immune response. Only little is known about Hsp and Hsp-encoding genes of mycoplasmas. The aim of this study was (i) to identify and characterize Hsp-encoding genes of different mycoplasma species, (ii) to construct and express recombinant mycoplasmal Hsp to facilitate investigations onto the influence of these molecules on mycoplasmoses and (iii) to analyze Hsp-expression during mycoplasma infection.

Fragments comprising almost the entire hsp60 gene as well as an immunologically important 600 bp fragment of the hsp70 gene were amplified by PCR from *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* and *M. hyopneumoniae*, and analyzed by nucleotide sequence analysis. These data allowed to determine the degree of conservation of species within the genus mycoplasma (the species analyzed in this study, *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, and the hsp70 only from *M. capricolum*) as well as with other species (*C. perfringens*, *B. subtilis*, and *E. coli*). In addition taxonomical analyses of the data were performed.

The hsp60 gene of *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. agalactiae*, *M. hyopneumoniae* and *M. pneumoniae* showed homologies of 98-99.9%, the homologies to the hsp60 of *M. genitalium* was only between 76.5-77.7%. Homologies to *C. perfringens*, *B. subtilis* and *E. coli* were between 49.2-59.7%. Analyses of the 600 bp-hsp70-fragments revealed a homology of 99.8% between *M. arthritis* and *M. bovis*, and 60.5 to 69.7% among the other *Mycoplasma* species with the exception of *M. pneumoniae*, *M. genitalium* and *M. capricolum* sharing a homology of 46.8-51.3% only. Homologies to *C. perfringens*, *B. subtilis*, and *E. coli* were 50.6-63.1%. The predicted amino acid sequences for Hsp60 showed a homology of 90.4 to 99.9% among the *Mycoplasma* species, and 53.2 to 60.8% in comparison to other bacterial species decreasing with the degree of phylogenetic relationship. The predicted Hsp70 fragment was 98.9% homologous between *M. arthritis*, and *M. bovis*; among the other *Mycoplasma* species it had a homology of 63.2 to 79.3%. In comparison to *C. perfringens*, *B. subtilis*, and *E. coli* the homology was 58.7 to 68.5%.

The taxonomic position determined generally corresponded to the position determined by using 16S rRNA-analyses; in addition however, it allowed a clear differentiation between the closely related species *M. agalactiae* and *M. bovis*.

After cloning and expression in *E. coli* JM105 two recombinant *M. arthritidis*-Hsp60-GST-fusion proteins (57 and 64 kDa) were obtained, and one Hsp70-GST-fusion protein each was obtained from *M. arthritidis* (42 kDa) and *M. bovis* (32 kDa). Rabbit antisera raised against the two recombinant Hsp60 of *M. arthritidis* and against two chemically synthesized antigenic peptides reacted specifically with Hsp60-epitopes of mycoplasmas and other bacteria. Also, the recombinant Hsp60 and Hsp70 proteins were specifically detected by bovine and porcine convalescent sera reacting strongly in a whole cell lysate based immuno blot.

The heat shock response of *M. hyopneumoniae* during infection was characterized using bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from *M. hyopneumoniae* infected pigs and healthy controls. Upon one- and two-dimensional gel electrophoresis protein profiles were determined using autoradiography and Western blotting with Hsp60 specific antibodies. It was shown that BALF from *M. hyopneumoniae* infected pigs induced a definite increase of Hsp60 expression even in comparison to cells that had been subjected to a heat shock treatment commonly used as a positive control.

Schlagworte: Mykoplasmen, Hsp, Sequenzierung, rekombinante Hsp60, BALF

Keywords: mycoplasmas, hsp, sequence, recombinant hsp60, BALF

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Schrifttum	2
2.1	Mykoplasmen	2
2.1.1	Molekularbiologische Aspekte der Mykoplasmen	5
2.1.2	Taxonomie	8
2.1.2.1	Taxonomie der Mykoplasmen.....	8
2.1.2.2	Taxonomische Untersuchungen	14
2.2	Hitzeschockproteine	16
2.2.1	Regulation der Hitzeschockantwort	20
2.2.2	Immunologische Bedeutung von Streßproteinen	23
2.2.3	Hitzeschockproteine bei Mykoplasmen.....	25
2.3	Bronchoalveoläre Lavage – Technik, Inhaltsstoffe, Möglichkeiten	26
2.4	Ziel der Untersuchungen	29
3	Material und Methoden	30
3.1	Chemikalien und Reagenzien.....	30
3.2	Geräte und Hilfsmittel	33
3.3	Verbrauchsmaterialien.....	35
3.4	Auswertungs-Software	35
3.5	Universelle Pufferlösungen.....	37
3.6	Mikrobiologische Methoden	37
3.6.1	Bakterien	37
3.6.2	Nährmedien.....	38
3.6.3	Kulturbedingungen	40
3.7	Molekularbiologische Methoden	41
3.7.1	Präparation von chromosomaler DNA	41
3.7.1.1	Ernte der Zellen.....	41
3.7.1.2	DNA-Isolierung aus Mykoplasmen und gramnegativen Bakterien mit dem Nucleon-Kit II.....	42
3.7.2	Präparation von Plasmid-DNA.....	43
3.7.2.1	Miniprep	43

3.7.2.2	Midiprep	44
3.7.3	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	46
3.7.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA.....	47
3.7.4.1	Spektroskopische Reinheitsbestimmung	47
3.7.4.2	Bestimmung der DNA-Konzentration durch Fluoreszenz von Ethidiumbromid	47
3.7.5	Auswertung und Dokumentation der Agarose-Gelelektrophorese	48
3.7.6	Analyse chromosomaler DNA.....	49
3.7.6.1	DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion.....	49
3.7.6.2	Primer und amplifizierte Fragmente.....	50
3.7.6.3	Optimierung der Polymerase-Kettenreaktion	52
3.7.6.4	Mutagenese-PCR.....	53
3.7.6.5	Sequenzierung von PCR-Produkten.....	56
3.7.7	Analyse von Plasmid-DNA.....	57
3.7.7.1	Überprüfung potentieller Klone	57
3.7.7.2	Sequenzierung von Plasmid-DNA	58
3.7.8	Klonierungstechniken	59
3.7.8.1	Ligation	59
3.7.8.1.1	Restriktionsverdau der Produkte aus der Klonierungs-PCR	59
3.7.8.1.2	Vektoren.....	60
3.7.8.1.3	Ligationsansatz	61
3.7.8.2	Transformation	62
3.7.8.2.1	Kompetente Zellen	62
3.7.8.2.2	Transformationsansatz.....	63
3.7.9	Expression rekombinanter mykoplasmales Hsp60- und Hsp70- Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteine	64
3.7.9.1	IPTG-Induktion	64
3.7.9.2	Aufreinigung der GST-Fusionsproteine mittels Glutathion-Sepharose-4B	64
3.7.9.3	Aufreinigung der GST-Fusionsproteine mittels Aggregat-Präparation.....	66
3.8	Proteinchemische und immunologische Methoden.....	67
3.8.1	Antiseren und Konjugate	67
3.8.2	Kolonieblot	69
3.8.3	Antigenpräparation und Proteinbestimmung.....	70
3.8.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAGE)	71

3.8.4.1	Eindimensionale SDS-PAGE.....	71
3.8.4.1.1	Probenvorbereitung.....	72
3.8.4.1.2	Durchführung der Elektrophorese.....	72
3.8.4.2	Zweidimensionale SDS-PAGE	74
3.8.4.2.1	Probenvorbereitung.....	74
3.8.4.2.2	Durchführung der 1. Dimension.....	75
3.8.4.2.3	Durchführung der 2. Dimension.....	77
3.8.4.3	Nachweis der aufgetrennten Proteine.....	78
3.8.4.3.1	Silberfärbung.....	78
3.8.4.3.2	Coomassie-Blau-Färbung.....	80
3.8.4.3.3	Westernblot.....	81
3.8.4.3.4	Autoradiographie.....	84
3.8.4.4	Auswertung und Dokumentation der SDS-PAGE	84
3.8.5	Herstellung von Kaninchenseren gegen rekombinante <i>M. arthritis-</i> <i>Hsp60-GST-Fusionsproteine</i> und synthetische Peptide.....	85
3.8.5.1	Tiere.....	85
3.8.5.2	Antigenpräparationen	85
3.8.5.3	Immunisierungsschema.....	86
3.8.5.4	Aufreinigung der Kaninchenseren mit CNBr-aktivierter Sepharose.....	87
3.8.6	Rekonvaleszentenseren in der Reaktion mit rekombinanten mykoplasmalen Hsp60- und Hsp70-GST-Fusionsproteinen	88
3.9	Untersuchungen zur Regulation der Hsps	89
3.9.1	Induktion einer Hitzeschockantwort durch bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit	89
3.9.1.1	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit (BALF).....	89
3.9.1.2	Radioaktive Markierung mykoplasmales (Hitzeschock-) Proteine	89
4	Ergebnisse.....	91
4.1	Polymerase-Kettenreaktion: Amplifikationsprodukte und Sequenzierergebnisse.....	91
4.1.1	hsp60-Gen von <i>M. arthritis</i> , <i>M. agalactiae</i> , <i>M. bovis</i> und <i>M.</i> <i>hyopneumoniae</i>	91
4.1.2	hsp70-Genfragment von <i>M. arthritis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. agalactiae</i> und <i>M.</i> <i>hyopneumoniae</i>	93
4.2	Analyse der DNA-Sequenzen.....	93

4.2.1	Sequenzhomologien der hsp60-Gene von <i>M. arthritidis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. agalactiae</i> , und <i>M. hyopneumoniae</i>	93
4.2.2	Sequenzhomologien der hsp70-Genfragmente von <i>M. arthritidis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. agalactiae</i> und <i>M. hyopneumoniae</i>	97
4.2.3	Taxonomische Einordnung von <i>M. arthritidis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. agalactiae</i> und <i>M. hyopneumoniae</i> anhand der Sequenziererergebnisse	99
4.3	Klonierung und Expression	102
4.3.1	Aminosäure-Sequenzhomologien der Hsp von <i>M. arthritidis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. agalactiae</i> und <i>M. hyopneumoniae</i>	102
4.3.1.1	Hsp60-Proteine	102
4.3.1.2	Hsp70-Proteinfragmente	102
4.3.2	Klonierung und Expression zweier <i>hsp60</i> -Genabschnitte von <i>M. arthritidis</i>	110
4.3.3	Klonierung und Expression eines <i>hsp70</i> -Genfragmentes von <i>M. arthritidis</i> und <i>M. bovis</i>	110
4.3.4	Herstellung Hsp60-spezifischer Seren	111
4.4	Reaktion von Rekonvaleszentenseren mit rekombinanten Hsp60- und Hsp70-GST- Fusionsproteinen	122
4.5	Einfluß von bronchoalveolärer Lavage vom Schwein mit <i>M. hyopneumoniae</i> - und ohne <i>M. hyopneumoniae</i> -Infektion auf die Hitzeschockantwort von <i>M. hyopneumoniae</i>	125
5	Diskussion	132
6	Zusammenfassung	144
7	Literaturverzeichnis	146
8	Anhang	172

Abkürzungen

A	Adenin
A.	<i>Acholeplasma</i>
Ab.	<i>Actinobacillus</i>
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
A. dest.	lat.: Aqua destilata
B.	<i>Bacillus</i>
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
C.	<i>Clostridium</i>
CFU	engl.: colony forming unit (koloniebildende Einheit)
Da	Dalton
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytosin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
DNA	engl.: desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethandiamintetraacetat
ELISA	engl.: enzyme-linked immuno sorbent assay (enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
G	Guanin
GAM	engl.: goat-anti-mouse (Ziege-anti-Maus-Antikörper)
GAR	engl.: goat-anti-rabbit (Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper)
h	engl.: hour (Stunde)
i.E.	internationale Einheiten
IBA	Immuno-Binding-Assay
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal

i.v.	intravenös
kbp	1000 Basenpaare
kDa	1000 Dalton
<i>L.</i>	<i>Legionella</i>
M	Molarität (mol/l)
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
<i>Mb.</i>	<i>Mycobacterium</i>
min	Minuten
mol	relative Molmasse
NC	Nitrocellulose
OD	optische Dichte
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>
PBS	engl.: phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	engl.: polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pI	isoelektrischer Punkt
p.i.	lat.: post infectionem
RNAse	Ribonuklease
rRNA	engl.: ribosomal RNA (ribosomale RNA)
s.	siehe
s.c.	subcutan
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	engl.: second (Sekunde)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Pufferlösung aus Tris und EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylamin
T _a	Anlagerungstemperatur
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
Tris-HCl	Tris

tRNA	engl.: transfer-RNA (Transfer-RNA)
U	Uracil
UV	ultraviolett
[v/v]	engl.: volume per volume (Volumen pro Volumen)
[w/v]	engl.: weight per volume (Gewicht pro Volumen)
2D	zweidimensional

1 Einleitung

Hitzeschockproteine (Hsp) bzw. Streßproteine sind ubiquitär vorkommende, durch hohe Aminosäure-Sequenzhomologien gekennzeichnete Proteine, deren genetisches System eines der am stärksten konservierten Systeme in der Natur darstellt. Hsp werden infolge von verschiedenen Umwelteinflüssen (plötzliche Temperaturerhöhung, Änderung des pH-Wertes, Einwirkung von UV-Strahlung, reaktive Sauerstoffmetabolite, Schwermetalle, Ethanol und Nährstoffmangel), die für die Zelle „Streß“ bedeuten, neu oder vermehrt synthetisiert. Im Zellstoffwechsel haben die Hsp eine unterstützende Rolle in der Proteinfaltung und -entfaltung, in der Zusammenlagerung von Polypeptiden zu Makromolekülen, in der Prävention ungewünschter Protein-Protein-Interaktionen, aber auch in der Translokation von Polypeptiden über Zellmembranen.

Einige Vertreter der Hsp sind immundominante Antigene, d.h. sie sind Hauptangriffsziele von Antikörpern und T-Zellen bei vielen bakteriellen Infektionen. In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß durch Hsp eine protektive Immunität gegenüber solchen Infektionen induziert werden kann. Diese Ergebnisse regten die Diskussion über Hsp als Komponente einer Vakzine an. Die große Homologie in DNA- bzw. Aminosäuresequenzen der Hsp aller Organismen kann aber auch zur Kreuzreaktivitäten zwischen den ursprünglich gegen bakterielle Hsp gerichteten Antikörpern bzw. T-Zellen mit wirtseigenen Hsp führen, die sich letztlich in Autoimmunreaktionen manifestieren können.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des DFG-Projektes „Charakterisierung der Hitzeschockproteine von Mykoplasmen und Untersuchungen zu deren Bedeutung in der Pathogenese von Mykoplasmeninfektionen“ (Ru 459/2-1) durchgeführt. Ziel der Arbeit war es, die Hsp von *Mycoplasma (M.) arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* auf der Basis ihrer *hsp60*- und *hsp70*-Gene bzw. -Proteine zu charakterisieren und damit eine molekularbiologische Grundlage zur Aufklärung einer möglichen pathogenetischen Bedeutung von Hsp in den durch Mykoplasmen ausgelösten Erkrankungen zu schaffen.

2 Schrifttum

2.1 Mykoplasmen

Mykoplasmen sind durch degenerative Evolution aus grampositiven Eubakterien hervorgegangen und stellen die kleinsten sich selbst replizierenden Organismen dar (MANILOFF 1992). An ihre meist parasitische Lebensweise sind Mykoplasmen optimal angepaßt. Das Genom der Mykoplasmen gehört zu den kleinsten unter den Prokaryonten. Sie haben alle überflüssigen Zellstrukturen und -funktionen aufgegeben und werden daher häufig als Modellorganismus einer „Minimumzelle“ betrachtet und in wissenschaftlichen Studien eingesetzt (RAZIN 1992a).

Bedingt durch das Fehlen einer Zellwand besitzen Mykoplasmen eine pleomorphe Zellgestalt mit kokkoid-oiden bis filamentös-verzweigten und -unverzweigten Formen. Der Durchmesser der Mykoplasmenzelle reicht von 300 bis 850 nm. Mykoplasmen können eine Länge von bis zu 40 µm erreichen. Für ihre Ernährung und ihr Wachstum sind Mykoplasmen mit einer gegenüber anderen Prokaryonten reduzierten Anzahl an Stoffwechselsystemen ausgestattet. Plasmamembran, Ribosomen und ein doppelsträngiges Genom müssen als Zellorganellen ausreichen (RAZIN et al. 1992a, TULLY et al. 1993).

Die meisten Mykoplasmen sind unbeweglich. Einige Vertreter zeigen eine gleitende Bewegung auf flüssigkeitsbedeckten Oberflächen. Für einige Spezies wurden auch terminale Anheftungsstrukturen gefunden, wie beispielsweise das Adhesin P1, die die Zelle zur Anheftung an Kapseln oder eukaryontische Zellen befähigen (KIRCHHOFF 1992). Zusätzlich verfügen Mykoplasmen über sehr gut entwickelte Transportsysteme, um alle von der Umwelt bzw. vom Wirtsorganismus benötigten Nährstoffe effizient über die Cytoplasmamembran zu befördern (DUDLER et al. 1988, GILSON et al. 1988).

Die biosynthetisch stark eingeschränkten Mykoplasmen sind auf eine Vielzahl an Stoffen vom jeweiligen Wirtsorganismus angewiesen und leben, aufgrund ihrer stark reduzierten Zellfunktionen und ihres kleinen Genoms, idealerweise als Parasiten oder Kommensalen. Aminosäuren, Nukleinsäurevorläufer, Sterole, Lipide und Vitamine vom Wirt werden anabol verwertet (RODWELL 1983, MILES 1992). Die gängigen Möglichkeiten Energie nutzbar zu machen, wie z.B. der Tricarbonsäurezyklus oder die Elektronentransportkette, sind den Mykoplasmen nicht mehr zugänglich oder kommen nur in eingeschränkter Form vor (MANOLUKAS et al. 1988). So beschränkt sich die Möglichkeit der ATP-Gewinnung auf Glykolyse, Arginin-Hydrolyse, Oxidation von Pyruvat oder Lactat (MILES et al. 1988, RAZIN

1992a). Für die *in vitro* Kultivierung von Mykoplasmen werden daher komplexe Nährmedien benötigt, die Fettsäuren, teilweise Cholesterin (Serumkomponente), zur Energiegewinnung geeignete Kohlenhydrate, Pepton und Hefeextrakt enthalten (RAZIN 1981, FREUNDT 1983). Mykoplasmen wachsen in sehr kleinen Kolonien (< 1 mm), meist in der für sie typischen „Spiegeleiform“. Das dunkle Koloniezentrum entsteht durch Penetration der Zellen in den Agar, während der durchscheinendere Außenbereich von nur auf dem Agar wachsenden Mykoplasmen gebildet wird (HAYFLICK 1969). Einzelne Spezies wachsen in uniformen, granulären Kolonieformen auf festen Mediumoberflächen (z.B. *M. hyopneumoniae*) (RAZIN und TULLY 1984, TULLY et al. 1993).

Alle Vertreter der Gattung *Mycoplasma* sind Parasiten und als Kommensalen oder Krankheitserreger mit Vertebraten assoziiert (RAZIN und TULLY 1984, TULLY et al. 1993). Sie besiedeln dabei hauptsächlich die Schleimhautoberflächen des Respirations- und Urogenitaltraktes und Gelenke, sind aber auch in Augen und Milchdrüse zu finden. Normalerweise sind Mykoplasmen extrazelluläre Erreger, einige Vertreter, wie z.B. *M. penetrans* und *M. gallisepticum*, wurden intrazellulär nachgewiesen (LO et al. 1992). Fast alle Spezies zeigen eine Wirts- und Gewebespezifität; einige Ausnahmen (*M. arginini*, *M. salivarium*) besiedeln verschiedene Wirte (RAZIN und FREUNDT 1984, RAZIN 1992a).

Neben den zur Normalflora gehörenden Kommensalen, verursacht eine Reihe von pathogenen Mykoplasmenspezies Erkrankungen, die selten tödlich sind, sondern sich in chronischen Infektionen manifestieren (RAZIN, 1992a). Dabei spielt die Membranoberfläche der Bakterien eine große Rolle. Sie stellt den Kontakt zur Umwelt her und interagiert mit den Wirtszellen (BOVÈ 1993). Über die jeweils vorhandenen Adhärenzstrukturen werden unterschiedliche Wirtszellen besiedelt. Die Membranoberflächen unterliegen einer großen Variabilität ihrer Oberflächenproteine, die die Pathogenität des Parasiten entscheidend beeinflusst. Anhand solcher Mechanismen kann z.B. die Immunantwort des Wirtes unterlaufen werden (RAZIN 1978, FELDNER et al. 1982, YOGEV et al. 1993, BEHRENS et al. 1994, BEHRENS et al. 1996).

Durch Mykoplasmen hervorgerufene Infektionen führen in der Landwirtschaft und bei Labortieren zu großen wirtschaftlichen Verlusten. In der Regel erkranken die Tiere an Mastitiden, Arthritiden, Pneumonien und damit verbundenen anderen Entzündungskrankheiten, die nur unzureichend therapierbar sind (SIMECKA et al. 1992). Beim Menschen lösen sie Bronchitiden und atypische Pneumonien oder Erkrankungen im Urogenitaltrakt aus. Außerdem konnten Mykoplasmen in Verbindung mit dem Auftreten verschiedener Erkran-

kungen wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis (HAKKARAINEN et al. 1992, RUNGE et al. 1997) isoliert werden.

Verschiedene Pathogenitätsfaktoren und Schädigungen des Wirtsgewebes werden als potentielle Virulenzmechanismen der Mykoplasmen diskutiert (COLE et al. 1968, VINCZE et al. 1975, HOWARD und TAYLOR 1978, GEARY et al. 1981, SIMECKA et al. 1992, TRYON und BASEMAN 1992, RAZIN 1992a, HEINRICH et al. 1993, COLE und GRIFFITH 1993, SU et al. 1993):

Aufzählung entnommen aus GUMMELT (1995):

1. Adhärenzstrukturen zur Anheftung an die Wirtszelle (Tip-Organell der Mykoplasmen und Sialoglycorezeptor auf der Wirtszelle bei *M. gallisepticum* und *M. pneumoniae*, Cytadhesin bei *M. hominis*)
2. Kapselstrukturen (*M. genitalium*, *M. hyopneumoniae* u. a.)
3. Nährstoffentzug und Zerstörung der Membranfunktion der Wirtszelle durch direkten Membrankontakt
4. Schädigung der Zellen durch Stoffwechselprodukte und Enzyme der Mykoplasmen wie H_2O_2 , Superoxidradikale, Phospholipasen, Proteasen und Nukleasen
5. Toxinproduktion (*M. bovis*, *M. mycoides*, *M. gallisepticum*)
6. Kreuzreaktionen mit Wirtsgewebe, die zu Autoimmunerkrankungen führen können
7. Bildung von Superantigenen und damit Induktion einer Autoimmunantwort (*M. arthritidis*-Mitogen)
8. Variabilität des Phänotyps und somit Beeinflussung des Pathogenitätspotentials, Umgehung des Immunsystems
9. Unwirksamkeit der Immunantwort des Wirtes durch Freisetzung löslicher Antigene, fehlende Antikörperbildung (sterische Hemmung durch sehr enge Verbindung zur Wirtszelle), nicht vorhandene mykoplasmazide Antikörper und fehlende Opsonisierung (verhindert Phagozytose)

In dieser Arbeit wurden die Mykoplasmenspezies *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* als für die Veterinärmedizin relevante Spezies und *M. arthritidis* als Modellorganismus der Polyarthrititis (*M. arthritidis*-Polyarthrititis der Ratte) untersucht.

M. bovis ist in Deutschland der wichtigste mykoplasmale Erreger von Rinderkrankheiten. Bei Kälbern verursacht er oft Pneumonien und Arthritiden, bei Kühen mit hoher Milchleistung hingegen meist Mastitiden, wobei nach Ausbruch der Krankheit die Milchleistung innerhalb weniger Tage auf nur einige Milliliter absinkt. Das abgesonderte Sekret ist nun milchig-sämig

bis blutig-eitrig oder eine klare, molkeartige Flüssigkeit mit Gewebefetzen. Die Euter schwellen an und stellen sich nach 3-4 Wochen selbst trocken. Die Ausbreitung des Erregers erfolgt in Gelenke, Reproduktions- und Respirationstrakt. Dort verursacht er Arthritiden, Aborte und Pneumonien (PFÜTZNER 1984). Aus einer zumeist katharrhalischen Pneumonie kann sich durch Sekundärinfektionen, meist mit Pasteurellen oder Aktinomyzeten, eine eitrig-pneumonie entwickeln. Bei Bullen wurden in Folge von *M. bovis* Infektionen Genitalerkrankungen und die Herabsetzung der Spermienmotilität, -konzentration und -penetrationsfähigkeit beobachtet. Zwischen dem Zeitpunkt der Infektion und dem Ausbruch der Krankheit können lange Zeiträume (Jahre) liegen (PFÜTZNER 1984, KIRCHHOFF und BINDER 1986, URBAN et al. 1989).

M. agalactiae verursacht bei Schafen und Ziegen, wie *M. bovis* beim Rind, Pneumonien, Arthritiden und Mastitiden bzw. Agalaktien (DAMASSA et al. 1992, REAL et al. 1994). Die Mastitiden und Agalaktien führen zu großen Verlusten in vielen Gebieten Europas, in denen diese Tiere in sehr großen Herden gehalten werden (COTTEW 1985). Zusätzlich treten bei den Tieren noch Keratokonjunktivitis und Vulvovaginitis auf.

M. hyopneumoniae ist der beim Schwein weltweit am weitesten verbreitete Erreger (WHITTLESTONE 1985). Die durch *M. hyopneumoniae* als Primärerreger hervorgerufene Enzootische Pneumonie ist eine der verlustreichsten Schweineseuchen (schlechte Mast- und Futterleistung) (FRIIS 1975, KIRCHHOFF 1988, STIPKOVITS 1990). Nach anfänglichem Husten kommt es im Verlauf der Erkrankung zu Veränderungen der Alveolarwände. Weitere Keime wie beispielsweise Pasteurellen können sich so leichter und vermehrt ansiedeln und führen schließlich zu einer interstitiellen Pneumonie (KOBISCH et al. 1993).

M. arthritidis verursacht eine Polyarthritiden bei Ratte und Maus, die experimentell auch beim Kaninchen ausgelöst werden kann (WASHBURN et al. 1980, KIRCHHOFF et al. 1983). Die *M. arthritidis*-Polyarthritiden der Ratte wurde für viele Studien zur Rheumatoiden Arthritis des Menschen herangezogen (KIRCHHOFF et al. 1989a, b). Das volle Krankheitsbild der Polyarthritiden beinhaltet Gelenkschwellungen aller vier Extremitäten, Rötungen und hohe Schmerzempfindlichkeit (COLE und WARD 1979, KIRCHHOFF et al. 1983, KIRCHHOFF und RUNGE 1998).

2.1.1 Molekularbiologische Aspekte der Mykoplasmen

In Übereinstimmung mit ihren reduzierten Zellfunktionen besitzen Mykoplasmen ein im Vergleich zu anderen Prokaryonten sehr kleines Genom, dessen Größe abhängig von

Spezies und Stamm zwischen 577 (*M. genitalium*) und 1380 kbp (*M. mycoides* sp. *mycoides* LC) liegt (NEIMARK und LANGE 1990, TULLY et al. 1993). Das Genom besteht aus einem zirkulären, doppelsträngigen DNA-Molekül, das für ca. 400-500 Gene kodiert (MUTO 1987). Auffällig ist bei den Mykoplasmen der hohe A+T-Anteil in Kontroll- und Spacerregionen, der den durchschnittlichen G+C-Anteil auf nur 23-40 mol% senkt (RAZIN 1992a, TULLY et al. 1993).

Die Replikation des Genoms erfolgt unidirektional und semikonservativ und geht zumeist von einigen an die Membran gebundenen Startpunkten aus. Mykoplasmen vermehren sich durch binäre Spaltung, wobei die zytoplasmatische Teilung und die Genomreplikation nicht synchron verlaufen, so daß zuerst „vielkernige“ Filamente entstehen, die erst später in Einzelzellen zerfallen (RAZIN 1981).

Nur wenige Mykoplasmen besitzen eine Polymerase mit Exonukleaseaktivität, und auch der Elongationsfaktor Tu kommt nur in einer Kopie bei den Mykoplasmen vor. Die bei *M. pulmonis* nachgewiesenen Exonukleasen ermöglichen der Zelle die Aufnahme von Vorstufen von Nukleinsäuren und erlauben das Überleben im Wirtsorganismus (RAZIN 1978, RAZIN 1985).

Die Hälfte der 400-500 Gene sind essentiell für die DNA- und RNA-Synthese sowie für die Proteinsynthese. Die sehr stark konservierten ribosomalen Gene liegen im Gegensatz zu anderen Prokaryonten meist nur in einer, manchmal auch in zweifacher Kopie vor. Im Gegensatz dazu besitzen *Bacillus (B.) subtilis* 10 und *Escherichia (E.) coli* sieben rRNA-Operons. Dennoch besteht kein Zusammenhang zwischen der Genomgröße und der Anzahl der rRNA-Operons (BOVÈ 1993). Die mykoplasmalen rRNA-Gene sind in einem Operon immer in der Reihenfolge 5' - 16S / 23S / 5S - 3' angeordnet und umfassen im Gegensatz zu anderen Prokaryonten nicht noch zusätzlich die tRNA-Gene. Diese liegen einzeln oder in Clustern vor, wobei jede tRNA-Spezies zumeist von einem Gen kodiert wird (im Vergleich: *M. capricolum*: 30 tRNA-Gene für 29 tRNAs; *B. subtilis*: 51 tRNA-Gene für 31 tRNAs, *E. coli*: 78 tRNA-Gene für 48 tRNAs) (RAZIN 1985, ANDACHI et al. 1987, MUTO 1987, BOVÈ 1993).

Die Translation der Mykoplasmen unterscheidet sich in einigen Punkten von der der anderen Eubakterien. *M. capricolum* stehen in der Translation nur 28 Anticodons gegenüber 39 Anticodons bei *E. coli* zur Verfügung. Daraus ergibt sich die Frage, wie dann die 61 Aminosäure-kodierenden Codons gelesen werden können. Beispielsweis wird Leucin durch die vier Codons CUU, CUC, CUA und CUG kodiert (= Box der Leucin-Familie), die sich nur in ihrer letzten Base unterscheiden. Bei *E. coli* und *B. subtilis* lesen drei tRNAs mit teilweise

modifizierten Basen in ihren Anticodons diese Box. Demgegenüber wird dies bei Mykoplasmen von einer einzigen tRNA (UAG) bewerkstelligt. Dieses Anticodon besitzt keine modifizierte Base an ihrer 1. Position und kann somit alle vier Basen an der 3. Position des Codons „wobbeln“. Allgemein sind bei Mykoplasmen weit weniger Modifikationen in den tRNAs als bei anderen Eubakterien zu finden (13 Modifikationen bei *M. capricolum* im Vergleich zu 23 bei *E. coli*) (RAZIN 1985, BOVÈ 1993). Zwischen dem geringen G+C-Gehalt der Mykoplasmen und der Codon-Nutzung besteht eine direkte Korrelation. Mykoplasmen benutzen zu ca. 90% Codons mit einem A oder T an der 3. Position, andere Eubakterien bedienen sich dieser Codons nur bis zu 4% (OSAWA et al. 1990).

Der Gebrauch des universellen Codes unterscheidet sich bei allen Mollicutes, mit Ausnahme von *Acholeplasma (A.) laidlawii*, von den übrigen Prokaryonten. So fungiert die allgemein übliche UGA-Sequenz nicht als Stop-Codon, sondern kodiert für Tryptophan (CITTI et al. 1988, TANAKA et al. 1989). Das CCG-Codon, das sonst für Arginin steht, wird aus Mangel an der entsprechenden tRNA nicht erkannt („nonsense-codon“) (BOVÈ 1993). Die Expression von klonierten Mykoplasmengenen, z.B. in *E. coli*, wird daher durch vorzeitigen Abbruch der Proteinsynthese erschwert.

Untersuchungen zeigten innerhalb der Gattung *Mycoplasma* sehr hohe Mutationsraten. Neben den hochkonservierten Genen wie rRNA-Genen, ATP-Operon, EF-Tu-Gen, Hsp-Genen usw. wurde in den verbleibenden Genbereichen große genetische Diversität festgestellt. Mögliche Ursachen scheinen in diesen Organismen die teilweise fehlenden Reparatursysteme, der niedrige G+C-Gehalt und die nicht-konservative Replikation zu sein. Zusätzlich kann es durch Plasmide, Bakteriophagen und Insertionselemente zu Veränderungen des genetischen Materials kommen (FERRELL et al. 1989, HERRMANN 1992).

Noch häufiger als Mutationen treten bei Mykoplasmen regulierte Veränderungen der Antigenexpression und des Phänotyps, vor allem ihrer Oberflächenproteine auf. Diese Veränderungen beruhen auf Modifikationen in Strukturgenen für Proteine, die durch Sequenzänderungen (während der Replikation) in regulatorischen Elementen verursacht werden (SEIFERT und SO 1988). Diese Sequenzänderungen werden durch Rekombinationen, Deletionen oder Insertionen ausgelöst und oft durch bestimmte Genprodukte reguliert. Werden dabei bestimmte Komponenten bzw. Phänotypen reversibel an- und abgeschaltet spricht man von Phasenvariation (SEIFERT und SO 1988). Ein Beispiel für ein solches System sind die Vlp- bzw. Vsp-Proteine von *M. hyorhina*, *M. pulmonis* und einigen anderen Mykoplasmen (WISE et al. 1992, YOGEV et al. 1993, CLEAVINGER et al. 1994, BEHRENS et al. 1996). Diese amphiphilen Membranproteine besitzen stark repetitive Strukturen und variieren in ihrer Größe durch Änderungen in der Anzahl dieser Motive. Das

Vlp-System besteht aus den Genen *vlpA*, -B und -C, lokalisiert in einem Gencluster. Jedes Gen besteht dabei aus drei Regionen: (1) der N-terminalen Domäne, die stark konserviert und für die Verankerung des Lipoproteins in der Membran verantwortlich ist, (2) dem relativ divergenten Mittelbereich und (3) der C-terminalen Domäne, die eine periodische Polypeptidstruktur an diesem Ende schafft. Die Größenvariation der Vlps wird über die Periodenanzahl der C-terminalen Domäne erzeugt. Diese Fähigkeit zur Phasenvariation bietet den entsprechenden Organismen viele Vorteile zur optimalen Anpassung an neue Umweltbedingungen und führt zu der Besiedlung neuer ökologischer Nischen bzw. dem Überleben in einem immunkompetenten Wirt (SIMECKA et al. 1992, RAZIN 1992a, BOVÈ 1993, DROESSE et al. 1995).

2.1.2 Taxonomie

2.1.2.1 Taxonomie der Mykoplasmen

Aufgrund mangelnder experimenteller Methoden zur Determination der Physiologie oder Genetik der Zellen, konnten Mykoplasmen lange Zeit phylogenetisch nicht eingeordnet werden. Das erste Mykoplasmen-Nomenklatorsystem stammt aus dem Jahre 1941 von SABIN. Er bezeichnete alle dem Erreger der bovinen Pleuropneumonie ähnelnden Organismen als „pleuropneumonia-like-organisms“ (PPLO's). EDWARD und FREUNDT entwickelten 1956 das Klassifikationssystem weiter und definierten die Ordnung *Mycoplasmatales* mit der Familie der *Mycoplasmataceae* und der Gattung *Mycoplasma* mit insgesamt 15 Spezies. Wiederholt wurde das System durch neue Ordnungen, Familien und Gattungen erweitert und erlangte letztlich den Status einer Klasse, die *Mollicutes* (=Weichhäuter). Prokaryonten dieser Klasse zeichnen sich durch geringe Zellgröße, kleines Genom mit geringem G+C-Gehalt, fehlende Zellwand, hohe Nährstoffansprüche und die Passierfähigkeit von bakteriendichten Filtern aus.

1970 nach der Entwicklung von molekularen Methoden zur Untersuchung der Evolution waren erste Rekonstruktionen des bakteriellen phylogenetischen Verwandtschaftsbaumes möglich. Bei Mykoplasmen werden zwei Modelle diskutiert:

- 1) basierend auf den Vorstellungen aus den 30er Jahren (nämlich, daß Mykoplasmen nichts anderes als eine stabile L-Phasen-Variante von Bakterien darstellen) postulierte NEIMARK (1973), daß sich Mykoplasmen grundsätzlich durch degenerative Evolution entwickelt haben. Zuerst fand also die Evolution und Diversifikation der Bakterien statt und

anschließend entstanden verschiedene Mykoplasmenspezies auf der Basis verschiedener Zweige des phylogenetischen Verwandtschaftsbaumes der Bakterien. NEIMARK folgerte daraus, daß die verschiedenen Mykoplasmenspezies untereinander nicht verwandt sind.

2) MOROWITZ und WALLACE (1973) erklärten Mykoplasmen zu Vorläufern der Bakterien. Diese „Urformen“ entstanden sehr früh in der Evolution lebender Formen. Die im Vergleich zu den Mykoplasmen viel größeren Bakteriengenome sollten durch Duplikationen der kleinen Mykoplasmeng Genome entstanden sein.

Ende der 70er Jahre entwickelten WOESE und MANILOFF (MANILOFF et al. 1978) ein neues, auf molekularbiologischen Untersuchungen basierendes Modell. Erste Untersuchungen wurden von MANILOFF und Mitarbeitern (1978) anhand der 16S rRNA-Gene von vier Mykoplasmenspezies, die die Gattungen *Acholeplasma*, *Spiroplasma* und *Mycoplasma* repräsentierten, im Vergleich zu Daten anderer Mikroorganismen durchgeführt. Mit den Ergebnissen stellten sie ein neues Modell zur Evolution der Mykoplasmen auf: (1) der mykoplasmale phylogenetische Verwandtschaftsbaum ist monophyletisch, (2) Mykoplasmen leiten sich phylogenetisch von einem Zweig der grampositiven Eubakterien mit geringem G+C-Gehalt ab und (3) die mykoplasmale Phylogenie läßt sich durch eine hohe Evolutionsrate charakterisieren. Seitdem wurde die nahe Verwandtschaft der Mykoplasmen zu den grampositiven Bakterien immer wieder bestätigt; so ähneln sich die Organismen unter anderem auch in ihrer Fettsäurenkomposition (GOLDFINE 1982), ihren rRNA- und tRNA-Sequenzen (HORI et al. 1981, ANDACHI et al. 1987) und ihren Methylierungsvorgängen (HSUCHEN und DUBIN 1980).

Nach der Methode von SAITON und NEI (SAITOU und NEI 1987) wurde ein neuer phylogenetischer Verwandtschaftsbaum für die Mykoplasmen erstellt (Abb. 1 u. 2). Hierbei gilt für alle Spezies, daß sie durch degenerative Entwicklung aus der grampositiven *Bacillus-Lactobacillus*-Gruppe hervorgegangen sind und sich in die sechs Gattungen *Asterole*-, *Anaero*-, *Achole*-, *Spiro*-, *Myco*- und *Ureaplasma* unterteilen lassen. Innerhalb dieser Gruppe weisen sie eine besonders enge Verwandtschaft mit einer kleinen Clostridien-Gruppe auf, die durch *C. innocuum* und *C. ramnosum* repräsentiert wird (WOESE et al. 1980, ROGERS et al. 1985, WEISBURG et al. 1989).

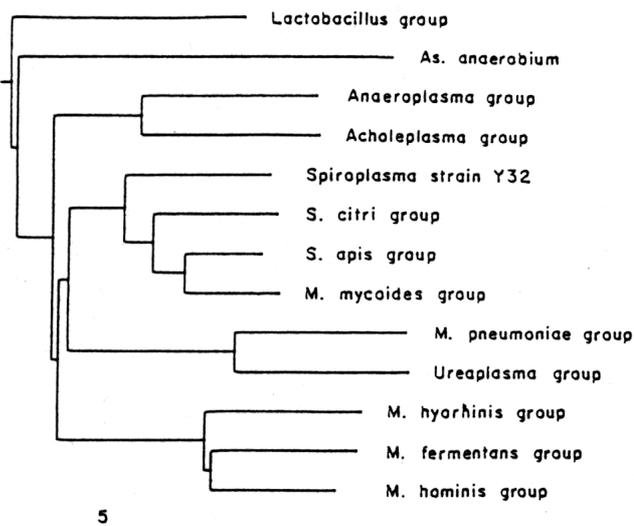


Abb. 1: Taxonomische Position der Mykoplasmen auf der Basis von 16S rRNA-Analysen (MANILOFF 1992)

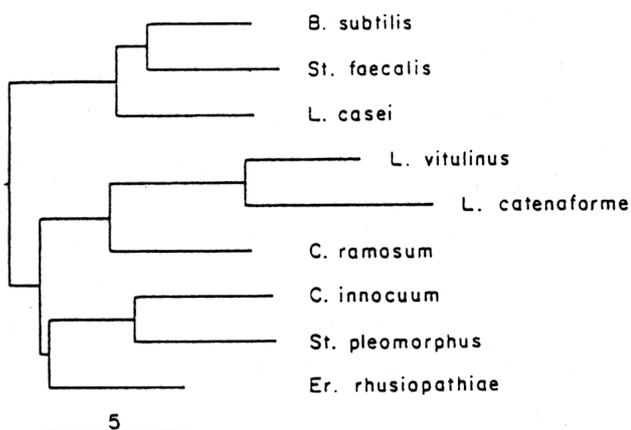


Abb. 2: Taxonomische Position der *Lactobacillus*-Gruppe auf der Basis von 16S rRNA-Analysen (MANILOFF 1992)

WOESE et al. (1980) postulierten nach ihren ersten Untersuchungen des 16S-rRNA-Gens den Ursprung der Gattung *Mycoplasma* in drei voneinander unabhängigen Linien des Spiroplasmazweiges und unterteilten diese anhand der erhaltenen Daten in sechs Gruppen: *M. hyorhinis*-, *M. fermentans*-, *M. hominis*-, *M. pneumoniae*-, *Ureaplasma*- und *M. mycoides*-Gruppe. 1989 wurden diese Arbeiten von WEISBURG et al. erweitert, indem sie 16S-rRNA-Analysen von 50 Mykoplasmenarten und eng verwandten grampositiven Bakterien erstellten. Ähnlich wie schon WOESE et al. (1980) unterteilten sie die Mykoplasmen in sechs Gruppen, deren sechste Gruppe verschiedene grampositive Bakterien enthält (Abb. 3 und 4a-4e).

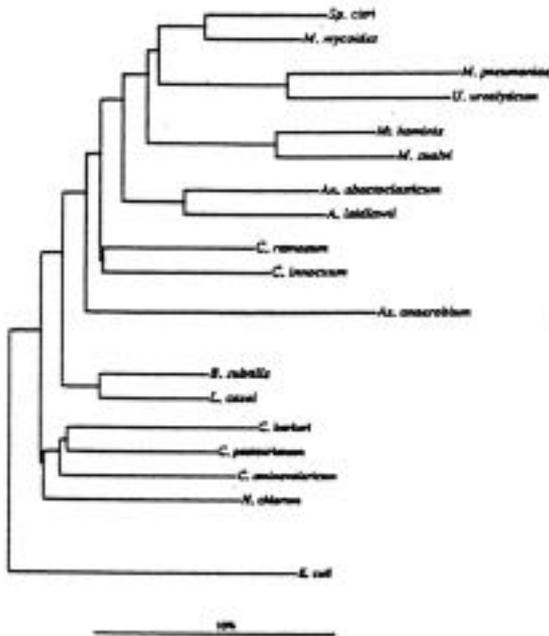


Abb. 3: Taxonomische Position der *Mollicutes* und ihrer Verwandten mit Zellwand (WEISBURG et al. (1989))

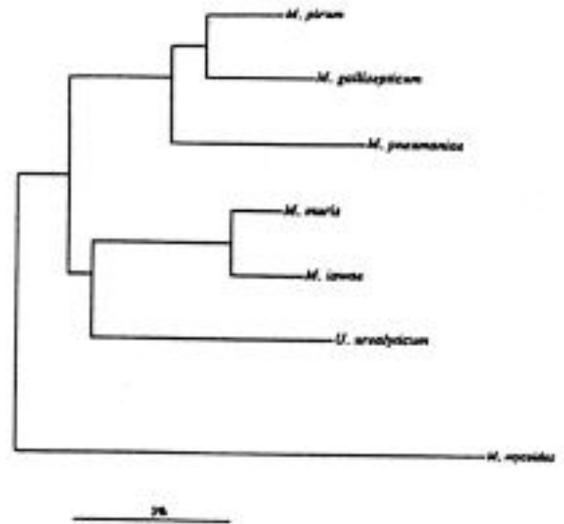


Abb. 4a: Taxonomische Position innerhalb der Pneumoniae-Gruppe (WEISBURG et al. (1989))

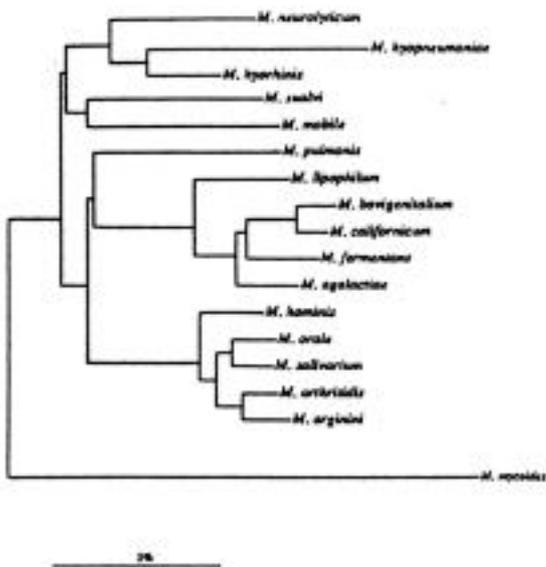


Abb. 4b: Taxonomische Positionen innerhalb der *Hominis*-Gruppe (WEISBURG et al. (1989))

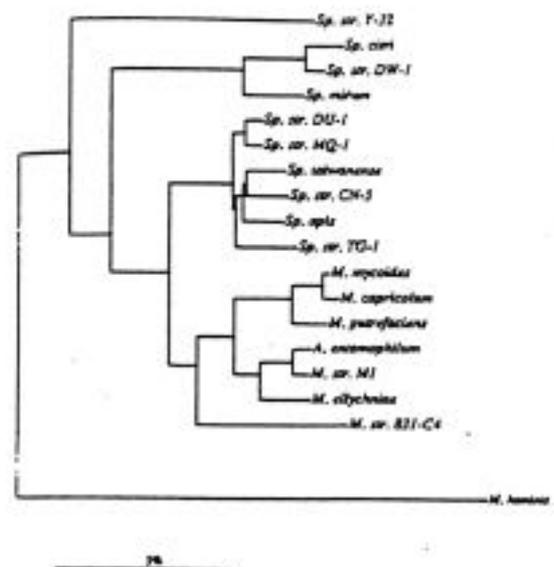


Abb. 4c: Taxonomische Positionen innerhalb der *Spiroplasma*-Gruppe (WEISBURG et al. (1989))

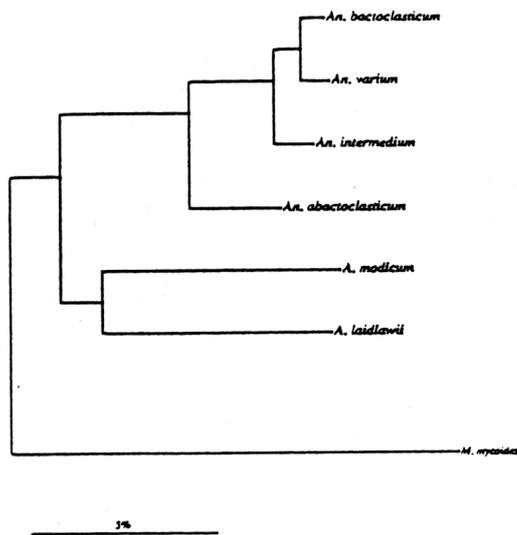


Abb. 4d: Taxonomische Positionen innerhalb der *Anaeroplasma*-Gruppe (WEISBURG et al. 1989)

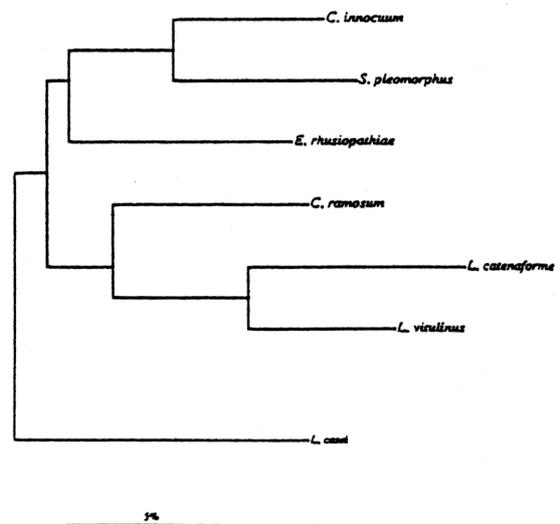


Abb.4e: Taxonomische Positionen innerhalb der Verwandten mit Zellwand (WEISBURG et al. 1989)

1993 schlugen TULLY et al., gemäß der Richtlinien des „International Committee of Systematic Bacteriology (ICSB)“ die zur Zeit gültige, revidierte Taxonomie der Klasse *Mollicutes* vor. In einem gemischten taxonomischen System wurden phänotypisch übereinstimmende Organismen an phylogenetische Linien angegliedert oder in diese eingefügt (z.B. Hinzunahme eines monophyletischen Arthropoden-assoziierten Clusters als neue Ordnung *Entomoplasmatales*, mit den Familien *Entomoplasmataceae* und *Spiroplasmataceae*). Die Klasse *Mollicutes* wurde trotz ihrer polyphyletischen Abstammung als Klasse beibehalten (Tab. 1 nach RAZIN et al. 1998).

Tab. 1: Taxonomietabelle der Klasse *Mollicutes* (RAZIN et al. 1998)

Klassifikation	Anzahl bekannter Spezies	G+C-Gehalt [mol%]	Genomgröße [kbp]	Cholesterinbedarf	Vorkommen	weitere Eigenschaften
Ordnung I <i>Mycoplasmatales</i>						
Familie I <i>Mycoplasmataceae</i> Gattung I <i>Mycoplasma</i>	102	23-40	580-1350	ja	Mensch, Tier	Wachstum bei 37°C
Gattung II <i>Ureaplasma</i>	6	27-30	760-1170	ja	Mensch, Tier	Harnstoffhydrolyse
Ordnung II <i>Entomoplasmatales</i>						
Familie I <i>Entomoplasmataceae</i> Gattung I <i>Entomoplasma</i>	5	27-29	790-1140	ja	Insekten, Pflanzen	Wachstum bei 30°C
Gattung II <i>Mesoplasma</i>	12	27-30	870-1100	nein	Insekten, Pflanzen	Wachstum bei 30°C
Familie II <i>Spiroplasmataceae</i> Gattung I <i>Spiroplasma</i>	33	24-31	780-2200	ja	Insekten, Pflanzen	Wachstum bei 30-37°C helikale Filamente
Ordnung III <i>Acholeplasmatales</i>						
Familie I <i>Acholeplasmataceae</i> Gattung I <i>Acholeplasma</i>	13	26-36	1500-1650	nein	Tier, einige Insekten u. Pflanzen	Wachstum bei 30-37°C
Ordnung IV <i>Anaeroplasmatales</i>						
Familie I <i>Anaeroplasmataceae</i> Gattung I <i>Anaeroplasma</i>	4	29-34	1500-1600	ja	Rind- oder Schafspansen	sauerstoffsensitive Anaerobier
Gattung II <i>Asteroleplasma</i>	1	40	1500	nein		

2.1.2.2 Taxonomische Untersuchungen

Die Taxonomie der Prokaryonten beruht heute im Gegensatz zu früheren künstlichen Systematiken auf ihren natürlichen Verwandtschaftsverhältnissen. Zwei Taxonomiesysteme werden heute unterschieden, (1) die phänetische Taxonomie, in der die Organismen anhand phänotypischer Eigenschaften klassifiziert werden und (2) die phylogenetische Taxonomie, die eine Gliederung der Organismen entlang ihrer natürlich entstandenen entwicklungsgeschichtlichen Linie vollzieht (RAZIN 1992b).

In der phänetischen Klassifizierung werden die Mikroorganismen nach ihrer Pathogenität, ihren Lebensräumen und morphologischen Merkmalen wie Zellform und -anordnung, Anfärbbarkeit, Sporenbildung und Geißelinsertion spezifiziert. Für eine möglichst detaillierte Untergliederung werden zusätzlich die Faktoren Kultivierungsbedingungen, Möglichkeiten der Energiegewinnung, physiologisch-biochemische und serologische Eigenschaften, Pigmentierung, Zellwand- und Lipidzusammensetzung, Antibiotikaresistenzen und homologe Antigene herangezogen. Die Klassifizierung der Bakterien erfolgt durch möglichst viele dieser phänotypischen Merkmale, die durch eine „+/-“-Bewertung prozentuale Ähnlichkeiten zwischen den Mikroorganismen ergeben und deren Eingruppierung ermöglichen. Neue Isolate lassen sich auf diese Weise relativ gut differenzieren und in bestehende Gruppen einordnen (DICE 1945, COSTAS et al. 1987, SCHLEGEL 1992, BROCK und MADIGAN 1994). Eine phänotypische Einordnung der Mykoplasmen wird durch das konforme Erscheinungsbild der Zellen erschwert, so daß vorwiegend Methoden zur Differenzierung aufgrund von Zellproteinen und Antigenen Anwendung finden (Auftrennung der Proteine in der 1D-/2D-SDS-PAGE und Detektion im Westernimmunoblot oder durch Gesamtproteinfärbung). Durch den Mangel an phänotypischen Merkmalen und durch die Antigen- und Phasenvariationen der Mykoplasmen ist es schwer, diese Organismen genau einzuordnen. Phänotypische Systematiken sind häufig unvollständig oder polyphyletisch, d.h. Organismen eines Clusters gehen auf verschiedene Entwicklungslinien zurück (WEISBURG et al. 1989). Moderne Klassifikationssysteme sollten eine einfache und eindeutige Differenzierung unter Berücksichtigung phylogenetischer Zusammenhänge ermöglichen. WOESE et al. (1980) postulierten für die Mykoplasmen einen Phylogenievergleich auf molekularer Ebene. Dieser Vergleich sollte auf der Basis von DNA- und Proteinsequenzen und ihren Mutationen während der Evolution erfolgen. Die Wissenschaftler erarbeiteten fünf Kriterien, die ein zum Phylogenievergleich geeignetes Gen erfüllen sollte (MANILOFF 1992):

(1) ubiquitäres Vorkommen, (2) gleichartige Funktion des Genproduktes, d.h. gleicher evolutionärer Druck, (3) Ausschluß lateralen Transfers, (4) möglichst stabile Zufallsmu-

tationen und (5) vollständige Sequenzierung und Isolierung. Die rRNA-Untereinheiten-Gene erfüllen diese Voraussetzungen, wobei das 16S-rRNA-Gen (1540 b) heute als Basis für die phylogenetische Taxonomie von Bakterien dient. Das 16S-rRNA-Gen setzt sich aus unterschiedlich stark konservierten Regionen zusammen, die sich sowohl zur Analyse tiefgehender genetischer Ereignisse, als auch zur Untersuchung von kürzlichen genetischen Veränderungen eignen. Immer häufiger werden Isolate hauptsächlich nach ihrer 16S-rRNA-Sequenz und nicht mehr nach phänotypischen Eigenschaften in das bestehende System eingeordnet (LAIGRET et al. 1990, STEMKE et al. 1992, NAMBA et al. 1993, PETTERSON et al. 1994).

Neben den 16S-rRNA-Analysen finden weitere molekularbiologische Methoden, die sich ebenfalls auf bestimmte Genomsequenzen stützen, Anwendung. Genomgrößen und -kartierungen können durch Pulsfeld-Gelelektrophorese, Renaturierungskinetiken und durch die Erstellung von Restriktionskarten anhand der im Restriktionsenzymverdau gewonnen Profile ermittelt werden (GRAU et al. 1991). Die Häufigkeit des Vorkommens und die Größe bestimmter Genbereiche werden mit Hilfe von DNA-Hybridisierungssonden oder PCR-Primern und anschließender elektrophoretischer Auftrennung überprüft. Ausgewählte Genbereiche werden sequenziert und auf ihre Homologie hin überprüft. Je nachdem, ob möglichst viele Bakterien eingeordnet, oder, ob eng verwandte Bakterien voneinander differenziert werden sollen, werden entweder hochkonservierte Gene (rRNA-, tRNA-Gene, ATPase-Operon u.a.) oder variable Genregionen gewählt, die spezifisch für den entsprechenden Organismus sind (DE BUYSER et al. 1992, TAYLOR et al. 1992, TOTH et al. 1994). Für einen phylogenetischen Vergleich von Spezies bzw. zu deren Definition wird die Homologie zwischen ihren Gesamtgenomsequenzen prozentual ermittelt. Die Genome der beiden Spezies werden hierfür zur Hybridisierung gebracht und der Anteil an komplementären Sequenzen bestimmt. Weisen Bakterien in einer solchen Hybridisierung mehr als 70% Homologie auf, werden sie derselben Spezies zugeordnet. Homologiewerte von 60-70% weisen auf eine Subspezies hin und eng verwandte Spezies besitzen noch 20-60% Hybridisierungsübereinstimmungen (SAILLARD et al. 1990, LEACH et al. 1993). Für eine sinnvolle Differenzierung sind diese phylogenetischen Parameter alleine aber unzureichend, und so wird die Spezieszuordnung ergänzt durch den Vergleich der phänotypischen Eigenschaften, der Lebensraumzugehörigkeit und der Pathogenität. Bakterien, die aufgrund der genetischen Definition einer Spezies angehören, können so als zwei getrennte Spezies geführt werden, oder Bakterien, die gleiche phänotypische Eigenschaften aufweisen, werden trotz mangelnder genetischer Homologie einer Spezies zugeordnet. Auch die Gruppierung der einzelnen

Spezies basiert vorwiegend auf phänotypischen Merkmalen, eine phylogenetische Definition existiert bisher nicht (RAZIN 1992b).

2.2 Hitzeschockproteine

Eine Streßantwort wurde 1962 erstmals von RITOSSA nachgewiesen. Bei seinen Arbeiten an isolierten Zellen der großen Speicheldrüse von *Drosophila melanogaster* entdeckte er Puffbildungen an deren Riesenchromosomen nach einer Temperaturerhöhung von 25 auf 30°C. Daß dabei neben der Puffbildung gleichzeitig die Synthese von großen Mengen bestimmter Proteine erfolgt, wurde von TISSIERES und Mitarbeitern (TISSIERES et al. 1974) erkannt. Sie gaben diesen Proteinen ihren heute noch gebräuchlichen Namen „Hitzeschockproteine (Hsp)“.

Hitzeschockproteine sind ubiquitär vorkommende, hochgradig konservierte Proteine, die durch eine Vielzahl von Streß- bzw. Umweltstimuli neu oder vermehrt synthetisiert werden (PELHAM 1988, KAUFMANN 1989, CRAIG et al. 1993). Seit Ende der 70er Jahre sind viele dieser Faktoren wie die Änderung des pH-Wertes und der Einfluß von Ethanol, UV-Strahlung, reaktive Sauerstoffderivate, Schwermetalle, Viren oder auch Nährstoffmangel untersucht worden und haben den umfassenderen Begriff der Streßproteine geprägt (NEIDHARDT et al. 1984, LINDQUIST 1986, KAUFMANN 1990). Ende der 70er Jahre wurden Hsp auch bei *E. coli*, Hefen und Hühnerfibroblasten nachgewiesen; mittlerweile sind Hsp bei allen bisher untersuchten Organismen bekannt (LEMEAUX et al. 1978, FINK und ZEUTER 1978, KELLY und SCHLESINGER, 1978, McALISTER und FINKEL 1980).

Bei der Hitzeschockantwort, die eines der am höchsten konservierten genetischen Systeme darstellt, handelt es sich um einen allgemeinen Zellmechanismus, der sowohl bei Pro- als auch Eukaryonten vorkommt (YOUNG und ELLIOT 1989). Die Vielzahl an Hsp und das breite Spektrum der induzierend wirkenden Streßfaktoren lassen darauf schließen, daß die Synthese der Hsp dem grundlegenden Schutz der Zelle und der Abwehr dient. Mittlerweile sind weit über 20 verschiedene Hsp bekannt, die anhand ihrer Molekularmasse verschiedenen Familien zugeordnet werden: die Hsp90, Hsp70, Hsp60-Familie und die Familie der kleinen Hsp (SCHUMANN 1993). Sogenannte "heat shock cognate proteins", die konstitutiv oder nur in bestimmten Entwicklungsphasen synthetisiert werden, werden auch zu den Hsp gezählt, da sie eine hohe Sequenzhomologie zu diesen aufweisen (LANGER und NEUPERT, 1991).

Die Bezeichnung der Hitzeschock- bzw. Streßproteine richtet sich nach ihrer Molekular-

masse, der die Abkürzung "Hsp" vorangestellt wird. Ausnahmen bilden die Hsp einiger Bakterien, besonders von *E. coli*. Diese Proteine wurden schon Anfang der 70er Jahre nachgewiesen, aber erst viel später als Hsp identifiziert. Aus historischen Gründen sind heute meist noch die damaligen Bezeichnungen HtpG (Hsp90), DnaK (Hsp70) und GroEL (Hsp60) üblich (GEORGOPOULOS und HERSKOWITZ 1971).

Hsp und die mit ihnen verwandten Proteine erfüllen auch in Abwesenheit von Stress wichtige physiologische Funktionen in der Zelle. Ihrer Rolle im Zellstoffwechsel entsprechend, werden Hsp oft als Chaperone bezeichnet, also als begleitende, andere Polypeptide unterstützende Proteine. Die Proteine der Hsp90-, Hsp70- und Hsp60-Familie assistieren bei der Proteinfaltung und -entfaltung sowie bei der Zusammenlagerung von Polypeptiden zu Makromolekülen. Proteine der Hsp70-Familie ermöglichen die Translokation bestimmter Proteine über intrazelluläre Membranen (KAUFMANN 1990, CRAIG et al. 1993). Jedes Hsp scheint mit einer Vielzahl an Proteinen zu interagieren, wobei die große Anzahl an "Kontaktadressen" möglicherweise evolutionären Veränderungen entgegenwirkt (KAUFMANN 1990).

Hsp70

Die Hsp70-Proteine kommen im Cytoplasma, Zellkern und endoplasmatisches Reticulum sowie in den Mitochondrien und Chloroplasten vor (MUNRO und PELHAM 1986, CRAIG et al. 1989). Sie stellen hochkonservierte Stressproteine dar, die innerhalb der Eukaryoten auf Ebene der Aminosäuren Homologien bis zu 98% zeigen. Diese Homologien reichen unter den Prokaryoten bis zu 70%, im Vergleich zwischen Pro- und Eukaryoten werden immer noch Werte bis zu 50% erreicht (LINDQUIST und CRAIG 1988, CRAIG et al. 1993). Die N-terminale Domäne des Proteins mit ATP-Bindungsstelle und ATPase-Aktivität ist dabei stärker konserviert als das C-terminale Ende, das auf Aminosäurenebene nur knapp 30% Homologie aufweist. Diese vermeintlich geringe Homologie der carboxyterminalen Domäne lässt sich durch ihre Funktion als Peptidbindungsstelle, erklären. Je nach dem „Aufgabengebiet“ des entsprechenden Hsp70-Vertreters unterscheiden sich auch die Proteinstrukturen, die mit dem Hsp interagieren (CRAIG und JACOBSEN 1985, GETHING und SAMBROOK 1992, BOORSTEIN et al. 1993).

Zu den Funktionen des bereits konstitutiv gebildeten Hsp70 gehört die Unterstützung bei der Faltung bzw. Entfaltung von Proteinen, die Stabilisierung solcher neu entstandenen Proteinstrukturen und das Verhindern unproduktiver Protein-Protein-Wechselwirkungen. Bei Eukaryoten gibt es zusätzlich Hilfestellung bei der posttranslationalen Translokation von Proteinen über Membranen wie die des Endoplasmatischen Reticulums (ER) oder der Mitochondrien (PELHAM 1986, ROTHMAN 1989, CRAIG et al. 1993). Die Interaktion von

Hsp70 mit den betreffenden Proteinen ist durch eine wiederholte Assoziation und ATP-abhängige Dissoziation beider Reaktionspartner geprägt. Herrscht in der Zelle ATP-Mangel, bleibt, wie im Fall von Zellstreß, das Protein an das Hsp70 gebunden. Bei der Dissoziation wird ATP zu ADP und P_i umgesetzt und das Hsp70 ändert seine Konformation (STRAUS et al. 1990, GEORGOPOULUS et al. 1991, LIBEREK et al. 1991b).

Das cytoplasmale Hsp70 ist ein Teil des für einen fehlerlosen Ablauf der Translation erforderlichen „Zellapparates“. Durch seine Bindung an die an den Ribosomen neu entstehenden Polypeptidketten wird das vorzeitige Falten dieser Stränge verhindert. Die Polypeptidkette wird an das Hsp60 „weitergereicht“, das dann die entgültige Faltung zum Protein bzw. die Zusammenlagerung zu Makromolekülen unterstützt (CRAIG et al. 1993).

