



TECHNISCHE  
UNIVERSITÄT  
DRESDEN

Technische Universität Dresden  
Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
Fachrichtung Biologie

## **Wissenschaftliche Abschlussarbeit**

zum Erwerb des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

Mit der Thematik

# **Funktion glykolytischer Enzyme von *Mycoplasma pneumoniae* in der Wirt-Erreger-Interaktion**

**angefertigt am:**

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus  
Technische Universität Dresden

vorgelegt von

**Anne Gründel, M. Sc.**

**Gutachter:** Prof. Dr. rer. nat. Isolde Röske  
Prof. Dr. med. Enno Jacobs

**Tag der Einreichung:** 17.06.2016

**Tag der Verteidigung:** 28.10.2016



## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
1 Stand der Wissenschaft .....	1
1.1 Eigenschaften und Zuordnung der Mykoplasmen .....	1
1.2 <i>Mycoplasma pneumoniae</i> als Krankheitserreger .....	2
1.3 Die Glykolyse von <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	5
1.4 Oberflächenassoziierte glykolytische Enzyme in Mikroorganismen .....	7
1.5 Humane Bindungspartner für glykolytische Enzyme .....	9
1.6 Motivation .....	14
2 Material und Methoden .....	15
2.1 Material .....	15
2.1.1 Geräte .....	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	16
2.1.3 Reagenzien und Chemikalien .....	17
2.1.4 Puffer und Lösungen .....	20
2.1.5 Bakterienstämme und Nährmedien .....	22
2.1.6 Zelllinien und Zellkulturmedien .....	24
2.1.7 Kits .....	24
2.1.9 Antikörper .....	25
2.2 Methoden .....	26
2.2.1 Kultivierung von <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	26
2.2.2 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	27
2.2.3 Kultivierung humaner Zelllinien .....	27
2.2.4 Molekularbiologische Methoden .....	27
2.2.5 Protein- und immunchemische Methoden .....	32
2.2.6 Tierexperimentelle Arbeiten .....	35
2.2.7 Lokalisationsuntersuchungen .....	36

## Inhaltsverzeichnis

---

2.2.8	Bindungsstudien .....	41
3	Ergebnisse .....	47
3.1	Herstellung der Expressionsklone für die Produktion glykolytischer Enzyme .....	47
3.2	Rekombinante Expression und Aufreinigung der glykolytischen Enzyme von <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	47
3.3	Reaktivität der Seren gegen die rekombinant hergestellten Proteine .....	48
3.4	Lokalisation der glykolytischen Enzyme in <i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129 .....	50
3.4.1	Auftreten der glykolytischen Enzyme in den Proteinfractionen von <i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129 .....	50
3.4.2	Oberflächenassoziation der glykolytischen Enzyme von <i>Mycoplasma pneumoniae</i> M129 .....	53
3.4.3	Sekretion glykolytischer Enzyme und Wachstumshemmung durch die Antiseren gegen die rekombinanten Proteine .....	63
3.5	Bindungseigenschaften der oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme an humane Zellen .....	65
3.6	Bindung glykolytischer Enzyme an humane ECM-Proteine .....	68
4	Diskussion .....	91
4.1	Herstellung und Charakterisierung von glykolytischen Enzymen und Antiseren .....	91
4.2	Lokalisation glykolytischer Enzyme in <i>Mycoplasma pneumoniae</i> .....	93
4.3	Adhärenz von <i>Mycoplasma pneumoniae</i> sowie der glykolytischen Enzyme an humane Zellen und humane ECM-Proteine .....	99
4.1	Die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin .....	105
5	Zusammenfassung .....	109
6	Ausblick .....	111
7	Publikationsliste .....	I
8	Abkürzungsverzeichnis .....	XI
9	Register Bacteria .....	VII
10	Abbildungsverzeichnis .....	VIII
11	Tabellenverzeichnis .....	X

## Inhaltsverzeichnis

---

12	Danksagung .....	XI
I	Anhang-Material und Methoden .....	XII
II	Anhang-Ergebnisse .....	XXI
III	Anhang-Daten .....	XXVIII
	Wissenschaftliche Beiträge .....	XLVII
	Versicherung .....	L

# 1 Stand der Wissenschaft

## 1.1 Eigenschaften und Zuordnung der Mykoplasmen

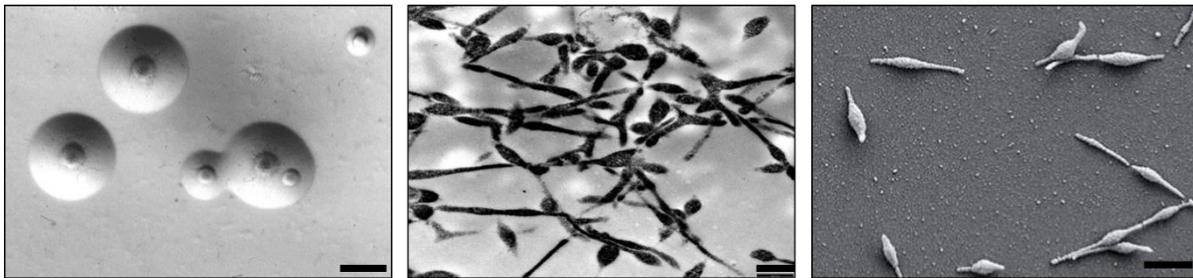
Die erste Dokumentation der Mykoplasmen kann auf das Jahr 1898 datiert werden, als Nocard und Roux 1898 diese Prokaryoten aus an Pleuropneumonie erkrankten Rindern isolieren konnten [1] und als ‚Pleuro-Pneumonia-Like-Organismus‘ (PPLO) bezeichneten. Die Umbenennung in die heutige Bezeichnung ‚Mycoplasma‘ kann auf die pilzähnliche Fadenform im mikroskopischen Bild zurückgeführt werden.

Aufgrund ihrer besonderen Merkmale grenzen sich diese Organismen von den anderen Klassen der Domäne der Bakterien ab. Sie bilden zusammen mit Ureaplasmen die Familie der *Mycoplasmataceae*, diese wiederum gehört der Klasse der *Mollicutes* an, zu der inzwischen mehr als 200 Spezies zählen [2, 3]. Die Klasse der *Mollicutes* eint als Merkmal das Fehlen einer Zellwand, woraus u. a. eine pleomorphe Gestalt resultiert, aber auch die primäre Resistenz gegenüber Antibiotika, die auf die Zellwandsynthese wirken. Weiterhin sind die Bakterien durch den Verlust der Zellwand anfällig für osmotische Schwankungen. So wird beispielsweise im Gegensatz zu anderen Prokaryoten Cholesterin in die Zellmembran eingebaut, um die Stabilität der Zellstruktur aufrechtzuerhalten.

Mykoplasmen gehören zu den kleinsten sich selbstreplizierenden Organismen, was sowohl auf die Zell- als auch auf die Genomgröße bezogen werden kann. Die Genomgröße dieser Bakterien variiert zwischen 580 kb (*Mycoplasma genitalium*) und 1,36 Mb (*Mycoplasma penetrans*) [4]. Das 816 kb große Genom von *Mycoplasma pneumoniae* [5, 6] entspricht beispielsweise damit nur einem Siebtel der genetischen Ausstattung von *Escherichia coli*. Die Genomgröße ist aber nicht darauf zurückzuführen, dass Vertreter der *Mollicutes* ursprüngliche Bakterien sind, sondern es wird spekuliert, dass sie sich durch sukzessive Reduktion der Erbinformationen entwickelt haben, der sogenannten degenerativen Evolution [7]. Der phylogenetische Ursprung dieser Mikroorganismen kann auf grampositive Bakterien, genauer auf die *Lactobacillus*-Gruppe mit ihrem geringen GC-Gehalt, zurückgeführt werden [8]. Weiterhin zeichnet Mykoplasmen ein alternativer genetischer Code aus, in dem das Basentriplett TGA die Aminosäure Tryptophan translatiert, wohingegen es bei anderen Prokaryoten ein Stopcodon definiert [9]. Die geringe Genomgröße begrenzt ebenfalls die enzymatische Ausstattung der Mykoplasmen, wodurch diverse Stoffwechselwege eingeschränkt werden [4, 10]. So ist sowohl die Synthese von Purinen und Pyrimidinen als auch von Aminosäuren und Fettsäuren nicht oder nur teilweise möglich [11]. Weiterhin gehören der Tricarbonsäurezyklus und die für eine funktionierende Atmungskette wichtigen Cytochrome nicht zum Repertoire der Mykoplasmen.

Die Produktion von ATP erfolgt nur über die Substratkettenphosphorylierung während der Glykolyse [12]. Aufgrund dieser Beschränkungen sind die Bakterien höchstwahrscheinlich an eine parasitäre Lebensweise angepasst, um über den Wirt mit fehlenden Bausteinen und Nährstoffen versorgt zu werden. Mykoplasmen besiedeln diverse Säugetiere, Vögel, Insekten, Reptilien, Fische und Pflanzen [13]. Unter ihnen finden sich Vertreter, die bedeutsame Pathogene für Mensch und Tier darstellen. Diese Erreger gehören größtenteils zu den Mykoplasmen und Ureaplasmen. Kolonisiert werden vor allem die Schleimhäute des Respirations- und des Urogenitaltraktes [2].

Eine *in vitro*-Kultivierung der Mykoplasmen wird nur durch komplexe Medien ermöglicht [14]. Auf festen Medien ist ein typisches Wachstum, die sogenannte ‚Spiegeleiform‘, der Kolonien zu finden, wohingegen in Flüssigkultur eher eine filamentöse Morphologie beobachtet werden kann (Abbildung 1-1).

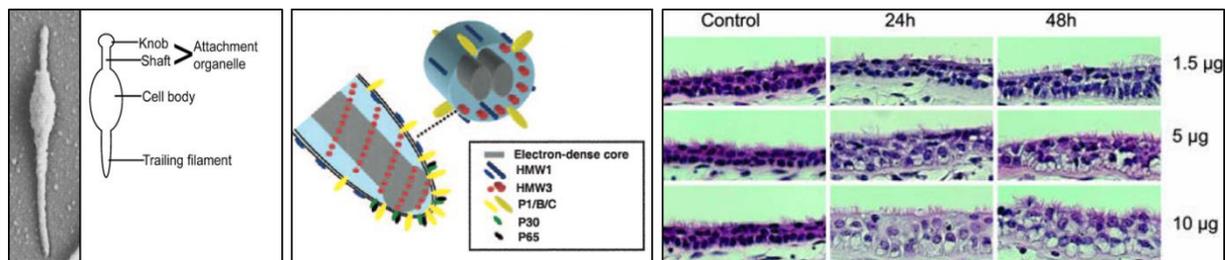


**Abbildung 1-1 Morphologievariationen von *M. pneumoniae*.** Links - spiegeleiförmige Kolonie von *M. pneumoniae* auf PLO-Agar (Dumke *et al.* unveröffentlicht), Maßstab 50 µm. Mitte - Elektronenmikroskopische Aufnahme des Wachstums auf Aclar® (Gründel *et al.* unveröffentlicht), Maßstab 0,5 µm. Rechts - Elektronenmikroskopische Aufnahme [3] ), Maßstab 1 µm.

## 1.2 *Mycoplasma pneumoniae* als Krankheitserreger

Der obligat humanpathogene Vertreter *M. pneumoniae* konnte erstmals in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts durch Eaton beschrieben werden [3, 15], worauf sich zunächst der Name ‚Eaton’s Agent‘ etablierte. Während dieser Zeit wurden diese Bakterien noch zu den Viren gezählt, doch weiterführende klinische Studien konnten das ‚Eaton’s Agent‘ zunächst als Erreger von atypischen Pneumonien beschreiben [16]. Da jedoch eine Anzucht im zellfreien Medium möglich war, aber auch eine Sensibilität gegenüber Antibiotika vorlag erfolgte die Zugehörigkeit der Spezies zu den Prokaryoten [17]. Aufgrund der neuen taxonomischen Zuordnung zu den Mykoplasmen erhielt das ‚Eaton’s Agent‘ den Namen *Mycoplasma pneumoniae* [18]. Epidemiologische Studien belegten, dass *M. pneumoniae* zu den klinisch relevanten Mykoplasmen gehört, da es vor allem bei Kindern und jungen Erwachsenen diverse Atemwegserkrankungen, wie beispielsweise Tracheobronchitis, Pharyngitis und eine atypische Pneumonie, hervorruft [19]. Der Mensch ist nach bisherigem Kenntnisstand der einzige natürliche Wirt [2]. Die Übertragung des Erregers erfolgt über

Aerosole [20]. Anschließend besiedelt er das respiratorische Flimmerepithel seines Wirtes [21, 22]. Der Krankheitsverlauf verläuft typischerweise sehr langsam, was auf die lange Replikationszeit und damit auf die Vermehrung der Mykoplasmen zurückzuführen ist. Die Inkubationszeit liegt mindestens bei zwei bis drei Wochen [3, 23, 24]. Primäre Anzeichen einer Infektion sind Halsschmerzen, trockener Husten sowie Entzündungen der Nasennebenhöhlen und Ohren, aber auch Kopfschmerzen und Fieber. Dies kann dann bis zu einer atypischen Lungenentzündung (interstitielle Pneumonie) führen. Die Häufigkeit einer *M. pneumoniae*-Infektion steigt mit Ansammlungen von Menschen, wie beispielsweise in Krankenhäusern oder Schulen [25]. Ein Ausbleiben jeglicher Symptome ist bei ungefähr 20 % der Infizierten, die dann als Träger in der Infektionskette dienen können, beschrieben [26]. Es besteht allerdings auch die Möglichkeit, dass es im Zuge der Infektion zu Komplikationen mit extrapulmonaler Manifestation kommt [27]. Es sind u. a. Enzephalitiden [28], Perikarditiden, Hauterkrankungen [29], akute Arthritiden [30] oder Arthrosen beschrieben [31]. *M. pneumoniae* tritt unabhängig vom Klima und der geografischen Lage ubiquitär sowohl endemisch in Form von kleinräumigen Infektionsausbrüchen aber auch epidemisch mit z. T. weltweit zu registrierenden Inzidenzpeaks auf [3]. Außerhalb dieser Epidemiezeiten ist der Erreger für 3-10 % aller ambulant erworbenen Pneumonien verantwortlich [32-34]. Ein epidemischer Anstieg von Infektionen durch *M. pneumoniae* kann im Schnitt alle drei bis sieben Jahre beobachtet werden [35-38]. Die Ursache für dieses Phänomen ist nicht abschließend geklärt.



**Abbildung 1-2 Virulenzfaktoren von *M. pneumoniae*.** Links - Schematische Darstellung des Attachment-Organells [39]. Mitte - Schematische Darstellung der Lokalisation der Proteine im Attachment-Organell [40]. Rechts - Auswirkungen des CARDS-Toxin auf humane Zellen [41].

Aufgrund des reduzierten Genoms von *M. pneumoniae* (816 kpb, 688 ORF's) [4, 11] ist das Repertoire an Pathogenitätsfaktoren begrenzt. Entscheidend für die Adhärenz der Bakterien an die Epithelzellen der Mukosa und damit den Start einer möglichen Wirtskolonisierung ist das polar lokalisierte Attachment-Organell (Abbildung 1-2). Diese ‚Tip‘-Struktur ist ein Komplex aus verschiedenen Proteinen, der durch Zytoskelettstrukturen stabilisiert wird [42-44]. Neben der Adhärenz spielt das ‚Attachment‘-Organell eine wichtige Rolle beim Gleitvorgang der Bakterien sowie bei der Zellteilung [45-47]. Ohne aktive Bewegung der Mykoplasmenzelle ist

eine normale Zellteilung nicht möglich [48]. Das in der Spitzenstruktur angereicherte vorkommende P1-Protein spielt als Hauptadhäsine eine besonders wichtige Rolle bei der Adhäsion und der damit verbundenen Infektion des Wirtes. Es ist ein Ligand zur Bindung an humane Moleküle, wodurch eine Interaktion zwischen Bakterium und Wirtsstrukturen maßgeblich vermittelt wird [2, 49, 50]. Unterstützt wird die Funktion des P1-Proteins durch die Adhäsine P40 und P90, die zu den akzessorischen Proteinen zählen. Ein Verlust dieser Proteine führt zur fehlerhaften Ausrichtung des Attachment-Organells, was mit einem Funktionsverlust einhergeht [49, 51]. Somit ist das P1-Protein zwar essenziell für die Adhärenz und damit die Virulenz des Erregers, aber nicht allein ausreichend für die Vermittlung der Bindung an Wirtsstrukturen [49, 52, 53]. Eingebunden in das hochkomplexe Attachment-Organell der Bakterien sind eine Vielzahl weiterer Proteine wie P30, P65, P41, P24, HMW1, HMW2 und HMW3 [39, 54-56].

Neben dem Attachment-Organell gibt es wenige weitere Pathogenitätsfaktoren, um die parasitäre Lebensweise der Bakterien zu gewährleisten. Dazu gehören zytotoxisch wirkende Proteine und Stoffwechselprodukte, wie z. B. Superoxid-Anionen und Wasserstoffperoxid. Diese bewirken eine verstärkte Zellschädigung bis hin zur Beeinträchtigung von Gewebsstrukturen [57, 58]. Da *M. pneumoniae* nicht in der Lage ist, eine Superoxid-Dismutase zu synthetisieren, nutzt der Organismus wahrscheinlich Enzyme des Wirtes, um sich selbst vor den Peroxiden zu schützen [59]. *M. pneumoniae* besitzt darüber hinaus die Fähigkeit, eine Art Exotoxin zu exprimieren. Dieses ‚Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome‘ (CARDS)-Toxin (Abbildung 1-2) ist ein dem Pertussis-Toxin ähnliches Protein, das das humane Surfactant Protein A auf den Epithelzellen des Respirationstraktes bindet und zur Zerstörung des Gewebes führt [60, 61]. Einen weiteren möglichen Virulenzfaktor stellt Schwefelwasserstoff dar, welches durch das Enzym HapE (Schwefelwasserstoff, Alanin und Pyruvat produzierendes Enzym) gebildet wird. Diese gasförmige Verbindung löst hämolytische Aktivitäten aus und führt zur Oxidation von Hämoglobin in Methämoglobin [62]. Durch diese Prozesse sichert der Organismus gleichzeitig die Akquirierung von Eisen.

Im Vergleich zu vielen anderen humanpathogenen Organismen stellt die Diagnostik von Infektionen durch *M. pneumoniae* immer noch eine Herausforderung dar. Aufgrund der langsamen Generationszeit ist ein kulturabhängiger Nachweis erst nach ca. zwei bis drei Wochen möglich. Dies setzt jedoch das Vorhandensein von Spezialnährböden (PPLO-Nährmedien) [63] voraus. Hinzu kommt, dass das Wachstum von ca. 100 µm großen Kolonien auf festem Nähragar durch weitere Methoden der Charakterisierung als

*M. pneumoniae* sicherzustellen ist, da auch Kommensalen (z. B. *M. orale*, *M. salivarium*) ähnlich wachsen können.

Aufgrund dieser Probleme in der Kultur bieten sich, insbesondere im ambulanten Bereich, für die Diagnostik von Infektionen eher serologische Nachweismethoden an, da diese deutlich schneller, sensitiver und spezifischer zu einem Ergebnis führen. Spezifitätsprobleme kommerzieller Tests, das Ausbleiben der Immunantwort bei bestimmten Patienten und in der Frühphase der Infektion sowie das häufige Fehlen von Serumpaaren eines Patienten für den Nachweis des Anstieges spezifischer Antikörper stellen jedoch auch die Aussagekraft der Resultate serologischer Verfahren infrage [64, 65]. Der schnellste, sensitivste und spezifischste Antigennachweis ist die Methode der Polymeraseketten-Reaktion (PCR). Hierbei werden verschiedene Targets im Genom der Bakterien als Zielsequenz verwendet und führen insbesondere in Verbindung mit der quantitativen real-time PCR zu diagnostisch gut verwertbaren Aussagen [3, 66].

Mykoplasmen-Infektionen sind primär gut behandelbar. Eine Pneumonie durch *M. pneumoniae* wird, insbesondere im pädiatrischen Bereich, vorzugsweise mit Makroliden behandelt, da die zellwandaktiven Betalaktamantibiotika (Penicilline, Cephalosporine) unwirksam sind. In den letzten Jahren wurden jedoch in immer stärkerem Umfang Makrolid resistente Stämme beschrieben [67], wodurch auf alternative Antibiotika mit verändertem Nebenwirkungsprofil zurückgegriffen werden muss (z. B. Fluorchinolone).

### **1.3 Die Glykolyse von *Mycoplasma pneumoniae***

Die geringe Genomgröße von *M. pneumoniae* führt zwingend zu einem eingeschränkten Metabolismus. Stoffwechselwege, wie der Pentosephosphatweg, die Atmungskette oder der Tricarbonsäurezyklus, werden unvollständig oder überhaupt nicht ausgeführt, da kodierende Gene für die entsprechenden Enzyme nicht vorliegen. Anabole Stoffwechselwege sind fast vollständig degeneriert [12, 68, 69]. Deshalb ist *M. pneumoniae* nur in der Lage, wenige Kohlenhydrate abzubauen, wie Glucose, Fructose oder Glycerol.

Der wichtigste Stoffwechselweg für die Energiegewinnung ist dabei die Glykolyse. Schritt für Schritt werden die Kohlenhydrate abgebaut und für die Gewinnung von weiteren Kohlenstoffquellen und Energie, in Form von ATP, genutzt [70, 71]. In Abbildung 1-3 sind die Glykolyse bei *M. pneumoniae* und die beteiligten Enzyme zusammengefasst. Grundsätzlich weicht der Stoffwechselweg nicht von anderen Mykoplasmen ab. Der anaerobe Abbau wird durch verschiedene Enzyme, die in einer Kette aufeinanderfolgen, sichergestellt. Der Energieträger Glucose wird dabei in die Zelle geschleust und zu Glucose-6-phosphat

umgewandelt, das durch das Enzym Glucose-6-phosphat-Isomerase (Pgi) zu Fructose-6-phosphat metabolisiert wird. Dieses Produkt entsteht ebenfalls bei der Umwandlung der Kohlenstoffquelle Fructose mithilfe der Phosphofruktokinase (FruK). Fructose-6-phosphat wird durch weitere Enzyme, wie der 1-Phosphofruktokinase (Pfk), Aldolase (Fba), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GapA), Phosphoglyceratkinase A (Pgk), Phosphoglyceratmutase (Pgm), Enolase (Eno) und der Pyruvatkinase (Pyk), zu Pyruvat umgewandelt. Dabei spielt Eno während der Substratkettenphosphorylierung eine entscheidende Rolle bei der Energiegewinnung [72], da eine Interaktion zu anderen glykolytischen Enzymen besteht [69]. Die Metabolisierung von Pyruvat wiederum kann in zwei Richtungen verlaufen: Zum einen kann über den Pyruvatdehydrogenase-Komplex, die Phosphotransacetylase (Pta) und die Acetatkinase (AckA) Acetat gebildet werden, zum anderen aber auch durch Lactatdehydrogenase (Ldh) Lactat produziert werden. Der genannte Pyruvatdehydrogenase-Komplex, der wichtig für die oxidative Decarboxylierung ist, besteht aus vier Komponenten. Dazu zählen die große (E1 $\alpha$ ; PdhA), und die kleine (E1 $\beta$ ; PdhB) Pyruvatdehydrogenase, hinzu kommen die Dihydrolipoyl-Transacetylase (E2; PdhC) und die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E3; PdhD). Die dazugehörigen vier kodierenden Gene werden in zwei Operons arrangiert [4, 73, 74]. Eine Assoziation konnte zwischen PdhA und dem P1-Protein beschrieben werden [75].

Im Prozess sind jedoch noch weitere Enzyme involviert, so ist das Enzym Triosephosphatisomerase (TpiA) wichtig für die Einführung des Energieträgers Glycerol in den Ablauf der Glykolyse. Die Enzyme Phosphomannomutase (ManB) und Transketolase (Tkt) spielen nicht direkt bei der Bildung von Pyruvat eine Rolle, aber ManB wird beispielsweise benötigt, um die reversible Umlagerung von Glucose-6-phosphat und Glucose-1-phosphat sicherzustellen. Dies ist wiederum wichtig für die Bildung von UDP-Glucose, den Baustein der Glykogensynthese. Tkt hingegen ist entscheidend für die Nukleotidsynthese.

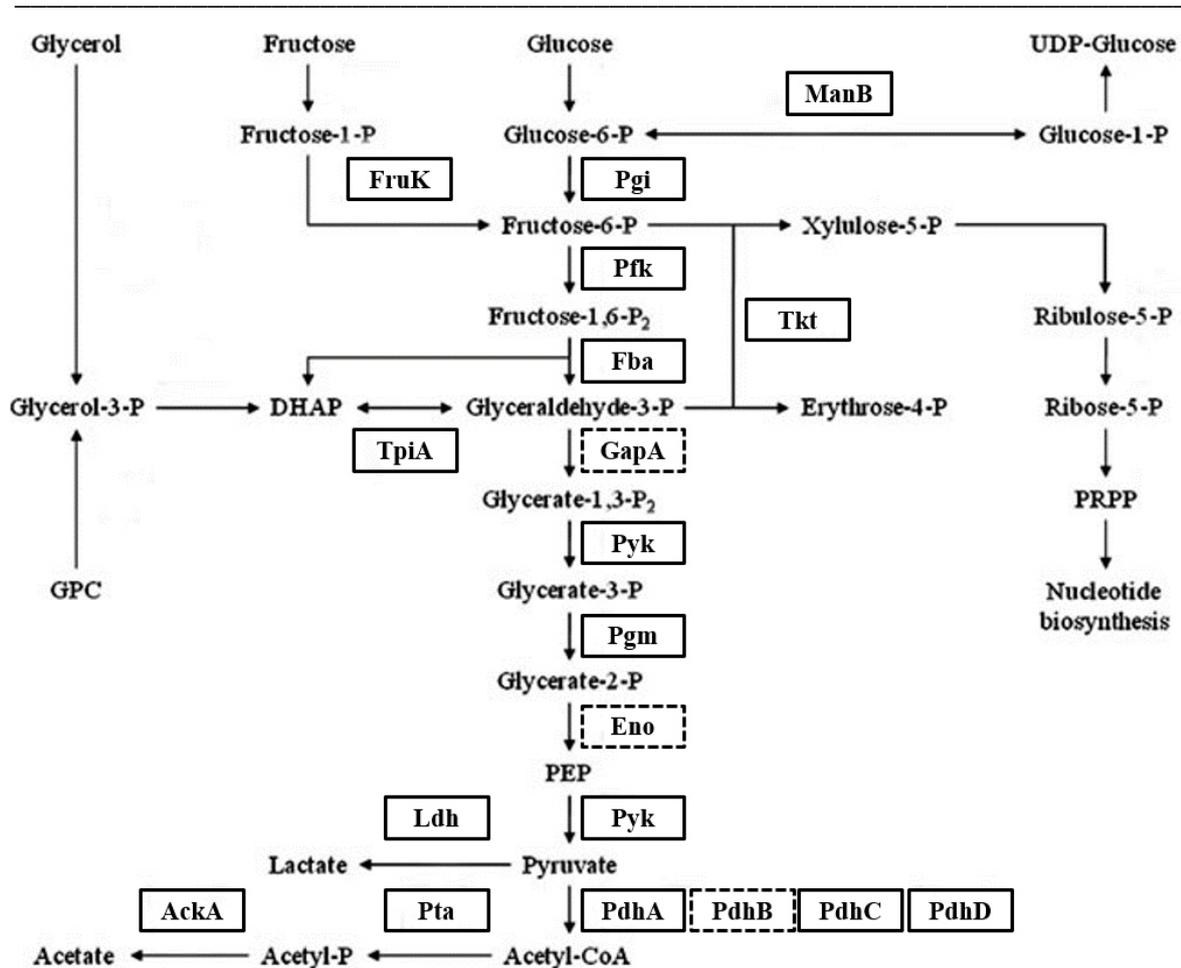


Abbildung 1-3 Die glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* im zentralen Stoffwechselweg (modifiziert nach [70]). Darstellung aller in dieser Arbeit untersuchten glykolytischen Enzyme. Gestrichelter Rahmen- Interaktion mit humanen Proteinen.

#### 1.4 Oberflächenassoziierte glykolytische Enzyme in Mikroorganismen

Neben der Hauptfunktion glykolytischer Enzyme im schrittweisen Abbau von Kohlenstoffquellen für die Energiegewinnung weisen einige von ihnen eine alternative Funktion auf. Damit gehören sie zur Klasse der sogenannten ‚moonlighting proteins‘, also zu Proteinen, die mehrere Funktionen in einem Organismus übernehmen können. Dabei sind die Aufgaben, die übernommen werden, vielfältig. Sie können beispielsweise eine Rolle während der Adhärenz, Invasion oder Evasion übernehmen [76], jedoch sind bereits auch andere Funktionen festgestellt worden. So können beispielsweise einige in der Glykolyse vorkommende Kinasen eine Bedeutung bei der Phosphorylierung von Nucleotiden besitzen [12]. Die Laktatdehydrogenase oder die NAD-Oxidase spielen eine Rolle bei der Regeneration von NAD und zusätzlich entsteht während des Prozesses das in der Pathogenese der Infektion wichtige Wasserstoffperoxid [77, 78]. Interessanterweise wird auch häufig ein extrazelluläres Auftreten der Enzyme bei diversen Organismen mit diesem Phänomen beobachtet. Inzwischen ist die Zahl der Moonlighting-Faktoren bei phylogenetisch diversen Mikroorganismen

[76, 79, 80] derart gewachsen, dass von einem weitverbreiteten Prinzip der variablen Proteinlokalisierung ausgegangen werden kann. So konnte allein GapA bei grampositiven Vertretern wie *Streptococcus pneumoniae* [81], *Bacillus anthracis* [82], Staphylokokken [83, 84] und *Listeria monocytogenes* [85], gramnegativen Organismen wie *Neisseria meningitidis* [86], *E. coli* [87], Pilzen wie *Paracoccidioides brasiliensis* [88], *Candida albicans* [79] und Protozoen wie *Trichomonas vaginalis* [80] als oberflächenassoziiert bestätigt werden. Weiterhin konnte für Eno ein extrazelluläres Auftreten bei den Bakterien *Bifidobacterium longum* [89], *Lactobacillus johnsonii* [90], *Aeromonas hydrophila* [91], diversen Streptokokken [92-95], *Pseudomonas aeruginosa* [96], [96] Pilzen wie *Saccharomyces cerevisiae* [97], *Paracoccidioides* spp. [98] und Parasiten wie *Onchocerca volvulus* [99], *Leishmania mexicana* [100] beschrieben werden. Andere bekannte oberflächenassoziierte Proteine sind Fba [101, 102] und TpiA [103-105]. Allerdings ist bisher unbekannt, durch welche Transportprozesse die glykolytischen Enzyme an die Zelloberfläche gelangen [106]. Das Vorkommen an der Oberfläche geht jedoch oft mit Interaktionen dieser Proteine mit der humanen extrazellulären Matrix sowie Komponenten des Fibrinolyse-Systems einher. Aktuelle Studien zeigen, dass die Zahl von Wirtsproteinen, die mit bakteriellen glykolytischen Enzymen interagieren, weiter steigt [107, 108].

Ein häufig beschriebener Bindungspartner für bakterielle glykolytische Enzyme ist Plasminogen (Plg). Interaktionen zwischen diesem Wirtsprotein und glykolytischen Enzymen konnte beispielsweise bei *B. animalis* subspecies *lactis* [109], *S. oralis* [104], *Borrelia burgdorferi* [110], *C. albicans* [111], *C. parapsilosis* [112] *Staphylococcus aureus* ([84, 113], Streptokokken der Gruppe B [114-116] und *N. meningitidis* [117] nachgewiesen werden. Weiterhin sind Bindungen zu Fibrinogen (Fn) [118], Laminin (Ln) [90], Fibronectin (Fc) bekannt [119-121]. In Kapitel 1.5 wird näher auf die Funktion der humanen Bindungspartner eingegangen.

Weiterhin ist oft eine Multifunktionalität eines oberflächenassoziierten Proteins mit der Bindung an verschiedene Wirtsproteine beschrieben worden. So ist Eno von *S. pyogenes* in der Lage, sowohl Plg als auch Albumin zu binden [122], für Eno von *B. anthracis* konnte eine Interaktion zu Plg sowie Ln beschrieben werden [123].

Ein extrazelluläres Auftreten sowie Bindungen von glykolytischen Enzymen zu Wirtsproteinen wurden auch bei Mykoplasmen beschrieben. So ist eine Oberflächenlokalisierung dieser Proteinklasse in *M. bovis* [124], *M. gallisepticum*, *M. suis* [125-127], *M. synoviae* [128], *M. fermentans* [129], *M. genitalium* [130, 131] und auch bei *M. pneumoniae* [32, 132] publiziert. Besonders hinzuweisen ist auf die Untersuchung von Regula *et al.* [133], die die

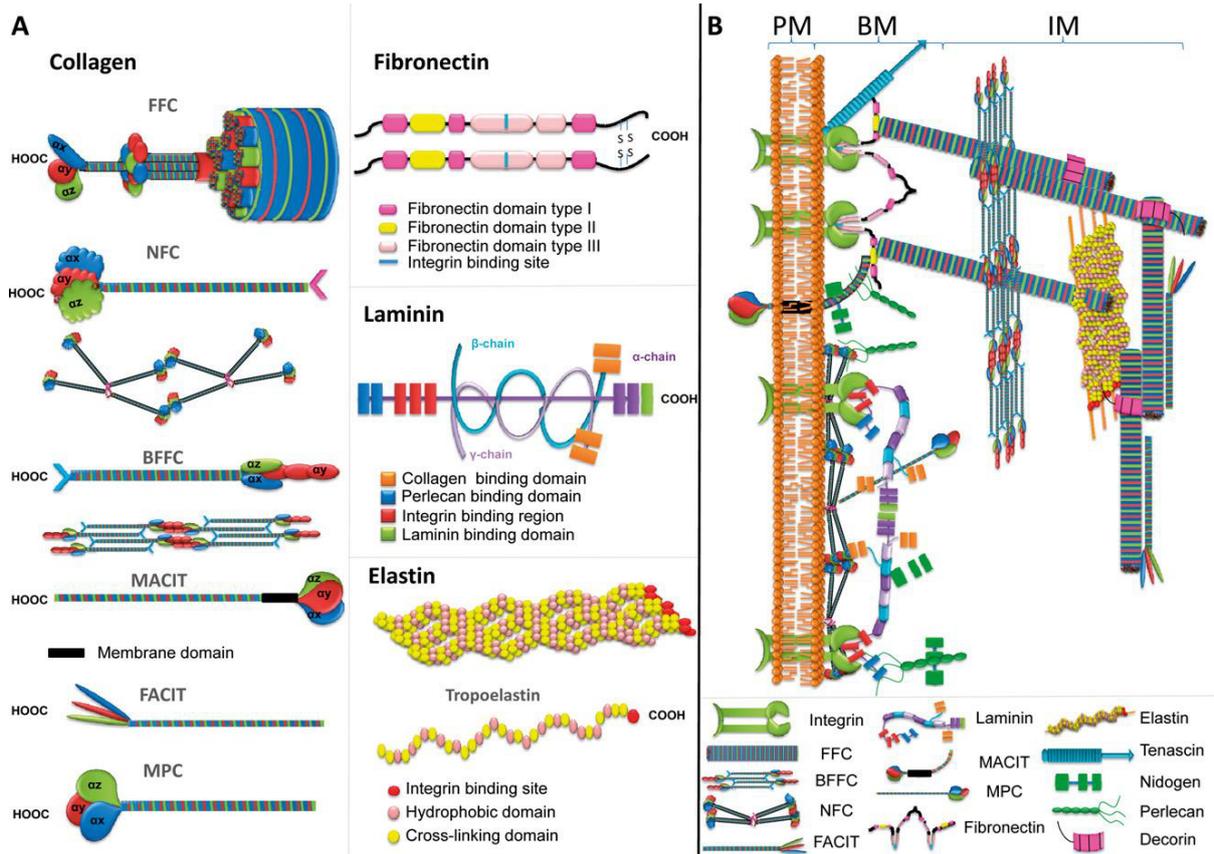
Proteine von *M. pneumoniae* in der Triton X-100-unlöslichen Phase charakterisiert. Die Fraktionierung mit diesem Detergenz separiert in dieser Phase die Proteine, die membranassoziiert sind. Mit einem Vorkommen ist auch ein Hinweis auf die mögliche Lokalisation auf der Zelloberfläche verbunden. So wurden Tkt, Pta, Fba, Ldh, GapA, PdhA und PdhB in der unlöslichen Phase der Triton X-100-Fraktionierung beschrieben [133].

Weiterhin konnte auch bei Mykoplasmen eine Bindung zu Wirtsproteinen gezeigt werden. So ist eine Plg-Bindung mit Eno bei *M. suis* [125, 127], *M. synoviae* [128], *M. gallisepticum* [134], *M. pneumoniae* [132] bestätigt. Weitere Bindungspartner von Wirtsproteinen bei den Mykoplasmen sind GapA [130, 135], Pyk [136], TpiA [131] und PdhB [118, 132].

Diese potenzielle Multifunktionalität ist eine effiziente Methode zur Nutzung der geringen Genom- und Proteinausstattung. Bisher ist allerdings unbekannt, wie die Vorgänge koordiniert werden [70]. Die Gene für die glykolytischen Enzyme auf dem Genom von *M. pneumoniae* sind verstreut und ein Teil der Proteine ist in der Lage, miteinander zu interagieren [69].

### **1.5 Humane Bindungspartner für glykolytische Enzyme**

Die Adhäsion der Bakterien an die Wirtszelle legt die Grundlage für eine erfolgreiche Kolonisation des Wirtes. Dabei spielen Interaktionen zwischen den oberflächenassoziierten Adhäsinen der Mikroorganismen und den eukaryotischen Wirtszellrezeptoren eine entscheidende Rolle [137]. Derartige Rezeptoren sind beispielsweise Proteine der extrazellulären Matrix und der Basalmembran [118]. Für *M. pneumoniae* kann dem Attachment-Organell eine besondere Bedeutung für diese Wirt-Erreger-Interaktionen zugesprochen werden. Allerdings zeigen verschiedene Studien, dass oberflächlich lokalisierte Proteine der Bakterien mit verschiedenen Komponenten der Wirtszellen interagieren können [32, 118, 138]. Zu klären bleibt, ob ausschließlich die Adhäsion vermittelt bzw. unterstützt wird, oder ob durch weitere Prozesse Virulenz bzw. Invasion beeinflusst werden.



**Abbildung 1-4 Schematische Darstellung von ECM-Komponenten.** A) auf der molekularen Ebene und B) der supermolekularen Organisation im Gewebe. FFC, fibrilläre Kollagene; BFFC, perlenschnurartige Kollagene; FACIT, fibrillenassoziierte Kollagene; MACIT, membranassoziiertes Kollagen; NFC, netzbildendes Kollagen; MPC, Verankerungsfibrillen; PM, Plasmamembran; BM, Basalmembran; IM, interstitielle Matrix [139].

Im Zuge der Adhärenz konnte für Moonlighting Proteine häufig eine Interaktion mit den Komponenten der extrazellulären Matrix beschrieben werden. Die extrazelluläre Matrix (ECM) ist die nichtzelluläre Struktur des tierischen Bindegewebes und essenziell für die Struktur, Verankerung und Versorgung von Zellen sowie für die Regeneration und Wundheilung, aber auch für die Vermittlung von Nerven- und Gefäßfunktion [140, 141]. Die komplexen Bestandteile der ECM können in die Gruppe der Fasern sowie in die Gruppe des Grundgewebes untergliedert werden, wobei die Fasern direkt ins Grundgewebe eingebettet sind. Zu den fasrigen Bestandteilen gehört die große Familie der Kollagene, aber auch Elastin kann in diesem Teil der ECM gefunden werden (Abbildung 1-4). Die Grundsubstanz hingegen stellt den ungeformten Teil der Matrix dar und besteht aus Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen sowie Adhäsinen [142]. Die erwähnten Adhäsine sind entscheidend, um den Zell-Zell-Kontakt zu erzeugen, da diese mit Zellrezeptoren interagieren können. Die Adhäsionsproteine sind sehr vielfältig, gehören häufig der Klasse der Glykoproteine an, zu denen beispielsweise Ln und Fc gehören. Die wichtigsten Bestandteile der extrazellulären Matrix und deren Organisation im Gewebe können Abbildung 1-4 entnommen werden.

Als Bindungspartner für bakterielle Proteine konnten diverse Glykoproteine der ECM wie Ln, Vitronektin (Vc), Fc und Fn identifiziert werden [143-154].

Eine Interaktion zwischen Ln und Eno konnte bei *S. aureus* [155], *L. crispatus* [90] und *B. anthracis* [123] beschrieben werden, aber auch andere glykolytische Enzyme weisen eine Bindungsaffinität zu diesem humanen Protein auf [101, 156, 157]. Weiterhin wurde bestätigt, dass bakterielle Proteasen Ln abbauen können, was unterstützend in den Prozessen der Infektion bzw. Invasion wirkt [158, 159]. Das Glykoprotein Ln ist ein wichtiger Bestandteil der ECM und kommt in jeder Basallamina vor. Die aktiven Domänen des Proteins dienen vorrangig der Bindung von Kollagen und Entactin [160], aber sie spielen auch bei der Zelladhäsion, -migration und -differenzierung eine Rolle [161-163].

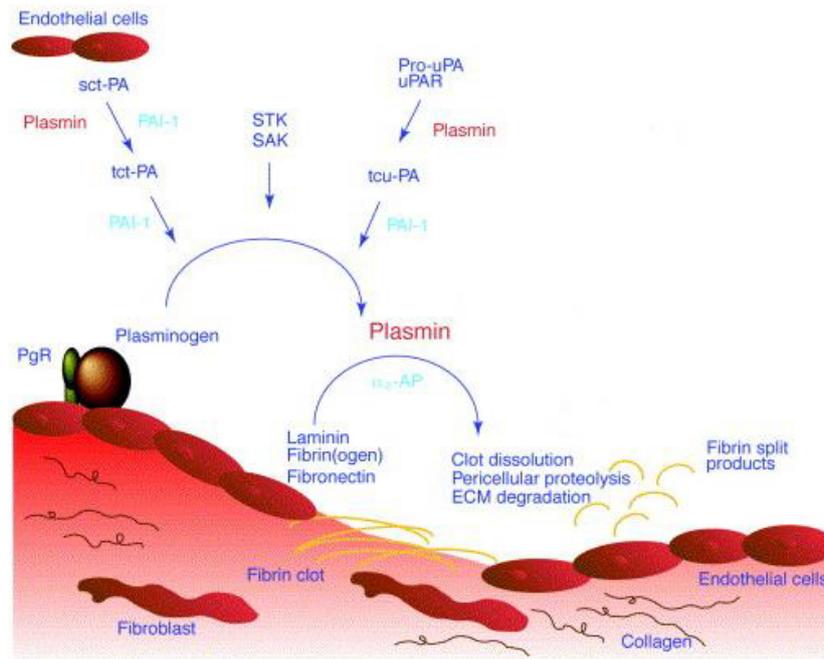
Weiterhin konnten Interaktionen bakterieller Faktoren zum Glykoprotein Fc dokumentiert werden. So wurde gezeigt, dass glykolytische Enzyme diverser Mikroorganismen an Fc binden können, wie Eno von *M. synoviae* [128], *P. brasiliensis* [119], *S. suis* [121] und *L. plantarum* [164] oder GapA von *T. vaginalis* [80] und *C. albicans* [101]. Die Arbeitsgruppe um Dallo wies bereits eine Interaktion zwischen PdhB von *M. pneumoniae* [118] und Fc nach. Die Bindung dieser ECM -Komponente durch bakterielle Proteine kann zu einer verstärkten bakteriellen Zellinvasion führen [118, 165]. Auch Fc gehört zur Klasse der Glykoproteine und kommt in zwei Varianten vor: Zum einen als unlösliches Protein der extrazellulären Matrix, zum anderen als lösliches Protein im Blutplasma, wo es ebenfalls eine Rolle bei der Thrombenbildung spielen kann.

Das Glykoprotein Fn wurde ebenfalls als Interaktionspartner bakterieller Proteine beschrieben. So ist beispielsweise durch Dumke *et al.* GapA von *M. pneumoniae* als Bindungspartner von Fn beschrieben [32], aber auch diverse Proteine grampositiver Bakterien gehen eine Bindung mit diesem ECM-Protein ein [143, 166]. Das aus drei Ketten (alpha-, beta-, gamma-Kette) zusammengesetzte Glykoprotein wird in der Leber produziert und ins Blutplasma abgegeben. Es ist eine Komponente der Koagulationskaskade, in der es durch Thrombin zu Fibrin gespalten wird. Die Ausbildung von Fibrin-Blutinseln ist wichtig für die Wundheilung, aber auch zur Abwehr bakterieller Infektionen.

Vc wird ebenfalls in der Leber produziert und spielt eine Rolle in diversen biologischen Prozessen, wie Zellmigration, Adhäsion und Angiogenese [167]. Für verschiedene Bakterien, wie *N. gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Hämophilus influenzae*, *S. aureus* und *S. pyogenes* ([152] konnten Interaktionen mit Vc nachgewiesen werden. Die Bindung an dieses Glykoprotein kann zu einer Optimierung der bakteriellen Adhärenz beispielsweise an respiratorische Epithelzellen führen [152, 168, 169].

Das ebenfalls multifunktionale Laktoferrin (Lf) gehört in die Gruppe der Transferrine. Es ist strukturell dem Transportprotein Transferrin sehr ähnlich, doch Lf bindet mit einer weit höheren Affinität Eisen und kann als Protease agieren. Im Zuge einer Infektion wird es vermehrt durch Schleimhautzellen ausgeschüttet. Dabei inhibiert das Glykoprotein das bakterielle Wachstum durch Eisenbindung. Jedoch konnten verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass Lf durch pathogene Mikroorganismen gebunden wird, um einen bestehenden Eisenmangel zu kompensieren [57, 170]. Die Arbeitsgruppe um Tryon wies eine Bindung von *M. pneumoniae* an dieses humane Protein nach [57].

Der am häufigsten beschriebene Interaktionspartner auf der Wirtsseite ist das zum Fibrinolyse-System gehörende Plg [138, 171, 172]. Dieses im Blut zirkulierende 92 kDa große Glykoprotein wird in der Leber produziert und ist die inaktive Vorläuferform der Serinprotease Plasmin. Die Aktivierung und die Rolle der Protease während der Fibrinolyse kann Abbildung 1-5 entnommen werden. Die Aktivierung von Plg erfolgt entweder über körpereigene Stoffe wie den gewebespezifischen Aktivator (tPA) oder den Urokinase-Typ Aktivator (uPA) oder über körperfremde Aktivatoren, wie die Streptokinase (STK) aus Streptokokken und die Staphylokinase (SAK) aus Staphylokokken [173]. Das multifunktionale Plasmin übernimmt verschiedene Aufgaben im Wirtsorganismus. So führt die Protease u. a. zur Degradierung von ECM-Proteinen, wie Ln, Fn und Fc [174], und spielt somit eine wichtige Rolle in der Auflösung von Thromben. Darüber hinaus kann auch der Abbau von Komplementfaktoren, wie C3b und C5, durch Plasmin erfolgen [175].



**Abbildung 1-5 Rolle von Plasmin in der Fibrinolyse, Remodellierung und Proteolyse durch direkte und indirekte Aktivierung verschiedener Kaskaden.** Selbstregulation der Plasminproduktion (rot). Darstellung der Inhibitoren (hellblau). Abkürzungen:  $\alpha_2$ -AP:  $\alpha_2$ -anti-Plasmin, ECM: Extrazelluläre Matrix, PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ-1, PgR: Plasminogen Rezeptor, Pro-uPA/tcuPA: Pro-Ketten Urokinase Plasminogen Aktivator/Zwei-Ketten Urokinase Plasminogen Aktivator; SAK, Staphylokinase; sct-PA/tct-PA, Single-Chain gewebspezifischer Plasminogen Aktivator/Zwei-Kettengewebsspezifischer Plasminogen Aktivator; STK, Streptokinase; uPAR, Urokinase Rezeptor [176].

Zu jeder Aktivierung gehört auch eine Inaktivierung, damit ein Ungleichgewicht ausgeschlossen werden kann. Die Inaktivierung der Fibrinolyse beruht zum einen auf der Hemmung des aktiven Plasmin, zum anderen auf der Blockierung der Aktivierung von Plg zu Plasmin. Eine wichtige Hemmkomponente ist der alpha-2-Plasmininhibitor ( $\alpha_2$ -AP), der zur sofortigen Inaktivierung von freiem Plasmin führt [177]. Weiterhin gibt es verschiedene Inhibitoren, die direkt die Plg-Aktivatoren hemmen, sogenannte Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI). Der wichtigste Hemmstoff ist der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) [178], der die Aktivatoren tPA und uPA inhibiert. PAI-1 wird überwiegend von den Endothelzellen und den Thrombozyten gebildet.

Eine Bindung an Plg konnte bisher für verschiedene glykolytische Enzyme diverser Mikroorganismen gezeigt werden, wie beispielsweise für *S. oralis* [104], *A. hydrophila* [91], *C. albicans* [111] oder *Leishmania mexicana* [100]. Eine Interaktion zwischen Plg und Mykoplasmen ist für *M. fermentans* [179], *M. synoviae* [128], *M. pneumoniae* [132] und *M. hyopneumoniae* [180] beschrieben. Neben der Bindung konnte darüber hinaus eine Aktivierung von Plg zu Plasmin durch Bakterien dokumentiert werden, so beispielsweise für *B. burgdorferi* [175], *S. agalctiae* [181] und *M. fermentans* [129].

## 1.6 Motivation

Ein besonderes Merkmal des humanpathogenen Bakteriums *M. pneumoniae* stellt das reduzierte Genom dar. Dadurch werden Stoffwechselwege, aber auch die Zahl der Pathogenitätsfaktoren stark begrenzt. Da der Erreger trotzdem ein erfolgreicher Parasit der respiratorischen Mukosa des Menschen ist und z. T. schwere Krankheitsbilder hervorrufen kann, besteht die Vermutung, dass bisher unbekannte Faktoren am Infektionsvorgang beteiligt sind. Durch Studien an anderen Mikroorganismen gibt es Hinweise auf die duale Rolle von Enzymen im Stoffwechsel und in der Pathogenese. Darunter finden sich glykolytische Enzyme, für die neben ihrer typischen Rolle in der intrazellulär ablaufenden Glykolyse ein extrazelluläres Vorkommen beschrieben wurde. In dieser Lokalisation interagieren diese Proteine mit verschiedenen Komponenten der humanen extrazellulären Matrix. In aller Regel ist in der Literatur bisher jedoch die Interaktion einzelner Enzyme mit ausgewählten Wirtsproteinen beschrieben.

Um diesem Phänomen einer multifunktionellen Rolle von Proteinen erstmals in Mykoplasmen komplexer nachzugehen, wird das gesamte Spektrum der glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* zunächst rekombinant hergestellt und für die Produktion von monospezifischen Antikörpern verwendet. Die anschließende Untersuchung der Lokalisation der glykolytischen Enzyme ist die Grundlage für weiterführende Experimente. Die zentrale Frage der Assoziation mit der Oberfläche der Bakterien wird durch verschiedene immunologische Techniken beantwortet. Der mögliche Zusammenhang der Lokalisation glykolytischer Enzyme mit dem Adhärenzapparat ist durch die Analyse von Mutanten, die durch den Verlust der wesentlichen Adhäsine P40, P90 und P1 gekennzeichnet sind, zu prüfen.

Für die glykolytischen Enzyme mit bestätigter Oberflächenlokalisation wird die Bindung der rekombinanten Proteine an verschiedene humane Zellen und die Interaktionen zu ausgewählten humanen ECM-Proteinen (Plasminogen, Laktoferrin, Laminin, Fibrinogen, Fibronectin und Vitronectin) untersucht. Festgestellte Bindungen zwischen Proteinen sind näher zu charakterisieren, indem der Einfluss ionischer Wechselwirkungen und der monospezifischen Seren auf die Interaktion geprüft wurde. Darüber hinaus wurde die mögliche Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin unter Verwendung verschiedener Aktivatoren in Gegenwart der entsprechenden rekombinanten Proteine getestet. Ziel der Arbeit ist es, exemplarisch für *M. pneumoniae* das gesamte Spektrum glykolytischer Enzyme auf der Oberfläche von Bakterienzellen zu charakterisieren und das Netzwerk an Interaktionen zu Komponenten der humanen ECM aufzuzeigen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Autoklav Varioklav	H+P Labortechnik (Oberschleißheim, DEU)
Begasungsbrutschrank Heracell™	Kendro Laboratory Products (Hanau, DEU)
Binokulares Mikroskop	Cambridge Instruments (Nussloch, DEU)
Blotkammer Xcell II™ Blot Modul	Invitrogen (Karlsruhe, DEU)
Elektrophoresekammer B2	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
Feinwaage BP 2100	Sartorius (Göttingen, DEU)
Fluoreszenzmikroskop (Axioskop)	Zeiss MicroImaging (Göttingen, DEU)
Gefrierschränke -20 °C	Liebherr (Bulle, CHE)
Gefrierschränke -80 °C	Colora Messtechnik (Lorch, DEU)
Kühlschränke	Liebherr (Bulle, CHE)
Magnetrührer	Faust Laborbedarf (Schaffhausen, CHE)
Mehrkanalpipette Transferpette®-8	Brand (Wertheim, DEU)
Mikrowelle	Sharp (Hamburg, DEU)
Minishaker MS1	Faust Laborbedarf (Schaffhausen, CHE)
Minizentrifuge Galaxy Mini	Merck (Darmstadt, DEU)
pH-Meter	WTW (Weilheim, DEU)
Photometer GeneQuant™ Pro	Biochrom (Cambridge, GBR)
Pipettensatz	Eppendorf (Hamburg, DEU)
Pipettierhilfe accu-jet®	Brand (Wertheim, DEU)
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph Instruments (Schwabach, DEU)
Schüttler MTS4	Faust Laborbedarf (Schaffhausen, CHE)
Sequenziergerät ABI PRISM® System 377	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Sonifier Microtip (Ultraschallsonde)	Branson (Carouge, CHE)
Spektralphotometer für 96-Well-Platten	Bio-Tek Instruments (Bad Friedrichshall, DEU)
Power Wave™ 200	
StepOne™ Real-Time PCR System	Applied Biosystem (Foster City, USA)

---

Sterilbank BSK	Antair (Mailand, ITA)
Stromversorgungsgerät E443	Consort (Tumhout, BEL)
Stromversorgungsgerät EPS 1001	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, (GBR))
Thermocycler GeneAmp® PCR-System 9700	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Thermocycler Mastercycler® Personal	Eppendorf (Hamburg, DEU)
Thermomixer comfort	Eppendorf Hamburg, DEU)
Tischzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus Instruments (Hanau, DEU)
UV-Transilluminator Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratories (München, DEU)
Überkopfschüttler Rotary Mixer	Laborbedarf A. Hartenstein (Würzburg, DEU)
Ultrazentrifuge Optima™ MAX-TLX	Beckman Coulter (Krefeld, DEU)
Vakuumentrifuge Maxi Dry Lyo	Heto Lab Equipment (Allerød, DNK)
Washer für 96-well-Platten	Tecan Austria (Grödig, AUT)
Columbus Plus Pro	
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Instruments (Hanau, DEU)

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Blotting Pads Xcell II	Invitrogen (Karlsruhe, DEU)
Einmalkanülen, steril (22G, 27G)	B. Braun (Melsungen, DEU)
Einmalpipetten Costar® Stripette® (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Corning (Corning, USA)
Einmalreaktionsgefäße (1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg, DEU)
Einmalspritzen, steril (2 ml, 10 ml)	BD Labware (Franklin Lakes, USA)
ELISA-Platten (96 Well)	Greiner Bio One (Frickenhausen, DEU)
Impfösen, steril	Greiner Bio One (Frickenhausen, DEU)
Kammer-Objekträger (Lab-Tek™ Chamber Slide™ System)	Nunc Brand Products (Roskilde, DNK)
Küvette (Quarz, Suprasil)	HelLama (Müllheim, DEU)

## Material und Methoden

---

MicroAmp Optical 96-Well Sequenzierplatte	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Mykoplasmen-Petrischale (25 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio One (Frickenhausen, DEU)
Nitrozellulose Membran Filterpapier Sandwich LC 2000	Invitrogen (Karlsruhe, DEU)
Nitrozellulose Membran Protran BA 83 (Ø 82 mm)	Schleicher & Schuell (Dassel, DEU)
NuPAGE® NOVEX 10 % Bis-Tris-Gel, 1 mm, 1 well	Invitrogen (Karlsruhe, DEU)
NuPAGE® NOVEX 10 % Bis-Tris-Gel, 1 mm, 15 Well	Invitrogen (Karlsruhe, DEU)
ParafiLam	American National Can (Chicago, USA)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym Scientific (Hess. Oldendorf, DEU)
Pipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl, 2500 µl)	Greiner Bio One (Frickenhausen, DEU)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio One (Frickenhausen, DEU)
Polypropylensäule	Qiagen (Hilden, DEU)
Säulenzentrifugator (5.000/10.000/30.000 MWCO)	Vivascience (Hannover, DEU)
Skalpell	B. Braun (Melsungen, DEU)
Zahnstocher	Franz Mensch, Hygostar (Eresing, DEU)
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio One (Frickenhausen, DEU)
Zellschaber	Greiner Bio One (Frickenhausen, DEU)

### 2.1.3 Reagenzien und Chemikalien

Agarose LE	Biozym Scientific (Hess. Oldendorf, DEU)
SlowFade® Gold Antifade Mountant	Invitrogen (Karlsruhe, DEU)
Borsäure (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	Merck (Darmstadt, DEU)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg, DEU)
Rinderserumalbumin (BSA) (2 mg/ml)	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
Chlorwasserstoff (HCl)	Merck (Darmstadt, DEU)
4-Chloro-1-naphthol	Sigma-Aldrich, Fluka (Buchs, CHE)

## Material und Methoden

---

Coomassie Brilliant Blue R250	Merck (Darmstadt, DEU)
D-(+)-Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	Merck (Darmstadt, DEU)
Dinatriumphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt, DEU)
Zellkulturmedium, Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco/Invitrogen (Carlsbad, USA)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)	Hybaid (Heidelberg, DEU)
DNA-Längenstandard: Smart-Ladder (10 kb)	Eurogentec (Seraing, BEL)
D-Val-Leu-Lys 4-Nitroanilin-Dihydrochlorid	Sigma-Aldrich (Buchs, CHE)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fermentas (St. Leon-Rot, DEU)
Essigsäure (100 %) (CH <sub>3</sub> COOH)	Merck (Darmstadt, DEU)
Ethanol (C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH)	Baker (Deventer, NLD)
Ethidiumbromid-Stammlösung (≥98 %; C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub> )	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Fibrinogen	Sigma-Aldrich (Buchs, CHE)
Fibronectin	Sigma-Aldrich (Buchs, CHE)
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories (Pasching, AUS)
Formaldehyd (Methanal)	Polysciences (Warrington, USA)
Freund's Complete Adjuvant	Sigma-Aldrich (Buchs, CHE)
Freund's Incomplete Adjuvant	Sigma-Aldrich (Buchs, CHE)
Glycerol (C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> (OH) <sub>3</sub> )	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Guanidinhydrochlorid (CH <sub>3</sub> N <sub>3</sub> HCl)	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Harnstoff (CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O)	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Hefeextrakt	Gibco BRL (Karlsruhe, DEU)
HPLC-Wasser	MP Biomedicals (Ohio, USA)
Immobilon <sup>TM</sup> Western HRP Substrate	Merck (Darmstadt, DEU)
Meerrettichperoxidase-Chemilumineszenzsubstrat	
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> S)	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Kanamycin (750 I.E./mg)	Sigma-Aldrich (Buchs, CHE)

## Material und Methoden

---

Laktoferrin ( $\geq 90$ %)	Sigma-Aldrich (Buchs, CHE)
Ladepuffer GelPilot <sup>®</sup> Loading Dye 5x	Qiagen (Hilden, DEU)
Laminin	Sigma-Aldrich (Buchs, CHE)
Luria Bertani (LB)-Agar	Difco/BD (Sparks, USA)
LB-Bouillon	Difco/BD (Sparks, USA)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck (Darmstadt, DEU)
$\beta$ -Mercaptoethanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> OS)	Ferak Berlin (Berlin, DEU)
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	Merck (Darmstadt, DEU)
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck (Darmstadt, DEU)
Natriumchlorid (NaCl)	Merck (Darmstadt, DEU)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck (Darmstadt, DEU)
Natriumhydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck (Darmstadt, DEU)
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck (Darmstadt, DEU)
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Hilden, DEU)
Nu-PAGE <sup>®</sup> MES-Running Buffer (20x)	Invitrogen (Karlsruhe, DEU)
Nu-PAGE <sup>®</sup> Transfer Buffer (20x)	Invitrogen (Karlsruhe, DEU)
Paraformaldehyd	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Penicillin G (10 mega I.E)	Jenapharm (Jena, DEU)
Pferdeserum	Gibco BRL (Karlsruhe, DEU)
Phenolrot (2 %)	Merck (Darmstadt, DEU)
Plasminogen	Sigma-Aldrich (München, DEU)
Ponceau S	Serva (Heidelberg, DEU)
Pleuropneumonia-like organism (PPLO)-Agar	Difco/BD (Sparks, USA)
PPLO-Bouillon	Difco/BD (Sparks, USA)
Protease inhibitor cocktail tablets	Roche Diagnostics (Mannheim, DEU)
L-Rhamnose-Monohydrat (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub> •H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich (München, DEU)
Natriumazid	Merck (Darmstadt, DEU)
Natriumdodecylsulfat (SDS, NaC <sub>12</sub> H <sub>25</sub> SO <sub>4</sub> )	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)

Magermilch	Difco/BD (Sparks, USA)
GoTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase 10x Puffer	Promega (Mannheim, DEU)
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) Substrat SuperSlow	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Carl Roth (Karlsruhe, DEU)
Tris-HCl	Sigma-Aldrich (München, DEU)
Octoxinol 9 (C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O(C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O) <sub>x</sub> ; x= 9-10), Triton <sup>®</sup> X-100	Sigma-Aldrich (München, DEU)
Trypsin (9,380 U/mg)	Sigma-Aldrich (München, DEU)
Polysorbat 20 (Tween20, C <sub>58</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub> )	Sigma-Aldrich (München, DEU)
Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA)	Merck (Darmstadt, DEU)
Vitronektin	Merck (Darmstadt, DEU)
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck (Darmstadt, DEU)

#### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 2-1 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Menge/ Volumen
1,5 %iges Agarosegel	Agarose	1,5 g
	1x TBE Puffer	100 ml
ELISA-Beladungspuffer	NaCl	1,46 g
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1,06 g
	NaHCO <sub>3</sub>	0,84 g
	Aqua dest.	100 ml
Blockungspuffer für ELISA und Western Blot	1x PBS	45 ml
	FKS	5 ml
	Tween 20	0,2 µl
Coomassie-Entfärber	CH <sub>3</sub> OH	90 ml
	CH <sub>3</sub> COOH	30 ml
	Aqua dest.	180 ml
Coomassie Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R250	4 Tabletten

## Material und Methoden

	CH <sub>3</sub> OH		80 ml
	CH <sub>3</sub> COOH		20 ml
	Aqua dest.		100 ml
Ethidiumbromidlösung (1 mg/l)	Ethidiumbromid-Stammlösung		400 µl
	Aqua dest.		100 ml
MES-Puffer	NuPAGE® MES-Running Buffer		50 ml
	Aqua dest.		950 ml
10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), Stammlösung	NaCl		88 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		16,5 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		2,2 g
	Aqua dest.	ad	1000 ml (pH 7,2)
Ponceau S-Lösung	Ponceau S		0,1 g
	CH <sub>3</sub> COOH		5 ml
	Aqua dest.	ad	100 ml
1x Probenpuffer (Ladepuffer für Proteine)	Tris		3,03 g
	SDS		1 g
	NaN <sub>3</sub>		0,01 g
	Aqua dest.	ad	40 ml (pH 6,8)
	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> (OH) <sub>3</sub>		5 ml
	Bromphenolblau		0,1 ml
	Aqua dest.	ad	50 ml
Puffer A (pH=8)	CH <sub>3</sub> N <sub>3</sub> HCl		286,59 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		6,89 g
	Tris-HCl		0,78 g
	Aqua dest.	ad	500 ml
Puffer B (pH=8)	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O		286,59 g
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		6,89 g
	Tris/HCl		0,78 g
	Aqua dest.	ad	500 ml
Puffer C	wie Puffer B		(pH 6,3)

## Material und Methoden

Puffer D	wie Puffer B	(pH 5,9)
Puffer E	wie Puffer B	(pH 4,5)
10x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE), Stammlösung	Tris	108,9 g
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	55,69 g
	EDTA	9,3 g
	Aqua dest.	ad 1000 ml
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)-Puffer	NuPAGE® Transfer Buffer	50 ml
	CH <sub>3</sub> OH	200 ml
	Aqua dest.	750 ml
Substratlösung für Immunoblot	4-Chloro-1-naphthol	6 mg
	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> OH	2 ml
	1x PBS	10 ml
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	7 µl

### 2.1.5 Bakterienstämme und Nährmedien

Tabelle 2-2 Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>		
Stamm M129	Wildtyp, Subtyp 1	ATCC 29342
Stamm B170 (MPN142)	ΔP40, ΔP90	zur Verfügung gestellt durch AG Herrmann (ZMBH, Universität Heidelberg, DEU)
Stamm IV22a (MPN141)	ΔP1	zur Verfügung gestellt durch AG Herrmann (ZMBH, Universität Heidelberg, DEU)
Stamm P01 <sup>-</sup> (MPN474)	ΔP01	zur Verfügung gestellt durch AG Herrmann (ZMBH, Universität Heidelberg, DEU)
<i>Escherichia coli</i>		
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>F<sup>-</sup> ompT hsdSB (rB<sup>-</sup> mB<sup>-</sup>) gal dcm (DE3)</i>	Novagen (San Diego, USA)

## Material und Methoden

<i>E. coli</i> NovaBlue	<i>endA1 hsdR17 (rK12- mK12+)</i> <i>supE44 thi-1</i>  <i>recA1 gyrA96 relA1</i> <i>lac[F'proA+B+lacIqZΔM15</i> <i>::Tn10(tetR)]</i>	Novagen  (San Diego, USA)
<i>E. coli</i> ® 10G	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>endA1 recA1 Φ80dlacZΔM15</i> <i>ΔlacX74 araD139</i> <i>Δ(ara,leu)7697 galU galK rpsL nupG</i> <i>λ- tonA</i>	Lucigen Corporation  (Middleton, USA)

**Tabelle 2-3 Zusammensetzung der verwendeten Medien.**

Medium	Zusammensetzung	Menge/ Volumen
PPLO-Bouillon	PPLO-Grundbouillon	21 g
	Glucose	14 g
	Aqua dest.	700 ml autoklavieren
	Pferdeserum	200 ml
	Hefeextrakt	100 ml
	Penicillin G	5 ml
	NaOH	2,5 ml (pH 7,8)
PPLO-Agar	PPLO-Grundmedium	7 g
	Aqua dest.	140 ml
	Pferdeserum	40 ml
	Hefeextrakt	20 ml
	Penicillin G	1 ml
	2 M NaOH (pH 7,8)	0,2 ml
LB-Bouillon (Difco)	Basispulver	25 g
	Aqua dest.	1000 ml autoklavieren
	ggf. Zugabe von Kanamycin (30 mg/ml)	1 ml
LB-Agar (Difco)	Basispulver	25 g
	Aqua dest.	1000 ml autoklavieren
	ggf. Zugabe von Kanamycin (30 µg/ml)	1 ml

### 2.1.6 Zelllinien und Zellkulturmedien

Tabelle 2-4 Übersicht über verwendete Zelllinien und den entsprechenden Nährmedien.

