

**MOLEKULARE, PHYLOGENETISCHE UND FUNKTIONELLE
ANALYSE MYKOPLASMALER HITZESCHOCKPROTEINE
UND UNTERSUCHUNGEN ZU DEREN EINFLUSS AUF
DIE IMMUNANTWORT UND PATHOGENESE VON
MYKOPLASMOSEN**

MARTIN RUNGE

**édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Mikrobiologie
Zentrum für Infektionsmedizin
der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover

MOLEKULARE, PHYLOGENETISCHE UND FUNKTIONELLE ANALYSE
MYKOPLASMALER HITZESCHOCKPROTEINE UND UNTERSUCHUNGEN ZU DEREN
EINFLUSS AUF DIE IMMUNANTWORT UND PATHOGENESE VON MYKOPLASMOSEN

HABILITATIONSSCHRIFT ZUR ERLANGUNG DER

VENIA LEGENDI

AN DER STIFTUNG TIERÄRZTLICHE HOCHSCHULE HANNOVER

vorgelegt von Dr. rer. nat. Martin Runge

Hannover 2005

Für Diana, Isabel und Elena

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Scherm, B., G.-F. Gerlach, and M. Runge. 2002. Analysis of heat shock protein 60 encoding genes of mycoplasmas and aspects for immunity and infection. *Vet. Microbiol.* 89 (2-3), 141-150.

Einige Aspekte der Arbeit wurden außerdem auf folgenden Tagungen präsentiert:

Deiters, U., M. Runge, R. Himmelreich, and H. Kirchhoff. Identification of heat-shock proteins in mycoplasmas. 10th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, Bordeaux, Frankreich, 19.-26.7.1994. Abstr. *IOM Letters* 3, 695-696, 1994.

Runge, M., B. Scherm, A. Schridde, and H. Kirchhoff. Characterization of heat-shock proteins from mycoplasmas and identification of DNA-fragments related to heat-shock protein-encoding genes. 11th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, Orlando, Florida, USA, 14.-19.7.1996. Abstr. *IOM Letters* 4, 148-149, 1996.

Runge, M. Untersuchungen zur Streßantwort von Mykoplasmen. Symposium „Mykoplasmen und Chlamydien sowie durch beide Erreger bedingte Krankheiten“ der Fachgruppe „Bakteriologie und bakterielle Krankheiten“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Schloß Beichlingen, 22.-23.4.1997.

Runge, M. Heat-shock proteins in mycoplasmas: Detection, biochemical characterization and their possible role in mycoplasmoses. Workshop der COST Action 826 „Mycoplasmas of ruminants“, Alghero, Sardinien, Italien, 11.-13.7.1997.

Runge, M. Identifizierung und Charakterisierung von Hitzeschockproteinen und Hitzeschockprotein-kodierenden Genen von Mykoplasmen. 1. Deutsches Mykoplasmen-Symposium, München, 30.10.-1.11.1997.

Scherm, B., J. Niewint, G.-F. Gerlach, R. Schmidt, und M. Runge. Analyse Hitzeschockprotein-kodierender Gene von Mykoplasmen und Gewinnung rekombinanter mykoplasmaaler Hitzeschockproteine. Minisymposium „Mikrobielle Pathogenität“ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Burg Rothenfels, 13.-15.5.1998.

Wedde, A., G.-F. Gerlach, B. Scherm, H. Kirchhoff, B. Huchzermeyer, and M. Runge. Characterization of the 60 kD-heat shock protein isolated from *Mycoplasma arthritidis* and *Mycoplasma bovis* and analysis of the antibody response to this heat shock protein. 12th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, Sydney, Australien, 22.-28.7.1998.

Scherm, B., G.-F. Gerlach, and M. Runge. Analysis of the Hsp60 encoding gene of different mycoplasmas. 12th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, Sydney, Australien, 22.-28.7.1998.

Niewint, J., G.-F. Gerlach, B. Scherm, and M. Runge. Analysis of the gene encoding for the 70 kD-heat shock protein of *Mycoplasma arthritidis* and *Mycoplasma bovis*. 12th International Congress of the International Organization for Mycoplasmaology, Sydney, Australien, 22.-28.7.1998.

Wedde, A., B. Scherm, G.-F. Gerlach, A. Sterner-Kock, and M. Runge. The influence of heat shock proteins on mycoplasma-induced arthritis. Internationales Symposium der COST Action 826 „Mycoplasmas of ruminants“, Toulouse, Frankreich, 2.-4.6.1999.

Scherm, B., G.-F. Gerlach, M. Ganter, R. Schmidt, and M. Runge. Induction of heat shock proteins after treatment of mycoplasmas with bronchoalveolar lavage fluid. Workshop der COST Action 826 „Mycoplasmas of ruminants“, Las Palmas, Gran Canaria, Spanien, 14.-16.6.2000.

Runge, M., and B. Scherm. Phylogenetic analysis of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on heat shock proteins. Workshop der COST Action 826 „Mycoplasmas of ruminants“. Las Palmas, Gran Canaria, Spanien, 14.-16.6.2000.

Runge, M. and B. Scherm. Taxonomic investigations of mycoplasmas based on a heat shock protein. 53. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Aachen, 30.9.-4.10.2001.

Anteile der Arbeit sind in den folgenden Monographien der Europäischen Union veröffentlicht:

Runge, M., B. Scherm, G.-F. Gerlach, and H. Kirchhoff. 1997. Heat-shock proteins in mycoplasmas: Detection, biochemical characterization and their possible role in mycoplasmoses. In: *Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. G. Leori, S. Santini, E. Scanziani and J. Frey (Hrsg.). Office for official publications of the European Communities, Brüssel, 2 (EUR 18018 EN), 20-21.

Wedde, A., G.-F. Gerlach, B. Scherm, and M. Runge. 1999. Isolation of the 60 kD-heat shock protein of *Mycoplasma arthritidis* and *Mycoplasma bovis* and detection of heat shock protein-specific antibodies in bovine sera. In: *Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. L. Stipkovits et al. (Hrsg.). Office for official publications of the European Communities, Brüssel, 3 (EUR 18756 EN), 90-93.

Scherm, B., J. Niewint, G.-F. Gerlach, F. Thiaucourt, and M. Runge. 1999. Characterization of the *hsp60* and *hsp70* genes of mycoplasmas. In: *Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. L. Stipkovits et al. (Hrsg.). Office for official publications of the European Communities, Brüssel, 3 (EUR 18756 EN), 47-49.

Wedde, A., B. Scherm, G.-F. Gerlach, A. Sterner-Kock, and M. Runge. 2000. The influence of heat shock proteins on mycoplasma-induced arthritis. In: *Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. D. Bergonier et al. (Hrsg.). Office for official publications of the European Communities, Brüssel, 4 (EUR 19245 EN), 247-250.

Scherm, B., G.-F. Gerlach, M. Ganter, R. Schmidt, and M. Runge. 2001. Increased synthesis of 60 kD heat shock protein after treatment of mycoplasmas with bronchoalveolar lavage fluid. In: *Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. J. B. Poveda et al. (Hrsg.). Office for official publications of the European Communities, Brüssel, 5 (EUR 19693), 77-79.

Runge, M., and B. Scherm. 2001. Phylogenetic relations of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the 70 kD heat shock protein: Preliminary results. In: *Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. J. B. Poveda et al. (Hrsg.). Office for official publications of the European Communities, Brüssel, 5 (EUR 19693), 80-83.

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	15
2	Schrifttum	17
2.1	Mykoplasmen	17
2.1.1	Biologie	17
2.1.2	Taxonomie und Phylogenie	19
2.1.3	Mykoplasmen als Krankheitserreger	22
2.1.4	Pathogenitätsmechanismen und Virulenzfaktoren	22
2.1.5	Beschreibung ausgewählter Mykoplasmenarten	24
2.2	Hitzeschockproteine	35
2.2.1	Funktion der Hitzeschockproteine	36
2.2.2	Die Hsp70- und Hsp60-Familie	37
2.2.3	Bedeutung von Hitzeschockproteinen im Verlauf von Infektionen und Erkrankungen	42
2.2.4	Hitzeschockproteine der Mykoplasmen	45
2.3	Zielsetzung	46
3	Material und Methoden	47
3.1	Geräte	47
3.2	Verbrauchsmaterialien	50
3.3	Chemikalien und Reagenzien	51
3.4	Antikörper	56
3.4.1	Primäre Antikörper	56
3.4.2	Sekundäre Antikörper	56
3.5	Bioinformatik	57
3.6	Universell verwendete Pufferlösungen	59
3.7	Mikrobiologische Methoden	59
3.7.1	Bakterien	59
3.7.2	Nährmedien	60
3.7.3	Kultivierung	63
3.8	Molekularbiologische Methoden	65
3.8.1	Präparation von chromosomaler DNA aus Mykoplasmen	65
3.8.2	Präparation von Plasmid-DNA	65
3.8.3	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten	66
3.8.4	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA	67
3.8.5	Agarose-Gelelektrophorese	67
3.8.6	DNA-Amplifikation	68
3.8.7	Sequenzierung von PCR-Produkten	72
3.8.8	Klonierungstechniken	74
3.8.9	Analyse von Plasmid-DNA	77
3.8.10	Expression rekombinanter mykoplasmales Hsp60- und Hsp70- Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteine	77

3.9	Proteinchemische und immunologische Methoden	79
3.9.1	Kolonieblot	79
3.9.2	Radioaktive Markierung und Induktion der Stressreaktion	80
3.9.3	Antigenpräparation und Proteinbestimmung	81
3.9.4	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	82
3.9.5	Zweidimensionale Gelelektrophorese	85
3.9.6	Nachweis der aufgetrennten Proteine	89
3.9.7	Herstellung von Antiseren	94
3.10	Funktionelle Untersuchungen	96
3.10.1	Untersuchungen zum Nachweis von Kreuzreaktionen mit eukaryontischen Zellen	96
3.10.2	Untersuchungen zur Reaktion von Rekonvaleszentenseren mit rekombinanten mykoplasmalen Hitzeschockproteinen	98
3.10.3	Untersuchungen zur Induktion von Zytokinen und Chemokinen durch rekombinante mykoplasmale Hitzeschockproteine	98
3.10.4	Untersuchungen zur Induktion einer Hitzeschockantwort durch bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit	104
3.11	Isolierung von Hitzeschockproteinen	105
3.11.1	Aufschluß der Bakterien für die Chromatographie	105
3.11.2	Untersuchungen zur ATPase-Aktivität	106
3.12	Tierversuche	107
3.12.1	Versuchstiere	107
3.12.2	Vorbereitung und Applikation des Immunisierungsmaterials	107
3.12.3	Aufbereitung des Infektionsmaterials und Infektion	108
3.12.4	Erhebung der klinischen Parameter	108
3.12.5	Tötung und Sektion	109
3.12.6	Histopathologie	109
3.12.7	Etablierung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays zum Nachweis einer Hitzeschockprotein-spezifischen Immunantwort	110
4	Ergebnisse	112
4.1	Nachweis von Hitzeschockproteinen bei Mykoplasmen	112
4.1.1	Ermittlung der logarithmischen Wachstumsphase	112
4.1.2	Thermische Inaktivierung der Mykoplasmen	113
4.1.3	Berechnung der dezimalen Reduktionszeit	115
4.1.4	Nachweis von Hitzeschockproteinen	115
4.2	Charakterisierung der mykoplasmalen Hitzeschockproteine	118
4.2.1	Biochemische Charakterisierung des Hsp60 und Hsp70	118
4.2.2	Sequenzierung von Amplifikationsprodukten des <i>hsp60</i> -Gens	121
4.2.3	Sequenzierung von Amplifikationsprodukten des <i>hsp70</i> -Gens	123
4.2.4	Taxonomische Einordnung	126
4.2.5	Reaktion Hsp60-spezifischer Seren	127
4.2.6	Isolierung der Hsp60 von <i>M. arthritidis</i> und <i>M. bovis</i>	127

4.2.7	Nachweis der ATPase-Aktivität bei nativem Hsp60 von <i>M. arthritidis</i> und <i>M. bovis</i>	134
4.3	Analyse der Immunreaktion gegen Hitzeschockproteine und der Bedeutung von Hitzeschockproteinen bei der Mykoplasmeninfektion	135
4.3.1	Klonierung und Expression von zwei Bereichen des <i>hsp60</i> -Gens von <i>M. arthritidis</i>	135
4.3.2	Klonierung und Expression eines <i>hsp70</i> -Genfragmentes von <i>M. arthritidis</i> und <i>M. bovis</i>	137
4.3.3	Reaktion von porcinen und bovinen Rekonvaleszentenseren mit rekombinanten mykoplasmalen Hitzeschockproteinen	140
4.3.4	Induktion des Hsp60 von <i>M. hyopneumoniae</i> durch bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit	144
4.3.5	Zytokinsekretion muriner Makrophagen nach Stimulation mit rekombinanten mykoplasmalen Hitzeschockproteinen	149
4.3.6	Nachweis von Kreuzreaktionen mit eukaryontischen Hitzeschockproteinen	150
4.3.7	Beeinflussung des Krankheitsverlaufs der <i>M. arthritidis</i> -Infektion der Ratte durch rekombinante mykoplasmale Hitzeschockproteine und Nachweis des immunogenen Potentials	151
5	Diskussion	161
5.1	Charakterisierung der Hitzeschock-Antwort verschiedener Mykoplasmenspezies und Identifizierung von Hitzeschockproteinen der Hsp60- und Hsp70-Familie	162
5.2	Analyse der Hitzeschockproteine kodierenden Gene und Gewinnung rekombinanter Hitzeschockproteine	166
5.3	Phylogenetische Analysen auf Basis der Hitzeschockproteine	169
5.4	ATPase-Aktivität von Hitzeschockproteinen	172
5.5	Kreuzreaktionen zwischen Hitzeschockproteinen von Mykoplasmen und eukaryontischen Zellen	173
5.6	Immunreaktionen auf Hitzeschockproteine	174
5.7	Verstärkte Expression von Hsp60 durch bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit	177
5.8	Protektiver Effekt in der Pathogenese der <i>M. arthritidis</i> -Polyarthrititis der Ratte durch Immunisierung mit Hsp60	178
6	Zusammenfassung	181
7	Summary	184
8	Literaturverzeichnis	186
9	Anhang	208
9.1	Rohdaten	208
9.1.1	Vergleich der Basensequenz der <i>hsp60</i> -Genabschnitte der untersuchten Mykoplasmen mit <i>hsp60</i> -Gensequenzen anderer Mykoplasmen- und Bakterienspezies	208

9.1.2	Vergleich der Basensequenz der <i>hsp70</i> -Genfragmente der untersuchten Mykoplasmen mit <i>hsp70</i> -Gensequenzen anderer Mykoplasmen- und Bakterienspezies	214
9.1.3	Immunogene Bereiche ausgewählter Hsp60-Proteine.....	221
9.1.4	Immunogene Bereiche ausgewählter Hsp70-Proteine.....	237
9.1.5	Arthritis-Score	249
9.1.6	ELISA-Aktivität.....	250
9.2	Tabellenverzeichnis	252
9.3	Abbildungsverzeichnis.....	253

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A.	<i>Acholeplasma</i>
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
B.	<i>Bacillus</i>
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
C.	<i>Clostridium</i>
cDNA	complementary DNA
cfu	colony forming units
CIRAD-EMVT	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Département d'Élevage et Médecine Vétérinaire
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytosin-5'-Triphosphat
dGTP	2'-Desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethandiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EP	Enzootische Pneumonie
EU	Endotoxin-Einheiten
FKS	Fetales Kälberserum
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
G	Guanin
GAM	goat-anti-mouse, Ziege-anti-Maus-Antikörper
GAR	goat-anti-rabbit, Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper
GM-CSF	granulocyte-monocyte colony-stimulating factor

GST	Glutathion-S-Transferase
h	hour , Stunde
Hsp	Hitzeschockprotein/-e
I.E.	internationale Einheiten
IEF	isoelektrische Fokussierung
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
<i>i. v.</i>	intravenös
kbp	1.000 Basenpaare
kDa	1.000 Dalton
LB	Luria broth
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molarität (mol/l)
<i>M.</i>	<i>Mycoplasma</i>
MAP	multiple antigenic peptide
MDHM	<i>M. fermentans</i> -derived high molecular weight material (spezielle Präparation aus <i>Mycoplasma fermentans</i>)
MHC	major histocompatibility complex
mIL	murines Interleukin
min	Minuten
mol	relative Molmasse
MOPS	Morpholinpropan-Sulfonsäure
NBT	Nitroblautetrazolium
OD	optische Dichte
OIE	Office International des Épizooties
OPD	Orthophenyldiamin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen- konzentration
pI	isoelektrischer Punkt
<i>p. i.</i>	<i>post infectionem</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
sec	Sekunde
T	Thymin

Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TIB	Tumor Immunology Bank (Zellsammlung der ATCC)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
Tris-HCl	Tris
tRNA	Transfer-RNA
U	Uracil
UV	ultraviolett
[v/v]	Volumen pro Volumen
[w/v]	Gewicht pro Volumen
2D	zweidimensional

1 EINLEITUNG

Unter den mehr als 180 bekannten Mykoplasmenspezies gibt es viele Krankheitserreger von Mensch und Tier, die oft chronisch verlaufende, schwer zu therapierende Erkrankungen des Respirationstraktes, des Urogenitaltraktes, der Augen und des Euters hervorrufen können. Auffallend häufig sind Mykoplasmen auch Erreger von Arthritiden. Durch Mykoplasmen ausgelöste Erkrankungen verursachen weltweit hohe Kosten in der Tierproduktion. In den Ländern der Dritten Welt und in Schwellenländern besitzen sie zudem eine sehr große sozio-ökonomische Bedeutung, was sich durch die Eingliederung von Mykoplasmosen wie der kontagiösen bovinen Pleuropneumonie und der kontagiösen caprinen Pleuropneumonie in die A- bzw. B-Liste des Office International des Épizooties widerspiegelt. Auch in Deutschland rufen durch Mykoplasmen ausgelöste Erkrankungen erhebliche Verluste in der Landwirtschaft hervor. Infektionen durch humanpathogene Mykoplasmen verursachen dagegen seltener schwere klinische Symptome, führen aber dennoch, vor allem aufgrund ihrer weiten Verbreitung in der Bevölkerung, im Gesundheitswesen und durch den Ausfall von Arbeitskraft ebenfalls zu erheblichen Kosten.

Obwohl Mykoplasmen als Krankheitserreger seit mehr als hundert Jahren bekannt sind, sind die Virulenzfaktoren dieser Bakterien und die Pathogenitätsmechanismen zumeist noch nicht aufgeklärt. Ebenso stehen wirkungsvolle Vakzine zur Prävention bis auf wenige Ausnahmen nicht zur Verfügung. Seit vielen Jahren wird bei verschiedenen Mykoplasmosen als ein wichtiger Pathogenitätsmechanismus diskutiert, daß ähnliche Antigene von Wirten und Mykoplasmen Autoimmunreaktionen und schließlich Autoimmunerkrankungen induzieren können oder aber zu einer molekularen Mimikry führen. Durch molekulare Mimikry könnten Mykoplasmen Immunreaktionen der Wirtsorganismen verhindern und dadurch über einen langen Zeitraum im Wirt persistieren, wodurch die häufig vorkommende Chronizität der Mykoplasmosen erklärt werden könnte.

Hitzeschockproteine sind ubiquitär vorhandene Proteine, die von pro- und eukaryontischen Zellen als Reaktion auf plötzlich auftretende, die Zelle schädigende Umwelteinflüsse, oder aber auch konstitutiv gebildet werden. Bei verschiedenen bakteriellen Infektionen wurden Kreuzreaktionen von Antikörpern und T-Zellen gegen das hoch konservierte und dennoch immundominante 60 kDa-Hitzeschockprotein der Erreger mit dem 60 kDa-Hitzeschockprotein ihrer Wirte nachgewiesen und als mögliche Auslöser von Autoimmunerkrankungen in Betracht gezogen. Im Gegensatz dazu wurde aber gerade durch Immunisierung mit diesem Hitzeschockprotein auch ein Schutz gegenüber verschiedenen bakteriellen Erkrankungen erreicht. Über die Bedeutung von Hitzeschockproteinen in der Pathogenese von Mykoplasmosen liegen bisher keine Erkenntnisse vor.

Mykoplasmen unterscheiden sich von anderen Bakterien durch einige phänotypische Besonderheiten, wie das Fehlen der Zellwand und die geringe Größe, sowie durch ein kleineres Genom, das ungefähr nur ein Fünftel so groß wie das Genom von

Escherichia coli ist. Mykoplasmen weisen damit die geringste Genomgröße unter den Bakterien auf, die nicht auf die Vermehrung in anderen Zellen angewiesen sind. Sie besitzen deshalb nur eine reduzierte Enzymausstattung und damit einhergehend sehr eingeschränkte Stoffwechsel- und Biosynthesewege. Es ist daher auch von grundsätzlichem Interesse, ob Mykoplasmen Hitzeschockproteine bilden und eine ähnliche Hitzeschockreaktion wie andere Bakterien aufweisen.

Ziel der Arbeit war daher zunächst die Gewinnung allgemeiner Informationen über die Hitzeschockreaktion ausgewählter veterinär- und humanmedizinisch relevanter Mykoplasmenspezies. Im Hinblick auf die mögliche Bedeutung in der Pathogenese bakterieller Infektionen und eine Verwendung als Bestandteil einer Vakzine wurde im weiteren Verlauf der Schwerpunkt auf die Identifizierung und Charakterisierung des 60-kDa-Hitzeschockproteins und der für dieses Hitzeschockprotein kodierenden Gene, die Charakterisierung der Immunantwort gegen dieses mykoplasmale Hitzeschockprotein und die Untersuchung des Einflusses des Hitzeschockproteins auf die Pathogenese einer Mykoplasmenenerkrankung gelegt.

Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des von mir selbständig geplanten und geleiteten Projektes „Charakterisierung der Hitzeschockproteine von Mykoplasmen und Untersuchungen zu deren Bedeutung in der Pathogenese von Mykoplasmeninfektionen“ (Ru 459/2-1) und im Graduiertenkolleg „Zell- und Molekularbiologie in der Tiermedizin“ sowie von der Europäischen Union im Rahmen der COST-Aktion 826 „Ruminants´ Mycoplasmoses“ gefördert.

Die Untersuchungen wurden größtenteils am Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt. Ein Teil der Hitzeschockgene wurde von mir im Labor von Dr. Francois Thiaucourt am Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement, Département d'Élevage et de Médecine Vétérinaire (CIRAD-EMVT), Montpellier, Frankreich, sequenziert. Ein Teil der Sequenzanalysen, die Gewinnung rekombinanter Hitzeschockproteine und Untersuchungen zum Einfluß bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit auf die Expression von Hitzeschockproteinen wurden im Rahmen der von mir und Prof. Dr. Gerald-F. Gerlach betreuten Dissertation von Frau Barbara Scherm durchgeführt. Die Arbeiten zum Nachweis von Zytokinen erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Andreas Emmendorffer in der Abteilung Infektionsbiologie des Fraunhofer Instituts für Aerosolforschung, Hannover. Die Arbeiten zur Isolierung nativer Hitzeschockproteine und die Tierversuche waren Bestandteil der von mir und Herrn Prof. Dr. Gerald-F. Gerlach betreuten Dissertation von Frau Astrid Wedde. Der ATPase-Nachweis wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. Bernd Huchzermeyer, Institut für Botanik, Fachbereich Biologie, Universität Hannover durchgeführt. Die histopathologischen Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Anja Sterner-Kock, in der Veterinär-Pathologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Mykoplasmen

2.1.1 Biologie

Der Trivialbegriff „Mykoplasmen“ bezeichnet eine Gruppe von Mikroorganismen, die sich durch einige Besonderheiten von anderen Bakterien unterscheidet. Auffälligstes Merkmal ist das Fehlen einer Zellwand. Die Mykoplasmenzelle wird daher durch die Zytoplasmamembran begrenzt. Diese enthält bei den meisten Mykoplasmenspezies, im Gegensatz zu allen anderen Prokaryonten, Cholesterine. Das Fehlen der Zellwand bedingt auch die Pleomorphie der Mykoplasmenzelle und die natürliche Resistenz gegenüber den Zellwandsynthese hemmenden β -Lactam-Antibiotika (RAZIN und FREUNDT 1984).

Mykoplasmen besitzen zumeist eine energetisch günstige kokkoide Zellmorphologie mit einer Größe von 0,3 - 0,8 μm . Es können auch verzweigte und unverzweigte filamentöse Formen von unterschiedlicher Länge sowie helikale oder flaschenförmige, mit einer Terminalstruktur ausgestattete Zellformen ausgebildet werden (RAZIN 1981, RAZIN und FREUNDT 1984). Die meisten Mykoplasmen-spezies sind unbeweglich. Einige Arten können sich jedoch aktiv gleitend fortbewegen (KIRCHHOFF 1992, WOLGEMUTH *et al.* 2003a, WOLGEMUTH *et al.* 2003b).

Ein Großteil der Mykoplasmenspezies wächst bei reduziertem Sauerstoffpartialdruck, einige benötigen ein anaerobes Milieu. Das Temperaturoptimum der meisten Arten liegt zwischen 30 und 37 °C. Auf festen Nährmedien bilden viele Mykoplasmen-spezies eine charakteristische Koloniemorphologie aus, die als "Spiegelei"-Form bezeichnet wird. Sie entsteht dadurch, daß die Zellen im Zentrum der Kolonie in den Nähragar hinein wachsen, wodurch die Kolonie zentral dunkler erscheint, die Zellen der Peripherie jedoch nur auf der Agaroberfläche wachsen. Wenige Spezies bilden uniforme, granuläre Kolonieformen. Die Mykoplasmenkolonien erreichen abhängig von der jeweiligen Art einen Durchmesser von 50 bis 600 μm , in Ausnahmen bis zu 2 mm. Sie sind also auf Nährböden mit bloßem Auge zumeist nicht oder kaum zu erkennen (HAYFLICK 1969, RAZIN und TULLY 1984, RAZIN *et al.* 1998).

Mykoplasmen entwickelten sich höchstwahrscheinlich durch degenerative Evolution aus grampositiven Bakterien (WOESE 1987, MANILOFF 1992). Wie auch andere Bakterien besitzen Mykoplasmen einen zirkulären DNA-Doppelstrang und replizieren das Genom ausgehend von membranassoziierten Startpunkten semikonservativ. Aufgrund der reduktiven Evolution haben sie jedoch nur eine geringe Genomgröße, die abhängig von der jeweiligen Spezies 580 bis 2.220 kbp beträgt. Das Genom kodiert für annähernd 500 Gene. Demgegenüber besitzen andere Bakterien eine Genomgröße von 1.050 bis über 10.000 kbp. Bei den Mykoplasmen beträgt der Anteil der Basen Guanin und Cytosin am Genom (G+C-Gehalt) 23 bis 33 mol% und

ist damit im Vergleich zu anderen Bakterien niedrig. In Ausnahmen wurde ein G+C-Gehalt von bis zu 40 mol% festgestellt. Die nicht für Proteine kodierenden Kontroll- und Spacerregionen enthalten mit bis zu 90 mol% einen besonders hohen Anteil an Adenin und Thymin (KIRCHHOFF und FLOSSDORF 1987, MUTO 1987, CHRISTIANSEN 1987a, CHRISTIANSEN *et al.* 1987a, CHRISTIANSEN 1987b, CHRISTIANSEN *et al.* 1987b, TULLY *et al.* 1993, RAZIN 1997b, RAZIN *et al.* 1998). Das mit 530 kbp bislang kleinste Genom ist bei den taxonomisch nicht zugeordneten und nicht kultivierbaren Phytoplasmen (Bermuda grass white leaf phytoplasma) festgestellt worden, die aufgrund phylogenetischer Analysen dennoch den Mykoplasmen zugerechnet werden (MARCONE *et al.* 1999). Die Genomgröße kann innerhalb einzelner Mykoplasmenpezies durch häufig vorkommende repetitive Elemente oder durch Integration viraler Sequenzen um bis zu 150 kbp schwanken (YE *et al.* 1995, RAZIN *et al.* 1998). Plasmide wurden erst bei wenigen Spezies nachgewiesen (DYBVIG und KHALED 1990, KING und DYBVIG 1994, KIRKPATRICK und SMART 1995).

Die essentiellen Gene der Protein-, DNA- und RNA-Synthese nehmen bei den Mykoplasmen wahrscheinlich mehr als die Hälfte des Genoms ein. Ribosomale RNA (rRNA)-Gene liegen mit einer Ausnahme lediglich in ein- oder zweifacher Ausführung in jeweils einem RNA-Operon in der Reihenfolge 5' - 16S - 23S - 5S - 3' vor. Im Gegensatz zu anderen Bakterien sind die Transfer-RNA (tRNA)-Gene bei den Mykoplasmen immer vom rRNA-Operon getrennt. Für die meisten tRNA kodiert nur ein einziges Gen. Auch die Codon-Nutzung weist bei den Mykoplasmen Besonderheiten auf: so kodiert das Nukleinsäure-Codon UGA, das bei anderen Prokaryonten als Stopcodon fungiert, bei den Gattungen *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Spiroplasma* und *Mesoplasma* für die Aminosäure Tryptophan, wodurch die Expression von Genen dieser Gattungen in anderen Bakterien erschwert ist (MUTO 1987, BOVE 1993, RAZIN 1997b, RAZIN *et al.* 1998).

Infolge des kleinen Genoms besitzen Mykoplasmen eine reduzierte Enzymausstattung und nur sehr eingeschränkte Stoffwechsel- und Biosynthesewege. *In vitro* müssen sie daher in komplexen Nährmedien kultiviert werden, die als Basalmedium Rinderherz-Aufguß enthalten, das mit Kohlenhydraten, Peptonen, Hefeextrakt und zumeist Serumzusatz ergänzt wird. Zur Unterdrückung des Wachstums anderer Bakterien werden oft Antibiotika zugesetzt. Die von den meisten Bakterien verwendeten Formen der Energiegewinnung durch den Tricarbonsäurezyklus oder die Elektronentransportkette können von den Mykoplasmen nicht mehr oder nur in eingeschränkter Form genutzt werden. Die Energiegewinnung erfolgt, abhängig von der Mykoplasmenpezies, durch Glykolyse, Hydrolyse von Arginin oder Harnstoff und durch Oxidation von organischen Säuren wie Laktat oder Pyruvat mit relativ geringer ATP-Ausbeute. Für den Abbau von Glukose stehen die Enzyme des Fructose-1,6-bisphosphat-Weges zur Verfügung, wohingegen der Pentosephosphat-Weg unvollständig ausgebildet ist. Bei der Glykolyse entstehendes Pyruvat kann zu Laktat oder Acetyl-Coenzym A metabolisiert werden. Zu ATP-Gewinn führt auch der hydrolytische Abbau von Arginin durch Substratketten-

phosphorylierung. Eine Sonderstellung nehmen die Spezies der Gattung *Ureaplasma* ein, bei denen keine der beschriebenen Energiegewinnungssysteme nachgewiesen wurden. Diese Mykoplasmen sind als einzige Bakterien auf Harnstoff als Substrat angewiesen. Sie besitzen einen Urease-Komplex, der, im Vergleich zu den Ureasen anderer Bakterien, eine erheblich höhere Aktivität aufweist. Sehr wahrscheinlich trägt bei den Ureaplasmen die Hydrolyse von Harnstoff zur Energiegewinnung bei. Aminosäuren, Nukleinsäurevorläufer, Sterole, Lipide und Vitamine müssen durch den Wirtsorganismus oder *in vitro* durch komplexe Nährmedien zur Verfügung gestellt werden. Die genannten Nährstoffe werden durch ABC-Transportersysteme, phosphoenolpyruvatabhängige Zucker-Phosphotransferase-Transportersysteme oder, nach Bindung an spezifische Carrier, mittels Diffusion durch Transmembranproteine durch die Zytoplasmamembran befördert (RODWELL 1983, DUDLER *et al.* 1988, GILSON *et al.* 1988, MANOLUKAS *et al.* 1988, MILES *et al.* 1988, MILES 1992, RAZIN 1992, TULLY *et al.* 1993, POLLACK *et al.* 1997, RAZIN 1997b).

2.1.2 Taxonomie und Phylogenie

Seit der erstmaligen Isolierung einer Mykoplasmenspezies, des Erregers der kontagiösen Pleuropneumonie des Rindes, Ende des neunzehnten Jahrhunderts, wurden bis heute über 180 weitere Arten beschrieben. Die taxonomische Einordnung der Mykoplasmen erfolgte erst relativ spät. In den dreißiger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts wurden Mykoplasmen, wahrscheinlich aufgrund ihrer Eigenschaft Filter mit einer Porengröße von 450 nm zu passieren, zunächst als Viren angesehen. Später wurden sie dann für stabile L-Formen, zellwandlose Varianten von zellwandbildenden Bakterien, gehalten. 1956 wurde schließlich eine Klassifizierung der Mykoplasmen vorgeschlagen, welche die Grundlage der gegenwärtigen Einteilung darstellt (EDWARDT und FREUNDT 1956).

Über viele Jahre wurde angenommen, daß Mykoplasmen von ursprünglichen Bakterien, Vorläufern der heutigen Eubakterien, abstammen. Eine in den letzten Jahren sich erhärtende Hypothese besagt jedoch, daß sich die Mykoplasmen vor ungefähr 600 Millionen Jahren, aufgrund der Reduktion des Genoms, von der *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus*-Gruppe des Phylums *Firmicutes* abspalteten. Vor ca. 450 Millionen Jahren entwickelten sich dann aus diesen ursprünglichen Mykoplasmen zwei Linien, die sich durch die Nutzung von UGA als Stop-Codon bzw. als Codon für Tryptophan unterschieden. Die nächsten Verwandten bei den zellwandtragenden Bakterien sind *Clostridium (C.) innocuum* und *C. ramnosum* (MANILOFF 1992, RAZIN *et al.* 1998).

Die heutige Klassifizierung der Mykoplasmen basiert, neben serologischen und physiologischen Untersuchungen, auf der Analyse der 16S rRNA-Gene sowie auch auf anderen molekularbiologischen Erkenntnissen. Taxonomisch werden Mykoplasmen in die Division *Tenericutes* mit der einzigen Klasse *Mollicutes* (lat. *mollis* - weich, *cutis* - Haut) eingeordnet (Tab. 1). Die Klasse *Mollicutes* teilt sich in

die vier Ordnungen *Mycoplasmatales*, *Entomoplasmatales*, *Acholeplasmatales* und *Anaeroplasmatales*. Die Gattung *Mycoplasma* (M.) beinhaltet mit mehr als 100 Spezies die meisten Mykoplasmenarten (WEISBURG *et al.* 1989, TULLY *et al.* 1993, RAZIN *et al.* 1998). Phylogenetisch können die Mykoplasmen in fünf Gruppen eingeordnet werden, die nach den Leitorganismen benannt wurden: die Spiroplasma-Gruppe, die Pneumoniae-Gruppe, die Hominis-Gruppe, die Anaeroplasma-Gruppe und die Asteroleplasma-Gruppe (WEISBURG *et al.* 1989, PETTERSSON *et al.* 2000).

Tab. 1: Taxonomie und herausragende Eigenschaften der Klasse *Mollicutes*
(modifiziert nach RAZIN *et al.* 1998)

Ordnung				
Familie				
	Gattung	Anzahl der Arten	Genomgröße (kB)	Habitat und charakteristische Eigenschaften
I. <i>Mycoplasmatales</i>				
	<i>Mycoplasmataceae</i>			
	<i>Mycoplasma</i>	104	580-1350	Vertebraten, cholesterin- abhängiges Wachstum
	<i>Ureaplasma</i>	6	760-1170	Vertebraten, cholesterin- abhängiges Wachstum, Harnstoffhydrolyse
II. <i>Entomoplasmatales</i>				
	<i>Entomoplasmataceae</i>			
	<i>Entomoplasma</i>	5	790-1140	Insekten und Pflanzen, cholesterinabhängiges Wachstum
	<i>Mesoplasma</i>	12	870-1100	Insekten und Pflanzen
	<i>Spiroplasmataceae</i>			
	<i>Spiroplasma</i>	33	780-2220	Insekten und Pflanzen, helikale Filamente
III. <i>Acholeplasmatales</i>				
	<i>Acholeplasmataceae</i>			
	<i>Acholeplasma</i>	13	1500-1650	Vertebraten, Insekten und Pflanzen
IV. <i>Anaeroplasmatales</i>				
	<i>Anaeroplasmataceae</i>			
	<i>Anaeroplasma</i>	4	1500-1600	Rumen von Rindern und Schafen, sauerstoffsensible Anaerobier
	<i>Asteroleplasma</i>	1	1500	Rumen von Rindern und Schafen, sauerstoffsensible Anaerobier
Ohne taxonomische Zuordnung				
	Phytoplasma	unbekannt	530-1185	Insekten und Pflanzen, bisher nicht kultivierbar, früher als „mycoplasma-like-organisms“ bezeichnet

2.1.3 Mykoplasmen als Krankheitserreger

Die Mykoplasmenspezies sind Parasiten und Kommensalen des Menschen, der Säugetiere, Vögel, Reptilien, Fische, Insekten und Pflanzen. Sie weisen häufig eine ausgesprochene Wirts- und Gewebespezifität auf, die wahrscheinlich auf ihren nutritiven Ansprüchen beruht und ihre parasitische Lebensweise reflektiert, obwohl einige Ausnahmen bekannt sind (RAZIN und TULLY 1984, RAZIN 1992, TULLY *et al.* 1993, NICHOLAS 1998, ROTTEM 2003). Die meisten Mykoplasmen sind extrazelluläre Bakterien. Einige Spezies, wie z. B. *M. penetrans* und *M. gallisepticum*, wurden jedoch auch intrazellulär nachgewiesen (LO *et al.* 1992, RAZIN *et al.* 1998, ROTTEM 2003).

Bei Menschen und Tieren werden häufig zunächst die Schleimhäute des Respirations- und Urogenitaltraktes besiedelt, weshalb Mykoplasmen auch als Oberflächenparasiten bezeichnet werden. Weitere Eintrittspforten sind die Augen und die Milchdrüsen. Später kann es zur Ausbreitung der Erreger im gesamten Organismus kommen, wobei viele Mykoplasmenspezies eine besondere Affinität zu den Gelenken aufweisen. Sowohl an den Primär- als auch den Sekundärlokalisationen können Krankheitssymptome auftreten. Die Schwere der klinischen Symptome wird jedoch oftmals erst durch weitere prädisponierende oder nachgeordnete Faktoren, wie beispielsweise der Immunitätslage des Wirtes, Umwelteinflüsse oder Sekundärinfektionen, beeinflusst, weshalb durch Mykoplasmen ausgelöste Erkrankungen auch als Faktorensyndrome bezeichnet werden.

Der wegen seiner hohen Kontagiösität gefürchtete und vor allem in Entwicklungs- und Schwellenländern hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten auslösende Erreger der kontagiösen Pleuropneumonie des Rindes, *M. mycoides* subspecies *mycoides* small colony type, wird als einzige Bakterienspezies in der A-Liste des Office International des Épizooties (OIE, World Organization for Animal Health) geführt. Durch Mykoplasmen hervorgerufene Infektionen verlaufen jedoch zumeist nicht fulminant, sondern chronisch. Sie können vor allem in der Landwirtschaft große wirtschaftliche Verluste zur Folge haben, da die Erkrankungen nur unzureichend therapierbar sind (MANILOFF 1992, SIMECKA *et al.* 1992, NICHOLAS 1998).

2.1.4 Pathogenitätsmechanismen und Virulenzfaktoren

Trotz der geringen Genomgröße besitzen Mykoplasmen eine erstaunliche Vielzahl von z. T. komplexen Virulenzfaktoren, die auch von anderen Bakterien bekannt sind. Viele Pathogenitätsmechanismen und Virulenzfaktoren der Mykoplasmen sind jedoch trotz intensiver Forschungen noch nicht aufgeklärt.

Die Motilität einiger Mykoplasmenspezies erleichtert die Besiedlung des Wirtes und das Eindringen in die Mukosa des Respirations- und Urogenitaltraktes. Die zellwandlosen Mykoplasmen sind in der Lage, mit den Wirtszellen in sehr engen Kontakt zu treten, wodurch mykoplasmale Stoffwechselprodukte wie Ammoniak,

Wasserstoffperoxid und Sauerstoffradikale sowie Enzyme wie Phospholipasen, Proteasen und Nukleasen wahrscheinlich zu einer direkten Schädigung der Wirtszellen führen können (COLE *et al.* 1968, ALMAGOR *et al.* 1983, RAZIN 1985, LAMONT *et al.* 1990, KIRCHHOFF 1992, SIMECKA *et al.* 1992, RAZIN *et al.* 1998, ROTTEM 2003, WOLGEMUTH *et al.* 2003b).

Bei verschiedenen Mykoplasmenspezies, wie beispielsweise *M. gallisepticum* und *M. pneumoniae*, wurden in der Zellmembran Zytadhärenzproteine nachgewiesen, die in Verbindung mit akzessorischen Proteinen und Proteinen des Zytoskeletts zur Adhäsion der Mykoplasmen an die Wirtszellen führen und damit eine wichtige Rolle in der Infektiosität spielen. Es wird diskutiert, daß es durch den direkten Kontakt der Mykoplasmenmembran mit der Membran der Wirtszelle zu einer, zumindest partiellen, Fusion der pro- und eukaryontischen Zelle kommt. Hierdurch wäre eine unmittelbare Schädigung der Wirtszelle durch die Enzyme und Stoffwechselprodukte der Mykoplasmen möglich (RAZIN und JACOBS 1992, HENRICH *et al.* 1993, KEELER *et al.* 1996, KRAUSE 1996, ROTTEM 2003, THOMAS *et al.* 2003). Bei einigen Arten wie *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. gallisepticum*, *M. hyopneumoniae* und *M. mycoides* subsp. *mycoides* wurden auch Toxine als Virulenzfaktoren diskutiert, obwohl potente Toxine bei den Mykoplasmen bisher nicht nachgewiesen wurden (BUTTERY *et al.* 1980, GEARY *et al.* 1981, GEARY und WALCZAK 1983, KRÜGER *et al.* 1984, RAZIN *et al.* 1998).

Eine indirekte Schädigung der Wirtszellen erfolgt wahrscheinlich durch den Entzug von Nährstoffen und insbesondere durch von Mykoplasmen ausgelöste immunmodulierende Effekte. Für viele Mykoplasmenspezies, wie z. B. *M. arginini*, *M. arthritis*, *M. capricolum*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis* und *M. pneumoniae*, ist ein Einfluß auf die Sekretion von Zytokinen, wie verschiedene Interleukine (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8) und den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α , nachgewiesen worden. Sie können dadurch immunsuppressiv oder stimulierend auf B- und T-Lymphozyten wirken. Mykoplasmen aktivieren zytotoxische Lymphozyten und Natürliche Killer-Zellen und modulieren die Expression des MHC (Major Histocompatibility Complex, Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex) Klasse II von Makrophagen (HERBELIN *et al.* 1994, AVRON und GALLILY 1995, BRENNER *et al.* 1997, MÜHLRADT *et al.* 1997, RAWADI *et al.* 1998, MÜHLRADT *et al.* 1998, RAWADI 2000). Neben lebenden, hitzeinaktivierten, lysierten oder mit Ultraschall behandelten Mykoplasmen, wirken auch zellfreie Überstände von *M. arthritis*-Kulturen, die ein als *Mycoplasma arthritis*-Mitogen (MAM) bezeichnetes Superantigen enthalten, mitogen auf Lymphozyten und können die Synthese von TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4 und IL-6 induzieren (MEHINDATE *et al.* 1994, AL DACCAK *et al.* 1994, COLE 1996).

Seit langem ist bekannt, daß Oberflächenstrukturen der Mykoplasmenmembranen, zu denen Polysaccharide, Proteine und Glykolipide gehören, starke Antigene sind (FERNALD 1979, KENNY 1979, RAZIN 1979, RAZIN und JACOBS 1992). Membranproteine und Lipopeptide verschiedener Mykoplasmenspezies wirken ähnlich stimulierend auf Monozyten wie bakterielles Endotoxin, das u. a. ein starker Stimulus für Makrophagen ist (RAWADI und ROMAN-ROMAN 1996).

Bei einigen pathogenen Mykoplasmenspezies wie *M. bovis*, *M. gallisepticum* und *M. hyorhinis* wurde ein System variabler Proteine oder Lipoproteine nachgewiesen. Diese können unabhängig voneinander reversibel und spontan exprimiert werden und sind in unterschiedlichen Varianten vorhanden. Durch die hochfrequente Variation dieser stark immunogenen Antigene auf der Oberfläche der Mykoplasmenmembran wird wahrscheinlich ein Schutz vor der Immunantwort des Wirtes erzielt (ROSENGARTEN und WISE 1991, YOGEV *et al.* 1993, BEHRENS *et al.* 1996, ROTTEM 2003).

Einen weiteren Virulenzfaktor stellt möglicherweise die große Ähnlichkeit einiger mykoplasmaaler Antigene mit Antigenen des Wirtes dar. Diese Antigen-gemeinsamkeiten könnten Autoimmunreaktionen auslösen oder eine molekulare Mimikry zur Folge haben (WISE und WATSON 1985, BASEMAN und TULLY 1997). Durch molekulare Mimikry, die Freisetzung löslicher Antigene, die sterische Hemmung infolge des engen Kontaktes mit der Wirtszelle, vor allem aber durch hochfrequente Veränderungen des Phänotyps durch Antigenvariation sind Mykoplasmen wahrscheinlich in der Lage, der Immunabwehr zu entgehen und über mehrere Jahre in einem Wirt zu persistieren. Die ausbleibende Produktion von mykoplasmaiden Antikörpern und die von verschiedenen Mykoplasmenspezies, wie beispielsweise *M. genitalium*, *M. hyopneumoniae* und *M. mycoides* subsp. *mycoides*, gebildeten Kapseln führen dazu, daß diese Mykoplasmen nicht opsoniert werden und daher die Komplementkaskade nicht ausgelöst wird (RAZIN 1992, SIMECKA *et al.* 1992, TRYON und BASEMAN J.B. 1992, COLE und GRIFFITHS 1993, YOGEV *et al.* 1993, BEHRENS *et al.* 1994, BASEMAN und TULLY 1997)

2.1.5 Beschreibung ausgewählter Mykoplasmenarten

In der vorliegenden Arbeit wurden die wesentlichen Untersuchungen an *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* durchgeführt. Für vergleichende molekularbiologische Analysen wurde, aufgrund der engen phylogenetischen Beziehung zu *M. bovis*, zusätzlich *M. agalactiae* in die Untersuchungen mit einbezogen. Diese Mykoplasmenspezies werden nachfolgend hinsichtlich ihrer Biologie und ihrer Bedeutung in der Veterinär- bzw. Humanmedizin beschrieben.

2.1.5.1 *Mycoplasma agalactiae*

M. agalactiae gilt als der „klassische“ Erreger der kontagiösen Agalaktie, obwohl sich ein ähnliches Krankheitsbild auch nach Infektion mit anderen Mykoplasmenspezies entwickeln kann (RUNGE 2001). Die kontagiöse Agalaktie ist eine seit langem bekannte und vor mehr als 180 Jahren erstmalig beschriebene Mykoplasmen-erkrankung von Schaf und Ziege, die weltweit auftritt und heute insbesondere in den Mittelmeeranrainerstaaten und in Westasien weit verbreitet ist. Aufgrund der hohen wirtschaftlichen Verluste hat die kontagiöse Agalaktie eine große sozio-ökonomische

Bedeutung und wird in der Liste B des OIE geführt (DAMASSA *et al.* 1992, BERGONIER und POUMARAT 1996, BERGONIER *et al.* 1997).

Die Erstisolierung erfolgte 1923 in Frankreich (nach EDWARDT und FREUNDT 1956). In Flüssigmedium wächst *M. agalactiae* in filamentösen Zellformen mit mycelartigen Verzweigungen, die bei einer Breite von 0,2 bis 0,8 µm eine Länge von bis zu 150 µm erreichen können und mithilfe der Dunkelfeldmikroskopie leicht nachweisbar sind. Über den Stoffwechsel ist wenig bekannt. Glukose, Arginin und Harnstoff können nicht zur Energiegewinnung verwendet werden. Zur Energiegewinnung trägt jedoch die Oxidation von Pyruvat bei. *M. agalactiae* sezerniert eine Phosphatase, wodurch Kristallbildungen auf pferdeserumhaltigen Nährböden entstehen, die als „film and spots“ bezeichnet werden. Die Phosphatase bewirkt eine Hämolyse von Schaferythrozyten. *M. agalactiae* ist eng mit der rinderpathogenen Mykoplasmenspezies *M. bovis* verwandt (COTTEW 1984, LAMBERT 1987, DAMASSA *et al.* 1992, MADANAT *et al.* 2001).

M. agalactiae infiziert vor allem Schafe und in geringerem Maße Ziegen. Der Erreger wird mit der Milch, durch Augen- und Nasensekret, Kot und Harn oder mit Aborten ausgeschieden. Die Infektion kann oral bei der Nahrungsaufnahme, über das Euter, oft aufgrund mangelnder Melkhygiene, oder okulär erfolgen. Nach oraler Infektion können histopathologisch häufig subakute Enteritiden festgestellt werden. Wahrscheinlich kann eine Übertragung auch aerogen, intrauterin und *sub partu* erfolgen. *M. agalactiae* kann monatelang in den Tieren persistieren ohne klinische Symptome hervorzurufen. Der Erreger ist dann im Genitaltrakt, dem äußeren Gehörkanal und den supramammären Lymphknoten nachweisbar. Erst unter bestimmten Bedingungen, wie beispielsweise dem Beginn der Laktationsperiode, kann es zum Ausbruch der Erkrankung kommen (COTTEW 1984, LAMBERT 1987, DAMASSA *et al.* 1992, MADANAT *et al.* 2001). Andere Wiederkäuer wie Rinder und Kamele, die keine klinischen Symptome aufweisen, dienen möglicherweise als Erregerreservoir (PERRIN *et al.* 1994).

Die Inkubationszeit variiert zwischen sieben Tagen und mehreren Monaten. Nach einer bakteriämischen Phase von zwei bis drei Tagen, die mit einer Temperaturerhöhung auf 41-42 °C einhergeht, werden das Euter, die Augen, Gelenke oder die Lunge besiedelt. Klinisch können Benommenheit, Freßunlust und je nach Absiedlungsort Arthritis, Keratokonjunktivitis, Pneumonie und Mastitis diagnostiziert werden. Es können subakute, akute und chronische Stadien der Erkrankung unterschieden werden. Die akute Form tritt durch die Einführung von infizierten Trägartieren in Herden auf, die keine Immunität gegen den Erreger besitzen. Das chronische Stadium tritt gewöhnlich in Endemiegebieten auf und verläuft im allgemeinen mit mildereren Symptomen, wobei lokalisierte Formen häufiger sind (LAMBERT 1987, BERGONIER und POUMARAT 1996).

Bei laktierenden Schafen ist das charakteristische Symptom die Mastitis. Daneben treten Arthritiden, Keratokonjunktivitiden und seltener respiratorische Symptome auf. Die Mastitis äußert sich in leichten Fällen als rein funktionelle Hypo- oder Agalaktie. Häufig gehen diese Symptome jedoch mit ein- oder beidseitiger katarrhalischer bis

parenchymatöser Mastitis einher, bei welcher es zu partiellen Indurationen und/oder Abzeßbildungen des Eutergewebes mit gleichzeitiger Anschwellung der mammären Lymphknoten kommt. Das Euter ist dann angeschwollen, heiß und fest. Die Milch kann normal aussehen, aber oft ist sie gelblich oder grau-bläulich verfärbt. Die Konsistenz der Milch kann dick oder wässrig sein (COTTEW 1984, LAMBERT 1987, BERGONIER und POUMARAT 1996).

Demgegenüber weisen andere adulte Schafe zumeist Arthritiden auf. Die klinischen Symptome variieren von leichter Lahmheit bis hin zu Immobilität oder fehlendem Stehvermögen, wodurch es in der Folge nicht selten zu Dekubitalstellen kommt. Patho-anatomisch äußert sich die Infektion als eine milde Synovitis ohne Beteiligung des Gelenkknorpels bis hin zu schweren Polyarthritiden, wobei häufig Karpal-, Tarsal- und Sprunggelenke betroffen sind (BERGONIER und POUMARAT 1996).

Die seltenere okuläre Form der Erkrankung betrifft gleichermaßen alle Altersgruppen und kann ein- oder beidseitig auftreten. Zunächst manifestiert sie sich als milde Konjunktivitis, die sich zu einer parenchymatösen Keratitis mit Gefäßeinsprossungen in die Kornea entwickelt. Die Kornea ist von Leukozyten infiltriert (REAL *et al.* 1994, MADANAT *et al.* 2001).

Nur gelegentlich werden bei adulten Tieren respiratorische Symptome festgestellt. Es überwiegt hier ein subklinischer Verlauf. Es können aber auch Bronchopneumonien mit nekrotischen Läsionen und fibrinöse Pleuritiden auftreten. Trächtige Schafe können am Ende der Gestationsphase verlammen. Bei Lämmern werden durch die Infektion vor allem Pneumonien, aber auch Arthritiden und Konjunktividen hervorgerufen (LEFEVRE *et al.* 1987, BERGONIER und POUMARAT 1996, THIAUCOURT und BÖLSKE 1996). Bei Ziegen wurde *M. agalactiae* auch in Fällen von Vulvovaginitis in Läsionen der Vulva-Mukosa und bei Pleuropneumonien in Lungenläsionen nachgewiesen. Im ersten Fall erfolgte die Infektion vermutlich transgenital.

Die Mortalität erreicht bei nicht laktierenden Schafen bis zu 3 %, bei Lämmern und laktierenden Schafen bis zu 10 %. Die Morbidität erreicht bei adulten Schafen bis zu 20 %, bei laktierenden Schafen bis zu 50 % und bei Lämmern bis zu 60 %. Bei laktierenden Ziegen und deren Lämmern wird eine höhere Mortalitäts- und Morbiditätsrate festgestellt (REAL *et al.* 1994, BERGONIER und POUMARAT 1996, MADANAT *et al.* 2001).

2.1.5.2 *Mycoplasma bovis*

M. bovis wurde erstmalig Mitte der fünfziger Jahre des letzten Jahrhunderts in Schweden aus Milch (ALSTROM 1955) und Anfang der sechziger Jahre aus an Mastitis erkrankten Kühen isoliert (HALE *et al.* 1962). Später wurde *M. bovis* als Erreger von Mastitiden in verschiedenen Ländern wie den USA, Kanada, England, Italien, der Bundesrepublik Deutschland, der damaligen Deutschen Demokratischen Republik und in jüngerer Zeit auch in Irland und Südamerika nachgewiesen. Heute ist von einem weltweiten Vorkommen auszugehen. *M. bovis* ist der bedeutendste

Erreger boviner Mykoplasmosen in Europa und Nordamerika. In Europa ist diese Mykoplasmenspezies für ein Viertel bis ein Drittel der Kälberpneumonien verantwortlich (JASPER 1981, WEIGT *et al.* 1981, PFÜTZNER 1984, PFÜTZNER und SACHSE 1996, NICHOLAS und AYLING 2003).

Als eigenständige Spezies wurde *M. bovis* erst Mitte der siebziger Jahre beschrieben (ASKAA und ERNØ 1976, MATTSSON *et al.* 1994). Bis zu diesem Zeitpunkt wurde *M. bovis* als Subspezies von *M. agalactiae* angesehen. Die enge taxonomische Beziehung zu *M. agalactiae* zeigt sich insbesondere durch das sehr ähnliche biochemische Verhalten und der ausgeprägten serologischen Kreuzreaktivität zwischen den beiden Spezies, die sich jedoch aufgrund genotypischer Analysen wie der DNA-DNA-Hybridisierung und dem PCR-Fingerprinting voneinander unterscheiden lassen (GUMMELT 1995, PFÜTZNER und SACHSE 1996, GUMMELT *et al.* 1996).

Der Stoffwechsel von *M. bovis* ist weitgehend ungeklärt. Energiegewinnung findet wie bei *M. agalactiae* weder durch Vergärung von Glukose noch durch Hydrolyse von Harnstoff oder Arginin statt, sondern durch Oxidation von Pyruvat. Der Erreger bewirkt ebenfalls eine Hämolyse und sezerniert Phosphatase in das Medium, wodurch auf Nährböden, die Pferdeserum enthalten, „film and spots“ auftreten können. Die Genomgröße des Referenzstammes PG45 beträgt 666 kbp. Der G+C-Gehalt variiert zwischen 27,8 und 32,9 mol% (NEIMARK und LANGE 1990, MATTSSON *et al.* 1994, PFÜTZNER und SACHSE 1996).

In Gebieten mit intensiver Milchviehhaltung können durch Infektionen mit diesem Erreger subakute bis akute Entzündungen des Euters, die enzootische *M. bovis*-Mastitis, hervorgerufen werden, die zu erheblichen ökonomischen Verlusten führen kann. Nach galaktogener, ascendierender Infektion des Zitzenkanals oder nach aerogener Besiedlung des Respirationstrakts, anschließender systemischer Streuung und sekundärer Manifestation im Euter, sinkt die Milchleistung innerhalb einiger Tage auf wenige Milliliter ab. Auffällig ist die Veränderung der Konsistenz des Sekrets, die von wässrig bis blutig-eitrig reicht. Typisch ist eine klare, flüssige oder seröse Phase über sedimentierten Fibrinflocken. Die Zellzahl in der Milch steigt auf bis zu 50 Millionen Leukozyten je Milliliter an. Die Infektion breitet sich hämatogen von einem Euterviertel zum anderen aus und zeigt sich zumeist resistent gegenüber einer Antibiotikatherapie. Die erkrankten Euterviertel schwellen ödematös an, eine vermehrte Rötung und Wärme ist aber zumeist nicht feststellbar. Nach drei bis vier Wochen kann die Erkrankung zu einer Agalaktie führen. Die enzootische *M. bovis*-Mastitis kann in allen Laktationsstadien sowie bei trocken stehenden Kühen auftreten (RUHNKE *et al.* 1976, JASPER 1977, BOUGHTON und WILSON 1978, ILLING 1979, JASPER 1981, WEIGT *et al.* 1981).

Ein gehäuftes Auftreten und besonders schwere Verlaufsformen sind vor dem Abkalben zu beobachten. Die Infektion kann über mehrere Wochen persistieren. Klinisch gesunde Kühe können *M. bovis* über die Milch ausscheiden. Die Mykoplasmenmastitis ist ebenfalls dadurch charakterisiert, daß die Kühe sich während der laufenden Laktationsperiode nicht von der Mastitis erholen können und

ihre Milchleistung auch in den folgenden Laktationsperioden geringer als vorher bleibt. Die klinischen Symptome der *M. bovis*-Mastitis sind aber nicht pathognomonisch. Bis heute ist nicht geklärt, wieso manche Tiere mit *M. bovis* infiziert sind ohne klinische Symptome zu zeigen (PFÜTZNER und SACHSE 1996). Histopathologisch können während der akuten Phase eine Füllung der Vakuolen mit polymorphkernigen Granulozyten und eine Degeneration der Alveolarepithelien, in der chronischen Phase fibroblastische Veränderungen im Euterparenchym nachgewiesen werden (JASPER 1977, JASPER *et al.* 1987).

Die Morbidiät variiert, abhängig von der Herdengröße, zwischen 10 und 50 %; gewöhnlich sind mehr als 20 % der Kühe betroffen. Als prädisponierende Faktoren spielen eine hohe Belegdichte, hohe Milchleistung, Fehler in der Melktechnik sowie in der Haltung und Fütterung der Tiere, Mängel im Stallklima und unzureichende Hygiene eine Rolle. Wichtigster Auslöser für eine Infektion ist die mangelnde Melkhygiene, wobei der Erreger durch die Melkmaschine, Reinigungstücher oder einen Reflux der Milch übertragen werden kann. Klinisch erkrankte Kühe scheiden zwischen 10^5 und 10^8 koloniebildende Einheiten (engl. colony forming units, cfu) *M. bovis* je Milliliter Milch aus, Kühe im subklinischen Stadium zwischen 10^3 bis 10^6 cfu je Milliliter. Experimentell konnte nachgewiesen werden, daß eine Infektion mit diesem Erreger jedoch bereits mit weniger als 10^2 cfu ausgelöst werden kann (JASPER *et al.* 1966, KARBE *et al.* 1967, BENNETT und JASPER 1980, JASPER *et al.* 1987, PFÜTZNER und SACHSE 1996).

Wie viele andere Mykoplasmen besitzt auch *M. bovis* eine hohe Affinität zu den Epithelzellen des Respirationtraktes (THOMAS *et al.* 2003). Insbesondere in Gebieten mit kleineren Rinderbeständen verursacht *M. bovis* bei Kälbern und Jungrindern Pneumonien, die häufig in Verbindung mit Polyarthritiden auftreten und zu einer verzögerten Gewichtsentwicklung führen. Auch bei diesen Erkrankungen versagt oft die antibiotische Therapie. Die Morbidität liegt zwischen 20 und 50 %. Die Rinder infizieren sich über erregerhaltige Aerosole oder über kontaminierte Staubpartikel. Vor allem nach primärer Infektion mit Viren und einer damit einhergehenden Schädigung des Respirationtraktes kann durch *M. bovis* eine katharrhalische Bronchopneumonie ausgelöst werden. Nach einer Inkubationszeit von zwei bis sechs Tagen treten klinische Symptome in Form von erhöhter Körpertemperatur, Freßunlust, serösem bis schleimig-eitrigem Nasenausfluß, Tachykardie, Dyspnoe und starkem Husten auf. Histologisch sind Infiltrationen von mononukleären Zellen in das peribronchiale und peribronchioläre Gewebe sowie in die Alveolen nachweisbar. Im weiteren Verlauf kommt es zu multifokalen Koagulationsnekrosen im Parenchym. Durch Superinfektionen mit weiteren bakteriellen Erregern wie Pasteurellen oder Aktinomycceten kann sich dann schließlich eine eitrig-pneumonische Erkrankung entwickeln (REILLY *et al.* 1993, RODRIGUEZ *et al.* 1996).

Nach hämatogener Ausbreitung von *M. bovis* können die Gelenke besiedelt werden und dadurch Polyarthritiden entstehen. Sie betreffen vor allem die Karpal- und Tarsalgelenke und führen zu schweren Lahmheiten und einem Anstieg der

Temperatur auf bis zu 41 °C (BINDER 1990, BINDER *et al.* 1990a). Klinisch-pathologisch sind Tendovaginitiden, Peritendinitiden und Synovitiden, histologisch hochgradige Infiltrationen von Histiozyten, Lymphozyten und Plasmazellen nachweisbar. Herdförmige Nekrosen und starke Fibrinablagerungen kennzeichnen das Erscheinungsbild im Stratum synoviale der infizierten Gelenke (CORBOZ *et al.* 1980, THOMAS *et al.* 1985).

Bei Bullen wurden in Folge von Infektionen mit *M. bovis* Genitalerkrankungen wie Orchitis und Vesiculitis sowie die Herabsetzung der Spermienmotilität, -konzentration und -penetrationsfähigkeit beobachtet. Die Inkubationszeit kann bis zu mehreren Jahren betragen (KIRCHHOFF und BINDER 1986, EAGLESOME und GARCIA 1990, PFÜTZNER und SACHSE 1996). *M. bovis* konnte in Präputialspülproben von Bullen und in frischem und tiefgefrorenem Sperma nachgewiesen werden. Die Infektion des weiblichen Genitaltraktes wird wahrscheinlich vor allem durch künstliche Befruchtung mit kontaminierten Samen hervorgerufen und führt auch hier zu einer Verschlechterung der Fertilisation (STIPKOVITS *et al.* 1979, KIRCHHOFF 1982, PFÜTZNER 1984, KIRCHHOFF und BINDER 1986, PFÜTZNER und SACHSE 1996). Der Erreger kann zudem intrauterin auf den Foetus übertragen werden und zu Aborten führen (STALHEIM und PROCTOR 1976, PFÜTZNER und SACHSE 1996).

2.1.5.3 *Mycoplasma arthritidis*

M. arthritidis ist ein Erreger von Arthritiden bei Ratte und Maus und wurde erstmalig 1938 isoliert (WOGLOM und WARREN 1938). Auch diese Mykoplasmenspezies wird in die Gruppe der nicht-fermentativen Mykoplasmen eingegliedert, da Glucose nicht zur Energiegewinnung verwendet werden kann. Energie kann jedoch durch die Hydrolyse von Arginin gewonnen werden. *M. arthritidis* hat einen G+C-Gehalt von 30-32,6 mol% (BOATMAN 1979, CASSEL und HILL 1979, RAZIN und FREUNDT 1984)

Nach natürlicher Infektion mit *M. arthritidis* werden bei Ratten und Mäusen Polyarthritiden hervorgerufen (COLLIER 1939, COLE und WARD 1979, AMMAR *et al.* 1980). Der Infektionsmodus dieser spontan auftretenden Infektionen ist unklar. Durch intravenöse Inokulation von *M. arthritidis* können in Mäusen und Ratten, durch intraartikuläre Injektion in Kaninchen Arthritiden auch experimentell induziert werden (COLE und WARD 1979, WASHBURN *et al.* 1980). Der Ausbruch einer Arthritis bei Ratten ist von der Anzahl und dem Stamm der zur Infektion verwendeten Mykoplasmen sowie vom Rattenstamm abhängig (BINDER *et al.* 1990b).

Das klinische Bild der Mykoplasmenarthrititis der Ratte ist dadurch gekennzeichnet, daß sich nach einer Inkubationszeit von zwei bis sechs Tagen an allen Gelenken der vier Extremitäten, unter Bevorzugung der Gelenke der vorderen Extremitäten, eine Polyarthritis entwickelt, die durch starke Schwellung, Rötung und Schmerzempfindlichkeit charakterisiert ist. Weitere Symptome sind häufig Rhinitis, Konjunktivitis und Trübung der Kornea. Gelegentlich kommt es zu einer Paralyse der hinteren Extremitäten (KIRCHHOFF *et al.* 1983, WASHBURN und RAMSAY 1989).

Die Erkrankung wurde bei Ratten zunächst als selbstlimitierende Arthritis angesehen (WARD und JONES 1962, HILL und DAGNALL 1975). Nach Infektion mit dem Stamm ISR1 konnte jedoch bei 20-30 % der Tiere eine chronische Arthritis beobachtet werden. Der Verlauf der chronischen Arthritis kann histopathologisch in vier Phasen unterteilt werden. Die erste Phase ist durch zwei Tage *p. i.* beginnende Gefäßveränderungen charakterisiert. In der zweiten, akuten Phase kommt es drei bis vier Tage *p. i.* zu einer Infiltration der Synovialmembran mit neutrophilen Granulozyten, zur Exsudation von Fibrin in den Gelenkspalt und zur Aktivierung von Synovialdeckzellen. Ab dem achten Tag *p. i.* bildet sich subchondrales Pannusgewebe. Die dritte Phase ist durch lymphoplasmazelluläre Infiltration in den Gelenkspalt gekennzeichnet und erreicht ihr Maximum 22 Tage *p. i.* Die vierte und chronische Phase beginnt ca. vier Wochen *p. i.* mit einer ansteigenden periartikulären Fibrosis, Ankylosis und Deformation der Gelenke (KIRCHHOFF *et al.* 1983, HERMANNNS *et al.* 1983).