Das Hsp70 vom Endoplasmatischen Reticulum und von den Mitochondrien und Chloroplasten erfüllt eine sehr wichtige Aufgabe bei der posttranslationalen Translokation von Proteinen über die entsprechenden Zellmembranen. In einem ATP-abhängigen Prozeß werden zunächst die Tertiär- und Sekundärstrukturen aufgelöst. Die so entfalteten, sogenannten Precursor-Proteine binden an das cytosolische Hsp70, das die degenerierten Proteine für die Dauer der Translokation stabilisiert. Die in den Organellen lokalisierten Hsp70 binden an das aminoternale Ende des Proteins sobald es die Membran passiert hat und verhindern so den Rücktransport des denaturierten Proteins (CRAIG et al. 1993).

Die Synthese der Hsp70 wird bei *E. coli* im Gegensatz zu der Multigenfamilie der Eukaryonten von nur einem Gen, dem *dnaK*, codiert. Das Protein DnaK wird auch konstitutiv exprimiert und ist in großen Mengen im Cytoplasma vorhanden. Für das prokaryontische DnaK konnte eine gleich große Affinität wie für das Hsp70 der Eukaryonten gegenüber denaturierten Proteinen nachgewiesen werden, so daß Modelle zur Funktion der Hsp von Eukaryonten auch auf Prokaryonten übertragbar zu sein scheinen. Gestützt wird diese Theorie durch die entscheidende Rolle von DnaK bei dem molekularen Mechanismus der Reaktivierung von hitzebehandelter RNA-Polymerase (LANGER et al. 1992). Die Reaktion von DnaK kann nur durch das Zusammenwirken mit zwei weiteren kohärenten Hitzeschockproteinen, DnaJ und GrpE, wirkungsvoll und zielgerecht erfolgen. Eine direkte Bindung von DnaJ an DnaK unterstützt dessen ATPase-Aktivität; GrpE ermöglicht die Dissoziation des entstandenen ADP. Die ATPase-Aktivität des DnaK kann durch konzertiertes Zusammenwirken dieser drei Proteine um das bis zu Fünzigfache gesteigert werden (LIBEREK et al. 1991a, FRANCELLA und RENSING 1994).

Hsp60

Hsp60-Proteine wurden im Cytosol von Bakterien und in Chloroplasten und Mitochondrien der Eukaryonten nachgewiesen (BARRACLOUGH und ELLIS 1980, McMULLIN und HALLBERG 1988). Wie alle anderen Hsp unterliegen sie einem hohen Konservierungsgrad, der sich in Aminosäurehomologien von bis zu 60% zwischen prokaryontischem und humanem Hsp60 zeigt. Das Hsp60 zählt zu den „common antigens“, also zu den immundominanten Antigenen vieler Bakterien und Parasiten (VAN EDEN 1990, SHINNIK 1991).

1972 wurde das erste Protein aus der Hsp60-Familie von *E. coli* von GEORGOPOULUS und seinen Mitarbeitern isoliert. Die Synthese eines 60 kDa (GroEL) und eines 10 kDa (GroES) großen Proteins war essentiell für den Zusammenbau von Phagenartikeln. Später wurden die Beteiligung von Hsp60 an ATP-abhängigen Faltungsprozessen von Polypeptiden sowie deren Zusammenlagerung zu Makromolekülen und deren Translokation beschrieben (CHENG et al. 1989). Bei Pflanzen wurde von BARRACLOUGH und ELLIS 1980 im Stroma ein Hsp60-homologes Protein nachgewiesen, das an der fehlerlosen Faltung der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase entscheidend beteiligt ist. Auch alle folgenden Hsp60-Isolierungen und -Charakterisierungen ordneten die Proteine der Hsp60-Familie der molekularen Chaperone zu. Hsp60 wird allerdings als „Chaperonin“ bezeichnet, da es zwar in Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten, jedoch nicht im Cytosol eukaryontischer Zellen vorkommt (GETHING 1997). Den Hsp60-Proteinen wird eine essentielle Bedeutung bei der Faltung und Entfaltung von Proteinen und deren Zusammenlagerung zu oligomeren Strukturen zugeschrieben. Entscheidend ist aber auch das Verhindern von unproduktiven Proteininteraktionen. Die molekulare Struktur des Hsp60 / GroEL ist die eines Homodecatamers aus zwei übereinanderliegenden Heptamerringen. Durch wiederholtes Binden unterstützt das Hsp60 den Aufbau der dreidimensionalen Struktur des entsprechenden Proteins. Wie im Falle von Hsp70 wird die Energie, die das Chaperonin zu seiner Dissoziation benötigt, durch die Hydrolyse von ATP zur Verfügung gestellt, die nur in Abwesenheit von GroES erfolgen kann (CRAIG et al. 1993, WELCH 1993). An *E. coli* konnte gezeigt werden, daß die Synthese des konstitutiv gebildeten Hsp60 in Stresssituationen um das vier- bis fünffache gesteigert werden kann. GroEL und GroES sind für das Wachstum der Bakterien bei allen Temperaturen essentiell. Das weist auf elementare Funktionen dieser Proteine in den Zellprozessen hin (BUKAU 1993).

2.2.1 Regulation der Hitzeschockantwort

Alle bisher untersuchten Organismen zeigten eine Regulation der Hitzeschockantwort auf der Transkriptionsebene. Der Mechanismus der Regulation unterscheidet sich zwischen Pro- und Eukaryonten, aber auch zwischen grampositiven und -negativen Bakterien (FRACELLA und RENSING 1994). Für GroEL konnten bei mehreren eukaryontischen Spezies zwei bis fünf Gene nachgewiesen werden. Die genetische Regulation erfolgt bei allen Organismen durch einen positiven Aktivator der Transkription (SCHUMANN 1993). Die regulativen Hauptakteure der in der Modulation der Hitzeschockgene aktiven Proteine gehören der „DnaK-Chaperon-Maschine“ (DnaK mit seinen Co-Chaperonen DnaJ und GrpE) oder der GroE-Chaperon-Maschine (GroEL mit seinem Co-Chaperonin GroES) an (MORIMOTO et al. 1994, GETHING 1997) an.

Gramnegative Bakterien wie *E. coli* regulieren die Expression der meisten Hitzeschockgene positiv über einen alternativen Sigma-Faktor und negativ über die DnaK-Chaperon-Maschine. Bereits Anfang der 70er Jahre konnten die Hitzeschockgene *dnaK*, *dnaJ* und *groE* identifiziert werden, Anfang der 80er Jahre wurde ein alternativer Sigma-Faktor (Sigma³² anstatt Sigma⁷⁰) entdeckt. Kodiert im *rpoH*-Gen (**R**NA-**P**olymerase **H**itze) bindet dieser Sigma-Faktor an die Core-RNA-Polymerase und dirigiert diese an den entsprechenden Promotor, der vor dem Hitzeschockgen liegt (BUKAU 1993). Mittlerweile sind etwa 35 Gene beschrieben worden, die unter der positiven Kontrolle von Sigma³² stehen, die zum Sigma³²-Regulon zusammengefaßt werden. Die Regulation der Hitzeschockantwort bedarf aber zusätzlicher Komponenten. Neben dem alternativen Sigma³²-Faktor sind die Konzentration an denaturierten Proteinen und die DnaK-Chaperon-Maschine entscheidend. Bei physiologischen Temperaturen ist nur wenig verfügbares aktives Sigma³² im Cytosol vorhanden, da die meisten Moleküle von der DnaK-Chaperon-Maschine gebunden und anschließend vermutlich proteolytisch abgebaut werden. Ist die Zelle Stressfaktoren ausgesetzt, erhöht sich die Menge an Sigma³² um das 15- bis 20-fache, bedingt durch eine steigende Translationsrate und eine Verlängerung der Halbwertszeit von 45 sec auf bis zu 5 min für diesen Faktor (SCHUMANN 1997). Die Variabilität der Translationsrate entsteht durch eine Sekundärstruktur auf RNA-Ebene, die zwischen dem Startcodon und der Ribosomenbindungsstelle der Sigma³²-mRNA ausgebildet ist. Diese Sekundärstruktur führt dazu, daß die Sigma³²-mRNA von der ribosomalen 30S-Untereinheit nicht erkannt wird. Unterliegt die Zelle einem Hitzeschock, kommt es vermutlich zum „Aufschmelzen“ dieser Sekundärstruktur, gefolgt von einer effizienten Translation. Untersuchungen deuten auf ein Protein hin, daß zur Stabilisierung der Sekundärstruktur bzw. zum „Aufschmelzen“ beiträgt

und wahrscheinlich durch das DnaK-System moduliert wird. Das "Abschalten" der Hitzeschockantwort (nach 8-10 min) erfordert die Interaktion der Hitzeschockproteine DnaK, DnaJ und GrpE, die an den Sigma³²-Faktor binden und seine Wechselwirkung mit der RNA-Polymerase verhindern (YURA et al. 1993). Neben Sigma³² existieren noch weitere Hitzeschock-Gengruppen, die unter der Kontrolle von alternativen Sigma-Faktoren stehen (MISSIAKAS und RAINA 1997, MODEL et al. 1997).

Beim Modellorganismus der grampositiven Bakterien, *B. subtilis*, werden die Hitzeschockgene in drei Klassen eingeteilt (HECKER et al. 1996):

1. Gene des *dnaK*- und *groE*-Operons

Die Hitzeschockantwort ist nur durch Hitze und Ethanol induzierbar und die exprimierten Proteine werden als spezifische Streßproteine bezeichnet.

2. Gene des Sigma^B-Regulons

Die Hitzeschockantwort ist durch weitere Streßfaktoren induzierbar und die exprimierten Proteine werden als generelle Streßproteine bezeichnet.

3. restliche Hitzeschockgene

wie bei Punkt 2.

Das *dnaK*-Operon von *B. subtilis* ist heptacistronisch (*hrcA-grpE-dnaK-dnaJ-orf35-orf50-orf28*) und das größte bisher gefundene DnaK-Operon (HOMUTH et al. 1997). Das *hrcA*-Gen codiert für den negativen Regulator des Operons. Das *groE*-Operon von *B. subtilis* ist wie bei allen bisher untersuchten Organismen bicistronisch, bestehend aus *groES* und *groEL*. Bei *B. subtilis* konnten keine vergleichbaren alternativen Sigma-Faktoren nachgewiesen werden. 1992 fanden WETZSTEIN et al. eine zwischen dem Promotor und dem ersten Gen des *hsp*-Operons gelegene palindrome Sequenz, die regulatorische Eigenschaften zu besitzen schien. Für alle *dnaK*- und *groE*-Operons wurde diese CIRCE genannte Sequenz (CIRCE: controlling inverted repeat of chaperone expression) gefunden, die aus einem 9 bp langen „inverted repeat“ mit einer 9 bp langen Spacerregion besteht (TTAGCACTC-N9-GAGTGCTAA), und eine der am höchsten konservierten DNA-Sequenzen bei Prokaryonten ist (NARBERHAUS und BAHL 1992). Die CIRCE-Sequenz liegt zwischen potentiellm Transkriptions- und Translationsstart und scheint als cis-aktive Sequenz bei der Regulation dieser Operons zu fungieren. Bei diesem Regulationsmodell wirkt die CIRCE- Sequenz als negatives cis-Element, das von seinem Gegenspieler, dem trans-Element, einem Repressorprotein, auf der Transkriptionsebene beeinflusst wird. Bei diesem trans-Element handelt es sich um *hrcA* (*hrcA*: heat regulation at circe) aus dem *dnaK*-Regulon (YUAN und WONG

1995, MOGK et al. 1997). Die Modulation dieses Repressorproteins erfolgt weder durch die DnaK-Chaperon-Maschine, wie bei dem alternativen Sigma³²-Faktor, noch konnte ein zusätzliches spezie-spezifisches Protein gefunden werden. In der Zelle sind vielmehr die aktive und inaktive Form des HrcA in einem Gleichgewicht vorhanden, das durch die Proteine des *groE*-Systems in Richtung der aktiven Form des Repressormoleküls verschoben werden kann. In seiner aktiven Form kann der Repressor an den Operator binden und die Transkription unterbinden. Die *groE*-Proteine wirken also als negative Regulatoren der Hitzeschockantwort. Mehrere Möglichkeiten sind denkbar, wie das GroE-System die aktive Form erzeugt: (1) es kann die Faltung des HrcA beeinflussen, (2) es kann für die Oligomerisierung des HrcA notwendig sein oder (3) es kann HrcA-Aggregate auflösen bzw. verhindern (SCHUMANN 1997).

Untersuchungen zeigten, daß der Regulationsmechanismus über die cis-aktive CIRCE-Sequenz und seinem trans-Repressorelement HrcA weiter verbreitet zu sein scheint als der alternative Sigma³²-Faktor. Beide Elemente konnten schon in einer Vielzahl von Bakterien beschrieben werden, so auch bei *M. pneumoniae* und *M. genitalium*. Bei einigen Bakterien-spezies konnten sogar beide Hauptmechanismen zur Regulation der Hitzeschockgene nachgewiesen werden, wobei das *dnaK*-Operon der Kontrolle von Sigma³² und das *groE*-Operon der Kontrolle des HrcA-CIRCE-Systems unterliegt. Weshalb einige Bakterien beide Mechanismen zur Regulation der Hitzeschockantwort besitzen, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es liegt die Vermutung nahe, daß abhängig von der Art der Stressoren verschiedene Signale an die Zelle weitergegeben werden, die entweder vom DnaK- oder vom GroE-System erkannt werden (SCHUMANN 1997).

Eukaryontische Zellen besitzen ein sogenanntes Hitzeschock-Element (HSE), einen DNA-Abschnitt stromaufwärts des Promotors der jeweiligen Hitzeschockproteine (MORIMOTO 1993). Im "ungestreßten" Zustand liegt das Aktivatorprotein, der Hitzeschock-Faktor (HSF), monomer und inaktiv im Cytoplasma und im Zellkern vor. Befindet sich die Zelle im "gestreßten" Zustand, wird die Transkription der Hsp durch den HSF, der an das Hitzeschock-Element bindet, induziert. Der HSF wird unter Einwirkung von Stressoren durch das Zusammenlagern zu Trimeren aktiviert und akkumuliert im Zellkern. Die Reaktionskette der HSF-Aktivierung unterliegt einer streßabhängigen Modulation durch Phosphorylierung und wird über Proteine der Hsp70-Familie an- und abgeschaltet. Der HSF wird mit Hilfe dieser Proteine in seiner monomeren Form gehalten und erst bei Streßsignalen freigegeben (CLOS et al. 1990, ABRAYAYA et al. 1992). Kommt es z.B. zu einer Temperaturerhöhung, wird die damit einhergehende Konzentration an denaturierten Proteinen durch Hsp70 erkannt. Monomeres HSF und denaturiertes Protein konkurrieren nun um das Hsp70, woraufhin sich

das Reaktionsgleichgewicht immer mehr auf die Seite des monomeren HSF verschiebt. In seiner trimeren Form aktiviert der HSF die Produktion weiterer Hitzeschockproteine. Nachdem der Großteil an denaturiertem Protein wieder "zurückgefaltet" wurde, bindet das nun vermehrt frei werdende Hsp70 wieder an den HSF und verschiebt das Gleichgewicht wieder in Richtung der monomeren Form (SORGER 1991, MORIMOTO 1993).

2.2.2 Immunologische Bedeutung von Streßproteinen

Im Gegensatz zur der allgemeinen Annahme, daß hoch konservierte Proteine schlechte Immunogene darstellen, sind manche Hitzeschockproteine, wie z.B. das Hsp65 von *Mycobacterium (Mb.) tuberculosis*, immundominante Antigene (SHINNIK et al. 1988, YOUNG et al. 1988a, b). In Versuchen mit monospezifischen Antikörpern wurden Hsp als die Hauptangriffsziele des Immunsystems bei vielen bakteriellen Infektionen identifiziert (FRANCELLA und RENSING 1994). Mikroorganismen synthetisieren Hitzeschockproteine vermutlich, um sich vor den schädigenden Einflüssen der Immunabwehr des Wirtes zu schützen (FIELDS et al. 1986). Die Hitzeschockproteine können von Makrophagen prozessiert werden. Da die aktivierten Makrophagen diese Mikroorganismen jedoch meist schnell abtöten, führt eine solche Infektion in der Regel lediglich zur Stimulation von T-Zellen gegen die präsentierten Streßproteine, nicht aber zum Ausbruch einer Erkrankung. Zu einem späteren Zeitpunkt sind diese T-Zellen dann in der Lage von Mikroorganismen infizierte und Hsp-präsentierende Makrophagen schnell zu erkennen und weitere Abwehrmechanismen zu mobilisieren (KAUFMANN 1989). Entdeckt wurde die diesbezüglich sehr wichtige Rolle der Hsp bei Untersuchungen von *Mb. tuberculosis* und *Mb. leprae* Infektionen (SHINNIK et al. 1988, YOUNG et al. 1988a). Bei mit *Mb. tuberculosis* infizierten Mäusen zeigte sich, daß 20% der CD4⁺-T-Lymphozyten ausschließlich das bakterielle Hsp60 erkennen (EMMRICH et al. 1986, KAUFMANN et al. 1987). Dieses Streßprotein zählt zu den sogenannten „common antigens“, also zu Antigenen, die unabhängig von ihrer verwandtschaftlichen Beziehung bei einer Vielzahl von Prokaryonten vorhanden sind und vom Wirt erkannt werden (SHINNIK et al. 1988). Aus welchen Gründen sind Hsp als Hauptziele der primären Immunantwort so attraktiv? Sie sind (1) während der Streßsituation „Infektion“ in relativ hoher Konzentration in der Zelle vorhanden und sie zeigen (2) eine besondere Antigenität, da sie der Prozessierung und anschließenden Präsentation durch Moleküle der MHC-Komplexe besonders zugänglich sind. Das immunologische Gedächtnis für die kreuzreaktiven Determinanten der Hsp wird schon früh im Leben angelegt und durch eine Vielzahl verschiedener Infektionen ständig

restimuliert. Im Falle einer bakteriellen Infektion ist somit eine schnelle erste Immunantwort gewährleistet (YOUNG und ELLIOT 1989).

Aufgrund des hohen Konservierungsgrades und der ubiquitären Verbreitung der Hsp kann es zu Kreuzreaktionen von Antikörpern mit körpereigenen Hsp kommen. Die Gefahr der Erkennung eines Selbst-Epitops durch gegen bakterielle Hsp-Antigene gebildete Antikörper ist immer gegeben (MURRAY und YOUNG 1992). Hsp werden aus diesem Grund als mögliche Auslöser von Autoimmunerkrankungen diskutiert. Ihre Rolle bei diesen Erkrankungen konnte bisher aber nicht eindeutig geklärt werden.

Die Rheumatoide Arthritis ist eine chronisch proliferierende, entzündliche Reaktion in Synovial-Membranen, für die ein Autoimmunprozeß verbunden mit T-Lymphozyten verantwortlich ist (HOLOSHITZ et al. 1983). Untersuchungen ergaben, daß reaktive T-Zellen ein 65 kDa großes Antigen - das Hsp60 - von *Mb. tuberculosis* erkennen. LAMB et al. (1989) wiesen eine Reaktion polyklonaler T-Zellen aus Filtraten von Synovialflüssigkeit mit Hsp60/70 von Mykobakterien und *E. coli* bzw. mit dem Hsp70 des Menschen nach. Bei einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen wurden bei den Patienten erhöhte Antikörpertiter gegen Hsp60 und Hsp70 dokumentiert. Reaktive T-Lymphozyten gegen körpereigene Hsp sind aber auch in gesunden Individuen nachweisbar (LAMB et al. 1989). Aufgrund welcher Prozesse der Wechsel von reaktiven T-Lymphozyten gegen körpereigene Hsp, die vom Immunsystem toleriert werden, zu aggressiven, autoreaktiven T-Zellen ausgelöst wird bzw. warum diese T-Zellen nicht der klonalen Deletion unterliegen, ist noch weitgehend unklar. Ein neuerer Ansatz versucht diese Daten mit einem Modell der Immunüberwachung zu erklären (KOGA et al. 1989, YOUNG und ELLIOT 1989). Eine ganze Reihe von T-Zell-Typen erkennt hochkonservierte Hsp-Determinanten, die verschiedene immunologische Aufgaben erfüllen. Dieser Pool an Lymphozyten wird schon während des Etablierens der Haut- und Darmflora induziert und bietet dem Immunsystem die Möglichkeit, schnell auf die verschiedensten Erreger zu antworten. Selbstreaktive T-Zellen helfen auch bei der Beseitigung von gestreßten Zellen, Tumorzellen oder Zellen mit intrazellulärem „Bakterienbefall“. Das Potential einer Autoreaktivität ist aber immer präsent. Die „normalen“ Zellen entkommen einer Eliminierung durch Expression substimulatorischer Mengen der entsprechenden Streßprotein-Determinanten auf ihrer Oberfläche oder durch intrazelluläre Lokalisation. In diesem Normalzustand der Zelle wird der Autoimmunreaktionsweg wahrscheinlich durch regulatorische immunologische Netzwerke unterdrückt (KAUFMANN 1990, COHEN und YOUNG 1991, VAN EDEN 1993).

2.2.3 Hitzeschockproteine bei Mykoplasmen

Hitzeschockproteine wurden bisher in allen untersuchten Organismen nachgewiesen. Es stellt sich die Frage, ob die Mykoplasmen, trotz ihres während der Evolution stark reduzierten Genoms, die Hsp-kodierenden Gene behalten haben. Dadurch, daß Mykoplasmen eine Art „Minimumzelle“ darstellen, könnte durch den Nachweis von mykoplasmalem Hsp die essentielle Rolle dieser Proteine einmal mehr verdeutlicht werden.

SONDERGARD-ANDERSEN et al. (1990) haben mit *M. pneumoniae*, *M. genitalium* und *M. fermentans* vergleichende Untersuchungen zu den „common antigens“ anderer Bakterien durchgeführt. Die Gesamtzelllysate dieser Spezies wurden nach Hitzeschock bei 40 oder 42° in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot charakterisiert. Als Antikörper dienten monospezifische Kaninchen-Antiseren gegen das „common antigen“ von *Legionella (L.) micdadei* bzw. von *Pseudomonas (Ps.) aeruginosa*. Das Antiserum gegen das „common antigen“ von *L. micdadei* reagierte mit den Gesamtzelllysaten der drei Mykoplasmenspezies, mit Proteinbanden bei 62 und 40 (nur *M. genitalium*) und 30 kDa (nur *M. fermentans*). Im Gegensatz zu den beiden anderen Mykoplasmenspezies konnte mit dem Antiserum gegen das „common antigen“ von *Ps. aeruginosa* bei *M. pneumoniae* ein ebenfalls 62 kDa großes Protein identifiziert werden.

DASCHER et al. (1990) untersuchten die Hitzeschockantwort von *A. laidlawii* K2 und JA1 sowie von *M. capricolum*. Ebenfalls nach Hitzeschock bei 42°C wurden die Kulturen im Immunoblot mit polyklonalen Antiseren, gerichtet gegen rekombinantes DnaK, nachgewiesen. Bei allen Spezies konnten Kreuzreaktionen dargestellt werden, wobei bei *A. laidlawii* K2 und JA1 fünf bzw. elf und bei *M. capricolum* sieben Hitzeschockproteinbanden charakterisiert werden konnten. Die Banden lagen in Bereichen von 66-68 kDa und 26-28 kDa. Da die Banden im höheren Molekularmassenbereich um ein Vielfaches intensiver als die Banden um 26-28 kDa waren, nahmen die Autoren an, daß das 66-68 kDa-Hsp immer in einer Basiskonzentration in der Zelle vorhanden ist, das 26-28 kDa-Hsp hingegen induziert gebildet wird.

DEITERS et al. (1994) versuchten bei *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. pulmonis*, *M. fermentans* und *M. pneumoniae* Hitzeschockproteine nachzuweisen. Nach Hitzeschock (Kontrollkulturen verblieben bei 32°C) wurden die Proteine der Kulturen anschließend in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot charakterisiert. Kaninchen-Antiserum gegen das Hsp60 von *Synechococcus* sp., das mit dem GroEL-Protein von *E. coli* reagiert, reagierte auch mit den untersuchten Mykoplasmenspezies im Molekularmassenbereich von 57-58 kDa. Der Nachweis von Hsp60 durch ein Antiserum gegen das Hsp60 von *M. pneumoniae* war nur bei

Lysaten von *M. pneumoniae* positiv. Es konnte damit eine Proteinbande bei 58 kDa nachgewiesen werden. Ein gegen das Hsp70 von *M. pneumoniae* gerichtetes Kaninchen-Antiserum reagierte dagegen mit fast allen untersuchten Mykoplasmenspezies. Diese Spezies scheinen ähnliche Epitopstrukturen zu besitzen. Diese Ergebnisse konnten von SCHERM (1996) in der zweidimensionalen Gelelektrophorese bestätigt werden. Wie auch schon DASCHER und MANILOFF (1992) vermuteten, scheinen die Hsp der Mykoplasmen, im Gegensatz zum GroEL und DnaK von *E. coli*, konstitutiv gebildet zu werden. Im Infektionsfall mit *M. pneumoniae* und *M. bovis* konnten in Patientenseren Antikörper gegen Hsp nachgewiesen werden. Hsp scheinen wichtige Antigen-Determinanten zu präsentieren. Der monoklonale *M. arthritidis* Antikörper A32, der auch mit Proteoglykanen der Ratte reagierte, band an das GroEL von *E. coli* und an Proteoglykane der Ratte, aber nicht an vergleichbare Proteine der Mykoplasmen (DEITERS et al. 1994). *M. arthritidis*, bakterielle Hsp und Proteoglykane aus Ratten scheinen also einen gemeinsamen Angriffspunkt zu besitzen, der als möglicher Auslöser für Autoimmunkrankheiten diskutiert wird. SCHRIDDE (1995) konnte die Ergebnisse der Arbeiten von DEITERS (1994) bestätigen, daß Mykoplasmen fähig sind Hsp zu synthetisieren.

VONSKI et al. (1992) haben in mehreren Mykoplasmenspezies die Expression von DnaK nachgewiesen. Das DnaK spielt in der Ausbildung der Immunantwort des Wirtes im Verlauf einer Infektion eine wichtige Rolle. Mittlerweile sind das Hsp60-Gen von *M. pneumoniae* und *M. genitalium* und das Hsp70-Gen von *M. pneumoniae*, *M. genitalium* und *M. capricolum* im Rahmen der Sequenzierprojekte des Gesamtgenoms dieser Spezies identifiziert und sequenziert worden. Wie andere Prokaryonten scheinen Mykoplasmen nur eine Kopie des jeweiligen *hsp*-Gens zu besitzen.

2.3 Bronchoalveoläre Lavage – Technik, Inhaltsstoffe, Möglichkeiten

Eine der zu diagnostischen und wissenschaftlichen Zwecken beim Schwein durchgeführten Untersuchungen der Lunge ist die bronchoalveoläre Lavage (BAL), die wie die Bronchoskopie unter Anästhesie durchgeführt wird (GANTER et al. 1990, KIPPER 1990). Mit Hilfe der Technik der bronchoalveolären Lavage steht Probenmaterial vom lebenden Tier zum spezifischen Erregernachweis und zu immunologischen oder cytologischen Untersuchungen zur Verfügung (GANTER et al. 1993).

Das narkotisierte Schwein wird in einer Hängevorrichtung fixiert und für die bronchoskopische Intervention in Narkose gelegt. Nach der Untersuchung der Trachea, Karina,

Bifurkation, der Hauptbronchien, der Segment- und Subsegmentbronchien mit Hilfe eines flexiblen Bronchoskops, wird die BAL durchgeführt. In der Regel wird physiologische Kochsalzlösung als Spülflüssigkeit mit geringer Reizwirkung eingesetzt (GANTER 1996). Die Sekretprobenabnahme erfolgt durch Instillation und anschließende Aspiration der Spülflüssigkeit. Das so gewonnene Lungensekret wird als bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) bezeichnet (HARTWIG 1994).

Die BALF fand bisher bei zytologischen (HARTWIG 1994, DELBECK 1995), biochemischen und mikrobiologischen (GANTER 1996) Untersuchungen der Lunge beim Schaf Anwendung. 1993 wandten GANTER et al. diese Probenentnahme und Untersuchungsmöglichkeit das erste Mal in der Routinediagnostik beim lebenden Schwein an. Die Analysen wurden hierbei immer im Vergleich zu Gewebeproben durchgeführt, wobei fast durchgängig eine höhere Nachweisrate bestimmter Bakterien in den BALFs erzielt wurde (KIPPER 1990). In einer Untersuchungsreihe von 89 an Pneumonie erkrankten Schweinen konnte *Actinobacillus (Ab.) pleuropneumoniae* im Immunfluoreszenztest bei 44 Tieren nachgewiesen werden, in parallel laufenden kulturellen Untersuchungen waren nur 5 Tiere *Ab.-pleuropneumoniae*-positiv (RUNGE et al. 1996). Die auf BALFs als Ausgangsmaterial entwickelte PCR für *M. hyopneumoniae* (BAUMEISTER et al. 1997) erzielte eine höhere Nachweisrate als kulturelle oder immunfluoreszenztechnische Verfahren. Untersuchungen der BALF erlauben somit quasi die Analyse der *in vivo* Situation des Patienten im bronchoalveolären Raum in einer weit sensitiveren Weise, als die bisher durch die alleinige Untersuchung von Lungengewebe praktizierten. Neben dem bronchoalveolären Keimspektrum sind mit der BAL auch Informationen über die Schleimhaut des Atemtraktes, über zytologische Parameter des Atemsekrets und über sekretorische Antikörper zu erhalten (GANTER et al. 1993). Ein Problem in der Gewinnung der BALF stellt die Kontamination mit Bakterien aus dem oberen Atemtrakt dar, die nicht ganz zu vermeiden ist (MEDURI und BASELSKI 1991) und den Nachweis von geringen Bakterienmengen im unteren Atemtrakt schwierig macht.

Das Keimspektrum der BALF gesunder Schweine setzt sich aus *E. coli*, *Klebsiella* sp., Staphylokokken, alpha-hämolyisierenden Streptokokken, Mikrokokken, *Bordetella bronchiseptica*, *Haemophilus parasuis* und coryneformen Bakterien (HENSEL et al. 1994) zusammen (Tab. 2).

Tab. 2: Keimspektrum der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit nach HENSEL et al. 1994

Hauptkeime in der BALF	prozentualer Anteil [%]
<i>E. coli</i>	42,1
<i>Klebsiella</i> sp.	18,3
Staphylokokken	67,6
alpha-hämolyisierende Streptokokken	49,4
Mikrokokken	12,8
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	3,1
<i>Haemophilus parasuis</i>	2,4
Coryneforme Bakterien	11,0

Die Gesamtzellzahl der BALF (s. Anhang) kann beim erkrankten Schwein großen tierspezifischen Schwankungen unterliegen, während gesunde Tiere eine konstante Zusammensetzung der BALF aufweisen (NEUMANN et al. 1995, GANTER und HENSEL 1997). Die kranken Tiere zeigen wie zu erwarten eine erhöhte Gesamtzellzahl, die durch die steigende Zahl an neutrophilen Granulozyten im Krankheitsfall bedingt ist (s. Anhang). Dieser schnelle Konzentrationsanstieg der neutrophilen Granulozyten in der BALF wird, im Falle einer Infektion, durch Bakterienexo- und endotoxine, die die Leukozytenemigration aus dem Blut aktivieren, hervorgerufen und ist beispielhaft für eine Lungenerkrankung des Tieres. Sie stellt einen entscheidenden Parameter in der Diagnose der Krankheit dar (BICKHARDT 1992, GANTER und HENSEL 1997). Aus körpereigenen Zellen werden Entzündungsmediatoren freigesetzt, die zu lokaler Vasodilatation und Erhöhung der Gefäßpermeabilität führen und die chemotaktischen Signale für Granulozyten darstellen (TEUTENBERG-RIEDEL 1998).

In Bezug auf die biochemische Zusammensetzung der BALF sind bisher nur Daten zu BALFs von Menschen veröffentlicht (s. Anhang). Dabei ist davon auszugehen, daß die Zusammensetzung beim Schwein nicht wesentlich von der beim Menschen abweicht und alle im Serum vorhandenen Inhaltsstoffe in einer Verdünnung von etwa 1:100 gegenüber der Konzentration im Serum ebenfalls in der BALF zu finden sind (GANTER 1996, TEUTENBERG-RIEDEL 1998).

Ein Problem bei der Untersuchung bakterieller Pathogenitätsmechanismen ist es, daß für Untersuchungen von *in vivo* Vorgängen letztlich oft nur *in vitro* Systeme zur Verfügung stehen, die nur begrenzte Aussagekraft besitzen können. Eine möglichst "naturgetreue" Nachstellung des Tiermodells ist deshalb das Ziel vieler *in vitro* Ansätze. In Bezug auf die

Interaktion von Bakterium (Pathogen) und Wirt und den dabei interessierenden phänotypischen und biochemischen Veränderungen auf Seiten des Bakteriums ist in dem Fall von Lungenkeimen des Schweines mit der BALF eine Möglichkeit geschaffen worden, die die *in vivo* Bedingungen gut widerspiegelt. Die Untersuchungen von TEUTENBERG-RIEDEL (1998) zum Einfluß von BALF auf die Antigenexpression von *Ab. pleuropneumoniae* bestätigten diese Annahme.

2.4 Ziel der Untersuchungen

Aufbauend auf in der Arbeitsgruppe bereits erarbeiteten Ergebnissen wurden die Untersuchungen an *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* als den in der Veterinärmedizin relevanten Mykoplasmenspezies durchgeführt. Ziel dieser Arbeit war es, die für Hsp60 und Hsp70 kodierenden Gene dieser Mykoplasmenspezies zu identifizieren, zu sequenzieren und im Rahmen eines Homologievergleiches bzw. einer taxonomischen Einordnung gegenüber den *hsp60* und *hsp70* anderer Bakterien zu charakterisieren. Nach Transformation und Expression in *E. coli* sollten rekombinante Hsp-Proteine gewonnen werden, die in weiterführenden Untersuchungen anhand der *M. arthritis*-Polyarthritis der Ratte auf ihren Einfluß auf die Pathogenese dieser Erkrankung geprüft werden sollten. Die zweite Zielsetzung dieser Arbeit war, die Induktion der Hsp in der Auseinandersetzung des Pathogens mit dem Wirt im geeigneten *in vitro* Modell zu beschreiben.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid, 4x reinst, Serva, Heidelberg

Agarose für DNA-Elektrophorese, Serva, Heidelberg

Agar, Oxoid über Unipath, Wesel

Ammoniumacetat, Merck, Darmstadt

Ammoniumpersulfat, Serva, Heidelberg

Ampholine, pH 3.5-10/5-7/7-9, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

Bacto-Trypton, Difco, Detroit, Michigan, USA

Bisacrylamid (N,N'-Methylenbisacrylamid), 2x reinst, Serva, Heidelberg

Biuret-Reagenz, Total-Protein/Gesamt-Eiweiß-Kit, Boehringer, Mannheim

Borsäure, Serva, Heidelberg

Bromphenolblau, reinst, Serva, Heidelberg

5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz, Sigma, Deisenhofen

BSA (Bovines Serum Albumin, Fraktion IV), Serva, Heidelberg

4-Chlor-1-Naphtol, Aldrich GmbH, Steinheim

Calciumchlorid, Merck, Darmstadt

Coomassie Brilliant Blue R250, Serva, Heidelberg

dATP, 100 mM, Promega Corporation über Serva, Heidelberg

dCTP, 100 mM, Promega Corporation über Serva, Heidelberg

dGTP, 100 mM, Promega Corporation über Serva, Heidelberg

dTTP, 100 mM, Promega Corporation über Serva, Heidelberg

Dithiothreitol, Sigma, Deisenhofen

N,N'-Dimethylformamid, Sigma, Deisenhofen

1 kb-DNA-Ladder, Gibco, Berlin

Eisessig, 96% [v/v], Merck, Darmstadt

Emulsigen, MVP Laboratories Inc., Ralston, Nebraska

Ethanol, 96% [v/v], Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid, [10 mg/ml], Amresco über Biometra, Göttingen

Ethylendiamin-Tetraacetat-Natriumsalz-Dihydrat, Na₂EDTA x 2 H₂O, Serva, Heidelberg

Fleischextrakt, Oxoid über Unipath, Wesel

Formalin, 38% [v/v], Merck, Darmstadt

GABo/IgG (H+L) (Ziege-anti-Rind-Immunglobulin), Peroxidase-konjugiert, Nordic

Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande

GAM/IgG (H+L) (Ziege-anti-Maus-Immunglobulin), Peroxidase-konjugiert, Nordic

Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande

GAR/IgG (H+L) (Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin), Peroxidase-konjugiert, Nordic

Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande

GASw/IgG (H+L) (Ziege-anti-Schwein-Immunglobulin), Peroxidase-konjugiert, Nordic

Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande

Gelatine, Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg

Glutathion Sepharose 4B, Pharmacia, Freiburg

Glutathion, reduziert, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Glycerin, 87% [v/v], Merck, Darmstadt

Glycin, Riedel-de-Haen, Seelze

Harnstoff (Urea), Serva, Heidelberg

Heart Infusion Agar, Difco, Detroit, Michigan, USA

Hefeextrakt, Oxoid Ltd., London, England

Isopropanol, Merck, Darmstadt

Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG), Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Jet-Star, Mini- und Midi-Plasmid-Purification System, Genomed GmbH, Bad Oeynhausen

Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt

Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4 , Merck, Darmstadt

Kaninchen-Hyperimmunserum gegen *M. arthritidis* ISR1, *M. bovis* PG45, *M. agalactiae* PG2, *M. hyopneumoniae* J, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Tierärztliche Hochschule Hannover

Lambda EcoRI / HindIII / BAP, DNA-Längenstandard, Appligene Oncor, Heidelberg

Lysozym, Sigma, München

Magnesiumchlorid, 25 mM, Promega Corporation über Serva, Heidelberg

Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Merck, Darmstadt

Manganchlorid, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

2-Mercaptoethanol, Merck, Darmstadt

Methanol, reinst, Merck, Darmstadt

Mineralöl, Perkin Elmer Cetus, Überlingen

Mineralöl, Sigma Chemie GmbH, Deisinghofen

Molekularmassenmarker, „Prestained SDS-PAGE Standards, Low Range“, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

MOPS, ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S}$), Roth, Karlsruhe

Natriumacetat, Serva, Heidelberg
Natriumcarbonat, wasserfrei, kristallin, Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, Sigma, München
tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat, NaH_2PO_4 , Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen, reinst, Sigma, München
di-Natrium-Thiosulfat, Pentahydrat, Sigma, München
Natronlauge, 32% [v/v], Fluka, Berlin
Natronlauge, 1 N, Merck, Darmstadt
Nitrotetrazoliumblausulfat, Sigma, Deisenhofen
NP-40, Tergitol NP-40, Sigma, München
Nucleon II Extraktions-Kit, Scotlab, Wiesloch
 Reagenz B
 Natriumperchlorat (5 M)
 Silica-Suspension
Penicillin G, Merck, Darmstadt
Pepton, Oxoid über Unipath, Wesel
Pferdeserum, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Tierärztliche Hochschule Hannover
 , 30 min. bei 56°C inaktiviert, sterilfiltriert
Phenolrot, Merck, Darmstadt
Phosphorsäure, 85% [v/v], Merck, Darmstadt
Restriktionsendonucleasen, *Bam*HI, *Hae*III, Appligene Oncor, Heidelberg
Restriktionsendonucleasen, *Xho*I, *Hha*I, Pharmacia, Freiburg
Rinderblut, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Tierärztliche Hochschule Hannover,
 defibriniert
RNAse, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Rubidiumchlorid (RbCl), Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Saccharose, Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg
Salzsäure, 37% [v/v], Merck, Darmstadt
Salzsäure, 1 N, Sigma Chemie GmbH, Deisinghofen
Schweineserum, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Tierärztliche Hochschule
 Hannover
SDS (Natriumdodecylsulfat), Serva, Feinbiochemika GmbH, Heidelberg

Silbernitrat, Sigma, München

Spermidin, Sigma, München

T4-DNA-Ligase, New England Biolabs GmbH, Schwalbach

Taq-Polymerase, 5000U/ml, Stratagene, Heidelberg

Taq-Polymerase-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,8, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1% [w/v]

Gelatine und andere Stabilisatoren, Stratagene, Heidelberg

TEMED, N,N,N',N'-Tetramethyldiamin, Serva, Heidelberg

Trichloressigsäure, Serva, Heidelberg

Tris (Tris(Hydroxymethyl-)aminomethan), Serva, Heidelberg

Tris-HCl (Tris(Hydroxymethyl-)hydrochlorid), Serva, Heidelberg

Triton X-100, Bio-Rad, München

Trypton, Difco über Nordwald, Hamburg

Tween-20 (Polyoxyethylensobitanmonolaurat), Merck, Darmstadt

Wasserstoffperoxid (H₂O₂), Aldrich-GmbH, Steinheim

Chemikalien ohne besondere Angaben wurden mit dem Reinheitsgrad "zur Analyse" verwendet

3.2 Geräte und Hilfsmittel

Analysenwaage BA 61 (0-60 g), Sartorius über Landgraf, Hannover

Analysenwaage (80-400 g), Sartorius über Landgraf, Hannover

Blottingkammer vertikal, Transphor Electrophoresis Unit TE 42, Hoefer, San Francisco, USA

Blotting-Steuergerät, Transphor Power Lid, Hoefer, San Francisco, USA

Brutschrank, Heraeus CO₂-Auto-Zero, Heraeus-Christ, Osterode

Elektrophoresekammer vertikal, SE 600, Hoefer, San Francisco, USA

Elektrophoresekammer horizontal, Submarine Agarose Gel Unit MAXTM HE99, Hoefer, San Francisco, USA

Fotolampen, Photocrescenta 220 V, 150 W, Philips, Hannover

Homogenisator, Mini-Potter, Braun Melsungen, Melsungen

Kühlzentrifuge Sorvall RC 5-B mit Rotoren GSA und SA600, Du Pont, Bad Homburg

Kühlzentrifuge Centrifuge 5402, Eppendorf, Berlin

Kühlzentrifuge Megafuge 1.0 R, Heraeus/Sepatech, Hanau

Magnetrührer LR 12, Mettler über Landgraf, Hannover

Mikroliterspritze, Hamilton Spritze Modell 705 N, Sigma Chemie GmbH, Deisinghofen

Mikrowellengerät M742 Sensor, Philips, Hannover

Mikro-Zentrifuge, neoLab, Heidelberg

Mini-PROTEAN II Multiscreen Apparatus, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Modular Mini-PROTEAN II Electrophoresis System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Objektiv Zuiko Auto-Macro, Brennweite 50 mm, Olympus, Hamburg

Orbital-Rocker, Red Rocker, Hoefer, San Francisco, USA

pH-Meter CG 707, Schott über Landgraf, Hannover

pH-Meter, Knick-PH-PT-1000, Einstabmesskette SE 100, Knick Elektronische Meßgeräte GmbH & Co., Berlin

Pipetten Pipetman, max. 10, 20, 100, 200, 1000 µl, Gilson über Abimed, Langenfeld

Quarzküvette für 80 µl Probevolumen, Pharmacia, Freiburg

Repro-Stativ, Kaiser über Foto-Haas, Hannover

Sofortbildkamera Polaroid MP 4, Bachhofer, Reutlingen

Spektralphotometer LKB Ultrospec III, Pharmacia, Freiburg

Spiegelreflexkamera OM-2, Olympus, Hamburg

Stativ für die Polaroidkamera, Bachhofer, Reutlingen

Stereomikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen

Sterilwerkbank Lamina Flow, Baker über Labotec, Göttingen

Stromversorgungsgerät Jeather Volt™ 800 (für horizontale Elektrophorese), Stratagene, Heidelberg

Stromversorgungsgerät PS 500 XT DC (für vertikale Elektrophorese), Hoefer, San Francisco, USA

Thermoblock BT 100, Kleinfeld Labortechnik, Hannover

Thermocycler DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer Cetus, Überlingen

UV-Transilluminator IL 350 M, 312 nm, Bachhofer, Reutlingen

Wasserbad W 13 mit Thermoelement D8, Haake über Landgraf, Hannover

Wipptisch, Red Rocker Variable Speed PR 50, Hoefer, San Francisco, USA

Wirbler Reax 2000, Heidolph über Landgraf, Hannover

Zentrifuge Digifuge, Heraeus, Hanau

Zentrifugenbecher Dryspin QTY 12, 250 ml, Nalgene, Braunschweig

Zentrifugenbecher Oak-Ridge, Sealing Cap, PC, 50 ml, Nalgene, Braunschweig

3.3 Verbrauchsmaterialien

Autoradiographie Film, Reflection™, NEF-496 DuPont, Dreieich

Gel-Blotting-Papier, 300 x 600 mm, Schleicher & Schuell, Dassel

Makrotiterplatte, Greiner, Solingen

Makrowellplatte, Greiner, Solingen

Mikroliterküvetten, 1 ml, Ratiolab, Dreieich

Nitrocellulose, BA 85, 0,45 µm Porengröße, Schleicher & Schuell, Dassel

Nitorcellulose-Plättchen BA 85, Porengröße 0,45 µm, Durchmesser 1 cm (selbstgestanzt), Schleicher & Schuell, Dassel

Polaroid-Film Typ 55, über Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Polypropylenröhrchen, Bluecaps, 50 ml, NUNC, Wiesbaden

Polypropylenröhrchen, Whitecaps, 15 ml, Chloroform-beständig, NUNC, Wiesbaden

Polystyrolröhrchen, steril, 10 ml, Greiner, Solingen

Reaktionsgefäße, 1, 2 ml, Sarstedt, Nürnbergrecht

Röntgenfilm X-O Mat, Kodak, N. Y., USA

Schwarzweiß-Fotonegativfilm T MAX, 100 ASA TMX 135, 36 Kodak, über Photo Haas, Hannover

Sterilfilter, 0,45 µm Porenweite, Millipore, Eschborn

Sterilfilitertips, für 20, 100, 200, 1000 µl, Biozym, Hess. Oldendorf

3.4 Auswertungs-Software

A. FRAGMENTS:

Berechnung der Molekularmassen der Amplifikationsprodukte, Plasmide und Proteine in der Agarose-Gelelektrophorese bzw. in der SDS-PAGE

(Jürgen Hermans, Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf)

B. OLIGO 4.0

Primer Analysis Software (Copyright 1989-91: Wojciech Rychlik)

C. CHROMAS 1.43 (32-bit)

Software zur Bearbeitung von Sequenz-Elektropherogrammen

(Conor McCarthy, School of Biomolecular and Biomedical Science, Faculty of Science, Griffith University, Brisbane, Australia)

Die Sequenzierungen wurden von den Firmen (1) MEDIGENE, Martinsried, Deutschland, und (2) SEQLAB, Göttingen, Deutschland, durchgeführt.

D. Programme der HUSAR 4.0-Gruppe (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources)

Geniusnet: Biocomputing Unit - Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg (Analysen, Transkriptionen, Datenbanksuche von Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen):

- ANTIGENIC: Suche nach möglichen/potentiellen antigenen Bereiche auf der Proteinebene
- BESTfit: Homologievergleich zweier Sequenzen nach dem Algorithmus von Smith und Waterman
- BLASTN: schneller Vergleich von Nukleotid-Sequenzen mit DNA-Sequenzen aus der Datenbank
- BLASTP: schneller Vergleich von Peptid-Sequenzen mit Protein-Sequenzen aus der Datenbank
- CLUSTAL: multipler Homologievergleich von DNA- oder Protein-Sequenzen nach der Methode von Thompson, Higgins und Gibson
- FASTA: Vergleich einer unbekanntem Sequenz mit jeder Art von Sequenz aus der Datenbank (sensitiver als BLAST)
- FETCH: Kopie von (Datenbank-)Dateien ins eigene Laufwerk
- GAP: Homologievergleich zweier Sequenzen nach dem Algorithmus von Needleman und Wunsch
- IRX: Sequenzsuche in der Datenbank
- MULTalign: Homologievergleich mehrerer Sequenzen nach dem Algorithmus von Needleman und Wunsch
- MAP: Erstellen von Restriktionskarten und Anzeige der möglichen Proteinsequenzen
- PEPDATA: Übersetzung von DNA-Sequenzen in Protein-Sequenzen in allen sechs Leserahmen
- PEPTIDstructure: Vorhersage des alpha-, beta-, coil- und turn-Anteils einer Aminosäuresequenz Aussage über Antigenität, Flexibilität, Hydrophobizität und Oberflächenstruktur

PRETTYPLOT: Darstellung von mit MULTalign konstruierten Dateien

TRANSLate: Übersetzung von DNA-Sequenzen in Protein-Sequenzen

3.5 Universelle Pufferlösungen

PBS, modifiziert nach DULBECCO und VOGT (1954)

NaCl	8,0 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	2,9 g
KCl	0,2 g
Aqua dest. ad	1000,0 ml

PBS-Tween-20, 0,1%ig [v/v]

Tween-20	1,0 ml
PBS ad.	1000,0 ml

Alle übrigen verwendeten Lösungen und Puffer sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

3.6 Mikrobiologische Methoden

3.6.1 Bakterien

Bezeichnung und Herkunft

Die in der PCR eingesetzte genomische DNA wurde aus den Stämmen *M. agalactiae* PG2, *M. arthritidis* ISR1, *M. bovis* PG45, *M. hyopneumoniae* J und *M. pneumoniae* FH extrahiert. Die Transformationsansätze und die IPTG-induzierte Proteinsynthese wurden mit den *E. coli*-Stämmen HB 101 und JM105 durchgeführt.

Die verwendeten Mykoplasmen- und *E. coli*-Stämme wurden aus der Sammlung des Institutes für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover bereitgestellt.

Tab. 3: Verwendete Mykoplasmen- und *E. coli*-Stämme

Mykoplasmenstämme (DNA-Extraktion, proteinchem. Analyse)	<i>E. coli</i>-Stämme (Transformation, IPTG-induzierte Proteinexpression)
<i>M. agalactiae</i> PG2	<i>E. coli</i> HB 101
<i>M. arthritidis</i> ISR1	<i>E. coli</i> JM 105
<i>M. bovis</i> PG45	
<i>M. hyopneumoniae</i> J	
<i>M. pneumoniae</i> FH	

3.6.2 Nährmedien

Alle verwendeten Medien wurden, falls nicht anders angegeben, bei 4°C gelagert. Seren wurden vor Zugabe 30 min bei 56°C inaktiviert.

Kulturmedien für Mykoplasmen

Standardmedium + 10% [v/v] Pferdeserum (nach ALUOTTO, 1970)

Heart Infusion Broth	19,0 g
Hefeextrakt, 50%ig [w/v]	5,0 g
Aqua dest. ad	900,0 ml

Der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt und die Lösung 15 min bei 121°C autoklaviert.

Nach Abkühlung auf 54°C wurden

Pferdeserum (sterilfiltriert)	100,0 ml
Penicillin G	2 x 10 ⁶ I.E.

zugesezt.

Zur Herstellung fester Nährböden wurden statt 19 g Heart Infusion Broth 30 g des Heart Infusion Agar eingesetzt. Das Flüssigmedium wurde bei -20°C, die Agarplatten wurden bei 4°C gelagert.

FRIIS-Medium (modifiziert nach FRIIS, 1975)

Lösung A

Bacto Brain Heart Infusion	5,1 g
Bacto PPLO Broth	5,5 g
Aqua dest. ad	750,0 ml

Lösung B

Schweineserum	190,0 ml
Hefeextrakt, 50%ig [w/v]	19,0 ml
Hank's Balanced Salt Solution	32,0 ml
Phenolrot, 0,1%ig [w/v]	8,0 ml

Die Lösungen wurden auf pH 7,4 eingestellt.

Lösung A wurde autoklaviert, Lösung B sterilfiltriert. Anschließend wurden beide Lösungen vereinigt. Zur Herstellung fester Nährböden wurden 0,7 %ig [w/v] Agar und 0,01%ig [w/v] Dextran zugesetzt.

Hefeextrakt, 50%ig [w/v]

500 g Bäckerhefe wurden in 500 ml Aqua dest. suspendiert und auf 1000 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 4,5 eingestellt und die Lösung 20 min bei 80°C inkubiert. Nach einem 30minütigen Zentrifugationsschritt bei 1300 x g wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Hank's Balanced Salt SolutionStammlösung A

NaCl	80,0 g
KCl	4,0 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0 g
Aqua dest. ad	400,0 ml

Nachdem die Salze vollständig gelöst waren, wurden 1,4 g CaCl₂ zugegeben. Danach wurde mit Aqua dest. auf 500,0 ml aufgefüllt und die Lösung wurde abgedeckt 30 min im Dampftopf gekocht.

Stammlösung B

Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	1,5 g
Aqua dest. ad	400,0 ml

Nach vollständiger Lösung wurden 0,6 g KH₂PO₄ zugegeben und danach wurde mit Aqua dest. auf 500,0 ml aufgefüllt.

Gebrauchslösung

Stammlösung A	50,0 ml
Stammlösung B	50,0 ml
Aqua dest.	900,0 ml

Kulturmedien für *E. coli*LURIA-Broth (LB-Medium)

Bacto-Trypton	10,0 g
Hefeextrakt (Difco)	5,0 g
NaCl	5,0 g
Aqua dest. ad	1000 ml

LB-Agar

Agar	15,0 g
Bacto-Trypton	10,0 g
Hefeextrakt (Difco)	5,0 g
NaCl	5,0 g
Aqua dest. ad	1000 ml

Nachdem alle Bestandteile vollständig gelöst waren, wurden die Medien autoklaviert.

3.6.3 Kulturbedingungen**Mykoplasmen**

M. hyopneumoniae wurde in FRIIS-Medium, die anderen Mykoplasmenspezies wurden in Standardmedium (nach ALUOTTO 1970) kultiviert. Zweimal 2 ml Nährmedium wurden hierfür mit je 0,2 ml der in Aqua dest. suspendierten Lyophilisate beimpft und 2 bis 4 Tage bebrütet. Anschließend wurden die Kulturen vereinigt und damit nun fünfmal 2 ml Nährmedium mit 0,2 ml beimpft. Nach weiteren 2 bis 4 Tagen erfolgte die dritte Passage: die Kulturen wurden wiederum vereinigt und je 5 ml in zweimal 50 ml Nährmedium gegeben. Nach weiteren 2 bis 4 Tagen Inkubation wurden die 50 ml-Ansätze auf zweimal 500 ml passagiert und entsprechend bebrütet.

Die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindliche Kultur wurde anschließend zur späteren DNA-Extraktion bzw. Antigenpräparation abzentrifugiert und die Zellen wurden entsprechend weiterbehandelt.

Die Kultivierung erfolgte in allen Fällen aerob bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂. Von allen Passagen wurden Wachstums- und Sterilkontrollen durchgeführt.

E. coli

E. coli wurde in Luria-Broth kultiviert. Hierfür wurde eine Einzelkolonie einer fraktioniert beimpften Luria-Platte in 5 ml Luria-Broth resuspendiert und über Nacht bei 37°C als Standkultur bebrütet. Diese Vorkultur wurde dann als Inokulum zu 50 ml Luria-Broth gegeben und im Rotationsschüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₆₀ von 0,3-0,5 inkubiert. Von allen Passagen wurden Wachstums- und Sterilkontrollen angelegt. Die *E. coli*-Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet.

E. coli-Stämme, die durch Transformation von Plasmiden eine Antibiotikumsresistenz gegen Ampicillin trugen, wurden in Luria-Broth bzw. auf Luria-Agar kultiviert. Das Flüssigmedium bzw. der Agar enthielten Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml. Das Antibiotikum wurde dem Flüssigmedium erst kurz vor der Inokulation zugegeben.

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 Präparation von chromosomaler DNA

3.7.1.1 Ernte der Zellen

Die auf 1000 ml angezüchtete Mykoplasmenkultur wurde auf Eis gekühlt und zur Herabsetzung der Nukleaseaktivität mit 35 ml 0,5 M EDTA-Lösung versetzt. Durch Zentrifugation (45 min, 25000 x g) wurden Zellpellets gewonnen, die vereinigt und, um die Serumproteine des Mediums zu entfernen, in 8 ml Waschpuffer resuspendiert wurden. Es folgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 4°C und 34000 x g. Das gewaschene Pellet wurde nun entweder direkt zur DNA-Extraktion eingesetzt oder mit 100 µl Waschpuffer überschichtet bei -80°C gelagert.

3.7.1.2 DNA-Isolierung aus Mykoplasmen und gramnegativen Bakterien mit dem Nucleon-Kit II

Der Nucleon-Kit II wurde zur DNA-Extraktion aus Zellkulturen und Blut entwickelt. Ein SDS-haltiger Puffer führt zur Zellyse. Die freiwerdenden Proteine werden nach der Ausfällung durch Natriumperchlorat mit Chloroform extrahiert. Die nun nachfolgend zugegebene Silica-Suspension lagert sich auf die proteinreiche Interphase auf und ermöglicht so das saubere Abpipettieren der DNA-haltigen wässrigen Phase. Bei der Durchführung wurde nach den Vorschriften des Herstellers vorgegangen.

Das gewaschene Zellpellet wurde in 12 ml Reagenz B suspendiert und zu gleichen Teilen auf zwei 15 ml-Polypropylen-Röhrchen verteilt. Zu beiden Röhrchen wurden 10 µl Ribonuklease A-Stammlösung gegeben und anschließend die Ansätze 30 min bei 37°C inkubiert. Beide Röhrchen wurden mit 1,5 ml Natriumperchloratlösung versetzt, 15 min bei Raumtemperatur (RT) geschüttelt und anschließend 20 min bei 65°C unter mehrmaligem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 5,5 ml -20°C-kaltem Chloroform und 10-minütigem Schütteln bei RT fielen die Proteine und andere Zellbestandteile in der organischen Phase aus. Zur Trennung der organischen von der DNA-haltigen wässrigen Phase wurden die Röhrchen 10 min bei 800 x g zentrifugiert. Die vorsichtig zugegebene Silica-Suspension bildete bei dem nachfolgenden Zentrifugationsschritt (3 min, 1400 x g) eine feste Trennschicht zwischen den beiden Phasen. Die obere, DNA-haltige Phase wurde in ein neues Röhrchen transferiert und eventuell noch vorhandene Silicareste wurden durch erneute Zentrifugation (1 min, 1300 x g) entfernt. Die Überstände beider Ansätze wurden in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt und anschließend wurde die Ethanolpräzipitation durchgeführt.

Das 50 ml-Röhrchen wurde mit dem 0,1-fachem Volumen an gekühlter 3 M Natriumacetat-Lösung und dem 2-fachen Volumen an 96%igem [v/v] eiskaltem Ethanol versetzt. Die Röhrchen wurden solange vorsichtig geschwenkt, bis der Ansatz klar wurde und die DNA sichtbar ausfiel. Die DNA-Fäden wurden mit einer zu einem Haken gebogenen Glaskapillare mit zugeschmolzener Öffnung aus der Lösung gewunden und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die so gewonnene DNA wurde mit 70%igem [v/v] Ethanol gewaschen, um restliche Salze zu entfernen. Anschließend wurde die präzipitierte DNA in 50-200 µl sterilem Aqua dest. bzw. TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst.

In dem Fall, daß bei dem Präzipitationsschritt keine DNA ausfiel, wurde der Ansatz über Nacht stehengelassen (-20°C) und die dann präzipitierte DNA aus der Lösung gewunden.

3.7.2 Präparation von Plasmid-DNA

3.7.2.1 Miniprep

Die durch einen Ligations- / Transformationsansatz erzeugten Klone wurden zur schnellen Analyse mittels „Miniprep“-Methode auf die Insertion des gewünschten DNA-Fragments untersucht. Enthielten die Klone das gewünschte Insert und sollte dieses weiteren Untersuchungen, wie z.B. der Sequenzierung, zur Verfügung stehen, schloß sich eine „Midi“-Präparation an.

STET-Medium

Sucrose	8,0 g
Triton X-100	0,5 ml
EDTA, pH 8,0	50 mM
Tris, pH 8,0	10 mM
Aqua dest. ad	100,0 ml

TE-Puffer

Tris, 1 M, pH 8,0	10,0 ml
EDTA, 0,5 M, pH 8,0	20,0 ml
Aqua dest. ad	1000,0 ml

Lysozylösung (10mg/ml)

Lysozym	100,0 mg
TE-Puffer	10,0 ml

Für die schnelle Miniprep-Methode wurden die Klone mit einem sterilen, stumpfen Zahnstocher gepickt und auf einer neuen Luria-Platte mit Ampicillinzusatz (LAP-Platte) auf kleiner Fläche ausgestrichen. Nach Bebrütung über Nacht bei 37°C wurde der gewachsene Bakterienrasen wiederum mit einem sterilen, stumpfen Zahnstocher aufgenommen und in 25 µl STET-Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 2 µl Lysozylösung wurden die Proben kurz auf Eis gestellt und anschließend 40 sec bei 100°C inkubiert. Die Präparationsansätze wurden dann bei 12500 x g 10 min zentrifugiert und der Überstand wurde in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Zum Ausfällen der Plasmid-DNA wurden 30 µl -20°C-kaltes Isopropanol zugegeben, die Ansätze mind. 5 min bei -20°C inkubiert und nochmals 10 min

bei 12500 x g zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Isopropanolüberstandes trockneten die Pellets in ca. 30 min und wurden dann zur weiteren Analyse in 20 µl sterilem A. dest. aufgenommen.

3.7.2.2 Midiprep

Zur Präparation von größeren Mengen an Plasmid-DNA, wurde der kommerzielle JETSTAR-Kit von der Firma Genomed verwendet. Dieser Kit ermöglicht speziell die Aufreinigung und Präparation von Plasmid-DNA mit sehr hoher Kopienzahl aus *E. coli*-Kulturen, die in Luria-Medium kultiviert wurden, und basiert auf einer Anionenaustauscher-Matrix. Die Lyse der Zellen erfolgt durch eine kombinierte Behandlung mit alkalischen und SDS-Puffern. RNA wird durch die Zugabe von RNase alkalisch hydrolysiert, Verunreinigungen werden durch die Anionenaustauscher-Matrix gebunden. Die Plasmid-DNA wird von der Säule eluiert und durch eine anschließende Alkoholpräzipitation aufgereinigt.

Alle Arbeitsschritte wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Lösungen (laut Angaben des Herstellers)

Lösung 1

Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
EDTA	10 mM
RNase	100 µg/ml Lösung 1

Lösung 2

NaOH	200 mM
SDS	1% [w/v]

Lösung 3

Kaliumacetat /Essigsäure, pH 5,5	3,2 M
----------------------------------	-------

Lösung 4

NaCl	600 mM
Natriumacetat/Essigsäure, pH 5,0	100 mM
Triton X-100	0,15% [w/v]

Lösung 5

NaCl	800 mM
Natriumacetat/Essigsäure, pH 5,0	100 mM

Lösung 6

NaCl	1250 mM
Tris-HCl, pH 8,5	100 mM

Lösungen 2 bis 6 wurden bei RT und Lösung 1 bei 4°C gelagert.

Der Klon, dessen Plasmid-DNA zur weiteren Charakterisierung präpariert werden sollte, wurde fraktioniert auf einer Luria-Platte mit Ampicillinzusatz (Abkürzung: LAP) angelegt. Nach Bebrütung über Nacht bei 37°C im Brutschrank wurde eine Einzelkolonie in 1 ml Luria-Medium überführt und 2 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 0,5 ml dieser Kultur in 5 ml LAP-Medium gegeben und über Nacht als Standkultur bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Mittels dieser 5-ml-Vorkultur wurden 100 ml LAP-Medium inokuliert und im Schüttler bei 37°C bis zu einer OD₆₆₀ von 0,8-0,9 belassen. Anschließend wurde die Kultur nach Zugabe von 1 µg Chloramphenicol über Nacht im Schüttler bei 37°C kultiviert und die Zellen wurden am nächsten Morgen bei 16000 x g (15 min, 20°C) geerntet. Die Überstände wurden sauber abgenommen und verworfen und das Pellet wurde in 4 ml Lösung 1 resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden nun 4 ml Lösung 2 zugeben, die Zentrifugenbecher geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit 4 ml Lösung 3 unter kräftigem Schütteln neutralisiert und die Mixtur 10 min bei 15000 x g zentrifugiert. Währenddessen wurden die Säulen für den Gebrauch mit 10 ml Lösung 4 equilibriert. Nach erfolgtem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand vorsichtig auf die Säule gegeben und die Säule zweimal mit 10 ml Lösung 5 gewaschen. 5 ml Lösung 6 eluierten die Plasmid-DNA, die zur Präzipitation mit 3,5 ml Isopropanol versetzt wurde. Nach mind. 30 min bei -20°C wurde das Eluat 30 min bei 15000 x g zentrifugiert und das Präzipitat durch Anschluß eines weiteren Zentrifugationschrittes mit 70%igem [v/v] Ethanol gewaschen. Das gewonnene Pellet wurde im Reaktionsröhrchen, mit der Öffnung nach unten an der Luft getrocknet (30 min) und die DNA in TE-Puffer resuspendiert.

3.7.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

A) Aus dem Agarosegel mit dem GeneClean-Kit

PCR-Amplifikate und Insert-DNA wurden nach Auftragung auf ein TAE-Agarosegel, Vektoren direkt nach dem Restriktionsverdau mit dem GeneClean-Kit II (DIANOVA, Deutschland) aufgereinigt. Die DNA-Banden wurden mit einer sterilen Rasierklinge im UV-Licht zügig ausgeschnitten, von allen überflüssigen Agarosegelresten befreit und in ein vorher ausgewogenes Reaktionsgefäß überführt. Das Gewicht der jeweiligen Bande wurde ermittelt und diese dann im dreifachen Volumen NaJ-Lösung solange bei 55°C inkubiert, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte (meist 3 min). Anschließend wurden den Ansätzen 5-10 µl Glasmilch (dem aufzureinigenden Vektoransatz direkt) zugegeben und die Mischungen bei RT 15 min unter mehrmaligen Schütteln inkubiert. Die Glasmilch und die an sie gebundene DNA wurden bei 10000 x g kurz abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Pellet nun dreimal mit 500 µl eiskalter New-Wash-Lösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde mindestens 5 min zentrifugiert und der Überstand sauber und vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 25 µl Aqua (A.) dest. resuspendiert und wiederum 3 min bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Nach weiteren 10 min bei 10000 x g wurden 20 µl der gewonnenen DNA-Lösung abgenommen, in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C aufbewahrt.