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft	Zellkulturmedium
HeLa	humane Zervixkarzinomazellen, adhärent	ATCC CCL-2	DMEM + 10 % FKS
MRC-5	humane fetale Lungenfibroblasten  adhärent	ATCC CCL-171	MEM + 10 % FKS
A549	humane  Lungenepithelzellen  adhärent	ATCC CCL-185	DMEM + 10 % FKS

### 2.1.7 Kits

Atto 488 Protein Labeling Kit	Jena Bioscience (Jena, DEU)
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology (Rockford, USA)
BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Foster City, USA)
BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit	Novagen (Madison, USA)
Dynabeads® Protein A Immunoprecipitation Kit	Life Technologie (Carlsbad, USA)
Expresso™ Rhamnose Cloning and Expression System	Lucigen (Middleton, USA)
MSB® Spin PCRapace Kit	Invitek (Berlin, DEU)
QIAamp® DNA Mini and Blood mini Kit	Qiagen (Hilden, DEU)
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen (Hilden, DEU)
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, DEU)
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden, DEU)

## 2.1.9 Antikörper

Tabelle 2-5 Verwendete Antikörper mit der entsprechenden Herkunft.

Bezeichnung	Herkunft
<b>Meerschweinchen</b>	
Antiseren gegen die rekombinanten Proteine FruK, Pgi, ManB, Pfk, Fba, Tkt, GapA, TpiA, Pgg, Pgm, Eno, Pyk, Ldh, AckA, Pta, PdhA, PdhB, PdhC, PdhD	AG Dumke (TU Dresden, DEU)
anti-P12	AG Dumke (TU Dresden, DEU)
anti-PIS	AG Dumke (TU Dresden, DEU)
anti-P30	AG Dumke (TU Dresden, DEU)
anti-Membranfraktion der Proteine von <i>M. pneumoniae</i> M129 (Ultrazentrifugation)	AG Dumke (TU Dresden, DEU)
anti-Zytosolfraktion der Proteine von <i>M. pneumoniae</i> M129 (Ultrazentrifugation)	AG Dumke (TU Dresden, DEU)
anti-M129 s.c. (subkutane Immunisierung mit Gesamtantigen <i>M. pneumoniae</i> M129)	AG Dumke (TU Dresden, DEU)
anti-M129 i.n. (intranasale Immunisierung mit Gesamtantigen <i>M pneumoniae</i> M129)	AG Dumke (TU Dresden, DEU)
<b>Kaninchen</b>	
anti-Plasminogen	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
anti-Fibronektin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
anti-Laminin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
anti-Vitronektin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
anti-Laktoferrin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
anti-Collagen	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
anti-TX-100-unlösliche Fraktion von <i>M. pneumoniae</i> M129	AG Herrmann (ZMBH, Universität Heidelberg, DEU)
anti-TX-100- lösliche Fraktion von M129	AG Herrmann (ZMBH, Universität Heidelberg, DEU)
anti-Goat IgG Peroxidase	Dako (Glostrup, DNK)
<b>Ziege</b>	
anti-Fibrinogen	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
anti-Guinea pig IgG Peroxidase	Dako (Glostrup, DK)
anti-Mouse IgG Peroxidase	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

anti-Guinea pig IgG-FITC	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
anti-Rabbit IgG-TRITC	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<b>Maus</b>	
anti-His(tidine)-Tag	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
<b>Schwein</b>	
anti-Rabbit IgG Peroxidase	Dako (Glostrup, DNK)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von *Mycoplasma pneumoniae*

Die Stämme *M. pneumoniae* M129 und P01<sup>-</sup> wurden jeweils in 50 ml PPLO-Bouillon in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) angezüchtet. Die Ernte der Bakterien erfolgte nach dem Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase ( $10^7$ - $10^8$  KBE/ml), die am Farbumschlag des Kulturmediums von Rot zu Gelb zu erkennen ist. Die adhärennten Mykoplasmen wurden zweimal mit PBS gespült und in 2 ml 1x PBS mithilfe eines Zellschabers aufgenommen. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 10.000 g für 15 min. Die pelletierten Mykoplasmen wurden in 1 ml 1x PBS resuspendiert und durch eine 27G-Kanüle gezogen, um mögliche Zellaggregate zu lösen. Anschließend wurde die Zellsuspension für eine weitere Kultivierung oder zur Gewinnung des Gesamtantigens verwendet. Nachdem die Proteinkonzentration mittels des BCA-Protein Assay Kits nach den Angaben des Herstellers ermittelt wurde (vgl. Kapitel 2.2.5.2), erfolgte die Lagerung des Gesamtantigens bei -20 °C.

Die nicht-adhärennten Mutationsstämme *M. pneumoniae* Iv22a und B170 wurden ebenfalls in PPLO-Bouillon angezüchtet. Im Unterschied zu den Stämmen M129 und P01<sup>-</sup> wurde auf einem Plattformschüttler bebrütet, damit sich die nicht-adhärennten Zellen in stetiger Bewegung befanden. Die Mykoplasmen-Ernte erfolgte auch in diesem Fall beim Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase. Die Bakteriensuspensionen wurden bei 4.000 g für 15 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml 1x PBS gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 10.000 g) wurden die pelletierten Zellen in 1 ml PBS resuspendiert und ebenfalls durch eine 27G-Kanüle gezogen.

Die Anzucht auf PPLO-Agar erfolgte durch Ausplattieren geeigneter Verdünnungsstufen einer Flüssigkultur auf PPLO-Agar-Platten. Anschließend wurden diese Platten bei 37 °C für acht Tage inkubiert und für weitere Experimente verwendet.

### **2.2.2 Kultivierung von *Escherichia coli***

Die Anzucht der *E. coli*-Stämme wurde in LB-Bouillon oder auf LB-Agar unter Zugabe des Antibiotikums Kanamycin mit einer Endkonzentration von 30 µg/ml (alle *M. pneumoniae*-spezifischen Gene wurden in Vektoren mit integrierter Kanamycin-Resistenz kloniert) durchgeführt. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eine Einzelkolonie mit dem korrekten Insert wurde für die Flüssigkultur verwendet, die auf einem Schüttler bei 37 °C und 200 rpm inkubiert wurde.

### **2.2.3 Kultivierung humaner Zelllinien**

Die adhärennten MRC5-, A549- und HeLa-Zellen wurden mit dem entsprechenden Medium (Tabelle 2-4) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Begasungsbrutschrank angezchtet. Die Passage erfolgte bei 100 % Konfluenz des Zellrasens. Die Zellen wurden für 5 min bei 37 °C mit Trypsin inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in DMEM aufgenommen und in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

### **2.2.4 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.4.1 DNA-Isolation**

Zur Isolation der genomischen DNA wurde das QIAamp DNA Mini Kit (Protokoll: DNA-Purification from Blood or Body Fluids) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Elution der DNA erfolgte mit zweimal 100 µl Elutionspuffer, anschließend wurde die Konzentration bestimmt und die Reinheit photometrisch überprüft. Die isolierte DNA wurde als Template für nachfolgende Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzt.

#### **2.2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase-chain reaction, PCR)**

Die Vervielfältigung der DNA-Abschnitte erfolgte unter Verwendung der GoTaq<sup>®</sup>-Polymerase (Tabelle 2-6).

Tabelle 2-6 Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes.

Reaktionskomponente	Volumen [ $\mu$ l]	Endkonzentration
5 x Green GoTaq <sup>®</sup> PCR-Puffer	10	1 x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
Desoxynukleotide (2 mM je dNTP)	4	0,16 mM je dNTP
Vorwärtsprimer (10 pmol)	1	0,2 pmol/ $\mu$ l
Rückwärtsprimer (10 pmol)	1	0,2 pmol/ $\mu$ l
GoTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase	0,25	1,25 U
Nuklease-freies Wasser	ad. 50	
Template	5	

Die Amplifikationen erfolgten im Thermocycler unter den in Tabelle 2-7 beschriebenen Bedingungen:

Tabelle 2-7 Programmablauf der PCR.

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	} 30
Anlagerung	variabel	1 min	
Elongation	72 °C	variabel (1 min/kb)	
Finale Elongation	72 °C	5 min	1
Reaktionsende	4 °C	$\infty$	

### 2.2.4.3 Multiple Mutation Reaction (MMR)

Die MMR stellt eine Methode dar, um Punktmutationen innerhalb einer Gensequenz einzuführen. Diese von Hames *et al.* [182] etablierte Methode wurde eingesetzt, um TGA-Codons in den untersuchten *M. pneumoniae*-spezifischen Genen gegen TGG-Codons auszutauschen (Tabelle 2-8).

**Tabelle 2-8 Zusammensetzung der Multiple Mutation Reaction.**

Reaktionskomponente	Volumen [ $\mu$ l]	Endkonzentration
10 x Ampligase Puffer	5	1 x (1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )
Desoxynukleotide (2 mM je dNTP)	5	0,2 mM je dNTP
Vorwärtsprimer (10 pmol)	1	0,2 pmol / $\mu$ l
Rückwärtsprimer	1	0,2 pmol / $\mu$ l
Mutationsprimer (10 pmol)	1	0,2 pmol / $\mu$ l
Pfu DNA Polymerase	1	2,5 U
Ampligase	3	15 U
Nuklease-freies Wasser	ad. 50	
DNA-Template	5	

Die Amplifikationen wurden im Thermocycler unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Tabelle 2-9):

**Tabelle 2-9 Programm der MMR.**

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	2 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	} 35
Anlagerung	variabel	1 min	
Elongation	68 °C	variabel (1 min /kb)	
Finale Elongation	68 °C	5 min	1
Reaktionsende	4 °C	$\infty$	

#### 2.2.4.4 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die Durchführung der horizontalen Gelelektrophorese erfolgte mit 1,5 %igen Agarosegelen. Hierzu wurden 7,5  $\mu$ l der PCR-Produkte in die Taschen des Agarosegels geladen und anschließend bei 5 V/cm Spannung für 70 min der Größe nach aufgetrennt. Zur Identifikation der Produktgröße wurde der Standard Smart Ladder (10 kb) verwendet. Die Gele wurden mittels Ethidiumbromidlösung gefärbt. Die anschließende Detektion und Dokumentation der Banden wurde mithilfe eines UV-Transilluminators durchgeführt.

#### **2.2.4.5 Aufreinigung von PCR-Produkten**

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte unter Verwendung des QIAquick PCR Purification Kits nach den Angaben des Herstellers. Traten neben dem gewünschten Fragment in der Gelelektrophorese unerwünschte Banden auf, so wurde die interessierende Bande ausgeschnitten, mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Die PCR-Produkte wurden mit 50 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und bis zur Wiederverwendung bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.4.6 Ligationsunabhängige Klonierung**

Mithilfe der Ligationsunabhängigen Klonierung konnten PCR-Produkte direkt in den pET-30 Ek/LIC Expressionsvektor oder in den pRham<sup>TM</sup> Vektor ohne vorherige Ligation kloniert werden. Dafür wurde das pET-30-Ek/LIC-Vector-Kit bzw. das Expresso<sup>TM</sup> Rhamnose Cloning Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet.

#### **2.2.4.7 Transformation von *Escherichia coli* NovaBlue**

Der *E. coli*-Stamm NovaBlue ist durch eine hohe Transformationsrate gekennzeichnet, weshalb erst dieser Stamm mit den entsprechenden Vektoren transformiert wurde, bevor die Transformation des Expressionsstammes BL21(DE3) erfolgte. Die NovaBlue GigaSingle<sup>TM</sup> kompetenten Zellen waren im pET-30 Ek/LIC-Vector-Kit enthalten. Die Transformation wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Transformierte Klone wurden anschließend auf LB-Agarplatten mit Kanamycin (30 µg/ml) selektioniert.

#### **2.2.4.8 Kolonie-Screening**

Zur Isolation von Klonen mit Plasmiden, in die die interessierenden Gensequenzen von *M. pneumoniae* integriert sind, wurden *E. coli*-Kolonien nach dem Zufallsprinzip mit einem Zahnstocher gepickt, auf LB-Agar mit Kanamycin ausgestrichen und das verbliebene Material danach direkt als Template in einen PCR-Ansatz überführt. Die verwendeten Primer sind der Tabelle I- 2 im Anhang zu entnehmen. Die Amplifikate der PCR, die die entsprechende Größe zeigten, wurden durch Sequenzierung (Kapitel 2.2.4.9) überprüft.

### 2.2.4.9 Sequenzierung

Zur Sequenzierung der PCR-Produkte wurde eine abgewandelte Form der Kettenabbruchmethode nach Sanger [183] verwendet. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden unverdünnt in die Sequenzierreaktionen (Tabelle 2-10) eingesetzt.

Tabelle 2-10 Pipettierschema für einen Ansatz der Sequenzierreaktionen.

Reaktionskomponente	Volumen [µl]	Endkonzentration
Big Dye Terminator	2	
Primer	1	1,67 pmol/µl
Nuklease-freies Wasser	1	
PCR-Produkt	2	

Die Amplifikationen erfolgten im Thermocycler unter folgenden Bedingungen (Tabelle 2-1):

Tabelle 2-11 Programm-Ablauf der Sequenzier-Reaktion.

	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94 °C	10 sec	} 25
Anlagerung	variabel	5 sec	
Elongation	72 °C	240 sec	
Reaktionsende	4 °C	∞	

Anschließend wurden die Produkte der Sequenzier-PCR mithilfe des MSB<sup>®</sup> Spin PCRapace Kit nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt, für 30 min in einer Vakuumentrifuge getrocknet und bis zur Sequenzierung bei -20 °C gelagert. Die Sequenzierung wurde unter Verwendung des Sequenzierers ABI-PRISM-3100-Genetic-Analyser am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene an der TU Dresden durchgeführt. Für die Auswertung der DNA-Sequenzen wurden die Programme Bio Edit und DNASTAR 6 (Module: EditSeq, Megalign und SeqMan) genutzt.

### 2.2.4.10 Plasmidpräparation

Die Isolation der Plasmide erfolgte unter Nutzung des QIAprep Spin Miniprep Kit nach den Angaben des Herstellers. Für die Plasmidpräparation wurden 10 ml einer

*E. coli*-Übernachtskultur verwendet. Bis zur Transformation wurde die Plasmid-DNA bei -20 °C gelagert.

#### **2.2.4.11 Transformation von *Escherichia coli* BL21(DE3)**

Die Transformation von *E. coli* BL21(DE3), ein Stamm mit hoher Expressionsrate, erfolgte ebenfalls unter Verwendung des pET-30Ek/LIC-Vector-Kits der Firma Novagen nach den Angaben des Herstellers. Für die Transformation wurde 1 µl Plasmid-DNA des *E. coli* Stammes NovaBlue verwendet. Die Anzucht der Klone sowie die Selektion erfolgten wie unter Kapitel 2.2.4.8 beschrieben.

#### **2.2.4.12 Transformation von *Escherichia cloni***

Die Transformation von *E. cloni* erfolgte ebenfalls unter Verwendung des Expresso Rhamnose Cloning and Expression Systems der Firma Lucigen nach den Angaben des Herstellers. Die Anzucht der Klone sowie die Selektion erfolgten wie unter Kapitel 2.2.4.8 beschrieben.

#### **2.2.4.13 Herstellung der Glycerolkultur**

Für die Langzeitlagerung von erfolgreich transformierten Klonen wurde eine Glycerolkultur hergestellt und dazu 4 ml der entsprechenden *E. coli*-Kulturen (Kapitel 2.2.2) für 10 min und 10.000 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 800 µl LB-Bouillon (mit 30 µg/ml Kanamycin) resuspendiert, auf 1 ml mit Glycerol aufgefüllt und bei -80 °C gelagert.

### **2.2.5 Protein- und immunchemische Methoden**

#### **2.2.5.1 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine**

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden 2x250 ml LB-Medium (mit 30 µg/ml Kanamycin) mit 12,5 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes angeimpft. Anschließend wurde die Kultur für 2 h bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zugabe von 1 mM IPTG startete die Expression und nach einer weiteren Inkubationszeit von 5 h bei 37 °C wurden die Zellen mittels Zentrifugation (20 min, 4.000 g) geerntet. Die Pellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Für die Expression mittels *E. cloni* wurden dem LB-Medium der Übernachtskultur 0,5 % Glucose und 30 µg/ml Kanamycin zugesetzt. Die Hauptkultur (2x250 ml LB-Bouillon mit 30 µg/ml Kanamycin) wurde mit der Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600nm}=0,6$ ) inkubiert. Die Induktion erfolgte mit dem Monosaccharid Rhamnose (Endkonzentration 0,2 %). Nach weiteren 5 h wurde die Kultur abzentrifugiert und das Zellpellet bei -80 °C gelagert.

Die Isolation und Aufreinigung der His<sub>6</sub>-markierten Proteine wurde mithilfe der Ni<sup>2+</sup>-NTA-

Affinitätschromatografie unter denaturierenden Bedingungen vorgenommen. Dafür wurden die Zellpellets in 7 ml Puffer A resuspendiert und für 1 h auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Ein Zentrifugationsschritt (15 min, 10.000 g) diente der Abtrennung von Zellresten. Parallel zur Inkubationsphase wurden 2,5 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose durch je achtmaliges Waschen mit Aqua bidest. und Puffer A äquilibriert. Danach wurde die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose mit dem Zellysatsatz versetzt, für 45 min auf dem Überkopfschüttler inkubiert und auf die Polypropylensäule geladen. Nacheinander wurde die Agarose mit 10 ml Puffer A, 15 ml Puffer B, 10 ml Puffer C gewaschen. Die Elution erfolgte mit 6 ml Puffer D und 6 ml Puffer E. Die einzelnen Fraktionen wurden unter Berücksichtigung der Ausschlussgröße mittels Säulenzentrifugatoren aufkonzentriert. Zur Kontrolle der rekombinanten Proteine schloss sich nach Auftrennung der Proteine mittels Elektrophorese (Kapitel 2.1.5.2) eine Coomassie-Blau-Färbung des Gels (Kapitel 2.2.5.4) und der Immunoblot an (Kapitel 2.2.5.6).

### **2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des BCA-Protein-Assay Kits der Firma Pierce nach den Angaben des Herstellers.

### **2.2.5.3 Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit ihres Molekulargewichtes wurde das NuPAGE-System der Firma Invitrogen verwendet. Hierfür wurden 100 µg der entsprechenden Proteineluate oder des Gesamtantigens mit dem gleichem Volumenanteil Ladepuffer versetzt, für 10 min bei 100 °C denaturiert und anschließend auf präperative oder analytische Gele aufgetragen. Der mitgeführte Standard (SeeBlue Plus2 Prestained) diente der Abschätzung des Molekulargewichtes der angefärbten Proteine. Die Elektrophorese wurde bei 200 V und 115 mA in MES-Puffer durchgeführt.

### **2.2.5.4 Coomassie-Blau-Färbung**

Um die rekombinanten Proteine anzufärben, wurden die Gele für 45 min in einer Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung geschwenkt. Nach dem anschließenden Waschschrift mit Coomassie-Entfärberlösung konnten die Proteinbanden visualisiert werden.

### **2.2.5.5 Western Blot**

In der SDS-PAGE (Kapitel 2.2.5.3) aufgetrennte Proteine wurden mithilfe einer Semidry-Apparatur auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurden zuvor Blottingpads, zwei Filterpapiere und eine Nitrozellulosemembran mit TBE-Puffer äquilibriert. Drei Blottingpads und ein Filterpapier wurden luftblasenfrei auf die Kathode gelegt, dann wurden das ungefärbte

Polyacrylamidgel, eine Nitrozellulosemembran, ein weiteres Filterpapier und drei Blottingpads aufgelegt. Bei 30 V und 170 mA wurde der Transfer auf die Membran innerhalb 1 h vollzogen. Mittels Ponceau-S-Färbung konnte die erfolgreiche Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran kontrolliert werden. Anschließend wurde die Membran für 2 h mit Blockpuffer auf einem Plattformschüttler inkubiert, um das Ponceau zu entfärben und unspezifische Bindungsstellen abzudecken.

### **2.2.5.6 Immunoblot**

Mithilfe des Immunoblots sind durch Antigen-Antikörper-Reaktion spezifisch Proteine auf der Nitrozellulosemembran oder im Colony Blot (Kapitel 2.2.7.5) nachweisbar. Dafür wurden die Primärantikörper in geeigneten Verdünnungen in Blockpuffer auf die Membran gegeben und bei Raumtemperatur für 90 min inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS + 0,1 % Tween 20 entfernt. Danach wurde der in Blockpuffer verdünnte peroxidasemarkierte Sekundärantikörper zugegeben und für 90 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Detektion entweder konventionell durch eine frisch hergestellte Substratlösung oder mittels Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrates nach den Angaben des Herstellers. Die entstandene Chemilumineszenz wurde unter Verwendung des BioImagers LAS-3000 aufgenommen. Um die Reaktivität der Seren auf ihre Spezifität zu testen, wurde das Gesamtantigen von *M. pneumoniae* M129 per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die verwendeten Verdünnungen der Primär sowie der Sekundärantikörper ist der Tabelle I- 4 zu entnehmen.

### **2.2.5.7 ELISA (engl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay)**

Der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde u. a. zur Bestimmung der quantitativen Reaktivität von antigenspezifischen Antikörpern eingesetzt. Mithilfe dieser Methode konnten z. B. Unterschiede zwischen den monospezifischen Seren gegen die rekombinanten Proteine überprüft werden. Dazu wurden 96-Well-Platten über Nacht mit 10 µg/ml *M. pneumoniae*-Gesamtantigen in Beladungspuffer (50 µl/Well) bei 4 °C beladen. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS + 0,1 % Tween 20 (ELISA-Waschpuffer) wurden unspezifische Bindungsstellen mit Blockpuffer (100 µl/Well) abgedeckt. Anschließend wurde der Primärantikörper hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 90 min bei 37 °C wurden ungebundene Antikörper abgewaschen und der peroxidasekonjugierte Sekundärantikörper hinzugegeben (50 µl; Inkubationszeit: 90 min bei 37 °C). Die Verdünnungen des Primärantikörpers und des Sekundärantikörpers sind Tabelle I- 3 im Anhang zu entnehmen und wurden in Vorversuchen ausgetestet. Bei der vergleichenden Messung von Reaktivitäten

wurden alle Antikörper in der gleichen Verdünnung verwendet (Primärantikörper: 1:250; Sekundärantikörper: 1:750). Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Visualisierung der Antigen-Antikörper-Bindung durch die Zugabe des Substrates TMB (50 µl). Die Reaktion wurde durch 50 µl 1 N Chlorwasserstoff abgestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Das Mitführen einer Negativprobe (Beladungspuffer ohne Antigen) dient der Charakterisierung der unspezifischen Reaktivität. In weiteren ELISA-Testungen wurden die Primärantikörper-Verdünnungen variabel je nach ihrer Reaktivität eingesetzt. Die entsprechenden Verdünnungen sind Tabelle I-3 zu entnehmen.

### **2.2.6 Tierexperimentelle Arbeiten**

#### **2.2.6.1 Herstellung von Antiseren**

Zur Gewinnung von polyklonalem Antiserum wurde für alle untersuchten rekombinanten Proteine ein Meerschweinchen (Charles River Wiga Deutschland GmbH) immunisiert. Alle Eingriffe fanden unter Narkose mit 50 mg/ml Ketamin und 7 % Xylazin statt. Die subkutante Grundimmunisierung erfolgte mit einer Mischung aus 100 µg Protein in 200 µl PBS und 100 µl komplettem Freund's Adjuvanz. Die Tiere wurden nach 28 Tagen und nach 42 Tagen geboostert. Dafür wurden 100 µg rekombinantes Protein in 200 µl PBS mit 100 µl inkomplettem Freund's Adjuvanz emulgiert und subkutan injiziert.

Die intranasale Immunisierung zur Gewinnung von Gesamtantigensserum durch eine Aufnahme der Bakterien, die dem natürlichen Infektionsweg weitgehend entspricht, wurde durch tropfenweise intranasale Applikation frisch gewachsener Mykoplasmen durchgeführt (ohne Adjuvanz). Die Zeitabstände für die intranasalen Boosterungen entsprachen denen der subkutanen Immunisierungen.

#### **2.2.6.2 Gewinnung der polyklonalen Seren**

Zehn Tage nach der letzten Boosterung wurden die narkotisierten Meerschweinchen mittels Herzpunktion entblutet. Das abgezogene Blut wurde in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen gesammelt und 3 h bei 4 °C gekühlt. Das Serum wurde durch Zentrifugation (3.000 g, 20 min) gewonnen, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Wenn erforderlich, wurde das Serum für 30 min bei 56 °C inaktiviert.

### 2.2.6.3 Aufreinigung der Antiseren

Die zur Immunisierung verwendeten rekombinanten Proteine wurden von *E. coli* Spezies produziert. Trotz der Aufreinigung der Proteine über Affinitätschromatografie sind Kontaminationen mit *E. coli*-Proteinen und die Produktion von Antikörper gegen diese Proteine in der Immunisierung nicht auszuschließen. Es wurde versucht, diese Fremdkörper zu entfernen.

Dazu wurden für die Gewinnung des Gesamtantigens der entsprechenden *E. coli*-Spezies 10 ml LB-Bouillon beimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Kultur wurde für 20 min bei 4.000 g zentrifugiert, das daraus resultierende Pellet wurde in 0,5 ml sterilem PBS resuspendiert und zur Freisetzung intrazellulärer Proteine für mindestens 20 min bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mittels Ultraschallbehandlung von 10x15 sec lysiert. Das Gesamtantigenlysat wurde auf 5 ml mit PBS aufgefüllt, zu einer Nitrozellulosemembran (5x5 cm) gegeben und für 60 min auf einem Plattformschüttler bei 37 °C inkubiert. Das Lysat wurde verworfen. Die Membran wurde dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und mit Blockpuffer bei 37 °C für 1 h behandelt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde die Membran in eine neue Schale überführt und über Nacht mit 3 ml des zu reinigenden Antiserums (1:50 Verdünnung in PBS) inkubiert. Die Fremdkörper binden hierbei an die *E. coli*-spezifischen Antigene an der Membran. Die gereinigten Antikörper wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.2.7 Lokalisationsuntersuchungen

#### 2.2.7.1 Fraktionierung des *Mycoplasma pneumoniae*-Gesamtantigens

Um die Proteine der Glykolyse in der *M. pneumoniae*-Zelle lokalisieren zu können, wurden verschiedene Fraktionierungen durchgeführt. Das *M. pneumoniae*-Gesamtantigen wurde dazu durch Ultrazentrifugation in eine Zytosolfraktion (intrazellulär lokalisierte Proteine) und in eine Membranfraktion (membranassoziierte Proteine) getrennt. Alternativ wurden die Gesamtproteine unter Verwendung von Triton X-100 in die lösliche und unlösliche Fraktion (membranassoziiert) aufgetrennt.

### **2.2.7.1.1 Fraktionierung des *Mycoplasma pneumoniae*-Gesamtantigens mittels**

#### **Ultrazentrifugation**

Verschiedene Mykoplasmenstämme (*M. pneumoniae* M129, B170, Iv22a und P01<sup>-</sup>) wurden angezüchtet und geerntet (Kapitel 2.2.1). Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt (Kapitel 2.2.5.2) und mit PBS auf 2 mg/ml eingestellt. Nach einer Ultraschallbehandlung von 10x 15 sec wurden die aufgeschlossenen Zellen für 10 min bei 6.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Zellreste wurden verworfen und der Überstand wurde für 1 h bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet stellte die Membranfraktion dar, während der Überstand die Proteine der Zytosolfraktion enthielt. Das Pellet wurde in 200-500 µl PBS mit Proteaseinhibitor resuspendiert. Die Lagerung der Fraktionen erfolgte bei -20 °C.

### **2.2.7.1.2 Fraktionierung des *Mycoplasma pneumoniae* Gesamtantigens mittels Triton X-100 (TX-100)**

Die TX-100-Fraktionierung führt ebenfalls zu einer Trennung des *M. pneumoniae* Gesamtantigens in zytosol- (wässrige Fraktion) und membranassoziierte Proteine (TX-100-unlösliche Fraktion) der Zellen. *M. pneumoniae* M129 wurde, wie beschrieben, angezüchtet, geerntet und zentrifugiert (10 min, 10.000 g). Das Zellpellet wird in 800 µl PBS mit Proteaseinhibitor aufgenommen und es werden 200 µl TX-100 (10 %ig) zugegeben. Die Suspension wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert. In einem Zentrifugationsschritt (12.000 g, 30 min bei 4 °C) werden die lösliche (Überstand) und die unlösliche TX-100-Fraktion (Sediment) gebildet. Die unlösliche Fraktion wurde in PBS resuspendiert und alle Fraktionen wurden bei -20 °C gelagert.

### **2.2.7.2 Wachstumshemmung durch monospezifische Antiseren und Abgabe der Proteine in den Überstand**

Um den Einfluss der monospezifischen Seren gegen die jeweiligen rekombinanten Proteine auf das Wachstum der Mykoplasmen zu untersuchen, wurden die hitzeinaktivierten Seren im Verhältnis 1:10 der PPLO-Bouillon hinzugefügt. Als Hemmkontrolle diente die Zugabe des Serums gegen das Gesamtantigen von *M. pneumoniae* M129 sowie das Präimmunserum. Die Ansätze wurde mit *M. pneumoniae* M129 beimpft und bei 37 °C für zwei Tage inkubiert. Die Beeinflussung des Wachstums wurde optisch und durch Messung des pH-Wertes geprüft. Um die Sekretion der glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* zu analysieren, wurde der Überstand von 100 ml Flüssigkultur in der logarithmischen Wachstumsphase gewonnen, ohne die Zellen vom Kulturflaschenboden abzulösen. Das Material wurde durch

Säulenkonzentratoren (MWCO 10.000) auf das Zehnfache aufkonzentriert. Die Detektion der Proteine erfolgte in einer ELISA-Reaktion (Kapitel 2.2.5.7), wobei der aufkonzentrierte Kulturüberstand unverdünnt als Antigen fungierte.

### 2.2.7.3 Immunfluoreszenz

Der Nachweis glykolytischer Enzyme an der Oberfläche der Mykoplasmenzelle erfolgte mithilfe der Immunfluoreszenz. Es wurden Mykoplasmen, wie im Kapitel 2.2.1 beschrieben, angezüchtet. Die Zellen wurden 1:10 mit PPLO-Bouillon verdünnt, je 1 ml in die Kavitäten eines Kammer-Objektträgers gegeben und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die adhären Zellen wurden dreimal mit temperiertem PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 10 % Formaldehyd in PBS für 20 min bei Raumtemperatur. Nach drei Waschstufen (2x PBS und 1x H<sub>2</sub>O) und der Blockierung (10% FKS in PBS) wurde der Primärantikörper (Meerschwein-Antikörper gegen die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Proteine) in einer 1:250 Verdünnung hinzugegeben. Als Kontrolle diente zum einen das Serum gegen das nur im Zytosol vorkommende Eno sowie das extrazelluläre GapA. Nach der Inkubation (30 min bei 37 °C) und dem Waschen (2x PBS und 1x H<sub>2</sub>O) wurden die Zellen mit einem zweiten Primärantikörper (1:250) gegen die TX-100-unlösliche Phase des *M. pneumoniae* M129 Gesamtantigens behandelt. Dieser Antikörper wurde im Kaninchen produziert und wird als Positivkontrolle mitgeführt, um die Mykoplasmenzelle nachzuweisen. Nach dem Waschen der Zellen wurden zwei Sekundärantikörper in einer 1:500 Verdünnung hinzugegeben, ein FITC-markiertes anti-Meerschweinchen- und ein TRITC-markiertes anti-Kaninchen-Serum, und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem letzten Waschstufen wurden die Kammern entfernt und die Objektträger luftgetrocknet. Die Proben wurden in Antifade-Medium eingebettet und mit einem Deckglas versehen. Die Detektion erfolgte unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskopes (Filter Set 44 von Carl Zeiss). Die spezifischen Informationen sind Tabelle 2-12 zu entnehmen.

**Tabelle 2-12 Fluoreszenzfarbstoffe mit den entsprechenden Filtereigenschaften.**

Fluorochrom	Anregungswellenlänge [nm]	Farbteiler	Emissionsfilter
FITC	495	FT 500	517
TRITC	545	FT 500	610

### 2.2.7.4 Chymotrypsin- und Trypsinverdau

Diese Methode wurde alternativ verwendet, um oberflächlich lokalisierte Proteine nachweisen zu können. Durch den milden Verdau mit einer häufig schneidenden Protease sind bei diesen Proteinen Abbauprodukte zu erwarten. Dafür wurden frisch geerntete Mykoplasmen (Kapitel 2.2.1) in 1 ml PBS aufgenommen. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurden je 200 µg Protein mit Trypsin in aufsteigenden Konzentrationen (0 bis 100 µg/ml) für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem anschließenden Zentrifugationsschritt (15 min bei 13.000 g) wurden die Pellets in 100 µl PBS resuspendiert, mit Proteinladepuffer versetzt und für 15 min bei 99 °C gekocht. Die Gesamtproteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der mögliche Verdau der glykolytischen Proteine wurde mithilfe der monospezifischen Seren untersucht. Das Serum gegen Eno diente als Kontrolle, dass kein Abbau zytosolischer Proteine stattfand. Das Serum gegen den C-terminalen Bereich des Proteins P1 wurde verwendet, um den erfolgreichen Abbau der Membranproteine zu kontrollieren. Die weitere Durchführung im Immunoblot erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.6 beschrieben.

In einem weiteren Versuch wurde das Enzym Chymotrypsin in aufsteigenden Konzentrationen (0 bis 100 µg/ml) verwendet. Dieses Enzym schneidet bevorzugt nach aromatischen Aminosäuren. Intakte Mykoplasmen wurden ähnlich behandelt wie mit Trypsin (Inkubation hier bei 30 °C) und auch die Detektion wurde vorgenommen wie zuvor beschrieben.

Um die grundsätzliche Abbaubarkeit der Enzyme zu belegen, wurden die rekombinanten Proteine ebenfalls mit Trypsin und Chymotrypsin (je 0 und 40 µg/ml), wie im oberen Abschnitt beschrieben, behandelt.

### 2.2.7.5 Colony Blot

Es kann angenommen werden, dass oberflächenassoziierte Proteine stabil auf den Mykoplasmen zu finden und über einen Colony Blot zu detektieren sind. Dazu wurden die Proteine von auf PPLO-Agar gewachsenen, acht Tage alten Mykoplasmen Kolonien geblottet, indem ein Stück Nitrozellulosemembran luftblasenfrei auf die Agarplatte abgelegt wurde. Nach einer fünfminütigen Inkubation wurde die Membran vorsichtig abgezogen, für 15 min bei Raumtemperatur luftgetrocknet und dreimal für 5 min mit Blockpuffer gewaschen. Die Detektion glykolytischer Enzyme wurde wie im Kapitel Immunoblot (Kapitel 2.2.5.6) durchgeführt. Positive Reaktionen sind durch dunkel gefärbte Kolonien gekennzeichnet. Dabei diente das Serum gegen das Gesamtantigen von *M. pneumoniae* M129 als Positivkontrolle sowie das Präimmenserum als Negativkontrolle.

Des Weiteren wurden frisch angezüchtete Mykoplasmenkolonien mit Trypsin,

Carboxypeptidase und Chymotrypsin (0 und 50 µg/ml), wie im Kapitel 2.2.5.6 beschrieben, behandelt und detektiert, um den Einfluss der Proteasen auf den Nachweis von Oberflächenproteinen mittels Colony Blot zu prüfen.

### **2.2.7.6 Untersuchung von Mutantenstämmen**

Die Einbeziehung verschiedener Mutationsstämme ermöglicht Aussagen, ob die Lokalisierung glykolytischer Proteine an der Zelloberfläche in Abhängigkeit zum Vorkommen ausgewählter Adhäsionsproteine steht. Dazu wurden die Stämme *M. pneumoniae* Iv22a, P01<sup>-</sup> und B170 angezüchtet (Kapitel 2.2.1), die Gesamtproteine in die Membran- und Zytosolfraktion aufgetrennt und als Antigene im ELISA (Kapitel 2.2.5.7) eingesetzt. Zusätzlich wurden für diese Stämme die Colony Blot-Technik und die Immunfluoreszenz angewendet, um mögliche Differenzen zum Stamm *M. pneumoniae* M129 zu analysieren.

### **2.2.7.7 Komplexbildungspotenzial der Pdh-Untereinheiten**

Im Zuge der Untersuchungen wurde die Oberflächenlokalisierung der Pdh-Komponenten von *M. pneumoniae* bestätigt. Die Fragestellung, ob die Pdh-Untereinheiten einen Komplex an der Oberfläche der Mykoplasmenzellen bilden, wurde durch Crosslinking- und Co-Immunpräzipitations-Experimente geklärt. Dafür wurden Mykoplasmen angezüchtet und geerntet (Kapitel 2.2.1). Anschließend wurde die Proteinkonzentration (Kapitel 2.2.5.2) der Zellen bestimmt und mit PBS auf 0,5 mg/ml eingestellt. Die Bakteriensuspension wurde dann mit Paraformaldehyd (Endkonzentration 1 %) für 60 min bei Raumtemperatur fixiert, für 15 min bei 6.000 g zentrifugiert und in 500 µl PBS resuspendiert. Die Co-Immunpräzipitation wurde mit dem Dynabeads Protein A Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Antikörper gegen das rekombinante Protein PdhB wurde an die Beads gekoppelt, für die Präzipitation 500 µl Bakteriensuspension zu dem Antikörper-Beads-Komplex gegeben und 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das gefällte Antigen wurde mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und im Immunoblot verwendet. Die Detektion der Antigene erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.6 beschrieben. Damit war es möglich, Proteine, die mit PdhB gekoppelt sind, aus der Suspension auszufällen und mit den spezifischen Antiseren nachzuweisen.

## 2.2.8 Bindungsstudien

### 2.2.8.1 Bindung rekombinanter Proteine an die humanen Zelllinien HeLa, MRC-5 und A549

Nach der Bestätigung der Lokalisierung an der Mykoplasmenoberfläche stand die Frage im Fokus, ob diese rekombinanten Proteine an humane Zellen adhäreren. Dazu wurde ein ELISA verwendet.

HeLa-, MRC-5- und A549-Zellen wurden wie beschrieben angezchtet (Kapitel 2.2.3), mittels Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in PBS aufgenommen. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt (Kapitel 2.2.5.2). Die ELISA-Platten wurden mit der Zellsuspension (100 µg/ml) beladen und 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die rekombinant hergestellten Proteine (15 µg/ml) zu den humanen Zellen gegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C wurden ungebundene Proteine durch Waschen entfernt und gebundene Proteine mit den jeweiligen monospezifischen Antiseren detektiert (Kapitel 2.2.5.7). Zur Standardisierung wurden parallel Vertiefungen der ELISA-Platten nur mit den rekombinanten Proteinen (15 µg/ml) beladen und mit den spezifischen Antikörpern inkubiert. Die Werte der optischen Dichte wurden anschließend mit denen der Kavitäten mit an humanen Zellen gebundenen Proteinen ins Verhältnis gesetzt.

Des Weiteren sollte eine Vorinkubation der rekombinanten Proteine mit den entsprechenden Antiseren zu einer Blockierung der Bindung an die Zellen führen. Hierfür wurden 15 µg/ml der rekombinanten Proteine mit den jeweiligen Antiseren (1:50) für 2 h auf einem Überkopfschüttler inkubiert, bevor diese, wie oben beschrieben, zu den humanen Zellen gegeben wurden.

Zusätzlich wurde zum Nachweis einer Interaktion von rekombinanten Proteinen und humanen Zellen die Immunfluoreszenz genutzt. Dafür wurden Zellen (50.000/ml) in die Kavitäten eines Kammer-Objektträgers eingesät und über Nacht bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde am nächsten Tag abgenommen, die Zellen wurden zweimal mit warmen PBS gewaschen und mit 10 %igem Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden die rekombinanten Proteine, die mit dem Farbstoff Atto 488 markiert waren, in einer Konzentration von 25 µg/ml zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Für die Markierung der rekombinanten Proteine wurde das Atto 488 Protein Labeling Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet. Nach erneutem Waschen wurden die gebundenen Proteine unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops detektiert (Kapitel 2.2.5.6). Als Negativkontrolle diente das Teilstück P8 des P1-Proteins, ein Peptid, das nicht an HeLa-Zellen bindet sowie als Positivkontrolle das Teilstück P12, ein Peptid, das an HeLa-Zellen bindet [184].

Auch für die Fragestellung einer möglichen Bindung der glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* an Komponenten der ECM lassen die Resultate der Experimente mit humanen Zellen Rückschlüsse zu. Um zu prüfen, welche humanen ECM-Proteine sich auf der Oberfläche der Zellen befinden, wurde ein ELISA sowie die Immunfluoreszenz, wie in den Kapitel 2.2.5.7 und 2.2.7.3 beschrieben, durchgeführt. Für den ELISA wurden die humanen Zellen an die Kavitäten einer 96-Well Platte gebunden und mit Seren gegen ausgewählte ECM-Proteine behandelt. Die dabei eingesetzten Verdünnungen sind Tabelle I- 3 zu entnehmen. Die Detektion erfolgte mit den HRP-konjugierten Sekundär-Antikörpern (je 1:1.000) spezifisch für den Wirt, aus dem die entsprechenden Primär-Antiseren gewonnen wurden.

Für die Immunfluoreszenz wurden Zellen in den Kavitäten eines Kammer-Objektträgers angezüchtet. Anschließend wurden die spezifischen Seren gegen die humanen Proteine Plg, Vc, Lf, Ln und Fc hinzugegeben (je 1:500). Nach Zugabe des TRITC-markierten Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:750 erfolgte die Detektion im Fluoreszenzmikroskop.

### **2.2.8.2 Adhärenzhemmtest**

Um Hinweise zu erhalten, ob oberflächenlokalisierte glykolytische Enzyme die Adhärenz von *M. pneumoniae* beeinflussen, wurde ein Test auf ELISA-Basis durchgeführt. HeLa-Zellen wurden mithilfe eines Schabers vom Zellkulturflaschenboden gelöst und in 1 ml PBS resuspendiert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Zellsuspension auf 100 µg/ml eingestellt und zur Beladung von 96-Well-Platten eingesetzt. Parallel wurde eine 48 h-alte Mykoplasmenkultur (vgl. Kapitel 2.2.1) geerntet und auf eine optische Dichte (600 nm) von 0,441 eingestellt. Die Experimente erfolgten in 500 µl Ansätzen, bei der eine 1:20-Verdünnung der eingestellten Mykoplasmen in PBS mit 25 % (v/v) PPLO-Bouillon und 10 % (v/v) Antiserum verwendet wurde. Die Ansätze wurden für 90 min bei 37 °C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die derart vorbehandelten Mykoplasmen wurden anschließend für 2 h bei 37 °C zu den mit HeLa-Zellen beladenen Kavitäten der 96-Well-Platten gegeben. Die Detektion der gebundenen Mykoplasmen erfolgte unter Verwendung des Serums gegen die TX-100-unlöslichen Proteine, die aus dem Kaninchen stammten. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.2.5.7 beschrieben. Zusätzlich wurde das Präimmunserum eines unbehandelten Meerschweinchens als Negativkontrolle sowie ein polyspezifisches Serum gegen die Gesamtproteine von *M. pneumoniae* M129 als Positivkontrolle mitgeführt.

### **2.2.8.3 Bindung humaner ECM-Proteine an *Mycoplasma pneumoniae* und an die oberflächenassoziierten rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme**

Zunächst wurden die humanen Proteine mithilfe des Atto 488 Protein Labeling Kits nach den Angaben des Herstellers markiert. Anschließend wurden die markierten Proteine (10 µg/ml) zu den fixierten Mykoplasmenzellen in den Kammer-Objektträgern gegeben. Die Mykoplasmen wurden wie beschrieben angezchtet (Kapitel 2.2.1). Nach einer Inkubation von 90 min bei 37 °C auf einem Plattformschüttler wurden ungebundene Proteine durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Mykoplasmen mit dem Serum gegen TX-100-unlösliche Fraktion (1:250) für 90 min bei 37 °C auf einem Plattformschüttler behandelt und anschließend mit PBS gewaschen. Die Detektion der gebundenen humanen Proteine sowie der markierten Mykoplasmen erfolgte mithilfe des Fluoreszenzmikroskops.

Eine schnelle Möglichkeit zur Überprüfung potenzieller Bindungspartner ist die Dot Blot Technik. Dafür wurden 2 µl der rekombinanten Proteine (1 mg/ml) und BSA als Negativkontrolle auf eine Nitrozellulosemembran getropft und für 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend wurde die Membran 3x15 min geblockt und die ausgewählten ECM-Proteine (je 10 µg/ml) über Nacht bei 4 °C oder 2 h bei Raumtemperatur hinzugegeben. Ungebundene Proteine wurden durch Waschen entfernt (3x10 min) und die Membran mit den entsprechenden Antisera (Tabelle I- 4) für 90 min bei Raumtemperatur auf einem Plattformschüttler behandelt. Die Detektion erfolgte mittels peroxidasemarkiertem Sekundäntikörper, für den ebenfalls eine Inkubationszeit von 90 min bei Raumtemperatur gewählt wurde. Die Reaktion wurde unter Verwendung des Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrates nach den Angaben des Herstellers und des Bioimagers LAS-3000 visualisiert.

Die Interaktion zwischen *M. pneumoniae* M129, den rekombinanten Proteinen und den ECM-Proteinen wurde weiterhin in einem ELISA untersucht. Dafür wurden Kavitäten einer 96-Well-Platte mit *M. pneumoniae* Gesamtantigen (100 µg/ml) oder rekombinantem Protein (15 µg/ml) beladen und anschließend geblockt. Anschließend wurden die ECM-Proteine in ansteigender Konzentration (0; 5; 25; 50 µg/ml) für 2 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C hinzugegeben. Die Detektion der gebundenen humanen Proteine erfolgte mit den entsprechenden ECM-Seren und den dazugehörigen HRP-markierten Konjugaten.

#### 2.2.8.4 Charakterisierung der Bindung der glykolytischen Enzyme von

##### *Mycoplasma pneumoniae* an humane ECM-Proteine

Bindungen der glykolytischen Enzyme an ECM-Proteine können durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden. Dazu gehören monospezifische Antikörper, die an die rekombinanten Proteine binden und mögliche Interaktionsstellen zu den ECM-Proteinen blockieren können. Zur Untersuchung dieses Einflusses wurden je nach Versuchsansatz 96-Well-Platten mit den rekombinanten Proteinen (15 µg/ml) für 2 h bei 37 °C beladen und geblockt. Zeitgleich wurden die ECM-Proteine (Plg 5 µg/ml; Lf 2,5 µg/ml; Vc 5 µg/ml; Ln 20 µg/ml, Fn 15 µg/ml; Fc 15 µg/ml) mit den Seren gegen die rekombinanten Proteine (Verdünnung 1:50) für 90 min auf einem Überkopfschüttler bei Raumtemperatur vorinkubiert. Die behandelten humanen Proteine wurden anschließend zu den rekombinanten Proteinen gegeben und für 2 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte mit den Antiseren gegen die entsprechenden ECM-Proteine und den Konjugatseren (Tabelle I- 3). Einen weiteren Einfluss auf Interaktionen zwischen glykolytischen Enzymen und den ECM-Proteinen können ionische Wechselwirkungen haben, da die bakteriellen Enzyme eine große Zahl geladener Aminosäuren besitzen. Die Bindungen sind durch die Zufuhr von Salzen zu beeinflussen. Um diesen Einfluss zu testen, wurden 96-Well-Platten mit den rekombinanten Proteinen (15 µg/ml) beladen und anschließend geblockt. Danach wurden die ECM-Proteine in Lösungen mit Salzen in ansteigender Konzentration hinzugegeben. Bei den verwendeten Salzen handelte es sich um Natriumchlorid (NaCl) und Natriumbromid (NaBr), die in Konzentrationen von 0; 62,5; 125; 250; 350; 650 mM in Lösung vorlagen. Die übrigen Versuchsbedingungen entsprachen denen zum Nachweis des Einflusses der Antiseren. Auch in Gegenwart der Salze wurde für 2 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Detektion der gebundenen ECM-Proteine erfolgte unter Verwendung der Antiseren gegen die ECM-Proteine und den entsprechenden Konjugaten.

Einige Aminosäuren haben einen stärkeren Einfluss auf die Bindung an ECM-Proteine als andere. So besitzt Lysin eine hohe Affinität zu Plg. Beruht die Bindung der glykolytischen Proteine mit ECM-Proteinen auf den Lysin-Resten, kann die Bindung durch den Einsatz von Lysin-Analoga reduziert werden. Um dies zu überprüfen, wurde das Lysin-Analogon ε-Aminocapronsäure in einer Konzentration von 1 mM verwendet, das ebenfalls direkt zu den ECM-Proteinen hinzugegeben wurde. Die Versuchsbedingungen und die Detektion der ECM-Proteine entsprachen den in diesem Kapitel erwähnten Experimenten.

### 2.2.8.5 Plasmin-Enzymaktivitätsassay

Plasminogen ist das inaktive Proenzym von Plasmin. Die Protease Plasmin spielt u. a. eine wichtige Rolle bei der Fibrinspaltung (Fibrinolyse), einem wesentlichen Vorgang im körpereigenen Gerinnungssystem. Die Bindung von *M. pneumoniae* Proteinen an Plg könnte das Aktivierungspotenzial von Plg zu Plasmin begünstigen, sofern bei gebundenen Plg für die Aktivierung wichtige Bindungsstellen von den glykolytischen Proteinen beeinflusst werden. Deshalb wurde in Gegenwart von humanen Aktivatoren die Generierung von Plasmin aus dem Komplex von Plg und rekombinantes Protein untersucht. Die Plasminbildung kann durch Umsatz eines spezifischen Substrates im ELISA detektiert werden.

Die rekombinanten Proteine (10 µg/ml) wurden zur Beladung der 96-Well Platten verwendet. Als Kontrolle dienten BSA als nicht Plg bindendes Protein und Beladungspuffer. Nach dem Waschen und Blocken wurde humanes Plg (10 µg/ml) für 2 h bei 37 °C zugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe des humanen Urokinase-Typ Plasminogen-Aktivators (uPA) oder des gewebespezifischen Aktivators (tPA) in einer Konzentration von 5 ng/Well und des Plasmin-spezifischen Substrates D-Val-Leu-Lys 4-Nitroanilin-Dihydrochlorid (0,5 mM). Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und die optische Dichte bei 405 nm nach 16 h gemessen.

Um einen Effekt der rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme auf die Aktivierung von Plg zu Plasmin ohne den Einfluss der unterschiedlichen Bindungskapazität von Plg an verschiedene Proteine zeitabhängig zu analysieren, wurden 96-Well-Platten mit den rekombinanten Proteinen (25 µg/ml) beladen. Im Anschluss an den Blockierungsschritt für 1 h bei 37 °C erfolgte die Zugabe eines Gemisches aus Substrat (0,6 mM), Aktivatoren (tPA oder uPA, 5 ng/Well) und Plg (7,5 µg/ml). Die Platte wurde bei 37 °C gelagert und nach definierten Zeitpunkten bei einer Wellenlänge von 405 nm ausgelesen.

### 2.2.8.6 Abbau von ECM-Proteinen in Gegenwart von rekombinanten Proteinen und humanem Plasminogen

Die Peptidase Plasmin ist in der Lage, diverse Proteine zu spalten. Die Bindung der rekombinanten Proteine an Plg könnte den Prozess beeinflussen. Um diesen Aspekt der Interaktion zu untersuchen, wurde ein Immunoblot verwendet. Rekombinante Proteine (25 µg/ml) wurden an die Kavitäten einer 96-Well-Platte über Nacht bei 4 °C gebunden. Nach dem Waschen und Blockieren wurde humanes Plg (15 µg/ml) hinzugeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden Fn und andere ECM-Proteine (jeweils Plg-frei) in einer Konzentration von je 10 µg/ml zusammen mit uPA oder tPA (5 ng/Well) pipettiert. Das Endvolumen betrug 50 µl und die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Die Probenahme wurde nach

verschiedenen Zeitpunkten (0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 24 h) vorgenommen. Zu jedem Zeitpunkt wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1:1 verdünnt. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C 10 min inkubiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion der ECM-Proteine erfolgte unter Verwendung der spezifischen Antikörper und den dazugehörigen Konjugaten. Die Verdünnungen sind Tabelle I- 4 im Anhang zu entnehmen. Das Chemilumineszenz-Signal wurde mithilfe des Bioimagers LAS-3000 detektiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung der Expressionsklone für die Produktion glykolytischer Enzyme

Um eine vollständige Expression der entsprechenden Proteine zu gewährleisten, wurden zunächst TGA-Triplets, die in 14 der 19 für glykolytische Enzyme kodierenden Genen von *M. pneumoniae* M129 vorkommen, mithilfe der MMR in TGG-Triplets umgewandelt (Tabelle I- 1, Anhang). Die PCR-Produkte wurden dann in die entsprechenden Vektoren kloniert und mittels Koloniescreenings überprüft. Dabei wurden die Produktgröße (siehe Abbildung 3-1) und die Sequenz der Amplifikate überprüft. Durch die Bestätigung des erfolgreichen Austausches der TGA-Triplets und den Abgleich des Inserts mit der Originalsequenz (GenBank Nr. GCA\_000027345.1) konnten die entsprechenden *E. coli*-Klone für die Produktion der rekombinanten Proteine eingesetzt werden.

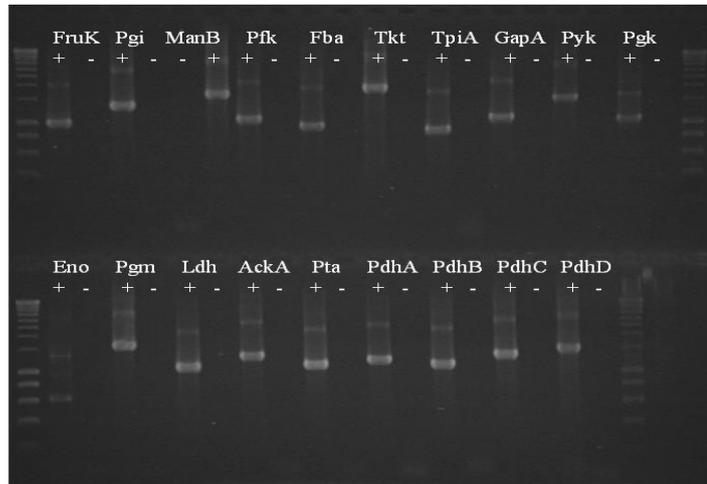
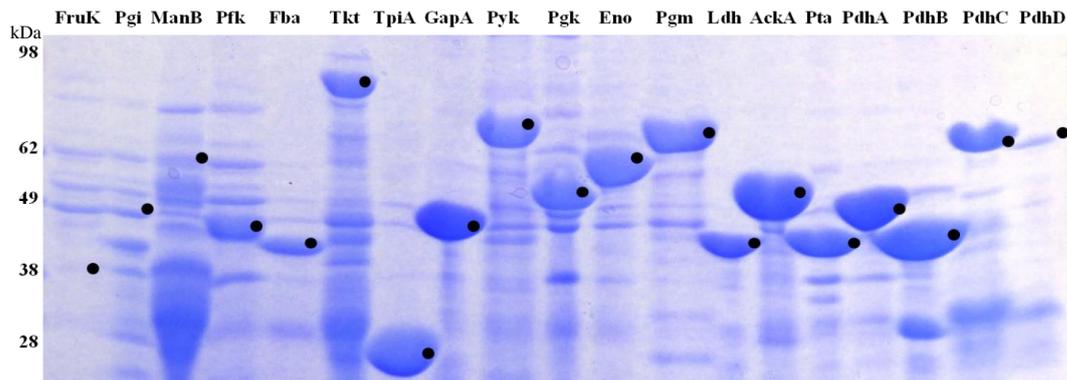


Abbildung 3-1 Darstellung PCR-Amplifikate der kodierenden Sequenzen. Standard (SmartLadder 10 kb).

#### 3.2 Rekombinante Expression und Aufreinigung der glykolytischen Enzyme von *Mycoplasma pneumoniae*

Nach der erfolgreichen Transformation konnten *E. coli*-Flüssigkulturen angezchtet und die Produktion der Proteine induziert werden. Die Aufreinigung der His<sub>6</sub>-getaggten Proteine wurde mithilfe der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatografie durchgeführt. Die anschließende Kontrolle der hergestellten Proteine erfolgte durch eine Auftrennung mittels SDS-PAGE und Coomassie-Blau-Färbung (Abbildung 3-2).

## Ergebnisse



**Abbildung 3-2 SDS-PAGE der aufgereinigten rekombinanten Proteine mit anschließender Coomassie-Färbung.** Auftrennung der im Eluat E enthaltenen rekombinanten Proteine mit einer Konzentration von 1 mg/ml. Der Marker gibt die molekulare Masse in kDa an.

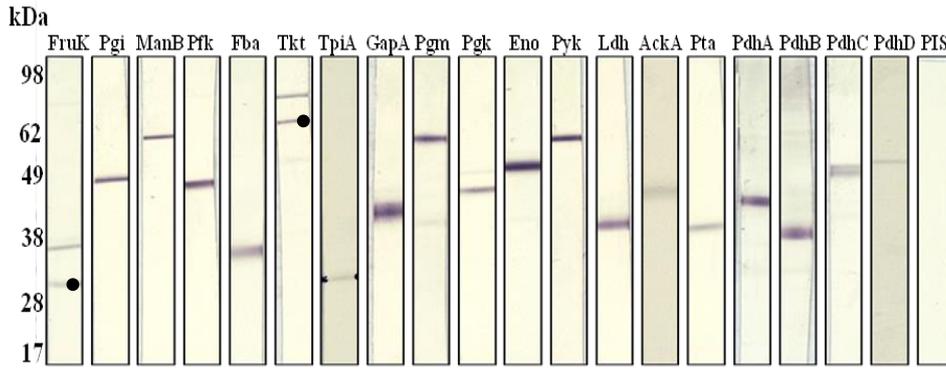
Die dominanten Banden entsprachen dem errechneten Molekulargewicht bei fast allen Proteinen, allerdings sind auch Nebenbanden zu finden, die jedoch meist deutlich schwächer ausgeprägt waren. Zur weiteren Charakterisierung wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und auf eine Reaktion mit monoklonalen anti-His-Tag Antikörpern getestet (Abbildung II- 1, Anhang), auch hier entsprach die Höhe der Banden den errechneten Molekulargewichten. Die Ergebnisse bestätigen die erfolgreiche Expression der interessierenden Proteine in *E. coli*.

### 3.3 Reaktivität der Seren gegen die rekombinant hergestellten Proteine

Die in *E. coli* produzierten glykolytischen Enzyme wurden zur Immunisierung von Meerschweinchen verwendet. Die gewonnenen Seren wurden im Immunoblot gegen das *M. pneumoniae* M129-Gesamtantigen qualitativ auf ihre Spezifität geprüft. Dabei ergaben alle Seren eine charakteristische Bande in Höhe des errechneten Molekulargewichtes des entsprechenden glykolytischen Enzyms (Abbildung 3-3). Die Seren gegen Tkt und FruK zeigten außerdem eine Kreuzreaktion mit einem weiteren *M. pneumoniae* M129-Protein. Deshalb wurde das Produkt mit dem errechneten Molekulargewicht des entsprechenden glykolytischen Enzyms in Abbildung 3-3 mit einem Punkt markiert.

Es konnten jedoch deutliche Unterschiede in den Intensitäten der einzelnen Banden wahrgenommen werden, die es notwendig machten, die quantitative Reaktivität zu überprüfen.

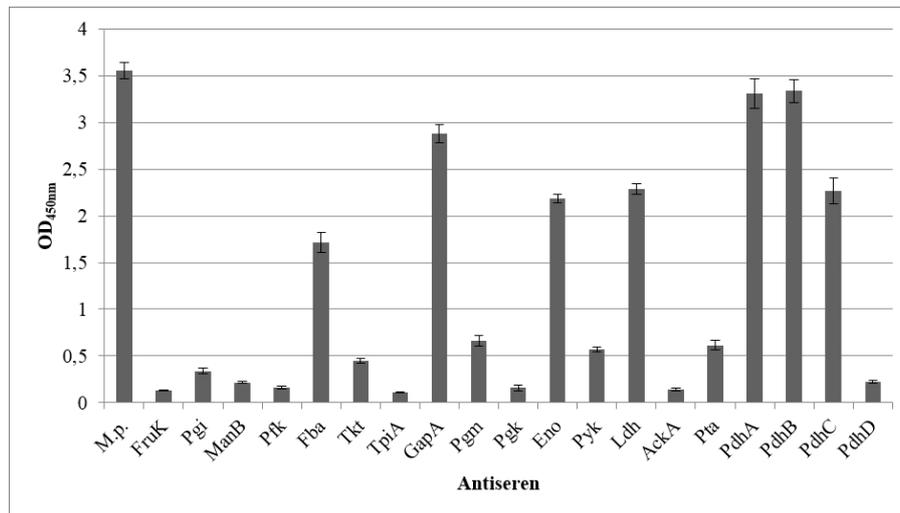
## Ergebnisse



**Abbildung 3-3 Charakterisierung der Reaktivität der Seren gegen die rekombinanten Proteine im Western Blot.** Reaktion der Seren (je 1:250) mit dem *M. pneumoniae*-Gesamtantigen (100 µg/ml). Mit Punkt gekennzeichnet: Putatives Molekulargewicht von FruK und Tkt.

Ein zusätzlicher Test erfolgte durch die Vorinkubation der Seren mit den entsprechenden rekombinanten Proteinen, um die Spezifität zu überprüfen. Anschließend wurden die vorinkubierten Seren auf einen *M. pneumoniae* M129 Gesamtantigen Blot gegeben. Wie der Abbildung II- 2 im Anhang zu entnehmen ist, konnte gezeigt werden, dass die Bindung vollständig gehemmt wird.

Zur quantitativen Beurteilung der Reaktivität der Seren wurden Assays angewandt, die auf der ELISA-Technik basierten. Dafür wurden 96-Well-Platten mit dem Gesamtantigen von *M. pneumoniae* M129 beladen und mit den Seren gegen die rekombinanten Proteine inkubiert (Abbildung 3-4).



**Abbildung 3-4 Überprüfung der Reaktivität der Seren gegen die rekombinanten Proteine mit dem *M. pneumoniae*-Gesamtantigen im ELISA.** Zum Vergleich wurde das Antiserum (s.c.) gegen das *M. pneumoniae*-Gesamtantigen mitgeführt. Alle Seren wurden in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt. Die Konzentration des Gesamtantigens betrug 10 µg/ml (Daten im Anhang Tabelle III-1).

Die quantitative Reaktivität der einzelnen Seren gegen die rekombinanten Proteine variierte. So zeigten die Seren gegen PdhA, PdhB und GapA hohe OD<sub>450nm</sub>-Werte, die vergleichbar mit der Reaktion des Gesamtantigen-Serums von *M. pneumoniae* war. Die Seren gegen die rekombinanten Proteine Fba, Eno, Ldh und PdhC wiesen eine mittlere Reaktivität (OD<sub>450nm</sub>-Werte zwischen 1,5 und 2,5) auf. Die restlichen Seren gegen die rekombinanten Proteine FruK, Pgi, ManB, Pfk, Tkt, TpiA, Pgk, Pgm, AckA, Pyk, Pta und PdhD zeigten eine stark verringerte optische Dichte, die teilweise deutlich unter 0,5 liegt. Dieses Ergebnis kann unterschiedliche Ursachen haben, ist jedoch für die Interpretation der nachfolgenden Versuche zu berücksichtigen.

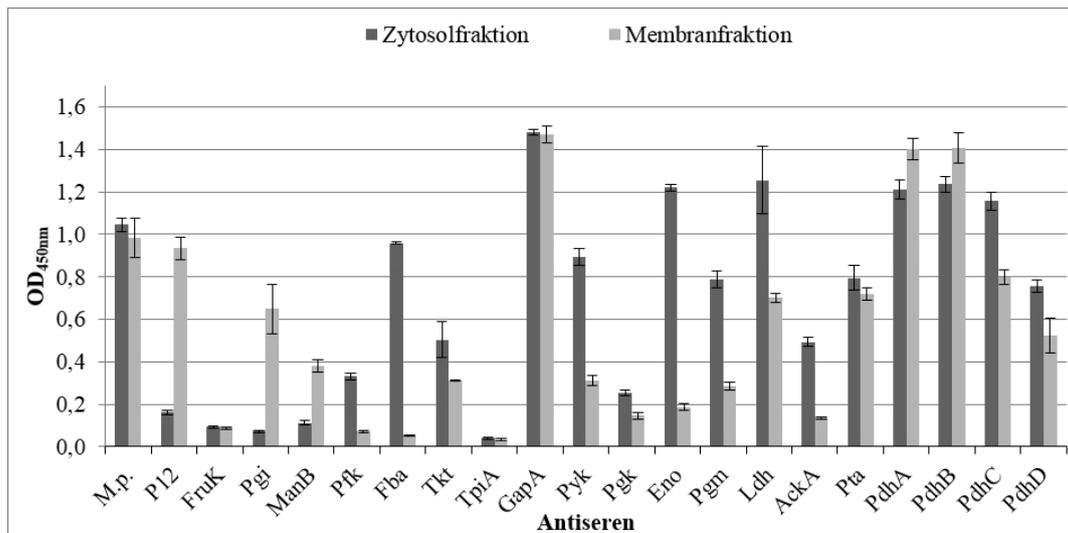
### **3.4 Lokalisation der glykolytischen Enzyme in *Mycoplasma pneumoniae* M129**

#### **3.4.1 Auftreten der glykolytischen Enzyme in den Proteinfraktionen von**

##### ***Mycoplasma pneumoniae* M129**

Um einen ersten Hinweis auf die Lokalisation der zu untersuchenden Proteine zu erhalten, wurde das Gesamtantigen von *M. pneumoniae* M129 in seine Membran- und Zytosolfraktion aufgetrennt. Dafür wurden die entsprechenden Antigene zum einen durch Ultrazentrifugation und zum anderen durch TX-100-X-Fraktionierung gewonnen. Die Detektion des Vorkommens der glykolytischen Enzyme erfolgte mithilfe der ELISA-Technik. Dafür wurden die Kavitäten einer 96-Well-Platte mit der Membran- und Zytosol-Fraktion der Gesamtproteine (Fraktionierungsmethode: Ultrazentrifugation) beladen und mit den Seren gegen die rekombinanten Proteine inkubiert. Das Resultat ist Abbildung 3-5 zu entnehmen.

Ein Großteil der glykolytischen Enzyme war in der Fraktion der membranassoziierten Proteine von *M. pneumoniae* M129 zu finden. Lediglich die Seren gegen die rekombinanten Proteine Pfk, Pgk, Fba, AckA und Eno zeigten eine schwache Reaktion mit der Membranfraktion (OD<sub>450nm</sub> < 0,2). FruK und TpiA hingegen wiesen stets eine schwache Reaktion auf, aber sie reagierten mit beiden Fraktionen. Mit den restlichen Seren konnten starke Reaktivitäten festgestellt werden, die z. T. über die Werte der Positivkontrollen hinausgingen.