KIRCHHOFF *et al.* (1983) konnten die Mykoplasmen aus verschiedenen Organen (u. a. aus Leber, Niere, Milz, Thymus, Uterus, Lunge und Herz) bis zu 8 Wochen *p. i.* isolieren. Eine Isolierung aus den Gelenken war bei allen Tieren bis zu 4 Wochen *p. i.*, bei ca. 20 % der Tiere über den gesamten Versuchszeitraum bis zu 7 Monaten *p. i.* möglich. In anderen Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß *M. arthritidis*-Antigene in den Gelenken länger persistieren, als Mykoplasmen kulturell nachweisbar sind (HILL und DAGNALL 1975). Die Mykoplasmenarthritis der Ratte eignet sich nicht nur zum Studium durch Mykoplasmen induzierter Arthritiden bei Nutztieren, sondern aufgrund der Chronizität und der Ähnlichkeiten im histopathologischen Bild auch als Modell für die Rheumatoide Arthritis des Menschen (KIRCHHOFF *et al.* 1983, HERMANNNS *et al.* 1983, KIRCHHOFF *et al.* 1989, KIRCHHOFF und RUNGE 1998).

Als mögliche Virulenzfaktoren werden zwischen *M. arthritidis* und verschiedenen Rattengeweben nachgewiesene Kreuzreaktionen, Toxine und ein Superantigen diskutiert. Diese Virulenzfaktoren könnten auch synergistisch wirken.

Kreuzreaktionen zwischen *M. arthritidis* und Rattengeweben sind schon seit langem bekannt und von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben worden (CAHILL *et al.* 1971, THIRKILL *et al.* 1981, KIRCHHOFF *et al.* 1984, STULLE *et al.* 1988). Mittels eines monoklonalen Antikörpers konnte auch eine Kreuzreaktion zwischen *M. arthritidis* und Knorpelgewebe der Lewis-Ratte und des Menschen nachgewiesen werden (RUNGE *et al.* 1990). Ebenso konnten CD4⁺-T-Zellen aus mit *M. arthritidis* infizierten Lewis-Ratten gewonnen werden, die nicht nur durch *M. arthritidis*-Antigen, sondern auch durch syngene Chondrozyten der Ratte zur Proliferation angeregt wurden (BUSCHE *et al.* 1990). Wie bei anderen pathogenen Mikroorganismen könnte die auf der Gleichartigkeit von Antigenen der Mykoplasmen und des Wirtes beruhende molekulare Mimikry von *M. arthritidis* zunächst die Besiedlung im Wirt erleichtern, da die den Wirtsantigenen ähnlichen oder mit ihnen identischen Antigene der Mykoplasmen vom Immunsystem zunächst nicht als fremd erkannt werden und daher keine Immunreaktion hervorrufen. In späteren Stadien, nach Elimination der

Mykoplasmen, könnte die Erkrankung dann durch Autoimmunreaktionen aufrecht erhalten werden (FUJINAMI und OLDSTONE 1985, KIRCHHOFF *et al.* 1989, BUSCHE *et al.* 1990). Als weitere Virulenzfaktoren kommen Komponenten der Membranen von *M. arthritidis* in Betracht, die *in vitro* toxische Eigenschaften gegenüber Ratten, Meerschweinchen, Mäusen und Hühnerembryonen besitzen und eine hämolytische Aktivität aufweisen (KRÜGER *et al.* 1984, KRÜGER 1985).

Bedeutung in der Pathogenese von *M. arthritidis*-Infektionen hat wahrscheinlich auch die Produktion des Superantigens MAM, das in zahlreichen Untersuchungen charakterisiert worden ist (COLE und ATKIN 1991, COLE und GRIFFITHS 1993, COLE 1996, RINK *et al.* 1996, COLE *et al.* 2000). Dieses Superantigen aktiviert murine Lymphozyten und humane periphere Blutlymphozyten durch die Vernetzung des MHC Klasse II-Moleküls auf der präsentierenden Zelle mit dem T-Zell-Rezeptor, ohne daß eine Prozessierung des Antigens stattgefunden hat (CROW *et al.* 1992, COLE *et al.* 1993). Es ist denkbar, daß durch diese polyklonale Stimulation von B- und T-Zellen auch autoimmune T-Zell-Klone und Autoantikörper induziert werden können. Trotz intensiver Forschung ist jedoch weiterhin unklar, welche Rolle dieses Superantigen bei chronisch entzündlichen Arthritiden spielt. In Versuchen mit Ratten konnte weder durch intraartikuläre Injektion, noch durch systemische Verabreichung von MAM eine Arthritis hervorgerufen werden (CANNON *et al.* 1988). Auch die durch Kollagenase induzierte Arthritis bei der Maus wurde durch Injektion des Superantigens nicht verstärkt (SUSTACKOVA *et al.* 1995). Im Gegensatz hierzu zeigten Untersuchungen von COLE und GRIFFITH (1993), daß die systemische Applikation von MAM eine bestehende durch Kollagen induzierte Arthritis in Mäusen verstärkt und den Ausbruch der Erkrankung unterstützt.

2.1.5.4 *Mycoplasma hyopneumoniae*

M. hyopneumoniae ist der Primärerreger der Enzootischen Pneumonie (EP) und wurde erstmals 1965, gleichzeitig von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen, beschrieben (MARE und SWITZER 1965, GOODWIN *et al.* 1965). Diese Mykoplasmenspezies weist eine kokkoide Zellform mit einem mittleren Zelldurchmesser von 0,2 µm auf. Die Größe des Genoms von *M. hyopneumoniae* beträgt 892 kbp mit einem mittleren G+C-Gehalt von 28,6 mol%. Im Vergleich zu anderen Mykoplasmen stellt *M. hyopneumoniae* besonders hohe Anforderungen an die Kultivierungsbedingungen und wächst sehr langsam. Glukose kann zur Energiegewinnung verwendet werden, weshalb diese Spezies zu den fermentativen Mykoplasmen gezählt wird (ROSS 1992, KOBISCH und FRIIS 1996, CALSAMIGLIA *et al.* 1999, MINION *et al.* 2004).

M. hyopneumoniae ist der am weitesten verbreitete und ökonomisch bedeutendste Krankheitserreger des Schweines. Weltweit können bei 12-81 % der Schlachttiere typische Veränderungen des Lungengewebes festgestellt werden, die auf eine EP zurückgeführt werden. Unter Berücksichtigung bereits abgeheilte Läsionen muß jedoch von einem wesentlich höheren Prozentsatz ausgegangen werden (SIMECKA

et al. 1992, WALLGREN et al. 1994, ROSS 1999). In Deutschland ist der Erreger in den Schweinebeständen ebenfalls weit verbreitet (PFÜTZNER und BLAHA 1995). HORST et al. (1997) konnten eine Seroprävalenz zwischen 75 und 100 % nachweisen. Infolge der EP entstehen, aufgrund der schlechten Mast- und Futterleistung und des notwendigen Einsatzes von Antibiotika, große wirtschaftliche Schäden, deren Kosten in Nordamerika auf 200 Millionen bis 1 Milliarde US-Dollar geschätzt wurden (CLARK et al. 1991, SIMECKA et al. 1992, ROSS 1999).

Die Erkrankung ist durch eine Morbidität zwischen 30 und 80 % und eine sehr niedrige Mortalität charakterisiert. Eine Infektion erfolgt über den Respirationstrakt durch erregerhaltige Aerosole der Atemluft, die bis zu einer Entfernung von 3,5 km übertragen werden können, oder durch Nasensekrete. Nach einer Inkubationszeit von ein bis drei Wochen ist über einen Zeitraum von mehreren Wochen oder Monaten trockener Husten das einzige klinische Symptom. Obwohl Schweine aller Altersgruppen für eine Infektion mit *M. hyopneumoniae* empfänglich sind, infizieren sich vor allem Ferkel in den ersten Lebenswochen. Der Erreger wird von infizierten Sauen auf deren Ferkel, zwischen den Würfen oder später von älteren Schweinen auf die Läufer übertragen. Von den klinischen Symptomen sind vor allem Läufer und Mastschweine betroffen. Nach Infektion von EP-freien Herden mit *M. hyopneumoniae* entwickeln allerdings alle Tiere eine Pneumonie. Die Tiere weisen ein verzögertes Wachstum sowie eine geringere Zunahme des Gewichtes auf und kümmern. Nach bronchogener Ausbreitung adhäriert der Erreger an das Flimmerepithel. Im Verlauf der Erkrankung kommt es zu Veränderungen der Alveolarwände. Nach Sekundärinfektionen mit anderen Krankheitserregern können weitere Symptome festgestellt werden. Aufgrund des Verlustes der Zilien und der damit einhergehenden verminderten mukoziliären Clearance sowie degenerativen Veränderungen des Alveolarepithels und verminderter Produktion von Surfactant der Typ II Pneumozyten können sich andere bakterielle Erreger wie *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Hämophilus parasuis* oder *Actinobacillus pleuropneumoniae* leichter und vermehrt ansiedeln und schließlich zu einem Symptomenkomplex mit interstitieller Pneumonie, Pleuritis und Perikarditis führen, der auch als MIRD (Mycoplasma-induced Respiratory Disease) bezeichnet wird (FRIIS 1974, KIRCHHOFF 1988, STIPKOVITS 1990, SIMECKA et al. 1992, ROSS 1992, KOBISCH et al. 1993, MAES et al. 1996, ROSS 1999). Nach initialer Schädigung des Alveolarepithels durch virale Erreger, wie dem „Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome“ Virus oder dem „Porcine Respiratory Corona“ Virus kann eine Infektion mit *M. hyopneumoniae* auch die Dauer und Schwere der viralen Erkrankungen negativ beeinflussen (THACKER et al. 1999, THACKER et al. 2001, OPRIESSING und HALBUR 2004).

Gelegentlich kann unter Feldbedingungen eine Beteiligung der Gelenke nachgewiesen werden. Die Schwere der klinischen Symptome hängt nicht nur von Superinfektionen mit anderen Krankheitserregern ab, sondern auch von weiteren Faktoren, wie beispielsweise den Haltungsbedingungen, den klimatischen Bedingungen und möglicherweise auch der unterschiedlichen Virulenz einzelner

Stämme von *M. hyopneumoniae* (WHITTLESTONE 1979, KIRCHHOFF 1988, ROSS 1992, KOBISCH *et al.* 1993, FEENSTRA *et al.* 1994).

Pathologisch ist die durch *M. hyopneumoniae* hervorgerufene Erkrankung eine katarrhalische Pneumonie mit Exsudat in den Luftwegen. Die makroskopisch sichtbaren, scharf abgegrenzten Läsionen sind auf die Spitzen- und Mittellappen beschränkt und treten ein bis zwei Wochen nach der Infektion auf. Histopathologisch kann zunächst eine Besiedlung der Zilien des oberen Respirationstraktes mit Mykoplasmen festgestellt werden, die insbesondere auf der Adhärenz eines Adhäsins von *M. hyopneumoniae* an Glykolipidrezeptoren der Zilienoberfläche beruht und zu degenerativen Veränderungen und schließlich zum Verlust von Zilien führen kann. In der akuten Phase der Infektion sind eine Hyperplasie der Epithelzellen sowie eine perivaskuläre und peribronchiale Anhäufung von mononukleären Zellen nachweisbar. Im späteren Stadium der Erkrankung können charakteristische perivaskuläre und peribronchiale Knötchen beobachtet werden. Das Exsudat besteht aus mukoiden Bestandteilen, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen (BLANCHARD *et al.* 1992, ROSS 1992, KOBISCH *et al.* 1993, DEBEY und ROSS 1994, ZHANG *et al.* 1994, ZHANG *et al.* 1995, THACKER *et al.* 1999).

Zur Bekämpfung der EP stehen, im Gegensatz zu fast allen anderen durch Mykoplasmen ausgelösten Erkrankungen, einige kommerziell erhältliche Vakzine zur Verfügung. Diese führen zwar zu einer Verringerung der Lungenläsionen, zu verbesserten Wachstumsraten und zu einer Reduktion der Kosten für Antibiotika, können aber eine Kolonisation der Schweine mit *M. hyopneumoniae* und eine Ausscheidung des Erregers zumindest nicht vollständig verhindern (SCHEIDT *et al.* 1994, SCHATZMANN *et al.* 1996, REYNAUD *et al.* 1998, THACKER *et al.* 1998, CALSAMIGLIA *et al.* 1999, KYRIAKIS *et al.* 2001, THACKER *et al.* 2004).

2.1.5.5 *Mycoplasma pneumoniae*

M. pneumoniae ist ein weltweit vorkommender Infektionserreger des Menschen und kann Tracheobronchitis und eine als „atypische Pneumonie“ beschriebene Lungenentzündung verursachen (KRAUSE und TAYLOR-ROBINSON 1992, JACOBS 1997). *M. pneumoniae* wurde in den vierziger Jahren des letzten Jahrhunderts zunächst als sogenanntes „Eaton agent“, als filtrierbares Agens, bezeichnet (EATON *et al.* 1944). In den sechziger Jahren wurde der Erreger von CHANOCK (1963) als Mykoplasmenspezies erkannt und von SOMERSON *et al.* (1963) beschrieben.

M. pneumoniae weist eine flaschenförmige Zellform auf. Diese Mykoplasmenspezies gehört zu den am langsamsten wachsenden Mykoplasmen. Das Genom hat eine Größe von 816 kbp und einen G+C-Gehalt von durchschnittlich 40 mol% (KRAUSE und TAYLOR-ROBINSON 1992, RAZIN 1997a). *M. pneumoniae* hydrolysiert kein Arginin und kann Energie durch den Abbau von Glukose gewinnen, wobei als Stoffwechselprodukte Sauerstoffradikale und Wasserstoffperoxid freigesetzt werden, die, begünstigt durch den engen Zellkontakt, zu Schäden an den Membranen der

Wirtszellen führen (JACOBS *et al.* 1991, KRAUSE und TAYLOR-ROBINSON 1992, BASEMAN und TULLY 1997).

Von einer durch *M. pneumoniae* verursachten Erkrankung sind am häufigsten Personen bis zu einem Alter von 35 Jahren betroffen, wobei die höchste Infektionsrate bei Kindern im Alter von 5-15 Jahren festgestellt wurde. Der Erreger wird durch Aerosole vor allem bei intensivem oder wiederholtem Kontakt, wie er beispielsweise in Familien oder Kindergärten vorkommt, übertragen und führt in der Regel nur zu milden Infektionen des Respirationstraktes. Diese können klinisch symptomlos bleiben, aber aufgrund entzündlicher Reaktionen und immunologischer Komplikationen, wie beispielsweise der Bildung von Autoantikörpern, auch einen schweren Verlauf nehmen. In den USA beträgt der Anteil der durch *M. pneumoniae* verursachten Lungenentzündungen 15 bis 20 % an der Gesamtzahl der Pneumonien. Außer der normalerweise auf den Respirationstrakt beschränkten Erkrankung können verschiedene extrapulmonale Komplikationen festgestellt werden. Dazu gehören Erbrechen, Durchfall, die Produktion von Kälte-Agglutininen, Myalgien und Arthralgien, dermatologische Erkrankungen, Meningitiden und Meningoencephalitiden (CLYDE 1979, BIBERFELD 1985, KRAUSE und TAYLOR-ROBINSON 1992, FOY 1993, JACOBS 1997, RAZIN *et al.* 1998).

Die Pathomechanismen des Krankheitsverlaufes einer *M. pneumoniae*-assoziierten Infektion sind nur teilweise untersucht. *M. pneumoniae* besitzt spezielle Proteinstrukturen, die ein adhärentes Wachstum ermöglichen. Als Adhäsine sind das „major adhesin“ P1 (ein 169 kDa großes Protein) und das P30-Adhäsine (32 kDa) sowie einige akzessorische Proteine bekannt, die einen engen Kontakt zu den Wirtszellen vermitteln (RAZIN und JACOBS 1992, ATHAMNA *et al.* 1996). Die Interaktion zwischen Parasit und Wirtszelle erfolgt über spezielle, neuraminidaseempfindliche Rezeptoren (RAZIN 1985, ROBERTS *et al.* 1989). Die Adhärenzproteine sind am polaren Ende der Mykoplasmenzelle in der sogenannten „tip structure“ lokalisiert, mit welcher die Mykoplasmen z. B. an Epithelzellen der Trachea adhärieren können (RAZIN und JACOBS 1992, KRAUSE 1996).

Während die Virulenzfaktoren weitgehend identifiziert wurden, ist über die immunpathologischen Faktoren der *M. pneumoniae*-Infektion nur wenig bekannt. *M. pneumoniae* induziert in der Lunge des Menschen entzündliche Reaktionen, die u. a. auf der Interaktion des Krankheitserregers mit den Epithelzellen der Lunge und den Zellen des Immunsystems beruhen. Bereits früh wurden die mitogenen Eigenschaften von *M. pneumoniae* erkannt (FERNALD 1972, BIBERFELD und GRONOWICZ 1976, BIBERFELD 1977). Später wurde nach Stimulation von eukaryontischen Zellen mit *M. pneumoniae* die Sekretion einer Vielzahl von Zytokinen wie IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, TNF- α , Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) sowie Interferon (IFN)- γ nachgewiesen (MAKHOUL *et al.* 1987, JACOBS *et al.* 1991, KITA *et al.* 1992, PIETSCH und JACOBS 1993, MESEGUER *et al.* 1994, MESEGUER *et al.* 1996, JACOBS 1997, MESEGUER *et al.* 1998, CHMURA *et al.* 2003).

2.2 Hitzeschockproteine

Alle Organismen sind ständig sich verändernden Umweltbedingungen ausgesetzt, die von den für sie optimalen Bedingungen abweichen. Die dadurch entstehenden Belastungen werden als Stress bezeichnet. Prokaryontische und eukaryontische Zellen reagieren auf plötzlich auftretende, unphysiologische Noxen mit der Expression von spezifischen Proteinen. Diese Reaktion wird Stress- oder Hitzeschockantwort und die exprimierten Proteine werden entsprechend als Stress- oder Hitzeschockproteine (Hsp; die Abkürzung Hsp wird im nachfolgenden Text für den Singular und Plural verwendet) bezeichnet.

Zu Beginn der sechziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde erstmals die zelluläre Stressantwort als Reaktion auf einen Hitzeschock sowie nach Einwirkung von 2,4-Dinitro-Phenol anhand von „Aufwölbungen“ (engl. puffs), Stellen mit hoher genetischer Aktivität, an den Speicheldrüsenchromosomen der Taufliege *Drosophila* beschrieben (nach RITOSSA 1996). Erst mehr als ein Jahrzehnt später wurde jedoch nachgewiesen, daß die Ausbildung von „puffs“ als Reaktion auf eine plötzliche Temperaturerhöhung mit der Synthese dieser speziellen Gruppe von Proteinen einhergeht (TISSIERES *et al.* 1974).

Wie in den folgenden Jahren festgestellt wurde, kann die Synthese dieser Proteine jedoch nicht nur durch Hitzeschock und 2,4-Dinitro-Phenol, sondern auch durch eine Vielzahl anderer als Stressfaktoren wirkender Einflüsse induziert werden: hierzu zählen u. a. UV-Strahlen, Entzündungen und Fieber, Alkohole, verschiedene Schwermetalle, Wasserstoffsuperoxid, freie Sauerstoffradikale, Anästhetika, Insektizide und Pestizide sowie Schwankungen des pH-Wertes und der Osmolarität. Diese Stressreaktion ist bei allen bislang untersuchten Organismen vorhanden (NEIDHARDT *et al.* 1984, LINDQUIST 1986, LINDQUIST und CRAIG 1988, KAUFMANN 1990, WATSON 1990, WELCH 1993). Nach NOVER (1990a, 1990b) kann bei den Stressfaktoren zwischen hitzeschockartigen Induktoren, die gleichermaßen wie nach einem Hitzeschock die Ausbildung eines ganzen Spektrums von Proteinen hervorrufen, und spezifischen Induktoren, die lediglich einzelne Hsp induzieren, unterschieden werden.

Später wurde bekannt, daß Hsp auch ohne den Einfluß von Stressfaktoren konstitutiv synthetisiert werden und im Stoffwechsel von Pro- und Eukaryonten eine wichtige Rolle bei der Faltung neugebildeter Polypeptide in deren Tertiärstruktur sowie bei der Zusammensetzung von Proteinen zu funktionellen Komplexen spielen. Da Hsp die Polypeptide nicht enzymatisch verändern und nicht Bestandteil des finalen, funktionellen Proteins oder Proteinkomplexes sind, sondern nur eine unterstützende Aufgabe haben, werden sie auch als Chaperone (engl. chaperone, Gouvernante) bezeichnet.

Hsp sind aufgrund ihrer Funktionen evolutionär hochkonserviert und werden entsprechend ihres Molekulargewichts in mehrere Familien unterteilt: die Hsp100-, die Hsp 90-, die Hsp70-, die Hsp60-, die Hsp40-Familie und die Familie der kleinen Hsp (15-30 kDa) (NOVER 1990b, JÄATTELA und WISSING 1992, MULTHOFF *et al.*

1998, PARCELLIER *et al.* 2003). Da bereits Anfang der siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts bei *Escherichia (E.) coli* einige Hsp in Zusammenhang mit der Replikation von Bakteriophagen charakterisiert, aber nicht als solche erkannt wurden, haben diese Hsp von *E. coli* Bezeichnungen erhalten, die noch heute für die Hsp anderer Bakterien synonym verwendet werden. So bezeichnet DnaK das bakterielle Hsp70, GroEL das Hsp60, DnaJ das Hsp40, GrpE das Hsp20 und GroES das bakterielle Hsp10 (GEORGOPOULOS und HERSKOWITZ 1971, GEORGOPOULOS und WELCH 1993, MOGK *et al.* 2001).

2.2.1 Funktion der Hitzeschockproteine

Hsp besitzen im normalen und im Stress beeinflussten Zellstoffwechsel eine Vielzahl wichtiger physiologischer Funktionen, die nachfolgend kurz beschrieben werden:

Proteine enthalten die gesamte Information zu ihrer Faltung und Funktion in der Abfolge ihrer Aminosäuren. Bei der vektoriellen Synthese von Peptiden an den Ribosomen steht ihnen aber zunächst nicht die Gesamtheit dieser Information zur Verfügung. Zudem enthält das Zytosol mit ungefähr 340 µg je Mikroliter eine große Menge an Proteinen und anderen Makromolekülen. Dieser Zustand in den Zellen wird auch als „molecular crowding“ bezeichnet. Die dichtgedrängt liegenden Moleküle können in Wechselwirkung mit den neu synthetisierten Peptiden treten und dadurch eine korrekte Faltung verhindern oder zu funktionslosen Aggregaten führen. Vor allem Intermediate, bei denen Bereiche mit hydrophoben Aminosäuren exponiert sind, sind anfällig gegenüber hydrophoben Wechselwirkungen mit anderen Proteinen. Hsp binden an diese hydrophoben Bereiche und verhindern dadurch unproduktive Protein-Protein-Interaktionen. In ATP-abhängigen Prozessen können Hsp dann die korrekte Faltung der Proteine vermitteln (NOVER 1990a, NOVER 1990b, LANGER und NEUPERT 1991, ZIMMERMAN und TRACH 1991, WELCH 1992, CRAIG *et al.* 1993, WELCH 1993, HARTL 1996, NOVER und SCHARF 1997, BEISSINGER und BUCHNER 1998, MOGK *et al.* 2002).

In Prokaryonten werden neu synthetisierte Peptide durch ein als „Trigger-Faktor“ bezeichnetes Hsp gebunden, das vermutlich die hydrophoben Bereiche schützt und die ersten Faltungsvorgänge unterstützt. Nach dem Ablösen des Trigger-Faktors falten sich 67 % der Peptide selbständig, während die übrigen, vor allem größere und komplexere Peptide, von den Chaperonen der Hsp70- und Hsp60-Familie erkannt und bei den Faltungsvorgängen unterstützt werden (DEUERLING *et al.* 1999, BUKAU *et al.* 2000, MOGK *et al.* 2001). Hsp sind auch posttranslationell in den Transport der neu gebildeten Polypeptide und in die Translokation von Precursor-Proteinen durch die Membranen von Mitochondrien, Chloroplasten und des endoplasmatischen Reticulums involviert, indem sie eine vorzeitige vollständige Faltung der Peptide verhindern (PELHAM 1988, OSTERMANN *et al.* 1990, ELLIS und VAN DER VIES 1991, WELCH 1992, NELSON *et al.* 1992, SANDERS *et al.*

1992, GEORGOPOULOS und WELCH 1993, NOVER und SCHARF 1997, PARCELLIER *et al.* 2003).

Eine weitere wichtige Rolle spielen Hsp beim Abbau denaturierter und abnorm gefalteter Proteine, wie sie auch nach Einwirkung der oben geschilderten Stressfaktoren entstehen können, indem sie diese durch Anlagerung markieren und dem Abbau durch Proteasen zuführen. Die Bindung führt zu einem Defizit freier Hsp und wird durch eine gesteigerte Synthese der Hsp von der Zelle ausgeglichen (GOFF und GOLDBERG 1985, ANANTHAN *et al.* 1986, GLOVER und LINDQUIST 1998). Die vermehrte Synthese von Hsp schützt die Zellen daher auch vor Einflüssen durch Hitze und andere Stressfaktoren, die zu einer Entfaltung und Aggregation von Proteinen führen. Untersuchungen an Zellen, die für kurze Zeit einer erhöhten, subletalen Temperatur ausgesetzt wurden, zeigten zudem, daß diese Zellen anschließend besser gegen eine stärkere Temperaturerhöhung über einen längeren Zeitraum geschützt sind als eine entsprechende Kontrollpopulation. Dieses als Thermotoleranz bezeichnete Phänomen wurde bei den verschiedensten pro- und eukaryontischen Zellen nachgewiesen (LANDRY *et al.* 1982, LI 1983, LI und MAK 1985). Die Toleranz gegenüber Stressfaktoren korreliert eng mit der gesteigerten Synthese von Hsp70 (KAUFMANN 1990, MOGK *et al.* 1999). So wiesen besonders hitzeresistente Varianten von Hamsterfibroblasten eine vermehrte Expression von Hsp70 auf (LASZLO und LI 1985). Diese Thermotoleranz wird auch dann entwickelt, wenn die erste Hitzeschockantwort nicht durch eine Temperaturerhöhung, sondern durch einen anderen Stressfaktor hervorgerufen wird (PLESSET *et al.* 1982, LI 1983). An Hirn- und Herzzellen durchgeführte Experimente ließen ebenfalls diese sogenannte „Kreuztoleranz“ erkennen: Ein sublethaler Hitzeschock oder andere Vorbehandlungen, die zu einer gesteigerten Hsp70-Synthese führten, minderten die schädigenden Effekte einer anschließend ausgelösten Ischämie (BENJAMIN und WILLIAMS 1994). DnaK-defiziente Mutanten von *E. coli* wiesen nach einem Hitzeschock im Vergleich zum Wildtyp eine drastisch erhöhte Anzahl aggregierter Proteine auf. Auch die Überexpression von Hsp60 und anderen Chaperonen konnte die Aggregation der Proteine nicht verhindern (MOGK *et al.* 1999). Demgegenüber konnten bereits bestehende Proteinaggregate mit Hilfe des ClpB, einem Protein der Hsp100-Familie, und DnaK wieder aufgelöst und sogar in ihre aktive Form überführt werden (GLOVER und LINDQUIST 1998, GOLOUBINOFF *et al.* 1999, MAYER *et al.* 2000).

2.2.2 Die Hsp70- und Hsp60-Familie

Hsp60- und Hsp70-Moleküle werden in den Zellen konstitutiv exprimiert, was auf ihre elementaren Funktionen in den Zellprozessen hinweist. Nach Einwirkung von Stressfaktoren werden diese Proteine verstärkt synthetisiert. In *E. coli* konnte dabei die Produktion des Hsp60 (GroEL) um das vier- bis fünffache gesteigert werden (BUKAU 1993).

Bei den Proteinen der Hsp70-Familie mit einem Molekulargewicht von 63-78 kDa können zwei Gruppen unterschieden werden. Die eine Gruppe ist bei Eukaryonten im Zytosol und im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums lokalisiert. Die andere Gruppe ist in den Mitochondrien und Chloroplasten der Eukaryonten und im Zytoplasma von Prokaryonten vorhanden. Im Gegensatz zu der Multigenfamilie der Eukaryonten wird die Synthese des Hsp70 (DnaK) von *E. coli* nur von einem Gen, dem *dnaK*, kodiert (MUNRO und PELHAM 1986, CRAIG *et al.* 1989).

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, spielen Proteine der Hsp70-Familie im Proteinstoffwechsel unter physiologischen Bedingungen und unter Einwirkung von Stressfaktoren eine essentielle Rolle. Zu den Funktionen des Hsp70 der Prokaryonten gehört die Unterstützung der Proteinfaltung der nach der Translation entstehenden Peptidketten, die Verhinderung der Bildung von Proteinaggregaten und, in Zusammenarbeit mit ClpB, die Auflösung von Proteinaggregaten nach Einwirkung von Stressfaktoren sowie die Regulation der Hitzeschockantwort (CRAIG *et al.* 1993, HARTL 1996, BUKAU und HORWICH 1998, BUKAU *et al.* 2000). Für das Hsp70 konnten bei Eukaryonten Aminosäuresequenzhomologien bis zu 98 %, innerhalb von Prokaryonten bis zu 70 % und zwischen Pro- und Eukaryonten bis zu 50 % festgestellt werden (LINDQUIST und CRAIG 1988, CRAIG *et al.* 1993). Obwohl Hsp der Hsp70-Familie hoch konserviert sind, konnte in dem Archaeobacterium *Methanococcus jannaschii* überraschenderweise kein Hsp70-Gen nachgewiesen werden (BULT *et al.* 1996).

Das Hsp70 kann seine Funktion nur in Verbindung mit Co-Chaperonen effizient erfüllen. Insbesondere bei *E. coli* sind diese Mechanismen gut erforscht. Die Arbeitsweise des Hsp70 ist am Beispiel des DnaK und der Co-Chaperone DnaJ und GrpE in Abb. 1 dargestellt (die in den Klammern stehenden Ziffern beziehen sich auf die Abb. 1):

Die Proteine werden zunächst an das Co-Chaperon DnaJ gebunden (1) und anschließend an DnaK weitergegeben (2). Auch eine sofortige Bindung der Proteine an DnaK ist möglich. DnaJ hat ein Molekulargewicht von 37 kDa und besteht aus einer hoch konservierten aminoterminalen Domäne, welche die ATPase-Aktivität des DnaK-Moleküls stimulieren kann, und einer carboxyterminalen Domäne, an die Proteine binden können (LIBEREK *et al.* 1991, HARTL 1996, BEISSINGER und BUCHNER 1998, BUKAU und HORWICH 1998).

Das DnaK-Molekül verfügt über eine carboxyterminal gelegene, mit nur 30 % Aminosäuresequenzhomologie relativ gering konservierte Domäne mit einer Peptidbindungstasche, die mit hydrophoben, etwa fünf Aminosäuren langen Segmenten der Proteine interagieren kann (CRAIG und JACOBSEN 1985, GETHING und SAMBROOK 1992, CRAIG *et al.* 1993, BUKAU und HORWICH 1998, ERBSE *et al.* 2004). Die stärker konservierte aminoterminal Domäne besitzt eine ATP-Bindungsstelle und ist zu dessen Hydrolyse befähigt. Durch Interaktion mit dem Co-Chaperon DnaJ wird die Spaltung des energiereichen Triphosphates stimuliert. Der nun entstandene DnaK-ADP-Komplex besitzt eine hohe Affinität zu den Proteinen (2). Durch Anlagerung des Co-Chaperons GrpE, das ein Molekulargewicht

von 24 kDa hat, wird die Affinität von DnaK zum ADP stark herabgesetzt, wodurch das ADP dissoziiert. Nach erneuter Bindung von ATP an DnaK löst sich das gefaltete Protein vom DnaK. Der Ausgangszustand ist nun wiederhergestellt, in dem Proteine nur mit einer geringen Affinität gebunden werden (3). Eine Regulierung der Funktion des DnaK findet somit durch den ADP/ATP-Austausch über die beiden Co-Chaperone DnaJ und GrpE statt. DnaK bindet Proteine mit einem Molekulargewicht >30 kDa und assistiert bei der Faltung von 5-18 % der Gesamtproteine in der Zelle (LIBEREK *et al.* 1991, BEISSINGER und BUCHNER 1998, BUKAU und HORWICH 1998, BUKAU *et al.* 2000).

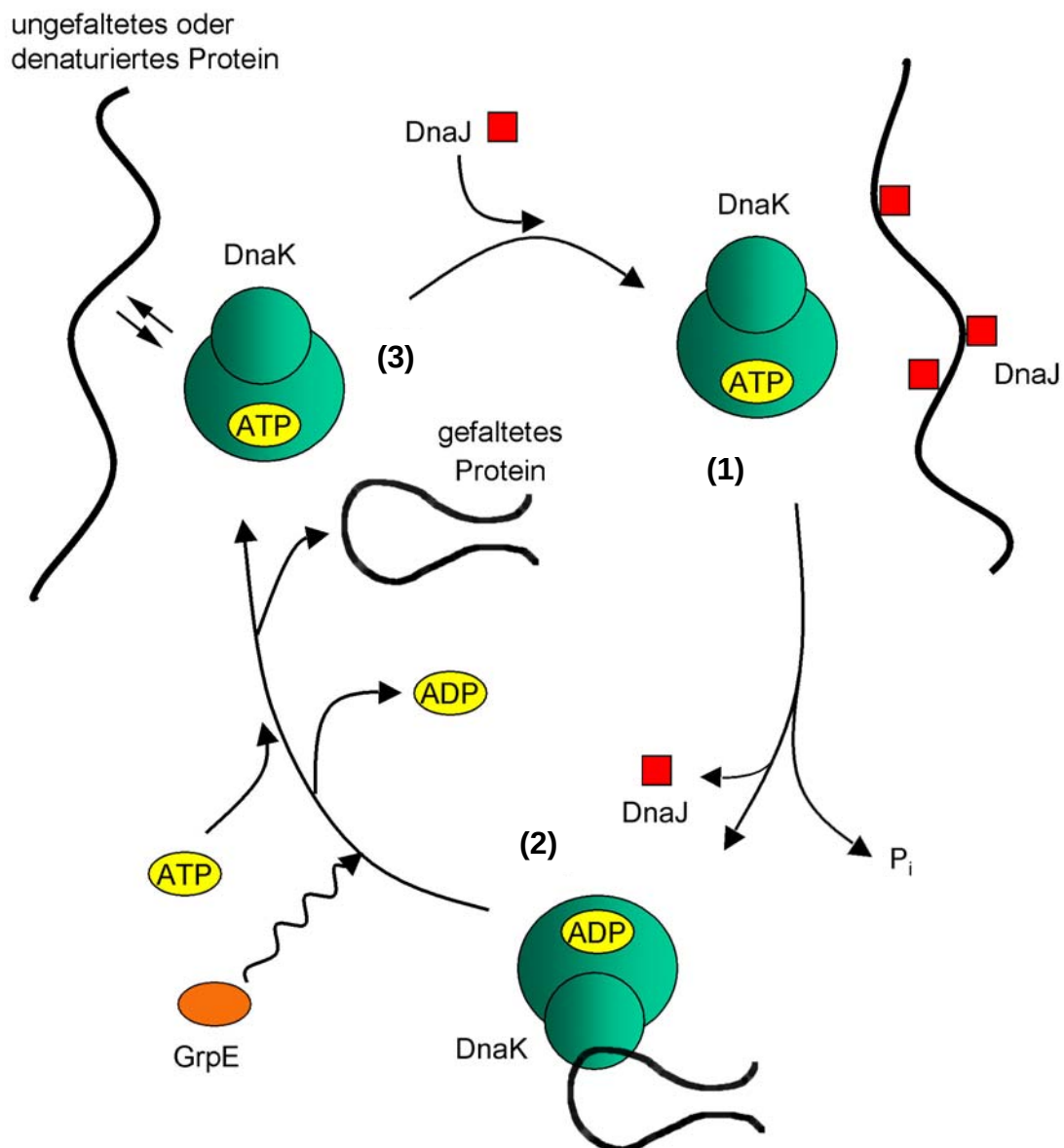


Abb. 1: Modell des DnaK-Zyklus: Proteinfaltung durch DnaK (Hsp70) unter Beteiligung der Co-Chaperone DnaJ (Hsp40) und GrpE (Hsp20)

Verändert nach BEISSINGER und BUCHNER (1998) sowie BUKAU und HORWICH (1998); die einzelnen Schritte werden im Text erläutert.

Die Proteine der Hsp60-Familie umfassen Hsp mit einem Molekulargewicht von 53-62 kDa. Auch diese Hsp können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Hsp der einen Gruppe sind in Bakterien sowie den Mitochondrien und Chloroplasten von Eukaryonten lokalisiert (HEMMINGSEN *et al.* 1988, CHENG *et al.* 1989). Die Vertreter der anderen Gruppe kommen im Zytosol von Eukaryonten und in Archaeobakterien vor (FRYDMAN *et al.* 1992, DITZEL *et al.* 1998).

Bereits Anfang der siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde die gesteigerte Synthese eines 60 kDa (GroEL) und eines 10 kDa (GroES) Proteins von *E. coli* in Zusammenhang mit der Replikation von Bakteriophagen nachgewiesen (GEORGOPOULOS *et al.* 1972, GEORGOPOULOS und WELCH 1993). Homologe Proteine wurden später auch im Zytosol anderer Bakterien und in den Mitochondrien von Eukaryonten sowie in den Chloroplasten von Pflanzen gefunden (BARRACLOUGH und ELLIS 1980, MUNRO und PELHAM 1986, McMULLIN und HALLBERG 1988, CRAIG *et al.* 1989).

Erst viele Jahre nach dem ersten Nachweis wurde die eigentliche Funktion des Hsp60 im Zellstoffwechsel erkannt: die Beteiligung an ATP-abhängigen Faltungsprozessen von Proteinen und die Verhinderung sinnloser Protein-Protein-Interaktionen (CHENG *et al.* 1989). Da die Hsp60-homologen Proteine der Chloroplasten an der Faltung der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase beteiligt sind, wurden sie hier als „ribulose biphosphate carboxylase subunit-binding proteins“ (RUBISCO) bezeichnet (ELLIS und VAN DER VIES 1991, GEORGOPOULOS und WELCH 1993). Proteine der Hsp60-Familie sind hoch konserviert. Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen Prokaryonten und Eukaryonten beträgt bis zu 60 % (SHINNICK 1991).

Im nativen, funktionsfähigen Zustand bilden die einzelnen 60 kDa Proteine von *E. coli* einen zylinderförmigen, aus zwei Ringen mit jeweils sieben Untereinheiten bestehenden Proteinkomplex mit einem Molekulargewicht von annähernd einer Million Dalton. Die Struktur dieses als Chaperonin oder auch als GroEL bezeichneten Proteinkomplexes wurde durch elektronenoptische und kristallographische Untersuchungen aufgeklärt (HARTL 1996, BUKAU und HORWICH 1998).

Wie das Hsp70 kann auch das Hsp60 seine Funktion nur in Verbindung mit einem Co-Chaperon effizient erfüllen. Die Arbeitsweise des Hsp60 ist an *E. coli* gut erforscht. Sie wird am Beispiel des Chaperonins GroEL und des aus einem Ring aus 10 kDa Untereinheiten bestehenden Co-Chaperons GroES beschrieben (Abb. 2; die in den Klammern stehenden Ziffern im Text beziehen sich auf die Ziffern in der Abbildung):

Die beiden Ringe des GroEL bilden jeweils einen Hohlraum. Ungefaltete oder fehlerhaft gefaltete Proteine, die Segmente mit hydrophoben Aminosäuren präsentieren, werden an der Innenseite des offenen Hohlraums durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden (1 und 2). Durch die Bindung und Hydrolyse von ATP sowie die Anlagerung von GroES werden im GroEL Konformationsänderungen induziert, wodurch das Protein in einer Art Kammer eingeschlossen wird (3 und 4).

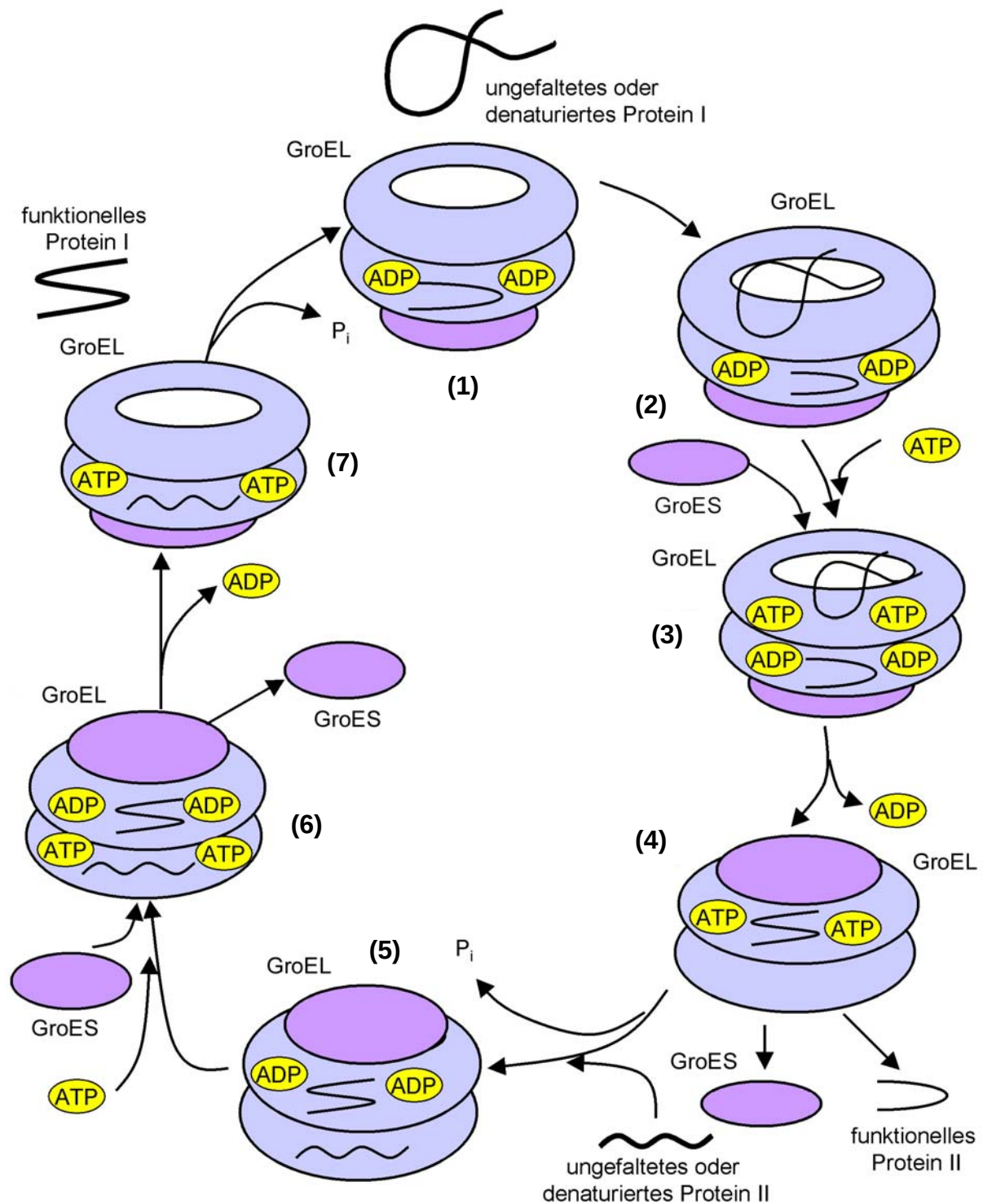


Abb. 2: Modell des GroEL-Zyklus: Proteinfaltung durch GroEL (Hsp60) unter Beteiligung des Co-Chaperons GroES (Hsp10)

Verändert nach HARTL (1996), BEISSINGER und BUCHNER (1998) sowie BUKAU und HORWICH (1998); die einzelnen Schritte werden im Text erläutert.

Die Konformationsänderungen führen zu einer Verdopplung des Volumens des GroEL und zu einem „Wegdrehen“ der Bindungsstellen für das Protein, wodurch es zu einer Entfaltung des Peptids kommt. Das Protein kann jetzt in der Kammer seine funktionelle Faltung ohne die Interaktion mit zytosolischen Proteinen durchführen (4). Manche Proteine falten sich jedoch erst, nachdem sie aus der Kammer entlassen worden sind. Die Bindung eines weiteren Proteins in der gegenüberliegenden Kammer sowie die anschließende Bindung von ATP und GroES führen zur Dissoziation des GroES-Moleküls der ersten Kammer und zur Freisetzung des darin eingeschlossenen Proteins (5-7). Das GroEL arbeitet demzufolge einem Zweitaktmotor vergleichbar gegenläufig (CRAIG *et al.* 1993, WELCH 1993, GEORGOPOULOS und WELCH 1993, FRYDMAN *et al.* 1994, HARTL 1996, BEISSINGER und BUCHNER 1998, BUKAU und HORWICH 1998, MOGK *et al.* 2001). GroEL bindet Proteine mit einem Molekulargewicht von ungefähr 20-60 kDa und assistiert vermutlich bei der Faltung von 10-15 % der Proteine einer Zelle (LIBEREK *et al.* 1991, BUKAU und HORWICH 1998, BUKAU *et al.* 2000).

2.2.3 Bedeutung von Hitzeschockproteinen im Verlauf von Infektionen und Erkrankungen

Ebenso wie sich die Zellen eines Wirtsorganismus vor den schädlichen Einflüssen einer bakteriellen oder viralen Infektion schützen, schützen sich auch Bakterien gegen die Abwehrreaktion des Wirtes mit Hsp. So beschrieben FIELDS *et al.* (1986), daß Mutanten von *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium mit Defekten in Hsp-Genen schneller von Makrophagen abgetötet werden als der Wildtyp. Im Verlauf einer Infektion kommt es vermutlich sowohl bei den Mikroorganismen als auch beim Wirt, beispielsweise durch die Einwirkung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten aus Phagozyten, Eisendepletion, Änderungen im pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck und in der Osmolarität zu einer gesteigerten Expression von Hsp. Im Wirt wird dieser Effekt zudem durch die Einwirkung bakterieller Enzyme, lokaler Nährstoffdepletion und anderer durch die Erreger ausgelösten Stressfaktoren verstärkt. Wirt und Pathogen bedienen sich demzufolge desselben Mechanismus, um die Schäden bei der Auseinandersetzung mit dem jeweils anderen Organismus zu minimieren (FERRIS *et al.* 1988, POLLA und KANTENGWA 1991).

Für die Hsp ist die auffallend hohe Konservierung der Aminosäuresequenzen charakteristisch (KLUMPP und BAUMEISTER 1998). Entgegen der Annahme, daß hoch konservierte Antigene schwache Immunogene darstellen, sind gerade Proteine der Hsp60- und Hsp70-Familien immundominante Antigene vieler Bakterien und eukaryotischer Parasiten. Während bei Infektionen mit Protozoen wie *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma cruzi* oder Leishmanien vor allem Antikörper gegen Hsp70 gebildet werden, wurden bei Infektionen durch Bakterien wie *Bordetella pertussis*, *Treponema pallidum*, *Borrelia burgdorferi* und Mykobakterien Antikörper und

T-Zellen, die gegen Hsp60 und Hsp70 gerichtet sind, nachgewiesen (YOUNG und ELLIOTT 1989, KAUFMANN 1990, VAN EDEN 1990).

Die hohe Konservierung ist jedoch nicht nur ein Zeichen für die wichtigen Funktionen, die Hsp in den Organismen ausüben, sondern in Verbindung mit der Immundominanz dieser Proteine auch eine mögliche „Achillesferse“ in der Beziehung Pathogen-Wirt: Epitope der Hsp der Bakterien könnten Autoimmunreaktionen gegen gleiche oder ähnliche Epitope auf den Hsp des Wirtes hervorrufen. Folgerichtig wurden bei Autoimmunerkrankungen wie dem Systemischen Lupus Erythematoses (MINOTA *et al.* 1988a, MINOTA *et al.* 1988b) und der Rheumatoiden Arthritis (TSOULFA *et al.* 1989, HOLOSHITZ *et al.* 1989) erhöhte Konzentrationen von Hsp-reaktiven Antikörpern und T-Zellen nachgewiesen.

Viele weitere Untersuchungen, vor allem mit dem Hsp60 von *Mycobacterium tuberculosis*, weisen auf die Beteiligung von Hsp an Autoimmunreaktionen hin: Hsp60 von Mykobakterien und Mensch besitzen gemeinsame Epitope (MUNK *et al.* 1989). In verschiedenen Arbeiten konnten T-Zellen identifiziert werden, die mit Epitopen des Hsp60 von *Mycobacterium tuberculosis* und dem humanen Homologen reagierten (KOGA *et al.* 1989, LAMB *et al.* 1989). Zudem wurden CD8⁺ T-Zellen identifiziert, die nicht nur gegen das Hsp60 von *Mycobacterium tuberculosis* gerichtet waren, sondern auch gestresste Makrophagen lysierten, die keine exogenen Antigene präsentierten (KOGA *et al.* 1989). In Untersuchungen über die sogenannte Adjuvans-Arthritis, einem experimentellen Modell einer Autoimmunerkrankung in der Ratte, wurde deutlich, daß gegen mykobakterielles Hsp60 gerichtete T-Zellen an der Entwicklung der Erkrankung beteiligt sind. Mit der Übertragung eines Hsp60-reaktiven T-Zellklones auf immunologisch naive Ratten konnten Arthritiden induziert werden. Darüberhinaus konnte eine Reaktion von T-Zellen sowohl mit dem Hsp60 von *Mycobacterium tuberculosis* als auch mit einem Protein des Gelenkknorpels der Ratten festgestellt werden (VAN EDEN *et al.* 1989). Auch Patienten mit Rheumatoider Arthritis wiesen eine humorale (TSOULFA *et al.* 1989) und zelluläre Immunantwort (HOLOSHITZ *et al.* 1989) gegen das Hsp60 von *Mycobacterium tuberculosis* auf. Ähnlich reagierten T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit *Yersinia*-assoziierter-Arthritis nicht nur mit Yersinien-Antigenen, sondern auch mit Hsp60 von Mykobakterien und Mensch (HERMANN *et al.* 1991). Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis konnte eine lokal begrenzte, verstärkte Expression von Hsp60 in Synovialis-Biopsien nachgewiesen werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß autologes Hsp60 an lokalen, intraartikulären Autoimmunreaktionen beteiligt ist, wobei fraglich ist, ob diese lokale Hsp60-Expression eine Ursache oder die Folge des Krankheitsprozesses ist (GRAEFF-MEEDER *et al.* 1990, KIESSLING *et al.* 1991, GRAEFF-MEEDER *et al.* 1993).

Hsp als auslösende Agentien einer Erkrankung werden auch in Verbindung mit Arteriosklerose diskutiert, da die Immunantwort gegen Hsp60 mit dem Ausmaß der Arteriosklerose assoziiert ist. In arteriosklerotischen Plaques werden vermehrt Hsp exprimiert. Eine Kreuzreaktion zwischen Hsp von z. B. *Chlamydia pneumoniae* und homologen eukaryontischen Hsp könnte auch hier durch Autoimmunreaktionen zu

Schäden an den Blutgefäßen führen (LAMB und FERNS 2002, LAMB *et al.* 2003, XU 2003, WICK *et al.* 2004).

Im Gegensatz zu den möglichen und z. T. nachgewiesenen pathogenen Effekten der durch Hsp ausgelösten Autoimmunreaktionen konnten nach Immunisierung mit Hsp60 aber auch protektive Eigenschaften festgestellt werden: Durch Vorbehandlung mit mykobakteriellem Hsp60 sowie durch Übertragung eines weiteren Hsp60-reaktiven T-Zellklons konnte bei Ratten die Entwicklung der Adjuvans-Arthritis verhindert werden (VAN EDEN *et al.* 1988). In ähnlichen Versuchen konnten Ratten durch Vorbehandlung mit mykobakteriellem Hsp60 vor einer durch die Zellwände von Streptokokken induzierten Arthritis geschützt werden. Nicht immunisierte Ratten waren nach Übertragung von T-Zellen aus den mit Hsp60 immunisierten Tieren ebenfalls vor der Arthritis geschützt (VAN DEN BROEK *et al.* 1989). Eine protektive Wirkung von mykobakteriellem Hsp60 ist auch für die sterile, durch das Mineralöl Pristan induzierte Arthritis in Mäusen belegt (THOMPSON *et al.* 1990).

Die mit mykobakteriellem Hsp60 in Adjuvans induzierte Immunisierung von „non obese diabetic“-Mäusen, die spontan einen insulinabhängigen Diabetes Mellitus entwickeln und als Tiermodell für die entsprechende Erkrankung beim Menschen dienen (CASTANO und EISENBARTH 1990), bewirkte, daß die Mäuse zunächst zwar einen leichten Diabetes ausprägten, es jedoch nicht zur Entwicklung des spontanen Diabetes kam. Bestimmte T-Zellklone, welche spezifisch mit Epitopen des murinen Hsp60 reagierten, vermochten dagegen einen insulinabhängigen Diabetes Mellitus auszulösen (ELIAS *et al.* 1990).

Hsp wurden auch in Tiermodellen für infektiöse Erkrankungen des Menschen als „Subunit“-Vakzine eingesetzt. Dazu zählen beispielsweise die *Legionella pneumophila*-Infektion des Meerschweinchens (BLANDER und HORWITZ 1993) oder die *Yersinia enterocolitica*-Infektion der Maus (NOLL und AUTENRIETH 1996). Die Immunisierung mit Hsp70 bewirkte zudem einen starken Adjuvans-Effekt (HARMALA *et al.* 2002).

Auch bei gesunden Menschen wurden Hsp-spezifische B- und T-Zellen nachgewiesen, die gemeinsame Epitope des mykobakteriellen und humanen Hsp60 erkannten (MUNK *et al.* 1989, LAMB *et al.* 1989, KAUFMANN 1992). In jüngerer Zeit wurden daher kreuzreaktive T-Zellen nicht mehr als potentielle Auslöser von autoimmunen Reaktionen im Wirtsorganismus, sondern als ein regulatorisches Element im Immunsystem zum Schutz vor einer eventuell schädlichen Erkennung von Autoantigenen angesehen (ANDERTON *et al.* 1995, VAN DER ZEE R. *et al.* 1998, POCKLEY 2003).

Auf medizinischem Gebiet zeichnen sich vor allem in der Tumorforschung neue Möglichkeiten für den therapeutischen Einsatz von Hsp ab, die bereits in klinischen Studien zur Anwendung kommen: Durch die Immunisierung mit Hsp und an Hsp gebundenen Proteinen, die aus Tumorzellen gewonnen wurden, konnte eine tumorspezifische Immunreaktion ausgelöst werden (LIU *et al.* 2002, POCKLEY 2003, CASEY *et al.* 2003, HOOS und LEVEY 2003). Andererseits sind Hsp gerade im Tumorgewebe oft überexprimiert und tragen dadurch zum Überleben und zur

Expansion des Tumorgewebes bei. Nach Meinung von WHITESELL *et al.* (2003) könnte durch Inhibitoren der Stressantwort auf die Expression der Hsp in dem Tumorgewebe Einfluß genommen werden.

Neben dem Einsatz als Anti-Tumor-Vakzine, könnten Hsp auch bei anderen Erkrankungen, wie beispielsweise zum Schutz von Nervenzellen bei Schlaganfällen, neurodegenerativen Erkrankungen oder Epilepsie, therapeutisch eingesetzt werden (YENARI 2002, KELLY und YENARI 2002). Ferner könnten Hsp als prognostische Indikatoren für den Belastungszustand von Zellen, beispielsweise nach einem Herzinfarkt, verwendet werden. Hsp sind aber auch für den Einsatz in der Biotechnologie, bei gleichzeitiger Überproduktion von Hsp und rekombinanten Proteinen, zur *de novo*-Faltung rekombinanter Proteine, zur Rückfaltung aggregierter Proteine oder zur Proteinreinigung geeignet (NEUHAUS-STEINMETZ *et al.* 1994, MOGK *et al.* 2002, HOFFMANN und RINAS 2004).

2.2.4 Hitzeschockproteine der Mykoplasmen

Bisher wurden nur wenige Untersuchungen bezüglich der Hsp von Mykoplasmen durchgeführt. In einer Studie von DASCHER *et al.* (1990) wurde eine Induktion von Hsp mittels radioaktiver Markierung bei *Acholeplasma (A.) laidlawii* und *M. capricolum* nachgewiesen. Mit einem monoklonalen Antikörper gegen Hsp70 von *E. coli* wurde in Westernblot-Analysen bei diesen beiden Mykoplasmenspezies ein entsprechendes Protein erkannt. Ebenfalls mit einem monoklonalen Antikörper wurde bei *M. salivarium* und *M. orale* Hsp60 nachgewiesen. Unter Verwendung von polyklonalen Antikörpern gegen bakterielles und humanes Hsp60 und Hsp70 konnten auch bei *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. fermentans*, *M. gallisepticum* und *A. laidlawii* entsprechende Proteine detektiert werden (SØNDERGARD-ANDERSEN *et al.* 1990, DASCHER und MANILOFF J. 1992, CHATTIN-KACOURIS *et al.* 2002).

Aufgrund von Sequenzhomologien zwischen dem Hsp70 von *M. genitalium* und *Bacillus (B.) subtilis* wurde, nach Überprüfung von Genbibliotheken von *M. hyopneumoniae* mit Hyperimmunseren und Seren von konvaleszenten Schweinen, ein rekombinantes 42 kDa Protein als Teil des Hsp70 von *M. hyopneumoniae* identifiziert. Durch monospezifische Antikörper gegen dieses Hsp70 wurde das Wachstum von *M. hyopneumoniae* unterdrückt (CHOU *et al.* 1997). Später konnten CHEN *et al.* (2003) durch Vakzinierung von BALB/c-Mäusen mit der für das 42 kDa kodierenden Gensequenz eine starke Induktion von IgG und eine Steigerung der Produktion von IL-2, IL-4 und IFN- γ sowie eine Proliferation der Milzzellen nachweisen.