B) Aus dem PCR-Ansatz mit MicroSpin-Columns

Für eine schnelle Aufreinigung der DNA direkt aus dem PCR-Ansatz wurden MicroSpin™ Columns von Pharmacia verwendet. Die Reaktionsgefäße besitzen eine Sephacryl® -Matrix, die auf der Basis der Gelfiltration aufreingt. Die MicroSpin™ Columns waren gebrauchsfertig und erlaubten eine Aufreinigung ohne Verdünnung der Probe.

Vor dem Gebrauch wurde die Matrix in der Säule durch kurzes Mischen im TE-Puffer resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesteckt. Dann wurde die Säule 1min bei 735 x g zentrifugiert und anschließend in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. 40 µl des PCR-Ansatzes wurden vorsichtig, ohne das Matrix-Säulenbett aufzuwirbeln, aufgetragen und die Probe wurde durch einen zweiminütigen Zentrifugations-schritt bei 735 x g aufgereinigt.

3.7.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

3.7.4.1 Spektroskopische Reinheitsbestimmung

Anhand der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm kann die Konzentration und Reinheit einer DNA-Lösung ermittelt werden. Bei einer Wellenlänge von 260 nm zeigen Nukleinsäuren ein Absorptionsmaximum. Bei dieser Wellenlänge und 1cm Schichtdicke der Quarzküvette entspricht eine OD von 1 einer Konzentration von ungefähr 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder 20 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide. Nur sehr saubere DNA-Lösungen liefern hier exakte Werte, da auch andere Moleküle bei 260 nm zur Extinktion angeregt werden. Bei 280 nm werden hauptsächlich Proteine zur Extinktion angeregt, so daß der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} Aufschluß über die Reinheit der DNA-Präparationen gibt. Der Quotient von sehr reinen Präparationen liegt zwischen 1,8 und 2,0. Niedrigere Werte weisen auf einen hohen Proteinanteil, höhere Werte auf Verunreinigung mit RNA oder denaturierter DNA hin (SAMBROOK et al. 1989).

Die Messung der DNA-Lösung wurde in einem Spektralphotometer durchgeführt. Die Lösung wurde mit Aqua dest. entsprechend verdünnt (z.B. 1:40), um den Maximalmeßwert des Gerätes nicht zu überschreiten. Die Messung erfolgte in einer Mikrometer-Quarzküvette mit einem Probenvolumen von 80 µl. Der Leerwert wurde mit Aqua dest. eingestellt.

3.7.4.2 Bestimmung der DNA-Konzentration durch Fluoreszenz von Ethidiumbromid

Diese Methode ist besonders für stark mit Proteinen verunreinigte oder nur sehr geringen DNA-Gehalt (< 250 ng/ml) aufweisende Proben geeignet.

Auf ein 1%iges Agarosegel, das 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (s. 3.7.5) enthielt, wurden 5 µl der zu untersuchenden Probe und je 5 µl von verschiedenen Konzentrationen eines DNA-Standards aufgetropft. Das Gel wurde etwa 2 h bei RT belassen, ausreichend für den Interkalierungsprozeß des Ethidiumbromids in die Basen der DNA. Die DNA-Konzentration der unbekannt Probe konnte dann durch den Vergleich der Intensität des Fluoreszenzsignals (Ethidiumbromid im UV-Licht) mit der des Standards ermittelt werden. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur DNA-Menge in dem aufgetropften Volumen. Die Auswertung erfolgte durch optischen Vergleich der Intensitäten auf einem Polaroidfoto des Gels (s. 3.7.5)

3.7.5 Auswertung und Dokumentation der Agarose-Gelelektrophorese

A) Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (Tris-Acetat-Puffer), 50-fache Stammlösung

Tris	242,0 g
Essigsäure, 99%ig [w/v]	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8.0)	100,0 ml
Aqua dest. ad	1000,0 ml

TAE-Puffer, einfach

TAE-Puffer, 50x	20 ml
Aqua dest. ad	1000,0 ml

0,5 M EDTA-Lösung

Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	186,1 g
NaOH-Plätzchen	20,0 g
Aqua dest. ad	1000,0 ml

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 8,0 eingestellt.

Auftragspuffer, 10-fach

Bromphenolblau	4,0 mg
0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0)	100,0 µl
TAE-Puffer, 50x	40,0 µl
Glycerin, 87%ig [v/v]	565,0 µl
Aqua dest.	360,0 µl

Ethidiumbromid-Lösung

0,5 mg/ml in H₂O

Molekularmassenmarker

1 kb-Leiter

lambda / EcoRI / HindIII

Herstellung der Gebrauchslösungen laut Hersteller.

Zur Herstellung eines 1%igen Geles wurden 2,5 g Agarose in 250 ml TAE-Puffer gegeben

und unter Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Die warme Agaroselösung wurde bei RT unter Rühren auf ca. 50°C abgekühlt. Kurz vor dem Gießen des Geles wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben. Ethidiumbromid ist ein interkalierender Farbstoff, der sich zwischen die benachbarten Basenpaare des DNA-Moleküls einlagert. Durch UV-Licht (254-400 nm) wird dieser Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt und dient so der Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente.

Als Gelsystem wurde eine Flachbettgelkammer verwendet, in der nach Bedarf Probenkämme eingesetzt waren. Aus dem polymerisierten Gel wurden die Kämme entfernt und es wurde in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gellaufkammer eingesetzt. Die Proben wurden mit dem Auftragspuffer (10-fach) 1:5 bis 1:10 verdünnt, der Molekularmassenmarker wurde in einem Volumen von 8 µl pro Geltasche eingesetzt. Nach 30 min bei konstant 50 V, zum kontrollierten Eindringen der Proben in das Gel, wurde die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 80 V durchgeführt.

B) Auswertung und Dokumentation

Zur Dokumentation wurde das Gel im durchscheinenden UV-Licht mit einer Polaroid-Kamera mit vorgeschaltetem Rotfilter fotografiert. Als Filmmaterial wurden Polaroid-Planfilme des Types 57/high speed, 4 x 5, eingesetzt. Die Molekülmassen der Amplifikationsprodukte konnten anhand eines in den Gelen mitgeführten Molekularmassenmarkers berechnet werden. Dazu wurde aus den bekannten Molekularmassen der Markerbanden und dem reziproken Wert ihrer Laufstrecke im Gel eine lineare Eichkurve erstellt, aus der die Molekularmassen der unbekannt DNA-Fragmente bestimmt werden konnten. Die Erstellung der Eichkurve und die Berechnung der Molekularmassen wurde mit dem Computerprogramm "Fragment" (s. 3.4) durchgeführt.

3.7.6 Analyse chromosomaler DNA

3.7.6.1 DNA-Amplifikation mittels Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung geringer DNA-Mengen eines definierten DNA-Abschnittes. Ein solches "Verstärkersystem" läßt sich mittels zweier Oligonukleotide, den Primern, und einer DNA-Polymerase zusammenstellen.

Sense- und antisense-Oligonukleotide werden mit einer für sie spezifischen Anlagerungs-

temperatur (Annealingtemperatur: 37-65°C) an die denaturierte DNA hybridisiert. Anschließend wird die Temperatur auf die Arbeitstemperatur der entsprechenden DNA-Polymerase (Extensionstemperatur: 72°C) erhöht und die Ziel-Sequenz von der Polymerase in Gegenwart aller vier Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) neu synthetisiert. Nach erneuter Denaturierung (94°C) beginnt ein neuer Zyklus durch Abkühlen auf die "Annealingtemperatur". Die Zyklen werden 20-45 mal wiederholt. Dadurch, daß die neu synthetisierte DNA wieder amplifiziert wird, findet eine Kettenreaktion statt, an deren Ende praktisch nur noch die amplifizierte DNA vorhanden ist.

Die Primer dienen der Polymerase in dem Extensionsschritt als Startpunkte für die cDNA-Synthese. Das Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase (aus dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus*) liegt bei 72°C. Bei der Strangsynthese verlängert die Polymerase die Oligonukleotide durch den komplementären Einbau der dNTPs von 5' in 3' Richtung. Der Nachweis der spezifischen PCR-Produkte kann z. B. über die Größe mittels Agarosegelelektrophorese (s. 3.7.5) oder durch Hybridisierung mit geeigneten DNA-Sonden erfolgen.

3.7.6.2 Primer und amplifizierte Fragmente

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer (Oligonukleotide) sind in Tab. 4 und 5 aufgeführt. Die Auswahl der *hsp60*-Primer erfolgte anhand eines Sequenzvergleiches bekannter *hsp60*-Gene möglichst nah verwandter Mykoplasmen- und anderer Bakterienspezies. In diesem Vergleich, mit Hilfe des Programms "MULTalign" (s. 3.4) wurde die *hsp60*-Gensequenzen von *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli* verglichen und auf Sequenzhomologien hin analysiert. Über die Gesamtgenlänge von ca. 1600 bp wurden 10 Sequenzabschnitte mit hohem Homologiegrad zum Primerdesign ausgewählt, fünf Vorwärts- (auf der ersten Hälfte des Gens) und fünf Rückwärts-Primer (auf der zweiten Hälfte des Gens). Die Basenabfolge der Oligonukleotide basierte auf der Sequenz des entsprechenden *M. pneumoniae*-Genabschnittes.

Tab. 4: Primer, eingesetzt zur Amplifikation des *hsp60*-Gens

Primerbezeichnung	Primersequenz		T _a ¹⁾ / Anzahl der Basen
P1	5'	GCT GTT AAG GTA ACC GTT GGT CC 3'	59°C / 23
P2	5'	GAT GGA GTG ACC ATC GCT AAG G 3'	59°C / 22
P3	5'	TGG GGA CGG TAC TAC CAC TG 3'	59°C / 20
P4	5'	GCT CAA GCT ATG GCC TTA GTT GG 3'	59°C / 23
P5	5'	TTA GGG GAA GCT CGC CGT GT 3'	59°C / 20
P6	5'	CCC TTA CCA CCA ATA ACC GTG G 3'	59°C / 22
P7	5'	TCC GTA GCA CCA CCA ACC CGT A 3'	59°C / 22
P8	5'	GCA ATA CCA CCC CCC GA 3'	59°C / 17
P9	5'	CTG ATG CAG CTT TTT CGA GTG CAG 3'	59°C / 24
P10	5'	CAT ACA CAG CAA CGC TGG TGG 3'	59°C / 21

1) T_a: berechnete Anlagerungstemperatur

Das Primerpaar zur Amplifikation der 600 bp großen *hsp70*-Genfragmente wurde der Literatur (GALLEY et al. 1992) entnommen.

Tab. 5: Primer, eingesetzt zur *hsp70*-Amplifikation

Primerbezeichnung	Primersequenz		T _a ¹⁾ / Anzahl der Basen
P701	5'	CAR GCN ACN AAR GAY GCN GG 3'	62°C / 20
P702	5'	GCN ACN GCY TCR TCN GGR TT 3'	62°C / 20

Anmerkung: N = A+c+T+g R = A+g Y = c+T

1) T_a: berechnete Anlagerungstemperatur

Die Primer wurden von der Firma GIBCO BRL - LIFE TECHNOLOGIES hergestellt und als Lyophilisate geliefert. Nach dem Lösen in sterilem A. dest. wurden 20 µl der Primerlösung 1:50 (in A. dest.) verdünnt und die optische Dichte dieser Lösung wurde bei 260 nm ermittelt. Nach folgender Formel wurde die Konzentration der Stammlösung errechnet und diese dann portioniert bei -20°C eingefroren:

$$\text{Konz. in } \mu\text{g / ml} = \text{OD}_{260} \times \text{molekulare Masse per OD} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zum Einsatz in der PCR wurde die Stammlösung mit sterilem A. dest. auf 10 pmol/µl eingestellt und in 25-µl-Portionen bei -20°C gelagert. Diese Gebrauchsverdünnungen wurden nach einmaligem Gebrauch verworfen.

Die im PCR-Lauf verwendeten Reaktionsbedingungen sind in der Tab. 7 aufgeführt und entsprechen den optimalen Bedingungen. Zusätzlich wurden die Primer mit Hilfe des Programms "Oligo 4.0" (s. 3.4) hinsichtlich ihres GC-Gehaltes und des Fehlens von Sekundärstrukturen und von komplementären Basen am 3'-OH-Ende auf ihre Eignung in der PCR überprüft.

Tab. 6: Pipettierschema eines 50 µl PCR-Ansatzes

Reagenzien	Volumen [µl]
A. dest.	23
<i>Taq</i> -Polymerase-Puffer, 10 x	5
MgCl ₂ [25 mM]	2
Primer „hin“ [10 pmol/µl]	4
Primer „rück“ [10pmol/µl]	4
dNTP [100 mM]	8
Template	2
<i>Taq</i> -Polymerase, [1,25 U/µl]	2

Tab. 7: PCR-Lauf-Bedingungen

Denaturierung	PCR-Ansatz ohne <i>Taq</i> -Polymerase	94°C / 3 min
sofortige Abkühlung auf Eis	Zugabe der <i>Taq</i> -Polymerase	
35 Zyklen PCR-Lauf	Denaturierung Anlagerung Strang-Verlängerung	94°C / 30 sec 60°C / 1,5 min 72°C / 2,5 min
erweiterter Elongations-schritt des letzten Zyklus		72°C / 8 min
Abkühlen		4°C

3.7.6.3 Optimierung der Polymerase-Kettenreaktion

Eine möglichst optimale Sensitivität und Spezifität der PCR wurde durch die Optimierung der Reaktionsparameter erreicht. Im Optimierungsverfahren wurde je ein Parameter pro Optimierungsschritt verändert. Die Ansätze wurden im Agarosegel überprüft und der Wert, der zur intensiveren Bande, ohne Nebenbande führte, wurde in das Protokoll übernommen. Bei der

Ermittlung der optimalen Zykluszahl wurde die geringste Anzahl an Zyklen bei gleichbleibend intensiver Agarosegelbande gewählt. In Tab. 8 sind die ausgetesteten Parameter und deren Einsatzgrößen aufgeführt.

Tab. 8: Im Rahmen der Optimierung ausgetestete Konzentrationen, Temperaturen und Zykluszeiten

Parameter	Zeitdauer, Temperatur, Zykluszahl
Taq-Polymerase [U/Ansatz]	1,25 / 2,5 / 5,0
dNTPs [μ M je dNTP]	50 / 100 / 200 / 300
Primer [pmol je Primer/Ansatz]	10 / 20 / 30 / 40 / 50
MgCl ₂ [mM]	0,5 / 1,0 / 1,5 / 2,0
Extensionszeit [sec]	60 / 90 / 120 / 150 / 180
Annealingtemperatur [°C]	59 / 60 / 63 / 65
Annealingzeit [sec]	60 / 90 / 120
Zykluszahl	35 / 40 / 45 / 50

3.7.6.4 Mutagenese-PCR

Mit der PCR wurde ein gezielter Basenaustausch in der cDNA von *M. arthritidis* und *M. bovis* vorgenommen. Die Genese der Mutanten erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Ansätzen (PCR1 u. PCR2). In PCR1 wurde die cDNA mit je einem Mutationsprimer (s. Tab. 9) und einem Endprimer für das Plasmid pGEX-5X-3 (s. Tab. 10) synthetisiert. Es entstanden zwei PCR-Fragmente, die sich im Bereich der Mutationsprimer überschneiden und die neue Basensequenz enthielten. Die zwei Fragmente wurden in der Fusions-PCR (PCR2) mit den beiden Endprimern verknüpft. Der Basenaustausch in der cDNA war dadurch vollzogen.

Tab. 9: Mutageneseprimer

Primerbezeichnung	Primersequenz	T _m ¹⁾ / Anzahl der Basen
Mutationsprimer M1	5' TG GGT GGT GAT GAT TGG GAT AAT GCA ATT GTT AAA TGG ATG GTT GAA GAA ATT 3'	65°C / 53
Mutationsprimer M2	5' AAT TTC TTC AAC CAT CCA TTT AAC AAT TGC ATT ATC CCA ATC ATC ACC ACC CA 3'	65°C / 53

1) T_m: Schmelztemperatur

Tab. 10: Plasmidprimer, abgeleitet von pGEX-5X-3, eingesetzt in der Mutagenese-PCR

Primerbezeichnung	Primersequenz	T_m ¹⁾ / Anzahl der Basen
<i>M. arthritidis</i> -Endprimer A1	5' GTC AAG GAT CCT AGA ACC AAC CGC TGT AGC TTT G 3'	65°C / 34
<i>M. arthritidis</i> -Endprimer A2	5' TC GAA CTC GAG CTA GGG CAT TCT AGT TGA ACC ACC 3'	65°C / 35
<i>M. bovis</i> -Endprimer B1	5' GTC AAG GAT CCT AGC GGG ACT TGA TGT TGT TAG A 3'	65°C / 34
<i>M. bovis</i> -Endprimer B2	5' TC GAA CTC GAG CTA TTT ATT AAT GGT ATC AGC TAC 3'	65°C / 35

1) T_m : Schmelztemperatur

2)

Nachstehend sind die Reaktionsansätze und PCR-Bedingungen der Mutagenese-PCR für *M. arthritidis* und *M. bovis* schematisch beschrieben (Tab. 11 und 12).

Die Größe der PCR-Produkte wurde in der Agarosegelelektrophorese überprüft und die entsprechenden Produkte wurden daraus extrahiert (s. 3.7.3). Je 10 µl der aufgereinigten cDNA-Fragmente wurden vereinigt. Aus dieser Mischung wurde eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:50, 1:100: 1:500, 1:1000, 1:5000, 1:10000, 1:50000, 1:100000) erstellt, um Reste des ursprünglichen Templates so stark zu verdünnen, daß es keinen Einfluß auf die Fusions-PCR hatte. Das einheitliche Template würde sonst bei einer PCR-Reaktion mit den

Tab. 11: Reaktionsansatz der Mutagenese-PCR

Reagenzien	Volumen [µl]
A. dest.	20
<i>Taq</i> -Polymerase-Puffer, 10 x	5
MgCl ₂ [25 mM]	3
Primer „hin“ [10 pmol/µl]	5
Primer „rück“ [10pmol/µl]	5
dNTP [100 mM]	8
Template	2
<i>Taq</i> -Polymerase, [1,25 U/µl]	2

Tab. 12: PCR-Bedingungen der Mutagenese-PCR

Denaturierung	PCR-Ansatz ohne <i>Taq</i> -Polymerase	94°C / 3 min
sofortige Abkühlung auf Eis	Zugabe der <i>Taq</i> -Polymerase	
30 Zyklen PCR-Lauf	Denaturierung	94°C / 60 sec
	Anlagerung	61°C / 2,0 min
	Strang-Verlängerung	72°C / 2,0 min
erweiterter Elongations-schritt des letzten Zyklus		72°C / 8 min
Abkühlen		4°C

äußeren Primern in einer höheren Rate amplifiziert als die fusionierte DNA. Durch die Verdünnung lag das Ausgangstemplate in so geringer Konzentration vor, daß der größte Anteil der PCR-Produkte aus der fusionierten cDNA bestand. Ab einer bestimmten Verdünnungsstufe war die Konzentration der eingesetzten cDNA so gering, daß in der Agarosegelelektrophorese kein PCR-Produkt mehr sichtbar war. Die Verdünnungsstufen des cDNA-Gemisches für die Fusions-PCR bei *M. arthritidis* und *M. bovis* wurde in gleichen Verdünnungsschritten erstellt.

Es wurden je 2 µl von der Ausgangslösung und der jeweiligen Verdünnungsstufe als Template in der Fusions-PCR eingesetzt. Die Fusions-cDNA mit dem Primerpaar A1 und A2 für *M. arthritidis* bzw. B1 und B2 für *M. bovis* wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Tab. 13 und 14):

Tab. 13: Reaktionsbedingungen für die Fusions-PCR

Reagenzien	Volumen [µl]
A. dest.	20
<i>Taq</i> -Polymerase-Puffer, 10 x	5
MgCl ₂ [25 mM]	3
Primer „hin“ [10 pmol/µl]	5
Primer „rück“ [10pmol/µl]	5
dNTP [100 mM]	8
Template	2
<i>Taq</i> -Polymerase, [1,25 U/µl]	2

Es wurden für jede untersuchte Spezies zehn Ansätze eingebracht, die sich nur durch die Konzentration der cDNA-Fragmente unterschieden. Die PCR-Produkte wurden in einer Agarosegelelektrophorese kontrolliert und aufgereinigt. Die Produkte der beiden geringsten

Verdünnungsstufen, die eine einheitliche und scharfe Bande bildeten, wurden für eine Ligation in den Vektor pGEX-5X-3 genutzt.

Tab. 14: PCR-Bedingungen für die Fusions-PCR

Denaturierung	PCR-Ansatz ohne <i>Taq</i> -Polymerase	94°C / 3 min
sofortige Abkühlung auf Eis	Zugabe der <i>Taq</i> -Polymerase	
30 Zyklen PCR-Lauf	Denaturierung Anlagerung Strang-Verlängerung	94°C / 60 sec 61°C / 2,0 min 72°C / 2,0 min
erweiterter Elongations-schritt des letzten Zyklus		72°C / 8 min
Abkühlen		4°C

3.7.6.5 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierungen wurden bei MEDIGENE und SEQLAB in Auftrag gegeben, die die Ergebnisse in Form von Elektropherogrammen und Sequenzdateien lieferten. Die beauftragten Labore arbeiteten nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach SANGER (1977) und konnten die aufgereinigten PCR-Produkte direkt einsetzen. Als Sequenzierungsprimer wurden dieselben Primer, die schon zur PCR selbst eingesetzt wurden, verwandt. Nach Erstellung der Gesamtsequenzen wurden zusätzliche Primer synthetisiert, mittels derer die Sequenz nochmals kontrolliert wurde (Tab. 15).

Tab. 15: Primer, eingesetzt zu Kontrollsequenzierungen

Primerbezeichnung	Primersequenz	T_a ¹⁾ / Anzahl der Basen
Seq1	5' TGG TAG ATA CAG CAG GTA CCG 3'	60°C / 2
Seq2	5' TCG TCT TAG CAT CAT GGC TGG 3'	60°C / 2
Seq3	5' TAA CAG CAA CTA CAT TAA TGG TAC 3'	60°C / 2
Seq4	5' CCC ACT GTT AAT CGT GGC ACC 3'	60°C / 2
Seq5	5' GTA CGG GTT GGT GGT GCT ACG G 3'	60°C / 2
Seq6	5' GCA GAA CTA CGC AGT GAA GCT G 3'	60°C / 2

1) T_a : berechnete Anlagerungstemperatur

A) Didesoxy-Kettenabbruch-Methode

Das zu sequenzierende DNA-Amplifikat liegt im allgemeinen als linearer Doppelstrang vor. Bei Einsatz von zirkulären Plasmiden müssen diese durch Behandlung mit alkalischen Substanzen denaturiert werden. Zur Trennung der DNA-Stränge werden die Proben 5 min auf 100°C erhitzt und anschließend durch sofortige Abkühlung auf Eis daran gehindert wieder einen Doppelstrang auszubilden. An dieser einzelsträngigen Matrize verlängert eine DNA-Polymerase die Primer mit den vorhandenen vier dNTP-Molekülen. Es werden vier Ansätze pro zu sequenzierender Probe durchgeführt, die jeweils eine der vier Basen anteilig als Didesoxynukleotidtriphosphat (ddNTP) enthalten. Der Einbau eines solchen dNTP-Analogons führt zu einem Abbruch der Sequenzierungsreaktion und so zu unterschiedlich langen DNA-Ketten. Diese werden in einer hochauflösenden Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt.

Zum Nachweis der Ketten bedient man sich in der Regel radioaktiver oder fluoreszierender Marker. Im Falle einer radioaktiven Markierung werden [³⁵S]dATP oder [³⁵P]dNTP verwendet; im Falle einer Fluoreszenzmarkierung werden die eingesetzten Primer mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Nach erfolgter Radiographie bzw. nach dem Fluoreszenznachweis im DNA-Sequenzierer kann die Sequenz gelesen werden. Bei der Verwendung von fluoreszierenden Dye-Deoxy-TerminatorenTM (je Base ein anderer Fluoreszenzfarbstoff) können alle Reaktionen in einem Gefäß durchgeführt werden. Die Didesoxy-Fragmente werden dann durch einen Laserstrahl, der das Gel abtastet, erfaßt.

B) Analyse der Sequenzierdaten

Die erhaltenen Sequenz-Elektropherogramme wurden mit Hilfe des Programms "CHROMAS 1.43" (s. 3.4) analysiert. Die fehlerhaft sequenzierten Anfangs- und Endbereiche gingen nicht in die Erstellung der Sequenz ein, einzelne nicht eindeutig sequenzierte Basen wurden mit Hilfe des Programms korrigiert. Die so erhaltene Sequenz wurde in eine Textdatei überschrieben und zur weiteren Bearbeitung über das "HUSAR"-Programmpaket (s. 3.4) modifiziert.

3.7.7 Analyse von Plasmid-DNA

3.7.7.1 Überprüfung potentieller Klone

In der Regel wurde die präparierte Plasmid-DNA sofort weiterverarbeitet, sonst wurde sie bei -20°C bis zu ihrer Untersuchung gelagert. Die Plasmidpräparationen der ausgewählten Klone

wurden nun, vergleichend mit der Kontrollpräparation des eingesetzten Vektors, mittels Restriktionsverdau (Tab. 16) linearisiert. Nach Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.7.5) konnten die Klone mit einem Insert ermittelt werden, da deren DNA-Bande um die Länge des Inserts (in kbp) größer war. Plasmid-DNA, die sequenziert und weiter analysiert werden sollte, wurde mittels Midipräparation in ausreichender Analysenmenge und hohem Reinheitsgrad präpariert.

Tab. 16: Restriktionsverdau

DNA bzw. Plasmid-DNA (gelöst in A. dest)	20 μ l
10 x Carlostpuffer	2,5 μ l
10 mM DTT	2,5 μ l
Restriktionsenzym	5-10 Units

Die Inkubation erfolgte im Wasserbad bei 37°C, 1-3 h.

Carlostpuffer

Tris-HCl, pH 8.0	330 mM
Kaliumacetat	660 mM
Magnesiumacetat	100 mM
Spermidin	30 mM
BSA	1 mg/ml

10mM Dithiothreitol

Dithiothreitol	1,54 g
Aqua dest. ad	1000,0 ml

3.7.7.2 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierungen wurden bei MEDIGENE und SEQLAB in Auftrag gegeben, die die Ergebnisse in Form von Elektropherogrammen und Sequenzdateien lieferten. Die beauftragten Labore arbeiteten nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach SANGER (1977) (s. 3.7.6.5).

Die DNA wurde wie in der Midipräparation gewonnen, aufgereinigt und in der Sequenzierreaktion eingesetzt. Als Sequenzierungsprimer dienten dieselben Primer, die

schon zur PCR selbst eingesetzt wurden (s. 3.7.6.2).

Die Sequenz-Elektropherogramme wurden mit Hilfe des Programms "CHROMAS 1.43" (s. 3.4) analysiert. Die fehlerhaft sequenzierten Anfangs- und Endbereiche gingen nicht in die Erstellung der Sequenz ein, einzelne nicht eindeutig sequenzierte Basen wurden mit Hilfe des Programms korrigiert. Die so erhaltene Sequenz wurde in eine Textdatei überschrieben und zur weiteren Bearbeitung über das "HUSAR"-Programmpaket (s. 3.4) modifiziert.

3.7.8 Klonierungstechniken

3.7.8.1 Ligation

3.7.8.1.1 Restriktionsverdau der Produkte aus der Klonierungs-PCR

A) Klonierungs-PCR

PCR-Fragmente, die als Insert zur Klonierung eingesetzt werden sollten, wurden über einen erneuten PCR-Lauf (s. 3.7.6.2) mit den zur Ligation benötigten Restriktionsschnittstellen versehen (Tab. 17). Das jeweils verwendete Primerpaar (PCR-Primern P1-P10 bzw. P701/P702) war bei Primer 1 um eine *Bam*HI-Schnittstelle und bei Primer 2 um eine *Xho*I-Schnittstelle verlängert worden.

Tab. 17: Schema der Klonierungs-PCR

Denaturierung	94°C		3 min
Denaturierung	94°C		1 min
Annealing	60°C	40 Zyklen	1,5 min
Verlängerung	72°C		2,5 min
Verlängerung, letzter Zyklus	72°C		8 min

In der PCR diente die jeweilige aus dem Agarosegel ausgeschnittene und aufgereinigte DNA-Bande als Template.

B) Restriktionsverdau

Die PCR-Produkte der Klonierungs-PCR wurden wiederum auf ein Agarosegel aufgetragen. Anschließend wurde die gewünschte DNA-Bande mit dem GeneClean-Kit II (s. 3.7.3) aufgereinigt. Das DNA-Fragment lag nun in 10 µl Aqua dest. vor und wurde zur Präparation

der für die Ligation notwendigen „sticky ends“ einem Restriktionsverdau (Tab. 18) mit *Bam*HI und *Xho*I unterworfen.

Tab. 18: Schema des Restriktionsverdaus der in der Klonierung eingesetzten PCR-Fragmente

	Volumen [μ l]
A. dest.	26
Carlos-Puffer, 10-fach	5
DTT-Lösung, 10-fach	5
Template	10
<i>Bam</i> HI	2
<i>Xho</i> I	2

Der Restriktionsverdau wurde nach 4 h bei 37°C auf Eis mit 2,2 μ l Ladepuffer (10-fach) abgestoppt und 10 μ l des Ansatzes wurden sofort auf ein 1%iges Agarosegel geladen. Nach 2 h bei 80V wurden die Banden der PCR-Fragmente unter dem UV-Licht auf die korrekte Fragmentgröße überprüft. Anschließend wurden die verbliebenen 40 μ l desselben Restriktionsverdaus direkt mit dem GeneClean-Kit II (s. 3.7.3) aufgereinigt und in 20 μ l A. dest. resuspendiert.

3.7.8.1.2 Vektoren

Für die Klonierungsversuche wurde der Plasmid-Vektor pGEX-5X-3 der Firma Pharmacia eingesetzt. Dieser Vektor ist Bestandteil eines Glutathion-S-Transferase (GST) Gen Fusion Systems, das für die Expression, Aufreinigung und Identifikation von Fusionsprotein-Produkten in *E. coli* entwickelt wurde.

Alle pGEX-Vektoren ermöglichen eine induzierbare, hochgradige intrazelluläre Expression von Genen oder Genfragmenten als Fusionsprodukte mit GST von *Schistosoma japonicum*. Der pGEX-5X-3 Vektor (Abb. 5) besitzt einen *tac*-Promoter, eine „multiple cloning site“ (MCS) mit 6 Restriktionsschnittstellen und einer Erkennungssequenz für den Faktor Xa, der eine Abtrennung des gewünschten Proteins vom Fusionsprodukt erlaubt.

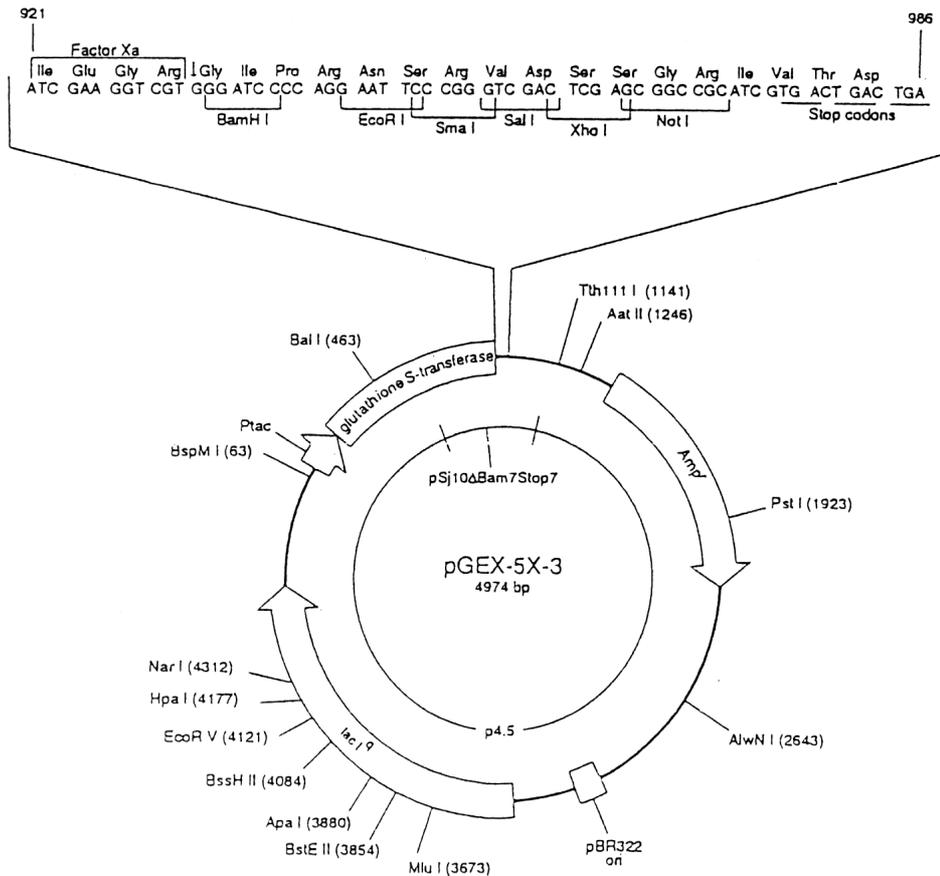


Abb. 5: Vektor pGEX-5X-3 (nach Certificate of Analysis, Pharmacia Biotech)

- AMP: Ampicillinresistenz
- pTAC: *Taq*-Promoter
- pBR322ori: Plasmid-Replikation
- lac i: *lac*-Gene mit *lac*-Promoter
- XhoI, BamHI: Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme

3.7.8.1.3 Ligationsansatz

Ligationspuffer, 10-fach

Tris-HCl, pH 7,6	500 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
BSA	500 µg/ml

Der Ligationspuffer wurde in 50 µl Portionen aliquotiert und bis zu seinem Gebrauch bei -20°C gelagert.

Alle Klonierungsreihen bedurften einer sorgfältigen Vorbereitung der jeweiligen Ligationsansätze. Hierfür wurden am Tag der Ligation die Vektoren und die zu klonierenden PCR-Fragmente immer „frisch“ bereitgestellt. Die Ligationsansätze wurden wie in Tab. 19 beschrieben pipettiert und über Nacht bei 16°C inkubiert. Neben den Klonierungsansätzen wurde zur Kontrolle immer ein Ansatz mit ungeschnittenem Vektor mitgeführt.

Tab. 19: Schema der Ligationsansätze

	Klonierungsansatz	Kontrollansatz
	Volumen [μ l]	Volumen [μ l]
Vektor	2	2
Insert	8	-
A. dest.	-	8
Ligationspuffer, 2-fach	10	10
Ligase	0,5	0,5

3.7.8.2 Transformation

3.7.8.2.1 Kompetente Zellen

Bakterienzellen, die als Empfängerzellen in einem Transformationsansatz eingesetzt werden, müssen durch chemische und physikalische Behandlung so verändert werden, daß ihre Fähigkeit DNA aufzunehmen, verstärkt wird. Diese Zellen werden dann als "Kompetente Zellen" bezeichnet. Die kompetent zu machenden Zellen wurden mit einer eiskalten Salzlösung behandelt, die zur Folge hat, daß die einzuschleusende DNA vermehrt an der Außenseite der Zelle aufgrund unterschiedlicher Ladung haften bleibt. Nach einer Hitzeschockbehandlung bei 42°C wird die DNA dann in die Zelle aufgenommen.

TFB-1

K-Acetat	0,29 g
RbCl	1,21 g
CaCl ₂	0,11 g
MnCl ₂	0,99 g
Glycerin, 50%ig [v/v]	30,0 ml
Aqua dest. ad	100,0 ml

TFB-2

MOPS	0,21 g
CaCl ₂	0,83 g
RbCl	0,12 g
Glycerin, 50%ig [v/v]	30,0 ml
(mit 1 M KOH auf pH 5.0 einstellen)	
Aqua dest. ad	100,0 ml

Die Lösungen wurden sterilfiltriert (Filter: 0,2 µm Porengröße) und im Kühlschrank aufbewahrt.

Die kompetent zu machenden Zellen (*E. coli* HB101 und JM105) wurden auf einer Luria-Platte fraktioniert ausgestrichen und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am Nachmittag des folgenden Tages wurde eine einzelne Kolonie zur Subkultivierung in ein steriles Röhrchen mit 3 ml Luria-Medium überführt und ohne Schütteln wiederum über Nacht bei 37°C inkubiert. Als Sterilitätskontrolle wurden 250 ml des Luria-Mediums in einem sterilen Kolben mit Schikane mitgeführt. Zeigte sich am nächsten Morgen keine Trübung des Mediums, wurde dieses zur weiteren Vermehrung der kompetent zu machenden Zellen verwendet. Die 3 ml Übernacht-Kultur wurde vor ihrer Weiterverwendung durch Gramfärbung auf Kontaminanten überprüft. Bei negativem Testergebnis wurden 2,5 ml dieser Kultur als Inokulat des sterilen 250 ml-Luria-Mediums eingesetzt und unter Schütteln bei 37°C bis zu einer OD₆₆₀ von 0,3-0,4 angezchtet. Nun wurden die Kulturen in eiskalten, sterilen Zentrifugenbechern 15 min, 4°C, bei 2600 x g geerntet. Der Überstand wurde sauber und vollständig abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die Zellen zügig auf Eis mit 60 ml eiskalter TFB-1 Lösung resuspendiert (kalte Pipetten!) und 90 min auf Eis inkubiert. Erneut wurde 15 min, 4°C, bei 2600 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden nun mit 10 ml eiskalter TFB-2 Lösung resuspendiert und auf Eis gestellt. Mit einer kalten Pipette wurden ca. 300 µl der Kulturlösung in vorgekühlte Reaktionsgefäße gegeben und möglichst schnell bei -70°C zur weiteren Lagerung eingefroren. Zur Reinheitskontrolle der kompetenten Zellen wurde ein Reaktionsgefäß einbehalten und damit eine Luria-Platte, eine Luria-Platte mit Ampicillin-Zusatz und eine Luria-Platte mit Topagarose zum Test auf Kontamination mit Phagen angelegt.

3.7.8.2.2 Transformationsansatz

Zu jedem Ligationsansatz wurden 100 µl kompetente Zellen (*E. coli* HB101 oder JM105)

pipettiert, gemischt und anschließend 2 h auf Eis inkubiert. Als Kontrolle der kompetenten Zellen wurde 1 µl ungeschnittener Vektor pGEX-5X-3 ebenfalls mit 100 µl kompetenter Zellen beschickt und auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 3 min wurden die Ansätze kurz auf Eis gestellt, zur Regeneration der Zellen und zur Expression der Resistenzmarker, der Kultur 300 µl Luria-Medium zugegeben und 60 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Jeder Ansatz wurde im Verhältnis 4:1 aufgeteilt und auf zwei Luria-Platten mit Ampicillin-Zusatz (LAP) mit dem stumpfen Ende eines Glasröhrchens ausplattiert. Nachdem die Inokulate auf den Platten getrocknet waren, wurden sie über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.7.9 Expression rekombinanter mykoplasmales Hsp60- und Hsp70-Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteine

3.7.9.1 IPTG-Induktion

Klone, deren mykoplasmales Proteinanteil exprimiert werden sollte, wurden auf ihre Induzierbarkeit durch Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG) überprüft. Die zu testenden Klone wurden fraktioniert auf einer LAP-Platte angelegt und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am Morgen des folgenden Tages wurden je Ansatz 2 ml LAP-Medium mit einer Einzelkolonie von der Platte beimpft und 2h bei 37°C im Rüttler inkubiert. Jeder Ansatz diente als Inokulat zum Beimpfen von je 2 Röhrchen LAP-Mediums (2 ml), wobei zu einem der beiden Röhrchen IPTG (Endkonzentration: 1 mM) gegeben wurde. Nach wiederum 2 h bei 37°C im Rüttler wurden die Ansätze mit und ohne IPTG-Zusatz auf Reaktionsgefäße verteilt und 5 min bei 14500 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in 50 µl A. dest. gelöst. 5 µl der Suspension wurden mit 5 µl Spaltpuffer 5 min auf 100°C erhitzt und zur Auswertung auf ein 15%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Ansätze wurden paarweise ohne IPTG-Zugabe und mit IPTG-Zugabe aufgetragen und anschließend in der Coomassie-Blau-Färbung ausgewertet.

3.7.9.2 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine mittels Glutathion-Sepharose-4B

Das „GST-Glutathion-Affinitätssystem“ von Pharmacia ermöglicht eine Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen auf der Basis einer Affinitätschromatographie. Der Ligand (redu-

ziertes Glutathion) wird durch Epoxy-Aktivierung an die Oxiran-Gruppe der Sepharose-4B-Matrix gebunden und ist komplementär zur Bindungsstelle der Glutathion-S-Transferase.

Nach GST-Fusionsproteinexpression in *E. coli* werden die Bakterienzellen geerntet und durch milde Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach dem Entfernen der Zelltrümmer kann das Zellysat direkt auf die vorbereitete Glutathion-Sepharose-4B-Matrix gegeben werden. Unspezifisch an die Matrix gebundene Proteine werden durch einen Waschpuffer entfernt. Das gebundene Fusionsprotein wird anschließend mit einem Elutionspuffer (10 mM an reduziertem Glutathion) unter Erhalt der Antigenität und Funktionalität eluiert. Diese Art der Aufreinigung erlaubt es in einem einzelnen Chromatographiedurchlauf über 90% des entsprechenden Fusionsproteins aufzureinigen.

Triton X-100, 20%ig [v/v]

Triton X-100, 100%ig [v/v]	20,0 ml
Aqua dest. ad	100,0 ml

Elutionspuffer

red. Glutathion	1,5 g
Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0 ad	500,0 ml

A) Large-Scale-Anzucht und Präparation

Die nach der IPTG-Induktion (s. 3.7.9.1) gewonnene Bakterienkultur (100 ml) wurde bei 7700 x g (10 min, 4°C) abzentrifugiert und das Pellet anschließend 30 min getrocknet. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Das Pellet wurde in 5 ml eiskaltem, sterilem PBS resuspendiert und anschließend mittels Ultraschall aufgeschlossen. Das Fusionsprotein wurde mit 20%igem [v/v] Triton X-100 auf eine Endkonzentration von 1% eingestellt und bei RT 30 min gemischt. Nach einem Zentrifugationsschritt (12000 x g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

B) Batch-Aufreinigung

Die Glutathion-Sepharose-4B (GS4B) wurde nach den Angaben des Herstellers mit PBS auf eine 50% Suspension eingestellt. Zu dem in der Präparation gewonnenen Überstand wurden nun 100 µl der 50%igen GS4B pipettiert und das Gemisch wurde 30 min bei RT auf einem Wipptisch inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (500 x g, 5 min) wurde das Sediment dreimal mit dem 10-fachen Bettvolumen PBS gewaschen und wiederum zentrifugiert.

C) Batch-Elution

Die Matrix wurde mit 1ml Elutionspuffer pro ml Bettvolumen resuspendiert und unter Mischen 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das eluierte Material mit 500 x g 5 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Eluationsschritt wurde noch zweimal wiederholt und die Überstände wurden anschließend vereinigt.

3.7.9.3 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine mittels Aggregat-Präparation

Die Konzentration der Fusionsproteine war nach der Expression des Plasmidvektors pGEX-5X-3 so hoch, daß das Löslichkeitsprodukt dieser Proteine im Cytosol überschritten wurde und sogenannte Einschlusskörperchen („inclusion bodies“) gebildet wurden, die einer Aufreinigung über eine Matrix in der Chromatographie nicht mehr zugänglich waren. Diese Proteine wurden mittels einer Aggregat-Präparation aufgereinigt.

Hochkonzentrierte GST-Fusionsproteine, die das Löslichkeitsprodukt im Cytosol überschritten („inclusion bodies“), wurden mittels Aggregatpräparation, wie z.B. auch für Lipopolysaccharide üblich, aufgereinigt. Hierbei wurden die Bakterienzellen nach der Expression der Fusionsproteine geerntet und anschließend über einen saccharosehaltigen hypertonen Puffer, Temperaturschock und Lysozymbehandlung aufgeschlossen. Die Aggregate wurden durch ein Detergenzgemisch in Lösung gebracht und nach Ultraschallbehandlung und Zentrifugation in Aqua dest. aufgenommen.

Tris-Puffer, saccharosehaltig

Saccharose	25 g
Tris, 50 mM, pH 8,0 ad	100 ml

Lysozymlösung, 10 mg/ml

Lysozym	100 mg
Tris, 250 mM, pH 8,0 ad	10 ml

2 x RIPA-Lösung

Tris, pH 7,4	20 mM
NaCl	300 mM
Natriumdesoxycholat	2 g
NP-40, Tergitol	2 g
Aqua dest. ad	100 ml

TET-Lösung

Tris, pH 8,0	100 mM
EDTA, pH 8,0	50 mM
Triton X-100	2 g
Aqua dest. ad	100 ml

Die nach der IPTG-Induktion (s. 3.7.9.1) pelletierten Bakterien (aus 50 ml-Kulturmedium) wurden in 1 ml Saccharose-haltigem Tris-Puffer resuspendiert und mindestens 30 min bei -70°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde den Zellen 0,25 ml Lysozymlösung zugegeben und die Ansätze wurden 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Detergenzmischung (4 Teile 2xRIPA, 1 Teil TET) hinzugegeben. Es wurde gut gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Lösungen wurden 5 min mittels Ultraschall (MidiTip, 50% duty cycle) homogenisiert und danach 20 min bei 28000 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden in 0,5 ml A. dest. aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Proteinaggregate wurden durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer oder Guanidinchlorid in Lösung gebracht. Dazu wurde das gewünschte Volumen der Aggregate in Reaktionsgefäße überführt, einer Zentrifugation unterworfen (1min, 16000 x g) und im gleichen Volumen an zweifachem SDS-Probenpuffer oder 5 M Guanidin-HCl-Lösung aufgenommen. Zur Entfernung nichtgelöster Bestandteile wurden die Ansätze nochmals 1 min bei 16000 x g zentrifugiert.

3.8 Proteinchemische und immunologische Methoden

3.8.1 Antiseren und Konjugate

In Tab. 20 sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgeführt.

Tab. 20: Antikörper, eingesetzt im Kolonieblot und Westernblot

Antikörper gegen	hergestellt in	eingesetzt für	verwendete Verdünnung in PBS
<i>M. arthritidis</i> (Gesamtzellysat)	Kaninchen	Kolonieblot Westernblot	1:1000
<i>M. bovis</i> (Gesamtzellysat)	Kaninchen	Kolonieblot Westernblot	1:1000
<i>M. agalactiae</i> (Gesamtzellysat)	Kaninchen	Kolonieblot Westernblot	1:1000
<i>M. hyopneumoniae</i> (Gesamtzellysat)	Kaninchen	Kolonieblot Westernblot	1:1000
MAP1 ^a	Kaninchen	Westernblot	1:500
MAP2 ^a	Kaninchen	Westernblot	1:500
pMA60-1 (rekomb.)	Kaninchen-68	Westernblot	1:200 - 1:500
pMA60-1 (rekomb.)	Kaninchen-73	Westernblot	1:200 - 1:500
pMA60-2 (rekomb.)	Kaninchen-76	Westernblot	1:200 - 1:500
pMA60-2 (rekomb.)	Kaninchen-78	Westernblot	1:200 - 1:500
Hsp60 ^b (von <i>M. arthritidis</i>)	Kaninchen	Westernblot	1:200
Hsp60 (von <i>Synechococcus</i> sp.)	Kaninchen	Westernblot	1:1000

^a: MAP1 und 2: synthetisch erstellte Peptide aus zwei verschiedenen antigenen Bereichen des Hsp60 von *M. pneumoniae*

^b: Hsp60 von *M. arthritidis*, gewonnen aus Gesamtzellysat, isoliert und aufgereinigt in der Affinitätschromatographie

Die Kaninchen-Hyperimmunseren wurden im Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover hergestellt. Die Kaninchenserum gegen MAP1 und MAP2 (MAP: multiple antigenic peptides) und gegen rekombinante Hsp60-Polypeptide wurden nach der unter 3.8.5 beschriebenen Methode gewonnen. Das Kaninchenserum gegen Hsp60 aus Gesamtzellysat von *M. arthritidis* wurde freundlicherweise von A. Wedde, Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt. Der Kaninchen-anti-Hsp60-AK (gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp.) wurde von der Firma Biomol (Deutschland) erworben.

Die für den immunologischen Nachweis eingesetzten Konjugate (1) Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin, (2) Ziege-anti-Maus-Immunglobulin, (3) Ziege-anti-Schwein-Immunglobulin und (4) Ziege-anti-Rind-Immunglobulin, jeweils konjugiert mit Peroxidase wurden von der Firma Nordic Immunological Laboratories (Tilburg, Niederlande) erworben.

3.8.2 Kolonieblot

Der Kolonieblot wurde modifiziert nach KOTANI und McGARRITY (1985a,b) durchgeführt.

Substratlösung

4-Chlor-1-Naphthol	12,0 mg
Methanol	4,0 ml
PBS	20,0 ml
H ₂ O ₂ , 30%ig [v/v]	20,0 µl

Das Chlornaphthol wurde in Methanol gelöst und dann langsam in das PBS überführt. Kurz vor Gebrauch wurde die Lösung mit Wasserstoffperoxid versetzt.

Tris-HCl (100mM)

Tris-HCl	12,1 g
Aqua dest. ad	1000,0 ml

pH-Wert: 7,4 (die Einstellung erfolgte mit NaOH)

Auf eine gut bewachsene Agarplatte (mit etwa 100 Kolonien) wurde eine Nitrocellulosemembran (NC) gelegt. Die Position des Filters auf der Agarplatte wurde markiert, um später das Koloniemuster auf der NC den Ursprungskolonien zuordnen zu können. Nach 5 min wurde die Membran mit der koloniebedeckten Seite nach oben in eine Petrischale oder in die Vertiefung einer Makrowellplatte überführt und dort mit dem 1. Antikörper (1:1000 in PBS) zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nicht gebundene Immunglobuline wurden anschließend durch dreimaliges Waschen (je 5 min) mit PBS-Tween entfernt. Der Kolonieblot wurde 2 h mit dem Konjugat Goat-anti-rabbit, gegen Kaninchen-Immunglobulin gerichtete Ziegenantikörper, gekoppelt mit Peroxidase (GAR / IgG (H+L) / PO) bei RT inkubiert. Dann wurde ungebundener 2. Antikörper (1:1000 in PBS) durch dreimaliges Waschen (je 5 min) mit PBS entfernt und durch die Zugabe der Substratlösung der immunologische Komplex nachgewiesen (Bildung eines blauen Farbkomplexes). Die

Reaktion wurde mit Leitungswasser abgestoppt und der Blot im Dunkeln bei RT getrocknet. Die lichtmikroskopische Auswertung erfolgte bei einer 32-58fachen Vergrößerung. Alle Inkubations- und Waschschriffe wurden bei RT auf einem Wipptisch durchgeführt.

3.8.3 Antigenpräparation und Proteinbestimmung

A) Antigenpräparation

Die auf 1000 ml angezüchtete Mykoplasmenkultur wurde 45 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in sterilem PBS resuspendiert und anschließend 30 min bei 20200 x g erneut abzentrifugiert. Dieser Waschschriff wurde noch zweimal wiederholt. Die Pellets wurden in ca. 2 ml sterilem PBS aufgenommen und mit dem Mini-Potter homogenisiert. 0,2 ml des Homogenisates wurden zur späteren Proteinbestimmung entnommen, der verbliebene Rest wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden zur weiteren Probenaufbereitung mittels Ultraschall aufgeschlossen (3 mal 30-60 sec; Stufe 2; 50% duty cycle). Darauf wurden die Proben portioniert und mehrfach eingefroren und wieder aufgetaut. Zur Beseitigung von unlöslichen Zellbestandteilen wurden die Proben nochmals 2 min bei 16000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in Reaktionsgefäße überführt und zur langfristigen Lagerung bei -80°C aufbewahrt.

B) Proteinbestimmung

Proteinbestimmung nach Fällung mit TCA

Zu 0,2 ml der zu untersuchenden Lösung wurde 1 ml Trichloressigsäure (TCA) pipettiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubation bei 4°C wurde die Probe bei 930 x g zentrifugiert und anschließend der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in einem Gemisch aus 0,5 ml 0,5 N NaOH, 0,5 ml Aqua dest. und 1 ml Biuret-Reagenz resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert.

Die Messung der Extinktion bei 546 nm erfolgte gegen den Leerwert (0,5 ml Aqua dest., 0,5 ml 0,5 N NaOH, 1 ml Biuret-Reagenz). Für das Biuret-Reagenz war anhand einer Eichkurve von Standard-Proteinen der Faktor 19 ermittelt worden.

Berechnung des Proteingehalts:

$$\text{Proteinkonz. [mg/ml]} = E \times 10 \times F$$

E: gemessene Extinktion bei 546 nm

F: Faktor des Biuret-Reagenz (=19)

Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Färbelösung (BRADFORD-Reagenz):

Coomassie Brilliant Blue	100 mg
Ethanol, 96%ig [v/v]	50 ml
Phosphorsäure, 85%ig [v/v]	100 ml
Aqua dest. ad	1000 ml

Nach dreistündigem Rühren wurde die Lösung filtriert und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

0,1 ml der zu untersuchenden Lösung wurde mit 1 ml der Färbelösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Probe bei 595 nm gegen den Leerwert (0,1 ml PBS, 1 ml Färbelösung) gemessen. Zur Ermittlung des Proteingehaltes wurde eine Eichgerade mittels BSA (bovines Serumalbumin)-Lösungen in Konzentrationen von 5-100 µg/ml erstellt.

Zur Proteinbestimmung der Bakterienkulturen wurden 500 µl der zu untersuchenden Kultur 10 min bei 20200 x g abzentrifugiert, das Pellet wurde in 0,1 ml PBS aufgenommen und erneut 10 min bei 20200 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal durchgeführt und das Pellet danach in 0,1 ml PBS resuspendiert. Die Probe wurde 10 min mittels Ultraschall (100% duty cycle) aufgeschlossen, anschließend mit 1 ml Färbelösung versetzt und die Extinktion der Probe wie oben beschrieben gemessen.

3.8.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, SDS-PAGE)

3.8.4.1 Eindimensionale SDS-PAGE

In der eindimensionalen SDS-PAGE werden die Moleküle anhand ihrer relativen Molekularmasse aufgetrennt. Durch Zusatz von Harnstoff und SDS werden die Proteine vollständig denaturiert und gleichmäßig negativ geladen, was eine Kompensation von Ladungsdifferenzen bedeutet.

Die Elektrophorese wurde mit einem vertikalen Gelsystem gemäß der Methode von LAEMMLI (1979) durchgeführt. Die Proben wurden zuerst in einem Sammelgel aufkonzentriert und anschließend über die Laufstrecke des Trenngels nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt.

3.8.4.1.1 Probenvorbereitung

Der Proteingehalt der Proben wurde nach der Methode von Bradford (s. 3.8.3) bestimmt. Die Proben wurden anschließend mit Spaltpuffer auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt und zur vollständigen Denaturierung 10 min bei 100°C erhitzt. Als Molekularmassenmarker für die Erstellung einer Eichgeraden wurden kommerziell erhältliche Standards (Prestained SDS-PAGE Standards; BioRad) verwendet. Der Molekularmassenstandard wurde portioniert und bei -20°C gelagert. Vor dem Einsatz in der SDS-PAGE wurde der Marker 1:2 mit Spaltpuffer verdünnt und 2 min auf 100°C erwärmt.

3.8.4.1.2 Durchführung der Elektrophorese

Bisacrylamid-Acrylamid-Lösung, 30%ig [w/v]

Acrylamid (4x)	29,20 g
Bisacrylamid (2x)	0,80 g
Aqua dest.	100,0 ml

Trenngelpuffer, 1,5 M TRIS-Puffer

Tris (-base)	18,18 g
Aqua dest. ad	100,0 ml

Die Lösung wurde mit Essigsäure auf pH 8,8 eingestellt.

Sammelgelpuffer, 0,5 M TRIS-Puffer

Tris (-base)	6,06 g
Aqua dest. ad	100,0 ml

Die Lösung wurde mit Essigsäure auf pH 6,8 eingestellt.

SDS-Lösung, 10%ig [w/v]

Natriumdodecylsulfat (SDS)	10,0 g
Aqua dest. ad	100,0 ml

Die Lösung wurde bei RT aufbewahrt.

Harnstoff-Lösung, 30%ig [w/v]

Harnstoff	30,0 g
Aqua dest. ad	100,0 ml

Ammoniumpersulfat-Lösung, 10%ig [w/v]

Ammoniumpersulfat (APS)	10,0 g
Aqua dest. ad	100,0 ml

Die Lösung wurde in Aliquots zu 0,1 ml bei -20°C gelagert.

"Overlay"-Puffer

SDS, 10%ig [w/v]	0,17 ml
Trenngelpuffer, 1,5 M Tris, pH 8,8	4,10 ml
Harnstoff, 30%ig [w/v]	1,80 ml
Aqua dest.	6,10 ml

Spaltpuffer, 2-fach konzentriert

Sammelgelpuffer, 0,5 M Tris, pH 6,8	2,50 ml
Harnstoff	0,60 g
SDS, 10%ig [w/v]	4,00 ml
Glycerin, 87%ig [v/v]	2,00 ml
2-Mercaptoethanol	1,00 ml
Aqua dest.	0,50 ml
Bromphenolblau	15,00 mg

Der Puffer wurde zu 0,5 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

LAEMMLI-Elektrodenpuffer (LAEMMLI 1979)

Tris (-base)	12,12 g
Glycin	57,60 g
SDS, 10%ig [w/v]	40,0 ml
Aqua dest. ad	4000,0 ml

pH-Wert: 8,3 (ohne Einstellung)

Trenngel

	<u>10%ig</u>	<u>20%ig</u>
Bisacrylamid-Acrylamid-Lösung, 30%ig [w/v]	11,8 ml	17,7 ml
SDS, 10%ig [w/v]	0,34 ml	0,34 ml
Trenngelpuffer, 1,5 M Tris, pH 8,8	8,2 ml	8,2 ml
Harnstoff, 30%ig [w/v]	3,6 ml	3,6 ml
Aqua dest.	11,2 ml	5,3 ml
APS, 10%ig [w/v]	128 µl	128 µl
TEMED	12,8 µl	12,8 µl

Sammelgel

Bisacrylamid-Acrylamid-Lösung, 30%ig [w/v]	1,2 ml
SDS, 10%ig [w/v]	0,1 ml
Sammelgelpuffer, 0,5 M Tris, pH 6,8	2,5 ml
Harnstoff, 30%ig [w/v]	1,0 ml
Aqua dest.	5,1 ml
APS, 10%ig [w/v]	100 µl
TEMED	5 µl

Die Polymerisationsdauer betrug mindestens 2 h. Das Probenvolumen pro Tasche betrug 20 µl (= 20 µg Probe), das Volumen des Molekularmassenmarkers betrug 10 µl; bei Benutzung von Kämmen mit nur einer großen Probestasche wurde ein Probenvolumen von 250 µl (= 250 µg Probe) aufgetragen. Der Elektrophoreselauf wurde bei 25 mA pro Gel durchgeführt und beendet, wenn die Lauffront des Bromphenolblaus das Gelende erreicht hatte.

3.8.4.2 Zweidimensionale SDS-PAGE

Proteingemische, die Moleküle mit gleichen Molekularmassen enthalten, können über eine zweidimensionale-Gelelektrophorese scharf aufgetrennt werden. Hierfür werden verschiedene Laufkonditionen für die 1. und 2. Dimension gewählt, wie z.B. Detergenzienzusatz, unterschiedliche pH-Werte, Kombination von Agarose- und SDS-Gel, u.a.. Zur zweidimensionalen Auftrennung wurde in dieser Arbeit in der 1. Dimension eine isoelektrische Fokussierung (IEF) und in der 2. Dimension eine SDS-PAGE mit dem MINI-PROTEAN-II-System (BioRad, München, Deutschland) durchgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte also nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und ihrer molekularen Masse.

3.8.4.2.1 Probenvorbereitung

Die über Nacht bei 4°C mit 10%iger [w/v] TCA-Lösung (Endkonz.) ausgefällten Proteine wurden 15 min bei 16000 x g abzentrifugiert und anschließend die Überstände entfernt. Die Proteinpellets wurden in 50 µl 8 M Harnstofflösung sorgfältig resuspendiert und mit 2 µl 0,25%iger [w/v] Bromphenolblau-Lösung (pH-Indikator) versetzt. Die Ansätze wurden mit 2 N NaOH neutralisiert, 15 min bei 100°C erhitzt und dann mit 50 µl Probenpuffer für die 1.

Dimension (PP1D) für den Einsatz in der Isoelektrischen Fokussierung umgepuffert. Bis zu ihrem Einsatz in der zweidimensionalen-Gelelektrophorese wurden die Proben bei -20°C gelagert und kurz vor dem Auftragen auf das Kapillargel nochmals 5 min auf 100°C erhitzt .

3.8.4.2.2 Durchführung der 1. Dimension

Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung

Acrylamid (4x)	14,19 g
N,N'-Methylen-Bisacrylamid (2x)	0,81 g
Aqua dest. ad	50,0 ml

Die Lösung wurde sterilfiltriert und in Aliquots zu je 700 µl bei -20°C aufbewahrt.

10%ig [w/v] Triton X-100

Triton X-100	10,0 g
Aqua dest. ad	100,0 ml

Die Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

pH-Ampholine

pH-Bereiche:	3,5-10 / 5-7 / 7-9
Konzentration der Stammlösung:	0,4 g/ml

Die Lösungen wurden portioniert und bei 4°C aufbewahrt.

10%ig [w/v] Ammoniumpersulfat (APS)

APS	1,0 g
Aqua dest. ad	10,0 ml

Die Lösung wurde zu 100 µl aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Gellösung für die 1. Dimension

Harnstoff	2,75 g
Acrylamid, 40%ig [w/v]	0,67 ml
Triton X-100, 10%ig [w/v]	1,0 ml
Ampholine, pH-Bereich 3,5-10	75 µl
Ampholine, pH-Bereich 5-7	125 µl
Ampholine, pH-Bereich 7-9	175 µl
Aqua dest.	0,86 ml

APS, 10%ig [w/v]	10 µl
TEMED	10 µl

Probenpuffer, 1. Dimension

Harnstoff	5,88 g
Triton X-100, konz.	200 µl
Ampholine, 7-9	200 µl
DTT	154 mg
Aqua dest. ad	10,0 ml

Probenüberschichtungspuffer

Harnstoff	4,8 g
Triton X-100, konz.	500 µl
Ampholine, 7-9	100 µl
DTT	15,4 mg
Aqua dest. ad	10,0 ml

auf 37°C erwärmen, um den Harnstoff zu lösen; 0,5 ml Aliquots bei -80°C einfrieren.

Kathodenpuffer

NaOH	0,5 g
Aqua dest. ad	250 ml

Anodenpuffer

H ₃ PO ₄ , 85%ig [v/v]	0,34 ml
Aqua dest. ad	2000,0 ml

Zur Herstellung der Gellösung wurde der Harnstoff vorgelegt und alle weiteren Komponenten außer TEMED und APS zugegeben. Die Mischung wurde bei 55°C gelöst. Die Kapillaren wurden zu dreiviertel mit der Gellösung gefüllt und nach vollständiger Polymerisation in den Probenbehälter für die 1. Dimension überführt. Zur Ausrichtung des pH-Gradienten wurde zunächst bei 200 V, 10 min, dann bei 300 V, 15 min und anschließend bei 400 V, 15 min ein Vorlauf durchgeführt. Die Puffer des Vorlaufs wurden verworfen. Anschließend wurden je Kapillare 15 µl der entsprechenden Probe aufgetragen. Für eine spätere eindeutige Auswertung ist das Auftragen gleicher Volumina obligat, um gleiche Spotmuster zu erhalten. Die IEF wurde unter folgenden Laufbedingungen durchgeführt:

400 V, 15 min; 750 V, 15 min; 1000 V, 2 h 30 min

Nach Beendigung des Laufs wurden die Kapillargele mittels Gelejektor auf Parafilm ausgedrückt, mit ca. 100 µl Probenpuffer der 2. Dimension überschichtet und bei -20°C eingefroren.

3.8.4.2.3 Durchführung der 2. Dimension

Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung 30%ig [w/v]

Acrylamid (4x)	29,20 g
Bisacrylamid (2x)	0,80 g
Aqua dest.	100,0 ml

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris-Puffer, pH 8,8

Tris (-base)	18,18 g
Aqua dest. ad	100,0 ml

Die Lösung wurde mit Essigsäure auf pH 8,8 eingestellt.

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris-Puffer, pH 6,8

Tris (-base)	6,06 g
Aqua dest. ad	100,0 ml

Die Lösung wurde mit Essigsäure auf pH 6,8 eingestellt.

10%ig [w/v] Natriumdodecylsulfat (SDS)

Natriumdodecylsulfat (SDS)	10,0 g
Aqua dest. ad	100,0 ml

Die Lösung wurde bei RT aufbewahrt.

Trenngel

Bisacrylamid-Acrylamid-Lösung, 30%ig [w/v]	3,8 ml
SDS, 10%ig [w/v]	0,1 ml
Trenngelpuffer, 1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml
TEMED	10 µl
Aqua dest.	3,9 ml
APS, 10%ig [w/v]	100 µl

Die Angaben sind ausreichend für zwei Gele.