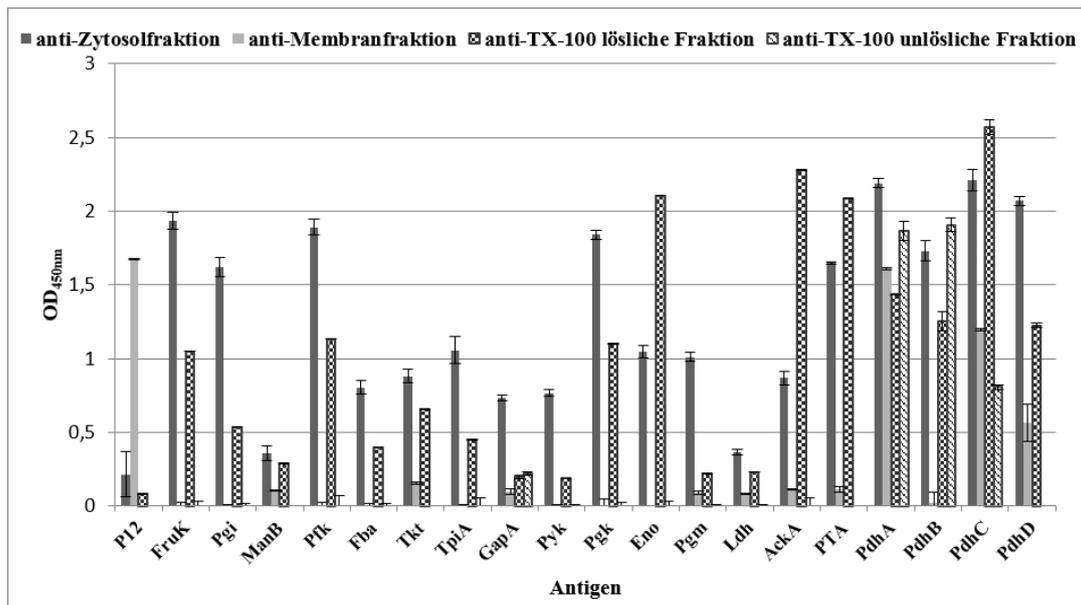


**Abbildung 3-5 Lokalisation der glykolytischen Enzyme in den nach Ultrazentrifugation von *M. pneumoniae* M129 gewonnenen Fraktionen.** Die Proteine der Fraktionen wurden als Antigen (je 15 µg/ml) immobilisiert und die Reaktion der Seren gegen die rekombinant hergestellten Proteine gemessen. Zur Quantifizierung wurde das *M. pneumoniae*-Gesamtantigensserum (M.p.) eingesetzt. Das Serum gegen den C-terminalen Bereich des P1-Proteins (P12) diente zur Kontrolle der Fraktionierung (Daten im Anhang Tabelle III-2).

Die qualitative Bewertung des Vorkommens der glykolytischen Enzyme in den Fraktionen wurde unter Verwendung der Immunoblot-Technik durchgeführt. Dafür wurden die Fraktionen der Ultrazentrifugation mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit den Antikörpern, die spezifisch gegen die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme sind, behandelt. Dieser Immunoblot zeigte, dass alle Seren mit der Zytosolfraktion nach Ultrazentrifugation reagierten (Abbildung II-12, Anhang). Erwartungsgemäß sind alle Proteine intrazellulär vorhanden. Die Reaktion mit der Membranfraktion bestätigte die Assoziation glykolytischer Enzyme mit der Membran der Mykoplasmenzelle. Bis auf FruK, Pfk, Pgk und TpiA konnten schwache bis stark ausgeprägte Banden in der Membranfraktion dokumentiert werden.

In einem weiteren Experiment wurden die Kavitäten einer 96-Well-Platte mit den rekombinanten Proteinen beladen und mit den Seren gegen die Membran- und Zytosolfraktion sowie gegen die TX-100-unlösliche und TX-100-lösliche Phase behandelt (Abbildung 3-6).

## Ergebnisse



**Abbildung 3-6 Lokalisation der glykolytischen Enzyme in *M. pneumoniae* nach Fraktionierung durch Triton-X-100 und Ultrazentrifugation.** Rekombinant hergestellte glykolytische Proteine und die Kontrolle P12 wurden als Antigen (15 µg/ml) eingesetzt und mit den Seren gegen die Fraktionsproteine inkubiert (Daten im Anhang Tabelle III-2).

Die Ergebnisse dieses Versuches unterscheiden sich leicht von den Ergebnissen des ELISA's, bei dem die Fraktionen als Antigene verwendet wurden. Übereinstimmend war jedoch, dass alle Proteine eine Reaktion mit den Seren gegen die intrazellulär vorhandenen Proteinen zeigten. Außerdem bestätigte sich, dass die Proteine FruK, Pfk, Fba, TpiA, Eno und Pgc nur in den zytosolischen Fraktionen von *M. pneumoniae* M129 zu finden sind. Das Vorkommen der Proteine GapA, PdhA-D und Ldh konnte sowohl in den zytosolischen als auch in den membranassoziierten Fraktionen von *M. pneumoniae* M129 festgestellt werden. Die Proteine AckA, Pgm und ManB zeigten eine schwache Reaktion mit der Membranfraktion, aber nicht mit der TX-100-unlöslichen Fraktion. Damit werden die Ergebnisse des obigen Versuches bestätigt. Als Abweichung trat jedoch auf, dass die Proteine Pta, Pyk, Pgm und Pgi in dieser Versuchsreihe, auch nach Wiederholung, nicht mit den Seren gegen die membranassoziierten Proteinen reagierten.

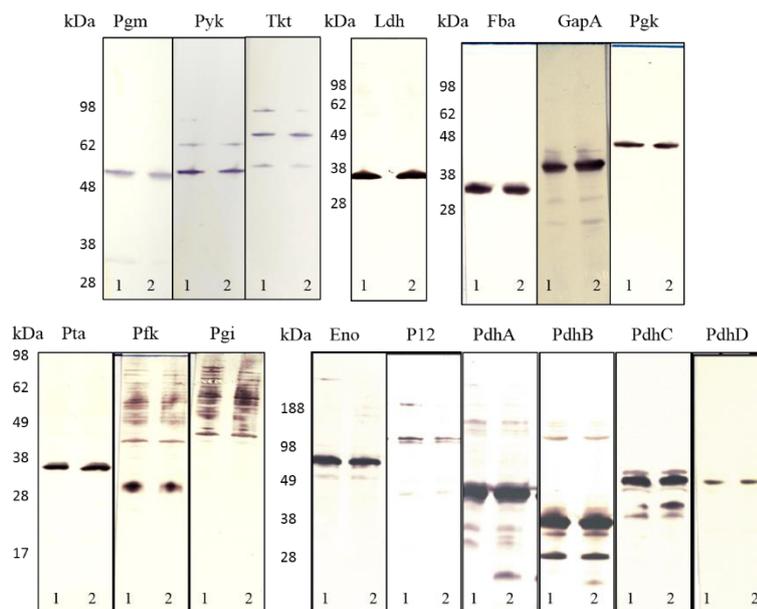
Teilweise zeigten sich auch Unterschiede in der Reaktion der Seren gegen die membranassoziierten Proteine in Abhängigkeit von der Fraktionierungsmethode. Eine unterschiedliche Zugänglichkeit der nachzuweisenden Proteine wie auch eine variable Konzentration der Proteine im Antigen der Immunisierung können Ursachen dafür sein. Die Ergebnisse beider Fraktionierungsmethoden sind nur bedingt miteinander vergleichbar, da diverse Faktoren Einfluss auf die Antikörper-Produktion haben. Die Resultate ergaben aber Hinweise auf die Membranassoziation verschiedener glykolytischer Enzyme von

*M. pneumoniae*, die durch weitere Versuche zu Klärung ihrer Oberflächenlokalisierung zu untersetzen sind.

### 3.4.2 Oberflächenassoziation der glykolytischen Enzyme von *Mycoplasma pneumoniae* M129

Die Fraktionierungen des *M. pneumoniae* M129-Gesamtantigens kann die Frage, ob glykolytische Enzyme auf der Oberfläche der Mykoplasmenzelle zu finden sind, nur unzureichend beantworten, da die Membran-Verankerung eines Proteins ohne Oberflächenzugänglichkeit möglich ist.

Zunächst wurde die Lokalisation durch milden Verdau des intakten Gesamtantigens von *M. pneumoniae* M129 mittels Trypsin und Chymotrypsin überprüft. Dabei werden nur die Proteine abgebaut, die sich an der Zelloberfläche befinden. Im Zytosol lokalisierte Proteine wurden nicht beeinflusst. Um den erfolgreichen Abbau zu kontrollieren, wurde der oberflächenassoziierte Teilbereich des P1-Proteins mitgeführt (P12).

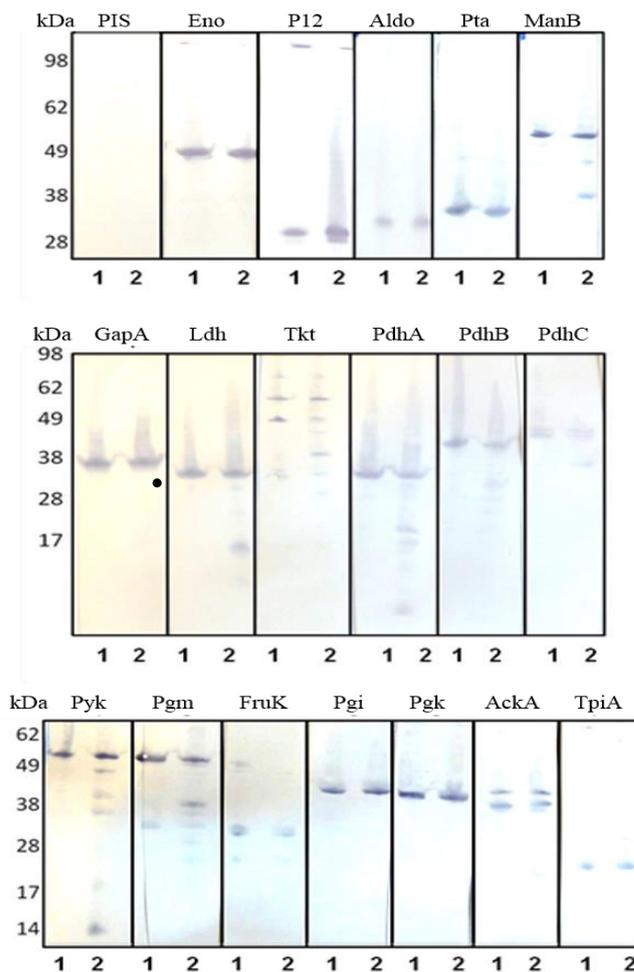


**Abbildung 3-7 Trypsinverdau des *M. pneumoniae*-Gesamtantigens.** Abbauprodukte werden durch Zugabe der Seren gegen die rekombinanten Proteine detektiert. 1) 0 µg Trypsin, 2) 100 µg Trypsin.

Wie in Abbildung 3-7 zu erkennen ist, konnten Abbauprodukte bei den Proteinen GapA, PdhA-C und Tkt sowie dem extrazellulären Teil P12 des P1-Proteins nachgewiesen werden. Da Banden mit dem errechneten Molekulargewicht erhalten blieben, deutet dies auf einen partiellen Verdau der glykolytischen Enzyme hin. Das P1-Protein wurde dagegen mit dem P12-Antiserum nicht mehr nachgewiesen. Mit ansteigender Trypsin-Konzentration nimmt die Intensität der Abbauprodukte zu (siehe Anhang Abbildung II- 3), die Banden der nicht

## Ergebnisse

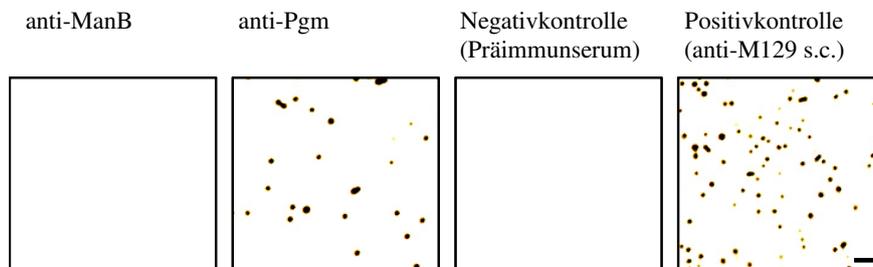
abgebauten Proteine blieben jedoch erhalten. Dadurch kann davon ausgegangen werden, dass diese Enzyme auf der Zelloberfläche der Mykoplasmen vorkommen. Der partielle Verdau lässt darauf schließen, dass sich ein erheblicher Anteil der Proteine innerhalb der Zelle befindet. Die restlichen Proteine (FruK, Pgi, Pfk, Fba, Ldh, TpiA, Pgi, Pgm, Eno, Pyk, PdhD, Pta, AckA, ManB) blieben vom Trypsinverdau unbeeinflusst. Das Vorkommen nicht abgebauter Proteine ist insofern auch methodisch von Bedeutung, da ein klar definiertes ausschließlich intrazelluläres Protein nicht verfügbar war. Die Schnittstellen von Trypsin sind die basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und modifiziertes Cystein und kommen in unterschiedlicher Anzahl bei den untersuchten Proteinen (Tabelle I- 1, Anhang) vor. Deshalb wurde noch ein weiteres Enzym zum Verdau verwendet. Dabei handelte es sich um die Peptidase Chymotrypsin, die befähigt ist, nach aromatischen Aminosäuren zu schneiden.



**Abbildung 3-8** Chymotrypsinverdau des *M. pneumoniae*-Gesamtantigens. Durch Zugabe der Seren gegen die rekombinanten Proteine werden Abbauprodukte detektiert. 1) 0 µg Chymotrypsin, 2) 100 µg Chymotrypsin. Mit Punkt gekennzeichnet: Abbauprodukt GapA.

Wie Abbildung 3-8 zu entnehmen ist, konnte auch in diesem Versuch der oberflächlich exponierte Bereich des P1-Proteins abgebaut werden. Weiterhin zeigten alle Proteine, die zuvor beim Trypsinverdau partiell verdaut wurden, ebenfalls Abbauprodukte (PdhA-C, GapA und Tkt). Zusätzlich konnte ein Abbau für die Proteine Pgm, Pyk und ManB detektiert werden. Somit weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass neun der 19 untersuchten glykolytischen Enzyme oberflächenassoziiert auftreten. Die Proteine FruK, Pgi, Pfk, Fba, TpiA, Pgk, Eno, PdhD, Pta, AckA und ManB kommen nur im Zytosol bzw. nicht extrazellulär vor. Ein Grund könnte auch sein, dass diese Proteine nicht durch die eingesetzten Enzyme abgebaut wurden. Zusätzlich wurde deshalb überprüft, ob die rekombinanten Proteine generell durch Trypsin abgebaut werden. Die Proteine wurden vollständig abgebaut (Abbildung II- 3, Anhang), was ihre prinzipielle Zugänglichkeit bestätigt.

Eine weitere Möglichkeit die Oberflächenlokalisierung von Proteinen zu überprüfen, stellt der Colony Blot dar. Bei dieser Technik werden Proteine an der Oberfläche von frisch gewachsenen intakten Mykoplasmenkolonien detektiert. Zugängliche Proteine der Mykoplasmenkolonien wurden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit den entsprechenden Antikörpern, die spezifisch für die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme sind, behandelt. Als Kontrolle diente das Serum gegen das Gesamtantigen von *M. pneumoniae* M129 sowie ein Präimmunserum.

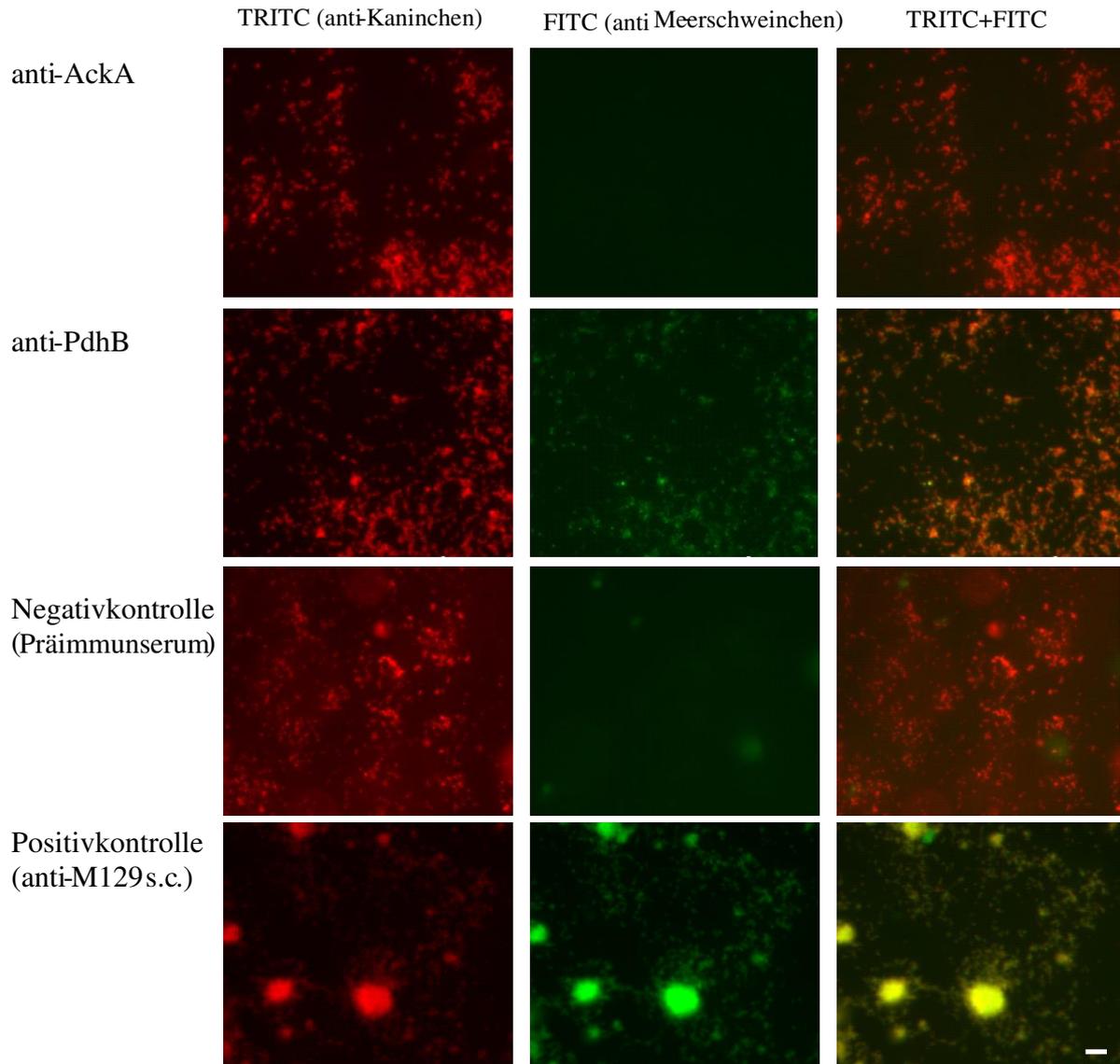


**Abbildung 3-9 Immunodetektion ausgewählter Proteine auf *M. pneumoniae* M129-Kolonien.** Exemplarisch wurden hier die Resultate der Reaktion mit anti-ManB, anti-Pgm, anti-M129 s.c. und PIS gezeigt. Verwendung von acht Tage alten Kolonien. Maßstab: 200 µm.

Wie in Abbildung 3-9 zu sehen, konnte eine Reaktion mit dem Serum gegen das Gesamtantigen von *M. pneumoniae* M129 detektiert werden. Bei der Behandlung mit dem Präimmunserum blieb das Ergebnis negativ. Weiterhin konnten positive Reaktionen mit den Seren gegen die rekombinanten Proteine PdhA-C, Pyk, Ldh, Pgm, GapA und Tkt nachgewiesen werden (siehe Abbildung II-5, Anhang). Die Seren gegen die restlichen rekombinanten Proteine (FruK, Pgi, ManB, AckA, Pfk, Pgk, Pta, PdhD, TpiA, Fba, Eno) zeigten keine Reaktivität mit den Oberflächen der Mykoplasmenkolonien. Somit spiegelt dieser Versuch im Wesentlichen die

Ergebnisse des Chymotrypsinabbaus wider. Das Serum gegen das rekombinante Protein ManB ergab im Colony Blot keine Reaktion, jedoch waren zuvor Abbauprodukte beim Chymotrypsinverdau zu erkennen. Auch mehrmalige Wiederholungen des Colony Blots mit höheren Antikörperkonzentrationen führten zu keinem anderen Ergebnis. Ein vorheriger Verdau von frisch gewachsenen Kolonien mit Trypsin und Chymotrypsin ergab eine prozentuale Verringerung der Anzahl an positiv reagierender Kolonien bei der Verwendung der Seren PdhA-C, Ldh, Tkt, GapA, Pyk, Pgm (siehe Abbildung II-4, Anhang). Dies spricht ebenfalls für die Lokalisation dieser Proteine auf der Oberfläche der Mykoplasmen. Da die Seren, die gegen zytosolische Proteine gerichtet waren, keine Reaktionen zeigten, konnte davon ausgegangen werden, dass die Mykoplasmenzellen intakt waren und nur Strukturen auf der Zelloberfläche abgebaut wurden.

Mit der Immunfluoreszenztechnik lässt sich alternativ eine Oberflächenlokalisierung von Proteinen nachweisen. Dafür wurden die adhärennten Mykoplasmen in den Kavitäten eines Kammer-Objektträgers kultiviert, fixiert und mit dem Präimmunserum, dem Serum gegen das Gesamtantigen von *M. pneumoniae* M129 sowie den Seren gegen die glykolytischen Proteine, die in Meerschweinchen produziert wurden, behandelt. Als Positivkontrolle wurde ein aus dem Kaninchen stammendes Serum gegen die TX-100-unlösliche Fraktion von *M. pneumoniae* M129 verwendet. So konnte die Detektion mit zwei unterschiedlich markierten Konjugaten stattfinden. Der FITC-markierte Sekundärantikörper dient zur Detektion der in Meerschweinchen produzierten Antiseren, während der TRITC-markierte Antikörper gegen das Primärserum aus dem Kaninchen gerichtet war. Da bei ordnungsgemäßer Testdurchführung stets eine Reaktivität gegen die membranassoziierten Proteine zu finden ist, wurde dadurch die Darstellung der Mykoplasmenzellen auf dem Objektträger bei negativem Bild mit FITC-Serum sichergestellt.

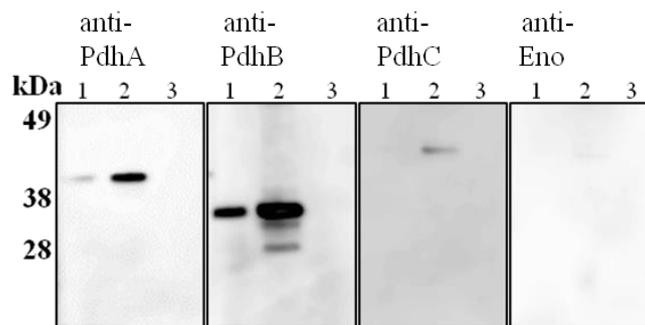


**Abbildung 3-10 Oberflächenlokalisierung ausgewählter glykolytischer Enzyme von *M. pneumoniae* M129 mittels Immunfluoreszenz.** Exemplarisch für anti-AckA, anti-PdhB, anti-M129 s.c. und PIS. Mikroskopische Aufnahme der fluoreszenzmarkierten Proteine (FITC). Die Basisfärbung der Zellen erfolgte mithilfe der im Kaninchen hergestellten anti-Triton X-100-unlöslichen Phase (TRITC). Maßstab 10  $\mu\text{m}$ .

Wie in Abbildung 3-10 erkennbar ist, zeigt die Negativkontrolle mit dem Präimmunserum als Primärantikörper keine Fluoreszenz (FITC), die Positivkontrolle hingegen (Serum gegen das Gesamtantigen *M. pneumoniae* M129) ergab eine deutliche Fluoreszenz. Bei den glykolytischen Enzymen wurde ein klares Fluoreszenzsignal nach Inkubation der Zellen mit den Seren gegen die Proteine PdhA-C, GapA, Ldh, Tkt, Pyk und Pgm detektiert. Die übrigen Seren gegen die Proteine FruK, Pgi, ManB, AckA, Pfk, Pgc, Pta, PdhD, TpiA, Fba und Eno zeigten kein Signal (Abbildung II-6, Anhang). Somit bestätigte dieser Test die Ergebnisse aus dem Verdau und dem Colony Blot.

## Ergebnisse

Die Ergebnisse der Lokalisationsstudien ergaben u. a. eine Oberflächenassoziation von PdhA-C. Der Pyruvatdehydrogenase-Komplex ist ein Multienzymkomplex, der eine wichtige Rolle bei der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl Coenzym A spielt. Die Oberflächenassoziation der genannten Pdh-Untereinheiten in *M. pneumoniae* wirft die Frage auf, ob diese Untereinheiten in der Lage sind, einen Komplex auf der Oberfläche der Mykoplasmenzelle zu bilden. Dafür wurden *in vivo* Crosslinking-Experimente mit Paraformaldehyd und anschließender Co-Immünpräzipitation durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3-11 zusammengefasst.



**Abbildung 3-11 Immunoblotreaktion der Komplexbildung der Pdh-Untereinheiten auf der Oberfläche der Mykoplasmenzelle mit anschließender Co-Immünpräzipitation.** Behandlung der Mykoplasmenzellen mit Paraformaldehyd (PFA) und anschließender Co-Immünpräzipitation mit anti-PdhB oder dem Präimmünserum (PIS). Die Detektion erfolgte mittels Antiseren gegen PdhA, PdhB, PdhC, Eno. 1) unbehandelte Zellen, 2) PFA unbehandelte Zellen/anti-PdhB, 3) PFA behandelte Zellen/PIS.

Danach sind PdhA-C in der Lage, einen Komplex auf der Oberfläche der Bakterienzelle zu bilden. Zur Kontrolle wurde überprüft, ob das Serum gegen das zytosolische Enzym Eno eine Reaktion zeigt. Die Reaktion blieb negativ. Auch das Serum gegen PdhD ergab keine Bande. Diese Untereinheit zeigte in vorhergehenden Versuchen ebenfalls keine Oberflächenassoziation. Eine Reaktion mit den Seren gegen die rekombinanten Proteine Pgm, Pyk, Ldh, Tkt und GapA wurde nicht nachgewiesen. Somit bilden nur die drei Pdh-Untereinheiten einen Komplex.

Die Zusammenfassung der Resultate der Lokalisationsexperimente in Tabelle 3-1 zeigt, dass für die glykolytischen Enzyme Tkt, GapA, Pgm, Pyk, Ldh und PdhA-C eine Oberflächenassoziation nachzuweisen ist. Die Ergebnisse der verschiedenen Methoden ergab eine ausgezeichnete Übereinstimmung, die eine abschließende Bewertung erlaubt. Diese oberflächenassoziierten Proteine stellen somit potenzielle Bindungspartner für Wirtsfaktoren dar.

## Ergebnisse

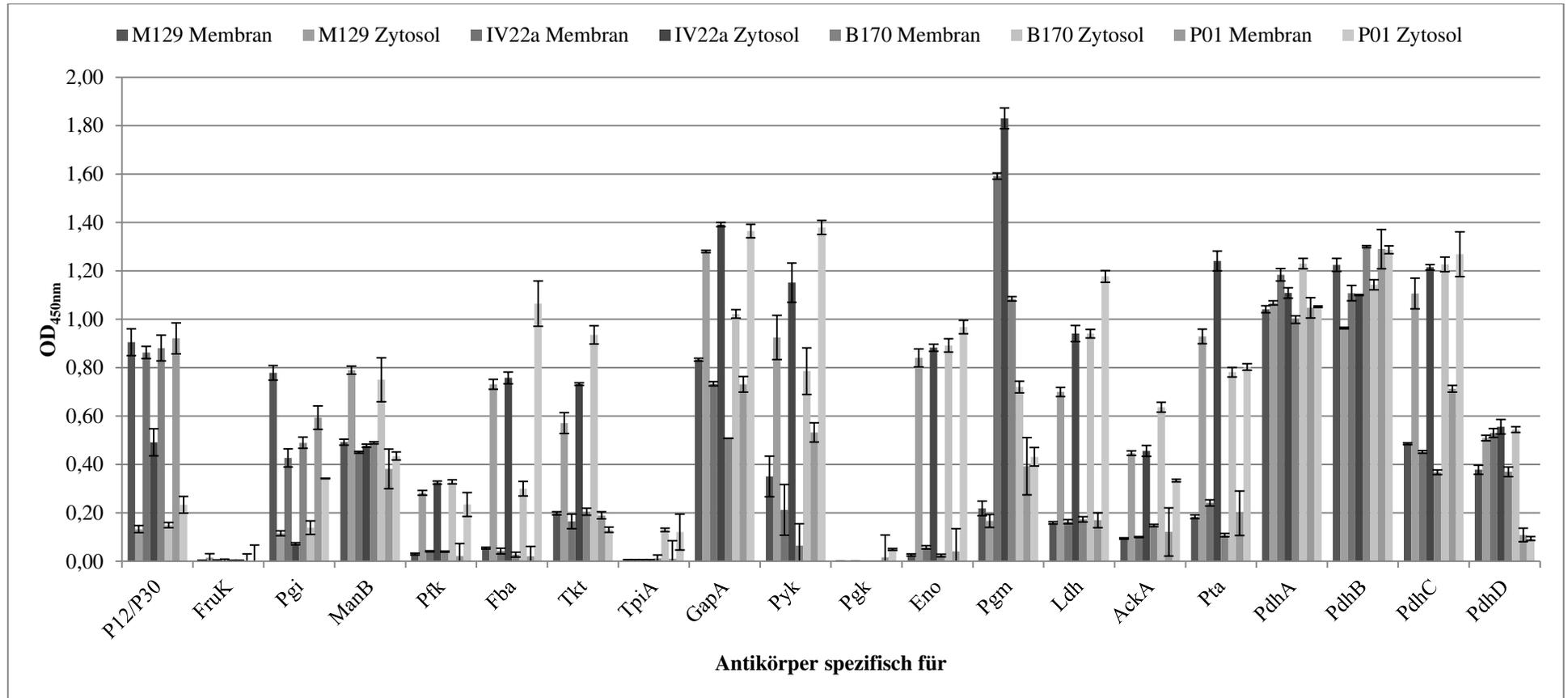
**Tabelle 3-1 Übersicht über die Lokalisationsexperimente der glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae*.** Grau unterlegte Proteine stellen die oberflächenassoziierten Proteine dar.

<b>Protein</b>	<b>Reaktion im Colony Blot</b>	<b>Abbauprodukte im Chymotrypsin-Verdau</b>	<b>Abbauprodukte im Trypsin-Verdau</b>	<b>Reaktion in der Immunfluoreszenz</b>
<b>FruK</b>	nein	nein	nein	nein
<b>Pgi</b>	nein	nein	nein	nein
<b>ManB</b>	nein	ja	nein	nein
<b>Pfk</b>	nein	nein	nein	nein
<b>Fba</b>	nein	nein	nein	nein
<b>Tkt</b>	ja	ja	nein	ja
<b>TpiA</b>	nein	nein	nein	nein
<b>GapA</b>	ja	ja	ja	ja
<b>Pgm</b>	ja	ja	nein	ja
<b>Pgk</b>	nein	nein	nein	nein
<b>Eno</b>	nein	nein	nein	nein
<b>Pyk</b>	ja	ja	nein	ja
<b>Ldh</b>	ja	ja	nein	nein
<b>AckA</b>	nein	nein	nein	nein
<b>Pta</b>	nein	ja	nein	nein
<b>PdhA</b>	ja	nein	ja	ja
<b>PdhB</b>	ja	ja	ja	ja
<b>PdhC</b>	ja	ja	ja	ja
<b>PdhD</b>	nein	nein	nein	nein

Weiterhin wurde untersucht, ob die Lokalisation der glykolytischen Enzyme in Abhängigkeit zu wesentlichen Proteinen des Adhäsionsapparates von *M. pneumoniae* steht. Das Vorkommen oberflächenlokalisierter Enzyme wurde in Mutanten mit Verlust des P1-Adhäsins (*M. pneumoniae* IV22a), der Adhäsine P40 und P90 (*M. pneumoniae* B170) oder des Oberflächenproteins P01 (*M. pneumoniae* P01<sup>-</sup>) getestet.

Erste Hinweise gab die Fraktionierung des Gesamtantigens der Mutanten mittels Ultrazentrifugation. Das Resultat ist Abbildung 3-12 zu entnehmen.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-12 ELISA-Reaktion der Membran- und Zytosolfraktion (Ultrazentrifugation) der *M. pneumoniae* Wild- und Mutanten-Stämme.** Verwendete Antigene je 15 ( $\mu\text{g/ml}$ ) und Detektion der glykolytischen Enzyme mit den entsprechenden Meerschweinchen-Antisera (Daten im Anhang Tabelle III-5).

Das Serum gegen das rekombinante Protein Eno wurde als Kontrolle für die Zytosolfraktion mitgeführt. Ein Gemisch aus dem Serum gegen den C-terminalen Bereich des P1-Proteins sowie dem Serum gegen das Protein P30 fungierte als Kontrolle für membranassoziierte Proteine (Tabelle III-5, Anhang). Die Ergebnisse der Kontrollseren bestätigen, dass die Fraktionierungen methodisch korrekt durchgeführt wurden. In Bezug auf die glykolytischen Enzyme wurde festgestellt, dass die Verteilung der Proteine in den einzelnen Fraktionen der verschiedenen Stämme vergleichbar mit dem Stamm M129 ist. Das bedeutet, dass sowohl die gleichen Proteine in der Membran- und Zytosolfraktion nachweisbar sind, als auch ihre Signalstärke (Konzentration) vergleichbar ist (Tabelle III-5, Anhang). Der einzige bemerkenswerte Unterschied konnte bei Pyk festgestellt werden. Es stellte sich heraus, auch nach mehreren Wiederholungen des Versuches, dass dieses Protein in *M. pneumoniae* B170 eine geringere Konzentration in der Membranfraktion aufweist, als in den Vergleichsstämmen. Dies könnte auf eine Abhängigkeit des quantitativen Auftretens von Pyk von den Adhäsinen P40 und P90 schließen lassen.

Nachdem bestätigt ist, dass die glykolytischen Proteine in den verschiedenen *M. pneumoniae* Stämmen gleichermaßen in der Membran- und Zytosolfraktion vorkommen, sollte das extrazelluläre Auftreten überprüft werden. Um die Oberflächenlokalisation zu testen, wurden die Colony Blot Technik und die Immunfluoreszenz verwendet.

Wie Tabelle 3-2 zu entnehmen ist, wurden die Proteine, die bei *M. pneumoniae* M129 als oberflächenassoziiert identifiziert wurden, auch in den Stämmen Iv22a, B170 und P01<sup>-</sup> auf der Oberfläche der Mykoplasmenzellen nachgewiesen.

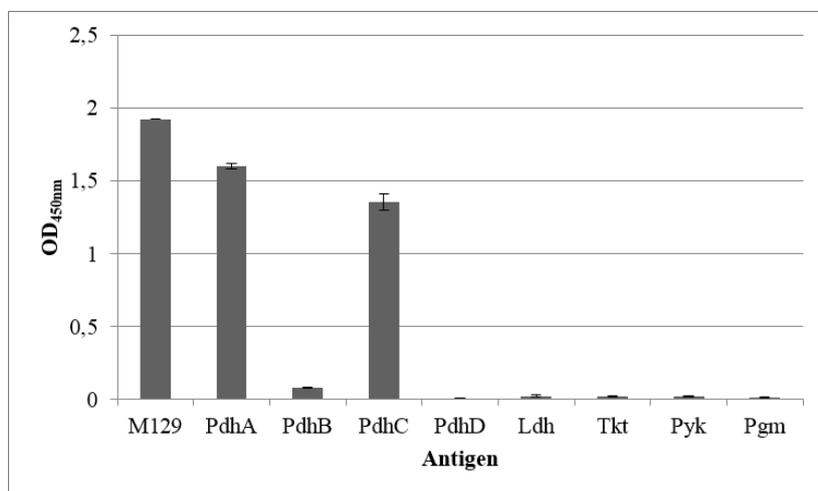
## Ergebnisse

Tabelle 3-2 Übersicht über die Ergebnisse der Lokalisation glykolytischer Enzyme in den untersuchten *M. pneumoniae* Stämme.

Protein	Stamm	Reaktion im Colony Blot	Abbauprodukte im Chymotrypsin-Verdau	Reaktion in der Immunfluoreszenz
<b>FruK</b>	M129	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>Pgi</b>	M129	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>ManB</b>	M129	<b>nein</b>	<b>ja</b>	<b>nein</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>Pfk</b>	M129	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>Fba</b>	M129	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>Tkt</b>	M129	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>TpiA</b>	M129	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>GapA</b>	M129	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>Pyk</b>	M129	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>Pgk</b>	M129	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>Eno</b>	M129	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>Pgm</b>	M129	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>Ldh</b>	M129	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>AckA</b>	M129	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>Pta</b>	M129	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>PdhA</b>	M129	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>PdhB</b>	M129	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>PdhC</b>	M129	<b>ja</b>	<b>ja</b>	<b>ja</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			
<b>PdhD</b>	M129	<b>nein</b>	<b>nein</b>	<b>nein</b>
	B170			
	P01-			
	Iv22a			

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass das Auftreten der glykolytischen Enzyme auf der Oberfläche der Mykoplasmen unabhängig von den Adhäsinen P1, P40 und P90 ist. Auch der Verlust des bisher wenig charakterisierten Oberflächenproteins P01 hat keine Auswirkung auf die Lokalisation der genannten Proteine. Die Konzentrationen der glykolytischen Enzyme weisen zwar Schwankungen auf, aber das Auftreten auf der Oberfläche wird durch das Fehlen der genannten Faktoren nicht blockiert.

In einem weiteren Versuch wurde evaluiert, ob ein Gesamtantigenserum von *M. pneumoniae* M129, das durch intranasale Immunisierung (natürlicher Infektionsweg) erzeugt wurde, die rekombinant hergestellten oberflächenassoziierten Proteine erkennt (Abbildung 3-13).



**Abbildung 3-13** Vorkommen spezifischer Antikörper gegen die oberflächenlokalisierten glykolytischen Enzyme im Serum intranasal infizierter Meerschweinchen. Als Antigen wurden die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme verwendet (je 15 µg/ml) und mit anti-M129 i.n. (1:250) inkubiert (Daten im Anhang Tabelle III-2).

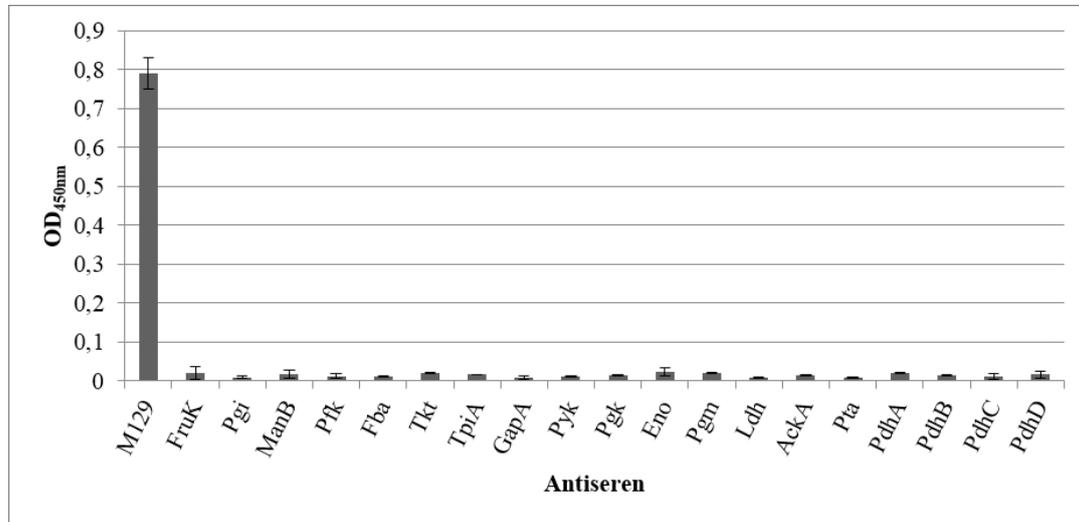
Während für den überwiegenden Teil der oberflächenlokalisierten Proteine OD<sub>450nm</sub>-Werte unter 0,1 detektiert wurden, sind hohe Antikörperspiegel gegen die Proteine PdhA und PdhC nachzuweisen. Dies ist ein für die Immunantwort des Wirtes interessantes Ergebnis, da offensichtlich nur ein kleiner Teil der Proteine mit antigenen Bereichen präsentiert wird.

### 3.4.3 Sekretion glykolytischer Enzyme und Wachstumshemmung durch die Antiseren gegen die rekombinanten Proteine

Ob die glykolytischen Enzyme während des Wachstums in das Flüssigmedium abgegeben werden, wurde mithilfe eines ELISA überprüft. Über den untersuchten Inkubationszeitraum wurde das Medium nicht gewechselt. Das komplette Medium einer vier Tage alten *M. pneumoniae* M129 Flüssigkultur (50 ml) wurde gewonnen und mittels Säulenzentrifugatoren aufkonzentriert. Das Endvolumen betrug dabei 5 ml. Dieses wurde

## Ergebnisse

unverdünnt als Antigen in der ELISA-Reaktion eingesetzt. Nach der Blockierung wurden die spezifischen Seren gegen die glykolytischen Enzyme hinzugegeben und anschließend detektiert. Zusätzlich wurde das Serum gegen das *M. pneumoniae* M129 Gesamtantigen verwendet, das als Positivkontrolle diente (Abbildung 3-14).



**Abbildung 3-14** Nachweis glykolytischer Enzyme im Überstand einer Flüssigkultur von *M. pneumoniae* M129. ELISA-Reaktion des zehnfach aufkonzentrierten Kulturüberstandes mit den Antiseren gegen die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme. Als Positivkontrolle fungierte das *M. pneumoniae*-Gesamtantigenserum (je 1:250) (Daten im Anhang Tabelle III-1).

Nur das Gesamtantigenserum ergab eine messbare Reaktivität, was darauf hindeutet, dass eine Vielzahl von *M. pneumoniae* M129-spezifischen Proteinen in den Überstand abgegeben werden. Eine Reaktion der Seren gegen die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme hingegen blieb aus. Von einer Sekretion in das Medium mit möglichen Auswirkungen vor allem *in vivo* ist nicht auszugehen.

In einem weiteren Versuch sollte die Frage geklärt werden, ob die Zugabe der Seren gegen die rekombinanten Proteine einen Einfluss auf das Wachstum von *M. pneumoniae* M129 haben. Dazu wurden die hitzeinaktivierten Seren gegen die glykolytischen Enzyme sowie das Gesamtantigenserum von *M. pneumoniae* M129 und das Präimmenserum zu einer Mykoplasmenkultur gegeben und unter Standardbedingungen inkubiert (Abbildung 3-15).

Das Wachstum der Mykoplasmen wurde nicht durch die Zugabe der Seren beeinflusst. Nur in Gegenwart des Gesamtantigensersums ergab sich eine Hemmung mit einer geringeren Anzahl koloniebildender Einheiten. Dies spiegelte sich auch im pH-Wert wider. So zeigten die Proben mit dem ungehemmten Wachstum aufgrund der Stoffwechsellätigkeit der Bakterien Werte um pH 5,5, während das Medium, in dem Mykoplasmen mit dem Gesamtantiserum inkubiert wurden, einen pH von 7,4 aufwies.

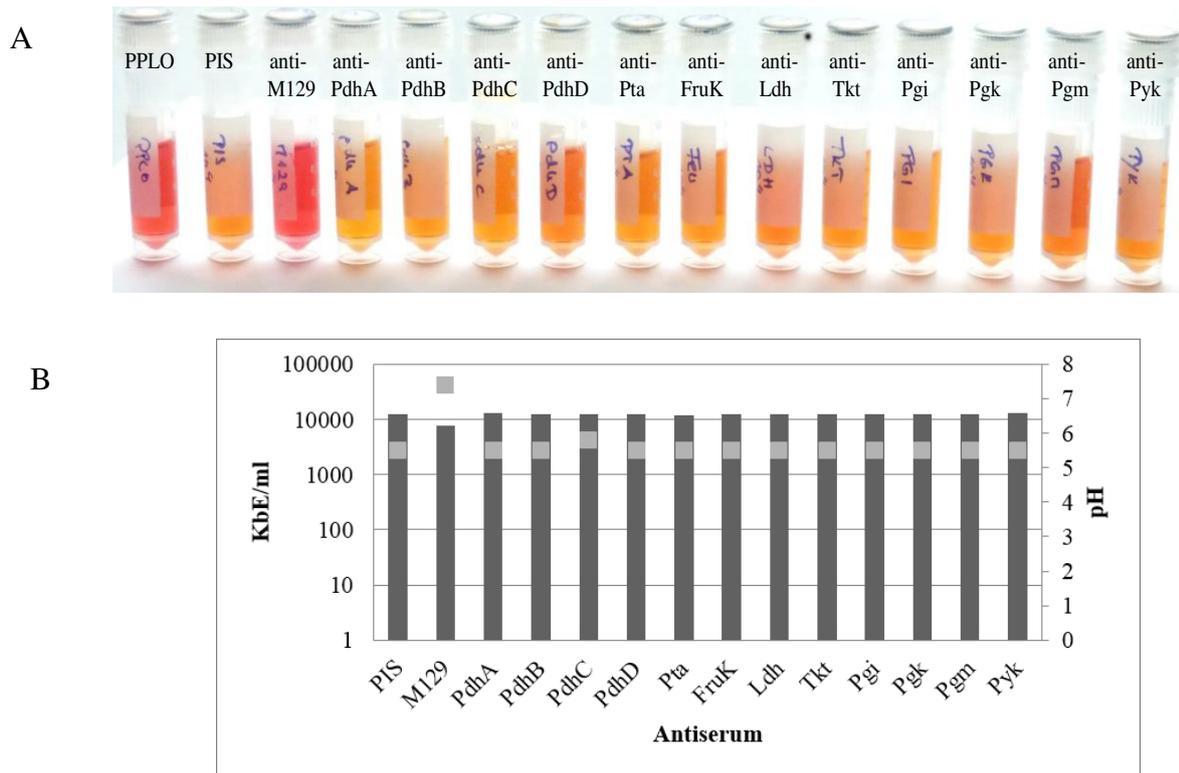
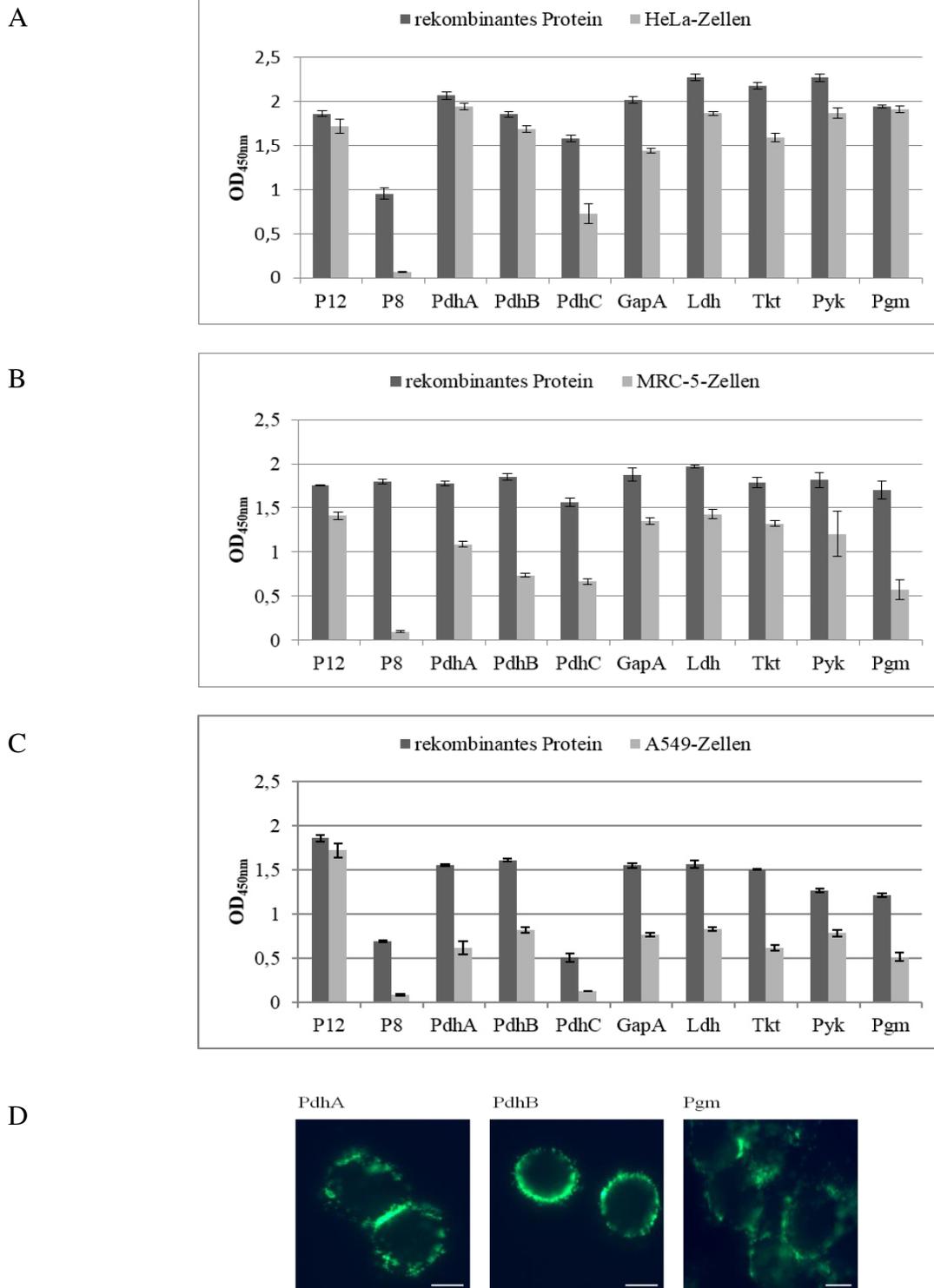


Abbildung 3-15 Einfluss der Zugabe der Antiseren gegen die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme auf das Wachstum von *M. pneumoniae* M129. Als Positivkontrolle wurden das Gesamtantigenserum sowie das Präimmunserum als Negativkontrolle mitgeführt. A) Optische Veränderung des Mediums. B) Einfluss der Seren gegen die rekombinant hergestellten Proteine bezogen auf koloniebildende Einheiten (KbE, Balken) sowie auf den pH-Wert (Quadrate).

### 3.5 Bindungseigenschaften der oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme an humane Zellen

Nach der Bestätigung der Oberflächenlokalisierung bestimmter glykolytischer Enzyme von *M. pneumoniae* stellt sich die Frage nach möglichen Interaktionen mit humanen ECM-Proteinen. Dazu wurde ein Assay auf ELISA-Basis mit humanen Zelllinien etabliert, da die Wahrscheinlichkeit, dass auf der Oberfläche der Zellen potenzielle Bindungspartner auftreten, aufgrund der ausgeprägten Adhäsion der Bakterien hoch ist. Dafür wurden die Kavitäten einer 96-Well-Platte mit den humanen Zellen der Linien MRC-5, A549 und HeLa beladen. Zum Vergleich wurden parallel Kavitäten mit rekombinanten Proteinen beladen. Anschließend wurden die rekombinanten Proteine zu den Zellen gegeben. Die Kavitäten mit immobilisierten rekombinanten Proteinen wurden in dieser Zeit mit PBS inkubiert. Nach dem Waschen wurden die immobilisierten Proteine und die an die Zellen gebundenen Proteine mithilfe der spezifischen Seren detektiert und die  $OD_{450nm}$ -Werte verglichen. Zusätzlich wurden fixierte Zellen mit rekombinanten Proteinen inkubiert, die zuvor mit dem Farbstoff Atto 488 konjugiert wurden. Eine Bindung der Proteine an die Zellen wurde im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Ergebnisse sind Abbildung 3-16 zu entnehmen.

## Ergebnisse



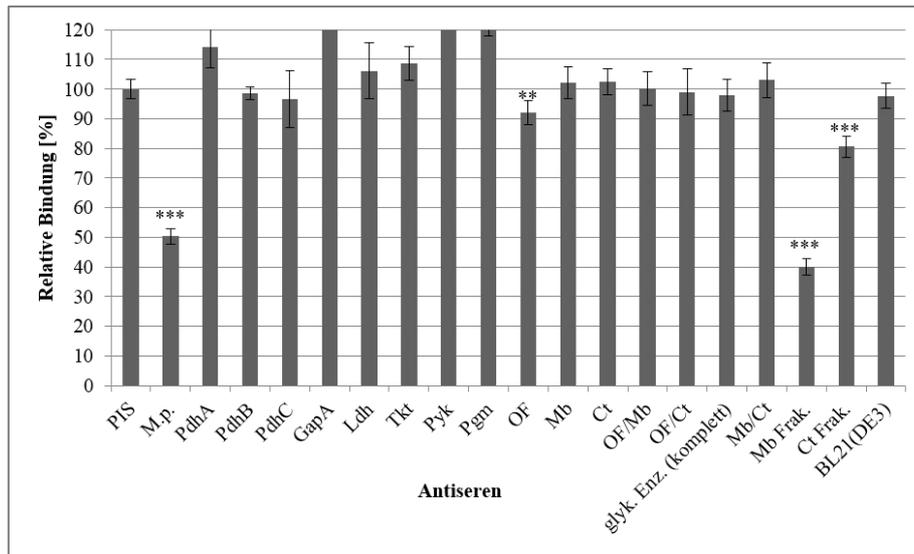
**Abbildung 3-16 Bindung der rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme an humane Zellen.** Als Positivkontrolle wurde das rekombinante Protein des C-terminalen Bereichs des P1-Adhäsins verwendet (rP12) sowie als Negativkontrolle das rekombinante Protein P8, das ebenfalls Teil des P1-Adhäsins ist. A) Bindung an HeLa-Zellen. B) Bindung an MRC-5-Zellen. (Daten im Anhang Tabelle III-6). C) Bindung an A549-Zellen. Als Antigen wurden die humanen Zellen in einer Konzentration von 100 µg/ml und die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme von je 15 µg/ml eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit den entsprechenden Seren gegen die rekombinant hergestellten Enzyme. D) Mikroskopische Aufnahme der Bindung Atto 488-markierter rekombinant hergestellter glykolytischer Enzyme an HeLa-Zellen am Beispiel der Proteine PdhA, PdhB und Pgm. Maßstab 10 µm.

Die Untersuchung der Bindungsaffinität ergab, dass alle glykolytischen Enzyme an die humanen Zellen binden. Die höchste Bindungsaffinität ist zu HeLa-Zellen festzustellen, dort war die Differenz zwischen den Werten der Ansätze ohne und mit Zellen am geringsten. Die geringste Bindungsaffinität zeigte sich in Bezug auf die Zelllinie A549, wobei sich große Differenzen zwischen einzelnen rekombinanten Proteinen ergaben. Vor allem die Bindung zwischen PdhC und den A549-Zellen war sehr schwach ausgeprägt. Der Wert der optischen Dichte lag im Bereich der Kontrolle P8, was schlussfolgern lässt, dass PdhC nicht an die humane Zelllinie A549 bindet, wohl aber an HeLa-Zellen. Eine mäßige Bindung konnte zur Zelllinie MRC5 nachgewiesen werden. Allerdings zeigten alle rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme Bindungseigenschaften mit dieser Zelllinie. Weiterhin ist der Abbildung zu entnehmen, dass Pgm, PdhA und PdhB die größte Schwankung in der Bindung an humane Zellen aufweisen. Die stärkste Assoziation konnte in diesen Fällen wiederum mit HeLa-Zellen beobachtet werden. Pgm und PdhB zeigten das geringste Interaktionspotenzial mit der Zelllinie MRC-5, wohingegen PdhA mäßige Bindungseigenschaften zu A549-Zellen besitzt. Die restlichen rekombinant hergestellten Proteine wiesen geringere Schwankungen auf.

Die Bindung der glykolytischen Enzyme an humane HeLa-Zellen konnte ebenfalls mithilfe der Proteinmarkierung nachgewiesen werden. Wie Abbildung 3-16 D entnommen werden kann binden die Proteine vor allem im Bereich der Zell-Zell-Kontakte. Die Bindung an HeLa-Zellen zeigte sich für alle oberflächenassoziierten Proteine (PdhA-C, GapA, Pyk, Pgm, Ldh, Tkt).

Es ist nicht auszuschließen, dass Seren gegen Oberflächenproteine den Prozess der Adhäsion der Bakterien beeinflussen. Durch die Verwendung eines ELISA-basierten Adhärenzhemmtestes wurde ein möglicher Einfluss der Antiseren gegen die glykolytischen Enzyme auf die Bindung von *M. pneumoniae* M129 an HeLa-Zellen analysiert. Dazu wurden die Kavitäten einer 96-Well-Platte mit den Zellen beladen. Frisch geerntete Mykoplasmenzellen wurden mit verschiedenen Seren vorinkubiert und zu den HeLa-Zellen gegeben. Nach dem Waschvorgang wurden die adhärennten Mykoplasmen mithilfe des Antiserums gegen die TX-100-unlösliche Fraktion detektiert (Abbildung 3-17). Als Kontrolle wurde das Serum gegen das *M. pneumoniae* M129-Gesamtantigen sowie das Präimmunserum verwendet.

## Ergebnisse



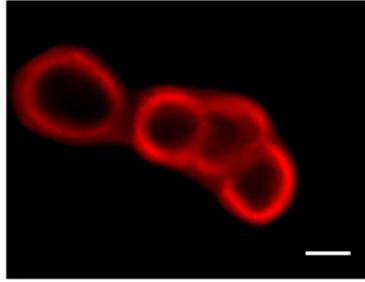
**Abbildung 3-17 Relative Bindung von *M. pneumoniae* M129 an HeLa-Zellen durch Vorinkubation der Mykoplasmenzellen mit den Seren gegen die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme.** Als Positivkontrolle diente das Gesamtantigenserum (M129) sowie als Negativkontrolle das Präimmunserum (PIS). Die ermittelten Werte der optischen Dichte wurden mit dem Präimmunserum gleichgesetzt (100 % Bindung). Die Ergebnisse der Vorinkubation mit den Seren gegen die rekombinant hergestellten Proteine wurden ins Verhältnis gesetzt. OF: Pool der Seren gegen PdhA-C, GapA, Pyk, Pgm, Ldh, Tkt; Mb: Pool der Seren gegen AckA, Pgi, ManB, Pta, PdhD; Ct: Pool der Seren gegen FruK, Pfk, Fba, TpiA, Eno, Pgk; glyk. Enz.: Pool aller glykolytischen Enzyme. Mb Frak. Serum gegen die Proteine der Membranfraktion von *M. pneumoniae*; Ct Frak. Serum gegen die Proteine der Zytosolfraktion von *M. pneumoniae* (beides nach Ultrazentrifugation). *t*-Test bezogen auf PIS: \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  (Daten im Anhang in Tabelle III-4).

Im Vergleich zur Vorinkubation mit dem Präimmunserum konnte keine signifikante Reduktion der adhärenierenden Mykoplasmen an HeLa-Zellen nach Vorbehandlung mit den Seren gegen glykolytische Enzyme gemessen werden. Eine signifikante Reduktion wurde jedoch mit Antikörpern gegen die Membran- und Zytosolfraktion sowie nach der Inkubation mit der Kombination aus den Seren gegen oberflächenassoziierte Proteine beobachtet. Auch die Vorinkubationen mit diversen Kombinationen der Seren gegen die glykolytischen Enzyme (Oberfläche: Seren gegen PdhA-C, GapA, Pgm, Pyk, Ldh, Tkt; Membran: Seren gegen AckA, Pgi, ManB, Pta, PdhD; Zytosol: FruK, Pfk, Fba, TpiA, Eno, Pgk) führte zu keinem messbaren Unterschied im Vergleich zur Kontrolle PIS.

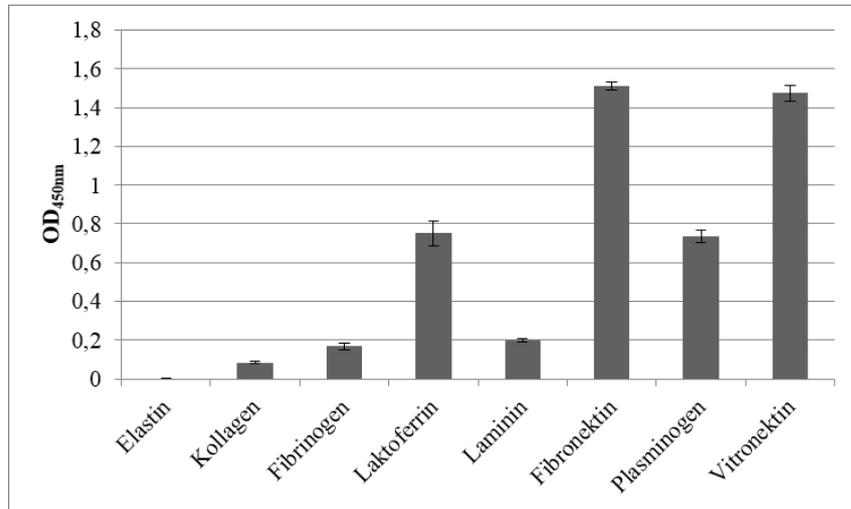
### 3.6 Bindung glykolytischer Enzyme an humane ECM-Proteine

Die nachgewiesene Bindung der glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* an humane Zellen machen Interaktionen dieser Proteine mit ECM-Komponenten wahrscheinlich. Weitere Versuche wurden durchgeführt, um detailliertere Erkenntnisse über mögliche Interaktionspartner zu gewinnen.

A



B



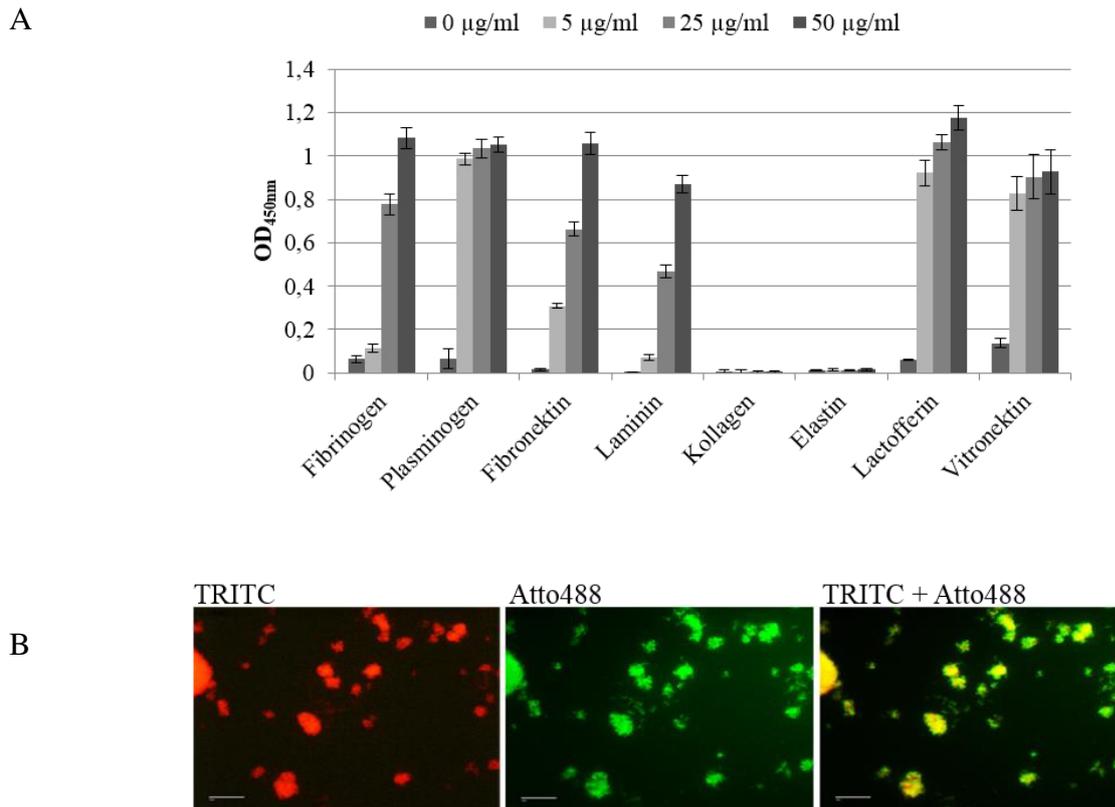
**Abbildung 3-18 Vorkommen von ECM-Proteinen auf der Oberfläche von humanen Zellen.** A) Mikroskopische Aufnahme der Reaktion von anti-Plasminogen mit HeLa-Zellen. Maßstab: 10  $\mu\text{m}$ . B) ELISA-Reaktion von Antiseren gegen verschiedene humane ECM-Proteine mit A549-Zellen. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt.

Abbildung 3-18A ist zu entnehmen, dass Plg auf der Oberfläche von HeLa-Zellen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren wurden die Proteine Vc, Ln, Fc auf der Oberfläche der HeLa-Zellen nachgewiesen. Zur Quantifizierung dieser Interaktionen wurde die ELISA-Technik angewendet.

Es wurde mit dieser Methode gezeigt, dass die humanen Proteine Plg, Vc, Fn, Fc, Ln und Lf auf der Oberfläche von A549-Zellen zu finden sind (Abbildung 3-18A). Es sind jedoch Unterschiede in der Reaktivität festzustellen. Während Fc bzw. Vc hohe und Plg bzw. Lf mittlere OD<sub>450nm</sub>-Werte zeigten, blieb die Reaktivität für Fn und Ln gering, aber messbar. Humanes Elastin und Collagen wurden nicht nachgewiesen.

Um erste Hinweise auf Interaktionen zwischen ECM-Proteinen und glykolytischen Enzymen zu erhalten, wurden zunächst Bindungsstudien der ECM-Proteine mit *M. pneumoniae* M129 durchgeführt. Dazu wurde eine ELISA-basierte Methode angewandt, die eine quantitative Beurteilung der Bindung ermöglichte. Hierbei wurde das Gesamtantigen von *M. pneumoniae* M129 zur Beladung der Platten verwendet, anschließend erfolgte die Zugabe der verschiedenen humanen ECM-Proteine in aufsteigender Konzentration und die Detektion mit den entsprechenden Antiseren. Das Resultat ist in Abbildung 3-19A dargestellt.