2.3 Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Hsp und die für die Hsp kodierenden Gene von Mykoplasmen identifiziert und charakterisiert, die Immunantwort gegen mykoplasmale Hsp untersucht und der Einfluß der Hsp auf die Pathogenese einer Mykoplasmenenerkrankung geprüft werden. Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf die Untersuchung des Hsp60 gelegt.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte

Chromatographie

Econo-System, BioRad Laboratories, München
bestehend aus

Systemcontroller, Modell ES-1,
UV Monitor, Modell EM-1,
Pumpe, Modell EP-1,
Fraktionssammler, Modell 2110
Recorder, Modell 1325

Brutschränke

Brutschrank, Memmert, Schwalbach
Heraeus CO₂-Auto-Zero, Heraeus-Christ, Osterode
Heraeus BB16, Function Line, Heraeus-Christ, Osterode

DNA-Sequenzierung

ABI PRISM 377 DNA Sequencer, Perkin-Elmer, Courtaboeuf, Frankreich

Elektrophorese- und Blotting

Transphor-System, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
bestehend aus

Blottingkammer, vertikal, Transphor Electrophoresis Unit TE 42,
Blotting-Steuergerät, Transphor Power Lid
Elektrophoresekammer, vertikal, SE 600
Stromversorgungsgerät PS 500 XT DC

Mini-PROTEAN-System, Bio-Rad Laboratories, München
bestehend aus

Mini-PROTEAN II Multiscreen Apparatus,
Modular Mini-PROTEAN II Electrophoresis System

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

Mikroliterspritze, Hamilton Spritze Modell 705 N, Sigma-Aldrich, Deisinghofen

Stromversorgungsgerät Jeather VoltTM 800, Stratagene, Heidelberg

Thermoblock BT 100, Kleinfeld Labortechnik, Hannover

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

Fotoeinrichtung

Fotolampen, Photocrescenta 220 V, 150 W, Philips, Hannover
Objektiv Zuiko Auto-Macro, Brennweite 50 mm, Olympus, Hamburg
Repro-Stativ, Kaiser über Foto-Haas, Hannover
Sofortbildkamera Polaroid MP 4, Bachhofer, Reutlingen
Spiegelreflexkamera OM-2, Olympus, Hamburg
Stativ für die Polaroidkamera, Bachhofer, Reutlingen

Gefriertruhen

Gefriertruhe Typ 63 (- 80 °C), FL, Burgwedel
Gefriertruhe 4402-3 (- 20 °C), Liebherr, Langenhagen

Mikroskop und Zubehör

Stereoleuchte M8, Heerbrugg
Stereolupe IM35, Zeiss, Jena
Stereomikroskop, Carl Zeiss, Oberkochen
Stereoleuchte KL 1500 electronic, Schott, Hofheim

Mischgeräte

Homogenisator, Mini-Potter, Braun Melsungen, Melsungen
Magnetrührer MR 80, Heidolph, Kelheim
Magnetrührer mit Heizplatte LR 12, Mettler über Landgraf, Hannover
Mischgerät Reax 2000, Heidolph über Landgraf, Hannover
Orbital-Wipptisch, Red Rocker, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Wipptisch, Red Rocker Variable Speed PR 50, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA

Photometer und Zubehör

Dynatech-Reader, Farmingdale, New York, USA
Quarzküvette für 80 µl Probenvolumen, Pharmacia, Freiburg
Spektralphotometer LKB Ultrospec III, Pharmacia, Freiburg

pH-Meter

pH-Meter CG 707, Schott über Landgraf, Hannover
pH-Meter, Knick-PH-PT-1000, Einstabmesskette SE 100, Knick Elektronische Meßgeräte, Berlin

Pipetten und Pipettierhilfen

Akkuboy, Integra Biosciences Tecnorama, Fernwald
8-Kanalpipette CAPP 25-200 µl, Cappeler Laboratory Technics, USA
Multipipette Plus, Eppendorf, Hamburg
Pipetten Pipetman, max. 10, 20, 100, 200, 1000 µl, Gilson über Abimed, Langenfeld

Polymerase-Kettenreaktion

Thermocycler DNA Thermal Cycler, Perkin-Elmer Cetus, Überlingen

Sterilisation

Autoklav, Typ 509312, Westima Sauter, Köln
Dampftopf Fissler Vitavit, Fissler, Idar-Oberstein
Hochdruckdampfsterilisator BCH, Webeco, Bad Schwartau
Sterilisator Sterimat Praktikus, Stiefenhofer, München

Sterilwerkbank

ClanLaF VFR 1806, Tecnorama, Fernwald
Sterilwerkbank Lamina Flow, Baker Company über Labotec, Göttingen

Waagen

Analysenwaage BA 61 (0-60 g), Sartorius über Landgraf, Hannover
Analysenwaage (80-400 g), Sartorius über Landgraf, Hannover
Präzisionswaage P 1200, Mettler, Gießen

Wasserbad

Wasserbad Fisions D8, Haake, Karlsruhe
Wasserbad W 13 mit Thermoelement D8, Haake, Karlsruhe

Zentrifugen und Zubehör

Kühlzentrifuge Sorvall RC 5-B mit Rotoren GSA und SA600, Du Pont, Bad Homburg
Kühlzentrifuge Centrifuge 5415 C, Eppendorf, Berlin
Kühlzentrifuge Megafuge 1.0 R, Heraeus, Hanau
Labofuge 6000, Heraeus-Christ, Osterode
Mikro-Zentrifuge, neoLab, Heidelberg
Universalzentrifuge, Hettich, Tuttlingen

Zentrifuge Digifuge, Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenbecher Dryspin QTY 12, 250 ml, Nalgene, Braunschweig
Zentrifugenbecher Oak-Ridge, Sealing Cap, PC, 50 ml, Nalgene, Braunschweig

Sonstige Geräte

Mikrotiterplattenwaschgerät Milenia Microwash 4, DPC Diagnostic Products Company, London, Großbritannien
Mikrowellengerät M742 Sensor, Philips, Hannover
Neubauer-Zählkammer, Brandt, Wertheim
Schlittenmikrotom, LKB Instruments, Bromma, Schweden
Ultraschallgerät Sonifier Cell Disrupter, Branson Europa B.V., Niederlande
Szintillationszähler Beckman, Typ LS 1801, Beckman Instruments, München

3.2 Verbrauchsmaterialien

Autoradiographie Film, Reflection™, NEF-496, DuPont, Dreieich
Dialyseschlauch Spectra/Por 3, M-cutoff 3,5 kDa, Spectrum Medical Industries, San Francisco, USA
Centricon-100 Säulen, Perkin-Elmer Cetus, Überlingen
Econo-Chromatographiesäule, BioRad, München
Econo-PAC10 DG Entsalzungssäule, BioRad, München
Falcon-Röhrchen, 15- und 50-ml, Becton Dickinson, Heidelberg
Gel-Blotting-Papier, 300 x 600 mm, Schleicher & Schuell, Dassel
Geneclean-Kit II, Dianova, Hamburg
Jet-Star, Mini- und Midi-Plasmid-Purification System, Genomed, Bad Oeynhausen
Kulturgefäße, 250 ml, Nungeon über Wilke & Witzel, Hamburg
Makrowell-Platte, Greiner, Solingen
MicroSpin® Säule, Pharmacia, Freiburg
Mikroküvette, 1 ml, Ratiolab, Dreieich
Mikrotiterplatte, 96 Vertiefungen, Greiner, Solingen
Mikrotiterplatte, 6, 24 und 96 Vertiefungen, Becton Dickinson, Heidelberg
Nitrozellulose BA 85, 0,45 µm Porengröße, Schleicher & Schuell, Dassel
Nitrozellulose-Plättchen BA 85, Porengröße 0,45 µm, Durchmesser 1 cm (selbstgestanzt), Schleicher & Schuell, Dassel
Nucleon II Extraktions-Kit, Scotlab, Wiesloch
 bestehend aus Reagenz B, Natriumperchlorat (5 M), Säule mit Silica-Suspension
Pasteurpipetten, Greiner, Solingen
Petrischalen, Greiner, Solingen
Photometerküvetten aus Plastik (1 ml Probevolumen), Müller Ratiolab, Dreieich
Pipettenspitzen, Greiner, Frickenhausen und Eppendorf, Hamburg

Polaroid-Film Typ 55, über Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Polypropylenröhrchen, Bluecaps, 50 ml, Nunc, Wiesbaden
Polypropylenröhrchen, Whitecaps, 15 ml, Chloroform-beständig, Nunc, Wiesbaden
Polypropylenröhrchen, 5, 10, 15 ml, Becton Dickinson, Heidelberg
Polystyrolröhrchen, steril, Greiner, Solingen
Reaktionsgefäße 0,5 ml, Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße, 1, 1,5 und 2 ml, Sarstedt, Nürnbrecht
Röntgenfilm X-O Mat, Kodak, New York, USA
Schwarzweißfoto-Negativfilm T MAX, 100 ASA TMX 135-36 Kodak, über Photo Haas, Hannover
Sterilfilter, 0,22 µm und 0,45 µm Porendurchmesser, Millipore, Eschborn
Sterilfilterspitzen, für 20, 100, 200, 1000 µl, Biozym, Hessisch Oldendorf

3.3 Chemikalien und Reagenzien

ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Perkin-Elmer, Courtaboeuf, Frankreich

bestehend aus A-Dye Terminator, C-Dye Terminator, G-Dye Terminator, T-Dye Terminator, dTTP, dATP, dCTP, dTTP, Tris-HCl (pH 9,0), MgCl₂, hitzestabiler Pyrophosphatase und AmpliTaq DNA Polymerase FS

2,2-Azino-Di-(3-Ethylbenzthiazoliumsulfat) (ABTS), Serva, Heidelberg

Acrylamid, 4x reinst, Serva, Heidelberg

Affi-Gel® Hz Hydrazide Gel, BioRad, München

Affi- Gel® Hz Immunoaffinity Kit, BioRad, München

Agar, Oxoid, Wesel

Agarose für DNA-Elektrophorese, Serva, Heidelberg

Aktinomycin D, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Ammoniumacetat, Merck, Darmstadt

Ammoniumpersulfat, Serva, Heidelberg

Ampholine, pH 3.5-10/ 5-7/ 7-9, Pharmacia, Freiburg

Amplify, Amersham, Braunschweig

[γ-³²P]ATP Amersham Pharmacia Biotech, Braunschweig

Bacto PPLO Agar, Difco, Detroit, Michigan, USA

Bacto PPLO Broth, Difco, Detroit, Michigan, USA

Bacto-Trypton, Difco, Detroit, Michigan, USA

BEBM Zellkulturmedium, Clonetics, USA

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

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

Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion IV, Serva, Heidelberg

Bromphenolblau, reinst, Serva, Heidelberg

5-Brom-4-Chlor-3-Indolyolphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP), Sigma-Aldrich, Deisenhofen

4-Chlor-1-Naphtol, Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid, Merck, Darmstadt
Columbia-Fertigagar, Oxoid, Wesel
Columbia-Pulvermedium, Oxoid, Wesel
Coomassie Brilliant Blue R250, Serva, Heidelberg
CNBr-Sepharose, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
dATP, 100 mM, Promega Corporation über Serva, Heidelberg
dCTP, 100 mM, Promega Corporation über Serva, Heidelberg
dGTP, 100 mM, Promega Corporation über Serva, Heidelberg
dTTP, 100 mM, Promega Corporation über Serva, Heidelberg
Dextranblau, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dextrose, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dikaliumcarbonat, Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
DMEM Zellkulturmedium, Cytogen, Berlin
DMEM Zellkulturmedium/-Pulver, BIO-Whittaker, Verviers, Belgien
N,N'-Dimethylformamid, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT), Sigma-Aldrich, Deisenhofen
1 kb-DNA-Leiter, Gibco, Berlin
2D-SDS-PAGE-Standard, BioRad, München
Dulbecco's Phosphatgepufferte Kochsalzlösung , BIO-Whittaker, Verviers, Belgien
Essigsäure, 100 % [v/v] (Eisessig), Merck, Darmstadt
Essigsäure, 96 % [v/v], Merck, Darmstadt
Emulsigen, MVP Laboratories, Ralston, Nebraska, USA
Eosin, Polyscientific, Bayshore, New York, USA
Ethanol, 96 % [v/v], Merck, Darmstadt
Ethanolamin, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ether, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethidiumbromid, [10 mg/ml], Amresco über Biometra, Göttingen
Ethyldiamin-Tetraacetat (EDTA), Serva, Heidelberg
Ethyldiamin-Tetraacetat-Natriumsalz-Dihydrat, Serva, Heidelberg
E-TOXATE[®] (*Limulus*-Amöbozytenlysate) zur Bestimmung von Endotoxin, Sigma, München
Fetales Kälberserum (FKS), Cytogen, Berlin
Fleischextrakt, Oxoid, Wesel
Formalin, 38 % [v/v], Merck, Darmstadt
Freund'sches Adjuvans, inkomplett, Difco, Detroit, Michigan, USA
Fungal-Agar, Oxoid, Wesel
Gelatine, Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Glutathion Sepharose 4B, Pharmacia, Freiburg
Glutathion, reduziert, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycerin, 87 % [v/v], Merck, Darmstadt

Glycin, Serva Feinbiochemica, Heidelberg und Riedel-de-Haen, Seelze
Größenstandard für DNA, Lambda-Phage verdaut mit *EcoRI/HindIII*, Appligene
Oncor, Heidelberg
Guanidinhydrochlorid, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hämalaun, Polyscientific, Bayshore, New York, USA
Harnstoff, Serva, Heidelberg
Heart Infusion Agar, Difco, Detroit, Michigan, USA
Heart Infusion Broth, Difco, Detroit, Michigan, USA
Hefeextrakt, Difco, Detroit, Michigan, USA
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure (HEPES), Boehringer Diagnostics,
Mannheim und Sigma Chemie, München
Interleukin-1 β (50 ng/ml), murin, Endogen über Biozol, Eching
Interleukin-6 (500 U/ml), murin, Endogen über Biozol, Eching
Ionenaustauschharz Amberlite MB 150, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isobutanol, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol, Merck, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG), Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Kaliumacetat, Serva, Heidelberg
Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
Kalilauge, Serva, Heidelberg
L-Asparagin, Sigma, München
L-Glutamin, Sigma, München
Lipopolysaccharid von *Escherichia coli* Serotype 0111.B4, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lumagel[®], J.T. Baker B.V., Deventer, Niederlande
Lysozym, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Macro Prep[®] High S-Matrix, BioRad, München
Magnesiumacetat, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Magnesiumchlorid, 25 mM, Promega Corporation über Serva, Heidelberg
Magnesiumchlorid-Hexahydrat, Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat-Septahydrat, Merck, Darmstadt
Manganchlorid, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Mayer's Hämatoxylin, Dako, Glostrup, Dänemark
2-Mercaptoethanol, Merck, Darmstadt
Methanol, reinst, Merck, Darmstadt
Mineralöl, Perkin-Elmer Cetus, Überlingen, und Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Molekulargewichtsmarker für Proteine, Prestained SDS-PAGE Standards, Low
Range, BioRad, München
Molybdatreagenz, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Morpholinpropan-Sulfonsäure (MOPS), Roth, Karlsruhe
N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamin, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumacetat, Serva, Heidelberg

Natriumborat, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumcarbonat, wasserfrei, kristallin, Merck, Darmstadt
Natriumchlorid, Sigma, München und Serva, Heidelberg
Natriumchloridlösung, 0,89 % [w/v], Braun Melsungen, Melsungen
tri-Natriumcitrat-Dihydrat, Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholat, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumhydrogencarbonat, Serva Feinbiochemika GmbH, Heidelberg
Natriumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (engl. sodiumdodecylsulfate, SDS), Serva, Heidelberg
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat, Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen, reinst, Sigma, München
Natriumperiodat, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
di-Natrium-Thiosulfat Pentahydrat, Sigma, München
Natronlauge, 32 % [v/v], Fluka, Berlin
Natronlauge, 1 N, Merck, Darmstadt
Nitrotetrazoliumblausulfat, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
NP-40, Tergitol NP-40, Sigma, München
Ortho-Phenylendiamin (OPD), Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Paraffin, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin G, Merck, Darmstadt, Hoechst, Frankfurt und Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Pepton, Oxoid, Wesel
Perchlorsäure, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Peroxidase-Konjugat, JacksonImmunoResearch über Dianova, Hamburg
Pferdeserum, Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover, 30 min bei 56 °C inaktiviert, sterilfiltriert
Phenolrot, Merck, Darmstadt
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Sigma, München
Phosphorsäure, 85 % [v/v], Merck, Darmstadt
Plasmid-Vektor pGEX-5X-3, Pharmacia Biotech, Freiburg
Plasmid pGEM-3Zf(+), Promega, Charbonnières, Frankreich
Poly-L-Lysin, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Protein A-Sepharose, Pharmacia, Freiburg
³⁵S-Protein labeling mix, DuPont, Dreieich
Restriktionsendonucleasen, *Bam*HI, *Hae*III, Appligene Oncor, Heidelberg
Restriktionsendonucleasen, *Xho*I, *Hha*I, Pharmacia, Freiburg
Rinderblut, Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover, defibriniert
RNase, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
RPMI 1640-Medium (ohne Methionin und Cystein), Serva, Heidelberg
RPMI 1640, Select-amine-Kit, Gibco, Eggenstein
RPMI 1640-Medium, BIO-Whittaker, Verviers, Belgien

Roti-Block[®], Carl Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Saccharose, Serva, Heidelberg
Salzsäure, 37 % [v/v], Merck, Darmstadt und Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Salzsäure, 1 N, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Schweineserum, Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin,
Tierärztliche Hochschule Hannover
Silbernitrat, Sigma, München
Spermidin, Sigma, München
Streptomycin, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sulfanilamid, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sucrose, Serva, Heidelberg
T4-DNA-Ligase, New England Biolabs, Schwalbach
Taq-Polymerase, Stratagene, Heidelberg
Taq-Polymerase-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,8, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0,1%
[w/v] Gelatine und andere Stabilisatoren), Stratagene, Heidelberg
Tergitol, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED), Serva, Heidelberg
Toluol, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trichloressigsäure, Serva, Heidelberg
Tris (Hydroxymethyl-)aminomethan (Tris), Serva, Heidelberg
Tris (Hydroxymethyl-)hydrochlorid (Tris-HCl), Serva, Heidelberg
Triton X-100, BioRad, München
Trypanblau-Lösung (in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺), Boehringer, Mannheim
Trypsin-/ EDTA-Lösung, Clonetics, USA, Sigma-Aldrich, Deisenhofen und Cytogen,
Berlin
Trypsin-Neutralisations-Lösung, Clonetics, USA
Trypton, Difco über Nordwald, Hamburg
Tween-20 (Polyoxyethylensobitanmonolaurat), Merck, Darmstadt
Wachstumsfaktoren, Clonetics, USA
Wasserstoffperoxid, Aldrich, Steinheim und Merck, Darmstadt
Xylol, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zink, Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Zitronensäure, Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Chemikalien ohne besondere Angaben wurden mit dem Reinheitsgrad „zur Analyse“
verwendet.

3.4 Antikörper

3.4.1 Primäre Antikörper

Für die Untersuchungen wurden folgende primäre Antikörper verwendet:

- Kaninchenhyperimmunseren gegen Ganzzelllysate von *M. arthritidis* ISR1, *M. bovis* PG45, *M. hyopneumoniae* J, *M. pneumoniae* FH, Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Kaninchenantiserum gegen Hsp60, isoliert aus *Synechococcus* sp. Stamm PCC 7942, Stress-Gene Biotechnologies über Biomol, Hamburg
- Kaninchenantiserum gegen murines Hsp70 (SPA880), Stress-Gene Biotechnologies über Biomol, Hamburg
- Monoklonaler Antikörper (Maus) gegen Hsp70 von *M. pneumoniae*, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. R. Himmelreich, ZMBH, Heidelberg
- Kaninchenantiseren gegen mykoplasmales Hsp60, eigene Herstellung
- Kaninchenantiseren gegen synthetisch erstellte Peptide (multiple antigenic peptide, MAP) aus zwei verschiedenen antigenen Bereichen des Hsp60 von *M. pneumoniae* (MAP1 und MAP2), eigene Herstellung
- Kaninchenantiserum gegen murines IL-1 β , Endogen über Biozol, Eching
- Rattenantiserum gegen murines IL-6, PharMingen, Heidelberg
- Seren von Rindern, Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover
- Seren von Schweinen, Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover

3.4.2 Sekundäre Antikörper

Als sekundäre Antikörper und Konjugate wurden folgende Antiseren verwendet:

- Ziege-anti-Rind-Immunglobulin (GABo/IgG H+L), Peroxidase-konjugiert, Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande über Biogenzia Lemanian, Bochum
- Ziege-anti-Maus-Immunglobulin (GAM/IgG H+L), Peroxidase-konjugiert, Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande über Biogenzia Lemanian, Bochum
- Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin (GAR/IgG H+L), Peroxidase-konjugiert, Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande über Biogenzia Lemanian, Bochum
- Ziege-anti-Schwein-Immunglobulin (GASw/IgG H+L), Peroxidase-konjugiert, Nordic Immunological Laboratories, Tilburg, Niederlande über Biogenzia Lemanian, Bochum

- Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin G, Peroxidase-konjugiert, Dianova, Hamburg
- Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin G, Alkalische Phosphatase-konjugiert, Dianova, Hamburg
- Ziege-anti-Ratte-Immunglobulin G, Alkalische Phosphatase-konjugiert, Dianova, Hamburg
- Schaf-anti-Ratte-Immunglobulin G, biotinyliert, Dianova, Hamburg
- Antikörper gegen murines IL-1 β , biotinyliert, Endogen über Biozol, Eching
- Ratten-Antikörper gegen murines IL-6, biotinyliert, PharMingen, Heidelberg

3.5 Bioinformatik

Für Analysen und Berechnungen wurden folgende Computerprogramme verwendet:

CHROMAS 1.43 (32-bit)

Bearbeitung von Sequenz-Elektropherogrammen (Conor McCarthy, School of Biomolecular and Biomedical Science, Faculty of Science, Griffith University, Brisbane, Australia).

FRAGMENTS

Berechnung der Länge von DNA-Fragmenten nach Agarosegelelektrophorese und des Molekulargewichtes von Proteinen nach SDS-PAGE (Jürgen Hermans, Institut für Entwicklungs- und Molekularbiologie der Pflanzen, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf)

OLIGO 4.0

Analyse von Oligonukleotid-Primern (Copyright 1989-91: Wojciech Rychlik)

Es wurden verschiedene Programme der HUSAR 4.0-Gruppe (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources), Geniusnet: Biocomputing Unit - Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg (Analysen, Transkriptionen, Datenbanksuche von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen) verwendet, die im folgenden kurz dargestellt werden:

ANTIGENIC

Suche nach potentiellen antigenen Bereichen von Proteinen

BESTfit

Homologievergleich von zwei Sequenzen nach dem Algorithmus von SMITH und WATERMAN (1981)

BLASTN

Vergleich von Nukleotidsequenzen mit DNA-Sequenzen aus einer Datenbank nach der Methode von ALTSCHUL *et al.* (1990)

BLASTP

Vergleich von Aminosäuresequenzen mit Proteinsequenzen aus einer Datenbank nach der Methode von ALTSCHUL *et al.* (1990)

CLUSTAL

Multipler Homologievergleich von DNA- oder Proteinsequenzen nach der Methode von THOMPSON *et al.* (1994)

FASTA

Vergleich einer unbekannten Sequenz mit jeder Art von Sequenz aus der Datenbank (sensitiver als BLAST)

FETCH

Kopie von (Datenbank-)Dateien ins eigene Laufwerk

GAP

Homologievergleich von zwei Sequenzen nach dem Algorithmus von NEEDLEMAN und WUNSCH (1970)

IRX

Sequenzsuche in der Datenbank

MULTalign

Homologievergleich mehrerer Sequenzen nach dem Algorithmus von NEEDLEMAN und WUNSCH (1970)

MAP

Erstellung von Restriktionskarten und der Anzeige der möglichen Proteinsequenzen

PEPDATA

Übersetzung von DNA-Sequenzen in Proteinsequenzen in allen sechs Leserahmen

PEPTIDstructure

Prognose des alpha-, beta-, coil- und turn-Anteils einer Aminosäuresequenz und Aussage über Antigenität, Flexibilität, Hydrophobizität und Oberflächenstruktur

PRETTYPLOT

Darstellung der mit MULTalign konstruierten Dateien

TRANSLate

Übersetzung von DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen

3.6 Universell verwendete Pufferlösungen

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS), modifiziert nach DULBECCO und VOGT (1954)

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

PBS-Tween

Tween-20	1,0 ml
PBS <i>ad</i>	1000,0 ml

Alle weiteren Lösungen und Puffer sind bei den entsprechenden Methoden aufgeführt.

3.7 Mikrobiologische Methoden

3.7.1 Bakterien

Für die Untersuchungen wurden folgende Mykoplasmenstämme verwendet:

M. agalactiae PG2

M. arthritidis ISR1

M. arthritidis ISR1p7 (Infektionsversuch)

M. bovis PG45

M. hyopneumoniae J

M. pneumoniae FH

Die Transformationsansätze und die Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG)-induzierte Proteinsynthese wurden mit den *E. coli*-Stämmen JM105 und HB 101 durchgeführt. Für vergleichende Untersuchungen wurde *E. coli* ATCC 4157 eingesetzt. Die Bakterien wurden aus der Sammlung des Instituts für Mikrobiologie und Tierseuchen, Zentrum für Infektionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover bereitgestellt.

3.7.2 Nährmedien

Die Nährmedien wurden, falls nicht anders angegeben, 15 min bei 121 °C autoklaviert und bei 4 °C gelagert. Seren wurden 30 min bei 56 °C inaktiviert, bevor sie dem Medium zugesetzt wurden.

3.7.2.1 Nährmedien zur Kultivierung von Mykoplasmen

Standardmedium (ALUOTTO *et al.* 1970)

Lösung 1:

Heart Infusion Broth	19,0 g
Aqua dest. <i>ad</i>	850,0 ml
pH 7,6	

Lösung 2:

Pferdeserum	100,0 ml
Hefeextrakt, 10 % [w/v]	50,0 ml
Penicillin G	2 x 10 ⁶ I.E.

Lösung 1 wurde autoklaviert. Nach Sterilfiltration von Lösung 2 wurden beide Lösungen vereinigt. Zur Herstellung fester Nährböden wurden statt 19,0 g Heart Infusion Broth 30,0 g Heart Infusion Agar zugesetzt. Das Flüssigmedium wurde bei -20 °C gelagert.

Friis-Medium; modifiziert nach FRIIS (1975)

Lösung 1:

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

Lösung 2:

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

Die Lösungen wurden auf pH 7,4 eingestellt. Lösung 1 wurde autoklaviert, Lösung 2 sterilfiltriert. Anschließend wurden beide Lösungen vereinigt. Zur Herstellung fester Nährböden wurden 0,7 % [w/v] Agar und 0,01 % [w/v] Dextran zugesetzt.

Hefeextrakt, 50 % [w/v]

500 g Bäckerhefe wurden in 500 ml Aqua dest. suspendiert und auf 1000 ml aufgefüllt. Anschließend wurde der pH-Wert auf 4,5 eingestellt und die Lösung 20 min bei 80 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (1.300 x g, 30 min) wurde der Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Hank's Balanced Salt Solution

Stammlösung A:

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

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

Stammlösung B:

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

Nachdem das Salz in Lösung gegangen war, wurden 0,6 g KH₂PO₄ zugegeben und es wurde mit Aqua dest. auf 500,0 ml aufgefüllt.

Gebrauchslösung:

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

3.7.2.2 Nährmedien zur Kultivierung von zellwandtragenden Bakterien

Nährbouillon

Aqua dest.	1000,0 ml
NaCl	5,0 g
Pepton	10,0 g
Fleischextrakt	10,0 g

Der pH-Wert wurde auf 7,2-7,4 eingestellt. Zur Herstellung von Nährböden wurden der Nährbouillon 11,0 g Agar zugesetzt.

Columbia-Agar

Columbia-Fertigagar	43,0 g
Aqua dest.	1000,0 ml

Der Fertigagar wurde durch Erhitzen gelöst und autoklaviert. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,3 und Abkühlung auf 50 °C wurden 5 % [v/v] defibriniertes Hammelblut zugegeben.

Luria-Broth (LB-Flüssigmedium)

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

Luria-Agar (LB-Agarmedium)

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

3.7.2.3 Nährmedien für die Sterilitätskontrolle

Blutagar

Nährbouillon	1000,0 ml
Agar	14,5 g
Nach Autoklavieren und Abkühlung auf 50 °C wurden 70,0 ml defibriniertes Rinderblut zugegeben.	

Hamburger-Test-Agar (HT-Agar)

Fungal Agar	50,0 g
Aqua dest. <i>ad</i>	1000,0 ml

3.7.3 Kultivierung

3.7.3.1 Kultivierung von Mykoplasmen

Die Mykoplasmenstämme lagen als Lyophilisate vor. *M. hyopneumoniae* wurde in Friis-Medium, die anderen Mykoplasmenpezies wurden in Standardmedium vermehrt. Dazu wurden jeweils 2 ml Medium mit 0,2 ml der in 1 ml Aqua dest. suspendierten Lyophilisate beimpft und über 2 bis 4 Tage inkubiert. Durch wiederholtes Passagieren wurden die Mykoplasmen an das Medium adaptiert. Zur Gewinnung größerer Mengen an Mykoplasmen wurden mehrere Einzelanzuchten der jeweiligen Mykoplasmenpezies vereinigt und in größere Kulturvolumina überführt. Die Kultivierung erfolgte aerob bei 37 °C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂. Zur Beurteilung des Wachstums wurden Subkulturen auf den entsprechenden festen Nährmedien angelegt. Bei allen Passagen wurden Wachstumskontrollen durchgeführt sowie Sterilitätskontrollen auf Blut- und HT-Agar angelegt.

3.7.3.2 Bestimmung der Lebendkeimzahl von Mykoplasmen

Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl in einer Flüssigkultur wurde die Anzahl Kolonie-bildender Einheiten, modifiziert nach der Methode von ALBERS und FLETCHER (1982) ermittelt. Dazu wurden jeweils 150 µl Flüssigmedium in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte vorgelegt. In die erste Vertiefung wurden 50 µl der Mykoplasmenkultur gegeben. Nach mehrfachem Durchmischen mit einer Pipette wurden 50 µl entnommen und in die nächste Vertiefung der Reihe überführt. Nach entsprechender Fortführung der Verdünnung wurde in der 12. Vertiefung eine Endverdünnung von $1:1,7 \times 10^7$ erreicht. Je 10 µl der 12 Verdünnungsstufen wurden auf Nährböden pipettiert und die Kolonien nach einer Inkubationszeit von 3-7 Tagen unter einem Stereomikroskop ausgezählt. Die cfu-Bestimmungen wurden im doppelten Ansatz durchgeführt. Die cfu/ml wurden aus dem Mittelwert der Anzahl der Kolonien, multipliziert mit der Verdünnungsstufe und dem Faktor 100, ermittelt.

3.7.3.3 Erstellung von Wachstumskurven der Mykoplasmen

Zur Ermittlung der exponentiellen Wachstumsphase wurden von jeder Mykoplasmenspezies 17 gleiche Ansätze, bestehend aus jeweils 0,8 ml Flüssigmedium, die mit 0,2 ml einer Mykoplasmenkultur beimpft worden waren, bereitgestellt und bei 32 °C oder 35 °C (*M. hyopneumoniae*) im Wasserbad inkubiert. In unterschiedlichen Zeitabständen wurde über insgesamt 80 Stunden jeweils eine Probe entnommen und aus diesem Ansatz die Lebendkeimzahl (3.7.3.2) in einer Doppelbestimmung ermittelt. Durch Anlegen eines Steigungsdreiecks an die exponentielle Wachstumsphase konnte die Teilungsrate (v) und die Generationszeit (g) nach folgenden Formeln berechnet werden:

$$v = \frac{\lg N_y - \lg N_x}{\lg 2(t_y - t_x)}$$

$$g = 1 / v$$

N_x = cfu/ml zum Anfangszeitpunkt t_x

N_y = cfu/ml zum Endzeitpunkt t_y

3.7.3.4 Thermische Inaktivierung von Mykoplasmen

Zu 0,8 ml Flüssigmedium wurden 0,2 ml Mykoplasmenkultur gegeben und abhängig von der Mykoplasmenspezies 16-20 Stunden bei 32 °C oder 35 °C (*M. hyopneumoniae*) inkubiert. Ein Hitzeschock wurde durch Inkubation der logarithmisch gewachsenen Kulturen bei verschiedenen Temperaturen induziert. Nach 10, 20, 40 60 und 90 min wurde für jede Temperatur die Lebendkeimzahl (3.7.3.2) ermittelt.

Bei Bakterien kann die thermische Inaktivierung durch den D-Wert quantifiziert werden. Der D-Wert gibt die Zeit an, die bei einer bestimmten Temperatur erforderlich ist, um die Lebendkeimzahl auf 1/10 zu reduzieren. Durch Interpolieren wurde anhand der Lebendkeimzahl der Mykoplasmen der von den jeweiligen Versuchsbedingungen abhängige D-Wert berechnet (DASCHER und MANILOFF 1992).

3.7.3.5 Kultivierung von *E. coli*

Für molekularbiologische Untersuchungen wurde *E. coli* in LB-Medium kultiviert. Hierfür wurde von einem fraktioniert beimpften LB-Agar eine Einzelkolonie entnommen, in 5 ml LB-Medium suspendiert und über Nacht bei 37 °C als Standkultur bebrütet. Diese Vorkultur wurde dann als Inokulum zu 50 ml LB-Medium gegeben und im Rotationsschüttler bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₆₀ von

0,3-0,5 inkubiert. Von allen Passagen wurden Wachstums- und Sterilkontrollen angelegt. Die Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet (16.000 g, 15 min). *E. coli*-Stämme, die durch Transformation mit Plasmiden eine Resistenz gegen Ampicillin trugen, wurden in LB-Medium bzw. auf LB-Agar kultiviert, die Ampicillin in einer Konzentration von 100 µl/ml enthielten. Für vergleichende Untersuchungen wurde *E. coli* in Nährbouillon kultiviert.

3.8 Molekularbiologische Methoden

3.8.1 Präparation von chromosomaler DNA aus Mykoplasmen

Zur Extraktion der DNA wurde das Nucleon-Kit II verwendet. Ein Liter einer Mykoplasmenkultur wurde auf Eis gekühlt, mit 35 ml 0,5 M EDTA-Lösung versetzt, zu je 250 ml portioniert und zentrifugiert (25.000 x g, 45 min, 4 °C). Die Sedimente wurden vereinigt und in 8 ml Waschpuffer resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (34.000 x g, 30 min, 4 °C) wurde das Pellet direkt zur DNA-Extraktion eingesetzt oder mit 100 µl Waschpuffer überschichtet bei -80 °C gelagert. Das weitere Vorgehen erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.8.2 Präparation von Plasmid-DNA

3.8.2.1 Miniprep

STET-Medium

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

TE-Puffer

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

Klone von *E. coli* wurden mit einem sterilen, stumpfen Zahnstocher aufgenommen, auf LB-Agar mit Ampicillinzusatz ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Bakterienrasen in 25 µl STET-Medium suspendiert. Nach Zugabe von 2 µl LysozymbLösung (100 mg/ 10 ml TE-Puffer) wurden die Proben kurz auf Eis gestellt und dann 40 sec bei 100 °C inkubiert. Nach Zentrifugation

(12.500 x g, 10 min) wurde der Überstand in ein steriles Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden 30 µl Isopropanol (-20 °C) zugesetzt, die Ansätze 5 min bei -20 °C inkubiert und nochmals zentrifugiert (12.500 x g, 10 min). Nach Entfernung des Isopropanolüberstandes wurden die Sedimente getrocknet und zur weiteren Analyse in 20 µl sterilem Aqua dest. aufgenommen.

3.8.2.2 Midiprep

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das JET-STAR-System der Firma Genomed verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

3.8.3 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten

3.8.3.1 Geneclean-Kit

PCR-Amplifikate und Insert-DNA wurden aus TAE-Agarosegelen, Vektoren direkt nach Restriktionsverdau mit dem Geneclean-Kit II aufgereinigt. Die DNA-Banden wurden, nachdem sie durch Färbung mit Ethidiumbromid und Anregung durch UV-Licht sichtbar gemacht wurden, mit einer sterilen Rasierklinge ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und ausgewogen. Die Agarosegelstücke wurden in der dreifachen Menge NaJ-Lösung solange bei 55 °C inkubiert, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte (ca. 3 min). Anschließend wurden den Ansätzen jeweils 5-10 µl Glasmilch zugegeben. Die Suspensionen wurden 15 min bei RT unter mehrmaligem Schütteln inkubiert. Dem aufzureinigenden Vektoransatz wurde die Glasmilch direkt zugesetzt. Die Glasmilch mit der an sie gebundenen DNA wurde kurz zentrifugiert (10.000 x g), der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit 500 µl eiskalter New-Wash-Lösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Ansatz zentrifugiert (10.000 x g, 5 min) und der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 25 µl Aqua dest. resuspendiert und 3 min bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10.000 x g, 10 min) wurden 20 µl der DNA-Lösung abgenommen, in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

3.8.3.2 MicroSpin-Säulen

Die gebrauchsfertigen MicroSpinTM-Säulen wurden für eine schnelle Aufreinigung der DNA aus PCR-Ansätzen auf Basis der Gelfiltration verwendet. Vor dem Gebrauch wurde die Sephacryl[®]-Matrix der Säule durch kurzes Mischen in TE-Puffer resuspendiert und in ein steriles 1,5 ml-Reaktionsgefäß eingesetzt. Die Säule wurde zentrifugiert (735 x g, 1 min) und in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt. 40 µl des PCR-Ansatzes wurden vorsichtig, ohne das Matrix-Säulenbett

aufzuwirbeln, aufgetragen. Die Probe wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt (735 x g, 2 min) aufgereinigt.

3.8.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

3.8.4.1 Spektroskopische Messung

Die DNA-Lösung wurde in einem Spektralphotometer bei 260 nm und 280 nm in einer Quarzküvette von 1 cm Schichtdicke untersucht. Die Konzentration der DNA-Lösung wurde bei OD₂₆₀ bestimmt (OD₂₆₀ von 1 entspricht der Konzentration von ungefähr 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder 20 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide). Durch Vergleichsmessungen bei OD₂₈₀ wurde die Reinheit der DNA-Präparationen ermittelt (SAMBROOK *et al.* 1989).

3.8.4.2 Bestimmung der Konzentration doppelsträngiger DNA mit Ethidiumbromid

Diese Methode eignet sich besonders für Proben, die stark mit Proteinen verunreinigt sind oder nur einen sehr geringen DNA-Gehalt (< 250 ng/ml) aufweisen. Auf ein 1 %iges Agarosegel, das Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml enthielt (3.8.5), wurden 5 µl der zu untersuchenden Probe und jeweils 5 µl verschiedener Konzentrationen eines DNA-Standards aufgetropft. Das Gel wurde 2 h bei RT im Dunkeln belassen und anschließend fotografiert. Anhand des Fotos wurde die DNA-Konzentration der Probe durch den Vergleich der Intensität des Fluoreszenzsignals im UV-Licht mit der des Standards ermittelt. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur DNA-Menge.

3.8.5 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (Tris-Acetate-EDTA-Puffer), 50-fache Stammlösung

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

TAE-Puffer, einfach

TAE-Puffer, 50x	20 ml
Aqua dest. <i>ad</i>	1000,0 ml

0,5 M EDTA-Lösung

Na ₂ -EDTA x 2H ₂ O	186,1 g
NaOH-Plättchen	20,0 g
Aqua dest. <i>ad</i>	1000,0 ml

Der pH-Wert wurde auf 8,0 eingestellt.

Auftragspuffer

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

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in einem horizontalen submarinen Agarosegel (1 % [w/v] Agarose in TAE-Puffer) mit einer Ethidiumbromidkonzentration von 0,5 µg/ml. Als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden mit dem Auftragspuffer 1:5 oder 1:10 verdünnt. Nach einer Laufzeit von 30 min bei 50 V, zum kontrollierten Eindringen der Proben in das Gel, wurde die Elektrophorese bei einer Spannung von 80 V durchgeführt.

Zur Dokumentation wurde das Gel im durchscheinenden UV-Licht mit einer Polaroid-Kamera mit vorgeschaltetem Rotfilter fotografiert. Die Größe unbekannter DNA-Fragmente wurde anhand eines im Gel mitgeführten Standards berechnet. Dazu wurde aus der bekannten Moleküllänge der Markerbanden und dem reziproken Wert ihrer Laufstrecke im Gel eine lineare Eichkurve erstellt, aus der die Größe der unbekannten DNA-Fragmente bestimmt werden konnte. Die Erstellung der Eichkurve und die Berechnung der Moleküllänge erfolgte mit der Software „FRAGMENTS“ (3.5).

3.8.6 DNA-Amplifikation

3.8.6.1 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation von *hsp60*-Gensequenzen

Mit der Software "MULTalign" (3.5) wurden die *hsp60*-Gene von *B. subtilis*, *C. perfringens*, *E. coli*, *M. genitalium* und *M. pneumoniae* auf homologe Sequenzen überprüft. Zum Design der Primer wurden über die Länge des gesamten Gens von ca. 1600 bp 10 Sequenzabschnitte - fünf Vorwärts- (auf der ersten Hälfte des Gens) und fünf Rückwärts-Primer (auf der zweiten Hälfte des Gens) - mit hohem Homologiegrad ausgewählt (Tab. 2). Die Basenabfolge der Oligonukleotide basierte auf der Sequenz des entsprechenden *M. pneumoniae*-Genabschnittes. Zusätzlich wurden die Primer mit dem Programm "OLIGO 4.0" (3.5) hinsichtlich ihres

GC-Gehaltes sowie des Fehlens von Sekundärstrukturen und von komplementären Basen am 3'-OH-Ende auf ihre Eignung in der PCR überprüft. Die Primer wurden von der Firma GIBCO BRL-Life Science Technologies (Eggenstein) als Lyophilisate bezogen. Nach Lösen und Verdünnen der Lyophilisate mit Aqua dest. wurde die DNA-Konzentration ermittelt (Konz. in $\mu\text{g/ml}$ = $\text{OD}_{260} \times \text{molekulare Masse per OD} \times \text{Verdünnungsfaktor}$) und auf eine Gebrauchsverdünnung von 10 pmol/ μl eingestellt.

Tab. 2: Primer für die Amplifikation von *hsp60*-Gensequenzen

Bezeichnung	Primersequenz	Position ¹⁾
P1	5' - GCT GTT AAG GTA ACC GTT GGT CC - 3'	73 – 95
P2	5' - GAT GGA GTG ACC ATC GCT AAG G - 3'	151 – 172
P3	5' - TGG GGA CGG TAC TAC CAC TG - 3'	252 – 271
P4	5' - GCT CAA GCT ATG GCC TTA GTT GG - 3'	481 – 503
P5	5' - TTA GGG GAA GCT CGC CGT GT - 3'	943 – 962
P6-r ²⁾	5' - CCC TTA CCA CCA ATA ACC GTG G - 3'	983 – 1004
P7-r	5' - TCC GTA GCA CCA CCA ACC CGT A - 3'	1130 – 1151
P8-r	5' - GCA ATA CCA CCC CCC GA - 3'	1231 – 1247
P9-r	5' - CTG ATG CAG CTT TTT CGA GTG CAG - 3'	1532 – 1555
P10-r	5' - CAT ACA CAG CAA CGC TGG TGG - 3'	1574 – 1594

¹⁾ Die Ziffern entsprechen den Positionen in der Sequenz des *hsp60*-Gens von *M. pneumoniae* ausgehend von Position 1 als erste Base im Startkodon

²⁾ Mit "r" bezeichnete Primer sind Rückwärts-Primer

Die PCR wurde zunächst unter Standardbedingungen durchgeführt. Um eine größtmögliche Sensitivität und Spezifität zu erreichen, wurden verschiedene Temperaturen und Zeitspannen für die Anlagerung der Primer, Zykluszahlen sowie Reagenzienkonzentrationen bei Veränderung nur jeweils eines Parameters untersucht. Die Ansätze wurden im Agarosegel hinsichtlich der Intensität des Amplifikationsproduktes und der Bildung von unspezifischen Produkten überprüft. Zur Ermittlung der optimalen Zykluszahl wurde die geringste Anzahl an Zyklen bei gleichbleibend intensiver Agarosegelbande gewählt.

Die optimierte PCR wurde schließlich in einem 50 μl -Reaktionsgemisch, bestehend aus 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 1 mM MgCl_2 , 4 mM jedes Desoxynucleotid-Triphosphats, 0,8 mM des jeweiligen Primers, ungefähr 10 ng Mykoplasmen-DNA und 2 U *Taq*-DNA-Polymerase, unter folgenden Bedingungen in einem Thermocycler durchgeführt: nach einem initialen Denaturierungsschritt von 3 min bei 94 °C erfolgte die Amplifikation über 35 Zyklen mit jeweils einer Denaturierung bei 94 °C für 30 sec, Anlagerung der Primer bei 60 °C für 90 sec und Strangverlängerung bei 72 °C für 150 sec. Nach dem letzten Zyklus schloss sich ein weiterer Elongationsschritt bei 72 °C über 8 min an.

3.8.6.2 Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation einer *hsp70*-Gensequenz

Zur Amplifikation eines ungefähr 600 bp großen Abschnitts des *hsp70*-Gens wurden die Sequenzen der Primer (Tab. 3) aus der Literatur entnommen (GALLEY *et al.* 1992). Bei den Primern handelt es sich um degenerierte Oligonukleotidprimer. Die Primersequenzen stellen hoch konservierte und spezieübergreifende Bereiche des *hsp70*-Gens dar. Die Primer wurden von der Firma GIBCO BRL-Life Science Technologies (Eggenstein) als Lyophilisate bezogen und wie oben beschrieben gelöst und verdünnt (3.8.6.1).

Tab. 3: Degenerierte Oligonukleotidprimer zur Amplifikation einer *hsp70*-Gensequenz

Bezeichnung	Primersequenz ¹⁾
P701	5' - CAR GCN ACN AAR GAY GCN GG - 3'
P702	5' - GC NAC NGC YTC RTC NGG RTT - 3'

¹⁾ N steht für die Basen A, C, G oder T; R für die Basen A oder G; Y für die Basen C oder T

Die PCR wurde in einem 50 µl-Reaktionsgemisch, bestehend aus 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 1,5 mM MgCl₂, 4 mM jedes Desoxynucleotid-Triphosphats, 0,4 mM des jeweiligen Primers, ungefähr 10 ng Mykoplasmen-DNA und 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase, unter folgenden Bedingungen in einem Thermocycler durchgeführt: nach einem initialen Denaturierungsschritt von 5 min bei 94 °C erfolgte die Amplifikation über 35 Zyklen mit jeweils einer Denaturierung bei 92 °C für 30 sec, Anlagerung der Primer bei 64 °C für 120 sec und Strangverlängerung bei 72 °C für 180 sec. Nach dem letzten Zyklus schloss sich ein weiterer Elongationsschritt bei 72 °C über 8 min an.

3.8.6.3 Gezielte Mutagenese mittels Polymerase-Kettenreaktion

Im Gegensatz zu anderen Bakterien kodiert in der Familie *Mycoplasmataceae* das Basentriplett TGA für die Aminosäure Tryptophan und führt nicht zu einem Abbruch der Proteinsynthese. Das Codon TGA in der *Hsp70*-Gensequenz der Mykoplasmen wurde daher durch das für Tryptophan kodierende Triplett TGG ersetzt, um eine Expression des vollständigen PCR-Produktes in *E. coli* zu ermöglichen. Hierfür wurden mutagene Primer erstellt, die in ihrer Sequenz das Triplett TGG anstelle von TGA aufwiesen (Tab. 4).

Mit der PCR wurde ein gezielter Basenaustausch in der cDNA von *M. arthritidis* und *M. bovis* vorgenommen. Die Genese der Mutanten erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Ansätzen. In der ersten PCR (Mutagenese-PCR) wurde die cDNA mit je einem mutagenen Primer und einem Endprimer für das Plasmid

pGEX-5X-3 synthetisiert (Tab. 5). Es entstanden zwei PCR-Fragmente, die sich im Bereich der mutagenen Primer überschneiden und die neue Basensequenz enthielten. Die zwei Fragmente wurden in der zweiten PCR (Fusions-PCR) mit den beiden Endprimern verknüpft. Der Basenaustausch in der cDNA war dadurch vollzogen.

Tab. 4: Primer für den Basenaustausch im TGA-Basentriplett

Primerbezeichnung	Primersequenz ¹⁾
mutagener Primer M1	5' - TG <u>GGT GGT GAT GAT TGG</u> GAT AAT GCA ATT <u>GTT AAA TGG ATG GTT GAA GAA ATT</u> - 3'
mutagener Primer M2	5' - AAT TTC <u>TTC AAC CAT CCA</u> TTT AAC AAT TGC <u>ATT ATC CCA ATC ATC ACC ACC CA</u> - 3'

¹⁾ Die veränderten Basentriplets sind mit Fettdruck markiert, die Überlappungsbereiche der Primer sind unterstrichen

Tab. 5: Plasmidprimer für die Mutagenese-PCR (abgeleitet von pGEX-5X-3)

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

Die Mutagenese-PCR wurde in einem 50 µl-Reaktionsgemisch, bestehend aus 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 1,5 mM MgCl₂, 4 mM jedes Desoxynucleotid-Triphosphats, 1 mM des jeweiligen Primers, ungefähr 10 ng Mykoplasmen-DNA und 2,5 U *Taq*-DNA-Polymerase, unter folgenden Bedingungen durchgeführt: nach einem initialen Denaturierungsschritt von 3 min bei 94 °C erfolgte die Amplifikation über 30 Zyklen mit jeweils einer Denaturierung bei 94 °C für 60 sec, Anlagerung der Primer bei 61 °C für 120 sec und Strangverlängerung bei 72 °C für 120 sec. Nach dem letzten Zyklus schloss sich ein weiterer Elongationsschritt bei 72 °C über 8 min an.

Die Größe der Amplifikationsprodukte wurde in der Agarosegelelektrophorese überprüft. Die entsprechenden Produkte wurden extrahiert (3.8.3.1). Je 10 µl der aufgereinigten cDNA-Fragmente wurden vereinigt. Aus dieser Mischung wurde eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1.000, 1:5.000, 1:10.000, 1:50.000, 1:100.000) erstellt, um Reste des ursprünglichen Templates so stark zu verdünnen, daß sie keinen Einfluß auf die Fusions-PCR hatten. Infolge der Verdünnung lag das Ausgangstemplate daher in so geringer Konzentration vor, daß der größte Anteil der PCR-Produkte aus der fusionierten cDNA bestand.

Es wurden je 2 µl von der Ausgangslösung und der jeweiligen Verdünnungsstufe als

Template in der Fusions-PCR eingesetzt. Die PCR wurde mit dem Primerpaar A1 und A2 für *M. arthritidis* bzw. B1 und B2 für *M. bovis* unter sonst gleichen Bedingungen wie die Mutagenese-PCR durchgeführt. Für jede Spezies wurden zehn Ansätze eingebracht, die sich nur durch die Konzentration der cDNA-Fragmente unterschieden. Die PCR-Produkte wurden in einer Agarosegelelektrophorese überprüft und anschließend aufgereinigt. Die Produkte der beiden geringsten Verdünnungsstufen, die eine einheitliche und scharfe Bande bildeten, wurden für eine Ligation in den Vektor pGEX-5X-3 genutzt.

3.8.7 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierungen nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach SANGER *et al.* (1977) wurden teilweise vom Autor im Labor von Dr. F. Thiaucourt am CIRAD-EMTV (Montpellier, Frankreich) durchgeführt (3.8.7.1 bis 3.8.7.5) oder bei der MediGene AG (München) und Seqlab GmbH (Göttingen) in Auftrag gegeben. Die aufgereinigten PCR-Produkte konnten direkt sequenziert werden. Als Sequenzierungsprimer wurden die gleichen Primer, die für die PCR verwendet wurden, eingesetzt. Nach Erstellung der Gesamtsequenzen wurden zusätzliche Primer synthetisiert, mittels derer die Basensequenz nochmals überprüft wurde (Tab. 6).

Tab. 6: Primer für Kontrollsequenzierungen

Primer	Primersequenz
Seq1	5' - TGG TAG ATA CAG CAG GTA CCG - 3'
Seq2	5' - TCG TCT TAG CAT CAT GGC TGG - 3'
Seq3	5' - TAA CAG CAA CTA CAT TAA TGG TAC - 3'
Seq4	5' - CCC ACT GTT AAT CGT GGC ACC - 3'
Seq5	5' - GTA CGG GTT GGT GGT GCT ACG G - 3'
Seq6	5' - GCA GAA CTA CGC AGT GAA GCT G - 3'

3.8.7.1 Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde mit dem ABI PRISM 377 DNA Sequencer entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei der Sequenzierung wurde das Plasmid pGEM-3Zf(+) als Kontrolle für die Analyse doppelsträngiger DNA mitgeführt. Vor der Sequenzierungsreaktion wurden die PCR-Produkte mit einer Centricon-100 Säule entsprechend den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Nachdem die einzelnen Reagenzien gemäß Tab. 7 pipettiert wurden, wurde die Sequenzierungsreaktion mit dem entsprechenden Template unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 25 Zyklen mit einer Denaturierung bei 96 °C über 30 sec,

Anlagerung des Primers bei 50 °C über 15 sec und Strangverlängerung bei 72 °C über 4 min.

Tab. 7: Reaktionsansatz für die Sequenzierung

Reagenzien	<i>M. arthritidis</i> (hsp60)	<i>M. bovis</i> (hsp60)	<i>M. bovis</i> (hsp70)
DNA	1,4 µl (29,6 ng/µl)	6,5 µl (6,2 ng/µl)	6 µl (7,3 ng/µl)
Primer ¹⁾ (3,2 pmol)	1,0 µl	1,0 µl	1,0 µl
Terminator Ready Reaction Mix	8,0 µl	8,0 µl	8,0 µl
Aqua dest.	9,6 µl	4,5 µl	5 µl
Gesamtvolumen	20 µl	20 µl	20 µl

¹⁾ Die Primersequenzen sind den Tabellen 2 und 3 zu entnehmen

3.8.7.2 Aufreinigung der Produkte der Sequenzierungsreaktion

Die Produkte wurden mittels Ethanolpräzipitation aufgereinigt. Der Sequenzierungsansatz wurde dazu in ein Eppendorfreaktionsgefäß mit 2 µl 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,6) und 50 µl 95 %igem [v/v] Ethanol gegeben, gut gemischt und in einer Mikrozentrifuge zentrifugiert (14.000 x g, 30 min). Die Ethanollösung wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet mit 250 µl Ethanol gewaschen und anschließend zentrifugiert (14.000 x g, 15 min). Die Alkohollösung wurde vollständig entfernt und das Pellet getrocknet.

3.8.7.3 Herstellung des Sequenziergels

Die Gelkassette wurde entsprechend den Vorschriften des Herstellers zusammengesetzt. Es wurde eine Gelkassette mit einer Trennstrecke von 48 cm verwendet. Die Geldicke betrug 0,2 mm.

Acrylamid-Stammlösung

38,0 g Acrylamid und 2,0 g Bisacrylamid wurden in Aqua dest. gelöst (bis zu einem Gesamtvolumen von 90 ml) und 10 g Ionenaustauschharz hinzugeben. Das Ionenaustauschharz wurde unter Rühren gelöst. Nach weiteren 10 min Rühren wurde die Lösung durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße gegeben und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

10-fach Tris-Borat-EDTA (TBE)- Puffer

Tris-base	108,0 g
Borsäure	55,0 g
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	8,3 g
pH 8,3	

Zur Herstellung des Sequenziergels wurden 8,1 ml Acrylamid-Stammlösung, 28,8 g Harnstoff und 1 g Ionenaustauscharz in 35 ml deionisiertem Wasser gelöst, durch einen Zellulosenitratfilter mit 0,2 µm Porengröße gegeben und 5 min entgast. Anschließend wurden zu der Gellösung 8 ml 10-fach TBE-Puffer gegeben. Mit deionisiertem Wasser wurde die Lösung auf 80 ml aufgefüllt. Schließlich wurde die Gellösung mit 400 µl 10 % [w/v] Ammoniumpersulfatlösung und 55 µl TEMED versetzt, in die Gelkassette eingefüllt und ein Probenkamm eingesetzt.

3.8.7.4 Sequenzierlauf

Als Probenpuffer wurde eine Lösung verwendet, die aus fünf Teilen deionisiertem Formamid und einem Teil 25 mM EDTA (pH 8,0), welches 50 mg/ml Dextranblau enthielt, bestand. Die Proben wurden in 4 µl Probenpuffer resuspendiert, 2 min bei 90 °C erhitzt und bis zum Beladen des Gels auf Eis gelagert. Je Vertiefung wurden 1,5 µl Probe auf das Gel geladen. Die Gelkassette wurde in das Gerät eingesetzt und eine Spannung von 2.400 V angelegt. Die Laufgeschwindigkeit lag bei 90 Basen je Stunde. Die Sequenziergenauigkeit betrug 98,5 % je Lauf.

3.8.7.5 Analyse der Sequenzierdaten

Die Sequenz-Elektropherogramme wurden mit Hilfe der Software CHROMAS 1.43 (3.5) analysiert. Die fehlerhaft sequenzierten Anfangs- und Endbereiche gingen nicht in die Erstellung der Sequenz ein. Einzelne, nicht eindeutig sequenzierte Basen wurden mit Hilfe des Programms korrigiert. Die so erhaltene Sequenz wurde in eine Textdatei überschrieben und zur weiteren Bearbeitung durch das "HUSAR"-Programmpaket (3.5) modifiziert.

3.8.8 Klonierungstechniken

3.8.8.1 Ligation

PCR-Fragmente, die als Insert zur Klonierung eingesetzt werden sollten, wurden über eine nachgeschaltete PCR (3.8.6) mit den zur Ligation benötigten Restriktionsschnittstellen versehen, indem die Primer (P1-P10 bzw. P701/P702) um eine *Bam*HI-Schnittstelle (1. Primer) und um eine *Xho*I-Schnittstelle (2. Primer) verlängert wurden. Die PCR wurde nach einem initialen Denaturierungsschritt von 3 min bei 94 °C mit 40 Zyklen, bestehend aus jeweils einer Denaturierung bei 94 °C für 60 sec, Anlagerung der Primer bei 60 °C für 90 sec und Strangverlängerung bei 72 °C für 150 sec, in einem Thermocycler durchgeführt. Nach dem letzten Zyklus schloss sich ein weiterer Elongationsschritt bei 72 °C für 8 min an. In der PCR diente

die jeweilige aus dem Agarosegel ausgeschnittene und aufgereinigte DNA-Bande als Template (3.8.3.1).

Die Produkte dieser Klonierungs-PCR wurden wiederum auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die gewünschten DNA-Banden mit dem Geneclean-Kit II (3.8.3.1) aufgereinigt. Zur Präparation der für die Ligation notwendigen „sticky ends“ wurde das DNA-Fragment einem Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Xho*I unterworfen, indem zu 10 µl DNA-Lösung, 5 µl Carlopuffer (bestehend aus 330 mM Tris-HCl, pH 8,0, 660 mM Kaliumacetat, 100 mM Magnesiumacetat, 30 mM Spermidin und 1mg/ml BSA), 5 µl 10 mM Dithiothreitol (DTT)-Lösung, 26 µl Aqua dest. und jeweils 2 µl der Restriktionsenzyme gegeben wurden. Nach 4 h Inkubation bei 37 °C im Wasserbad wurde der Restriktionsverdau auf Eis mit 2,2 µl Probenpuffer (10-fach konzentriert) abgestoppt. 10 µl des Restriktionsansatzes wurden im Agarosegel auf die korrekte Fragmentgröße überprüft. Die verbliebenen 40 µl wurden mit dem Geneclean-Kit II aufgereinigt und in 20 µl Aqua dest. resuspendiert.

Für die Klonierungsversuche wurde der Plasmid-Vektor pGEX-5X-3 eingesetzt. Dieser Vektor ist Bestandteil eines Glutathion-S-Transferase (GST)-Genfusion-Systems, das für die Expression, Aufreinigung und Identifikation von Fusionsprotein-Produkten in *E. coli* entwickelt wurde. Die pGEX-Vektoren ermöglichen eine induzierbare, hochgradige, intrazelluläre Expression von Genen oder Genfragmenten als Fusionsprodukte mit GST von *Schistosoma japonicum*. Der pGEX-5X-3 Vektor besitzt einen *lac*-Promoter, eine „multiple cloning site“ mit 6 Restriktions-enzymchnittstellen und einer Erkennungssequenz für den Faktor Xa, der eine Abtrennung des gewünschten Proteins vom Fusionsprodukt erlaubt.

Zur Vorbereitung der jeweiligen Ligationsansätze wurden am Tag der Ligation die Vektoren und die zu klonierenden PCR-Fragmente frisch präpariert bereitgestellt. Zu jedem Ligationsansatz wurden 2 µl Vektor-DNA, 8 µl Insert-DNA, 10 µl Ligationspuffer (bestehend aus 500 mM Tris-HCl, pH 7,6, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 500 µl/ml BSA) und 0,5 µl Ligase gegeben. Kontrollansätze enthielten ungeschnittenen Vektor und anstelle der Insert-DNA 8 µl Aqua dest. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert.

3.8.8.2 Transformation

TFB-1

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

TFB-2

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

Die Lösungen wurden sterilfiltriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde *E. coli* HB101 oder *E. coli* JM105 auf LB-Agar fraktioniert ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Nach ungefähr 30 h wurde eine einzelne Kolonie zur Subkultivierung in 3 ml LB-Medium überführt und ebenfalls bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die *E. coli*-Kultur wurde durch Gramfärbung auf Kontaminanten überprüft. 250 ml LB-Medium wurden dann mit 2,5 ml dieser Kultur inokuliert und unter Schütteln bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD₆₆₀ von 0,3-0,4 inkubiert. Die Kultur wurde in eiskalte, sterile Zentrifugenbecher überführt und durch Zentrifugation (2.600 x g, 15 min, 4 °C) geerntet. Der Überstand wurde verworfen. Die Bakterienzellen wurden auf Eis und unter Verwendung kalter Pipetten mit 60 ml eiskalter TFB-1 Lösung zügig resuspendiert und 90 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (2.600 x g, 15 min, 4 °C) wurde der Überstand wieder verworfen, das Sediment in 10 ml eiskalter TFB-2 Lösung resuspendiert und die Suspension auf Eis gestellt. Mit einer kalten Pipette wurden jeweils 300 µl Flüssigkultur in vorgekühlte Reaktionsgefäße gegeben und umgehend bei -70 °C zur weiteren Lagerung eingefroren. Zur Reinheitskontrolle wurde die Flüssigkultur eines Reaktionsgefäßes auf LB-Agar und LB-Agar mit Ampicillin-Zusatz ausgestrichen. Zur Kontrolle auf Kontaminationen mit Phagen wurde LB-Agar mit Topagarose angelegt. Zu jedem Ligationsansatz wurden 100 µl einer Suspension der kompetenten *E. coli* JM105- oder HB101-Zellen gegeben. Der Ansatz wurde gemischt und anschließend 2 h auf Eis inkubiert. Als Kontrolle wurde 1 µl ungeschnittener Vektor (pGEX-5X-3) ebenfalls mit 100 µl der Suspension kompetenter Zellen beschickt und auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 3 min wurden die Ansätze kurz auf Eis gestellt. Zur Regeneration der Zellen und zur Expression der Resistenzmarker wurden zu der Kultur 300 µl LB-Medium gegeben. Nach sechzigminütiger Inkubation bei 37 °C im Wasserbad wurde jeder Ansatz im Verhältnis 4:1 aufgeteilt und mit dem stumpfen Ende eines sterilen Glasröhrchens auf zwei LB-Agarplatten mit Ampicillin-Zusatz ausplattiert. Nachdem die Inokulate auf den Platten getrocknet waren, wurden sie über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

3.8.9 Analyse von Plasmid-DNA

3.8.9.1 Überprüfung potentieller Klone

Die Plasmidpräparationen der ausgewählten Klone wurden, vergleichend mit einer Kontrollpräparation des entsprechenden Vektors, durch Restriktionsverdau linearisiert, indem zu 20 µl DNA, 2,5 µl Carlospuffer (3.8.8.1), 2,5 µl 10 mM DTT-Lösung und 5 bis 10 U Restriktionsenzym gegeben wurden. Der Restriktionsansatz wurde bei 37 °C im Wasserbad 1-3 Stunden inkubiert und anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.8.5) analysiert. Klone mit Insert konnten aufgrund der Länge des Inserts von Klonen ohne Insert unterschieden werden. Plasmid-DNA, die sequenziert und weiter analysiert werden sollte, wurde mittels Midipräparation in ausreichender Analysenmenge und hohem Reinheitsgrad präpariert (3.8.2.2).

3.8.9.2 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierungen wurden bei der MediGene AG oder Seqlab GmbH in Auftrag gegeben. Die Ergebnisse wurden in Form von Elektropherogrammen und Sequenzdateien geliefert. Die DNA wurde durch Midipräparation gewonnen, aufgereinigt und in der Sequenzierreaktion eingesetzt. Als Sequenzierungsprimer dienten die gleichen Primer, die in der PCR eingesetzt wurden.

Die Sequenz-Elektropherogramme wurden mit Hilfe des Programms CHROMAS 1.43 (3.5) analysiert. Fehlerhaft sequenzierte Anfangs- und Endbereiche gingen nicht in die Erstellung der Sequenz ein. Einzelne nicht eindeutig sequenzierte Basen wurden mit Hilfe des Programms korrigiert. Die Basensequenz wurde in eine Textdatei überschrieben und zur weiteren Bearbeitung durch das HUSAR-Programmpaket (3.5) modifiziert.

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

3.8.10.1 Induktion von GST-Fusionsproteinen durch Isopropyl-β-D-Thiogalactosid

Klone, deren mykoplasmales Proteinanteil exprimiert werden sollte, wurden auf ihre Induzierbarkeit durch Isopropyl-β-D-Thiogalactosid (IPTG) überprüft. Dazu wurden die Klone fraktioniert auf LB-Agar mit Ampicillin-Zusatz ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Am folgenden Tag wurden je Ansatz 2 ml LB-Medium mit Ampicillinzusatz mit einer Kolonie von der Platte beimpft und 2 h bei 37 °C auf dem Rüttler inkubiert. Diese Flüssigkulturen dienten als Inokulum von je 2 Röhrchen mit jeweils 2 ml LB-Medium mit Ampicillinzusatz. Zu einem Röhrchen wurde IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM gegeben. Nach zwei weiteren Stunden Inkubation

bei 37 °C auf dem Rüttler wurden die beiden Ansätze in Eppendorfreaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (14.500 x g, 5 min), die Überstände verworfen und die Sedimente in 50 µl Aqua dest. gelöst. 5 µl der Suspension wurden mit 5 µl Spaltpuffer (3.9.4.1) vermischt und 5 min auf 100 °C erhitzt. Die Ansätze wurden paarweise (ohne IPTG- und mit IPTG-Zusatz) auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (3.9.4) und anschließend in der Coomassie-Blau-Färbung (3.9.6.1) ausgewertet.

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

Das „GST-Glutathion-Affinitätssystem“ von Pharmacia ermöglicht eine Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen auf der Basis einer Affinitätschromatographie. Der Ligand (reduziertes Glutathion) wird durch Epoxy-Aktivierung an die Oxiran-Gruppe der Sepharose-4B-Matrix gebunden und ist komplementär zur Bindungsstelle der Glutathion-S-Transferase.

Im Anschluß an die Expression der GST-Fusionsproteine in *E. coli* wurden die Bakterienzellen geerntet und durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Nach Entfernung der Zelltrümmer konnte das Zellysatz direkt auf die vorbereitete Glutathion-Sepharose-4B-Matrix (GS4B) gegeben werden. Unspezifisch an die Matrix gebundene Proteine wurden durch einen Waschpuffer entfernt. Das gebundene Fusionsprotein wurde anschließend mit einem Elutionspuffer unter Erhalt der Antigenität und Funktionalität eluiert. Durch diese Art der Aufreinigung konnte in einem einzelnen Chromatographiedurchlauf über 90 % des entsprechenden Fusionsproteins aufgereinigt werden.

a. Large-Scale-Anzucht und Präparation

Die Bakterienkulturen wurden nach IPTG-Induktion (3.8.10.1) zentrifugiert (7.700 x g, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde 30 min getrocknet. Die weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Das Sediment wurde in 5 ml eiskaltem, sterilem PBS resuspendiert und durch Ultraschall aufgeschlossen. Das Fusionsprotein wurde mit 20 %igem [v/v] Triton X-100 auf eine Endkonzentration von 1 % [w/v] eingestellt und bei RT 30 min suspendiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (12.000 x g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

b. Batch-Aufreinigung

Die GS4B wurde nach den Angaben des Herstellers mit PBS auf eine 5 %ige [w/v] Suspension eingestellt. Zu dem in der Präparation gewonnenen Überstand wurden 100 µl der 5 %igen GS4B-Suspension gegeben. Die Suspension wurde 30 min bei RT auf einem Wipptisch inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (500 x g, 5 min)

wurde das Sediment dreimal mit dem zehnfachen Bettvolumen PBS gewaschen und wiederum zentrifugiert.

c. Batch-Elution

Die Matrix wurde mit 1 ml Elutionspuffer (1,5 g reduziertes Glutathion, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 *ad* 500,0 ml) pro ml Bettvolumen resuspendiert und unter Mischen 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das eluierte Material zentrifugiert (500 x g, 5 min) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Elutionsschritt wurde zweimal wiederholt. Die Überstände wurden anschließend vereinigt.

3.8.10.3 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine mittels Aggregat-Präparation

Im Anschluß an die IPTG-Induktion (3.8.10.1) wurde das Bakterienpellet in 1 ml 50 mM Tris-Puffer (pH 8,0) mit 25 % [w/v] Saccharose resuspendiert und 30 min bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden 0,25 ml Lysozym-Puffer, bestehend aus 250 mM Tris (pH 8,0) und 10 mg Lysozym/ml, zugegeben und die Ansätze 10 min auf Eis inkubiert. Zu der Suspension wurden 10 ml eines 4:1 Gemisches von 2 x RIPA-Puffer (20 mM Tris, pH 7,4, 300 mM NaCl, 2 % [w/v] Natriumdesoxycholat, 2 % [w/v] Tergitol) und TET-Puffer (100 mM Tris, pH 8,0, 50 mM EDTA, pH 8,0, 2 % [w/v] Triton X-100) gegeben, vorsichtig vermischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde 5 min mittels Ultraschall (MidiTip, 50 % duty cycle) homogenisiert und anschließend zentrifugiert (28.000 x g, 20 min). Die Pellets wurden in 0,5 ml Aqua dest. aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die in der Suspension vorliegenden Proteinaggregate wurden durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer oder Guanidinchlorid in Lösung gebracht. Dazu wurde das gewünschte Volumen der Suspension in Reaktionsgefäße überführt, zentrifugiert (16.000 x g, 1 min) und im gleichen Volumen an SDS-Probenpuffer (3.9.4.2) oder 5 M Guanidin-HCl-Lösung aufgenommen. Zur Entfernung ungelöster Bestandteile wurden die Ansätze nochmals zentrifugiert (16.000 x g, 1 min).

3.9 Proteinchemische und immunologische Methoden

3.9.1 Kolonieblot

Der Kolonieblot wurde modifiziert nach der Methode von KOTANI und McGARRITY (1985) durchgeführt und diente zur Überprüfung der Identität der Mykoplasmen.

Substratlösung

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

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

PBS-Tween (0,1 % [v/v])

Tween-20	1,0 ml
PBS <i>ad</i>	1000,0 ml

Auf eine gut bewachsene Agarplatte (mit etwa 100 Mykoplasmenkolonien) wurde eine Nitrozellulosemembran gelegt. Die Position der Membran auf der Agarplatte wurde markiert, um später das Koloniemuster den Ursprungskolonien zuordnen zu können. Nach 5 min wurde die Membran mit der koloniebedeckten Seite nach oben in eine Petrischale oder in die Vertiefung einer Makrowellplatte überführt und dort mit einem Kaninchenantiserum gegen die jeweilige Mykoplasmaspezies (1:1000 in PBS verdünnt) zwei Stunden bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nicht gebundene Immunglobuline wurden anschließend durch dreimaliges Waschen (je 5 min) mit PBS-Tween entfernt. Der Kolonieblot wurde mit 1:1000 in PBS verdünntem, Peroxidase-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin (GAR/IgG H+L) 2 h bei RT inkubiert. Ungebundenes Konjugat wurde durch dreimaliges Waschen (je 5 min) mit PBS entfernt. Durch Zugabe der Substratlösung wurden gebundene Antikörper durch Bildung eines blauen Farbkomplexes nachgewiesen. Die Reaktion wurde mit Leitungswasser abgestoppt und der Blot im Dunkeln bei RT getrocknet. Die mikroskopische Auswertung erfolgte bei zweiunddreißig- bis achtundfünfzigfacher Vergrößerung. Alle Inkubations- und Waschschrte wurden auf einem Wipptisch durchgeführt.

3.9.2 Radioaktive Markierung und Induktion der Stressreaktion

Zur Herstellung eines cystein- und methionindefizienten Kulturmediums wurde ein Dialyseschlauch auf die benötigte Länge zugeschnitten und 10 min in Aqua dest. gekocht. Anschließend wurde das zu dialysierende Medium in den Schlauch pipettiert, dieser mit sterilen Klammern verschlossen und in RPMI 1640-Medium ohne Methionin und Cystein überführt, das zuvor mit den Aminosäuren des Selectamine-Kit nach den Angaben des Herstellers angereichert worden war. Die Dialyse erfolgte bei 4 °C auf einem Wipptisch, wobei das Medium dreimal nach jeweils

mehreren Stunden gewechselt wurde. Das fertig dialysierte Medium wurde bis zur weiteren Verwendung in Portionen zu 5 ml bei -80 °C gelagert. Vorab wurden Sterilkontrollen auf Blut- und HT-Agar angelegt.

In der logarithmischen Wachstumsphase befindliche Mykoplasmenkulturen (1 ml) wurden zentrifugiert (12.000 x g, 7 min), mit sterilem PBS gewaschen und in jeweils 0,5 ml dialysiertem Nährmedium vorsichtig resuspendiert. Nach Zusatz von je 100 µCi ³⁵S-Protein-labeling-mix pro Ansatz wurden die Kulturen einer dreißig- oder sechzigminütigen Hitzeschockbehandlung bei 43-45 °C unterzogen. Parallel angesetzte Kontrollen wurden bei 32 °C bzw. 35 °C (*M. hyopneumoniae*) inkubiert.

In einem weiteren Ansatz wurde als Stressfaktor anstelle der Hitzeschockbehandlung Wasserstoffperoxid in einer Endkonzentration von 1 M, 100 mM, 60 mM 10 mM, 1mM oder 100 µM dem Nährmedium zugesetzt. Die Mykoplasmenkulturen wurden ebenfalls 30 bzw. 60 min inkubiert. Als Negativkontrolle parallel angesetzte Kulturen wurden nicht mit Wasserstoffperoxid behandelt. Als Positivkontrollen wurden mit Hitzeschock behandelte Mykoplasmenkulturen verwendet.

3.9.3 Antigenpräparation und Proteinbestimmung

3.9.3.1 Antigenpräparation

Die auf 1000 ml angezüchtete Mykoplasmenkultur wurde zu je 250 ml portioniert und zentrifugiert (17.300 x g, 45 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die Sedimente wurden in je 2 ml eiskaltem, sterilem PBS resuspendiert, vereinigt und anschließend erneut zentrifugiert (20.200 x g, 30 min, 4 °C). Der Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Das Sediment wurde anschließend in 3 ml eiskaltem, sterilem PBS aufgenommen, bei -80 °C eingefroren und mit einem Mini-Potter im Eisbad homogenisiert. 0,2 ml des Homogenisats wurden zur späteren Proteinbestimmung entnommen. Der Rest wurde bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C eingefroren. Der Aufschluß der Zellen erfolgte im Eisbad mittels Ultraschall (fünfmal 30-60 sec, Stufe 2, 50 % duty cycle). Anschließend wurden die Proben portioniert, dann mehrfach eingefroren und wieder aufgetaut. Zur Beseitigung von unlöslichen Zellbestandteilen wurden die Proben nochmals zentrifugiert (16.000 x g, 2 min, 4 °C). Der Überstand wurde in Reaktionsgefäße überführt und zur längerfristigen Lagerung bei -80 °C aufbewahrt.