Sammelgel

Bisacrylamid-Acrylamid-Lösung, 30%ig [w/v]	0,65 ml
SDS, 10%ig [w/v]	50 µl
Sammelgelpuffer, 0,5 M Tris, pH 6,8	1,25 ml
TEMED	5 µl
Aqua dest.	3,05 ml
APS, 10%ig [w/v]	50 µl

Die Angaben sind ausreichend für zwei Gele.

Probenpuffer, 2. Dimension

Tris, 0,5 M, pH 6,8	10,0 ml
Glycerin	10,0 ml
SDS, 10%ig [w/v]	10,0 ml
DTT	1,2 g
Bromphenolblau, 0,05%ig [w/v]	6,0 ml
Aqua dest.	43,0 ml

Die Lösung wurde à 1 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die aufgetauten IEF-Gele wurden 10 min bei RT mit Probenpuffer für die 2. Dimension überschichtet und anschließend auf das Gel für die zweite Dimension übertragen. Die Kapillargele wurden hierbei immer in der gleichen Orientierung eingesetzt, d.h. auf der linken Seite befand sich der pH-Wert 3; der Molekularmassenmarker befand sich immer rechts neben dem pH-Wert 10. Die SDS-PAGE wurde im Elektrodenpuffer nach LAEMMLI (1979) bei 150 V durchgeführt.

3.8.4.3 Nachweis der aufgetrennten Proteine

Der Elektrophorese schloß sich eine Silberfärbung, eine Coomassie-Blau-Färbung oder ein Westernblot an.

3.8.4.3.1 Silberfärbung

Die Silberfärbung ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von Proteinen und Kohlenhydraten in Gelen. Abhängig von der chemischen Struktur können Proteine bis zu

einer Konzentration von 2 ng nachgewiesen werden. Die Färbung wurde in modifizierter Form nach den Angaben von BLUM et al. (1987) durchgeführt, d.h. es wurde vor der Silberimprägnierung und bei der Entwicklung Natriumthiosulfat eingesetzt, um die Sensitivität zu erhöhen und die unspezifische Hintergrundfärbung zu reduzieren.

Fixierlösung

Methanol	100,0 ml
Eisessig, mind. 96%ig [v/v]	24,0 ml
Formalin, 37%ig [v/v]	0,1 ml
Aqua dest. ad	200,0 ml

Natriumthiosulfat-Lösung

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,04 g
Aqua dest. ad	200,0 ml

Färbelösung

Silbernitrat	0,4 g
Formalin, 37%ig [v/v]	0,15 ml
Aqua dest. ad	200,0 ml

Entwickler

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,015 g
Formalin, 37%ig [v/v]	0,1 ml
Natriumcarbonat	6,0 g
Aqua dest. ad	200,0 ml

Stopplösung

Methanol	100,0 ml
Eisessig, mind. 96%ig [v/v]	24,0 ml
Aqua dest. ad	200,0 ml

Nach dem Lauf der SDS-PAGE wurde das Gel sofort in die Fixierlösung überführt und über Nacht inkubiert. Anschließend wurde mit 50%iger [v/v], 40%iger [v/v] und 30%iger [v/v] Ethanol-Lösung jeweils 20 min gewaschen. Nach einminütiger Inkubation in der Natriumthiosulfat-Lösung wurde das Gel anschließend zur Entfernung des überschüssigen Natriumthiosulfats dreimal 20 sec mit Aqua dest. gewaschen. Das Gel wurde nun 20 min mit

der Färbelösung imprägniert, zweimal mit Aqua dest. jeweils 20 sec gewaschen und dann mit Entwickler-Lösung überschichtet. Nach einer Minute bis zu einigen Minuten bildeten sich scharfe (braun-schwarze) Banden. Das Gel wurde wiederum zweimal 20 sec mit Aqua dest. gewaschen und anschließend 10 min in der Stopplösung geschwenkt.

Für eine spätere photographische Dokumentation wurde das Gel 20 min in 50%igem Methanol [v/v] gewaschen und dann in 30%iges [v/v] Methanol überführt. Zur dauerhaften Aufbewahrung wurde das Gel ca. 20 min in Geltrocknungspuffer gegeben und anschliessend zwischen Zellophanpapier getrocknet. Alle Inkubations- und Waschschriffe wurden auf einem Wipptisch durchgeführt.

Geltrocknungspuffer

Ethanol, 96%ig [v/v]	500,0 ml
Eisessig, 96%ig [v/v]	160,0 ml
Glycerin, 100%ig [v/v]	200,0 ml
A. dest. ad	2000,0 ml

3.8.4.3.2 Coomassie-Blau-Färbung

Mit der Coomassie-Blau-Färbung können Proteine bis zu einer Konzentration von 0,1 µg in z.B. SDS-Gelen nachgewiesen werden.

Färbelösung

Ethanol, 96%ig [v/v]	500,0 ml
Eisessig, 96%ig [v/v]	160,0 ml
Coomassie Brilliant Blue R250	10,0 g
Aqua dest. ad	2000,0 ml

Der Coomassie-Farbstoff wurde in Ethanol gelöst. Nach Zugabe der restlichen Lösungen wurde die Färbelösung filtriert.

Entfärbelösung

Ethanol, 96%ig [v/v]	500,0 ml
Eisessig, 96%ig [v/v]	160,0 ml
Aqua dest. ad	2000,0 ml

Das Gel wurde mindestens 1-3 h oder über Nacht in der Färbelösung geschwenkt.

Anschließend wurde es bis zur Entfärbung des Hintergrunds in der Entfärbelösung inkubiert. Für eine spätere photographische Dokumentation wurde das Gel in Aqua dest. überführt. Zur dauerhaften Aufbewahrung wurde das Gel ca. 20 min in Geltrocknungspuffer gegeben und anschließend zwischen Zellophanpapier getrocknet. Alle Inkubationsschritte erfolgten auf einem Wipptisch.

Geltrocknungspuffer (s. 3.8.4.3.1)

3.8.4.3.3 Westernblot

Im Westernblot werden die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran transferiert, wobei die Wanderung geladener Proteine im elektrischen Feld ausgenutzt wird. Die Durchführung erfolgte in einer vertikalen Blottingkammer und beruhte auf der Methode von TOWBIN et al. (1979) und BURNETT (1981). Der Nachweis der membrangebundenen Proteine erfolgte mit spezifischen ersten und zweiten Antikörpern, deren Bindung an die Proteine bzw. ersten Antikörper durch eine Farbreaktion dokumentiert wurde.

Towbin-Elektrodenpuffer

Tris (base)	12,12 g
Glycin	57,64 g
Aqua dest. ad	3200,0 ml
pH-Wert: 8,3 (ohne Einstellung)	
Methanol, 96%ig [v/v]	800,0 ml

Der Transfer wurde in einer vertikalen Blotkammer durchgeführt. Als Transfermembran diente Nitrocellulose (NC), als Transferpuffer Towbin-Puffer. Die Blotkassette wurde nach den Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Die Blotkassette wurde in Towbin-Puffer zur Äquilibrierung des Gels und zur Vermeidung von Luftblasen zwischen Gel und NC zusammengebaut. Der Transfer erfolgte 1,5 h bei 1 A. Im Anschluß daran wurde die NC-Membran auf Gelgröße zugeschnitten und das Gel verworfen.

Immunologischer Nachweis

A) Peroxidase-konjugierter zweiter Antikörper

Nach dem Transfer wurden die Blots zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit

3%iger [w/v] BSA-Lösung (in PBS-Tween) 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 15 min mit PBS-Tween gewaschen, um überschüssiges BSA zu entfernen. Die Bindung des 1. Antikörpers erfolgte 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Es schlossen sich 3 Waschschrte mit PBS-Tween jeweils 15 min an. Der Peroxidase-konjugierte 2. Antikörper wurde wieder 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C gebunden. Primäre Antikörper wurden in den Verdünnungen 1:200 bis 1:1000 (siehe Tab. 20), sekundäre Antikörper in der Verdünnung von 1:1000 in PBS eingesetzt. Nicht gebundene Immunglobuline wurden durch erneutes dreimaliges Waschen à 10 min mit PBS entfernt. Die Entwicklung erfolgte mit Substratlösung (s. 3.8.2) und wurde solange fortgesetzt, bis blau-lila-farbene Banden zu erkennen waren. Die Reaktion wurde mit Leitungswasser abgestoppt und der Blot auf Filterpapier im Dunkeln getrocknet. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden auf einem Wipptisch durchgeführt.

B) Alkalische Phosphatase-konjugierter zweiter Antikörper

Blockpuffer

Tris	1,2 g
NaCl	8,8 g
Aqua dest. ad	800,0 ml
Nach Einstellung des pH-Wertes mit HCl auf 8,0 Zusatz von	
Tween-20	0,5 ml
Gelatine	5,0 g
Aqua dest. ad	1000,0 ml

Der so erstellte Puffer wurde autoklaviert und anschließend bei RT aufbewahrt.

Waschpuffer, 10-fach

Tris	12,0 g
NaCl	88,0 g
Aqua dest. ad	800,0 ml
Nach Einstellung des pH-Wertes mit HCl auf 8,0 Zusatz von	
Tween-20	5,0 ml

Der Puffer wurde autoklaviert und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

Substratpuffer für Alkalische Phosphatase

Tris, 1M, pH 9,5	100,0 ml
NaCl, 1M	100,0 ml
MgCl ₂ , 1M	5,0 ml
Aqua dest. ad	1000,0 ml

Alle Komponenten dieses Puffers wurden sterilisiert eingesetzt. Der Puffer wurde anschließend autoklaviert. Die Lagerung des Puffers erfolgte bei 4°C.

Substratlösung für Alkalische PhosphataseNBT-Lösung:

Nitrotetrazoliumblausulfat	1,0 mg
N,N'-Dimethylformamid (DMF), 70% [v/v]	1,0 ml

BCIP-Lösung:

5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat-p-Toluidinsalz	0,5 mg
N,N'-Dimethylformamid (DMF), 70% [v/v]	1,0 ml

Die Aufbewahrung erfolgte in Glasbehältern bei -20°C. Die Gebrauchslösung wurde kurz vor der Inkubation mit je 100 µl NBT- und BCIP-Lösung auf 10 ml Substratpuffer hergestellt.

Die NC-Membran wurde nach Beendigung des Blotvorganges mind. 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C, mit Blockpuffer zur Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min mit Waschpuffer gewaschen (Entfernung überschüssiger Gelatine) und der 1. Antikörper, verdünnt in Waschpuffer, mind. 2 h bei RT (oder über Nacht bei 4°C) auf die Membran gegeben. Der Blot wurde wiederum dreimal 5 min mit Waschpuffer gewaschen und der Alkalische Phosphatase-konjugierte 2. Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG (H+L)), verdünnt in Waschpuffer, auf die Membran pipettiert. Die Inkubation erfolgte in der Regel über Nacht bei 4°C. Nach dreimal fünfminütigem Waschen mit Waschpuffer wurde die Membran mit Substratpuffer gewaschen (mind. dreimal 10 min, um eine ausreichende Umpufferung zu erreichen). Die Entwicklung erfolgte mit Substratlösung für Alkalische Phosphatase und wurde nach dem Erscheinen von deutlichen blau-violetten Banden mit reichlich Leitungswasser abgestopt. Der Blot wurde anschließend im Dunkeln zwischen Filterpapier getrocknet. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf einem Wipptisch.

3.8.4.3.4 Autoradiographie

Im Fall der wie unter 3.9.1.2 beschriebenen radioaktiven Markierung mykoplasmaer Proteine wurde die getrocknete Nitrocellulose, nach der Auswertung des zweidimensionalen Proteinmusters in der Westernblotanalyse, auf einen Autoradiografiefilm überführt. Die Expositionsdauer beträgt 20-24 h bei einer Temperatur von -70°C.

3.8.4.4 Auswertung und Dokumentation der SDS-PAGE

A) Eindimensionale SDS-PAGE

Die Bestimmung der molekularen Massen der aufgetrennten Proteine erfolgte mit Hilfe des Molekularmassenstandards. Dieses "Prestained SDS-PAGE Standard Kit, Low Range" (Biorad, München, Deutschland) setzte sich aus folgenden Proteinen zusammen:

Phosphorylase B, Bovines Serum Albumin, Ovalbumin, Carboanhydrase, Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor, Lysozym

Anhand der bekannten Angaben Molekularmassen der Markerbanden und deren Laufstrecke im Gel konnte eine Eichkurve erstellt werden, die eine lineare Abhängigkeit zwischen dem reziproken Wert der Beweglichkeit des Proteins und der Molekularmasse der Markerproteine aufwies (SOUTHERN 1979). Aus dieser Eichkurve konnten die Molekularmassen der unbekannt Proteine bestimmt werden. Die Erstellung der Eichkurve und die Berechnung der Molekularmassen wurden mit dem Computer-Programm "Fragments" (s. 3.4) durchgeführt. Der Algorithmus dieses Programms beruht auf der oben genannten mathematischen Beziehung.

B) Zweidimensionale SDS-PAGE

Berechnung des isoelektrischen Punktes

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes der aufgetrennten Proteine erfolgte mit Hilfe eines Molekularmassenstandards. Dieser "2D-SDS-PAGE- Standard" (BioRad) (Tab. 21) wurde, vergleichend zu den Proben, ebenfalls über die 1. und 2. Dimension aufgetrennt und anschließend die Proteine per Coomassie-Blau-Färbung nachgewiesen. So konnte anhand der Lage der Markerproteinbanden der pI der unbekannt Proteine ermittelt werden.

Tab. 21: Molekularmasse und pI der Proteine des 2D-SDS-PAGE-Standard

Protein	Molekularmasse [kDa]	pI
Conalbumin	76	6,0 / 6,3 / 6,6
Bovines Serum Albumin	66,2	4,98 / 5,07 / 5,18
Bovines Muskel Actin	43	5,47 / 5,5 / 5,53
GAPDH	36	8,3-8,5
Carbonanhydrase	31	5,9 / 6,0
Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor	21,5	4,5
Myoglobin	17,5	7

C) Berechnung der Molekularmasse

Die Berechnung der Molekularmassen erfolgte wie oben beschrieben.

3.8.5 Herstellung von Kaninchenseren gegen rekombinante *M. arthritidis*-Hsp60-GST-Fusionsproteine und synthetische Peptide

3.8.5.1 Tiere

Die Antikörperherstellung erfolgte in zwei Stallkaninchen des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen je eingesetztem Antigen.

3.8.5.2 Antigenpräparationen

A) Rekombinantes Hsp60 von *M. arthritidis*

Zur Immunisierung der Kaninchen wurden zwei rekombinante Hsp60-GST-Fusionsproteine von *M. arthritidis*, mit den Bezeichnungen pMA60-1 und pMA60-2 eingesetzt. Die rekombinanten GST-Fusionsproteine wurden über eine Aggregat-Präparation (s. 3.7.9.3) aus einer *E. coli*-Kultur aufgereinigt. Von der so erhaltenen Proteinsuspension wurden 50 µl entnommen und 5 min bei 16000 x g zentrifugiert. 100 µg des Pellets wurden in 30 µl 5 M Guanidin-HCl gelöst und erneut 5 min bei 16000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 370 µl physiologischer NaCl-Lösung versetzt.

B) Synthetische Peptide

Die zwei für die Immunisierung eingesetzten „Multiple Antigenic Peptides“ (MAPs) wurden am Institut für Peptidforschung Niedersachsen hergestellt. Die eingesetzten Peptidsequenzen sollten konservierte und stark antigene Bereiche des Hsp60 umfassen. Hierfür wurden die bekannten Hsp60-Aminosäure-Sequenzen von *M. pneumoniae* und *M. genitalium* auf das Vorkommen gemeinsamer antigener Bereiche, die gleichzeitig hydrophil und an der Proteinoberfläche befindlich sein sollten, verglichen (s. 3.4). Zwei Sequenzen wurden ausgesucht und in Form von MAPs synthetisiert. Hierbei werden die synthetisierten Peptide mit Hilfe der Aminosäure Lysin zu einem 10-14 kDa großen Molekül im Bäumchenschema verästelt. Eingesetzte antigene Peptidsequenzen:

MAP1: 5' HVE LLN GRL KQT TDK 3'

MAP2: 5' GIE DAS QLI ITE LDK 3'

Die MAPs lagen als Lyophilisate vor und wurden unmittelbar vor der Immunisierung in einer Konzentration von 200 µg/ml in physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

3.8.5.3 Immunisierungsschema

Den Kaninchen wurde vor der Immunisierung eine Blutprobe, die Nullprobe, entnommen und das Serum im Westernblot auf Reaktion mit den Gesamtzelllysaten von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* und den beiden rekombinanten Hsp60-Proteinen untersucht.

Zur Immunisierung wurden der Antigenpräparation (s. 3.8.5.2) 500 µl des Adjuvans Emulsionen zugegeben und es wurde eine stabile Emulsion hergestellt. Bei der Erstimmunisierung wurden 2 x 0,3 ml intramuskulär und 2 x 0,2 ml subcutan mit 100 µg/ml pro Tier verabreicht. Die Wiederholungsimmunisierungen erfolgten zwei und vier Wochen nach der Erstimmunisierung nach dem gleichen Schema. Probeblutungen aus der Ohrvene wurden nach 7, 14 und 28 Tagen entnommen und im Westernblot (s. 3.8.4.3.3) auf eine Antikörper-Antwort untersucht. Nach der 6. Woche wurden die Kaninchen in Narkose gelegt und durch Herzpunktion entblutet. Das gewonnene Serum wurde anschließend aufgereinigt.

3.8.5.4 **Aufreinigung der Kaninchenserum mit CNBr-aktivierter Sepharose**

Kopplungspuffer

Na ₂ HCO ₃	0,1 M
NaCl	0,5 M

A) Präparation des Liganden

100 ml *E. coli* JM105-Kultur mit einer OD₆₆₀ von 0,3-0,5 wurden bei 1500 x g abzentrifugiert und in 10 ml Kopplungspuffer aufgenommen. Die Zellen wurden mittels Ultraschall (viermal 30 sec, 50% duty cycle) auf Eis aufgeschlossen und 15 min bei 14400 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration des so gewonnenen Überstandes bei 280 nm (im Vergleich zu einer BSA-Eichkurve) ermittelt.

B) Kopplung

1,5 g CNBr-Sepharose (Sigma, Deisinghofen, Deutschland) wurden in einem Falcon-Röhrchen mit 50 ml 1 mM HCl resuspendiert und 30 min bei 1500 x g zentrifugiert. Das Sepharose-Sediment wurde nun anschließend fünfmal mit 50 ml 1 mM HCl und einmal mit 8 ml Kopplungspuffer gewaschen und jeweils wie oben zentrifugiert. Der präparierte *E. coli* HB101-Ligand wurde der Matrix zugegeben (Proteinmenge: 14 mg) und 2,5 h bei RT schonend gemischt. Zur Überprüfung des Bindungsgrades wurde die Proteinkonzentration des Überstandes nach Zentrifugation bestimmt. Die Sepharose wurde nun einmal mit 8 ml Kopplungspuffer gewaschen und freie Bindungsstellen wurden 1,5 h mit 10 ml Ethanolamin, pH 8,9, gesättigt. Die Matrix-Suspension wurde viermal im Wechsel mit jeweils 5 ml 1 M Natrium-Acetatpuffer, pH 5,0, und 1 M Natrium-Boratpuffer, pH 9,0, gewaschen. Das Sepharose-Sediment wurde in 5 ml PBS aufgenommen und damit eine Säule mit einem ca. 10 ml-Gesamtvolumen gepackt.

C) Aufreinigung des Antiserums

Bis zu 25 ml Antiserum wurden zur Absorption fünfmal über die Säule gegeben. Zwischen diesen Durchläufen wurde die Säule jeweils mit 0,1 M Natrium-Acetatpuffer, pH 4,0, und 0,1 M Tris, pH 7,5, regeneriert. Das so aufgereinigte Serum wurde fraktioniert aufgefangen und im Westernblot gegen *E. coli* JM105 getestet. Geeignete Fraktionen wurden vereinigt und in Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

3.8.6 Rekonvaleszentenseren in der Reaktion mit rekombinanten mykoplasmalen Hsp60- und Hsp70-GST-Fusionsproteinen

Mit Hilfe der rekombinanten Hsp60- und Hsp70-GST-Fusionsproteine (s. 3.7.9) wurden Rekonvaleszentenseren von Tieren, die im ELISA *M. bovis*- oder *M. hyopneumoniae*-Antikörpertiter aufwiesen, auf Reaktion mit diesen Proteinen, zum Nachweis von Hsp-Antikörpern, untersucht. Die eingesetzten Seren entstammten der Diagnostik des Mykoplasmenlabors des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover und besaßen im ELISA Antikörper-Titer gegen *M. bovis* bzw. gegen *M. hyopneumoniae* von $\geq 1:160$.

Die aufgereinigten rekombinanten *M. arthritidis*-Hsp60-GST-Fusionsproteine und die Hsp70-GST-Proteine von *M. arthritidis* und *M. bovis* wurden im Westernblot auf ihre Reaktion mit Rekonvaleszentenseren von Schwein und Rind getestet. Um eine Reaktion mit dem Fusionsanteil der Glutathion-S-Transferase (GST) auszuschließen, wurde diese als Kontrolle bei allen Seren mitgeführt. Die Proteine wurden auf ein Polyacrylamidgel (20 μ l pro Tasche; Konz.: 1 mg/ml) aufgetragen und in der SDS-PAGE (s. 3.8.4.1) aufgetrennt. Nach anschließendem Westernblot bei 1A, 2 h wurden die Proteine immunologisch (s. 3.8.4.3.3) nachgewiesen. Die bovinen und porcinen Rekonvaleszentenseren wurden 1:200 in sterilem PBS verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die entsprechenden 2. Antikörper (GASw / IgG (H+L) / PO; GABo / IgG (H+L) / PO) wurden in sterilem PBS 1:1000 verdünnt und 3 h bei RT eingesetzt. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit 4-Chlor-1-Naphthol als Substrat. Zusätzlich zu den Rekonvaleszentenseren wurden als Positivkontrolle für die Hsp60- bzw. Hsp70-Proteinbanden Westernblots mit Hsp60-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. bzw. Hsp70-Antikörper gegen Hsp70 von *M. pneumoniae* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Himmelreich, ZMBH, Heidelberg) analysiert. Als Negativkontrolle dienten bovine und porcine Seren aus der Diagnostik, die im ELISA keine Reaktion mit *M. bovis* bzw. *M. hyopneumoniae* aufwiesen.

3.9 Untersuchungen zur Regulation der Hsps

3.9.1 Induktion einer Hitzeschockantwort durch bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit

3.9.1.1 Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit (BALF)

Die in den Versuchsreihen eingesetzten BALFs wurden freundlicherweise von M. Ganter zur Verfügung gestellt (BAUMEISTER et al. 1998). Die Lungenspülungen wurden unter Azaperon/ Metomidat-Anästhesie entweder unter Sichtkontrolle mit einem Bronchoskop nach der Methode von HENSEL et al. (1994) oder blind mit einem Zentralkatheter nach HARMSSEN et al. (1979), modifiziert nach DELBECK (1995) durchgeführt. Zur Spülung wurden 80 ml physiologische NaCl-Lösung verwandt. Das zurückgewonnene Volumen lag zwischen 2 und 50 ml (BAUMEISTER 1996).

Die BALF wurde unmittelbar nach der Entnahme à 10 ml portioniert und bis zur Untersuchung bei -80°C eingefroren.

3.9.1.2 Radioaktive Markierung mykoplasmaaler (Hitzeschock-) Proteine

Für einen Versuchsdurchlauf wurden 15 mal 2 ml FRIIS-Medium mit 0,2 ml *M. hyopneumoniae* J beimpft. 0,5 ml desselben Inokulats wurden auf eine FRIIS-Agarplatte gegeben und wie die Flüssigkulturen 2-3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Der *M. hyopneumoniae*-Stamm wurde anschließend im Kolonieblot (s. 3.8.2) überprüft.

Pro Versuchsansatz (Anzahl der BALFs, Negativkontrolle (NK), Positivkontrolle (PK)) wurde 1 ml der sich in der logarithmischen Phase befindlichen Kultur in ein Reaktionsgefäß gegeben und 30 min bei 16000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen und jeweils 10 min bei 16000 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 100 µl FRIIS-Medium mit Cystein-Methionin-Defizit resuspendiert und 10 min bei 37°C adaptiert. Anschließend wurden den Ansätzen 100 µl der einzusetzenden BALF, der Negativ- und Positivkontrolle 100 µl NaCl, zugeben. Nach ausreichender Mischung wurden die Ansätze zur Adaption der Zellen 10 min bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend mit 2 µl des Cystein-/Methionin-Labeling-Mix (³⁵S-Markierung) versetzt und alle Ansätze, ausschließlich der PK, bei 37°C für 4 h bebrütet. Die PK wurde 1 h einem Hitzeschock bei 42°C unterzogen. Die Zellen befanden sich in ihrer logarithmischen Wachstumsphase. Die Reaktion wurde unmittelbar darauf durch eine Proteinfällung mit 20 µl 100%iger [w/v] TCA-

Lösung abgestopt und zu einer möglichst vollständigen Proteingewinnung über Nacht bei 4°C gehalten. Für die Sterilitätskontrolle wurden vor der Proteinfällung 50 µl jedes Ansatzes auf eine Blutplatte gebracht und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ bebrütet. Jeder der so gewonnenen Ansätze wurde in der 2D-SDS-Gelelektrophorese (s. 3.8.4.2) oder in der 1D-SDS-Gelelektrophorese (s. 3.8.4.1) aufgetrennt.

4 Ergebnisse

4.1 Polymerase-Kettenreaktion: Amplifikationsprodukte und Sequenzierergebnisse

4.1.1 *hsp60*-Gen von *M. arthritidis*, *M. agalactiae*, *M. bovis* und *M. hyopneumoniae*

Die Sequenzierung des *hsp60*-Gens von *M. arthritidis*, *M. agalactiae*, *M. bovis* und *M. hyopneumoniae* erfolgte auf der Basis von PCR-Fragmenten, die aufgereinigt aus dem Agarosegel direkt zur Sequenzierung eingesetzt werden konnten. Die Sequenzierung und die Datendarstellung in Form eines Elektropherogrammes wurden von den Firmen MEDIGENE (Martinsried, Deutschland) und SEQLAB (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die in der PCR eingesetzten Primer wurden mittels eines Sequenzvergleiches der *hsp60*-Gene von *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli* ermittelt. Über die Gesamtgenlänge von 1600 bp wurden zehn Sequenzabschnitte mit hohem Homologiegrad zum Primerdesign ausgewählt (Abb. 6). Die Basenabfolge der Oligonukleotide basierte auf der Sequenz des entsprechenden *M. pneumoniae*-Genabschnittes.

Die Auswahl der zur Sequenzierung geeigneten PCR-Fragmente erfolgte jeweils mittels eines PCR-Laufes. Mit der chromosomalen DNA der zu untersuchenden Mykoplasmen-spezies als Ziel-DNA wurden alle 25 möglichen Primerkombinationen unter Standardbedingungen getestet (Abb. 7 und 8). Zusätzlich wurden die Primer in einer solchen PCR mit *M. pneumoniae*-DNA als Positivkontrolle getestet (Abb. 9). Es wurden Primerkombinationen ausgewählt, die möglichst singuläre Banden mit der entsprechenden Fragmentgröße erzeugten. Die PCR-Parameter wurden für die einzelnen Reaktionen optimiert (Abb. 10a und b).

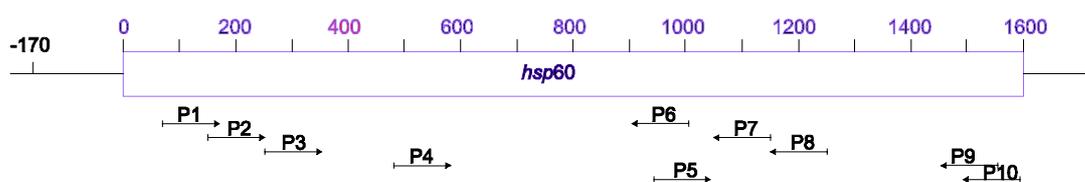


Abb. 6: Genkarte des *hsp60*-Gens von *M. pneumoniae* mit den Positionen der in der PCR eingesetzten Primer

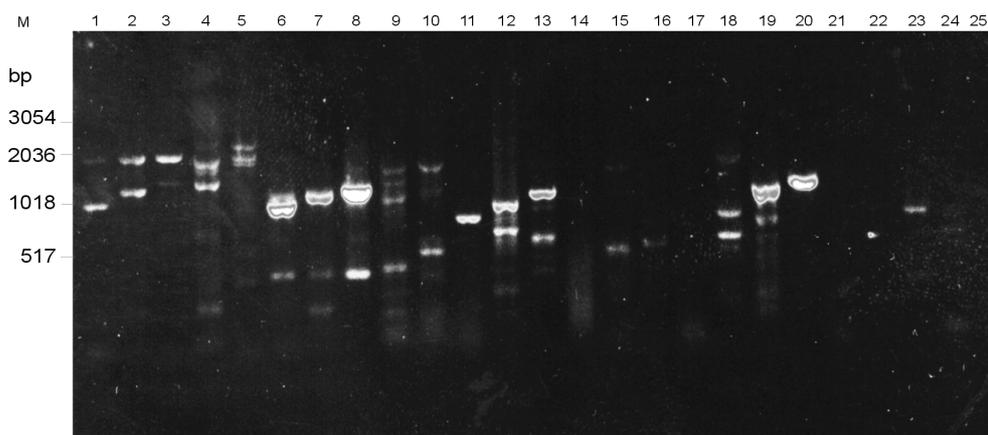


Abb. 7: Darstellung des Amplifikationsproduktprofils der *hsp60*-PCR von *M. arthritis*

Spur 1-25: PCR-Produkte der 25 möglichen Kombinationen der erzeugten *hsp60*-Primer

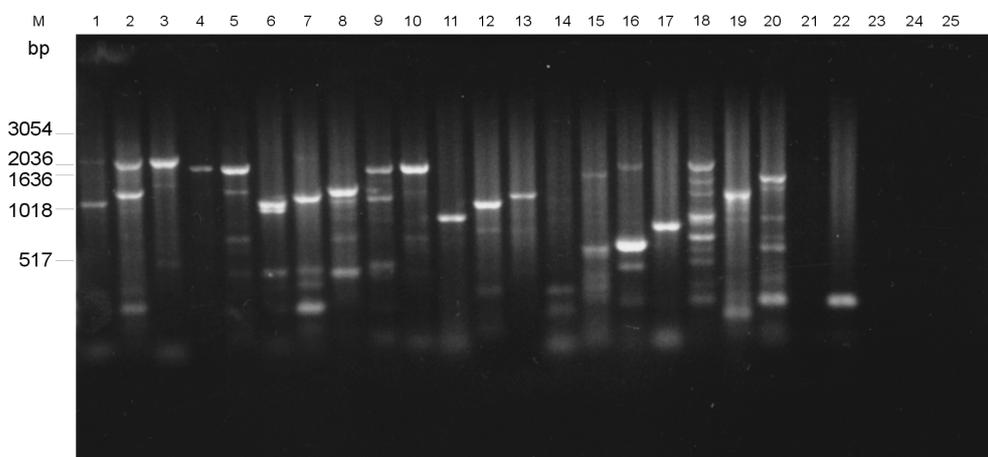


Abb. 8: Darstellung des Amplifikationsproduktprofils der *hsp60*-PCR von *M. bovis*

Spur 1-25: PCR-Produkte der 25 möglichen Kombinationen der erzeugten *hsp60*-Primer

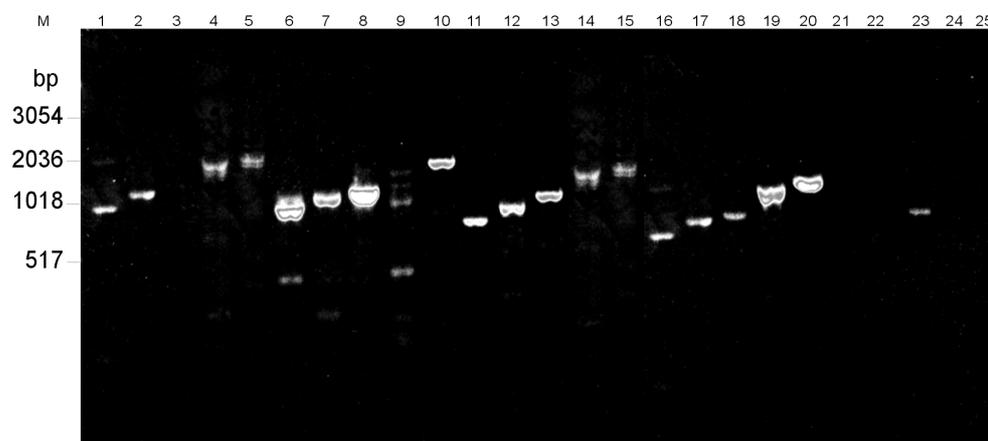


Abb. 9: Darstellung des Amplifikationsproduktprofils der *hsp60*-PCR von *M. pneumoniae*

Spur 1-25: PCR-Produkte der 25 möglichen Kombinationen der erzeugten *hsp60*-Primer

4.1.2 hsp70-Genfragment von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae*

Die Aufreinigung und Sequenzierung der *hsp70*-PCR-Produkte erfolgte wie unter 4.1.1 für die *hsp60*-Genabschnitte beschrieben. Zur Amplifikation der *hsp70*-Genfragmente wurden degenerierte Primer eingesetzt, die von GALLEY et al. (1992) auf der Basis des *hsp70*-Gens von *C. perfringens* entwickelt wurden (Abb. 11). Die Primer sind universell einsetzbar und vervielfältigen ein ca. 600 bp großes, im Zentrum des *hsp70*-Gens liegendes, Fragment. Die chromosomale DNA der zu untersuchenden Mykoplasmenspezies wurde mit diesem Primerpaar in der PCR amplifiziert. Die Reaktionsparameter wurden anschließend optimiert (Abb. 12).

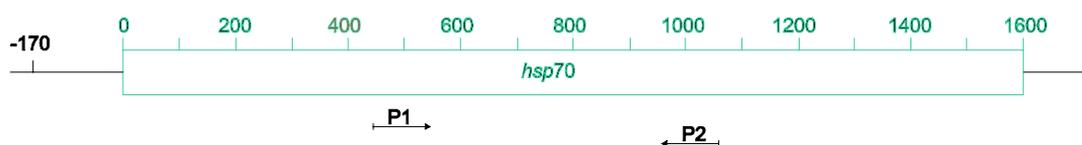


Abb. 11: Genkarte des *hsp70*-Gens von *C. perfringens* mit der Position des in der PCR eingesetzten Primerpaares

4.2 Analyse der DNA-Sequenzen

4.2.1 Sequenzhomologien der *hsp60*-Gene von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae*, und *M. hyopneumoniae*

Nach Sequenzierung der *hsp60*-Genfragmente, wurden diese Abschnitte zur fast kompletten *hsp60*-Gensequenz zusammengefügt. Folgende Größen konnten für die *hsp60*-Amplifikate von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* ermittelt werden.

***hsp60*-Gen-Amplifikate:**

<i>M. arthritidis</i> :	1446 bp	<i>M. bovis</i> :	1070 bp
<i>M. agalactiae</i> :	1462 bp	<i>M. hyopneumoniae</i> :	1108 bp

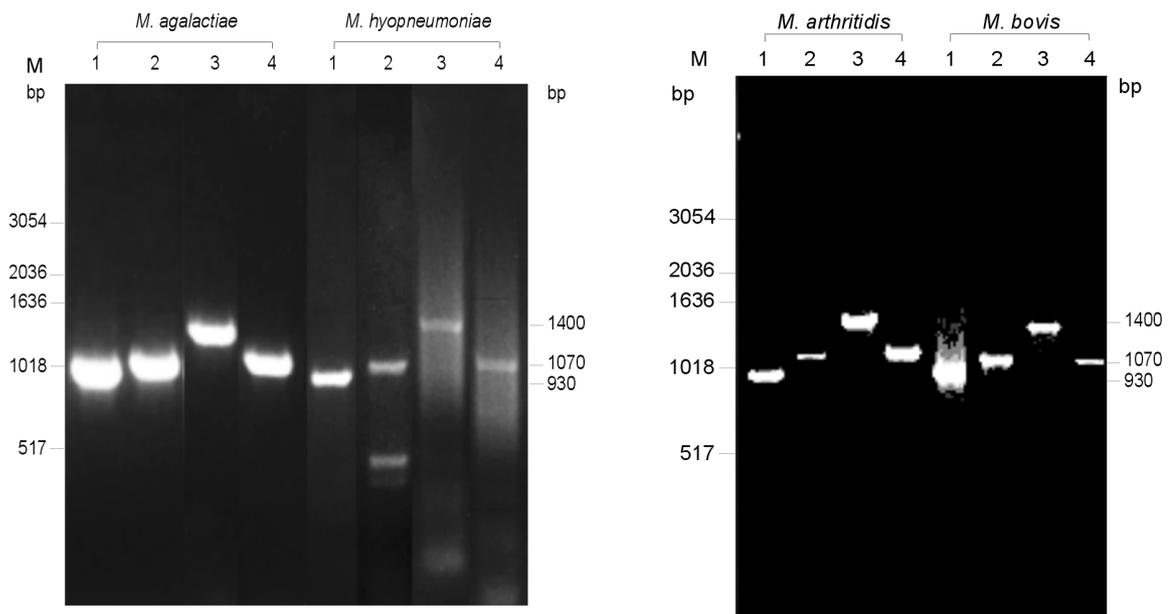


Abb. 10a und 10b: Darstellung der zur Sequenzierung ausgewählten *hsp60*-PCR-Produkte

- Spur 1: Fragment I der eingesetzten Mykoplasmenspezies (930 bp) / Primer: P1/P6
 Spur 2: Fragment II der eingesetzten Mykoplasmenspezies (1070 bp) / Primer: P1/P7
 Spur 3: Fragment III der eingesetzten Mykoplasmenspezies (1400 bp) / Primer: P2/P10
 Spur 4: Fragment IV der eingesetzten Mykoplasmenspezies (1070 bp) / Primer: P4/P10

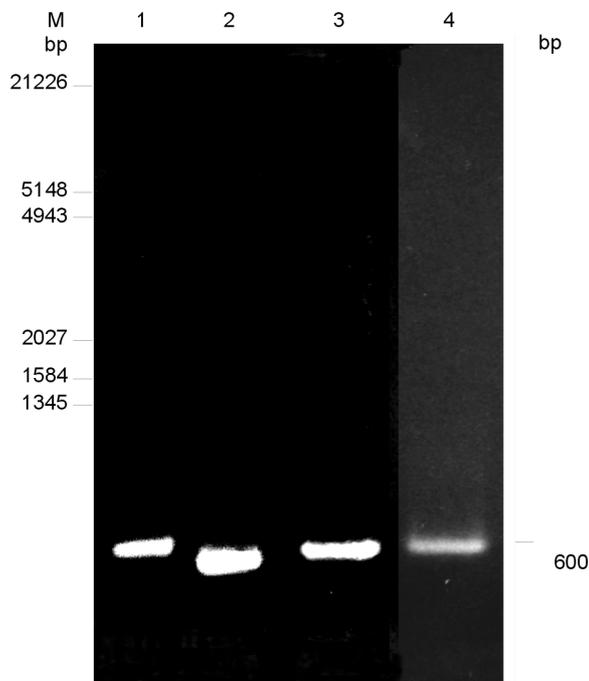


Abb. 12: Darstellung der zur Sequenzierung optimierten *hsp70*-PCR-Produkte

- | | | | |
|---------|-----------------|-----------------------------|----------|
| Spur 1: | Fragment MA70 | von <i>M. arthritis</i> | (550 bp) |
| Spur 2: | Fragment MB70 | von <i>M. bovis</i> | (595 bp) |
| Spur 3: | Fragment MAGA70 | von <i>M. agalactiae</i> | (601 bp) |
| Spur 4: | Fragment MHYO70 | von <i>M. hyopneumoniae</i> | (570 bp) |

Die mykoplasmalen *hsp60*-Teilsequenzen wurden mit *hsp60*-Sequenzen von *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli* mit Hilfe der Programme „clustal“ und „multalign“ des HUSAR (s. 3.4) verglichen (s. Anhang). Der Grad der Konservierung des jeweiligen Gens wurde über die homologen Genbereiche analysiert und mit den Programmen „bestfit“ und „gap“ des HUSAR (s. 3.4) ermittelt.

Dabei zeigten die *hsp60*-Genabschnitte der Mykoplasmenspezies, bis auf *M. genitalium*, untereinander Homologien von 98,0-99,9%. Die ermittelten Homologiewerte von *M. genitalium* gegenüber den weiteren Mykoplasmenspezies lagen zwischen 76,5 und 77,7%. Die Homologien der Mykoplasmenspezies zu *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli* waren abnehmend und lagen zwischen 59,7 und 49,2%. Der Sequenzvergleich ist prozentual in Tab. 22 dargestellt.

Tab. 22: DNA-Sequenzhomologien der *hsp60*-Genabschnitte zwischen *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* und anderen Mykoplasmen- und Bakterien-spezies

[%]	<i>M. arthritis</i> ISR 1	<i>M. bovis</i> PG 45	<i>M. agalactiae</i> PG 2	<i>M. hyopneumoniae</i> J	<i>M. pneumoniae</i> FH	<i>M. genitalium</i> G 37	<i>C. perfringens</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
<i>M. arthritis</i> ISR 1	-	98,7	99,9	98,9	99,2	76,8	56,1	55,9	52,4
<i>M. bovis</i> PG 45	-	-	98,8	98,0	98,8	77,4	55,3	55,8	53,3
<i>M. agalactiae</i> PG 2	-	-	-	99,1	99,9	77,0	56,2	56,2	52,7
<i>M. hyopneumoniae</i> J	-	-	-	-	99,1	77,7	56,0	56,1	52,3
<i>M. pneumoniae</i> FH	-	-	-	-	-	76,5	56,8	55,8	49,2
<i>M. genitalium</i> G 37	-	-	-	-	-	-	59,7	57,1	50,6
<i>C. perfringens</i>	-	-	-	-	-	-	-	65,1	56,8
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	64,6
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.2.2 Sequenzhomologien der hsp70-Genfragmente von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae*

Nach Sequenzierung mittels degenerierter Primer konnten für die *hsp70*-Amplifikate von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* folgende Größen ermittelt werden.

***hsp70*-Fragment:**

<i>M. arthritidis</i> : MA70	550 bp	<i>M. bovis</i> :	MB70	595 bp
<i>M. agalactiae</i> : MAGA70	601 bp	<i>M. hyopneumoniae</i> :	MHYO70	570 bp

Es erfolgte, wie unter Punkt 4.2.1, ein Vergleich der sequenzierten PCR-Produkte von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* mit *hsp70*-DNA-Sequenzen anderer Mykoplasmen- und Bakterienspezies (s. Anhang). Zwischen den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mykoplasmenspezies und bereits sequenzierten Spezies wurden Homologien von 46,8 bis 69,4%, zwischen *M. arthritidis* und *M. bovis* sogar von 99,8% ermittelt. Im Vergleich mit anderen Bakterien wiesen die *hsp70*-Sequenzen der Mykoplasmenspezies Homologien von 53,2 bis 60,5% auf. Der Sequenzvergleich ist prozentual in Tab. 23 dargestellt.

Tab. 23: DNA-Sequenzhomologien des *hsp70*-Genfragmentes zwischen *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* und anderen Mykoplasmen- und Bakterien-spezies

[%]	<i>M. arthritis</i> ISR 1	<i>M. bovis</i> PG 45	<i>M. agalactiae</i> PG 2	<i>M. hyopneumoniae</i> J	<i>M. pneumoniae</i> FH	<i>M. genitalium</i> G 37	<i>M. capricolum</i> cal. kid	<i>C. perfringens</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
<i>M. arthritis</i> ISR 1	-	99,8	66,6	69,4	60,9	64,0	64,4	59,2	55,3	54,7
<i>M. bovis</i> PG 45	-	-	66,7	69,7	62,0	65,0	65,7	60,3	56,6	55,6
<i>M. agalactiae</i> PG 2	-	-	-	67,4	60,5	63,0	68,1	60,5	56,4	53,2
<i>M. hyopneumoniae</i> J	-	-	-	-	60,9	63,7	64,7	59,6	58,6	53,3
<i>M. pneumoniae</i> FH	-	-	-	-	-	57,7	46,8	54,1	56,5	54,8
<i>M. genitalium</i> G 37	-	-	-	-	-	-	51,3	56,6	57,1	54,9
<i>M. capricolum</i> cal. kid	-	-	-	-	-	-	-	63,1	59,0	50,6
<i>C. perfringens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	63,8	58,8
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61,5
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.2.3 Taxonomische Einordnung von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* anhand der Sequenzierergebnisse

Aus den *hsp60*- und *hsp70*-DNA-Sequenzdaten von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* wurden mit Hilfe des HUSAR-Programmes „translate“ (s. 3.4) die Proteinsequenzen der *hsp60*- und *hsp70*-Genabschnitte bzw. -fragmente erstellt. Anhand dieser Proteinsequenzen wurden über die HUSAR-Programme „clustal“ und „clustree“ die phylogenetischen Positionen dieser Mykoplasmenspezies errechnet. In einem weiteren Ansatz wurden die phylogenetischen Positionen dieser Spezies zu *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *C. perfringens*, *B. subtilis*, *E. coli* (Hsp60, Hsp70) und *M. capricolum* (Hsp70) ermittelt, um eine umfassende taxonomische Einordnung zu ermöglichen (Abb. 13a,b,c und 14a,b,c).

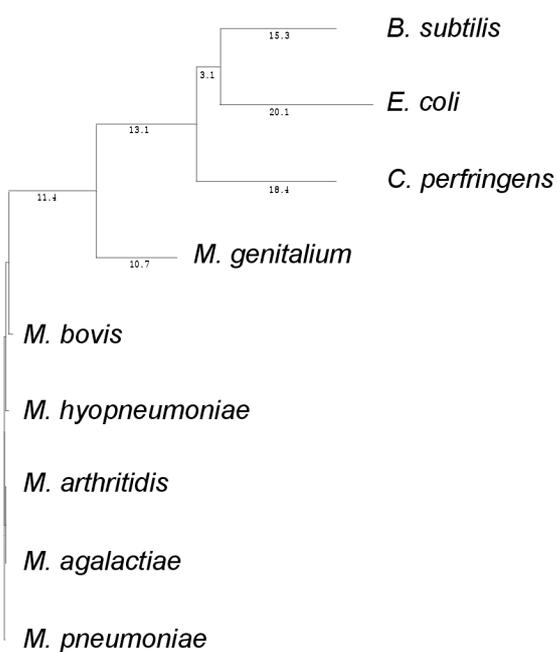


Abb. 13a: Taxonomische Position verschiedener Mykoplasmen- und Bakterienspezies auf Basis der DNA-Sequenz des *hsp60*

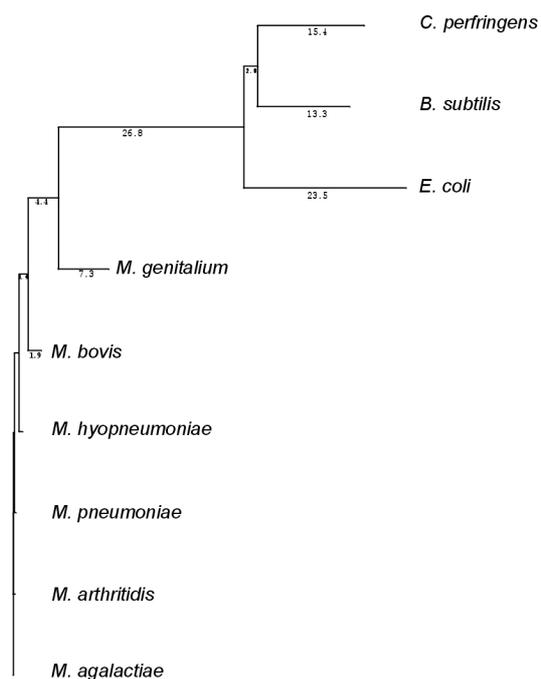


Abb. 13b: Taxonomische Position verschiedener Mykoplasmen- und Bakterienspezies auf Basis der Aminosäure-Sequenz des Hsp60

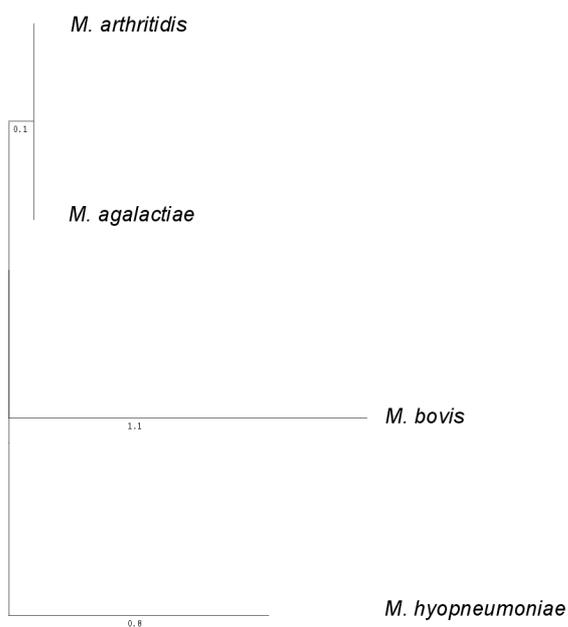


Abb. 13c: Taxonomische Position von *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* auf Basis der Aminosäure-Sequenz des Hsp60

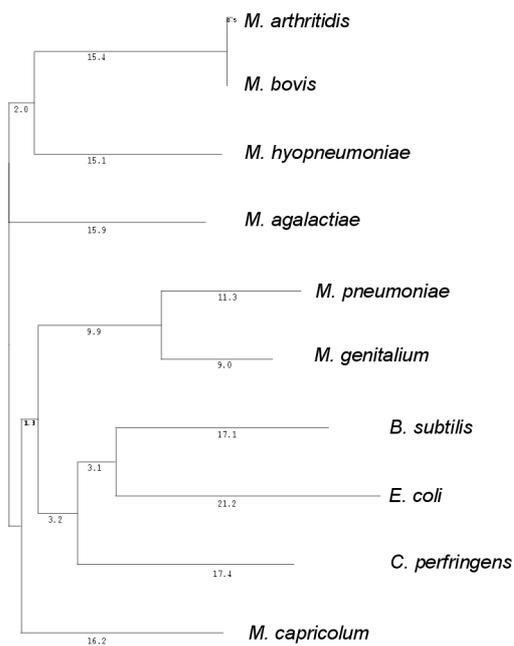


Abb. 14a: Taxonomische Position verschiedener Mykoplasmen- und Bakterienspezies auf Basis der DNA-Sequenz eines 600 bp großen Genfragmentes des *hsp70*

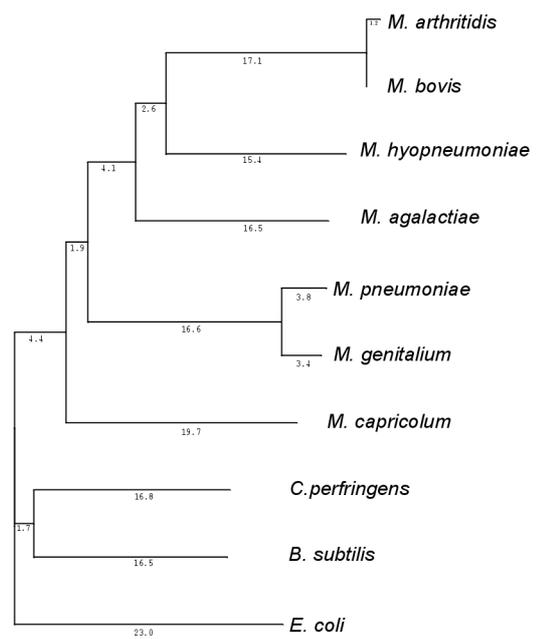


Abb. 14b: Taxonomische Position verschiedener Mykoplasmen- und Bakterienspezies auf Basis einer 200 Aminosäuren großen Sequenz des Hsp70

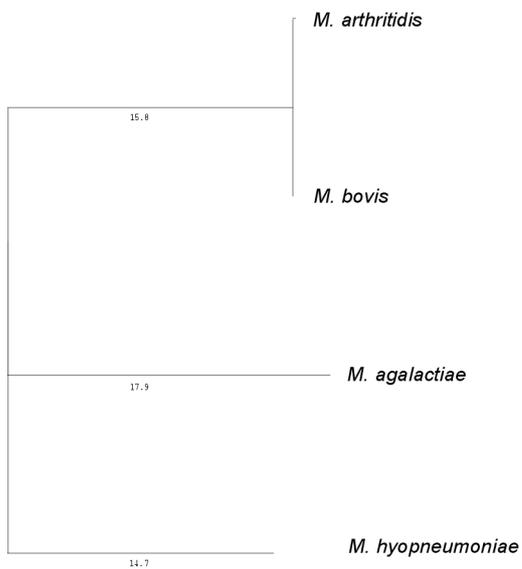


Abb. 14c: Taxonomische Position von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* auf Basis einer 200 Aminosäuren großen Sequenz des Hsp70

4.3 Klonierung und Expression

4.3.1 Aminosäure-Sequenzhomologien der Hsp von *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae*

4.3.1.1 Hsp60-Proteine

Der Aminosäure-Sequenzvergleich (Abb. 15) der Hsp60-Polypeptide von *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* untereinander und mit den Hsp60-Sequenzen von *M. pneumoniae* und *M. genitalium* ergab Homologien von 90,4-99,9%. Gegenüber *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli* lagen die Homologien im Bereich von 53,2 bis 60,8%. Der Sequenzvergleich ist prozentual in Tab. 24 dargestellt.

Am höchsten konserviert waren die Aminosäuresequenzen im N-terminalen und mittleren Bereich der Proteinsequenzen. Über das HUSAR-Programm „antigenic“ (s. 3.4) wurden potentielle antigene Bereiche des Hsp60 von *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* bestimmt (s. Anhang). Für die genannten Spezies konnten 17-22 antigene Bereiche ermittelt werden, die fast ausschließlich in stark konservierten Proteinregionen lokalisiert waren. Eine Ausnahme bildete ein Abschnitt im Bereich der Aminosäuren 122-133 des Hsp60 von *M. pneumoniae*, der sogar unter den Mykoplasmenspezies weniger als 50% Aminosäurehomologie aufwies (Abb.15).

4.3.1.2 Hsp70-Proteinfragmente

Der Aminosäure-Sequenzvergleich (Abb. 16) des Hsp70-Peptids von *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* untereinander und mit Hsp70-Sequenzen anderer Bakterien zeigte Homologien im Bereich von 58,7% bis 98,9%. Die Mykoplasmenspezies untereinander wiesen dabei Homologien von 63,2% bis 98,9% auf, im Vergleich mit anderen Bakterienspezies fielen die Werte auf 58,7% bis 68,5%. Der Sequenzvergleich ist prozentual in Tab. 25 dargestellt.

Über das HUSAR-Programm „antigenic“ wurden potentielle antigene Bereiche des Hsp70-Peptids von *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. agalactiae*, *M. hyopneumoniae* und dem DnaK-Protein von *E. coli* ermittelt. Für die Mykoplasmenspezies ergaben sich 10-12 antigene Regionen, für das gesamte DnaK-Protein sogar 30 antigene Regionen (s. Anhang). Die ermittelten Regionen waren fast ausschließlich in stark konservierten Bereichen des Hsp70 lokalisiert (Abb 16).

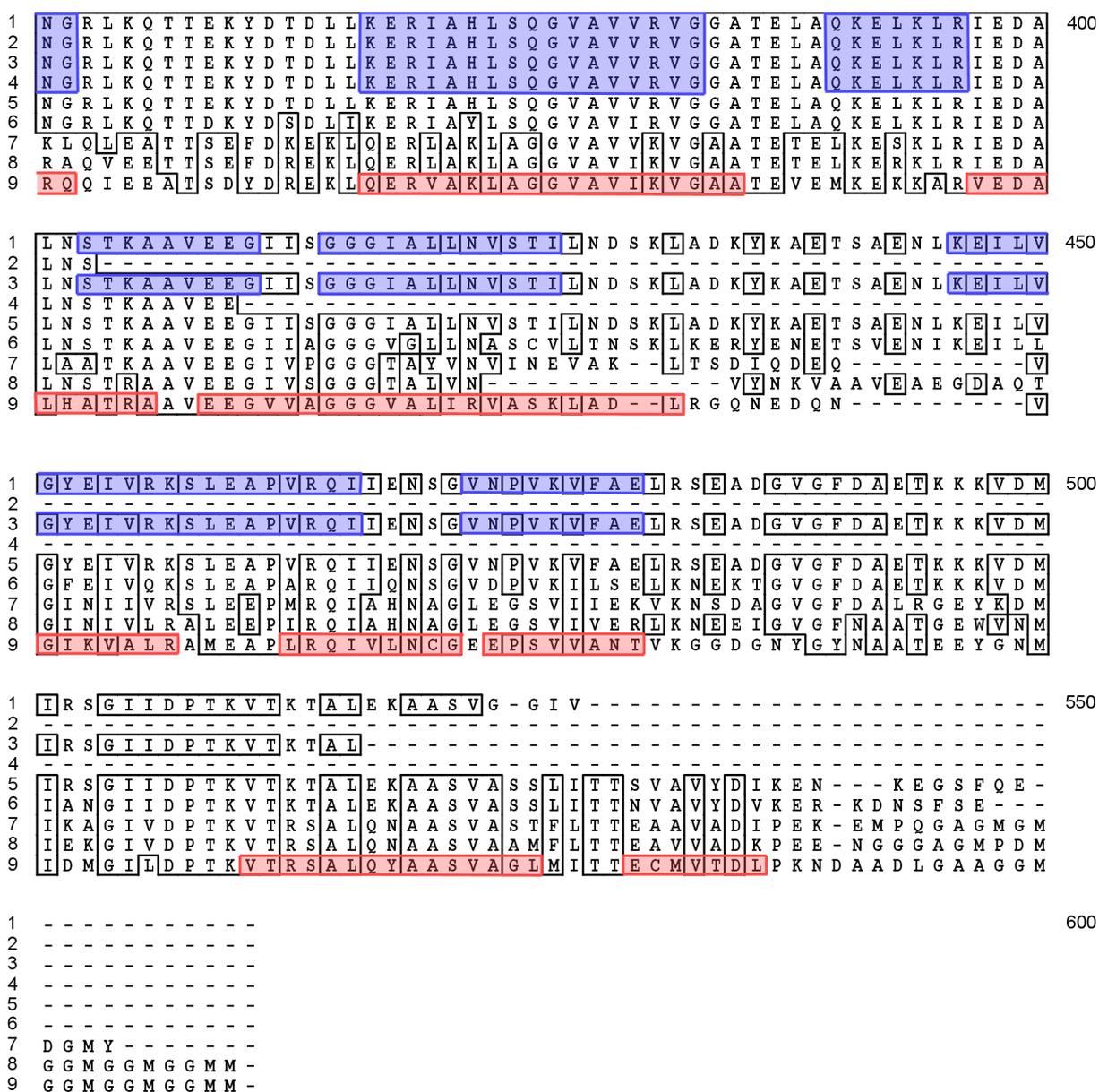


Abb. 15: Aminosäuresequenz-Homologievergleich der Hsp60-Proteine der untersuchten Mykoplasmenpezies mit Hsp60-Aminosäuresequenzen anderer Mykoplasmen- und Bakterienpezies

- 1: *M. arthritis* Immunogene Epitope des Hsp60 der untersuchten Mykoplasmen
- 2: *M. bovis* Immunogene Epitope des GroEL von *E. coli*
- 3: *M. agalactiae*
- 4: *M. hyopneumoniae*
- 5: *M. pneumoniae*
- 6: *M. genitalium*
- 7: *C. perfringens*
- 8: *B. subtilis*
- 9: *E. coli*

Tab. 24: Aminosäure-Sequenzhomologien des *hsp60*-Gens zwischen *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* und anderen Mykoplasmen- und Bakterienspezies

[%]	<i>M. arthritis</i> ISR 1	<i>M. bovis</i> PG 45	<i>M. agalactiae</i> PG 2	<i>M. hyopneumoniae</i> J	<i>M. pneumoniae</i> FH	<i>M. genitalium</i> G 37	<i>C. perfringens</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
<i>M. arthritis</i> ISR 1	-	96,3	99,9	98,4	99,4	90,5	58,8	59,8	55,4
<i>M. bovis</i> PG 45	-	-	96,3	95,2	96,3	91,3	58,3	60,0	53,2
<i>M. agalactiae</i> PG 2	-	-	-	98,9	99,9	91,0	59,9	60,8	56,1
<i>M. hyopneumoniae</i> J	-	-	-	-	98,4	92,7	59,5	60,6	54,1
<i>M. pneumoniae</i> FH	-	-	-	-	-	90,4	59,3	60,0	56,1
<i>M. genitalium</i> G 37	-	-	-	-	-	-	59,9	60,0	54,4
<i>C. perfringens</i>	-	-	-	-	-	-	-	78,7	68,7
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	71,7
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1 - - - - - 50
 2 - - - - -
 3 - - - - -
 4 - - - - -
 5 M S T D N G L I I G I D L G T T N S C V S V M E N G R P V V L E N P E G K R R T T P S I V S Y K - N N
 6 M S A D N G L I I G I D L G T T N S C V S V M E N G G R P V V L E N P E G K R R T T P S I V S Y K - N N
 7 - - M A K E K I I G I D L G T T N S C V S V M E G G Q P I I L E N P E G Q R R T T P S V V A F K - N S
 8 - - - M S K I I G I D L G T T N S C V A V L E G G E P V V I T N S E G A R R T T P S V V A F Q A N G
 9 - - - V S K V I G I D L G T T N S C V A V L E G G E P K V I A N A E G N R R T T P S V V A F K - N G
 10 - - - M G K I I G I D L G T T N S C V A I M D G T P P R V L E N A E G D R R T T P S I I A Y T Q D G

1 - - - - - 100
 2 - - - - -
 3 - - - - -
 4 - - - - -
 5 E I I V G D A A K R Q M V T N P - N T I V S I K R L M G T S N K V T V K N - - - - -
 6 E I I V G D A A K R Q M V T N P - N T I V S I K R L M G T S N K V K V Q N - - - - -
 7 D I I V G G A A K R Q A V T N P - N V V Q S I K S K M G T T S K - - - - -
 8 E R L V G Q V A K R Q A I T N P D K T I M S I K R H M G T D Y K - - - - -
 9 E R Q V G E V A K R Q S I T N P - N T I M S I K R H M G T D Y K - - - - -
 10 E T L V G Q P A K R Q A V T N P Q N T L F A I K R L I G R R F Q D E E V Q R D V S I M P F K I I A A

1 - - - - - 150
 2 - - - - -
 3 - - - - -
 4 - - - - -
 5 - - - - - P D G S T K E L T P E E V S A Q I L S Y L K D Y A E K K I G K T I S R A V I T V P A Y F
 6 - - - - - A D G T T K E L S P E Q I S A Q I L S Y L K D F A E K K I G K K I S R A V I T V P A Y F
 7 - - - - - V N L E G K D Y S P E Q I S A Q I L R Y M K N Y A E A K L G Q K A R V T T K A V I T V P A Y F
 8 - - - - - V N I D G K D L S P Q E I S A M I L Q K L K A D A E A Y L G E K V T E A V I T V P A Y F
 9 - - - - - V E I E G K D Y T P Q E I S A I I L Q H L K S Y A E S Y L G E T V S K A V I T V P A Y F
 10 D N G D A W V E V K G Q K M A P P Q I S A E V L K K M K K T A E D Y L G E P V T E A V I T V P A Y F

1 - - - - - 200
 2 - - - - - E P T A A A L A F G L D K N K D K N H K I L V F D L
 3 - - - - - A G L D V V R I I N E P T A A A L A F G L D K N K D K N H K I L V F D L
 4 - - - - - L E V L R I I N E P T A A A L A F G L D K V K K - E Q K I L V F D L
 5 - - - - - - - - - - I N E P T A A A L A F G L D K T E K - E M K V L V Y D L
 6 N D A E R N A T K T A G K I A G L N V E R I I N E P T A A A L A Y G I D K S N R - E M K V L V Y D L
 7 N D A Q R K A T K D A G T I A G L Q V E R I I N E P T A A A L A Y G L D K Q D K - E H T I L V Y D L
 8 N D A E R Q A T K D A G R I A G L D V K T I I N E P T A A A S L A Y G L D K M D S - A H K I L V Y D L
 9 N D A E R Q A T K D A G K I A G L E V E R I I N E P T A A A L A Y G L D K T D E - D Q T I L V Y D L
 10 N D A Q R Q A T K D A G R I A G L E V K R I I N E P T A A A L A Y G L D K G T G - N R T I I A V Y D L

1 G G G T F D V S I L E M E N G - - - - - A F Q V L S T S G D N H L G G D D T D N A I V K T M V E E I K 250
 2 G G G T F D V S I L E M E N G - - - - - A F Q V L S T S G D N H L G G D D - D N A I V K - M V E E I K
 3 G G G T F D V S I L E L A E G - - - - - T F E V L S T A G D N S L G G D D - D N E I V K - L I D L I K
 4 G G G T F D V S V L E L S G G - - - - - T F E V L S T S G D N H L G G D D W D N E I V N - L V K K I K
 5 G G G T F D V S L L D I A E G - - - - - T F E V L A T A G D N R L G G D D W D N K I I E F I L A H I A
 6 G G G T F D V S L L D I A E G - - - - - T F E V L A T A G D N R L G G D D W D N K I I E Y I S A Y I A
 7 G G G T F D V S I L A I G G G - - - - - S F D V I A T S G N N K L G G D N F D E E I K - L L G K I K
 8 G G G T F D V S I L D L G D G - - - - - V F E V V S T N G D A R L G G D D F D Q R I I D Y I A E D F K
 9 G G G T F D V S I L E L G D G - - - - - V F E V R S T A G D N R L G G D D F D Q V I I D H L V S E F K
 10 G G G T F D I S I I E I D E V D G E K T F E V L A T N G D T H L G G E D F D S R L I N Y L V E E F K