## Ergebnisse



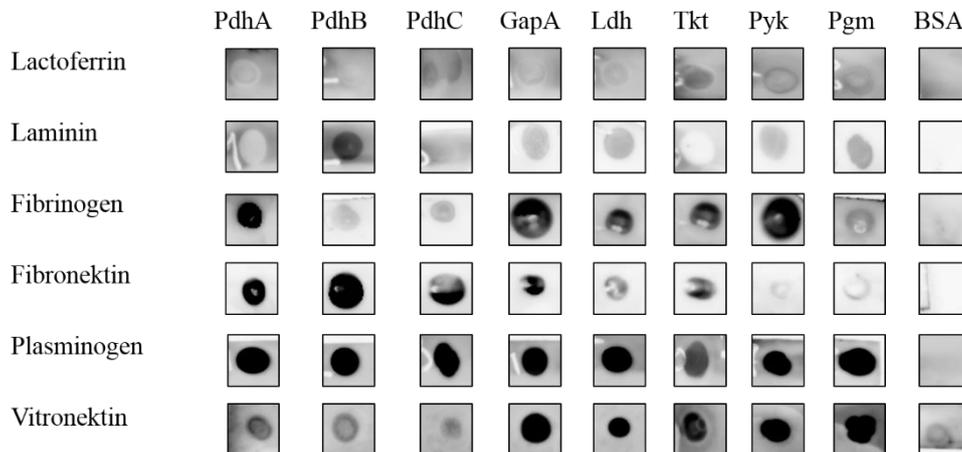
**Abbildung 3-19 Bindung von humanen ECM-Proteinen an *M. pneumoniae* M129.** A) ELISA-Reaktion der Bindung. Als Antigen wurden M129-Zellen eingesetzt (25 µg/ml). (Daten im Anhang Tabelle III-7) B) Bindung Atto 488-markiertes Plasminogen an *M. pneumoniae* M129. Die Basisfärbung der Zellen erfolgte mithilfe des im Kaninchen hergestellten anti-Triton X-100-unlöslichen Phase-Serums (TRITC). Maßstab 10 µm.

*M. pneumoniae* M129 ist in der Lage, sechs der acht untersuchten Proteine zu binden, lediglich für Kollagen und Elastin konnte keine Interaktion nachgewiesen werden. Es sind dabei quantitative Unterschiede in der Bindungsaffinität der ECM-Proteine festzustellen: hohe Bindungsaffinität bei Plg, Lf bzw. Vc und eine nachweisbare, aber nicht hochaffine Bindung zu Ln, Fn und Fc.

Zur ergänzenden Darstellung wurden die humanen ECM-Proteine mit Atto 488 markiert und zu den in Kammer-Objektträgern angewachsenen Mykoplasmen gegeben. Wie Abbildung 3-19B zu entnehmen ist, konnte exemplarisch die Bindung von Plg an Mykoplasmen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend wurde bestätigt, dass *M. pneumoniae* M129 mit verschiedenen humanen ECM-Proteinen interagiert. Da verschiedene Oberflächenproteine diese Bindungen eingehen könnten, wurde anschließend das Interaktionspotenzial der oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme mit den oben genannten ECM-Proteinen untersucht. Um erste Indizien für eine Interaktion zwischen den rekombinant hergestellten und den humanen Proteinen zu

erhalten, wurde die Dot Blot Technik angewendet. Dafür wurden die rekombinanten Proteine bzw. als Negativkontrolle BSA auf eine Nitrozellulosemembran getropft und anschließend mit den ECM-Proteinen inkubiert. Die Detektion erfolgte mithilfe der spezifischen Seren gegen die einzelnen ECM-Proteine (Abbildung 3-20).



**Abbildung 3-20 Bindung humaner ECM-Proteine an die oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme in einer Dot Blot-Reaktion.** Glykolytische Enzyme wurden auf eine Nitrozellulosemembran aufgetropft (1  $\mu$ l) und mit den humanen ECM-Proteinen behandelt. Die Detektion gebundener ECM-Proteine erfolgte mit den entsprechenden Antisera.

Der Abbildung ist zu entnehmen, dass z. B. alle glykolytischen Enzyme anscheinend in der Lage sind, mit Plg zu interagieren. Ebenso ist eine Bindung zwischen den untersuchten Mykoplasmenproteinen und Vc festzustellen. Allerdings weisen die rekombinant hergestellten Proteine PdhA C eine schwache Interaktion auf, die nur geringfügig stärker ist als die der Negativkontrolle. Auch Fn und Fc zeigten Interaktionen zu oberflächenassoziierten Proteinen von *M. pneumoniae*. Teilweise war das Signal sehr schwach, wie beispielsweise die Bindung von Fc an Pgm und Pyk sowie von Fn an Pgm, und lag nur gering über dem der Negativkontrolle. Dadurch sind keine klaren Aussagen über diese Bindungen möglich. Die Bindung von Lf an die glykolytischen Enzyme PdhC, Pyk, Pgm und Tkt wurde ebenfalls nur als sehr schwach nachgewiesen. Auch hier war der Unterschied zur Negativkontrolle gering. Die Reaktion der anderen rekombinanten Proteine ließ keine klare Aussage zu. Für Ln konnten eindeutige Bindungen mit PdhB, GapA, Ldh, Pyk und Pgm detektiert werden, während PdhA, PdhC und Tkt nur ein schwaches Signal ergaben. Durch den Dot Blot wurden somit erste Hinweise auf Interaktionspartner ermittelt.

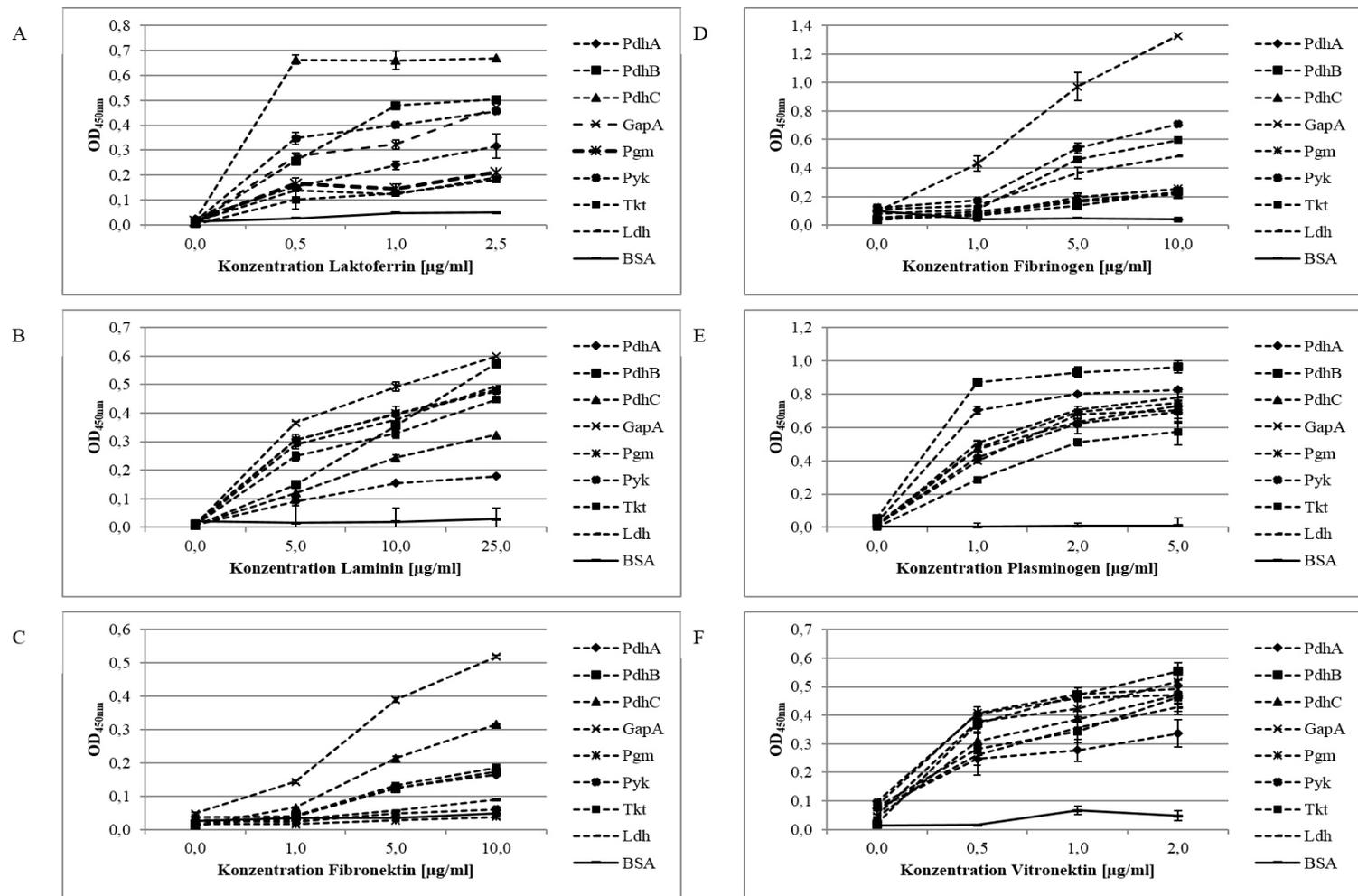
Für detailliertere Aussagen der Bindung der oberflächenassoziierten Proteine von *M. pneumoniae* mit den humanen ECM-Proteinen wurden die glykolytischen Enzyme zur Beladung der 96-Well-Platten verwendet, mit den verschiedenen humanen Proteinen in aufsteigender Konzentration inkubiert, die anschließend mit den entsprechenden Seren

detektiert wurden (Abbildung 3-21). Als Negativkontrolle wurde jeweils BSA verwendet, das in den Voruntersuchungen keine Interaktion mit den humanen ECM-Proteinen gezeigt hatte. Eine Reaktion wurde als Bindung angesehen, wenn die Werte der optischen Dichte (450 nm) über 0,2 lagen.

Durch die Experimente wurden eindeutige Bindungen zwischen Fn, Plg, Vc, Ln, Lf und vielen oberflächenassoziierten Proteinen nachgewiesen. Allerdings sind starke Unterschiede in der Bindungsaffinität zu beobachten. Die stärkste Interaktion zeigten die rekombinanten Proteine mit humanen Plg (Abbildung 3-21E). Es wurde mit allen oberflächenassoziierten Proteinen die Sättigung der Bindung erreicht und die Werte der optischen Dichte lagen bei Zugabe von 5 µg/ml Plg im Bereich von 0,6 und 1,0.

Auch die Bindung zu Vc (Abbildung 3-21F) war zu allen oberflächenassoziierten glykolytischen Enzymen ausgeprägt. Ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Bindung konnte auch bei diesen Kombinationen nachgewiesen werden. Auch hier lagen die Werte der optischen Dichte für die höchste Vc-Konzentration (2,0 µg/ml) zwischen 0,3 und 0,6. Die Interaktionen zwischen Ln (Abbildung 3-21B) und den untersuchten rekombinanten Proteinen zeigten mit Ausnahme von Tkt ebenfalls optische Dichten zwischen 0,3 und 0,6 für die eingesetzte Höchstkonzentration an Ln. Dennoch konnte auch hier eine Bindung mit allen untersuchten glykolytischen Enzymen nachgewiesen werden, was dazu führte, dass alle oberflächlich lokalisierten rekombinanten Proteine für weitere Untersuchungen mit Ln verwendet wurden.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-21 Analyse der Bindung der humanen ECM-Proteine an die oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae*.** Als Antigen wurden die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme verwendet (15 µg/ml). Anschließend wurden die ECM-Proteine in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Die Detektion erfolgte mit den entsprechenden Antisera gegen die ECM-Proteine. A) Bindung an Laktoferrin. B) Bindung an Laminin. C) Bindung an Fibronectin. D) Bindung an Fibrinogen E) Bindung an Plasminogen. F) Bindung an Vitronectin (Daten im Anhang Tabelle III-8).

## Ergebnisse

Fn zeigte eine ausgeprägte Interaktion mit GapA (Abbildung 3-21C), die Werte der optischen Dichte lagen bei bis zu 1,3. Für die restlichen oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme ergibt sich ein differenziertes Bild. Während für Pyk, Tkt und Ldh eine gegenüber GapA zwar deutlich verringerte, aber klar nachweisbare Assoziationen belegt wurde ( $OD_{450nm}$ -Werte zwischen 0,5 und 0,7), konnten für die übrigen Proteine schwache Bindungen mit Werten der optischen Dichte um 0,2 beobachtet werden.

Eine Bindung zu Lf (Abbildung 3-21A) wurde für Pyk, GapA und PdhA-C festgestellt. Dabei wurden Werte der optischen Dichte zwischen 0,3 und 0,7 gemessen, wobei in einigen Fällen der Bereich der Sättigung erreicht wurde. Für die übrigen glykolytischen Enzyme lag der maximale OD-Wert bei 0,2 und darunter.

Das humane ECM-Protein Fc zeigte eine starke Bindungsaffinität zu GapA (maximale  $OD_{450nm}=0,5$ ) bzw. PdhC (0,3). Mit den übrigen rekombinanten Proteinen ergaben sich  $OD_{450nm}$ -Werte von 0,2 und deutlich darunter.

Sehr schwache Interaktionen zwischen ECM-Proteinen und glykolytischen Enzymen ( $OD_{450nm} < 0,2$ ) wurden als negativ bewertet und nicht in weiterführende Untersuchungen einbezogen. Die Zusammenfassung der Bindungsstudien ist der Tabelle 3-3 zu entnehmen.

**Tabelle 3-3 Übersicht der Bindung glykolytischer Enzyme von *M. pneumoniae* an humane ECM-Proteine.**

Humanes Protein	PdhA	PdhB	PdhC	GapA	Ldh	Tkt	Pyk	Pgm
<b>Laktoferrin</b>	ja	ja	ja	ja	nein	nein	ja	nein
<b>Laminin</b>	nein	ja						
<b>Fibronektin</b>	nein	nein	ja	ja	nein	ja	nein	nein
<b>Fibrinogen</b>	ja							
<b>Plasminogen</b>	ja							
<b>Vitronektin</b>	ja							

Nachdem der Nachweis spezifischer Bindungen bestätigt worden ist, wurden die Interaktionen zwischen den glykolytischen Enzymen und den humanen ECM-Proteinen mittels verschiedener ELISA-Analysen näher charakterisiert. Dabei wurde der Einfluss der monospezifischen Seren bzw. durch den Einsatz steigender Salzkonzentrationen der Einfluss ionischen Wechselwirkungen auf die Bindung untersucht. Die Bedeutung der Lysinreste für die Plg-Bindung kann durch den Zusatz des Lysin-Analogons 6-Aminohexansäure nachgewiesen werden. In allen Fällen wurden nur die in Tabelle 3-3 bestätigten Interaktionen weiter analysiert.

### **3.6.1.1 Einfluss der monospezifischen Seren gegen glykolytische Enzyme von *Mycoplasma pneumoniae* auf die Bindung mit humanen ECM-Proteinen**

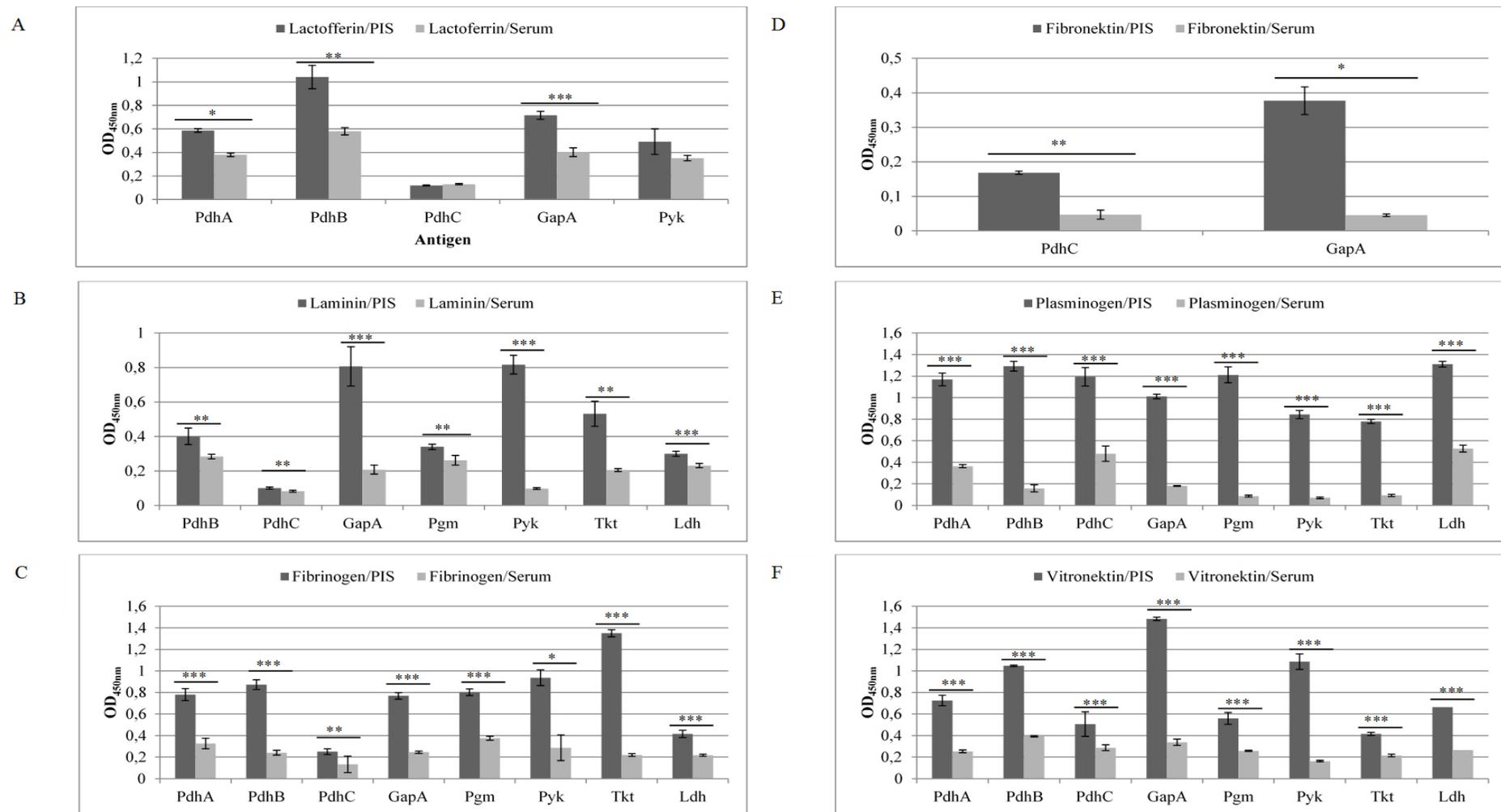
Zur Testung des Einflusses der polyklonalen Seren auf bestätigte Interaktionen wurden 96-Well-Platten mit den entsprechenden rekombinanten Proteinen beladen. Parallel wurden die ECM-Proteine mit den spezifischen Seren vorinkubiert und anschließend zu den immobilisierten Proteinen gegeben. Gebundene humane Proteine wurden mithilfe der spezifischen Antikörper gegen die ECM-Komponenten detektiert (Abbildung 3-22).

Wie aus Abbildung 3-22A zu entnehmen, konnte die Interaktion zwischen den rekombinanten Proteinen und Lf um bis zu 44 % (PdhB) durch die Vorinkubation mit den entsprechenden Seren reduziert werden. Auch für PdhA (Reduktion: 39 %), GapA (44%) und Pyk (28 %) verringerte sich die Bindung signifikant. Es war jedoch nicht möglich, die schwache Bindung zwischen Lf und dem rekombinanten Protein PdhC durch das entsprechende Serum weiter zu reduzieren.

Der Einfluss der Seren auf die Assoziation mit Ln (Abbildung 3-22B) zeigt ein ähnliches Bild. Auch wenn die Werte für Pgm und Ldh nur bei 18-22 % lagen, wurde eine Signifikanz der Abnahme festgestellt. Die Reduktion betragen für PdhB 30 %, für Tkt 60 % und für Pyk 88 %, was einer fast vollständigen Hemmung gleichzusetzen ist.

Die Vorinkubation von Fn (Abbildung 3-22C) mit den verschiedenen Seren führte zu einer signifikanten Reduktion bei allen untersuchten Proteinen. Die geringste Hemmung konnte für PdhC, Pgm und Ldh erreicht werden (Reduktion um ca. 50 %) Die Interaktion zwischen Fn und GapA, PdhB bzw. Pyk wurde zu rund 70 % verringert. Die stärkste Reduktion (um 85 %) wurde für Tkt ermittelt.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-22 Einfluss der monospezifischen Seren gegen oberflächenassoziierte glykolytische Enzyme von *M. pneumoniae* auf die Interaktion zwischen den rekombinant hergestellten Enzymen und den humanen ECM-Proteinen.** Die glykolytischen Enzyme wurden als Antigen verwendet (15 µg/ml). Anschließend erfolgte die Zugabe der humanen ECM-Proteine, welche zuvor 2 h mit den monospezifischen Seren vorinkubiert wurden. Als Negativkontrolle diente die Vorinkubation der Proteine mit dem Präimmunsere (PIS). A) Einfluss auf die Bindung an Laktoferrin. B) Einfluss auf die Bindung an Laminin. C) Einfluss auf die Bindung an Fibrinogen. D) Einfluss auf die Bindung an Fibronectin E) Einfluss auf die Bindung an Plasminogen. F) Einfluss auf die Bindung an Vitronectin. *t*-Test bezogen auf PIS: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  (Daten im Anhang in Tabelle III- 9).

Die Interaktion der glykolytischen Enzyme zu Fc (Abbildung 3-22D) konnte ebenfalls spezifisch durch die Seren beeinflusst werden. Die Assoziation von Fc zu PdhC wurde um bis zu 70 % reduziert und für GapA fast vollständig unterbunden (90 %).

Alle Bindungen rekombinanter Proteine zu Plg (Abbildung 3-22E) wurden durch Inkubation mit den Seren ebenfalls signifikant gehemmt. Eine Reduktion von 60 % wiesen die Proteine Ldh bzw. PdhC auf, PdhA eine Reduktion von 70 % und GapA von ca. 80 %. Für die restlichen glykolytischen Enzyme konnte eine fast vollständige Hemmung der Bindung zu Plg erreicht werden (Reduzierung um 90 %).

Die Interaktion zwischen Vc (Abbildung 3-22F) und den rekombinanten Proteinen wurde durch die entsprechenden Seren um 45 (PdhC und Tkt) bis 85 % (Pyk) reduziert.

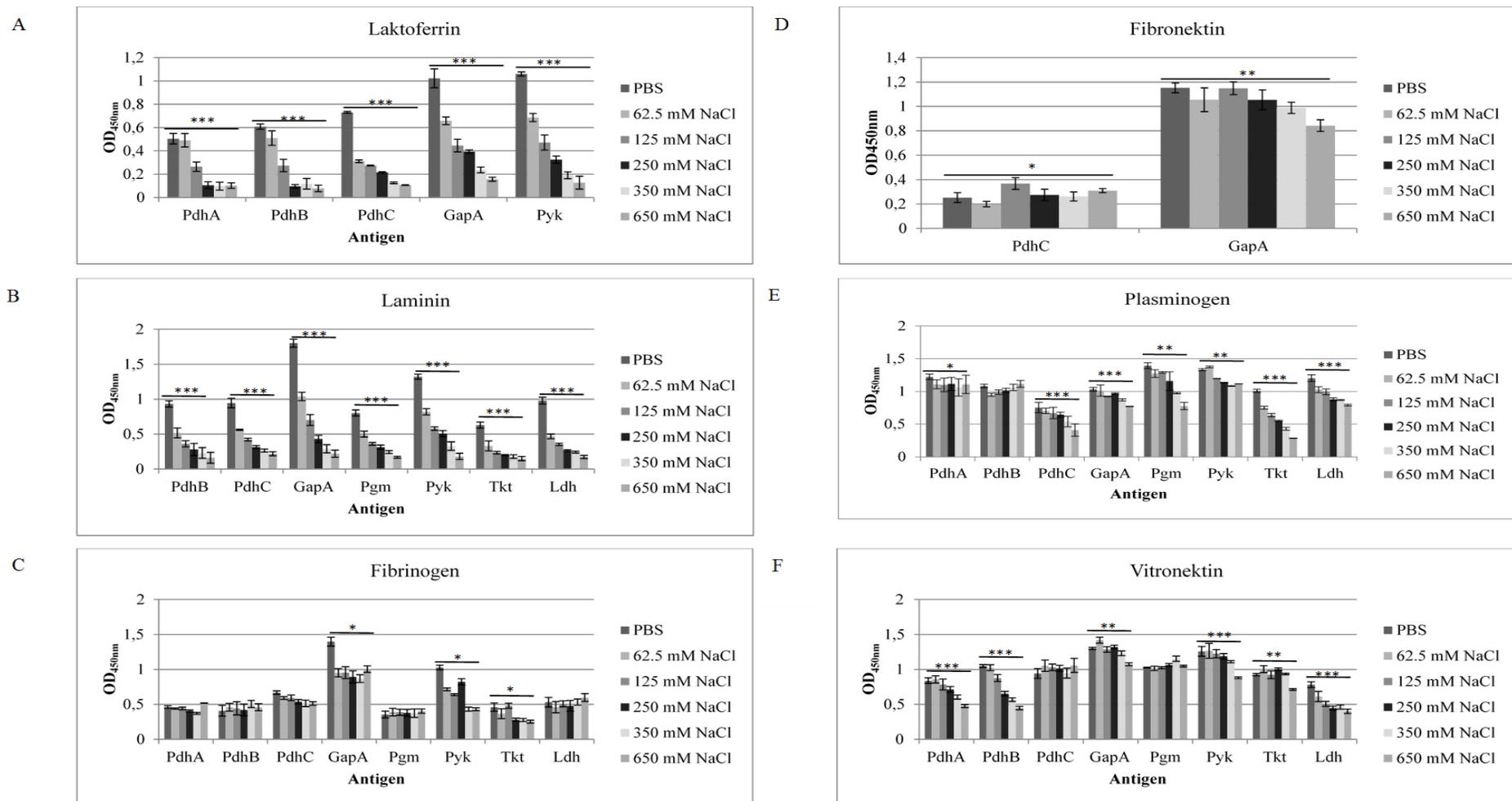
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Reduktion der Bindung zwischen den humanen ECM-Proteinen und den oberflächenassoziierten Enzymen durch die Vorinkubation der ECM-Proteine mit den entsprechenden Seren in fast allen Fällen möglich war. Es zeigte sich jedoch, dass die Seren unterschiedlich stark Einfluss auf die Bindung nehmen. Es wurden Werte zwischen 20 % (Ln und PdhA) und 90 % (Plg und Pgm) ermittelt. Eine komplette Hemmung der Interaktionen wurde nicht erreicht.

### **3.6.1.2 Einfluss ionischer Wechselwirkungen auf die Interaktionen zwischen ECM-Proteinen und rekombinant hergestellten glykolytischen Enzymen**

Zur Prüfung des Einflusses unterschiedlicher Salzkonzentrationen auf die Interaktion der Proteine wurden die rekombinanten Proteine immobilisiert und die humanen ECM-Proteine, die in PBS mit ansteigenden NaCl oder NaBr-Konzentrationen eingesetzt wurden, hinzugegeben. Die Detektion der gebundenen ECM-Proteine erfolgte mit den entsprechenden Antiseren. Die Ergebnisse für NaCl sind der Abbildung 3-23 zu entnehmen.

Die Gegenwart von NaCl beeinflusst die Bindung zwischen den humanen ECM-Proteinen und den oberflächenassoziierten glykolytischen Enzymen in unterschiedlicher Weise. Die Mitführung der Negativkontrolle PBS führte zu keiner messbaren Reaktion in Bezug auf die Bindung an die humanen ECM-Proteinen.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-23** Beeinflussung der Interaktion zwischen glykolytischen Enzymen von *M. pneumoniae* und den humanen Proteinen durch NaCl. Die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme wurden als Antigen verwendet (15 µg/ml). Die Inkubation der ECM-Proteine erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen an NaCl (62,5; 125; 250; 350; 650 mM) in PBS. Als Positivkontrolle wurde der Einfluss ohne NaCl (PBS) verwendet. A) Einfluss auf die Bindung an Laktoferrin. B) Einfluss auf die Bindung an Laminin. C) Einfluss auf die Bindung an Fibrinogen. D) Einfluss auf die Bindung an Fibronektin E) Einfluss auf die Bindung an Plasminogen. F) Einfluss auf die Bindung an Vitronektin. *t*-Test bezogen auf PBS: \* $p \leq 0,05$ ; \*\* $p \leq 0,01$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$  (Daten im Anhang in Tabelle III- 11).

Die Interaktion von Lf mit den oberflächenassoziierten Proteinen beruhte fast ausschließlich auf ionischen Wechselwirkungen (Abbildung 3-23A). Die signifikante Reduktion der Werte der Kontrolle und der höchsten Konzentration an NaCl lag bei allen Proteinen zwischen 85 und 90 %.

Auch die Interaktion mit Ln (Abbildung 3-23B) zeigt bei allen untersuchten rekombinanten Proteinen einen Einfluss ionischer Wechselwirkungen. In diesem Fall lag die Reduktion der Bindung in Gegenwart von PBS und der höchsten NaCl-Konzentration zwischen 76 und 88 %. Ähnlich wie für Lf korrelierte die Abnahme der Bindung zu Ln mit der Zunahme der NaCl-Konzentration.

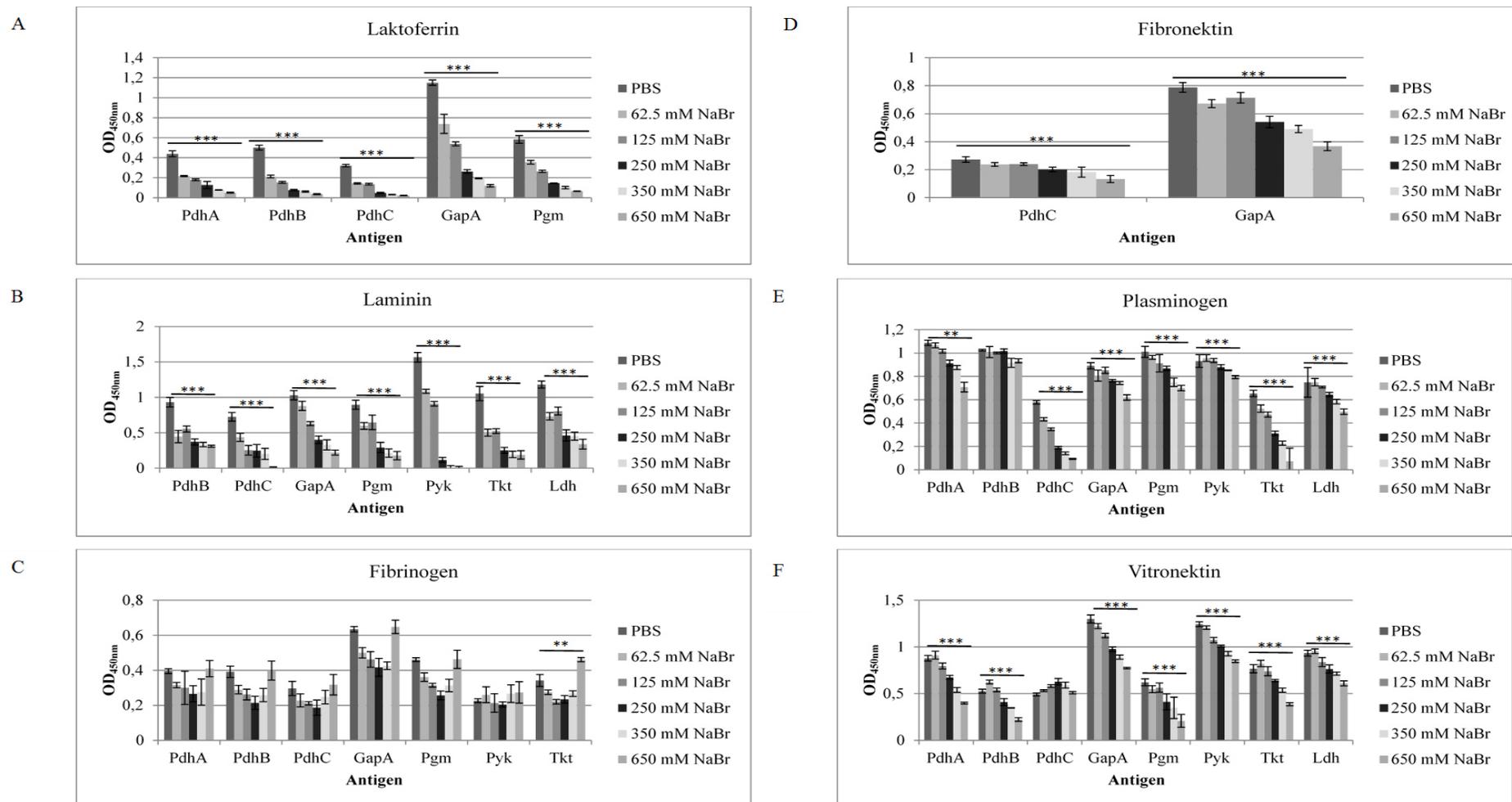
Dagegen ergaben sich für Fn (Abbildung 3-23C) wesentlich konstantere Bindungen. So konnte kein Einfluss des Salzes für die Interaktion zwischen Fn und PdhB, PdhC, Pgm bzw. Ldh festgestellt werden. Die Bindung von Fn und GapA bzw. Tkt wurde zwar durch den Zusatz von NaCl reduziert, blieb aber unverändert bei höheren Konzentrationen an NaCl. Bis auf PdhC zeigten die übrigen rekombinanten Proteine keine klare Abhängigkeit der Bindungsstärke von der NaCl-Konzentration.

Die Bindung der oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme an humanes Fc (Abbildung 3-23D) unterliegt ebenfalls nur teilweise ionischen Wechselwirkungen (GapA mit 27 % Reduktion). Die Interaktion zwischen PdhC und Fc konnte sogar um 63 % verbessert werden. Die Assoziation mit Plg (Abbildung 3-23E) basiert dagegen bei den meisten oberflächenassoziierten glykolytischen Proteinen auf ionischen Wechselwirkungen. Lediglich für PdhB ist dieser Einfluss nicht nachweisbar und für PdhA ist er relativ gering (Reduktion der Bindung um 10 %). Bei den übrigen Proteinen lag die Reduktion zwischen 16 (Pyk) und 72 % (Tkt).

Ionische Wechselwirkungen wirken ebenfalls auf die Interaktion vieler rekombinanter Proteine mit humanem Vc (Abbildung 3-23F). Dabei konnten die Bindungen um 25 bis 50 % reduziert werden. Keinen signifikanten Einfluss übte NaCl auf die Bindung zwischen Vc und PdhC sowie Pgm aus.

Um die Erkenntnisse der bisherigen bestehenden ionischen Wechselwirkungen zu überprüfen, wurden zusätzliche Versuche mit dem Salz NaBr durchgeführt (Abbildung 3-24).

## Ergebnisse



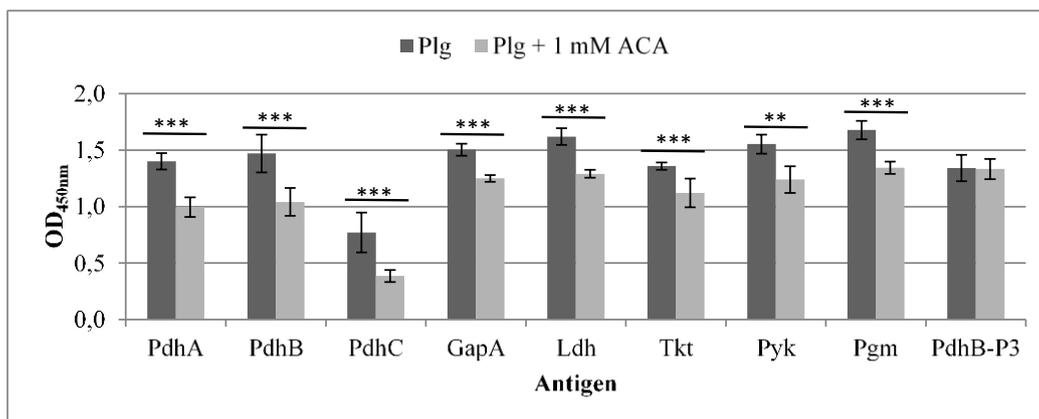
**Abbildung 3-24** Beeinflussung der Interaktion zwischen glykolytischen Enzymen von *M. pneumoniae* und den humanen Proteinen durch NaBr. Die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme wurden als Antigen verwendet (15 µg/ml). Die Zugabe der ECM-Proteine erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen an NaBr (62,5; 125; 250; 350; 650 mM) in PBS. Als Positivkontrolle wurde der Einfluss ohne Salz (PBS) verwendet. A) Einfluss auf die Bindung an Laktoferrin. B) Einfluss auf die Bindung an Laminin. C) Einfluss auf die Bindung an Fibrinogen. D) Einfluss auf die Bindung an Fibronectin E) Einfluss auf die Bindung an Plasminogen. F) Einfluss auf die Bindung an Vitronectin. *t*-Test bezogen auf PBS: \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  (Daten im Anhang in Tabelle III-11).

Die Untersuchung der ionischen Wechselwirkung basierend auf dem Salz NaBr zeigte für die überwiegende Zahl von Interaktionen zwischen rekombinanten Proteinen und Komponenten der humanen ECM ein der Zugabe von NaCl vergleichbares Bild. Es gibt jedoch auch Abweichungen hinsichtlich der Reduktionsraten (z. B. bei Fn und Tkt; Vc und Pgm).

Der alternative Einsatz von NaBr bestätigt, dass ein Großteil der untersuchten Protein-Protein-Interaktionen ionischen Wechselwirkungen unterliegt, ohne dass eine vollständige Aufhebung der Interaktion auf diese Weise zu erreichen ist. Hohe Schwankungen der gebundenen Proteine legen jedoch nahe, dass weitere molekulare Mechanismen an den Bindungen beteiligt sind.

### 3.6.1.3 Einfluss des Lysin-Analogons 6-Aminohexansäure auf die Interaktionen zwischen den oberflächenassoziierten glykolytischen Enzymen und den humanen ECM-Proteinen

Die Bindung von Proteinen an Plg kann u. a. aufgrund von Lysin-Anteilen erklärt werden. Die 6-Aminohexansäure (ACA), ein Lysin-Analogon, bindet hochaffin an die Kringle-Domänen von Plg. Ein Einfluss dieses Analogons und damit der Einfluss der Kringle-Domäne auf die Interaktion mit den oberflächenassoziierten Proteinen von *M. pneumoniae* und Plg wurde auf der Basis eines ELISA's untersucht. Dafür wurden die rekombinanten Proteine in 96-Well Platten immobilisiert, anschließend wurde Plg hinzugegeben, welches zuvor in PBS unter Zusatz von ACA verdünnt wurde. Gebundenes Plg wurde wie beschrieben detektiert. Das Resultat ist in Abbildung 3-25 zusammengefasst.



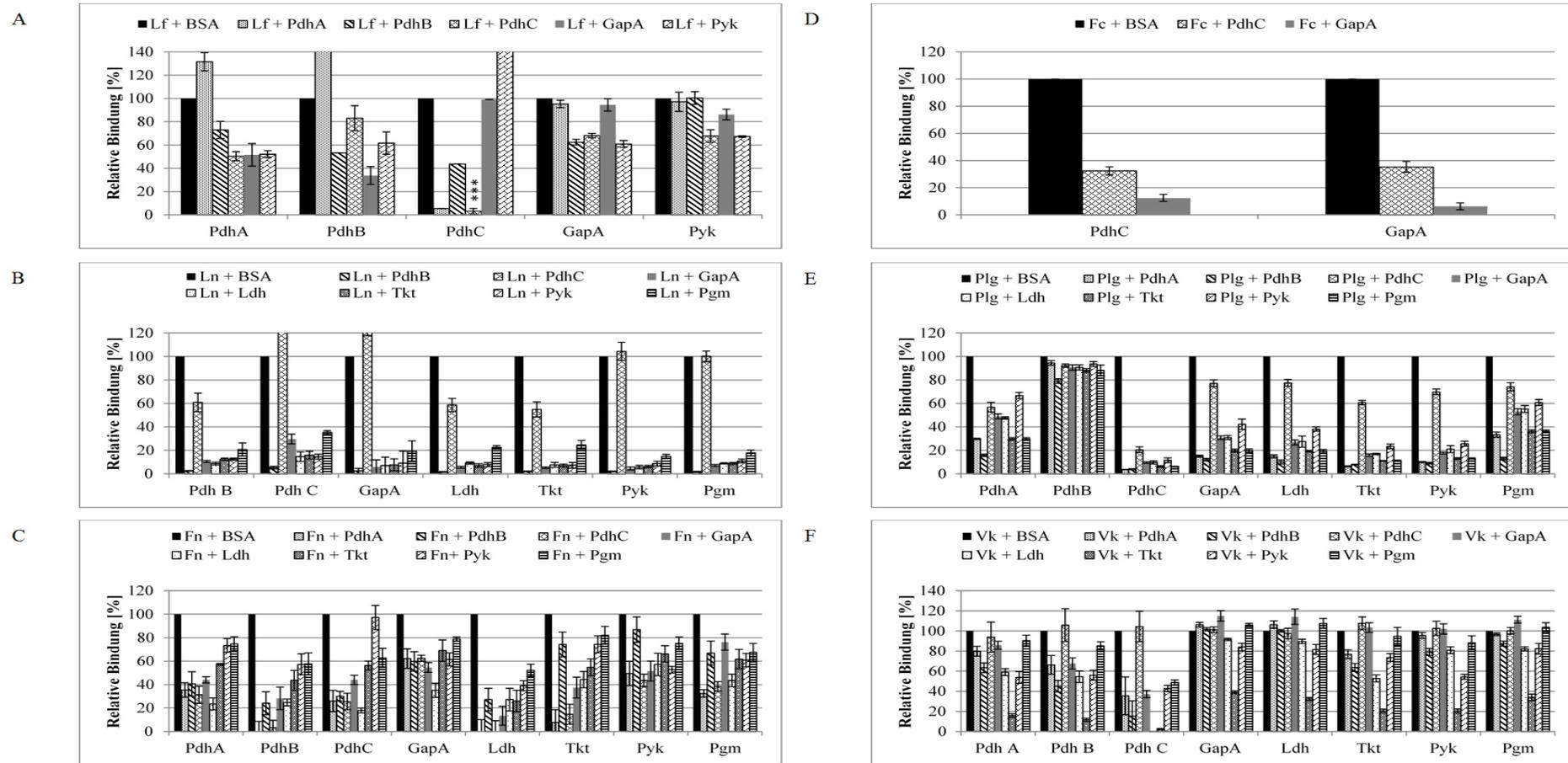
**Abbildung 3-25** Beeinflussung der Plasminogenbindung an die glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* durch die Zugabe von 6-Aminohexansäure. Die rekombinanten Proteine wurden als Antigen verwendet (15 µg/ml). Die Inkubation mit 2,5 µg/ml Plasminogen erfolgte unter Zugabe von 1mM 6-Aminohexansäure (ACA). Als Positivkontrolle wurde die Plasminogenbindung in PBS untersucht. Die Detektion erfolgte mit anti-Plasminogen. *t*-Test bezogen auf Plg: \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  (Daten im Anhang in Tabelle III- 10).

Der Einsatz des Lysin-Analogons führt bei allen Bindungspartnern von Plg zu einer ähnlichen Beeinflussung der Assoziation. Nur die Kontrolle mit PdhB-P3 (Teilbereich von PdhB), ein Plg-Bindungspartner ohne Lysinreste, zeigte keine Reduktion der Interaktion. Bei allen anderen oberflächenassoziierten glykolytischen Enzymen konnte ein signifikanter Einfluss von ACA im Vergleich zur Kontrolle ohne ACA beobachtet werden. Es sind jedoch quantitative Unterschiede der Reduktion festzustellen, so wurde die höchste Verringerung (ca. 50 %) für PdhC gemessen werden. Eine weitere Reduzierung der Plg-Bindung wurde durch die Erhöhung der Konzentration des Lysin-Analogons erzielt (Abbildung II- 8, Anhang).

### **3.6.1.4 Untersuchung der Bindungsstellen der glykolytischen Enzyme an humane ECM-Proteine**

Um erste Ergebnisse darüber zu erhalten, ob sich die verschiedenen oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme bei der Bindung an humane ECM-Proteine untereinander beeinflussen, wurden die entsprechenden rekombinanten Proteine in den Kavitäten einer 96-Well-Platte immobilisiert. Nach der Blockierung wurden die humanen ECM-Komponenten hinzugegeben, die zuvor mit den verschiedenen rekombinanten Proteinen vorinkubiert wurden. Die gebundenen humanen Proteine wurde dann mit den entsprechenden Antiseren nachgewiesen und die optische Dichte ermittelt (Abbildung 3-26). Hintergrund war die Fragestellung, ob durch die komplexe Abdeckung der Bindungsregionen auf den ECM-Faktoren die Assoziation mit den bakteriellen Faktoren eingeschränkt wird. Das Signifikanzniveau der vorliegenden Daten sind der Tabelle III-13 im Anhang zu entnehmen.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-26 Relative Bindung der humanen ECM-Proteinen an die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme in Abhängigkeit von der Besetzung der Bindungsstellen.** Die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme wurden als Antigen immobilisiert (15 µg/ml). Anschließend wurden die humanen ECM-Proteine, die zuvor 2 h mit den rekombinanten Proteinen (15 µg/ml) vorinkubiert wurden, hinzugegeben. Die Detektion der gebundenen ECM-Proteine erfolgte mit den entsprechenden Seren gegen die humanen Proteine. Als Positivkontrolle diente die Vorinkubation der humanen ECM-Proteine mit BSA, deren Werte der optischen Dichte als 100% Bindung angesehen wurde. Die Ergebnisse der Vorinkubation mit den glykolytischen Enzymen wurden dazu ins Verhältnis gesetzt. A) Einfluss auf die Bindung an Laktoferrin (Lf). B) Einfluss auf die Bindung an Laminin (Ln). C) Einfluss auf die Bindung an Fibrinogen (Fn). D) Einfluss auf die Bindung an Fibronectin (Fc). E) Einfluss auf die Bindung an Plasminogen (Plg). F) Einfluss auf die Bindung an Vitronectin (Vc) (Daten im Anhang in Tabelle III- 12).

Die Ergebnisse der Experimente ergaben ein komplexes Muster an Beeinflussungen. So wird die Bindung von Lf durch Vorinkubation des ECM-Proteins mit den entsprechenden rekombinant hergestellten Proteinen beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation von Lf mit PdhC stets zu einer Reduktion führt. Ebenso führt die Zugabe von PdhB und Pyk zu einer Reduktion der Bindung zu fast allen glykolytischen Enzymen. Die Vorinkubation von Lf mit GapA hingegen resultierte zwar in einer Reduktion der Bindung zwischen dem ECM-Protein und PdhA bzw. PdhB, nahm jedoch keinen Einfluss auf die Interaktion der restlichen Proteine.

Die Untersuchung bezüglich der Bindungsstellen für Ln (Abbildung 3-26B) zeigte eine starke Beeinflussung der Proteine untereinander. Unabhängig vom gewählten Protein für die Vorinkubation konnte in der Regel eine Reduktion der Interaktion nachgewiesen werden. Die Bindung wurde fast vollständig inhibiert. Vor allem die Vorinkubation mit PdhB führte zu einer Reduktion von bis zu 95 %. Nur die Vorinkubation mit PdhC war weniger effizient. Die Vorinkubation mit diesem glykolytischen Enzym führte im Fall von Ldh und Tkt zwar zu einer Verringerung, jedoch lag die relative Bindung noch bei ca. 60 % im Vergleich zur Kontrolle. Bei den restlichen Proteinen ergab die vorherige Zugabe von PdhC keine signifikante Reduktion bzw. konnte sogar ein positiver Effekt auf die Bindung festgestellt werden (GapA). Die Interaktion zwischen rekombinantem Protein und Fn konnte durch die Vorinkubation mit den entsprechenden rekombinanten Proteinen stets gemindert werden. Vor allem die vorherige Zugabe von PdhA und PdhC führte zur Reduktion der Bindung zwischen Ldh und Fn um bis zu 99 %.

Auch die Bindung zu Fc (Abbildung 3-26D) wurde durch die Vorbehandlung mit den diversen glykolytischen Enzymen nachweisbar verringert. Die Vorinkubation PdhC und GapA führte zu einer Bindungsreduktion von über 70%. Dabei resultierte aus der Vorinkubation von Fc mit GapA eine stärkere Bindungsreaktion als mit PdhC. Die Differenz liegt dabei zwischen 20 bis 30 %.

Die Bindung zwischen den rekombinant hergestellten Enzymen und Plg (Abbildung 3-26E) wurde in allen Fällen durch die Vorinkubation mit den entsprechenden Proteinen reduziert. Allerdings war die Reduktion unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Interaktion zwischen Plg und PdhC konnte mit allen Proteinen so weit reduziert werden, so dass die relative Bindung nicht über 20 % lag. Im Gegensatz dazu ist die Bindung zwischen PdhB und Plg nur schwach reduziert (stets über 80%). Bei den anderen Proteinen konnte die Assoziation zwischen einen Wert von 40 bis 80 % verringert werden. Die Vorinkubation von Plg mit dem rekombinanten Protein PdhC zeigte in der Regel den geringsten Einfluss auf die Interaktion.

Die Vorbehandlung von Vc mit den rekombinant hergestellten Proteinen (Abbildung 3-26F) ergab, dass die Bindung im Vergleich zu den anderen ECM-Proteinen nur geringfügig reduziert wird. Allerdings ist ersichtlich, dass Tkt übereinstimmend den stärksten Einfluss nimmt. Die Vorinkubation mit PdhC hingegen führte nicht zur Reduktion der Interaktion. Die anderen Proteine weisen dagegen größere Schwankungen in ihrer Auswirkung auf die Bindung der einzelnen rekombinanten Proteine an Vc auf.

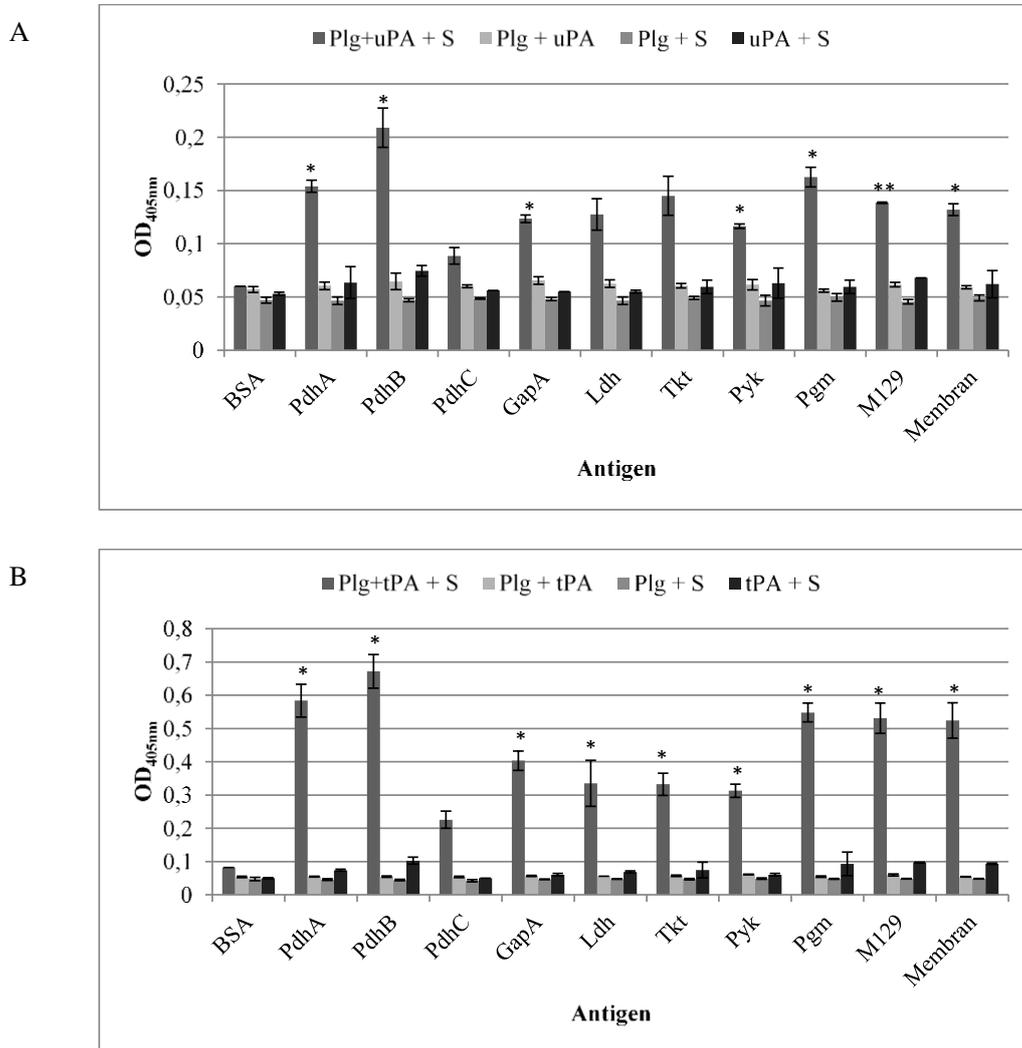
### **3.6.1.5 Aktivierung des Vorläuferproteins Plasminogen zu Plasmin in Gegenwart der glykolytischen Enzyme von *Mycoplasma pneumoniae***

Plg ist das inaktive Vorläuferprotein von Plasmin. Gebundenes Plg kann durch bestimmte Aktivatoren in die aktive Form Plasmin umgewandelt werden. Es wurde eine ELISA-basierte Methode entwickelt, um das Plg-Aktivierungspotenzial in Gegenwart der glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* zu testen. Das generierte Plasmin wurde über die Umsetzung des spezifischen chromogenen Substrates photometrisch gemessen. Die Einzelergebnisse sind Abbildung 3-27 zu entnehmen.

Bei dem Enzymaktivitätsassay wurde BSA als Negativkontrolle verwendet. Weiterhin wurden drei Kontrollansätze mitgeführt, bei denen jeweils ein Bestandteil fehlte, der zur vollständigen Aktivierung von Plg zu Plasmin notwendig ist (Plg, Aktivator uPA oder tPA, Plasminspezifisches Substrat). Nach Auswertung konnte festgestellt werden, dass bei den jeweiligen Kontrollansätzen keine Reaktion, also keine Plg-Aktivierung, beobachtet werden kann ( $OD_{450nm} \leq 0,1$ ). Dagegen sind signifikante Unterschiede in den Ansätzen mit allen essenziellen Komponenten in Gegenwart der verschiedenen Proteine zu finden. Während bei der Immobilisierung eines Proteins (BSA) ohne Interaktion mit Plg keine Aktivierung erfolgte, kann eine Generierung von Plasmin nach Bindung des Plg an die immobilisierten glykolytischen Enzyme sowie an das Gesamtantigen und an die Membranfraktion von *M. pneumoniae* M129 initiiert werden. Auffällig war jedoch, dass aus der Kombination mit dem gewebespezifischen Plasminogenaktivator (tPA, Abbildung 3-27 B) ein wesentlich höheres Aktivierungspotenzial resultierte als mit dem Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA, Abbildung 3-27A). Die Werte der optischen Dichte mit tPA lagen unter sonst vergleichbaren Bedingungen um das Zwei- bis Dreifache höher als die Reaktionen mit uPA. Die Bindung des humanen Plg an das immobilisierte Protein PdhB führte mit beiden Aktivatoren zu den höchsten Werten der optischen Dichte. Aber auch die Ansätze mit den Proteinen PdhA, GapA, Pyk, Tkt, Pgm, Ldh sowie dem Gesamtantigen und der Membranfraktion von *M. pneumoniae* weisen signifikante Abweichungen zur Kontrolle BSA auf. Allerdings lagen diese Werte unter denen

## Ergebnisse

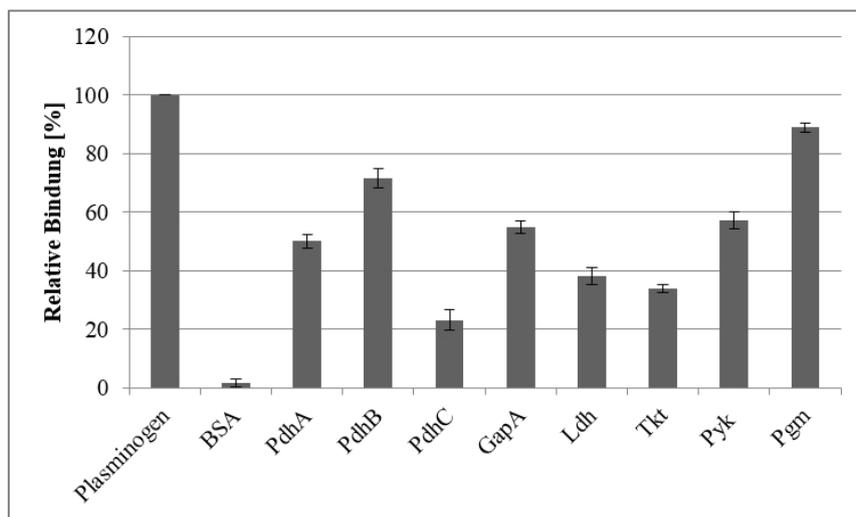
des immobilisierten PdhB. In Gegenwart von PdhC ist zwar eine Erhöhung der OD<sub>450nm</sub>-Werte messbar, diese wich aber nicht signifikant von der Negativkontrolle BSA ab.



**Abbildung 3-27 Aktivierung von Plasminogen nach Interaktion mit den rekombinant hergestellten glykolytischen Enzymen von *M. pneumoniae*.** Die rekombinanten Proteine sowie *M. pneumoniae*-Gesamtantigen (M129) bzw. die Membranfraktion des Gesamtproteins (Membran) wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml immobilisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von humanem Plasminogen (Plg, 15 µg/ml) sowie den Plasminogen-Aktivatoren (5 ng/well) und des Plasmin-spezifischen Substrates D-Val-Leu-Lys-4-Nitronanilin Dihydrochlorid (S). Das Weglassen je einer Komponente des Versuchsansatzes diente der Kontrolle. A) Verwendung des humanen Urokinase-Aktivators (uPA) B) Verwendung des gewebespezifischen Aktivators (tPA). Signifikanz in Bezug auf die Negativkontrolle (BSA). *t*-Test bezogen auf BSA: \* $p \leq 0,05$  (Daten im Anhang in Tabelle III- 14).

## Ergebnisse

Da die Aktivierungspotenziale in Gegenwart der glykolytischen Enzyme sehr variabel waren, wurde zusätzlich deren Bindungsaffinität an Plg quantitativ getestet, um eine mögliche Ursache dieser Unterschiede zu finden (Abbildung 3-28). Dafür wurden die Kavitäten einer ELISA-Platte mit Plg und den rekombinant hergestellten glykolytischen Enzymen beladen. Anschließend wurde Plg in derselben Konzentration wie bei der Immobilisierung zu den rekombinanten Proteinen gegeben. Gebundenes Plasminogen wurde mithilfe des entsprechenden Antikörpers detektiert. Die Reaktivität des immobilisierten Plg wurde als 100 % angenommen und auf die Bindung an die rekombinanten Proteine übertragen. Somit konnte der prozentuale Anteil der Bindung abgeschätzt werden.



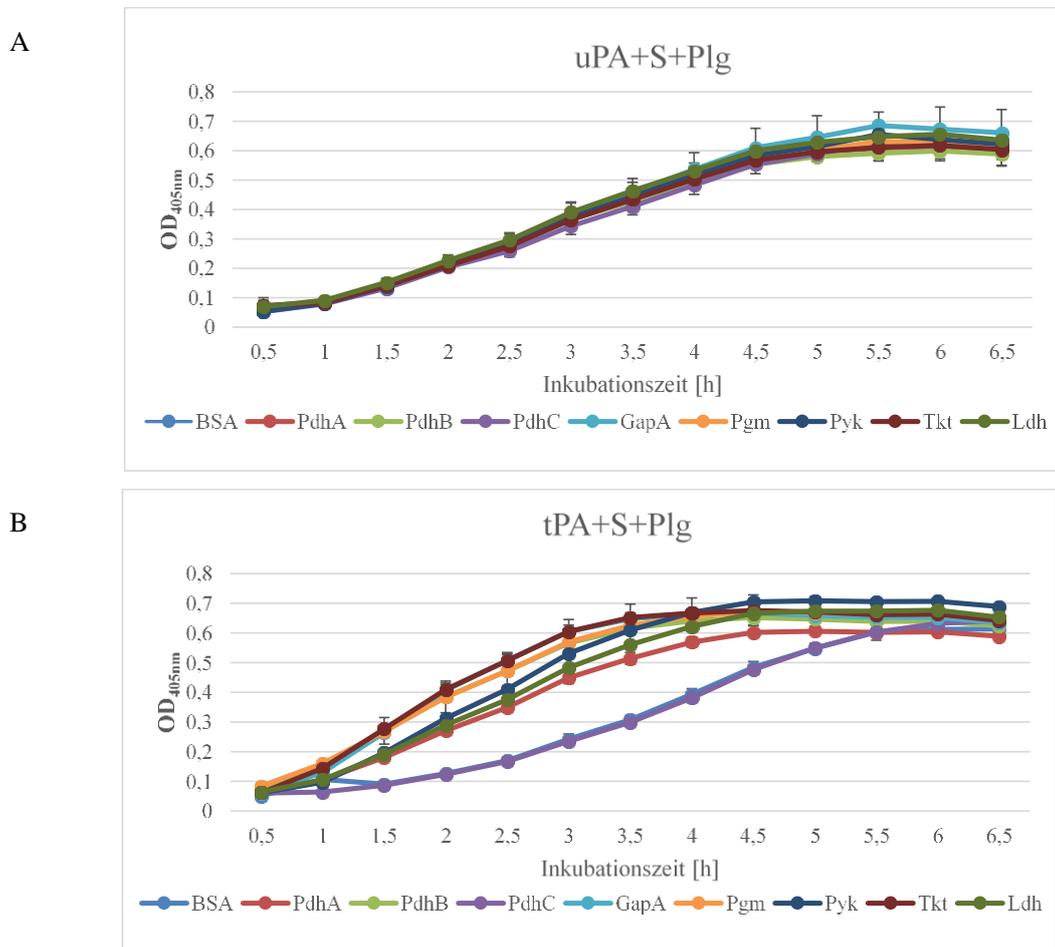
**Abbildung 3-28 Relative Bindung von humanem Plasminogen an oberflächenlokalisierte glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae*.** Die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme (10 µg/ml) sowie Plasminogen als Positivkontrolle (5 µg/ml) wurden immobilisiert. Anschließend wurden 5 µg/ml Plasminogen bzw. PBS (Plg-Ansätze) hinzugegeben. Die Detektion des gebundenen Plasminogens erfolgte mit anti-Plasminogen. Die ermittelten Werte der optischen Dichte des Antigens Plasminogen wurden als 100% einer Bindung betrachtet. Die Ergebnisse mit den glykolytischen Enzymen wurden dazu ins Verhältnis gesetzt.

Nach Auswertung der prozentualen Bindung von Plg an die glykolytischen Enzyme ist festzustellen, dass die Proteine mit der höchsten Bindungsaffinität auch die höhere Aktivierung zeigen. So ergaben sich für PdhB (72 % Plg-Bindung im Vergleich zu immobilisiertem Plg) und Pgm (89 %) auch die höchsten Generierungen von Plasmin. Dagegen zeigte PdhC die geringste Affinität zu humanem Plg (23 %), was die geringste Aktivierung von Plg zu Plasmin zur Folge hat. Somit konnte der Einfluss der Bindungskapazität der verschiedenen Proteine für Plg auf das Aktivierungspotenzial belegt werden.

Mit den Ergebnissen in Abbildung 3-27 und -28 wurden die Bedeutung des Aktivators und des an die rekombinanten Proteine gebundenen Anteils von Plg für das erreichte Niveau der Plasminbildung nach einer Inkubation über Nacht bestätigt. Es erscheint sinnvoll, den zeitlichen

## Ergebnisse

Verlauf der Aktivierung näher zu charakterisieren. Zusätzlich wurden Plg, Aktivator und Substrat zusammen zu den immobilisierten rekombinanten Proteinen gegeben, um Unterschiede in der Plg-Bindung zu vermeiden (Abbildung 3-29).



**Abbildung 3-29 Vergleich des Einflusses der Aktivatoren auf den zeitlichen Verlauf der Plasminbildung.** Die rekombinanten Proteine wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml immobilisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von humanem Plasminogen (Plg, 15 µg/ml) sowie der Plasminogen-Aktivatoren (5 ng/well) und des Plasmin-spezifischen Substrates (S). A) Verwendung des humanen Urokinase-Aktivators (uPA) B) Verwendung de gewebespezifischen Aktivators (tPA) (Daten im Anhang in Tabelle III- 14).

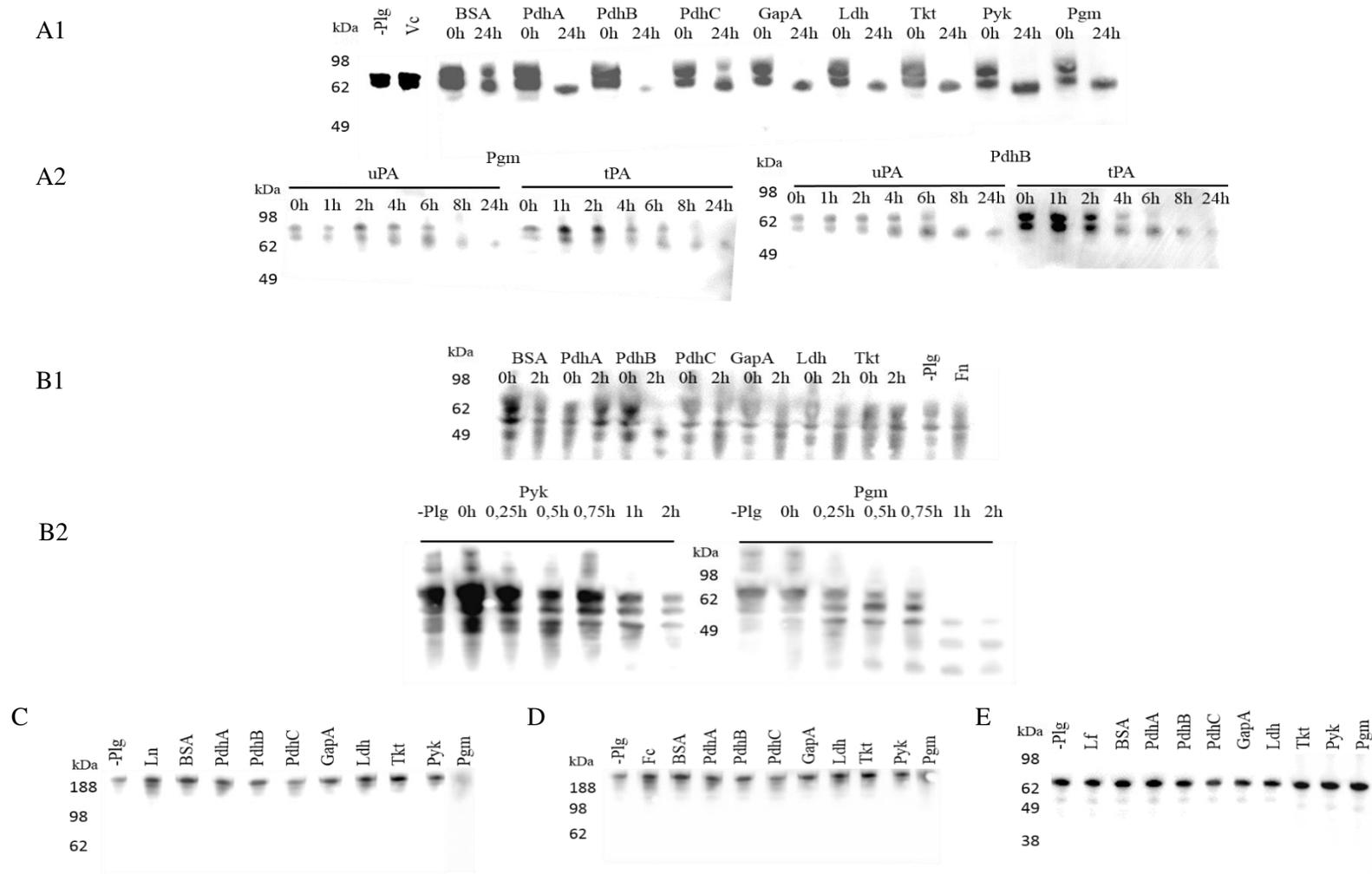
Es ist festzustellen, dass die Anwesenheit der rekombinant hergestellten Proteine zu keiner Inhibierung der Plg-Aktivierung führt. Bei Einsatz des Aktivators uPA ergab sich keine Änderung der Werte der optischen Dichte im Vergleich zu BSA. Das bedeutet, dass die Gegenwart der rekombinanten Proteine im Vergleich zu BSA die Generierung von Plasmin nicht verringert. Das Plateau der Aktivierung ist nach 5 bis 5,5 h erreicht. Im Falle des Aktivators tPA wurde jedoch beobachtet, dass die Aktivierung in Gegenwart der rekombinanten Proteine erhöht war. Das Plateau wurde im Vergleich mit uPA 1 bis 2 h früher erreicht; die OD<sub>450nm</sub>-Werte sind jedoch vergleichbar. Die Ausnahme stellt das rekombinant hergestellte Protein PdhC dar, das mit tPA die gleichen Werte der optischen Dichte wie die Kontrolle BSA aufwies. Für beide Proteine werden nach 5,5 h dann die Werte der übrigen Proteine erreicht.