3.9.3.2 Proteinbestimmung

a. Proteinbestimmung nach Fällung mit Trichloressigsäure

0,2 ml der zu untersuchenden Lösung wurden mit 1 ml 15 % [v/v] Trichloressigsäure versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 4 °C wurde die Probe zentrifugiert

(2.000 x g, 10 min). Das Sediment wurde in einer Lösung aus 0,5 ml 0,5 N NaOH, 0,5 ml Aqua dest. und 1 ml Biuret-Reagenz aufgenommen und 30 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Die Messung der Extinktion bei 546 nm erfolgte gegen den Leerwert (0,5 ml Aqua dest., 0,5 ml 0,5 N NaOH, 1 ml Biuret-Reagenz). Für das Biuret-Reagenz war anhand einer Eichkurve mit Standard-Proteinen der Faktor (F) 19 ermittelt worden. Der Proteingehalt einer Probe ließ sich nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Proteingehalt} \left[\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right] = \frac{\text{Extinktion}_{546\text{nm}} \cdot F \cdot 10}{5}$$

b. Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976)

Färbelösung

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

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

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

Zur Bestimmung des Proteingehaltes von Bakterienkulturen wurden 500 µl der zu untersuchenden Kultur abzentrifugiert (20.200 x g, 10 min). Das Sediment wurde in 0,1 ml PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert (20.200 x g, 10 min). Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal durchgeführt und das Sediment danach in 0,1 ml PBS resuspendiert. Die Probe wurde 10 min mittels Ultraschall im Eisbad (100 % duty cycle) aufgeschlossen, anschließend mit 1 ml Färbelösung versetzt und die Extinktion der Probe, wie oben beschrieben, gemessen.

3.9.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese wurde mit einem vertikalen Gelsystem in einem diskontinuierlichen Puffersystem in Anlehnung an die von LAEMMLI (1970) beschriebene Methode durchgeführt.

3.9.4.1 Probenvorbereitung für die gelelektrophoretische Untersuchung des Proteinprofils nach Hitzeschock

Spaltpuffer

Probenpuffer:

Tris	4,84 g
SDS	1,00 g
EDTA	3,00 mg
Aqua tridest. <i>ad</i>	100,0 ml
Die Lösung wurde auf pH 8,0 eingestellt.	
Bromphenolblau	10,00 mg
Der Puffer wurde zu 0,5 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert.	

Dithiothreitol (DTT)-Lösung (2,6 M):

DTT	250,0 mg
Aqua tridest.	0,50 ml

Gebrauchsfertiger Spaltpuffer:

Probenpuffer	0,50 ml
DTT-Lösung	5,00 µl

Für die Probenaufbereitung wurden jeweils zwei identische 1 ml-Mykoplasmenkulturen verwendet. Eine Flüssigkultur diente der Bestimmung des Proteingehaltes, die zweite Flüssigkultur der Probenaufbereitung für die elektrophoretische Analyse. Die Flüssigkulturen wurden zentrifugiert (16.000 x g, 7 min) und die Überstände verworfen. Für die elektrophoretische Analyse wurde das Sediment dreimal mit Phenylmethylsulfonylfluorid-Lösung (0,5 mM in PBS) gewaschen. Für die Proteinbestimmung wurde das Sediment dreimal mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS aufgenommen.

Die Probe für die elektrophoretische Analyse wurde mit Spaltpuffer auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt und zur vollständigen Denaturierung 5 min bei 100 °C erhitzt. Als Molekulargewichtsmarker für die Erstellung einer Eichgeraden wurden kommerziell erhältliche Standards verwendet, die entsprechend den Angaben der Hersteller aufbereitet wurden.

3.9.4.2 Probenvorbereitung nach Antigenpräparation

Spaltpuffer, 2-fach konzentriert

Sammelgelpuffer, 0,5 M Tris, pH 6,8	2,5 ml
Harnstoff	0,6 g
SDS, 10 % [w/v]	4,0 ml
Glycerin, 87 % [v/v]	2,0 ml
2-Mercaptoethanol	1,0 ml
Aqua dest.	0,5 ml
Bromphenolblau	15,0 mg
Der Puffer wurde zu 0,5 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert.	

Der Proteingehalt der Proben wurde nach der Methode von BRADFORD (3.9.3.2) bestimmt. Die Proben wurden anschließend mit Spaltpuffer auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml eingestellt und zur vollständigen Denaturierung 5-10 min bei 100 °C erhitzt. Die Molekulargewichtsmarker wurden entsprechend den Angaben der Hersteller aufbereitet.

3.9.4.3 Durchführung der Elektrophorese

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

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

„Overlay“-Puffer

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

Laemmli-Elektrodenpuffer (LAEMMLI 1970)

Tris	12,12 g
Glycin	57,60 g
SDS, 10 % [w/v]	40,0 ml
Aqua dest. <i>ad</i>	4000,0 ml
pH-Wert: 8,3	

Tab. 8: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele

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

Trenngel	9 %	10 %	20 %
Bisacrylamid-Acrylamid-Lösung, 30 % [w/v]	10,8 ml	11,8 ml	17,7 ml
Natriumdodecylsulfat, 10 % [w/v]	0,34 ml	0,34 ml	0,34 ml
Trenngelpuffer, 1,5 M Tris, pH 8,8	8,2 ml	8,2 ml	8,2 ml
Harnstoff, 30 % [w/v]	3,6 ml	3,6 ml	3,6 ml
Aqua dest.7	12,2 ml	11,2 ml	5,3 ml
Ammoniumpersulfat, 10 % [w/v]	128 µl	128 µl	128 µl
TEMED	12,8 µl	12,8 µl	12,8 µl

Die Gele wurden entsprechend Tab. 8 angesetzt. Das Trenngel wurde in die Gelkassette pipettiert und mit Overlay-Puffer überschichtet. Nach der Polymerisation wurde der Puffer abgegossen und das Sammelgel hinzugegeben. Die Polymerisationsdauer betrug mindestens 2 h. Die Probentaschen wurden mit jeweils 20 µl Probe (entsprechend einer Proteinkonzentration von 20 µl) beschickt. Das Volumen des Molekulargewichtsmarkers betrug 10 µl. Bei Benutzung von Kämmen mit nur einer Probentasche wurde ein Probenvolumen von 250 µl (entsprechend einer Proteinkonzentration von 250 µl) aufgetragen. Der Elektrophoreselauf wurde bei 15 bzw. 25 mA pro Gel durchgeführt und beendet, sobald die Laufmittelfront das Gelende erreicht hatte.

3.9.5 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Für die zweidimensionale Auftrennung wurde das MINI-PROTEAN-II-System verwendet, bei dem als erste Dimension eine isoelektrische Fokussierung (IEF), als zweite Dimension eine SDS-PAGE durchgeführt wird. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

3.9.5.1 Probenvorbereitung

Probenpuffer, 1. Dimension

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

Die Proteine wurden durch Einwirkung von 10 %iger [w/v] TCA-Lösung (Endkonzentration) über Nacht bei 4 °C ausgefällt und anschließend abzentrifugiert (16.000 x g, 15 min). Die Überstände wurden verworfen, die Proteinpellets in 50 µl 8 M Harnstofflösung resuspendiert und mit 2 µl 0,25 %iger [w/v] Bromphenolblau-Lösung versetzt. Nach Neutralisation mit 2 N NaOH wurden die Ansätze 15 min bei 100 °C erhitzt und dann mit 50 µl Probenpuffer für die 1. Dimension umgepuffert. Die Proben wurden anschließend bei -20 °C gelagert und kurz vor dem Auftragen auf das Kapillargel nochmals 5 min auf 100 °C erhitzt.

3.9.5.2 Erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung)

Acrylamid-Bisacrylamid-Stammlösung

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

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

Gellösung für die 1. Dimension

Harnstoff	2,75 g
Acrylamid, 40 % [w/v]	0,67 ml
Triton X-100, 10 % [w/v]	1,0 ml
Ampholine, pH-Bereich 3,5-10 (0,4 g/ml)	75,0 µl
Ampholine, pH-Bereich 5-7 (0,4 g/ml)	125 µl
Ampholine, pH-Bereich 7-9 (0,4 g/ml)	175 µl
Aqua dest.	0,86 ml
Ammoniumpersulfat, 10 % [w/v]	10,0 µl
TEMED	10,0 µl

Zur Herstellung der Gellösung wurde der Harnstoff vorgelegt und alle weiteren Komponenten zugegeben. Die Mischung wurde bei 55 °C gelöst.

Probenüberschichtungspuffer

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

Der Probenüberschichtungspuffer wurde auf 37 °C erwärmt, um den Harnstoff zu lösen. Aliquots zu je 0,5 ml wurden bei -80 °C eingefroren.

Kathodenpuffer

NaOH	0,5 g
Aqua dest. <i>ad</i>	250 ml

Anodenpuffer

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

Die Kapillaren wurden zu Dreiviertel mit der Gellösung gefüllt und nach vollständiger Polymerisation in den Probenhalter für die erste Dimension überführt. Zur Ausrichtung des pH-Gradienten wurde zunächst 10 min bei 200 V, dann 15 min bei 300 V und anschließend 15 min bei 400 V ein Vorlauf durchgeführt. Die Puffer des Vorlaufs wurden verworfen. Anschließend wurden je Kapillare 15 µl der entsprechenden Probe aufgetragen. Die IEF wurde dann unter folgenden Laufbedingungen durchgeführt: 400 V, 15 min; 750 V, 15 min; 1000 V, 2 h 30 min. Nach Beendigung des Laufs wurden die Kapillargele mittels Gelejektor auf Parafilm ausgedrückt, mit jeweils ca. 100 µl Probenpuffer der zweiten Dimension (3.9.5.3) überschichtet und bei -20 °C eingefroren.

3.9.5.3 Zweite Dimension (SDS-PAGE)

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

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

Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-Puffer)

Tris	6,06 g
Aqua dest. <i>ad</i>	100,0 ml

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

Trenngelpuffer (1,5 M Tris-Puffer)

Tris	18,18 g
Aqua dest. <i>ad</i>	100,0 ml

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

Sammelgel

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

Trenngel

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

Probenpuffer, 2. Dimension

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

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

Die Gele wurden wie oben beschrieben angesetzt und in die Gelkassette pipettiert. Die Polymerisationsdauer betrug mindestens 2 h. Die aufgetauten Gele der isoelektrischen Fokussierung (1. Dimension) wurden 10 min bei RT mit Probenpuffer

für die 2. Dimension überschichtet und anschließend auf die Gele für die 2. Dimension übertragen. Die Kapillargele wurden hierbei immer in der gleichen Orientierung eingesetzt. Die SDS-PAGE wurde im Elektrodenpuffer nach LAEMMLI (1970) bei 150 V durchgeführt.

3.9.6 Nachweis der aufgetrennten Proteine

Die durch Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden durch Coomassie-Blau-Färbung, Silberfärbung, Autoradiographie oder Westernblot nachgewiesen.

3.9.6.1 Coomassie-Blau-Färbung

Färbelösung

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

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

Entfärbelösung

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

Das Gel wurde mindestens 1 h in der Färbelösung inkubiert und anschließend bis zur Entfärbung des Hintergrunds mit Entfärbelösung behandelt. Für eine fotografische Dokumentation wurde das Gel in Aqua dest. überführt. Alle Inkubationsschritte erfolgten auf einem Wipptisch.

3.9.6.2 Silberfärbung

Die Färbung wurde in modifizierter Form nach der Methode von BLUM *et al.* (1987) durchgeführt.

Fixierlösung

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

Natriumthiosulfat-Lösung

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

Färbelösung

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

Entwickler

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

Stopplösung

Methanol, 100 % [vv]	100,0 ml
Eisessig, 96 % [v/v]	24,0 ml
Aqua dest. <i>ad</i>	200,0 ml

Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel über Nacht in der Fixierlösung inkubiert und dann mit 50 %iger [v/v], 40 %iger [v/v] und 30 %iger [v/v] Ethanol-Lösung jeweils 20 min gewaschen. Es folgten eine einminütige Inkubation in Natriumthiosulfat-Lösung und dreimaliges Waschen für jeweils 20 sec mit Aqua dest. Das Gel wurde anschließend 20 min mit der Färbelösung imprägniert und zweimal mit Aqua dest. jeweils 20 sec gewaschen. Die Silberionen wurden mit Entwicklerlösung reduziert. Abhängig von der Reaktionsstärke wurde die Entwicklung nach ein bis mehreren Minuten abgestoppt, indem das Gel zweimal 20 sec mit Aqua dest. gewaschen und anschließend 10 min in Stopplösung inkubiert wurde. Es folgte ein 20 minütiger Waschschrift in 50 %igem Methanol [v/v]. Anschließend wurde das Gel in 30 %iges [v/v] Methanol überführt und ausgewertet.

3.9.6.3 Autoradiographie

Fixierlösung

Ethanol	50,0 ml
Eisessig, 96 % [v/v]	10,0 ml
Aqua dest. <i>ad</i>	50,0 ml

Polyacrylamidgele mit radioaktiv markierten Proteinen wurden für 1 h in Fixierlösung und für weitere 30 min in Verstärkerlösung (Amplify) inkubiert. Nach Trocknen des Gels wurde ein Autoradiographiefilm aufgelegt und nach 3-14 Tagen entwickelt.

3.9.6.4 Westernblot

Die Durchführung des Westernblots erfolgte in einer vertikalen Blottingkammer in Anlehnung an die Methoden von TOWBIN *et al.* (1979) und BURNETT (1981).

Towbin-Elektrodenpuffer

Tris	12,12 g
Glycin	57,64 g
Aqua dest. <i>ad</i>	3200,0 ml
Methanol, 96 % [v/v]	800,0 ml

Die Blotkassette wurde entsprechend den Angaben des Herstellers zusammengebaut. Als Transfermembran diente Nitrozellulose. Der Transfer erfolgte für 90 min bei 1 A.

a. Nachweis immunogener Proteine mit Peroxidase-konjugiertem zweitem Antikörper

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran in 3 %iger [w/v] BSA-Lösung (in PBS-Tween) 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 15 min mit PBS-Tween gewaschen. Die Bindung des primären Antikörpers erfolgte 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Nach drei jeweils 15 minütigen Waschschritten mit PBS-Tween wurde der Peroxidase-konjugierte sekundäre Antikörper ebenfalls 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C gebunden. Primäre Antikörper wurden in den Verdünnungen 1:200 bis 1:1.000, sekundäre Antikörper in der Verdünnung 1:1.000 in PBS eingesetzt. Nicht gebundene Immunglobuline wurden durch dreimaliges, jeweils zehnminütiges Waschen mit PBS entfernt. Die Entwicklung erfolgte mit Substratlösung (3.9.1). Nach Entwicklung der Banden wurde die Substratreaktion durch mehrmaliges Spülen mit Leitungswasser abgestoppt und der Blot zwischen Filterpapier im Dunkeln getrocknet. Die Wasch- und Inkubationsschritte wurden auf einem Wipptisch durchgeführt.

b. Nachweis immunogener Proteine mit Alkalische-Phosphatase-konjugiertem zweitem Antikörper

Blockpuffer

Tris	1,2 g
NaCl	8,8 g
Aqua dest. <i>ad</i>	800,0 ml

Nach Einstellung des pH-Wertes mit HCl auf 8,0 Zusatz von

Tween-20	0,5 ml
Gelatine	5,0 g
Aqua dest. <i>ad</i>	1000,0 ml

Der Puffer wurde autoklaviert und anschließend bei RT aufbewahrt.

Waschpuffer, 10-fach

Tris	12,0 g
NaCl	88,0 g
Aqua dest. <i>ad</i>	800,0 ml

Nach Einstellung des pH-Wertes mit HCl auf 8,0 Zusatz von

Tween-20	5,0 ml
Aqua dest. <i>ad</i>	1000,0 ml

Der Puffer wurde autoklaviert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde der Puffer 1:10 mit Aqua dest. verdünnt.

Substratpuffer für Alkalische Phosphatase

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

Der Puffer wurde autoklaviert. Die Lagerung des Puffers erfolgte bei 4 °C.

Substratlösung für Alkalische Phosphatase

Nitrotetrazoliumblausäurechlorid (NBT)-Lösung:

NBT	1,0 mg
N,N'-Dimethylformamid, 70 % [v/v]	1,0 ml

5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p-Toluidinsalz (BCIP)-Lösung:

BCIP	0,5 mg
N,N'-Dimethylformamid, 70 % [v/v]	1,0 ml

Die Lagerung erfolgte in Glasbehältern bei -20 °C. Die Gebrauchslösung wurde kurz vor der Inkubation hergestellt, indem zu 10 ml Substratpuffer je 100 µl NBT- und BCIP-Lösung gegeben wurden.

Die Nitrozellulosemembran wurde nach Beendigung des Blotvorganges mindestens 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit Blockpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 min mit Waschpuffer gewaschen, der primäre Antikörper, verdünnt in Waschpuffer, zugesetzt und mindestens 2 h bei RT (oder über Nacht bei 4°C) inkubiert. Der Blot wurde wiederum dreimal 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der Alkalische-Phosphatase-konjugierte Antikörper zugegeben. Die Inkubation erfolgte in der Regel über Nacht bei 4 °C. Nach dreimal fünfminütigem Waschen mit Waschpuffer wurde die Membran mit Substratpuffer gewaschen (mindestens dreimal 10 min). Die Entwicklung erfolgte mit Substratlösung für Alkalische Phosphatase und wurde nach dem Erscheinen von deutlichen Banden mit Leitungswasser abgestoppt. Der Blot wurde anschließend im Dunkeln zwischen Filterpapier getrocknet. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf einem Wipptisch.

3.9.6.5 Auswertung der Gelelektrophorese

a. SDS-PAGE

Die Bestimmung der Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine erfolgte mit Hilfe des Molekulargewichtsstandards. Anhand der bekannten Molekulargewichte der Markerbanden und deren Laufstrecke im Gel wurde eine Eichkurve erstellt, die eine lineare Abhängigkeit zwischen dem reziproken Wert der Beweglichkeit des Proteins und des Molekulargewichtes der Markerproteine aufwies (SOUTHERN 1975). Die Erstellung der Eichkurve und die Berechnung der Molekulargewichte wurden mit der Software FRAGMENTS (3.5) durchgeführt.

b. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Bestimmung des isoelektrischen Punktes (pI) der aufgetrennten Proteine erfolgte mit Hilfe eines Standards (2D-SDS-PAGE-Standard), der, vergleichend zu den Proben, ebenfalls über die 1. und 2. Dimension aufgetrennt wurde. Anhand der Lage der Markerproteinbanden konnte der pI der unbekannten Proteine ermittelt werden. Die Berechnung der Molekulargewichte erfolgte wie oben beschrieben.

3.9.7 Herstellung von Antiseren

Zur Gewinnung Hsp60-spezifischer Seren wurden Stallkaninchen aus der hauseigenen Zucht des Instituts für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover eingesetzt.

3.9.7.1 Antigenpräparationen

Zur Immunisierung der Kaninchen wurden rekombinante Hsp60-GST-Fusionsproteine von *M. arthritidis*, synthetische Peptide und antigenhaltige Nitrozellulose eingesetzt.

a. Rekombinantes Hsp60 von *M. arthritidis*

Die rekombinanten GST-Fusionsproteine wurden über eine Aggregat-Präparation (3.8.10.3) aufgereinigt. Von dieser Proteinsuspension wurden 50 µl entnommen, zentrifugiert (16.000 x g, 5 min), 100 µl in 30 µl 5 M Guanidin-HCl gelöst und erneut zentrifugiert (16.000 x g, 5 min). Der Überstand wurde abgenommen und mit 370 µl physiologischer NaCl-Lösung versetzt.

b. Synthetische Peptide

Die für die Immunisierung eingesetzten „multiple antigenic peptides“ (MAPs) mit den Bezeichnungen MAP1 und MAP2 wurden am Institut für Peptidforschung, Hannover, hergestellt. Die Peptidsequenzen sollten konservierte und stark antigene Bereiche des Hsp60 umfassen. Hierfür wurden die bekannten Hsp60-Aminosäuresequenzen von *M. pneumoniae* und *M. genitalium* auf das Vorkommen gemeinsamer antigenen Bereiche, die gleichzeitig hydrophil und an der Proteinoberfläche befindlich sein sollten, mit Hilfe eines anerkannten Algorithmus (Methode von Kolaskar; HUSAR-Programm ANTIGENIC) verglichen (3.5). Zwei Sequenzen wurden ausgesucht und in Form von MAPs synthetisiert (MAP1: 5' - HVE LLN GRL KQT TDK - 3' und MAP2: 5' - GIE DAS QLI ITE LDK - 3'). Hierbei wurden die synthetisierten Peptide mit Hilfe der Aminosäure Lysin zu einem 10-14 kDa großen Molekül im Bäumchenschema verästelt. Die MAPs lagen als Lyophilisate vor und wurden unmittelbar vor der Immunisierung in einer Konzentration von 200 µl/ml in physiologischer Kochsalzlösung gelöst.

c. Antigenhaltige Nitrozellulose

Nach Auftrennung von Ganzzelllysaten durch SDS-PAGE (3.9.4) wurden Hsp60-Banden von Mykoplasmen durch das Antiserum gegen Hsp60 aus *Synechococcus*

sp. im Westernblot (3.9.6.4) identifiziert. Parallel laufende Banden wurden ausgeschnitten.

3.9.7.2 Immunisierung und Serumgewinnung

Den Kaninchen wurde vor der Immunisierung aus der Ohrvene eine Blutprobe zur Gewinnung des Präimmunserums entnommen. Zur Serumgewinnung wurde das Blut 2 h bei RT stehen gelassen und anschließend zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen, portioniert und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

a. Immunisierung mit rekombinanten Hsp60 oder synthetischen Peptiden

Der Antigenpräparation (3.9.7.1) wurden 500 µl des Adjuvans Emulsigen zugesetzt. Daraus wurde eine stabile Emulsion mit einem Proteingehalt von 100 µl/ml hergestellt. Zur Erstimmunisierung wurden je Tier 2 x 0,3 ml der Emulsion intramuskulär und 2 x 0,2 ml subkutan verabreicht. Die Wiederholungsimmunisierungen erfolgten zwei und vier Wochen nach der Erstimmunisierung nach dem gleichen Schema. Zur Überprüfung der Antikörperreaktion wurde nach 7, 14 und 28 Tagen aus der Ohrvene Blut entnommen. Nach der 6. Woche wurden die Kaninchen in Narkose gelegt und durch Herzpunktion entblutet. Die Gewinnung des Serums erfolgte wie oben beschrieben. Eine Serokonversion wurde in Westernblots nach SDS-PAGE (3.9.6.4) mit Ganzzelllysaten von Mykoplasmen (3.9.3) und Hsp60-haltigen Fraktionen aus der Chromatographie (3.11) überprüft.

b. Immunisierung mit antigenhaltiger Nitrozellulose

In Anlehnung an die Vorgehensweise von CHILES *et al.* (1987) erfolgte die „Injektion“ der Hsp60-enthaltenden Nitrozellulose-Banden subkutan im Bereich des Rückens. Die Banden wurden so zusammengerollt, daß sie in eine Kanüle gesteckt werden konnten. Nach dem Einstich wurden sie dann mit einem in die Kanüle passenden Stempel subkutan abgesetzt. Die zweite und dritte Immunisierung wurde im Abstand von je 3 Wochen durchgeführt. Nach weiteren 2 Wochen wurden die Kaninchen narkotisiert und durch Herzpunktion entblutet. Die Serumgewinnung und Überprüfung der Serokonversion erfolgte wie oben beschrieben.

3.9.7.3 Aufreinigung von Kaninchenserum mit CNBr-aktivierter Sepharose

100 ml einer *E. coli* JM105-Kultur (OD₆₆₀ von 0,3-0,5) wurden zentrifugiert (1.500 x g, 10 min). Das Pellet wurde in 10 ml Kopplungspuffer, bestehend aus 0,1 M Na₂HCO₃ und 0,5 M NaCl, aufgenommen. Die Zellen wurden mittels Ultraschall im Eisbad (viermal je 30 sec, 50 % duty cycle) aufgeschlossen und zentrifugiert (14.400 x g, 15 min). Anschließend wurde die Proteinkonzentration des Überstandes nach Bradford (3.9.3.2) ermittelt.

1,5 g CNBr-aktivierte Sepharose wurden in 50 ml 1 mM HCl suspendiert und zentrifugiert (1.500 x g, 30 min). Das Sepharose-Sediment wurde fünfmal mit 50 ml 1 mM HCl und einmal mit 8 ml Kopplungspuffer gewaschen und jeweils, wie oben beschrieben, zentrifugiert. Der präparierte *E. coli*-Ligand wurde der Matrix zugesetzt (Proteinmenge: 14 mg) und 2,5 h bei RT mit dieser schonend gemischt. Zur Überprüfung des Bindungsgrades wurde die Proteinkonzentration des Überstandes nach Zentrifugation bestimmt (3.9.3.2). Die Sepharose wurde anschließend einmal mit 8 ml Kopplungspuffer gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden 1,5 h mit 10 ml Ethanolamin (pH 8,9) gesättigt. Die Matrix-Suspension wurde viermal im Wechsel mit jeweils 5 ml 1 M Natriumacetat-Puffer (pH 5,0) und 1 M Natriumborat-Puffer (pH 9,0) gewaschen. Das Sepharose-Sediment wurde in 5 ml PBS aufgenommen und damit eine Säule mit einem Gesamtvolumen von ca. 10 ml gepackt.

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

3.9.7.4 Aufreinigung von Kaninchenserum mit Protein A-Sepharose

Die in der Immunaффinitätschromatographie verwendeten Kaninchenantikörper wurden durch Bindung an Protein A-Sepharose in einer Econo-Säule (0,5 cm Durchmesser, 5 cm Länge) nach Angaben des Herstellers aus dem Anti-Hsp60-Serum aufgereinigt. Die in Aqua dest. gewaschenen Beads wurden bis zu einer Höhe von 1,5 cm in die Säule gefüllt und mit Waschpuffer (0,05 M Tris-Puffer, pH 7,0) äquiliбriert. Anschließend wurde 1 ml Serum auf die Säule gegeben. Nachdem das Serum nahezu vollständig in die Füllung eingesickert war, erfolgte ein Waschen der Säule mit 15 ml Waschpuffer. Die Elution wurde mit 20 ml 0,1 M Glycin-Puffer (pH 3,0) durchgeführt und das Eluat in Fraktionen zu je 1 ml aufgefangen. In die Auffangröhrchen wurden je 50 µl 1 M Tris-HCl (pH 9,0) zur Neutralisation vorgelegt. Die Konzentration an IgG in den einzelnen Fraktionen wurde im Photometer bei 280 nm bestimmt, wobei eine OD₂₈₀ von 1 ungefähr einer IgG-Konzentration von 0,8 mg/ml entspricht.

3.10 Funktionelle Untersuchungen

3.10.1 Untersuchungen zum Nachweis von Kreuzreaktionen mit eukaryontischen Zellen

Für die Untersuchungen wurden Rindernierenzellen, Schweinenierenzellen und embryonale Rattenfibroblasten als permanente Zelllinien sowie primäre tracheo-

bronchiale Epithelzellen vom Menschen eingesetzt (Tab. 9). Die Zellen wurden kulturell auf Kontaminationen mit Mykoplasmen überprüft.

Tab. 9: Eukaryontische Zellen für die Untersuchungen zum Nachweis von Kreuzreaktionen

Zelllinie/ Bezeichnung	Zelltyp	Herkunft	Merkmale
Madin Darby Bovine Kidney (MDBK)	Rindernierenzellen	Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover	permanente Zell- linie, Monolayer
Pig Kidney (PK 15/ A)	Schweinenieren- zellen	Institut für Virologie, Tierärztliche Hochschule Hannover	permanente Zell- linie, Multilayer
Embryonale Ratten- fibroblasten (RE)	Embryonale Rattenfibroblasten	Zentrales Tierlabor, Medizinische Hochschule Hannover	permanente Zell- linie, Monolayer
Normal Human Bronchial/Tracheal Epithelial Cells (NHBE)	Humane Schleim- hautepithelzellen aus Bronchea und Trachea	Clonetics, USA	Primärzellen mit einer Lebens- dauer von ca. 15 Passagen

Für die Kultivierung dieser eukaryontischen Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) oder Bronchial/Tracheal Epithelial Cell Medium (BEBM) verwendet. Dem BEBM wurde, entsprechend den Angaben des Herstellers, anstelle von FKS definierte Wachstumsfaktoren zugesetzt. Das Medium wurde dann als BEGM (Bronchial/Tracheal Epithelial Cell Growth Medium) bezeichnet.

Die MDBK-, PK15/A- und RE-Zellen lagen als dicht gewachsene Monolayer- bzw. Multilayerkulturen vor. Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurde zunächst das alte Kulturmedium aus den Gewebekulturflaschen entnommen und im Verhältnis 1:5 mit frischem DMEM mit 10 % [v/v] FKS vermischt. Anschließend wurden die Zellen durch Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % [w/v] Trypsin, 0,02 % [w/v] EDTA) gewonnen. Mit konditioniertem Medium wurde die Zellzahl auf $0,5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden in Gewebekulturflaschen bei 37 °C in 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert.

NHBE-Zellen lagen als gefriergetrocknete Kultur mit einer Zelldichte von $7,35 \times 10^5$ Zellen/ml vor und wurden, entsprechend den Angaben des Herstellers, weiter verarbeitet. Die Zellen wurden dazu in 30 ml BEGM aufgenommen. Je 5 ml der Zellsuspension wurden auf Gewebekulturflaschen verteilt und bei 37 °C in 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen, entsprechend den Angaben des Herstellers, mit HEPES gespült, durch Trypsinieren abgelöst, mit Trypsin-Neutralisationslösung behandelt, zentrifugiert, mit BEGM auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt und in Gewebekulturflaschen ausgesät.

Die Zellkulturen wurden täglich mikroskopisch kontrolliert. Nach jeweils zwei Tagen erfolgte ein Wechsel des Nährmediums. Bei Erreichen von ca. 80 % Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Die Vitalität der Zellen wurde durch eine Trypanblaufärbung überprüft. Die Einstellung der Zellzahl erfolgte mittels einer Neubauer-Zählkammer (LINDL und BAUER 1987). Für die Untersuchungen wurden die Zellproteine durch SDS-PAGE aufgetrennt (3.9.4) und im Westernblot auf die Reaktion mit einem Antiserum gegen Hsp60 von *Synechococcus sp.* untersucht (3.9.6.4).

3.10.2 Untersuchungen zur Reaktion von Rekonvaleszentenseren mit rekombinanten mykoplasmalen Hitzeschockproteinen

Für die Untersuchungen wurden Seren von Rindern und Schweinen verwendet, die aus den diagnostischen Untersuchungen des Mykoplasmenlabors des Instituts für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover stammten und im ELISA (AMMAR *et al.* 1980, SCHERM *et al.* 2002) mit Ganzzellantigenen von *M. bovis* bzw. *M. hyopneumoniae* einen Antikörpertiter zwischen 1:160 und >1:2.560 aufwiesen. Als Negativkontrolle wurden Seren eingesetzt, die im ELISA keine Reaktion zeigten.

Die aufgereinigten rekombinanten *M. arthritidis*-Hsp60-GST-Fusionsproteine und die Hsp70-GST-Fusionsproteine von *M. arthritidis* und *M. bovis* wurden in der SDS-PAGE (3.9.4) aufgetrennt (20 µl je Spur), auf Nitrozellulose übertragen (3.9.6.4) und mit den Rekonvaleszentenseren (1:200 in PBS verdünnt) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte nach Waschen und dreistündiger Inkubation bei RT mit Peroxidasekonjugat (GASw/ IgG (H+L) bzw. GABo/ IgG (H+L), 1:1.000 in PBS verdünnt) und 4-Chlor-1-Naphthol als Substrat. Um eine Reaktion mit dem Fusionsanteil der Glutathion-S-Transferase zu erkennen, wurde diese als Kontrolle bei allen Seren mitgeführt. Zusätzlich zu den Rekonvaleszentenseren wurden als Positivkontrolle Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus sp.* bzw. Antikörper gegen murines Hsp70 und entsprechende Konjugate verwendet. Die Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf einem Wipptisch.

3.10.3 Untersuchungen zur Induktion von Zytokinen und Chemokinen durch rekombinante mykoplasmale Hitzeschockproteine

Die Zellen zum Nachweis von Zytokinen und Chemokinen wurden freundlicherweise von PD Dr. A. Emmendörffer, Fraunhofer Institut für Aerosolforschung, Hannover, Abt. Immunbiologie, zur Verfügung gestellt.

3.10.3.1 Kultivierung der Testzellen

RPMI1640-Vollmedium

RPMI1640 wurde mit 10 % [v/v] FKS versetzt, das zuvor 30 min bei 56 °C inaktiviert worden war. Dieses Medium wurde zur Kultivierung von L929- und RAW267.4-Zellen verwendet.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)- α

DMEM-Pulver	10,08 g
NaHCO ₃	2,20 g
L-Glutamin	0,29 g
L-Asparagin	0,02 g
Streptomycin	0,10 g
Penicillin	10 ⁵ U
β -Mercaptoethanol	5 x 10 ⁻⁵ M
Aqua dest. <i>ad</i>	1000 ml

Der pH-Wert wurde auf 7,3 eingestellt.

Das DMEM- α -Medium wurde mit 20 % [v/v] „L-Zell-konditioniertem Medium“ und 10 % [v/v] hitzeinaktiviertem (30 min bei 56 °C) FKS supplementiert. Dieses Medium diente zur Kultivierung von BAC1.2F5-Zellen.

„L-Zell-konditioniertes“ Medium

Zur Herstellung von „L-Zell-konditioniertem“ Medium wurden L929-Zellen (siehe unten) in DMEM- α mit Zusatz von 0,22 g NaHCO₃/100 ml und 10 % [v/v] FKS vermehrt. Nach Ausbildung eines Monolayers wurde das Medium durch serumfreies Hungermedium (DMEM ohne Zusätze) ersetzt. Die Zellen wurden weitere sieben Tage im Hungermedium inkubiert.

Der Medienüberstand, in den die L929-Zellen Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) sezernierten, wurde steril gewonnen, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Zur Überprüfung der proliferativen Wirkung auf BAC1.2F5-Zellen wurde dieser Medienzusatz zunächst in verschiedenen Konzentrationen dem DMEM-Medium zugefügt, das Wachstum der Zellen beobachtet und diejenige Konzentration des „L-Zell-konditionierten“ Mediums bestimmt, bei welcher die M-CSF-abhängigen BAC1.2F5-Zellen nach mikroskopischer Beurteilung maximal proliferierten.

Die verschiedenen, nachstehend beschriebenen Testzellen wurden in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser mit 10 ml Medium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte

kultiviert. Täglich wurde die Vitalität, Morphologie, Dichte und Sterilität mikroskopisch beurteilt.

Um zu gewährleisten, daß die Zellen als Monolayer wuchsen, wurden sie nach jeweils 2-4 Tagen passagiert. Adhärent wachsende Zellen der Linien L929 und BAC1.2F5 wurden mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst, indem das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit 3 ml Trypsinlösung überschichtet und 1 min bei RT inkubiert wurden. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml Medium resuspendiert und zentrifugiert (200 x g, 5 min). Das Zellpellet wurde in frischem Kulturmedium resuspendiert und in der Verdünnung 1:3 in neue Petrischalen eingesät. RAW264.7-Zellen wurden zur Passage mit 10 ml Medium von der Oberfläche der Kulturschale abgespült und 1:5 verdünnt.

Die Lagerung von Zellen erfolgte in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml bei -70 °C oder über flüssigem Stickstoff in einer Lösung, bestehend aus 90 % [v/v] FKS und 10 % [v/v] Dimethylsulfoxid.

BAC1.2F5-Zellen

BAC1.2F5-Zellen stammen von murinen Milzzellen (BAC1), die mit dem SV40-Virus transformiert wurden (SCHWARZBAUM *et al.* 1984). Sie stellen unreife Makrophagen dar und vermögen nur in Anwesenheit des Wachstumsfaktors M-CSF zu proliferieren (MORGAN *et al.* 1987). Die Kultivierung erfolgte in DMEM- α -Medium.

L929-Zellen

L929-Zellen sind adhärent wachsende Fibroblasten aus der C3H-Maus. Diese Zellen wurden im Bioassay zur Bestimmung von TNF- α in Zellkulturüberständen eingesetzt (BAARSCH *et al.* 1991) und zur Herstellung von „L-Zell-konditioniertem“ Medium verwendet, welches für die Kultivierung von BAC1.2F5-Zellen benötigt wurde. Die Kultivierung erfolgte für den Bioassay in RPMI1640-Vollmedium oder zur Gewinnung von „L-Zell-konditioniertem“ Medium in DMEM- α -Medium.

RAW264.7-Zellen

Diese Zellen entstammen einem Aszitestumor einer männlichen Maus, der durch die intraperitoneale Injektion des Abelson-Leukämie-Virus induziert wurde. Es handelt sich um eine Makrophagenzelllinie (ATCC TIB-71, RASCHKE *et al.* 1978), die in RPMI1640-Vollmedium kultiviert wurde.

3.10.3.2 Untersuchung auf Endotoxin

Die Untersuchung der rekombinanten Hsp auf Kontamination mit Endotoxin erfolgte mit dem E-Toxate-Testkit. Dieser enthält als Reagenz *Limulus*-Amöbozytenlysat. Das Amöbozytenlysat agglutiniert bei Anwesenheit von weniger als 0,1 Endotoxin-Units

(EU)/ml. Proben, die eine Gelbildung hervorrufen, werden als Endotoxin- bzw. Lipopolysaccharid (LPS)-positiv befundet.

Alle rekombinanten Hsp wurden auf eine LPS-Kontamination untersucht, bevor sie zur Stimulation der Makrophagen eingesetzt wurden. Entsprechend den Herstellerangaben wurden der LPS-Standard (20.000 EU) und das Amöbozytenlysat in endotoxinfreiem Wasser gelöst und auf Eis gelagert. Für die Standardreihe wurde die LPS-Stammlösung (4.000 EU/ml) in endotoxinfreiem Wasser verdünnt.

Für alle Proben wurden zwei hitzesterilisierte Glasröhrchen verwendet. In ein Röhrchen wurden zum Nachweis von LPS 100 µl Probe und 100 µl Amöbozytenlysat pipettiert. Das zweite Röhrchen diente zum Nachweis einer eventuell in der Probe enthaltenen Substanz, welche eine Gelierung inhibieren würde. Dazu wurden in dieses Röhrchen neben 100 µl Probe und 100 µl Lysat zusätzlich 10 µl der Standardverdünnung mit einer LPS-Konzentration von 4 EU/ml pipettiert. Für die Standardreihe wurden 100 µl der Standardverdünnungen mit 100 µl Lysat versetzt. Als Negativkontrolle wurden 100 µl endotoxinfreies Wasser eingesetzt. Alle Testansätze wurden vibrationsfrei bei 37 °C im Wasserbad 1 h inkubiert.

Bei der Auswertung wurden die Röhrchen um 90° gekippt und festgestellt, ob ein festes Gel entstanden war. Ansätze, bei denen sich ein Gel gebildet hatte, wurden als LPS-kontaminiert bewertet.

3.10.3.3 Aktivierung der Testzellen

Für die Stimulation der Zellen der Makrophagenlinien BAC1.2F5 und RAW264.7 wurden zunächst pro Vertiefung einer 24-Loch-Makrowellplatte 5×10^5 Zellen in ein Volumen von 500 µl des entsprechenden Mediums eingesät. Die Aktivierung der Zellen erfolgte mit rekombinanten Hsp, die wie unter 3.8.10 beschrieben, hergestellt wurden.

Die rekombinanten Hsp wurden im jeweiligen Medium vorverdünnt. Im Testansatz zur Stimulation der Zellen betrug die finale Proteinkonzentration 1 µl/ml (Gesamtvolumen 1.000 µl). Für die Negativkontrolle wurden Makrophagen in Medium ohne Stimulator kultiviert, für die Positivkontrolle wurden die Zellen mit 1 µl/ml LPS stimuliert.

Die zellfreien Überstände wurden zunächst portioniert bei -20 °C gelagert und anschließend, wie nachfolgend beschrieben, hinsichtlich des Gehaltes an Zytokinen und Stickoxiden untersucht.

3.10.3.4 Nachweis von Zytokinen und Chemokinen

a. Nachweis von Tumornekrosefaktor- α

Aktinomycin D-Lösung

5 mg Aktinomycin D wurden durch Zugabe von 0,5 ml 70 %igem [v/v] Ethanol gelöst und mit 4,5 ml RPMI1640 verdünnt. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4 °C aufbewahrt.

Die Aktivität von murinem TNF- α in Zellkulturüberständen wurde in einem Bioassay mit L929-Fibroblasten bestimmt. Diese Zellen sind sensitiv gegenüber TNF- α -vermittelter Zytotoxizität und sterben entsprechend dem Gehalt an TNF- α im Medium ab (FLICK und GIFFORD 1984, BAARSCH *et al.* 1991).

Für den Test wurden 1×10^4 L929-Zellen in 100 μ l RPMI1640-Vollmedium in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte ausgesät und 22 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die zu testenden Medienüberstände der stimulierten Makrophagen wurden jeweils in Doppelbestimmung eingesetzt. 100 μ l der Proben wurden dazu im Überstand der L929-Zellen 1:2 über acht bis zwölf Vertiefungen verdünnt. Nach Zusatz von Aktinomycin D-Lösung (2,5 μ l/ml) zur Hemmung der Proliferation wurde der Ansatz 20 h inkubiert. In der mikroskopischen Auswertung wurden diejenigen Ansätze als TNF- α -enthaltend eingestuft, in denen 50 % oder mehr Zellen abgestorben waren.

b. Nachweis von murinem Interleukin-1 β

Bindungspuffer

NaHCO ₃	17,3 g
Na ₂ CO ₃	8,6 g
Aqua dest. <i>ad</i>	1000 ml

Der pH-Wert wurde auf 9,5 eingestellt.

Farbsubstrat (OPD-Lösung)

Zitrat-Phosphat-Puffer, pH 5:	
0,2 M Na ₂ HPO ₄ -Lösung	10,3 ml
0,1 M Zitrat-Lösung	9,7 ml

Ortho-Phenylendiamin(OPD)-Lösung:

400 mg OPD wurden in 100 ml Zitrat-Phosphat-Puffer gelöst. Diese Substratlösung wurde portioniert bei -20 °C gelagert.

Murines IL-1 β (mIL-1 β) in den Zellkulturüberständen wurde mittels eines Sandwich-ELISAs ermittelt. Gegen mIL-1 β gerichtete Antikörper (Konzentration: 1 mg/ml Bindungspuffer) wurden 1:100 in Bindungspuffer verdünnt. 50 μ l dieser Antikörperverschüttung wurden in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Zur Absättigung von freien Bindungskapazitäten wurden 50 μ l Blockier-Reagenz (Roti-Block[®], 1:5 in PBS-Tween verdünnt) je Vertiefung dazu pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde in einer geschlossenen feuchten Kammer auf dem Rüttler 1 h bei RT inkubiert.

Nach vier Waschzyklen mit einer PBS-Tween-Lösung (400 μ l) wurden 50 μ l des Standards (50 ng IL-1 β /ml) 1:2 in PBS über sieben Vertiefungen der Mikrotiterplatte verdünnt. Die Proben wurden in Doppelbestimmung mit je 50 μ l eingesetzt. Es erfolgte eine Inkubation in einer feuchten Kammer für 2 h auf einem Rüttler bei RT. Nach vier Waschschritten wurden je Vertiefung 50 μ l eines 1:100 in PBS-Tween verdünnten zweiten, biotinylierten Antikörpers gegen mIL-1 β (Konzentration: 0,3 mg/ml) zugesetzt. Der Ansatz wurde in der feuchten Kammer 1 h bei RT auf einem Rüttler inkubiert. Nach vier Waschschritten wurden je Vertiefung 50 μ l Peroxidase-Konjugat in einer Verdünnung von 1:500 in PBS-Tween hinzugegeben. Der Ansatz wurde 45 min bei RT inkubiert. 5 ml OPD-Lösung wurden direkt vor Gebrauch mit 3 μ l H₂O₂ versetzt. Im Anschluß an vier weitere Waschschriffe wurden je 50 μ l dieser Substratlösung in jede Vertiefung gegeben. Zur Entwicklung der Farbreaktion wurde der Ansatz 5-10 min im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde mit 100 μ l 1 N HCl abgestoppt und die Extinktion bei 490 nm bestimmt. Die Extinktion ist dabei proportional zur Antigenkonzentration der Probe.

c. Nachweis von murinem Interleukin-6

Die Durchführung, Messung und Auswertung zum Nachweis von murinem Interleukin-6 (mIL-6) erfolgte in der gleichen Weise wie für mIL-1 β beschrieben. Zur Bindung an die Mikrotiterplatte wurden Ratten-Antikörper (IgG₁) gegen mIL-6 in der Konzentration 0,5 mg/ml verwendet, die 1:200 in Bindungspuffer vorverdünnt wurden. Als Standard wurden 500 U mIL-6/ml eingesetzt. Der zweite Ratte-anti-Maus-Antikörper (IgG₁-biotinyliert; Konzentration: 0,5 mg/ml) wurde 1:5.000 in PBS-Tween verdünnt.

d. Nachweis von Stickoxiden in Zellkulturüberständen

Makrophagen sezernieren nach Stimulation Stickoxide in das Kulturmedium, welche in Nitrit und Nitrat umgewandelt werden, die mittels der Griess-Reaktion (Zugabe von Sulfanilamid, Salzsäure und Ethylendiamin) als farbiger Komplex photometrisch bestimmt werden können.

In einer Mikrotiterplatte wurden 25 µl der zu untersuchenden Medienüberstände mit 25 µl PBS verdünnt. 50 µl des Standards (10 mmol/l) wurden über 14 Vertiefungen, beginnend mit einer 1:2 Verdünnung, in PBS titriert. Als Leerwert wurden 50 µl PBS eingesetzt. 50 µl 1 %ige Sulfanilamidlösung (1 g in 100 ml 4 N HCl) und 10 µl 37 %ige [v/v] Salzsäurelösung wurden je Vertiefung dazu pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde dann 10 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl 1 %ige [w/v] Ethylendiaminlösung (1 g N-(1-Naphthyl) Ethylendiamin in 100 ml Methanol) zugesetzt. Der Testansatz wurde weitere 2 min bei RT inkubiert und die Extinktion bei 560 nm gemessen. Die Stickoxidkonzentrationen der Proben wurden anhand der Standardkurve berechnet.

3.10.4 Untersuchungen zur Induktion einer Hitzeschockantwort durch bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit

Die in den Versuchsreihen eingesetzte bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit (BALF) von Schweinen wurde freundlicherweise von Prof. Dr. M. Ganter, Klinik für kleine Klautiere, Tierärztliche Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt. Die Lungenspülungen wurden unter Azaperon-Metomidat-Anästhesie entweder unter Sichtkontrolle mit einem Bronchoskop nach der Methode von HENSEL *et al.* (1994) oder blind mit einem Zentralkatheter nach HARMSEN *et al.* (1979) modifiziert nach DELBECK (1995) durchgeführt. Zur Spülung wurden 80 ml physiologische NaCl-Lösung verwendet. Das zurückgewonnene Volumen lag zwischen 2 und 50 ml. Die BALF wurde unmittelbar nach der Entnahme zu je 10 ml portioniert und bis zur Untersuchung bei - 80 °C eingefroren.

Je Ansatz wurde 1 ml einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden *M. hyopneumoniae*-Kultur in ein Reaktionsgefäß gegeben und zentrifugiert (16.000 x g, 30 min). Das Pellet wurde zweimal mit PBS gewaschen (16.000 x g, 10 min), anschließend in 100 µl Friis-Medium mit Cystein-Methionin-Defizit resuspendiert und 10 min bei 37 °C adaptiert. Nach Zusatz von 100 µl BALF oder 100 µl physiologischer Kochsalzlösung für die Negativ- und Positivkontrolle und 10 minütiger Inkubation der Zellen bei 37 °C wurden die Ansätze mit je 2 µl Cystein-Methionin-Labeling-Mix (³⁵S-Markierung) versetzt. Mit Ausnahme der Positivkontrolle wurden alle Ansätze 4 h bei 37 °C bebrütet. Die Positivkontrolle wurde einem einstündigen Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Die Reaktion wurde unmittelbar darauf durch eine Proteinfällung mit 20 µl 100 %iger [w/v] TCA-Lösung abgestoppt. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden die Mykoplasmen in der ein- (3.9.4) oder zweidimensionalen (3.9.5) Gelelektrophorese aufgetrennt. Zur Sterilitätskontrolle wurden vor der Proteinfällung 50 µl jedes Ansatzes auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ bebrütet. Im Anschluß an die Auswertung des zweidimensionalen Proteinmusters nach Westernblot (3.9.6.4) wurde die zuvor getrocknete Nitrozellulosemembran auf einen

Autoradiographiefilm gelegt. Die Expositionsdauer betrug 20-24 h bei einer Temperatur von -70°C .

3.11 Isolierung von Hitzeschockproteinen

3.11.1 Aufschluß der Bakterien für die Chromatographie

Der Aufschluß der Mykoplasmen erfolgte wie unter 3.9.3.1 beschrieben. Zur weiteren Verwendung in der Ionenaustauscherchromatographie wurde das Sediment nach dem letzten Zentrifugationsschritt jedoch in 3 ml sterilem Waschpuffer (3.11.1.1) aufgenommen.

3.11.1.1 Ionenaustauscherchromatographie

Waschpuffer für die Kationenaustauschchromatographie (50 mM)

Natriumdihydrogenphosphat-Lösung 100 mM	25,5 ml
Di-Natriumhydrogenphosphat-Lösung 100 mM	24,5 ml
Aqua dest. <i>ad</i>	100,0 ml

Der pH-Wert wurde auf 6,8 eingestellt.

Die Chromatographien wurden bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Es wurde eine Macro Prep[®] High S-Matrix als starker Kationenaustauscher verwendet, da in Vorversuchen mit verschiedenen Anionenaustauschern (DEAE- und Q-Sepharose Fast Flow; Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) keine ausreichende Reinigung erzielt werden konnte. Die Kationenaustauschermatrix wurde in eine Econo-Chromatographie-Säule von 1 cm Durchmesser bis zu einer Höhe von 7 cm eingefüllt und mit 50 ml Waschpuffer äquilibriert. Anschließend wurde 1 ml (5 mg Proteingehalt) des Ganzzelllysates auf die Säule geladen. Nach einem Vorlauf mit Waschpuffer (50 ml) bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min erfolgte über eine entsprechende Programmierung des Econo-Systems eine stufenweise Zumischung des Elutionspuffers (0,05 M Phosphatpuffer, 1 M NaCl, pH 6,8). In insgesamt 170 min wurden bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min 85 Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Diese Fraktionen wurden nach SDS-PAGE (3.9.4) im Westernblot (3.9.6.4) mit den Hsp60-spezifischen Antiseren auf das Vorhandensein von Hsp60 überprüft.

3.11.1.2 Immunaффinitätschromatographie

Für die Immunaффinitätschromatographie wurde ein über Protein A-Sepharose gereinigtes Kaninchenantiserum gegen mykoplasmales Hsp60 eingesetzt. Als

Trägermaterial diente Affi-Gel® Hz Hydrazide Gel. Es wurde entsprechend den Angaben des Herstellers verfahren.

Die Immunglobulinhaltigen Fraktionen wurden über eine Econo-Pac 10 DG-Entsalzungssäule in einem Kopplungspuffer (pH 5,5) entsprechend den Angaben des Herstellers äquilibriert. Anschließend erfolgte die Oxidation der Kohlenhydratreste der F_c-Region durch NaIO₄. Dazu wurden 500 µl Stammlösung (25 mg NaIO₄ in 1,2 ml Aqua dest.) zu den Immunglobulinen, die in 5 ml Kopplungspuffer vorlagen, gegeben. Nach einstündiger Inkubationszeit auf dem Schüttler (bei RT und vor Lichteinwirkung geschützt) folgte eine erneute Umpufferung mit Hilfe einer Econo-Pac 10 DG-Entsalzungssäule. Es wurden Fraktionen von 1 ml aufgefangen und durch Extinktionsmessung bei 280 nm auf Proteine untersucht. Während der einstündigen Inkubationszeit wurden 5 ml Affi-Gel® Hz Hydrazide Gel in ein Plastikröhrchen überführt und fünfmal mit 10 ml Kopplungspuffer gewaschen. Anschließend wurde die IgG-haltige und umgepufferte Fraktion (Proteingehalt 7,2 mg) mit der gewaschenen Matrix vermischt und für 16 bis 20 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Wipptisch inkubiert. Danach wurde das Trägermaterial mit dem gebundenen IgG in eine Econosäule gefüllt und mit 50 ml Waschpuffer (PBS, pH 7) gewaschen. Die Immunaффinitätschromatographie wurde bei einer Umgebungstemperatur von 4 °C durchgeführt. Hsp60 von *M. arthritidis* bzw. von *M. bovis* enthaltende Fraktionen aus der Ionenaustauscherchromatographie wurden über Nacht bei einer Laufgeschwindigkeit von 0,33 ml/min mit den an die Matrix gekoppelten Antikörpern in Kontakt gebracht. Nicht gebundenes Material wurde mit 20 ml Waschpuffer entfernt und anschließend das Antigen eluiert. Der geeignete Elutionspuffer, der die Hsp60-Proteine durch unspezifische Elution vom Liganden verdrängt, ohne die Proteine zu denaturieren, wurde empirisch ermittelt. Hsp60-haltige Fraktionen wurden nach SDS-PAGE mittels Silberfärbung und Westernblotting mit Anti-Hsp60-Seren nachgewiesen.

3.11.2 Untersuchungen zur ATPase-Aktivität

Für den Enzymnachweis wurde γ -³²P markiertes ATP verwendet. Die ATP-Hydrolyse wurde an der Freisetzung von ³²P-Orthophosphat (γ -³²P_i) aus [γ -³²P]ATP nach einer von HOMEYER *et al.* (1989) entwickelten Methode gemessen. Sie basiert auf der relativ hohen Lipophilie des Phosphomolybdat-Komplexes. Durch die Bestimmung der Gesamtaktivität der Probe (ges. Aktivität) und der Aktivität des hydrolysierten Phosphats (Aktivität γ -³²P_i) läßt sich die Menge an freigesetztem γ -³²P_i bestimmen. 0,2 ml der durch Immunaффinitätschromatographie aufgereinigten Hsp60-Fraktion wurden mit 0,1 ml [γ -³²P]ATP-haltigem Puffer (Endkonzentration 1 mM [γ -³²P]ATP) 40 min bei 20 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von Perchlorsäure gestoppt und denaturiertes Protein abzentrifugiert. Zu 0,2 ml des Überstandes wurden 2 ml Molybdatreagenz und 1 ml eines Isobutanol-Toluol-Gemisches gegeben. Danach wurde 20 sec geschüttelt. Das γ -³²P_i lag nun in der organischen

Phase als Phosphomolybdat-Komplex vor. Die Aktivität des $\gamma^{32}\text{P}_i$ wurde in einem Szintillationszähler bestimmt. Die Meßwerte wurden als DPM (departs per minute) ermittelt. Dafür wurden zu 0,2 ml der organischen Phase 1 ml des Szintillation-Cocktails Lumagel® gegeben. Vor der Zugabe von Molybdatreagenz und Isobutanol-Toluol-Gemisch wurden 0,05 ml des Überstandes abgenommen, mit Lumagel® vermischt und die DPM ermittelt. Die Aktivität dieser Probe entsprach der gesamten Aktivität des eingesetzten $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Mit Hilfe der beiden Messungen ließ sich die Menge an freigesetztem $\gamma^{32}\text{P}_i$ bestimmen.

3.12 Tierversuche

Der Tierversuch wurde von der Bezirksregierung Hannover unter dem Aktenzeichen 98/46 genehmigt. Der Ablauf des Tierversuchs ist in Tab. 11 zusammengefaßt.

3.12.1 Versuchstiere

Für das Versuchsvorhaben wurden 50 weibliche Ratten des Inzuchtstammes LEWIS von der Fa. Bomholt Gaard, Dänemark, erworben. Die Ratten wogen zu Beginn des Versuches durchschnittlich 160 g und waren 8 Wochen alt. Drei bzw. zwei Tiere derselben Versuchsgruppe wurden zusammen in einem Makrolonkäfig (960 cm² Fläche, 15 cm Höhe) auf Weichholzgranulat gehalten. Gefüttert wurde *ad libitum* mit einer handelsüblichen, pelletierten Alleindiät für Ratten. Wasser stand über eine Trinkflasche ebenfalls *ad libitum* zur Verfügung. Die Tiere wurden in den Stallungen des Instituts für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin der Tierärztlichen Hochschule Hannover, in Räumen mit separatem Lüftungssystem gehalten. Die Ratten der Negativkontrollgruppe wurden räumlich getrennt aufgestellt. Während des Adaptationszeitraumes von einer Woche wurden die Tiere täglich an die versuchsdurchführenden Personen gewöhnt.

3.12.2 Vorbereitung und Applikation des Immunisierungsmaterials

Die Ratten wurden in vier Versuchsgruppen eingeteilt:

- Gruppe 1: Infektionskontrolle (Infektion mit *M. arthritidis* ISR1p7), 10 Tiere
- Gruppe 2: Applikation von rekombinanten Hsp60-Fusionsproteinen und Infektion mit *M. arthritidis* ISR1p7, 15 Tiere
- Gruppe 3: Applikation von rekombinantem Hsp70-Fusionsprotein und Infektion mit *M. arthritidis* ISR1p7, 15 Tiere
- Gruppe 4: Negative Kontrolle, 10 Tiere

Den Ratten der Gruppe 2 wurden am Tag 14 und am Tag 7 vor der Infektion mit *M. arthritidis* ISR1p7 zwei rekombinante Hsp60-Fusionsproteine (MA60-1 und

MA60-2) von *M. arthritidis* (3.8.10) zu gleichen Teilen injiziert. Die rekombinanten Proteine lagen jeweils in gelöster Form in 5 M Guanidin-HCl in einer Konzentration von 2,5 mg/ml vor. Von beiden Lösungen (MA60-1 und MA60-2) wurden je 200 µl abgenommen und mit 3,6 ml 0,89 %iger [w/v] Natriumchloridlösung versetzt. Anschließend wurde diese Lösung auf Eis mit einem gleichen Volumen inkomplettem Freund-Adjuvans durch mehrfaches Aufziehen in einer Spritze vermischt. Jede Ratte wurde mit insgesamt 50 µl Hsp60 immunisiert. Die Aufarbeitung des rekombinanten Hsp70-Fusionsproteins (MA70) von *M. arthritidis* ISR1 (3.8.10) zur Immunisierung der Tiere der Gruppe 3 wurde auf die gleiche Art durchgeführt. Tieren der Gruppe 1 wurde eine entsprechende Präparation ohne Protein injiziert. Je Ratte wurden jeweils 400 µl intraperitoneal appliziert. Die Tiere der Gruppe 4 blieben unbehandelt.

3.12.3 Aufbereitung des Infektionsmaterials und Infektion

Die Infektion wurde mit dem hochvirulenten Stamm *M. arthritidis* ISR1p7 durchgeführt, der durch Rattenpassagen aus dem arthritogenen Stamm *M. arthritidis* ISR1 (LABER *et al.* 1975) gewonnen wurde. *M. arthritidis* ISR1p7 wurde in 200 ml Standardmedium angezüchtet (3.7.2.1). Eine Wachstums- und Sterilkontrolle wurde auf einer Standardagarplatte und auf einer Columbia-Agarplatte angelegt (3.7.2.3). Die Flüssigkultur wurde zentrifugiert (27.000 x g, 45 min), das Pellet in 2 ml Standardmedium aufgenommen und mit einem sterilen Potter resuspendiert. Die Mykoplasmasuspension wurde in Aliquots von je 500 µl aufgeteilt und bei -80 °C eingefroren. Anhand eines Aliquots wurde die Lebendkeimzahl der Mykoplasmasuspension bestimmt (3.7.3.2).

Kurz vor der Infektion wurde ein Aliquot der *M. arthritidis* ISR1p7-Suspension aufgetaut und mit 0,89 %iger [w/v] Natriumchloridlösung auf eine Zellzahl von 3×10^8 cfu/ml eingestellt. Von dieser Suspension wurde den Ratten 1 ml intravenös injiziert.

3.12.4 Erhebung der klinischen Parameter

Die Ratten wurden über den Versuchszeitraum von 5 Wochen täglich einer Allgemeinuntersuchung unterzogen, wobei u. a. das Haarkleid, die Haltung und das Verhalten begutachtet wurden. Das Körpergewicht und ein Arthritis-Score wurden an den Tagen 3, 4, 6, 8, 13 und 16 *p. i.* ermittelt. Bei der Untersuchung wurden die Tarsal-, Karpal- und die Zehengrundgelenke der Hinterextremitäten auf das Vorhandensein einer Arthritis überprüft und der Schweregrad der Arthritis anhand der Schwellung, Rötung, Lahmheit und Schmerzhaftigkeit des Gelenkes durch einen Score von 0 bis 3 beschrieben (Tab. 10). Zur Bestimmung des Arthritis-Scores wurden insgesamt 6 Gelenke pro Tier beurteilt und zu einem Gesamt-Score addiert (modifiziert nach COLE *et al.* (1969) und BINDER *et al.* (1990b)). Ergänzend dazu wurde der Gelenkdurchmesser mit einer Schublehre erfaßt und direkt mit dem

Gelenkdurchmesser der entsprechenden Gelenke der Ratten der Negativkontrolle verglichen. In wöchentlichen Abständen wurde den Versuchstieren retrobulbär eine Blutprobe entnommen.

Tab. 10: Arthritis-Score

Arthritisgrad	klinische Symptome	Score pro Gelenk
keine Arthritis	Keine	0
geringgradige Arthritis	leichte Rötung und Schwellung, keine Lahmheit	1
mittelgradige Arthritis	deutliche Rötung und Schwellung, leichte Lahmheit	2
hochgradige Arthritis	starke Rötung und Schwellung, starke Lahmheit	3

3.12.5 Tötung und Sektion

Zu verschiedenen Zeitpunkten des Versuchs wurden Ratten mit Kohlendioxid getötet. Nach Öffnung von Thorax und Abdomen wurde das Blut durch Herzpunktion gewonnen. Die inneren Organe wurden adspektorisch untersucht. Für histopathologische Untersuchungen wurden die Gelenke nach Entfernung der Haut in 5 %igem [v/v] Formalin fixiert.

3.12.6 Histopathologie

Proben für die histopathologischen Untersuchungen wurden vor der Infektion sowie am Tag 9 und 21 *p. i.* entnommen. Die Gewebeproben wurden nach der Entnahme in Formalin mit 10 % [w/v] Zink gegeben, 24 h fixiert und dann in Paraffin eingebettet (LEONG und GILHAM 1989).

Von ausgewählten Paraffinblöcken wurden Schnitte mit einer Schichtdicke von 4-5 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern aufgezogen und 24 h bei 37 °C getrocknet. Zur mikroskopischen Beurteilung wurden die Gewebeproben mit Hämatoxilin-Eosin gefärbt. Die Präparate wurden hierfür zuvor 1 h bei 60 °C erhitzt und anschließend zur Entparaffinisierung zweimal 5 min in Xylol verbracht. Im Anschluss erfolgte die Rehydratation über eine absteigende Alkoholreihe bis hin zu destilliertem Wasser. Nach einer sechsminütigen Inkubation in Hämalauun wurden die Schnitte unter Leitungswasser gespült, 1 min in saurem Eosin gefärbt und erneut mit Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert und in ein Xylolbad gegeben. Die Präparate wurden unter Deckgläsern versiegelt und mikroskopisch beurteilt.

3.12.7 Etablierung eines Enzyme-linked Immunosorbent Assays zum Nachweis einer Hitzeschockprotein-spezifischen Immunantwort

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde zum Nachweis spezifischer Antikörper gegen mykoplasmales Hsp60 in den Seren der Versuchstiere (3.12) entwickelt.

ABTS-Substratlösung

Zu 10 ml Zitronensäurephosphatpuffer (100 mM $C_6H_8O_7 \times H_2O$ mit 40 mM $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$ auf pH 4,25 titriert) wurden 8 mg 2,2'-Azino-di(-3-ethylbenzthiazoliumsulfonat-6) (ABTS) und 20 µl 35 %iges [v/v] H_2O_2 gegeben.

Bei den Ratten erfolgte die Blutentnahme durch Punktion des retrobulbären Gefäßplexus nach Ethernarkose. Die Serumgewinnung entspricht der unter 3.9.7.2 beschriebenen Vorgehensweise.

Zunächst wurde eine für die Bindung von Hsp60 geeignete Mikrotiterplatte, ein geeigneter Bindungspuffer sowie durch Titration die optimale Antigenkonzentration ermittelt. Anschließend wurde eine Charge mit Hsp60 beschichteter Mikrotiterplatten hergestellt, indem Polysorb®-Platten mit 100 µl der 1:10 in Bindungspuffer verdünnten Hsp60-haltigen Fraktionen aus der Ionenaustauscherchromatographie von *M. arthritidis* mit einer Proteinkonzentration von 25 µl/ml beschickt wurden. Nach drei Stunden Inkubation auf einem Rüttler bei RT und dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (PBS mit 0,05 % [v/v] Tween) waren die Mikrotiterplatten gebrauchsfertig.

In Waschpuffer 1:100 vorverdünnte Rattenserum sowie als Positiv- und Negativkontrolle verwendete Seren wurden in einer 1:2 Verdünnungsreihe zu dem an die Mikrotiterplatte gekoppelten Antigen gegeben. Auf allen Mikrotiterplatten wurde in der 1. und 2. Spalte das positive bzw. negative Kontrollserum mitgeführt. Die Reihe A stellte auf allen Mikrotiterplatten die Konjugatkontrolle (geringste Antigenverdünnung ohne Zugabe von Kontroll- bzw. Patientenserum) und die Reihe H die Serumkontrolle (ohne Antigen, 1:100 verdünntes Serum) dar. Nach dreißigminütiger Inkubation und erneutem dreimaligen Waschen wurde mit einem 1:25.000 verdünnten, biotinylierten Sekundärantikörper (Schaf-anti-Ratte IgG) inkubiert (100 µl pro Vertiefung, 30 min bei RT). Die Waschschrte wurden wiederholt. Anschließend wurde mit einem 1:15.000 verdünnten Streptavidin-Peroxidase-Komplex (100 µl pro Vertiefung) inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von jeweils 100 µl ABTS-Substratlösung eingeleitet. Nach 10 min wurde die Absorption bei 410/490 nm gemessen. Die relativen Antikörperkonzentrationen in den Rattenserum wurden photometrisch durch Vergleich mit einem als Standard eingesetzten positiven

Kontrollserum ermittelt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden auf einem Wipptisch durchgeführt.