1 N K - Y N Y N P E T E K M A M A R L K E E A E R A K I T L S E S M V A N I S L P F L A M S Q - T G P 300
 2 N K - Y N Y N P E T E K M A M A R L K E E A E R A K I T L S E S M V A N I S L P F L A M S Q - T G P
 3 K D - Y K T D V T N N K M A M A R L K A A E K A K I D L S S S Q Q A T I M L P F L V M Q Q G S E P
 4 E E - Y D F D P K S D K M A L T R L K E E A E K T K I N L S N Q S V S T V S L P F L G M G K - N G P
 5 Q E H N G L N L S N D K M A M Q R L K E A A E R A K I E L S A Q L E A I I S L P F L T V T E - K G P
 6 K E H Q G L N L S K D K M A M Q R L K E A A E R A K I E L S A Q L E T I I S L P F L T V T Q - K G P
 7 A E - Y N I D L R Q E K M A L Q R L K D E A E K A K I N L S S Q L E V E I N L P F I A M N E - S G P
 8 G E - N G I D L R Q D K M A L Q R L K E G R Q K A K I E L S S S T Q T L I N L P F I T A D A - T G P
 9 K E - N G I D L S K D K M A L Q R L K D A A E K A K K D L S G V S S T Q I S L P F I T A G E - A G P
 10 K D - Q G I D L R N D P L A M Q R L K E A A E K A K I E L S S A Q Q T D V N L P Y I T A D A - T G P

1 I N V E L E L K R S E F E K M T D D L L Q R T K K P L L D A L S E A K L Q I N D L D E V L L V G G S 350
2 I N V E L E L K R S E F E K M T D D L L Q R T K K P L L D A L S E A K L Q I N D L D E V L L V G G S
3 I S V E A T L R R S Q F E E M T S H L V E R C R K P I E T A L A D A K I K I S D L D D V I L V G G S
4 I N V E L E L K R S E F E K M T A H L I D R T R K P I V D A L K Q A K I E A S D L D E V L L V G G S
5 V N V E L K L T R A K F E E I T K Q L L E R T R N P I S D V L R E A K I K P E E I N E I L L V G G S
6 V N V E L K L T R A K F E E L T K P L L E R T R N P I S D V I K E A K I K P E E I N E I L L V G G S
7 I S F A T T L T R A K F E N K I T K H L V D L T I Q P V K D A L S A A K K T P S E I N E V L L V G G S
8 K H I D M T L T R A K F N E L T H D L V E R T I N I M K E A L K S G N V S L N D I D K V I L V G G S
9 L H L E L T L T R A K F E E L S S H L V E R T M G P V R Q A L Q D A G L S A S E I D K V I L V G G S
10 K H M N I K V T R A K L E S L V E D L V N R S I E P L K V A L Q D A G L S V S I D I D D V I L V G G Q

1 T R M P A V Q K L V A D T I - N K K P N N S F L S - - - - - 400
2 T R M P A V Q K L V A D T I - N K K - - - - -
3 T R I P A V Q Q L V E S I L - N K K A N R S V - - - - -
4 T R M P A V Q S M I E H T L - N K K P - - - - -
5 T R M P A V Q K L V E S M V P G H S P N R S I N P D E V V A I G A A I Q G G V L R G D V K D V L L L
6 T R M P A V Q K L V E S M V P G K K P N R S I N P D E V V A I G A A I Q G G V L R G D V K D V L L L
7 T R I P A V Q E L V K S L L - N K K E P N R S I N P D E V V A M G A A V Q G G V L A G E V T D I L L L
8 T R I P A V Q E A V K N F T - G K K E P S K G V N P D E C V A M G A A I Q G G V L T G D V K D V L L L
9 T R I P A V Q E A I K K E T - G K E A H K G V N P D E V V A L G A A I Q G G V I T G D V K D V V L L L
10 T R M P M V Q K K V A E F F - G K E P R K D V N P D E A V A I G A A V Q G G V L T G D V K D V L L L

1 - - - - - 450
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 D V T P L T L S I E T L G G V A T P L I K R N T T I P V S K S Q I F S T A Q D N Q E S V D V V V C Q Q
6 D V T P L T L S I E T L G G V A T P L I K R N T T I P V S K S Q I F S T A Q D N Q E S V D V V V C Q Q
7 D V T P L T L S I E T M G G V M T K L I E R N T T I P A K R T Q I F S T A Q D N Q P A V D I N V V L Q Q
8 D V T P L T L S I E T L G G V A T P L I E R N T T I P A R K S Q I L S T A A D N Q T S V E I H V V L Q Q
9 D V T P L T L S I E T M G G V M T K L I D R N T T I P T S K S Q V F S T A A D N Q T A V D I H V L L Q Q
10 D V T P L S L G I E T M G G V M T L I A K N T T I P T K H S Q V F S T A E D N Q S A V T I H V L L Q

1 - - - - - 500
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 G E R P M A R D N K S L G R F N L G G I Q P A P K G K P Q I E I T F S L D A N G I L N V K A K D L T
6 G E R P M S R D N K S L G R F N L G G I Q P A P K G K P Q I E I T F S L D A N G I L N V K A K D L T
7 G E R A M A A D N K S L G R F Q L T S G I Q P A P R G I P Q I E V T F F E I D A N G I V S V S A K D K N
8 G E R Q M A A D N K T L G R F T L S G I A P A P R G I P Q I E V A F D I D A N G I V K V S A T D K A
9 G E R P M S A D N K T L G R F Q L T D I P P A P R G V P Q I E V S F D I D K N G I V N V R A K D L G
10 G E R K R A A D N K S L G Q F N L D G I N P A P R G M P Q I E V T F D I D A D G I L H V S A K D K N

1 - - - - - 550
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 T Q K E N S I T T I S D N G N L S E E E I Q K M I R D A E A N K E R D N V I R E R I E L R N E G E S I
6 T Q K E N S I T T I S D N G N L S E E E I Q K M I R D A E A N K E R D N I I R E R I E L R N E G E G I
7 T N E E K T I T I S N S G N L S E A E V E R M I K E A Q E N A A N D E A K K K N I E L K N K A E N Y
8 T G K E A N I T I S A S T N L S D A E I D K A V K E A E Q F A E E D K K R K E A I E V R N N A E Q T
9 T G K E Q N I T I T K S S S G L S D E E I E R M V K E A E E N A D A D A K K K E I E V R N E A D Q L
10 S G K E Q K I T I K A S S G L N E D E I Q K M V R D A E A N A E A D R K F E E L V Q T R N Q G D H L

1 - - - - - 600
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 V S T I K E I L Q S P E A K D F P K E E K E K L D K I T G G I D A A I K A N D Y T K L K A E I E N F
6 V N T I K E I L A S P D A K N F P K E E K E K L E K L T G N I D A A I K A N D Y A K L K V E I E N F
7 I N I E T S L Q A G D K - I S A E Q K E Q S Q K M I D E I K E L V K N E N Y E A L E Q K M A E L
8 V Y Q T E K T L N E L G D K - V S A E E K S E I E A K I E V K K V K D - G D D I Q A I K K A M E D L
9 V F Q T E K T L K D L E G K - V D E E Q V K K A N D A K D A L K A A I E K N E F E E I K A K K D E L
10 L H S T R K Q V E E A G D K - L P A D D K T A I E S A L T A L E T A L K G E D K A A I E A K M Q E L

1	- - - - -	650
2	- - - - -	
3	- - - - -	
4	- - - - -	
5	KK - REEMAKKYNPNGDQQQP - - - - - A Q - - - - -	
6	KK - REEMAKKYNPTGEQGPQ - - - - - AK - - - - -	
7	EQAMAAAEEFANKHNDSDSN - - - - - NNSSEQNN - - - - -	
8	TQAFYKVSSEKLYQQNGGAQQGGFDPIIMGGANAGAGATNNNDNVDADF	
9	QTI VQE L S M K L Y E E A A K A Q Q - - - - - A Q G G A N A E G K A D D N V V D A E Y	
10	A Q V S Q K L M E I A Q Q Q H A Q Q Q T - - - - - A G A D A S A N N A K D D D V V D A E F	
1	- - - - -	700
2	- - - - -	
3	- - - - -	
4	- - - - -	
5	- - - - -	
6	- - - - -	
7	- - - - -	
8	EVQDDK - - - -	
9	EEVND D Q N K K	
10	EEVKDKK - - - -	

Abb. 16: Aminosäuresequenz-Homologievergleich der Hsp70-Proteinfragmente der untersuchten Mykoplasmenpezies mit Hsp70-Aminosäuresequenzen weiterer Mykoplasmen- und Bakterienspezies

1:	<i>M. arthritis</i>		Immunogene Epitope des Hsp70-Fragmentes der untersuchten Mykoplasmen
2:	<i>M. bovis</i>		
3:	<i>M. agalactiae</i>		Immunogene Epitope des DnaK von <i>E. coli</i>
4:	<i>M. hyopneumoniae</i>		
5:	<i>M. pneumoniae</i>		
6:	<i>M. genitalium</i>		
7:	<i>M. capricolum</i>		
8:	<i>C. perfringens</i>		
9:	<i>B. subtilis</i>		
10:	<i>E. coli</i>		

Tab. 25: Aminosäure-Sequenzhomologien des *hsp70*-Genfragmentes zwischen *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* und anderen Mykoplasmen- und Bakterienspezies

[%]	<i>M. arthritidis</i> ISR 1	<i>M. bovis</i> PG 45	<i>M. agalactiae</i> PG 2	<i>M. hyopneumoniae</i> J	<i>M. pneumoniae</i> FH	<i>M. genitalium</i> G 37	<i>M. capricolum</i> cal. kid	<i>C. perfringens</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
<i>M. arthritidis</i> ISR 1	-	98,9	71,7	78,6	66,8	67,9	63,2	59,6	59,1	59,1
<i>M. bovis</i> PG 45	-	-	74,2	79,3	68,9	68,9	65,3	62,2	62,8	62,2
<i>M. agalactiae</i> PG 2	-	-	-	73,0	69,8	70,4	70,4	61,3	67,3	60,8
<i>M. hyopneumoniae</i> J	-	-	-	-	69,3	70,9	69,3	60,3	65,1	58,7
<i>M. pneumoniae</i> FH	-	-	-	-	-	95,0	67,2	64,7	68,0	63,5
<i>M. genitalium</i> G 37	-	-	-	-	-	-	67,9	64,8	68,5	63,7
<i>M. capricolum</i> cal. kid	-	-	-	-	-	-	-	67,2	67,6	62,4
<i>C. perfringens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	75,0	68,1
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	68,1
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

4.3.2 **Klonierung und Expression zweier *hsp60*-Genabschnitte von *M. arthritidis***

Nach erfolgreicher Klonierungs-PCR (s. 3.7.8) wurden die *M. arthritidis-hsp60*-Fragmente 26 (MA60-1) und 410 (MA60-2) in die Plasmidvektoren pGH432 und pGH433 (Advanced Vectors Inc., Hopkins, Minnesota, USA) ligiert und in *E. coli* HB101 transformiert. Die Proteinexpression, induziert durch IPTG, führte zu keinem nachweisbaren Produkt. Deshalb wurden die Fragmente MA60-1 und MA60-2 in den GST-Expressionsvektor pGEX-5X-3 ligiert und in *E. coli* JM105 transformiert. (Abb. 17). Die gewonnenen Klone und der Kontrollklon, der nur das pGEX-5X-3 Plasmid besaß, wurden in Reinkultur angezüchtet. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde durch IPTG-Induktion initiiert. Nach Ernte der Zellen und anschließender Aggregatpräparation wurden die rekombinanten Proteine pMA60-1, pMA60-2 und GST vor und nach der Induktion in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die erfolgreich überexprimierten und aufgereinigten rekombinanten *M. arthritidis*-Hsp60-Proteine pMA60-1 (entspricht der ersten Hälfte des Hsp60-Proteins von *M. arthritidis*) und pMA60-2 (entspricht der zweiten Hälfte des Hsp60-Proteins von *M. arthritidis*) wurden in der Coomassie-Blau-Färbung (Abb. 18 A) nachgewiesen und im Immunoblot (mit Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp.) als Hsp60-Fragmente identifiziert (Abb. 18 B). Die Größe der GST-fusionierten Fragmente lag bei 57 kDa (pMA60-1) und 64 kDa (pMA60-2). Die Molekularmasse der mykoplasmalen Proteinanteile entsprach 26 und 35 kDa, die des GST-Anteils entsprach 29 kDa (Abb. 18 A und B). Im Immunoblot (Abb. 18 B) zeigten im Molekularmassenbereich von 64 kDa alle Spuren, dem Induktionsschema entsprechend, eine Reaktion mit dem Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp.. Diese Banden sind auf die sehr starke Kreuzreaktion des Antikörpers mit *E. coli* Hsp60 zurückzuführen, das auch nach erfolgreicher Aggregatpräparation noch in geringen Mengen vorhanden ist. Im Fall einer IPTG-Induktion ist die *E. coli*-Zelle „Streß“ ausgesetzt, der in einer erhöhten Syntheserate des Hsp60 von *E. coli* resultiert.

4.3.3 **Klonierung und Expression eines *hsp70*-Genfragmentes von *M. arthritidis* und *M. bovis***

Die *hsp70*-Genfragmente von *M. arthritidis* (MA70) und *M. bovis* (MB70) wurden in die Plasmidvektoren pGH432 und pGH433 (Advanced Vectors Inc., Hopkins, Minnesota, USA) ligiert und in *E. coli* HB101 transformiert. Die Proteinexpression, induziert durch IPTG, führte zu keinem nachweisbaren Produkt. Deshalb wurden die Fragmente MA70 und MB70 in den

Plasmidvektor pGEX-5X-3 (4795 bp) ligiert und in *E. coli* JM105 transformiert (Abb. 19). Als Kontrolle diente der Klonierungsvektor pGEX-5X-3 ohne Insert. Die Proteinexpression wurde durch IPTG-Zugabe induziert. Die Zellsuspensionen wurden auf ein 20%iges SDS-PAGE-Gel aufgetragen und das Gel wurde anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt bzw. nach Immunoblotting mit spezifischen Hsp-Antisera analysiert. Als Ergebnis einer erfolgreichen Proteinexpression wurden neue, um die Größe des klonierten Fragments verschobene, GST-Fusionsprotein-Banden erwartet. Nach der Induktion zeigte die Kontrolle eine verstärkte Bande des Proteins Glutathion-S-Transferase bei 29 kDa (Abb. 20 A). Die Klone pMA70 und pMB70 zeigten eine verstärkte Fusionsproteinbande, die um das Proteingewicht des synthetisierten Mykoplasmenpeptids (3kDa) verschoben war und nun bei 32 kDa lag (Abb. 20 A). Die geringe Molekularmasse des Mykoplasmenpeptids lag mit 3 kDa weit unter den erwarteten 13 kDa des jeweiligen gesamten Inserts. *E. coli* erkannte das mykoplasmale Tryptophancodon UGA an Basenposition 176-178 (*M. arthritidis*) bzw. 207-209 (*M. bovis*) im mykoplasmalem Insert als Stopcodon und brach die Proteinsynthese an diesem Punkt ab.

Die rekombinanten Fusionsproteine pMA70 und pMB70 konnten auch mit dem monoklonalen Maus-Antikörper SPA880 im Immunoblot detektiert werden. Im Zellaufschluß der IPTG-induzierten rekombinanten Hsp70-Peptide wurde durch den Hsp70-Antikörper eine zusätzlich entstandene 32 kDa große Bande nachgewiesen (Abb. 20 B). Die Kontrolle mit bloßem Klonierungsvektor pGEX-5X-3 zeigte dagegen bei 29 kDa keine Reaktion mit dem Maus-Antikörper SPA880.

Durch Mutagenese mittels PCR konnte das UGA-Codon in der Sequenz des *hsp70*-PCR-Fragmentes von *M. arthritidis* in ein VGG-Codon geändert werden. Anschließend gelang die Expression eines 42 kDa großen rekombinanten Fusionsproteins in *E. coli*, welches das gesamte *hsp70*-Fragment-Genprodukt von *M. arthritidis* beinhaltet. Die Ligation des PCR-Produktes erfolgte in den Plasmidvektor pGEX-5X-3, die Transformation in *E. coli* HB101. Nach der IPTG-Induktion der Proteinsynthese war in der Coomassie-Blau-Färbung ein 42 kDa großes GST-Fusionsprotein (Abb. 21) mit einem *M. arthritidis*-Hsp70-Anteil von 13 kDa nachzuweisen.

4.3.4 Herstellung Hsp60-spezifischer Seren

Zur weiteren Charakterisierung der Hsp60 von Mykoplasmen wurden mit Hilfe der rekombinanten Hsp60-Proteine von *M. arthritidis* (Ma26Hsp60, Ma410Hsp60) und von zwei sogenannten „multiple antigenic peptides“ (MAP1 und MAP2) Antisera im Kaninchen hergestellt

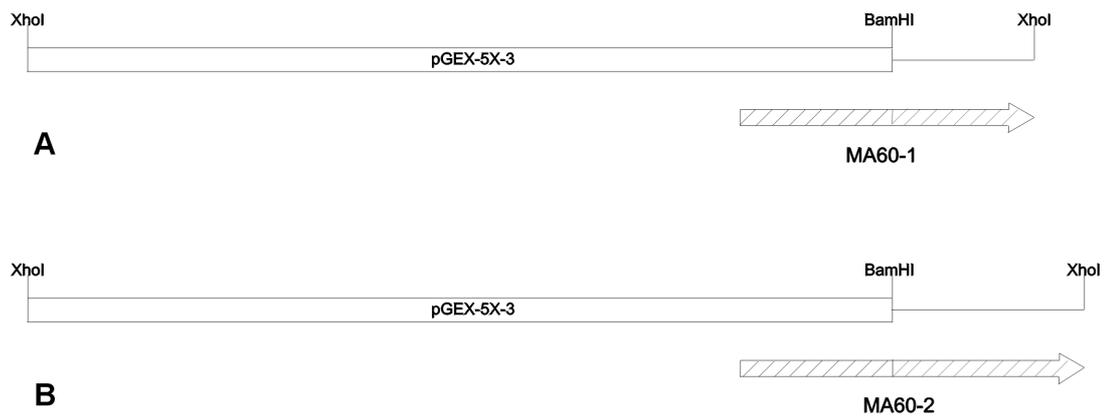


Abb. 17: Plasmidkarten des GST-Expressionsvektors pGEX-5X-3 mit den Inserts (A) MA60-1 und (B) MA60-2

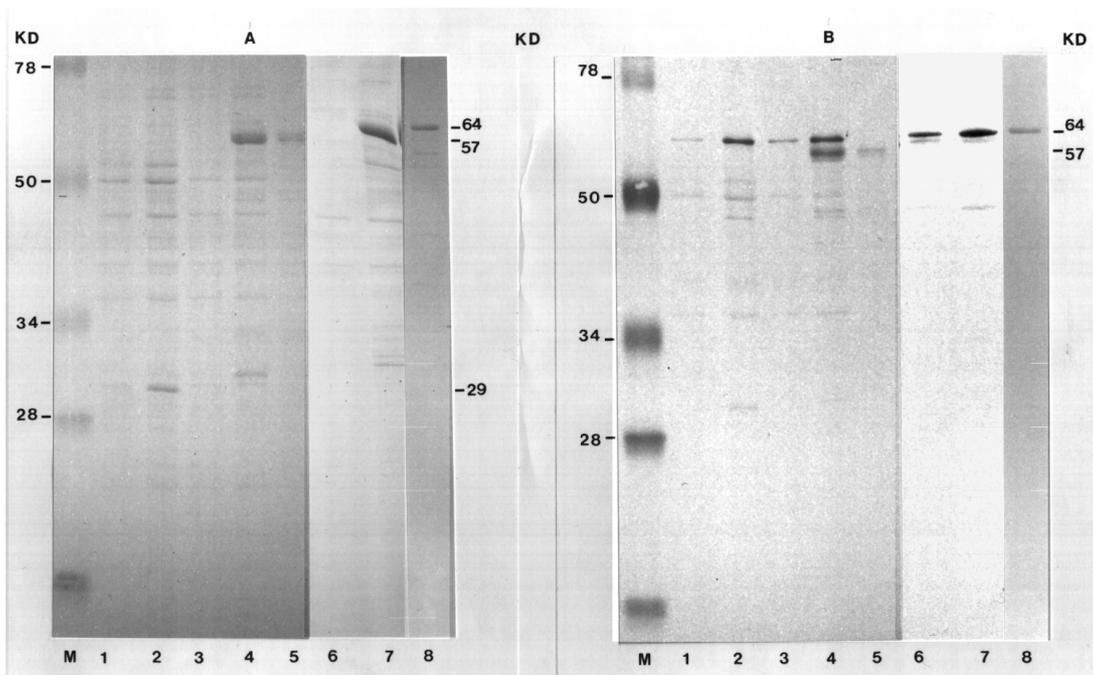


Abb. 18: Analyse rekombinanter Hsp60-Fusionsproteine von *M. arthritidis* nach Auftrennung in der SDS-PAGE in der (A) Coomassie-Blau-Färbung und im (B) Immunoblot mit Kaninchen-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp.

- Spur M: Molekulargewichtsmaker
 Spur 1: *E. coli* JM105 transformiert mit pGEX-5X-3
 Spur 2: *E. coli* JM105 transformiert mit pGEX-5X-3 nach IPTG-Induktion (Expression der Glutathion-S-Transferase, GST)
 Spur 3: *E. coli* JM105 transformiert mit pMA60-1
 Spur 4: *E. coli* JM105 transformiert mit pMA60-1 nach IPTG-Induktion
 Spur 5: Aggregatpräparation des rekombinanten Fusionsproteins MA60-1
 Spur 6: *E. coli* JM105 transformiert mit pMA60-2
 Spur 7: *E. coli* JM105 transformiert mit pMA60-2 nach IPTG-Induktion
 Spur 8: Aggregatpräparation des rekombinanten Fusionsproteins MA60-2

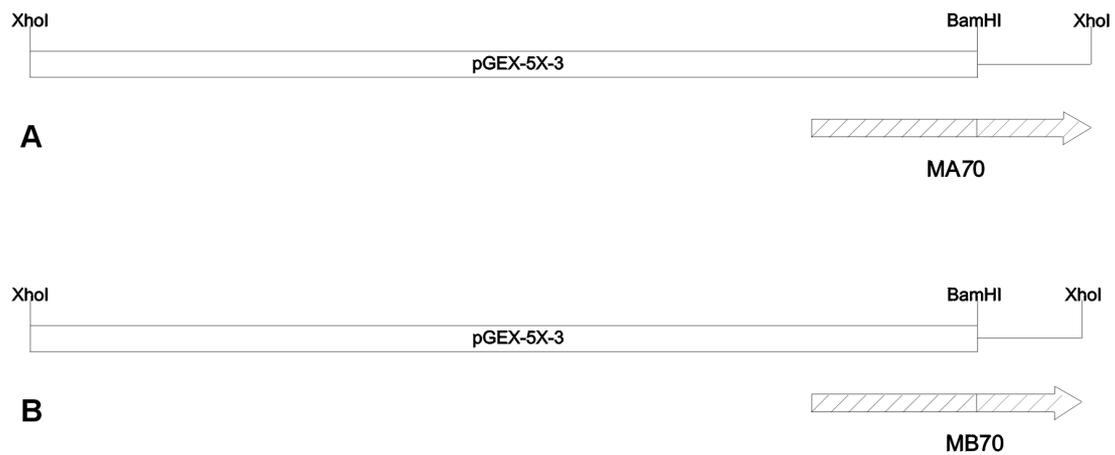


Abb. 19: Plasmidkarten des GST-Expressionsvektors pGEX-5X-3 mit den Inserts (A) MA70 und (B) MB70

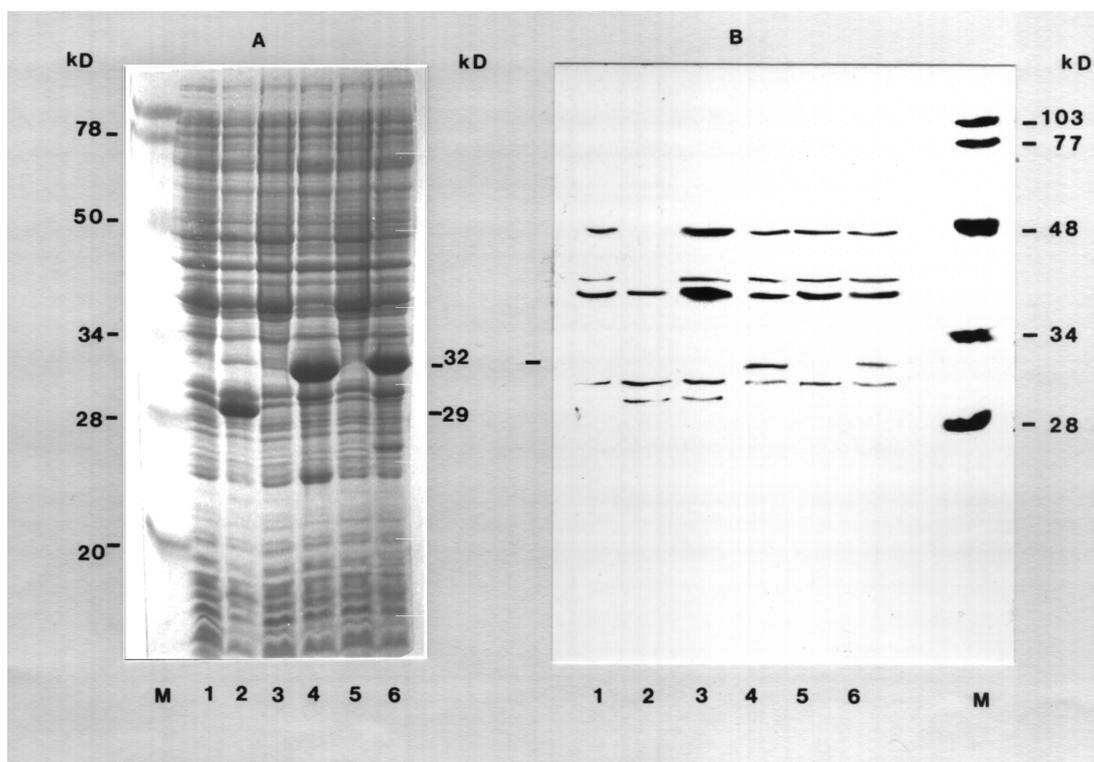


Abb. 20: Analyse rekombinanter Hsp70-Fusionsproteine von *M. arthritidis* und *M. bovis* nach Auftrennung in der SDS-PAGE in der (A) Coomassie-Blau-Färbung und im (B) Immunoblot mit Maus-Antikörper gerichtet SPA 880 gerichtet gegen murines Hsp70.

- Spur M: Molekulargewichtsmaker
 Spur 1: *E. coli* JM105 transformiert mit pGEX-5X-3
 Spur 2: *E. coli* JM105 transformiert mit pGEX-5X-3 nach IPTG-Induktion (Expression der Glutathion-S-Transferase, GST)
 Spur 3: *E. coli* JM105 transformiert mit pMA70
 Spur 4: *E. coli* JM105 transformiert mit pMA70 nach IPTG-Induktion
 Spur 5: *E. coli* JM105 transformiert mit pMB70
 Spur 6: *E. coli* JM105 transformiert mit pMB70 nach IPTG-Induktion

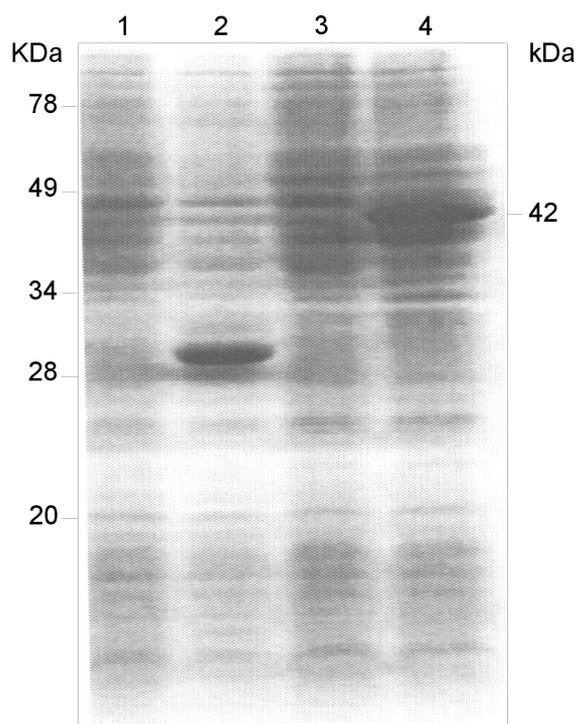


Abb. 21: Darstellung des 42 kDa GST-Fusionsproteins nach Mutagenese des *hsp70*-Genfragmentes von *M. arthritidis* nach PCR

Spur 1: *E. coli* HB101 transformiert mit pGEX-5X-3

Spur 2: *E. coli* HB101 transformiert mit pGEX-5X-3 nach IPTG-Induktion
(Expression der Glutathion-S-Transferase, GST)

Spur 3: *E. coli* HB101 transformiert mit pMA70-mut

Spur 4: *E. coli* HB101 transformiert mit pMA70-mut nach IPTG-Induktion

(s. 3.8.5). Die gewonnenen Seren wurden, im Falle der rekombinanten Proteine, zur Entfernung der *E. coli*-Protein-spezifischen Antikörper über eine CNBr-aktivierte Sepharosesäule mit gebundenem *E. coli*-Gesamtzellysat aufgereinigt. Die Sensitivität und Spezifität der Reaktion der Seren mit verschiedenen Hsp60 wurde mit den Gesamtzellysaten von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae*, *M. hyopneumoniae*, *M. pneumoniae*, *C. perfringens*, Streptokokken sp. und *E. coli* und mit MAP1 in der SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot getestet (Abb. 22a-22i). Als positives Kontrollserum und Standard wurde der kommerzielle Hsp60-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (Biomol, Deutschland) bei allen Spezies eingesetzt. Im allgemeinen erkannten die hergestellten Seren die gegebenen Hsp60-Proteine eindeutig, manchmal allerdings in Molekularmassenbereichen um die 50 kDa. Das Hsp60-Protein neigt in der SDS-PAGE teilweise zur Degradation und weist dann Banden im Molekularmassenbereich von 40-50 kDa auf. Der kommerzielle Antikörper der Positivkontrolle wurde daraufhin auf die Eindeutigkeit seiner Reaktion durch Vorversuche analysiert. In der Regel erkennt er die Proteinbande um 60 kDa eindeutig, meist aber auch die Banden der entstandenen Untereinheiten. Alle durch den kommerziellen Antikörper identifizierten Banden können eindeutig dem jeweiligen Hsp60 Protein zugeordnet werden. Die Kaninchenseren und die Positivkontrolle reagierten mit dem Gesamtzellysat von *M. arthritidis* (Abb. 22a) mit einer Bande von 60 kDa, dabei besonders intensiv mit dem Serum 1 und 2 (gegen pMA60-1), Serum 3 (gegen pMA60-2) und dem Serum gegen MAP1. Zusätzlich identifizierten alle eingesetzten Seren eine Bande bei 52 kDa. Die gewonnenen Seren reagierten mit dem *M. bovis*-Gesamtzellysat (Abb. 22b) im Bereich von 60 kDa nur sehr schwach oder gar nicht, zeigten aber durchgehend eine deutliche Doppelbande bei 38-40 kDa, die auch von der Positivkontrolle erkannt wurde. Die Seren gegen pMA60-1 und pMA60-2 sowie die gewonnenen MAP-Seren reagierten hier am stärksten ohne weiteren Nebenbanden. Die Hsp60-Banden des *M. agalactiae*-Gesamtzellysates (Abb. 22c) wurden von fast allen Seren bei 50 kDa identifiziert, die durch das MAP2-Serum beschriebene Bande lag bei 48 kDa, die Positivkontrolle erkannte beide Fragmente. Das pMA60-2 Serum 3 reagierte, wie auch das Positivserum, schwach bei 60 kDa mit dem Zellysat. Alle Seren reagierten mit dem *M. hyopneumoniae*-Gesamtzellysat (Abb. 22d) deutlich und fast ausschließlich bei 60 kDa; das Positivserum erkannte im Bereich von 36 kDa eine zusätzliche Bande. Die Reaktionen des pMA60-1-, pMA60-2- und des MAP2-Serums zeigten keine Nebenbanden. Die aufgereinigten Seren gegen die zwei rekombinanten Hsp60-Proteine identifizierten, wie auch die Positivkontrolle, das Hsp60 im *M. pneumoniae*-Gesamtzellysat (Abb. 22e) bei 60 kDa. Die intensive Reaktion erzeugte bei den gewonnenen Seren viele unspezifische Nebenbanden. Die beiden MAP-Seren reagierten, bis auf eine

sehr schwache Bande bei 40 kDa, dagegen nicht mit dem Zellysat. Bis auf das pMA60-1- und das MAP2-Serum detektierten alle eingesetzten Seren eine deutliche Hsp60-Bande bei 62 kDa nach Reaktion mit Streptokokken-Gesamtzellysat (Abb. 22f). Die gegen pMA60-1 und MAP2 gerichteten Seren erkannten eine singuläre Bande um die 52 kDa, die auch von dem MAP1-Serum als zusätzliche Bande identifiziert wurde. Das Hsp60 von *C. perfringens* (Abb. 22g) wurde von allen Seren und der Positivkontrolle bei einer Molekularmasse von 60 kDa erkannt; die nachgewiesene Proteinbande war bei den beiden MAP-Seren relativ schwach. Die vier gegen rekombinante Proteine gerichteten Seren reagierten zusätzlich bei 53 kDa mit dem *C. perfringens*-Gesamtzellysat. Bis auf das MAP1-Serum reagierten alle mit dem *E. coli*-Gesamtzellysat in Reaktion gebrachten Seren mit einer starken Doppelbande im Molekulargewichtsbereich von 58 und 70 kDa (Abb. 22h). Zusätzlich wurde von allen Seren und dem Positivserum bei 38 kDa eine eindeutige Bande nachgewiesen. Die Kaninchenserum und das positive Kontrollserum erkannten MAP1 als schwache Doppelbande bei 14 und 12 kDa (Abb. 22i).

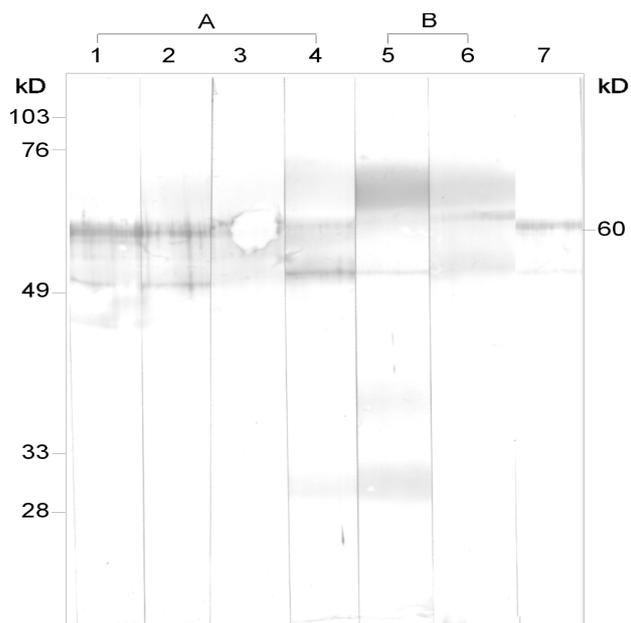


Abb. 22a: Reaktion der Kaninchen-Antiseren gegen (A) rekombinantes Hsp60 und (B) „multiple antigenic peptides“ (MAPs) und (7) des Kaninchen-Antikörpers gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. mit Gesamtzellsat von *M. arthritidis*.

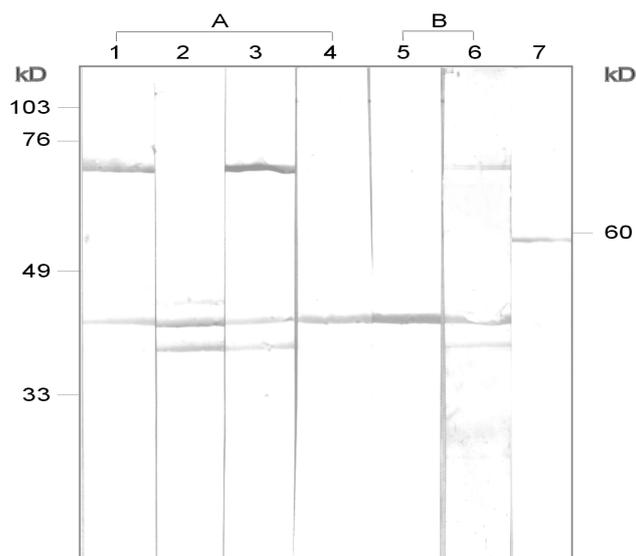


Abb. 22b: Reaktion der Kaninchen-Antiseren gegen (A) rekombinantes Hsp60 und (B) „multiple antigenic peptides“ (MAPs) und (7) des Kaninchen-Antikörpers gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. mit Gesamtzellsat von *M. bovis*

Abb. 22a und 22b:

- Spur 1: Kaninchen-Antiserum-1 gegen das rekombinante pMA60-1-GST-Fusionsprotein
- Spur 2: Kaninchen-Antiserum-2 gegen das rekombinante pMA60-1-GST-Fusionsprotein
- Spur 3: Kaninchen-Antiserum-3 gegen das rekombinante pMA60-2-GST-Fusionsprotein
- Spur 4: Kaninchen-Antiserum-4 gegen das rekombinante pMA60-2-GST-Fusionsprotein
- Spur 5: Kaninchen-Antiserum-5 gegen MAP1
- Spur 6: Kaninchen-Antiserum-6 gegen MAP2
- Spur 7: Kaninchen-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (Biomol, Deutschland)

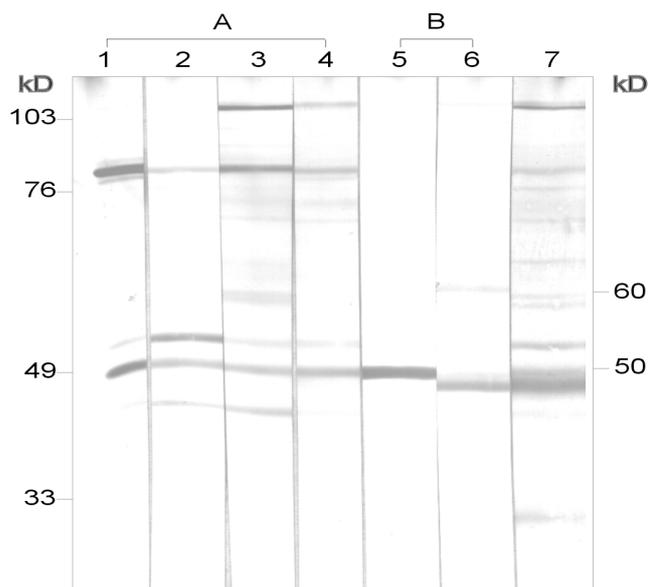


Abb. 22c: Reaktion der Kaninchen-Antiseren gegen (A) rekombinantes Hsp60 und (B) „multiple antigenic peptides“ (MAPs) und (7) des Kaninchen-Antikörpers gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. mit Gesamtzellsat von *M. agalactiae*.

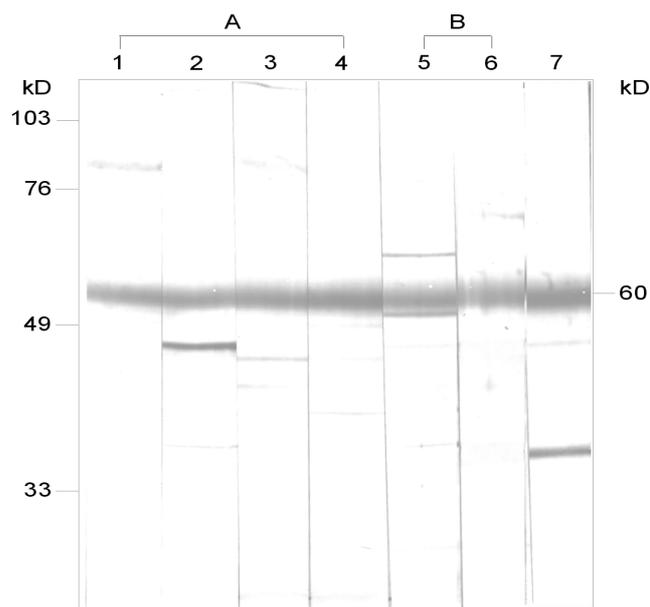


Abb. 22d: Reaktion der Kaninchen-Antiseren gegen (A) rekombinantes Hsp60 und (B) „multiple antigenic peptides“ (MAPs) und (7) des Kaninchen-Antikörpers gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. mit Gesamtzellsat von *M. hyopneumoniae*

Abb. 22c und 22d:

- Spur 1: Kaninchen-Antiserum-1 gegen das rekombinante pMA60-1-GST-Fusionsprotein
- Spur 2: Kaninchen-Antiserum-2 gegen das rekombinante pMA60-1-GST-Fusionsprotein
- Spur 3: Kaninchen-Antiserum-3 gegen das rekombinante pMA60-2-GST-Fusionsprotein
- Spur 4: Kaninchen-Antiserum-4 gegen das rekombinante pMA60-2-GST-Fusionsprotein
- Spur 5: Kaninchen-Antiserum-5 gegen MAP1
- Spur 6: Kaninchen-Antiserum-6 gegen MAP2
- Spur 7: Kaninchen-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (Biomol, Deutschland)

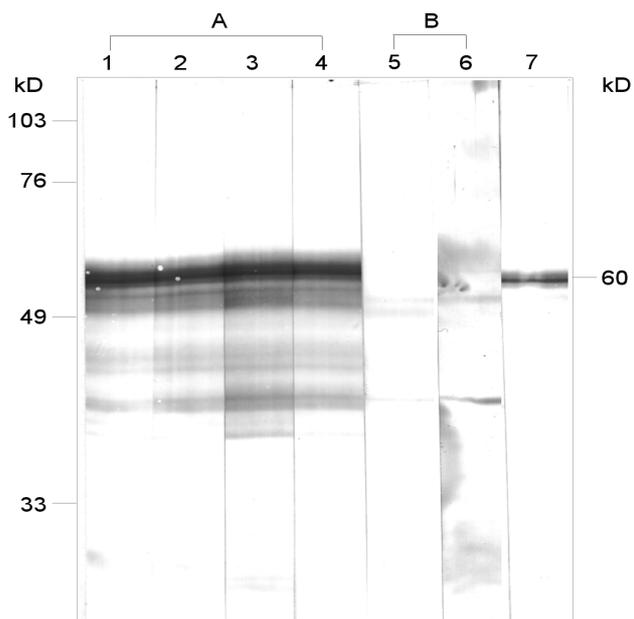


Abb. 22e: Reaktion der Kaninchen-Antiseren gegen (A) rekombinantes Hsp60 und (B) „multiple antigenic peptides“ (MAPs) und (7) des Kaninchen-Antikörpers gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. mit Gesamtzellsat von *M.pneumoniae*.

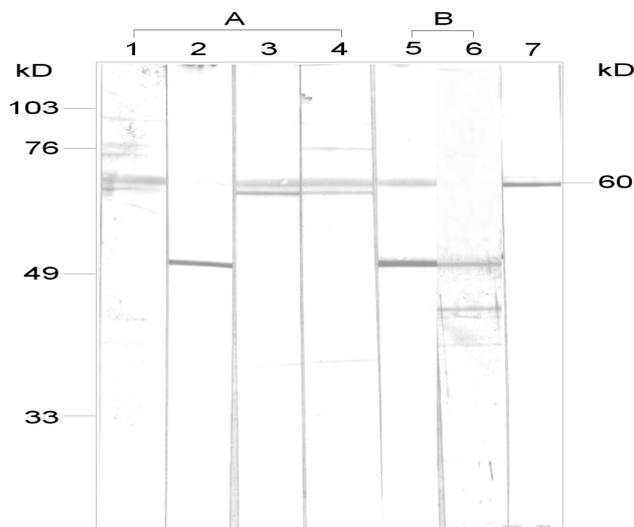


Abb. 22f: Reaktion der Kaninchen-Antiseren gegen (A) rekombinantes Hsp60 und (B) „multiple antigenic peptides“ (MAPs) und (7) des Kaninchen-Antikörpers gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. mit Gesamtzellsat von Streptokokken.

Abb. 22e und 22f:

- Spur1: Kaninchen-Antiserum-1 gegen das rekombinante pMA60-1-GST-Fusionsprotein
- Spur 2: Kaninchen-Antiserum-2 gegen das rekombinante pMA60-1-GST-Fusionsprotein
- Spur 3: Kaninchen-Antiserum-3 gegen das rekombinante pMA60-2-GST-Fusionsprotein
- Spur 4: Kaninchen-Antiserum-4 gegen das rekombinante pMA60-2-GST-Fusionsprotein
- Spur 5: Kaninchen-Antiserum-5 gegen MAP1
- Spur 6: Kaninchen-Antiserum-6 gegen MAP2
- Spur 7: Kaninchen-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (Biomol, Deutschland)

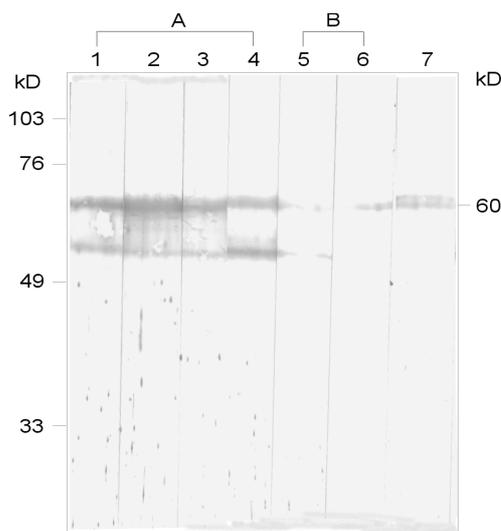


Abb. 22g: Reaktion der Kaninchen-Antisera gegen (A) rekombinantes Hsp60 und (B) „multiple antigenic peptides“ (MAPs) und (7) des Kaninchen-Antikörpers gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. mit Gesamtzellysate von *C. perfringens*.

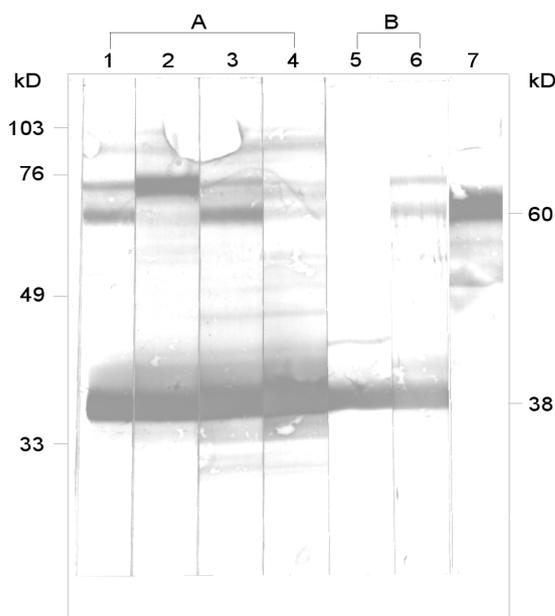


Abb. 22h: Reaktion der Kaninchen-Antisera gegen (A) rekombinantes Hsp60 und (B) „multiple antigenic peptides“ (MAPs) und (7) des Kaninchen-Antikörpers gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. mit Gesamtzellysate von *E. coli*

Abb. 22g und 22h:

- Spur 1: Kaninchen-Antiserum-1 gegen das rekombinante pMA60-1-GST-Fusionsprotein
- Spur 2: Kaninchen-Antiserum-2 gegen das rekombinante pMA60-1-GST-Fusionsprotein
- Spur 3: Kaninchen-Antiserum-3 gegen das rekombinante pMA60-2-GST-Fusionsprotein
- Spur 4: Kaninchen-Antiserum-4 gegen das rekombinante pMA60-2-GST-Fusionsprotein
- Spur 5: Kaninchen-Antiserum-5 gegen MAP1
- Spur 6: Kaninchen-Antiserum-6 gegen MAP2
- Spur 7: Kaninchen-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (Biomol, Deutschland)

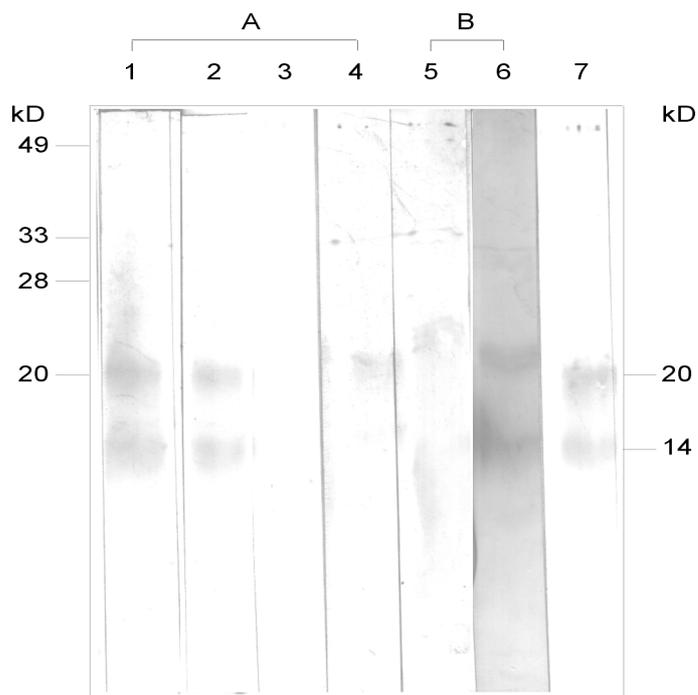


Abb. 22i: Reaktion der Kaninchen-Antiseren gegen (A) rekombinantes Hsp60 und (B) „multiple antigenic peptides“ (MAPs) und (7) des Kaninchen-Antikörpers gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. mit MAP1.

- Spur 1: Kaninchen-Antiserum-1 gegen das rekombinante pMA60-1-GST-Fusionsprotein
- Spur 2: Kaninchen-Antiserum-2 gegen das rekombinante pMA60-1-GST-Fusionsprotein
- Spur 3: Kaninchen-Antiserum-3 gegen das rekombinante pMA60-2-GST-Fusionsprotein
- Spur 4: Kaninchen-Antiserum-4 gegen das rekombinante pMA60-2-GST-Fusionsprotein
- Spur 5: Kaninchen-Antiserum-5 gegen MAP1
- Spur 6: Kaninchen-Antiserum-6 gegen MAP2
- Spur 7: Kaninchen-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (Biomol. Deutschland)

4.4 Reaktion von Rekonvaleszentenseren mit rekombinanten Hsp60- und Hsp70-GST- Fusionsproteinen

Hitzeschockproteine der Hsp60- und Hsp70-Familien sind immundominante Proteine, gegen die im Falle einer Infektion vom Wirt Antikörper gebildet werden. Für die *M. bovis*-Infektion des Rindes und die *M. hyopneumoniae*-Infektion des Schweins wurden verschiedene Rekonvaleszentenseren, die im ELISA nicht oder sehr stark mit *M. bovis* bzw. *M. hyopneumoniae* reagierten, auf ihre Reaktion mit den rekombinanten Hsp60- und Hsp70-GST-Fusionsproteinen untersucht. Die rekombinanten Fusionsproteine wurden wie unter 3.7.9 beschrieben gewonnen und mittels Aggregatpräparation (s. 3.7.9.3) aufgereinigt, anschließend in einer 10%igen SDS-PAGE aufgetrennt und im Immunoblot mit den zur Verfügung stehenden Seren analysiert. Als Kontrollseren wurden der kommerzielle Kaninchen-Hsp60-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (Biomol, Deutschland) und ein Kaninchen-Hsp60-Antikörper gegen das Hsp60 von *M. bovis* (freundlicherweise überlassen von A. Wedde, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Tierärztliche Hochschule Hannover), bzw. der Maus-Antikörper SPA 880 gegen Hsp70 (freundlicherweise überlassen von R. Himmelreich, ZMBH, Heidelberg) mitgeführt (Abb. 23a-23h).

Die im ELISA stark mit *M. bovis*- bzw. *M. hyopneumoniae*-reagierenden Rinder- und Schweineseren besaßen Antikörpertiter gegen Hsp60 bzw. Hsp70 und erkannten, wie die Kontrollseren, die rekombinanten Proteine pMA60-1, pMA60-2, pMA70 und pMB70. Die Rekonvaleszentenseren, die im ELISA keine Reaktion mit *M. bovis* bzw. *M. hyopneumoniae* zeigten, reagierten nur schwach oder gar nicht mit den rekombinanten Proteinen (Abb. 23a-h). So lagen die detektierten Banden für pMA60-1 bei 57 kDa, für pMA60-2 bei 64 und 53 kDa und für pMA70 und pMB70 bei 32 und 30 kDa. Zusätzliche Banden von 44 und 42 kDa wurden teilweise durch im ELISA stark reagierenden Rekonvaleszentenseren in Reaktion mit pMA60-1 und -2 nachgewiesen (Abb. 23a-d). Das Maus-Positivkontrollserum gegen Hsp70 zeigte Kreuzreaktivität mit dem, durch die Aggregataufreinigung nicht entfernten, *E.-coli*-Hsp70-Anteil bei 70 kDa (Abb. 23e-h).

Alle Seren wurden auch auf ihre Reaktion mit reiner Glutathion-S-Transferase getestet, um eine etwaige Kreuzreaktion der Seren mit dem jeweiligen GST-Anteil der rekombinanten Proteine auszuschließen. Im Immunoblot konnte diesbezüglich keine Reaktion nachgewiesen werden.

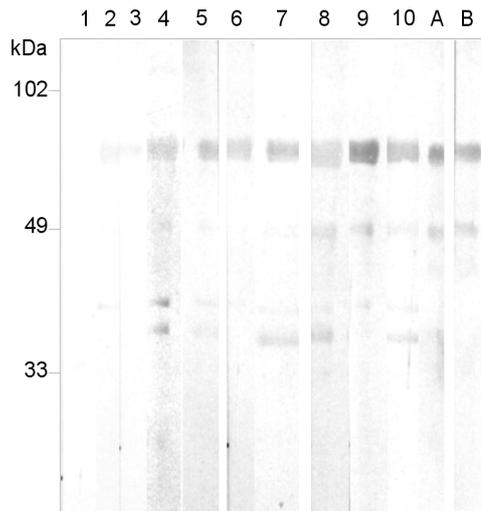


Abb. 23a: Reaktion von bovinen Rekonvaleszentenseren, die im ELISA einen negativen bzw. positiven Antikörperspiegel gegen *M. bovis* aufwiesen, mit rekombinantem pMA60-1-GST-Fusionsprotein

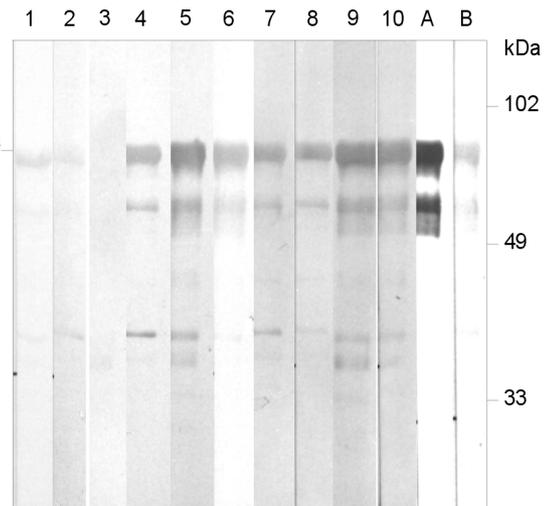


Abb. 23b: Reaktion von bovinen Rekonvaleszentenseren, die im ELISA einen negativen bzw. positiven Antikörperspiegel gegen *M. bovis* aufwiesen, mit rekombinantem pMA60-2-GST-Fusionsprotein

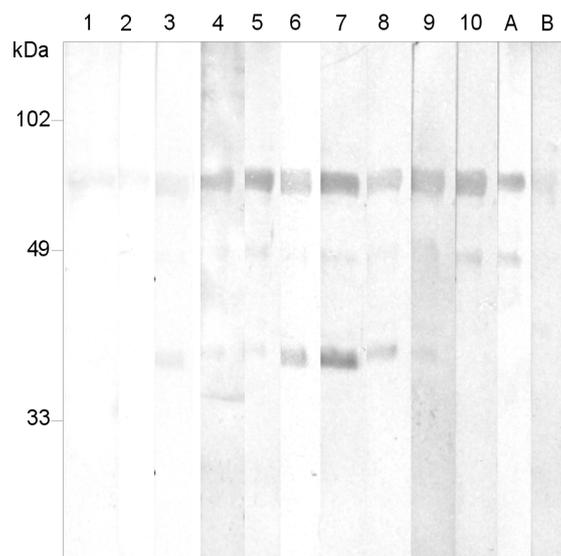


Abb. 23c: Reaktion von porcinen Rekonvaleszentenseren, die im ELISA einen negativen bzw. positiven Antikörperspiegel gegen *M. hyopneumoniae* aufwiesen, mit rekombinantem pMA60-1-GST-Fusionsprotein

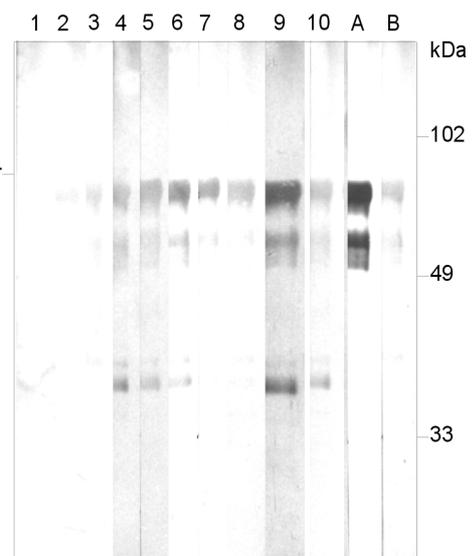


Abb. 23d: Reaktion von porcinen Rekonvaleszentenseren, die im ELISA einen negativen bzw. positiven Antikörperspiegel gegen *M. hyopneumoniae* aufwiesen, mit rekombinantem pMA60-2-GST-Fusionsprotein

Abb. 23a-d:

- Spur 1-3: Rekonvaleszentenseren, die im ELISA keine Antikörper gegen *M. bovis* oder *M. hyopneumoniae* aufwiesen
- Spur 4-10: Rekonvaleszentenseren, die im ELISA Antikörper gegen *M. bovis* oder *M. hyopneumoniae* aufwiesen
- Spur A: Kontrollserum A: Kaninchenantikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (Biomol, Deutschland)
- Spur B: Kontrollserum B: Kaninchenantiserum gegen Hsp60 von *M. bovis* (A. Wedde, Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Tierärztliche Hochschule Hannover)

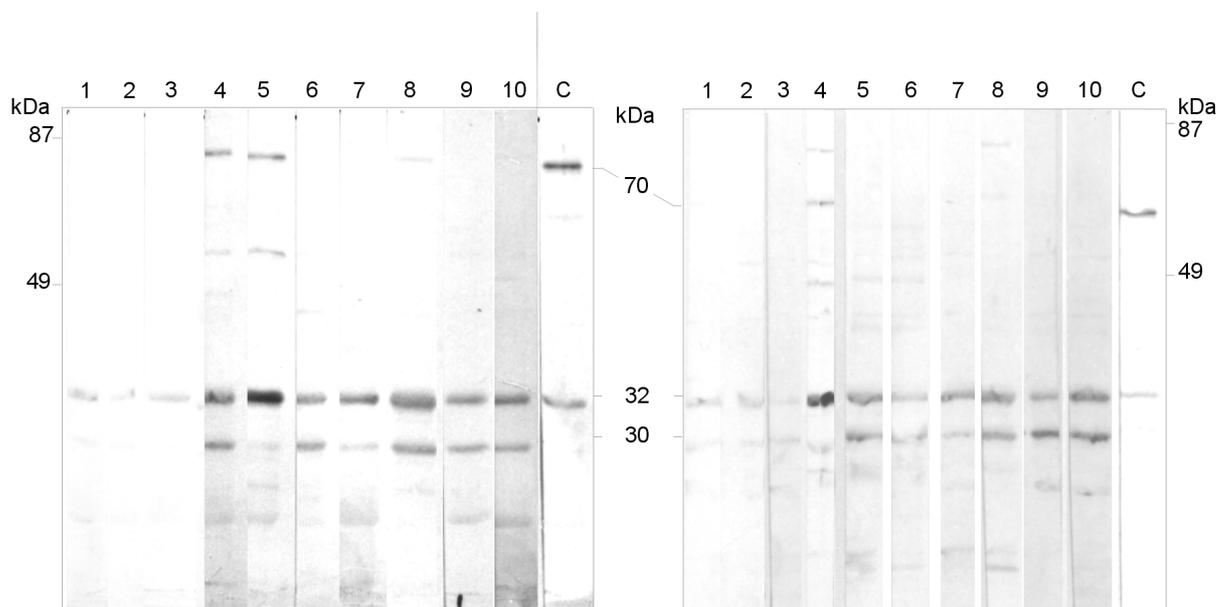


Abb. 23e: Reaktion von bovinen Rekonvaleszentenseren, die im ELISA einen negativen bzw. positiven Antikörperspiegel gegen *M. bovis* aufwiesen, mit rekombinantem pMA60-1-GST-Fusionsprotein

Abb. 23f: Reaktion von bovinen Rekonvaleszentenseren, die im ELISA einen negativen bzw. positiven Antikörperspiegel gegen *M. bovis* aufwiesen, mit rekombinantem pMA60-2-GST-Fusionsprotein

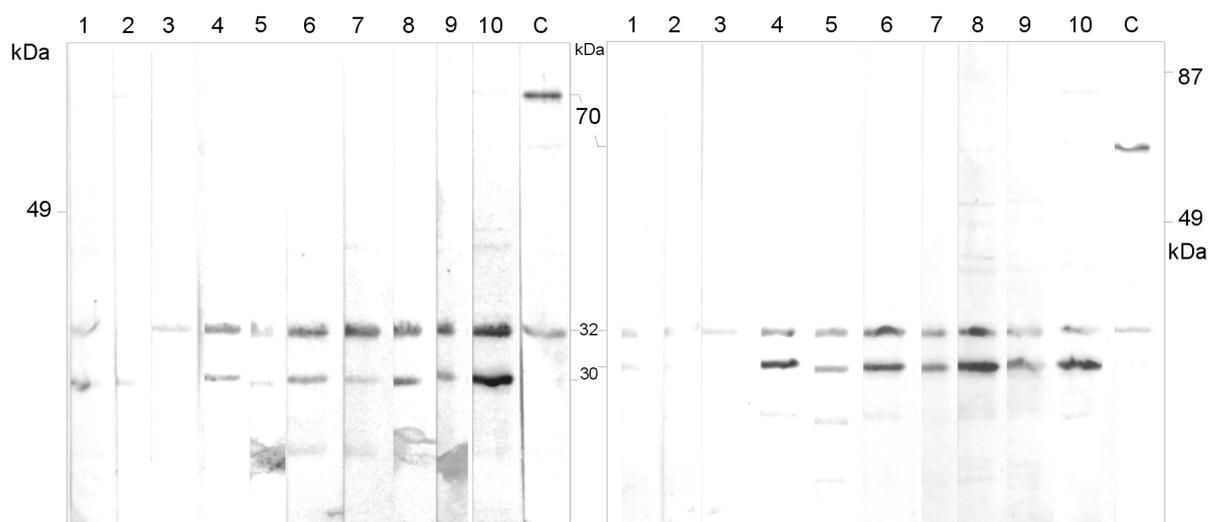


Abb. 23g: Reaktion von porcinen Rekonvaleszentenseren, die im ELISA einen negativen bzw. positiven Antikörperspiegel gegen *M. hyopneumoniae* aufwiesen, mit rekombinantem pMA60-1-GST-Fusionsprotein

Abb. 23h: Reaktion von porcinen Rekonvaleszentenseren, die im ELISA einen negativen bzw. positiven Antikörperspiegel gegen *M. hyopneumoniae* aufwiesen, mit rekombinantem pMA60-2-GST-Fusionsprotein

Abb. 23e-h:

- Spur 1-3: Rekonvaleszentenseren, die im ELISA keine Antikörper gegen *M. bovis* oder *M. hyopneumoniae* aufwiesen
- Spur 4-10: Rekonvaleszentenseren, die im ELISA Antikörper gegen *M. bovis* oder *M. hyopneumoniae* aufwiesen
- Spur C: Kontrollserum C: Antikörper gegen murines Hsp70 (SP 880)

4.5 Einfluß von bronchoalveolärer Lavage vom Schwein mit *M. hyopneumoniae*- und ohne *M. hyopneumoniae*-Infektion auf die Hitzeschockantwort von *M. hyopneumoniae*

In diesem Teil der Arbeit sollte am Beispiel von *M. hyopneumoniae* der Einfluß von BALF auf die Hitzeschockantwort des Pathogens näher untersucht werden. Das System der bronchoalveolären Lavage (BAL) bietet eine Möglichkeit, die Wirt-Pathogen-Beziehung unter Bedingungen zu untersuchen, die dessen *in vivo* Zustand sehr nahe kommen. Im Respirationstrakt ist die *M. hyopneumoniae*-Zelle im Wirt dessen Schutz- und Abwehrmechanismen, wie der vermehrten Synthese von Immunglobulinen und Interleukinen ausgesetzt. Die bronchoalveoläre-Lavageflüssigkeit (BALF) eines gesunden Tieres unterscheidet sich von der BALF eines *M. hyopneumoniae*-infizierten Tieres deutlich in der Zusammensetzung und in der Konzentration bestimmter Komponenten.