Nachdem eine Aktivierung von Plg zur Protease Plasmin nachweisbar war, ist ein Abbau verschiedener ECM-Proteine möglich. Zur Prüfung dieses für eine physiologische Wirkung maßgeblichen Vorganges wurden die rekombinanten Proteine immobilisiert und mit Plg inkubiert. Danach wurden die verschiedenen ECM-Proteine bzw. die entsprechenden Aktivatoren in PBS hinzugegeben und der Gesamtansatz inkubiert. Die Probennahmen erfolgten nach bestimmten Zeitpunkten, die Gesamtproteine wurden mithilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe der spezifischen ECM-Antikörper. Das Resultat kann Abbildung 3-30 entnommen werden.

Für einen Großteil der ECM-Proteine (Lf, Ln und Fc) wurden unter den gegebenen Versuchsbedingungen nach 24 h keine Abbauprodukte nachgewiesen. Dieses Ergebnis war unabhängig von den verwendeten Aktivatoren (uPA und tPA). Die humanen ECM-Proteine Fn und Vc jedoch zeigten Veränderungen über die Zeit. Im Falle von Fn konnten zwar geringe Abbauprodukte in Gegenwart aller oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme beobachtet werden, aber ein nennenswerter Abbau der 63,5 kDa großen alpha-Kette wurde nur für PdhB und Pgm beobachtet. Es sei darauf hingewiesen, dass dies die Proteine mit der höchsten Bindungsaffinität zu Plg sind. Unterschiede im zeitlichen Verlauf bzw. durch die unterschiedlichen Aktivatoren sind nicht festzustellen.

Nach 24 h war auch der Teilabbau von humanem Vc in Gegenwart aller oberflächlich lokalisierten glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* nachzuweisen. Dabei führte die Verwendung des Aktivators tPA zum schnelleren Abbau des 75 kDa großen Teilbereichs durch PdhB, während dieser Unterschied im Falle der anderen untersuchten Proteine nicht festzustellen werden konnte.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-30 Zeitabhängiger Abbau humaner ECM-Proteine durch Plasmin.** Plasminogen, welches mit den glykolytischen Enzymen und BSA inkubiert wurde, wurde durch die Zugabe des gewebespezifischen Aktivators (tPA) zu Plasmin aktiviert. Als Negativkontrolle fungierte das nicht Plasminogen bindende BSA. A1) Abbau von Vitronectin (Vc). A2) Abbau von Vitronectin und der Einfluss der Aktivatoren uPA (Urokinase-Aktivator) und tPA. B)1 Abbau von Fibrinogen (Fn). B2) Abbau von Fibrinogen und der Einfluss der Aktivatoren uPA und tPA. C) Abbau von Laminin (Ln). D) Abbau von Fibronectin (Fc). E) Abbau von Laktoferrin (Lc).

## 4 Diskussion

### 4.1 Herstellung und Charakterisierung von glykolytischen Enzymen und Antiseren

Das reduzierte Genom von nur 816 kbp hat zur Folge, dass diverse Stoffwechselwege in *M. pneumoniae*, wie beispielsweise der Citratzyklus, degeneriert sind. Der Organismus ist an eine parasitäre Lebensweise adaptiert, um essenzielle Stoffwechselprodukte des Wirtes verfügbar zu haben [185]. Die Initialisierung der Besiedlung des humanen Respirationstraktes wird durch Proteine sichergestellt, die u. a. zu den wenigen Pathogenitätsfaktoren gehören, die dieser Organismus wegen seiner limitierten Genomgröße ausbilden kann. Aufgrund ihrer Bedeutung für den Kolonisationsvorgang sind die Adhäsine und das CARDS-Toxin die am besten untersuchten Virulenzfaktoren des Bakteriums. Dazu gehört vor allem das in der Spitzenstruktur vorkommende P1-Protein, das sowohl das prominenteste Adhäsins als auch das am stärksten immunogene Antigen darstellt [2, 49, 186]. Obwohl auch in wesentlich komplexer ausgestatteten Mikroorganismen beschrieben, kann besonders in Mykoplasmen die geringe Anzahl von Virulenzfaktoren durch die Bereitstellung multifunktionaler Proteine, so genannte Moonlighting Proteine, kompensiert werden. Der stetige Wissenszuwachs über Virulenzfaktoren in *M. pneumoniae*, kann zur Klärung des langwierigen Infektionsprozesses beitragen [187]. So war beispielsweise bestätigt, dass die glykolytischen Enzyme GapA [32] und PdhB [118, 132] nicht nur intrazellulär auftreten, sondern auch extrazellulär vorkommen, wo sie mit den humanen ECM-Proteinen interagieren können. Eine derartige Interaktion mit den humanen Proteinen Fn, Fc und Plg ist für diese beiden Enzyme bereits früher beschrieben [32, 118, 132]. Die anfänglichen Hinweise, dass die glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* unter Umständen weitere Pathogenitätsfaktoren sein könnten sowie die Vielzahl an neu nachgewiesenen Faktoren in anderen Bakterien, führen zu der Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit: Die Untersuchung der Komplexität dieser Interaktionen in einer gut charakterisierten Spezies mit medizinischer Bedeutung.

Um diese Frage so detailliert wie möglich zu beantworten, wurde der komplette Satz der neunzehn glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* einbezogen. Mithilfe von rekombinant hergestellten glykolytischen Proteinen und spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen diese Proteine wurde die Grundlage für weiterführende Experimente gelegt.

Für die rekombinante Produktion der glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* in *E. coli* ist es notwendig, den alternativen genetischen Code, der in Mykoplasmen existiert, methodisch zu umgehen. In Mykoplasmen kodiert ein TGA-Triplett für die Aminosäure Tryptophan, in *E. coli*

jedoch für ein Stopcodon. Um das gewünschte Tryptophan auch in *E. coli* erzeugen zu können, wurde die TGA-Triplets mittels der MMR-PCR erfolgreich in TGG umgeschrieben [182]. Die Nutzung der MMR für die Manipulation einer Vielzahl von Genen mit unterschiedlicher Zahl von TGA-Kodons bestätigte die Eignung dieser Methode. Die erfolgreiche Expression der rekombinanten Proteine, basierend auf der spezifischen Detektion der His<sub>6</sub>-Markierung, konnte mithilfe der SDS-PAGE, des Immunoblots und der zur Quantifizierung genutzten ELISA-Reaktion gezeigt werden. Im Gegensatz zu Proteinen mit ausgeprägten Transmembrandomänen ist die Produktion glykolytischer Enzyme offensichtlich relativ unproblematisch in *E. coli* möglich.

Im Immunoblot reagierten die rekombinanten Proteine unterschiedlich stark mit dem subkutan hergestellten Gesamtantigensserum. Dies lässt darauf schließen, dass die glykolytischen Enzyme zum einen in unterschiedlichen Konzentrationen in *M. pneumoniae* vorkommen. So scheinen beispielsweise PdhA, PdhB und GapA in hohen Konzentrationen vorzuliegen. Dagegen gehören FruK, Pyk und TpiA zu den Proteinen mit sehr geringer Reaktivität im Vergleich zum Gesamtantigensserum. Zum anderen können die verschiedenen Proteine aber auch unterschiedlich immunogen sein. Eine Variation der Immunogenität der einzelnen Proteine wird auch durch die Verwendung der Seren von intranasal mit *M. pneumoniae* stimulierten Tieren deutlich. Das Serum reagierte besonders gut mit PdhA und PdhC, die anderen oberflächenassoziierten Proteine waren hingegen kaum oder nicht nachweisbar. Somit sind vor allem PdhA und PdhC immunogen im Tiermodell Meerschweinchen. Wie die Immunogenität der einzelnen Proteine im Menschen ausgeprägt ist, sollte in weiteren Versuchen geklärt werden. Divergenzen der Immunogenität von Proteinen in Abhängigkeit von der Tierart konnten bereits in verschiedenen Studien belegt werden [188, 189]. Generell lässt sich aber feststellen, dass die Reaktivität des Serums nach subkutaner Immunisierung wesentlich ausgeprägter ist als nach intranasaler Immunisierung. Bei der subkutanen Immunisierung konnte eine gesteigerte Reaktivität besonders gegen Proteine, die aufgrund ihrer Einbettung in die Bakterienstrukturen (z. B. Membranen) leichter zugänglich sind, festgestellt werden. Dagegen war die Reaktivität gegen Proteine, die nur im Zytosol lokalisiert sind, nicht höher (Ausnahmen: Eno und Fba).

Die geprüften rekombinanten Proteine wurden zur Immunisierung von Meerschweinchen verwendet, um polyklonale Antikörper zu gewinnen. Die Reaktion der Antiseren mit dem Gesamtantigen von *M. pneumoniae* zeigte im Western Blot, dass für den Großteil der hergestellten Seren eine Monospezifität nachgewiesen werden konnte, d. h. es wurden Banden in Höhe der errechneten Molekulargewichte detektiert. Im ELISA ergaben sich jedoch

Unterschiede in der Reaktivität gegenüber dem Gesamtantigen. So zeigten beispielsweise Antiseren gegen PdhB und GapA eine sehr gute Reaktion mit dem Gesamtantigen; FruK und TpiA wiesen eine sehr schwache Reaktivität auf. Die Seren gegen Fba und Pyk zeigten eine mittlere Reaktivität. Erwartungsgemäß spiegeln sich im Wesentlichen die Resultate der Reaktivität der rekombinanten Proteine mit dem Gesamtantigenserum wider. Dies bestätigt, dass damit offensichtlich vor allem Unterschiede in der Konzentration bzw. Antigenität und weniger die Zugänglichkeit aufgrund der Verankerung in der Membran wichtig sind. Hinsichtlich des bereits erwähnten Faktums der unterschiedlichen Konzentrationen der einzelnen Proteine im Gesamtantigen wurde für den Pdh-Komplex gezeigt, dass PdhA im Vergleich zu PdhB und PdhC in doppelt so hoher Konzentration im Gesamtantigen vorliegt [190]. Ein weiterer Grund könnte aber auch in der Behandlung der verwendeten Bakterien liegen. Für die Testung der Reaktivität der Seren mit dem Gesamtantigen wurden unbehandelte Zellen verwendet, d. h. es fand kein weiterer Zellaufschluss statt, wie beispielweise eine Ultraschallbehandlung, der die Zugänglichkeit aller Proteine, vor allem der zytosolischen Proteine, gewährleisten hätte.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass als erster Schritt alle glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* erfolgreich rekombinant produziert und monospezifischen Seren gegen diese Antigene generiert werden konnten. Damit sind die methodischen Werkzeuge gegeben, die Charakterisierung der Enzyme und deren Rolle im Infektionsprozess zu untersuchen.

### **4.2 Lokalisation glykolytischer Enzyme in *Mycoplasma pneumoniae***

Bevor die Untersuchung möglicher Interaktionen der glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* mit humanen ECM-Proteinen aufgenommen werden konnte, galt es die Frage der Lokalisation der Enzyme zu klären. Nach den bisher publizierten Studien ist davon auszugehen, dass nur oberflächenassoziierte Proteine für diese Interaktionen relevant sind. Dafür wurde in der vorliegenden Arbeit ein breites Spektrum an Methoden angewendet, um die Oberflächenassoziation der Proteine so sicher wie möglich zu klären. Die Verwendung verschiedener Fraktionierungsmethoden sollte erste Hinweise zur Lokalisation der Enzyme geben, zum anderen wurden durch Anwendung verschiedener immunologischer Methoden versucht, deren Oberflächenassoziation zu bestätigen.

Die Inkubation der Seren gegen die verschiedenen Fraktionen des Gesamtproteins mit den rekombinanten Proteinen ergab, dass sich nur wenige glykolytische Enzyme in der Membranfraktion bzw. in der TX-100-unlöslichen Fraktion befinden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass alle Proteine im Zytosol von *M. pneumoniae* anzutreffen sind. Da dies für die

eigentliche Funktion der glykolytischen Enzyme essenziell ist, stellt dieses Ergebnis eine Art methodische Kontrolle dar. Die Enzyme PdhA-D, GapA und Ldh konnten in den Membranfraktionen nachgewiesen werden. Die glykolytischen Enzyme AckA, Pgm und ManB ergaben hingegen verhältnismäßig schwache Reaktionen mit den Seren gegen die Fraktion der Membranproteine. Hier ist zu bemerken, dass auch in diesem Test die Reaktivität des Serums u. a. von der Konzentration des Antigens in der Fraktion abhängt. So konnte mit dem ELISA gezeigt werden, dass es starke Unterschiede in der Verteilung einzelner Proteine des Pdh-Komplexes bei Betrachtung von Membran- und Zytosolfraktion gab. PdhC liegt hauptsächlich in der Zytosolfraktion vor, wohingegen PdhA und PdhB eine vergleichbare Verteilung in der Membran- und Zytosolfraktion aufweisen. Die Schwankungen dieser drei Proteine bezüglich ihrer Konzentration wie auch der Verteilung in den Fraktionen kann eine unterschiedlich starke Reaktivität der Antiseren gegen Fraktionen des Gesamtantigens erklären. Um diese Problematik zu umgehen, wurden daraufhin die Proteinfractionen von Membran und Zytosol mit den Seren gegen die rekombinanten Proteine inkubiert. Das Vorkommen aller glykolytischen Enzyme im Zytosol der Mykoplasmen wurde über dieses Experiment ebenfalls bestätigt. Außerdem konnte festgestellt werden, dass ca. 70 % der glykolytischen Enzyme ebenfalls in den Membranfraktionen vorhanden waren, wenngleich die Reaktivitäten nicht immer die gleiche Intensität aufwiesen.

Das Vorkommen eines Proteins in den Membranfraktionen ist allerdings nicht mit der Oberflächenassoziation gleichzusetzen. Um diesen Aspekt für die glykolytischen Enzyme zu klären, wurden weitere Studien durchgeführt.

Eine Oberflächenlokalisierung von glykolytischen Enzymen ist bisher für diverse Bakterien, darunter auch Mykoplasmen, mehrfach beschrieben worden. So ist dieses Vorkommen vor allem für GapA bekannt. Dieses Enzym konnte bei *S. pneumoniae* [81], *B. anthracis* [82], *C. albicans* [79], *T. vaginalis* [80], aber auch bei Vertretern der Mykoplasmen, wie z. B. bei *M. pneumoniae* [32] und *M. gallisepticum* [191], als oberflächlich bestätigt werden. Im Fall von *M. gallisepticum* ist GapA außerdem ein wichtiges Cytoadhäsion [192]. Andere glykolytische Enzyme sind bisher zwar weniger oft beschrieben, wurden aber ebenfalls als extrazellulär eingestuft. Dies gilt u. a. auch für PdhB in *M. pneumoniae* [132]. Weitere glykolytische Enzyme wie TpiA oder Eno wurden ebenfalls mit einer Oberflächenassoziation in Verbindung gebracht. So konnte TpiA bei den grampositiven Bakterien *S. aureus* [105] und *S. oralis* [104] nachgewiesen werden. Eno hingegen wurde bei diversen Organismen wie *P. aeruginosa* [96], *S. cerevisiae* [97] oder *B. longum* [109] beschrieben. Fba sowie Pgi und Pfk sind ebenfalls Beispiele für extrazellulär auftretende glykolytische Enzyme [86, 102, 104, 107, 120]. Auch

die Enzyme Pgm und Pyk konnten in anderen Organismen als oberflächlich beschrieben werden, so beispielsweise bei *C. albicans*, *S. suis* oder *L. lactis* [104, 193-197]. Pyk gilt außerdem in *M. gallisepticum* als extrazellulär [136]. Weiterhin wurden spezifische Antikörper gegen verschiedene Pdh-Untereinheiten aus dem Serum von mit *M. bovis* infizierten Tieren bestätigt [198], was für eine Oberflächenexpression dieser Proteine spricht. Das Enzym Tkt ist ebenfalls als immunogen in *M. mycoides* subspecies *capri* klassifiziert [199]. Ldh jedoch konnte bisher nur in *S. suis* als Adhäsion beschrieben werden [200].

Ob und welche glykolytischen Proteine von *M. pneumoniae* auf der Membranoberfläche der Zelle zu finden sind, wurde in dieser Arbeit detailliert untersucht. Hierfür wurde der Verdau der Enzyme durch Trypsin und Chymotrypsin an der Zelloberfläche von *M. pneumoniae* genutzt [201]. Trypsin und Chymotrypsin waren in der Lage, alle rekombinant hergestellten Enzyme zu verdauen, was mit der *in silico*-Analyse der Enzymschnittstellen übereinstimmt (Tabelle I- 1, Anhang). Damit ist es prinzipiell möglich, dieses Verfahren für die Analyse der Oberflächenlokalisierung einzusetzen. Nach der Trypsin-Behandlung von intakten Zellen konnte gezeigt werden, dass PdhA-C und GapA abgebaut wurden. Da davon auszugehen ist, dass nur kleine Proteinabschnitte oberflächlich zugänglich sind, wurde alternativ Chymotrypsin verwendet. Diese Protease schneidet Proteine nach aromatischen Aminosäuren. Auch für dieses Enzym wurde das Vorkommen von Schnittstellen in den Zielproteinen zuvor untersucht (Tabelle I- 1, Anhang). Die Behandlung intakter Zellen mit Chymotrypsin konnte zusätzlich zu den genannten Proteinen Abbauprodukte für die glykolytischen Enzyme Tkt, ManB, Ldh und Pgm belegen. Allerdings war für kein Enzym ein vollständiger Abbau zu bestätigen. Daraus ist zu schließen, dass die genannten Enzyme zumindest partiell extrazellulär auf der Oberfläche vorliegen. Aufgrund der Tatsache, dass diese Proteine im Zytosol der Mykoplasmenzelle vorkommen und somit für den enzymatischen Verdau nicht erreichbar sind, lässt sich auf diese Weise nicht klären, ob die Enzyme an der Zelloberfläche frei zugänglich oder in der Membran verankert sind. Einige Proteine, die zuvor in der Membran von *M. pneumoniae* lokalisiert wurden, wie AckA, Pgi, PdhD und Pta, zeigten keinen Abbau. Diese Enzyme sind möglicherweise mit der Membran assoziiert oder in sie integriert, sind aber zum Zellinneren gerichtet.

Das Fehlen von enzymatischen Abbauprodukten sollte jedoch kritisch betrachtet werden. So kann die Ursache dafür auch in der Unzugänglichkeit der entsprechenden Proteinregion liegen. Möglicherweise sind gerade die Schnittstellen in der Membran verankert oder ins Zellinnere gerichtet und somit für den enzymatischen Abbau nicht zugänglich. Denkbar ist auch die Oberflächenlokalisierung relativ kleiner Bereiche ohne Zugänglichkeit für die verwendeten

Proteasen.

Die Ergebnisse der Abbauprobe konnten durch den Colony Blot und die Immunfluoreszenz weitgehend bestätigt werden. Beide Methoden ergaben, dass die glykolytischen Enzyme PdhA-C, GapA, Ldh, Tkt, Pyk, Pgm an der Oberfläche der Mykoplasmenzellen lokalisiert sind. Für die Enzyme PdhA-C konnte außerdem gezeigt werden, dass sie in der Lage sind, an der Oberfläche der Mykoplasmenzelle einen Komplex zu bilden. Die genaue Funktion des Komplexes gilt es in Zukunft zu klären. Für das Protein ManB hingegen, für das zuvor Abbauprodukte gezeigt wurden, wurde die Oberflächenlokalisierung nicht nachgewiesen. Die Ergebnisse für dieses Protein sind schwierig zu interpretieren. Möglicherweise sind auch hier sehr kleine Bereiche oberflächlich angeordnet, die zwar Schnittstellen für Proteasen aufweisen, aber keine Epitope für die Auslösung einer Immunantwort. Dies könnte auch bei anderen Enzymen der Fall sein. Da die mitgeführten Kontrollen von zuvor bestätigten intra- und extrazellulären Proteinen die erwartete Reaktion zeigten, ist die methodische Durchführung der Verfahren bestätigt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass 14 der 19 glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* in der Membran nachzuweisen sind (Abbildung 4-1). Für die Enzyme Tkt, Ldh, GapA, PdhA und PdhB wurde bereits der Nachweis in der TX-100-unlöslichen Fraktion beschrieben [133]. Dies ist eine Übereinstimmung mit den vorliegenden Ergebnissen für alle Enzyme außer mit Fba. Zusätzlich wurden aber noch weitere Proteine gefunden, die zuvor nicht als membran-assoziiert beschrieben wurden, darunter PdhC, PdhD, Pgi, ManB, AckA, Pyk und Pgm. Interessanterweise wurde das Enzym Eno nur im Zytosol von *M. pneumoniae* lokalisiert, obwohl eine Oberflächenassoziation bei diversen Mykoplasmen bisher gezeigt werden konnte. Eno tritt extrazellulär bei *M. bovis* [124], *M. gallisepticum* [134] und *M. suis* [127] auf und für *M. pneumoniae* wurde mithilfe bioinformatischer Methoden ebenfalls eine extrazelluläre Lokalisation prognostiziert [202]. Dieses Vorkommen wurde sowohl in dieser Arbeit wie auch bei Thomas *et al.* (2013) jedoch nicht bestätigt [132]. Die Vermutung, ob ein Enzym zur Klasse der Moonlighting Proteine gehört oder nicht, kann generell durch bioinformatische Untersuchungen nur schwer vorhergesagt werden [203], was die Notwendigkeit experimenteller Herangehensweise unterstreicht.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass keines der glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* im Überstand unterschiedlich alter Bouillonkulturen nachzuweisen ist, was im Gegensatz zu anderen Bakterien steht, wie beispielsweise bei *Leptospira interrogans* [204, 205]. Dies lässt darauf schließen, dass eine Verankerung oder Anlagerung der Proteine in der Mykoplasmenmembran vorliegt, so dass nur kleine, in vielen Fällen nicht immunogene

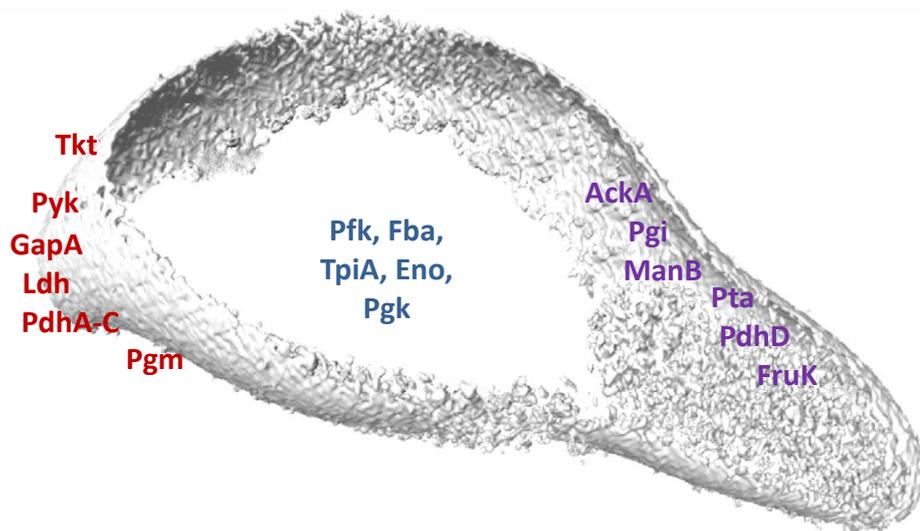
Teilbereiche der glykolytischen Enzyme mögliche Interaktionen mit Wirtsfaktoren eingehen können. Unterstützt wird diese Aussage durch partiellen enzymatischen Abbau sowie der Antikörperproduktion intranasal infizierter Meerschweinchen. Diese zeigt lediglich messbare Antikörperkonzentrationen gegen die extrazellulären Enzyme PdhA und PdhC. Um die Art der Membranassoziation einzelner Enzyme an der Membran genauer zu beschreiben, wurde mithilfe einer *in silico* Analyse das Vorhandensein möglicher Transmembrandomänen (TM-Domänen) (Abbildung II- 9-11, Anhang) ([www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)) [206] für die acht (PdhA-C, Pyk, Pgm, Ldh, GapA und Tkt) nach außen gerichteten Enzyme durchgeführt. Danach scheinen PdhB, GapA, Ldh und Tkt in die Membran integriert zu sein, während PdhA und PdhC, Pgm und Pyk an die Membran angelagert nach außen gerichtet sind. Eine Oberflächenassoziation ohne Membranverankerung wurde auch für die glykolytischen Enzyme GapA, Eno und Pgc von *L. plantarum* festgestellt [207]. Antikainen *et al.* konnten zeigen, dass GapA und Eno von *L. crispatus* mit Lipoteichonsäuren an der Zelloberfläche verankert sind. Diese Interaktion stellte sich als pH-abhängig heraus; eine Bindung der glykolytischen Enzyme an die Lipoteichonsäure fand unter niedrigen pH-Werten statt [90]. Ein entsprechender Einfluss des pH-Wertes oder weiteren Faktoren wurde in der vorliegenden Studie nicht geprüft und ist eine Frage für zukünftige Untersuchungen.

Hinsichtlich der membranassoziierten Enzyme, für die keine Oberflächenlokalisierung nachgewiesen werden konnte, ergab die TM-Analyse, dass sich ManB und FruK integral verhalten, während für PdhD, AckA, Pgi und Pta keine TM-Domänen gefunden wurden. Diese Enzyme scheinen peripher angelagert zu sein. Für die Enzyme, die ausschließlich im Zytosol gefunden wurden, sind keine TM-Domänen vorhergesagt. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die Membran der *Mollicutes* eine besondere Stellung unter den bakteriellen Strukturen dieser Art hat und über den Proteintransport oder die Translokation nur sehr wenig bekannt ist [106].

Die Verteilung der glykolytischen Enzyme in Membran und Zytosol der Zellen ist unabhängig vom Vorkommen wichtiger Adhäsine, wie dem P1- oder dem P90-Protein von *M. pneumoniae*. Durch Untersuchung der Mutantenstämme B170, Iv22a und P01<sup>-</sup> wurde ein dem Wildtyp vergleichbare Lokalisation der glykolytischen Enzyme gezeigt [208-211]. Ältere Studien hatten ergeben, dass z. B. PdhA mit dem P1-Adhäsine einen Komplex bildet [75], so dass eine funktionale Interaktion beider Proteinklassen nicht auszuschließen ist. Da PdhA auch in den Mutantenstämmen Iv22a und B170 als oberflächenassoziiert gefunden wurde, liegt es nahe, dass die oberflächlich lokalisierten glykolytischen Enzyme nicht an das Vorkommen der Hauptadhäsine von *M. pneumoniae* gebunden sind. Ob die Enzyme auf der gesamten

Mykoplasmenoberfläche verteilt vorliegen oder ausschließlich in der Spitzenstruktur anzutreffen sind, war mit dem Methodenspektrum dieser Arbeit nicht nachzuweisen. Da die Abwesenheit der Adhäsine P1, P40 und P90 zum Verlust der Adhärenz führt, kann die Lokalisation der glykolytischen Enzyme als nicht essenziell für die Adhärenz angesehen werden [49, 51, 52]. Auch der Verlust des zellumspannenden Oberflächenproteins P01 [208] zeigte keinen Einfluss auf die Lokalisation der Proteine in der Zelle von *M. pneumoniae*. Es muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben, zu klären, ob oberflächenlokalisierte glykolytische Enzyme mit anderen Proteinklassen des Bakteriums funktionale Interaktionen eingehen.

Die systematische Untersuchung der glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* bestätigte, dass eine überraschend hohe Zahl dieser Proteine an der Zelloberfläche nachzuweisen ist. Das komplexe Vorkommen der verschiedenen glykolytischen Enzyme ist in Abbildung 4-1 zusammengefasst. Damit ergeben sich vielfältige Möglichkeiten zu Wechselwirkungen mit Wirtsproteinen.



**Abbildung 4-1 Zusammenfassung der Lokalisation der glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* in einem Elektronen Tomogramm.** Blau: glykolytische Enzyme, die nur im Zytosol von *M. pneumoniae* vorkommen. Violett: glykolytische Enzyme in der Membran von *M. pneumoniae*. Rot: oberflächenassoziierte glykolytische Enzyme von *M. pneumoniae* (Grafik abgewandelt von [185]).

### 4.3 Adhärenz von *Mycoplasma pneumoniae* sowie der glykolytischen Enzyme an humane Zellen und humane ECM-Proteine

Die Lokalisationsstudien der einzelnen Enzyme dienen als Grundlage für Untersuchungen potenzieller Bindungspartner des Wirtes. Dabei richtet sich der Fokus vor allem auf oberflächenassoziierte Proteine. Eine Assoziation zu humanen Zellen konnte schon häufig bei *M. pneumoniae* beschrieben werden. So zeigten Schurwanz, Dumke, Hausner und Thomas eine Bindung an humane Zellen [32, 132, 184, 212], wie aber schon bei Krause und Chen wurde in diesen Studien hauptsächlich mit HeLa-Zellen gearbeitet [213]. Diese Zellen gehören jedoch nicht zum humanen respiratorischen Epithel und stellen somit nicht die natürliche Zielstruktur für *M. pneumoniae* dar. Aus diesem Grund wurden hier zusätzlich die respiratorischen Zelllinien MRC-5 und A549 verwendet. Es wurde festgestellt, dass fast alle oberflächenassoziierten Proteine in der Lage sind, an die getesteten humanen Zellen zu binden. Das einzige Protein, das nur eine schwache Interaktion mit den humanen Zellen A549 zeigte, war das zum Pyruvatdehydrogenase-Komplex gehörende PdhC. Wirtsstrukturen, an die die untersuchten Proteine binden können, sind offensichtlich auf verschiedenen humanen Zellen zu finden. Es konnten nur Unterschiede in Bezug auf die Bindungsaffinität festgestellt werden, was möglicherweise auf das Mengenverhältnis der Wirtsproteine auf der Zelloberfläche der einzelnen Zelllinien zurückzuführen ist. Eine Vorinkubation der Mykoplasmen mit den einzelnen Antikörpern gegen die oberflächenassoziierten Enzyme zeigte keine Reduktion der Bindung mit humanen Zellen. Jedoch konnte eine leichte Bindungsminderung beobachtet werden, wenn die einzelnen Seren kombiniert werden. Dies spricht für eine geringe Konzentration der Proteine auf der Zelloberfläche, auf eine geringe Immunität der exponierten Bereiche oder die Überlagerung durch die stärker bindungsaktiven Adhäsine. Es ist aber auch ein Hinweis für die Vernetzung der glykolytischen Enzyme sowie für ein mögliches Zusammenspiel der Proteine untereinander.

Wie durch den ELISA bestätigt, können auf der Oberfläche der humanen Zellen verschiedene ECM-Proteine detektiert werden. So wurde das Vorkommen von Plg, Vc, Ln, Fn, Fc und Lc nachgewiesen. Für alle diese Proteine sind Interaktionen mit Faktoren diverser Mikroorganismen beschrieben. Damit sind sie auch potenzielle Bindungspartner für die extrazellulären glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae*. So konnte beispielsweise eine Bindung von *S. pneumoniae* mit Plg [81] sowie mit Lc [214], von *C. albicans* mit Fc und Ln [79], von *E. coli* mit Plg und Fn [87] sowie von *H. influenzae* mit Vc [154] bestätigt werden. Auch für Mykoplasmen-Spezies werden Bindungsaffinitäten verschiedener Enzyme zu humanen Proteinen berichtet [215]. So konnten Interaktionen zwischen *M. pneumoniae* und Plg

schon mehrfach beschrieben werden, z. B. für die glykolytischen Enzyme Eno und PdhB [132]. PdhB ist zusätzlich in der Lage, Fc zu binden [118]. Auch *M. gallisepticum* kann mithilfe der alpha-Enolase Plg binden [134]. Weiterhin konnten Hölzle *et al.* zeigen, dass die Enolase von *M. suis* an Erythrozyten bindet [125]. Es ist auch belegt, dass die alpha-Enolase von *M. fermentas* mit Plg interagiert [129]. Wie die Beispiele belegen, existiert eine hohe Variabilität an Interaktionen. Vor allem das Potenzial von metabolischen Proteinen als Moonlighting-Proteinen wurde häufig aufgezeigt [107].

Für die humanen ECM-Proteine Ln, Plg und Vc wurden für *M. pneumoniae* in ersten Untersuchungen durch Friedrich und Pfeiffer Bindungen mithilfe eines Liganden-Immunoblot-Assays nachgewiesen [190, 216]. Die restlichen humanen ECM-Proteine zeigten keine Banden in diesem Assay, was jedoch eine Interaktion nicht ausschließt, wie es auch Untersuchungen von Friedrich aus dem Jahre 2013 zeigen konnten, da teilweise sehr hohe Konzentrationen an humanen Proteinen für bestimmte Interaktionen nötig sind [190]. Wie aber schon anhand der Verteilung der glykolytischen Enzyme im Gesamtantigen von *M. pneumoniae* ersichtlich wurde, schwanken die Konzentrationen der einzelnen bakteriellen Enzyme. Liegen die Enzyme in geringen Konzentrationen vor, so wird ein Bindungsnachweis schwierig. Andererseits könnten die einzelnen Proteine auch schlecht zugänglich sein, sodass Bindungsstellen im Gesamtantigen nicht frei verfügbar sind. Es gab aber auch im Fall von Plg, Vc und Ln gut erkennbare Banden auf dem *M. pneumoniae* Gesamtantigenblot, die den berechneten Molekulargewichten der oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme entsprachen. So konnten für Plg Banden auf Höhe der berechneten Molekulargewichte von PdhA-C sowie Pyk, Ldh, GapA und Pgm festgestellt werden. Die Inkubation von Ln mit dem Gesamtantigenblot ergab hingegen Banden auf Höhe der Molekulargewichte von PdhA/B, GapA und Ldh [190, 216]. Vc hingegen zeigte ein großes Interaktionspotential, so wurden Banden u. a. auf Höhe der Molekulargewichte von PdhA/B, GapA, Pgm und Pyk nachgewiesen.

Damit konnte nachgewiesen werden, dass *M. pneumoniae* in der Lage ist, humane ECM-Proteine zu binden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass mehrere Enzyme des Bakteriums fähig sind, eine Bindung mit definierten humanen Proteinen einzugehen. Aufgrund der Ergebnisse wurde eine weitere Methode angewendet, die eine höhere Sensitivität besitzt [217]. Der durchgeführte Bindungsassay basierend auf der ELISA-Technik bestätigte die Resultate des Immunoblots. Zusätzlich ergaben sich auch Interaktionen zu weiteren ECM-Proteinen, wie Lc. Damit wurden die Ergebnisse der Studie von Tryon und Baseman bestätigt, die die Bindung von *M. pneumoniae* an Laktoferrin beschreibt, ohne auf die zugrunde liegenden bakteriellen Proteine einzugehen [57]. Interaktionen zu den humanen ECM-Proteinen Kollagen und Elastin

wurden nicht nachgewiesen. Bisher sind beide Wirtsfaktoren auch nur als schwache Bindungspartner mit *M. fermentas* in Verbindung gebracht worden [218]. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass diese humanen ECM-Proteine Einfluss auf Bindungen, z. B. an Wirtszellen, nehmen könnten [218, 219]. Dieser Aspekt sollte in weiterführenden Studien bearbeitet werden.

Zusätzlich konnte durch Pfeiffer bestätigt werden, dass *M. pneumoniae* unabhängig von der Anwesenheit der Hauptadhäsine, wie beispielsweise P1, an die hier untersuchten ECM-Proteine bindet [216]. Die Bindungen zu den humanen ECM-Proteinen waren trotz Verwendung verschiedener Mutanten-Stämme (B170, Iv22a, M129) quantitativ vergleichbar.

Aufgrund der gewonnenen Kenntnisse wurde weitere Untersuchungen durchgeführt, um potentielle Bindungspartner zu identifizieren. Interaktionen zwischen glykolytischen Enzymen und humanen Proteinen wurden schon mehrfach beschrieben und bestätigt. Aus der Literatur ist bekannt, dass beispielsweise GapA bei diversen Mikroorganismen eine Rolle als Moonlighting-Protein spielt [107]. So sind allein Bindungen von GapA an Plg bei diversen Organismen beschrieben, u. a. bei *B. anthracis* [82] und *E. coli* [220]. Weiterhin ist bekannt, dass dieses glykolytische Enzym an andere Wirtspoteine, wie Fn [32, 221], bindet. Das glykolytische Enzym PdhB wurde ebenfalls mehrfach als Interaktionspartner von humanen ECM-Proteinen beschrieben, auch in *M. pneumoniae* konnte eine Interaktion zu Plg [132] und Fc [118] nachgewiesen werden. Im Falle von *L. plantarum* zeigte sich eine Interaktion zu Fc [222]. Eine Interaktion von oberflächenassoziiertes Pgm mit Plg konnte bei *S. anginosus* nachgewiesen werden [104]. Weiterhin bindet Pyk von *S. gordonii* an das Muzin des Speichels [223]. Damit ist bestätigt, dass diverse ECM-Proteine, wie auch glykolytische Enzyme als potentielle Bindungspartner zur Verfügung stehen. Das Phänomen, dass einzelne glykolytische Enzyme mehrere Wirtspoteine binden, konnte schon mehrfach gezeigt werden [107, 207].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die oberflächenassoziierten Proteine von *M. pneumoniae* in der Lage sind, Interaktionen zu Wirtspoteinen einzugehen. Allerdings gab es Diskrepanzen der Ergebnisse zwischen den verwendeten Methoden, was auf deren Sensitivität zurückzuführen ist [224]. Prinzipiell kann jedes getestete humane Protein durch verschiedene glykolytische Enzyme von *M. pneumoniae* gebunden werden. Die bakteriellen Proteine weisen somit Multifunktionalität hinsichtlich der Bindung auf – eine Eigenschaft, die der Gruppe der Moonlighting Proteinen zugesprochen wird. Die Bindungsstudien ergaben eindeutige Interaktionen zwischen Fn, Vc, Plg und allen oberflächenassoziierten Proteinen, deren Affinitäten unterschiedlich ausgeprägt waren. Interaktionen zu Ln, Lf und Fc konnten dagegen nur für einen Teil der oberflächenlokalisierten Enzyme von *M. pneumoniae*

nachgewiesen werden. Die bestehenden Interaktionen sind als spezifisch einzustufen, da Konzentrationsunterschiede und die Vorinkubation mit den entsprechenden Antikörpern einen signifikanten Einfluss auf die Interaktion hatte [32, 132]. Da jedoch keine Interaktion dadurch komplett gehemmt werden konnte, wurden weitere Faktoren untersucht, die die Bindung zwischen glykolytischen Enzymen von *M. pneumoniae* und den humanen ECM-Proteinen haben könnten. Aufgrund des hohen Anteils an geladenen Aminosäuren in den Enzymen (Anhang, Tabelle I-1) wurde der Fokus u. a. auf ionische Wechselwirkungen gelegt. Der niedrigste isoelektrische Punkt konnte für PdhC bei 5,6 und der höchste für Pyk (isoelektrischer Punkt 9,2) ermittelt werden. Der Einfluss dieser Wechselwirkungen wurde unter Verwendung von Salzen der Hofmeister-Reihe untersucht [225]. Wie bereits dokumentiert, können bakterielle Proteine aufgrund der vorhandenen Ladungsbedingungen von Ionen an Wirtsproteine binden. So zeigte Königs *et al.* anhand des BBA-70 Proteins in *B. burgdorferi*, dass die Interaktion mit Plg ionischen Wechselwirkungen unterliegt [175]. Dies ist auch der Fall für die Plg-Bindung des Proteins E von *H. influenzae* [226]. Ionische Wechselwirkungen konnten aber auch bei Interaktionen mit Vc festgestellt werden. Dies wurde beispielsweise für das an der Evasion beteiligte Hic Protein von *S. pneumoniae* gezeigt [153]. Im Gegensatz dazu konnten auch Interaktionen nachgewiesen werden, die unabhängig von der Ladung sind, z. B. für die Oberflächenproteine ErpP, ErpA und ErpC von *B. burgdorferi*, die ebenfalls mit Plg interagieren [227]. Für *M. pneumoniae* wurde deutlich, dass ein Großteil der Bindungen ionischen Einflüssen unterliegt. Vor allem die Bindungen zu Ln und Lf hängen stark von den vorliegenden Ladungsverhältnissen ab. Die Verwendung hoher Salzkonzentrationen führte zu einer fast vollständigen Aufhebung der Interaktion bei den ECM-Proteinen, bei denen eine nur sehr geringe Reduktionsrate bei Vorinkubation mit den entsprechenden Seren zu erkennen war. Die Interaktionen von Plg mit den glykolytischen Enzymen unterliegen dagegen nur im geringen Maße ionischen Wechselwirkungen. Einige Bindungen wurden zwar durch die Zugabe von Salzen reduziert, konnten aber nicht komplett aufgehoben werden. Einige Interaktionen waren jedoch gänzlich unbeeinflusst, wie beispielsweise die Bindung zwischen Plg und PdhB, die nicht durch die Zugabe der Salze reduziert werden kann. Auch die Bindung an humanes Fc unterliegt nur teilweise ionischen Einflüssen. Ähnlich verhält es sich mit der Bindung zu Vc, auch hier konnte die Bindung nicht oder nur bis zu einer relativen Bindung von 50 % reduziert werden. Die Interaktion der bakteriellen Enzyme zu Fn hingegen scheint nicht durch Ladungsbedingungen beeinflusst zu werden. Auch die Verwendung des weitaus chaotrophen Salzes NaBr führte nur zu einer minimalen Reduktion.

Zusammengefasst ist festzustellen, dass die Interaktionen zu den ECM-Proteinen Vc, Fn, Fc

und Ln durch die Zugabe von NaBr stärker beeinflusst wurden, als zu den anderen Proteinen (Plg, Lf). Dies lässt auf hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den glykolytischen Enzymen und Vc, Fn, Fc und Ln schließen. Ionische Wechselwirkungen spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen glykolytischen Enzymen und humanen Wirtsproteinen und sollten somit stets bei Interaktionsstudien beachtet werden.

Die Zugabe von Salzen muss jedoch nicht immer zwingend zu einer Reduktion der Interaktion führen. So wurde die Bindung der oberflächenassoziierten Proteine an humanes Fn durch die Zugabe von CaCl<sub>2</sub> erhöht (Abbildung II- 7, Anhang). Dieses Phänomen konnte bereits für die funktionelle Domäne des Fn-bindenden Proteins (Efb) von *S. aureus* beobachtet werden [228]. Allerdings können die Salze nicht nur einen Einfluss auf die Bindung, sondern auch auf die Struktur der Proteine haben. Am Beispiel der Carboxypeptidase von *Sulfolobus solfataricus* wurde dokumentiert, dass NaCl eine destabilisierende Wirkung bei einem pH= 7,5 aber nicht bei pH=9 hat [229].

Ein weiterer Faktor, der eine Bindung zu ECM-Proteinen beeinflussen kann, ist die Gegenwart der Aminosäure Lysin. Es wurde gezeigt, dass die Bindungen von verschiedenen Proteinen an Plg u. a. auf Lysin-Resten basieren, da Plg hochaffine Lysin-Bindungsdomänen besitzt, die auch als ‚Kringel Domains‘ bezeichnet werden [230, 231]. Die 6-Aminohexansäure wurde verwendet, um diese Eigenschaft näher zu charakterisieren. Sie ist in der Amino- und Carboxygruppe ähnlich strukturiert wie die Aminosäure Lysin und soll als Analogon die möglichen Lysin-Bindungsstellen abdecken [232]. Dies führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, wodurch auch Bindungen an Plg unterbunden werden [233]. Im Falle der oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme konnte die Bindung zu Plg erfolgreich verringert werden. Die signifikante Reduktion war dabei unabhängig von der Lokalisation und Anzahl der Lysin-Reste innerhalb der glykolytischen Enzyme. Dabei ist zu bemerken, dass die oberflächenassoziierten Proteine PdhA/C, GapA und Tkt kein C-terminales Lysin aufweisen. Dies bestätigt gleichzeitig die Aussage, dass Proteine ohne ein C-terminales Lysin Plg binden können [101].

Die Kringel-Domänen unterscheiden sich in den Affinitäten zum genannten Lysin-Analogon [230]. So besitzen die Kringel-Domänen 1, 4 und 5 eine hohe Affinität zum Analogon, wodurch eine Bindung zu anderen Proteinen fast vollständig unterbunden wird. Die Domäne 2 weist jedoch nur eine geringe Affinität und die Domäne 3 überhaupt keine Bindung zur 6-Aminohexansäure auf. Damit kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die Oberflächen assoziierten Proteine von *M. pneumoniae* höchstwahrscheinlich an die Kringel-Domäne 2 binden, da zwar eine Reduktion der Bindung beobachtet werden konnte, aber keine vollständige

Hemmung auftrat.

Darüber hinaus kann angenommen werden, dass andere Oberflächen assoziierten Proteine, die nicht zur Klasse der glykolytischen Enzyme gehören, ebenfalls potenzielle Bindungspartner der untersuchten ECM-Proteine sind, da die Interaktion nicht blockiert wurde.

Eine gegenseitige Beeinflussung der oberflächenassoziierten Proteine untereinander konnte zusätzlich nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich hier ein komplexes Muster. Die Bindungen zu den humanen ECM-Proteine Vc und Lf wurden nur gering durch die Vorinkubation der glykolytischen Enzyme miteinander beeinflusst. Das deutet darauf hin, dass auf diesen ECM-Proteinen Regionen vorhanden sind, die spezifisch für die jeweilige Bindung sind. Die Interaktionen zwischen den glykolytischen Enzymen und Ln, Fc und Plg wurden dagegen stark reduziert. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um gleiche oder strukturell verwandte Proteinbereiche, die verschiedene Assoziationen vermitteln. Das ein bakterielles Protein an diverse Rezeptoren unterschiedlicher Zelltypen bindet, ist bereits durch Studien bestätigt [234]. So wurde z. B. für das Bakterium *S. aureus* beschrieben, dass oberflächenlokalisiertes Protein A sowohl Fc, als auch Fn und Elastin binden kann [235], wobei es sich dabei um strukturell ähnliche Bindestellen handelt [236]. Auch in *Helicobacter pylori* konnten Bindungsstellen ausgemacht werden, welche Plasminogen und Vitronektin binden. Diese Bindungsstellen befanden sich in räumlicher Nähe zueinander [237].

Durch ihre Eigenschaft, humane ECM-Proteine zu binden, können einige glykolytische Enzyme der Klasse der ‚Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules‘ (MSCRAMM) zugeordnet werden [238]. Charakterisiert wird diese Molekülklasse durch oberflächenassoziierte Proteine, die in der Lage sind, an Komponenten der extrazellulären Matrix zu adhären. Dazu gehören die ECM-Proteine Fn, Fc und Ln, aber auch Plg. Ein drittes Charakteristikum ist die hohe Bindungsaffinität, die nicht signifikant durch andere Moleküle gestört wird. Einige MSCRAMMs besitzen zudem noch die Fähigkeit, an verschiedene Liganden binden zu können. So ist bekannt, dass das Protein YadA von *Yersinia enterocolitica* Kollagen [239, 240], aber auch Fn sowie Ln bindet. Weiterhin kann ein Organismus verschiedene MSCRAMM’s exprimieren, wie es aus *S. aureus* bekannt ist [241, 242]. Diese Proteinklasse konnte auch schon in verschiedenen Mykoplasmen beschrieben werden, vor allem in der tierpathogenen Spezies *M. hyopneumoniae* [243]. So adhärirt das Protein P104 an Heparin, Plg und Fn [244]. Weitere Proteine wurden in *M. hyopneumoniae* als MSCRAMM identifiziert [245, 246]. Auch das Protein OsmC vom *M. gallisepticum* ist als Heparin-Bindungspartner beschrieben [247] und das Protein LppT von *M. conjunctivae* besitzt

Bindungskapazitäten zu Fc [248]. Aber auch in *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. fermentas* und *M. hyorhinae* wurden MSCRAMM's identifiziert [41, 60, 130, 249, 250]. Diese Arbeit zeigt, dass die oberflächenlokalisierten glykolytischen Enzyme GapA, PdhB, Pyk und Pgm von *M. pneumoniae* der Klasse der MSCRAMMs zuzuordnen sind.

### 4.1 Die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin

Die gewonnenen Erkenntnisse zur Interaktion mit Plg warfen die Frage auf, ob eine Aktivierung des gebundenen Plg in Gegenwart der glykolytischen Enzyme ermöglicht wird. Dies ist in der Literatur mehrfach beschrieben. So zeigten Fernandes *et al.*, dass das oberflächenlokalisierte Protein OmpL1 von *Leptospira* spp. ein Interaktionspartner der humanen ECM ist [251]. Zusätzlich konnte eine Bindung zu Plg sowie dessen Aktivierung nachgewiesen werden. Diese Aktivierung wurde auch in Gegenwart oberflächenlokalisierter Proteine von *B. burgdorferi* [175, 226] bestätigt. Die Aktivatoren uPA und tPA schneiden dabei Plg an der proteolytischen Schnittstelle Arg<sup>561</sup>-Val<sup>562</sup> [252]. Der in der vorliegenden Studie verwendete Plg-Aktivitätsassay ergab, dass die Komplexe aus Plg und allen oberflächenassoziierten Enzymen in der Lage waren, Plg zu Plasmin umzuwandeln. Es waren jedoch Unterschiede im Potenzial der Aktivierung messbar. Das Protein PdhB zeigte die höchste Aktivierung und die Unterschiede korrelieren mit der Bindungseffizienz von Plg an die bakteriellen Proteine. So weist PdhC eine verringerte Plg-Bindung auf. Dadurch steht weniger gebundenes Plg zur Verfügung, das durch die Aktivatoren zu Plasmin umgewandelt werden kann. Die Feststellung quantitativer Unterschiede der Bindungskapazitäten erscheint somit wesentlich für vergleichende Untersuchungen.

Es ist ebenfalls möglich, dass die Bindungsstelle(n) zwischen Plg und den rekombinanten Proteinen von Bedeutung für den Prozess der Aktivierung ist. Allerdings kann die Bindung der glykolytischen Enzyme an die proteolytische Schnittstelle zur Aktivierung ausgeschlossen werden, da dies zu einer Blockierung der Plasminbildung führen würde. Die Aktivierung von Plg unter dem Zusatz der Aktivatoren uPA und tPA zeigte jedoch keine signifikante Abweichung in Gegenwart der glykolytischen Enzyme verglichen mit den Kontrollen. Dies spricht dafür, dass die Schnittstelle von Plg für den Aktivator zugänglich ist. Ergänzend wurde beobachtet, dass die Aktivierung mittels tPA nach Interaktion mit den glykolytischen Enzymen signifikant gefördert wurde. Die einzige Ausnahme stellte dabei PdhC dar. Eine derartige Förderung der proteolytischen Aktivität von tPA konnten Okada *et al.* mithilfe eines synthetischen Peptides der Staphylokinase ebenfalls beobachten. In ihrer Studie führten sie diesen Effekt auf eine strukturelle Änderung des an das Peptid gebundenen Plg zurück [253].

Dies könnte auch die Ursache dafür sein, dass der proteolytische Effekt des Aktivators verstärkt wurde. Ähnliche Beobachtungen machten Hurmalainen *et al.* im Falle *L. crispatus*. Sie konnten im zeitlichen Verlauf den Einfluss der beiden Aktivatoren beurteilen. Es stellte sich heraus dass die Zugabe von tPA zu einer erhöhten Plasminbildung führte [254]. Die festgestellten Unterschiede der Effizienzen der Aktivatoren stellen generell einen interessanten Aspekt im Prozess der Plasminproduktion dar. Es wurde gezeigt, dass der Aktivator tPA im Vergleich zu uPA zu einer schnelleren Plasminbildung führt. Als Hauptaktivator der Fibrinolyse gilt tPA als wichtig für die Fibrin-Bildung. Im Gegensatz dazu wird uPA durch einen speziellen Rezeptor erkannt, den sogenannten Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor (uPAR). Dieser Rezeptor spielt eine wichtige Rolle bei der Zellmigration und -adhäsion [173]. Shenkman zeigte, dass der gewebespezifische Aktivator in blutfreien Medien eine stärkere Aktivierung aufweist als der Urokinase-Aktivator [255]. Es bleibt für *M. pneumoniae* die Frage offen, wie effizient die Aktivierung im natürlichen Wirt-Erreger-System abläuft.

Die Aktivierung von Plg zu Plasmin ist die Voraussetzung für den Abbau verschiedener Proteine während der Fibrinolyse. Die proteolytische Aktivität von Plasmin führt beispielsweise zur Degradation von Fn, Komplementfaktoren und anderen ECM-Proteinen. Die Prozesse, die über den Abbau durch Plasmin ablaufen, sind wichtig für die Zellmigration, aber auch für die Entfernung apoptotischer Zellen in Geweben [256]. Mikroorganismen können sich diese Eigenschaften ebenfalls zunutze machen. Es ist denkbar, dass sich die Bindung an Plg positiv auf dessen Konformation auswirkt, was zu einer erhöhten Aktivierung führen könnte. Der Prozess der Fibrinolyse stellt eine Schnittstelle zwischen der bakteriellen Pathogenese und der Wirtsabwehr dar [257].

Für *M. pneumoniae* wurde hier bestätigt, dass in Gegenwart von PdhB und Pgm der Abbau von Fn durch die Plasminaktivierung induziert werden konnte. Diverse Organismen sind in der Lage, Fn mit der Hilfe von aktivem Plasmin zu spalten [258], was für die Fibrinolyse von Bedeutung sein kann. Dieser zelluläre Prozess führt zur Auflösung von lokalen Thromben, wodurch der Transport der Mikroorganismen optimiert ist [172]. Die Umsetzung von Fn kann die Blutgefäßdurchlässigkeit fördern [259] sowie die Akkumulation beeinflussen [260]. Weiterhin kann die Evasion inflammatorischer Zellen durch diesen Prozess gefördert werden [257]. Ein wichtiges Beispiel der Auswirkung des Zusammenspiels der Plg-Aktivierung und der Erreger konnte für *Y. pestis* festgestellt werden [261]. Dabei fördert Plasmin u. a. die Virulenz des Erregers, da u. a. durch die erleichterte Gewebepenetration das Wachstum und die Verbreitung der Bakterien unterstützt wird [262, 263].

Die Aktivierung von Plg zu Plasmin kann aber auch zur direkten Degradation anderer ECM-Proteine führen [264]. Somit ist das Vordringen der Mikroorganismen in die ECM bzw. in die Basismembranen erleichtert. *B. hermsii* nutzt Plasmin beispielsweise zum verbesserten Eindringen in das Zielgewebe [265]. Derartige Prozesse, die durch Bakterien beeinflusst sind, wurden schon mehrfach beschrieben. Beispiele sind *S. typhimurium*, *B. burgdorferi*, *S. pneumoniae*, *S. agalactiae* und *M. fermentas* und *H. influenzae* [172, 266].

Neben dem Abbau von Fn wurde der Abbau des humanen ECM-Proteins Vc in Gegenwart der glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* nachgewiesen. Dieser Abbau erfolgte durch alle Proteine, die in der Lage sind, Plg zu binden und zu aktivieren. Plasmin spielt bei der Degradation von Vc eine wichtige Rolle [267]. Der Abbau dieses ECM-Proteins hat Einfluss auf die Umwandlung von einem anti-Fibrinolyse-Protein in ein pro-Fibrinolyse-Protein. Vc bindet den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ 1 (PAI-1) und stabilisiert dessen Struktur, wodurch der inhibitorische Effekt verstärkt wird. So verhindert PAI-1 die Umwandlung von Plg zu Plasmin. Durch den Abbau von Vc wird der inhibitorische Effekt von PAI-1 gegenüber uPA und tPA aufgehoben und die Umwandlung von Plg zu Plasmin kann verstärkt stattfinden [268]. Weiterhin ist Vc in der Lage, an Plg zu binden, was zu einer reduzierten Aktivierung durch tPA führt. Allerdings wird die Aktivierung durch erhöhte Vc-Konzentrationen gestört [269].

Generell ist Plasmin aber in der Lage, diverse ECM-Proteine abzubauen, so auch Ln, Lc und Fc. Für *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Y. pestis* sowie *Leptospira* species ist der Abbau von Ln durch aktiviertes Plg nachzuweisen [270-272]. Vieira zeigte zusätzlich den erfolgreichen Abbau von Fc [272]. In der vorliegenden Arbeit konnte die Degradation für diese Proteine jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Zum einen könnte die gebildete Plasminmenge nicht für den Abbau ausreichen, zum anderen kann auch die Konzentrationen der Aktivatoren eine Rolle spielen. So bestätigte beispielsweise Quigley *et al.* den Einfluss der Aktivatorkonzentration bei der Spaltung von Fc [273]. Es zeigte sich eine Korrelation zwischen der Aktivatormenge und der Zunahme der Abbauprodukte von Fc. Neben den genannten Gründen kann auch die Bindungskapazität der glykolytischen Enzyme für Plg entscheidend sein. Die Effizienz der Degradation korreliert mit der Menge an gebildetem Plasmin. Der Versuchsaufbau sollte in weiterführenden Experimenten mit der gleichen Menge an gebundenem Plg wiederholt werden, um vergleichbare Aussagen zum Abbau treffen zu können. Durch den Nachweis der Plasminbildung in Gegenwart verschiedener glykolytischer Enzyme und den Abbau von Vc ist das prinzipielle Potenzial zum Abbau weiterer ECM-Proteine gegeben. Interessant wäre zusätzlich die Frage, ob ein Abbau von

Komplementfaktoren in Gegenwart der oberflächenassoziierten Proteine erreicht werden kann. Ein Abbau des Komplementfaktors C3b wurde beispielsweise durch das oberflächengebundene Protein BBA70 von *B. burgdorferi* nachgewiesen [175]. Dieser Vorgang ist bisher bei Mykoplasmen noch nicht bestätigt worden.

## 5 Zusammenfassung

*Mycoplasma pneumoniae* ist ein parasitär lebendes Bakterium, das eine atypische Pneumonie beim Menschen verursacht. Aufgrund seiner geringen Genomgröße besitzt dieser Organismus einen eingeschränkten Metabolismus sowie eine limitierte Zahl an Pathogenitätsfaktoren. Dennoch ist dieser Mikroorganismus perfekt an seinen Wirt angepasst und es war zu vermuten, dass neben dem komplexen Adhäsionsapparat von *M. pneumoniae* auch glykolytische Enzyme eine Rolle bei der Interaktion mit humanen Zellen spielen. Diese Enzyme sind maßgeblich bei intrazellulär ablaufenden Stoffwechselprozessen beteiligt. Es wurde jedoch bereits bei anderen Bakterien gezeigt, dass glykolytische Enzyme ebenfalls auf der Bakterienoberfläche zu finden sind und dort mit Komponenten der extrazellulären Matrix des Wirtes interagieren können. Dieser Vorgang trägt offensichtlich zur erfolgreichen Kolonisation des Wirtes bei. Ziel dieser Arbeit war es, alle glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* hinsichtlich ihrer Lokalisierung zu beschreiben und Teilaspekte ihrer Funktion in der Interaktion mit Wirtskomponenten zu analysieren.

Die glykolytischen Enzyme wurden rekombinant produziert und für die Herstellung von monospezifischen polyklonalen Antikörpern verwendet. Die Lokalisation der Enzyme wurde durch Nachweis in der Membran- und Zytosolfraktion des *M. pneumoniae* Gesamtantigens untersucht. Mittels Immunfluoreszenz, Colony Blot und Protease-Verdau intakter Bakterienzellen wurde bestätigt, dass acht (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Lactatdehydrogenase, Transketolase, Pyruvatdehydrogenase, Phosphoglyceratmutase und Pyruvatdehydrogenase Untereinheiten A-C) der 19 glykolytischen Enzyme mit der Bakterienoberfläche assoziiert vorkommen.

Die Untersuchung von Mutanten ergab, dass die Lokalisation der Enzyme nicht an das Vorkommen der für die Anheftung der Bakterien an Zielstrukturen wesentlichen Adhäsine wie die Proteine P1, P40 und P90 sowie das Oberflächenprotein P01, gekoppelt ist. Jedoch sind sowohl intakte Zellen von *M. pneumoniae* als auch die oberflächenlokalisierten glykolytischen Enzyme in der Lage, an verschiedene humane Zellen zu binden. Eine Analyse der nachweisbaren Proteine auf der Oberfläche der Zellen führte zur Auswahl von sechs humanen Proteinen für weiterführende Studien: Plasminogen, Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen, Laminin und Laktoferrin. Mittels ELISA wurde eine konzentrationsabhängige Bindung der oberflächenassoziierten Enzyme von *M. pneumoniae* mit Wirtsproteinen festgestellt, die hinsichtlich der Intensität jedoch Unterschiede aufwies. So konnten ausgeprägte Interaktionen aller Enzyme mit humanem Plasminogen und Vitronectin nachgewiesen werden. Die Bindung von Fibronectin und Laktoferrin ist dagegen nur für einen Teil der glykolytischen Enzyme zu

bestätigen. Die Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren ergab, dass alle Bindungen zwischen glykolytischen Enzymen und humanen Proteinen spezifisch durch die entsprechenden Antiseren gehemmt werden und dass der Großteil der Interaktionen ionischen Wechselwirkungen unterliegt. Die Bindung zu Plasminogen basiert überwiegend auf Lysin-Resten. Untersuchungen, ob sich die glykolytischen Enzyme gegenseitig in der Bindung zu Wirtsfaktoren beeinflussen, ergab ein komplexes Muster, das hinsichtlich Plasminogen, Fibronectin und Laminin für eine Überlagerung der für die Interaktion maßgeblichen Proteinbereiche spricht.

Die Untersuchung einer möglichen Aktivierung von inaktivem Plasminogen zu proteolytisch aktivem Plasmin ergab, dass in Gegenwart aller oberflächenlokalisierten glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* Plasmin gebildet wird. Es wurden jedoch Unterschiede im Aktivierungspotenzial nachgewiesen. Die Pyruvatdehydrogenase Untereinheit B zeigte die höchste, die Pyruvatdehydrogenase Untereinheit C die geringste Plasminproduktion. Die Verwendung des gewebespezifischen Plasminogenaktivators führte zu einer höheren Aktivierung als der Urokinase-Typ Plasminogenaktivator. Die Variabilität der Plasminproduktion kann mit der unterschiedlichen Bindungsaffinität der glykolytischen Enzyme zu Plasminogen begründet werden. So besitzt die Pyruvatdehydrogenase Untereinheit B im Vergleich mit der Pyruvatdehydrogenase Untereinheit C ein höheres Bindepotenzial, das sich in der gemessenen Aktivierung widerspiegelt. Die Bildung von Plasmin kann zum Abbau verschiedener extrazellulärer Matrix-Proteine führen. Diese Prozesse sind physiologisch, z. B. in der Fibrinolyse, von Bedeutung. Während in Gegenwart der glykolytischen Enzyme die humanen Proteine Laktoferrin, Laminin und Fibronectin nicht abgebaut wurde, konnte Fibrinogen in Gegenwart der Pyruvatdehydrogenase Untereinheit B bzw. der Phosphoglyceratmutase und Vitronectin durch alle glykolytischen Enzyme (bis auf die Pyruvatdehydrogenase Untereinheit C) degradiert werden.

Mit der erstmals durchgeführten Analyse aller glykolytischen Enzyme eines Mikroorganismus hinsichtlich ihrer Lokalisation und der Bindung zu Komponenten der humanen extrazellulären Matrix wurde ein komplexes Netzwerk an Wirt-Erreger-Interaktionen nachgewiesen.

## 6 Ausblick

Die Analyse der glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* zeigt, wie effektiv ein Bakterium mit minimaler genetischer und damit metabolischer Ausstattung an seinen Wirt angepasst ist. In zukünftigen Studien sind die molekularen Grundlagen dieser Interaktionen weiter zu untersuchen. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten liefern z. B. die Grundlage für die Analyse der exakten Proteinregionen, die für die Interaktion zwischen den humanen Proteinen und den glykolytischen Enzymen entscheidend sind. Das beinhaltet ebenfalls die Bedeutung einzelner Peptidsequenzen für das Potenzial zur Plasminaktivierung.

Die bisherigen Untersuchungen haben bestätigt, dass *M. pneumoniae* in der Lage ist, humane Proteine zu binden und Plasminogen zu aktivieren. Es ist jedoch noch unklar, welche Rolle die glykolytischen Enzyme dabei spielen oder ob andere Proteine stärker involviert sind. Das in dieser Arbeit etablierte Methodenspektrum kann auf Elongationsfaktoren und Chaperone angewendet werden, um deren Potenzial als Proteine mit dualer Funktion näher zu untersuchen. Mithilfe der Elektronenmikroskopie wäre es denkbar, die Lokalisation der glykolytischen Enzyme auf der Oberfläche der Mykoplasmenzelle näher zu identifizieren.

Das Potenzial einzelner Enzyme, Plasminogen in Plasmin zu aktivieren und die Analyse der Einflussfaktoren auf diesen Prozess erfordern weitere Studien. Außerdem können weiterführende Degradierungsversuche der ECM-Proteine einen Einblick auf die Auswirkung dieser Interaktion auf die Wirtinvasion geben. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass nicht nur humane ECM-Proteine durch das gebildete Plasmin abgebaut werden, sondern dass beispielsweise auch Komplementfaktoren wie C3b und C5 degradiert werden. Dadurch könnte sich das diesbezügliche Potenzial der oberflächenlokalisierten Proteine von *M. pneumoniae* erweitern.