Tab. 11: Verlauf des Tierversuchs

	Tag vor bzw. nach Infektion						
	-14	-7	0	7	9	14	21
Gruppe 1 (n = 10)	B/ Adj.	B/ Adj.	B/ Infektion	B	P	B	Ende/ B P
Gruppe 2 (n = 15)	B/ MA60	B/ MA60	B/ Infektion P	B	P	B	Ende/ B P
Gruppe 3 (n = 15)	B/ MA70	B/ MA70	B/ Infektion/ P	B	P	B	Ende/ B P
Gruppe 4 (n = 10)	B	B	B/ P	B		B	Ende/ B

B Entnahme von Blutproben

Infektion Infektion mit 3×10^8 cfu *M. arthritidis* ISR1p7

MA60 Applikation von 50 µl Gluthation-S-Transferase-Hsp60-Fusionsprotein in inkomplettem Freund's Adjuvans

MA70 Applikation von 50 µl Gluthation-S-Transferase-Hsp70-Fusionsprotein in inkomplettem Freund's Adjuvans

Adj. Applikation von inkomplettem Freund's Adjuvans (negative Kontrollgruppe)

P Entnahmezeitpunkt für histopathologische Untersuchungen der Gelenke von jeweils 2 Ratten

Ende Abschluß des Tierversuchs

4 ERGEBNISSE

4.1 Nachweis von Hitzeschockproteinen bei Mykoplasmen

4.1.1 Ermittlung der logarithmischen Wachstumsphase

M. arthritidis, *M. bovis* und *M. pneumoniae* wurden bei 32 °C kultiviert. *M. hyopneumoniae* wies erst bei einer Temperatur von 35 °C ein ausreichendes Wachstum auf. Die Wachstumskinetiken von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* sowie die daraus für die Mykoplasmen ermittelten Teilungsraten, Generationszeiten und die logarithmischen Wachstumsphasen sind in Abb. 3 und Tab. 12 dargestellt.

Tab. 12: Ermittlung der Teilungsrate, Generationszeit und logarithmischen Wachstumsphase von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae*

Mykoplasmen- spezies	lg Nx	tx [h]	lg Ny	ty [h]	v	g [h]	Logarithmische Wachstumsphase [Stunden nach Inokulation]
<i>M. arthritidis</i> ^{a)}	7,4	12,0	8,2	22,0	0,27	3,7	9 – 26
<i>M. bovis</i> ^{a)}	8,2	9,0	8,8	17,6	0,23	4,4	6 – 28
<i>M. hyopneumoniae</i> ^{b)}	8,2	10,0	8,6	24,0	0,1	10,5	4 – 26
<i>M. pneumoniae</i> ^{a)}	7,3	14,9	7,8	28,0	0,13	7,9	9 – 30

^{a)} Kultivierung bei 32 °C

^{b)} Kultivierung bei 35 °C

Nx: cfu/ml zum Anfangszeitpunkt tx

Ny: cfu/ml zum Endzeitpunkt ty

v: Teilungsrate (Zellteilungen pro Stunde)

g: Generationszeit (für einen Teilungszyklus benötigte Zeit)

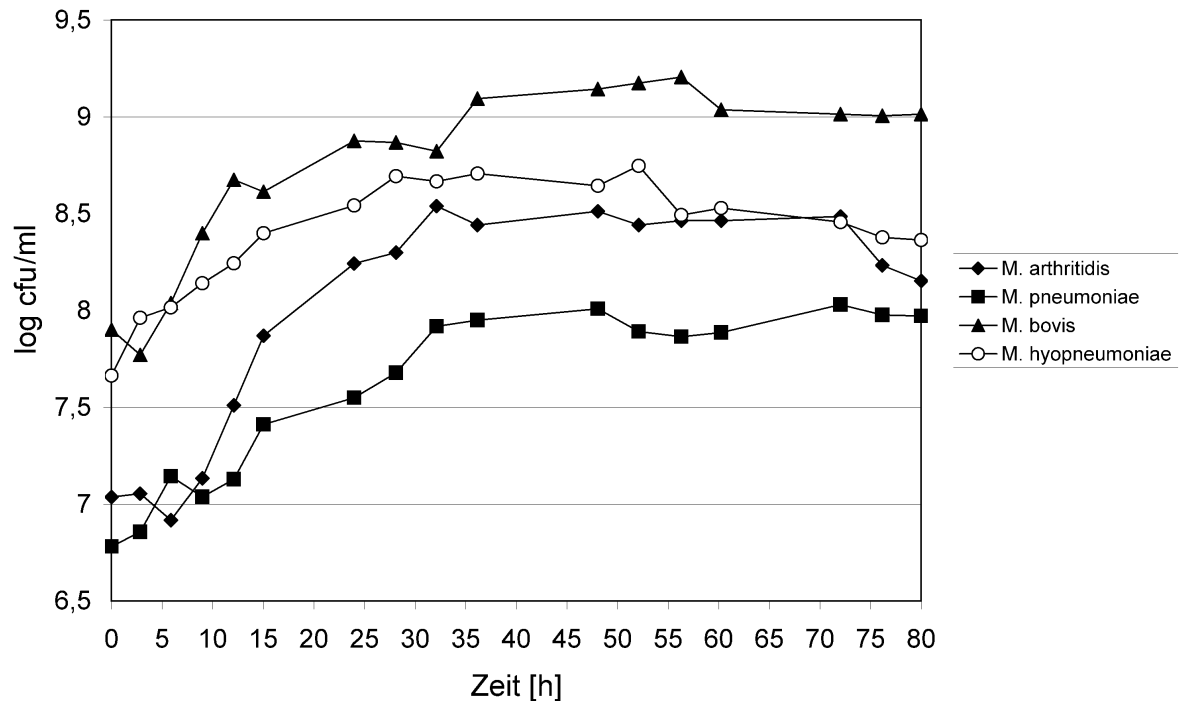


Abb. 3: Wachstumskinetiken von *M. arthritis*, *M. bovis* und *M. pneumoniae* (32 °C) und *M. hyopneumoniae* (35 °C)

4.1.2 Thermische Inaktivierung der Mykoplasmen

In Abb. 4 ist die Überlebensfähigkeit der Mykoplasmen in Abhängigkeit von der Temperatur und der Zeit dargestellt. Eine Erhöhung der Temperatur von 32 °C auf 43 °C hatte bei *M. arthritis* nur eine geringfügige Abnahme der Lebendkeimzahl zur Folge. Auch bei einer Erhöhung der Temperatur auf 45 °C war erst nach 40 min eine kontinuierliche Abnahme der Lebendkeimzahl zu erkennen. Nach einer Erhöhung auf 47 °C konnten bereits nach 20 min keine vermehrungsfähigen Mykoplasmen mehr nachgewiesen werden.

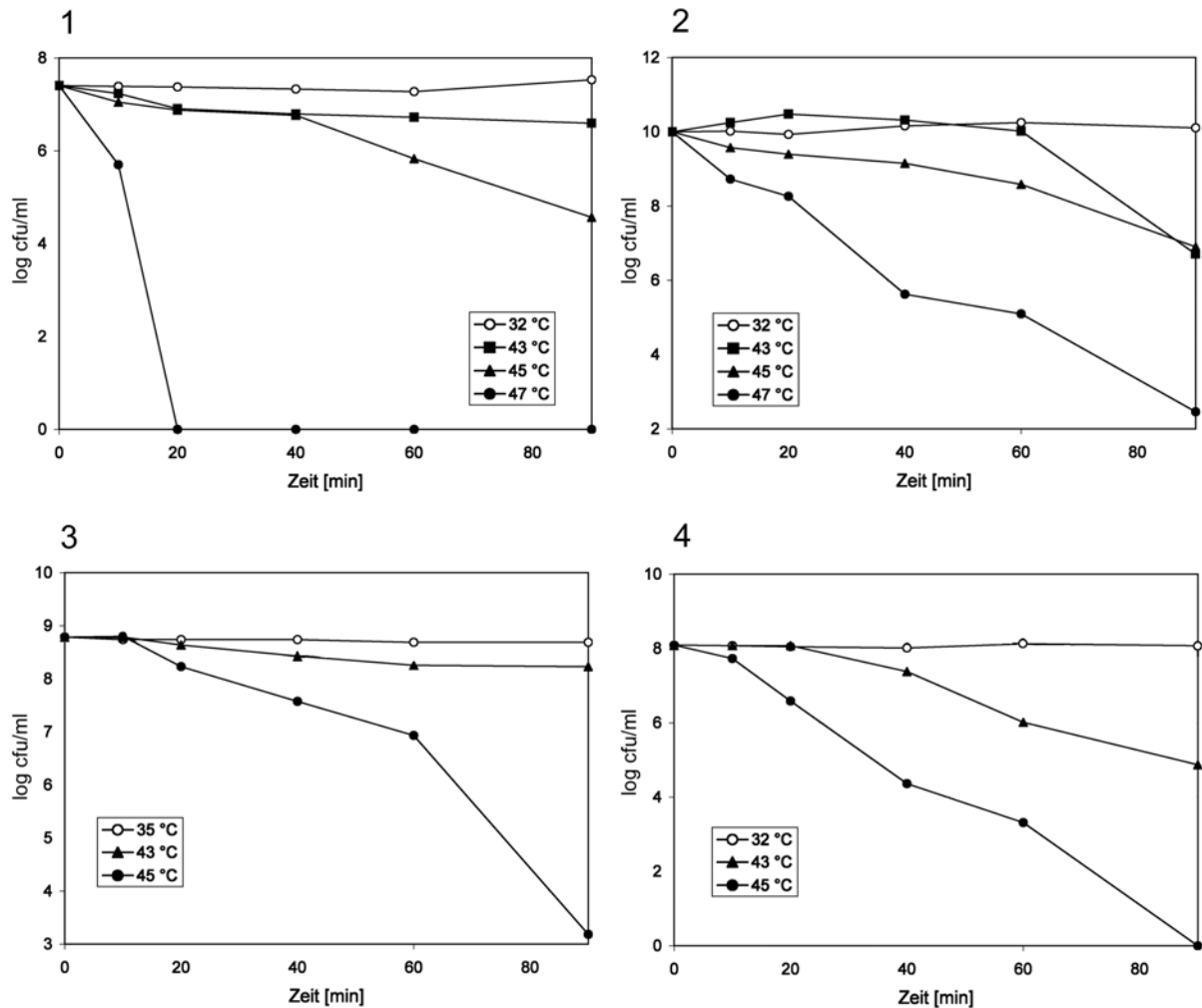


Abb. 4: Thermische Inaktivierung von *M. arthritis* (1), *M. bovis* (2), *M. hyopneumoniae* (3) und *M. pneumoniae* (4) in der logarithmischen Wachstumsphase

Bei *M. bovis* konnte nach Temperaturerhöhungen von 32 °C auf 43 °C bzw. 45 °C eine ähnliche Wachstumskinetik wie bei *M. arthritis* festgestellt werden. Nach Erhöhung auf 47 °C konnten jedoch über den gesamten Untersuchungszeitraum, wenn auch in stark abnehmender Keimzahl, vermehrungsfähige Mykoplasmen nachgewiesen werden.

Eine Erhöhung der Temperatur von 35 °C auf 43 °C hatte auf die Lebendkeimzahl von *M. hyopneumoniae* nur einen geringfügigen Einfluß. Nach Erhöhung der Temperatur auf 45 °C fiel die Lebendkeimzahl hingegen nach 10 min zunächst langsam, nach 60 min schnell ab.

Die Lebendkeimzahl von *M. pneumoniae* fiel im Verlauf einer Kultivierung bei 43 °C nach 20 min kontinuierlich ab. Bei einer Temperatur von 45 °C war ebenfalls eine kontinuierliche Verringerung der Lebendkeimzahl erkennbar. Nach 90 min konnten bei dieser Temperatur keine vermehrungsfähigen Mykoplasmen mehr nachgewiesen werden. In den Kulturen von *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* waren nach

Erhöhung der Temperatur von 35 °C bzw 32 °C auf 47 °C keine vermehrungsfähigen Mykoplasmen festzustellen.

4.1.3 Berechnung der dezimalen Reduktionszeit

Die thermische Inaktivierung von Bakterien kann durch die dezimale Reduktionszeit D quantifiziert werden (DASCHER und MANILOFF 1992). D ist die Zeit, die bei einer bestimmten Temperatur erforderlich ist, um eine Reduktion auf ein Zehntel der Lebendkeimzahl zu erreichen. Die D-Werte von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* sind in Tab. 13 angegeben.

Tab. 13: Dezimale Reduktionszeit (D) von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae*

Mykoplasmenspezies	D [min] bei 43 °C	D [min] bei 45 °C	D [min] bei 47 °C
<i>M. arthritidis</i>	- ¹⁾	55,6	9,2
<i>M. bovis</i>	81,0	56,3	9,5
<i>M. hyopneumoniae</i>	-	39,1	k. W. ²⁾
<i>M. pneumoniae</i>	54,5	18,6	k. W.

¹⁾ Innerhalb von 90 min wurde eine Reduktion der cfu/ml auf 1/10 des Ausgangswertes nicht erreicht

²⁾ Kein Wachstum feststellbar

4.1.4 Nachweis von Hitzeschockproteinen

Die Mykoplasmenkulturen wurden je Spezies in zwei Aliquots aufgeteilt, von denen ein Aliquot einem Hitzeschock ausgesetzt, das andere als Kontrolle bei physiologischen Temperaturen inkubiert wurde. Zur Analyse der Proteinprofile nach Hitzeschock wurde für beide Ansätze eine Nährlösung verwendet, die mit Ausnahme der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein alle anderen Aminosäuren enthielt. Diesem Medium wurden mit dem radioaktiven Isotop ³⁵S markiertes Methionin und Cystein zugesetzt, die im Verlauf der Stoffwechselaktivität in die Proteine eingebaut wurden. Nach Auftrennung in der SDS-PAGE wurden die Proteinbanden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Bei *M. arthritidis* konnte eine verstärkte Synthese von Proteinen mit Molekulargewichten von 69 und 82 kDa, bei *M. bovis* von 33, 35, 56 und 70 kDa, bei *M. hyopneumoniae* von 36, 60, 89, 147 und 152 kDa, und bei *M. pneumoniae* von 23, 26, 61, 70 und 99 kDa nachgewiesen werden (Abb. 5).

Nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid in Konzentrationen von 1 M, 100 mM oder 60 mM konnte bei *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae*

keine Proteinbiosynthese festgestellt werden. Der Zusatz von 10 mM, 1mM oder 100 μ M Wasserstoffperoxid führte nicht zu einer vermehrten Synthese von Stressproteinen (nicht dargestellt).

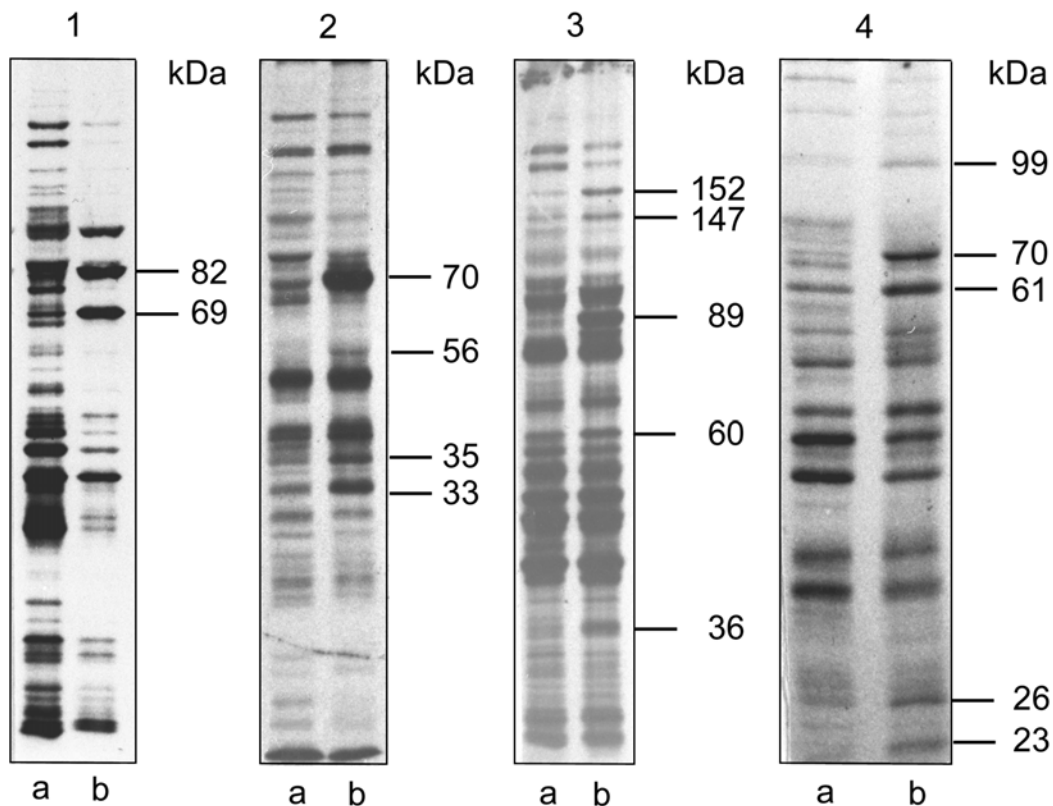


Abb. 5: Proteinprofil von *M. arthritidis* (1), *M. bovis* (2), *M. hyopneumoniae* (3) und *M. pneumoniae* (4) nach Hitzeschock

Die Mykoplasmen wurden bei 32 °C bzw. 35 °C (*M. hyopneumoniae*) kultiviert (a) oder einem Hitzeschock (b) bei 43 °C (*M. hyopneumoniae*, *M. pneumoniae*) bzw. 45 °C (*M. arthritidis*, *M. bovis*) unterzogen. Nach metabolischer Markierung mit 35 S-Methionin/Cystein wurden die Mykoplasmen als Ganzzelllysate in der SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Molekulargewichte der nach Hitzeschock vermehrt exprimierten Proteine sind angegeben.

Zum Nachweis des Hsp60 und Hsp70 wurden die Mykoplasmen zunächst durch SDS-PAGE aufgetrennt, mittels Westernblot auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit Antiseren gegen homologe Hsp inkubiert.

Bei *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* reagierte das Antiserum gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. mit einem 61 kDa-Protein. Im Vergleich dazu wurde bei *E. coli* ein 64 kDa-Protein nachgewiesen. Im Gegensatz zu dem Hsp60 von *E. coli* war eine verstärkte Expression eines Proteins dieses Molekulargewichts durch Hitzeschock bei den Mykoplasmen nicht erkennbar (Abb. 6).

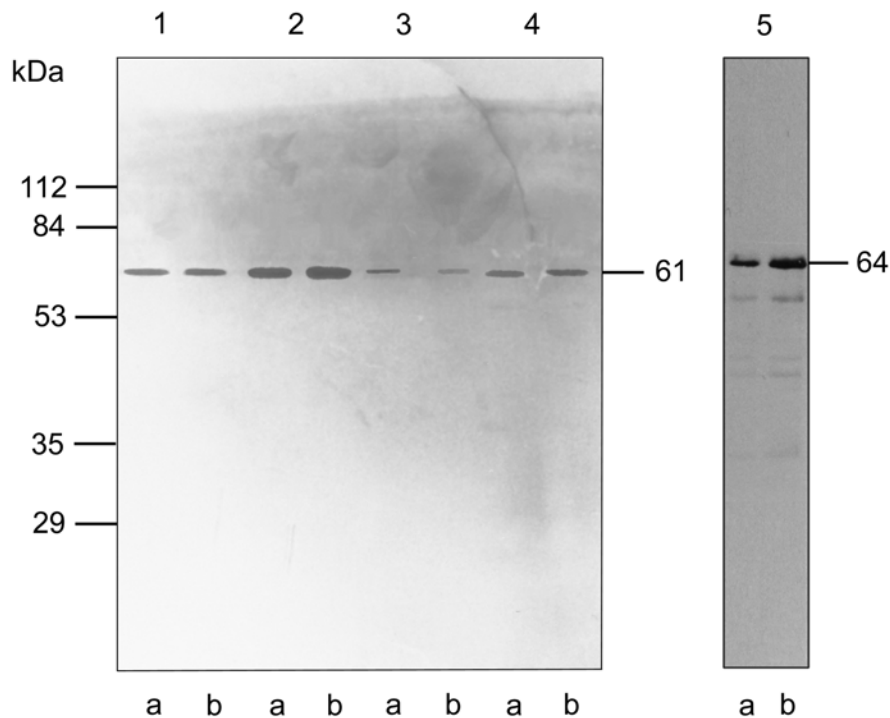


Abb. 6: Hsp60-Profil von *M. arthritidis* (1), *M. bovis* (2), *M. hyopneumoniae* (3), *M. pneumoniae* (4) und *E. coli* (5) nach Reaktion mit einem Antiserum gegen Hsp60

Die Bakterien wurden bei 32 °C bzw. 35 °C (*M. hyopneumoniae*) kultiviert (a) oder einem Hitzeschock (b) bei 43 °C (*M. hyopneumoniae*, *M. pneumoniae*) bzw. 45 °C (*E. coli*, *M. arthritidis*, *M. bovis*) unterzogen. Nach Auftrennung der Bakterien als Ganzzelllysate in der SDS-PAGE wurde die Reaktion im Westernblot mit einem Antiserum gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (1:500 in PBS verdünnt) untersucht. Am linken Bildrand sind die Molekulargewichte des Größenstandards, am rechten Bildrand das Molekulargewicht des Hsp60 angegeben.

Unter Verwendung eines Kaninchenantiseraums gegen ein Hsp70-Fusionsprotein von *M. pneumoniae* konnte lediglich bei *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 69 kDa und bei *E. coli* eine Proteinbande von 74 kDa nachgewiesen werden. Eine verstärkte Expression der Proteine nach Hitzeschock war nicht erkennbar (Abb. 7).

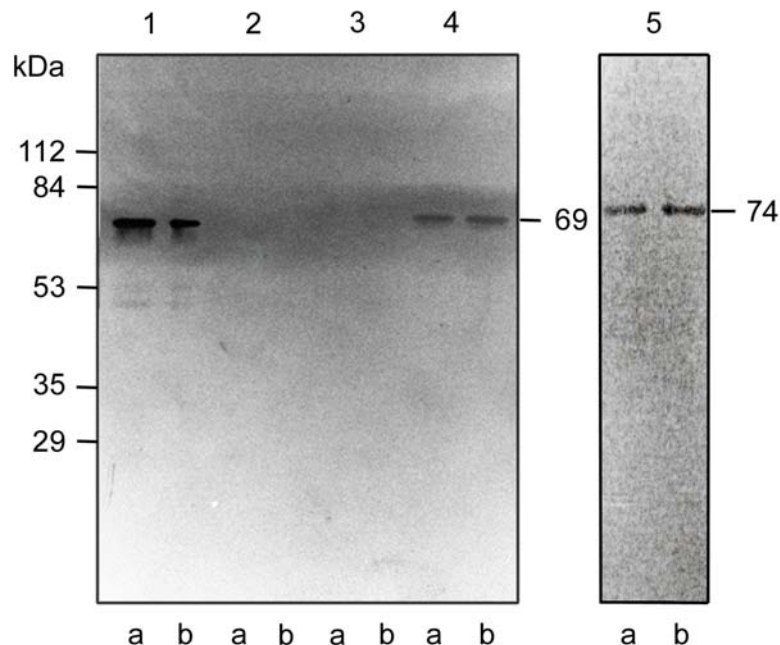


Abb. 7: Hsp70-Profil von *M. pneumoniae* (1), *M. arthritis* (2), *M. bovis* (3), *M. hyopneumoniae* (4) und *E. coli* (5) nach Reaktion mit einem Antiserum gegen Hsp70 von *M. pneumoniae*

Die Mykoplasmen wurden bei 32 °C bzw. 35 °C (*M. hyopneumoniae*) kultiviert (a) oder einem Hitzeschock (b) bei 43 °C (*M. hyopneumoniae*, *M. pneumoniae*) bzw. 45 °C (*E. coli*, *M. arthritis*, *M. bovis*) unterzogen. Nach Auftrennung der Mykoplasmen als Ganzzelllysate in der SDS-PAGE wurde die Reaktion im Westernblot mit einem Antiserum gegen Hsp70 von *M. pneumoniae* (1:500 in PBS verdünnt) untersucht. Am linken Bildrand sind die Molekulargewichte des Größenstandards, am rechten Bildrand ist das Molekulargewicht des Hsp70 angegeben.

4.2 Charakterisierung der mykoplasmalen Hitzeschockproteine

4.2.1 Biochemische Charakterisierung des Hsp60 und Hsp70

Zur Ermittlung des isoelektrischen Punktes (pI) des Hsp60 und Hsp70 wurden die Mykoplasmenproteine durch isoelektrische Fokussierung und anschließende SDS-PAGE aufgetrennt, mittels Westernblot auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit Antiseren gegen homologe Hsp inkubiert. Nach zweidimensionaler Gelelektrophorese und Westernblot mit einem Antiserum gegen Hsp60 von

Synechococcus sp. war bei *M. arthritidis* und *M. bovis* bei 61 kDa ein Spot mit einem pI von 5,8 bzw. 5,7 nachweisbar. Bei *M. pneumoniae* und *M. hyopneumoniae* waren drei Spots von 61, 57, und 55 kDa mit einem pI von 5,3 bzw. 5,4 zu erkennen (Abb. 8).

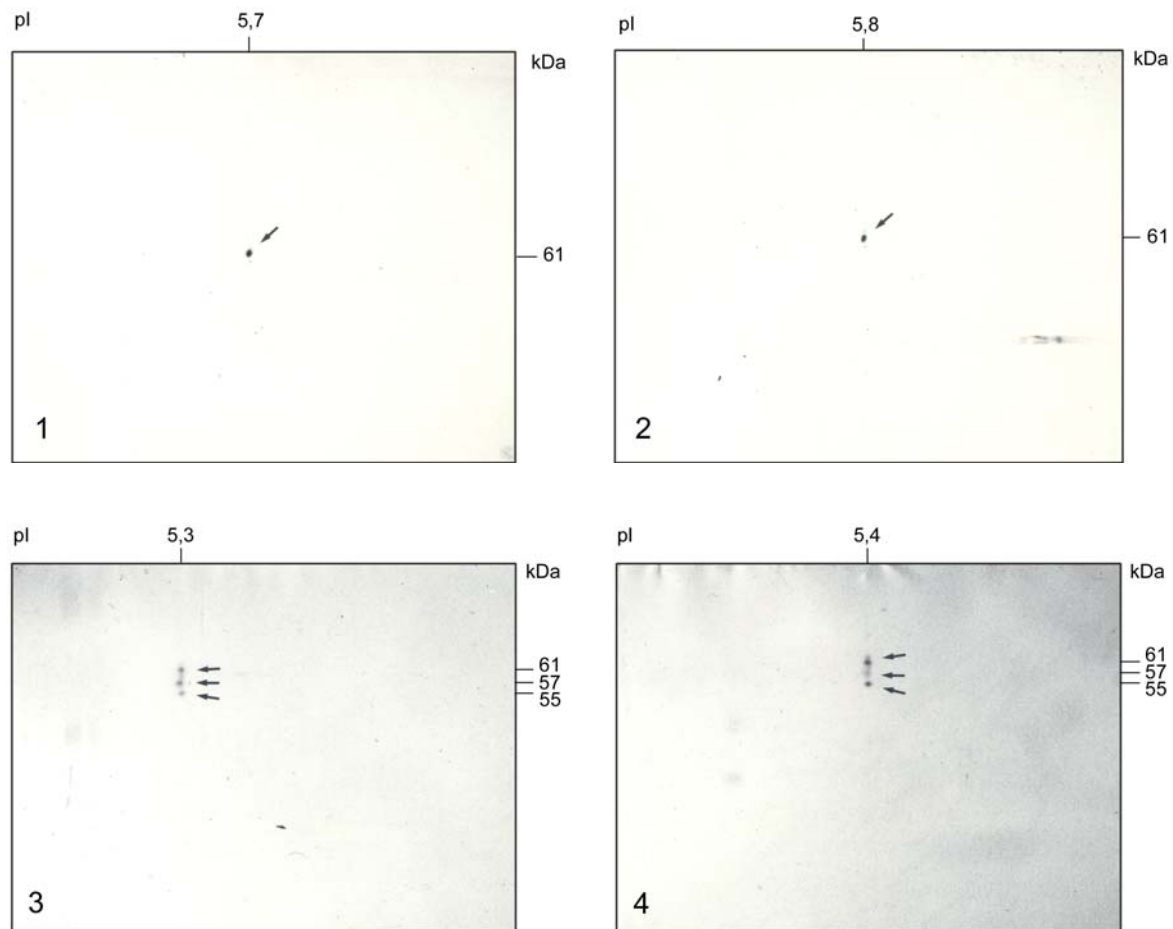


Abb. 8: Hp60-Profil von *M. bovis* (1), *M. arthritidis* (2), *M. pneumoniae* (3) und *M. hyopneumoniae* (4) nach zweidimensionaler Gelelektrophorese, Westernblot und Reaktion mit einem Antiserum gegen Hsp60

Im Anschluß an eine Kultivierung bei 32 °C (*M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. pneumoniae*) bzw. 35 °C (*M. hyopneumoniae*) wurden die Mykoplasmen einem Hitzeschock bei 43 °C (*M. pneumoniae*, *M. hyopneumoniae*) oder 45 °C (*M. arthritidis*, *M. bovis*) unterzogen. Nach Auftrennung der Proteine durch IEF und SDS-PAGE wurde die Reaktion im Westernblot mit einem Antiserum gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (1:500 in PBS verdünnt) untersucht. Die isoelektrischen Punkte des Hsp60 sind am oberen Bildrand, das Molekulargewicht ist am rechten Bildrand angegeben.

Nach zweidimensionaler Gelelektrophorese und Westernblot mit einem Antiserum gegen Hsp70 von *M. pneumoniae* waren bei *M. pneumoniae* drei Spots bei 68 kDa

mit einem pI von 5,3, 5,4 und 5,5, bei *M. hyopneumoniae* jedoch nur ein Spot mit einem pI von 5,3 zu erkennen (Abb. 9).

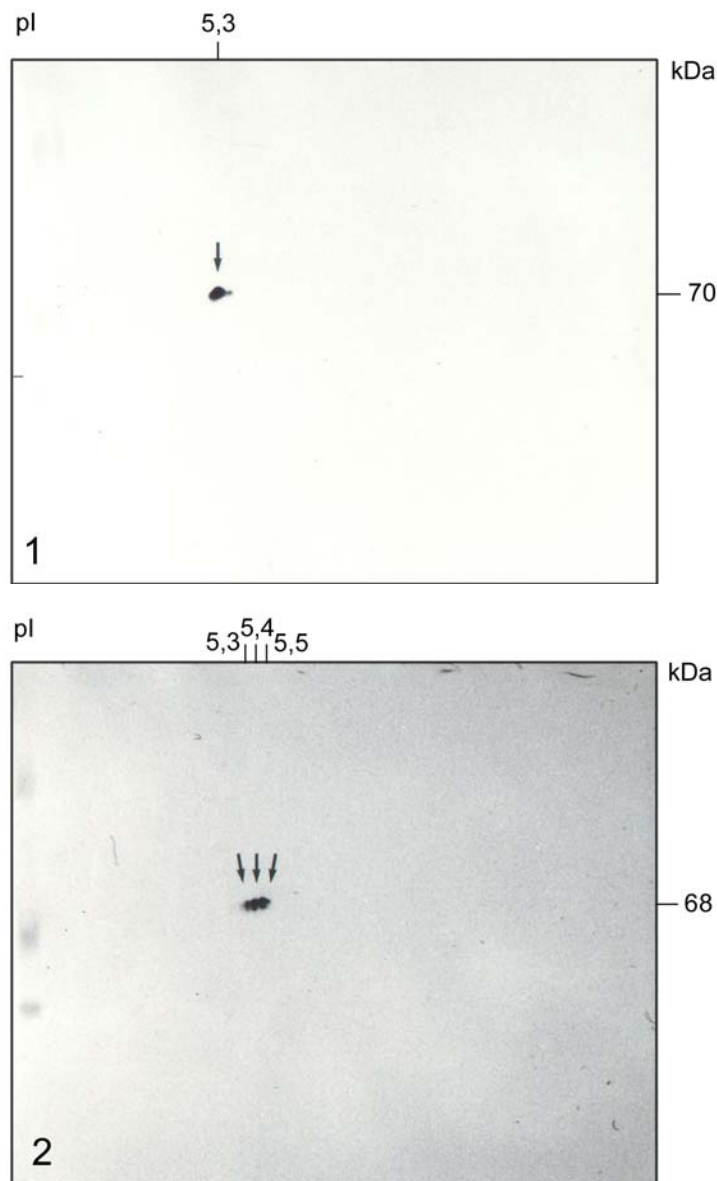


Abb. 9: Hsp70-Profil von *M. hyopneumoniae* (1) und *M. pneumoniae* (2) nach zweidimensionaler Gelelektrophorese und Reaktion mit einem Antiserum gegen Hsp70 von *M. pneumoniae*

Die Mykoplasmen wurden im Anschluß an eine Kultivierung bei 32 °C (*M. pneumoniae*) bzw. 35 °C (*M. hyopneumoniae*) einem Hitzeschock bei 43 °C unterzogen. Nach Auftrennung der Proteine durch IEF und SDS-PAGE wurde die Reaktion im Westernblot mit einem Antiserum gegen Hsp70 von *M. pneumoniae* (1:500 in PBS verdünnt) untersucht. Die isoelektrischen Punkte des Hsp70 sind am oberen Bildrand, das Molekulargewicht ist am rechten Bildrand angegeben.

4.2.2 Sequenzierung von Amplifikationsprodukten des *hsp60*-Gens

Durch PCR wurden Abschnitte des *hsp60*-Gens von *M. agalactiae*, *M. arthritidis*, *M. bovis* und *M. hyopneumoniae* amplifiziert. Ein Teil der Amplikons wurde sequenziert und mit Sequenzen bekannter Hsp verglichen. Insgesamt wurden 25 mögliche Primerkombinationen untersucht, die mit genomischer DNA der jeweiligen Mykoplasmenspezies als Ziel-DNA in der PCR eingesetzt wurden. Zur Kontrolle wurde DNA von *M. pneumoniae* verwendet. Die 25 Amplikons hatten eine Größe zwischen 200 und 1400 bp. Acht Amplikons wurden ausgewählt und in beide Richtungen sequenziert (Abb. 10).

Durch Vergleich der Sequenzen mit publizierten Sequenzen der *hsp60*-Gene von *B. subtilis*, *C. perfringens*, *E. coli*, *M. genitalium*, *M. pneumoniae* und *M. capricolum* wurden diese Amplikons als Fragmente des *hsp60*-Gens identifiziert. Schließlich wurden die Sequenzen der überlappenden Amplikons zu annähernd der gesamten Sequenz der *hsp60*-Gene zusammengefügt (Anhang 9.1.1). Die Größe der zusammengesetzten Amplifikate betrug bei *M. agalactiae* 1462 bp, *M. arthritidis* 1446 bp, *M. bovis* 1070 bp und *M. hyopneumoniae* 1108 bp. Die Sequenzen wurden auf der Datenbank des EMBL (European Molecular Biology Laboratory), Heidelberg, unter den Zugangsnummern AJ251762 (*M. bovis*), AJ251763 (*M. arthritidis*), AJ251764 (*M. agalactiae*) und AJ 251765 (*M. hyopneumoniae*) hinterlegt.

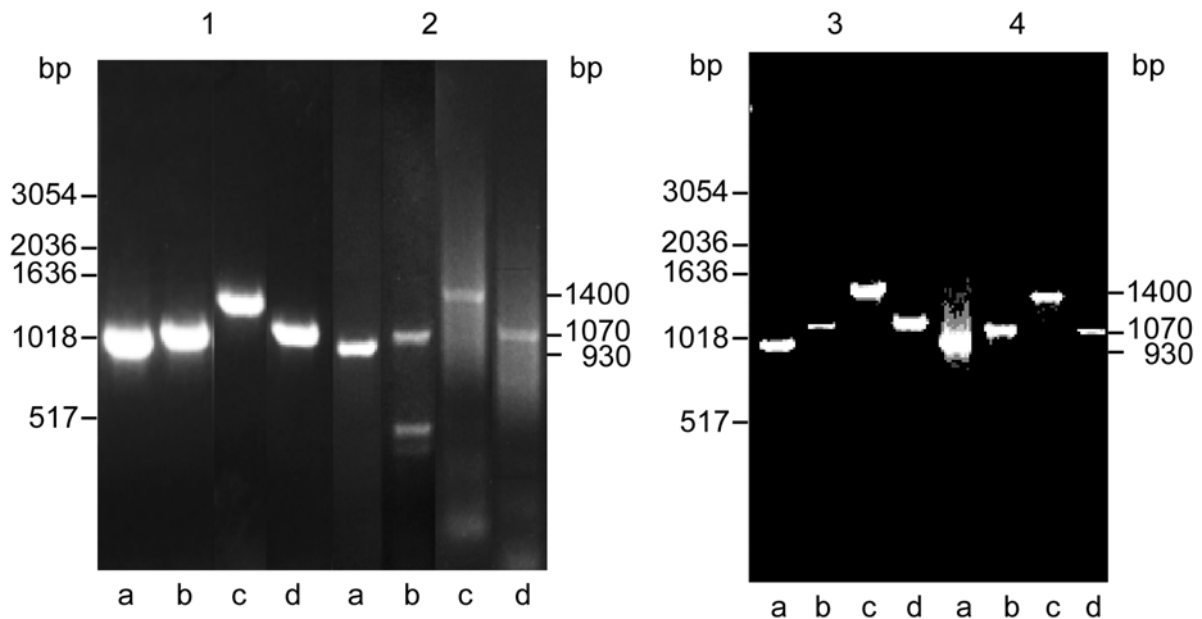


Abb. 10: Darstellung der zur Sequenzierung ausgewählten Amplifikationsprodukte aus dem *hsp60*-Gen von *M. agalactiae* (1), *M. hyopneumoniae* (2), *M. arthritidis* (3) und *M. bovis* (4) in der Agarosegelelektrophorese

Es wurden Produkte mit einer Größe von 930 bp mit dem Primerpaar P1/P6 (a), 1070 bp mit dem Primerpaar P1/P7 (b) und dem Primerpaar P4/P10 (d) sowie 1400 bp mit dem Primerpaar P2/P10 (c) gewonnen. Am linken Bildrand sind Größenstandards, am rechten Bildrand ist die Größe der Amplifikationsprodukte angegeben.

Über die Analyse homologer Genbereiche wurde der Grad der Konservierung ermittelt (Tab. 14). Die *hsp60*-Gene von *M. agalactiae*, *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* wiesen eine Basensequenzhomologie von 98,0 bis 99,9 % auf. Demgegenüber betrug die Sequenzhomologie zum *hsp60*-Gen von *M. genitalium* lediglich 76,5 bis 77,7 %. Die Homologien zu den *hsp60*-Genen von *B. subtilis*, *C. perfringens* und *E. coli* betrugen, abhängig vom phylogenetischen Verwandtschaftsgrad der Mykoplasmen zu den zellwandtragenden Bakterien, 49,2 bis 59,7 % (Tab. 14 und Anhang 9.1.1). Mit den eukaryontischen *hsp60*-Sequenzen wurden Homologien zwischen 50 und 65 % ermittelt.

Die aus den *hsp60*-Sequenzen kalkulierten Aminosäuresequenzen wiesen innerhalb der Mykoplasmenspezies eine Homologie von 90,4 bis 99,9 % und mit den anderen Bakterienspezies, abhängig vom Grad der phylogenetischen Verwandtschaft, 53,2 bis 60,8 % auf (Tab. 14), wobei die am höchsten konservierten Aminosäuresequenzen im N-terminalen und mittleren Bereich der Proteinsequenzen lagen.

Tab. 14: Basen- und Aminosäuresequenzhomologie der *hsp60*-Gene zwischen verschiedenen Spezies der Mykoplasmen und zellwandtragenden Bakterien

Basen- / Aminosäure- sequenz- homologie [%]	<i>M. arthritis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. agalactiae</i>	<i>M. hyopneu- moniae</i>	<i>M. pneumoniae</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	52.4 / 55.4	53.3 / 53.2	52.7 / 56.1	52.3 / 54.1	49.2 / 56.1	50.6 / 54.4	56.8 / 68.7	64.6 / 71.7	-
<i>B. subtilis</i>	55.9 / 59.8	55.8 / 60.0	56.2 / 60.8	56.1 / 60.6	55.8 / 60.0	57.1 / 60.0	65.1 / 78.7	-	-
<i>C. perfringens</i>	56.1 / 58.8	55.3 / 58.3	56.2 / 59.9	56.0 / 59.5	56.8 / 59.3	59.7 / 59.9	-	-	-
<i>M. genitalium</i>	76.8 / 90.5	77.4 / 91.3	77.0 / 91.0	77.7 / 92.7	76.5 / 90.4	-	-	-	-
<i>M. pneumoniae</i>	99.2 / 99.4	98.8 / 96.3	99.9 / 99.9	99.1 / 98.4	-	-	-	-	-
<i>M. hyopneu- moniae</i>	98.9 / 98.4	98.0 / 95.2	99.1 / 98.9	-	-	-	-	-	-
<i>M. agalactiae</i>	99.9 / 99.9	98.8 / 96.3	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. bovis</i>	98.7 / 96.3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. arthritis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Es konnten 17 bis 22 potentiell antigene Bereiche des Hsp60 von *M. agalactiae*, *M. arthritis*, *M. bovis* und *M. hyopneumoniae* ermittelt werden, die fast ausschließlich in stark konservierten Proteinregionen lokalisiert waren (Anhang 9.1.3). Eine Ausnahme bildete ein Abschnitt im Bereich der Aminosäuren 122-133 des Hsp60 von *M. pneumoniae*, der zwischen verschiedenen Mykoplasmenpezies weniger als 50 % Aminosäuresequenzhomologie aufwies.

4.2.3 Sequenzierung von Amplifikationsprodukten des *hsp70*-Gens

Für die Amplifikation der *hsp70*-Genfragmente der Mykoplasmen wurden degenerierte Primer verwendet. Die von GALLEY *et al.* (1992) auf Basis des *hsp70*-Gens von *C. perfringens* entwickelten Primer amplifizierten ein ca. 600 bp langes, zentral im *hsp70*-Gen von *C. perfringens* gelegenes Fragment.

Die Reaktionsparameter der PCR wurden für die Vervielfältigung eines entsprechenden Genabschnittes bei den Mykoplasmen optimiert. Nach der

Sequenzierung wurden für die Amplifikate folgende Größen ermittelt: *M. agalactiae* 601 bp, *M. bovis* 595 bp, *M. arthritidis* 550 bp und *M. hyopneumoniae* 570 bp (Abb. 11). Die Sequenzen wurden auf der Datenbank des EMBL unter den Zugangsnummern AJ251841 (*M. agalactiae*), AJ251842 (*M. hyopneumoniae*), AJ251861 (*M. arthritidis*) und AJ 276681 (*M. bovis*) hinterlegt.

Diese *hsp70*-Amplifikate wiesen untereinander und mit *hsp70*-Genen bereits sequenzierter Mykoplasmenspezies Basensequenzhomologien von 60,5 bis 69,4 % auf. Zwischen *M. arthritidis* und *M. bovis* wurde eine Sequenzhomologie von 99,8 % ermittelt. Mit zellwandtragenden Bakterien wurden Homologien von 53,2 bis 60,5 % nachgewiesen (Tab. 15, Anhang 9.1.2).

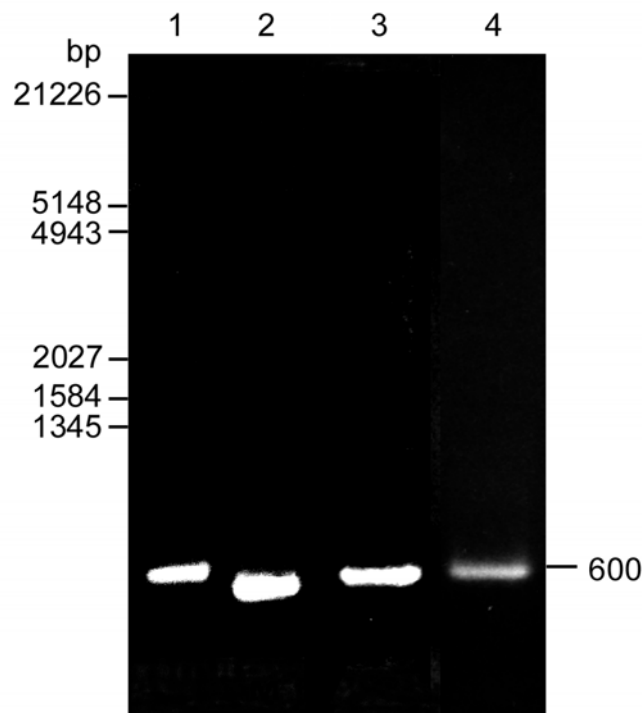


Abb. 11: Darstellung der zur Sequenzierung ausgewählten Amplifikationsprodukte aus dem *hsp70*-Gen von *M. agalactiae* (1), *M. arthritidis* (2), *M. hyopneumoniae* (3) und *M. bovis* (4) in der Agarosegelelektrophorese. Am linken Bildrand sind Größenstandards, am rechten Bildrand ist die ungefähre Größe der Amplifikationsprodukte angegeben.

Tab. 15: Basen- und Aminosäuresequenzhomologie des *hsp70*-Genfragments zwischen verschiedenen Spezies der Mykoplasmen und zellwandtragenden Bakterien

Basen- / Aminosäure- Sequenz- homologie [%]	<i>M. arthritis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. agalactiae</i>	<i>M. hyopneu- moniae</i>	<i>M. pneumoniae</i>	<i>M. genitalium</i>	<i>M. capricolum</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
<i>E. coli</i>	54,7 / 59,1	55,6 / 62,2	53,2 / 60,8	53,3 / 58,7	54,8 / 63,5	54,9 / 63,7	50,6 / 62,4	58,8 / 68,1	61,5 / 68,1	-
<i>B. subtilis</i>	55,3 / 59,1	56,6 / 62,8	56,4 / 67,3	58,6 / 65,1	56,5 / 68,0	57,1 / 68,5	59,0 / 67,6	63,8 / 75,0	-	-
<i>C. perfringens</i>	59,2 / 59,6	60,3 / 62,2	60,5 / 61,3	59,6 / 60,3	54,1 / 64,7	56,6 / 64,8	63,1 / 75,0	-	-	-
<i>M. capricolum</i>	64,4 / 63,2	65,7 / 65,3	68,1 / 70,4	64,7 / 69,3	46,8 / 67,2	51,3 / 67,9	-	-	-	-
<i>M. genitalium</i>	64,0 / 67,9	65,0 / 68,9	63,0 / 70,4	63,7 / 70,9	57,7 / 95,0	-	-	-	-	-
<i>M. pneumoniae</i>	60,9 / 66,8	62,0 / 68,9	60,5 / 69,8	60,9 / 69,3	-	-	-	-	-	-
<i>M. hyopneu- moniae</i>	69,4 / 78,6	69,7 / 79,3	67,4 / 73,0	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. agalactiae</i>	66,6 / 71,7	66,7 / 74,2	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. bovis</i>	99,8 / 98,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. arthritis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Die Homologie der kalkulierten Aminosäuresequenzen des Hsp70-Peptids betrug innerhalb der Mykoplasmen 63,2 bis 98,9 %, zwischen Mykoplasmen und zellwandtragenden Bakterien 58,7 bis 68,5 % (Tab. 15). Es konnten 10 bis 12 potentiell antigene Bereiche innerhalb des Hsp70-Peptids von *M. agalactiae*, *M. arthritis*, *M. bovis* und *M. hyopneumoniae* ermittelt werden, die fast ausschließlich in stark konservierten Bereichen des Hsp70 lokalisiert waren (Anhang 9.1.4).

4.2.4 Taxonomische Einordnung

Aus den Nukleinsäuresequenzen der *hsp60*- und *hsp70*-Genfragmente von *M. agalactiae*, *M. arthritidis*, *M. bovis* und *M. hyopneumoniae* wurden mittels der Software TRANSLATE die Proteinsequenzen der entsprechenden Abschnitte erstellt. Nach der Methode der „neighbour-joining“-Distanz wurde aus den Aminosäure- und den Nukleinsäuresequenzen mit der Software CLUSTAL und CLUSTREE die phylogenetische Stellung dieser Mykoplasmenspezies zueinander und zu *M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *B. subtilis*, *C. perfringens*, *E. coli* und *M. capricolum* (nur Hsp70) bestimmt.

Aufgrund der in Kapitel 4.2.2 dargestellten großen Homologie der Basensequenzen der *hsp60*-Gene innerhalb der Mykoplasmenspezies konnte kein Stammbaum erstellt werden, der, mit Ausnahme von *M. genitalium*, eine Unterscheidung der hier untersuchten Mykoplasmenspezies ermöglichte. Basierend auf den abgeleiteten Aminosäuresequenzen war ebenfalls nur eine geringfügig verbesserte Differenzierung von *M. bovis* und *M. hyopneumoniae* zueinander und zu den anderen Mykoplasmenspezies möglich (nicht dargestellt). Im Gegensatz dazu konnten auf der Grundlage des *hsp70*-Genfragmentes und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenz Stammbäume generiert werden, mit denen die einzelnen Mykoplasmenspezies eindeutig differenziert werden konnten (Abb. 12 und Abb. 13).

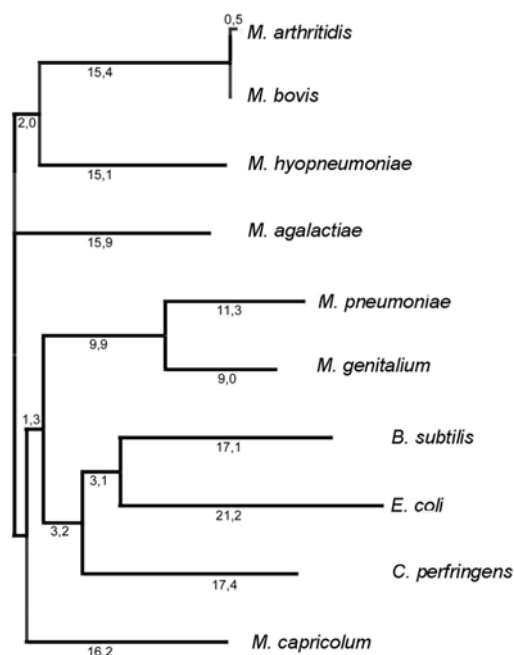


Abb. 12: Taxonomische Position verschiedener Mykoplasmen- und Bakterienspezies auf Basis der „neighbour-joining“-Distanz der Nukleinsäuresequenz eines 600 bp großen Genfragments des *hsp70*

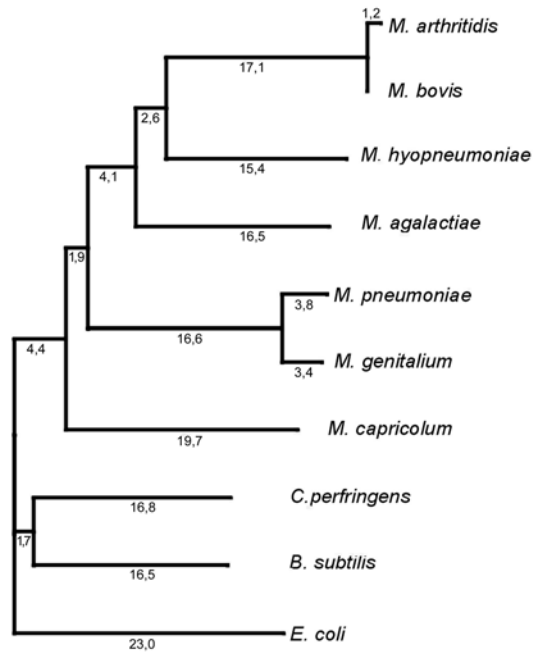


Abb. 13: Taxonomische Position verschiedener Mykoplasmen- und Bakterienspezies auf Basis der „neighbour-joining“-Distanz der 200 Aminosäuren großen Sequenz des Hsp70

4.2.5 Reaktion Hsp60-spezifischer Seren

Die Seren von drei Kaninchen (1-65 und 2-64, immunisiert mit Hsp60-haltigen Nitrozellulosestreifen; 9-74, immunisiert mit MAP1) reagierten im Westernblot mit Hsp60 von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. pneumoniae* und *M. hyopneumoniae*. Es wurden aber auch Kreuzreaktionen mit den Hsp60 anderer Bakterien nachgewiesen (nicht dargestellt). Die monospezifischen Antiseren wurden für die Versuche zur Aufreinigung nativer Hsp60-Proteine verwendet.

4.2.6 Isolierung der Hsp60 von *M. arthritidis* und *M. bovis*

Zur Gewinnung und Aufreinigung von nativem Hsp60 der Mykoplasmen wurden die Ionenaustauscherchromatographie und die Immunaффinitätschromatographie eingesetzt. Die aufgereinigten, nativen Hsp60-Proteine wurden auf enzymatische Aktivität untersucht. Das Hsp60 von *M. arthritidis* wurde zudem als Antigen in einem ELISA zur Überprüfung der Antikörperantwort gegen natives Hsp60 nach Immunisierung von Ratten mit den rekombinanten Hsp und Infektion mit *M. arthritidis* verwendet.

4.2.6.1 Chromatographie

In Vorversuchen wurde zunächst ein schwacher und ein starker Anionenaustauscher eingesetzt. Mit dem starken Anionenaustauscher Q-Sepharose (Econo-Chromatographie-Säule, 1 cm Durchmesser, 7 cm Packhöhe) wurde eine ungefähr zehn- bis fünfzehnfache Aufreinigung des Hsp60 erzielt. Ein noch höherer Aufreinigungsgrad der Hsp60 wurde mit einem Kationenaustauscher erreicht. Eine weitere Aufreinigung der vereinigten Hsp60-haltigen Fraktionen aus der Ionenaustauscherchromatographie erfolgte durch Immunaффinitätschromatographie. Der Aufreinigungsgrad wurde anhand der im Westernblot und nach SDS-PAGE durch Silberfärbung erzielten Ergebnisse geschätzt.

4.2.6.2 Kationenaustauscherchromatographie

Durch die Aufreinigung mittels Kationenaustauscherchromatographie wurden die Hsp60 im Vergleich zum Ganzzellysat ungefähr um das zwanzigfache (Hsp60 von *M. arthritidis*) bzw. um das fünfundzwanzigfache (Hsp60 von *M. bovis*) konzentriert (Abb. 14 und Abb. 15).

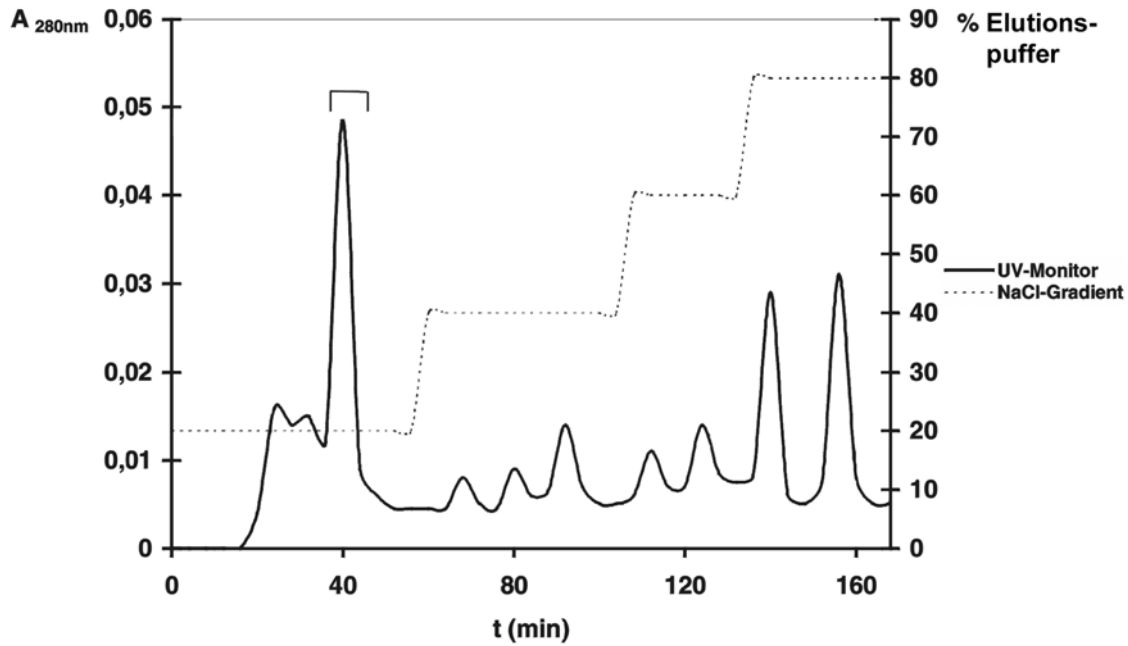


Abb. 14: Elutionsprofil des Ganzzelllysates von *M. arthritidis* nach Kationenaustauscherchromatographie

Die Elution der Proteine erfolgte nach Bindung des Ganzzelllysates an eine Macro Prep® High S-Matrix (1 cm Durchmesser, 7 cm Packhöhe) und Waschen der Säule mit Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,8) durch stufenweise Erhöhung der NaCl-Konzentration von 0 bis 0,8 M (0-80 % Elutionspuffer bestehend aus 50 mM Phosphat und 1 M NaCl, pH 6,8) bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Als relative Konzentrationsangabe ist auf der linken y-Achse die Absorption bei 280 nm angegeben. Hsp60-enhaltende Fraktionen (8-12 bei 0,2 M NaCl) sind mit einer Klammer markiert.

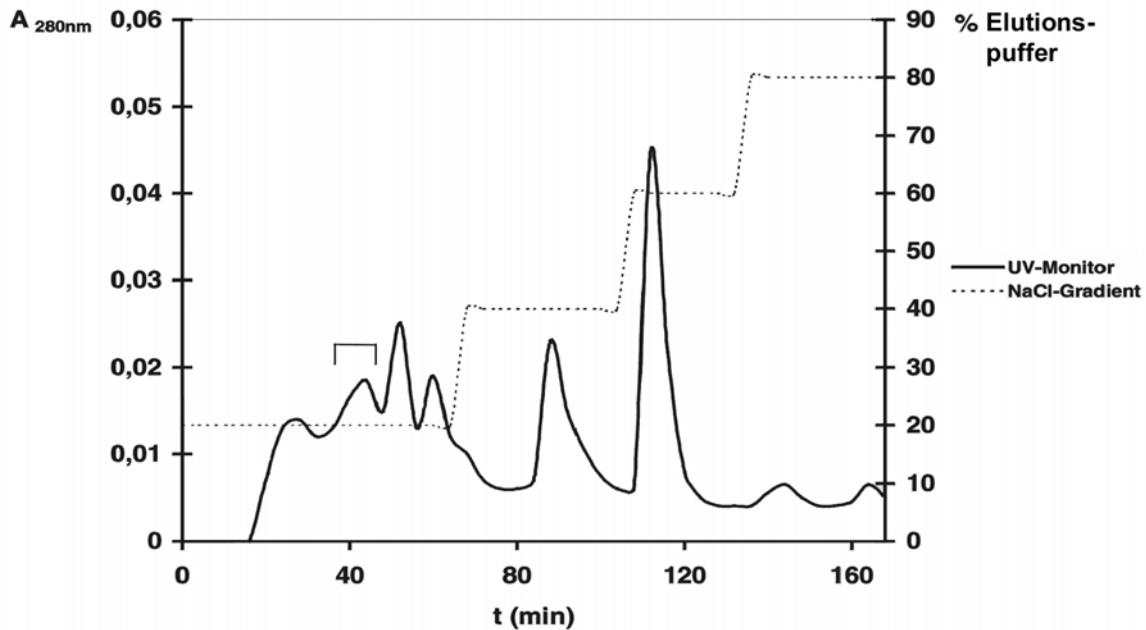


Abb. 15: Elutionsprofil des Ganzzelllysates von *M. bovis* nach Kationenaustauscherchromatographie

Die Elution der Proteine erfolgte nach Bindung des Ganzzelllysates an eine Macro Prep® High S-Matrix (1 cm Durchmesser, 7 cm Packhöhe) und Waschen der Säule mit Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,8) durch stufenweise Erhöhung der NaCl-Konzentration von 0 bis 0,8 M (0-80 % Elutionspuffer bestehend aus 50 mM Phosphat und 1 M NaCl, pH 6,8) bei einer Elutionsgeschwindigkeit von 0,5 ml/min. Als relative Konzentrationsangabe ist auf der linken y-Achse die Absorption bei 280 nm angegeben. Hsp60-enhaltende Fraktionen (8-12 bei 0,2 M NaCl) sind mit einer Klammer markiert.

4.2.6.3 Immunaффinitätschromatographie

Monospezifische Seren von zwei Kaninchen (1-65 und 2-64), die mit mykoplasmalem Hsp60 immunisiert worden waren, und Serum von einem Kaninchen (9-74), das mit einem „multiple antigenic peptide“ (MAP1) immunisiert worden war, wurden auf ihre Verwendung in der Immunaффinitätschromatographie überprüft. Dazu wurden die Immunglobuline zunächst durch Bindung an Sepharose-gekoppeltes Protein A aufgereinigt. Nach Oxidation der Kohlenhydratreste der F_c-Region banden die Antikörper über eine Hydrazonbindung kovalent an das als Trägermaterial verwendete Affi-Gel®Hz Hydrazide Gel. Das mit den immobilisierten Immunglobulinen als Liganden bestückte Trägermaterial wurde in eine Econo-Chromatographie-Säule gefüllt. In zahlreichen Probeläufen wurde das weiter aufzureinigende Eluat aus der Ionenaustauscherchromatographie unter Einsatz verschiedener Kopplungspuffer auf die Säule gegeben und das nicht gebundene

Material ausgewaschen. Zusätzlich wurde eine Auswahl von Elutionspuffern getestet, um die gebundenen Hsp60-Proteine durch unspezifische Elution, wie beispielsweise durch Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke, von dem Liganden zu verdrängen.

Die beste Aufreinigung wurde mit dem Serum eines mit Hsp60 immunisierten Kaninchens (2-64) erreicht (Abb. 16). Ausgehend von dem aufgearbeiteten Ganzzellysat mit einem Proteingehalt von 5 mg/ml konnten nach zwei Aufreinigungsschritten je Mykoplasmaspezies vier Fraktionen gewonnen werden, in denen das Hsp60 mehr als 95 % des Gesamtproteins darstellte (Abb. 17 und Abb. 18).

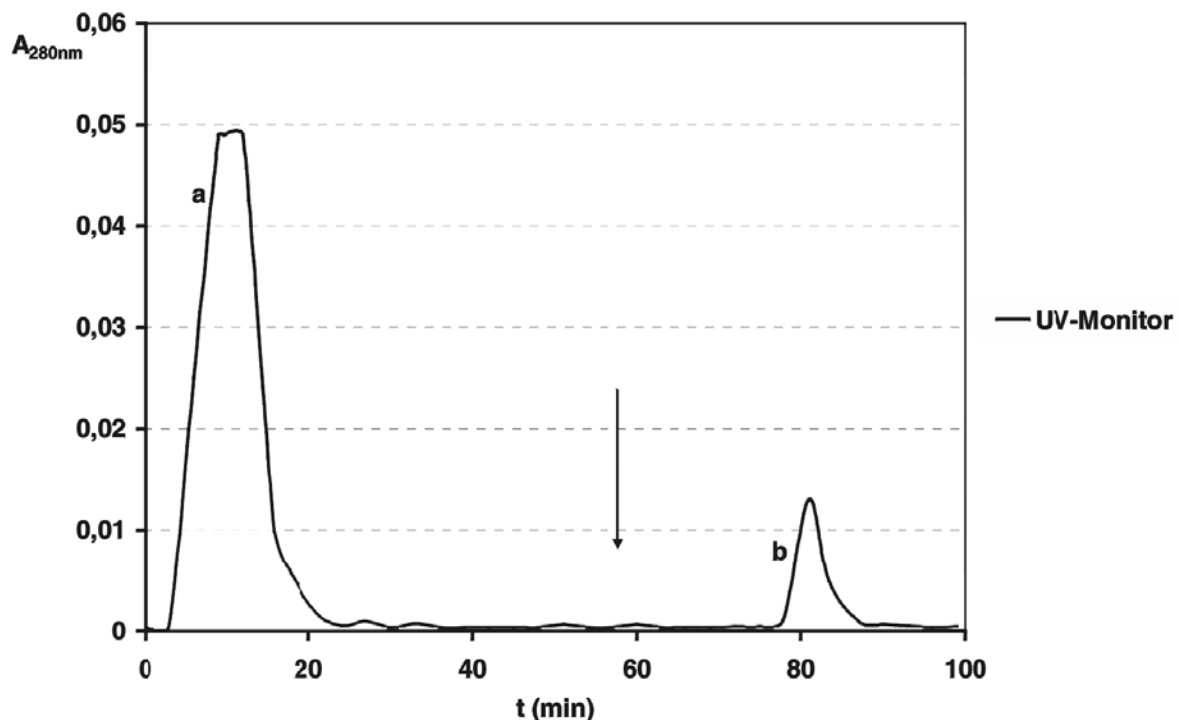


Abb. 16: Elutionsprofil Hsp60-haltiger Fraktionen von *M. arthritidis* nach Immunaффinitätschromatographie

Aus der Kationenaustauschchromatographie gewonnene Fraktionen mit angereichertem Hsp60 von *M. arthritidis* wurden auf eine Agarosegelmatrix mit kovalent gebundenem Kaninchenantikörper gegen Hsp60 von *M. arthritidis* aufgetragen (1 cm Durchmesser, Packhöhe 5 cm). Nach Entfernung nicht gebundener Bestandteile (Peak a) durch Waschen mit 50 mM NaCl in PBS, pH 7,0, erfolgte die Elution des Hsp60 (Peak b) mit 0,1 M Glycin, pH 3,0. Der Elutionsstart ist mit einem Pfeil markiert.

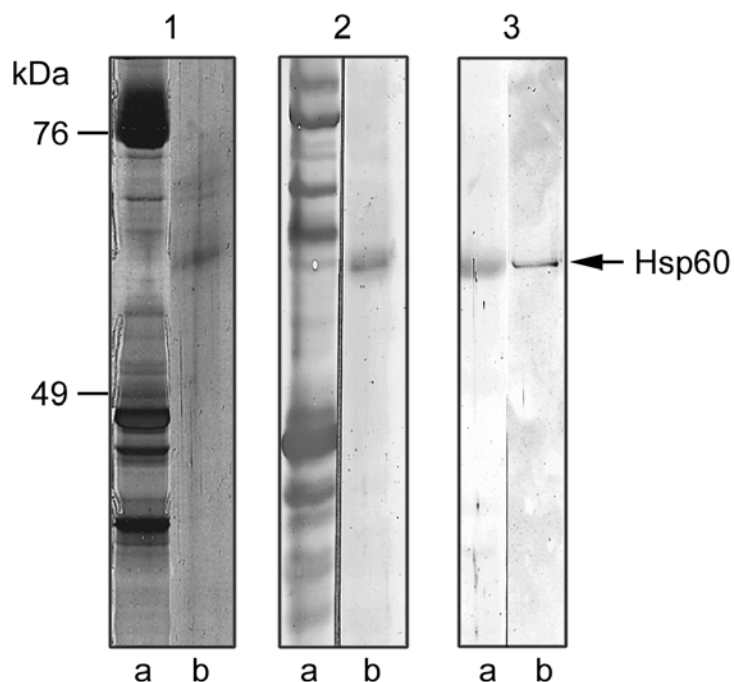


Abb. 17: Aufreinigung des Hsp60 von *M. arthritidis* durch Immunaффinitätschromatographie

Mittels SDS-PAGE wurden ein Ganzzel lysat von *M. arthritidis* (a) und eine Fraktion nach Immunaффinitätschromatographie (b) aufgetrennt.