In dieser Versuchsreihe wurden *M. hyopneumoniae*-Zellen mit BALF von *M. hyopneumoniae*-infizierten und -nichtinfizierten Schweinen inkubiert und die dadurch bedingten Veränderungen in der Gesamtproteinzusammensetzung und -konzentration mit Hilfe metabolischer ³⁵S-Markierung untersucht. Die Positiv- (PK) und Negativkontrolle (NK) wurden mit physiologischer NaCl-Lösung anstelle von BALF versetzt. Die NK diente ausschließlich der Wachstumskontrolle, die PK wurde dagegen einem konventionellen Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad unterzogen (DEITERS 1994). Die Auftrennung der Proteine erfolgte in der ein- oder zweidimensionalen Gelelektrophorese (s. 3.8.4.2), die Detektion mit Hilfe der Autoradiographie oder im Immunoblot mit einem kommerziellen Kaninchen-Hsp60-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (Biomol, Deutschland).

In Abb. 24a und 24b sind NK und PK vergleichend in der Radiographie dargestellt. Diese Gele wurden anschließend im Immunoblot mit dem Hsp60-Antikörper charakterisiert (Abb. 24c und 24d). In beiden Darstellungsweisen waren keine Unterschiede zwischen PK und NK zu erkennen. Nach Hitzeschock war eine verminderte Syntheserate vieler Proteine nachzuweisen. Neu oder verstärkt synthetisierte Proteine waren nicht zu detektieren. Der Hsp60-Antikörper erkannte eindeutig das Hsp60 von *M. hyopneumoniae* in der PK und NK und wies in seiner Intensität keine Unterschiede auf. Zwischen Ansätzen mit BALF von nicht mit *M. hyopneumoniae*-infizierten Schweinen (N-BALF) und BALF von mit *M. hyopneumoniae*-infizierten Schweinen (P-BALF) waren eindeutige Unterschiede nachzuweisen. Das in der Autoradiographie nachgewiesene Proteinspektrum der P-BALF war stark reduziert; einzelne Proteinspots traten nun neu oder sehr verstärkt auf (Abb. 25a-25b). Auch die Reaktion mit dem Hsp60-Antikörper im Immunoblot zeigte eine deutliche Zunahme der Konzentration des Hsp60 von *M. hyopneumoniae* (Abb. 25c-d).

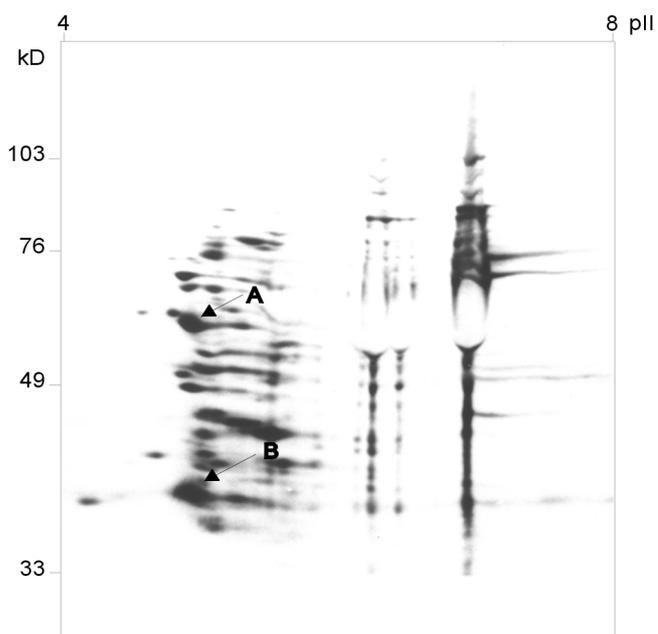


Abb. 24a: Darstellung des Gesamtproteinprofils von *M. hyopneumoniae*, inkubiert mit 0,85%iger NaCl / ohne Hitzeschock (= NK) nach zweidimensionaler Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie
A, B: Hsp60-Protein, in zwei Fragmente degradiert

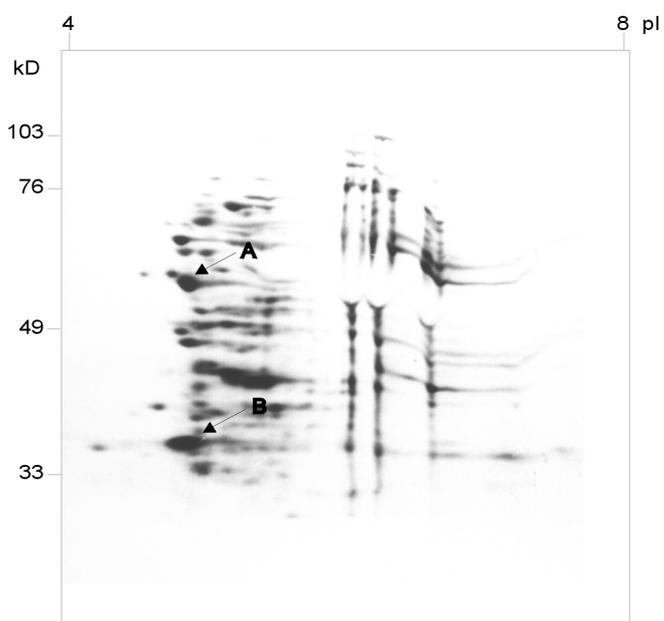


Abb. 24b: Darstellung des Gesamtproteinprofils von *M. hyopneumoniae*, inkubiert mit 0,85%iger NaCl / mit 60 minütigem Hitzeschock bei 42°C (= PK) nach zweidimensionaler Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie
A, B: Hsp60-Protein, in zwei Fragmente degradiert

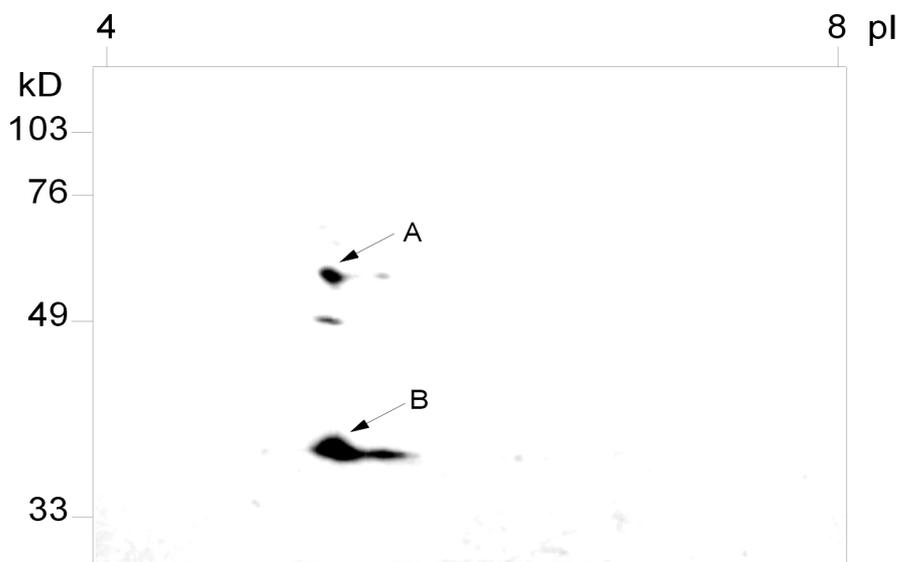


Abb. 24c: Nachweis des Hsp60 von *M. hyopneumoniae*, inkubiert mit 0,85%iger NaCl / ohne Hitzeschock (= NK) nach zweidimensionaler Gelelektrophorese und anschließendem Immunoblot mit Kaninchen-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp.

A, B: Hsp60-Protein, in zwei Fragmente degradiert

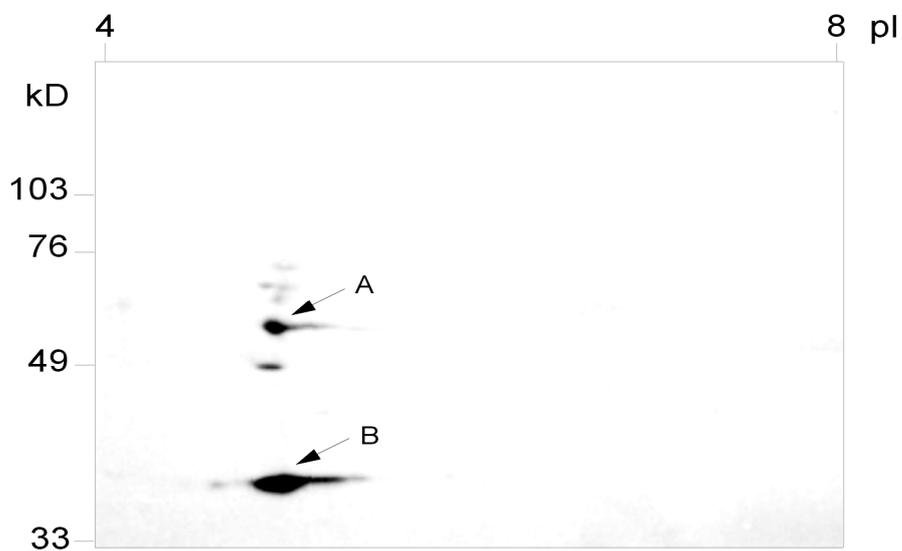


Abb. 24d: Nachweis des Hsp60 von *M. hyopneumoniae*, inkubiert mit 0,85%iger NaCl / mit 60 minütigem Hitzeschock bei 42°C (= PK) nach zweidimensionaler Gelelektrophorese und anschließendem Immunoblot mit Kaninchen-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp.

A, B: Hsp60-Protein, in zwei Fragmente degradiert

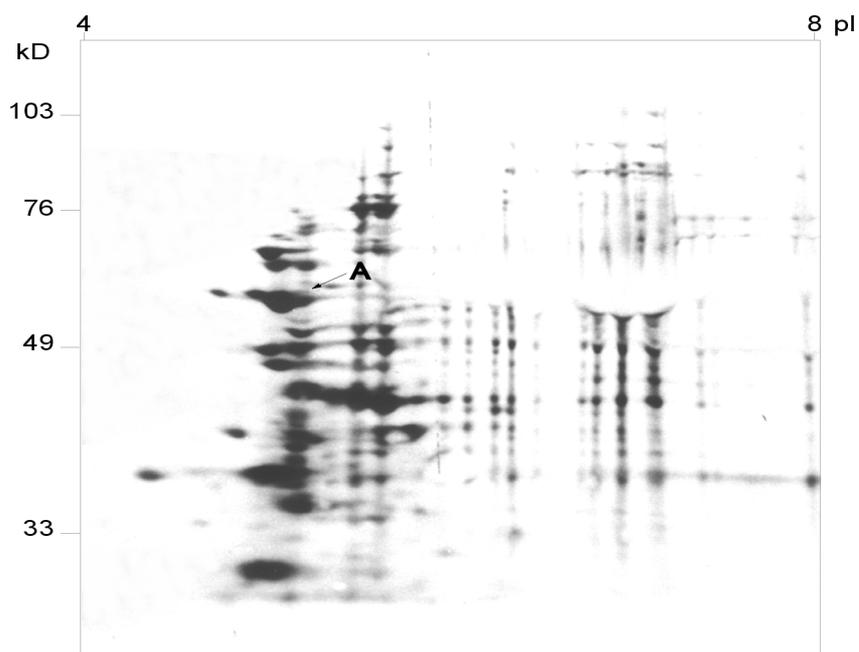


Abb. 25a: Darstellung des Gesamtproteinprofils von *M. hyopneumoniae*, inkubiert mit *M. hyopneumoniae*-negativer BALF vom Schwein nach 10%iger SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie
A: Hsp60-Protein

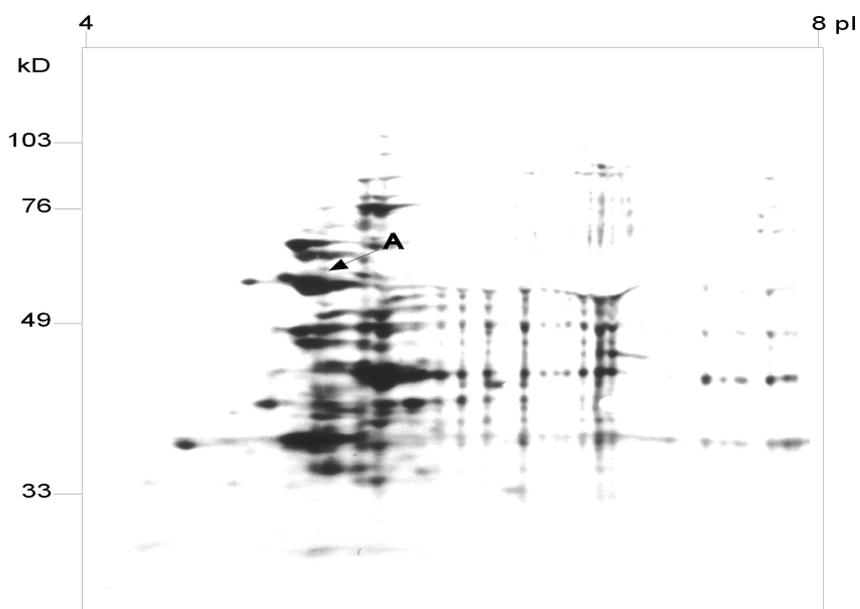


Abb. 25b: Darstellung des Gesamtproteinprofils von *M. hyopneumoniae*, inkubiert mit *M. hyopneumoniae*-positiver BALF vom Schwein nach 10%iger SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie
A: Hsp60-Protein

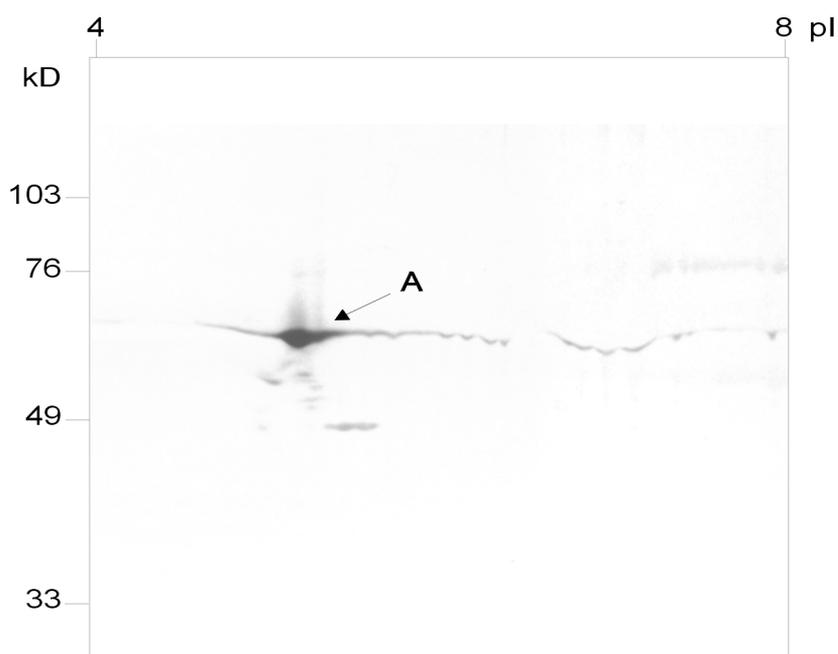


Abb. 25c: Nachweis des Hsp60 von *M. hyopneumoniae*, inkubiert mit *M.-hyopneumoniae*-negativer BALF vom Schwein nach 10%iger SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot mit Kaninchen-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp.

A: Hsp60-Protein

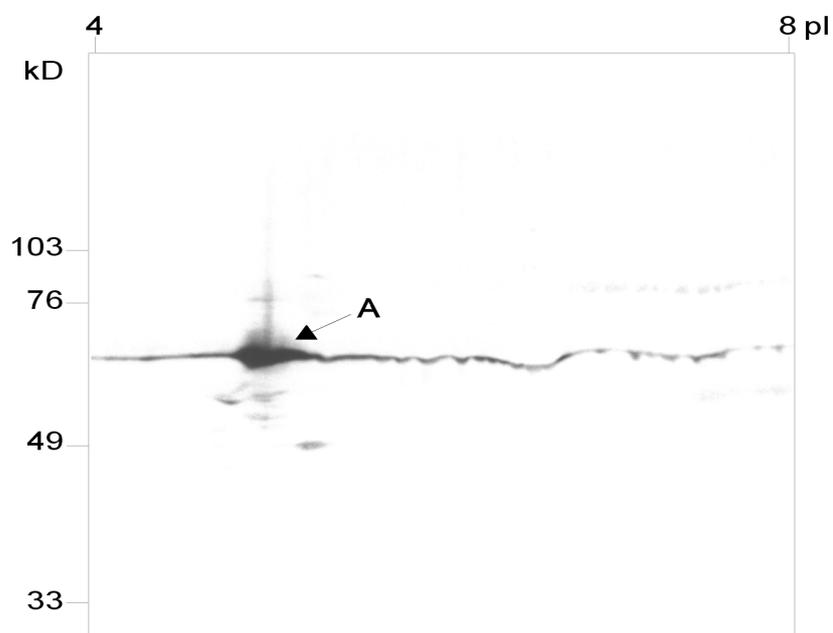


Abb. 25d: Nachweis des Hsp60 von *M. hyopneumoniae*, inkubiert mit *M.-hyopneumoniae*-positiver BALF vom Schwein nach 10%iger SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot mit Kaninchen-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp.

A: Hsp60-Protein

Nach dieser beispielhaft durchgeführten Charakterisierung des Proteinspektrums in der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden die weiteren Ansätze über ein 10%iges SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und im Immunoblot mit dem Kaninchen-Hsp60-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. untersucht. Die Ansätze mit BALF von *M. hyopneumoniae*-infizierten Tieren zeigten gegenüber den entsprechenden BALF-Ansätzen von Tieren ohne *M. hyopneumoniae*-Infektion eine deutlich erhöhte Syntheserate des Hsp60 (Abb. 26).

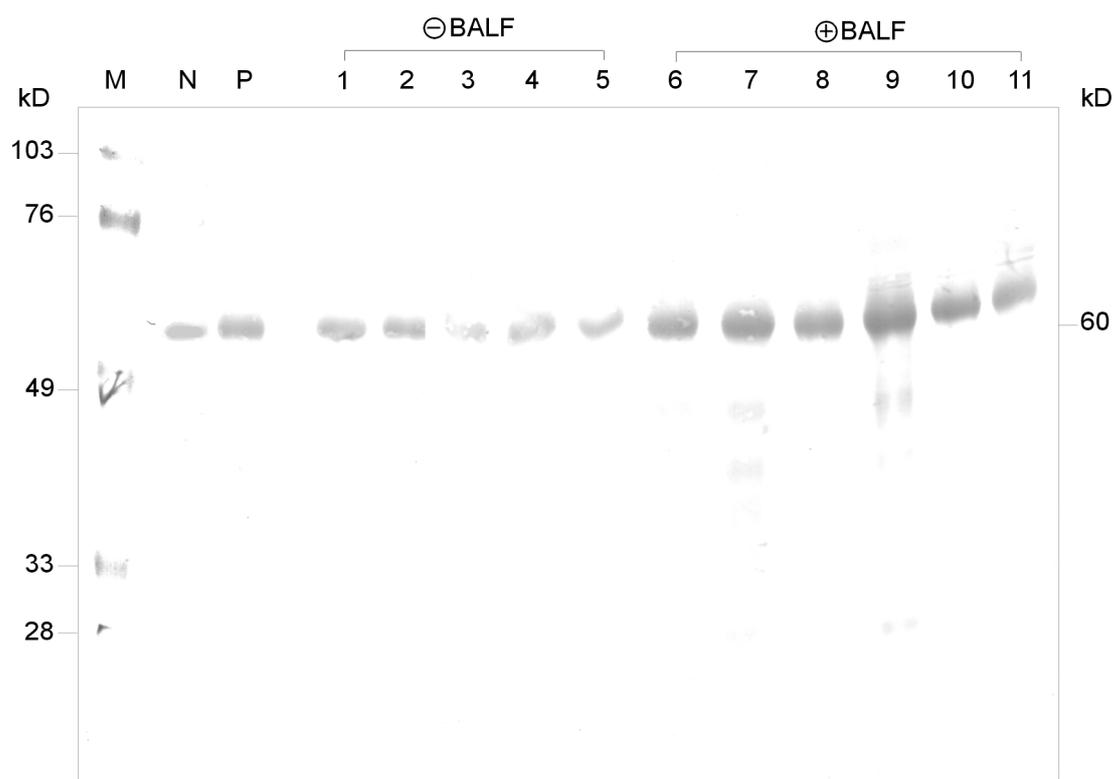


Abb. 26: Nachweis des Hsp60 von *M. hyopneumoniae* inkubiert mit BALF vom Schwein nach 10%iger SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot mit Kaninchen-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp.

- M: Marker. Low Range Prestained-Standard (Biorad, München, Deutschland)
 N: Negativkontrolle NK
M. hyopneumoniae inkubiert mit 0,85%iger NaCl-Lösung
 P: Positivkontrolle PK
M. hyopneumoniae inkubiert mit 0,85%iger NaCl-Lösung, 60-minütiger Hitzeschock bei 42°C
 Spur 1-5: *M. hyopneumoniae* inkubiert mit *M.-hyopneumoniae*-negativer BALF 1-5
 Spur 6-11: *M. hyopneumoniae* inkubiert mit *M.-hyopneumoniae*-positiver BALF 6-11

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des DFG-Projektes „Charakterisierung der Hitzeschockproteine von Mykoplasmen und Untersuchungen zu deren Bedeutung in der Pathogenese von Mykoplasmeninfektionen“ (Ru 459/2-1) durchgeführt. Im Verlauf der Streßantwort werden sogenannte Hitzeschockproteine (Hsp) neu oder vermehrt synthetisiert. Diese konservierten, ubiquitär vorkommenden Proteine werden auch von den Zellen der Wirtsorganismen bei bakteriellen oder viralen Infektionen verstärkt produziert. Durch die Immunreaktion des Wirtes und die Veränderung des Milieus werden auch von den eindringenden Mikroorganismen Hsp gebildet. Diese Proteine scheinen wichtige, teilweise immundominante Antigene (wie z.B. Hsp65 von *Mycobacterium (Mb.) tuberculosis*) bei Infektionen mit einigen bakteriellen Erregern zu sein. Untersuchungen zeigten, daß vor allem Hsp aus der Hsp60- und Hsp70-Familie, Immunität vermitteln können. Über Hsp von Mykoplasmen war bisher nur wenig bekannt. Da das Genom der Mykoplasmen aufgrund der zumeist parasitischen Lebensweise im Laufe der Evolution stark reduziert wurde, stellte sich die Frage, welche Bedeutung diesen Proteinen bei durch Mykoplasmen hervorgerufenen Erkrankungen zukommt. Ziel dieser Arbeit war es Hsp-kodierende Gene verschiedener tierpathogener Mykoplasmenpezies (*M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae*, *M. hyopneumoniae*) zu identifizieren und anhand ihrer DNA- und Aminosäuresequenzen zu charakterisieren und taxonomisch einzuordnen. Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, durch Klonierung und Expression rekombinante Hsp von einigen in dieser Arbeit untersuchten Mykoplasmenpezies zu gewinnen. Diese Proteine dienten zur Erstellung von Ausgangsmaterial für immunologische Untersuchungen, wie zur Gewinnung von Kaninchen- und Ratte-seren, die gegen mykoplasmale Hsp gerichtet sind, und zur Charakterisierung von Rekonvaleszenten-seren in Bezug auf ihre Reaktion mit rekombinanten mykoplasmalen Hsp. Mit Hilfe der rekombinanten Proteine sollte außerdem im Modell der *M. arthritidis*-Polyarthrit der Ratte der Einfluß rekombinanter mykoplasmales Hsp auf die Pathogenese dieser Erkrankung überprüft werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte als Grundlage für weiterführende Arbeiten die Rolle der Hsp von Mykoplasmen im akuten Infektionsgeschehen untersucht werden. In einem *in vitro*-Modell wurde die Synthese von Hsp als Reaktion von *M. hyopneumoniae* auf den Einfluß des Wirtes durch den Einsatz von BALF untersucht.

Identifizierung und Charakterisierung Hsp60- und Hsp70-kodierender Genfragmente

Die Ausgangsbasis zur Sequenzierung der *hsp60*- und *hsp70*-Gene der in der Tiermedizin relevanten Mykoplasmenspezies *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* beruhte auf den recht unterschiedlichen *hsp60*-Genen der bereits sequenziert vorliegenden *hsp60* von *M. pneumoniae* (HIMMELREICH et al. 1996) und *M. genitalium* (SWISS-PROT: P47632). Die Homologie von nur 76% zwischen *M. pneumoniae* und *M. genitalium* unterschied sich stark von den *hsp60*-Homologiewerten von Untersuchungen anderer Gattungen und widersprach im gewissen Sinne den Erkenntnissen über den sehr hohen Konservierungsgrad dieser Proteingruppe (VAN EDEN 1990, SHINNIK 1991). Möglicherweise konnten die Mykoplasmen aufgrund ihrer degenerativen Entwicklung und dem Verlust vieler Gensysteme diesen extrem hohen Konservierungsgrad der *hsp*-Gene nicht aufrechterhalten. Ein besonders homologer, aber auch antigener Genabschnitt des *hsp70*-Gens (GALLEY et al. 1992) wurde für eine umfassende Charakterisierung der bei bakteriellen Infektionen immunologisch wichtigen Hsp sequenziert (LAMB et al. 1989, FRANCELLA und RENSING 1994).

Die Existenz nur eines *hsp60*- und *hsp70*-Gens, wie bei den übrigen Prokaryonten (LANGER et al. 1992), wurde in der vorliegenden Arbeit bei den analysierten Mykoplasmenspezies mit *hsp60*- und *hsp70*-spezifischen DNA-Sonden im Southernblot nachgewiesen (NIEWINT 1998). Daraufhin wurde die technisch weniger aufwendige und schnelle Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Isolierung und Amplifikation der *hsp*-Gene von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* gewählt. Für die PCR waren schon sehr geringe Mengen an mykoplasmaer DNA ausreichend. Die Erstellung von geeigneten Primern, die trotz des hohen A+T-Gehaltes des Mykoplasmen-genoms spezifisch an die zu amplifizierende DNA banden, bedurfte für das *hsp60*-Gen verschiedener Versuchsreihen. Nach Homologievergleichen der *hsp60*-DNA- und Aminosäuresequenzen von *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli* wurden, über das gesamte Gen verteilt, zehn Primer (fünf Vorwärts- und fünf Rückwärtsprimer) aus besonders stark konservierten Bereichen der gegenübergestellten Sequenzen ausgewählt. Die meisten der 25 möglichen Primerkombinationen erzeugten Amplifikate, aber nur 8 Reaktionen ergaben singuläre und eindeutige Banden. Vier dieser DNA-Banden wurden ausgewählt, aufgereinigt und sequenziert. Die Primer zur Erzeugung eines 600 bp großen *hsp70*-Fragmentes wurden der Literatur entnommen (GALLEY et al. 1992). Diese degenerierten Primer waren besonders hochkonservierten Bereichen des *hsp70*-Gens entlehnt und sollten „omnipotent“ bei allen Organismen einsetzbar sein. Diese *hsp70*-Primer amplifizierten reproduzierbar im erwarteten Bereich von 600 bp singuläre Banden.

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden ausschließlich über die „Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources“ (HUSAR) analysiert und bearbeitet (s. 3.4). Alle der Sequenzierung unterzogenen PCR-Produkte wurden durch den Vergleich mit Gen-Datenbanken eindeutig als Fragmente von *hsp60*- und *hsp70*-Genen identifiziert und im Falle der *hsp60*-Amplifikate zur fast vollständigen *hsp60*-Gensequenz zusammengesetzt. Die so erhaltenen *hsp60*- und *hsp70*-DNA-Sequenzen von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* wurden mit dem HUSAR-Programm „translate“ in Aminosäuresequenzen übersetzt und wie die DNA-Sequenzen im Rahmen eines Homologievergleiches analysiert.

Die Analyse der *hsp60*-Sequenzen von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae*, *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* (HIMMELREICH et al. 1996) zeigten mit 98,0-99,9% unerwartet hohe Homologien. Im Vergleich mit *M. genitalium* (SWISS-PROT: P47632) wiesen diese Mykoplasmenspezies durchgehend nur Homologiewerte zwischen 76,5 und 77,7% auf. Die Konservierung des *hsp60*-Gens der Gattung *Mycoplasma* scheint die bisher allgemein nachgewiesenen sehr hohen Homologien zu bestätigen (SHINNIK 1991). Der ungewöhnlich niedrige Konservierungsgrad von *M. genitalium* könnte in der geringen Genomgröße dieses Bakteriums (570 kbp) begründet sein. *M. genitalium*, mit dem kleinsten Genom freilebender Bakterien, ist durch den dadurch bedingten Mangel an Reparatursystemen und Korrekturmechanismen einem relativ starken Mutationsdruck, vornehmlich an der dritten Basenposition eines Codons, ausgesetzt (YOGEV et al. 1990). Die Homologie zu *hsp60*-Genen von *C. perfringens*, *B. subtilis*, *E. coli* betrug 49,2 bis 56,8%, abnehmend mit dem Grad der phylogenetischen Verwandtschaft (HEMMINGSEN et al. 1988, LI und WONG 1992, RUSANGAWA et al. 1992).

Der Homologievergleich der ca. 600 bp großen, den mittleren Bereich des Gens repräsentierenden, *hsp70*-Genfragmente dokumentierte die auffallend hohe Konservierung von 99,9% von *M. arthritidis* und *M. bovis* im Vergleich von nur 51,3-69,7% zwischen den weiteren Mykoplasmenspezies (HIMMELREICH et al. 1996, FALAH und GUPTA 1996). Gegenüber *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli* ergaben sich für den untersuchten 600 bp großen DNA-Abschnitt Homologien von 50,6-63,1%, abnehmend mit ihrer phylogenetischen Verwandtschaft (BARDWELL und CRAIG 1984, WETZSTEIN et al. 1990, GALLEY et al. 1992).

Für eine Charakterisierung der immunologischen Bedeutung von mykoplasmalen Hsp war die Ableitung und Untersuchung der Aminosäuresequenzen und der daraus zu ermittelnden antigenen Bereiche der untersuchten Spezies sinnvoll. Das Hsp60 der untersuchten Mykoplasmenspezies zeigte Homologien von 90,4-99,9%, im Vergleich zu *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli* waren die Homologiewerte mit 53,2-60,8% jedoch deutlich geringer. Der

Vergleich der abgeleiteten Aminosäure-Homologien der *hsp70*-Genfragmente dokumentierte Homologien von 63,2-79,3% innerhalb der untersuchten Mykoplasmen, von fast 99% zwischen *M. arthritidis* und *M. bovis* und von 58,7-68,5% zu den Sequenzen anderer Bakterien-spezies. Sowohl beim Hsp60 als auch beim Hsp70 nahmen die Homologiewerte mit dem Grad der phylogenetischen Verwandtschaft ab. Auffallend war jedoch, daß auch im Vergleich zu humanem Hsp60 und Hsp70, also zu Eukaryonten die Homologien nicht geringer als 50-65% waren, was die hohe Konservierung dieser Hsp-Gruppen unterstreicht (HUNT und MORIMOTO 1985, VENNER et al. 1990).

Am höchsten konserviert waren die Aminosäuresequenzen der Hsp60 und Hsp70 im N-terminalen und mittleren Bereich der Proteinsequenzen. Es überschritten sich 12-13 antigenische Abschnitte der mykoplasmalen Hsp60 mit 13 antigenen Regionen des GroEL und 4-5 antigenische Abschnitte der mykoplasmalen Hsp70-Fragmente mit vier antigenen Bereichen des DnaK von *E. coli* (BARDWELL und CRAIG 1984). Die antigenen Sequenzen lagen fast ausschließlich in stark konservierten Bereichen.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hsp60 und Hsp70 DNA- und daraus abgeleiteten Proteinsequenzen erlaubten zwei weitere Vorgehensweisen. Es bestand zum einen die Möglichkeit, die Eignung von Hsp für eine taxonomische Einordnung zu überprüfen. Über die Sequenzdaten konnte über die Programme „clustal“ und „clusttree“ die taxonomische Position der untersuchten Mykoplasmen- und Bakterien-spezies generiert und diese vergleichend beschrieben werden. Zum anderen erschien der Nachweis übereinstimmender potentiell antigenen Bereiche innerhalb des Hsp60 und des Hsp70-Fragmentes als Ansatz zur Untersuchung der immunologischen Rolle der Hsp geeignet. Hsp werden sehr konträr diskutiert. Einerseits könnten sie aufgrund ihrer hohen Konservierung Ursache von Autoimmunreaktionen sein, andererseits können diese Hsp bei Infektionen mit bakteriellen Erregern jedoch auch eine protektive Immunität vermitteln (HOLOSHITZ et al. 1983, COHEN et al. 1985, VAN DEN BROECK et al. 1989). So erschien die Klonierung und Expression des *hsp60*- und *hsp70*-Gens und die durch die gewonnenen rekombinanten mykoplasmalen Hsp mögliche Charakterisierung der Immunantwort als sinnvoll.

Taxonomische Einordnung

Mit Hilfe der ermittelten *hsp60*- und *hsp70*-Gensequenzen wurde eine taxonomische Einordnung der hier untersuchten Mykoplasmen-spezies angestrebt. In den letzten Jahren wurde vermehrt versucht, neben der üblichen 16S-rRNA-Analyse weitere geeignete Gen- bzw. Proteingruppen auf ihre taxonomische Verwendbarkeit hin zu untersuchen und einzu-

setzen. Gene bzw. Proteine, die für die Bestimmung von taxonomischen Positionen potentiell geeignet sind, müssen einerseits einen sehr hohen Konservierungsgrad aufweisen, andererseits aber auch die Evolutionsvorgänge, ausgelöst durch verschiedene Formen der Mutation, widerspiegeln (WOESE und MANILOFF 1974). Die hohe Konservierung der Hsp und vor allem ihr ubiquitäres Vorkommen in allen Organismen ließen ihren Einsatz in einem taxonomischen Vergleich als sinnvoll erscheinen. Ein erster Ansatz sollte mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten und zum Homologievergleich herangezogenen DNA- und Aminosäuresequenzen des Hsp60 und Hsp70 unternommen werden. Die phylogenetischen Positionen auf der Basis dieser Sequenzen ermöglichten eine eindeutige Zuordnung der einbezogenen Bakterienspezies. Im Fall der Aminosäuresequenzen von Hsp60 war gegenüber der Darstellung auf der Basis der DNA-Sequenzen eine eindeutigere Zuordnung der Mykoplasmenspezies möglich, die aus den etwas niedrigeren Homologiewerten resultierte. Mit den Teilsequenzen oder Peptiden des Hsp70 (Homologiewerte von in der Regel 50-70%) konnten die hier untersuchten Spezies klar unterschieden und eingeordnet werden. Die Differenzierung von *M. bovis* und *M. agalactiae*, die vor gut 20 Jahren noch einer gemeinsamen Spezies zugeordnet wurden (ASKAA und ERNOE 1976), ist auf morphologischen, biochemischen und serologischen Wege auch heute noch schwierig, auf molekularbiologischem Wege ist ihre Unterscheidung mittlerweile jedoch unproblematisch (MATTSSON et al. 1991, GUMMELT et al. 1996, SUBRAMANIAM et al. 1998). Mit Hilfe des taxonomischen Vergleichs der Hsp60 oder Hsp70 konnten diese beiden Spezies in dieser Studie ebenfalls klar unterschieden und zugeordnet werden.

Wie lassen sich diese taxonomischen Daten im Vergleich zu 16S-rRNA-Analysen von WEISBURG et al. (1989) einordnen? „Modellhaft“ sollte die Möglichkeit der taxonomischen Einordnung dieser Spezies überprüft und zum bestehenden 16S-rRNA-Modell verglichen werden. WEISBURG et al. (1989) teilten die *Mollicutes* in sechs Gruppen, in die *M. pneumoniae*-, die *M. hominis*-, die *Spiroplasma*-, die *Anaeroplasma*-, die *Asteoleplasma*-Gruppe und in die Gruppe der Verwandten mit Zellwand ein. Dabei wurden *M. pneumoniae* der *M. pneumoniae*-Gruppe, *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* der *M. hominis*-Gruppe und *M. capricolum* der *Spiroplasma*-Gruppe zugeordnet. Wie bei WEISBURG und Mitarbeitern (1989) konnte anhand der eigenen Untersuchungen eine engere Relation der Spezies der *Spiroplasma*- und *M. pneumoniae*-Gruppe zueinander als zu den Spezies der *M. hominis*-Gruppe ermittelt werden. Alle in dieser Studie analysierten Spezies sind den 16S-rRNA-Analysen entsprechenden Gruppen zuzuordnen. Für die Spezies *M. bovis* und *M. agalactiae* ergab sich im taxonomischen Vergleich auf der Basis der Hsp-Gene und -Proteine ein größerer Abstand als bei der Einordnung durch WEISBURG et al. (1989).

Es erscheint also durchaus als sinnvoll, stark konservierte, ubiquitär vorkommende Gene bzw. Proteine neben den 16S-rRNA-Analysen zu taxonomischen Vergleichen und Einordnungen einzusetzen. Die Ergebnisse der taxonomischen Untersuchung auf der Basis der Hsp zeigt die Möglichkeit einer dem 16S-rRNA-System zum Teil überlegenen phylogenetischen Analyse. Die 16S-rRNA-Untersuchungen sind sicherlich durch solche neuen Systeme nicht zu ersetzen, könnten aber durch diese zweckmäßig ergänzt und ausgebaut werden. Der Einsatz verschiedener geeigneter Gene und Proteine auf dem Gebiet der Taxonomie würde eine differenziertere Spezieseinordnung für zeitlich begrenzte Evolutionsperioden ermöglichen.

Klonierung und Expression rekombinanter Hsp

Als Grundlage zur weiteren Charakterisierung und zur Untersuchung der immunologischen Bedeutung von Hsp wurden Genfragmente des *hsp60* von *M. arthritidis* und *hsp70* von *M. arthritidis* und *M. bovis* in einen Plasmidvektor kloniert und anschließend in *E. coli* exprimiert. Zur Klonierung ausgewählt wurden die PCR-Amplifikate MA60-1 und MA60-2 des *hsp60* und die ca. 600 bp großen *hsp70*-Genfragmente MA70 und MB70. Um in der späteren immunologischen Untersuchung die antigenen Bereiche des *hsp60* genauer einschätzen zu können, wurden zwei *hsp60*-Abschnitte, die die erste und zweite Hälfte des *hsp60* repräsentieren, ausgewählt. Aufgrund der sehr hohen Homologien der Hsp60-DNA- und -Aminosäuresequenzen innerhalb der untersuchten Mykoplasmenspezies erschien die Expression rekombinanter Proteine von *M. arthritidis* als ausreichend.

Die Klonierungsvektoren pGH432 bzw. pGH433 besaßen einen zur IPTG-Induktion geeigneten *tac*-Promotor. Die Genexpression, induziert durch IPTG, ergab in der SDS-PAGE nach Coomassie-Blau-Färbung jedoch keine zusätzlichen bzw. verstärkten Proteinbanden. Das Vektorsystem pGH432/433 schien zur Expression der mykoplasmaalen Hsp-Fragmente also nicht geeignet zu sein. Vermutlich identifizierten die *E. coli* Zellen die relativ kleinen Expressionsprodukte als degradierte Proteinfragmente und unterwarfen sie dem enzymatischen Abbau im Cytosol. Eine Lösung wurde in der Wahl eines Plasmidvektors zur Generierung von Expressionsprodukten in Form von Fusionsproteinen gesucht. Durch den Einsatz des Plasmidvektors pGEX-5X-3 konnten Fusionsprodukte ausreichender Größe mit Glutathion-S-Transferase (GST) in *E. coli* JM105 hergestellt werden. In der SDS-PAGE nach Coomassie-Blau-Färbung lagen die Molekularmassen der GST-Expressionsprodukte pMA60-1 und pMA60-2 bei 57 und 64 kDa, die von pMA70 und pMB70 bei jeweils 32 kDa, mit einem GST-Anteil von jeweils 29 kDa. Die Konzentration der überexprimierten rekombinanten GST-Fusionsprodukte überschritt die Löslichkeitsprodukte der jeweiligen

Proteine im Cytosol und bildete Aggregate. Die gebildeten Einschlußkörperchen mußten daher anschließend nicht affinitätschromatographisch isoliert werden, sondern konnten mit Hilfe einer Aggregatpräparation aufgereinigt werden.

Die Größe des Hsp-Anteils der Expressionsprodukte pMA70 und pMB70 betrug nur 3 kDa anstatt der erwarteten 13 kDa. Ein durch *E. coli* HB101 als Stop-Codon erkanntes UGA-Codon in den 600 bp langen Gensequenzen führte zum vorzeitigen Abbruch der Proteinexpression (YOGEV et al. 1990). Mit Hilfe einer Mutagenese-PCR konnte das UGA-Codon des *hsp70*-Genfragmentes von *M. arthritidis* in UGG und damit in ein universell übliches Tryptophancodon umgeschrieben werden. Nach Klonierung und IPTG-induzierter Expression dieses PCR-Fragmentes wurde in der SDS-PAGE nach Coomassie-Blau-Färbung ein 42 kDa großes pMA70-GST-Fusionsprodukt nachgewiesen und mit Hilfe einer Aggregatpräparation aufgereinigt.

Die Auftrennung und Darstellung der exprimierten und aufgereinigten Klonierungsprodukte erfolgte nach SDS-PAGE in der Coomassie-Blau-Färbung oder im Immunoblot mit spezifischen Antiseren gegen Hsp60 bzw. Hsp70. Die jeweiligen Verschiebungen der Banden von 29 kDa (reine Glutathion-S-Transferase) auf 57 (pMA60-1) und 64 kDa (pMA60-2) bzw. auf 32 (pMA70, pMB70) und 42 kDa (pMA70-mut) konnten mit beiden Nachweisverfahren dargestellt werden. Allerdings reagierten der Kaninchenantikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. und der Antikörper SPA880 gegen murines Hsp70 im Immunoblot teilweise mit *E. coli*-Proteinbanden, die durch die Aggregatpräparation nicht vollständig entfernt wurden. Dabei war im Fall des Immunoblots von pMA60-1 und pMA60-2 mit dem Anti-Hsp60-Serum eine erhöhte Synthese des *E. coli*-Hsp60 bei der Induktion der Plasmidgenexpression durch IPTG zu beobachten. Der Antikörper zeigte starke Kreuzreaktivität mit *E. coli* Hsp60-Epitopen. Die Induktion einer Überexpression auf Plasmidebene bedeutet also auch für die *E. coli*-Zelle „Streß“, der eine gesteigerte Hsp-Synthese zur Folge hat.

Rekombinante Hsp60 und Hsp70 konnten somit als GST-Fusionsproteine in gewünschten Mengen synthetisiert und nach Bedarf zur weiteren Charakterisierung dieser Hsp eingesetzt werden. Die aufgereinigten rekombinanten GST-Fusionsproteine pMA60-1 und pMA60-2 dienten zur Gewinnung von Kaninchenseren, die gegen mykoplasmales Hsp60 gerichtet waren. Zusätzlich wurden zwei Peptide MAP1 und MAP2 (je 14 kDa), auf der Basis von zwei antigenen Bereichen des Hsp60 von *M. pneumoniae* synthetisch hergestellt, im Kaninchen eingesetzt. Die gegen pMA60-1 und pMA60-2 erzeugten Antiseren wurden mit Hilfe von *E. coli*-Gesamtzellysat, das an CNBr-aktivierte Sepharose gebunden war, aufgereinigt und somit weitgehend von Komponenten befreit, die gegen *E. coli* JM105 gerichtet waren. Die Spezifität der gewonnenen Seren wurde nach SDS-PAGE und Westernblot in der Reaktion

mit Ganzzelllysaten von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae*, *M. hyopneumoniae*, *M. pneumoniae*, *C. perfringens*, Streptokokken und *E. coli* und in der Reaktion mit MAP1 überprüft. Die Reaktionen wurden durch den zusätzlichen Einsatz eines kommerziellen Kaninchenantikörpers gegen das Hsp60 von *Synechococcus* sp. als Positivkontrolle überprüft. Durch Vorversuche wurde sichergestellt, daß die von diesem Antikörper nachgewiesenen Proteinbanden eindeutig Hsp60-Epitope repräsentieren. Diese Vorversuche zeigten außerdem, daß bedingt durch die Probenaufbereitung des jeweiligen Gesamtzelllysates oder der ausgefällten Probe, meist mehrere dem Hsp60 zuzuordnende Banden detektiert werden können. Das Hsp60-Molekül scheint also bei der Probenvorbereitung teilweise zu degradieren. Die Reaktionen der gewonnenen Kaninchenserum mit den verschiedenen Gesamtzelllysaten bestätigten diese Daten. Zusätzlich zur 60-kDa-Bande reagierten vermehrt Banden im Molekularmassenbereich von ca. 40-50 kDa. Wie schon der kommerzielle Kaninchen-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp., zeigten die gegen rekombinantes mykoplasmales Hsp60 und gegen MAPs erzeugten Kaninchenserum starke Kreuzreaktionen mit verschiedenen Mykoplasmen- und Bakterienspezies. Aufgrund der hohen Konservierung des Hsp60 aller Organismen ist es wahrscheinlich, daß speziesübergreifend dem Wirtsorganismus homologe Epitopbereiche des Antigens präsentiert werden. Die Kaninchenserum erkannten eindeutig die Hsp60-Proteinbanden der untersuchten Spezies und können somit im Immunoblot in Folgeversuchen eingesetzt werden.

Die rekombinanten GST-fusionierten mykoplasmalen Hsp dienten desweiteren zur Charakterisierung der Reaktion von Rekonvaleszentenserum mit Hsp-Komponenten. Die rekombinanten Fusionsproteine pMA60-1, pMA60-2, pMA70 und pMB70 wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Immunoblot auf ihre Reaktion mit Rekonvaleszentenserum von Rind und Schwein untersucht. Die Rinder- und Schweineserum reagierten im ELISA in unterschiedlicher Stärke mit *M. bovis* bzw. mit *M. hyopneumoniae*. Die im ELISA nicht mit *M. bovis* bzw. *M. hyopneumoniae* reagierenden Seren erkannten die Hsp-Epitope der eingesetzten rekombinanten Fusionsproteine nur schwach oder gar nicht. Im Gegensatz dazu detektierten die im ELISA stark mit *M. bovis* bzw. *M. hyopneumoniae* reagierenden Seren im Immunoblot intensive Banden der aufgetrennten rekombinanten Hsp. Hsp60 und Hsp70 scheinen bei einer Infektion mit diesen Erregern eine Rolle als wesentliche Antigene zu spielen. Es ist sehr wahrscheinlich, daß der Wirtsorganismus bereits bei früheren Infektionen mit anderen Erregern Antikörper gegen Hsp-Epitope gebildet hat und aufgrund der hohen Konservierung besonders der Hsp60 und Hsp70 somit auch Epitope der rekombinanten mykoplasmalen Hsp erkennt. Die schwachen Reaktionen mit den

entsprechenden im ELISA negativen Seren könnten durch solche vorausgegangenen Kontakte verursacht worden sein. Auffallend ist aber die sehr starke Reaktion der „positiven“ Rekonvaleszentenserum mit den rekombinanten Hsp60- und Hsp70-Epitopen. Die Reaktion des Antikörpers SP 880 gegen murines Hsp70 mit den rekombinanten Hsp70-Fragmenten läßt die Eingrenzung des Bindungsbereiches dieses Antikörpers auf 30 Aminosäuren zu. Beim Einsatz von aufgereinigter Glutathion-S-Transferase in der SDS-PAGE konnte im anschließenden Immunoblot mit denselben Seren keine Reaktion nachgewiesen und somit eine Reaktion mit GST-Epitopen ausgeschlossen werden. Der Versuch zeigt erstmals auch für Mykoplasmen die immundominante Rolle der Hsp der Hsp60- und Hsp70-Familien (SHINNIK et al. 1988, YOUNG et al. 1988). Die durch *M. bovis* bzw. *M. hyopneumoniae* infizierten Tiere hatten einen hohen Antikörperspiegel gegen Hsp60- und Hsp70-Epitope gebildet.

Wie Untersuchungen von VAN DEN BROECK et al. (1989) und Wedde (1999) zeigen haben Hsp auch auf die Pathogenese der Polyarthrit der Ratte Einfluß. VAN DEN BROECK et al. (1989) beschrieben bei der Streptokokken-Zellwand-induzierten Arthritis der Ratte die protektive Wirkung des Hsp60 (65 kDa-Protein) von *Mycobacterium (Mb.) tuberculosis*. Die intraperitoneale Verabreichung von 50 µg dieses 65 kDa-Proteins fünf Tage vor Induktion der Streptokokken-Zellwand-Arthritis schützte die Ratten umfassend vor dem Ausbruch einer chronischen Polyarthrit. Die Möglichkeit, mykoplasmale Hsp als Teilkomponente einer protektiven Vakzine einzusetzen, wurde beispielhaft im Tiermodell der *M. arthritidis*-Polyarthrit der Ratte im Rahmen der Dissertation von WEDDE (1999) untersucht. Die rekombinanten Hsp pMA60-1 und pMA60-2 wurden intraperitoneal verabreicht und die Polyarthrit anschließend (nach 14 Tagen) durch intravenöse Infektion mit *M. arthritidis* ISR1 ausgelöst. Diese Tiere waren gegenüber den Tieren der Positivkontrolle, im Sinne einer Vakzine protektiv geschützt.

Bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) als *in vitro*-Modell für die Induktion einer Hitzeschockantwort in *M. hyopneumoniae*

Die zweite Zielsetzung dieser Arbeit war es, die Induktion von Hsp in der Auseinandersetzung des Pathogens mit dem Wirt in einem geeigneten *in vitro* Modell zu beschreiben. Die bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) ermöglicht neben dem bronchoalveolären Keimspektrum auch Rückschlüsse auf den Zustand der Schleimhaut des Atemtraktes, auf zytologische Parameter des Atemsekrets und auf sekretorische Antikörper (GANTER et al. 1993, RUNGE et al. 1996). Untersuchungen der BALF ermöglichen somit eine Analyse der

in vivo Vorgänge im bronchoalveolären Raum in einer sehr sensitiven Weise (KIPPER 1990, GANTER et al. 1993, TEUTENBERG-RIEDEL 1998). Die Induktion von Hsp bei Mykoplasmen, die einen Wirt infizieren wurde in dieser Arbeit exemplarisch an *M. hyopneumoniae*, dem Primärerreger der Enzootischen Pneumonie des Schweines untersucht. *M. hyopneumoniae*-Zellen wurden mit BALFs von *M. hyopneumoniae*-infizierten und -nichtinfizierten Schweinen inkubiert. Die Synthese von Hsp wurde durch metabolische ³⁵S-Markierung, in Anlehnung an die Arbeit von TEUTENBERG-RIEDEL (1998), detektiert. Das Proteinspektrum konnte dann nach ein- bzw. zweidimensionaler SDS-PAGE und anschließendem Westernblot im Autoradiogramm charakterisiert werden. Im immunologischen Nachweisverfahren wurde anschließend das Hsp60 dargestellt.

Die Auswirkungen und unterschiedlichen Einflüsse einer BALF von *M. hyopneumoniae*-infizierten und -nichtinfizierten Schweinen auf *M. hyopneumoniae*-Zellen sollten vergleichend zum gängigen Hsp-Induktionssystem „Hitzeschock“ am Beispiel des Hsp60 beschrieben werden. Hierfür wurden die Ansätze der Negativkontrolle und Positivkontrolle nicht mit BALF, sondern mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Die Negativkontrolle wurde anschließend noch mit ³⁵S-radioaktiv markierten Aminosäuren versetzt, die Positivkontrolle einem Hitzeschock unterzogen. Die Parameter des Hitzeschocks beruhen auf vorhergehenden Versuchen von DEITERS (1994).

Die Unterschiede zwischen Negativ- und Positivkontrolle und den Proben mit BALF von *M. hyopneumoniae*-infizierten und -nichtinfizierten Schweinen waren in Bezug auf das Hsp60 gravierend. Die Induktion von Hsp durch Temperaturerhöhung, der allgemeinen Methode zur Auslösung einer Hitzeschockantwort, führte bei Negativkontrolle und Positivkontrolle weder im Autoradiogramm noch im Immunoblot zu einer Synthesesteigerung der detektierten Proteine. Als Reaktion von *M. hyopneumoniae* auf Zusatz von BALF von *M. hyopneumoniae*-infizierten Schweinen konnten dagegen im Vergleich zu BALF von nicht mit *M. hyopneumoniae*-infizierten Schweinen bei zwei Proteinen (60 kDa – pl: 5,8 / 45 kDa – pl: 6,0) im Autoradiogramm eine erhöhte Syntheserate nachgewiesen werden. Bei einem Protein (60 kDa – pl: 5,8) zeigte sich im Immunoblot mit dem Antikörper gegen das Hsp60 von *Synechococcus* sp. eine bis um das fünffache erhöhte Proteinmenge gegenüber der Reaktion mit der BALF von nicht mit *M. hyopneumoniae*-infizierten Tieren. Die Lokalisation, molekulare Masse und pl des Hsp60-Spots in der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2DGE) bestätigten damit die Ergebnisse von SCHERM (1996). Die mit einer Streßantwort häufig einhergehende Herunterregulierung vieler „housekeeping“-Proteine war sowohl bei der Positivkontrolle als auch nach Behandlung mit BALFs von nichtinfizierten Tieren im Autoradiogramm nachzuweisen. Neben der Bestätigung einer Hsp-Synthese als Schutz des

Erregers gegen die Abwehrreaktion des Wirtsorganismus (MURRAY und YOUNG 1992), konnten durch den Einsatz geeigneter BALF die Veränderungen im Zellstoffwechsel der Mykoplasmen weit deutlicher als durch Hitzeinduktion dargestellt werden. Die *M. hyopneumoniae*-Zellen waren in der Gegenwart von BALF von *M. hyopneumoniae*-infizierten Schweinen, die verschiedene Komponenten des Bronchoalveolärraums des Wirtes enthält, offensichtlich einer Stresssituation ausgesetzt derzufolge sie mit einer signifikanten Steigerung der Synthese von zwei Proteinen reagierte (BICKHARDT 1992, GANTER und HENSEL 1997). Auch im Immunoblot mit dem Antikörper gegen das Hsp60 von *Synechococcus* sp. ließ sich diese Induktion nachweisen. Die Reaktion mit Hsp60 in der BALF *M. hyopneumoniae*-nichtinfizierter Schweine deutet auf eine ständige Synthese des Hsp60 in einer Basiskonzentration im normalen Zellstoffwechsel hin. Alle Folgeversuche, analysiert in der eindimensionalen SDS-PAGE, bestätigten im Immunoblot mit dem Antikörper gegen das Hsp60 von *Synechococcus* sp. die Ergebnisse der 2DGE. Die sieben eingesetzten BALFs von *M. hyopneumoniae*-infizierten Schweinen induzierten, gegenüber den BALFs von *M. hyopneumoniae*-nichtinfizierten Tieren, eine erhöhte Expression von Hsp60 in *M. hyopneumoniae*. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Proteinsynthese weiterer in das Infektionsgeschehen involvierter Hsp, wie z.B. das Hsp70, in ähnlicher Weise erhöht wird (MURRAY und YOUNG 1992).

HENNIG et al. (1999) wiesen die Übereinstimmung der in der BALF detektierten Faktoren und Komponenten mit den Bedingungen im bronchoalveolären Raum im Tier nach. In Folge dieser Untersuchungen erscheint der Einsatz von BALF für eine *in vivo* Vorgänge wider-spiegelnde Darstellung von Interaktionen zwischen Erreger und Wirtsorganismus und -faktoren im bronchoalveolären Raum als sinnvoll. Im Falle der Hitzeschockantwort von *M. hyopneumoniae* konnte die Induktion von Hsp durch Zugabe von BALF differenzierter und eindeutiger als im bloßen Hitzeschockversuch erzeugt und nachgewiesen werden. Es scheinen somit wirtsspezifische Faktoren in der BALF vorhanden zu sein, die einen Einfluß auf die Antigenexpression von *M. hyopneumoniae* besitzen.

In der Reaktion der *M. hyopneumoniae*-Zellen mit BALFs und der Rekonvaleszentenseren mit rekombinanten Hsp60 und Hsp70 gelang es erstmals mykoplasmale Hsp als sehr wichtige Antigene im Infektionsgeschehen dieser Krankheiten darzustellen. Die allgemeine These, daß von Hsp wesentliche immunogene Antigene darstellen, konnte durch die Untersuchungen an Mykoplasmen erhärtet werden. Im Tierversuch konnten intraperitoneale Gaben von rekombinantem Hsp60 von *M. arthritidis* die Mehrheit der Ratten vor dem Auslösen der *M. arthritidis*-Polyarthritis im Sinne einer protektiven Vakzine schützen (Wedde 1999). Neben der Möglichkeit der näheren Charakterisierung der Interaktionen zwischen

Pathogen und Wirt auf der Basis der Hsp, erscheint der Einsatz dieser Proteine als Teilkomponente einer protektiven Vakzine bei bakteriellen Infektionen als sinnvoll.

6 Zusammenfassung

Hitzeschockproteine (Hsp) sind konservierte, ubiquitär vorkommende Proteine, die als Reaktion auf einen Hitzeschock oder andere Umweltfaktoren entweder neu oder verstärkt synthetisiert werden. Seit längerer Zeit werden insbesondere Hsp der Hsp60- und Hsp70-Familie als Ursache von Autoimmunreaktionen diskutiert. Im Gegensatz dazu können diese Hsp bei einige Infektionen mit bakteriellen Erregern jedoch auch Immunität vermitteln. Über Hsp von Mykoplasmen - Bakterien mit genetischer Minimalausstattung - ist bisher sehr wenig bekannt. Das Ziel der Arbeit war es (1) Hsp-kodierende Gene verschiedener Mykoplasmenpezies zu identifizieren und charakterisieren, (2) mykoplasmale rekombinante Hsp zu exprimieren und Untersuchungen zur Bedeutung dieser Proteine bei Mykoplasmeninfektionen zu ermöglichen und (3) die Expression von Hsp im Infektionsverlauf darzustellen.

Genabschnitte fast des gesamten *hsp60*-Gens und eines immunologisch wichtigen, 600 bp großen, *hsp70*-Fragmentes von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae* wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Diese Daten ermöglichten die Ermittlung des Konservierungsgrades innerhalb der Gattung *Mycoplasma* (an den in dieser Studie untersuchten Spezies sowie an *M. pneumoniae*, *M. genitalium* und *M. capricolum*) sowie an anderen Spezies (*C. perfringens*, *B. subtilis*, *E. coli*). Der Konservierungsgrad der *hsp60*-Gene betrug innerhalb der Mykoplasmenpezies 98-99,9%. Eine Ausnahme bildete *M. genitalium* mit 76,5-77,7%. Mit *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli* bestand eine Homologie von 49,2-59,7%. Die Homologien der *hsp70*-Fragmente betrugen 99,8% zwischen *M. arthritidis* und *M. bovis*, 46,8-51,3% zwischen *M. pneumoniae*, *M. genitalium* und *M. capricolum* und 60,5-69,7% innerhalb der weiteren Mykoplasmenpezies. Mit *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli* bestanden Homologien von 50,6-63,1%. Die Ergebnisse des Homologievergleichs der aus den DNA-Sequenzen ermittelten Hsp60-Proteinsequenzen zeigte Werte von 90,4 bis zu 99,9% innerhalb der Mykoplasmenpezies und von 53,2-60,8% im Vergleich mit anderen Bakterienpezies, abnehmend mit dem Grad der phylogenetischen Verwandtschaft. Die Homologien der Hsp70-Proteinfragmente lagen bei 98,9% zwischen *M. arthritidis* und *M. bovis*, bei 63,2-79,3% innerhalb der weiteren Mykoplasmenpezies und bei 58,7-68,5% im Vergleich mit *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli*. Die Bestimmung der taxonomischen Position der Mykoplasmen- und Bakterienpezies auf der Basis der Hsp60- bzw. Hsp70-DNA- und Proteinteilsequenzen entsprach der taxonomischen Einordnung mittels 16S rRNA-Analysen und erlaubte auch eine Differenzierung der beiden eng verwandten Spezies *M. agalactiae* und *M. bovis*.

Nach Transformation in *E. coli* JM105 konnten zwei rekombinante GST-Fusionsproteine von Teilsequenzen des Hsp60 von *M. arthritidis* (57 und 64 kDa) und je ein GST-Fusionsprotein des Hsp70-Fragmentes von *M. arthritidis* und *M. bovis* (42 und 32 kDa) gewonnen werden. Mit den beiden rekombinanten mykoplasmaalen Hsp60-GST-Fusionsproteinen und mit zwei synthetisch hergestellten antigenen Peptiden wurden Antikörper im Kaninchen hergestellt, die das Hsp60 der Gesamtzellsate von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae*, *M. hyopneumoniae*, *M. pneumoniae*, *C. perfringens*, *E. coli* und Streptokokken sp. spezifisch erkannten. Im Immunoblot reagierten alle rekombinanten Hsp60- und Hsp70-GST-Fusionsproteine mit Rekonvaleszentenseren von Rind und Schwein, die im ELISA stark mit *M. bovis*- bzw. *M. hyopneumoniae*-Gesamtantigen reagierten, was die immundominante Rolle von Hsp60 und Hsp70 bestätigt.

Die Charakterisierung der *in vivo* Vorgänge der Hitzeschockantwort von *M. hyopneumoniae* in der Interaktion mit dem Wirt wurde in einem *in vitro*-Modell an bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) von *M. hyopneumoniae*-infizierten und -nichtinfizierten Schweinen analysiert. Nach ein- und zweidimensionaler Gelelektrophorese wurden die Proteinprofile der Mykoplasmen in der Autoradiographie und im Immunoblot mit Hsp60-spezifischen Antikörpern dargestellt. BALFs von *M. hyopneumoniae*-infizierten Tieren bewirkte eine eindeutige und weit intensivere Steigerung der Synthese von Hsp60 in den Mykoplasmen als Hitzeschock, wie der Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen zeigte.

7 Literaturverzeichnis

ABRAVAYA, K, M.P. MYERS, S.P. MURPHY, and R. I. MORIMOTO (1992):

The human heat shock protein hsp70 interacts with HSF, the transcription factor that regulates heat shock gene expression.

Genes Dev., **6**: 1153-1165

ALUOTTO, B.B., R.G. WITTLER, C.O. WILLIAMS, and J.E. FABER (1970):

Standardized bacteriologic techniques for the characterization of mycoplasma species.

Int. J. Syst. Bacteriol., **20**: 35-38

ANDACHI, Y., F. YAMAO, M. IWAMI, and S. OSAWA (1987):

Occurrence of unmodified adenine and uracil at the first position of anticodon in threonine tRNAs in *Mycoplasma capricolum*.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**: 7398-7402

ASKAA, G., and H. ERNOE (1976):

Elevation of *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis* to Species Rank: *Mycoplasma bovis* (Hale et al.) *comb. nov.*

Int. J. of Syst. Bacteriology, **26** (3): 323-325

BARDWELL, J.C., and E.A. CRAIG (1984):

Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible *dnaK* gene are homologous.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**: 848-852

BARRACLOUGH, R., and R.J. ELLIS (1980):

Protein synthesis in chloroplasts: IX: assembly of newly-synthesized large subunits into ribulose biphosphate carboxylase in isolated intact pea chloroplasts.

Biochem. Biophys. Acta, **608**: 19-31

BAUMEISTER, A.K. (1996):

Nachweis von *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit vom Schwein mittels der Polymerase-Kettenreaktion.

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

BAUMEISTER, A.K., M. RUNGE, M. GANTER, A.A. FEENSTRA, F. DELBECK, and H. KIRCHHOFF (1998):

Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluids of pigs by PCR.

Clin. Microbiol., **36**: 1984-1988

BEHRENS, A., M. HELLER, D. YOGEV, and R. ROSENGARTEN (1994):

A family of phase- and size-variant membrane surface lipoprotein antigens (Vsps) of *Mycoplasma bovis*.

Infect. Immun., **62**: 5057-5084

BEHRENS, A., M. HELLER, R. ROSENBUSCH, and H. KIRCHHOFF (1996):

Immunolectron microscopic localization of variable proteins on the surface of *Mycoplasma bovis*.

Microbiology, **142**: 1863-1871

BERGEY'S MANUAL of SYSTEMATIC BACTERIOLOGY (1984):

N.R. Krieg and J.G. Holt (eds.), Williams and Wilkens Co. Baltimore, Vol. 1

BICKHARDT, K. (1992):

Kompendium der allgemeinen inneren Medizin und Pathophysiologie für Tierärzte.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

BLUM, H., H. BEIER, and H.J. GROSS (1987):

Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels.

Electrophoresis, **8**: 93-99

BOORSTEIN, W., T. ZIEGELHOFFER, and E.A. CRAIG (1993):

Molecular evolution of the HSP70 multigene family.

Mol. Evol.

BOVÈ, J. M. (1993):

Molecular feature of *Mollicutes*.

Clin. infect. Dis., **17**/Suppl. 1: 10-31

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

BROCK, T.D., and M.T. MADIGAN:

Biology of Microorganisms.

Seventh Edition 1994, Prentice-Hall International Editions, New Jersey

BROECK, M.F. VAN DEN, E.J.M. HOGERVORST, M.C.J. VAN BRUGGEN, W. VAN EDEN, R. VAN DER ZEE, and W.B. VAN DEN BERG (1989):

Protection against streptococcal cell wall-induced arthritis by pretreatment with the 65-kD mycobacterial heat shock protein.