## 7 Publikationsliste

1. Brandis H, Otte HJ: **Mikroorganismen ohne Zellwand (Mollicutes)**. In: *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. 5 edn. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1984: 497-504.
2. Razin S, Yogev D, Naot Y: **Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas**. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, **62**(4):1094-1156.
3. Atkinson TP, Balish MF, Waites KB: **Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of Mycoplasma pneumoniae infections**. *FEMS Microbiol Rev* 2008, **32**(6):956-973.
4. Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, Pirkl E, Li BC, Herrmann R: **Complete sequence analysis of the genome of the bacterium Mycoplasma pneumoniae**. *Nucleic Acids Res* 1996, **24**(22):4420-4449.
5. Herrmann R, Reiner B: **Mycoplasma pneumoniae and Mycoplasma genitalium: a comparison of two closely related bacterial species**. *Curr Opin Microbiol* 1998, **1**(5):572-579.
6. Lluch-Senar M, Mancuso FM, Climente-Gonzalez H, Pena-Paz MI, Sabido E, Serrano L: **Rescuing discarded spectra: Full comprehensive analysis of a minimal proteome**. *Proteomics* 2016, **16**(4):554-563.
7. Razin S: **Molecular biology and genomics of Mollicutes**. *Bulletin of Insectology* 2007, **60**(2):101-103.
8. Maniloff ES, Johnson KM: **Incremental recording for photorefractive hologram multiplexing: comment**. *Opt Lett* 1992, **17**(13):961.
9. Inamine JM, Ho KC, Loechel S, Hu PC: **Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by Mycoplasma pneumoniae, Mycoplasma genitalium, and Mycoplasma gallisepticum**. *J Bacteriol* 1990, **172**(1):504-506.
10. Baseman JB, Tully JG: **Mycoplasmas: sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety**. *Emerg Infect Dis* 1997, **3**(1):21-32.
11. Dandekar T, Sauerborn R: **Comparative genome analysis and pathway reconstruction**. *Pharmacogenomics* 2002, **3**(2):245-256.
12. Pollack JD, Myers MA, Dandekar T, Herrmann R: **Suspected utility of enzymes with multiple activities in the small genome Mycoplasma species: the replacement of the missing "household" nucleoside diphosphate kinase gene and activity by glycolytic kinases**. *OMICS* 2002, **6**(3):247-258.
13. Dybvig K, Voelker LL: **Molecular biology of mycoplasmas**. *Annu Rev Microbiol* 1996, **50**:25-57.
14. Stanbridge E: **Mycoplasmas and cell cultures**. *Bacteriol Rev* 1971, **35**(2):206-227.
15. Eaton MD, Meiklejohn G, van HW: **Studies on the Etiology of Primary Atypical Pneumonia: A filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters and chick embryos T**. *J Exp Med* 1944, **79**(6):649-668.
16. Chanock RM, Cook MK, Fox HH, Parrott RH, Huebner RJ: **Serologic evidence of infection with Eaton agent in lower respiratory illness in childhood**. *N Engl J Med* 1960, **262**:648-654.
17. Chanock RM, James WD, Fox HH, Turner HC, Mufson MA, Hayflick L: **Growth of Eaton PPLO in broth and preparation of complement fixing antigen**. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962, **110**:884-889.
18. Chanock RM, Dienes L, Eaton MD, Edward DG, Freundt EA, Hayflick L, Hers JF, Jensen KE, Liu C, Marmion BP *et al*: **Mycoplasma pneumoniae: Proposed Nomenclature for Atypical Pneumonia Organism (Eaton Agent)**. *Science* 1963, **140**(3567):662-662.
19. Cassell GH, Cole BC: **Mycoplasmas as agents of human disease**. *N Engl J Med* 1981, **304**(2):80-89.
20. Kashyap S, Sarkar M: **Mycoplasma pneumonia: Clinical features and management**. *Lung India* 2010, **27**(2):75-85.
21. Talkington DF, Waites KB, Schwartz SB, Besser RE: **Emerging from obscurity: understanding pulmonary and extrapulmonary syndromes, pathogenesis, and epidemiology of human Mycoplasma pneumoniae infections**. *Emerging infections* 2001, **5**:47-84.
22. Chaudhry R, Ghosh A, Chandolia A: **Pathogenesis of Mycoplasma pneumoniae: An update**. *Indian Journal of Medical Microbiology* 2016, **34**(1):7.
23. Foy HM, Grayston JT, Kenny GE, Alexander ER, McMahan R: **Epidemiology of Mycoplasma pneumoniae infection in families**. *JAMA* 1966, **197**(11):859-866.
24. Sande MA, Gadot F, Wenzel RP: **Point source epidemic of Mycoplasma pneumoniae infection in a prosthodontics laboratory**. *Am Rev Respir Dis* 1975, **112**(2):213-217.
25. Waites KB, Talkington DF: **Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen**. *Clin Microbiol Rev* 2004, **17**(4):697-728, table.
26. Clyde WA, Jr.: **Mycoplasma pneumoniae respiratory disease symposium: summation and significance**. *Yale J Biol Med* 1983, **56**(5-6):523-527.
27. Narita M: **Classification of Extrapulmonary Manifestations Due to Mycoplasma pneumoniae Infection on the Basis of Possible Pathogenesis**. *Front Microbiol* 2016, **7**:23.
28. Christie LJ, Honarmand S, Yagi S, Ruiz S, Glaser CA: **Anti-galactocerebroside testing in Mycoplasma pneumoniae-associated encephalitis**. *J Neuroimmunol* 2007, **189**(1-2):129-131.
29. Schalock PC, Dinulos JG: **Mycoplasma pneumoniae-induced cutaneous disease**. *Int J Dermatol* 2009, **48**(7):673-680.
30. Davis CP, Cochran S, Lisse J, Buck G, DiNuzzo AR, Weber T, Reinartz JA: **Isolation of Mycoplasma pneumoniae from synovial fluid samples in a patient with pneumonia and polyarthritis**. *Arch Intern Med* 1988, **148**(4):969-970.
31. Harjacek M, Ostojic J, Djakovic RO: **Juvenile spondyloarthropathies associated with Mycoplasma pneumoniae infection**. *Clin Rheumatol* 2006, **25**(4):470-475.

32. Dumke R, Hausner M, Jacobs E: **Role of Mycoplasma pneumoniae glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in mediating interactions with the human extracellular matrix.** *Microbiology* 2011, **157**(Pt 8):2328-2338.
33. von Baum H, Welte T, Marre R, Suttorp N, Luck C, Ewig S: **Mycoplasma pneumoniae pneumonia revisited within the German Competence Network for Community-acquired pneumonia (CAPNETZ).** *BMC Infect Dis* 2009, **9**:62.
34. Dumke R, Schnee C, Pletz MW, Rupp J, Jacobs E, Sachse K, Rohde G: **Mycoplasma pneumoniae and Chlamydia spp. infection in community-acquired pneumonia, Germany, 2011-2012.** *Emerg Infect Dis* 2015, **21**(3):426-434.
35. Foy HM: **Infections caused by Mycoplasma pneumoniae and possible carrier state in different populations of patients.** *Clin Infect Dis* 1993, **17 Suppl 1**:S37-S46.
36. Chalker V, Stocki T, Mentasti M, Fleming D, Harrison T: **Increased incidence of Mycoplasma pneumoniae infection in England and Wales in 2010: multilocus variable number tandem repeat analysis typing and macrolide susceptibility.** *Euro Surveill* 2011, **16**(19).
37. Lind K, Benzon MW, Jensen JS, Clyde WA, Jr.: **A seroepidemiological study of Mycoplasma pneumoniae infections in Denmark over the 50-year period 1946-1995.** *Eur J Epidemiol* 1997, **13**(5):581-586.
38. Dumke R, Stolz S, Jacobs E, Juretzek T: **Molecular characterization of macrolide resistance of a Mycoplasma pneumoniae strain that developed during therapy of a patient with pneumonia.** *Int J Infect Dis* 2014, **29**:197-199.
39. Hatchel JM, Balish MF: **Attachment organelle ultrastructure correlates with phylogeny, not gliding motility properties, in Mycoplasma pneumoniae relatives.** *Microbiology* 2008, **154**(Pt 1):286-295.
40. Krause DC, Balish MF: **Cellular engineering in a minimal microbe: structure and assembly of the terminal organelle of Mycoplasma pneumoniae.** *Mol Microbiol* 2004, **51**(4):917-924.
41. Kannan TR, Baseman JB: **ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of Mycoplasma pneumoniae represents unique virulence determinant among bacterial pathogens.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(17):6724-6729.
42. Meng KE, Pfister RM: **Intracellular structures of Mycoplasma pneumoniae revealed after membrane removal.** *J Bacteriol* 1980, **144**(1):390-399.
43. Krause DC: **Mycoplasma pneumoniae cytheadherence: unravelling the tie that binds.** *Mol Microbiol* 1996, **20**(2):247-253.
44. Krause DC: **Mycoplasma pneumoniae cytheadherence: organization and assembly of the attachment organelle.** *Trends Microbiol* 1998, **6**(1):15-18.
45. Balish MF: **Subcellular structures of mycoplasmas.** *Front Biosci* 2006, **11**:2017-2027.
46. Razin S, Jacobs E: **Mycoplasma adhesion.** *J Gen Microbiol* 1992, **138**(3):407-422.
47. Henderson GP, Jensen GJ: **Three-dimensional structure of Mycoplasma pneumoniae's attachment organelle and a model for its role in gliding motility.** *Mol Microbiol* 2006, **60**(2):376-385.
48. Hasselbring BM, Jordan JL, Krause RW, Krause DC: **Terminal organelle development in the cell wall-less bacterium Mycoplasma pneumoniae.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(44):16478-16483.
49. Baseman JB, Cole RM, Krause DC, Leith DK: **Molecular basis for cytheadhesion of Mycoplasma pneumoniae.** *J Bacteriol* 1982, **151**(3):1514-1522.
50. Seybert A, Herrmann R, Frangakis AS: **Structural analysis of Mycoplasma pneumoniae by cryo-electron tomography.** *J Struct Biol* 2006, **156**(2):342-354.
51. Seto S, Layh-Schmitt G, Kenri T, Miyata M: **Visualization of the attachment organelle and cytheadherence proteins of Mycoplasma pneumoniae by immunofluorescence microscopy.** *J Bacteriol* 2001, **183**(5):1621-1630.
52. Layh-Schmitt G, Herrmann R: **Spatial arrangement of gene products of the P1 operon in the membrane of Mycoplasma pneumoniae.** *Infect Immun* 1994, **62**(3):974-979.
53. Layh-Schmitt G, Harkenthal M: **The 40- and 90-kDa membrane proteins (ORF6 gene product) of Mycoplasma pneumoniae are responsible for the tip structure formation and P1 (adhesin) association with the Triton shell.** *FEMS Microbiol Lett* 1999, **174**(1):143-149.
54. Hedreyda CT, Krause DC: **Identification of a possible cytheadherence regulatory locus in Mycoplasma pneumoniae.** *Infect Immun* 1995, **63**(9):3479-3483.
55. Nakane D, Kenri T, Matsuo L, Miyata M: **Systematic Structural Analyses of Attachment Organelle in Mycoplasma pneumoniae.** *PLoS Pathog* 2015, **11**(12):e1005299.
56. Kawamoto A, Matsuo L, Kato T, Yamamoto H, Namba K, Miyata M: **Periodicity in Attachment Organelle Revealed by Electron Cryotomography Suggests Conformational Changes in Gliding Mechanism of Mycoplasma pneumoniae.** *MBio* 2016, **7**(2).
57. Tryon VV, Baseman JB: **The acquisition of human lactoferrin by Mycoplasma pneumoniae.** *Microb Pathog* 1987, **3**(6):437-443.
58. Almagor M, Kahane I, Yatziv S: **Role of superoxide anion in host cell injury induced by mycoplasma pneumoniae infection. A study in normal and trisomy 21 cells.** *J Clin Invest* 1984, **73**(3):842-847.
59. Lynch RE, Cole BC: **Mycoplasma pneumoniae: a prokaryote which consumes oxygen and generates superoxide but which lacks superoxide dismutase.** *Biochem Biophys Res Commun* 1980, **96**(1):98-105.
60. Kannan TR, Provenzano D, Wright JR, Baseman JB: **Identification and characterization of human surfactant protein A binding protein of Mycoplasma pneumoniae.** *Infect Immun* 2005, **73**(5):2828-2834.
61. Bose S, Segovia JA, Somarajan SR, Chang TH, Kannan TR, Baseman JB: **ADP-ribosylation of NLRP3 by Mycoplasma pneumoniae CARDS toxin regulates inflammasome activity.** *MBio* 2014, **5**(6).
62. Grosshennig S, Ischebeck T, Gibhardt J, Busse J, Feussner I, Stulke J: **Hydrogen sulfide is a novel potential virulence factor of Mycoplasma pneumoniae: characterization of the unusual cysteine desulfurase/desulfhydrase HapE.** *Mol Microbiol* 2016, **100**(1):42-54.
63. Hayflick L: **Tissue cultures and mycoplasmas.** *Tex Rep Biol Med* 1965, **23**:Suppl.

64. Loens K, Goossens H, Ieven M: **Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*: current status of diagnostic methods.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010, **29**(9):1055-1069.
65. Loens K, Ieven M: ***Mycoplasma pneumoniae*: Current Knowledge on Nucleic Acid Amplification Techniques and Serological Diagnostics.** *Front Microbiol* 2016, **7**:448.
66. Waites KB, Xiao L, Paralanov V, Viscardi RM, Glass JI: **Molecular methods for the detection of *Mycoplasma* and *ureaplasma* infections in humans: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology.** *J Mol Diagn* 2012, **14**(5):437-450.
67. Principi N, Esposito S: **Macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*: its role in respiratory infection.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013, **68**(3):506-511.
68. Halbedel S, Hames C, Stulke J: **Regulation of carbon metabolism in the mollicutes and its relation to virulence.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2007, **12**(1-2):147-154.
69. Dutow P, Schmidl SR, Ridderbusch M, Stulke J: **Interactions between glycolytic enzymes of *Mycoplasma pneumoniae*.** *J Mol Microbiol Biotechnol* 2010, **19**(3):134-139.
70. Schmidl SR, Gronau K, Pietack N, Hecker M, Becher D, Stulke J: **The phosphoproteome of the minimal bacterium *Mycoplasma pneumoniae*: analysis of the complete known Ser/Thr kinome suggests the existence of novel kinases.** *Mol Cell Proteomics* 2010, **9**(6):1228-1242.
71. Halbedel S, Hames C, Stulke J: **In vivo activity of enzymatic and regulatory components of the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system in *Mycoplasma pneumoniae*.** *J Bacteriol* 2004, **186**(23):7936-7943.
72. Pancholi V: **Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases.** *Cell Mol Life Sci* 2001, **58**(7):902-920.
73. Fraser CM, Gocayne JD, White O, Adams MD, Clayton RA, Fleischmann RD, Bult CJ, Kerlavage AR, Sutton G, Kelley JM *et al*: **The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*.** *Science* 1995, **270**(5235):397-403.
74. Chambaud I, Heilig R, Ferris S, Barbe V, Samson D, Galisson F, Moszer I, Dybvig K, Wroblewski H, Viari A *et al*: **The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(10):2145-2153.
75. Layh-Schmitt G, Podtelejnikov A, Mann M: **Proteins complexed to the P1 adhesin of *Mycoplasma pneumoniae*.** *Microbiology* 2000, **146** ( Pt 3):741-747.
76. Henderson KC, Sheppard ES, Rivera-Betancourt OE, Choi JY, Dluhy RA, Thurman KA, Winchell JM, Krause DC: **The multivariate detection limit for *Mycoplasma pneumoniae* as determined by nanorod array-surface enhanced Raman spectroscopy and comparison with limit of detection by qPCR.** *Analyst* 2014, **139**(24):6426-6434.
77. Halbedel S, Eilers H, Jonas B, Busse J, Hecker M, Engelmann S, Stulke J: **Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*: analysis of the promoters of the *ackA* and *ldh* genes.** *J Mol Biol* 2007, **371**(3):596-607.
78. Hames C, Halbedel S, Hoppert M, Frey J, Stulke J: **Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae*.** *J Bacteriol* 2009, **191**(3):747-753.
79. Gozalbo D, Gil-Navarro I, Azorin I, Renau-Piqueras J, Martinez JP, Gil ML: **The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein.** *Infect Immun* 1998, **66**(5):2052-2059.
80. Lama A, Kucknoor A, Mundodi V, Alderete JF: **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a surface-associated, fibronectin-binding protein of *Trichomonas vaginalis*.** *Infect Immun* 2009, **77**(7):2703-2711.
81. Bergmann S, Rohde M, Hammerschmidt S: **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen-binding protein.** *Infect Immun* 2004, **72**(4):2416-2419.
82. Matta SK, Agarwal S, Bhatnagar R: **Surface localized and extracellular Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Bacillus anthracis* is a plasminogen binding protein.** *Biochim Biophys Acta* 2010, **1804**(11):2111-2120.
83. Modun B, Morrissey J, Williams P: **The staphylococcal transferrin receptor: a glycolytic enzyme with novel functions.** *Trends Microbiol* 2000, **8**(5):231-237.
84. Modun B, Williams P: **The staphylococcal transferrin-binding protein is a cell wall glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.** *Infect Immun* 1999, **67**(3):1086-1092.
85. Schaumburg J, Diekmann O, Hagendorff P, Bergmann S, Rohde M, Hammerschmidt S, Jansch L, Wehland J, Karst U: **The cell wall subproteome of *Listeria monocytogenes*.** *Proteomics* 2004, **4**(10):2991-3006.
86. Tunio SA, Oldfield NJ, a'Aldeen DA, Wooldridge KG, Turner DP: **The role of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GapA-1*) in *Neisseria meningitidis* adherence to human cells.** *BMC Microbiol* 2010, **10**:280.
87. Egea L, Aguilera L, Gimenez R, Sorolla MA, Aguilar J, Badia J, Baldoma L: **Role of secreted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the infection mechanism of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: interaction of the extracellular enzyme with human plasminogen and fibrinogen.** *Int J Biochem Cell Biol* 2007, **39**(6):1190-1203.
88. Barbosa MS, Bao SN, Andreotti PF, de Faria FP, Felipe MS, dos Santos FL, Mendes-Giannini MJ, Soares CM: **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Paracoccidioides brasiliensis* is a cell surface protein involved in fungal adhesion to extracellular matrix proteins and interaction with cells.** *Infect Immun* 2006, **74**(1):382-389.
89. Candela M, Biagi E, Centanni M, Turrone S, Vici M, Musiani F, Vitali B, Bergmann S, Hammerschmidt S, Brigidi P: **Bifidobacterial enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host.** *Microbiology* 2009, **155**(Pt 10):3294-3303.
90. Antikainen J, Kuparinen V, Lahteenmaki K, Korhonen TK: **Enolases from Gram-positive bacterial pathogens and commensal lactobacilli share functional similarity in virulence-associated traits.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007, **51**(3):526-534.

91. Sha J, Erova TE, Alyea RA, Wang S, Olano JP, Pancholi V, Chopra AK: **Surface-expressed enolase contributes to the pathogenesis of clinical isolate SSU of *Aeromonas hydrophila***. *J Bacteriol* 2009, **191**(9):3095-3107.
92. Cork AJ, Jergic S, Hammerschmidt S, Kobe B, Pancholi V, Benesch JL, Robinson CV, Dixon NE, Aquilina JA, Walker MJ: **Defining the structural basis of human plasminogen binding by streptococcal surface enolase**. *J Biol Chem* 2009, **284**(25):17129-17137.
93. Hughes MJ, Moore JC, Lane JD, Wilson R, Pribul PK, Younes ZN, Dobson RJ, Everest P, Reason AJ, Redfern JM *et al*: **Identification of major outer surface proteins of *Streptococcus agalactiae***. *Infect Immun* 2002, **70**(3):1254-1259.
94. Severin A, Nickbarg E, Wooters J, Quazi SA, Matsuka YV, Murphy E, Moutsatsos IK, Zagursky RJ, Olmsted SB: **Proteomic analysis and identification of *Streptococcus pyogenes* surface-associated proteins**. *J Bacteriol* 2007, **189**(5):1514-1522.
95. Brzychczy-Wloch M, Gorska S, Brzozowska E, Gamian A, Heczko PB, Bulanda M: **Identification of high immunoreactive proteins from *Streptococcus agalactiae* isolates recognized by human serum antibodies**. *FEMS Microbiology Letters* 2013, **349**(1):61-70.
96. Ceremuga I, Seweryn E, Bednarz-Misa I, Pietkiewicz J, Jermakow K, Banas T, Gamian A: **Enolase-like protein present on the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* binds plasminogen**. *Folia Microbiol (Praha)* 2014, **59**(5):391-397.
97. Decker BL, Wickner WT: **Enolase activates homotypic vacuole fusion and protein transport to the vacuole in yeast**. *J Biol Chem* 2006, **281**(20):14523-14528.
98. Chaves EG, Weber SS, Bao SN, Pereira LA, Bailao AM, Borges CL, Soares CM: **Analysis of *Paracoccidioides* secreted proteins reveals fructose 1,6-bisphosphate aldolase as a plasminogen-binding protein**. *BMC Microbiol* 2015, **15**:53.
99. Jolodar A, Fischer P, Bergmann S, Buttner DW, Hammerschmidt S, Brattig NW: **Molecular cloning of an alpha-enolase from the human filarial parasite *Onchocerca volvulus* that binds human plasminogen**. *Biochim Biophys Acta* 2003, **1627**(2-3):111-120.
100. Vanegas G, Quinones W, Carrasco-Lopez C, Concepcion JL, Albericio F, Avilan L: **Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana***. *Parasitol Res* 2007, **101**(6):1511-1516.
101. Crowe JD, Sievwright IK, Auld GC, Moore NR, Gow NA, Booth NA: ***Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins**. *Mol Microbiol* 2003, **47**(6):1637-1651.
102. Tunio SA, Oldfield NJ, Berry A, a'Aldeen DA, Wooldridge KG, Turner DP: **The moonlighting protein fructose-1, 6-bisphosphate aldolase of *Neisseria meningitidis*: surface localization and role in host cell adhesion**. *Mol Microbiol* 2010, **76**(3):605-615.
103. Pereira LA, Bao SN, Barbosa MS, da Silva JL, Felipe MS, de Santana JM, Mendes-Giannini MJ, de Almeida Soares CM: **Analysis of the *Paracoccidioides brasiliensis* triosephosphate isomerase suggests the potential for adhesin function**. *FEMS Yeast Res* 2007, **7**(8):1381-1388.
104. Kinby B, Booth NA, Svensater G: **Plasminogen binding by oral streptococci from dental plaque and inflammatory lesions**. *Microbiology* 2008, **154**(Pt 3):924-931.
105. Yamaguchi M, Ikeda R, Nishimura M, Kawamoto S: **Localization by scanning immunoelectron microscopy of triosephosphate isomerase, the molecules responsible for contact-mediated killing of *Cryptococcus*, on the surface of *Staphylococcus***. *Microbiol Immunol* 2010, **54**(6):368-370.
106. Bendtsen JD, Kiemer L, Fausboll A, Brunak S: **Non-classical protein secretion in bacteria**. *BMC Microbiol* 2005, **5**:58.
107. Kainulainen V, Korhonen TK: **Dancing to another tune-adhesive moonlighting proteins in bacteria**. *Biology (Basel)* 2014, **3**(1):178-204.
108. Huberts DH, van dK, I: **Moonlighting proteins: an intriguing mode of multitasking**. *Biochim Biophys Acta* 2010, **1803**(4):520-525.
109. Candela M, Bergmann S, Vici M, Vitali B, Turrone S, Eikmanns BJ, Hammerschmidt S, Brigidi P: **Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium***. *J Bacteriol* 2007, **189**(16):5929-5936.
110. Floden AM, Watt JA, Brissette CA: ***Borrelia burgdorferi* enolase is a surface-exposed plasminogen binding protein**. *PLoS One* 2011, **6**(11):e27502.
111. Jong AY, Chen SH, Stins MF, Kim KS, Tuan TL, Huang SH: **Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells**. *J Med Microbiol* 2003, **52**(Pt 8):615-622.
112. Kozik A, Karkowska-Kuleta J, Zajac D, Bochenska O, Kedracka-Krok S, Jankowska U, Rapala-Kozik M: **Fibronectin-, vitronectin- and laminin-binding proteins at the cell walls of *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* pathogenic yeasts**. *BMC Microbiol* 2015, **15**(1):197.
113. Furuya D, Yagihashi A, Uehara N, Yajima T, Kobayashi D, Watanabe N: **Genotype analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with and without reduced susceptibility to vancomycin using pulsed-field gel electrophoresis**. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2001, **22**(9):536-538.
114. Fulde M, Bernardo-Garcia N, Rohde M, Nachtigall N, Frank R, Preissner KT, Klett J, Morreale A, Chhatwal GS, Hermoso JA *et al*: **Pneumococcal phosphoglycerate kinase interacts with plasminogen and its tissue activator**. *Thromb Haemost* 2014, **111**(3):401-416.
115. Fulde M, Steinert M, Bergmann S: **Interaction of streptococcal plasminogen binding proteins with the host fibrinolytic system**. *Front Cell Infect Microbiol* 2013, **3**:85.
116. Boone TJ, Burnham CA, Tyrrell GJ: **Binding of group B streptococcal phosphoglycerate kinase to plasminogen and actin**. *Microb Pathog* 2011, **51**(4):255-261.

117. Shams F, Oldfield NJ, Lai SK, Tunio SA, Wooldridge KG, Turner DP: **Fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Neisseria meningitidis* binds human plasminogen via its C-terminal lysine residue.** *Microbiologyopen* 2016, **5**(2):340-350.
118. Dallo SF, Kannan TR, Blaylock MW, Baseman JB: **Elongation factor Tu and E1 beta subunit of pyruvate dehydrogenase complex act as fibronectin binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*.** *Mol Microbiol* 2002, **46**(4):1041-1051.
119. Donofrio FC, Calil AC, Miranda ET, Almeida AM, Benard G, Soares CP, Veloso SN, Soares CM, Mendes Giannini MJ: **Enolase from *Paracoccidioides brasiliensis*: isolation and identification as a fibronectin-binding protein.** *J Med Microbiol* 2009, **58**(Pt 6):706-713.
120. Kainulainen V, Loimaranta V, Pekkala A, Edelman S, Antikainen J, Kylvaja R, Laaksonen M, Laakkonen L, Finne J, Korhonen TK: **Glutamine synthetase and glucose-6-phosphate isomerase are adhesive moonlighting proteins of *Lactobacillus crispatus* released by epithelial cathelicidin LL-37.** *J Bacteriol* 2012, **194**(10):2509-2519.
121. Esgleas M, Li Y, Hancock MA, Harel J, Dubreuil JD, Gottschalk M: **Isolation and characterization of alpha-enolase, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus suis*.** *Microbiology* 2008, **154**(Pt 9):2668-2679.
122. Kornblatt MJ, Kornblatt JA, Hancock MA: **The interaction of canine plasminogen with *Streptococcus pyogenes* enolase: they bind to one another but what is the nature of the structures involved?** *PLoS One* 2011, **6**(12):e28481.
123. Agarwal S, Kulshreshtha P, Bambah MD, Bhatnagar R: **alpha-Enolase binds to human plasminogen on the surface of *Bacillus anthracis*.** *Biochim Biophys Acta* 2008, **1784**(7-8):986-994.
124. Song Z, Li Y, Liu Y, Xin J, Zou X, Sun W: **alpha-Enolase, an adhesion-related factor of *Mycoplasma bovis*.** *PLoS One* 2012, **7**(6):e38836.
125. Hoelzle LE, Hoelzle K, Helbling M, Aupperle H, Schoon HA, Ritzmann M, Heinritzi K, Felder KM, Wittenbrink MM: **MSG1, a surface-localised protein of *Mycoplasma suis* is involved in the adhesion to erythrocytes.** *Microbes Infect* 2007, **9**(4):466-474.
126. Hoelzle LE, Hoelzle K, Harder A, Ritzmann M, Aupperle H, Schoon HA, Heinritzi K, Wittenbrink MM: **First identification and functional characterization of an immunogenic protein in unculturable haemotrophic *Mycoplasmas* (*Mycoplasma suis* HspA1).** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007, **49**(2):215-223.
127. Schreiner SA, Sokoli A, Felder KM, Wittenbrink MM, Schwarzenbach S, Guhl B, Hoelzle K, Hoelzle LE: **The surface-localised alpha-enolase of *Mycoplasma suis* is an adhesion protein.** *Vet Microbiol* 2012, **156**(1-2):88-95.
128. Bao S, Guo X, Yu S, Ding J, Tan L, Zhang F, Sun Y, Qiu X, Chen G, Ding C: ***Mycoplasma synoviae* enolase is a plasminogen/fibronectin binding protein.** *BMC Vet Res* 2014, **10**:223.
129. Yavlovich A, Rechnitzer H, Rottem S: **Alpha-enolase resides on the cell surface of *Mycoplasma fermentans* and binds plasminogen.** *Infect Immun* 2007, **75**(12):5716-5719.
130. Alvarez RA, Blaylock MW, Baseman JB: **Surface localized glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Mycoplasma genitalium* binds mucin.** *Mol Microbiol* 2003, **48**(5):1417-1425.
131. Bao S, Chen D, Yu S, Chen H, Tan L, Hu M, Qiu X, Song C, Ding C: **Characterization of triosephosphate isomerase from *Mycoplasma gallisepticum*.** *FEMS Microbiol Lett* 2015, **362**(17):fnv140.
132. Thomas C, Jacobs E, Dumke R: **Characterization of pyruvate dehydrogenase subunit B and enolase as plasminogen-binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*.** *Microbiology* 2013, **159**(Pt 2):352-365.
133. Regula JT, Boguth G, Gorg A, Hegermann J, Mayer F, Frank R, Herrmann R: **Defining the mycoplasma 'cytoskeleton': the protein composition of the Triton X-100 insoluble fraction of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* determined by 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry.** *Microbiology* 2001, **147**(Pt 4):1045-1057.
134. Chen H, Yu S, Shen X, Chen D, Qiu X, Song C, Ding C: **The *Mycoplasma gallisepticum* alpha-enolase is cell surface-exposed and mediates adherence by binding to chicken plasminogen.** *Microb Pathog* 2011, **51**(4):285-290.
135. Mudahi-Orenstein S, Levisohn S, Geary SJ, Yogev D: **Cytadherence-deficient mutants of *Mycoplasma gallisepticum* generated by transposon mutagenesis.** *Infect Immun* 2003, **71**(7):3812-3820.
136. He S, Qi J, Yu S, Yin Y, Tan L, Bao S, Qiu X, Wang X, Fei R, Ding C: **Expression and immunological characteristics of the surface-localized pyruvate kinase in *Mycoplasma gallisepticum*.** *Microb Pathog* 2015, **89**:161-168.
137. Finlay BB, Cossart P: **Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens.** *Science* 1997, **276**(5313):718-725.
138. Raymond BB, Djordjevic S: **Exploitation of plasmin(ogen) by bacterial pathogens of veterinary significance.** *Vet Microbiol* 2015, **178**(1-2):1-13.
139. Chagnot C, Lustrat A, Astruc T, Desvaux M: **Bacterial adhesion to animal tissues: protein determinants for recognition of extracellular matrix components.** *Cell Microbiol* 2012, **14**(11):1687-1696.
140. Giebel J: **Extrazelluläre Matrix und Bedeutung der Grundregulation.** In.; 2006.
141. Hynes RO: **The extracellular matrix: not just pretty fibrils.** *Science* 2009, **326**(5957):1216-1219.
142. Ayad S, Boot-Handford R, Humphries M, Kadler K, Shuttleworth A: **The Extracellular Matrix Factsbook**, 2 edn: Academic Press; 1998.
143. Rivera J, Vannakambadi G, Hook M, Speziale P: **Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria.** *Thromb Haemost* 2007, **98**(3):503-511.
144. Piroth L, Que YA, Widmer E, Panchaud A, Piu S, Entenza JM, Moreillon P: **The fibrinogen- and fibronectin-binding domains of *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding protein A synergistically promote endothelial invasion and experimental endocarditis.** *Infect Immun* 2008, **76**(8):3824-3831.
145. Henderson B, Nair S, Pallas J, Williams MA: **Fibronectin: a multidomain host adhesin targeted by bacterial fibronectin-binding proteins.** *FEMS Microbiol Rev* 2011, **35**(1):147-200.

146. Mu R, Kim BJ, Paco C, Del RY, Courtney HS, Doran KS: **Identification of a group B streptococcal fibronectin binding protein, SfbA, that contributes to invasion of brain endothelium and development of meningitis.** *Infect Immun* 2014, **82**(6):2276-2286.
147. Froman G, Switalski LM, Faris A, Wadstrom T, Hook M: **Binding of Escherichia coli to fibronectin. A mechanism of tissue adherence.** *J Biol Chem* 1984, **259**(23):14899-14905.
148. Vercellotti GM, McCarthy JB, Lindholm P, Peterson PK, Jacob HS, Furcht LT: **Extracellular matrix proteins (fibronectin, laminin, and type IV collagen) bind and aggregate bacteria.** *Am J Pathol* 1985, **120**(1):13-21.
149. Crago AM, Koronakis V: **Binding of extracellular matrix laminin to Escherichia coli expressing the Salmonella outer membrane proteins Rck and PagC.** *FEMS Microbiol Lett* 1999, **176**(2):495-501.
150. Linke C, Caradoc-Davies TT, Young PG, Proft T, Baker EN: **The laminin-binding protein Lbp from Streptococcus pyogenes is a zinc receptor.** *J Bacteriol* 2009, **191**(18):5814-5823.
151. Singh B, Blom AM, Unal C, Nilson B, Morgelin M, Riesbeck K: **Vitronectin binds to the head region of Moraxella catarrhalis ubiquitous surface protein A2 and confers complement-inhibitory activity.** *Mol Microbiol* 2010, **75**(6):1426-1444.
152. Singh B, Su YC, Riesbeck K: **Vitronectin in bacterial pathogenesis: a host protein used in complement escape and cellular invasion.** *Mol Microbiol* 2010, **78**(3):545-560.
153. Kohler S, Hallstrom T, Singh B, Riesbeck K, Sparta G, Zipfel PF, Hammerschmidt S: **Binding of vitronectin and Factor H to Hic contributes to immune evasion of Streptococcus pneumoniae serotype 3.** *Thromb Haemost* 2015, **113**(1):125-142.
154. Hallström T, Blom AM, Zipfel PF, Riesbeck K: **Nontypeable Haemophilus influenzae protein E binds vitronectin and is important for serum resistance.** *J Immunol* 2009, **183**(4):2593-2601.
155. Carneiro CR, Postol E, Nomizo R, Reis LF, Brentani RR: **Identification of enolase as a laminin-binding protein on the surface of Staphylococcus aureus.** *Microbes Infect* 2004, **6**(6):604-608.
156. Sjostrom I, Grondahl H, Falk G, Kronvall G, Ullberg M: **Purification and characterisation of a plasminogen-binding protein from Haemophilus influenzae. Sequence determination reveals identity with aspartase.** *Biochim Biophys Acta* 1997, **1324**(2):182-190.
157. Amblee V, Jeffery CJ: **Physical Features of Intracellular Proteins that Moonlight on the Cell Surface.** *PLoS One* 2015, **10**(6):e0130575.
158. Singh B, Fleury C, Jalalvand F, Riesbeck K: **Human pathogens utilize host extracellular matrix proteins laminin and collagen for adhesion and invasion of the host.** *FEMS Microbiol Rev* 2012, **36**(6):1122-1180.
159. Caswell CC, Oliver-Kozup H, Han R, Lukomska E, Lukomski S: **Sc11, the multifunctional adhesin of group A Streptococcus, selectively binds cellular fibronectin and laminin, and mediates pathogen internalization by human cells.** *FEMS Microbiol Lett* 2010, **303**(1):61-68.
160. Smith J, Ockleford CD: **Laser scanning confocal examination and comparison of nidogen (entactin) with laminin in term human amniochorion.** *Placenta* 1994, **15**(1):95-106.
161. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR: **Laminin--a glycoprotein from basement membranes.** *J Biol Chem* 1979, **254**(19):9933-9937.
162. Morgenthau A, Pogoutse A, Adamiak P, Moraes TF, Schryvers AB: **Bacterial receptors for host transferrin and lactoferrin: molecular mechanisms and role in host-microbe interactions.** *Future Microbiol* 2013, **8**(12):1575-1585.
163. Halper J, Kjaer M: **Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins.** *Adv Exp Med Biol* 2014, **802**:31-47.
164. Castaldo C, Vastano V, Siciliano RA, Candela M, Vici M, Muscariello L, Marasco R, Sacco M: **Surface displaced alfa-enolase of Lactobacillus plantarum is a fibronectin binding protein.** *Microb Cell Fact* 2009, **8**:14.
165. Patti JM, Hook M: **Microbial adhesins recognizing extracellular matrix macromolecules.** *Curr Opin Cell Biol* 1994, **6**(5):752-758.
166. Buscetta M, Papisergi S, Firon A, Pietrocola G, Biondo C, Mancuso G, Midiri A, Romeo L, Teti G, Speziale P *et al*: **FbsC, a novel fibrinogen-binding protein, promotes Streptococcus agalactiae-host cell interactions.** *J Biol Chem* 2014, **289**(30):21003-21015.
167. Balish MF: **Mycoplasma pneumoniae, an underutilized model for bacterial cell biology.** *J Bacteriol* 2014, **196**(21):3675-3682.
168. Ikeda M, Enomoto N, Hashimoto D, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Suda T, Nagata T: **Nontypeable Haemophilus influenzae exploits the interaction between protein-E and vitronectin for the adherence and invasion to bronchial epithelial cells.** *BMC Microbiol* 2015, **15**:263.
169. Leroy-Dudal J, Gagniere H, Cossard E, Carreiras F, Di MP: **Role of alphavbeta5 integrins and vitronectin in Pseudomonas aeruginosa PAK interaction with A549 respiratory cells.** *Microbes Infect* 2004, **6**(10):875-881.
170. Mickelsen PA, Blackman E, Sparling PF: **Ability of Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, and commensal Neisseria species to obtain iron from lactoferrin.** *Infect Immun* 1982, **35**(3):915-920.
171. Xolalpa W, Vallecillo AJ, Lara M, Mendoza-Hernandez G, Comini M, Spallek R, Singh M, Espitia C: **Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen Mycobacterium tuberculosis.** *Proteomics* 2007, **7**(18):3332-3341.
172. Sanderson-Smith ML, De Oliveira DM, Ranson M, McArthur JD: **Bacterial plasminogen receptors: mediators of a multifaceted relationship.** *J Biomed Biotechnol* 2012, **2012**:272148.
173. Bergmann S, Hammerschmidt S: **Fibrinolysis and host response in bacterial infections.** *Thromb Haemost* 2007, **98**(3):512-520.
174. Cesarman-Maus G, Hajjar KA: **Molecular mechanisms of fibrinolysis.** *Br J Haematol* 2005, **129**(3):307-321.

175. Koenigs A, Hammerschmidt C, Jutras BL, Pogoryelov D, Barthel D, Skerka C, Kugelstadt D, Wallich R, Stevenson B, Zipfel PF *et al*: **BBA70 of *Borrelia burgdorferi* is a novel plasminogen-binding protein.** *J Biol Chem* 2013, **288**(35):25229-25243.
176. Parry MA, Zhang XC, Bode I: **Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues.** *Trends Biochem Sci* 2000, **25**(2):53-59.
177. Gils A: **Plasminogen Activators Inhibitors.** In: *Plasminogen: Structure, Activation, and Regulation.* 1 edn. Edited by Waisman DM: Springer US; 2003.
178. Mimuro J: **Type 1 plasminogen activator inhibitor: its role in biological reactions.** *Rinsho Ketsueki* 1991, **32**(5):487-489.
179. Yavlovich A, Higazi AA, Rottem S: **Plasminogen binding and activation by *Mycoplasma fermentans*.** *Infect Immun* 2001, **69**(4):1977-1982.
180. Seymour LM, Deutscher AT, Jenkins C, Kuit TA, Falconer L, Minion FC, Crossett B, Padula M, Dixon NE, Djordjevic SP *et al*: **A processed multidomain mycoplasma hyopneumoniae adhesin binds fibronectin, plasminogen, and swine respiratory cilia.** *J Biol Chem* 2010, **285**(44):33971-33978.
181. Magalhaes V, Veiga-Malta I, Almeida MR, Baptista M, Ribeiro A, Trieu-Cuot P, Ferreira P: **Interaction with human plasminogen system turns on proteolytic activity in *Streptococcus agalactiae* and enhances its virulence in a mouse model.** *Microbes Infect* 2007, **9**(11):1276-1284.
182. Hames C, Halbedel S, Schilling O, Stulke J: **Multiple-mutation reaction: a method for simultaneous introduction of multiple mutations into the glpK gene of *Mycoplasma pneumoniae*.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**(7):4097-4100.
183. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: **DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977, **74**(12):5463-5467.
184. Schurwanz N, Jacobs E, Dumke R: **Strategy to create chimeric proteins derived from functional adhesin regions of *Mycoplasma pneumoniae* for vaccine development.** *Infect Immun* 2009, **77**(11):5007-5015.
185. Kuhner S, van N, V, Betts MJ, Leo-Macias A, Batisse C, Rode M, Yamada T, Maier T, Bader S, Beltran-Alvarez P *et al*: **Proteome organization in a genome-reduced bacterium.** *Science* 2009, **326**(5957):1235-1240.
186. Baseman JB, Reddy SP, Dallo SF: **Interplay between mycoplasma surface proteins, airway cells, and the protean manifestations of mycoplasma-mediated human infections.** *Am J Respir Crit Care Med* 1996, **154**(4 Pt 2):S137-S144.
187. Spuesens EB, Fraaij PL, Visser EG, Hoogenboezem T, Hop WC, van Adrichem LN, Weber F, Moll HA, Broekman B, Berger MY *et al*: **Carriage of *Mycoplasma pneumoniae* in the upper respiratory tract of symptomatic and asymptomatic children: an observational study.** *PLoS Med* 2013, **10**(5):e1001444.
188. Brinks V, Jiskoot W, Schellekens H: **Immunogenicity of therapeutic proteins: the use of animal models.** *Pharm Res* 2011, **28**(10):2379-2385.
189. Banga AK: **Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems,** 3 edn: CRC Press; 2015.
190. Friedrich K: **Charakterisierung der Proteine des pdh-Clusters in *Mycoplasma pneumoniae*.** Masterarbeit TU Dresden. 2013.
191. Goh MS, Gorton TS, Forsyth MH, Troy KE, Geary SJ: **Molecular and biochemical analysis of a 105 kDa *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin (GapA).** *Microbiology* 1998, **144** ( Pt 11):2971-2978.
192. Papazisi L, Troy KE, Gorton TS, Liao X, Geary SJ: **Analysis of cytoadherence-deficient, GapA-negative *Mycoplasma gallisepticum* strain R.** *Infect Immun* 2000, **68**(12):6643-6649.
193. Wu Z, Zhang W, Lu C: **Immunoproteomic assay of surface proteins of *Streptococcus suis* serotype 9.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008, **53**(1):52-59.
194. Katakura Y, Sano R, Hashimoto T, Ninomiya K, Shioya S: **Lactic acid bacteria display on the cell surface cytosolic proteins that recognize yeast mannan.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **86**(1):319-326.
195. Blom AM, Bergmann S, Fulde M, Riesbeck K, Agarwal V: ***Streptococcus pneumoniae* phosphoglycerate kinase is a novel complement inhibitor affecting the membrane attack complex formation.** *J Biol Chem* 2014, **289**(47):32499-32511.
196. Lopez CM, Wallich R, Riesbeck K, Skerka C, Zipfel PF: ***Candida albicans* uses the surface protein Gpm1 to attach to human endothelial cells and to keratinocytes via the adhesive protein vitronectin.** *PLoS One* 2014, **9**(3):e90796.
197. Zhang H, Zheng J, Yi L, Li Y, Ma Z, Fan H, Lu C: **The identification of six novel proteins with fibronectin or collagen type I binding activity from *Streptococcus suis* serotype 2.** *J Microbiol* 2014, **52**(11):963-969.
198. Sun Z, Fu P, Wei K, Zhang H, Zhang Y, Xu J, Jiang F, Liu X, Xu W, Wu W: **Identification of novel immunogenic proteins from *Mycoplasma bovis* and establishment of an indirect ELISA based on recombinant E1 beta subunit of the pyruvate dehydrogenase complex.** *PLoS One* 2014, **9**(2):e88328.
199. Corona L, Cillara G, Tola S: **Proteomic approach for identification of immunogenic proteins of *Mycoplasma mycoides* subsp. capri.** *Vet Microbiol* 2013, **167**(3-4):434-439.
200. Li Q, Liu H, Du D, Yu Y, Ma C, Jiao F, Yao H, Lu C, Zhang W: **Identification of Novel Laminin- and Fibronectin-binding Proteins by Far-Western Blot: Capturing the Adhesins of *Streptococcus suis* Type 2.** *Front Cell Infect Microbiol* 2015, **5**:82.
201. Djordjevic SP, Cordwell SJ, Djordjevic MA, Wilton J, Minion FC: **Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin.** *Infect Immun* 2004, **72**(5):2791-2802.
202. Chumchua V, Pornputtpong N, Thammarongtham C, Meksuriyen D: **Homology modeling of *Mycoplasma pneumoniae* enolase and its molecular interaction with human plasminogen.** *Bioinformatics* 2008, **3**(1):18-23.
203. Beynon RJ, Hammond D, Harman V, Woolerton Y: **The role of proteomics in studies of protein moonlighting.** *Biochem Soc Trans* 2014, **42**(6):1698-1703.

204. Gotz F, Yu W, Dube L, Prax M, Ebner P: **Excretion of cytosolic proteins (ECP) in bacteria.** *Int J Med Microbiol* 2015, **305**(2):230-237.
205. Nogueira ES, Schleier T, Durrenberger M, Ballmer-Hofer K, Ward TR, Jaussi R: **High-level secretion of recombinant full-length streptavidin in *Pichia pastoris* and its application to enantioselective catalysis.** *Protein Expr Purif* 2014, **93**:54-62.
206. Krogh A, Larsson B, von HG, Sonnhammer EL: **Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes.** *J Mol Biol* 2001, **305**(3):567-580.
207. Glenting J, Beck HC, Vrang A, Riemann H, Ravn P, Hansen AM, Antonsson M, Ahrne S, Israelsen H, Madsen S: **Anchorless surface associated glycolytic enzymes from *Lactobacillus plantarum* 299v bind to epithelial cells and extracellular matrix proteins.** *Microbiol Res* 2013, **168**(5):245-253.
208. Hegermann J, Halbedel S, Dumke R, Regula J, Gabdoulline RR, Mayer F, Stulke J, Herrmann R: **The acidic, glutamine-rich Mpn474 protein of *Mycoplasma pneumoniae* is surface exposed and covers the complete cell.** *Microbiology* 2008, **154**(Pt 4):1185-1192.
209. Franzoso G, Hu PC, Meloni GA, Barile MF: **The immunodominant 90-kilodalton protein is localized on the terminal tip structure of *Mycoplasma pneumoniae*.** *Infect Immun* 1993, **61**(4):1523-1530.
210. Dallo SF, Chavoya A, Baseman JB: **Characterization of the gene for a 30-kilodalton adhesion-related protein of *Mycoplasma pneumoniae*.** *Infect Immun* 1990, **58**(12):4163-4165.
211. Catrein I, Dumke R, Weiner J, III, Jacobs E, Herrmann R: **Cross-complementation between the products of the genes P1 and ORF6 of *Mycoplasma pneumoniae* subtypes 1 and 2.** *Microbiology* 2004, **150**(Pt 12):3989-4000.
212. Hausner M, Schamberger A, Naumann W, Jacobs E, Dumke R: **Development of protective anti-*Mycoplasma pneumoniae* antibodies after immunization of guinea pigs with the combination of a P1-P30 chimeric recombinant protein and chitosan.** *Microb Pathog* 2013, **64**:23-32.
213. Krause DC, Chen YY: **Interaction of *Mycoplasma pneumoniae* with HeLa cells.** *Infect Immun* 1988, **56**(8):2054-2059.
214. Hakansson A, Roche H, Mirza S, McDaniel LS, Brooks-Walter A, Briles DE: **Characterization of binding of human lactoferrin to pneumococcal surface protein A.** *Infect Immun* 2001, **69**(5):3372-3381.
215. Balasubramanian S, Kannan TR, Baseman JB: **The surface-exposed carboxyl region of *Mycoplasma pneumoniae* elongation factor Tu interacts with fibronectin.** *Infect Immun* 2008, **76**(7):3116-3123.
216. Pfeiffer M: **Bindungspartner und Stoffwechselaktivität Oberflächen-lokalisierter glykolytischer Enzyme von *Mycoplasma pneumoniae* unter besonderer Berücksichtigung der Pyruvatdehydrogenase.** Masterarbeit TU Dresden. 2014.
217. Meilof JF, Bantjes I, De JJ, Van Dam AP, Smeenk RJ: **The detection of anti-Ro/SS-A and anti-La/SS-B antibodies. A comparison of counterimmunoelectrophoresis with immunoblot, ELISA, and RNA-precipitation assays.** *J Immunol Methods* 1990, **133**(2):215-226.
218. Yavlovich A, Rottem S: **Binding of host extracellular matrix proteins to *Mycoplasma fermentans* and its effect on adherence to, and invasion of HeLa cells.** *FEMS Microbiol Lett* 2007, **266**(2):158-162.
219. Fürnkranz U, Siebert-Gulle K, Rosengarten R, Szostak MP: **Factors influencing the cell adhesion and invasion capacity of *Mycoplasma gallisepticum*.** *Acta Vet Scand* 2013, **55**:63.
220. Ferreira E, Gimenez R, Canas MA, Aguilera L, Aguilar J, Badia J, Baldoma L: **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for efficient repair of cytotoxic DNA lesions in *Escherichia coli*.** *Int J Biochem Cell Biol* 2015, **60**:202-212.
221. Aguilera L, Gimenez R, Badia J, Aguilar J, Baldoma L: **NAD<sup>+</sup>-dependent post-translational modification of *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.** *Int Microbiol* 2009, **12**(3):187-192.
222. Vastano V, Salzillo M, Siciliano RA, Muscariello L, Sacco M, Marasco R: **The E1 beta-subunit of pyruvate dehydrogenase is surface-expressed in *Lactobacillus plantarum* and binds fibronectin.** *Microbiol Res* 2014, **169**(2-3):121-127.
223. Kesimer M, Kilic N, Mehrotra R, Thornton DJ, Sheehan JK: **Identification of salivary mucin MUC7 binding proteins from *Streptococcus gordonii*.** *BMC Microbiol* 2009, **9**:163.
224. Tan XM, Hu HF, Chen SQ: **[Preparation of rabbit monoclonal antibody against cGMP and development of competitive ELISA for cGMP].** *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2015, **44**(4):423-428.
225. Hofmeister F: **Zur Lehre von der Wirkung der Salze.** *Arch Exp Pathol Pharmacol* 1888, **24**:247-260.
226. Barthel D, Singh B, Riesbeck K, Zipfel PF: **Haemophilus influenzae uses the surface protein E to acquire human plasminogen and to evade innate immunity.** *J Immunol* 2012, **188**(1):379-385.
227. Brissette CA, Haupt K, Barthel D, Cooley AE, Bowman A, Skerka C, Wallich R, Zipfel PF, Kraiczy P, Stevenson B: **Borrelia burgdorferi infection-associated surface proteins ErpP, ErpA, and ErpC bind human plasminogen.** *Infect Immun* 2009, **77**(1):300-306.
228. Wade D, Palma M, Lofving-Arholm I, Sallberg M, Silberring J, Flock JI: **Identification of functional domains in Efb, a fibrinogen binding protein of *Staphylococcus aureus*.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998, **248**(3):690-695.
229. Villa A, Zecca L, Fusi P, Colombo S, Tedeschi G, Tortora P: **Structural features responsible for kinetic thermal stability of a carboxypeptidase from the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*.** *Biochem J* 1993, **295** (3):827-831.
230. Marti D, Schaller J, Ochensberger B, Rickli EE: **Expression, purification and characterization of the recombinant kringle 2 and kringle 3 domains of human plasminogen and analysis of their binding affinity for omega-aminocarboxylic acids.** *Eur J Biochem* 1994, **219**(1-2):455-462.
231. Graefe KH, Lutz W, Bönisch H: **Duale Reihe. Pharmakologie und Toxikologie**, 1 edn: Thieme; 2011.
232. Aktories K, Förstermann U, Forth W: **Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie**, 9 edn: Elsevier, Urban & Fischer; 2016.

233. Sjöholm I: **Studies on the conformational changes of plasminogen induced during activation to plasmin and by 6-aminohexanoic acid.** *Eur J Biochem* 1973, **39**(2):471-479.
234. Ofek I, Sharon N, Abraham SN: **Bacterial Adhesion.** In: *The Prokaryotes Ecophysiology and Biochemistry.* 3 edn. Edited by Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E: Springer New York; 2006.
235. Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VKH, M.: **Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus.** *Nature Reviews Microbiology* 2014, **12**:49-62.
236. Keane FM, Loughman A, Valtulina V, Brennan M, Speziale P, Foster TJ: **Fibrinogen and elastin bind to the same region within the A domain of fibronectin binding protein A, an MSCRAMM of Staphylococcus aureus.** *Mol Microbiol* 2007, **63**(3):711-723.
237. Ringner M, Valkonen KH, Wadstrom T: **Binding of vitronectin and plasminogen to Helicobacter pylori.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994, **9**(1):29-34.
238. Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M: **MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues.** *Annu Rev Microbiol* 1994, **48**:585-617.
239. Emody L, Heesemann J, Wolf-Watz H, Skurnik M, Kapperud G, O'Toole P, Wadstrom T: **Binding to collagen by Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis: evidence for yopA-mediated and chromosomally encoded mechanisms.** *J Bacteriol* 1989, **171**(12):6674-6679.
240. Terti R, Skurnik M, Vartio T, Kuusela P: **Adhesion protein YadA of Yersinia species mediates binding of bacteria to fibronectin.** *Infect Immun* 1992, **60**(7):3021-3024.
241. Walsh EJ, Miajlovic H, Gorkun OV, Foster TJ: **Identification of the Staphylococcus aureus MSCRAMM clumping factor B (ClfB) binding site in the alphaC-domain of human fibrinogen.** *Microbiology* 2008, **154**(Pt 2):550-558.
242. Bernard CS, Giraud C, Spagnolo J, de Bentzmann S: **Biofilms: The Secret Story of Microbial Communities.** In: *Bacterial Pathogenesis: Molecular and Cellular Mechanisms.* 1 edn. Edited by Loch C, Simonet M: Caister Academic Press; 2012.
243. Hopfe M, Henrich B: **Multifunctional Cytoadherence Factors.** In: *Mollicutes: Molecular Biology and Pathogenesis.* edn. Edited by Browning GF, Citti C. Norfolk: Caister Academic Press; 2014: 107-130.
244. Deutscher AT, Tacchi JL, Minion FC, Padula MP, Crossett B, Bogema DR, Jenkins C, Kuit TA, Walker MJ, Djordjevic SP: **Mycoplasma hyopneumoniae Surface proteins Mhp385 and Mhp384 bind host cilia and glycosaminoglycans and are endoproteolytically processed by proteases that recognize different cleavage motifs.** *J Proteome Res* 2012, **11**(3):1924-1936.
245. Bogema DR, Scott NE, Padula MP, Tacchi JL, Raymond BB, Jenkins C, Cordwell SJ, Minion FC, Walker MJ, Djordjevic SP: **Sequence TTKF downward arrow QE defines the site of proteolytic cleavage in Mhp683 protein, a novel glycosaminoglycan and cilium adhesin of Mycoplasma hyopneumoniae.** *J Biol Chem* 2011, **286**(48):41217-41229.
246. Seymour LM, Falconer L, Deutscher AT, Minion FC, Padula MP, Dixon NE, Djordjevic SP, Walker MJ: **Mhp107 is a member of the multifunctional adhesin family of Mycoplasma hyopneumoniae.** *J Biol Chem* 2011, **286**(12):10097-10104.
247. Jenkins C, Geary SJ, Gladd M, Djordjevic SP: **The Mycoplasma gallisepticum OsmC-like protein MG1142 resides on the cell surface and binds heparin.** *Microbiology* 2007, **153**(Pt 5):1455-1463.
248. Zimmermann L, Peterhans E, Frey J: **RGD motif of lipoprotein T, involved in adhesion of Mycoplasma conjunctivae to lamb synovial tissue cells.** *J Bacteriol* 2010, **192**(14):3773-3779.
249. Yavlovich A, Tarshis M, Rottem S: **Internalization and intracellular survival of Mycoplasma pneumoniae by non-phagocytic cells.** *FEMS Microbiol Lett* 2004, **233**(2):241-246.
250. Gong M, Meng L, Jiang B, Zhang J, Yang H, Wu J, Shou C: **p37 from Mycoplasma hyorhinis promotes cancer cell invasiveness and metastasis through activation of MMP-2 and followed by phosphorylation of EGFR.** *Mol Cancer Ther* 2008, **7**(3):530-537.
251. Fernandes LG, Vieira ML, Kirchgatter K, Alves IJ, de Moraes ZM, Vasconcelos SA, Romero EC, Nascimento AL: **OmpL1 is an extracellular matrix- and plasminogen-interacting protein of Leptospira spp.** *Infect Immun* 2012, **80**(10):3679-3692.
252. Hervio L, Brunner C, Sorell L, Kang C, Muller H, ngles-Cano E: **Effect of plasminogen activators on human recombinant apolipoprotein(a) having the plasminogen activation cleavage site.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1434**(1):124-134.
253. Okada K, Ueshima S, Matsuno H, Nagai N, Kawao N, Tanaka M, Matsuo O: **A synthetic peptide derived from staphylokinase enhances plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator.** *J Thromb Haemost* 2011, **9**(5):997-1006.
254. Hurmalainen V, Edelman S, Antikainen J, Baumann M, Lahteenmaki K, Korhonen TK: **Extracellular proteins of Lactobacillus crispatus enhance activation of human plasminogen.** *Microbiology* 2007, **153**(Pt 4):1112-1122.
255. Shenkman B, Livnat T, Budnik I, Tamarin I, Einav Y, Martinowitz U: **Plasma tissue-type plasminogen activator increases fibrinolytic activity of exogenous urokinase-type plasminogen activator.** *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012, **23**(8):729-733.
256. Deryugina EI, Quigley JP: **Cell surface remodeling by plasmin: a new function for an old enzyme.** *J Biomed Biotechnol* 2012, **2012**:564259.
257. Degen JL, Bugge TH, Goguen JD: **Fibrin and fibrinolysis in infection and host defense.** *J Thromb Haemost* 2007, **5 Suppl 1**:24-31.
258. Wolff DG, Castiblanco-Valencia MM, Abe CM, Monaris D, Moraes ZM, Souza GO, Vasconcelos SA, Isaac L, Abreu PA, Barbosa AS: **Interaction of Leptospira elongation factor Tu with plasminogen and complement factor H: a metabolic leptospiral protein with moonlighting activities.** *PLoS One* 2013, **8**(11):e81818.

259. Coleman JL, Benach JL: **Use of the plasminogen activation system by microorganisms.** *J Lab Clin Med* 1999, **134**(6):567-576.
260. Castellino FJ, Ploplis VA: **Structure and function of the plasminogen/plasmin system.** *Thromb Haemost* 2005, **93**(4):647-654.
261. Zimble DL, Eddy JL, Schroeder JA, Lathem WW: **Inactivation of Peroxiredoxin 6 by the Pla Protease of Yersinia pestis.** *Infect Immun* 2016, **84**(1):365-374.
262. Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD: **A surface protease and the invasive character of plague.** *Science* 1992, **258**(5084):1004-1007.
263. Sebbane F, Jarrett CO, Gardner D, Long D, Hinnebusch BJ: **Role of the Yersinia pestis plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**(14):5526-5530.
264. Lähteenmäki K, Kuusela P, Korhonen TK: **Bacterial plasminogen activators and receptors.** *FEMS Microbiol Rev* 2001, **25**(5):531-552.
265. Gebbia JA, Monco JC, Degen JL, Bugge TH, Benach JL: **The plasminogen activation system enhances brain and heart invasion in murine relapsing fever borreliosis.** *J Clin Invest* 1999, **103**(1):81-87.
266. Virkola R, Lahteenmaki K, Eberhard T, Kuusela P, van AL, Ullberg M, Korhonen TK: **Interaction of Haemophilus influenzae with the mammalian extracellular matrix.** *J Infect Dis* 1996, **173**(5):1137-1147.
267. Gechtman Z, Belleli A, Lechpammer S, Shaltiel S: **The cluster of basic amino acids in vitronectin contributes to its binding of plasminogen activator inhibitor-1: evidence from thrombin-, elastase- and plasmin-cleaved vitronectins and anti-peptide antibodies.** *Biochem J* 1997, **325** ( Pt 2):339-349.
268. Reed III GL: **Thrombolysis.** In: *Principles of Molecular Cardiology.* edn. Edited by Runge MS, Patterson C: Humana Press; 2005.
269. Preissner KT: **Specific binding of plasminogen to vitronectin. Evidence for a modulatory role of vitronectin on fibrin(ogen)-induced plasmin formation by tissue plasminogen activator.** *Biochem Biophys Res Commun* 1990, **168**(3):966-971.
270. Lahteenmaki K, Virkola R, Pouttu R, Kuusela P, Kukkonen M, Korhonen TK: **Bacterial plasminogen receptors: in vitro evidence for a role in degradation of the mammalian extracellular matrix.** *Infect Immun* 1995, **63**(9):3659-3664.
271. Lahteenmaki K, Virkola R, Saren A, Emody L, Korhonen TK: **Expression of plasminogen activator pla of Yersinia pestis enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix.** *Infect Immun* 1998, **66**(12):5755-5762.
272. Vieira ML, Atzingen MV, Oliveira R, Mendes RS, Domingos RF, Vasconcellos SA, Nascimento AL: **Plasminogen binding proteins and plasmin generation on the surface of Leptospira spp.: the contribution to the bacteria-host interactions.** *J Biomed Biotechnol* 2012, **2012**:758513.
273. Quigley JP, Gold LI, Schwimmer R, Sullivan LM: **Limited cleavage of cellular fibronectin by plasminogen activator purified from transformed cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**(9):2776-2780.
274. Dandekar T, Huynen M, Regula JT, Ueberle B, Zimmermann CU, Andrade MA, Doerks T, Sanchez-Pulido L, Snel B, Suyama M *et al*: **Re-annotating the Mycoplasma pneumoniae genome sequence: adding value, function and reading frames.** *Nucleic Acids Res* 2000, **28**(17):3278-3288.
275. Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, Dao P, Sahinalp SC, Ester M, Foster LJ *et al*: **PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes.** *Bioinformatics* 2010, **26**(13):1608-1615.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
°C	Grad Celsius
AckA	Acetatkinase
ad	aufgefüllt auf
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
d. h.	das heißt
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECM-Protein	extrazelluläres Matrixprotein
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbant assay
Eno	Enolase
et al.	et alii (lat.: und andere)
Fba	Aldolase
Fn	Fibrinogen
Fc	Fibronectin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
FruK	1-Phosphofruktokinase
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
G	Guanin
GapA	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
His	Histidin
HPLC	high performance liquid chromatography
i.n.	intranasal
IgG	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
KbE	Kolonie bildende Einheiten

## Abkürzungsverzeichnis

---

kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Ldh	Lactatdehydrogenase
Ln	Laminin
Lf	Laktoferrin
M	Molar
M. p.	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
mA	Milliampere
ManB	Phosphomannomutase
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMR	Multiple-Mutation-Reaction
mRNA	messenger RNA
MTZ	Medizinisch Theoretisches Zentrum
MWCO	Molecular weight cutt off
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pdh	Pyruvatdehydrogenase
PFA	Paraformaldehyd
Pfk	Phosphofruktokinase A
pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Pgi	Glucose-6-phosphat-Isomerase
Pgk	Phosphoglyceratkinase
Pgm	Phosphoglyceratmutase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonen-Aktivität
PIS	Präimmunserum
Plg	Plasminogen
PPLO	Pleuropneumonia-like organismus
Pta	Phosphotransacetylase
Pyk	Pyruvatkinase
RNA	Ribonucleic acid
rpm	revolutions oer minute
RT	Raumtemperatur bzw. reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR
s	Sekunde

## Abkürzungsverzeichnis

---

s.c.	subkutan
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
ssDNA	single stranded
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered Saline
Tkt	Transketolase
TM	Transmembran
tPA	Gewebespezifischer Plasminogenaktivator
TpiA	Triosephosphatisomerase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Isothiocyanat
TU Dresden	Technische Universität Dresden
TX	Triton X
U	Unit
u. a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
UV	ultraviolett
V	Volt
Vc	Vitronectin
x	-fach,-mal
z. B.	zum Beispiel
ZMBH	Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg
μ	Mikro-

## 9 Register Bacteria

<b>A</b>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i>
<b>B</b>	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>B. anthracis</i>
	<i>Bifidobacterium animals</i> subspecies <i>lactis</i>	<i>B. animals</i> subspecies <i>lactis</i>
	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>B. longum</i>
	<i>Borrelia burgdorferi</i>	<i>B. burgdorferi</i>
	<i>Borrelia hermsii</i>	<i>B. hermsii</i>
<b>C</b>	<i>Candida albicans</i>	<i>C. albicans</i>
	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>C. parapsilosis</i>
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>C. trachomatis</i>
<b>E</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
	<i>Escherichia cloni</i>	<i>E. cloni</i>
<b>H</b>	<i>Hämophilus influenzae</i>	<i>H. influenzae</i>
	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>H. pylori</i>
<b>L</b>	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>L. crispatus</i>
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>L. johnsonii</i>
	<i>Lactobacillus lactis</i>	<i>L. lactis</i>
	<i>Leishmania mexicana</i>	<i>L. mexicana</i>
	<i>Leptospira interrogans</i>	<i>L. interrogans</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>
<b>M</b>	<i>Mycoplasma conjunctivae</i>	<i>M. conjunctivae</i>
	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	<i>M. gallisepticum</i>
	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	<i>M. hyorhinis</i>
	<i>Mycoplasma penetrans</i>	<i>M. penetrans</i>
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>M. pneumoniae</i>
	<i>Mycoplasma suis</i>	<i>M. suis</i>
	<i>Mycoplasma synoviae</i>	<i>M. synoviae</i>
	<i>Mycoplasma fermentans</i>	<i>M. fermentans</i>
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	<i>M. genitalium</i>
	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	<i>M. hyopneumoniae</i>
	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>	<i>M. hyorhinis</i>
	<i>Mycoplasma mycoides</i>	<i>M. mycoides</i>
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>N. gonorrhoeae</i>
<b>N</b>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>N. meningitidis</i>
<b>O</b>	<i>Onchocerca volvulus</i>	<i>O. volvulus</i>
<b>P</b>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>P. brasiliensis</i>
	<i>Paracoccidoides</i> spp.	<i>P. spp.</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<b>S</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>
	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>S. aureus</i>
	<i>Streptococcus suis</i>	<i>S. suis</i>
	<i>Streptococcus agalctiae</i>	<i>S. agalctiae</i>
	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>S. oralis</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>S. pneumoniae</i>
	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>S. anginosus</i>
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>S. pyogenes</i>
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	<i>S. solfataricus</i>
<b>T</b>	<i>Trichomonas vaginalis</i>	<i>T. vaginalis</i>
<b>Y</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Y. pestis</i>

## 10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Morphologievariationen von <i>M. pneumoniae</i> .....	2
Abbildung 1-2 Virulenzfaktoren von <i>M. pneumoniae</i> ..	3
Abbildung 1-3 Die glykolytischen Enzyme von <i>M. pneumoniae</i> im zentralen Stoffwechselweg (modifiziert nach [70]).....	7
Abbildung 1-4 Schematische Darstellung von ECM-Komponenten. ....	10
Abbildung 1-5 Rolle von Plasmin in der Fibrinolyse, Remodellierung und Proteolyse durch direkte und indirekte Aktivierung verschiedener Kaskaden..	13
Abbildung 3-1 Darstellung PCR-Amplifikate der kodierenden Sequenzen. Standard .....	47
Abbildung 3-2 SDS-PAGE der aufgereinigten rekombinanten Proteine mit anschließender Coomassie-Färbung.....	48
Abbildung 3-4 Überprüfung der Reaktivität der Seren gegen die rekombinanten Proteine mit dem <i>M. pneumoniae</i> -Gesamtantigen im ELISA..	49
Abbildung 3-5 Lokalisation der glykolytischen Enzyme in den nach Ultrazentrifugation von <i>M. pneumoniae</i> M129 gewonnenen Fraktionen.....	51
Abbildung 3-6 Lokalisation der glykolytischen Enzyme in <i>M. pneumoniae</i> nach Fraktionierung durch Triton-X-100 und Ultrazentrifugation.....	52
Abbildung 3-7 Trypsinverdau des <i>M. pneumoniae</i> -Gesamtantigens. ....	53
Abbildung 3-8 Chymotrypsinverdau des <i>M. pneumoniae</i> -Gesamtantigens.....	54
Abbildung 3-9 Immundetektion ausgewählter Proteine auf <i>M. pneumoniae</i> M129-Kolonien.	55
Abbildung 3-10 Oberflächenlokalisierung ausgewählter glykolytischer Enzyme von <i>M. pneumoniae</i> M129 mittels Immunfluoreszenz.....	57
Abbildung 3-11 Immunoblotreaktion der Komplexbildung der Pdh-Untereinheiten auf der Oberfläche der Mykoplasmenzelle mit anschließender Co-Immunpräzipitation.....	58
Abbildung 3-12 ELISA-Reaktion der Membran- und Zytosolfraktion (Ultrazentrifugation) der <i>M. pneumoniae</i> Wild- und Mutanten-Stämme.....	60
Abbildung 3-13 Vorkommen spezifischer Antikörper gegen die oberflächenlokalisierten glykolytischen Enzyme im Serum intranasal infizierter Meerschweinchen. ....	63
Abbildung 3-14 Nachweis glykolytischer Enzyme im Überstand einer Flüssigkultur von <i>M. pneumoniae</i> M129..	64
Abbildung 3-15 Einfluss der Zugabe der Antiseren gegen die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme auf das Wachstum von <i>M. pneumoniae</i> M129 .....	65

## Abbildungsverzeichnis

---

Abbildung 3-16 Bindung der rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme an humane Zellen.....	66
Abbildung 3-17 Relative Bindung von <i>M. pneumoniae</i> M129 an HeLa-Zellen durch Vorinkubation der Mykoplasmenzellen mit den Seren gegen die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme. ....	68
Abbildung 3-18 Vorkommen von ECM-Proteinen auf der Oberfläche von humanen Zellen..	69
Abbildung 3-19 Bindung von humanen ECM-Proteinen an <i>M. pneumoniae</i> M129. ....	70
Abbildung 3-20 Bindung humaner ECM-Proteine an die oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme in einer Dot Blot-Reaktion.. ....	71
Abbildung 3-21 Analyse der Bindung der humanen ECM-Proteine an die oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme von <i>M. pneumoniae</i> .....	73
Abbildung 3-22 Einfluss der monospezifischen Seren gegen oberflächenassoziierte glykolytische Enzyme von <i>M. pneumoniae</i> auf die Interaktion zwischen den rekombinant hergestellten Enzymen und den humanen ECM-Proteinen.....	76
Abbildung 3-23 Beeinflussung der Interaktion zwischen glykolytischen Enzymen von <i>M. pneumoniae</i> und den humanen Proteinen durch NaCl.....	78
Abbildung 3-24 Beeinflussung der Interaktion zwischen glykolytischen Enzymen von <i>M. pneumoniae</i> und den humanen Proteinen durch NaBr.....	80
Abbildung 3-25 Beeinflussung der Plasminogenbindung an die glykolytischen Enzyme von <i>M. pneumoniae</i> durch die Zugabe von 6-Aminohexansäure.....	81
Abbildung 3-26 Relative Bindung der humanen ECM-Proteinen an die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme in Abhängigkeit von der Besetzung der Bindungsstellen.. ....	83
Abbildung 3-27 Aktivierung von Plasminogen nach Interaktion mit den rekombinant hergestellten glykolytischen Enzymen von <i>M. pneumoniae</i> . ....	86
Abbildung 3-28 Relative Bindung von humanem Plasminogen an oberflächenlokalisierte glykolytischen Enzyme von <i>M. pneumoniae</i> . ....	87
Abbildung 3-29 Vergleich des Einflusses der Aktivatoren auf den zeitlichen Verlauf der Plasminbildung.....	88
Abbildung 3-30 Zeitabhängiger Abbau humaner ECM-Proteine durch Plasmin. ....	90
Abbildung 4-1 Zusammenfassung der Lokalisation der glykolytischen Enzyme von <i>M. pneumoniae</i> in einem Elektronen Tomogramm.....	98

## 11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Zusammensetzung der Puffer und Lösungen.....	20
Tabelle 2-2 Bakterienstämme.....	22
Tabelle 2-3 Zusammensetzung der verwendeten Medien.....	23
Tabelle 2-4 Übersicht über verwendete Zelllinien und den entsprechenden Nährmedien.....	24
Tabelle 2-5 Verwendete Antikörper mit der entsprechenden Herkunft.....	25
Tabelle 2-6 Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes.....	28
Tabelle 2-7 Programmablauf der PCR.....	28
Tabelle 2-8 Zusammensetzung der Multiple Mutation Reaction.....	29
Tabelle 2-9 Programm der MMR.....	29
Tabelle 2-10 Pipettierschema für einen Ansatz der Sequenzierreaktionen.....	31
Tabelle 2-11 Programm-Ablauf der Sequenzier-Reaktion.....	31
Tabelle 2-12 Fluoreszenzfarbstoffe mit den entsprechenden Filtereigenschaften.....	38
Tabelle 3-1 Übersicht über die Lokalisationsexperimente der glykolytischen Enzyme von <i>M. pneumoniae</i> . .....	59
Tabelle 3-2 Übersicht über die Ergebnisse der Lokalisation glykolytischer Enzyme in den untersuchten <i>M. pneumoniae</i> Stämme .....	62
Tabelle 3-3 Übersicht der Bindung glykolytischer Enzyme von <i>M. pneumoniae</i> an humane ECM-Proteine.....	74

## 12 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Enno Jacobs bedanken, für das interessante Thema, die Begutachtung der Arbeit sowie der Möglichkeit diese Arbeit in seinem Institut durchzuführen.