- 1: Proteinprofil nach Silberfärbung
- 2: Antigenprofil nach Westernblot und Reaktion mit einem Hyperimmunserum gegen *M. arthritidis*
- 3: Antigenprofil nach Westernblot und Reaktion mit einem Antiserum gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp.

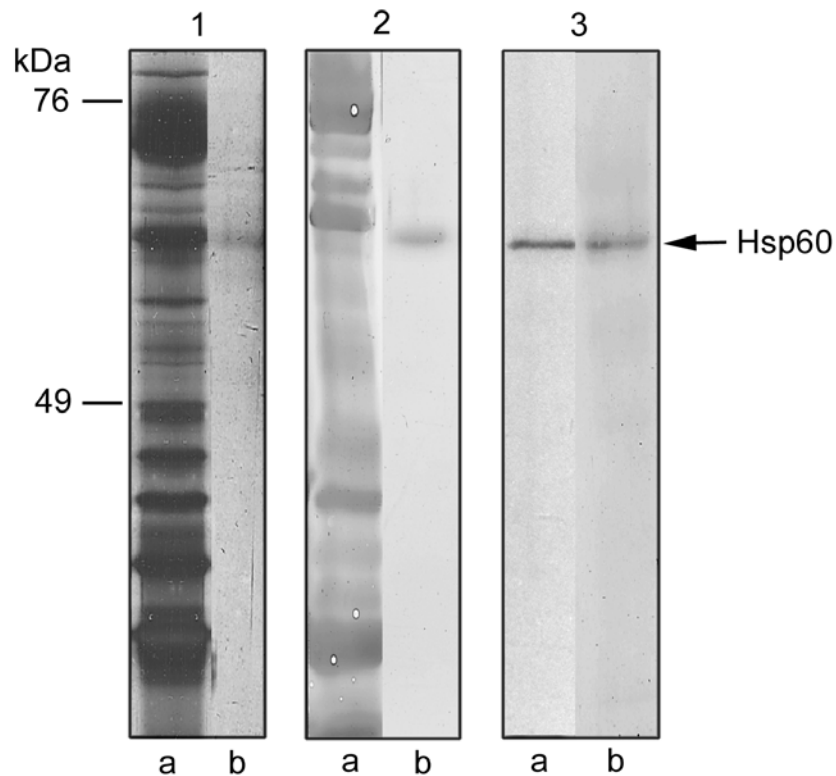


Abb. 18: Aufreinigung des Hsp60 von *M. bovis* durch Immunaффinitätschromatographie

Mittels SDS-PAGE wurden ein Ganzzelllysate von *M. bovis* (a) und eine Fraktion nach Immunaффinitätschromatographie (b) aufgetrennt.

- 1: Proteinprofil nach Silberfärbung
- 2: Antigenprofil nach Westernblot und Reaktion mit einem Hyperimmunserum gegen *M. bovis*
- 3: Antigenprofil nach Westernblot und Reaktion mit einem Antiserum gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp.

4.2.7 Nachweis der ATPase-Aktivität bei nativem Hsp60 von *M. arthritidis* und *M. bovis*

Untersuchungen auf ATPase-Aktivität wurden an dem durch Immunaффinitätschromatographie aufgereinigtem Hsp60 von *M. arthritidis* und *M. bovis* (Proteingehalt jeweils 5 µl/ml) durchgeführt. Als Kontrolle wurde Puffer anstelle des Hsp60 verwendet. Die Meßwerte sind in Tab. 17 dargestellt.

Tab. 16: ATPase-Aktivität des Hsp60 von *M. arthritidis* und *M. bovis*

Probe	ges. Aktivität	Aktivität $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$		
		Messung 1	Messung 2	$\bar{x}$
Hsp60 <i>M. arthritidis</i>	401523,5	2813,8	2913,3	2863,5
Hsp60 <i>M. arthritidis</i>	407508,1	2799,6	2839,9	2819,8
Hsp60 <i>M. bovis</i>	403823,5	2698,1	2791,5	2744,8
Hsp60 <i>M. bovis</i>	473159,0	3198,5	3206,7	3202,6
Negativkontrolle	399753,7	2439,4	2347,1	2393,3
Negativkontrolle	405626,0	2422,5	2410,7	2416,6

Die ATPase-Aktivität wurde anhand der Mittelwerte der Meßdaten der Aktivität $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_i$ nach folgender Formel ermittelt, in die Verdünnungsfaktoren und Inkubationszeiten einbezogen wurden (nach Empfehlung von PD Dr. B. Huchzermeyer, Institut für Botanik, Universität Hannover):

$$\text{Akt}_{\text{Probe}} = \left(\frac{\bar{x} \cdot 5 \cdot 60}{\text{Akt}_{\text{ges}} \cdot 40 \cdot 2 \cdot 2} \right)_{\text{Werte der Probe}} - \left(\frac{\bar{x} \cdot 5 \cdot 60}{\text{Akt}_{\text{ges}} \cdot 40 \cdot 2 \cdot 2} \right)_{\text{Werte der Kontrolle}}$$

Akt._{Probe}: ATPase-Aktivität der Probe

$\bar{x}$: Mittelwert der Aktivitäten des hydrolysierten Phosphats
(aus Messung 1 und 2)

Akt._{ges}: Gesamtaktivität der Probe

Die ATPase-Aktivität der Probe wurde anschließend durch den Proteingehalt der Probe geteilt. Für das Hsp60 von *M. arthritidis* wurde eine Aktivität von 0,4 µmol ATP_{hydrolysiert} x h⁻¹ x mg Protein⁻¹, für das Hsp60 von *M. bovis* wurde eine Aktivität von 0,3 µmol ATP_{hydrolysiert} x h⁻¹ x mg Protein⁻¹ ermittelt.

4.3 Analyse der Immunreaktion gegen Hitzeschockproteine und der Bedeutung von Hitzeschockproteinen bei der Mykoplasmeninfektion

4.3.1 Klonierung und Expression von zwei Bereichen des *hsp60*-Gens von *M. arthritidis*

Nach Einfügen der Restriktionsschnittstellen wurden zwei *hsp60*-Fragmente von *M. arthritidis*, *ma60-1* (Primer 2 und 6) und *ma60-2* (Primer 4 und 10), in den Vektor pGEX-5X-3 ligiert und mit diesem *E. coli* JM105-Zellen transformiert. Durch Induktion mit ITPG wurden zwei rekombinante Proteine mit einem Molekulargewicht von 57 kDa (MA60-1) und 64 kDa (MA60-2) exprimiert und durch anschließende Aggregatpräparation aufgereinigt. Nach Auftrennung in der SDS-PAGE wurden im Westernblot mit Antikörpern gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. die mykoplasmalen Anteile der rekombinanten GST-fusionierten Proteine, die der aminoterminalen und der carboxyterminalen Hälfte des Hsp60 von *M. arthritidis* entsprachen, als Bestandteile des Hsp60-Proteins identifiziert (Abb. 19). Der Anteil der Hsp60-Fragmente an dem Molekulargewicht der rekombinanten Proteine betrug 28 bzw. 35 kDa, der des GST-Proteins 29 kDa (Abb. 19).

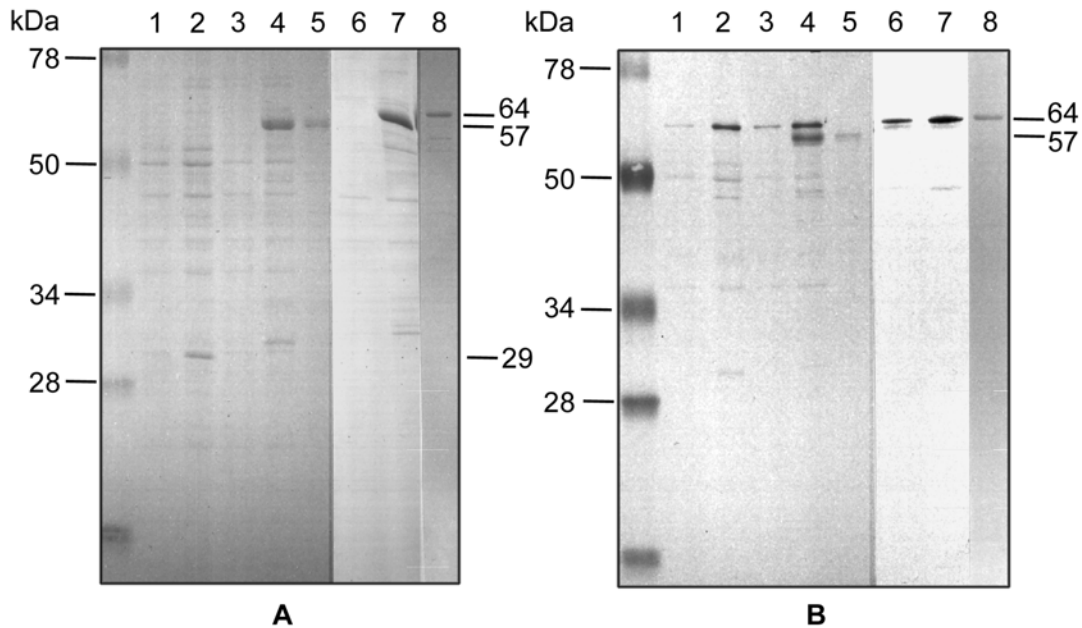


Abb. 19: Analyse rekombinanter Hsp60-Fusionsproteine von *M. arthritidis*

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (A) und Westernblot (B) nach Reaktion mit einem Antiserum gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (1:500 in PBS verdünnt) nachgewiesen. Am linken Bildrand sind die Molekulargewichte des Größenstandards, am rechten Bildrand die Molekulargewichte der rekombinanten Hsp60-Fusionsproteine (57 und 64 kDa) und der Glutathion-S-Transferase (29 kDa) angegeben.

- Spur 1: *E. coli* JM105, transformiert mit pGEX-5X-3
- Spur 2: Expression der Glutathion-S-Transferase in *E. coli* JM105 nach Transformation mit pGEX-5X-3 und IPTG-Induktion
- Spur 3: *E. coli* JM105, transformiert mit pMA60-1
- Spur 4: Expression des rekombinanten Hsp60-Fusionsproteins MA60-1 in *E. coli* JM105 nach Transformation mit pMA60-1 und IPTG-Induktion
- Spur 5: Aggregatpräparation des rekombinanten Fusionsproteins MA60-1
- Spur 6: *E. coli* JM105, transformiert mit pMA60-2
- Spur 7: Expression des rekombinanten Hsp60-Fusionsproteins MA60-2 in *E. coli* JM105 nach Transformation mit pMA60-2 und IPTG-Induktion
- Spur 8: Aggregatpräparation des rekombinanten Fusionsproteins MA60-2

Im Westernblot konnte in fast allen Spuren aufgrund der sehr starken Kreuzreaktion des Antikörpers gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. mit Hsp60 von *E. coli* bei 64 kDa eine Reaktion nachgewiesen werden. Diese Reaktion war auch nach der Aggregatpräparation noch erkennbar. Im Fall einer IPTG-Induktion ist die *E. coli*-Zelle „Stress“ ausgesetzt, der in einer erhöhten Syntheserate des Hsp60 von *E. coli* resultiert.

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

Die *hsp70*-Genfragmente von *M. arthritidis* (*ma70*) und *M. bovis* (*mb70*) wurden in den Plasmidvektor pGEX-5X-3 ligiert und in *E. coli* JM105 transformiert. Nach Induktion durch IPTG exprimierten die Klone mit den Plasmiden pMA70 und pMB70 eine Fusionsproteinbande mit einem Molekulargewicht von 32 kDa. Die rekombinanten Fusionsproteine MA70 und MB70 konnten mit einem monoklonalen Antikörper gegen murines Hsp70 im Westernblot nachgewiesen werden. Mit dem Klonierungsvektor pGEX-5X-3 ohne Insert transformierte Zellen, die als Kontrolle verwendet wurden, zeigten dagegen bei 29 kDa keine Reaktion mit dem monoklonalen Antikörper. Das Molekulargewicht des mykoplasmaalen Anteils am Fusionsprotein betrug jedoch lediglich 3 kDa statt der erwarteten 13 kDa des gesamten Inserts. Offensichtlich wurde die von Mykoplasmen als Tryptophancodon genutzte Sequenz UGA an Basenposition 176-178 bei *M. arthritidis* bzw. 207-209 bei *M. bovis* von *E. coli* als Stopcodon erkannt und die Proteinsynthese abgebrochen. Durch eine Mutagenese-PCR wurde das UGA-Codon in der Sequenz des *hsp70*-Gen-Fragmentes von *M. arthritidis* in ein UGG-Codon umgeschrieben. Nach Ligation dieses PCR-Produktes in den Plasmidvektor pGEX-5X-3 (pMA70-mut und pMB70-mut) und Transformation von *E. coli* HB101 wurde ein rekombinantes Fusionsprotein von 42 kDa exprimiert (Abb. 20 und Abb. 21). Der Anteil des Hsp70 von *M. arthritidis* am Fusionsprotein betrug nun 13 kDa.

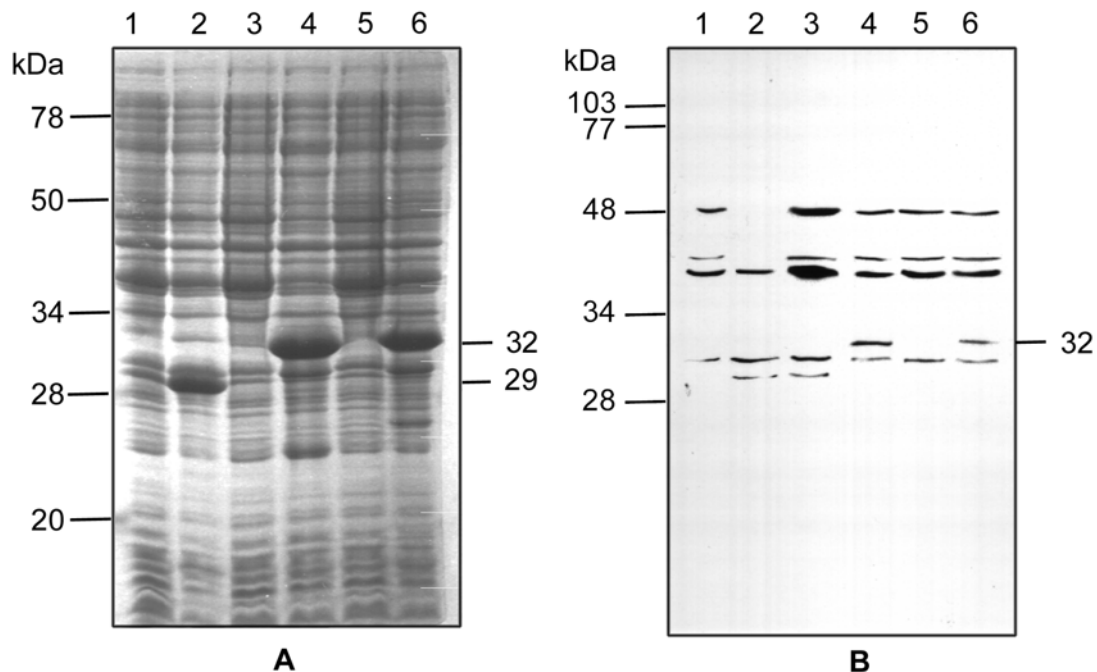


Abb. 20: Analyse rekombinanter Hsp70-Fusionsproteine von *M. arthritidis* und *M. bovis*

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (A) und Westernblot (B) nach Reaktion mit einem Antikörper gegen murines Hsp70 (1:10.000 in PBS verdünnt) nachgewiesen. Am linken Bildrand sind die Molekulargewichte der Größenstandards, am rechten Bildrand das Molekulargewicht des rekombinanten Hsp70-Fusionsproteins (32 kDa) und der Glutathion-S-Transferase (29 kDa) angegeben.

- Spur 1: *E. coli* JM105, transformiert mit pGEX-5X-3
- Spur 2: Expression der Glutathion-S-Transferase in *E. coli* JM105 nach Transformation mit pGEX-5X-3 und IPTG-Induktion
- Spur 3: *E. coli* JM105, transformiert mit pMA70
- Spur 4: Expression des rekombinanten Hsp70-Fusionsproteins MA70 in *E. coli* JM105 nach Transformation mit pMA70 und IPTG-Induktion
- Spur 5: *E. coli* JM105, transformiert mit pMB70
- Spur 6: Expression des rekombinanten Hsp70-Fusionsproteins MB70 in *E. coli* JM105 nach Transformation mit pMB70 und IPTG-Induktion

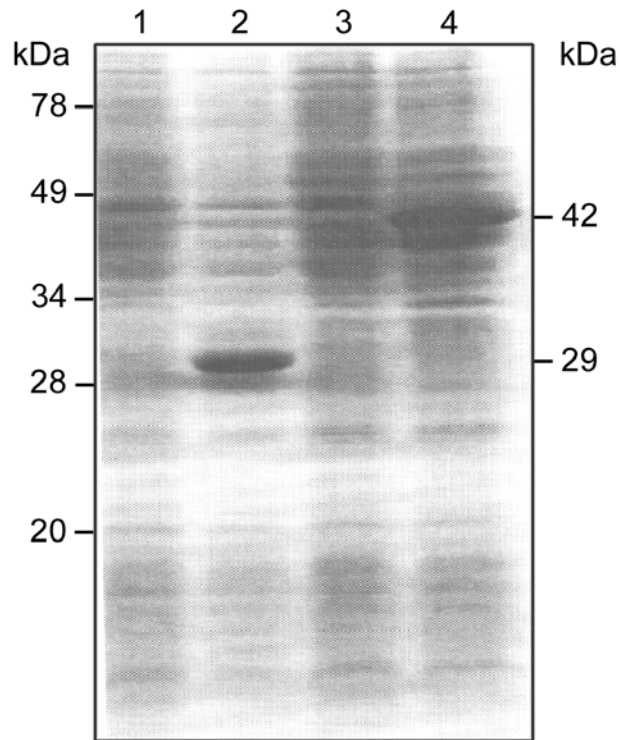


Abb. 21: Darstellung des 42 kDa Fusionsproteins nach Mutagenese des *hsp70*-Genfragmentes von *M. arthritidis*

Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung nachgewiesen. Am linken Bildrand sind die Molekulargewichte der Größenstandards, am rechten Bildrand ist das Molekulargewicht des rekombinanten Hsp70-Fusionsproteins angegeben.

- Spur 1: *E. coli* HB101, transformiert mit pGEX-5X-3 ohne Insert, keine IPTG-Induktion
- Spur 2: *E. coli* HB101, transformiert mit pGEX-5X-3 ohne Insert nach IPTG-Induktion; Expression der Glutathion-S-Transferase (29 kDa)
- Spur 3: *E. coli* HB101, transformiert mit pMA70-mut, keine IPTG-Induktion
- Spur 4: *E. coli* HB101, transformiert mit pMA70-mut nach IPTG-Induktion; Expression des rekombinantes Fusionsproteins (42 kDa)

4.3.3 Reaktion von porcinen und bovinen Rekonvaleszentenseren mit rekombinanten mykoplasmalen Hitzeschockproteinen

Für die Untersuchungen wurden zwei Gruppen von Seren von Rindern und Schweinen ausgewählt. Die eine Gruppe wies im ELISA keinen Antikörpertiter (Titer < 1:10), die andere Gruppe einen Antikörpertiter von mindestens 1:160 gegen *M. bovis*- bzw. *M. hyopneumoniae*-Ganzzellantigenen auf. Die rekombinanten Hsp60- und Hsp70-Fusionsproteine wurden nach SDS-PAGE im Westernblot mit den Seren inkubiert. Als positive Kontrolle diente das Antiserum gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. oder der monoklonale Antikörper gegen murines Hsp70.

Rinder- und Schweineseren mit einem ELISA-Titer $\geq 1:160$ erkannten, wie die Seren der Positivkontrolle, die rekombinanten Proteine MA60-1, MA60-2, MA70 und MB70. Es wurde bei MA60-1 eine Bande von 57 kDa nachgewiesen. Bei MA60-2 wurden Banden von 64 und 53 kDa, bei MA70 und MB70 Banden von 32 und 30 kDa nachgewiesen. Seren, die im ELISA keine Reaktion mit *M. bovis* bzw. *M. hyopneumoniae* zeigten, reagierten nicht oder nur schwach mit den rekombinanten Proteinen. Im ELISA hochtitrige Seren wiesen mit MA60-1 und MA60-2 auch Banden bei 42 und 44 kDa auf (Abb. 22 und Abb. 23). Der als positive Kontrolle gegen Hsp70 verwendete monoklonale Antikörper zeigte eine Kreuzreaktivität mit dem, durch die Aggregataufreinigung nicht entfernten, Hsp70-Anteil von *E. coli* bei 70 kDa (Abb. 24 und Abb. 25). Eine Reaktion mit Glutathion-S-Transferase ohne Insert wurde nicht nachgewiesen.

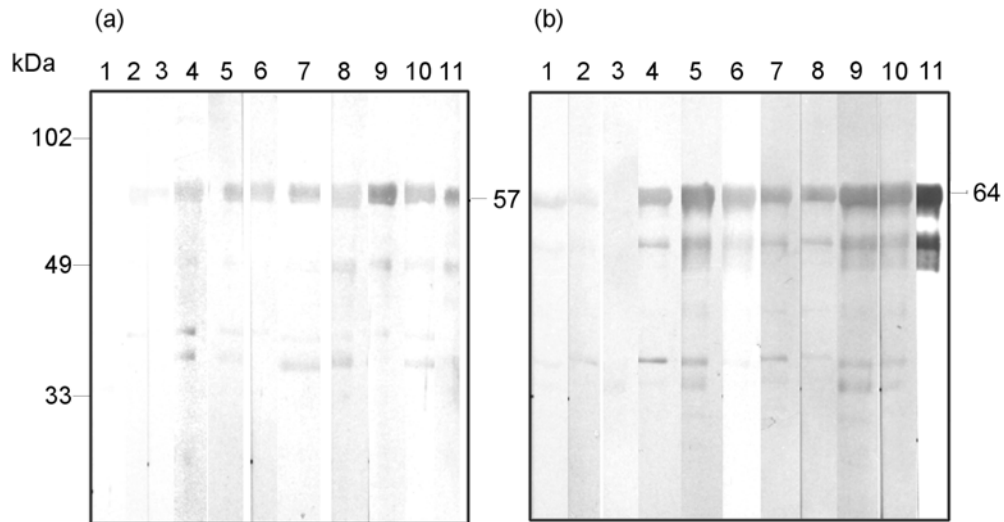


Abb. 22: Reaktion von bovinen Rekonvaleszentenseren mit dem rekombinanten MA60-1- (a) und dem rekombinanten MA60-2-GST-Fusionsprotein (b) im Westernblot.

Am linken Bildrand sind die Molekulargewichte des Größenstandards, am rechten Bildrand ist das Molekulargewicht der rekombinanten Hsp60-Fusionsproteine angegeben.

Spur 1-3: Rekonvaleszentenseren, die im ELISA keinen Antikörpertiter gegen *M. bovis* aufwiesen

Spur 4-10: Rekonvaleszentenseren, die im ELISA Antikörpertiter von mindestens 1:160 gegen *M. bovis* aufwiesen

Spur 11: Kaninchenantikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (1:1.000 in PBS verdünnt)

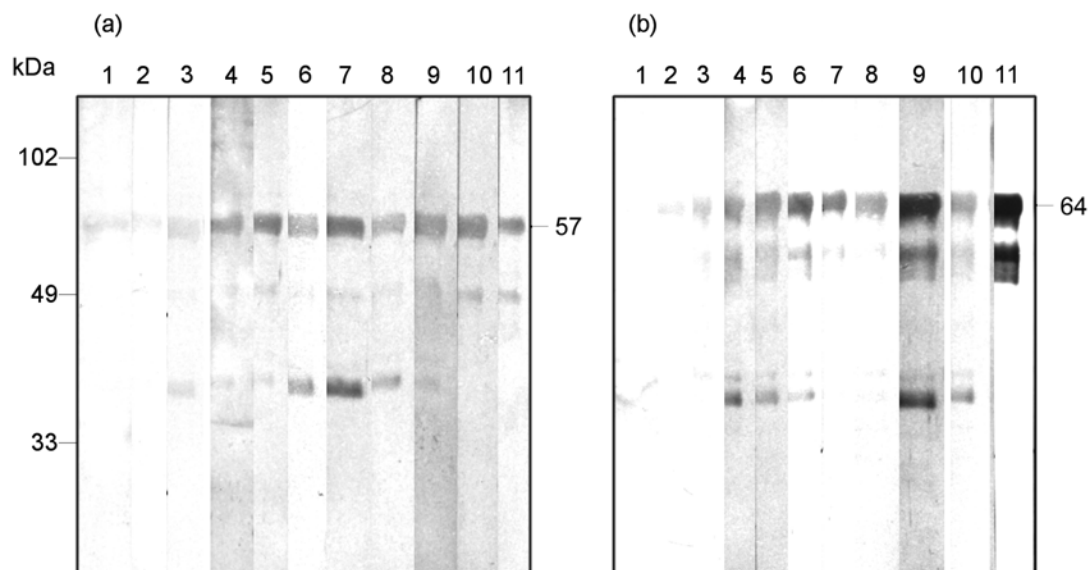


Abb. 23: Reaktion von porcinen Rekonvaleszentenseren mit dem rekombinanten MA60-1- (a) und dem rekombinanten MA60-2-GST-Fusionsprotein (b) im Westernblot.

Am linken Bildrand sind die Molekulargewichte des Größenstandards, am rechten Bildrand ist das Molekulargewicht der rekombinanten Hsp60-Fusionsproteine angegeben.

Spur 1-3: Rekonvaleszentenseren, die im ELISA keinen Antikörpertiter gegen *M. hyopneumoniae* aufwiesen

Spur 4-10: Rekonvaleszentenseren, die im ELISA Antikörpertiter von mindestens 1:160 gegen *M. hyopneumoniae* aufwiesen

Spur 11: Kaninchenantikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (1:1000 in PBS verdünnt)

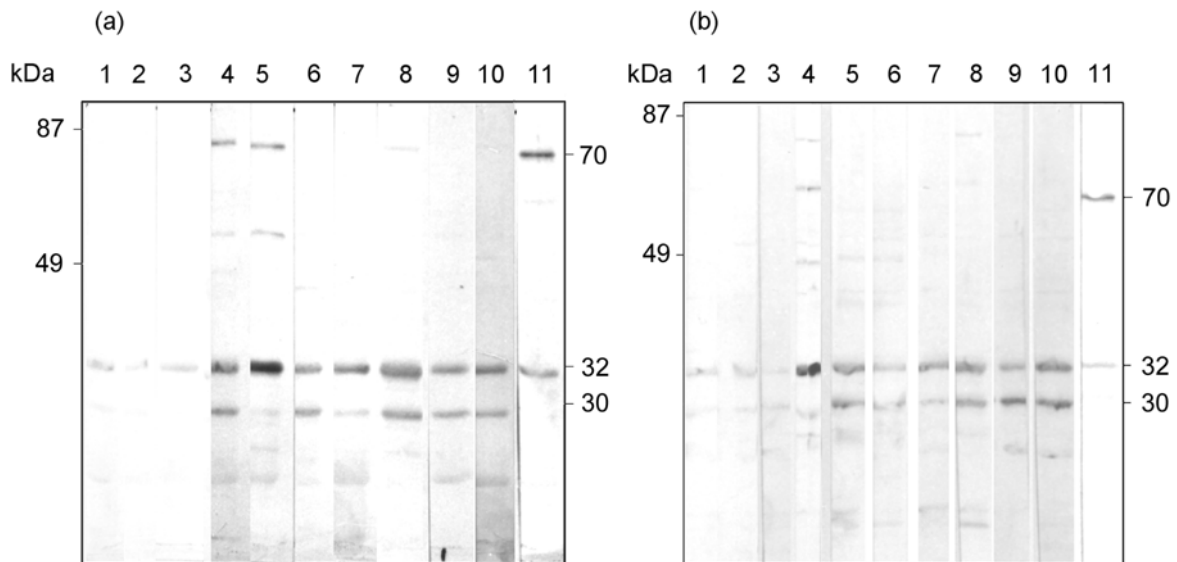


Abb. 24: Reaktion von bovinen Rekonvaleszentenseren mit dem rekombinanten MA70- (a) und dem rekombinanten MB70-GST-Fusionsprotein (b) im Westernblot.

Am linken Bildrand sind die Molekulargewichte des Größenstandards, am rechten Bildrand die Molekulargewichte der rekombinanten Fusionsproteine (30 und 32 kDa) sowie des Hsp70-Anteils von *E. coli* (70 kDa) angegeben.

Spur 1-3: Rekonvaleszentenseren, die im ELISA keinen Antikörpertiter gegen *M. bovis* aufwiesen

Spur 4-10: Rekonvaleszentenseren, die im ELISA einen Antikörpertiter von mindestens 1:160 gegen *M. bovis* aufwiesen

Spur 11: Antikörper gegen murines Hsp70 (SP 880; 1:10.000 in PBS verdünnt)

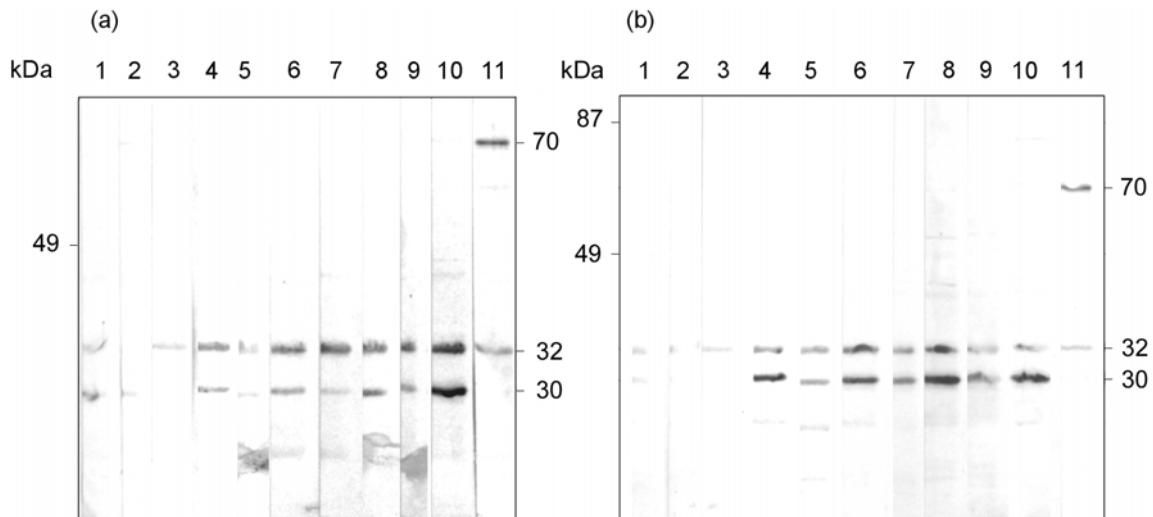


Abb. 25: Reaktion von porcinen Rekonvaleszentenseren mit dem rekombinanten MA70- (a) und dem rekombinanten MB70-GST-Fusionsprotein (b) im Westernblot.

Am linken Bildrand sind die Molekulargewichte des Größenstandards, am rechten Bildrand die Molekulargewichte der rekombinanten Fusionsproteine (30 und 32 kDa) sowie des Hsp70-Anteils von *E. coli* (70 kDa) angegeben.

Spur 1-3: Rekonvaleszentenseren, die im ELISA keinen Antikörpertiter gegen *M. hyopneumoniae* aufwiesen

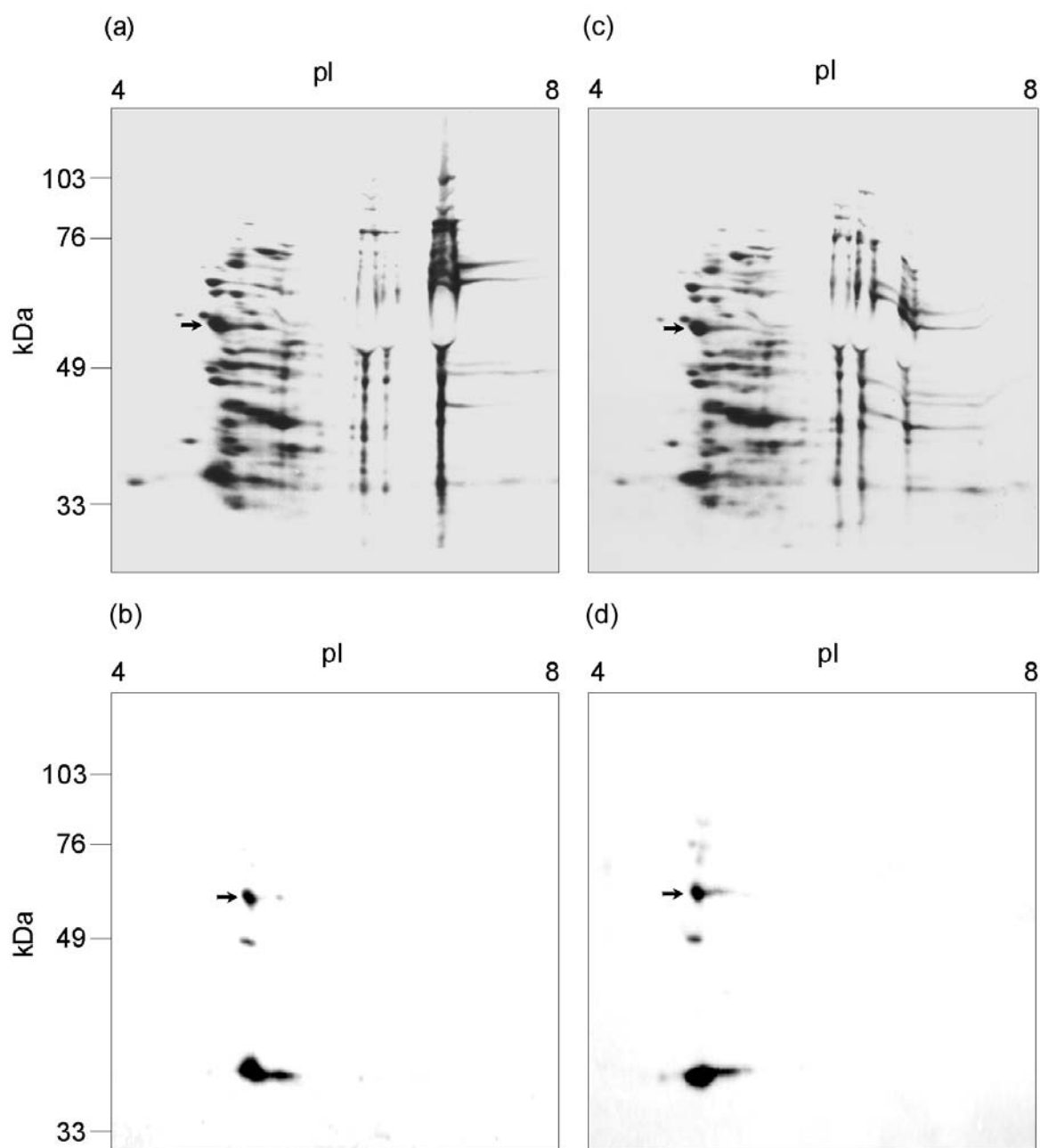
Spur 4-10: Rekonvaleszentenseren, die im ELISA einen Antikörpertiter von mindestens 1:160 gegen *M. hyopneumoniae* aufwiesen

Spur 11: Antikörper gegen murines Hsp70 (SP 880; 1:10.000 in PBS verdünnt)

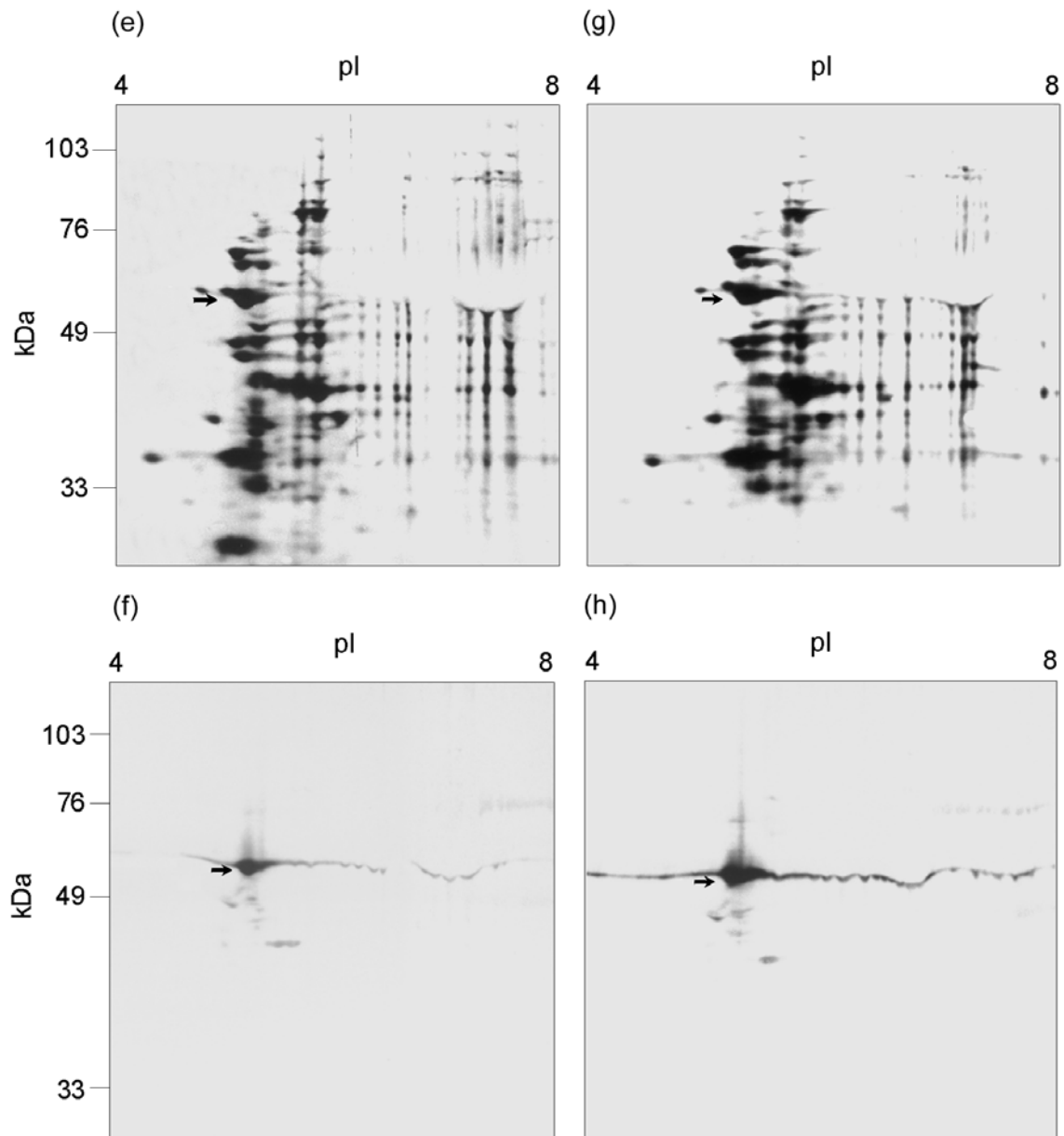
4.3.4 Induktion des Hsp60 von *M. hyopneumoniae* durch bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit

M. hyopneumoniae wurde in Flüssigmedium mit Zusatz von BALF inkubiert. Ein Teil der Kultur wurde mit BALF von Schweinen, die mit *M. hyopneumoniae* infiziert waren, ein anderer Teil mit BALF von nicht infizierten Schweinen versetzt. Anschließend wurden Veränderungen in der Zusammensetzung und Konzentration der Mykoplasmenproteine mittels metabolischer Markierung mit ^{35}S untersucht. Als Positiv- und Negativkontrollen wurden Mykoplasmenzellen verwendet, deren Medium mit physiologischer Kochsalzlösung anstelle von BALF versetzt wurde. Die Negativkontrolle diente ausschließlich als Wachstumskontrolle, die Positivkontrolle wurde dagegen einem Hitzeschock bei 43 °C unterzogen. Die Analyse erfolgte sowohl durch Auftrennung der Proteine in der ein- oder zweidimensionalen Gelelektrophorese und anschließender Autoradiographie, als auch im Westernblot mit dem Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp.

In Gegenwart von BALF infizierter Schweine wurde, ebenso wie nach Hitzeschock, eine Vielzahl der Proteine von *M. hyopneumoniae* vermindert exprimiert (Abb. 26 g, c). Demgegenüber war eine verstärkte Expression insbesondere eines 45 kDa- und eines 60 kDa-Proteins nachweisbar (Abb. 26 e, g). Das 60 kDa-Protein wurde im Westernblot als Hsp60 identifiziert (Abb. 26 h). Dieses Hsp wurde in geringeren Konzentrationen auch nach Kokultivierung von *M. hyopneumoniae* mit BALF aus nicht infizierten Schweinen nachgewiesen (Abb. 26 f).



Beschriftung siehe übernächste Seite



Beschriftung siehe nächste Seite

Abb. 26: Antigenprofil von *M. hyopneumoniae* nach Inkubation mit bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF)

M. hyopneumoniae-Kulturen wurden bei 35 °C mit NaCl (a, b, c, d), mit BALF nicht mit *M. hyopneumoniae* infizierter Schweine (e, f) oder mit BALF *M. hyopneumoniae*-infizierter Schweine (g, h) inkubiert. Ein Teil der Kulturen wurde einem Hitzeschock bei 43 °C (c, d) unterzogen. Nach metabolischer Markierung mit ³⁵S-Methionin/Cystein wurden die Mykoplasmen als Ganzzelllysate durch IEF und SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels Autoradiographie (a, c, e, g) oder nach anschließendem Westernblot (b, d, f, h) mit einem Antiserum gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (1:1.000 in PBS verdünnt) dargestellt. Der Bereich der isoelektrischen Fokussierung ist am oberen Bildrand, die Position der Molekulargewichtsmarker am linken Bildrand dargestellt. Der Pfeil markiert das Hsp60.

Nach dieser beispielhaft durchgeführten Charakterisierung des Proteinspektrums in der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurden die weiteren Ansätze in der eindimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit dem Kaninchen-Hsp60-Antikörper gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. untersucht. Die Ansätze mit BALF von *M. hyopneumoniae*-infizierten Tieren zeigten gegenüber den entsprechenden BALF-Ansätzen von Tieren ohne *M. hyopneumoniae*-Infektion eine deutlich erhöhte Syntheserate des Hsp60 (Abb. 27).

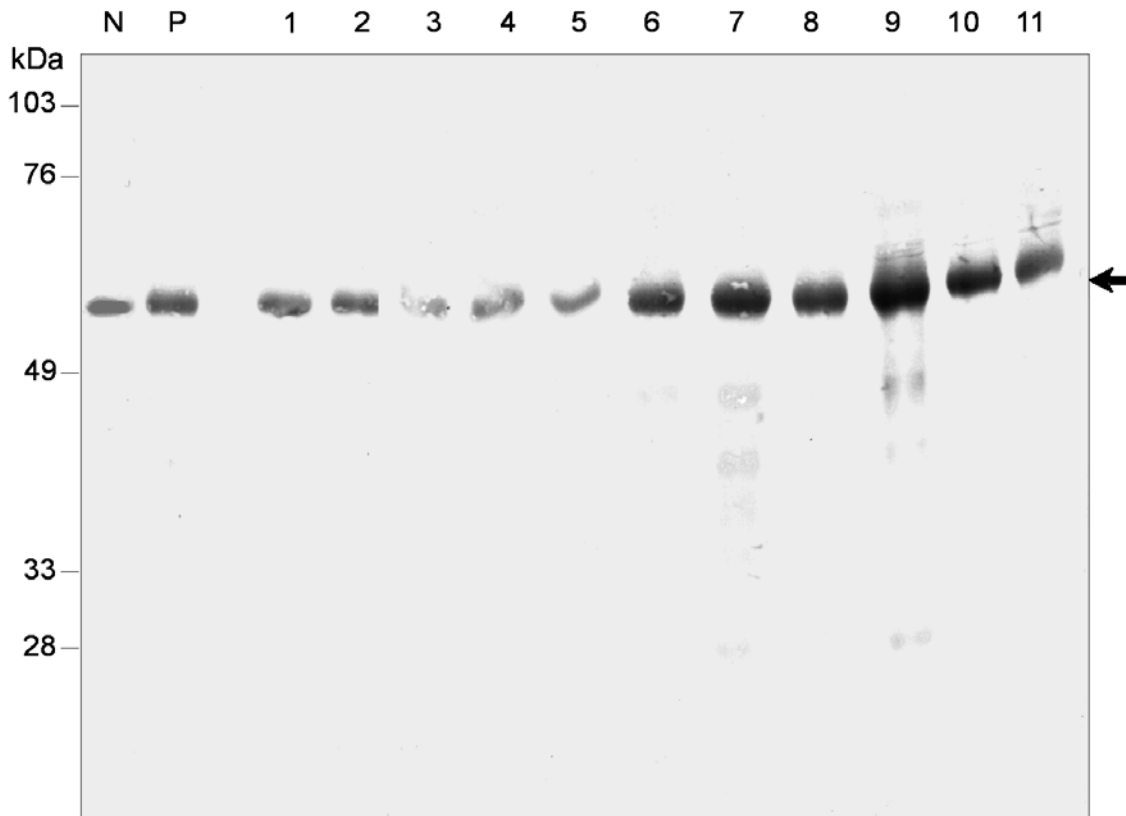


Abb. 27: Hsp60-Profil von *M. hyopneumoniae* nach Inkubation mit bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF)

M. hyopneumoniae-Kulturen wurden mit BALF von *M. hyopneumoniae*-infizierten bzw. nicht mit *M. hyopneumoniae*-infizierten Schweinen behandelt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit einem Antiserum gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (1:1.000 in PBS verdünnt) inkubiert.

Spur N: *M. hyopneumoniae*, inkubiert mit 0,85 % NaCl-Lösung bei 35 °C

Spur P: *M. hyopneumoniae*, inkubiert mit 0,85 % NaCl-Lösung nach Hitzeschock bei 42 °C

Spur 1-5: *M. hyopneumoniae*, inkubiert mit BALF nicht infizierter Schweine

Spur 6-11: *M. hyopneumoniae*, inkubiert mit BALF *M. hyopneumoniae*-infizierter Schweine

4.3.5 Zytokinsekretion muriner Makrophagen nach Stimulation mit rekombinanten mykoplasmalen Hitzeschockproteinen

Untersuchungen zur immunstimulatorischen Wirkung der rekombinanten Hitzeschockproteine MA60-1 und MA60-2 wurden an den Makrophagenzelllinien BAC1.2F5 und RAW264.7 durchgeführt. Der Zusatz von MA60-2 induzierte bei den Zelllinien BAC1.2F5 und RAW264.7 eine im Vergleich zur Negativkontrolle um mehr als das zwanzigfach gesteigerte Sekretion von IL-6 (Abb. 28) bzw. IL-1 β (Abb. 29). Im Vergleich zu dem als Positivkontrolle eingesetzten LPS wurde nach Stimulation mit MA60-2 ungefähr ein Drittel der IL-6- bzw. IL-1 β -Sekretion erreicht. Durch Zusatz von MA60-1 war keine Sekretion von IL-6 und IL-1 β festzustellen. Im Gegensatz zur Stimulation mit LPS konnte weder mit MA60-2 noch mit MA60-1 eine Sekretion von TNF- α und Stickoxiden induziert werden (nicht dargestellt).

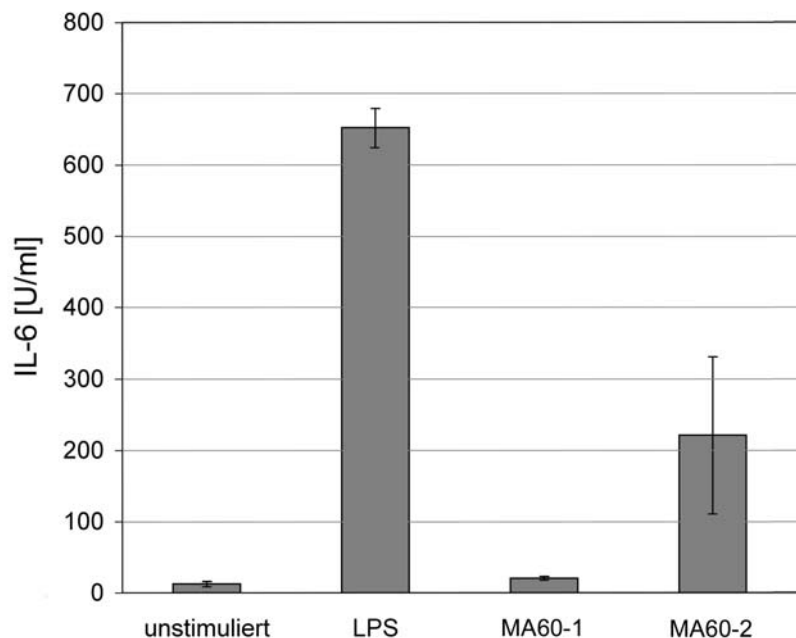


Abb. 28: Interleukin-6-Sekretion von BAC1.2F5-Zellen nach Aktivierung mit rekombinanten Hsp60-Peptiden (MA60-1 und MA60-2)

Die Zellen wurden mit jeweils 1 μ l/ml MA60-1, MA60-2 oder LPS (Positivkontrolle) stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Sekretion von IL-6 wurde mittels eines Antigen-ELISA's nachgewiesen. Dargestellt sind der Mittelwert, Maximalwert und Minimalwert.

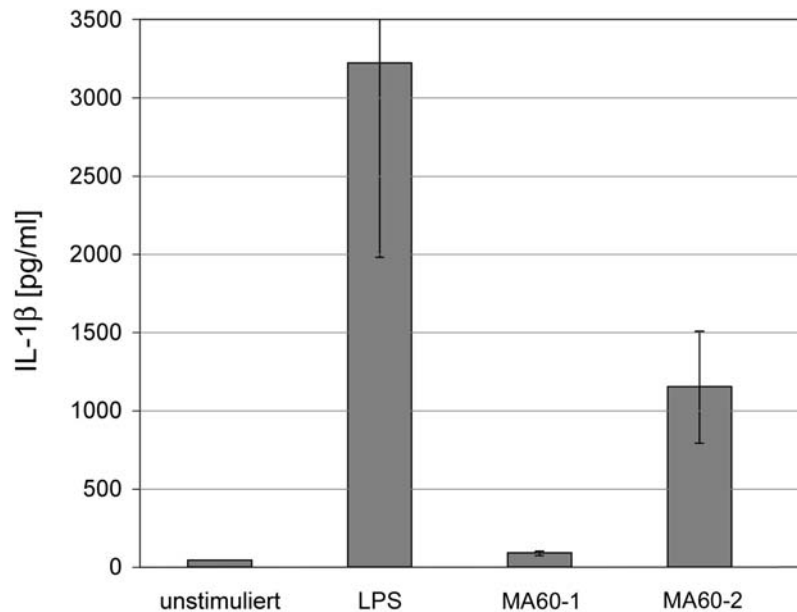


Abb. 29: Interleukin-1 β -Sekretion von RAW264.7-Zellen nach Aktivierung mit rekombinanten Hsp60-Peptiden (MA60-1 und MA60-2)

Die Zellen wurden mit jeweils 1 μ l/ml MA60-1, MA60-2 oder LPS (Positivkontrolle) stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Die Sekretion von IL-1 β wurde mittels eines Antigen-ELISA's nachgewiesen. Dargestellt sind der Mittelwert, Maximalwert und Minimalwert.

4.3.6 Nachweis von Kreuzreaktionen mit eukaryontischen Hitzeschockproteinen

Nach Auftrennung durch SDS-PAGE und anschließendem Westernblot wurde mit dem Antiserum gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. eine Bande mit einem Molekulargewicht von 60 kDa bei Rattenfibroblasten, Schweinenierenzellen und humanen broncho-trachealen Epithelzellen und von 59 kDa bei Rindernierenzellen nachgewiesen. Die Banden waren nach Hitzeschock im Vergleich zu den unbehandelten Zellen verstärkt (Abb. 30).

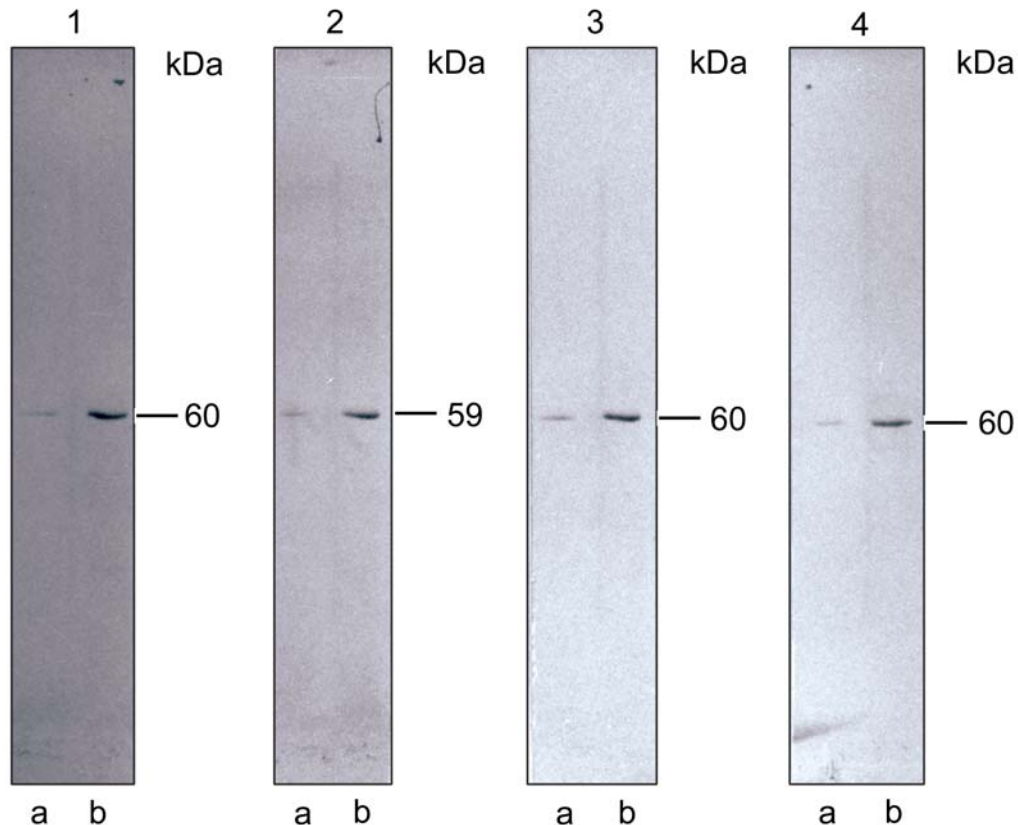


Abb. 30: Hsp60-Profil von epithelialen Rattenfibroblasten (1), Rindernierenzellen (2), Schweinenierenzellen (3) und humanen broncho-trachealen Epithelzellen (4)

Die Zellen wurden bei 37 °C kultiviert (a) oder einem Hitzeschock (b) bei 43 °C (Rattenzellen) bzw. 45 °C (Rinderzellen, Schweinezellen, humane Zellen) unterzogen. Nach Auftrennung der Ganzzelllysate in der SDS-PAGE wurde die Reaktion im Westernblot mit einem Antiserum gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. (1:500 in PBS verdünnt) dargestellt.

4.3.7 Beeinflussung des Krankheitsverlaufs der *M. arthritis*-Infektion der Ratte durch rekombinante mykoplasmale Hitzeschockproteine und Nachweis des immunogenen Potentials

Für die Untersuchungen wurden vier Tiergruppen gebildet. Die Tiere einer Gruppe (Gruppe 1, 10 Ratten) erhielten zunächst lediglich Adjuvans und dienten später als Infektionskontrolle. Tiere einer zweiten Gruppe (Gruppe 2, 15 Ratten) wurden mit den rekombinanten Hsp60-Fusionsproteinen MA60-1 und MA60-2 immunisiert. Die Tiere der dritten Gruppe (Gruppe 3, 15 Ratten) erhielten die gleiche Menge rekombinanten Hsp70-Fusionsproteins. Nach 14 Tagen wurden die Ratten dieser drei Gruppen mit *M. arthritis* ISR1p7 infiziert. Eine weitere Tiergruppe (Gruppe 4, 10 Ratten) wurde nicht infiziert und diente als negative Kontrolle.

4.3.7.1 Klinische und histopathologische Befunde

Die Ratten zeigten während des Adaptationszeitraumes und zu Beginn des Versuches ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Bei den Ratten der Gruppen 2 und 3 konnte vor der Infektion mit *M. arthritidis* durch die Immunisierung mit rekombinantem Hsp60 bzw. Hsp70 weder eine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens noch klinisch oder histopathologisch eine Veränderung der Gelenke festgestellt werden.

An den Tagen 3, 4, 6, 8, 13 und 16 *p. i.* wurden neben der täglichen allgemeinen Untersuchung der Ratten die Parameter Arthritis-Score und Körpergewicht ermittelt. Zur Bestimmung des Arthritis-Scores wurde für jeweils sechs Gelenke pro Tier, abhängig vom Grad der klinischen Symptome und vom Gelenkdurchmesser, ein Wert von null bis drei festgelegt, so daß ein Tier maximal einen Score von 18 erreichen konnte.

Mit Hsp60 immunisierte Tiere der Gruppe 2 wiesen am Tag 3, 4, 6 und 8 *p. i.* deutlich niedrigere Medianwerte des Arthritis-Scores auf, als die Tiere der Infektionskontrolle oder die mit Hsp70 immunisierten Tiere. Am Tag 3 *p. i.* war der Unterschied zur positiven Kontrolle (Gruppe 1) signifikant ($p < 0,05$; 2-Stichproben-Wilcoxon-Cox-Test) (Abb. 31 und Anhang 9.1.5). Nach Tag 8 *p. i.* sank der Arthritis-Score der Tiere der Gruppe 2 beträchtlich, wobei berücksichtigt werden muss, daß am Tag 9 *p. i.* einige Tiere aufgrund massiver klinischer Symptome euthanasiert wurden. Die Anzahl euthanasierter Tiere war jedoch in der Gruppe 2 erheblich geringer als in den Vergleichsgruppen 1 und 3 (Tab. 17).

Tab. 17: Anteil lebender und euthanasierter Ratten in den Gruppen 1 bis 4 ab dem 9. Tag *post infectionem*

	Lebende Tiere	Euthanasierte Tiere
Gruppe 1	30,0 % (3 von 10 Tieren)	70,0 % (7 von 10 Tieren)
Gruppe 2	69,2 % (9 von 13 Tieren)	30,8 % (4 von 13 Tieren)
Gruppe 3	38,5 % (5 von 13 Tieren)	61,5 % (8 von 13 Tieren)
Gruppe 4	100 %	0 %

Von den drei überlebenden Ratten der Gruppe 1 wiesen zwei Tiere über die abklingende Arthritis hinaus, Nasenausfluß und ataktische Bewegungen auf. Die überlebenden Ratten der Gruppe 2 zeigten, außer der abklingenden Arthritis, keine weiteren klinischen Symptome und keine Störungen des Allgemeinbefindens.

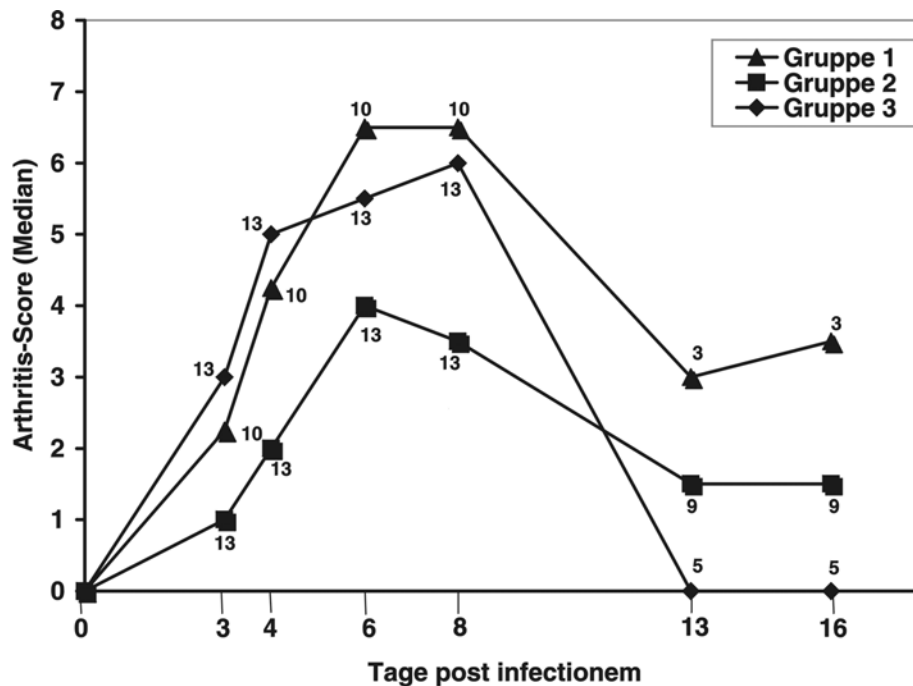


Abb. 31: Arthritis-Score (Medianwert) von Lewis-Ratten nach Infektion mit *M. arthritidis*

Die Tiere wurden mit 3×10^8 cfu *M. arthritidis* ISR1p7 infiziert. Vor der Infektion erhielten die Ratten der Gruppe 1 (Infektionskontrolle) inkomplettes Freund's Adjuvans. Ratten der Gruppe 2 wurden in einwöchigem Abstand zweimal mit jeweils 50 µl rekombinanten Hsp60-Fusionsproteinen, Tiere der Gruppe 3 mit jeweils 50 µl rekombinanten Hsp70-Fusionsprotein immunisiert. Am Tag 9 *p. i.* wurde ein Teil der Tiere getötet. Die Ziffern an den Messpunkten geben die Anzahl der untersuchten Tiere an.

Die Gewichtsentwicklung verlief bei den Tieren der Infektionskontrolle und bei den mit rekombinanten Hsp70 immunisierten Ratten nach der Infektion mit *M. arthritidis* annähernd parallel. Bis zum Tag 8 *p. i.* war eine stetige Abnahme zu verzeichnen. Im Vergleich zu den Tieren der negativen Kontrolle war bei den mit Hsp60 immunisierten Ratten bis zum Tag 4 *p. i.* keine, bis zum Tag 8 nur eine leichte Abnahme des Gewichts messbar. Nach dem 8. Tag wurde eine Zunahme des Gewichts gemessen, wobei auch hier die vorzeitige Tötung von Tieren mit massiven klinischen Symptomen berücksichtigt werden muss (Abb. 32).

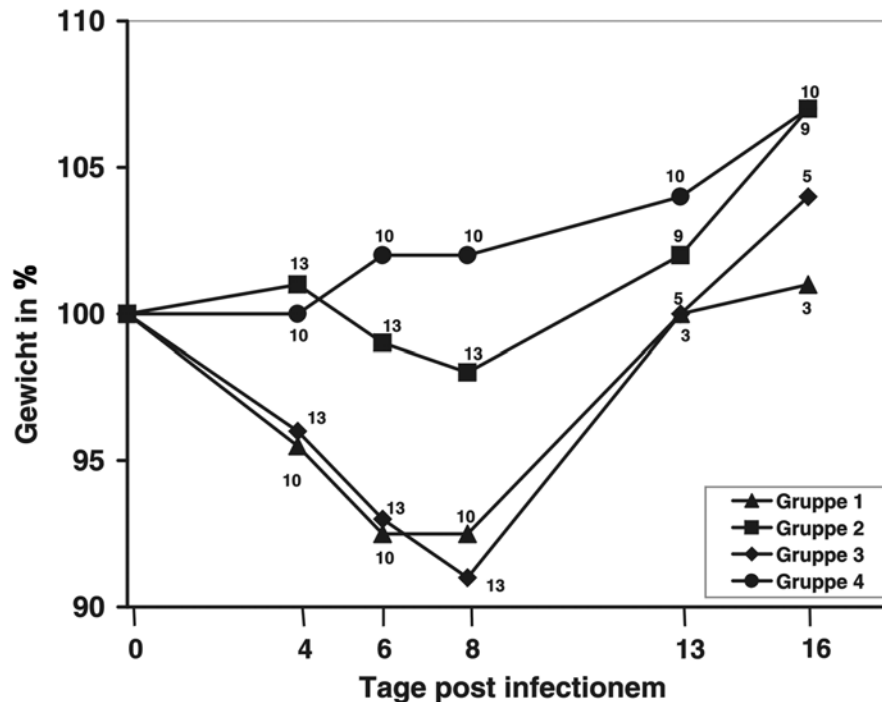


Abb. 32: Gewichtsentwicklung von Lewis-Ratten nach Infektion mit *M. arthritis* (Medianwert in Prozent relativ zum Gewicht am Tag der Infektion)

Die Tiere der Gruppe 1, 2 und 3 wurden mit 3×10^8 cfu *M. arthritis* ISR1 infiziert. Vor der Infektion erhielten die Ratten der Gruppe 1 (Infektionskontrolle) inkomplettes Freund's Adjuvans. Ratten der Gruppe 2 wurden in einwöchigem Abstand zweimal mit jeweils 50 µl rekombinanten Hsp60-Fusionsproteinen, Tiere der Gruppe 3 mit jeweils 50 µl rekombinantem Hsp70-Fusionsprotein immunisiert. Ratten der Gruppe 4 blieben unbehandelt. Am Tag 9 *p. i.* wurde ein Teil der Tiere getötet. Die Ziffern an den Messpunkten geben die Anzahl der untersuchten Tiere an.

Neun Tage *p. i.* wiesen die klinisch auffälligen Gelenke der mit Hsp60 oder Hsp70 immunisierten Ratten sowie auch die Gelenke der Ratten der Infektionskontrolle im histologischen Bild eine akute Arthritis mit Deposition von Entzündungszellen und Fibrinpräzipitation auf (Abb. 33). Das entzündliche Infiltrat bestand aus Granulozyten, mononukleären Zellen und vereinzelt histiozytären Zellen. Ebenso war eine beginnende Pannusbildung mit Formation von spindelförmigen Fibroblasten sowie eine beginnende Proliferation von unreifem Granulationsgewebe mit Kapillareinsprossung und Fibrosierung der Synovialmembran nachweisbar. Bei einem Teil der untersuchten Gelenke wurde eine hochgradige Infiltration von gemischtzelligen entzündlichen Infiltraten festgestellt. Zum Teil trat bereits eine vakuoläre Degeneration der Knorpelzellen auf und es waren Knorpelerosionen sowie Hyperplasie und der Verlust von Synovialdeckzellen zu beobachten. Der hyaline Knorpel war dann weitestgehend zerstört. Im Vergleich zu den Gelenken von Tieren der Infektionskontrolle traten in den Gelenken der zuvor mit rekombinantem Hsp60 immunisierten Ratten allgemein geringfügigere Veränderungen auf. Eine

semiquantitative Bewertung der histopathologischen Veränderungen ist in Tab. 18 dargestellt.