J. Exp. Med., **170**; 449-466

BUKAU, B. (1993):

Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response.

Mol. Microbiol., **9**: 671-680

BURNETT, W.N. (1981):

„Westernblotting“: electrophoretic transfer of proteins from sodium-dodecylsulfate-polyacrylamid gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.

Anal. Biochem., **112**: 195-203

BUYSER, M.L. DE, A. MORVAN, S. AUBERT, F. DILASSER, N. EL SOLH, and M.L. DE BUYSER (1992):

Evaluation of a ribosomal RNA gene probe for the identification of species and subspecies within the genus *Staphylococcus*.

J. Gen. Microbiol., **138** (5): 889-899

CHENG, M., F. HARTL, J. MARTIN, R. POLLOCK, F. KALOUSSEK, W. NEUPERT, E. HALLBERG, R. HALLBERG, and A. HORWICH (1989):

Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria.

Nature, **341**: 125-130

CITTI, C., S. SAILLARD, and J.M. BOVÈ (1988):

Chromosomal DNA sequences coding for tRNAs recognizing UGA as a tryptophan codon in mollicutes.

in: G. Stanek, G.H. Cassell, J.G. Tully, und R.F. Withcomb (ed.): Recent advances in mycoplasmaology. Proceedings of the 7th Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, Baden near Vienna.

Zentralblatt für Bakteriologie, Suppl. 20, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag: 894-895

CLEAVINGER, C.M., M.F. KIM, and K.S. WISE (1994):

Processing and surface presentation of *Mycoplasma hyorhinis* variant Lipoprotein VlpC.

Bacteriol, **176** (8): 2463-2467

CLOS, J., J.T. WESTWOOD, P.B. BECKER, S. WILSON, K. LAMBERT, and C. WU (1990):

Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation.

Cell, **63**: 1985-1997

COHEN, I.R. and D.B. YOUNG (1991):

Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus.

Immunology Today, **12** (4): 105-110

COHEN, I.R., J. HOLOSHITZ, W. van EDEN, and A. FRENKEL (1985):

T lymphocyte clones illuminate pathogenesis and affect therapy of experimental arthritis.

Arthritis Rheum., **28**: 841

COLE, B.C., L.R. WASHBURN, and D. TAYLOR-ROBINSON (1968):

Hemolysin and peroxide activity of mycoplasma species.

Bacteriol., **95**: 2022-2033

COLE, B.C., and J.R. WARD (1979):

Mycoplasmas as arthritogenic agents.

in: J.G. TULLY, and R.F. WITHCOMB (ed.): The Mycoplasmas. Vol. II. Human and animal mycoplasmas.

Academic Press, New York, San Francisco: 367-398

COLE, B.C., and M.M. GRIFFITH (1993):

Triggering and exacerbation of autoimmune arthritis by the *Mycoplasma arthritidis* superantigen MAM.

Arthritis and Rheumatism, **36**: 994-1002

COSTABEL, U. (1994):

Atlas der bronchoalveolären Lavage.

Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 7

COSTAS, M., R.H. LEACH, and D.L. MITCHELMORE (1987):

Numerical analysis of PAGE protein patterns and the taxonomic relationships within the *Mycoplasma mycoides* cluster.

J. General Microbiol., **133** (12): 3319-3329

COTTEW, G.S. (1985):

Infections with *Mollicutes* in sheep and goats.

in: J. Gylstorff (ed.): Infektionen durch *Mycoplasmatales*, Jena: Gustav Fischer

CRAIG, E.A., and K. JACOBSEN (1985):

Mutations in cognate gene of *Saccharomyces cerevisiae* HSP70 result in reduced growth rates at low temperatures.

Mol. Cell. Biol., **5**: 33517-3524

CRAIG, E.A., J. KRAMER, J. SHILLING, M. WERNER-WASHBURNE, S. HOLMES, J. KOSIC-SMITHER, and C.M. NICOLET (1989):

SSC1, an essential member of the *S. cerevisiae* HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein.

Mol. Cell. Biol., **9**: 3000'-3008

CRAIG, E.A., B.D. GAMBILL, and R.J. NELSON (1993):

Heat-shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis.

Microbiol. Rev., **57**: 402-414

DAMASSA, A.J., P.S. WAKENELL, and D.L. BROOKS (1992):

Mycoplasmas of goats and sheep.

J. Vet. Diagn. Invest., **4** (1): 101-113

DASCHER, C.C., S.K. PODDAR, and J. MANILOFF (1990):

Heat shock response in mycoplasmas, genome-limited organisms.

Bacteriol., **172** (4): 1823-1827

DASCHER, C.C., and J. MANILOFF (1992):

Heat shock response.

in: J. MANILOFF, R.N. McELHANEY, L.R. FINCH, and J.B. BASEMAN (ed.): Mycoplasmas. Molecular biology and pathogenesis.

American Society for Microbiology, Washington D.C.: 349-354

DEITERS, U. (1994):

Nachweis von Streß-Proteinen bei Mykoplasmen.

Diplomarbeit, Fachbereich Biologie, Universität Hannover

DEITERS, U., M. RUNGE, R. HIMMELREICH, and H. KIRCHHOFF (1994):

Identification of heat-shock proteins in mycoplasmas.

IOM-Letters **3**: 695

DELBECK, F. (1995):

Erfolgskontrolle einer oralen Chlortetrazyklin-Behandlung bei lungenkranken Schweinen mittels der bronchoalveolären Lavage.

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

DICE, L.R. (1945):

Measure of the amount of etiological association between species.

Ecology, **26**: 297-302

DROESSE, M., G. TANGEN, I. GUMMELT, H. KIRCHHOFF, L.R. WASHBURN, and R. ROSENGARTEN (1995):

Major membran proteins and lipoproteins as highly variable immunogenic surface components and strain-specific antigenic markers of *Mycoplasma arthritis*.

Microbiology, **141**: 3207-3219

DULBECCO, R., and M. VOGT (1954):

Plaque formation and isolation of pure lines with *Poliomyelitis* virus.

J. Exp. Med., **99**: 167-182

DUDLER, R., C. SCHMIDHAUSER, R.W. PARISH, R.E.H. WETTENHALL, and T. SCHMIDT (1988):

A mycoplasma high-affinity transport system and the *in vitro* invasiveness of mouse sarcoma cells.

EMBO J., **7**: 3963-3970

EDEN, VAN W. (1990):

Heat-shock proteins in autoimmune arthritis: A critical contribution based on the adjuvant arthritis model.

APMIS **98**: 383-394

EDEN, VAN W. (1993):

Possible role of bacterial heat-shock proteins in autoimmune diseases.

Zbl. Bakt., **278**: 377-382

EDWARDT, D.G., and E.A. FREUNDT (1956):

The classification and nomenclature of the order *Mycoplasmatales*.

Science, **155**: 1964-1966

EMMRICH, F., J. THOLE, J. VAN EMBDEN, and S.H. KAUFMANN (1986):

A recombinant 64 kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin specifically stimulates human T4 clones reactive to mycobacterial antigens.

J. Exp. Med., **163**: 1024-1029

FALAH, M., and R.S. GUPTA (1996):

Cloning of Hsp70/DnaK gene region of *Mycoplasma capricolum*: phylogenetic analysis of mycoplasma based on Hsp70 sequences.

Unpublished, Sequence submitted to EMBL: 1996

FELDNER, J., U. GRÖBEL, and W. BREDT (1982):

Mycoplasma pneumoniae adhesin localized to tip structure by monoclonal antibody.

Nature, **298**: 765-767

FERRELL, R.V., M.B. HEIDARI, K.S. WISE, and M.A. McINTOSH (1989):

A *Mycoplasma* genetic element resembling prokaryotic insertion sequences.

Mol. Microbiol., **3** (7): 957-967

FIELDS, P.I., R.V. SWANSON, C.G. HAIDARIS, and F. HEFFRON (1986):

Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**: 5189-5193

FINK, K., and E. ZEUTHER (1978):

Heat shock proteins in *Tetrahymena*.

ICN-UCLA Symposium, Mol. Cell. Biol., **12**: 103-115

FRACELLA, F., und L. RENSING (1994):

Streßproteine in Biologie und Medizin.

in: Biomol im Dialog, **7**: 1-11

FREUNDT, A.A. (1958):

The *Mycoplasmataceae*.

Seite 90-117, Munksgaard, Copenhagen

FREUNDT, E.A. (1983):

Culture media for classic mycoplasmas.

in: S. Razin und J.G. Tully (ed.): Methods in mycoplasmaology, Vol. 1: mycoplasma characterization.

Academic Press, New York, London: 127-135

FRIIS, N.F. (1971):

A selectiv medium for *Mycoplasma suis pneumoniae*.

Acta vet. scand., **12**: 454-456

FRIIS, N.F. (1975):

Svinets mykoplasmer - en oversigt (Mycoplasmas of swine - a review).

Nord. Veterinaermed., **27**: 329-336

GALLEY, K.A., B. SINGH, and R.S. GUPTA (1992):

Cloning of HSP70 (*dnaK*) gene from *Clostridium perfringens* using a general polymerase chain reaction based approach.

Biochim. Biophys. Acta, **1130**: 203-208

GANTER, M. (1996):

Pneumologische Untersuchungen beim Schaf unter besonderer Berücksichtigung der bronchoalveolären Lavage.

Habilitationsschrift, Tierärztliche Hochschule Hannover

GANTER, M., und A. HENSEL (1997):

Bronchoalveolar lavage (BAL) in selected healthy pigs.

Lab. Anim. (im Druck)

GANTER, M., S. KIPPER, und A. HENSEL (1990):

Bronchoscopy and bronchoalveolar lavage of live anesthetized pigs.

in: 11th Congress of the International Pig Veterinary Society, Lausanne 1990.

Proceedings, S. 109

GANTER, M., S. KIPPER, H. SCHÖTTGER-WEGENER, G. BECKMANN, und S. BUNKA (1993):

Pneumoniediagnostik am lebenden Schwein mit Hilfe der Lungenspülung.

Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr., **106**: 330-333

GEARY, S.J., M.E. TOURTELOTTE, and J.A. CAMERON (1981):

Inflammatory toxin from *Mycoplasma bovis*.

Science, **212**: 1032-1033

GEORGOPOULOS, C., and I. HERSKOWITZ (1971):

Escherichia coli mutants blocked in lambda DNA synthesis.

in: The bacteriophage Lambda. A.D. Hershey (ed.), Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y., 553-564

GEORGOPOULOS, C., D. ANG, K. LIBEREK, and M. ZYLICZ (1991):

Properties of the *Escherichia coli* heat shock proteins and their role in bacteriophage lambda growth.

in: R. Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos (ed.): Stress proteins in biology and medicine.

Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y., 199-221

GETHING, M.-J. (1997):

Guidebook to molecular chaperones and protein folding catalysis.

Oxford University Press

GETHING, M.-J., and J. SAMBROOK (1992):

Protein folding in the cell.

Nature (London), **355**: 33-45

GILSON, E., G. ALLOING, T. SCHMIDT, J.-P. CLAVERYS, R. DUDLER, and M. HOFNUNG (1988):

Evidence for high affinity binding-protein dependent transport systems in gram-positive bacteria and in *Mycoplasma*.

EMBO J., **7**: 3971-3974

GOLDFINE, H. (1982):

Lipids of prokaryotes – structure and distribution.

Curr. Top. Membr. Transp., **17**: 1-43

GRAU, O., F. LAIGRET, P. CARLE, J.G. TULLY, D.L. ROSE, and J.M. BOVÈ (1991):

Identification of a plant derived mollicute as a strain of an avian pathogen, *Mycoplasma iowae*, and its implications for mollicute taxonomy.

Int. J. Syst. Bacteriol., **41** (4): 473-478

GUMMELT, I. (1995):

Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Differenzierung von *Mycoplasma bovis* und *Mycoplasma agalactiae*.

Dissertation, Fachber. Biologie, Univers. Hannover

GUMMELT, I., H. HOTZEL, M. RUNGE, und H. KIRCHHOFF (1996):

Taxonomic relationship between *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae*.

In: Report of the COST Action 826 Agriculture and Biotechnology „Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics“. J. Frey, K. Sarris (Eds.) European Commission, Vol. I, S. 27-29

HAKKARAINEN, K., H. TURUNEN, A. MIETTINEN, M. KARPPILIN, K. KAITILA, and E. JANSON (1992):

Mycoplasmas and arthritis.

Ann. Rheumatol. Dis., **51**: 1170-1172

HARTWIG, W. (1994):

Die Eignung der Bronchoskopie und der bronchoalveolären Lavage (BAL) für die epidemiologische Untersuchung respiratorischer Untersuchungen im Schweinebestand.

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

HAYFLICK, L. (1969):

Fundamental biology of class *Mollicutes*, order *Mycoplasmatales*.

in: Hayflick (ed.): The Mycoplasmatales and the L-phase of bacteria. Appleton-Century-Criffs Meredith Cporopration, N.Y., S. 15-47

HECKER, M., U. VÖLKER, and W. SCHUHMANN (1996):

Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*.

Mol. Microbiol., **19**: 417-428

HEINRICH, B., R.C. FELDMANN, and U. HADDING (1993):

Cytadhesins of *Mycoplasma hominis*.

Infection and Immunity, **61**: 2945-2951

HEMMINGSSEN, S.M., C. WOOLFORD, S.M. van der VIES, K. TILLY, D.T. DENNIS, C.P. GEORGOPOULOS, R.W. HENDRIX, and J. ELLIS (1988):

Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly.

Nature, **333**: 330-334

HENNIG, I., B. TEUTENBERG-RIEDEL, and G.-F. GERLACH (1999):

Downregulation of a protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigen during the course of infection. Microb. Pathogen., **26**: 53-63

HENSEL, A., M. GANTER, S. KIPPER, S. KREHON, M.M. WITTENBRINK, und K. PETZOLDT (1994):

Prevalence of aerobic bacteria in bronchoalveolar lavage fluids from healthy pigs.

Am. J. Vet. Rs., **55**: 1697-1703

HERRMANN, R. (1992):

in: J. MANIHOFF, R.N. McELHANEY, L.R. FINCH, and J.B. BASEMAN (ed.): Mycoplasmas. Molecular Biology and Pathogenesis.

American Society for Microbiology, Washington D.C., S. 157-168

HIMMELREICH, R., H. HILBERT, H. PLAGENS, E. PIRKL, B.C. LI, and R. HERRMANN (1996):

Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*.

Nucl. Acids Res., **24**: 4420-4449

-
- HOLOSHITZ, J., Y. NAPARSTEK, A. BEN-NUN, and I.R. COHEN (1983):
Lines of T lymphocytes induce or vaccinate against automimmune arthritis.
Science, **219**: 56-58
- HOMUTH, G., S. MASUDA, A. MOGK, Y. KOBAYASHI, and W. SCHUHMANN (1997):
The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic.
J. Bacteriol., **179**: 1153-1164
- HORI, H., M. SAWADA, S. OSAWA, K. MURAO, and H. ISHIKURA (1981):
The nucleotide sequence of 5S rRNA from *Mycoplasma capricolum*.
Nucleic Acid Res., **9**: 5407-5410
- HOWARD, C.J., and G. TAYLOR (1978):
Interaction of mycoplasmas and phagocytes.
Yale J. Biol. Med., **56**: 643-648
- HSUCHEN, C.-C., and D.T. DUBIN (1980):
Methylation patterns of mycoplasma transfer and ribosomal ribonucleic acid.
J. Bacteriol., **144**: 991-998
- HUNT, C., and R.I. MORIMOTO (1985):
Conserved features of eukaryotic *hsp70* genes revealed by comparison with nucleotide sequence of human *hsp70*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**: 6455-6459
- JÜTTNER, F.-M., J. SMOLLE, W. PETEK, E. MEINITZER, V. SCHALK, G.B. FRIEHS, und W.F. LIST (1989):
Permeabilität der alveolokapillären Membran bei unilateralen Lungenlavagen.
Anaesthesist, **38**: 22-28
- KAUFMANN, S.H.E. (1989):
Streßproteine: Virulenzfaktoren intrazellulärer Krankheitserreger?
Immun. Infekt., **17**: 125-128
- KAUFMANN, S.H.E. (1990):
Heat shock proteins and the immune response.
Immun. Today, **11**: 129-136

KAUFMANN, S.H.E., U. VÄTH, J.E.R. THOLE, J.D.A. VAN EMBDEN, and F. EMMRICH (1987):
Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kilodalton protein.

Eur. J. Immunol., **17**: 351-357

KELCH, H., and C. HUTTER (1989):

Technical recommendations and guidelines for bronchoalveolar lavage (BAL): report of the European Society of Pneumology Task group on BAL.

Europ. resp. J., **2**: 561-585

zit. nach U. COSTABEL (1994)

KELLEY, P., and M.J. SCHLESINGER (1978):

The effect of amino-acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts.

Cell, **15**: 1277-1286

KIPPER, S. (1990):

Bronchoskopie bei Schweinen sowie mikrobiologische und zytologische Untersuchungen der bronchoalveolären Lavageflüssigkeiten.

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

KIRCHHOFF, H. (1988):

Mykoplasmen beim Schwein.

Tagung Fachgr. Tierseuchenrecht. Aktuelles zur Verhütung und Bekämpfung übertragbarer Tierkrankheiten, Hannover, 1988: 74-87

KIRCHHOFF, H. (1992):

Motility.

in: J. MANILOFF, R.N. McELHANEY, L.R. FINCH, and J.B. BASEMAN (eds.): *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*.

American Society for Microbiology, Washington D.C., S.

KIRCHHOFF, H., J. HEITMANN, H. MIELKE, H. DUBENKOPF, and R. SCHMIDT (1983):

Studies of polyarthritis caused by *Mycoplasma arthritidis* in rats. 2. Serological investigation of rats experimentally infected with *Mycoplasma arthritidis* ISR1.

Zbl. Bakt. Hyg. Abt. 1, Orig. A, **254**: 275-280

KIRCHHOFF, H., und A. BINDER (1986):

Untersuchungen zur Verbreitung von *Mycoplasma bovis* und anderen Mykoplasmen-Spezies bei Rindern des norddeutschen Raumes.

Med. Vet., B **33**: 68-72

KIRCHHOFF, H., und M. RUNGE (1998):

100 Jahre Mykoplasmen - Pathogenität für Nutz- und Haustiere.

Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr., **111** (10): 387-392

KIRCHHOFF, H., W. HEITMANN, M. KRÜGER, und A. BINDER (1989):

Zur besonderen Stellung der Mykoplasmen als arthritogene Erreger.

in: H. Deicher (ed.): Pathomechanismen entzündlicher rheumatischer Erkrankungen bei Mensch und Tier.

DFG Sonderforschungsbereiche, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft

KIRCHHOFF, H., A. BINDER, M. RUNGE, B. MEIER, R. JACOBS, and K. BUSCHE (1989):

Pathogenic mechanisms in the *Mycoplasma arthritidis* polyarthritis of rats.

Rheumatol. Int., **9**: 193-196

KOBISCH, M., B. BLANCHARD, and M.F. LE POTIER (1993):

Mycoplasma hyopneumoniae infections in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection.

Vet. Res., **24**: 67-77

KOGA, T., A. WAND-WÜTTENBERGER, J. DE BRUYN, M.E. MUNK, B. SCHOEL, and S.H.E.

KAUFMANN (1989):

T cells against a bacterial heat-shock protein recognize stressed macrophages.

Science, **245**: 1112-1115

KOTANI, H., and G.J. McGARRITY (1985a):

Identification of mycoplasma colonies by immunobinding.

J. Clin. Microbiol., **23**: 783-785

KOTANI, H., and G.J. McGARRITY (1985b):

Rapid and simple identification of mycoplasmas by immunobinding.

J. Immunol. Methods, **85**: 257-267

LAEMMLI, U.K. (1970):

Cleavage of structural structure proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4.

Nature, **227**: 680-685

LAIGRET, F., O. GRAU, and J.M. BOVÈ (1990):

Comparison of 16S rRNA sequences of various Mollicutes.

Zbl. Suppl. **20**: 435-440

LAMB, J.R., V. BAL, P. MENDEZ-SAMPERIO, A. MEHLERT, A. SO, J. ROTHBARD, S. JINDAL, R.A. YOUNG, and D.B. YOUNG (1989):

Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity.

Int. Immunol., **1**: 191-196

LANGER, T., and W. NEUPERT (1991):

Heat shock proteins hsp60 and hsp70: their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins.

Curr. Top. Microbiol. Immunol., **167**: 3-29

LANGER, T., C. LU, H. ECHOLS, J. FLANAGAN, M.K. HAER, and F.U. HARTL (1992):

Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperon-mediated protein folding.

Nature (London), **356**: 683-689

LEACH, R.H., H. ERNO, and K.J. MACOWAN (1993):

Proposal for designation of F38 type caprine mycoplasmas as *Mycoplasma capricolum* subsp. *capripneumoniae* subsp. *nov.* and consequent obligatory relegation of strains currently classified as *M. capricolum* (Tully, Barile, Edwards, Theodore, and Erno (1974) to an additional new subspecies, *M. capricolum* subsp. *capricolum* subsp. *nov.*

Int. J. Syst. Bacteriol., **43** (3): 603-605

LEMEAUX, P.G., S.L. HERENDEEN, P.L. BLOCH, and F.C. NEIDHARDT (1978):

Transient rates of synthesis of individual polypeptides in *E. coli* following temperature shifts.

Cell, **13**: 427-434

LI, M., and S.L. WONG (1992):

Cloning and characterization of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*.

J. Bacteriol., **174**: 3981-3992

LIBEREK, K., J. MARSZALEK, D. ANG, and C. GEORGOPOULOS (1991):

Escherichia coli DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**: 2874-2878

LIBEREK, K., D. SKOWYRA, M. ZYLICZ, C. JOHNSON, and C. GEORGOPOULOS (1991):
The *Escherichia coli* DnaK chaperone, the 70-kDa heat shock protein eukaryotic equivalent, changes conformation upon ATP hydrolysis, thus triggering its dissociation from a bound target protein.
J. Bio. Chem., **226**: 14491-14496

LINDQUIST, S. (1986):
The heat shock response.
Annu. Rev. Biochem., **55**: 1151

LINDQUIST, S.L., and E.A. CRAIG (1988)
The heat shock proteins.
Annu. Rev. Genet., **22**: 631-677

LO, S.-C., M.M. HAYES, J.G. TULLY, R.-Y.-H. WANG, H. KOTANI, D.L. ROSE, and J.W.K. SHIH (1992):
Int. J. Syst. Bacteriol., **42**: 357-364

MANILOFF, J., L. MAGRUM, L.B. ZABLEN, and C.R. WOESE (1978):
Phylogenetic relationships of mycoplasmas as determined by 16S ribosomal RNA characterization.
Zentralbl. Bakteri. Infektionskr. Parasitenkd. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A, **241**: 171-172

MANILOFF, J. (1992):
Phylogeny of mycoplasmas.
in: J. MANILOFF, R.N. McELHANEY, L.R. FINCH, and J.B. BASEMAN (eds.): Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis.
American Society for Microbiology, Washington D.C., S.

MANOLUKAS, J., M.F. BARILE, D.K.F. CHANDLER, and J.D. POLLACK (1988):
Presence of anaplerotic reactions and transamination, and the absence of the tricarboxylic acid cycle in *Mollicutes*.
Gen. Microbiol., **134**: 791-800

MATTSSON, J.G., H. GERSDORF, U.B. GOBEL, and K.E. JOHANSSON (1991):
Detection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA.
Mol. Cell Probes, **5** (1): 27-35

McALISTER, L., and D.B. FINKEL (1980):
Heat shock proteins and thermal resistance in yeast.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **93**: 819-824

McMULLIN, T.W., and R. L. HALLBERG (1988):

A highly evolutionary conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *Escherichia coli* groEL gene.

Mol. Cell. Biol., **8**: 371-380

MEDURI, G.O., and V. BASELSKI (1991):

The role of bronchoalveolar lavage in diagnosing nonopportunistic bacterial pneumonia.

Chest, **100**: 179-190

MILES, R.J. (1992):

Catabolism in *Mollicutes*.

gen. Microbiol., **138**: 1773-1783

MILES, R.J., B.J. WADHER, C.L. HENDERSON, and K. MOHAN (1988):

Increased growth yields of *Mycoplasma* spp. in the presence of pyruvate.

Letters in Applied Microbiology, **7**: 149-151

MISSIAKAS, D., and S. RAINA (1997):

Protein misfolding in the cell envelope of *Escherichia coli*: New signaling pathways.

Trends in Biochemical Science, **22**: 59-63

MODEL, P., G. JOVANOVIC, and J. DWORKIN (1997):

The *Escherichia coli* phage-shock-protein (*psp*) operon.

Mol. Microbiol., **24**: 255-261

MOGK, A., G. HOMUTH, C. SCHOLZ, L. KIM, F.X. SCHMID, and W. SCHUHMANN (1997):

The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*.

EMBO J., im Druck

MORIMOTO, R.I. (1993):

Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes.

Science, **259**: 1409-1413

MORIMOTO, R.I., A. TISSIERES, and C. GEORGOPOULOS (1994):

The biology of heat shock proteins and molecular chaperones.

Cold Spring Harbor Laboratory Press

-
- MOROWITZ, H.J., and D.C. WALLACE (1973):
Genome size and life cycle of the mycoplasma.
Ann. N.Y. Acad. Sci., **225**: 62-73
- MUNRO, S., H.R. PELHAM (1986):
An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein.
Cell, **46** (2): 291-300
- MURRAY, P.J., and R.A. YOUNG (1992):
Stress and immunological recognition in host-pathogen interactions.
J. Bacteriol., **174** (13): 4193-4196
- MUTO, A. (1987):
The genome structure of *Mycoplasma capricolum*.
Isr. J. med. Sci., **23**: 334-341
- NABERHAUS, F., and H. BAHL (1992):
Cloning, sequencing and molecular analysis of the *groESL* operon of *Clostridium acetobutylicum*.
J. Bacteriol., **174**: 3282-3289
- NAMBA, S., H. OYAIZU, S. KATO, S. IWANAMI, and T. TSUCHIZAKI (1993):
Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasmalike organisms.
Int. J. Syst. Bacteriol., **43** (3):461-467
- NEIDHARDT, F.C., R.A. VAN BOGELEN, and V. VAUGHN (1984):
The genetics and regulation of heat-shock proteins.
Ann. Rev. Genet., **18**: 295-329
- NEIMARK, H. (1973):
Implications of the phylogenetic relationship between acholeplasmas and lactic acid bacteria.
Colloq. INSERM, **33**: 71-78
- NEIMARK, H. (1979):
Phylogenetic relationships between mycoplasmas and other prokaryotes.
In M.F. BARILE and S. RAZIN (ed.): The mycoplasmas. Vol. 1: 43-61, Academic Press, Inc., New York

NEIMARK, H.C., and C.S. LANGE (1990):

Pulse-field electrophoresis indicates full length mycoplasma chromosomes range widely in size.

Nucleic Acid Res., **18** (18): 5443-5448

NEUMANN, R., W. LEONARDT, A. BALLIN, G. MEHLHORN, und S. DIEKE (1985):

Die Methode der intravitalen Lungenspülung beim Schein - Gewinnung und Differenzierung von Alveolarzellen.

Arch. Exp. Veterinärmed., **39**: 525-534

NIEWINT, J. (1998):

Identifizierung und Charakterisierung von Hitzeschock-Protein-kodierenden Genen bei Mykoplasmen.

Diplomarbeit, Fachb. Biologie, Universität Hannover

OSAWA, S., A. MUTO, T. OHAMA, Y. ANDACHI, R. TANAKA, and F. YAMAO (1990):

Procaryotic genetic code.

Experientia, **46**: 1097-1106

PELHAM, H.R.B. (1986):

Speculation on the function of the heat shock and glucose-regulated proteins.

Cell, **46**: 959-69

PELHAM, H. (1988):

Heat shock proteins. Coming in from the cold.

Nature, **332**: 776-777

PETTERSON, B., K.E. JOHANSSON, and M. UHLEN (1994):

Sequence analysis of 16S rRNA from mycoplasmas by direct solid phase DNA sequencing.

Appl. Environ. Microbiol., **60** (7): 2456-2461

PFÜTZNER, H. (1984):

Die *Mycoplasma-bovis*-Infektion des Rindes.

Monatshefte für Veterinärmedizin, **39**: 217-220

RAZIN, S. (1978):

The mycoplasmas.

Microbio. Rev., **42** (2): 414-470

RAZIN, S. (1981):

Mycoplasmas: the smallest pathogenic prokaryotes.

Isr. J. med. Sci., **17**: 510-515

RAZIN, S. (1985):

Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*).

Microbiol. Rev., **49**: 419-455

RAZIN, S. (1992a):

Peculiar properties of mycoplasmas: The smallest self-replicating prokaryotes.

FEMS Microbiol. Letter, **100**: 423-432

RAZIN, S. (1992b):

Mycoplasma taxonomy and ecology.

in: J. MANILOFF, R.N. McELHANEY, L.R. FINCH, and J.B. BASEMAN (eds.): Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis.

American Society for Microbiology, Washington D.C., S.

RAZIN, S., and E. A. FREUNDT (1984):

The mycoplasmas.

in: N.R. Krieg, J.G. Holt (ed.): Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, London: 740-793

RAZIN, S., and J.G. TULLY (1984):

Methods in Mycoplasmaology.

Academic Press, New York

RAZIN, S., D. YOGEV, and Y. NAOT (1998):

Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas.

Microbiol. Molecular Biol. Rev., **62** (4): 1094-1156

REAL, F., S. DENIZ, B. ACOSTA, O. FERRER, and J.B. POVEDA (1994):

Caprine contagious agalactia cause by *Mycoplasma agalactiae* in the Canary Islands.

Veterinary Record, **135** (1): 15-16

RITOSSA, F. (1962):

A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila.

Experientia, **18**: 571

RODEWELL, A.W. (1983):

Defined and partly defined media.

in: S. Razin und J.G. Tully (ed.): Methods in mycoplasmaology.

Acad. Press, N.Y., Vol. 1

ROGERS, M.J., J. SIMMONS, R.T. WALKER, W.G. WEISBURG, C.R. WOESE, R.S. TANNER, I.M. ROBINSON, D.A. STAHL, G. OLSEN, R.H. LEACH, and J. MANILOFF (1985):
Construction of the mycoplasma evolutionary tree from 5S rRNA sequence data.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**: 1160-1164

ROTHMAN, J. (1989):
Polypeptide chain binding proteins lysys of protein folding and related processes in
59: 591-601

RUNGE, M., M. GANTER, F. DELBECK, W. HARTWIG, A. RÜFFER, B. FRANZ, und G. AMTSBERG (1996):
Nachweis von Pneumonieerregern bei Schweinen aus Problembeständen: kulturelle und immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der bronchoalveolären Lavage (BAL) und serologische Befunde.
Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr., **109**: 101-107

RUNGE, M., S. RYKENA, K. WILDHAGEN, H. DEICHER, and H. KIRCHHOFF (1997):
Detection of *Ureaplasma urealyticum* in urine of patients with systemic lupus erythematosus and healthy individuals by culture and polymerase chain reaction.
J. Med. Microbiol., **46** (5): 413-418

RUSANGANWA, E., B. SINGH, and R.S. GUPTA (1992):
Cloning of Hsp60 (*groEL*) gene from *Clostridium perfringens* using a polymerase chain reaction based approach.
Biochem. Biophys. Acta

SABIN, A.B. (1941):
The filtrable microorganisms of the pleuropneumoniae group.
Bacteriol. Rev., **5**: 1-65 und 331-335

SAILLARD, C., P. CARLE, J.M. BOVÈ, C. BEBEAR, S.C. LO, J.W. SHIH, R.Y. WANG, L. ROSE, and T.G. TULLY (1990):
Genetic and serologic relatedness between *Mycoplasma fermentans* strains and a mycoplasma recently identified in tissues of AIDS and non AIDS patients.
Res. Virol., **141** (3): 385-395

SAITOU, N., and M. NEI (1987):
The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.
Mol. Biol. Evol., **4**: 406-425

SAMBROOK, J., E.F. FRITSCH, and R. MANIATIS (1989):

Molecular cloning: a laboratory manual.

2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, E.5 - E.7

SCHERM, B. (1996):

Untersuchungen zur Charakterisierung von Hitzeschockproteinen bei Mykoplasmen.

Diplomarbeit, Fachbereich Chemie, Universität Hannover

SCHLEGEL, H.G.

Allgemeine Mikrobiologie

7. Auflage 1992, Thieme Verlag, Stuttgart, New York

SCHMEKEL, B., Y. HÖRNBLAD, M. HVATUM, A.-L. NORLUND, and P. VENGE (1995):

Kinetic retrieval of eosinophil cationic protein, hyaluronan, secretory IgA, albumin, and urea during BAL in healthy subjects.

Chest, **108**: 62-67

SCHRIDDE, A. (1995):

Vergleich mykoplasmaer, bakterieller und eukaryotischer Hitzeschockproteine mit biochemischen und molekularbiologischen Methoden.

Diplomarbeit, Fachber. Biologie, Univers. Hannover

SCHUMANN, W. (1993a):

Funktion und Regulation der Hitzeschock-Proteine bei Pro- und Eukaryonten.

Biomol im Dialog, S. 3-7

SCHUMANN, W. (1997):

Ein zweiter Hauptmechanismus zur Regulation der Hitzeschock-Antwort bei Bakterien.

Biospektrum, Vol. **5/97**, 3. Jahrgang: 32-42

SEIFERT, H.S., and M. SO (1988):

Genetic mechanism of bacterial antigenic variation.

Microbiol. Rev., **52**: 327-336

SIMECKA, J.W., J.K. DAVIES, M.K. DAVIDSON, S.E. ROSS, C.T.K.-H. STADTLÄNDER, and G.H. CASSELL (1992):

Mycoplasma diseases of animals.

in: J. MANILOFF, R.N. McELHANEY, L.R. FINCH, and J.B. BASEMAN (eds.): Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis.

American Society for Microbiology, Washington D.C.: 391-415

SHINNIK, T.M. (1991):

Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens.

Curr. Top. Microbiol. Immunol., **167**: 145-159

SHINNIK, T.M., M.H. VODKIN, and J.L. WILLIAMS (1988):

The *Mycobacterium tuberculosis* 65-kDa antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the *E. coli* GroEL protein.

Infect. Immun., **56**: 446-451

SOENDERGARD-ANDERSEN, J., J.S. JENSEN, S.A. ULDUM, and K. LIND (1990):

Heat-shock protein in *Mycoplasma pneumoniae* shown bei immunoblotting to be related to the bacterial common antigen.

J. Infect. Dis., **161**: 1039-1040

SORGER, P.K. (1991):

Heat shock factor and the heat shock response.

Cell, **63**: 363-366

SOUTHERN, E.M. (1975):

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.

Mol. Biol. **98**: 503

STIPKOVITS, L. (1990):

What about *M. (Mycoplasma) hyopneumoniae*.

Pigs, **6**/Nr.3: 27-29

STEMKE, G.W., F. LAIGRET, O. GRAU, and J.M. BOVÉ (1992):

Phylogenetic relationships of three porcine mycoplasmas, *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma flocculare*, and *Mycoplasma hyorhinis*, and a complete 16S-rRNA sequence of *M. flocculare*.

Internat. J. Syst. Bacteriol., **42** (2): 220-225

STRAUS, D., W. WALTER, and C. GROSS (1990):

DnaK protein GrpE negatively regulate heat shock protein gene expression by controlling the synthesis and stability of sigma-factor.

Dev., **4**: 2202-2209

SU, C.J., S.F. DALLO, A. CHAVOYA, and J.B. BASEMAN (1993):

Possible origin of sequence divergence in the P1 cytoadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*.

Infection and Immunity, **61**, 816-822

SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY OF MYCOPLASMATALES (1970):

Minutes of the Meeting.

Int. J. Syst. Bacteriol. **21**: 151-153

SUBRAMANIAM, S., D. BERGONIER, F. POUMARAT, S. CAPAUL, Y. SCHLATTER, J. NICOLET, and J. FREY (1998):

Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR.

Mol. Cell Probes, **12** (3): 161-169

TANAKA, R., A. MUTO, and S. OSAWA (1989):

Nucleotide sequence of tryptophan tRNA gene in *Acholeplasma laidlawii*.

Nucleic Acids Res., **17**: 5842

TAYLOR, T.K., J.B. BASHIRUBBIN, and A.R. GOULD (1992):

Relationships between members of the *Mycoplasma mycoides* cluster as shown by DNA probes and sequence analysis.

Int. J. Syst. Bacteriol., **42** (4): 593-601

TEUTENBERG-RIEDEL, B. (1998):

Einfluß bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit von Schweinen auf die Antigenexpression von *Actinobacillus pleuropneumoniae in vitro*.

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover

TISSIERES, A., H.K. MITCHELL, and U.M. TRACY (1974):

Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs.

Mol. Biol., **84**: 389-398

TOTH, K.F., N. HARRISON, and B.B. SEARS (1994):

Phylogenetic relationships among members of the class *Mollicutes* deduced from *rps3* gene sequences.

Int. J. Syst. Bacteriol., **44** (1): 119-124

TOWBIN, H., T. STAEGELIN, and J. GORDON (1979):

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **76**: 4350-4354

TRYON, V.V., and J.B. BASEMAN (1992):

Pathogenic determinants and mechanisms.

in: J. MANILOFF, R.N. McELHANEY, L.R. FINCH, and J.B. BASEMAN (eds.): *Mycoplasmas: Molecular Biology and Pathogenesis*.

American Society for Microbiology, Washington D.C.: 457-471

TULLY, J.G., J.B. BOVÉ, F. LAIGRET, and R.F. WITHCOMB (1993):

Revised Taxonomy of the Class *Mollicutes*: Proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated mollicutes to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*), and emended descriptions of the order *Mycoplasmatales*, family *Mycoplasmataceae*.

Int. J. Syst. Bacteriol. **43** (2): 378-385

URBAN, S., K. REISSHAUER, und H. KIRCHHOFF (1989):

Kulturelle und serologische Untersuchungen zum Nachweis von *Mycoplasma bovis* in Rinderbeständen und Mastitiden ungeklärter Genese.

Tierärztl. Umschau, **44**: 776-782

VELLUTI, G., O. CAPELLI, M. LUSUARDI, A. BRAGHIROLI, M. PELLEGRINO, G. MILANTI, and L. BENEDETTI (1983):

Bronchoalveolar lavage in normal lung. First of three parts: protein, enzymatic and ionic features.

Respiration, **44**: 403-410

VENNER, T.J., B. SINGH, and R.S. GUPTA (1990):

Nucleotide sequences and novel structural features of human and chinese hamster *hsp60* (chaperonin) gene families.

DNA Cell Biol., **9**: 545-552

VINCZE, S., G. KLEIN, and H. ALTMANN (1975):

Desoxyribonuclease activity in the serum and spleens of rats with mycoplasma induced arthritis.

Rheumatol., **34**: 49-54

VONSKI, M.S., G.V. ASTAVATZATURIANTZ, E. JACOBS, and S.N. BORCHENIUS (1992):

Western blot analysis of heat shock proteins in mycoplasmas.

IOM-Letters **2**: 331

WACHOWSKI, CH., and H. KIRCHHOFF (1986):

Untersuchung der Empfindlichkeit von *Mycoplasma-bovis*-Feldstämmen gegenüber verschiedenen Antibiotika und Chemotherapeutika.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **99**: 41-44

WALLACE, D.C., and H.J. MOROWITZ (1973):

Genome size and evolution.

Chromosoma, **40**: 121-126

WASHBURN, L.R., B.C. COLE, and J.R. WARD (1980):

Chronic arthritis of rabbits induced by mycoplasmas. II. Antibody response and the deposition of immune complexes.

Arthritis Rheum., **23** (7): 837-845

WEDDE, A. (1999):

Der Einfluß von Hitzeschockproteinen auf die *Mycoplasma arthritidis*-Infektion der Ratte.

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover, im Druck

WEISBURG, W.G., J. G. TULLY, D.L. ROSE, J. P. PETZEL, H. OYAIZU, D. YANG, L. MANDELCO, J. SECHREST, T.G. LAWRENCE, J. VAN ETEN, J. MANILOFF, and C.R. WOESE (1989):

A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: Basis for their classification.

Bacteriol., **171**: 6455-6467

WELCH, W. (1993):

Stress-Proteine.

Spektrum d. Wissenschaft Juli 1993, S. 40-47

WETZSTEIN, M., U. VÖLKER, J. DEDIO, S. LÖBAU, U. ZUBER, M. SCHIESSWOHL, C. HERGET, M. HECKER, and W. SCHUHMANN (1992):

Cloning, sequencing and the molecular analysis of the *dnaK* locus from *Bacillus subtilis*.

J. Bacteriol., **174**: 3300-3310

WHITTLESTONE, P. (1985):

Mycoplasma infections of swine.

in: J. Gylstorff (ed.): Infektionen durch *Mycoplasmatales*, Jena: Gustav Fischer

WISE, K.S., D. YOGEV, and R. ROSENGARTEN (1992):

in: J. MANILOFF, R.N. McELHANEY, L.R. FINCH, and J.B. BASEMAN (ed.): Mycoplasmas. Molecular Biology and Pathogenesis.

American Society for Microbiology, Washington D.C.: 473-489

WOESE, C.R., J. MANILOFF, and L.B. ZABLEN (1980):

Phylogenetic analysis of the mycoplasmas.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**: 494-498

WOESE, C.R. (1987):

Bacterial evolution.

Microbiological Reviews, **51** (2): 221-271

YOGEV, D., S. SELA, H. BERCOVIER, and S. RAZIN (1990):

Nucleotide sequence and codon usage of the elongation factor Tu (EF-Tu) gene from *Mycoplasma pneumoniae*.

Mol. Microbiol., **4**: 1303-1310

YOGEV, D., R. ROSENGARTEN, and K.S. WISE (1993):

Variation and genetic control of surface antigen expression in mycoplasmas: The Vlp system of *Mycoplasma hyorhinitis*.

Zbl. Bakt., **278**: 275-286

YOUNG, D.B., R. LATHIGRA, R. HENDRIX, D. SWEETSER, and R.A. YOUNG (1988a):

Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**: 4267-4270

YOUNG, D.B., R. LATHIGRA, and A. MEHLERT (1988b):

Stress-induced proteins as antigens in infectious diseases.

UCLA Symposium on Molecular & Cellular Biology, Vol. 96: Stress-induced proteins, J.R. Seramisco, S.L. Lindquist, M.L. Pardue (ed.), N.Y.: Liss, p. 294

YOUNG, R.A., and T.J. ELLIOTT (1989):

Stress proteins, infection, and immune surveillance.

Cell, **59**: 5-8

YUAN, G., and S. WONG (1995):

Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* regulatory mutants: evidence for *orf39* in the *dnaK* operon as a repressor gene in regulating the expression of both *groE* and *dnaK*.

J. Bacteriol., **177**: 6462-6468

YURA, T., N. NAGAI, and H. MORI (1993):

Regulation of the heat-shock response in bacteria.

Ann. Rev. Microbiol., **47**: 321-350

8 Anhang

- A. Homologievergleich ausgewählter *hsp60*-Gene bzw. -Genabschnitte
- B. Homologievergleich ausgewählter *hsp70*-Gene bzw. -Genabschnitte
- C. Immunogene Bereiche ausgewählter Hsp60-Proteine mit dem Programm „antigenic“
- D. Immunogene Bereiche ausgewählter Hsp70-Proteine mit dem Programm „anitgenic“
- E. Zelluläre Bestandteile der Bronchoalveolären Lavage vom Schwein
- F. Nichtzelluläre Bestandteile der Bronchoalveolären Lavage des gesunden Menschen

A. Homologievergleich ausgewählter *hsp60*-Gene bzw. -Genabschnitte

1 - - - - - 50
 2 - - - - -
 3 - - - - -
 4 - - - - -
 5 - - - A T G G C A A A G G A A T T A G T A T T T G G C A A G A A T G C C C G C A A T A A A C T G C T
 6 - - - A T G G C T A A A A C A T T A T A T T T C G G T G A A G A A G C A A G A A G A T C T A T G C A
 7 - - - A T G G C T A A A A G A A A T T A A A G T T T A G T G A A G A A G C T C G C C G C G C A A T G C T
 8 - - - A T G G C A G C T A A A A G A C G T A A A A T T C G G T A A C G A C G C T C G T G T G A A A A T G C T
 9 A T G G C A G C T A A A A G A C G T A A A A T T C G G T A A C G A C G C T C G T G T G A A A A T G C T

1 - - - - - 100
 2 - - - - -
 3 - - - - -
 4 - - - - -
 5 A G C T G G T A T T A A A A T T A G C A G A C G C T G T T A A G G T A A C C G T T G G T C C T A
 6 G C A G G G T A T T A A A T A A G A T A G C A A A T G C C T G T T A A A G T A A C A G T A G G T C C T A
 7 A G C G G T G T A G A T A A A T T A G C T A A C A C T G T T A A G G T T A C A T T A G G A C C C A A
 8 T C G C G G T G T C G A T G C A C T T T G C T G A T G C T G T T A A A G T A A C T T T A G G A C C C A A
 9 G C G C G G T A A A C G T A C T G G C A G A T G C A G T G A A A G T T A C C T C G G T C C A A

1 - - - - - 150
 2 - - - - -
 3 A A G G T C A A A A C G T G A T T T T A G G T C G G A A A G T T T T C C A A T C C T T T A A T T A C T
 4 - - - - -
 5 A A G G T C A A A A C G T G A T T T T A G G T C G G A A A G T T T T C C A A T C C T T T A A T T A C T
 6 A A G G C C A A A A T G T T A T T T A G A G A G A A A A T T T G C A A A C C C A T T A A T T A C T
 7 A A G G A C G A A A T G T T A T T T A G A T A A A A A A T T T G G A T C A C C A T T A A T A C A C
 8 A A G G A C G A A A C G T G G T T C T A G A G A A A A A A T T C G G T T C T C C A T T A A T C A C A
 9 A A G G C C G T A A C G T A G T T C T G G A T A A A T C T T T C G G T G C A C C G A C C A T C A C C

1 A A C G A T G G A G T G A C C A T C G C T A A G G A A A T T G A A C T A A C T G A T C C T T T A G A
 2 A A C G A T G G A G T G A C C A T C G C T A A G G A A A T T G A A C T A A C T G A T C C T T T A G A
 3 A A C G A T G G A G T G A C C A T C G C T A A G G A A A T T G A A C T A A C T G A T C C T T T A G A
 4 A A C G A T G G A G T G A C C A T C G C T A A G G A A A T T G A A C T A A C T G A T C C T T T A G A
 5 A A C G A T G G A G T G A C C A T C G C T A A G G A A A T T G A A C T A A C T G A T C C T T T A G A
 6 A A C G A T G G G G T T A C A A T C G C A A A A G A A A T A G A A C T T A G T G A T C C A G T T G A
 7 A A T G A T G G G G T T A C A A A T A G C A A G A A A T T G A A C T T G A A G A T G C T T A T G A
 8 A A T G A C G G T G T A A C A A T C G C T A A A G A A A A T C G A G C T A G A A G A C G C G T T T G A
 9 A A A G A T G G T G T T T C C G T T G C T C G T G A A A T C G A A C T G G A A G A C A A G T T C G A

1 A A A C A T T G G T G C T A A G G T T A T T T C G G T A G C T G C T G T A T C T A C C A A T G A T A
 2 A A A C A T T G G T G C T A A G G T T A T T T C G G T A G C T G C T G T A T C T A C C A A T G A T A
 3 A A A C A T T G G T G C T A A G G T T A T T T C G G T A G C T G C T G T A T C T A C C A A T G A T A
 4 A A A C A T T G G T G C T A A G G T T A T T T C G G T A G C T G C T G T A T C T A C C A A T G A T A
 5 A A A C A T T G G T G C T A A G G T T A T T T C G G T A G C T G C T G T A T C T A C C A A T G A T A
 6 A A A T A T T G G T G C T A A G G T T A T T T C A A G T T G C T G C A G T G T C A A C T A A T G A C A
 7 A A A T A T G G G A G C T C A A C T T G T A A A A G A A G T A G C T A C A A A G A C T A A T G A T G
 8 A A A C A T G G G T G C T A A G C T T G T T G C T G A A G T A G C C A G C A A A A C A A A C G A C G
 9 A A A T A T G G G T G C T A A G A T G T T G C T G A A A G A A G T T G C T C T A A A G C A A A C G A C G

1 T T G C T G G G G A C G G T A C T A C C A C T G C T A C C A T C T T G G C A C A G G A A A T G A C T
 2 T T G C T G G G G A C G G T A C T A C C A C T G C T A C C A T C T T G G C A C A G G A A A T G A C T
 3 T T G C T G G G G A C G G T A C T A C C A C T G C T A C C A T C T T G G C A C A G G A A A T G A C T
 4 T T G C T G G G G A C G G T A C T A C C A C T G C T A C C A T C T T G G C A C A G G A A A T G A C T
 5 T T G C T G G G G A C G G T A C T A C C A C T G C T A C C A T C T T G G C A C A G G A A A T G A C T
 6 T T G C T G G G G A T T G G T A C A A C A A C A G C T A C C A T A T T A G C A C A A G A A A T G A C A
 7 T G G C A G G A G A T T G A A C T A C T A C A G C T A C C T T A T T A G C T C A A G C A A T T A T A
 8 T T G C C G G T G A C G G T A C A A C A A C T G C A A C A G T T C T T G C G C A A G C A A T G A T C
 9 C T G C A G G C G A C G G T A C C A C A C T G C A A C C G T A C T T G G C T C A G G C T A T C A T C

1 A A C C G T G G T G T G G A A G C T G T T A A T A A T G G C G C T A A T C C A G T T A A T G T C C G
 2 A A C C G T G G T G T G G A A G C T G T T A A T A A T G G C G C T A A T C C A G T T A A T G T C C G
 3 A A C C G T G G T G T G G A A G C T G T T A A T A A T G G C G C T A A T C C A G T T A A T G T C C G
 4 A A C C G T G G T G T G G A A G C T G T T A A T A A T G G C G C T A A T C C A G T T A A T G T C C G
 5 A A C C G T G G T G T G G A A G C T G T T A A T A A T G G C G C T A A T C C A G T T A A T G T C C G
 6 A A C C G T G G T A T T G A A A A T T A T C A A A A A G G T G C T A A T C C T G T T A A C A T C C G
 7 A G C G A G G A T T A A A A A A T G T A A C A G C A G G G G C A A A T C C T A T T A T A T A C C G
 8 C G T G A A G G C C T T A A A A A C G T A A C A G C A G G C G C T A A C C T G T A G G C G T G C G
 9 A C T G A A G G T C T G A A A G C T G T T G C T G C G G G C A T G A A C C C G A T G G A C C T G A A

1 C C G T G G G A T T G A A G A T G C T A G T C A G T T A A T T - A T T A C T G A G T T A G A T A A G 400
2 C C G T G G G A T T G A A A A T G C T A G T C G G T T G G T T G A T T A C T G A G T G G G A T G A G
3 C C G T G G G A T T G A A G A T G C T A G T C A G T T A A T T - A T T A C T G A G T T A G A T A A G
4 C C G T G G G A T T G A A G A T G C T A G T C A G T T A A T T - A T T A C T G A G T T A G A T A A G
5 C C G T G G G A T T G A A G A T G C T A G T C A G T T A A T T - A T T A C T G A G T T A G A T A A G
6 C A G G G G T A T T G A A G A T G C A A G C T T A C T T A T T - A T T A A A G A A C T T G A A A A G
7 A A A T G G A A T T A A A A C T G C A G T T G A A A A G C T - G T A G A G G A A A T A C A A A A T
8 T A A A G G G A T T G G A A C A A G C T G T A G C G G T T G C G - A T C G A A A A C T T A A A A G A A
9 A C G T G G T A T T G A C A A A G C G G T T A C C G C T G C A - G T T G A A G A A C T T G A A A G C G

1 C G T T C C A A - - A A A G A T T A A T A C C A A C G A A G A A A T C G A G C A A G T T G C A G C G 450
2 C G T T C C G C T T A A G A G A T T A A T A C C G A C G A A G A A A T C G A G C A A G T T G C A G C G
3 C G T T C C A A - - A A A G A T T A A T A C C A A C G A A G A A A T C G A G C A A G T T G C A G C G
4 C G T T C C A A - - A A A G A T T A A T A C C A A C G A A G A A A T C G A G C A A G T T G C A G C G
5 C G T T C C A A - - A A A G A T T A A T A C C A A C G A A G A A A T C G A G C A A G T T G C A G C G
6 T A C T C T A A - - A A A A A T T A A T A C T A A C G A A G A G A T A G A C A A G T T G C A G C T
7 A T T T C T A A - - G C C T G T A A A T G G A A A A G A A G A C A T A G C T A G A G T T G C T G C A
8 A T T T C T A A - - G C C A A T C G A A G G C A A A G A G T C T A T C G C T C A G G T T G C T G C G
9 C T G T C C G T - - A C C A T G C T C T G A C T C T A A A G C G A T T G C T C A G G T T G G T A C C

1 A T C T C T T C C G - - G T T C C A A G G A A A T T G G G A A G C T G A T T G C T C A A G C T A T 500
2 A T C T C T T C C G - - G T T C C A A G G A A A T T G G G A A G C T G A T T G C T C A A G C T A T
3 A T C T C T T C C G - - G T T C C A A G G A A A T T G G G A A G C T G A T T G C T C A A G C T A T
4 A T C T C T T C C G - - G T T C C A A G G A A A T T G G G A A G C T G A T T G C T C A A G C T A T
5 A T C T C T T C C G - - G T T C C A A G G A A A T T G G G A A G C T G A T T G C T C A A G C T A T
6 A T C T C T T C A G - - G T T C T A A A G A A A T T G G T A A A C T G A T C G C T C A A G C A A T
7 A T T T C A G C A G - - C T G A T G A A A A A A T T G G T A A A G T T A A T T G C A G A T G C T A T
8 A T C T C T G C T G - - C T G A T G A G G A A G T C G G A A G C C T T A T C G C T G A A G C A A T
9 A T C T C C G C T A A C T C C G A C G A A A C C G T A G G T A A A C T G A T C G C T G A A G C G A T

1 G G C C T T A G T T G G T A A A A A C G G T G T C A T T A C C A C C G A T G A T G C T A A G A C G A 550
2 G G C C T T A G T T G G T A A A A A C G G T G T C A T T A C C A C C G A T G A T G C T A A G A C G A
3 G G C C T T A G T T G G T A A A A A C G G T G T C A T T A C C A C C G A T G A T G C T A A G A C G A
4 G G C C T T A G T T G G T A A A A A C G G T G T C A T T A C C A C C G A T G A T G C T A A G A C G A
5 G G C T T T A G T T G G T A A A A A T G G C G T G A T A A C A A C T G A T G A T G C A A A A C C A
6 G G A A A A G G T A G G A A A T G A A G G A G T T A T A A C T G T A G A A G A A T C T A A A T C A A
7 G G A A G C G C G T A G G A A A C G A C G G C G T T A T C A C A A T C G A A G A G T C T A A A G C T
8 G G A C A A A G T C G G T A A A A G A A G C G T T A T C A C C G T T G A A G A C G G T A C C G G T C
9 G G A C A A A G T C G G T A A A A G A A G C G T T A T C A C C G T T G A A G A C G G T A C C G G T C

1 T T A A C A C T A C C C T A G A A A C C A C T G A A G G G A T T G A G T T T A A A G G T A C T T A C 600
2 T T A A C A C T A C C C T A G A A A C C A C T G A A G G G A T T G A G T T T A A A G G T A C T T A C
3 T T A A C A C T A C C C T A G A A A C C A C T G A A G G G A T T G A G T T T A A A G G T A C T T A C
4 T T A A C A C T A C C C T A G A A A C C A C T G A A G G G A T T G A G T T T A A A G G T A C T T A C
5 T T A A C A C T A C C C T A G A A A C C A C T G A A G G G A T T G A G T T T A A A G G T A C T T A C
6 T T A A T A C A A C A T T A G A A A C C A C T G A A G G A A T T G A A T T T A A A G G A A C A T A T
7 T G G G A A C T G A G T T A G A T G T T G T T G A A G G T A T G C A A T T T G A T A G G G A T A T
8 T C A C A A C T G A G C T T G A A A G T T G A A G G T A T G C A A T T C G A C C G C G G A T A T
9 T G C A G G A C G A A C T G G A C G T G G T T G A A G G T A T G C A G T T C G A C C G T G G C T A C

1 G C T T C C C C T T A C A T G G T T A G C G A T C A A G A A A A A A T G G A A G T G G T G T T A G A 650
2 G C T T C C C C T T A C A T G G T T A G C G A T C A A G A A A A A A T G G A A G T G G T G T T A G A
3 G C T T C C C C T T A C A T G G T T A G C G A T C A A G A A A A A A T G G A A G T G G T G T T A G A
4 G C T T C C C C T T A C A T G G T T A G C G A T C A A G A A A A A A T G G A A G T G G T G T T A G A
5 G C T T C C C C T T A C A T G G T T A G C G A T C A A G A A A A A A T G G A A G T G G T G T T A G A
6 G C A T C A C C T T A T A T G T T A G T G A T C A A G A A A A A A T G G A A G T T G T T T T A G A
7 G T A T C A G C T T A T A T G G T T A C T G A T A C T G A A A A A A T G G A A G C T G T T T T A G A
8 G C G T C T C C T T A C A T G G T A A C T G A C T C T G A T A A G A T G G A A G C G G T T C T T G A
9 C T G T C T C C T T A C T T C A T C A A C A A G C C G A A A C T G G C G C A G T A G A A C T T G A

1 C C A A C C G A A G A T C T T G G T C A G T G C G A T G A A G A T T A A C A C C A T T A A G G A A A 700
2 C C A A C C G A A G A T C T T G G T C A G T G C G A T G A A G A T T A A C A C C A T T A A G G A A A
3 C C A A C C G A A G A T C T T G G T C A G T G C G A T G A A G A T T A A C A C C A T T A A G G A A A
4 C C A A C C G A A G A T C T T G G T C A G T G C G A T G A A G A T T A A C A C C A T T A A G G A A A
5 C C A A C C G A A G A T C T T G G T C A G T G C G A T G A A G A T T A A C A C C A T T A A G G A A A
6 A C A A C C T A A A A T C T T A G T A A G C T C T T T A A A A T T A A C A C A T T A A A G A A A
7 T A A T C C A T T A G T A T T A A T A A C A G A T A A A G A A A T A A G C A A T A T A C A A G A T T
8 C A A T C C T T A C A T C T T A A T C A C A G A C A A A A A A T C A C A A A C A T T C A A G A A A
9 A A G C C C G T T C A T C T G C T G G C T G A C A A G A A A A T C T C A A C A T C C G C G A A A

1 T C T T A C C G T T A C T A G A A G G T A G C A T G G A A A A C G G T A A C C C A C T G T T A A T C 750
2 T C T T A C C G T T A C T A G A A G G T A G C A T G G A A A A C G G T A A C C C A C T G T T A A T C
3 T C T T A C C G T T A C T A G A A G G T A G C A T G G A A A A C G G T A A C C C A C T G T T A A T C
4 T C T T A C C G T T A C T A G A A G G T A G C A T G G A A A A C G G T A A C C C A C T G T T A A T C
5 T C T T A C C G T T A C T A G A A G G T A G C A T G G A A A A C G G T A A C C C A C T G T T A A T C
6 T T C T T C C G C T T T T A G A A G G T A G T G T T G A A A A T G G T A A T C C A T T A T T A A T T
7 T A T T A C C A T T A C T T G A G C A A A T A G T T C A A G C A G G T A A A A A C T T T A A T A
8 T C T T C C T G T G C T T G A G C A G G T T G T T C A G C A A G G C A A A C C A T T G C T T C T G
9 T G C T G C G G T T C T G G A A G C T G T T G C C A A A G C A G G C A A A C C G C T G C T G A T C

1 G T G G C A C C T G A C T T T G C T G A A G A A G T G G T A A C T A C T T T A G C G G T G A A C A A 800
2 G T G G C A C C T G A C T T T G C T G A A G A A G T G G T T A C T A C T T T A G C G G T G A A C A A
3 G T G G C A C C T G A C T T T G C T G A A G A A G T G G T A A C T A C T T T A G C G G T G A A C A A
4 G T G G C A C C T G A C T T T G C T G A A G A A G T G G T A A C T A C T T T A G C G G T G A A C A A
5 G T G G C A C C T G A C T T T G C T G A A G A A G T G G T A A C T A C T T T A G C G G T G A A C A A
6 G T T G C A C C T G A C T T T G C A G A A G A A G T T G T T A C T A C T T T A G C A G T T A A T A A
7 A T A G C T G A T G A T A T A G A A G G C G A A G C T A T G A C A C A T T A G T T G T T A A T A A
8 A T C G C T G A G A T G T T G A A G G C G A A G C A C T T G C T A C A C T T G T T G T G A A C A A
9 A T C G C T G A A G A T G T T A G A A G G C G A A G C G C T G G C A A C T G C T G T T G T T A A C A C

1 G C T T C G C G G T A C C A T T A A T G T A G T T G C T G T T A A A T G T A A C G A A T A C G G G G 850
2 G C T T C G C G G T A C C A T T A A T G T A G T T G C T G T T A A A T G T A A C G A A T A C G G G G
3 G C T T C G C G G T A C C A T T A A T G T A G T T G C T G T T A A A T G T A A C G A A T A C G G G G
4 G C T T C G C G G T A C C A T T A A T G T A G T T G C T G T T A A A T G T A A C G A A T A C G G G G
5 G C T T C G C G G T A C C A T T A A T G T A G T T G C T G T T A A A T G T A A C G A A T A C G G G G
6 A C T C A G G G C A C C A T T A A T G T T G T T G C T G T T A A A T G T A A T A T G G T G
7 A T T A A G A G A A A C A T T A C T T G T G T A A A G C A C C T G G A T T T G G T G
8 A C T T C G C G G C A C A T T C A A C G C A G T G C T G T T A A A G C T C T G G T T C G G T G
9 C A T T C G T G G C A T C G T G A A A G T C G C T G C G G T T A A A G C A C C G G G C T T C G G C

1 A A C G C C A A A A G G C A G C T T T G G A A G A T T T A G C C A T T A G T A C T G G C A C C T T A 900
2 A A C G C C A A A A G G C A G C T T T G G A A G A T T T A G C C A T T A G T A C T G G C A C C T T A
3 A A C G C C A A A A G G C A G C T T T G G A A G A T T T A G C C A T T A G T A C T G G C A C C T T A
4 A A C G C C A A A A G G C A G C T T T G G A A G A T T T A G C C A T T A G T A C T G G C A C C T T A
5 A A C G C C A A A A G G C A G C T T T G G A A G A T T T A G C C A T T A G T A C T G G C A C C T T A
6 A A C G T C A A A A A G C A G C T T T A G A A G A T T T A G C A A T T A G T A G T G G A A C C T T A
7 A T A G A A G A A A A G A A A T G T T A C A A G A T A T A G C T A C T T T A A C A G G A G G C G T T
8 A T C G C C G T A A A G C A A T G C T T G A A G A C A T C G C T G T C C T T A C T G G C G G A G A A
9 A T C G T C G T A A A A G C T A T G C T G C A G G A T A T C G C A A C C T G A C T G G C G G T A C C

1 G C T T A C A A C A A T G A A C T A G G T G G T G G C T T T A A G G A T G T G A C T G T A A A C C A 950
2 G C T T A C A A C A A T G A A C T A G G T G G T G G C T T T A A G G A T G T G A C T G T A A A C C A
3 G C T T A C A A C A A T G A A C T A G G T G G T G G C T T T A A G G A T G T G A C T G T A A A C C A
4 G C T T A C A A C A A T G A A C T A G G T G G T G G C T T T A A G G A T G T G A C T G T A A A C C A
5 G C T T A C A A C A A T G A A C T A G G T G G T G G C T T T A A G G A T G T G A C T G T A A A C C A
6 G C A T A T A A C C G A A A T T A A T A G T G G T T T T A A A G A T G T T A C T G T T G A T A A
7 G T T A T A T C T G A T G A A G T A G G C G G A G A C T T A A A A G A A G C T A C A T T A G A T A T
8 G T C A T C A G A A G A T C T T G G C C T T G A A C T T G A A A T C T A C T C A A A T C G C T C A
9 G T G A T C T C T G A A G A G A T C G G T A T G G A G C T G G A A A A G C A A C C C T G G A A G A

1 C T T A G G G A A G C T C G C C G T G T G C A A G T A G C C A A A G A A A A A C C A C G G T T A 1000
2 C T T A G G G A A G C T C G C C G T G T G C A A G T A G C C A A A G A A A A A C C A C G G T T A
3 C T T A G G G A A G C T C G C C G T G T G C A A G T A G C C A A A G A A A A A C C A C G G T T A
4 C T T A G G G A A G C T C G C C G T G T G C A A G T A G C C A A A G A A A A A C C A C G G T T A
5 C T T A G G G A A G C T C G C C G T G T G C A A G T A G C C A A A G A A A A A C C A C G G T T A
6 T T T A G G T G A T G C T A G A A A G G T T C A A A T A G C T A A A G G A A A A C T A C T G T T A
7 G C T T G G A A G A A G C T G A A A G T G T T A A G G T A A C T A A A G A A A G T A C T A C A A T A G
8 A T T G G G A C G C T T C T A A A G T T G T C G T T A C T A A A G A A A C A C A C A A T C G
9 C C T G G G T C A G G C T A A A C G T G T T G T G A T C A A C A A A G A C A C A C C A T A T C A