Außerdem möchte ich Frau Prof. Dr. Isolde Röske danken, für Betreuung sowie die Erstellung des Erstgutachtens, aber auch für die stetige Begleitung während meines Studiums und während der Doktorarbeit. Frau Prof. Röske weckte in mir die Neugierde an der Mikrobiologie, wofür ich ihr ebenfalls sehr dankbar bin.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Roger Dumke für die exzellente Zusammenarbeit, für die Unterstützung und die hervorragende Betreuung. Die fachlichen und praktischen Hinweise sowie die interessanten Diskussionen und Anregungen haben stets zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene für die schöne Zusammenarbeit, den Zusammenhalt und das tolle Arbeitsklima. Die gute Atmosphäre, die Diskussionsrunden, das Schweinsohrfrühstück, der Kuchen und noch vieles mehr waren eine Unterstützung zu jeder Zeit. Ines Wolf, Sigi Gäbler und Diana Günther danke ich für die hervorragende technische Assistenz sowie für die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Besonders möchte ich mich noch bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium ermöglichten und bei allen Freunden, die mich in jeder Lebenslage unterstützten, auch wenn es noch so schwierig war.

## I Anhang-Material und Methoden

Tabelle I- 1 Charakteristik verwendeter Enzyme

Enzym	Gen <sup>a</sup>	TGA Codons	Putatives M <sub>w</sub> (kDa)	Phosphorylierung <sup>b</sup>	Trypsin-Schnittstellen <sup>d</sup>	Chymotrypsin-Schnittstellen <sup>d</sup>
Acetatkinase (AckA)	<i>mpn533</i>	0	43,8	ja	51	37
Phosphofruktokinase A (Pfk)	<i>mpn302</i>	0	36,0	ja	25	29
Aldolase (Fba)	<i>mpn025</i>	1	31,1	ja	13	27
Enolase (Eno)	<i>mpn606</i>	1	49,2	ja	26	45
Glucose-6-phosphat-Isomerase (Pgi)	<i>mpn250</i>	2	48,8	nein	48	43
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GapA)	<i>mpn430</i>	1	36,8	ja	23	42
Lactatdehydrogenase (Ldh)	<i>mpn674</i>	0	33,9	ja	24	38
Phosphotransacetylase (Pta)	<i>mpn428</i>	1	35,2	ja	26	32
1- Phosphofruktokinase (FruK)	<i>mpn079</i>	1	33,6	nein	23	19
Phosphoglyceratkinase (Pgg)	<i>mpn429</i>	2	44,2	ja	26	40
Phosphoglyceratmutase (Pgm)	<i>mpn628</i>	0	56,4	ja	43	42
Phosphomannomutase (ManB)	<i>mpn066</i>	3	62,7	ja	65	58
Pyruvatdehydrogenase E1 große Untereinheit (PdhA)	<i>mpn393</i>	4	40,6	ja	31	40
Pyruvat dehydrogenase E1 kleine Untereinheit (PdhB)	<i>mpn392</i>	1	35,9	ja	29	32
Dihydrolipoyl-Transacetylase E2 (PdhC)	<i>mpn391</i>	0	42,4	ja	20	37
Pyruvat dehydrogenase complex component E3 (PdhD)	<i>mpn390</i>	1	49,4	ja	29	44
Pyruvatkinase (Pyk)	<i>mpn303</i>	3	57,3	ja	39	62
Transketolase (Tkt)	<i>mpn082</i>	3	72,4	ja	55	52
Triosephosphatisomerase (TpiA)	<i>mpn629</i>	2	27,0	ja	22	18

<sup>a</sup> - *M. pneumoniae* M129 (NCBI RefSeq no. NC\_000912.1. [274])

<sup>b</sup> - nach [70]

<sup>c</sup> - <http://www.psort.org> (PSORTb 3.0.2;[275])

<sup>d</sup> - [http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/)

## Anhang I- Material und Methoden

**Tabelle I- 2** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer (bezogen durch die Firma Biomers, Ulm, DEU).

<b>Target</b>	<b>Oligonukleotid</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>	<b>Beschreibung</b>	
<b><i>AckA</i></b>	MpAckAf1	GAA TAA TAC CTA CAG CTG TCG	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung	
	MpAckAf2	TAG CGC CAC TGC ACA ACA AG		
	MpAckAf3	ATT GGT TAT GTA GCA GAA CAG G		
	MpAckAr	GAC TTG GTA CTT ACT CCC ATC		
	MpAckAVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> AAC GAC AAC AAA ATT TTA GTA G		
	MpAckAVr	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> CTA TTT TTG AGT TAG TCG AAT GGA		
<b><i>Pfk</i></b>	MpPfkf1	GAT CTC GAC AAA TTC CGC C	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung	
	MpPfkf2	CTA AAT TGC TAA GCG AGT TGG G		
	MpPfkr	GTA AGC TGG GTC ATC TAA CAT TG		
	MpPfkVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> AGT CCA AAA ACA ACC		
	MpPfkVr	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> TTA AAT AAT ATT TTT ATT AAT GAC TG		
	<b><i>Fba</i></b>	MpAldof1		CAG TAC CGG TGA TGA AAT TGT G
MpAldof2		GCT CGC ATT TAC CCT TTC AAG		
MpAldor		GGT TGA TTT ACC AAC GTT GGG		
MpAldoVf		<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> CTA GTA AAC ATC AAA CAA ATG		
MpAldoVr		<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> CTA AGC CTT ATT GGT TGA ACC		
MpAldoM1		P-CCG ACA ACT <u>GGA</u> AGG GTT TAA ACT ATG	MMR	
<b><i>Eno</i></b>	MpEnof1	CAC CAC CAA AAT AGA TTT GTT TC	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung	
	MpEnof2	CAA TAA GGC TAA GTT AGG TGC		
	MpEnof3	CCA GGT AGT GAC ATT GCG		
	MpEnof4	CGA AGA CAC GAC AAT TGC TG		
	MpEnor	GAT AAT GAG GGC AAT TGC TTT AG		
	MpEnoVf	GAC GAC GAC AAG ATG AGT GCA CAA ACT GGA ACC		
	MpEnoVr	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> TTA AGC TTT TTGCGG TTT AAT G		
	MpEnoM1	P-CAA TAA TGC TAA GTA CTT AGG <u>TTG GAAC</u>		MMR
	<b><i>Pgi</i></b>	MpPgif1		CCT TGT GAC TTT ATG AGA GCT ATC
MpPgif2		GCA GTT GCT AGA GCA ATT AAG G		

## Anhang I- Material und Methoden

	MpPgif3	CAC GAC AAA GAA GCT CAA AAT AG	Sequenzierung
	MpPgir	CGT CAT AGT GGA TTA AGC GC	
	MpPgiVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> GAA AGT AAA TGG TTA ACA G	
	MpPgiVr	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> CTA TTC ACG ACC AAG TTT AGC	
	MpPgiM1	P-GGT TTT TCA <u>TGG</u> GCT TTG GTA GTA AC	MMR
	MpPgiM2	P-TGC TTT GCG TCA <u>CTG</u> GCT TTA C	
<b>GapA</b>	MpGapAf	GAA TTA CTC GCC ATA GGT TAA AG	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung
	MpGapAr	CTG AAA GTC AAA CGC TTG G	
	MpGapAVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> CTA GCA AAG AGT AAG ACT ATC	
	MpGapAVr	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> TTA AAG CTT GGC ACA ATA GTT AAC	
	MpGapAM1	P-CTA ACC TGC CAT <u>GGG</u> CAG AAC AC	MMR
<b>Ldh</b>	MpLdhVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> AAG AGT CTT AAA GTA GCA CTC ATT G	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung
	MpLdhVr	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> TTA TAG TTT AGC TAA CTT AAT GTT GTC CTT	
<b>Pta</b>	MpPtaf1	CTG GTG GTG GTG CAT CTT TAG C	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung
	MpPtar	GCA CCC GAC AAC CTC AAA C	
	MpPtaVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> AGT GTT ATT GAT CTT TTA AAA C	
	MpPtaVr	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> TTA TTT AAG TGT TTG CGC TG	
	MpPtaM1	P-CCT GAA GGT <u>TGG</u> TCG CCA	MMR
<b>FruK</b>	MpFruKf1	GTC ATA ACC TGC TTG TAG TGC G	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung
	MpFruKf2	GAT TGC TTA CCT TAA GGC TAA CG	
	MpFruKr	CTT TGG CTG TTT GGC TAG TTC	
	MpFruKVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> CTT AAC CAC AAC AGT AAA GTT <u>TGG</u> ATA G	
	MpFruKVr	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> TTA TAA ATA GTA ATA ATT AGT AGC TTT TAG CAC	
<b>Pgk</b>	MpPgkf1	CGA ATC CTC TTA CGT AAA CCA G	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung
	MpPgkf2	GAT GTG AAT GAG GCT GGT G	
	MpPgkf3	GGA GGA AGA CTT AGT CCA AAC C	
	MpPgkr	CCA GCA CTT TGA ACA CGT TG	
	MpPgkM1	P-CAG TTC <u>TGG</u> GCA TCA TTG GGT G	MMR
	MpPgkM2	P-CAA <u>TGG</u> CCA GCA GAA CTT CAG	
<b>Pgm</b>	MpPgmf1	GCA AGG CAT CTT TGG ATG TC	Amplifikation,

## Anhang I- Material und Methoden

	MpPgmf2	CAG TCA CAT GGA CCA TTT GTA TG	Klonierung und	
	MpPgmf3	GTC ACA CAT GCT CTT TCA AAC AG	Sequenzierung	
	MpPgmf4	CTG ATA TGG TAG GTC ATA CTG GTA AC		
	MpPgmr	GCC ATC AGA TAC ACC GAT ACC		
	MpPgmVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> CAT AAG AAG GTC TTA CTA GCC		
	MpPgmVr	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> TTA CTT TTT ACT TAT TAA AAG GGA G		
<b>ManB</b>	MpManBf1	GAT AAG ACC CAG TTA TTC TGC	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung	
	MpManBf2	GTG TGA TGT GAT TAC CTC TAT G		
	MpManBf3	TTA CAT GGT ACT TCG GTG AAG		
	MpManBf4	GAC AAT GAA CTA GTA GTG G		
	MpManBf5	CCT AGT CGA ATA TGT CTT GG		
	MpManBVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> AAC AGT AAC GCA TAC TTG		
	MpManB Vr	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> CTA AGC TTT ATC GAG GTT GAG C		
	MpManBM1	P-TAA GGA TAC <u>CTG</u> GGA GTT AGC G	MMR	
	MpManBM2	P-GCG ATT GCC GAA <u>TGG</u> AAT CCG		
	MpManBM3	P-TGG TGA TTA CTA TAA <u>CTG</u> <u>GAC</u> GG		
<b>PdhA</b>	MpPdhAf1	GTT AGC AGC CGT GTT GCA AG	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung	
	MpPdhAf2	CAA CGA ACA GTT AAA GCA CGC		
	MpPdhAf3	CAA AAC GCT GCC CAT TAA C		
	MpPdhAf4	GCG AGT TAC GAA GCA ATG C		
	MpPdhAr	GAT AGA TCC ATT GCG TTA CCC		
	MpPdhAVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> GCA ATT TTG ATT AAA AAC		
	MpPdhAVr	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> TTA GTC TTT AAA GTA TTT TTT AGC		
		MpPdhAM1	P-GCT TGT <u>TTG</u> GCA ACG TGC TG	MMR
		MpPdhAM2	P-GCT TTT ACT TTA <u>CTG</u> <u>GAA</u> CGG TAA C	
		MpPdhAM3	P-CCA TTC ACA AGT <u>GGA</u> ACT CGG	
	MpPdhAM4	P-CTT CTC <u>TTG</u> <u>GCG</u> TCA AGG TC		
<b>PdhB</b>	MpPdhBf1	GTT GAC TCC TGA TCT AGC GC	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung	
	MpPdhBf2	CAT GCC AAT GGG TGG TG		
	MpPdhBf3	GGG TAA CGC AAT GGA TCT AG		
	MpPdhBf4	GGA CAA GGG CAT TGA ACT C		

## Anhang I- Material und Methoden

	MpPdhBr	CTA GGT GCA ATT ATT CTA ACA AAC		
	MpPdhBVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> TCA AAA ACA ATT CAA GCA AAT AAC		
	MpPdhBVR	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> TTA CTT TAA AAG TTG GTT AAC AGC TTC		
	MpPdhBM1	P-CGT ACC ATT TCC CCT <u>TGG</u> GAC AAG	MMR	
<b>PdhC</b>	MpPdhCf	CAG CTA ACT GCA GTA AAT GCA AC	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung	
	MpPdhCr	CAC ACG CCA CCA AAG TAT TC		
	MpPdhCVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> GCA AAT GAG TTT AAG TTC AC		
	MpPdhCVr	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> CTA AGC TAC TTC TAA ATC AAT TAA TTC		
<b>PdhD</b>	MpPdhDf1	CAT GGA AGA ACG TGT TGT GC	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung	
	MpPdhDf2	CAA GAT TGT CGA TTA CCT CC		
	MpPdhDr	CTT CTA ACG CTG CGT TGA AG		
	MpPdhDVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> AAT TAC GAT CTC ATT ATT ATA G		
	MpPdhDVR	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> CTA TTT AAA GTG ATC AAA AAG AGC		
	MpPdhDM1	P-GTA GCA CTT ACC <u>TGG</u> AAC CAA TTG		MMR
<b>Pyk</b>	MpPykf1	GAT CGC AGC GCT TTA ATT G	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung	
	MpPykf2	CAC TTA CAA CAT GGT AAA CGA TG		
	MpPykf3	GAG ATC CCA TAT TAC AAG GTG C		
	MpPykr	GAC GAT ATG GAG GTT GCA GC		
	MpPykVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> ATT CAC CAC CTAAAA CG		
	MpPykVr	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> TTA TAA GCT AAT GAT CTT ATT GTG AA		
	MpPykM1	P-CTA <u>TGG</u> ACG CTA GCA ATG TTA GAT GAC CCA		MMR
	MpPykM2	P-CAA GGT GCC TTA <u>CTG</u> GCA ACG		
	MpPykM3	P-CAG TGA GTT <u>TTG</u> GAA GCA GGT GG		
<b>Tkt</b>	MpTktf1	CCT AAT TGC CCA ACT AGC C	Amplifikation, Klonierung und Sequenzierung	
	MpTktf2	GTG ATG GTG ATC TCC AGG AAG		
	MPTktf3	CAC AAG CAG GTC ATA GCA CG		
	MPTktf4	CAA GTC GGT GGT GAT GGA C		
	MPTktR	GTA GGA ATA TAG TCC TTA AAC GAA C		
	MpTktVf	<u>GAC GAC GAC AAG ATG</u> AAA AAC CTG TTT GCT TG		
	MpTktVr	<u>GAG GAG AAG CCC GGT</u> TTA ACT CTT TAG AGT TTT AAT CAA C		
	MpTktM1	P-CAA CAT GGG <u>GTG</u> GAA TTA CC		MMR

## Anhang I- Material und Methoden

	MpTktM2	P-GTT TAT TAA <u>TTG</u> GAC GGA AAA CGA TTA	
	MpTktM3	P-CAG GTT <u>TGG</u> CGG CCT TGT	
<b>TpiA</b>	MpTpiAf1	GCA CCT GAT AAA GTA GTC CCA C	Amplification, Klonierung und Sequenzierung
	MpTpiAr	GAG TTA CCG ATT TGT CCT TGT G	
	MpTpiAVfR	<u>GAA GGA GA TAT ACA TAT</u> GCG TAC GAA ATA CCT AAT TG	
	MpTpiAVrR	<u>GTG ATG GTG GTG ATG ATG</u> TGC ATA TAC TTG TGC CAT TAC	
	MpTpiAM1	P-GGT AAC <u>TGG</u> AAG ACA AAT AAG GAT TTA CAC	MMR
	MpTpiAM2	P-GCT TAC GAA CCA ATT <u>TGG</u> GCA AT	
<b>pET</b>	ExpNF	GTA TGA AAG AAA CCG CTG C	Sequenzierung
<b>pRham</b>	pRham	GCTTTTTAGACTGGTCGTAGGGAG	
<b>Vektor</b>	pETite	CTCAAGACCCGTTTAGAGGC	

— (einfach unterstrichen) Vektorsequenz

= (doppelt unterstrichen) TGA in TGG umgewandelt

**Tabelle I- 3** Verwendete Verdünnungen der Antiseren und Konjugate für ELISA-Analysen.

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung	Beschreibung
anti-AckA	1:250	anti-GP	1:1.000	Reaktivität,
anti-Eno	1:750	anti-GP	1:1.000	Lokalisation,
anti-Fba	1:750	anti-GP	1:1.000	Bindungsanalysen
anti-FruK	1:250	anti-GP	1:1.000	
anti-GapA	1:750	anti-GP	1:1.000	
anti-Ldh	1:250	anti-GP	1:1.000	
anti-ManB	1:250	anti-GP	1:1.000	
anti-PdhA	1:2.000	anti-GP	1:1.000	
anti-PdhB	1:2.000	anti-GP	1:1.000	
anti-PdhC	1:750	anti-GP	1:1.000	
anti-PdhD	1:250	anti-GP	1:1.000	
anti-Pgk	1:250	anti-GP	1:1.000	
anti-Pgm	1:250	anti-GP	1:1.000	

## Anhang I- Material und Methoden

<b>anti-Pta</b>	1:250	anti-GP	1:1.000	
<b>anti-Pyk</b>	1:250	anti-GP	1:1.000	
<b>anti-Tkt</b>	1:250	anti-GP	1:1.000	
<b>anti-TpiA</b>	1:250	anti-GP	1:1.000	
<b>anti-P12</b>	1:500	anti-GP	1:1.000	Lokalisation, Bindungsanalysen
<b>anti-P8</b>	1:500	anti-GP	1:1.000	
<b>anti-P30</b>	1:500	anti-GP	1:1.000	
<b>anti-P40</b>	1:500	anti-GP	1:1.000	
<b>anti-P90</b>	1:500	anti-GP	1:1.000	
<b>anti-Membranfraktion von M.p.</b>	1:750	anti-GP	1:1.000	Lokalisation, Bindungsanalysen
<b>anti-Zytosolfraktion von M.p.</b>	1:750	anti-GP	1:1.000	
<b>anti-M129 s.c.</b>	1:1.500	anti-GP	1:1.000	
<b>anti-M129 i.n.</b>	1:250	anti-GP	1:1.000	
<b>anti-TX-100-unlösliche Fraktion von M.p.</b>	1:750	anti-rabbit	1:1.000	
<b>anti-TX-100-lösliche Fraktion von M.p.</b>	1:750	anti-rabbit	1:1.000	
<b>anti-Kollagen</b>	1:500	anti-rabbit	1:1.000	Bindungsanalysen
<b>anti-Elastin</b>	1:500	anti-mouse	1:1.000	
<b>anti-Fibrinogen</b>	1:1.000	anti-goat	1:1.000	
<b>anti-Fibronectin</b>	1:1.000	anti-rabbit	1:1.000	
<b>anti-Laminin</b>	1:750	anti-rabbit	1:1.000	
<b>anti-Laktoferrin</b>	1:4.000	anti-rabbit	1:1.000	
<b>anti-Plasminogen</b>	1:2.500	anti-rabbit	1:1.000	
<b>anti-Vitronectin</b>	1:2.500	anti-rabbit	1:1.000	

## Anhang I- Material und Methoden

**Tabelle I- 4** Verwendete Verdünnungen der Antiseren und Konjugate für Immunoblot-Analysen sowie Colony Blot und Dot Blot.

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Detektionsmethode</b>	<b>Beschreibung</b>
<b>anti-AckA</b>	1:100	anti-GP	1:750	Chromogenes Substrat	Spezifität, Lokalisation
<b>anti-Eno</b>	1:500	anti-GP	1:750		
<b>anti-Fba</b>	1:500	anti-GP	1:750		
<b>anti-FruK</b>	1:100	anti-GP	1:750		
<b>anti-GapA</b>	1:500	anti-GP	1:750		
<b>anti-Ldh</b>	1:100	anti-GP	1:750		
<b>anti-ManB</b>	1:100	anti-GP	1:750		
<b>anti-PdhA</b>	1:750	anti-GP	1:750		
<b>anti-PdhB</b>	1:750	anti-GP	1:750		
<b>anti-PdhC</b>	1:500	anti-GP	1:750		
<b>anti-PdhD</b>	1:100	anti-GP	1:750		
<b>anti-Pgk</b>	1:100	anti-GP	1:750		
<b>anti-Pgm</b>	1:250	anti-GP	1:750		
<b>anti-Pta</b>	1:100	anti-GP	1:750		
<b>anti-Pyk</b>	1:250	anti-GP	1:750		
<b>anti-Tkt</b>	1:100	anti-GP	1:750		
<b>anti-TpiA</b>	1:100	anti-GP	1:750		
<b>anti-HisTag</b>	1:1.250	anti-mouse	1:750		Expressionskontrolle
<b>anti-P12</b>	1:500	anti-GP	1:750		Lokalisation
<b>anti-P30</b>	1:500	anti-GP	1:750		
<b>anti-P40</b>	1:500	anti-GP	1:750		
<b>anti-P90</b>	1:500	anti-GP	1:750		
<b>anti-Membranfraktion von <i>M.p.</i></b>	1:750	anti-GP	1:750		
<b>anti-Zytosolfraktion von <i>M.p.</i></b>	1:750	anti-GP	1:750		Lokalisation
<b>anti-M.p. s.c.</b>	1:750	anti-GP	1:750		
<b>anti-Kollagen</b>	1:500	anti-rabbit	1:1.000	Chemilumineszenz	
<b>anti-Elastin</b>	1:500	anti-mouse	1:750		
<b>anti-Fibrinogen</b>	1:1.000	anti-goat	1:1.000		
<b>anti-Fibronectin</b>	1:1.000	anti-rabbit	1:1.500		

## Anhang I- Material und Methoden

---

<b>anti-Laminin</b>	1:1.000	anti-rabbit	1:1.500
<b>anti-Laktoferrin</b>	1:2.500	anti-rabbit	1:1.500
<b>anti-Plasminogen</b>	1:2.000	anti-rabbit	1:1.500
<b>anti-Vitronektin</b>	1:2.000	anti-rabbit	1:1.500

## II Anhang-Ergebnisse

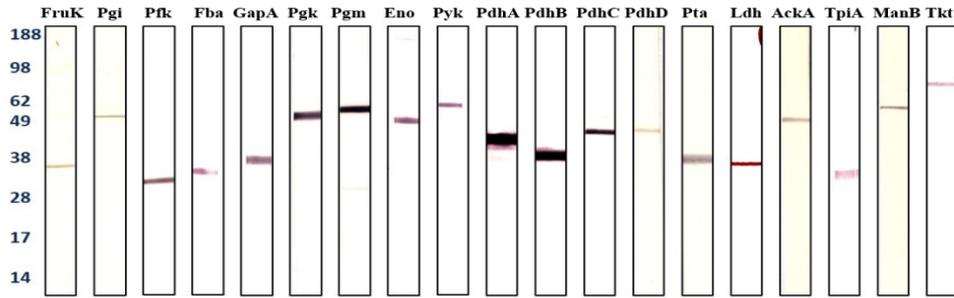


Abbildung II- 1 Charakterisierung rekombinanter Proteine im Immunoblot durch Zugabe eines His-Tags spezifischen Serums. Detektion der in Eluat E enthaltenen rekombinanten Proteine.

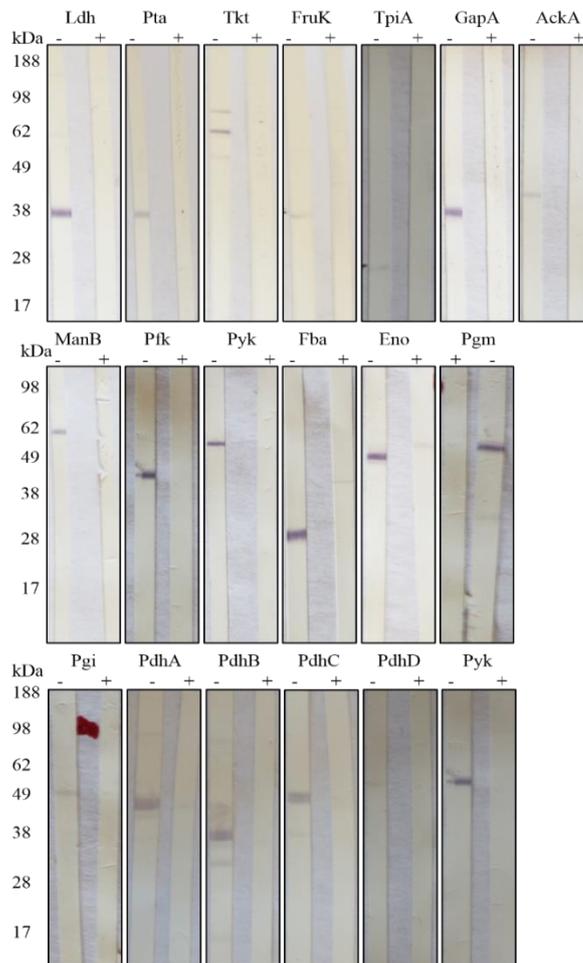
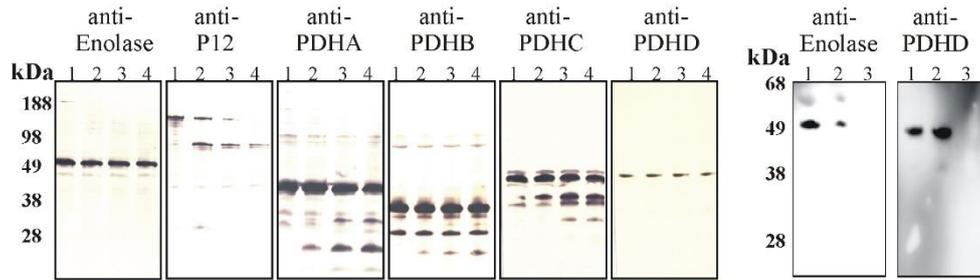
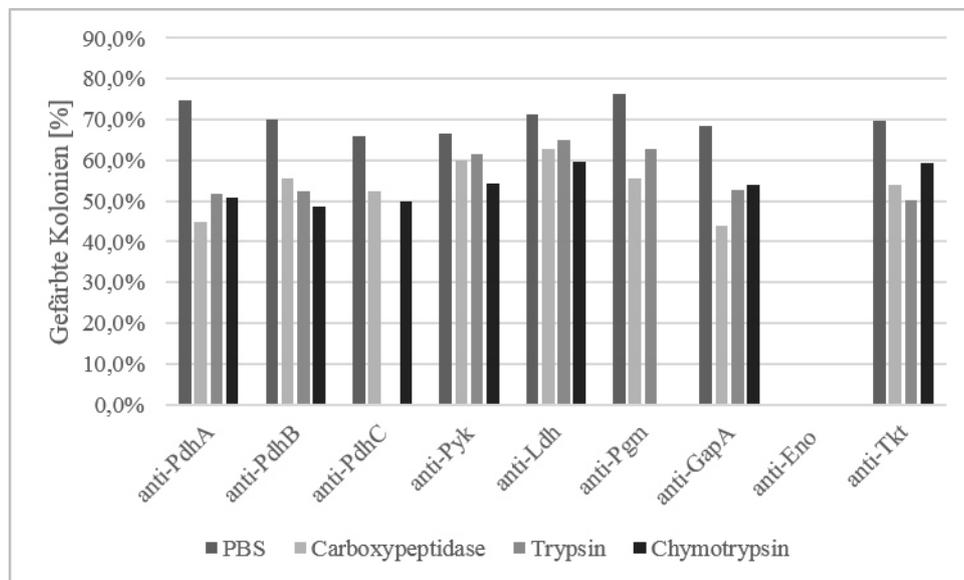


Abbildung II- 2 Charakterisierung der Reaktivität und Spezifität der Seren gegen die rekombinanten Proteine im Western Blot. Reaktion der Seren (je 1:250) mit dem *M. pneumoniae* Gesamtantigen (100 µg/ml). -...Vorinkubation der einzelnen Seren mit PBS, +... Vorinkubation der einzelnen Seren mit den entsprechenden rekombinant hergestellten Proteinen (50 µg/ml).

## Anhang II- Ergebnisse

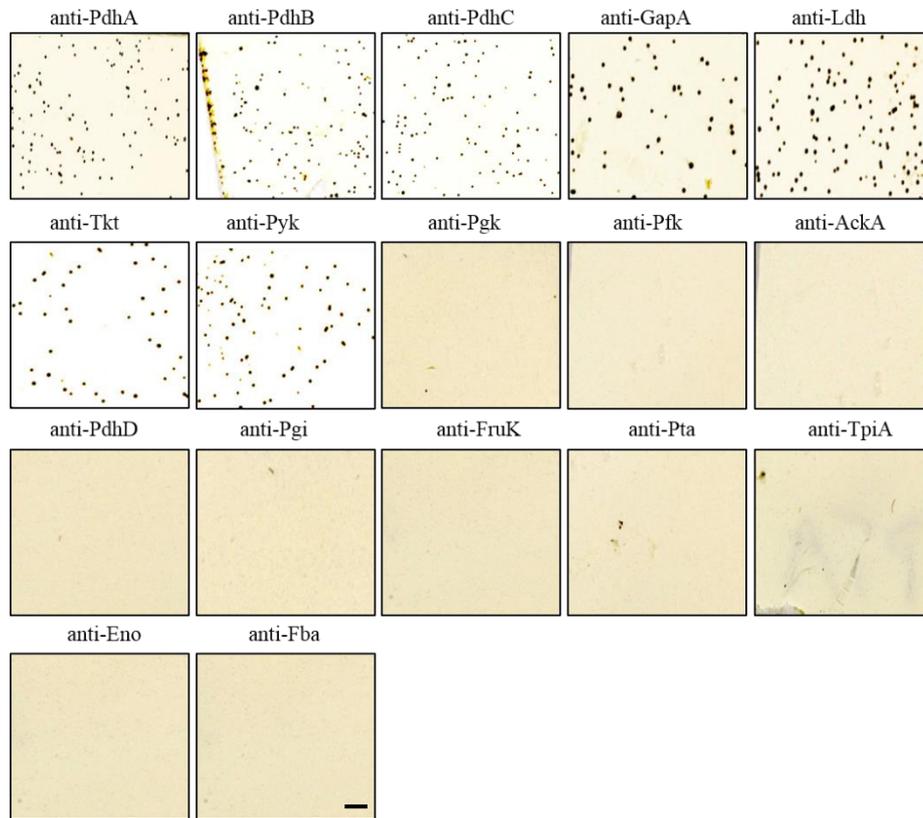


**Abbildung II- 3 Trypsinverdau.** Abbauprodukte werden durch Zugabe der Seren gegen die rekombinanten Proteine detektiert. 1) 0 µg Trypsin, 2) 2,5 µg Trypsin, 3) 10 µg Trypsin, 4) 50 µg Trypsin. Links: Trypsinverdau des *M. pneumoniae* Gesamtantigens. Rechts: Trypsinverdau der rekombinanten Proteine.



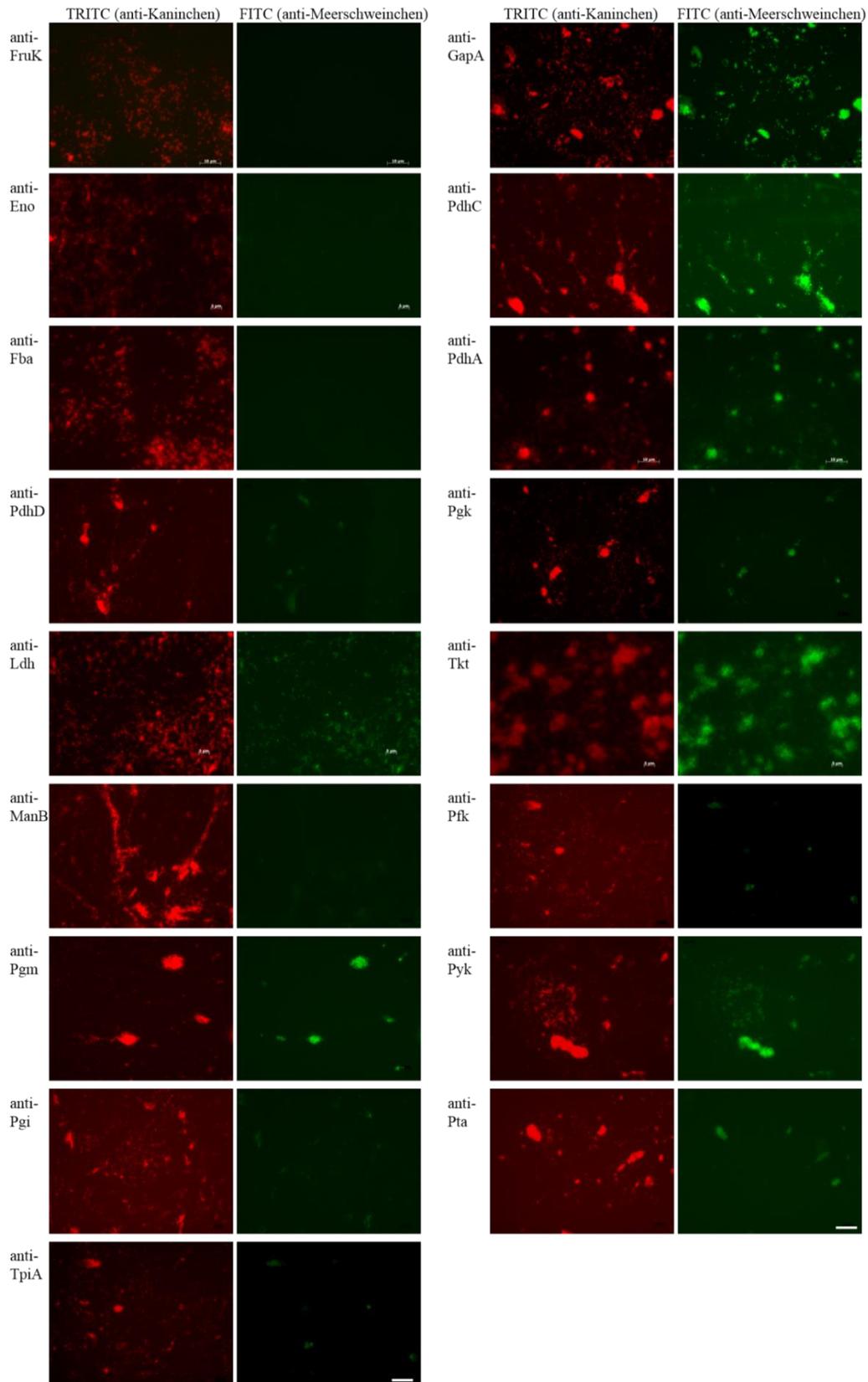
**Abbildung II-4 Prozentualer Anteil von Kolonien mit extrazellulären Proteinen von *M. pneumoniae* nach Verwendung verschiedener Proteasen.** Verdau der Oberflächenproteine auf den Kolonien mittels Carboxypeptidase, Trypsin und Chymotrypsin (je 50 µg/ml). PBS diente als Kontrolle. Angabe des prozentualen Anteils der gefärbten Kolonien in Bezug auf die KfE Verwendung von acht Tage alten Kolonien (Daten Tabelle III-3).

## Anhang II- Ergebnisse



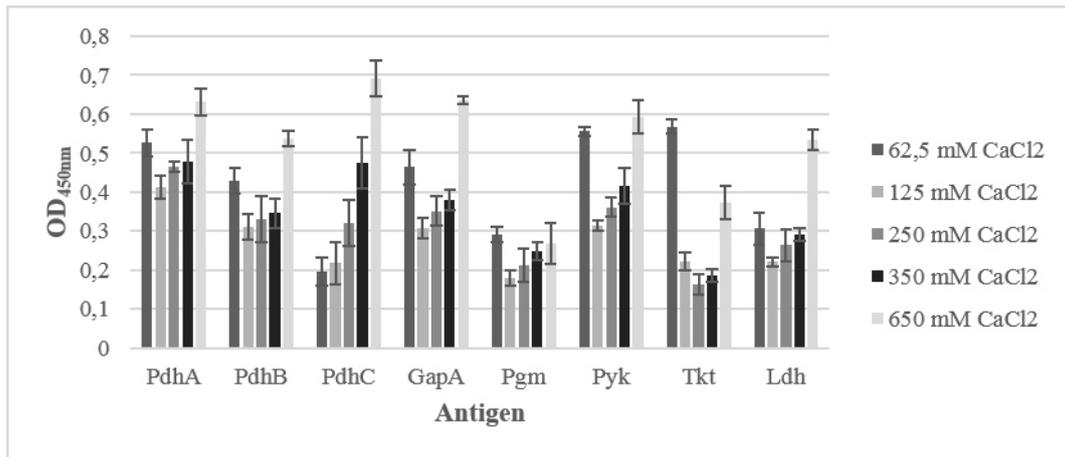
**Abbildung II- 5** Immundetektion ausgewählter Proteine auf *M. pneumoniae* Kolonien. Verwendung von acht Tage alten Kolonien. Maßstab: 200  $\mu$ m.

## Anhang II- Ergebnisse

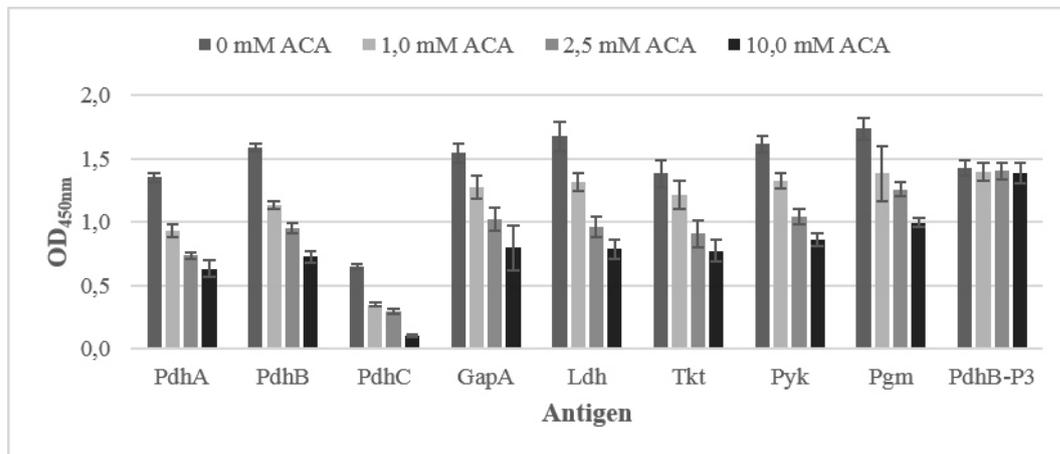


**Abbildung II- 6 Oberflächenlokalisierung glykolytischer Enzyme von *M. pneumoniae* mittels Immunfluoreszenz.** Mikroskopische Aufnahme der Fluoreszenz-markierten Proteine (FITC). Die Basisfärbung der Zellen erfolgte mit Hilfe des im Kaninchen hergestellten Serums gegen die TX-100-unlösliche Phase (TRITC). Maßstab 10 µm.

## Anhang II- Ergebnisse



**Abbildung II- 7 Beeinflussung der Interaktion zwischen glykolytischen Enzymen von *M. pneumoniae* und Fibrinogen durch CaCl<sub>2</sub>.** Die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme wurden als Antigen verwendet (15 µg/ml). Die Inkubation der ECM-Proteine erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen an CaCl<sub>2</sub> (62,5; 125; 250; 350; 650 mM) in PBS (Daten Tabelle III-11).



**Abbildung II- 8 Beeinflussung der Plasminogenbindung an die glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* durch die Zugabe von 6-Aminohexansäure.** Die rekombinanten Proteine wurden als Antigen verwendet (15 µg/ml). Die Inkubation mit 2,5 µg/ml Plasminogen erfolgte unter Zugabe von verschiedenen Konzentrationen 6-Aminohexansäure (ACA; 1 mM; 2,5 mM; 10,0 mM). Als Positivkontrolle wurde die Plasminogenbindung in PBS untersucht. Die Detektion erfolgte mit anti-Plasminogen (Daten Tabelle III-10).

## Anhang II- Ergebnisse

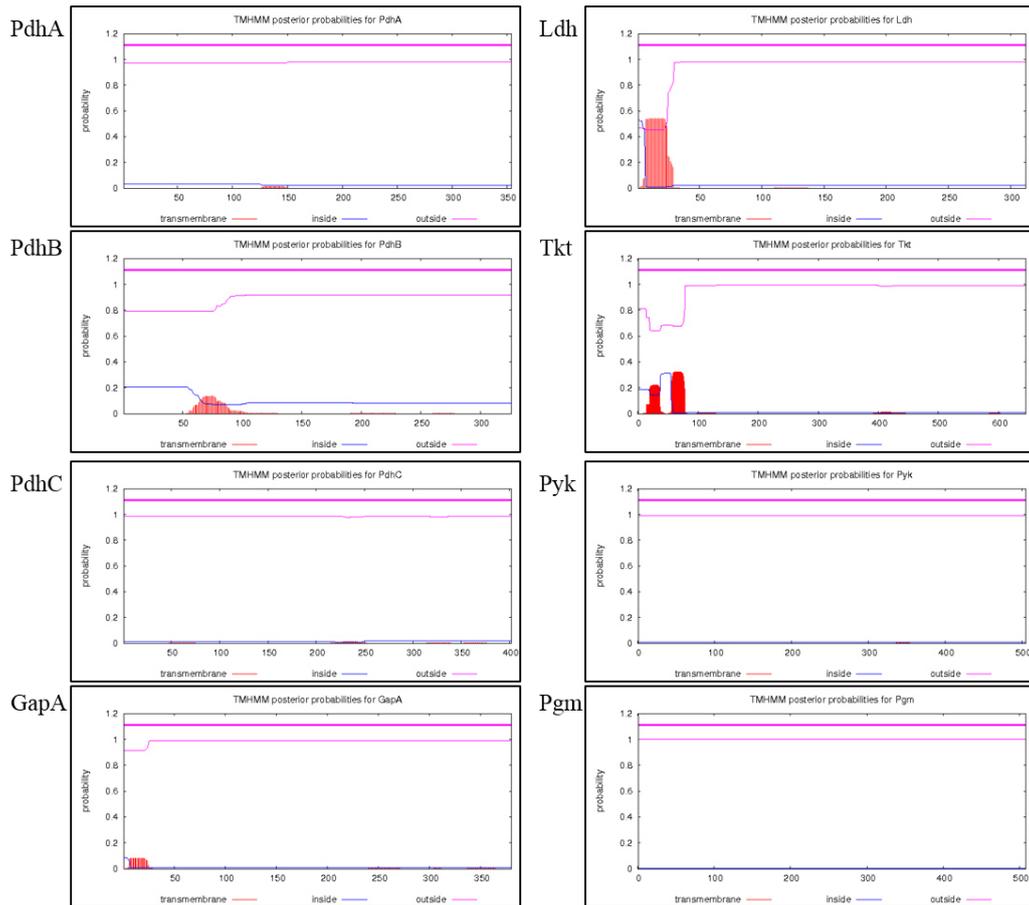


Abbildung II- 9 Putative Transmembran-Domänen der oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae*.

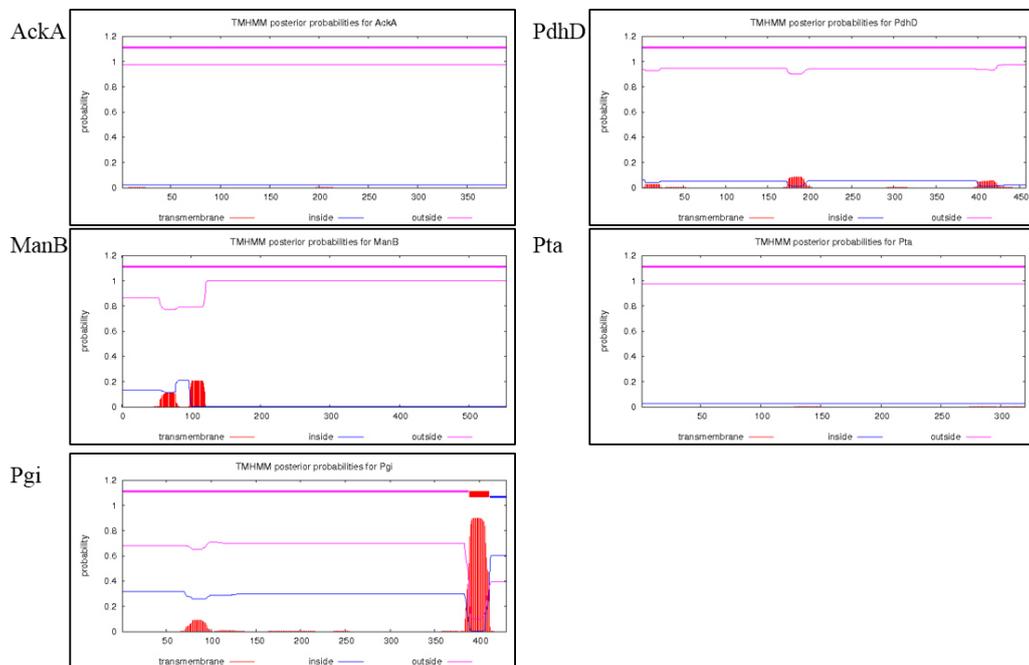


Abbildung II- 10 Putative Transmembran-Domänen der membranassoziierten glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae*.

## Anhang II- Ergebnisse

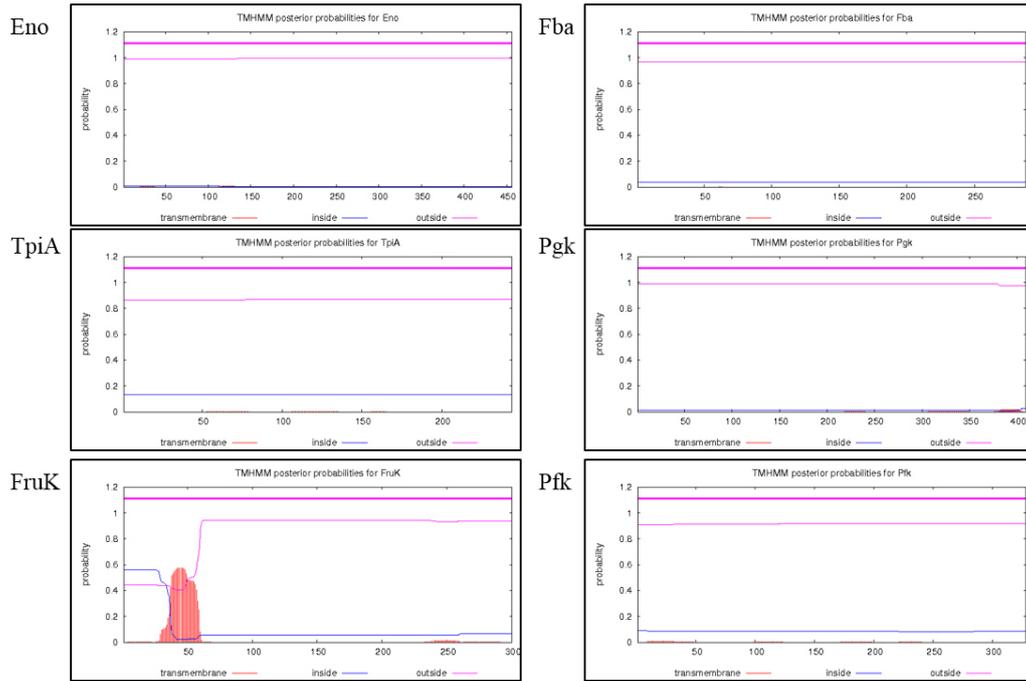


Abbildung II- 41 Putative Transmembran-Domänen der zytosolassoziierten glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae*.

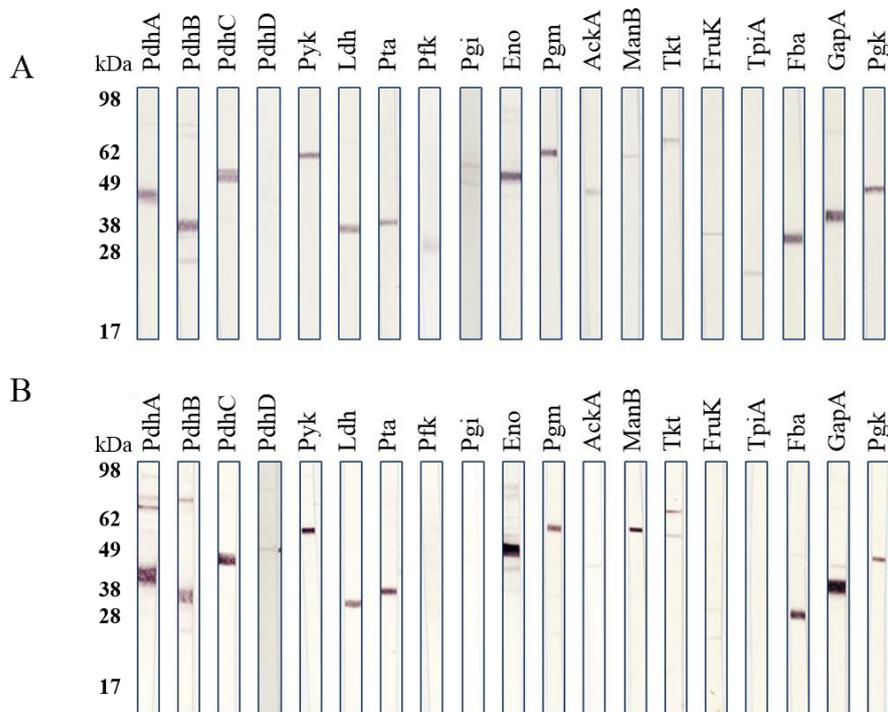


Abbildung II- 5 Lokalisation der glykolytischen Enzyme in den nach Ultrazentrifugation von *M. pneumoniae* M129 gewonnenen Fraktionen. Reaktion der Seren mit dem Antigen der Membran- und Zytosolfraction (je 100  $\mu\text{g/ml}$ ). A) Verwendetes Antigen: Zytosolfraction, B) verwendetes Antigen: Membranfraction

### III Anhang-Daten

Tabelle III- 1 Überprüfung der Reaktivität der Seren gegen die rekombinant hergestellten Proteine mit dem *M. pneumoniae* Gesamtantigen, den Proteinen der Membran- sowie Zytosolfraktion und dem 10x aufkonzentrierten Kulturüberstand.

Serum	Antigen							
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)							
	M.p.		Zytosol Fraktion		Membran Fraktion		Überstand (10x)	
<b>M.p.</b>	3,56	± 0,09	1,05	± 0,03	0,98	± 0,09	0,79	± 0,04
<b>FruK</b>	0,13	± 0,01	0,09	± 0,00	0,09	± 0,01	0,02	± 0,02
<b>Pgi</b>	0,34	± 0,03	0,07	± 0,00	0,65	± 0,12	0,01	± 0,00
<b>ManB</b>	0,22	± 0,01	0,11	± 0,01	0,38	± 0,03	0,02	± 0,01
<b>Pfk</b>	0,16	± 0,02	0,33	± 0,02	0,07	± 0,01	0,01	± 0,01
<b>Fba</b>	1,71	± 0,11	0,96	± 0,01	0,05	± 0,00	0,01	± 0,00
<b>Tkt</b>	0,45	± 0,02	0,50	± 0,08	0,31	± 0,00	0,02	± 0,00
<b>TpiA</b>	0,11	± 0,01	0,04	± 0,00	0,03	± 0,01	0,02	± 0,00
<b>GapA</b>	2,88	± 0,10	1,48	± 0,01	1,47	± 0,04	0,01	± 0,00
<b>Pgm</b>	0,67	± 0,06	0,79	± 0,04	0,29	± 0,02	0,02	± 0,00
<b>Pgk</b>	0,16	± 0,03	0,25	± 0,01	0,15	± 0,02	0,02	± 0,00
<b>Eno</b>	2,18	± 0,05	1,22	± 0,01	0,19	± 0,02	0,02	± 0,01
<b>Pyk</b>	0,57	± 0,03	0,89	± 0,04	0,31	± 0,02	0,01	± 0,00
<b>Ldh</b>	2,29	± 0,06	1,26	± 0,16	0,70	± 0,02	0,01	± 0,00
<b>AckA</b>	0,15	± 0,01	0,49	± 0,02	0,14	± 0,01	0,02	± 0,00
<b>Pta</b>	0,61	± 0,05	0,79	± 0,06	0,72	± 0,03	0,01	± 0,00
<b>PdhA</b>	3,31	± 0,16	1,21	± 0,04	1,40	± 0,05	0,02	± 0,00
<b>PdhB</b>	3,34	± 0,13	1,24	± 0,04	1,41	± 0,07	0,01	± 0,00
<b>PdhC</b>	2,27	± 0,14	1,16	± 0,04	0,80	± 0,03	0,01	± 0,01
<b>PdhD</b>	0,22	± 0,01	0,76	± 0,03	0,52	± 0,08	0,02	± 0,01
<b>P12</b>			0,16	± 0,01	0,93	± 0,05		

### Anhang III- Daten

**Tabelle III- 2 Lokalisation der glykolytischen Enzyme in *M. pneumoniae* nach Fraktionierung durch Triton X-100 und Ultrazentrifugation sowie das Vorkommen spezifischer Antikörper gegen die oberflächenlokalisierten glykolytischen Enzyme im Serum intranasal infizierter Meerschweinchen.** Als Antigen wurden die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme verwendet (je 15 µg/ml).

Antigen	Serum						M.p. <i>i.n.</i>	
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)							
	Zytosol Fraktion	Membran Fraktion	TX-100-lösliche Fraktion		TX-100-unlösliche Fraktion			
<b>P12</b>	0,22 ± 0,15	1,67 ± 0,01	0,08 ± 0,00	0,00 ± 0,00				
<b>FruK</b>	1,93 ± 0,06	0,01 ± 0,02	1,05 ± 0,00	0,00 ± 0,03				
<b>Pgi</b>	1,62 ± 0,07	0,00 ± 0,01	0,54 ± 0,00	0,00 ± 0,02				
<b>ManB</b>	0,36 ± 0,05	0,10 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,00 ± 0,00				
<b>Pfk</b>	1,89 ± 0,06	0,00 ± 0,02	1,13 ± 0,00	0,00 ± 0,07				
<b>Fba</b>	0,80 ± 0,05	0,00 ± 0,01	0,40 ± 0,00	0,00 ± 0,02				
<b>Tkt</b>	0,88 ± 0,05	0,16 ± 0,01	0,65 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,003			
<b>TpiA</b>	1,06 ± 0,09	0,00 ± 0,01	0,45 ± 0,00	0,00 ± 0,05				
<b>GapA</b>	0,73 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,01				
<b>Pyk</b>	0,77 ± 0,02	0,00 ± 0,01	0,19 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,02 ± 0,003			
<b>Pgk</b>	1,84 ± 0,03	0,01 ± 0,04	1,10 ± 0,00	0,00 ± 0,02				
<b>Eno</b>	1,05 ± 0,04	0,00 ± 0,00	2,11 ± 0,00	0,00 ± 0,03				
<b>Pgm</b>	1,01 ± 0,03	0,09 ± 0,01	0,22 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,01 ± 0,003			
<b>Ldh</b>	0,36 ± 0,02	0,08 ± 0,00	0,23 ± 0,00	0,00 ± 0,01	0,02 ± 0,010			
<b>AckA</b>	0,87 ± 0,05	0,11 ± 0,00	2,28 ± 0,00	0,00 ± 0,05				
<b>PTA</b>	1,65 ± 0,01	0,11 ± 0,02	2,09 ± 0,00	0,00 ± 0,00				
<b>PdhA</b>	2,19 ± 0,03	1,61 ± 0,01	1,44 ± 0,00	1,86 ± 0,07	1,60 ± 0,018			
<b>PdhB</b>	1,73 ± 0,07	0,02 ± 0,07	1,25 ± 0,07	1,91 ± 0,05	0,08 ± 0,003			
<b>PdhC</b>	2,21 ± 0,07	1,20 ± 0,01	2,57 ± 0,05	0,81 ± 0,02	1,35 ± 0,058			
<b>PdhD</b>	2,07 ± 0,03	0,56 ± 0,13	1,23 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,003			
<b>M.p.</b>					1,92 ± 0,003			

## Anhang III- Daten

**Tabelle III- 3 Prozentualer Anteil glykolytischer Enzyme auf der Oberfläche von *M. pneumoniae* nach Verwendung verschiedener Proteasen.** Verdau der Oberflächenproteine auf den Kolonien mittels Carboxypeptidase, Trypsin und Chymotrypsin (je 50 µg/ml). PBS diente als Kontrolle. Verwendung von 8 Tage alten Kolonien.

	PBS	Carboxypeptidase	Trypsin	Chymotrypsin
<b>anti-PdhA</b>	74,60%	44,70%	51,80%	50,90%
<b>anti-PdhB</b>	70,10%	55,60%	52,30%	48,70%
<b>anti-PdhC</b>	65,80%	52,30%	51,90%	49,90%
<b>anti-Pyk</b>	66,40%	59,80%	61,50%	54,30%
<b>anti-Ldh</b>	71,30%	62,70%	65,00%	59,60%
<b>anti-Pgm</b>	76,20%	55,60%	62,70%	65,3%
<b>anti-GapA</b>	68,30%	43,90%	52,60%	53,90%
<b>anti-Eno</b>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<b>anti-Tkt</b>	69,70%	54,10%	50,30%	59,20%
<b>anti-P12</b>	95,60%	43,90%	41,10%	35,70%

**Tabelle III- 4 Relative Bindung von *M. pneumoniae* an HeLa-Zellen durch Vorinkubation der Mykoplasmen-Zellen mit den Seren gegen die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme.** Als Positivkontrolle diente das Gesamtantigenserum (M129) sowie als Negativkontrolle das Präimmenserum (PIS). Die ermittelten Werte der optischen Dichte wurden mit dem Präimmenserum gleichgesetzt (100 % Bindung). Die Ergebnisse der Vorinkubation mit den Seren gegen die rekombinant hergestellten Proteine wurden ins Verhältnis gesetzt. OF: Pool der Seren gegen PdhA-C, GapA, Pyk, Pgm, Ldh, Tkt; Mb: Pool der Seren gegen AckA, Pgi, ManB, Pta, PdhD; Ct: Pool der Seren gegen FruK, Pfk, Fba, TpiA, Eno, Pgk; glyk. Enz.: Pool aller glykolytischen Enzyme. Mb Frak. Serum gegen die Proteine der Membranfraktion von *M. pneumoniae*; Ct Frak. Serum gegen die Proteine der Zytosolfraktion von *M. pneumoniae* (beides nach Ultrazentrifugation).

Serum	<u>OD<sub>450-620</sub> ±SD</u>	<b>relative Adhärenz [%]</b>
<b>PIS</b>	0,81 ± 0,04	100,0
<b>M.p.</b>	0,41 ± 0,02	50,3
<b>pdhA</b>	1,06 ± 0,07	114,2
<b>pdhB</b>	0,90 ± 0,02	98,5
<b>pdhC</b>	0,90 ± 0,09	96,7
<b>GapA</b>	1,25 ± 0,09	134,7
<b>LDH</b>	0,98 ± 0,09	106,2
<b>TKT</b>	1,01 ± 0,05	108,6
<b>PYK</b>	1,33 ± 0,11	143,8
<b>PGM</b>	1,23 ± 0,13	132,4
<b>OF</b>	0,74 ± 0,03	92,0
<b>Mb</b>	0,82 ± 0,04	102,1
<b>Ct</b>	0,83 ± 0,04	102,5
<b>OF/Mb</b>	0,81 ± 0,05	100,1
<b>OF/Ct</b>	0,80 ± 0,06	99,1
<b>glyk. Enz. (komplett)</b>	0,79 ± 0,04	97,9
<b>Mb/Ct</b>	0,83 ± 0,05	103,0
<b>Mb Frak.</b>	0,32 ± 0,02	40,0
<b>Ct Frak.</b>	0,65 ± 0,03	80,6
<b>BL21(DE3)</b>	0,79 ± 0,03	97,7

### Anhang III- Daten

**Tabelle III- 5 Reaktion der Membran- und Zytosolfraktion (Ultrazentrifugation) der *M. pneumoniae* Wild- und Mutanten-Stämme.** Verwendete Antigene je 15 (µg/ml) und Detektion der glykolytischen Enzyme mit den entsprechenden Meerschweinchen-Antisera.