Bei den 21 Tage *p. i.* entnommenen Gelenken war eine hochgradige, chronische und progressive Arthritis und Synovitis mit massiven Infiltrationen von mononukleären Zellen in den Gelenkspalt sowie massiver fibrinöser Exsudation und teilweiser Aktivierung der Synovialdeckzellen nachweisbar (Abb. 34). Das proteinreiche Exsudat zeigte eine beginnende Fibrosierung mit Formation von spindelförmigen Fibroblasten. Im Gelenklumen waren z. T. mononukleäre Zellen vorhanden. Die Knorpelerosion war insbesondere bei den Ratten der Infektionskontrolle weiter fortgeschritten. Superfizielle Chondrozyten waren z. T. multinukleär. Auch zu diesem Zeitpunkt waren die histopathologischen Veränderungen in den klinisch veränderten Gelenken bei den mit Hsp60 immunisierten Tiere deutlich geringfügiger als bei den Tieren der Positivkontrolle (Tab. 18).

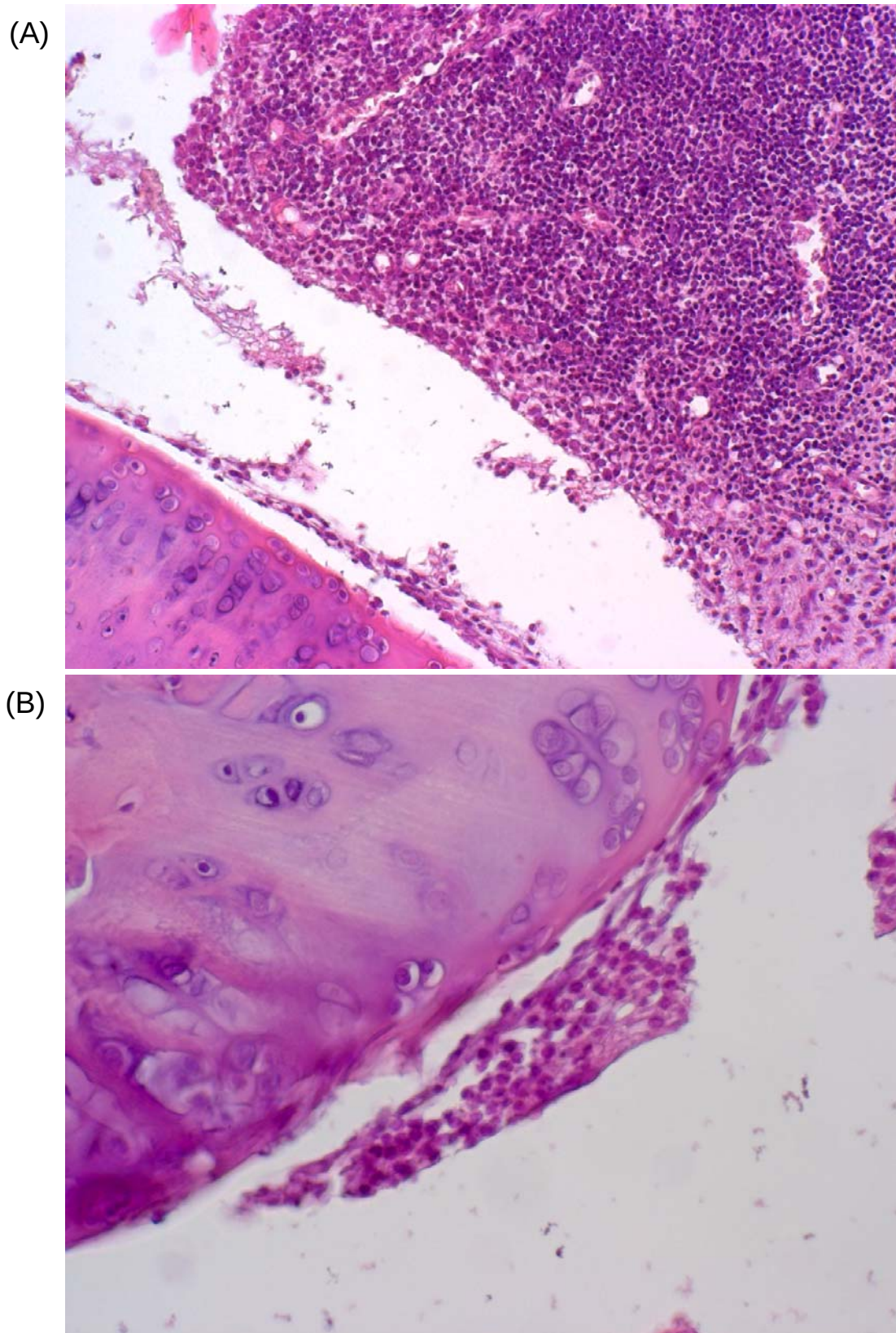


Abb. 33: Fibrino-purulente Arthritis mit hochgradiger Infiltration von Entzündungszellen in den erweiterten Gelenkspalt 9 Tage nach Infektion mit *M. arthritis* ISR1p7
Hämatoxylin-Eosin-Färbung; A: 40-fache Vergrößerung; B: 100-fache Vergrößerung

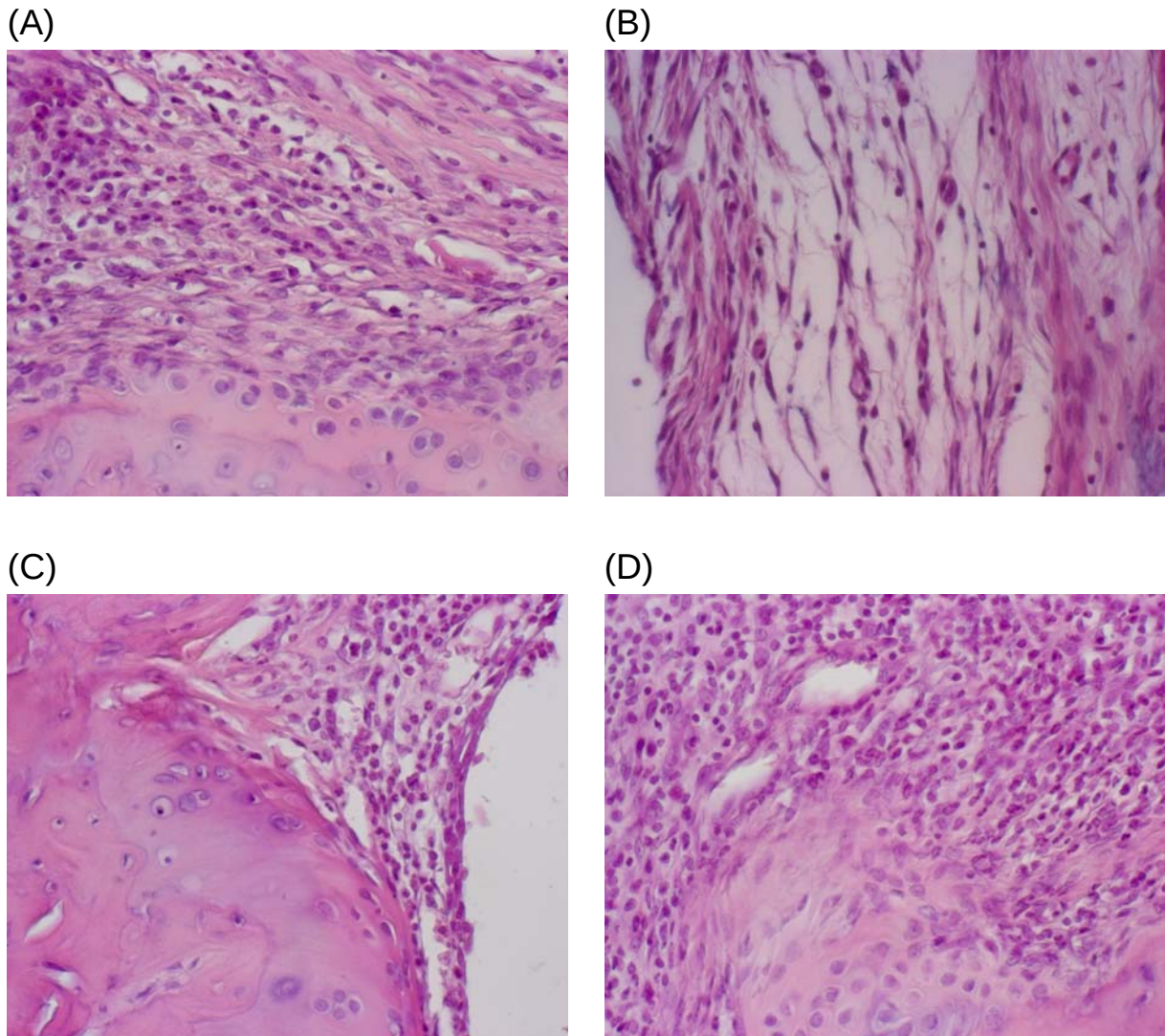


Abb. 34: Chronisch-proliferative Arthritis und Synovitis 21 Tage nach Infektion mit *M. arthritis* ISR1p7

Pannusformation und Destruktion des hyalinen Gelenkknorpels (A), Proliferation von Fibroblasten und Formation von kollagenen Fibrillen in der Gelenkkapsel (B), chronische papilläre Proliferation der Synovialis mit gemischten Entzündungszellinfiltraten (C), Destruktion des hyalinen Knorpels mit chronischer Pannusformation und Proliferation der Synovialis (D); Hämatoxylin-Eosin-Färbung; 40-fache Vergrößerung.

Tab. 18: Semiquantitative Bewertung der histopathologischen Veränderungen in den Gelenken von Ratten nach Infektion mit *M. arthritidis* ISR1p7: Vergleich der mit rekombinanten Hsp60-Fusionsproteinen immunisierten Ratten mit nicht immunisierten Tieren

Histopathologische Befunde	Infektion mit <i>M. arthritidis</i>	Infektion mit <i>M. arthritidis</i> nach Immunisierung mit rekombinantem Hsp60	Infektion mit <i>M. arthritidis</i>	Infektion mit <i>M. arthritidis</i> Nach Immunisierung mit rekombinantem Hsp60
	Entnahmezeitpunkt 9 Tage <i>p. i.</i>		Entnahmezeitpunkt 21 Tage <i>p. i.</i>	
Infiltration des Synovialraums mit Granulozyten; Suppurative Synovitis	2,4,3 ^{a)}	2,2,2	2,2,2	1,1,1
Fibrinbildung	4,3,4	3,2,3	2,2,3	2,1,1
Knorpelusuraen	4,3,4	3,3,3	4,4,3	4,3,3
Chondrolyse	4,4,3	4,3,3	4,4,4	3,3,3
Osteoblasten-Regeneration mit Matrixproduktion	4,4,4	3,3,3	4,4,4	3,3,3
Kollagenes Bindegewebe, Gelenkkapsel, Granulationsgewebe	2,3,2	1,2,1	3,3,3	2,2,2
Proliferation der Synovialdeckzellen	2,2,2	1,1,1	4,3,4	3,2,3

^{a)} Bewertung der histopathologischen Veränderungen an jeweils drei Gelenken im Vergleich zu Gelenken nicht infizierter Tiere (Negativkontrolle)

- 1: Geringgradige Entzündungsinfiltrate, vorwiegend neutrophile Granulozyten, Fibrin, Exsudat
- 2: Mittelgradige Entzündungsinfiltrate, Granulozyten mit Knorpelinvasion, Vakuolisierung der Chondrozyten, mittelgradige Exsudatansammlung, Knorpelerosion, Obliteration des Gelenkspaltes mit Zelldetritus
- 3: Hochgradige Proliferation der Synovialdeckschicht, Knorpeldestruktion, Pannusformation, Exsudat, Obliteration des Gelenkspaltes mit Zelldetritus
- 4: Höchstgradige Chondrolyse, fibrinöses Exsudat, Fibrosierung, Pannus, Synovialproliferation, Gelenkspaltdeformation

4.3.7.2 Nachweis von Antikörpern gegen natives Hsp60

Zur Untersuchung der Antikörperreaktion gegen natives Hsp60 der mit rekombinantem Hsp60 immunisierten Ratten wurde ein experimenteller ELISA entwickelt. Als Antigen wurden Hsp60-haltige Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie von *M. arthritidis* mit einer Ausgangskonzentration von 25 µl Protein je ml eingesetzt. Ein Serumpool von mehreren Präimmunseren, die im Westernblot keine Reaktion mit dem Hsp60 von *M. arthritidis* aufgewiesen hatten, wurde als negatives Kontrollserum verwendet. Ein Serumpool von mehreren Rekonvaleszentenseren, die im Westernblot mit dem Hsp60 von *M. arthritidis* reagierten, stellte das positive Kontrollserum dar.

In Vorversuchen wurden Mikrotiterplatten mit unterschiedlichen Oberflächenstrukturen (Maxisorp®- und Polysorp®-Mikrotiterplatte, Nunc, Wiesbaden) und verschiedene Antigenbindungspuffer (Carbonat-Bicarbonatpuffer, Phosphatpuffer, Zitratpuffer) untersucht, um eine optimale Kopplung des Antigens an die Festphase zu erreichen sowie die Ausgangsverdünnungen für Antigen und Serum zu ermitteln. Polysorp®-Mikrotiterplatten und Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,6) erwiesen sich für den ELISA als am besten geeignet. Das Antigen wurde in einer Ausgangsverdünnung von 1:10 eingesetzt. Die Seren wurden nach einer 1:100 Vorverdünnung 1:2 weiter verdünnt.

Das positive Kontrollserum wurde als Referenz-Standardserum verwendet. Zur Bestimmung der Eichgeraden wurde eine Regressionsanalyse innerhalb des linearen Bereichs der „geblankten“ und „log-log“-transformierten OD-Werte des positiven Kontrollserums durchgeführt. Der Schnittpunkt dieser Geraden mit der y-Achse erhielt den Prozentrang 100, dem Serum wurde eine ELISA-Aktivität von 100 ELISA-Units zugeordnet. Basierend auf den berechneten Werten der Eichgerade wurde für jede Serumverdünnung der zu prüfenden Rattenseren, die im linearen Bereich lag, der Schnittpunkt mit der y-Achse errechnet. Das arithmetische Mittel der Werte wurde als Prozentsatz des positiven Kontrollserums angegeben.

Mit diesem Versuchsansatz wurden die Seren der als Infektionskontrolle verwendeten Tiere (Gruppe 1) und Seren der Ratten, denen vor der Infektion rekombinantes Hsp60 appliziert wurde (Gruppe 2), zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf das Vorhandensein von Hsp60-spezifischen Antikörpern überprüft. In dem Serum eines Tieres der Gruppe 2 war vor der Immunisierung mit dem rekombinanten Hsp60 eine Aktivität von 17,7 ELISA-Units gegen das native Hsp60 von *M. arthritidis* nachweisbar. Die anderen Ratten zeigten erst nach der Immunisierung eine Antikörperreaktion, die durch die Booster-Immunisierung nicht wesentlich gesteigert werden konnte. Bei den Ratten der positiven Kontrollgruppe war vor der Infektion mit *M. arthritidis* ISR1p7 keine Antikörperreaktion festzustellen. Nach der Infektion wiesen die Seren der mit Hsp60 immunisierten Gruppe eine erheblich gestiegene ELISA-Aktivität auf, die im Verlauf der Untersuchung nur noch geringfügig zunahm. Bei den Ratten der nicht immunisierten positiven Kontrollgruppe war nun ebenfalls eine Antikörperreaktion gegen das native Hsp60 nachweisbar. Beide Tiergruppen

erreichten bereits sieben Tage nach der Infektion annähernd die gleichen Werte (Abb. 35).

Zusätzlich wurden Seren von zwei Ratten, die vor der Infektion mit rekombinatem Hsp70 immunisiert wurden (Gruppe 3), überprüft. Diese Tiere zeigten am Tag 14 und am Tag 7 vor der Infektion keinen meßbaren Antikörpertiter gegen mykoplasmales Hsp60 (nicht dargestellt).

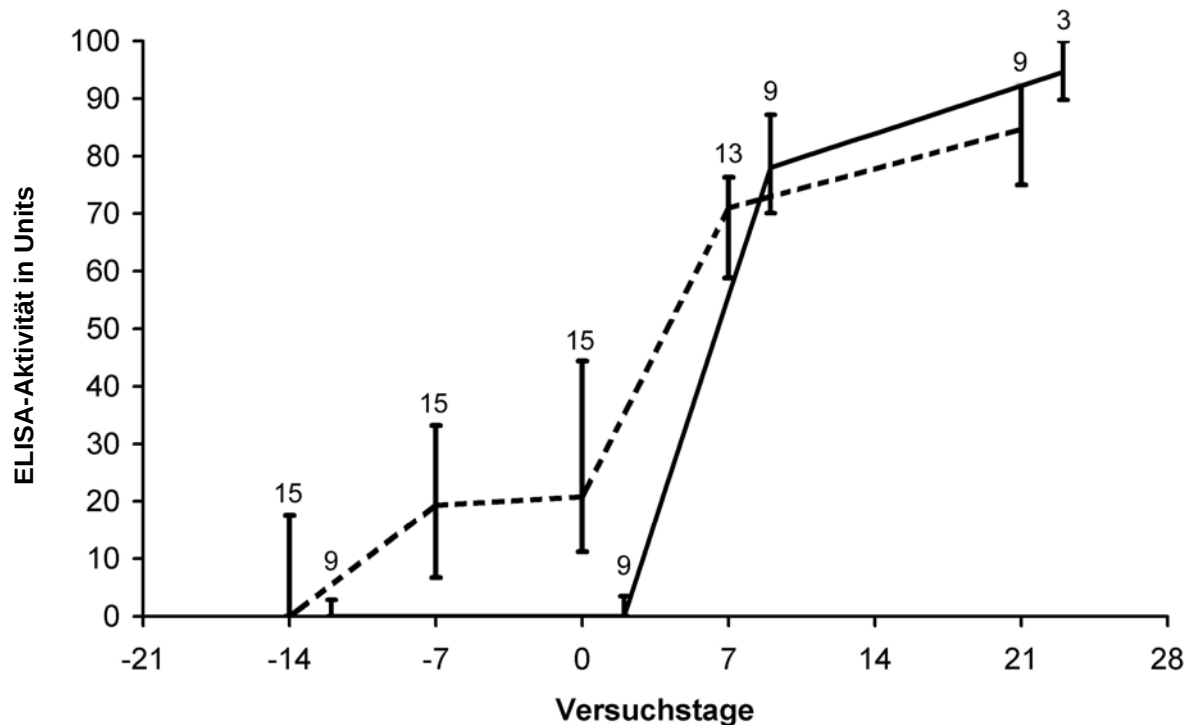


Abb. 35: Antikörperreaktion von Ratten nach Immunisierung mit rekombinanten Hsp60-Fusionsproteinen im Vergleich zu Kontrolltieren vor und nach Infektion mit *M. arthritidis* im ELISA

Die ELISA-Aktivität der immunisierten Tiere ist mit einer gestrichelten Linie, die der nicht immunisierten Tiere mit einer durchgezogenen Linie dargestellt. Die Infektion mit *M. arthritidis* erfolgte am Tag 0. Die Ziffern an den Messpunkten geben die jeweilige Anzahl der untersuchten Tiere/ Seren an. Angegeben ist der Medianwert mit Minimal- und Maximalwerten der ELISA-Aktivität.

5 DISKUSSION

Die Grundlage für das Überleben aller Organismen ist die Fähigkeit, sich wechselnden Umweltbedingungen anzupassen. Diese Veränderungen können langsam erfolgen und dadurch zur Evolution der Organismen beitragen. Die Umweltbedingungen können sich aber auch schnell verändern und die Lebensfähigkeit der Organismen unmittelbar beeinträchtigen. Zu diesen sich rasch verändernden Umweltbedingungen gehören in Bezug auf Bakterien beispielsweise Abweichungen im Nährstoffangebot, die Anreicherung von Stoffwechselprodukten, Strahlung oder Temperaturschwankungen. Um unmittelbare Schäden durch diese plötzlich auftretenden Noxen über einen gewissen Zeitraum zu verhindern, hat sich bei den Organismen im Laufe der Evolution neben DNA-Reparaturmechanismen auch eine Maschinerie zur Minimierung von Schäden an Proteinen entwickelt. Diese besteht aus verschiedenartigen Proteinen, die als Hitzeschock- oder Stressproteine bezeichnet werden.

In Hinblick auf das vergleichsweise kleine Genom der Mykoplasmen und den Verlust genetischer Information im Verlauf der phylogenetischen Entwicklung stellt sich die Frage, ob die Stressreaktion derart essentiell ist, daß sie auch bei diesen Mikroorganismen vorhanden ist. Ein weiterer Aspekt ist die Bedeutung von Hsp in der Pathogenese von Mykoplasmosen. Mykoplasmen sind als Krankheitserreger seit mehr als hundert Jahren bekannt. Dennoch sind die Virulenzfaktoren dieser Bakterien und die Pathogenitätsmechanismen noch unzureichend aufgeklärt. Seit vielen Jahren wird hinsichtlich verschiedener Mykoplasmaspezies diskutiert, daß ähnliche Antigene von Mykoplasmen und Wirtsorganismen Autoimmunreaktionen und schließlich Autoimmunerkrankungen induzieren, oder aber zu einer molekularen Mimikry führen könnten. Durch molekulare Mimikry könnten Mykoplasmen Immunreaktionen der Wirte verhindern und über einen langen Zeitraum im Wirt persistieren, wodurch die Chronizität vieler Mykoplasmenenerkrankungen erklärbar würde. Bei verschiedenen anderen Bakterien wurden vor allem Kreuzreaktionen von Antikörpern und T-Zellen mit den hoch konservierten 60 kDa-Hsp der Erreger und ihrer Wirte nachgewiesen und als mögliche Auslöser von Autoimmunerkrankungen in Betracht gezogen.

Wirkungsvolle Vakzinen zur Prävention der durch Mykoplasmen induzierten Erkrankungen stehen, bis auf wenige Ausnahmen, nicht zur Verfügung. Aufgrund der in verschiedenen Tiermodellen festgestellten protektiven Eigenschaften der Hsp könnten diese Proteine als potentielle Bestandteile von „Subunit“-Vakzinen auch bei Mykoplasmosen eingesetzt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Hsp und die für sie kodierenden Gene von Mykoplasmen identifiziert und charakterisiert, die Immunantwort gegen mykoplasmale Hsp und die Expression mykoplasmales Hsp im Wirt untersucht sowie der Einfluß der Hsp auf die Pathogenese einer Mykoplasmenenerkrankung geprüft werden. Ein besonderer Schwerpunkt wurde auf die Untersuchung des 60 kDa-Hsp gelegt.

Die Untersuchungen wurden zum einen an *M. pneumoniae*, dem Erreger einer weit verbreiteten Tracheobronchitis und atypischen Pneumonie des Menschen, zum anderen an den tierpathogenen und auch in Deutschland wirtschaftlich relevanten Spezies *M. bovis*, einem weltweit verbreiteten ätiologischen Agens von Mastitiden, Pneumonien und Arthritiden des Rindes, und *M. hyopneumoniae*, dem vor allem in Ländern mit intensiver Schweinehaltung auftretenden Primärerreger der Enzootischen Pneumonie des Schweines, sowie an *M. arthritidis* durchgeführt. Die durch *M. arthritidis* verursachte Polyarthrit der Ratte eignet sich als Modell für mykoplasmeninduzierte Arthritiden bei Großtieren und für die Rheumatoide Arthritis des Menschen. Zusätzlich wurde in die Untersuchung Hsp-kodierender Gene *M. agalactiae*, ein ebenfalls weit verbreiteter Erreger von Mastitiden, Pneumonien und Arthritiden bei Schaf und Ziege, mit einbezogen.

5.1 Charakterisierung der Hitzeschock-Antwort verschiedener Mykoplasmenspezies und Identifizierung von Hitzeschockproteinen der Hsp60- und Hsp70-Familie

Bisher wurden bei Mykoplasmen nur wenige Untersuchungen im Hinblick auf Hsp durchgeführt. Die Reaktion auf einen Hitzeschock wurde bislang nur bei den Mykoplasmenspezies *A. laidlawii* und *M. capricolum* mittels radioaktiver Markierung der Proteine umfassend analysiert (DASCHER *et al.* 1990). *M. capricolum* reagierte nach Hitzeschock mit einer gesteigerten Synthese von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 26, 50, 66, 75, 78, 87 und 105 kDa, wobei ein signifikanter Anstieg in der Proteinkonzentration bei dem 26 kDa- und bei dem 105 kDa-Protein festzustellen war. Bei *A. laidlawii* Stamm JA1 konnten nach Hitzeschock elf Proteine mit einem Molekulargewicht von 20, 27, 29, 35, 39, 49, 56, 68, 75, 90 und 92 kDa nachgewiesen werden. Hier lagen signifikante Zunahmen in der Proteinkonzentration bei dem 68 kDa- und bei dem 75 kDa-Protein vor. Bei dem Stamm *A. laidlawii* K2 wurden fünf Hsp mit einem Molekulargewicht von 29, 36, 57, 68 und 78 kDa gebildet. Mit einem monoklonalen Antikörper gegen das DnaK (Hsp70) von *E. coli* wurde in Westernblot-Analysen bei den genannten Mykoplasmenspezies ein entsprechendes Hsp erkannt. In weiteren Untersuchungen wurden bei *M. salivarium* und *M. orale* mit einem monoklonalen Antikörper gegen Hsp60, bei *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *M. fermentans*, *M. gallisepticum* und *A. laidlawii* durch den Einsatz polyklonaler Antikörper gegen bakterielles und humanes Hsp60 und Hsp70 homologe Hsp nachgewiesen (SØNDERGARD-ANDERSEN *et al.* 1990, DASCHER und MANILOFF 1992, CHATTIN-KACOURIS *et al.* 2002).

In den eigenen Arbeiten zur Expression von Hsp wurde zunächst für die zu untersuchenden Mykoplasmenspezies über Wachstumskurven die logarithmische Phase ermittelt, um eine Synthese von Stressproteinen aufgrund von Nährstoffmangel, Anreicherung von Stoffwechselprodukten, wie beispielsweise Wasserstoffsuperoxid, oder Veränderung des pH-Wertes auszuschließen (Abb. 3, Tab. 12). Entsprechend DASCHER *et al.* (1990) wurden die Mykoplasmen bei 32 °C

kultiviert. *M. hyopneumoniae* wies bei dieser Temperatur jedoch nur ein sehr schwaches Wachstum auf, so daß bei dieser Spezies die Temperatur auf 35 °C erhöht werden musste. Erwartungsgemäß variierte die Wachstumsgeschwindigkeit. Die als relativ schnell wachsende Mykoplasmen bekannten Spezies *M. arthritidis* und *M. bovis* wiesen eine Generationszeit von 3,7 bzw. 4,4 Stunden auf, für die langsam wachsenden Spezies *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* wurde eine Generationszeit von 10,5 bzw. 7,9 Stunden ermittelt.

Im weiteren Verlauf wurde die individuelle Temperaturtoleranz für die einzelnen Mykoplasmenpezies durch Wachstumskinetiken untersucht (Abb. 4). Eine Erhöhung auf 43 °C wurde von allen Mykoplasmen über einen Zeitraum von 60 min gut toleriert. Bei *M. bovis* wurde in den ersten 40 min sogar ein Anstieg der Lebendkeimzahl festgestellt, der von DASCHER und MANILOFF (1992) bei Untersuchungen mit *M. capricolum* ebenfalls beobachtet und auf Disaggregation von Zellklumpen zurückgeführt wurde. Die Zunahme der Lebendkeimzahl könnte jedoch auch auf der Steigerung der metabolischen Aktivität und dadurch vermehrter Zellteilung beruhen (MILES 1992). Erst nach 60 min wurde bei *M. bovis* und *M. pneumoniae* eine verstärkte Reduktion der Lebendkeimzahl festgestellt. Bei *M. arthritidis* und *M. hyopneumoniae* wurde nach ungefähr 20 min lediglich eine leicht verringerte Lebendkeimzahl beobachtet, die bis zum Versuchsende annähernd unverändert blieb. Im Verlauf der Kultivierung bei 45 °C kam es bei *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* bereits nach 20 min zu einer kontinuierlich fortschreitenden Reduktion der Lebendkeimzahl. Am Versuchsende konnten bei diesen beiden Spezies keine vermehrungsfähigen Mykoplasmen mehr nachgewiesen werden. Demgegenüber war bei *M. arthritidis* und *M. bovis* eine geringere Abnahme der Lebendkeimzahl zu verzeichnen. *M. bovis* tolerierte auch eine Temperaturerhöhung auf 47 °C. Bis zum Versuchsende konnten bei dieser Temperatur noch vermehrungsfähige Zellen nachgewiesen werden. Diese hohe und ähnliche Thermotoleranz von *M. arthritidis* und *M. bovis* wird durch die Angabe der dezimalen Reduktionszeit besonders deutlich (Tab. 13). Demgegenüber wiesen *M. hyopneumoniae* und vor allem *M. pneumoniae* vergleichsweise geringe D-Werte auf. Zusammenfassend ist festzustellen, daß die Mykoplasmen speziesabhängig eine Temperaturerhöhung um 8 bis 13 °C gut tolerierten. Die geringste Toleranz gegenüber höheren Temperaturen wies *M. pneumoniae* auf. *M. arthritidis* und *M. bovis* zeigten eine vergleichsweise erstaunlich hohe Tenazität gegenüber höheren Temperaturen.

Zum Nachweis der Hsp wurden die Mykoplasmen aufgrund der ermittelten Thermotoleranz einem Hitzeschock durch plötzliche Erhöhung der Temperatur um 8 °C (*M. hyopneumoniae*), 11 °C (*M. pneumoniae*) bzw. 13 °C (*M. arthritidis*, *M. bovis*) unterzogen. Nach metabolischer Markierung der Proteine mit ³⁵S-Methionin/Cystein, Auftrennung durch SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie konnte bei diesen Mykoplasmenpezies im Vergleich zu unbehandelten Kulturen eine gesteigerte Synthese von verschiedenen Hsp nach Hitzeschock in einem Molekulargewichtsbereich zwischen 23 und 152 kDa

festgestellt werden (Abb. 5). Ebenso wie bei den Untersuchungen von DASCHER *et al.* (1990) war das Proteinmuster auch bei diesen Mykoplasmen sehr heterogen. Von den Autoren wurde bei zwei Stämmen von *A. laidlawii*, also selbst innerhalb der gleichen Spezies, eine Induktion unterschiedlicher Proteine beobachtet.

Ein Teil der Proteine ließ sich aufgrund ähnlicher Molekulargewichte näherungsweise der Hsp60-, Hsp70- bzw. Hsp90-Familie zuordnen. Allerdings konnte lediglich bei *M. pneumoniae* und in geringerem Umfang auch bei *M. hyopneumoniae* eine verstärkte Synthese des potentiellen Hsp60 beobachtet werden. Im Vergleich zu den Kontrollen waren viele Proteine nach dem Hitzeschock in verminderter Stärke oder gar nicht mehr nachweisbar. Dieses Herunterregulieren der Expression von „housekeeping“-Proteinen als Reaktion auf einen Hitzeschock ist für Bakterien charakteristisch.

Im Gegensatz zu anderen Organismen konnte nach Behandlung der Mykoplasmen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid (100 µM - 1 M) die Induktion von Stressproteinen nicht festgestellt werden. Im Verlauf von Untersuchungen einer russischen Arbeitsgruppe zur Induktion von Hsp mit Wasserstoffperoxid wurden bei anderen Mykoplasmenpezies die gleichen Ergebnisse erzielt (Dr. M. Vonski, Abteilung für Zellkultur, Zytologisches Institut der Russischen Akademie der Wissenschaften, St. Petersburg, Russland, persönliche Mitteilung). Das Ausbleiben einer verstärkten Synthese von Hsp unter der Einwirkung von Wasserstoffperoxid könnte auf den stoffwechselphysiologischen Eigenschaften der Mykoplasmen beruhen. Da dieses Molekül von den Mykoplasmen als Stoffwechselendprodukt gebildet und auch in größeren Mengen in das umgebende Milieu abgegeben wird, stellt Wasserstoffperoxid vermutlich keinen Stressfaktor für Mykoplasmen dar (MILES 1992, POLLACK *et al.* 1997, RAZIN *et al.* 1998).

Zur Identifizierung GroEL (Hsp60)- und Dnak (Hsp70)-homologer Proteine bei Mykoplasmen wurden Westernblot-Analysen mit entsprechenden Antiseren durchgeführt. Mit einem Antiserum gegen das Hsp60 von *Synechococcus* sp., das eine Kreuzreaktion mit dem GroEL-Protein von *E. coli* aufwies, konnte auch eine starke Reaktion mit einem 61 kDa-Protein von *M. arthritis*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* festgestellt werden (Abb. 6). Demzufolge besteht eine serologische Homologie zwischen den Hsp60-Molekülen dieser Mykoplasmenpezies und dem Hsp60 bzw. GroEL von *Synechococcus* sp. und *E. coli*. Die Hsp60 konnten bei den hitzegeschockten Zellen und gleichermaßen auch bei den Zellen der Kontrollpopulationen nachgewiesen werden. Eine verstärkte Synthese war im Westernblot nicht feststellbar. Auch VONSKI *et al.* (1992) konnten bei anderen Mykoplasmenpezies eine vermehrte Synthese von Hsp60 als Reaktion auf einen Hitzeschock im Westernblot nicht nachweisen. Demgegenüber identifizierten SØNDERGARD-ANDERSEN *et al.* (1990) bei *M. pneumoniae* und *M. fermentans* mit einem Antiserum gegen Hsp60 von *Legionella micdadei* ein Protein von 62 kDa nur nach Temperaturerhöhung. Bei *M. genitalium* wurde dieses Protein allerdings auch bei den Zellen der Kontrollpopulation nachgewiesen. DASCHER und MANILOFF (1992) führten diesen Unterschied auf eine weniger

starke Kreuzreaktivität des Antiserums mit den Hsp60 von *M. fermentans* und *M. pneumoniae* zurück.

In den eigenen Untersuchungen mit einem gegen das Hsp70 von *M. pneumoniae* gerichteten und mit dem DnaK von *E. coli* kreuzreagierenden Antiserum konnte eine Reaktion mit einem 69 kDa-Protein von *M. hyopneumoniae* nachgewiesen werden (Abb. 7). Wie bereits von DASCHER und MANILOFF (1992) für *A. laidlawii* und *M. capricolum* beschrieben, wurde das Hsp70 von *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* auch von den Zellen der Kontrollpopulationen konstitutiv exprimiert. Trotz einer vermutlich auch bei den Mykoplasmen hohen evolutionären Konservierung des Hsp70 war bei *M. arthritidis* und *M. bovis* keine Reaktion mit diesem Antiserum nachweisbar. Möglicherweise sind bei diesen beiden Mykoplasmenspezies die kreuzreagierenden Epitope des Hsp70 den Antikörpern nicht zugänglich, oder sie werden durch die Linearisierung in der SDS-PAGE zerstört.

Die entsprechenden Hsp konnten auch durch zweidimensionale Gelelektrophorese mit anschließendem Westernblot dargestellt werden. Die pI lagen in einem pH-Bereich zwischen 5,3 und 5,8 (Abb. 8). Nach Reaktion mit dem Antiserum gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. konnten bei *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* neben einem 61 kDa-Spot zwei weitere Spots mit 57 und 55 kDa festgestellt werden, die in der eindimensionalen SDS-PAGE nicht nachweisbar waren. Bei diesen Spots könnte es sich um neu gebildete Hsp60, deren Proteinbiosynthese durch die Präparation unterbrochen wurde, um Isoformen des Hsp60 oder lediglich um präparationsbedingte Bruchstücke des Hsp60 handeln. Letzteres kann aber wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da ähnliche Reaktionen bei den anderen Mykoplasmenspezies nicht zu beobachten waren und die Spotbildung reproduzierbar war.

Nach Inkubation mit dem Antiserum gegen Hsp70 von *M. pneumoniae* wurde entsprechend den Ergebnissen der eindimensionalen SDS-PAGE lediglich bei *M. pneumoniae* und *M. hyopneumoniae* eine Reaktion bei 68 bzw. 70 kDa festgestellt (Abb. 9). Die Molekülgröße des Hsp70 entsprach näherungsweise der in der eindimensionalen SDS-PAGE ermittelten Größe. Bei *M. pneumoniae* konnten drei Spots mit pI zwischen 5,3 und 5,5 nachgewiesen werden, die vermutlich Isoformen des Hsp70 darstellen. Aufgrund der geringen Aminosäuresequenzhomologie des carboxyterminalen Endes des Hsp70 und dem daraus ableitbaren geringeren Evolutionsdruck ist es denkbar, daß das Protein auch innerhalb einer Spezies aus zwar funktionell gleichartigen Aminosäuren besteht, die jedoch verschiedene pI aufweisen können und daher zu einer Verschiebung des pI des Gesamtmoleküls führen (CRAIG *et al.* 1993, BUKAU und HORWICH 1998)

Die eigenen Untersuchungen zeigen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, daß auch *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* verschiedene, durch Hitzeschock induzierbare Proteine synthetisieren und über dem GroEL und z. T. auch dem DnaK von *E. coli* homologe Proteine verfügen, die, wie bei zellwandtragenden Bakterien, konstitutiv exprimiert

werden (DASCHER *et al.* 1990, SØNDERGARD-ANDERSEN *et al.* 1990, DASCHER und MANILOFF 1992, VONSKI *et al.* 1992). Die konstitutive Expression der mykoplasmalen Hsp60 und Hsp70 ist ein deutlicher Hinweis auf die essentielle Bedeutung dieser Proteine im Stoffwechsel der Mykoplasmen.

5.2 Analyse der Hitzeschockproteine kodierenden Gene und Gewinnung rekombinanter Hitzeschockproteine

Ziel war zunächst, nach der Sequenzierung der *hsp60*- und *hsp70*-Genfragmente von *M. arthritidis*, *M. bovis* und *M. hyopneumoniae*, die Analyse der Basensequenzen und abgeleiteten Aminosäuresequenzen. In einem weiteren Schritt sollten rekombinante Proteine dieser immunologisch bedeutsamen Hsp als Grundlage für immunologische und tierexperimentelle Untersuchungen gewonnen werden. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu *M. bovis* wurde *M. agalactiae* zusätzlich in die vergleichenden Untersuchungen mit einbezogen. *M. bovis* wurde anfangs als Subspezies von *M. agalactiae* geführt (HALE *et al.* 1962, SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY OF MYCOPLASMATALES 1970) und erst 1976 aufgrund serologischer Untersuchungen und DNA-DNA-Hybridisierungen als eigenständige Spezies etabliert (ASKAA und ERNØ 1976).

Zur Amplifikation von Fragmenten der *hsp60*-Gene mittels PCR wurden Primer entwickelt, deren Sequenzen von den bereits publizierten Sequenzen der *hsp60*-Gene von *M. pneumoniae* (HIMMELREICH *et al.* 1996) und *M. genitalium* (SWISS-PROT: P47632) abgeleitet wurden. Die Basensequenzhomologie zwischen *M. pneumoniae* und *M. genitalium* beträgt lediglich 76 %. Sie weicht dadurch sehr von dem beträchtlichen Grad an Sequenzhomologien zwischen den *hsp60*-Genen anderer Bakterien ab und widerspricht daher den Erkenntnissen über den sehr hohen Konservierungsgrad dieser Proteingruppe (VAN EDEN 1990, SHINNICK 1991). Über die Gesamtgenlänge von 1600 bp wurden zehn Sequenzabschnitte (für fünf Vorwärts- und fünf Rückwärtsprimer) mit hohem Homologiegrad ausgewählt. Zur Auswahl der geeigneten Primerkombinationen wurde die Ziel-DNA der zu untersuchenden Mykoplasmenspezies mit allen möglichen Primerkombinationen zunächst unter Standardbedingungen getestet. Als Kontrolle wurde die DNA von *M. pneumoniae* eingesetzt. Nach Auswahl geeigneter Primerkombinationen wurden die PCR-Bedingungen optimiert. Die meisten der 25 möglichen Primerkombinationen erzeugten Amplifikate, aber nur 8 Reaktionen ergaben singuläre und eindeutige Banden. Die Sequenzierung der *hsp60*-Gene von *M. agalactiae*, *M. arthritidis*, *M. bovis* und *M. hyopneumoniae* erfolgte auf der Basis von PCR-Fragmenten, die nach Aufreinigung aus den Agarosegelen direkt zur Sequenzierung eingesetzt wurden. Ausgehend von diesen Sequenzen wurden weitere Primer entwickelt, die für Kontrollsequenzierungen eingesetzt wurden.

Die Sequenzdaten wurden über die „Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources“ (HUSAR) analysiert, bearbeitet und konnten durch den Vergleich mit Gendatenbanken eindeutig als Fragmente von *hsp60*-Genen identifiziert werden. Im

Anschluß an die Sequenzierung der z. T. überlappenden *hsp60*-Fragmente konnten die einzelnen Fragmente zur fast kompletten *hsp60*-Gensequenz zusammengefügt werden. Die Sequenzanalyse zeigte einen sehr hohen Homologiegrad von 98,0 bis 99,9 % zwischen den *hsp60*-Fragmenten der hier untersuchten Mykoplasmenspezies sowie zu *M. pneumoniae*. Zu dem *hsp60*-Gen von *M. genitalium* wurden Homologiewerte von lediglich 76,5 bis 77,7 % ermittelt (Tab. 14). Der vergleichsweise niedrige Konservierungsgrad des Hsp60 von *M. genitalium* ist möglicherweise auf die sehr geringe Genomgröße (570 kBp) dieser Mykoplasmenspezies zurückzuführen, die durch den Mangel an DNA-Reparatursystemen einem relativ hohen Mutationsdruck, insbesondere an der dritten Basenposition eines Codons, ausgesetzt ist (YOGEV *et al.* 1990, RAZIN *et al.* 1998). Der Grad der Homologie der Mykoplasmen zu den zellwandtragenden Bakterien (Tab. 14) betrug zwischen 49,2 % (*M. pneumoniae* und *E. coli*) und 59,7 % (*M. genitalium* und *C. perfringens*). Die Homologien spiegelten damit erwartungsgemäß eine Abhängigkeit von der phylogenetischen Stellung der zellwandtragenden Bakterien zu den Mykoplasmen wieder (HEMMINGSEN *et al.* 1988, LI und WONG 1992, RUSANGANWA *et al.* 1992, RAZIN *et al.* 1998, KWOK *et al.* 1999).

Zur Charakterisierung von *hsp70*-Fragmenten wurde ein homologer Genabschnitt des *hsp70*-Gens ausgewählt, dessen Genprodukt stark antigen wirkt. Zur Amplifikation dieser *hsp70*-Genfragmente wurden in der PCR degenerierte Primer eingesetzt, die von GALLEY *et al.* (1992) auf der Basis eines hochkonservierten Bereiches des *hsp70*-Gens von *C. perfringens* entwickelt wurden und ein ca. 600 bp großes Fragment umfassen. Auch diese Sequenzen wurden mit den Programmen der HUSAR-Gruppe analysiert und konnten durch den Vergleich mit den Gendatenbanken eindeutig als Fragmente von *hsp70*-Genen identifiziert werden. Innerhalb der Mykoplasmen wurden jedoch sehr unterschiedliche DNA-Homologien der sequenzierten PCR-Produkte ermittelt, die von 46,8 bis 51,3 % zwischen *M. pneumoniae*, *M. genitalium* und *M. capricolum* bis zu 99,8 % zwischen *M. arthritidis* und *M. bovis* reichten (HIMMELREICH *et al.* 1996, FALAH und GUPTA 1997). Die Homologie zu den *hsp70*-Genen der anderen Bakterien (Tab. 15) lag, ähnlich wie bei den *hsp60*-Genen, abhängig vom Verwandtschaftsgrad zwischen 53,2 % (*M. agalactiae* und *E. coli*) und 60,5 % (*M. agalactiae* und *C. perfringens*) (BARDWELL und CRAIG 1984, WETZSTEIN *et al.* 1990, GALLEY *et al.* 1992).

Zur Untersuchung der immunologischen Bedeutung von mykoplasmaalen Hsp war die Ableitung und Untersuchung der Aminosäuresequenzen und der daraus zu ermittelnden antigenen Bereiche sinnvoll. Ein Vergleich der von den DNA-Sequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergab bei den Mykoplasmen für die Hsp60-Peptide Homologien von 90,4 bis 99,9 %, für das Hsp70-Peptid Homologien von 63,2 bis 98,9 % (Tab. 14 und Tab. 15). Die Homologien gegenüber anderen Bakterien betrugen 53,2 bis 60,8 % für die Hsp60-Peptide und 58,7 bis 68,5 % für die Hsp70-Peptide. Sie entsprachen damit früheren Untersuchungen an Hsp zellwandtragender Bakterien (LINDQUIST und CRAIG 1988, SHINNICK 1991,

CRAIG *et al.* 1993). Ebenfalls übereinstimmend mit den Hsp60 anderer Prokaryonten und Eukaryonten waren die Aminosäuresequenzen im N-terminalen und mittleren Bereich des Hsp60 am höchsten konserviert (HARTL 1996, BUKAU und HORWICH 1998). Innerhalb der Hsp60 der Mykoplasmen konnten 17 bis 22 potentiell antigene Bereiche (mit dem Programm „ANTIGENIC“ des HUSAR) ermittelt werden. 12-13 dieser antigenen Bereiche überschnitten sich mit 13 antigenen Regionen des GroEL von *E. coli*. In den Hsp70-Peptiden wurde mit 10 bis 12 Sektionen ein hoher Anteil potentiell antigenen Abschnitte festgestellt, die sich mit vier antigenen Bereichen des DnaK von *E. coli* überschnitten. Die antigenen Bereiche sind fast ausschließlich in hochkonservierten Proteinregionen lokalisiert (siehe Anhang).

Zur Gewinnung rekombinanter Proteine wurden zwei PCR-Amplifikate des *hsp60*-Gens von *M. arthritidis*, welche die erste und zweite Hälfte des Gens repräsentieren, und die Amplifikate des *hsp70*-Gens von *M. arthritidis* und *M. bovis* ausgewählt. Die Gen-Fragmente wurden in den Expressionsvektor pGEX-5X-3 ligiert, nachdem sie über eine Klonierungs-PCR mit den benötigten Restriktionsschnittstellen (*Bam*HI bzw. *Xho*I) versehen worden waren. Das Expressionsprodukt dieses Plasmidvektors ist ein Fusionsprotein mit dem Enzym GST. Mit den Ligationsprodukten wurde der *E. coli* Stamm JM105 transformiert. Nach IPTG-Induktion und Ernte der Zellen wurden die rekombinanten Fusionsproteine durch Aggregatpräparation gewonnen und nach SDS-PAGE durch Coomassie- und Silberfärbung sowie im Westernblot unter Verwendung von Antiseren gegen Hsp60 und Hsp70 dargestellt.

Den amino- und carboxyterminalen Anteilen des Hsp60 von *M. arthritidis* entsprechend, wurden zwei Fusionsproteine mit 57 und 64 kDa (mit einem GST-Anteil von 29 kDa) identifiziert, die als MA60-1 und MA60-2 bezeichnet wurden (Abb. 19). Bei den Fusionsproteinen mit Hsp70-Anteil von *M. arthritidis* und von *M. bovis* konnte in beiden Fällen ein Protein mit einem Molekulargewicht von lediglich 32 kDa isoliert werden (Abb. 20). Die geringe Größe der Hsp70-Fusionsproteine beruhte auf dem in der Sequenz enthaltenen mykoplasmaalen Tryptophancodon UGA, das von *E. coli* als Stopcodon erkannt wurde und zum Abbruch der Proteinsynthese führte (YOGEV *et al.* 1990, RAZIN *et al.* 1998). Durch gezielten Basenaustausch mittels Mutagenese-PCR wurde das UGA-Codon des *hsp70*-Genfragmentes von *M. arthritidis* in ein UGG-Codon und dadurch in ein universelles Tryptophancodon umgeschrieben. Nach Ligation in den Plasmidvektor pGEX-5X-3 und Transformation von *E. coli* Stamm HB101 konnte schließlich ein 42 kDa großes rekombinantes Fusionsprotein exprimiert und aufgereinigt werden (Abb. 21). Aufgrund des hohen Grades an Basensequenzhomologie von 99,8 % zwischen dem *hsp70*-Genfragment von *M. arthritidis* und *M. bovis* wurde auf eine Umschreibung des *hsp70*-Genfragmentes von *M. bovis* verzichtet.

Die rekombinanten Fusionsproteine wurden als Antigene zur Gewinnung von Kaninchenantisera gegen mykoplasmale Hsp, zur Charakterisierung von Immunreaktionen gegen Hsp und in einem Versuch zur Modulation des Krankheitsverlaufes einer durch *M. arthritidis* induzierten Polyarthrititis der Ratte mit Hsp eingesetzt.

5.3 Phylogenetische Analysen auf Basis der Hitzeschockproteine

Die taxonomische Einordnung von Bakterien beruhte ursprünglich auf phänotypischen Analysen wie Untersuchungen zur Morphologie, Biochemie und Antigenität. Die Entwicklung molekularbiologischer Methoden erlaubte später die Etablierung einer molekularen Phylogenie, die auf der Differenzierung bestimmter Gene basiert. Zumeist werden hierfür 16S rRNA-Gene verwendet, über die mittlerweile umfangreiche Datenbanken vorliegen. Diese Gene sind in allen Bakterien vorhanden und besitzen überall die gleiche Funktion, wodurch ein umfassender phylogenetischer Stammbaum aufgebaut werden kann.

Die Analyse von 16S rRNA-Genen bietet viele weitere Vorteile: Innerhalb der 16S rRNA-Gene befinden sich sowohl konservierte Bereiche, wodurch auch bei unbekannten Organismen die Bindung von PCR-Primern möglich ist, als auch variable Bereiche, welche die Unterscheidung der einzelnen Organismen erlauben. Ein weiterer Vorteil ist, daß 16S rRNA-Gene, von wenigen Ausnahmen abgesehen, nicht durch horizontalen Gentransfer an andere Organismen weitergegeben werden (WOESE 1987, OLSEN und WOESE 1993, WANG und ZHANG 2000, WOESE 2000). Die Analyse der 16S rRNA-Gene weist aber auch Nachteile auf: Isolate einer Spezies und manchmal auch eng verwandte Spezies innerhalb einer Gattung können nicht immer eindeutig unterschieden werden. Aus diesen Gründen sollten weitere Gene in die phylogenetischen Untersuchungen mit einbezogen werden. Diese Gene müssen einerseits einen sehr hohen Konservierungsgrad aufweisen, andererseits aber auch die evolutionären Veränderungen widerspiegeln, die durch verschiedene Formen der Mutation ausgelöst werden (LUDWIG und SCHLEIFER 1994, BALDAUF *et al.* 1996, SCHNEIDER *et al.* 1997). Viele in Frage kommenden Gene haben jedoch gegenüber den 16S rRNA-Genen den Nachteil, daß sie nicht ubiquitär verbreitet sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher die ubiquitär verbreiteten *hsp60*- und *hsp70*-Gene auf ihre Eignung für phylogenetische Analysen innerhalb der Mykoplasmen untersucht. Über die Sequenzdaten konnte mit den Programmen „CLUSTAL“ und „CLUSTTREE“ die taxonomische Position der untersuchten Mykoplasmen- und Bakterienspezies generiert und diese vergleichend beschrieben werden.

Mit Ausnahme von *M. genitalium* wiesen die *hsp60*-Gene innerhalb der Mykoplasmenspezies mit einer DNA-Sequenzhomologie zwischen 98 und nahezu 100 % nur eine sehr geringe Heterogenität auf, die annähernd mit der von KWOK *et al.* (1999) festgestellten Heterogenität von *hsp60*-Genfragmenten innerhalb verschiedener *Staphylococcus aureus*-Stämme übereinstimmt. Da die Aminosäuresequenzen eine etwas geringere Homologie als die Basensequenzen aufwiesen, mit Ausnahme von *M. genitalium* zwischen annähernd 95 und 100 %, war eine Zuordnung der Mykoplasmenspezies auf Grundlage der Aminosäuresequenzen möglich. Diese Werte entsprachen jedoch nicht den Sequenzhomologien von 74 bis

93 %, die KWOK *et al.* (1999) für 23 verschiedene Staphylokokkenspezies ermittelt hatten.

Eine klare Unterscheidung der Mykoplasmenspezies gelang mit den Basensequenzen und den aus ihnen abgeleiteten Peptiden des Hsp70-Fragmentes mit Sequenzhomologien von annähernd 50 bis 70 % (Abb. 12 und Abb. 13). Basierend auf den 16S rRNA-Sequenzen werden die Mykoplasmen in fünf unterschiedliche phylogenetische Gruppen eingeordnet: die Pneumoniae-, Hominis-, Spiroplasma-, Anaeroplasmata- und Asteoleplasma-Gruppe (Abb. 36). Innerhalb dieser Gruppen können wiederum verschiedene „Cluster“ und „Subcluster“ differenziert werden (WEISBURG *et al.* 1989, PETTERSSON *et al.* 2000). In Übereinstimmung mit der auf Analyse der 16S rRNA beruhenden Zuordnung konnten die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mykoplasmenspezies, durch Analyse des Hsp70-Fragmentes, ebenfalls der Pneumoniae-Gruppe (*M. pneumoniae*), der Hominis-Gruppe (*M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. agalactiae* und *M. hyopneumoniae*) und der Spiroplasma-Gruppe (*M. capricolum*) zugeordnet werden. Wie von WEISBURG *et al.* (1989) und JOHANSSON *et al.* (1998) auf Grundlage der 16S rRNA-Analysen beschrieben, zeigte sich auch hier eine engere Beziehung zwischen den Spezies der Spiroplasma- und Pneumoniae-Gruppe als zwischen jenen und den Spezies der Hominis-Gruppe.

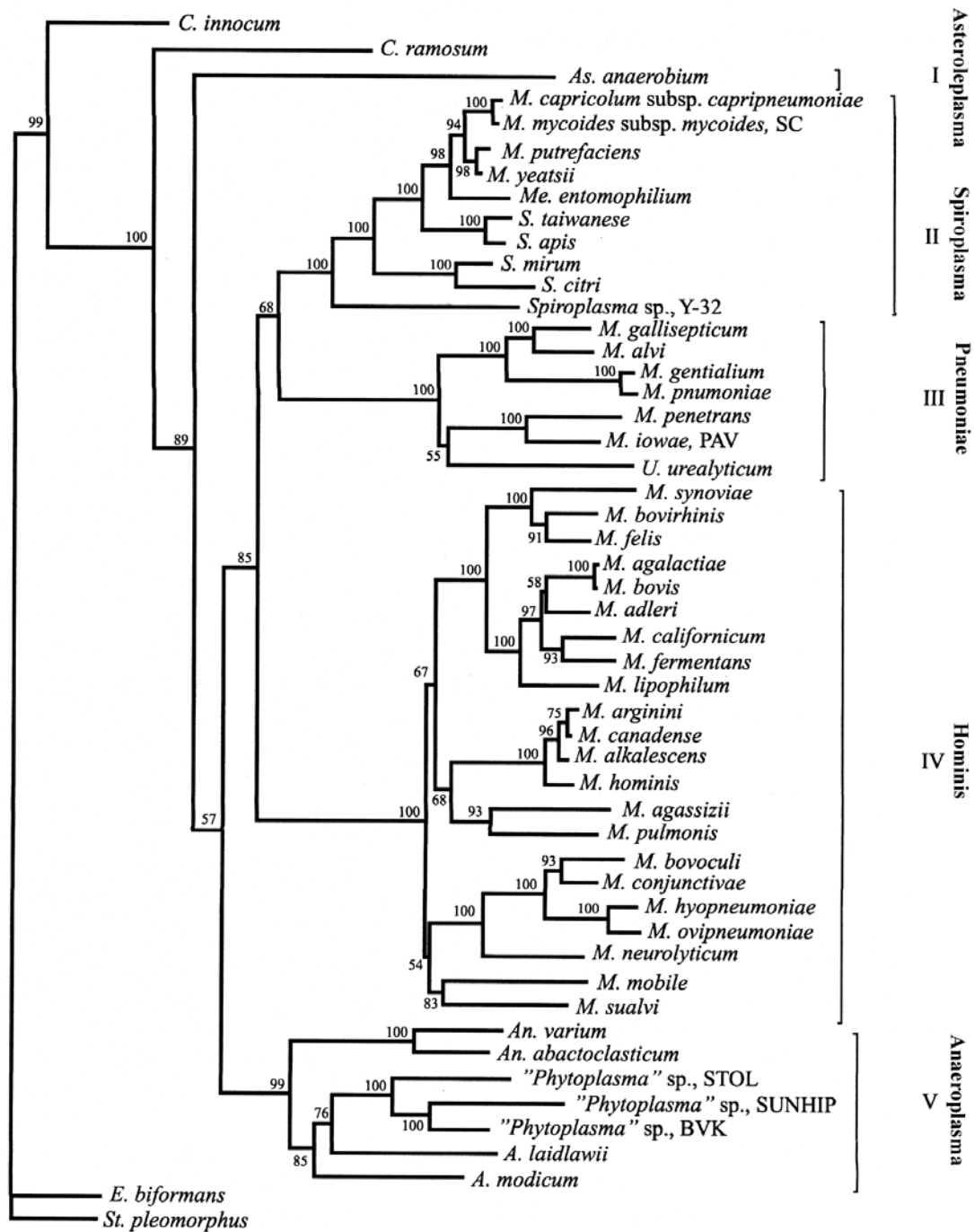


Abb. 36: Phylogenetischer Stammbaum der Mykoplasmen basierend auf 16S rRNA-Sequenzen.

Vertreter der nah verwandten Gattungen *Clostridium* (C.) sind in dem Stammbaum eingeschlossen. *Streptococcus* (St.) *pleomorphus* und *Eubacterium* (E.) *bififormans* repräsentieren Vertreter außerhalb des Mykoplasmenstammbaums stehender Gruppen von Bakterien (aus JOHANSSON *et al.* 1998).

Die zweifelsfreie Differenzierung der eng verwandten und früher einer Spezies zugeordneten Mykoplasmenarten *M. bovis* und *M. agalactiae* ist mit morphologischen, biochemischen und serologischen Untersuchungen nicht möglich. Eine Differenzierung kann jedoch mit vergleichsweise aufwendigen molekularbiologischen Methoden durchgeführt werden (MATTSSON *et al.* 1991, GUMMELT 1995, GUMMELT *et al.* 1996, SUBRAMANIAM *et al.* 1998). Durch die Analyse des Hsp70-Fragmentes konnten diese beiden Spezies mit verhältnismäßig geringem Aufwand klar voneinander unterschieden und zugeordnet werden (Abb. 13). Im Vergleich zu dem Stammbaum, der auf Grundlage der 16S rRNA-Sequenzen erstellt wurde, konnte durch Analyse des Hsp70-Fragmentes für die Spezies *M. bovis* und *M. agalactiae* sogar ein größerer phylogenetischer Abstand ermittelt werden (WEISBURG *et al.* 1989, JOHANSSON *et al.* 1998). Auch die Ergebnisse von FALAH und GUPTA (1997) zur Taxonomie von *M. capricolum* und von SULAIMAN *et al.* (2000) zur Differenzierung von Cryptosporidien bestätigen die Eignung des Hsp70 für phylogenetische Analysen.

Seit einigen Jahren wird bei phylogenetischen Untersuchungen vermehrt eine Ergänzung der bis heute üblichen Analyse der 16S rRNA-Gene gefordert. Hsp sind wegen ihrer ubiquitären Verbreitung und ihrem hohen Konservierungsgrad ideale Moleküle zur Untersuchung von Verwandtschaftsbeziehungen (FALAH und GUPTA 1997, KWOK *et al.* 1999). AHMAD *et al.* (1999) verwendeten dagegen zur Erstellung eines phylogenetischen Stammbaumes, anstelle von Hsp, Aminosäuresequenzhomologien des zum *dnaK*-Operon gehörenden, ubiquitär in grampositiven Bakterien verbreiteten Transkriptionsfaktors *hrcA*.

Die Ergebnisse der vorliegenden taxonomischen Untersuchungen von Mykoplasmen auf der Basis der Hsp zeigen eine dem 16S rRNA-System gleichwertige und in Bezug auf die Differenzierung von *M. agalactiae* und *M. bovis* sogar überlegene Möglichkeit der phylogenetischen Analyse auf und stellen daher eine sinnvolle und erfolgversprechende Ergänzung zu den 16S rRNA-Sequenzanalysen bei Mykoplasmen dar. Die Überprüfung verschiedener geeigneter Gene und Proteine auf dem Gebiet der Taxonomie würde eine differenziertere Spezialeinordnung für zeitlich begrenzte Evolutionsperioden ermöglichen.

5.4 ATPase-Aktivität von Hitzeschockproteinen

Ziel dieser Untersuchungen war die funktionelle Charakterisierung nativer Hsp60 von *M. arthritidis* und *M. bovis*. Zur Aufreinigung von Hsp wurden in der Literatur unterschiedliche Methoden, wie beispielsweise die Ausschlußchromatographie, Anionenaustauschchromatographie mittels FPLC (engl. fast protein liquid chromatography), Hydroxylapatit-Säulenchromatographie oder Immunaффinitätschromatographie beschrieben (WELCH und FERAMISCO 1982, BLANDER und HORWITZ 1993, TAKATA *et al.* 1995). Zur Isolierung von nativem Hsp60 aus Mykoplasmen wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Immunaффinitätschromatographie eingesetzt. Die Hsp60 enthaltenden Fraktionen der Mykoplasmen-

lysate waren jedoch mit einem geringen Anteil anderer Proteine verunreinigt und konnten nur in sehr geringen Mengen gewonnen werden (nicht dargestellt). In einem neuen Ansatz wurden Kombinationen aus Ionenaustausch- und Immunaффinitätschromatographie angewendet. Die besten Ergebnisse bei der Isolierung der mykoplasmalen Hsp wurden schließlich durch Vorreinigung mit einem Kationenaustauscher und anschließende Aufreinigung mittels Immunaффinitätschromatographie erzielt (Abb. 14 bis Abb. 18).

Um größere Mengen an monospezifischen Antiseren gegen Hsp60 für die Immunaффinitätschromatographie zur Verfügung zu haben, wurden zunächst Kaninchen mit mykoplasmalen Hsp60 immunisiert. Dazu wurden zwei Versuchsansätze gewählt. Im ersten Ansatz wurden in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteine von *M. arthritidis* und *M. bovis* auf Nitrozellulose transferiert und die Hsp60 der Mykoplasmen mit Antiserum gegen Hsp60 von *Synechococcus* sp. identifiziert. Entsprechende Banden aus Parallelansätzen wurden ausgeschnitten und zur Immunisierung verwendet. Im zweiten Ansatz wurden künstliche Peptide (sogenannte „multiple antigenic peptides“ mit projiziert antigenen Epitopen und einem Molekulargewicht von 13 kDa), basierend auf den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *hsp60*-Gensequenzen von *M. pneumoniae* und *M. genitalium*, als Antigene eingesetzt. Nach Immunisierung und Serumgewinnung wurden in beiden Ansätzen die Antikörper über Protein A gereinigt und anschließend an das Trägermaterial gekoppelt. Für die Immunaффinitätschromatographie erwies sich das Antiserum eines Kaninchens als am besten geeignet, das mit an Nitrozellulosemembran fixiertem Hsp60 immunisiert worden war.

Durch die Aufreinigung mittels Kationenaustausch- und Immunaффinitätschromatographie konnten die Hsp nach SDS-PAGE und Silberfärbung in reiner Form dargestellt werden. Für die aufgereinigten Hsp60 von *M. arthritidis* und *M. bovis* konnte eine den Hsp60 anderer Bakterienspezies und von Eukaryonten vergleichbare ATPase-Aktivität ($0,3 - 0,4 \mu\text{mol ATP}_{\text{hydrolysiert}}$ pro Stunde und pro mg Protein) nachgewiesen werden (CHEETHAM *et al.* 1994, MIERNYK und HAYMAN 1996). Es muss dabei jedoch berücksichtigt werden, daß durch die Aufreinigung Co-Chaperone entfernt worden sind und die ATPase-Aktivität auch von der Menge des angebotenen Substrates abhängig ist (ZYLICZ *et al.* 1983, CHEETHAM *et al.* 1994, MIERNYK und HAYMAN 1996). Aufgrund der Enzymaktivität konnte davon ausgegangen werden, daß das Hsp in nativer Form vorlag und durch die Aufreinigungsprozedur nicht denaturiert worden war. Das aufgereinigte Hsp60 von *M. arthritidis* wurde in weiteren Untersuchungen als Antigen in einem ELISA eingesetzt.

5.5 Kreuzreaktionen zwischen Hitzeschockproteinen von Mykoplasmen und eukaryontischen Zellen

Bereits vor drei Jahrzehnten wurden erstmalig Kreuzreaktionen zwischen murinen Synovialiszellen und *M. pulmonis* (HARWICK *et al.* 1976) sowie später auch

M. arthritidis (THIRKILL *et al.* 1981) beschrieben. In den folgenden Jahren wurden weitere Kreuzreaktionen zwischen Mykoplasmen und verschiedenen Wirtsgeweben nachgewiesen und als Pathogenitätsfaktoren, insbesondere bei mykoplasmen-induzierten Arthritiden, diskutiert (BIBERFELD 1985, RUNGE *et al.* 1990, BUSCHE *et al.* 1990, BARILE *et al.* 1991, RAZIN 1992, BASEMAN *et al.* 1996, FEIZI und LOVELESS 1996). Obwohl Kreuzreaktionen zwischen Hsp anderer Bakterien, wie beispielsweise *Mycobacterium tuberculosis*, und eukaryontischen Hsp seit langem bekannt und intensiv erforscht sind, wurde im Falle der Mykoplasmen eine Beteiligung von Hsp an den Kreuzreaktionen und möglichen Autoimmunerkrankungen bisher nicht untersucht (KOGA *et al.* 1989, LAMB *et al.* 1989, HERMANN *et al.* 1991, MULTHOFF *et al.* 1998, XU 2003).

Unter Verwendung eines Antiserums gegen bakterielles Hsp60 konnten im Westernblot Kreuzreaktionen zwischen den eukaryontischen Hsp60 einer Rattenfibroblasten-, Rindernieren- und Schweinenierenzelllinie sowie einer Primärkultur von humanen bronchotrachealen Epithelzellen einerseits und den Hsp60 von *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* andererseits nachgewiesen werden (Abb. 30). Die Hsp60 der Mykoplasmen und die Hsp60 der entsprechenden Wirtszellen besitzen demnach gemeinsame Epitope. Seit längerem ist bekannt, daß T-Zellen gegen bakterielles Hsp60, z. B. bei der Adjuvans-Arthritis der Ratte und in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Rheumatoider Arthritis, vorkommen (RES *et al.* 1988, HOLOSHITZ *et al.* 1989, VAN EDEN 1990, GASTON *et al.* 1990) Ebenso konnte eine Reaktion Hsp60-reaktiver T-Zellen mit Proteoglykanen aus dem Gelenkknorpel festgestellt werden (VAN EDEN *et al.* 1988). Bei diesen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen wie dem Diabetes der „non obese diabetic“-Maus (ELIAS *et al.* 1990) werden durch konservierte bakterielle Hsp hervorgerufene Immunreaktionen als Ursache für die Autoimmunerkrankungen diskutiert. Die gemeinsamen Epitope der mykoplasmaalen und eukaryontischen Hsp60 könnten ebenso bei Infektionen mit Mykoplasmen zu Autoimmunreaktionen und schließlich zu Autoimmunerkrankungen führen.