1 T T G G T G G T A A G G G T T C T A A G G A A A C G A T C C A A A A A C A C C T T G A C C T T C T A 1050
2 T T G G T G G T A A G G G T T C T T A G G A A A C G A T C C A A A A A C A C C T T G A C C T T C T A
3 T T G G T G G T A A G G G T T C T A A G G A A A C G A T C C A A A A A C A C C T T G A C C T T C T A
4 T T G G T G G T A A G G G T T C T T A G G G A A A C G A C C C A A A A A C A C C T T G A C C T T C T A
5 T T G G T G G T A A G G G T T C T A A G G A A A C G A T C C A A A A A C A C C T T G A C C T T C T A
6 T T G G T G G T A A A G G C A A T A A G A T A A A A T C A A A A A G C A T G T T G A A C T T C T A
7 T T A A T G G A A G A G A A A C T C A G A A G A G A T T A A A A A T A G A A T T A A C C A A A T C
8 T T G A A G G C G C T G G C A A A A C A A G A C A A A A T T C T G C C C G T G T T G A C T C A A A T C
9 T C G A T G G C G T G G G T G A A G A A G C T G C A A T C C A G G G C C G T G T T G C T C A G A T C

1 A A T G G T C G T T T A A A G C A A A C T A C C G A A A A G T A C G A T A C C G A T C T G T T A A A 1100
2 A A T G G T C G T T T A A A G C A A A C T A C C G A A A A G T A C G A T A C C G A T C T G T T A A A
3 A A T G G T C G T T T A A A G C A A A C T A C C G A A A A G T A C G A T A C C G A T C T G T T A A A
4 A A T G G T C G T T T A A A G C A A A C T A C C G A A A A G T A C G A T A C C G A T C T G T T A A A
5 A A T G G T C G T T T A A A G C A A A C T A C C G A A A A G T A C G A T A C C G A T C T G T T A A A
6 A A C G G G A A G A T T A A A A C A A A C C A C T G A C A A G T A T G A T T C T G A T T T A A T T A A
7 A A A T T A C A A A T T A G A A G C T A C T A C T T C T G A A A T T T G A C A A A G A A A A A T T A C A
8 C G C G C T C A A G T T G G A A G A A A C A A C T T C T G A A A T T C G A C A A G A A A A A T T A C A
9 C G T C A G C A G A G A T T G A A G A A G C A A C T T C T G A C T A C G A C C G T G A A A A A C T G C A

1 G G A A C G G A T T G C C C A C C T C A G T C A A G G G G T A G C T G T A G T A C G G G T T G G T G 1150
2 G G A A C G G A T T G C C C A C C T C A G T C A A G G G G T A G C T G T A G T A C G G G T T G G T G
3 G G A A C G G A T T G C C C A C C T C A G T C A A G G G G T A G C T G T A G T A C G G G T T G G T G
4 G G A A C G G A T T G C C C A C C T C A G T C A A G G G G T A G C T G T A G T A C G G G T T G G T G
5 G G A A C G G A T T G C C C A C C T C A G T C A A G G G G T A G C T G T A G T A C G G G T T G G T G
6 A G A A A G A A T T G C T T A A T T A A G T C A A G G T G T T G C T G T A T C G T G T G G T G
7 A G A A A G A T T A G C T A A A A T T A G C A A G G T G G G T T G C A G T G T T A A G G T G G A G
8 A G A G C G T C T T G C T A A A C T T G C T G G C G G C G T A G C T G T C A T C A A A G T C G G C G
9 G G A A C G C G T A G C G A A A C T G G C A G G C G G C G T T G C A G T T A T C A A A G T G G T G

1 G T G C T A C G G A A C T A G C A C A A A A A G A G T T A A A A C T C C G C A T T G A A G A T G C C 1200
2 G T G C T A C G G A A C T A G C A C A A A A A G A G T T A A A A C T C C G C A T T G A A G A T G C C
3 G T G C T A C G G A A C T A G C A C A A A A A G A G T T A A A A C T C C G C A T T G A A G A T G C C
4 G T G C T A C G G A A C T A G C A C A A A A A G A G T T A A A A C T C C G C A T T G A A G A T G C C
5 G T G C T A C G G A A C T A G C A C A A A A A G A G T T A A A A C T C C G C A T T G A A G A T G C C
6 G T G C A A C T G A A C T C G C A C A A A A A G A A T T A A A A C T C A G A A T C G A A G A C G C T
7 C T G C C A C T G A A A C A G A G C T T A A G G A A A G T A A G T T A A G A A T A G A G G A T G C T
8 C T G C G A C T G A A A C T G A G C T G A A A G A G C G T A A A C T T C G C A T C G A A G A C G C C
9 C T G C T A C C G A A G T T G A A A T G A A A G A G A A A A A G C A C G C A T T G A A G A T G C C

1 T T A A A C T C G A C T A A G G C A G C T G T T G A A G A A G G G A T T A T T T C C G G G G G T G G 1250
2 T T A A A C T C G A C T A A G G C A G C T G T T G A A G A A G G G A T T A T T T C C G G G G G T G G
3 T T A A A C T C G A C T A A G G C A G C T G T T G A A G A A G G G A T T A T T T C C G G G G G T G G
4 T T A A A C T C G A C T A A G G C A G C T G T T G A A G A A G G G A T T A T T T C C G G G G G T G G
5 T T A A A C T C G A C T A A G G C A G C T G T T G A A G A A G G G A T T A T T T C C G G G G G T G G
6 T T A A A T T C C A C C A A A G C T G C A G T T G A A G A A G G G A T T A T T C G C T G G A G G T G G
7 T T A G C A G C T T A C A A A G G C A G C T G T T G A A G A A G G G A T T A G T T C C A G G T G G T G G
8 T T G A A C T C A A C T C G C G C A G C T G T T G A A G A A G G C A T C G T A T C C C G G T G G T G G
9 C T G C A C G C G A C C C G T G C T G C G G T A G A A G A A G G C G T G G T T G C T G G T G G T G G

1 T A T T G C T T T A C T T A A C G T A T C C A C T A T C C T C A A T G A C A G T A A G T T G G C T G 1300
2 T A T T G C T T T A C T T A A C G T A T C C A C T A T C C T C A A T G A C A G T A A G T T G G C T G
3 T A T T G C T T T A C T T A A C G T A T C C A C T A T C C T C A A T G A C A G T A A G T T G G C T G
4 T A T T G C T T T A C T T A A C G T A T C C A C T A T C C T C A A T G A C A G T A A G T T G G C T G
5 T G T T G G T T A T T A A A T G C T T C T T G T G T T T T A A C T A A C A G T A A A C T A A A A G
6 A A C A G C T T A C G T A A A T G T A A T A A A T - - - - G - - - A A - - - - - - - - - - -
7 T A C A G C G C T T G T A A A C G T A T A T A A C - - - - - A - - - - - - - - - - -
8 T G T T G C G C T G A T C C G C G T A G C G T C T - - - - - A - - - - - - - - - - -

1 A C A A G T A C A A G G C A G A A A C T A G T G C G G A A A A C C T C A A G G A A A T C C T G G T T 1350
2 A C A A G T A C A A G G C A G A A A C T A G T G C G G A A A A C C T C A A G G A A A T C C T G G T T
3 A C A A G T A C A A G G C A G A A A C T A G T G C G G A A A A C C T C A A G G A A A T C C T G G T T
4 A C A A G T A C A A G G C A G A A A C T A G T G C G G A A A A C C T C A A G G A A A T C C T G G T T
5 A A C G A T A T G A A A A T G A A A C T A G T G T T G A A A A C A T T A A A G A A A T C C T A C T T
6 - - - - - G T G G C A A A A T T A A C T T C T G A T A T T C A A G A T G A A C A A - - - - G T T
7 - - - - - G T C G C T G C A G T T G A A G C T G A A G G C G A T G C T C A A A - - - - - C A
8 - - - - - C T G G C T G A C C T G C G T G T G T C A G A A C G A A G A C C A G A A C - - - - G T G

1 G G T T A T G A A A T T G T G C G T A A G T C A C T A G A A G C A C C A G T G C G C C A A A T T A T 1400
2 G G T T A T G A A A T T G T G C G T A A G T C A C T A G A A G C A C C A G T G C G C C A A A T T A T
3 G G T T A T G A A A T T G T G C G T A A G T C A C T A G A A G C A C C A G T G C G C C A A A T T A T
4 G G T T A T G A A A T T G T G C G T A A G T C A C T A G A A G C A C C A G T G C G C C A A A T T A T
5 G G T T T T G A A A T T G T G C A A A A G T C T C T A G A A G C A C C A G C G G C G T C A A A T T A T
6 G G T A T A A T A T A A T T G T A A G A G C T T T A G A A G A A C C T A T G A G A C A A A T A G C
7 G G T A T C A A C A T C G T G C T T C G A C G C G C T T G A A G A G C C A A T C C G A T C A A A T C G C
8 G G T A T C A A A G T T G C A C T G C G T G C A A T G G A A G C T C C G C T G C G T C A G A T C G T

```

1  T G A A A A C T C C G G G G T T A A C C C A G T T A A A G T A T T T G C A G A A C T A C G C A G T G 1450
2  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
3  T G A A A A C T C C G G G G T T A A C C C A G T T A A A G T A T T T G C A G A A C T A C G C A G T G
4  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
5  T G A A A A C T C C G G G G T T A A C C C A G T T A A A G T A T T T G C A G A A C T A C G C A G T G
6  T C A A A A C T C A G G A G T T G A C C C A G T T A A A A T T C T C A G T G A A A A A T G
7  T C A T A A C G C A G G A T T A G A A G G T T C A G T A T A A T A G A A A A A G T T A A A A A T A
8  A C A C A A C G C T G G C C T T G A A G G A T C T G T C A T C G T T G A G C G C C T C A A A A A C G
9  A T T G A A C T G C G G C G A A G A A C C G T C T G T T G T T G C T A A C A C C G T T A A A G G C G

1  A A G C T G A T G G T G T T G G T T T T G A T G C T G A A A C C A A A A G A A G G T C G A C A T G 1500
2  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
3  A A G C T G A T G G T G T T G G T T T T G A T G C T G A A A C C A A A A A G A A G G T C G A C A T G
4  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
5  A A G C T G A T G G T G T T G G T T T T G A T G C T G A A A C C A A A A A G A A G G T C G A C A T G
6  A A A A A A C T G G T G T T G G C T T T G A T G C T G A G A C T A A A A A G A A G G T T G A T A T G
7  G T G A A T G C A G G T G T A G G A T T T G A T G C T T T A A G A G G A G A A T A T A A A G A T A T G
8  A A G A A A T C G G C G T A G G C T T C A A C G C T G C A A C T G G C G A A T G G G T A A A C A T G
9  G C G A C G G C A A C T A C G G T T A C A A C G C A G C A A C C G A A G A A T A C G G C A A C A T G

1  A T C C G C A G C G G T A T T A T T G A C C C T A C T A A G G T A A C C A A A A C T G C A C T C G A 1550
2  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
3  A T C C G C A G C G G T A T T A T T G A C C C T A C T A A G G T A A C C A A A A A C T G C A C T C G -
4  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
5  A T C C G C A G C G G T A T T A T T G A C C C T A C T A A G G T A A C C A A A A A C T G C A C T C G A
6  A T T G C A A A T G G A A T C A T T G A T C C C A A C C A A A G T A A C T A A A A A C T G C A C T T G A
7  A T T A A A G C A G G A A T A G T T G A T C C A A C T A A A G G T T A C A A G A T C A G C T C T T C A
8  A T C G A A A A A G G T A T C G T T G A C C C A A C A A A A G T T A C A C G C T C A G C T C T T C A
9  A T C G A C A T G G G T A T C C T G G A T C C A A C C A A A G T A A C T C G T T C T G C T C T G C A

1  A A A A G C T G C A T C A G T A G G T T A A G G A A T T G T T - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 1600
2  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
3  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
4  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
5  A A A A G C T G C A T C A G T A G C A A G T T C C T T A A T T A C C A C C A G C G T T G C T G T G T
6  A A A A G C T G C T T C T G T A G C T A G T T C A T T A A T T A C T A C T A A A T G T T G C T G T G T
7  A A A T G C A G C A T C A G T A G C A T C A A C A T T C C T T A A C A A C A G A G G C T G C T G T A G
8  A A A C G C T G C G T C T G T A G C T G C A A T G T T C C T T A A C A A C A G A A G C T G T T G T C G
9  G T A C G C A G C T T C T G T G C T G G C C T G A T G A T C A C C A C C G A A T G C A T G G T T A

1  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 1650
2  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
3  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
4  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
5  A T G A T A T T A A G G A A A A C A A G G A A G G T A G C T T C C A A G A A T A G - - - - - - - - - - -
6  A T G A T G T T A A A G A G A G A A A A G A T A A C T C C T T T T C A G A A T A A - - - - - - - - - - -
7  C A G A T A T T C C A G A A A A A A A A T G C C T C A - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
8  C T G A C A A G C C A G A A G A A A A C G G T G G C G G C G C A G G A A T G C C T G A - - - - - - - - -
9  C C G A C C T G C C G A A A A A C G A T G C A G C T G A C T T A G G C G C T G C T G G C G G T A T G

1  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 1683
2  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
3  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
4  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
5  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
6  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
7  G A C G G A A T G T A T T A A - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
8  G G C G G C A T G G G C G G T A T G G G T G G A A T G A T G T A A
9  G G C G G C A T G G G T G G C A T G G G C G G C A T G A T G T A A

```

DNA-Sequenzhomologievergleich des *hsp60*-Genabschnittes der untersuchten Mykoplasmenpezies mit *hsp60*-Gensequenzen anderer Mykoplasmen- und Bakterienpezies

- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| 1: <i>M. arthritis</i> | 6: <i>M. genitalium</i> |
| 2: <i>M. bovis</i> | 7: <i>C. perfringens</i> |
| 3: <i>M. agalactiae</i> | 8: <i>B. subtilis</i> |
| 4: <i>M. hyopneumoniae</i> | 9: <i>E. coli</i> |
| 5: <i>M. pneumoniae</i> | |

1 - - - - - 400
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 A G A G G T T T C A G C G C A A A A T T C T T G A G C T T A C C T T A A G G A C T A T G C G G A A A A G A
6 A C A A A T T T T C A G C G T G A A A A T T C C T T T A G A G T T A T A T T G A A A A A T T A T G C T G A A A A A
7 A C A A A T T T T C A G C G T G A A A A T T C C T T T A G A G T T A T A T T G A A A A A T T A T G C T G A A A G C T A
8 A G A A A T T T T C A G C G T A A T G A T T A C C T T T C A A A A A C A A C T T A A A A A G C A G A T G C C A G A A G C T T
9 A G A A A T T T T C A G C G T A A T G A T T A C C T T T C A A A A A C A A C T T A A A A A T C A T A C G C T G A A A G C T T
10 G C A G A T T T C T G C T G A A A G T G C T T G A A A A A A A A A T T G A A G A A A A C C G C T G A A G A T T

1 - - - - - 450
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 A G A T T G G T A A A A C G A T T T C C C G T G C T G T T A T T A C C G T A C C T G C T T A C T T T T
6 A G A T T G G T A A A A A A G A T T T C A A G A G C A G T T A T T A C T G T T C C T G C A T A C T T T T
7 A A T T A G G A C A A A A A A G T T A A C A A A A G C T G T T A T T A C A G T T C C A G C T T A C T T T C
8 A C T T A G G A C A A A A A A G T T A A C A G A A A G C A G T T A T C A C A G T T C C T G C A T A C T T T T
9 A T C T T G G C G A A A C A G T T A T C A A A A G C A G T T A T C A C A G T T C C T G C A T A C T T T T
10 A C C T G G T G A A A C C G G T A A C T G A A G C T G T T A T C A C C G T A C C G G C A T A C T T T T

1 - - - - - 500
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 A A C G A T G C A G A A C G G A A A C G C T A C T A A A A A C C G C T G G T A A G A T T G C T G G T T T T
6 A A T G A T G C C G G A A A A G A A A C G C T A C T A A A A A C C G C T G G T A A G A T T G C T G G T T T T
7 A A T G A T G C A C G A A A A G A A A G C C T A C T A A A A A G A T G C T G G T A A C A A T T A G C A G G A T T T
8 A A T G A T G C C G A A A A G A C A A G C T A C T A A A A G G A T G C T G G T A G A T T A G C T G G T T T T
9 A A C G A T G C T G A G C G T C A A G C A A C A A A A G A C T G C T G G T A A A A T T G C A G G T C T T
10 A A C G A T G C T C A G C G T C A G C A A C C A A A A G A C C A G C A G G C G T A A T C G C T G G T G T C T

1 - - - - - 550
2 T G A T G T T G T T A G A A T T A T T A A C G A A C C A A C C G C T G C A G C T T T T G G C A T T T T G
3 A G A A G T T T T A C G T A T T A T T A A A T G A A C C T A C A G C C G C C A G C T T T A G C T T T T G
4 - - - - -
5 A A A C G T T G A G A G G A T T A T T A A C G A A C C A A C C G C C G C C T T G G C A T T T T G
6 A A A T G T T G A A A A G G A T T C A T T A A C G A A C C A A C C T G C C T G C C T T T A G C T T A T G
7 A C A T G T T G A A A A G A T T A T T A A C G A A C C A A C C T G C C T G C C T T T A G C T T A T G
8 A G A T G T T A A G A C A A T A A A C G A A C C A A C C A A G C C T G C A T T T A G C A T T A C G
9 T G A A G T A G A A C G T A T C A T C A A C G A G C C G A C T G C A G C A G C C T T T G C A T A C G
10 G G A A G T A A A A C G T A T C A T C A A C G A A C C G A C C G C A G C T G C A G C T G C G C T G C T T A C G

1 G G T T A G A C A A A A A A C A A G G A T A A A A A A T C A T A A A A T T T T A G T T T T C G A C C T T 600
2 G G T T A G A C A A A A A A C A A G G A T A A A A A A T C A T A A A A T T T T A G T T T T C G A C C T T
3 G A C T T G A C A A A A G T T A A A A A A G A A C A A A A A T T C T T G T T T T T G A C C T T T A
4 G C C T T G A C A A A A C T T G A A A A A G A A A T G - - - A A A A G T T C T T G T T C T T A G A C C T T A
5 G G A T C G A C A A A G T C T A A C C G A G A A A T G - - - A A A A G T C T T G G T T T A C G A C C T T
6 G G A T T G A C A A A G C A A G A T A A A G A A G A T G - - - A A A A G T C T T G G T T T A G A C C T T G
7 G A C T A G A T A A A A C A A G A T A A A G A A G A A A - - - A C A A T T T T A G T T A T G A C C T T A
8 G A T T A G A C A A A A T G G A T A G T G C T C A C - - - A A A A T C T T A G T A T A T G A C C T A
9 G A C T T G A T A A A A C A G A T G A A G A T C A A - - - A C G A T C C T A G T A T A C G A C C T T
10 G T C T G A C A A A G G C A T C A T C A A C G A A C C G A C C G C A G C T G C G C T G C T T A C G

1 G G T G G A G G A A C A T T T T G A C G T T T C A A T T T T A G A A A T G G A A A A T G G C G - - - 650
2 G G T G G A G G A A C A T T T T G A C G T T T C A A T T T T A G A A A T G G A A A A T G G C G - - -
3 G T G G C G G A A C G T T T T G A C G T T T C A A T T T T A G A A A T T A G C C T G A A G G A - - -
4 G G T G G G G A A C T T T T G A T G T C T A G T T T T A G A A T T A T C C T G A T T A T C C G T G G A - - -
5 G G T G G T G G T A C C T T T T G A C G T T T C C T T A C T T T G A C A T T G C T G A A G G T A - - -
6 G G T G G T G G A A C T T T T T G A T G T A T T A C T T T A C T T T G A C A T T G C T G A G G T A - - -
7 G G A G G A G G A A C T T T T T G A T G T T T C T A T T C T A G C T A T T G T A G C T A T T G G T G G A - - -
8 G G T G G T G G T A C T T T T C G A C G T A T C T A T C T T A G A C T T A G G A G A T G G A G - - -
9 G G C G G C G G T A C A T T T C G A C G T T T C C A T C C T T T G A G C T T T G G C G A C G G T G - - -
10 G G T G G T G G T A C T T T T C G A T A T T T C T A T T A T C G A A A T C G A C G A G T T G A C G G

1 - - - - - 700
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 - - - - -
6 - - - - -
7 - - - - -
8 - - - - -
9 - - - - -
10 C G A A A A A C C T T T C A A G T A C T A T C T A C T T C G G G G G A C A A C C A T T T T G G G T G
C A T T T T C A A G T A C T A T C T A C T T C G G G G G A C A A C C A T T T T G G G T G
C A T T T T G A A G T T T T A T C A A C A G C A G G G T G A T A A T A G C C T T T G G T G
C T T T G A A G T T T T A T C A A C T A G T G G T G A T A A T C A T T T A G G T G
C T T T C G A A G T A T T A G C C A C T G C T G G G G A C A A C C G T T T T G G G T G
C T T T G A A G T A C T T T G C A A C T G C T G G G G A C A A C C G T T T T G G G T G
- - - - - G T T T T G A T G T T A T T G C A A C T A G T G G A A A T A A T T A G G T G
- - - - - T A T T T G A A G T T G T A T C A A C A A A C G G A G A T G C T A G A T T A G G T G
- - - - - T A T T C G A A G T T C G T T C A A C T G C C G G C G A C A A C C G T C T G G G T G
C G A A A A A C C T T T C G A A G T T C T G G C A A C C A A C C G G T T G G G G G

1 G T G A T G A T T G A G A T A A T G C A A A T T G T T A A A A T G A A T - - - G G T T G A A G A A A T T 750
2 G T G A T G A T T G A G A T A A T G C A A A T T G T T A A A A T G A A T - - - G G T T G A A G A A A T T
3 G G G A T G A C T T G A G A C T A A A T G A A A T T G T T A A A A T G A A T - - - A A T T G A A T T A A A T T C
4 G G G A T G A C T T G G G A C T A A A T G A A A T T G T T A A A A T G A C T - - - T G T T A A A A A A T C
5 G T G A T G A C T T G G G A C T A A A C A A G A T C A T T A T G A A T T C A T C T C T A G C C C A C A T T G C C C
6 G T G A T G A C T T G G G A C T A A A C A A G A T C A T T A T G A A T T C A T C T C T A G C C C A C A T T G C C C
7 G A G A T A A T T T T T G A T G A A G A A A T T A T C A A A T G A T T - - - A C T A G G T A A A A T T T
8 G A G A T G A C T T T T T G A C C A A A G A A T T A T C A G A T T A T A T - - - A G C T G A A G A C T T T T
9 G G A C T G A C C A A G T T A T C A T C A T C T - - - G G T G T C T G A A T T C
10 G T G A A G A C T T T C G A C A G C C G T C T G A T C A A C T A T C T - - - G G T T G A A G A A T T C

1 A A A A A A T A A A T A C A A C T A T A A C C C A G A A A C T G A A A A A A T G G C A A T G G C A A A G 800
2 A A A A A A T A A A T A C A A C T A T A A C C C A G A A A C T G A A A A A T G G C A A T G G C A A A G
3 A A A A A A G A A G A C T A A C A A A A C A G A T T A A A A A T G G C A A T G G C A A A G
4 A A A G A A G A A T A T G A T T T T G A T C C A A A A A G T G A T A A A A T G G C G C T T A C A A A G
5 C A A G A A C A C A A A T G G G C T T A A A C C T T G T C C A A T G A C A A G A T G G C T A A T G C A A C G
6 A A A G A A C A C A A A T G G G C T T A A A C C T T G T C C A A T G A C A A A A G A T G G C A A T G C A A C G
7 A A A G C T G A A T A C G A A A T T T G A T T T A A C T A A A A G A T A A A A T G G C T T T A C A A A G
8 A A A G C T G A A A A A C G A A A T T T G A T T T A A C T A A A A G A T A A A A T G G C T T T A C A A A G
9 A A A A A A G A A A C G G C A A T T G A T T T G T C A A A A G A C A A A A T G G C G C T T C A A G C G
10 A A G A A A G A T C A G G C A T T G A C C T G C G C A A C G A T C C G C T G G C A A T G C A G C G

1 A C T A A A A G A A G A A G C T G A A A G A G C A A A A A T T A C T C T T T C T G A A A G T A T G G 850
2 A C T A A A A G A A G A A G C T G A A A A G A G C A A A A A T T A C T C T T T C T G A A A G T A T G G
3 T T A A A A G C G G C A G C T G A A A A A G C A A A A A T T G A C T T T A T C T A G A T C A A A C
4 A C T T A A A A G A A G A G C T G A A A A A A C C C A A A A A T T A A T C T T T C T A A A T C A A G T G
5 C T T A A A G G A A G C G G C T G A A C G T G C T A A G A T T G A A C T T T C C G C C C A A C T A G
6 G C T T A A A A G A A G C A G C T G A A C G T G C T A A G A T T G A A C T T T C C G C C C A A C T A G
7 A T T A A A A G A T T G A A G C T G A A A A A G C A A A A A T T A A T T T A T C T A G C C A A T T A G
8 A T T A A A A G A A G G T C G T C A A A A A G C T A A A A T T G A G T T A T C C A T C A T C A C T C
9 T T T G A A A G A C G C A G C T G A A A A A G C G A A A A T T G A G T T A T C C G G C G T C T T T
10 C C T G A A A G A A G C G A G C A G A A A A G C G A A A A T C G A A C T G T C T T C C G C T C A G C

1 T T G C T A A A T A T T T C T C T A C C A T T C T T G G C C A T G T C A C A A A - - - C A G G A C C C A 900
2 T T G C T A A A T A T T T C T C T A C C A T T C T T T G G C C A T G T C A C A A A - - - C A G G A C C C A
3 A T A G C T A C A A T T A T G C T T C C A T T T T T A G G T T A T G C A A C A A G G T T C A G A A C C C T
4 T T T C T A C A G T T T C T C T A C C A T T T T A G G A A T G G G C A A A A - - - A C G G G C C C G
5 A A G C A A T T A T C T C T T A C C G T C T T A A C G G T T A C C G A A A A - - - A G G T C C C G
6 A A A C G A T T A T T T C T C T A C C A T T T T T A A A C T G T T A C C G A A A - - - A A G G T C C C T
7 A A G T T G A A A T T A A T T T A C C A T T T A T T G C C A A T G A A T G A A A - - - G T G G A C C A A
8 A A A C A A T T A A A C T T A C C A T T T A T T A A C T G C T G A T G C A A G - - - C T G G T C C A A
9 C T A C G C A A A T T T C T T T A C C G T T T A T C A C A G C T G G A G A A G - - - C A G G A C C G
10 A G A C C G A C G T T A A C C T G C C A T A C A T C A C T G C A G A C G C G A - - - C C G G T C C G

1 A T T A A T G T C G A A T T G G A A C T A A A A A G A T C G G A G T T T G A A A A A A T G A C T G A 950
2 A T T A A T G T C G A A T T G G A A C T A A A A A G A T C G G A G T T T G A A A A A A T G A C T G A
3 A T T A A T G T T G A A G C A A C C T T A A G A A A G A A G T C A A T T T G A A A A A A T G A C A T C
4 A T T A A C G T T G A A C T T G A A C T T A A A A G A T C A G A A A T T T G A A A A A T G A C T G C
5 G T A A C G T T G A A C T T A A A C T A A C C C G T G C T A A G T T T G A A A A A A T T A C C A A A
6 G T T A A C G T T G A A G T T A A A A C T A A C C C G T G C T A A G T T T G A G G A G T T A C A A A A
7 A T T T C T T T T G C A A C A A C T C T A A C A A G A A G T G A A A T T T A A C A A A A T T A C A A A A
8 A A A C A C A T T A G A A T A T G A A C A T T A A C A A G A G C T A A A A T T C A A T G A A T T A A C T C A
9 C T T C A C C T T T G A A C T T A C A T T A A C A C T C G C T A A A A T T C G A A G A G A G T T T C T T C
10 A A A C A C A T T G A A C A T C A A A G T G A C T C G T G C G A A A C T G G A A A G C C T G G T T G A

1 C G A T C T A C T A C A A A G A A C T A A A A A C C A C T A T T A G A T G C A T T A A G C G A A A G 1000
2 C G A T C T A C T A C A A A G A A C T A A A A A C C A C T A T T A G A T G C A T T A A G C T G A A A G
3 G C A T T T A G T T T G A A A G A T G T A G A A A A C C C T A T T T G A A A C A G C T T T A G C T G A T G
4 C C A T T T A A T C G A T A G A A C T C G C A A A C C A A T T G T T G A T G C T C T A A A A C A A G
5 A C A A T T A C T T A G A A C G T A C T C G C A A C C C A A T T T C G G A T G T T A C C G T G A A G
6 A C C A C T A C T T T G A A A G A A C A A T A A A C C C T A T T T C A G A T G T T A T C A C G G A A A G
7 A C A T T T A G T T T G A C T T G A C T A T T C A A C C A G T T A A A G A T G C T T T A A G T G C T G
8 T G A C T T A G T T T G A A A G A A C A A T C A A C A A T G A A A G A A G C T T T A A A A T C A G
9 T C A T T T A G T T A G A G C G C A A C A T T G G G T C C C T G T C C G T C A A G C C T T C A A T G
10 A G A T C T G G T A A A C C G T T C A T T G A G C C G C T G A A A G T T G C A C T G C A G G A C G

1 C A A A A T T A C A A A T T A T G A T C T A G A T G A A G T T T T A T T A G T T G G T G G T T C A A 1050
2 C A A A A T T A C A A A T T A T G A T C T A G A T G A A G T T T T A T T A G T T G G T G G T T T C A A
3 C T A A A A T T C A A A G A T T C T G A T T T A G A T G A C G T A A T T T T A G T T G G G G G T T C A A
4 C A A A A T T G A A G C T T C A G A T C T T G A T G A A G T T C T C C T T G T A G G T G G A T C A A
5 C C A A G A T T A A A C C A G A A G A A A T T A A T G A A A T C T T G T T G G T G G G T G G A T C G
6 C T A A G A T T A A A C C C T G A A G A A T T A A T G A A A T T C T T T T A G T T G G T G G T T C T
7 C T A A A A A A C A A C T C A A G T G A A A T T A A T A T G A A G T T T T A T T A G T T G G T G G G T C A A
8 G T A A T G T T T C A T T A A A T G A T A T A G A T A A A G T A A T C T T A G T T G G T G G A T C A A
9 C A G G A C T T T C T G C A A G C G A A A T C G A C A A G T C A A T C C T T G T C G G C G G A T C A A
10 C T G G C T T G T C C G T A T C T G A T A T C G A C C A A C G T T A T C C T C G T T G G T G G A T C A G

1 - - - - - 1450
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 A G G G G G C A T T C C A A C C A G C A C C C A A A G G G T A A A C C C C A A A T T T G A A A T T A C C T T
6 A G G T G G T A T T C A A C C A G C A C C T A A A G G T A A A C C C C A A A T T T G A A A T T A C C T T
7 A A C A G G A A T T C A A C C A G C T C C T A A G A G G T A T T C C C A C A A A T T T G A A A G T T A C C T T
8 A T C A G G A A T T G C T C C A G C T C C A A G A G G A A T C C C T C A A A T A G A A G T T T G C C T T T
9 T A C T G A T A T T C C C G C C A G C A C C G C G T G C C T C A A A T A G A A G T T T T C C T T T
10 A G A T G G T A T C A A C C C G G C A C C G C G C G G C A T G C C G C A G A T C G A A G T T A C C T T

1 - - - - - 1500
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 T T A G C T T T G G A C G C C A A C G G G A T C T T T A A A C G T T A A A G C T A A G A T T T A A C C
6 T T A G T T T G G A T G C C A A A T G G G A T C T T T A A A T T A A A G C T A A G A T T T A A C C C
7 T T G A A A T T G G A T G C T A A T G G G T A T T G T T A A A G T T T C A G C A A A G A T A A A A T
8 T C G A T A T A G A T G C T A A C G G T A T A G T T A A A A G T T T C A G C A A A C T G A T A A G C T
9 T C G A T A T T G A C A A A A C G G T A T C G T A A A C G T A A G A G C A A A A G A C T T A G G C
10 T C G A T A T C G A T G C T G A C G G T A T C C T G C A C G T T T C C G C G A A G A T A A A A C

1 - - - - - 1550
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 A C T C A A A A G A G A A A A C A G T A T T A C T A T T A G T G A C A A C G G C A A C T T T G T C C G A
6 A C G C A A A A G G A A A A C A G T A T T A C C A T T A G T G A C A A C G G T A A A C T T T T C T G A
7 A C T A A T G A A G A A A A A C A T A T T A C T A T T C A A A T T C A G A A A T T T A A G T G A
8 A C T G G A A A A G A A A A C A C A T T A C A A T T C A C A G C T T C A A C T A A G C G A
9 A C A G G A A A A G A A C A A A A C A T T A C A A T C A A A T C T T C T C A G G T C T T C C A G A
10 A G C G G T A A A G A G C A G A G A T C A C A T C A A G G C T T C T C T G G T C T G A A C G A

1 - - - - - 1600
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 A G A G G A A A T C C A A A A G A T G A T T C G T G A T G C G G A A G C C A A C A A G G A G C G T G
6 G G A G G A G A T C C A A A A G A T G A T T C C G T G A T G C T G A A A G C T A A C A A G G A A C G G G
7 A G C T G A A G T T G A A A A G A A T G A T A A A A G A A G C T C A A A G A A A T G C T G C A A A T G
8 T G C T G A A A T A G A A A G C T G T A A A A G A A G C A G A A C A A T T T G C T G A A A A A G
9 T G A A G A G A T C G A A C G C A T G G T A A A A G A A G C G G A A G A A A A T G C T G A C G C T G
10 A G A T G A A A T C C A G A A A A T G G T A C G C G A C G C A G A A G C T A A C G C C G A A G C T G

1 - - - - - 1650
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 A C A A T G T G A T T C G T G A A C G C A T T G A G C T C C G T A A C G A A G G T G A A A G C A T C
6 A T A A C A T C A T C C G T G A A C G T A T T G A A T T A C G T A A T G A A G G G G A A G G T A T T
7 A T G A A G C T A A G A A A A A A A A A T A T T G A A T T A A A A A A T A A A G C T G A A A A C T A T
8 A T A A G A A G A G A A A A A G A A A C T A T A G A A A A A C A A T G C T G A G C A A A C T
9 A T G C G A A G A A A A A A G A A G A A A T C G A A G T C C G C A A C G A A G C A G A T C A G C T T
10 A C C G T A A G T T T G A A G A G C T G T A C A G A C T C G C A A C C A G G C G A C C A T C T G

1 - - - - - 1700
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 G T T G A G C A C G A T T A A G G A G A T T C T C C A A A G T C C C G A A G C G A A G G A C T T C C C
6 G T T T A A T A C C A T T C A A A A G A G A T T T A G C A A A G T C C C T G A A T G C T A A G A A T T T C C C
7 A T T A A C A T T A T T G A A A A C T T A C A C T T A A T T A C A A G C T G G T G A T A A A A T T A G T G C
8 G T T T A C C A A A C A G A A A A A A C T T A A A A T G A A C T T G G T G A T A A A T T T C A G A C
9 G T T T T C C A A A C T G A G A A A A C A T T T A A A A G A T C T T G A A G G C A A A G T G G A C G A
10 C T G C A C A G C A C C G T A A G C A G G T T G A A G A A G C A G G C G A C A A A C T G C C G G C

1 - - - - - 1750
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 T A A A G A A G A G A A A G G A A A A A C T C G A C A A G A T T A C C G G T G G T A T T G A T G C A G
6 T A A A G A A G A A A A A G A G A A G T T A G A A A A G C T A A C A G G T A A C A T T T G A T G C T G
7 T - - - G A A C A A A A A G A A C A A T C A C A A A A A T G A T T G A T G A T G A A A G A C
8 T - - - G A A G A A A A A T C A G A A A T A G A A - - - G C T A A A A T C G A A A G T T A A A A A A G
9 A - - - G A A C A A A G T G A A A A A G C C A A C G A T G C C A A A G A C G C T T T A A A A G C A G
10 T - - - G A C G A C A A A A C T G C T A T C G A G T C T G C G C T G A C T G C A C T G G A A A C T G

```

1  - - - - - 1800
2  - - - - -
3  - - - - -
4  - - - - -
5  C A A T T A A G G C C A A T G A C T A C A C C A A G T T A A A A G C C G A A A T C G A A A A C T T C
6  C T A T T A A A G C T A A T G A C T A T G C C A A A A C T C A A A G T G G A A A T T G A A A A C T T T
7  T A G T T A A A A A T G A A A A C T A T G A A G C T T T A G A A C A A A A A A T G G C T G A A C T T A
8  T T A A A G A T G G T G A C G A T A T A C A A G C T A T C A A G A A A G C T A T G G A A G A T T T A
9  C G A T T G A G A A A A A C G A A T T T G A A G A G A T T C A A A G C G A A A A A A G A T G A G C T T
10 C T C T G A A A G G T G A A G A C A A A G C C G C T A T C G A A G C G A A A A T G C A G G A A C T G

```

```

1  - - - - - 1850
2  - - - - -
3  - - - - -
4  - - - - -
5  A A G A A G T G A A G G G A A G A A A T G G C C A A G A A G T A C A A C C C T A A C G G G A T C A
6  A A G A A G T G A A G A G A A G A G A T G G C A A A A A A A T A T A A C C C A A C T G G T G A A C A
7  G A A C A A G C A A T G G C T G C A G C T G C T G A A T T T G C T A A C C A A A C A T A A T G A T T C
8  A C T C A A G C A T T C T A C A A A G T A T C A G A A A A A T T A T A C C A A C A A A A T G G T G G
9  C A A C A A T C G T T C A A G A G C T T T C T A T G A A G C T T T A T G A A G A A G C T G C T A A
10 G C A C A G G T T T C C A G A A A C T G A T G G A A A T C G C C A G C A G C A A C A T G C C A

```

```

1  - - - - - 1900
2  - - - - -
3  - - - - -
4  - - - - -
5  A G G T C A A C C A G C A C A A T A A - - - - -
6  A G G T C C A C A A G C A A A A T A A - - - - -
7  A G A T T C A A A T A A T A A T T C A T C A G A A C A A A A T A A T T A A - - - - -
8  A G C A C A A G G T C A A G G A T T C G A T C C A A T C A T C A T G G G T G G A G C T A A T G C T G
9  A G C A C A G C A A G C T C A A G C G G A G C A A A C G C T G A A G G C A A A G C G G A T G A C A
10 G C A G C A G A C T G C C G G T G C T G A T G C T T C T G C A A A C A A C G C G A A A G A T G A C G

```

```

1  - - - - - 1950
2  - - - - -
3  - - - - -
4  - - - - -
5  - - - - -
6  - - - - -
7  - - - - -
8  G A G C A G G T G C T A C A A A C A A C A C G A T G A C A A T G T T G T A G A T G C T G A T T T C
9  A C G T T G T C G A C G C T G A A T A C G A A G A A G T A A A C G A C G A C C A A A A C A A A A A A
10 A T G T T G T C G A C G C T G A A T T T G A A G A A G T C A A A G A C A A - - A A A T A A - - -

```

```

1  - - - - - 2000
2  - - - - -
3  - - - - -
4  - - - - -
5  - - - - -
6  - - - - -
7  - - - - -
8  G A A G T T C A A G A T G A T A A A T A A
9  - - - - -
10 - - - - -

```

DNA-Sequenzhomologievergleich des *hsp70*-Genfragmentes (600 bp) der untersuchten Mykoplasmenspezies mit *hsp70*-Gensequenzen anderer Mykoplasmen- und Bakterienspezies

- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| 1: <i>M. arthritidis</i> | 6: <i>M. genitalium</i> |
| 2: <i>M. bovis</i> | 7: <i>M. capricolum</i> |
| 3: <i>M. agalactiae</i> | 8: <i>C. perfringens</i> |
| 4: <i>M. hyopneumoniae</i> | 9: <i>B. subtilis</i> |
| 5: <i>M. pneumoniae</i> | 10: <i>E. coli</i> |

C. Immunogene Bereiche ausgewählter Hsp60-Proteine mit dem Programm „antigenic“

ANTIGENIC von *M. arthritidis* Hsp60

Length 476 residues, score calculated from 4 to 473

Report all peptides over 6 residues

Found 21 hits scoring over 1.00 (true average 1.02)

Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.206 length 13 at residue 27-39

```

          *
Sequence:  GAKVISVAAVSTN
           |               |
           27             39

```

(2) Score 1.192 length 17 at residue 322-338

```

          *
Sequence:  KERIAHLSQGVAVVRVG
           |               |
           322             338

```

(3) Score 1.190 length 10 at residue 226-235

```

          **
Sequence:  TINVVAVKCN
           |               |
           226             235

```

(4) Score 1.183 length 12 at residue 211-222

```

          *
Sequence:  AEEVTTLAVNK
           |               |
           211             222

```

(5) Score 1.175 length 8 at residue 202-209

```

          *
Sequence:  PLLIVAPD
           |               |
           202             209

```

(6) Score 1.151 length 21 at residue 401-421

```

          *
Sequence:  KEILVGYEIVRKSLEAPVRQI
           |               |
           401             421

```

(7) Score 1.144 length 9 at residue 427-435

*

Sequence: VNPVKVFAE
 | |
 427 435

(8) Score 1.127 length 15 at residue 167-181

*

Sequence: MEVVLDQPKILVSAM
 | |
 167 181

(9) Score 1.127 length 12 at residue 370-381

*

Sequence: GGGIALLNVSTI
 | |
 370 381

(10) Score 1.107 length 8 at residue 187-194

*

Sequence: KEILPLLE
 | |
 187 194

(11) Score 1.100 length 8 at residue 102-109

*

Sequence: EQVAAISS
 | |
 102 109

(12) Score 1.097 length 7 at residue 267-273

*

Sequence: DVTVNHL
 | |
 267 273

(13) Score 1.096 length 9 at residue 154-162

*

Sequence: TYASPYMVS
 | |
 154 162

(14) Score 1.095 length 9 at residue 299-307

*

Sequence: QKHLDLLNG
 | |
 299 307

ANTIGENIC von *M. bovis* Hsp60

Length 356 residues, score calculated from 4 to 353

Report all peptides over 6 residues

Found 17 hits scoring over 1.00 (true average 1.02)

Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.206 length 13 at residue 24-36

*

Sequence: GAKVISVAAVSTN
 | |
 24 36

(2) Score 1.192 length 17 at residue 320-336

*

Sequence: KERIAHLSQGVAVVRVG
 | |
 320 336

(3) Score 1.190 length 10 at residue 224-233

**

Sequence: TINVVAVKCN
 | |
 224 233

(4) Score 1.183 length 12 at residue 209-220

*

Sequence: AEEVVTTLAVNK
 | |
 209 220

(5) Score 1.175 length 8 at residue 200-207

*

Sequence: PLLIVAPD
 | |
 200 207

(6) Score 1.127 length 15 at residue 165-179

*

Sequence: MEVVLDQPKILVSAM
 | |
 165 179

(7) Score 1.118 length 11 at residue 78-88

*

Sequence: SRLVDYTVGTA
 | |
 78 88

(8) Score 1.107 length 8 at residue 185-192

*

Sequence: KEILPLLE
 | |
 185 192

(9) Score 1.100 length 8 at residue 100-107

*

Sequence: EQVAAISS
 | |
 100 107

(10) Score 1.097 length 7 at residue 265-271

*

Sequence: DVTVNHL
 | |
 265 271

(11) Score 1.096 length 9 at residue 152-160

*

Sequence: TYASPVMVS
 | |
 152 160

(12) Score 1.095 length 9 at residue 297-305

*

Sequence: QKHLDLLNG
 | |
 297 305

(13) Score 1.095 length 14 at residue 113-126

*

Sequence: GKLIAQAMALVGKN
 | |
 113 126

(14) Score 1.094 length 6 at residue 276-281

*

Sequence: RVQVAK
 | |
 276 281

ANTIGENIC von *M. agalactiae* Hsp60

Length 487 residues, score calculated from 4 to 484

Report all peptides over 6 residues

Found 22 hits scoring over 1.00 (true average 1.02)

Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.206 length 13 at residue 43-55

*

Sequence: GAKVISVAAVSTN

43		55

(2) Score 1.192 length 17 at residue 338-354

*

Sequence: KERIAHLSQGVAVVRVG

338		354

(3) Score 1.190 length 10 at residue 242-251

**

Sequence: TINVVAVKCN

242		251

(4) Score 1.183 length 12 at residue 227-238

*

Sequence: AEEVVTTLAVNK

227		238

(5) Score 1.175 length 8 at residue 218-225

*

Sequence: PLLIVAPD

218		225

(6) Score 1.151 length 21 at residue 417-437

*

Sequence: KEILVGYEIVRKSLEAPVRQI

417		437

(7) Score 1.144 length 9 at residue 443-451

*

Sequence: VNPVKVFAE
 | |
 443 451

(8) Score 1.127 length 15 at residue 183-197

*

Sequence: MEVVLDQPKILVSAM
 | |
 183 197

(9) Score 1.127 length 12 at residue 386-397

*

Sequence: GGGIALLNVSTI
 | |
 386 397

(10) Score 1.107 length 8 at residue 203-210

*

Sequence: KEILPLLE
 | |
 203 210

(11) Score 1.100 length 8 at residue 118-125

*

Sequence: EQVAAISS
 | |
 118 125

(12) Score 1.097 length 7 at residue 283-289

*

Sequence: DVTVNHL
 | |
 283 289

(13) Score 1.096 length 9 at residue 170-178

*

Sequence: TYASPYMVS
 | |
 170 178

(14) Score 1.095 length 9 at residue 315-323

*

Sequence: QKHLDLLNG
 | |
 315 323

ANTIGENIC von *M. hyopneumoniae* Hsp60

Length 368 residues, score calculated from 4 to 365

Report all peptides over 6 residues

Found 17 hits scoring over 1.00 (true average 1.01)

Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.206 length 13 at residue 30-42

*

Sequence: GAKVISVAAVSTN
 | |
 30 42

(2) Score 1.192 length 17 at residue 325-341

*

Sequence: KERIAHLSQGVAVVRVG
 | |
 325 341

(3) Score 1.190 length 10 at residue 229-238

**

Sequence: TINVVAVKCN
 | |
 229 238

(4) Score 1.183 length 12 at residue 214-225

*

Sequence: AEEVVTTLAVNK
 | |
 214 225

(5) Score 1.175 length 8 at residue 205-212

*

Sequence: PLLIVAPD
 | |
 205 212

(6) Score 1.127 length 15 at residue 170-184

*

Sequence: MEVVLDQPKILVSAM
 | |
 170 184

(7) Score 1.107 length 8 at residue 190-197

*

Sequence: KEILPLLE
 | |
 190 197

(8) Score 1.100 length 8 at residue 105-112

*

Sequence: EQVAAISS
 | |
 105 112

(9) Score 1.097 length 7 at residue 270-276

*

Sequence: DVTVNHL
 | |
 270 276

(10) Score 1.096 length 9 at residue 157-165

*

Sequence: TYASPYMVS
 | |
 157 165

(11) Score 1.095 length 7 at residue 304-310

*

Sequence: HLDLLNG
 | |
 304 310

(12) Score 1.095 length 14 at residue 118-131

*

Sequence: GKLIQAAMALVGKN
 | |
 118 131

(13) Score 1.094 length 12 at residue 281-292

*

Sequence: RVQVPKKKTTVI
 | |
 281 292

(14) Score 1.083 length 8 at residue 83-90

*

Sequence: ASQLIITE
 | |
 83 90

(8) Score 1.141 length 9 at residue 451-459

*

Sequence: LRQIVLNCG
 | |
 451 459

(9) Score 1.136 length 15 at residue 499-513

*

Sequence: VTRSALQYAASVAGL
 | |
 499 513

(10) Score 1.134 length 14 at residue 19-32

**

Sequence: GVNVLADAVKVTLG
 | |
 19 32

(11) Score 1.131 length 8 at residue 36-43

*

Sequence: RNVVLDKS
 | |
 36 43

(12) Score 1.130 length 8 at residue 461-468

*

Sequence: EPSVVANT
 | |
 461 468

(13) Score 1.127 length 10 at residue 197-206

*

Sequence: RGYLSPYFIN
 | |
 197 206

(14) Score 1.126 length 14 at residue 212-225

*

Sequence: AVELESPFILLADK
 | |
 212 225

(15) Score 1.114 length 7 at residue 320-326

*

Sequence: AKRVVIN
 | |
 320 326

(16) Score 1.103 length 9 at residue 51-59

*

Sequence: KDGVSVARE
 | |
 51 59

(17) Score 1.101 length 7 at residue 518-524

*

Sequence: ECMVTDL
 | |
 518 524

(18) Score 1.088 length 7 at residue 186-192

*

Sequence: ELDVVEG
 | |
 186 192

(19) Score 1.083 length 10 at residue 396-405

*

Sequence: VEDALHATRA
 | |
 396 405

(20) Score 1.080 length 7 at residue 158-164

*

Sequence: VGKLIAE
 | |
 158 164

(21) Score 1.079 length 7 at residue 74-80

*

Sequence: VKEVASK
 | |
 74 80

(22) Score 1.074 length 9 at residue 343-351

*

Sequence: QGRVAQIRQ
 | |
 343 351

(23) Score 1.072 length 7 at residue 289-295

*

Sequence: LQDIATL
 | |
 289 295

(24) Score 1.050 length 7 at residue 297-303

*

Sequence: GGTWISE
 | |
 297 303

D. Immunogene Bereiche ausgewählter Hsp70-Proteine mit dem Programm „anitgenic“

ANTIGENIC von *M. arthritidis* Hsp70-Fragment

Length 194 residues, score calculated from 4 to 191

Report all peptides over 6 residues

Found 11 hits scoring over 1.00 (true average 1.01)

Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.176 length 9 at residue 161-169

*

Sequence: LDEVLLVGG
 | |
 161 169

(2) Score 1.156 length 11 at residue 173-183

**

Sequence: MPAVQKLVADT
 | |
 173 183

(3) Score 1.132 length 8 at residue 19-26

*

Sequence: HKILVFDL
 | |
 19 26

(4) Score 1.126 length 11 at residue 105-115

*

Sequence: VANISLPFLAM
 | |
 105 115

(5) Score 1.108 length 15 at residue 145-159

*

Sequence: KPLLDALSEAKLQIN
 | |
 145 159

(6) Score 1.103 length 7 at residue 42-48

*

Sequence: AFQVLST
 | |
 42 48

(7) Score 1.095 length 6 at residue 31-36

*

Sequence: FDVSIL
 | |
 31 36

(8) Score 1.094 length 7 at residue 4-10

*

Sequence: AAALAFG
 | |
 4 10

(9) Score 1.092 length 7 at residue 61-67

*

Sequence: NAIVKTM
 | |
 61 67

(10) Score 1.073 length 9 at residue 120-128

*

Sequence: PINVELELK
 | |
 120 128

(11) Score 1.057 length 7 at residue 97-103

*

Sequence: KITLSES
 | |
 97 103

ANTIGENIC von *M. bovis* Hsp70-Fragment

Length 197 residues, score calculated from 4 to 194

Report all peptides over 6 residues

Found 12 hits scoring over 1.00 (true average 1.01)

Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.176 length 9 at residue 171-179

*

Sequence: LDEVLLVGG
 | |
 171 179

(2) Score 1.156 length 11 at residue 183-193

**

Sequence: MPAVQKLVADT
 | |
 183 193

(3) Score 1.151 length 6 at residue 4-9

*

Sequence: DVVRII
 | |
 4 9

(4) Score 1.132 length 8 at residue 29-36

*

Sequence: HKILVFDL
 | |
 29 36

(5) Score 1.126 length 11 at residue 115-125

*

Sequence: VANISLPFLAM
 | |
 115 125

(6) Score 1.108 length 15 at residue 155-169

*

Sequence: KPLLDALSEAKLQIN
 | |
 155 169

(7) Score 1.103 length 7 at residue 52-58

*

Sequence: AFQVLST
 | |
 52 58

(8) Score 1.095 length 6 at residue 41-46

*

Sequence: FDVSIL
 | |
 41 46

(9) Score 1.094 length 7 at residue 14-20

*

Sequence: AAALAFG
 | |
 14 20

(10) Score 1.090 length 7 at residue 71-77

*

Sequence: NAIVKWM
 | |
 71 77

(11) Score 1.073 length 9 at residue 130-138

*

Sequence: PINVELELK
 | |
 130 138

(12) Score 1.057 length 7 at residue 107-113

*

Sequence: KITLSES
 | |
 107 113

ANTIGENIC von *M. agalactiae* Hsp70-Fragment

Length 200 residues, score calculated from 4 to 197

Report all peptides over 6 residues

Found 12 hits scoring over 1.00 (true average 1.03)

Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.168 length 11 at residue 181-191

*

Sequence: IPAVQQLVESI
 | |
 181 191

(2) Score 1.164 length 10 at residue 169-178

*

Sequence: LDDVILVGGS
 | |
 169 178

(3) Score 1.145 length 10 at residue 114-123

*

Sequence: TIMLPFLVMQ
 | |
 114 123

(4) Score 1.137 length 9 at residue 38-46

*

Sequence: FDVSILELA
 | |
 38 46

(5) Score 1.132 length 9 at residue 25-33

*

Sequence: EQKILVFDL
 | |
 25 33

(6) Score 1.127 length 10 at residue 145-154

*

Sequence: SHLVERCRKP
 | |
 145 154

(7) Score 1.106 length 10 at residue 71-80

*

Sequence: VKTLIDLIKK
 | |
 71 80

(8) Score 1.094 length 11 at residue 12-22

*

Sequence: AAALAFGLDKV
 | |
 12 22

(9) Score 1.089 length 7 at residue 128-134

*

Sequence: PISVEAT
 | |
 128 134

(10) Score 1.080 length 7 at residue 49-55

*

Sequence: TFEVLST
 | |
 49 55

(11) Score 1.056 length 12 at residue 156-167

*

Sequence: ETALADAKIKIS
 | |
 156 167

(12) Score 1.054 length 9 at residue 104-112

*

Sequence: KIDLSSSQQ
 | |
 104 112

ANTIGENIC von *M. hyopneumoniae* Hsp70-Fragment

Length 189 residues, score calculated from 4 to 186

Report all peptides over 6 residues

Found 10 hits scoring over 1.00 (true average 1.01)

Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.176 length 9 at residue 162-170

*

Sequence: LDEVLLVGG
 | |
 162 170

(2) Score 1.175 length 8 at residue 20-27

*

Sequence: MKVLVYDL
 | |
 20 27

(3) Score 1.163 length 9 at residue 32-40

*

Sequence: FDVSVLELS
 | |
 32 40

(4) Score 1.145 length 12 at residue 103-114

*

Sequence: NQSVSTVSLPFL
 | |
 103 114

(5) Score 1.112 length 8 at residue 65-72

*

Sequence: VNTLVKKI
 | |
 65 72

(6) Score 1.101 length 12 at residue 146-157

**

Sequence: KPIVDALKQAKI
 | |
 146 157

(7) Score 1.094 length 7 at residue 6-12

*

Sequence: AAALAFG
 | |
 6 12

(8) Score 1.074 length 7 at residue 174-180

*

Sequence: MPAVQSM
 | |
 174 180

(9) Score 1.073 length 7 at residue 123-129

*

Sequence: NVELELK
 | |
 123 129

(10) Score 1.073 length 6 at residue 44-49

*

Sequence: FEVLST
 | |
 44 49

(7) Score 1.121 length 10 at residue 234-243

*

Sequence: SRLINYLVEE
 | |
 234 243

(8) Score 1.112 length 7 at residue 189-195

*

Sequence: TIAVYDL
 | |
 189 195

(9) Score 1.104 length 8 at residue 174-181

*

Sequence: AAALAYGL
 | |
 174 181

(10) Score 1.104 length 11 at residue 112-122

*

Sequence: PPQISAEVLKK
 | |
 112 122

(11) Score 1.102 length 8 at residue 12-19

*

Sequence: TNSCVAIM
 | |
 12 19

(12) Score 1.099 length 11 at residue 278-288

*

Sequence: QTDVNLPLYITA
 | |
 278 288

(13) Score 1.098 length 13 at residue 83-95

*

Sequence: QRDVSIMPFKIIA
 | |
 83 95

(14) Score 1.096 length 11 at residue 591-601

**

Sequence: LAQVSQKLMEI
 | |
 591 601

(15) Score 1.087 length 8 at residue 65-72

*

Sequence: TLFAIKRL
 | |
 65 72

(16) Score 1.084 length 7 at residue 162-168

*

Sequence: GLEVKRI
 | |
 162 168

(17) Score 1.083 length 7 at residue 47-53

*

Sequence: ETLVGQP
 | |
 47 53

(18) Score 1.079 length 7 at residue 350-356

*

Sequence: QKKVAEF
 | |
 350 356

(19) Score 1.078 length 9 at residue 420-428

*

Sequence: TKHSQVFST
 | |
 420 428

(20) Score 1.073 length 7 at residue 37-43

*

Sequence: PSIIAYT
 | |
 37 43

(21) Score 1.072 length 6 at residue 624-629

*

Sequence: DDVVDA
 | |
 624 629

(22) Score 1.072 length 8 at residue 540-547

*

Sequence: DHELLHSTR
 | |
 540 547

(23) Score 1.068 length 6 at residue 216-221

*

Sequence: FEVLAT
 | |
 216 221

(24) Score 1.066 length 7 at residue 471-477

*

Sequence: QIEVTFD
 | |
 471 477

(25) Score 1.061 length 7 at residue 603-609

*

Sequence: QQQHAQQ
 | |
 603 609

(26) Score 1.058 length 8 at residue 201-208

*

Sequence: DISIIEID
 | |
 201 208

(27) Score 1.057 length 10 at residue 566-575

**

Sequence: ESALTALETA
 | |
 566 575

(28) Score 1.053 length 6 at residue 530-535

*

Sequence: EELVQT
 | |
 530 535

(29) Score 1.051 length 7 at residue 270-276

*

Sequence: KIELSSA
 | |
 270 276

(30) Score 1.037 length 6 at residue 24-29

*

Sequence: PRVLEN
 | |
 24 29

E. Zelluläre Bestandteile der Bronchoalveolären Lavage vom Schwein

Tab. 26: Zelluläre Bestandteile der BALF des Schweines

	SPF-Schweine (KIPPER 1990)	Feldinfektion mit bakteriellen Pneumonieerregern
Gesamtzellzahl [10 ⁶ Zellen/ml]	0,3-3,9	6,5
Alveolarmakrophagen [%]	90,1	32,2
neutrophile Granulozyten [%]	5,9	63,1
Lymphozyten [%]	3,0	4,6
esinophile Granulozyten [%]	0,3	-

F. Nichtzelluläre Bestandteile der Bronchoalveolären Lavage des gesunden Menschen

Tab. 27: Nichtzelluläre Bestandteile der BALF des gesunden Menschen (¹ KELCH und HUTTER, 1989 zitiert nach COSTABEL, 1994; ² VELLUTI et al., 1983; ³ JÜTTNER et al., 1989; ⁴ SCHMEKEL et al., 1995)

Substanzen	ungefähre Konzentration
Gesamteiweiß ¹	70 µg/ml
Albumin ¹	20 µg/ml
IgG ¹	2,5-10 µg/ml
IgA ¹	2,5-6 µg/ml
IgM ¹	100 ng/ml
IgE ¹	0,06-0,3 ng/ml
α ₁ -Antiprotease ¹	1-2 µg/ml
α ₂ -Makroglobulin ¹	0,04 µg/ml
Elastase ¹	nachweisbar
Myeloperoxidase ¹	nachweisbar
eosinophilen-kationisches Protein ¹	nachweisbar
Kollagenase ¹	nicht nachweisbar bei Gesunden
angiotensinkonvertierendes Enzym ¹	nachweisbar
Neopterin ¹	20 nmol/l
Transferrin ¹	4 µg/ml
Fibronektin ¹	30-150 ng/ml

Substanzen	ungefähre Konzentration
Vitronectin ¹	40-80 ng/ml
Prokollagen-III-Peptid ¹	nicht nachweisbar bei Gesunden
Hyaluronsäure ¹	5-14 ng/l
Prokoagulansaktivität	0-100 TTU/ml
Plasminogenaktivator ¹	0,1-0,5 U/ml
Interleukin-1 ¹	nachweisbar
Interleukin-2 ¹	nachweisbar
Interleukin-6 ¹	4-6 fmol/ml
polare Lipide ¹	78 µg/ml
nichtpolare Lipide ¹	45 µg/ml
Histamin ¹	100-800 pg/ml
Prostaglandin E ₂ ¹	200-2000 pg/ml
6-Keto-Prostaglandin F _{1α} ¹	20-400 pg/ml
Prostaglandin F _{2α} ¹	30 pg/ml
Thromboxan B ¹	25-85 pg/ml
Kalium ²	5,8 µg/ml
Calcium ²	2,5 µg/ml
Phosphat ³	
Harnstoff ⁴	0,5-5,5 mmol/l (je nach Kontaktzeit der BALF)

Die Angaben beziehen sich auf die unkonzentrierte BAL-Flüssigkeit von Normalpersonen

Wissenschaftliche Betreuung und Förderung

Die Dissertation wurde wissenschaftlich von Prof. Dr. G.-F. Gerlach und Dr. Martin Runge betreut und durch die DFG im Rahmen des DFG-Projektes „Charakterisierung der Hitzeschockproteine von Mykoplasmen und Untersuchungen zu deren Bedeutung in der Pathogenese von Mykoplasmeninfektionen“ (Ru 459/2-1) gefördert.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden publiziert:

1. Runge, M., B. Scherm, G.-F. Gerlach, and H. Kirchhoff. 1997. Heat-shock proteins in mycoplasmas: Detection, biochemical characterization and their possible role in mycoplasmoses. In: Report of the COST Action 826 Agriculture and Biotechnology „Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics“. G. Leori, S. Santini, E. Scanziani and J. Frey (Eds.) European Commission. Vol. II.
2. Wedde, A., G.-F. Gerlach, B. Scherm, and M. Runge. 1998. Isolation of the 60 kD-heat shock protein of *Mycoplasma arthritidis* and *Mycoplasma bovis* and detection of heat shock protein-specific antibodies in bovine sera. In: Report of the COST Action 826 Agriculture and Biotechnology „Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics“. L. Stipkovits et al. (Hrsg.) European Commission. Vol. III
3. Scherm, B., J. Niewint, G.-F. Gerlach, F. Thiaucourt, and M. Runge. 1998. Characterization of the *hsp60* and *hsp70* genes of mycoplasmas. In: Report of the COST Action 826 Agriculture and Biotechnology „Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics“. L. Stipkovits et al. (Hrsg.) European Commission. Vol. III
4. Wedde, A., B. Scherm, G.-F. Gerlach, A. Sterner-Kock, and M. Runge. 1999. The influence of heat shock proteins on mycoplasma-induced arthritis. In: Report of the COST Action 826 Agriculture and Biotechnology „Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics“. D. Bergonier et al. (Hrsg.) European Commission. Vol. IV

Lebenslauf

Name: Barbara Scherm
Anschrift: Fundstr. 4
30161 Hannover
Geburtsdatum: 22.04.1970 in Coburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1976 - 1980 Grundschole am Heimatring, Coburg
1980 - 1989 Gymnasium Alexandrinum, Coburg
Abitur: Juni 1989

Auslandsaufenthalt

1989 - 1990 Au-pair-Mädchen in Mailand, Italien;
Besuch einer italienischen Sprachschule

Hochschulausbildung

1990 - 1996 Studium der Biochemie an der Universität Hannover
August 1992 Vordiplom
November 1995 Diplomprüfung in den Fächern Biochemie, Biophysikalische Chemie und Mikrobiologie
Dezember 1995 - Juni 1996 Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover
Betreuer: Prof. Dr. H. Kirchhoff
Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen zur Charakterisierung von Hitzeschockproteinen bei Mykoplasmen
ab 1996 Dissertation am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G.-F. Gerlach im Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover angefertigt.

Herrn Prof. Dr. G.-F. Gerlach danke ich besonders für die Übernahme der Betreuung der Arbeit und die jederzeit gewährte Anregung und großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Frau Prof. Dr. H. Kirchhoff danke ich für ihr stets reges Interesse an den fortführenden Arbeiten ihrer ehemaligen Abteilung, für die freundliche Unterstützung und Hilfe und ganz besonders für die Übernahme des Referates.

Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Müller danke ich für die Übernahme des Referates und die freundliche Unterstützung bei allen biochemischen und prüfungsrelevanten Problemen.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. M. Runge für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte freundliche und unkomplizierte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit. Ich habe mich selten in einem Arbeitsteam so wohl gefühlt wie im Mykoplasmen-Team!

Bei allen Mitarbeitern des Institutes für Mikrobiologie und Tierseuchen der Tierärztlichen Hochschule Hannover bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft und die stets freundliche und nette Zusammenarbeit. Lieber Jörg, liebsten Dank für Deine aufopfernde Hilfsbereitschaft in allen Computerfragen.

Bei Prof. J. Frey und E. Vilei bedanke ich mich für die herzliche Aufnahme in Bern und für die fundierte und kompetente Einführung in die Möglichkeiten der Klonierung und Proteinexpression.

Mein besonders herzlicher Dank geht an alle standhaften letzten „Weichhäuter“. Die Arbeitsatmosphäre war stets engagiert und witzig und in gegenseitiger Unterstützung waren immer alle großen und kleinen Probleme zu lösen.

Liebe Rosi, wie alle Diplomanden und Doktoranden wurde ich von Dir ins Mykoplasmenlabor eingeführt und in jeder Beziehung mit Rat und Tat begleitet. Mehr als ein ganz liebes Danke!

Liebe Astrid, als „letzte Zeugen“ der mykoplasmalen Geschehnisse konnte ich immer auf Deine Unterstützung zählen und das nicht nur in tiermedizinischen Fragen.

Im Besonderen danke ich meinen Eltern, die mir immer hilfreich zur Seite standen und mir das Erreichen meiner Ziele jederzeit ermöglichten.

Lieber Stefan - Danke für all' die Motivation und Geduld.