Serum	Antigen															
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)															
	<u>M129</u>				<u>IV22a</u>				<u>B170</u>				<u>P01</u>			
	Membran	Zytosol	Fraktion		Membran	Zytosol		Membran	Zytosol	Fraktion		Membran	Zytosol	Fraktion		
<b>P12/P30</b>	0,91	± 0,05	0,13	± 0,01	0,86	± 0,03	0,49	± 0,06	0,88	± 0,05	0,15	± 0,01	0,92	± 0,06	0,23	± 0,03
<b>FruK</b>	0,00	± 0,00	0,02	± 0,02	0,00	± 0,01	0,00	± 0,01	0,00	± 0,00	0,00	± 0,01	0,00	± 0,03	0,00	± 0,07
<b>Pgi</b>	0,78	± 0,03	0,12	± 0,01	0,43	± 0,04	0,07	± 0,00	0,49	± 0,02	0,14	± 0,03	0,59	± 0,05	0,34	± 0,00
<b>ManB</b>	0,49	± 0,01	0,79	± 0,02	0,45	± 0,00	0,48	± 0,01	0,49	± 0,00	0,75	± 0,09	0,38	± 0,08	0,44	± 0,02
<b>Pfk</b>	0,03	± 0,00	0,28	± 0,01	0,04	± 0,00	0,33	± 0,01	0,04	± 0,00	0,33	± 0,01	0,02	± 0,05	0,24	± 0,05
<b>Fba</b>	0,05	± 0,00	0,73	± 0,02	0,04	± 0,01	0,76	± 0,02	0,03	± 0,01	0,30	± 0,03	0,02	± 0,04	1,06	± 0,09
<b>Tkt</b>	0,20	± 0,01	0,57	± 0,04	0,16	± 0,03	0,73	± 0,01	0,21	± 0,01	0,94	± 0,04	0,19	± 0,01	0,13	± 0,01
<b>TpiA</b>	0,00	± 0,01	0,00	± 0,01	0,00	± 0,01	0,00	± 0,01	0,01	± 0,01	0,13	± 0,01	0,01	± 0,07	0,12	± 0,07
<b>GapA</b>	0,83	± 0,01	1,28	± 0,00	0,73	± 0,01	1,39	± 0,01	0,51	± 0,00	1,02	± 0,02	0,73	± 0,03	1,36	± 0,03
<b>Pyk</b>	0,35	± 0,08	0,93	± 0,09	0,21	± 0,10	1,15	± 0,08	0,06	± 0,09	0,79	± 0,10	0,53	± 0,04	1,38	± 0,03
<b>Pgk</b>	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	0,02	± 0,09	0,05	± 0,00
<b>Eno</b>	0,03	± 0,00	0,84	± 0,04	0,06	± 0,01	0,88	± 0,01	0,02	± 0,01	0,89	± 0,03	0,04	± 0,09	0,97	± 0,03
<b>Pgm</b>	0,22	± 0,03	0,17	± 0,03	1,59	± 0,01	1,83	± 0,04	1,08	± 0,01	0,72	± 0,02	0,39	± 0,12	0,43	± 0,04
<b>Ldh</b>	0,16	± 0,01	0,70	± 0,02	0,16	± 0,01	0,94	± 0,03	0,17	± 0,01	0,94	± 0,02	0,17	± 0,03	1,18	± 0,02
<b>AckA</b>	0,09	± 0,00	0,45	± 0,01	0,10	± 0,00	0,46	± 0,02	0,15	± 0,01	0,64	± 0,02	0,12	± 0,10	0,33	± 0,01
<b>Pta</b>	0,18	± 0,01	0,93	± 0,03	0,24	± 0,01	1,24	± 0,04	0,11	± 0,01	0,78	± 0,02	0,20	± 0,09	0,80	± 0,01
<b>PdhA</b>	1,04	± 0,01	1,07	± 0,01	1,18	± 0,03	1,11	± 0,02	1,00	± 0,02	1,23	± 0,02	1,05	± 0,04	1,05	± 0,00
<b>PdhB</b>	1,22	± 0,03	0,96	± 0,00	1,11	± 0,03	1,10	± 0,00	1,30	± 0,00	1,14	± 0,02	1,29	± 0,08	1,29	± 0,02
<b>PdhC</b>	0,49	± 0,00	1,11	± 0,06	0,45	± 0,01	1,21	± 0,01	0,37	± 0,01	1,23	± 0,03	0,71	± 0,01	1,27	± 0,09
<b>PdhD</b>	0,38	± 0,02	0,51	± 0,01	0,53	± 0,02	0,56	± 0,03	0,37	± 0,02	0,54	± 0,01	0,11	± 0,03	0,09	± 0,01

## Anhang III- Daten

**Tabelle III- 6 Bindung der rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme an humane Zellen.** Als Positivkontrolle wurde das rekombinante Protein des C-terminalen Bereichs des P1-Adhäsins verwendet (P12) sowie als Negativkontrolle das rekombinante Protein P8, welches keine Bindung an humane Zellen zeigt.

	<b>Antigen</b>											
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)											
	<b>HeLa</b>				<b>MRC-5</b>				<b>A549</b>			
	rekombinantes Protein		Zellen		rekombinantes Protein		Zellen		rekombinantes Protein		Zellen	
<b>P12</b>	1,86	± 0,03	1,72	± 0,08	1,75	± 0,01	1,41	± 0,04	1,86	± 0,03	1,72	± 0,08
<b>P8</b>	0,96	± 0,06	0,07	± 0,01	1,80	± 0,02	0,09	± 0,01	0,69	± 0,01	0,09	± 0,01
<b>PdhA</b>	2,07	± 0,04	1,95	± 0,04	1,77	± 0,03	1,09	± 0,03	1,56	± 0,02	0,62	± 0,07
<b>PdhB</b>	1,86	± 0,03	1,69	± 0,04	1,85	± 0,03	0,74	± 0,02	1,62	± 0,01	0,82	± 0,03
<b>PdhC</b>	1,58	± 0,04	0,73	± 0,11	1,57	± 0,05	0,66	± 0,03	0,51	± 0,05	0,12	± 0,01
<b>GapA</b>	2,02	± 0,04	1,44	± 0,03	1,88	± 0,07	1,35	± 0,04	1,55	± 0,03	0,77	± 0,02
<b>Ldh</b>	2,28	± 0,04	1,87	± 0,02	1,97	± 0,02	1,43	± 0,05	1,57	± 0,05	0,83	± 0,02
<b>Tkt</b>	2,18	± 0,04	1,59	± 0,04	1,79	± 0,06	1,32	± 0,03	1,51	± 0,01	0,62	± 0,03
<b>Pyk</b>	2,27	± 0,04	1,87	± 0,06	1,81	± 0,09	1,21	± 0,25	1,27	± 0,02	0,78	± 0,04
<b>Pgm</b>	1,95	± 0,02	1,91	± 0,03	1,71	± 0,10	0,57	± 0,11	1,22	± 0,02	0,52	± 0,05

## Anhang III- Daten

**Tabelle III- 7 Bindung von humanen ECM-Proteinen an *M. pneumoniae*.** ELISA-Reaktion der Bindung. Als Antigen wurden M129-Zellen eingesetzt (25 µg/ml).

	0 µg/ml		5 µg/ml		25 µg/ml		50 µg/ml	
<b>Fibrinogen</b>	0,06	± 0,02	0,11	± 0,02	0,78	± 0,05	1,08	± 0,05
<b>Plasminogen</b>	0,07	± 0,05	0,99	± 0,03	1,03	± 0,04	1,05	± 0,03
<b>Fibronectin</b>	0,02	± 0,01	0,31	± 0,01	0,66	± 0,03	1,06	± 0,05
<b>Laminin</b>	0,00	± 0,00	0,07	± 0,01	0,47	± 0,03	0,87	± 0,04
<b>Collagen</b>	0,00	± 0,01	0,01	± 0,01	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00
<b>Elastin</b>	0,01	± 0,00	0,01	± 0,00	0,01	± 0,00	0,02	± 0,00
<b>Laktoferrin</b>	0,06	± 0,00	0,92	± 0,06	1,06	± 0,03	1,18	± 0,06
<b>Vitronectin</b>	0,14	± 0,02	0,83	± 0,08	0,90	± 0,10	0,93	± 0,10

**Tabelle III- 8 Analyse der Konzentrations-abhängigen Bindung der humanen ECM-Proteine an die oberflächenassoziierten glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae*.** Als Antigen wurden die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme verwendet (15 µg/ml). Anschließend wurden die ECM-Proteine in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Die Detektion erfolgte mit den entsprechenden Antisera gegen die ECM-Proteine.

Antigen	<b>Laktoferrin</b>							
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)							
	0 µg/ml		0,5 µg/ml		1,0 µg/ml		2,5 µg/ml	
<b>PdhA</b>	0,03	± 0,00	0,15	± 0,01	0,24	± 0,02	0,32	± 0,05
<b>PdhB</b>	0,01	± 0,00	0,26	± 0,01	0,48	± 0,01	0,50	± 0,00
<b>PdhC</b>	0,02	± 0,00	0,66	± 0,02	0,66	± 0,04	0,67	± 0,00
<b>GapA</b>	0,01	± 0,00	0,27	± 0,02	0,32	± 0,02	0,47	± 0,01
<b>Pgm</b>	0,02	± 0,02	0,17	± 0,02	0,15	± 0,02	0,21	± 0,00
<b>Pyk</b>	0,01	± 0,00	0,35	± 0,02	0,40	± 0,01	0,46	± 0,00
<b>Tkt</b>	0,00	± 0,00	0,10	± 0,04	0,13	± 0,01	0,18	± 0,00
<b>Ldh</b>	0,01	± 0,00	0,14	± 0,01	0,13	± 0,01	0,19	± 0,00
<b>BSA</b>	0,01	± 0,01	0,03	± 0,05	0,05	± 0,01	0,05	± 0,00
Antigen	<b>Laminin</b>							
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)							
	0 µg/ml		5,0 µg/ml		10,0 µg/ml		25,0 µg/ml	
<b>PdhA</b>	0,01	± 0,00	0,09	± 0,01	0,15	± 0,00	0,18	± 0,00
<b>PdhB</b>	0,01	± 0,00	0,15	± 0,01	0,36	± 0,01	0,57	± 0,00
<b>PdhC</b>	0,01	± 0,00	0,12	± 0,02	0,24	± 0,01	0,32	± 0,00
<b>GapA</b>	0,01	± 0,00	0,37	± 0,00	0,49	± 0,02	0,60	± 0,01
<b>Pgm</b>	0,01	± 0,01	0,31	± 0,00	0,40	± 0,03	0,48	± 0,00
<b>Pyk</b>	0,01	± 0,00	0,30	± 0,02	0,40	± 0,03	0,48	± 0,00
<b>Tkt</b>	0,01	± 0,00	0,25	± 0,02	0,33	± 0,02	0,45	± 0,00
<b>Ldh</b>	0,01	± 0,00	0,29	± 0,01	0,38	± 0,03	0,49	± 0,00
<b>BSA</b>	0,02	± 0,00	0,01	± 0,06	0,02	± 0,05	0,03	± 0,04
Antigen	<b>Fibronectin</b>							
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)							
	0 µg/ml		1,0 µg/ml		5,0 µg/ml		10,0 µg/ml	
<b>PdhA</b>	0,04	± 0,00	0,04	± 0,00	0,13	± 0,00	0,16	± 0,00
<b>PdhB</b>	0,01	± 0,00	0,04	± 0,00	0,12	± 0,01	0,17	± 0,00
<b>PdhC</b>	0,01	± 0,00	0,07	± 0,00	0,21	± 0,01	0,32	± 0,00

Anhang III- Daten

<b>GapA</b>	0,05	± 0,00	0,14	± 0,01	0,39	± 0,01	0,52	± 0,01
<b>Pgm</b>	0,02	± 0,00	0,02	± 0,00	0,03	± 0,00	0,04	± 0,00
<b>Pyk</b>	0,03	± 0,01	0,02	± 0,00	0,05	± 0,00	0,06	± 0,00
<b>Tkt</b>	0,01	± 0,00	0,04	± 0,00	0,13	± 0,00	0,19	± 0,00
<b>Ldh</b>	0,03	± 0,00	0,03	± 0,00	0,06	± 0,00	0,09	± 0,00
<b>BSA</b>	0,03	± 0,02	0,03	± 0,01	0,04	± 0,02	0,05	± 0,02
	<b>Fibrinogen</b>							
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)							
Antigen	<b>0 µg/ml</b>		<b>1,0 µg/ml</b>		<b>5,0 µg/ml</b>		<b>10,0 µg/ml</b>	
<b>PdhA</b>	0,05	± 0,00	0,10	± 0,00	0,18	± 0,03	0,23	± 0,00
<b>PdhB</b>	0,04	± 0,00	0,07	± 0,00	0,13	± 0,00	0,23	± 0,00
<b>PdhC</b>	0,04	± 0,00	0,08	± 0,01	0,16	± 0,02	0,21	± 0,00
<b>GapA</b>	0,09	± 0,01	0,43	± 0,05	0,97	± 0,10	1,33	± 0,01
<b>Pgm</b>	0,05	± 0,00	0,07	± 0,00	0,20	± 0,03	0,26	± 0,00
<b>Pyk</b>	0,12	± 0,00	0,17	± 0,01	0,54	± 0,04	0,71	± 0,00
<b>Tkt</b>	0,08	± 0,00	0,11	± 0,00	0,46	± 0,02	0,59	± 0,00
<b>Ldh</b>	0,11	± 0,00	0,14	± 0,00	0,37	± 0,04	0,48	± 0,00
<b>BSA</b>	0,10	± 0,05	0,04	± 0,02	0,05	± 0,00	0,04	± 0,02
	<b>Plasminogen</b>							
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)							
Antigen	<b>0 µg/ml</b>		<b>1,0 µg/ml</b>		<b>2,0 µg/ml</b>		<b>5,0 µg/ml</b>	
<b>PdhA</b>	0,02	± 0,00	0,70	± 0,02	0,80	± 0,01	0,83	± 0,01
<b>PdhB</b>	0,05	± 0,00	0,87	± 0,02	0,93	± 0,03	0,96	± 0,04
<b>PdhC</b>	0,02	± 0,00	0,48	± 0,01	0,69	± 0,01	0,75	± 0,01
<b>GapA</b>	0,01	± 0,00	0,40	± 0,01	0,68	± 0,03	0,70	± 0,06
<b>Pgm</b>	0,01	± 0,01	0,47	± 0,05	0,63	± 0,07	0,73	± 0,05
<b>Pyk</b>	0,01	± 0,00	0,42	± 0,01	0,62	± 0,01	0,69	± 0,07
<b>Tkt</b>	0,00	± 0,00	0,29	± 0,01	0,51	± 0,02	0,57	± 0,08
<b>Ldh</b>	0,01	± 0,00	0,51	± 0,01	0,70	± 0,02	0,78	± 0,06
<b>BSA</b>	0,01	± 0,01	0,00	± 0,02	0,01	± 0,02	0,01	± 0,05
	<b>Vitronektin</b>							
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)							
Antigen	<b>0 µg/ml</b>		<b>0,5 µg/ml</b>		<b>1,0 µg/ml</b>		<b>2,0 µg/ml</b>	
<b>PdhA</b>	0,07	± 0,02	0,25	± 0,06	0,28	± 0,04	0,34	± 0,05
<b>PdhB</b>	0,02	± 0,00	0,37	± 0,03	0,47	± 0,01	0,55	± 0,03
<b>PdhC</b>	0,04	± 0,00	0,31	± 0,04	0,39	± 0,03	0,47	± 0,03
<b>GapA</b>	0,08	± 0,00	0,41	± 0,02	0,47	± 0,02	0,49	± 0,01
<b>Pgm</b>	0,05	± 0,00	0,38	± 0,02	0,42	± 0,03	0,52	± 0,03
<b>Pyk</b>	0,10	± 0,00	0,40	± 0,01	0,46	± 0,01	0,47	± 0,02
<b>Tkt</b>	0,08	± 0,02	0,28	± 0,06	0,34	± 0,04	0,46	± 0,06
<b>Ldh</b>	0,07	± 0,00	0,26	± 0,02	0,36	± 0,02	0,43	± 0,01
<b>BSA</b>	0,01	± 0,00	0,02	± 0,00	0,07	± 0,02	0,05	± 0,02

### Anhang III- Daten

**Tabelle III- 9 Einfluss der monospezifischen Seren gegen oberflächenassoziierte glykolytische Enzyme auf die Interaktion zwischen den rekombinant hergestellten glykolytischen Enzymen und den humanen ECM-Proteinen.** Die glykolytischen Enzyme wurden als Antigen verwendet (15 µg/ml). Anschließend erfolgte die Zugabe der vorinkubierten humanen ECM-Proteine, welche zuvor 2 h mit den monospezifischen Seren vorinkubiert wurden. Als Negativkontrolle diente die Vorinkubation mit dem Präimmunsrum (PIS).

		<b>Laktoferrin</b>		
		Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)		
Antigen		<b>Laktoferrin/PIS</b>	<b>Laktoferrin/Serum</b>	<b>Relative Bindung [%]</b>
<b>PdhA</b>		0,59 ± 0,02	0,38 ± 0,01	64,8
<b>PdhB</b>		1,04 ± 0,10	0,58 ± 0,03	55,7
<b>PdhC</b>		0,12 ± 0,00	0,13 ± 0,01	109,0
<b>GapA</b>		0,72 ± 0,03	0,40 ± 0,04	56,2
<b>Pyk</b>		0,49 ± 0,11	0,35 ± 0,02	71,6
		<b>Plasminogen</b>		
		Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)		
Antigen		<b>Plasminogen/PIS</b>	<b>Plasminogen/Serum</b>	<b>Relative Bindung [%]</b>
<b>PdhA</b>		1,17 ± 0,06	0,36 ± 0,01	31,2
<b>PdhB</b>		1,29 ± 0,05	0,16 ± 0,03	12,3
<b>PdhC</b>		1,19 ± 0,09	0,48 ± 0,07	40,2
<b>GapA</b>		1,01 ± 0,02	0,18 ± 0,00	17,9
<b>Pgm</b>		1,21 ± 0,07	0,09 ± 0,01	7,2
<b>Pyk</b>		0,84 ± 0,04	0,07 ± 0,01	8,4
<b>Tkt</b>		0,78 ± 0,02	0,09 ± 0,01	12,0
<b>Ldh</b>		1,31 ± 0,03	0,53 ± 0,03	40,3
		<b>Vitronektin</b>		
		Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)		
Antigen		<b>Vitronektin/PIS</b>	<b>Vitronektin/Serum</b>	<b>Relative Bindung [%]</b>
<b>PdhA</b>		0,73 ± 0,03	0,25 ± 0,03	35,0
<b>PdhB</b>		1,05 ± 0,01	0,39 ± 0,03	37,6
<b>PdhC</b>		0,51 ± 0,03	0,29 ± 0,01	56,9
<b>GapA</b>		1,48 ± 0,09	0,34 ± 0,01	22,8
<b>Pgm</b>		0,56 ± 0,03	0,26 ± 0,03	46,2
<b>Pyk</b>		1,09 ± 0,03	0,16 ± 0,01	15,1
<b>Tkt</b>		0,42 ± 0,02	0,22 ± 0,01	52,0
<b>Ldh</b>		0,66 ± 0,02	0,27 ± 0,01	40,1
		<b>Laminin</b>		
		Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)		
Antigen		<b>Laminin/PIS</b>	<b>Laminin/Serum</b>	<b>Relative Bindung [%]</b>
<b>PdhB</b>		0,40 ± 0,05	0,28 ± 0,01	70,7
<b>PdhC</b>		0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,01	81,7
<b>GapA</b>		0,81 ± 0,11	0,21 ± 0,03	25,8
<b>Pgm</b>		0,34 ± 0,02	0,26 ± 0,03	77,0
<b>Pyk</b>		0,82 ± 0,05	0,10 ± 0,01	11,9
<b>Tkt</b>		0,53 ± 0,07	0,21 ± 0,01	38,6
<b>Ldh</b>		0,30 ± 0,01	0,23 ± 0,01	77,0
		<b>Fibrinogen</b>		
		Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)		

Anhang III- Daten

Antigen	Fibrinogen/PIS		Fibrinogen/Serum		Relative Bindung [%]
<b>PdhA</b>	0,78	± 0,06	0,33	± 0,05	239,2
<b>PdhB</b>	0,87	± 0,05	0,24	± 0,02	27,7
<b>PdhC</b>	0,25	± 0,03	0,13	± 0,08	53,6
<b>GapA</b>	0,77	± 0,03	0,25	± 0,01	32,0
<b>Pgm</b>	0,80	± 0,03	0,38	± 0,02	46,8
<b>Pyk</b>	0,94	± 0,07	0,29	± 0,12	30,7
<b>Tkt</b>	1,35	± 0,03	0,22	± 0,01	16,3
<b>Ldh</b>	0,42	± 0,03	0,22	± 0,01	52,5
	<b>Fibronektin</b>				
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)				
Antigen	Fibronektin/PIS		Fibronektin/Serum		
<b>PdhC</b>	0,17	± 0,00	0,05	± 0,01	27,9
<b>GapA</b>	0,38	± 0,04	0,05	± 0,00	12,0

**Tabelle III- 10** Beeinflussung der Plasminogenbindung an die glykolytischen Enzyme von *M. pneumoniae* durch die Zugabe von 6-Aminohexansäure. Die rekombinanten Proteine wurden als Antigen verwendet (15 µg/ml). Die Inkubation mit 2,5 µg/ml Plasminogen erfolgte unter Zugabe von 6-Aminohexansäure (ACA). Als Positivkontrolle wurde die Plasminogenbindung in PBS untersucht.

Antigen	Plasminogen			
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)			
	0 mM ACA	1,0 mM ACA	2,5 mM ACA	10,0 mM ACA
<b>PdhA</b>	1,35 ± 0,04	0,93 ± 0,05	0,74 ± 0,03	0,63 ± 0,07
<b>PdhB</b>	1,59 ± 0,03	1,13 ± 0,03	0,95 ± 0,04	0,73 ± 0,04
<b>PdhC</b>	0,64 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,11 ± 0,01
<b>GapA</b>	1,54 ± 0,08	1,27 ± 0,09	1,02 ± 0,09	0,79 ± 0,18
<b>Ldh</b>	1,67 ± 0,12	1,32 ± 0,07	0,96 ± 0,08	0,79 ± 0,08
<b>Tkt</b>	1,38 ± 0,11	1,21 ± 0,11	0,91 ± 0,11	0,77 ± 0,08
<b>Pyk</b>	1,61 ± 0,07	1,32 ± 0,06	1,04 ± 0,06	0,86 ± 0,05
<b>Pgm</b>	1,74 ± 0,08	1,38 ± 0,21	1,26 ± 0,06	1,00 ± 0,03
<b>PdhB-P3</b>	1,42 ± 0,06	1,40 ± 0,07	1,40 ± 0,07	1,39 ± 0,08

Anhang III- Daten

**Tabelle III- 11** Beeinflussung der Interaktion zwischen glykolytischen Enzymen und humanen Proteinen durch NaCl, NaBr und CaCl<sub>2</sub>. Die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme wurden als Antigen verwendet (15 µg/ml). Die Inkubation der ECM-Proteine erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen an NaCl, NaBr, CaCl<sub>2</sub> (62,5; 125; 250; 350; 650 mM) in PBS. Als Positivkontrolle wurde der Einfluss ohne Salz (PBS) verwendet.

Antigen	Laktoferrin						
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)						
	PBS	62.5 mM NaCl	125 mM NaCl	250 mM NaCl	350 mM NaCl	650 mM NaCl	
<b>PdhA</b>	0,51 ± 0,04	0,49 ± 0,06	0,27 ± 0,04	0,11 ± 0,03	0,10 ± 0,03	0,10 ± 0,02	
<b>PdhB</b>	0,61 ± 0,02	0,51 ± 0,06	0,27 ± 0,05	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,05	0,08 ± 0,03	
<b>PdhC</b>	0,73 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,27 ± 0,00	0,22 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,00	
<b>GapA</b>	1,02 ± 0,08	0,66 ± 0,03	0,45 ± 0,05	0,39 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,16 ± 0,02	
<b>Pyk</b>	1,06 ± 0,07	0,69 ± 0,02	0,47 ± 0,10	0,33 ± 0,14	0,19 ± 0,10	0,13 ± 0,05	
Antigen	PBS	62.5 mM NaBr	125 mM NaBr	250 mM NaBr	350 mM NaBr	650 mM NaBr	
<b>PdhA</b>	0,44 ± 0,03	0,22 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,13 ± 0,04	0,08 ± 0,00	0,05 ± 0,01	
<b>PdhB</b>	0,50 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,00	
<b>PdhC</b>	0,32 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	
<b>GapA</b>	1,15 ± 0,03	0,74 ± 0,10	0,54 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,19 ± 0,00	0,12 ± 0,01	
<b>Pyk</b>	0,58 ± 0,04	0,36 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,15 ± 0,00	0,10 ± 0,01	0,07 ± 0,00	
Antigen	Plasminogen						
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)						
	PBS	62.5 mM NaCl	125 mM NaCl	250 mM NaCl	350 mM NaCl	650 mM NaCl	
<b>PdhA</b>	1,22 ± 0,04	1,11 ± 0,07	1,10 ± 0,10	1,11 ± 0,10	1,06 ± 0,13	1,11 ± 0,14	
<b>PdhB</b>	1,08 ± 0,03	0,95 ± 0,02	0,99 ± 0,03	1,01 ± 0,03	1,06 ± 0,05	1,12 ± 0,05	
<b>PdhC</b>	0,75 ± 0,08	0,70 ± 0,04	0,67 ± 0,09	0,65 ± 0,04	0,54 ± 0,08	0,41 ± 0,09	
<b>GapA</b>	1,03 ± 0,03	1,01 ± 0,09	0,92 ± 0,00	0,97 ± 0,01	0,87 ± 0,02	0,77 ± 0,00	
<b>Pgm</b>	1,39 ± 0,04	1,27 ± 0,06	1,29 ± 0,01	1,16 ± 0,14	0,97 ± 0,01	0,78 ± 0,06	
<b>Pyk</b>	1,33 ± 0,02	1,37 ± 0,01	1,20 ± 0,00	1,13 ± 0,01	1,08 ± 0,01	1,12 ± 0,00	
<b>Tkt</b>	1,01 ± 0,02	0,75 ± 0,02	0,64 ± 0,03	0,55 ± 0,01	0,43 ± 0,02	0,29 ± 0,00	
<b>Ldh</b>	1,20 ± 0,05	1,03 ± 0,05	0,99 ± 0,05	0,88 ± 0,02	0,87 ± 0,01	0,79 ± 0,01	
Antigen	PBS	62.5 mM NaBr	125 mM NaBr	250 mM NaBr	350 mM NaBr	650 mM NaBr	
<b>PdhA</b>	1,09 ± 0,02	1,07 ± 0,02	1,02 ± 0,02	0,91 ± 0,03	0,87 ± 0,02	0,71 ± 0,04	

Anhang III- Daten

<b>PdhB</b>	1,16	± 0,03	1,13	± 0,05	1,12	± 0,02	1,11	± 0,03	1,02	± 0,06	1,03	± 0,03
<b>PdhC</b>	0,58	± 0,01	0,43	± 0,01	0,35	± 0,01	0,19	± 0,01	0,14	± 0,01	0,09	± 0,00
<b>GapA</b>	0,89	± 0,03	0,81	± 0,05	0,85	± 0,03	0,76	± 0,01	0,74	± 0,01	0,62	± 0,02
<b>Pgm</b>	1,01	± 0,05	0,96	± 0,02	0,91	± 0,07	0,87	± 0,02	0,75	± 0,04	0,70	± 0,02
<b>Pyk</b>	0,93	± 0,05	0,96	± 0,03	0,94	± 0,02	0,88	± 0,02	0,85	± 0,00	0,79	± 0,01
<b>Tkt</b>	0,65	± 0,03	0,52	± 0,03	0,47	± 0,02	0,31	± 0,02	0,23	± 0,02	0,07	± 0,11
<b>Ldh</b>	0,75	± 0,13	0,75	± 0,03	0,71	± 0,01	0,64	± 0,02	0,58	± 0,02	0,50	± 0,02
	<b>Vitronektin</b>											
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)											
Antigen	<b>PBS</b>		<b>62.5 mM NaCl</b>		<b>125 mM NaCl</b>		<b>250 mM NaCl</b>		<b>350 mM NaCl</b>		<b>650 mM NaCl</b>	
<b>PdhA</b>	0,84	± 0,04	0,86	± 0,05	0,78	± 0,08	0,71	± 0,04	0,60	± 0,03	0,48	± 0,02
<b>PdhB</b>	1,05	± 0,02	1,03	± 0,04	0,88	± 0,05	0,65	± 0,03	0,57	± 0,02	0,45	± 0,02
<b>PdhC</b>	0,94	± 0,07	1,05	± 0,08	1,03	± 0,05	1,01	± 0,04	0,95	± 0,07	1,06	± 0,10
<b>GapA</b>	1,30	± 0,02	1,42	± 0,04	1,29	± 0,04	1,32	± 0,03	1,23	± 0,03	1,07	± 0,02
<b>Pgm</b>	1,03	± 0,01	1,02	± 0,03	1,02	± 0,01	1,06	± 0,02	1,15	± 0,04	1,05	± 0,01
<b>Pyk</b>	1,26	± 0,07	1,27	± 0,11	1,22	± 0,06	1,19	± 0,04	1,11	± 0,01	0,88	± 0,01
<b>Tkt</b>	0,93	± 0,02	1,00	± 0,05	0,92	± 0,05	1,00	± 0,02	0,94	± 0,01	0,71	± 0,01
<b>Ldh</b>	0,78	± 0,04	0,61	± 0,07	0,51	± 0,04	0,45	± 0,03	0,46	± 0,03	0,40	± 0,03
Antigen	<b>PBS</b>		<b>62.5 mM NaBr</b>		<b>125 mM NaBr</b>		<b>250 mM NaBr</b>		<b>350 mM NaBr</b>		<b>650 mM NaBr</b>	
<b>PdhA</b>	0,88	± 0,03	0,91	± 0,04	0,80	± 0,03	0,67	± 0,02	0,54	± 0,03	0,40	± 0,01
<b>PdhB</b>	0,53	± 0,02	0,62	± 0,02	0,54	± 0,02	0,41	± 0,04	0,35	± 0,00	0,22	± 0,02
<b>PdhC</b>	0,49	± 0,02	0,53	± 0,01	0,58	± 0,02	0,63	± 0,03	0,59	± 0,03	0,51	± 0,01
<b>GapA</b>	1,30	± 0,04	1,22	± 0,03	1,12	± 0,02	0,98	± 0,02	0,89	± 0,02	0,77	± 0,01
<b>Pgm</b>	0,72	± 0,02	0,80	± 0,02	0,66	± 0,01	0,52	± 0,01	0,42	± 0,02	0,29	± 0,01
<b>Pyk</b>	1,24	± 0,03	1,21	± 0,02	1,07	± 0,03	1,01	± 0,01	0,93	± 0,02	0,85	± 0,01
<b>Tkt</b>	0,77	± 0,04	0,82	± 0,03	0,74	± 0,05	0,64	± 0,01	0,54	± 0,02	0,39	± 0,02
<b>Ldh</b>	0,93	± 0,03	0,95	± 0,02	0,84	± 0,05	0,76	± 0,04	0,71	± 0,02	0,61	± 0,03
	<b>Laminin</b>											
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)											

Anhang III- Daten

Antigen	PBS	62.5 mM NaCl	125 mM NaCl	250 mM NaCl	350 mM NaCl	650 mM NaCl
<b>PdhB</b>	0,93 ± 0,04	0,52 ± 0,07	0,36 ± 0,04	0,28 ± 0,09	0,23 ± 0,08	0,16 ± 0,08
<b>PdhC</b>	0,94 ± 0,07	0,56 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,31 ± 0,02	0,26 ± 0,02	0,22 ± 0,03
<b>GapA</b>	1,80 ± 0,06	1,04 ± 0,06	0,70 ± 0,08	0,43 ± 0,05	0,29 ± 0,06	0,22 ± 0,05
<b>Pgm</b>	0,80 ± 0,04	0,50 ± 0,04	0,36 ± 0,02	0,31 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,17 ± 0,01
<b>Pyk</b>	1,32 ± 0,04	0,82 ± 0,05	0,58 ± 0,03	0,51 ± 0,04	0,33 ± 0,06	0,18 ± 0,04
<b>Tkt</b>	0,63 ± 0,04	0,33 ± 0,07	0,23 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,15 ± 0,03
<b>Ldh</b>	0,98 ± 0,05	0,47 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,17 ± 0,02
Antigen	PBS	62.5 mM NaBr	125 mM NaBr	250 mM NaBr	350 mM NaBr	650 mM NaBr
<b>PdhB</b>	0,93 ± 0,07	0,45 ± 0,09	0,55 ± 0,04	0,37 ± 0,04	0,33 ± 0,03	0,31 ± 0,01
<b>PdhC</b>	0,72 ± 0,06	0,44 ± 0,06	0,25 ± 0,07	0,25 ± 0,09	0,20 ± 0,08	0,01 ± 0,00
<b>GapA</b>	1,03 ± 0,07	0,88 ± 0,06	0,63 ± 0,03	0,40 ± 0,05	0,33 ± 0,07	0,22 ± 0,04
<b>Pgm</b>	0,90 ± 0,06	0,60 ± 0,05	0,65 ± 0,10	0,29 ± 0,07	0,21 ± 0,06	0,18 ± 0,06
<b>Pyk</b>	1,57 ± 0,07	1,09 ± 0,03	0,91 ± 0,03	0,12 ± 0,03	0,00 ± 0,04	0,00 ± 0,03
<b>Tkt</b>	1,05 ± 0,10	0,50 ± 0,05	0,52 ± 0,03	0,25 ± 0,04	0,19 ± 0,05	0,19 ± 0,06
<b>Ldh</b>	1,18 ± 0,05	0,73 ± 0,05	0,81 ± 0,05	0,46 ± 0,08	0,45 ± 0,06	0,34 ± 0,07
<b>Fibrinogen</b>						
Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)						
Antigen	PBS	62.5 mM NaCl	125 mM NaCl	250 mM NaCl	350 mM NaCl	650 mM NaCl
<b>PdhA</b>	0,46 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,52 ± 0,00
<b>PdhB</b>	0,41 ± 0,08	0,46 ± 0,06	0,44 ± 0,10	0,42 ± 0,08	0,51 ± 0,05	0,46 ± 0,05
<b>PdhC</b>	0,67 ± 0,02	0,59 ± 0,02	0,59 ± 0,04	0,54 ± 0,03	0,51 ± 0,05	0,51 ± 0,02
<b>GapA</b>	1,40 ± 0,06	0,95 ± 0,06	0,95 ± 0,08	0,89 ± 0,08	0,87 ± 0,06	1,00 ± 0,05
<b>Pgm</b>	0,35 ± 0,05	0,39 ± 0,05	0,39 ± 0,04	0,38 ± 0,05	0,38 ± 0,06	0,40 ± 0,03
<b>Pyk</b>	1,03 ± 0,03	0,71 ± 0,02	0,64 ± 0,01	0,82 ± 0,05	0,43 ± 0,03	0,43 ± 0,02
<b>Tkt</b>	0,46 ± 0,06	0,37 ± 0,07	0,48 ± 0,04	0,28 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,25 ± 0,02
<b>Ldh</b>	0,53 ± 0,07	0,46 ± 0,08	0,51 ± 0,04	0,48 ± 0,08	0,53 ± 0,04	0,60 ± 0,05
Antigen	PBS	62.5 mM NaBr	125 mM NaBr	250 mM NaBr	350 mM NaBr	650 mM NaBr
<b>PdhA</b>	0,40 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,30 ± 0,09	0,27 ± 0,05	0,28 ± 0,07	0,41 ± 0,05

Anhang III- Daten

<b>PdhB</b>	0,39 ± 0,03	0,29 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,21 ± 0,04	0,26 ± 0,04	0,40 ± 0,05
<b>PdhC</b>	0,30 ± 0,04	0,23 ± 0,04	0,21 ± 0,01	0,19 ± 0,04	0,25 ± 0,04	0,32 ± 0,06
<b>GapA</b>	0,63 ± 0,01	0,50 ± 0,03	0,46 ± 0,04	0,42 ± 0,05	0,43 ± 0,02	0,65 ± 0,04
<b>Pgm</b>	0,46 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,31 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,31 ± 0,04	0,46 ± 0,05
<b>Pyk</b>	0,23 ± 0,01	0,26 ± 0,05	0,21 ± 0,05	0,20 ± 0,02	0,27 ± 0,05	0,27 ± 0,06
<b>Tkt</b>	0,34 ± 0,03	0,28 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,23 ± 0,02	0,27 ± 0,02	0,46 ± 0,01
<b>Ldh</b>	0,45 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,23 ± 0,03	0,27 ± 0,03	0,28 ± 0,05	0,43 ± 0,02
Antigen	<b>PBS</b>	<b>62.5 mM CaCl<sub>2</sub></b>	<b>125 mM CaCl<sub>2</sub></b>	<b>250 mM CaCl<sub>2</sub></b>	<b>350 mM CaCl<sub>2</sub></b>	<b>650 mM CaCl<sub>2</sub></b>
<b>PdhA</b>		0,53 ± 0,04	0,41 ± 0,03	0,47 ± 0,01	0,48 ± 0,06	0,63 ± 0,03
<b>PdhB</b>		0,43 ± 0,03	0,31 ± 0,03	0,33 ± 0,06	0,35 ± 0,04	0,54 ± 0,02
<b>PdhC</b>		0,20 ± 0,04	0,22 ± 0,05	0,32 ± 0,06	0,47 ± 0,07	0,69 ± 0,05
<b>GapA</b>		0,46 ± 0,04	0,31 ± 0,03	0,35 ± 0,04	0,38 ± 0,03	0,64 ± 0,01
<b>Pgm</b>		0,29 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,25 ± 0,02	0,27 ± 0,05
<b>Pyk</b>		0,56 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,42 ± 0,05	0,59 ± 0,04
<b>Tkt</b>		0,57 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,37 ± 0,04
<b>Ldh</b>		0,31 ± 0,04	0,22 ± 0,01	0,26 ± 0,04	0,29 ± 0,02	0,53 ± 0,03
	<b>Fibronectin</b>					
	Mittelwert (OD <sub>450/620</sub> ±SD)					
Antigen	<b>PBS</b>	<b>62.5 mM NaCl</b>	<b>125 mM NaCl</b>	<b>250 mM NaCl</b>	<b>350 mM NaCl</b>	<b>650 mM NaCl</b>
<b>PdhC</b>	0,25 ± 0,04	0,20 ± 0,02	0,37 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,26 ± 0,04	0,31 ± 0,02
<b>GapA</b>	1,15 ± 0,04	1,05 ± 0,10	1,15 ± 0,05	1,05 ± 0,08	0,99 ± 0,05	0,84 ± 0,05
Antigen	<b>PBS</b>	<b>62.5 mM NaBr</b>	<b>125 mM NaBr</b>	<b>250 mM NaBr</b>	<b>350 mM NaBr</b>	<b>650 mM NaBr</b>
<b>PdhC</b>	0,27 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,04	0,13 ± 0,03
<b>GapA</b>	0,79 ± 0,03	0,67 ± 0,03	0,71 ± 0,04	0,54 ± 0,04	0,49 ± 0,03	0,37 ± 0,03

## Anhang III- Daten

**Tabelle III- 12 Relative Bindung der humanen ECM-Proteinen an die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme in Abhängigkeit von der Besetzung der Bindungsstellen.** Die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme wurden als Antigen immobilisiert (15 µg/ml). (Daten basierend auf OD<sub>450/620</sub>).

	Kombination	Antigen relative Adhärenz [%]±SD [%]															
		PdhA		PdhB		PdhC		GapA		Ldh		Tkt		Pyk		Pgm	
<b>Laktoferrin</b>	<b>Lf + BSA</b>	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00					100,00	± 0,00		
	<b>Lf + PdhA</b>	131,58	± 7,81	348,65	± 8,76	5,33	± 0,00	95,26	± 3,18					97,17	± 8,29		
	<b>Lf + PdhB</b>	73,02	± 7,39	53,26	± 0,00	43,60	± 0,00	62,42	± 2,46					100,40	± 5,45		
	<b>Lf + PdhC</b>	50,36	± 3,88	83,04	± 10,72	3,06	± 2,41	68,10	± 1,93					67,81	± 5,41		
	<b>Lf + GapA</b>	51,60	± 9,65	33,77	± 7,64	99,11	± 0,00	94,48	± 5,23					86,25	± 4,53		
	<b>Lf + Pyk</b>	52,10	± 3,05	61,67	± 9,56	462,50	± 0,00	60,94	± 2,97					67,37	± 0,69		
<b>Laminin</b>	<b>Ln + BSA</b>			100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00
	<b>Ln + PdhB</b>			2,58	± 1,12	5,40	± 2,12	2,50	± 0,23	1,67	± 0,30	2,08	± 0,33	2,11	± 0,38	1,76	± 0,68
	<b>Ln + PdhC</b>			60,90	± 4,14	159,36	± 17,22	134,90	± 5,56	58,72	± 6,45	54,90	± 7,77	104,36	± 4,65	100,10	± 7,33
	<b>Ln + GapA</b>			10,56	± 4,17	29,60	± 6,06	5,88	± 0,81	5,66	± 0,65	5,18	± 1,37	4,56	± 0,77	7,14	± 0,87
	<b>Ln + Ldh</b>			8,76	± 4,09	14,62	± 7,27	6,98	± 0,97	9,20	± 2,06	7,59	± 1,41	5,74	± 0,53	8,90	± 1,91
	<b>Ln + Tkt</b>			12,39	± 3,34	15,90	± 5,13	7,66	± 1,61	7,00	± 1,36	6,99	± 0,98	6,18	± 0,90	8,75	± 1,72
	<b>Ln + Pyk</b>			12,53	± 2,14	14,56	± 10,24	9,14	± 1,73	7,86	± 2,41	7,32	± 1,96	8,77	± 1,59	11,03	± 3,01
	<b>Ln + Pgm</b>			20,79	± 1,42	35,29	± 8,96	19,15	± 1,42	22,54	± 3,74	24,64	± 1,76	14,73	± 2,41	17,81	± 5,07
<b>Fibronektin</b>	<b>Fc + BSA</b>					100,00	± 0,00	100,00	± 0,00								
	<b>Fc + PdhC</b>					32,33	± 3,02	35,30	± 4,00								
	<b>Fc + GapA</b>					12,44	± 2,61	6,24	± 2,54								
<b>Fibrinogen</b>	<b>Fn + BSA</b>	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00
	<b>Fn + PdhA</b>	35,41	± 6,10	0,00	± 8,60	26,06	± 9,06	62,14	± 8,32	0,00	± 10,05	7,85	± 10,75	49,50	± 10,28	32,52	± 3,19
	<b>Fn + PdhB</b>	40,63	± 10,33	24,11	± 9,75	30,13	± 4,12	59,73	± 8,24	27,23	± 9,70	74,22	± 10,58	86,86	± 10,80	66,86	± 10,28
	<b>Fn + PdhC</b>	31,30	± 7,29	3,28	± 6,19	25,53	± 7,05	62,43	± 2,64	0,00	± 9,19	14,71	± 8,49	43,51	± 5,33	38,54	± 4,09
	<b>Fn + GapA</b>	43,99	± 2,62	28,31	± 9,61	44,07	± 3,96	54,62	± 4,18	13,41	± 8,09	37,50	± 8,86	51,56	± 8,56	76,21	± 6,89
	<b>Fn + Ldh</b>	23,58	± 5,14	24,77	± 2,95	17,87	± 2,06	35,11	± 6,06	27,19	± 9,70	44,26	± 6,96	57,16	± 9,56	43,51	± 5,36
	<b>Fn + Tkt</b>	57,27	± 0,80	43,54	± 8,54	56,30	± 3,88	69,00	± 9,12	26,07	± 9,22	54,72	± 7,16	66,18	± 6,95	61,79	± 8,20
	<b>Fn+ Pyk</b>	73,33	± 5,77	57,24	± 8,99	97,20	± 10,28	61,45	± 5,57	38,97	± 4,29	74,35	± 7,18	52,76	± 2,82	60,84	± 5,75
	<b>Fn + Pgm</b>	74,76	± 6,03	57,64	± 9,31	62,75	± 8,16	78,87	± 1,65	52,22	± 5,18	82,03	± 7,65	75,18	± 5,43	67,60	± 7,55
<b>Plasminogen</b>	<b>Plg + BSA</b>	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00
	<b>Plg + PdhA</b>	29,76	± 0,47	94,47	± 1,97	3,63	± 0,12	15,06	± 0,91	14,96	± 1,33	6,35	± 0,35	10,01	± 0,52	33,38	± 2,19
	<b>Plg + PdhB</b>	15,77	± 1,00	78,99	± 1,96	3,85	± 0,38	11,99	± 1,19	10,13	± 1,58	7,84	± 0,42	9,13	± 0,72	12,97	± 1,07
	<b>Plg + PdhC</b>	56,78	± 4,11	92,31	± 1,30	20,55	± 2,43	77,09	± 2,98	77,57	± 2,80	60,69	± 1,96	69,83	± 2,40	74,15	± 3,49

### Anhang III- Daten

	<b>Plg + GapA</b>	48,92 ± 2,13	90,60 ± 2,32	9,63 ± 0,68	30,84 ± 1,57	26,76 ± 2,10	15,99 ± 0,99	17,79 ± 0,84	52,89 ± 2,64
	<b>Plg + Ldh</b>	47,56 ± 0,94	90,71 ± 2,22	9,78 ± 1,41	30,90 ± 1,69	27,47 ± 4,73	16,93 ± 0,54	21,01 ± 2,98	55,26 ± 2,99
	<b>Plg + Tkt</b>	29,76 ± 1,08	88,16 ± 1,54	6,19 ± 0,71	19,81 ± 1,32	19,25 ± 0,61	11,03 ± 0,43	13,04 ± 0,77	36,14 ± 1,27
	<b>Plg + Pyk</b>	66,62 ± 2,63	93,54 ± 2,06	11,58 ± 1,99	42,31 ± 4,40	38,13 ± 1,77	23,36 ± 2,01	25,67 ± 2,15	60,74 ± 2,59
	<b>Plg + Pgm</b>	29,76 ± 1,12	88,16 ± 4,59	6,19 ± 0,31	19,81 ± 1,47	19,25 ± 1,49	11,03 ± 0,50	13,04 ± 0,56	36,14 ± 1,12
<b>Vitronektin</b>	<b>Vc + BSA</b>	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
	<b>Vc + PdhA</b>	79,82 ± 4,97	66,27 ± 9,31	35,47 ± 18,85	106,26 ± 2,32	106,33 ± 3,66	76,78 ± 4,49	95,54 ± 2,90	96,74 ± 1,39
	<b>Vc + PdhB</b>	63,41 ± 4,86	45,00 ± 5,74	15,40 ± 15,15	101,77 ± 1,60	100,02 ± 1,3	63,70 ± 4,05	79,19 ± 3,46	87,49 ± 2,50
	<b>Vc + PdhC</b>	93,84 ± 15,06	105,76 ± 16,37	104,37 ± 15,19	101,34 ± 2,81	97,50 ± 5,23	107,70 ± 6,32	102,57 ± 7,06	100,13 ± 3,27
	<b>Vc + GapA</b>	85,84 ± 3,88	67,74 ± 5,62	37,28 ± 3,64	115,03 ± 5,29	114,12 ± 7,65	103,38 ± 4,85	101,94 ± 5,11	111,27 ± 3,37
	<b>Vc + Ldh</b>	59,01 ± 3,42	54,54 ± 5,66	-19,07 ± 7,09	91,68 ± 1,17	89,62 ± 2,16	52,79 ± 3,55	80,81 ± 3,40	82,26 ± 2,03
	<b>Vc + Tkt</b>	15,86 ± 1,65	11,60 ± 1,71	2,19 ± 0,67	38,94 ± 1,54	32,37 ± 1,5	20,41 ± 1,77	20,36 ± 2,04	33,91 ± 3,24
	<b>Vc + Pyk</b>	53,83 ± 5,84	55,97 ± 5,03	42,75 ± 3,16	84,07 ± 3,88	81,53 ± 4,92	73,55 ± 3,93	54,31 ± 2,50	82,40 ± 5,23
	<b>Vc + Pgm</b>	90,50 ± 5,33	85,15 ± 4,06	48,81 ± 2,46	105,98 ± 1,61	107,52 ± 4,99	94,75 ± 8,87	88,19 ± 7,04	103,65 ± 4,56

Anhang III- Daten

Tabelle III- 13 Signifikanzniveau der relativen Bindung der humanen ECM-Proteinen an die rekombinant hergestellten glykolytischen Enzyme in Abhängigkeit von der Besetzung der Bindungsstellen (Tabelle III-12). *t*-Test bezogen auf Kontrolle mit BSA: \* $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$

	Kombination	Signifikanz									
		<i>p</i>									
		<u>PdhA</u>	<u>PdhB</u>	<u>PdhC</u>	<u>GapA</u>	<u>Ldh</u>	<u>Tkt</u>	<u>Pyk</u>	<u>Pgm</u>		
<b>Laktoferrin</b>	<b>Lf + PdhA</b>	0,665	0,869	0,356	0,626			0,018	*		
	<b>Lf + PdhB</b>	0,002 **	0,031 *	0,025 *	0,002 **			0,005	**		
	<b>Lf + PdhC</b>	0,002 **	0,065	0,342	0,011 *			0,001	***		
	<b>Lf + GapA</b>	0,003 **	0,517	0,802	0,172			0,430			
	<b>Lf + Pyk</b>	0,001 ***	0,011 *	0,014 *	0,001 ***			0,002	**		
<b>Laminin</b>	<b>Ln + PdhB</b>		0,001 ***	0,002 **	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***
	<b>Ln + PdhC</b>		0,001 ***	0,004 **	0,159	0,004 **	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***
	<b>Ln + GapA</b>		0,001 ***	0,001 ***	0,005 **	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***
	<b>Ln + Ldh</b>		0,001 ***	0,030 *	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***
	<b>Ln + Tkt</b>		0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***
	<b>Ln + Pyk</b>		0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***
	<b>Ln + Pgm</b>		0,001 ***	0,013 *	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***
<b>Fibronektin</b>	<b>Fc + PdhC</b>			0,002	0,001						
	<b>Fc + GapA</b>			0,002	0,000						
<b>Fibrinogen</b>	<b>Fn + PdhA</b>	0,002 **	0,004 **	0,006 **	0,010 **	0,038 *	0,009 **	0,015 *	*	0,027 *	*
	<b>Fn + PdhB</b>	0,003 **	0,005 **	0,003 **	0,057	0,196	0,079	0,345		0,036	*
	<b>Fn + PdhC</b>	0,013 *	0,002 **	0,003 **	0,001 ***	0,084	0,005 **	0,002 **	**	0,004	**
	<b>Fn + GapA</b>	0,001 ***	0,001 ***	0,007 **	0,002 **	0,026 *	0,005 **	0,006 **	**	0,021	**
	<b>Fn + Ldh</b>	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 **	0,006 **	0,009 **	0,054		0,006	**
	<b>Fn + Tkt</b>	0,002 **	0,001 ***	0,001 ***	0,115	0,072	0,009 **	0,001 ***	***	0,002	**
	<b>Fn + Pyk</b>	0,023 *	0,003 **	0,945	0,008 **	0,049 *	0,007 **	0,001 ***	***	0,007	**
	<b>Fn + Pgm</b>	0,010 **	0,028 *	0,006 **	0,085	0,082	0,081	0,027	**	0,014	*
<b>Plasminogen</b>	<b>Plg + PdhA</b>	0,001 ***	0,002 **	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	***	0,001	***
	<b>Plg + PdhB</b>	0,001 ***	0,002 **	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	***	0,001	***

Anhang III- Daten

	<b>Plg + PdhC</b>	0,001 ***	0,035 *	0,001 ***	0,001 ***	0,002 **	0,001 ***	0,001 ***	0,003 **
	<b>Plg + GapA</b>	0,001 ***	0,045 *	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***
	<b>Plg + Ldh</b>	0,001 ***	0,054	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***
	<b>Plg + Tkt</b>	0,001 ***	0,010 **	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***
	<b>Plg + Pyk</b>	0,001 ***	0,014 *	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***
	<b>Plg + Pgm</b>	0,001 ***	0,066	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***
<b>Vitronektin</b>	<b>Vc + PdhA</b>	0,018 *	0,003 **	0,011 *	0,086	0,074	0,03 *	0,069	0,011 *
	<b>Vc + PdhB</b>	0,003 **	0,006 **	0,007 **	0,993	0,06	0,024 **	0,03 *	0,003 **
	<b>Vc + PdhC</b>	0,291	0,628	0,563	0,478	0,153	0,967	0,602	0,190
	<b>Vc + GapA</b>	0,067	0,083	0,003 **	0,095	0,640	0,019	0,044 *	0,578
	<b>Vc + Ldh</b>	0,001 ***	0,004 **	0,001 ***	0,095	0,006 **	0,001 ***	0,021	0,001 ***
	<b>Vc + Tkt</b>	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***	0,001 ***
	<b>Vc + Pyk</b>	0,001 ***	0,003 **	0,002 **	0,021 **	0,001 ***	0,001 ***	0,014 *	0,005 **
	<b>Vc + Pgm</b>	0,056	0,008 **	0,008 **	0,141	0,058	0,240	0,141	0,302

### Anhang III- Daten

**Tabelle III- 14 Aktivierung von Plasminogen nach Interaktion mit den rekombinant hergestellten glykolytischen Enzymen von *M. pneumoniae* sowie der Vergleich des Einflusses der Aktivatoren auf den zeitlichen Verlauf der Plasminbildung.** Die rekombinanten Proteine sowie *M. pneumoniae*-Gesamtantigen bzw. die Membranfraktion des Gesamtproteins (Membran) wurden mit einer Konzentration von 10 µg/ml immobilisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von humanen Plasminogen (Plg, 15 µg/ml) sowie den Plasminogen-Aktivatoren (5 ng/well) und des Plasmin-spezifischen Substrates D-Val-Leu-Lys-4-Nitronanilin Dihydrochlorid (S).

	Kombination	Antigen															
		relative Adhärenz [%] +SD [%]															
		PdhA		PdhB		PdhC		GapA		Ldh		Tkt		Pyk		Pgm	
<b>Laktoferrin</b>	<b>Lf + BSA</b>	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00					100,00	± 0,00		
	<b>Lf + PdhA</b>	131,58	± 7,81	348,65	± 8,76	5,33	± 0,00	95,26	± 3,18					97,17	± 8,29		
	<b>Lf + PdhB</b>	73,02	± 7,39	53,26	± 0,00	43,60	± 0,00	62,42	± 2,46					100,40	± 5,45		
	<b>Lf + PdhC</b>	50,36	± 3,88	83,04	± 10,72	3,06	± 2,41	68,10	± 1,93					67,81	± 5,41		
	<b>Lf + GapA</b>	51,60	± 9,65	33,77	± 7,64	99,11	± 0,00	94,48	± 5,23					86,25	± 4,53		
	<b>Lf + Pyk</b>	52,10	± 3,05	61,67	± 9,56	462,50	± 0,00	60,94	± 2,97					67,37	± 0,69		
<b>Laminin</b>	<b>Ln + BSA</b>			100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00
	<b>Ln + PdhB</b>			2,58	± 1,12	5,40	± 2,12	2,50	± 0,23	1,67	± 0,30	2,08	± 0,33	2,11	± 0,38	1,76	± 0,68
	<b>Ln + PdhC</b>			60,90	± 4,14	159,36	± 17,22	134,90	± 5,56	58,72	± 6,45	54,90	± 7,77	104,36	± 4,65	100,10	± 7,33
	<b>Ln + GapA</b>			10,56	± 4,17	29,60	± 6,06	5,88	± 0,81	5,66	± 0,65	5,18	± 1,37	4,56	± 0,77	7,14	± 0,87
	<b>Ln + Ldh</b>			8,76	± 4,09	14,62	± 7,27	6,98	± 0,97	9,20	± 2,06	7,59	± 1,41	5,74	± 0,53	8,90	± 1,91
	<b>Ln + Tkt</b>			12,39	± 3,34	15,90	± 5,13	7,66	± 1,61	7,00	± 1,36	6,99	± 0,98	6,18	± 0,90	8,75	± 1,72
	<b>Ln + Pyk</b>			12,53	± 2,14	14,56	± 10,24	9,14	± 1,73	7,86	± 2,41	7,32	± 1,96	8,77	± 1,59	11,03	± 3,01
<b>Ln + Pgm</b>			20,79	± 1,42	35,29	± 8,96	19,15	± 1,42	22,54	± 3,74	24,64	± 1,76	14,73	± 2,41	17,81	± 5,07	
<b>Fibronektin</b>	<b>Fc + BSA</b>					100,00	± 0,00	100,00	± 0,00								
	<b>Fc + PdhC</b>					32,33	± 3,02	35,30	± 4,00								
	<b>Fc + GapA</b>					12,44	± 2,61	6,24	± 2,54								
<b>Fibrinogen</b>	<b>Fn + BSA</b>	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00
	<b>Fn + PdhA</b>	35,41	± 6,10	0,00	± 8,60	26,06	± 9,06	62,14	± 8,32	0,00	± 10,05	7,85	± 10,75	49,50	± 10,28	32,52	± 3,19
	<b>Fn + PdhB</b>	40,63	± 10,33	24,11	± 9,75	30,13	± 4,12	59,73	± 8,24	27,23	± 9,70	74,22	± 10,58	86,86	± 10,80	66,86	± 10,28
	<b>Fn + PdhC</b>	31,30	± 7,29	3,28	± 6,19	25,53	± 7,05	62,43	± 2,64	0,00	± 9,19	14,71	± 8,49	43,51	± 5,33	38,54	± 4,09
	<b>Fn + GapA</b>	43,99	± 2,62	28,31	± 9,61	44,07	± 3,96	54,62	± 4,18	13,41	± 8,09	37,50	± 8,86	51,56	± 8,56	76,21	± 6,89
	<b>Fn + Ldh</b>	23,58	± 5,14	24,77	± 2,95	17,87	± 2,06	35,11	± 6,06	27,19	± 9,70	44,26	± 6,96	57,16	± 9,56	43,51	± 5,36
	<b>Fn + Tkt</b>	57,27	± 0,80	43,54	± 8,54	56,30	± 3,88	69,00	± 9,12	26,07	± 9,22	54,72	± 7,16	66,18	± 6,95	61,79	± 8,20
	<b>Fn+ Pyk</b>	73,33	± 5,77	57,24	± 8,99	97,20	± 10,28	61,45	± 5,57	38,97	± 4,29	74,35	± 7,18	52,76	± 2,82	60,84	± 5,75
	<b>Fn + Pgm</b>	74,76	± 6,03	57,64	± 9,31	62,75	± 8,16	78,87	± 1,65	52,22	± 5,18	82,03	± 7,65	75,18	± 5,43	67,60	± 7,55
<b>Plasminogen</b>	<b>Plg + BSA</b>	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00
	<b>Plg + PdhA</b>	29,76	± 0,47	94,47	± 1,97	3,63	± 0,12	15,06	± 0,91	14,96	± 1,33	6,35	± 0,35	10,01	± 0,52	33,38	± 2,19

### Anhang III- Daten

	<b>Plg + PdhB</b>	15,77	± 1,00	78,99	± 1,96	3,85	± 0,38	11,99	± 1,19	10,13	± 1,58	7,84	± 0,42	9,13	± 0,72	12,97	± 1,07
	<b>Plg + PdhC</b>	56,78	± 4,11	92,31	± 1,30	20,55	± 2,43	77,09	± 2,98	77,57	± 2,80	60,69	± 1,96	69,83	± 2,40	74,15	± 3,49
	<b>Plg + GapA</b>	48,92	± 2,13	90,60	± 2,32	9,63	± 0,68	30,84	± 1,57	26,76	± 2,10	15,99	± 0,99	17,79	± 0,84	52,89	± 2,64
	<b>Plg + Ldh</b>	47,56	± 0,94	90,71	± 2,22	9,78	± 1,41	30,90	± 1,69	27,47	± 4,73	16,93	± 0,54	21,01	± 2,98	55,26	± 2,99
	<b>Plg + Tkt</b>	29,76	± 1,08	88,16	± 1,54	6,19	± 0,71	19,81	± 1,32	19,25	± 0,61	11,03	± 0,43	13,04	± 0,77	36,14	± 1,27
	<b>Plg + Pyk</b>	66,62	± 2,63	93,54	± 2,06	11,58	± 1,99	42,31	± 4,40	38,13	± 1,77	23,36	± 2,01	25,67	± 2,15	60,74	± 2,59
	<b>Plg + Pgm</b>	29,76	± 1,12	88,16	± 4,59	6,19	± 0,31	19,81	± 1,47	19,25	± 1,49	11,03	± 0,50	13,04	± 0,56	36,14	± 1,12
<b>Vitronektin</b>	<b>Vc + BSA</b>	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00	100,00	± 0,00
	<b>Vc + PdhA</b>	79,82	± 4,97	66,27	± 9,31	35,47	± 18,85	106,26	± 2,32	106,33	± 3,66	76,78	± 4,49	95,54	± 2,90	96,74	± 1,39
	<b>Vc + PdhB</b>	63,41	± 4,86	45,00	± 5,74	15,40	± 15,15	101,77	± 1,60	100,02	± 1,3	63,70	± 4,05	79,19	± 3,46	87,49	± 2,50
	<b>Vc + PdhC</b>	93,84	± 15,06	105,76	± 16,37	104,37	± 15,19	101,34	± 2,81	97,50	± 5,23	107,70	± 6,32	102,57	± 7,06	100,13	± 3,27
	<b>Vc + GapA</b>	85,84	± 3,88	67,74	± 5,62	37,28	± 3,64	115,03	± 5,29	114,12	± 7,65	103,38	± 4,85	101,94	± 5,11	111,27	± 3,37
	<b>Vc + Ldh</b>	59,01	± 3,42	54,54	± 5,66	-19,07	± 7,09	91,68	± 1,17	89,62	± 2,16	52,79	± 3,55	80,81	± 3,40	82,26	± 2,03
	<b>Vc + Tkt</b>	15,86	± 1,65	11,60	± 1,71	2,19	± 0,67	38,94	± 1,54	32,37	± 1,5	20,41	± 1,77	20,36	± 2,04	33,91	± 3,24
	<b>Vc + Pyk</b>	53,83	± 5,84	55,97	± 5,03	42,75	± 3,16	84,07	± 3,88	81,53	± 4,92	73,55	± 3,93	54,31	± 2,50	82,40	± 5,23
	<b>Vc + Pgm</b>	90,50	± 5,33	85,15	± 4,06	48,81	± 2,46	105,98	± 1,61	107,52	± 4,99	94,75	± 8,87	88,19	± 7,04	103,65	± 4,56

## Wissenschaftliche Beiträge

### Fachzeitschriften:

1. Gründel A., Jacobs E., Dumke R., 2016. Interactions of surface-displayed glycolytic enzymes of *Mycoplasma pneumoniae* with components of the human extracellular matrix. Submitted to: International Journal of Medical Microbiology.
2. Gründel A., Pfeiffer M., Jacobs E., Dumke R., 2016. Network of surface-displayed glycolytic enzymes in *Mycoplasma pneumoniae* and their interactions with human plasminogen. Infection and Immunity. 84, 666-676.
3. Gründel A., Friedrich K., Pfeiffer M., Jacobs E., Dumke R., 2015. Subunits of the Pyruvate Dehydrogenase Cluster of *Mycoplasma pneumoniae* Are Surface-Displayed Proteins that Bind and Activate Human Plasminogen. PLoS One 10(5), e0126600
4. Wolf S., Reetz W., Hoffmann K., Gründel A., Schwarz BA., Hänel I., Otto PH., 2012. Discovery and genetic characterization of novel caliciviruses in German and Dutch poultry. Archives of Virology 157(8) 1499-507

### Buchbeiträge:

1. Gründel A., Friedrich K., Pfeiffer M., Jacobs E., Dumke R.. Pyruvate Dehydrogenase Subunit B and Plasminogen Binding in *Mycoplasma*. In: Moonlighting Proteins: Novel Virulence Factors in Bacterial Infections (Vorraussichtlich Dezember 2016)

## Kongressbeiträge:

1. Gründel A., Jacobs E., Dumke R., 2016. Interaction of surface-localized glycolytic enzymes of *Mycoplasma pneumoniae* with human vitronectin: binding characteristics and degradation. Poster, International Organization of Mycoplasmology, 21. Kongress, 03.-07.07.2016, Brisbane, Australien
2. Gründel A., Friedrich K., Pfeiffer M., Jacobs E., Dumke R., 2015. Die glykolytischen Enzyme von *Mycoplasma pneumoniae* in der Wirt-Erreger-Interaktion. Vortrag, Symposium der deutschsprachigen Mykoplasmen Sektion 2015, 24.-25.10.2015, Dresden, Deutschland
3. Gründel A., Lück K., Menzel S., Petzold M., Sarnow K., Dumke, R. Lück C., 2015. Phenotypic and genotypic characterization of a new Legionella species isolated from a cooling tower during the outbreak investigation in Ulm, Germany. Vortrag. Studiengruppe für Legionella Infektionen (ESGLI), 4. Jahrestagung, 16.-17.09.2016, London, Vereinigtes Königreich
4. Gründel A., Jacobs E., Dumke R., 2015. Surface exposed glycolytic proteins of *Mycoplasma pneumoniae* are able to bind human vitronectin. Vortrag, Deutsche Gesellschaft für Mikrobiologie und Hygiene e.V. (DGHM), 67. Jahrestagung, 27.30.09.2015, Münster, Deutschland
5. Gründel A., Jacobs E., Dumke R., 2015. Glycolytic enzymes as virulence factors in *Mycoplasma pneumoniae*. Vortrag, International Mycoplasma Meeting, Sektion 2015,03.-05.06.2015, Istanbul, Türkei
6. Gründel A., Jacobs E., Dumke R., 2014. The analysis of the localization of the glycolytic enzymes in *Mycoplasma pneumoniae*. Vortrag, Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V. (DGHM), 66. Jahrestagung, 05.-08.10.2014, Dresden, Deutschland

7. Gründel A. Friedrich K., Jacobs E., Dumke R., 2014. Investigation of the proteins of the pyruvate dehydrogenase complex in *Mycoplasma pneumoniae*. Vortrag, International Organization of Mycoplasmology, 20. Kongress, 01.-06.06.2014, Blumenau, Brasilien
8. Gründel A., Jacobs E., Dumke R., 2013. The PDH complex in *Mycoplasma pneumoniae*. Poster, Deutsche Gesellschaft für Mikrobiologie und Hygiene e.V. (DGHM), 65. Jahrestagung, 22.-25.9.2013, Rostock, Deutschland
9. Gründel A. Friedrich K., Jacobs E., Dumke R., 2013. Localization of the pyruvate dehydrogenase complex in *Mycoplasma pneumoniae*. Poster, Center für Regenerative Therapien (CRTD), 7. Sommer-Konferenz, 26.06.2013, Dresden, Deutschland

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität Dresden zwischen 2012-2016 unter der Betreuung von Frau. Prof. Dr. rer.nat. habil. Isolde Röske und Herr Prof. Dr. med. habil Enno Jacobs angefertigt.

### **Versicherung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der TU Dresden wird anerkannt.

Anne Gründel