5.6 Immunreaktionen auf Hitzeschockproteine

Zur weiteren Charakterisierung sollte geprüft werden, ob mykoplasmale Hsp vom Immunsystem der Wirte auch während einer natürlichen Infektion erkannt werden und welchen Einfluß sie auf das Immunsystem haben. Zur Untersuchung einer Antikörperreaktion wurden die rekombinanten Hsp60-, bzw. Hsp70-Fusionsproteine MA60-1, MA60-2, MA70 sowie MB70 als Antigene im Westernblot eingesetzt und mit Seren von Rindern und Schweinen inkubiert, die klinische Symptome einer Mykoplasmeninfektion aufwiesen. Dabei wurden solche Seren verwendet, die im ELISA einen Titer gegen *M. bovis*, bzw. *M. hyopneumoniae* von $\geq 1:160$ aufwiesen, und bei denen somit von einer spezifischen Antikörperreaktion infolge einer Mykoplasmeninfektion ausgegangen werden konnte. Zur Kontrolle wurden Seren eingesetzt, die keine Reaktion im ELISA zeigten.

Die hochtitrigen bovinen und porcinen Rekonvaleszentenseren wiesen eine mittlere bis starke Reaktion mit den rekombinanten Hsp60- und Hsp70-Fusionsproteinen auf. Bei den bovinen Seren war die Reaktion mit dem geringer konservierten MA60-2 ausgeprägter als mit dem vergleichsweise höher konservierten MA60-1. Im Gegensatz dazu reagierten ELISA-negative Seren nicht oder nur sehr schwach (Abb. 22 bis Abb. 25). Bei Verwendung des aufgereinigten Vektorproteins GST als Antigen war keine Reaktion der Seren nachzuweisen. Diese Ergebnisse zeigen, daß auch bei einer Mykoplasmeninfektion Hsp60 und Hsp70, ebenso wie bei anderen bakteriellen Infektionen, dominierende Antigene sind (SHINNICK *et al.* 1988, YOUNG *et al.* 1988, YOUNG und ELLIOTT 1989, KAUFMANN 1990, VAN EDEN 1990). Die schwachen Reaktionen von Seren, die im ELISA nicht reaktiv waren, könnten, abgesehen von der unterschiedlichen Sensitivität der Testsysteme, auf Kreuzreaktionen von Antikörpern gegen entsprechende Hsp anderer Bakterien oder auf vorausgegangenen Infektionen mit Mykoplasmen beruhen.

Makrophagen spielen in der Körperabwehr eine zentrale Rolle, indem sie wirtsfremdes Material phagozytieren, prozessieren und schließlich als Antigen präsentieren. Durch Sekretion von Zytokinen und Chemokinen können sie immunmodulierend wirken. Zudem scheiden Makrophagen Enzyme, Sauerstoffradikale (Superoxid, Wasserstoffperoxid), Stickoxide und Proteine des Komplementsystems aus. Durch die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen können Makrophagen aber auch Einfluß auf das umgebende Gewebe ausüben und entzündliche Prozesse hervorrufen. Ihre Aktivierung erfolgt über rezeptorgesteuerte Signaltransduktion und Oberflächenliganden, an welche Botenstoffe (z. B. Zytokine, Hormone), Peptide und Komplementfaktoren gebunden werden (ADAMS und HAMILTON 1984, CAVAILLON 1994).

Wegen der zentralen Rolle der Makrophagen bei der Immunreaktion wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung der rekombinanten Fusionsproteine MA60-1 und MA60-2 auf murine Makrophagenzelllinien untersucht. Die Stimulation mit MA60-2 führte zu einer vergleichsweise starken Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 (Abb. 28 und Abb. 29). Das MA60-2 entspricht der weniger konservierten carboxyterminalen Hälfte des Hsp60 mit einer geringeren Aminosäuresequenzhomologie zwischen den Organismen. MA60-1 ist dagegen stärker konserviert und wird deswegen vermutlich von den Makrophagen nicht als fremdes Protein erkannt. Das Vektorprotein GST hatte keine Wirkung auf die Sekretion der Zytokine. Eine Kontamination mit Endotoxin, einem potenten Makrophagenaktivator, war in den Präparationen der rekombinanten Hsp nicht nachzuweisen.

Durch die Sekretion von IL-1 und IL-6 können die Makrophagen *in vivo*, u. a. auf B- und T-Lymphozyten, umfangreichen Einfluß ausüben. IL-6 ist dabei ein wichtiges Zytokin, das die Differenzierung von B-Zellen zu antikörpersezernierenden Plasmazellen fördert (HIRANO 1992). Es bildet ferner einen Kostimulus für IL-2, was zu einer Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen führt. Primär in der Leber wird dadurch die Entstehung von „Akute-Phase-Proteinen“ induziert, die bei entzündlichen

Prozessen Funktionen des Komplementsystems ausüben. IL-1 bewirkt eine Stimulation der T-Helfer (TH)2-Zellen, die daraufhin die Zytokine IL-4 und IL-5 sezernieren (DINARELLO 1992). Dies führt zu einer B-Zellproliferation und -differenzierung. Über die Sekretion des makrophageninhibierenden Zytokins IL-10 üben diese Zellen dann wiederum einen negativ regulierenden Einfluß auf Makrophagen aus. Durch die Sekretion von Interferon (IFN)- γ durch TH1-Zellen erfolgt eine Stimulation der Makrophagen. Die Bildung von GM-CSF und IL-3 durch T-Lymphozyten kann in einer Entzündungsreaktion zu einer lokalen Proliferation von Makrophagen führen.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen von GALDIERO *et al.* (1997), die eine Freisetzung von Zytokinen aus Monozyten nach Stimulation durch das GroEL von *E. coli* beobachteten, konnten in den eigenen Untersuchungen die Makrophagen weder durch MA60-1 noch durch MA60-2 zur Sekretion von TNF- α angeregt werden. TNF- α ist neben IL-1 ein wichtiger Mediator in der Entzündungsreaktion, der von T-Zellen, Makrophagen und Natürlichen Killerzellen gebildet wird. TNF- α zeigt ein breites Spektrum biologischer Aktivitäten. Neben tumoriziden Eigenschaften übt TNF- α eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten aus und stimuliert Makrophagen zur Phagozytose (CARSWELL *et al.* 1975, LOHMANN-MATTHES 1989, TRACY und CERAMI 1990). Auch die Bildung antimikrobiell wirkender Stickoxide konnte im Rahmen der eigenen Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

Zur zytokininduzierenden und mitogenen Wirkung von Mykoplasmen wurden bereits eine Vielzahl von Untersuchungen durchgeführt. Insbesondere die Sekretion von IL-1, IL-2 und TNF- α wird durch viele Mykoplasmen beeinflusst. Die Lipopeptide MALP-2 von *M. fermentans* und MALP-H von *M. hyorhina* sowie das Superantigen MAM von *M. arthritidis* sind hinsichtlich ihrer Zytokine induzierenden Kapazität intensiv erforscht. Die durch andere Mykoplasmenarten induzierte Zytokinsekretion wird dagegen nicht näher definierten Membranpräparationen oder Membranproteinen zugeschrieben (AL DACCAR *et al.* 1994, MÜHLRADT *et al.* 1997, RAZIN *et al.* 1998, MÜHLRADT *et al.* 1998).

Aufgrund der durch MA60-2 induzierten Sekretion von IL-1 β und IL-6 ist von einem immunstimulierenden Einfluß des carboxyterminalen Teils des mykoplasmaalen Hsp60 auszugehen. Die Induktion verschiedener Zytokine ist auch als Reaktion auf die Hsp anderer Bakterien beschrieben worden (FRIEDLAND *et al.* 1993, PEETERMANS *et al.* 1994, RETZLAFF *et al.* 1994, GALDIERO *et al.* 1997). Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Untersuchungen konnte mit den rekombinanten Hsp60-Fusionsproteinen der Mykoplasmen TNF- α nicht induziert werden. Nach GALDIERO *et al.* (1997) sollen Hsp durch die Aktivierung von Lymphozyten auch an der Initiierung inflammatorischer Prozesse im Verlauf einer Infektion beteiligt sein. Bakterielle Hsp könnten jedoch nicht nur eine Rolle bei der Modulation der Immunantwort spielen, sondern durch unspezifische Aktivierung von Immunzellen auch Ursache von Autoimmunreaktionen sein (MULTHOFF *et al.* 1998).

Da in der vorliegenden Untersuchung die immunstimulierende Wirkung nur von dem geringer konservierten Teil des mykoplasmalen Hsp60 induziert wurde, ist ein verstärkender Effekt durch wirtseigene Hsp und eine dadurch verursachte Auslösung von Autoimmunreaktionen eher unwahrscheinlich.

5.7 Verstärkte Expression von Hsp60 durch bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit

Obwohl eine verstärkte Expression von bakteriellen Hsp im Verlauf einer Infektion und eine Beteiligung dieser Proteine am Infektionsgeschehen seit längerem vermutet wird, ist wenig darüber bekannt (POLLA 1988, BUCHMEIER und HEFFRON 1990, POLLA und KANTENGWA 1991, MURRAY und YOUNG 1992). Ziel dieser Untersuchungen war es daher, die Expression von Hsp am Beispiel von *M. hyopneumoniae* in einem *in vitro* Modell zu analysieren.

Die bronchoalveoläre Lavage bietet die Möglichkeit, die Wirt-Pathogen-Beziehung unter Bedingungen zu untersuchen, die dem *in vivo* Zustand sehr nahe kommen. Da das Pathogen im Respirationstrakt verschiedensten Schutz- und Abwehrmechanismen des Wirtes ausgesetzt ist, unterscheidet sich die BALF gesunder und infizierter Tiere deutlich in der Zusammensetzung und Konzentration bestimmter Zellen, sekretorischer Antikörper und anderer Komponenten und spiegelt somit die Bedingungen im bronchoalveolären Raum im Tier wider (GANTER *et al.* 1993, HENNIG *et al.* 1999).

Die Mykoplasmen wurden in der logarithmischen Phase aus der Flüssigkultur gewonnen und mit BALF von *M. hyopneumoniae*-infizierten und nicht mit *M. hyopneumoniae* infizierten Schweinen inkubiert. Kontrollen wurden mit physiologischer Kochsalzlösung anstelle der BALF versetzt. Die Negativkontrolle blieb unbehandelt, die Positivkontrolle wurde einem Hitzeschock unterzogen. Nach metabolischer Markierung mit ³⁵S-Methionin/Cystein wurden die Veränderungen im Proteinspektrum in der ein- und zweidimensionalen Gelelektrophorese und nach Westernblot mit einem Antiserum gegen Hsp60 untersucht.

In der zweidimensionalen Gelelektrophorese war das Proteinspektrum nach Inkubation mit BALF von infizierten Schweinen im Vergleich zu dem Proteinspektrum nach Inkubation mit BALF nicht-infizierter Schweine, ebenso wie nach Hitzeschock, deutlich reduziert. Einzelne Proteine traten jedoch neu oder verstärkt auf. Eine erhöhte Syntheserate wurde insbesondere bei einem 60 kDa-Protein mit einem pI von 5,8 nachgewiesen. Dieses Protein wurde im Westernblot als Hsp60 identifiziert. Wie in den vorhergehenden Versuchen zur Identifizierung der Hsp ließ sich in der negativen Kontrolle und nach Inkubation mit BALF nicht infizierter Schweine auch hier eine Basiskonzentration an Hsp60 nachweisen. Demgegenüber konnte jedoch bei den mit BALF infizierter Schweine behandelten *M. hyopneumoniae*-Zellen eine ungefähr um das fünffache erhöhte Zunahme der Hsp60-Konzentration festgestellt werden (Abb. 26). Die vermehrte Expression des Hsp60 in der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurde mit BALF einer größeren

Anzahl von infizierten und nicht infizierten Schweinen in der eindimensionalen SDS-PAGE bestätigt (Abb. 27).

Offensichtlich sind in der BALF wirtsspezifische Faktoren vorhanden, die einen Einfluß auf die Proteinexpression von *M. hyopneumoniae* ausüben und eine typische Stressreaktion hervorrufen. Die vermehrte Expression von Hsp könnte *M. hyopneumoniae* zunächst vor Schäden schützen, die in der initialen Phase der Infektion durch die plötzlich erfolgende Veränderung der Umweltbedingungen ausgelöst werden könnten. Später könnten die mykoplasmaalen Hsp den Erreger vor den Abwehrreaktionen des Wirtsorganismus schützen. In Übereinstimmung mit HENNIG *et al.* (1999) zeigen die Ergebnisse auch, daß der Einsatz von BALF für eine der *in vivo*-Situation ähnliche Darstellung von Interaktionen zwischen Erreger und Wirtsorganismus und -faktoren im bronchoalveolären Raum sinnvoll ist.

5.8 Protektiver Effekt in der Pathogenese der *M. arthritidis*-Polyarthritis der Ratte durch Immunisierung mit Hsp60

Obwohl Hsp während einer Infektion, aufgrund ihrer phylogenetischen Konservierung, ubiquitären Verbreitung und ihrer starken Antigenität, durch einen Zusammenbruch der Selbsttoleranz durchaus zu Autoimmunreaktionen und Autoimmunerkrankungen führen könnten, zeigten viele Untersuchungen der letzten Jahre eine protektive Wirkung von Hsp60 und Hsp70 bei Infektionen mit bakteriellen Erregern. Aus diesem Grund wurde der Einsatz von Hsp als Bestandteile von Vakzinen diskutiert (VAN DEN BROEK *et al.* 1989, BLANDER und HORWITZ 1993, BEY *et al.* 1995, NOLL *et al.* 1997). In jüngerer Zeit wurde vor allem die Bedeutung von Hsp in der Krebsbekämpfung und ihr Einsatz als Bestandteil einer Anti-Tumor-Vakzine untersucht (LIU *et al.* 2002, POCKLEY 2003, CASEY *et al.* 2003, HOOS und LEVEY 2003).

Der Einfluß von mykoplasmaalen Hsp auf den Verlauf einer durch Mykoplasmen induzierten Erkrankung sollte durch die Immunisierung von Ratten des Inzuchtstammes Lewis, die besonders empfänglich für eine *M. arthritidis*-Polyarthritis sind, mit den vorangehend beschriebenen rekombinanten Hsp60- und Hsp70-Fusionsproteinen untersucht werden. Ziel des Tierversuchsvorhabens war im Einzelnen die Klärung der Fragen, ob (I.) die Applikation dieser rekombinanten Hsp einen Einfluß auf das Allgemeinbefinden der Ratte hat oder Symptome einer Arthritis auslösen kann, (II.) durch die Immunisierung mit diesen rekombinanten Hsp die Symptome der *M. arthritidis*-Polyarthritis verstärkt oder vermindert werden und, ob (III.) die rekombinanten Hsp spezifische Antikörper induzieren, die auch mit nativem Hsp der Mykoplasmen reagieren.

Es wurden vier Tiergruppen gebildet, von denen drei Gruppen mit *M. arthritidis* ISR1p7 infiziert wurden. Tiere der ersten Gruppe dienten als Infektionskontrolle. Die Tiere der zweiten Gruppe wurden vor der Infektion mit den beiden rekombinanten Hsp60-Fusionsproteinen immunisiert, die Tiere der dritten Gruppe erhielten die gleiche Menge rekombinantes Hsp70-Fusionsprotein. Eine vierte Gruppe fungierte als negative

Kontrolle. Während des Immunisierungs- und Infektionszeitraumes wurde das Allgemeinbefinden täglich untersucht und regelmäßig die Gewichtsentwicklung erfaßt sowie die Stärke der Erkrankung durch Ermittlung eines Arthritis-Scores überprüft. Zur Serumgewinnung und Überprüfung des Antikörperstatus wurden den Tieren vor und nach der Immunisierung Blutproben entnommen. Je zwei Tiere wurden am Tag der Infektion und nach jeweils 9 und 21 Tagen getötet und die Gelenke pathohistologisch untersucht.

Nach Immunisierung mit den rekombinanten Fusionsproteinen zeigten die Ratten ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Klinische oder histopathologische Symptome einer Arthritis waren zu diesem Zeitpunkt nicht feststellbar (Abb. 31 und Abb. 32). Bei den meisten Ratten der mit den rekombinanten Hsp60-Fusionsproteinen immunisierten Tiergruppe waren die Krankheitssymptome nach der Infektion deutlich schwächer ausgeprägt, als bei den Tieren der Infektionskontrolle und den mit dem rekombinanten Hsp70-Fusionsprotein immunisierten Tieren (Abb. 31). Die semi-quantitative Auswertung der pathohistologischen Untersuchungen bestätigte die klinischen Befunde (Tab. 18). Ein statistisch signifikanter Unterschied war am dritten Tag *p. i.* feststellbar. Zu berücksichtigen ist jedoch, daß am Tag 9 *p. i.* 7 von 10 Tieren der Infektionskontrolle (70 %), 4 von 13 der mit Hsp60 immunisierten Tiere (31 %) und 8 von 13 Tieren der mit Hsp70 immunisierten Tiere (62 %) aufgrund der Schwere der Erkrankung euthanasiert werden mußten.

Durch den experimentellen ELISA war bereits eine Woche nach der ersten Immunisierung eine einsetzende Antikörperreaktion gegen die rekombinanten Hsp60-Fusionsproteine MA60-1 und MA60-2 feststellbar. Die Bildung von Antikörpern belegt die Immunogenität der rekombinanten Fusionsproteine und die Kreuzreaktivität mit dem nativen Hsp60. Am Tag 7 und 21 nach der Infektion mit *M. arthritidis* konnte ein deutlicher Anstieg der ELISA-Aktivität nachgewiesen werden. In der als Kontrolle dienenden Gruppe der infizierten, aber nicht immunisierten Ratten (Infektionskontrolle), waren vor der Infektion keine Hsp60-spezifischen Antikörper nachweisbar. Nach der Infektion wies diese Tiergruppe ebenfalls eine starke ELISA-Aktivität auf (Abb. 35). Die Produktion von Hsp60-spezifischen Antikörpern dieser Tiergruppe zeigte zum einen, wie auch in den Versuchen mit den Rekonvaleszentenseren von Rindern und Schweinen (Abb. 22 ff.), daß im Verlauf einer Infektion mit Mykoplasmen Hsp60 als Antigen erkannt wird, zum anderen, aufgrund des raschen Anstiegs der Reaktion, daß die Tiere sich bereits vorher immunologisch mit bakteriellem Hsp60 auseinandergesetzt hatten. Die Seren von zwei mit rekombinantem Hsp70 immunisierten Ratten zeigten im Verlauf der Untersuchung eine Antikörperreaktion, die jener von Ratten der Infektionskontrolle entsprach. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die ELISA-Aktivitäten nicht durch Kreuzreaktionen mit anderen Bestandteilen des Immunisierungsmaterials zustande kamen.

Durch die Applikation der rekombinanten Hsp wurden bei den Ratten keinerlei Krankheitssymptome ausgelöst. Auch nach Infektion der Tiere mit *M. arthritidis* ISR1p7 war eine Verstärkung der Arthritis, z. B. durch die mögliche Induktion von

Autoimmunreaktionen, nicht nachweisbar. Aufgrund des deutlich abgeschwächten Krankheitsverlaufes der mit Hsp60 behandelten Gruppe konnte demgegenüber ein protektiver Effekt von Hsp60 festgestellt werden.

In Untersuchungen von CHEN *et al.* (2003) zur Entwicklung einer DNA-Vakzine, basierend auf dem Gen für das Hsp-Antigen P42 von *M. hyopneumoniae*, konnte eine Stimulation von verschiedenen Zytokinen, die Proliferation von Milzzellen und die Produktion wachstumsinhibierender Antikörper nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den vorliegenden Untersuchungen wurden diese Versuche jedoch an BALB/c-Mäusen und nicht im homologen Wirt durchgeführt.

Daß es in den eigenen Untersuchungen nur zu einem begrenzten Schutz vor der Erkrankung kam, könnte darauf beruhen, daß es sich bei der *M. arthritidis*-Polyarthritis der Ratte um ein multifaktorielles Krankheitsgeschehen handelt, an dem vermutlich eine Vielzahl von Virulenzfaktoren des Erregers beteiligt sind und bei dem es sich, im Gegensatz zum Modell der „streptococcal cell wall“-induzierten Arthritis oder zur Adjuvans-Arthritis, um eine Erkrankung durch Infektion mit lebenden Bakterien handelt. Trotz der nur unvollständigen Protektion erscheint der Einsatz der Hsp60 als Teilkomponente einer protektiven Vakzine bei bakteriellen Infektionen sinnvoll.

Bislang wurden nur sehr wenige wirksame Vakzinen gegen Mykoplasmen-erkrankungen beschrieben. Für hochkontagiöse Mykoplasmosen, wie die durch *M. mycoides* subsp. *mycoides* small colony type (A-Liste der OIE) und *M. bovis* beim Rind sowie die durch *M. agalactiae*, *M. capricolum* subsp. *capripneumoniae* (B-Liste der OIE) und andere Mykoplasmaspezies bei Schaf und Ziege hervorgerufenen Erkrankungen, aber auch die durch *M. pneumoniae* verursachten Erkrankungen des Menschen, stehen keine oder nur sehr bedingt taugliche Vakzine zur Verfügung (NICHOLAS und BASHIRUDDIN 1995, RAZIN *et al.* 1998). Aufgrund der erfolgversprechenden protektiven Eigenschaften ist zu prüfen, ob rekombinante Hsp60-Proteine beispielsweise in Form von Subunit-Vakzinen auch bei anderen Mykoplasmosen wirksam sind und, ob unter veränderten Versuchsbedingungen, wie z. B. durch Gabe anderer Mengen an rekombinantem Hsp60 oder einer anderen Immunisierungsroute, ein besserer und möglicherweise vollständiger Schutz zu erreichen ist.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Hitzeschockproteine (Hsp) und Hsp-kodierende Gene von Mykoplasmen identifiziert und charakterisiert. Die Untersuchungen wurden an den veterinär- bzw. humanmedizinisch relevanten Spezies *Mycoplasma (M.) arthritidis*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* und *M. pneumoniae* durchgeführt. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen besonderen Bedeutung in der Pathogenese bakterieller Infektionserkrankungen wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf das 60 kDa-Hsp gelegt.

Nach Ermittlung der Temperaturleranz wurden die einzelnen Mykoplasmenpezies einem Hitzeschock ausgesetzt. Dabei zeigte sich eine gesteigerte Synthese von verschiedenen Proteinen, die sich aufgrund ihrer Molekulargewichte den Hsp60-, Hsp70- und Hsp90-Familien zuordnen ließen. Durch Behandlung der Mykoplasmen mit Wasserstoffsuperoxid konnten keine Stressproteine induziert werden. Die Hsp60- und Hsp70-homologen Proteine wurden durch Westernblot-Analysen nach ein- und zweidimensionaler Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte charakterisiert. Von *M. arthritidis* und *M. bovis* wurden die Hsp60 durch eine Kombination von Kationenaustausch- und Immunaффinitätschromatographie isoliert, aufgereinigt und auf ihre ATPase-Aktivität untersucht. Dabei konnte eine mit den Hsp60 von anderen Bakterienpezies und von Eukaryonten vergleichbare ATPase-Aktivität nachgewiesen werden. Das aufgereinigte Hsp60 von *M. arthritidis* wurde in nachfolgenden Untersuchungen als Antigen in einem ELISA eingesetzt.

In die Analyse der *hsp60*-Gene wurde die Spezies *M. agalactiae* aufgrund der engen Verwandtschaft zu *M. bovis* einbezogen. Die Sequenzierung der *hsp60*-Gene von *M. agalactiae*, *M. arthritidis*, *M. bovis* und *M. hyopneumoniae* erfolgte auf der Basis von PCR-Fragmenten. Die Sequenzen der als Primer verwendeten Oligonukleotide wurden durch Vergleich bereits bekannter *hsp60*-Gene von *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *Clostridium (C.) perfringens*, *Bacillus (B.) subtilis* und *E. coli* ermittelt. Über die Gesamtgenlänge wurde eine Sequenz von 1600 bp abgedeckt. Die *hsp60*-Sequenzen der untersuchten Mykoplasmenpezies wiesen untereinander und mit dem *hsp60*-Gen von *M. pneumoniae* Homologien von 98,0 bis 99,9 % auf. Mit dem *hsp60*-Gen von *M. genitalium* betrug die Homologie lediglich 76,5 bis 77,7 %. Die Homologien der *hsp60*-Sequenzen der verschiedenen Mykoplasmenpezies mit *C. perfringens*, *B. subtilis* und *E. coli* lagen abhängig von der phylogenetischen Stellung zu den Mykoplasmen zwischen 59,7 und 49,2 %.

Zusätzlich wurden *hsp70*-Genfragmente untersucht. Zur Amplifikation wurden degenerierte Primer eingesetzt, die auf der Basis eines hochkonservierten Bereiches des *hsp70*-Gens von *C. perfringens* generiert wurden. Es wurde ein ca. 600 bp großes Fragment abgedeckt. Die Sequenzanalyse ergab innerhalb der Mykoplasmen sehr unterschiedliche Homologien von 46,8 bis 51,3 % zwischen *M. pneumoniae*, *M. genitalium* und *M. capricolum* und bis zu 99,8 % zwischen *M. arthritidis* und

M. bovis. Die Homologien mit den *hsp70*-Genen der anderen Bakterien betrugen abhängig vom Verwandtschaftsgrad 53,2 bis 60,5 %.

Bei Vergleich der von den Basensequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergab bei den Mykoplasmen für die Hsp60-Peptide Homologien von 90,4 bis 99,9 %, für das Hsp70-Peptid Homologien von 63,2 bis 98,9 %. Die Homologien mit anderen Bakterienspezies betrugen 53,2 bis 60,8 % für die Hsp60-Peptide und 58,7 bis 68,5 % für das Hsp70-Peptid. Die Konservierung der Aminosäuresequenzen war im N-terminalen und mittleren Bereich des Hsp60 am höchsten. In den Hsp60 der untersuchten Mykoplasmaspezies konnten 17 bis 22 potentiell antigene Bereiche ermittelt werden, die fast ausschließlich in stark konservierten Proteinregionen lokalisiert waren. In den Hsp70-Peptiden wurden 10 bis 12 potentiell antigene Bereiche festgestellt.

Anhand der Basensequenzen und der von diesen abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *hsp70*-Fragmente konnte die auf 16S rRNA-Analysen beruhende phylogenetische Einteilung der Mykoplasmen bestätigt werden. Zudem konnten die sehr nahe verwandten Spezies *M. bovis* und *M. agalactiae* eindeutig unterschieden werden. Die Analyse des Hsp70 stellt damit eine sehr erfolgversprechende Ergänzung zu den bisher verwendeten 16S rRNA-Analysen dar.

Zur Klärung der Frage, ob mykoplasmale Hsp vom Immunsystem erkannt werden und, ob sie in Immunreaktionen eingreifen, wurden rekombinante Hsp60 und Hsp70 als Fusionsproteine mit Gluthation-S-Transferase hergestellt. Diese zeigten im Westernblot mit Seren von Rindern und Schweinen, die im ELISA hohe Antikörpertiter gegen *M. bovis* bzw. *M. hyopneumoniae* aufwiesen, eine starke Reaktion, während ELISA-negative Seren nicht oder nur sehr schwach reagierten. Ein Einfluß des mykoplasmalen Hsp60 auf das Immunsystem wurde *in vitro* durch Stimulation von Makrophagenzelllinien nachgewiesen. Mit einem rekombinanten Fusionsprotein, das dem carboxyterminalen Teil des Hsp60 entspricht, wurde eine deutlich gesteigerte Sekretion der Zytokine IL-1 β und IL-6 induziert.

Ob bakterielle Hsp im Verlauf einer Infektion eine Rolle spielen, wurde an einem *in vitro* Modell, und zwar an der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) von mit *M. hyopneumoniae* infizierten Schweinen, untersucht. Hierfür wurde *M. hyopneumoniae* mit BALF von *M. hyopneumoniae*-infizierten und nicht mit *M. hyopneumoniae* infizierten Schweinen inkubiert. Die Veränderung im Proteinspektrum der Mykoplasmen wurde in der ein- und zweidimensionalen Gelelektrophorese und nach Westernblot mit Antiseren gegen Hsp60 untersucht. Bei unbehandelten Mykoplasmen und mit BALF nicht infizierter Schweine inkubierten Mykoplasmen wurde eine Basiskonzentration an Hsp60 nachgewiesen. Bei den mit BALF infizierter Schweine behandelten *M. hyopneumoniae*-Zellen war demgegenüber die Konzentration des Hsp60 um das fünffache erhöht. Offensichtlich sind in der BALF Faktoren vorhanden, die einen Einfluß auf die Proteinexpression von *M. hyopneumoniae* ausüben.

Für die Untersuchungen zum Einfluß von Hsp auf die Pathogenese einer Erkrankung wurde als Tiermodell die *M. arthritidis*-Polyarthrititis der Ratte gewählt, nachdem in

Westernblot-Analysen Kreuzreaktionen zwischen mykoplasmalen und eukaryontischen Hsp nachgewiesen worden waren. Die Ratten wurden mit den rekombinanten Fusionsproteinen immunisiert und danach mit einem hoch virulenten Stamm von *M. arthritidis* infiziert. Bei den meisten der mit Hsp60 immunisierten Ratten war der Krankheitsverlauf deutlich milder, als bei den nicht immunisierten Tieren der Infektionskontrolle und den mit dem rekombinanten Hsp70 immunisierten Tieren. Die pathohistologischen Befunde stimmten mit dem klinischen Bild überein. Der durch die Immunisierung mit den rekombinanten Hsp60 erzielte protektive Effekt stellt einen erfolgversprechenden Ansatz für die Entwicklung von Vakzinen dar.

7 SUMMARY

In this study heat-shock proteins (Hsp) and Hsp-encoding genes of mycoplasmas were identified and characterised. The investigations were performed on the medically relevant species *Mycoplasma (M.) arthritidis*, *M. bovis*, *M. hyopneumoniae* and *M. pneumoniae* and were focused on the 60 kDa-Hsp due to its special importance in the pathogenicity of bacterial infections, as described in the literature.

After the determination of the temperature tolerance of each of the mycoplasma species, they were each heat-shocked. An increased synthesis of some proteins could be demonstrated. According to their molecular weights these proteins were identified as the Hsp60-, Hsp70- and Hsp90-families. Stress proteins were not induced following treatment with hydrogen peroxide.

The Hsp60- and Hsp70-homologous proteins of the mycoplasmas were characterised according to their molecular weights and isoelectric points in Western immunoblotting analysis after one- and two-dimensional gel electrophoresis. The Hsp60 of *M. arthritidis* and *M. bovis* was isolated and purified by a combination of ion-exchange and immuno-affinity chromatography and investigated for its ATPase activity. An ATPase activity similar to the activity of the Hsp60 of other bacteria and eukaryotes was detected. The purified Hsp60 of *M. arthritidis* was used as antigen in an ELISA.

Due to the close phylogenetic relation of *M. agalactiae* to *M. bovis* this mycoplasma species was included in the analysis of the mycoplasmal *hsp60* genes. Fragments of the *hsp60* genes of *M. agalactiae*, *M. arthritidis*, *M. bovis* and *M. hyopneumoniae* representing almost the entire coding region were amplified by PCR. The primer sequences were obtained by the comparison of the previously published *hsp60* genes of *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, *Clostridium (C.) perfringens*, *Bacillus (B.) subtilis* and *Escherichia (E.) coli*. Within the mycoplasmas the *hsp60* genes showed sequence homologies of 98.0 % to 99.9 %, with the exception of the *hsp60* gene of *M. genitalium*, which was determined to be only 76.5 % to 77.7 % homologous. Homologies to *C. perfringens*, *B. subtilis* and *E. coli* were between 49.2 % and 59.7 %.

In addition a 600 bp fragment of the *hsp70* gene was investigated. The primers were deduced from conserved regions of the *hsp70* gene of *C. perfringens*. Different sequence homologies from 46.8 % to 51.3 % between *M. pneumoniae*, *M. genitalium*, and *M. capricolum* and up to 99.8 % between *M. arthritidis* and *M. bovis* were obtained. The homologies to the *hsp70* genes of the other bacteria was 53.2 % to 60.5 % depending on the degree of phylogenetic relationship.

The homologies of the amino acid sequences of the Hsp60 deduced from the nucleic acid sequences of the *hsp60* gene were 90.4 to 99.9 % between the mycoplasmas, and 53.2 % to 60.8 % between the mycoplasmas and other bacteria species. The amino acid sequences were most highly conserved at the N-terminal and the central region of the Hsp60 molecule. The homologies of the amino acid sequences of the Hsp70 peptide deduced from the nucleic acid sequences of the *hsp70* gene fragment

were 63.2 % to 98.9 % between the mycoplasmas, and 58.7 % to 68.5 % between the mycoplasmas and other bacteria species.

Seventeen to 22 potential antigenic domains, mainly localized within the highly conserved regions of the Hsp60 molecule, could be detected. The Hsp70 peptide shows 10 to 12 potential antigenic domains.

The phylogenetic classification based on 16S rRNA analysis was confirmed by phylogenetic trees obtained from the nucleic and amino acid sequences of the *hsp70* fragments. In addition the closely related species *M. bovis* and *M. agalactiae* could be unequivocally differentiated. Investigation of Hsp70 offers an efficient tool to complement analysis of 16S rRNA genes.

To investigate the recognition of mycoplasmal Hsp by the immune system and the influence of the Hsp on immune reactions, recombinant Hsp60- and Hsp70-gluthation-S-transferase fusion proteins were constructed. Porcine and bovine convalescent sera with strong reactions in a *M. hyopneumoniae*- or *M. bovis*-ELISA showed also a strong reaction with the recombinant fusion proteins in Western immunoblotting, indicating that mycoplasmal Hsp60 and Hsp70 are immunogenic in natural infection. Sera that were negative in ELISA did not specifically recognise the recombinant proteins in Western immunoblots. The influence of mycoplasmal Hsp60 on immune reactions was shown *in vitro* by the stimulation of macrophage cell lines. A significant secretion of IL-1 β and IL-6 was induced by a recombinant fusion protein, corresponding to the carboxy-terminal part of the Hsp60.

A possible role of mycoplasmal Hsp during infection was studied in an *ex vivo* model using metabolic labelling of *M. hyopneumoniae* in the presence of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from *M. hyopneumoniae*-infected and non-infected pigs. The changes in the protein profile were investigated in one- and two-dimensional gel electrophoresis and Western immunoblotting with antisera against Hsp60. Constitutive expression of Hsp60 was shown in untreated mycoplasmas and in mycoplasmas treated with BALF from non-infected pigs. Hsp60 expression of *M. hyopneumoniae* was clearly increased in the presence of BALF from infected pigs thereby implying host-specific factors influencing the expression of mycoplasma proteins.

The influence of Hsp on pathogenesis was studied in an animal model, the *M. arthritidis*-polyarthritis of rats, after the detection of cross-reactions between mycoplasmal and eukaryotic Hsp in Western blotting analysis. The rats were immunised with the recombinant Hsp fusion proteins and challenged with a highly virulent strain of *M. arthritidis*. Rats immunized with Hsp60 developed a clear antibody response as determined in an ELISA using native mycoplasmal Hsp60 as the solid phase antigen. Upon challenge, the Hsp60 immunised rats showed clearly reduced clinical symptoms in comparison to the other animals challenged. The histopathological results correspond to clinical findings. The protective potential of Hsp60 with respect to mycoplasma-induced arthritis represents a promising approach for the development of vaccines against mycoplasmoses.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMS, D. O. and HAMILTON, T. A. 1984. The cell biology of macrophage activation. *Annu. Rev. Immunol.* 2, 283-318.
- AHMAD, S., SELVAPANDIYAN, A., and BHATNAGAR, R. K. 1999. A protein-based phylogenetic tree for gram-positive bacteria derived from *hrcA*, a unique heat-shock regulatory gene. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (4), 1387-1394.
- AL DACCAK, R., MEHINDATE, K., HEBERT, J., RINK, L., MECHERI, S., and MOURAD, W. 1994. *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen induces proinflammatory monokine gene expression in the THP-1 human monocytic cell line. *Infect. Immun.* 62, 2409-2416.
- ALBERS, A. C. and FLETCHER, R. D. 1982. Simple method for quantitation of viable mycoplasmas. *Appl. Environ. Microbiol.* 43, 958-960.
- ALMAGOR, M., YATZIV, S., and KAHANE, I. 1983. Inhibition of host-cell catalase by *Mycoplasma pneumoniae* - a possible mechanism for cell injury. *Infect. Immun.* 41, 251-256.
- ALSTROM, I. 1955. Filterable pleomorphic organisms resistant to antibiotics and pasteurization, isolated from milk. *Nord. Hyg. Tidskr.* 36, 230-232.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W., and LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
- ALUOTTO, B. B., WITTLER, R. G., WILLIAMS, C. O., and FABER, J. E. 1970. Standardized bacteriologic techniques for the characterization of *Mycoplasma* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20, 35-38.
- AMMAR, A. M., SABRY, M. Z., and KIRCHHOFF, H. 1980. Distribution of mycoplasmas in field and laboratory rodents in Egypt. *Z. Verstierkd* 22, 216-223.
- ANANTHAN, J., GOLDBERG, A. L., and VOELLMY, R. 1986. Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 232, 522-524.
- ANDERTON, S. M., VAN DER ZEE R., PRAKKEN, B., NOORDZIJ, A., and VAN EDEN, W. 1995. Activation of T cells recognizing self 60-kD heat shock protein can protect against experimental arthritis. *J. Exp. Med.* 181, 943-952.
- ASKAA, G. and ERNØ, H. 1976. Elevation of *Mycoplasma agalactiae* subsp *bovis* to species rank - *Mycoplasma bovis* (Hale *et al.*) comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 26, 323-325.
- ATHAMNA, A., KRAMER, M. R., and KAHANE, I. 1996. Adherence of *Mycoplasma pneumoniae* to human alveolar macrophages. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 15, 135-141.
- AVRON, A. and GALLILY, R. 1995. Mycoplasma stimulates the production of oxidative radicals by murine peritoneal-macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 57, 264-268.
- BAARSCH, M. J., WANNEMUEHLER, M. J., MOLITOR, T. W., and MURTAUGH, M. P. 1991. Detection of tumor necrosis factor-alpha from porcine alveolar macrophages using an L929 fibroblast bioassay. *J. Immunol. Methods* 140, 15-22.
- BALDAUF, S. L., PALMER, J. D., and DOOLITTLE, W. F. 1996. The root of the universal tree and the origin of eukaryotes based on elongation factor phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7749-7754.
- BARDWELL, J. C. and CRAIG, E. A. 1984. Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible *dnaK* gene are homologous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 848-852.

- BARILE, M. F., YOSHIDA, H., and ROTH, H. 1991. Rheumatoid arthritis: New findings on the failure to isolate or detect mycoplasmas by multiple cultivation or serologic procedures and a review of the literature. *Rev. Infect. Dis.* 13, 571-582.
- BARRACLOUGH, R. and ELLIS, R. J. 1980. Protein synthesis in chloroplasts. IX. Assembly of newly-synthesized large subunits into ribulose biphosphate carboxylase in isolated intact pea chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* 608, 19-31.
- BASEMAN, J. B., REDDY, S. P., and DALLO, S. F. 1996. Interplay between mycoplasma surface proteins, airway cells, and the protean manifestations of mycoplasma-mediated human infections. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 137-144.
- BASEMAN, J. B. and TULLY, J. G. 1997. Mycoplasmas: Sophisticated, reemerging, and burdened by their notoriety. *Emerg. Infect. Dis.* 3, 21-32.
- BEHRENS, A., HELLER, M., KIRCHHOFF, H., YOGEV, D., and ROSENGARTEN, R. 1994. A family of phase-variant and size-variant membrane-surface lipoprotein antigens (Vsps) of *Mycoplasma bovis*. *Infect. Immun.* 62, 5075-5084.
- BEHRENS, A., HELLER, M., ROSENBUSCH, R., and KIRCHHOFF, H. 1996. Immunoelectron microscopic localization of variable proteins on the surface of *Mycoplasma bovis*. *Microbiology (Read)* 142, 1863-1871.
- BEISSINGER, M. and BUCHNER, J. 1998. How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* 379, 245-259.
- BENJAMIN, I. J. and WILLIAMS, R. S. 1994. Expression and function of stress proteins in the ischemic heart. In: R. E. Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgopoulos (Hrsg.), *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Plainview, New York, USA, S. 533-553.
- BENNETT, R. H. and JASPER, D. E. 1980. Bovine mycoplasmal mastitis from intra-mammary inoculations of small numbers of *Mycoplasma bovis* - local and systemic antibody response. *Am. J. Vet. Res.* 41, 889-892.
- BERGONIER, D., BERTHELOT, X., and POUMARAT, F. 1997. Contagious agalactia of small ruminants: Current knowledge concerning epidemiology, diagnosis and control. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 16, 848-873.
- BERGONIER, D. and POUMARAT, F. 1996. Contagious agalactia of small ruminants: Epidemiology, diagnosis and control. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 15, 1431-1475.
- BEY, R. F., LARSON, M. E., LOWERY, D. E., LEE, B. W., KNUTSON, K. S., SIMONSON, R. R., and KING, V. L. 1995. Protection of C3H/He mice from experimental *Borrelia burgdorferi* infection by immunization with a 110-kilodalton fusion protein. *Infect. Immun.* 63, 3213-3217.
- BIBERFELD, G. 1977. Activation of human lymphocyte subpopulations by *Mycoplasma pneumoniae*. *Scand. J. Immunol.* 6, 1145-1150.
- BIBERFELD, G. 1985. Infection sequelae and autoimmune reactions in *Mycoplasma pneumoniae* infection. In: S. Razin and M. F. Barile (Hrsg.), *The mycoplasmas*. Academic Press, Orlando, San Diego, USA, S. 533-553.
- BIBERFELD, G. and GRONOWICZ, E. 1976. *Mycoplasma pneumoniae* is a polyclonal B-cell activator. *Nature* 261, 238-239.
- BINDER, A. 1990. Vorkommen und Bedeutung von Mykoplasmen bei Rindern und Schweinen. *Prakt. Tierarzt* 71, 22-25.
- BINDER, A., AMTSBERG, G., DOSE, S., FISCHER, W., SCHOLZ, H., and KIRCHHOFF, H. 1990a. Isolation of mycoplasmas and bacteria from cattle with respiratory diseases. *Zentralbl. Veterinärmed. B* 37, 430-435.

- BINDER, A., GÄRTNER, K., HEDRICH, H. J., HERMANN, W., KIRCHHOFF, H., and WONIGEIT, K. 1990b. Strain differences in sensitivity of rats to *Mycoplasma arthritidis* ISR1 infection are under multiple gene control. *Infect. Immun.* 58, 1584-1590.
- BLANCHARD, B., VENA, M. M., CAVALIER, A., LELANNIC, J., GOURANTON, J., and KOBISCH, M. 1992. Electron-microscopic observation of the respiratory tract of spf piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Microbiol.* 30, 329-341.
- BLANDER, S. J. and HORWITZ, M. A. 1993. Major cytoplasmic membrane protein of *Legionella pneumophila*, a genus common antigen and member of the hsp60 family of heat shock proteins, induces protective immunity in a guinea pig model of Legionnaires' disease. *J. Clin. Investig.* 91, 717-723.
- BLUM, H., BEIER, H., and GROSS, H. J. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- BOUGHTON, E. and WILSON, C. D. 1978. *Mycoplasma bovis* mastitis. *Vet. Rec.* 103, 70-71.
- BOVE, J. M. 1993. Molecular features of *Mollicutes*. *Clin. Infect. Dis.* 17, 10-31.
- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- BRENNER, C., WROBLEWSKI, H., LEHENAFF, M., MONTAGNIER, L., and BLANCHARD, A. 1997. Spiralin, a mycoplasmal membrane lipoprotein, induces T-cell-independent B-cell blastogenesis and secretion of proinflammatory cytokines. *Infect. Immun.* 65, 4322-4329.
- BUCHMEIER, N. A. and HEFFRON, F. 1990. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. *Science* 248, 730-732.
- BUKAU, B. 1993. Regulation of the *Escherichia coli* heat-shock response. *Mol. Microbiol.* 9, 671-680.
- BUKAU, B., DEUERLING, E., PFUND, C., and CRAIG, E. A. 2000. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* 101, 119-122.
- BUKAU, B. and HORWICH, A. L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92, 351-366.
- BULT, C. J., WHITE, O., OLSEN, G. J., ZHOU, L., FLEISCHMANN, R. D., SUTTON, G. G., BLAKE, J. A., FITZGERALD, L. M., CLAYTON, R. A., GOCAYNE, J. D., KERLAVAGE, A. R., DOUGHERTY, B. A., TOMB, J. F., ADAMS, M. D., REICH, C. I., OVERBEEK, R., KIRKNESS, E. F., WEINSTOCK, K. G., MERRICK, J. M., GLODEK, A., SCOTT, J. L., GEOGHAGEN, N. S., and VENTER, J. C. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273, 1058-1073.
- BURNETT, W. N. 1981. "Westernblotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium-dodecylsulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112, 195-203.
- BUSCHE, K., SCHLESIER, M., RUNGE, M., BINDER, A., and KIRCHHOFF, H. 1990. T-cell lines responding to *Mycoplasma arthritidis* and chondrocytes in the *Mycoplasma arthritidis* infection of rats. *Immunobiology* 181, 398-405.
- BUTTERY, S. H., COTTEW, G. S., and LLOYD, L. C. 1980. Effect of soluble factors from *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* on the collagen content of bovine connective tissue. *J. Comp. Pathol.* 90, 303-314.
- CAHILL, J. F., COLE, B. C., WILEY, B. B., and WARD, J. R. 1971. Role of biological mimicry in pathogenesis of rat arthritis induced by *Mycoplasma arthritidis*. *Infect. Immun.* 3, 24-35.

- CALSAMIGLIA, M., PIJOAN, C., and TRIGO, A. 1999. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. J. Vet. Diagn. Invest 11, 246-251.
- CANNON, G. W., COLE, B. C., WARD, J. R., SMITH, J. L., and EICHWALD, E. J. 1988. Arthritogenic effects of *Mycoplasma arthritidis* T-cell mitogen in rats. J. Rheumatol. 15, 735-741.
- CARSWELL, E. A., OLD, L. J., KASSEL, R. L., GREEN, S., FIORE, N., and WILLIAMSON, B. 1975. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3666-3670.
- CASEY, D. G., LYSAGHT, J., JAMES, T., BATEMAN, A., MELCHER, A. A., and TODRYK, S. M. 2003. Heat shock protein derived from a non-autologous tumour can be used as an anti-tumour vaccine. Immunology 110, 105-111.
- CASSEL, G. H. and A. HILL. 1979. Murine and other small animal mycoplasmas. In: J. G. Tully and R. F. Whitcomb (Hrsg.), Human and animal mycoplasmas. 2. Aufl. Academic Press, New York/ San Francisco, USA, 235-273.
- CASTANO, L. and EISENBARTH, G. S. 1990. Type-I diabetes: A chronic autoimmune disease of human, mouse, and rat. Annu. Rev. Immunol. 8, 647-679.
- CAVAILLON, J. M. 1994. Cytokines and macrophages. Biomed. Pharmacother. 48, 445-453.
- CHANOCK, R. M. 1963. *Mycoplasma pneumoniae* - proposed nomenclature for atypical pneumonia organism (Eaton Agent). Science 140, 662-664.
- CHATTIN-KACOURIS, B. R., ISHIHARA, K., MIURA, T., OKUDA, K., IKEDA, M., ISHIKAWA, T., and ROWLAND, R. 2002. Heat shock protein of *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma orale* strains isolated from HIV-seropositive patients. Bull. Tokyo Dent. Coll. 43, 231-236.
- CHEETHAM, M. E., JACKSON, A. P., and ANDERTON, B. H. 1994. Regulation of 70-kDa heat-shock-protein ATPase activity and substrate binding by human DnaJ-like proteins, HSJ1a and HSJ1b. Eur. J. Biochem. 226, 99-107.
- CHEN, Y. L., WANG, S. N., YANG, W. J., CHEN, Y. J., LIN, H. H., and SHIUAN, D. 2003. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. Infect. Immun. 71, 1155-1160.
- CHENG, M. Y., HARTL, F. U., MARTIN, J., POLLOCK, R. A., KALOUSEK, F., NEUPERT, W., HALLBERG, E. M., HALLBERG, R. L., and HORWICH, A. L. 1989. Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. Nature 337, 620-625.
- CHILES, T. C., O'BRIEN, T. W., and KILBERG, M. S. 1987. Production of monospecific antibodies to a low-abundance hepatic membrane protein using nitrocellulose immobilized protein as antigen. Anal. Biochem. 163, 136-142.
- CHMURA, K., LUTZ, R. D., CHIBA, H., NUMATA, M. S., CHOI, H. J., FANTUZZI, G., VOELKER, D. R., and CHAN, E. D. 2003. *Mycoplasma pneumoniae* antigens stimulate Interleukin-8. Chest 123, 425.
- CHOU, S. Y., CHUNG, T. L., CHEN, R. J., RO, L. H., TSUI, P. I., and SHIUAN, D. 1997. Molecular cloning and analysis of a Hsp (heat shock protein)-like 42 kDa antigen gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Biochem. Mol. Biol. Int. 41, 821-831.
- CHRISTIANSEN, C. 1987a. The mycoplasma genome. 1. Microbiol. Sci. 4, 168-172.
- CHRISTIANSEN, C. 1987b. The mycoplasma genome. 2. Microbiol. Sci. 4, 292-295.
- CHRISTIANSEN, C., CHRISTIANSEN, G., and RASMUSSEN, O. F. 1987a. Heterogeneity of *Mycoplasma hominis* as detected by a probe for ATP genes. Isr. J. Med. Sci. 23, 591-594.

- CHRISTIANSEN, G., ANDERSEN, H., BIRKELUND, S., and FREUNDT, E. A. 1987b. Genomic and gene variation in *Mycoplasma hominis* strains. *Isr. J. Med. Sci.* 23, 595-602.
- CLARK, L. K., ARMSTRONG, C. H., FREEMAN, M. J., SCHEIDT, A. B., SANDSFREEMAN, L., and KNOX, K. 1991. Investigating the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd with enzootic pneumonia. *J. Vet. Med. A* 86, 543-550.
- CLYDE, W. A. 1979. *Mycoplasma pneumoniae* infections of man. In: J. G. Tully and R. F. Whitcomb (Hrsg.), *The mycoplasmas*. Academic Press, New York, San Francisco, USA, 75-303.
- COLE, B. C. 1996. Mycoplasma interactions with the immune system: Implications for disease pathology. *ASM News* 62, 471-475.
- COLE, B. C., AHMED, E., ARANEO, B. A., SHELBY, J., KAMERATH, C., WEI, S. H., McCALL, S., and ATKIN, C. L. 1993. Immunomodulation *in vivo* by the *Mycoplasma arthritidis* superantigen, MAM. *Clin. Infect. Dis.* 17, 163-169.
- COLE, B. C. and ATKIN, C. L. 1991. The *Mycoplasma arthritidis* T-cell mitogen, MAM - a model superantigen. *Immunol. Today* 12, 271-276.
- COLE, B. C., CAHILL, J. F., WILEY, B. B., and WARD, J. R. 1969. Immunological responses of the rat to *Mycoplasma arthritidis*. *J. Bacteriol.* 98, 930-937.
- COLE, B. C. and GRIFFITHS, M. M. 1993. Triggering and exacerbation of autoimmune arthritis by the *Mycoplasma arthritidis* superantigen MAM. *Arthritis Rheum.* 36, 994-1002.
- COLE, B. C., MU, H. H., and SAWITZKE, A. D. 2000. The mycoplasma superantigen MAM: Role in arthritis and immune-mediated disease. *Int. J. Med. Microbiol.* 290, 489-490.
- COLE, B. C. and WARD, J. R. 1979. Mycoplasmas as arthritogenic agents. In: J.G.Tully and R.F.Whitcomb (Hrsg.), *The mycoplasmas*, 2, Human and animal mycoplasmas Academic Press, New York, San Francisco, USA, S. 367-398.
- COLE, B. C., WARD, J. R., and MARTIN, C. H. 1968. Hemolysin and peroxide activity of *Mycoplasma* species. *J. Bacteriol.* 95, 2022-2030.
- COLLIER, W. A. 1939. Infectious polyarthritis of rats. *J. Pathol. Bacteriol.* 48, 579-589.
- CORBOZ, L., KELLER, H., WALDVOGEL, A., and WEIDELI, U. 1980. Spontaneous and experimental cases of polyarthritis and polysynovitis in calves due to *Mycoplasma* 2. Bacteriological and pathological-anatomical findings. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 122, 479-491.
- COTTEW, G. S. 1984. Overview of mycoplasmoses in sheep and goats. *Isr. J Med. Sci.* 20, 962-964.
- CRAIG, E. A., GAMBILL, B. D., and NELSON, R. J. 1993. Heat shock proteins: Molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* 57, 402-414.
- CRAIG, E. A. and JACOBSEN, K. 1985. Mutations in cognate genes of *Saccharomyces cerevisiae* hsp70 result in reduced growth rates at low temperatures. *Mol. Cell Biol.* 5, 3517-3524.
- CRAIG, E. A., KRAMER, J., SHILLING, J., WERNER-WASHBURNE, M., HOLMES, S., KOSIC-SMITHERS, J., and NICOLET, C. M. 1989. SSC1, an essential member of the yeast Hsp70 multigene family encodes a mitochondrial protein. *Mol. Cell Biol.* 9, 3000-3008.
- CROW, M. K., ZAGON, G., CHU, Z. Q., RAVINA, B., TUMANG, J. R., COLE, B. C., and FRIEDMAN, S. M. 1992. Human B-cell differentiation induced by microbial superantigens - unselected peripheral blood lymphocytes secrete polyclonal immunoglobulin in response to *Mycoplasma arthritidis* mitogen. *Autoimmunity* 14, 23-32.
- DAMASSA, A. J., WAKENELL, P. S., and BROOKS, D. L. 1992. Mycoplasmas of goats and sheep. *J. Vet. Diagn. Invest.* 4, 101-113.

- DASCHER, C. C. and MANILOFF J. 1992. Heat shock response. In: Maniloff J., McElhaney R.N., Finch L.R., and Baseman J.B. (Hrsg.), *Mycoplasmas. Molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, S. 349-354.
- DASCHER, C. C., PODDAR, S. K., and MANILOFF, J. 1990. Heat shock response in mycoplasmas, genome-limited organisms. *J. Bacteriol.* 172, 1823-1827.
- DEBEY, M. C. and ROSS, R. F. 1994. Ciliostasis and loss of cilia induced by *Mycoplasma hyopneumoniae* in porcine tracheal organ cultures. *Infect. Immun.* 62, 5312-5318.
- DELBECK, F. 1995. Erfolgskontrolle einer oralen Chlortetrazyklin-Behandlung bei lungenkranken Schweinen mittels bronchoalveolärer Lavage. Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- DEUERLING, E., SCHULZE-SPECKING, A., TOMOYASU, T., MOGK, A., and BUKAU, B. 1999. Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature* 400, 693-696.
- DINARELLO, C. A. 1992. Role of interleukin-1 in infectious diseases. *Immunol. Rev.* 127, 119-146.
- DITZEL, L., LOWE, J., STOCK, D., STETTER, K. O., HUBER, H., HUBER, R., and STEINBACHER, S. 1998. Crystal structure of the thermosome, the archaeal chaperonin and homolog of CCT. *Cell* 93, 125-138.
- DUDLER, R., SCHMIDHAUSER, C., PARISH, R. W., WETTENHALL, R. E. H., and SCHMIDT, T. 1988. A mycoplasma high-affinity transport-system and the *in vitro* invasiveness of mouse sarcoma-cells. *EMBO Journal* 7, 3963-3970.
- DULBECCO, R. and VOGT, M. 1954. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J. Exp. Med.* 99, 167-182.
- DYBVIG, K. and KHALED, M. 1990. Isolation of a 2nd cryptic plasmid from *Mycoplasma mycoides* subsp *mycoides*. *Plasmid* 24, 153-155.
- EAGLESOME, M. D. and GARCIA, M. M. 1990. The effect of *Mycoplasma bovis* on fertilization processes *in vitro* with bull spermatozoa and zona-free hamster oocytes. *Vet. Microbiol.* 21, 329-337.
- EATON, M. D., MEIKLEJOHN, G., and VAN HERICK, W. 1944. Studies on the etiology of primary atypical pneumonia. A filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters, and chicken embryos. *J. Exp. Med.* 79, 649-668.
- ELIAS, D., MARKOVITS, D., RESHEF, T., VAN DER, Z. R., and COHEN, I. R., 1990. Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1576-1580.
- ELLIS, R. J. and VAN DER VIES, S. M. 1991. Molecular chaperones. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 321-347.
- ERBSE, A., MAYER, M. P., and BUKAU, B. 2004. Mechanism of substrate recognition by Hsp70 chaperones. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 617-621.
- FALAH, M. and GUPTA, R. S. 1997. Phylogenetic analysis of mycoplasmas based on Hsp70 sequences: Cloning of the *dnaK* (hsp70) gene region of *Mycoplasma capricolum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47, 38-45.
- FEIZI, T. and LOVELESS, R. W. 1996. Carbohydrate recognition by *Mycoplasma pneumoniae* and pathologic consequences. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154, 133-136.
- FERNALD, G. W. 1972. *In vitro* response of human lymphocytes to *Mycoplasma pneumoniae*. *Infect. Immun.* 5, 552-558.

- FERNALD, G. W. 1979. Humoral and cellular immune responses to mycoplasmas. In: J. G. Tully and R. F. Whitcomb (Hrsg.), *The mycoplasmas*. Academic Press, New York, San Francisco, USA, S. 399-423.
- FERRIS, D. K., HAREL-BELLAN, A., MORIMOTO, R. I., WELCH, W. J., and FARRAR, W. L. 1988. Mitogen and lymphokine stimulation of heat shock proteins in T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 3850-3854.
- FIELDS, P. I., SWANSON, R. V., HAIDARIS, C. G., and HEFFRON, F. 1986. Mutants of *Salmonella typhimurium* that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 5189-5193.
- FLICK, D. A. and GIFFORD, G. E. 1984. Comparison of *in vitro* cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. *J. Immunol. Methods* 68, 167-175.
- FOY, H. M. 1993. Infections caused by *Mycoplasma pneumoniae* and possible carrier state in different populations of patients. *Clin. Infect. Dis.* 17, 37-46.
- FRIEDLAND, J. S., SHATTOCK, R., REMICK, D. G., and GRIFFIN, G. E. 1993. Mycobacterial 65-kD heat shock protein induces release of proinflammatory cytokines from human monocytic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 91, 58-62.
- FRIIS, N. F. 1974. Mycoplasmas in pigs with special regard to the respiratory tract. Dissertation, Royal Veterinary and Agriculture University, København, Danmark.
- FRYDMAN, J., NIMMESGERN, E., ERDJUMENT-BROMAGE, H., WALL, J. S., TEMPST, P., and HARTL, F. U. 1992. Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. *EMBO Journal* 11, 4767-4778.
- FRYDMAN, J., NIMMESGERN, E., OHTSUKA, K., and HARTL, F. U. 1994. Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. *Nature* 370, 111-117.
- FUJINAMI, R. S. and OLDSTONE, M. B. A. 1985. Amino-acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic-protein and virus - mechanism for autoimmunity. *Science* 230, 1043-1045.
- GALDIERO, M., DE LERO, G. C., and MARCATILI, A., 1997. Cytokine and adhesion molecule expression in human monocytes and endothelial cells stimulated with bacterial heat shock proteins. *Infect. Immun.* 65, 699-707.
- GALLEY, K. A., SINGH, B., and GUPTA, R. S. 1992. Cloning of Hsp70 (*dnaK*) gene from *Clostridium perfringens* using a general polymerase chain reaction based approach. *Biochim. Biophys. Acta* 1130, 203-208.
- GANTER, M., KIPPER, S., SCHÖTTGER-WEGENER, H., BECKMANN, G., und BUNKA, S. 1993. Pneumoniediagnostik am lebenden Schwein mit Hilfe der Lungenspülung. *Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.* 106, 330-333.
- GASTON, J. S., LIFE, P. F., JENNER, P. J., COLSTON, M. J., and BACON, P. A. 1990. Recognition of a mycobacteria-specific epitope in the 65-kD heat-shock protein by synovial fluid-derived T cell clones. *J. Exp. Med.* 171, 831-841.
- GEARY, S. J., TOURTELLOTTE, M. E., and CAMERON, J. A. 1981. Inflammatory toxin from *Mycoplasma bovis* - isolation and characterization. *Science* 212, 1032-1033.
- GEARY, S. J. and WALCZAK, E. M. 1983. Cytopathic effect of whole cells and purified membranes of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infect. Immun.* 41, 132-136.

- GEORGOPOULOS, C. and HERSKOWITZ, I. 1971. *Escherichia coli* mutants blocked in Lambda DNA synthesis. In: A. D. Hershey (Hrsg.), The bacteriophage Lambda. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York, USA, S. 553-564.
- GEORGOPOULOS, C. and WELCH, W. J. 1993. Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9, 601-634.
- GEORGOPOULOS, C. P., HENDRIX, R. W., KAISER, A. D., and WOOD, W. B. 1972. Role of the host cell in bacteriophage morphogenesis: Effects of a bacterial mutation on T4 head assembly. *Nat. New Biol.* 239, 38-41.
- GETHING, M. J. and SAMBROOK, J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33-45.
- GILSON, E., ALLOING, G., SCHMIDT, T., CLAVERYS, J. P., DUDLER, R., and HOFNUNG, M. 1988. Evidence for high-affinity binding-protein dependent transport-systems in gram-positive bacteria and in mycoplasma. *EMBO Journal* 7, 3971-3974.
- GLOVER, J. R. and LINDQUIST, S. 1998. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 94, 73-82.
- GOFF, S. A. and GOLDBERG, A. L. 1985. Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of lon and other heat shock genes. *Cell* 41, 587-595.
- GOLOUBINOFF, P., MOGK, A., ZVI, A. P., TOMOYASU, T., and BUKAU, B. 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13732-13737.
- GRAEFF-MEEDER, E. R., RIJKERS, G. T., VOORHORST-OGINK, M. M., KUIS, W., VAN DER, Z. R., VAN EDEN, W., and ZEGERS, B. J. 1993. Antibodies to human Hsp60 in patients with juvenile chronic arthritis, diabetes mellitus, and cystic fibrosis. *Pediatr. Res.* 34, 424-428.
- GRAEFF-MEEDER, E. R., VOORHORST, M., VAN EDEN, W., SCHUURMAN, H. J., HUBER, J., BARKLEY, D., MAINI, R. N., KUIS, W., RIJKERS, G. T., and ZEGERS, B. J. 1990. Antibodies to the mycobacterial 65-kd heat-shock protein are reactive with synovial tissue of adjuvant arthritic rats and patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Am. J. Pathol.* 137, 1013-1017.
- GUMMELT, I. 1995. Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Differenzierung von *Mycoplasma bovis* und *Mycoplasma agalactiae*. Dissertation, Fachbereich Biologie, Universität Hannover.
- GUMMELT, I., HOTZEL, H., RUNGE, M., and KIRCHHOFF, H. 1996. Taxonomic relationship between *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae*. In: J. Frey and K. Sarris (Hrsg.), Report of the COST Action 826 "Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics", European Commission, S. 27-29.
- HARMALA, L. A., INGULLI, E. G., CURTSINGER, J. M., LUCIDO, M. M., SCHMIDT, C. S., WEIGEL, B. J., BLAZAR, B. R., MESCHER, M. F., and PENNELL, C. A. 2002. The adjuvant effects of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 result from the rapid and prolonged activation of antigen-specific CD8+ T cells in vivo. *J. Immunol.* 169, 5622-5629.
- HARMSSEN, A. G., BIRMINGHAM, J. R., ENGEN, R. L., and JESKA, E. L. 1979. A method for obtaining swine alveolar macrophages by segmental pulmonary lavage. *J. Immunol. Methods* 27, 199-202.
- HARTL, F. U. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-579.
- HARWICK, H. J., MAHONEY, A. D., KALMANSON, G. M., and GUZE, L. B. 1976. Arthritis in mice due to infection with *Mycoplasma pulmonis*. II. Serological and histological features. *J. Infect. Dis.* 133, 103-112.

- HEMMINGSSEN, S. M., WOOLFORD, C., VAN DER VIES, S. M., TILLY, K., DENNIS, D. T., GEORGOPOULOS, C. P., HENDRIX, R. W., and ELLIS, R. J. 1988. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* 333, 330-334.
- HENNIG, I., TEUTENBERG-RIEDEL, B., and GERLACH, G. F. 1999. Downregulation of a protective *Actinobacillus pleuropneumoniae* antigen during the course of infection. *Microb. Pathog.* 26, 53-63.
- HENRICH, B., FELDMANN, R. C., and HADDING, U. 1993. Cytoadhesins of *Mycoplasma-hominis*. *Infect. Immun.* 61, 2945-2951.
- HENSEL, A., GANTER, M., KIPPER, S., KREHON, S., WITTENBRINK, M. M., and PETZOLDT, K. 1994. Prevalence of aerobic bacteria in bronchoalveolar lavage fluids from healthy pigs. *Am. J. Vet. Res.* 55, 1697-1702.
- HERBELIN, A., RUUTH, E., DELORME, D., MICHELHERBELIN, C., and PRAZ, F. 1994. *Mycoplasma arginini* Tuh-14 membrane lipoproteins induce production of interleukin-1, interleukin-6, and tumor-necrosis-factor-alpha by human monocytes. *Infect. Immun.* 62, 4690-4694.
- HERMANN, E., LOHSE, A. W., VAN DER, Z. R., VAN EDEN, W., MAYET, W. J., PROBST, P., PORALLA, T., MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H., and FLEISCHER, B. 1991. Synovial fluid-derived *Yersinia*-reactive T cells responding to human 65-kDa heat-shock protein and heat-stressed antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* 21, 2139-2143.
- HERMANN, W., SCHULZ, L. C., KIRCHHOFF, H., and HEITMANN, J. 1983. Studies of polyarthritis caused by *Mycoplasma arthritidis* in rats. 3. Histopathological findings. *Zentralbl. Bakteriol. A* 254, 423-434.
- HILL, A. and DAGNALL, G. J. R. 1975. Experimental polyarthritis in rats produced by *Mycoplasma arthritidis*. *J. Comp. Pathol.* 85, 45-52.
- HIMMELREICH, R., HILBERT, H., PLAGENS, H., PIRKL, E., LI, B. C., and HERRMANN, R. 1996. Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res.* 24, 4420-4449.
- HIRANO, T. 1992. The biology of interleukin-6. *Chem. Immunol.* 51, 153-180.
- HOFFMANN, F. and RINAS, U. 2004. Roles of heat-shock chaperones in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 89, 143-161.
- HOLOSHITZ, J., KONING, F., COLIGAN, J. E., DE BRUYN, J., and STROBER, S. 1989. Isolation of CD4-CD8-mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature* 339, 226-229.
- HOMEYER, U., LITEK, K., HUCHZERMEYER, B., and SCHULTZ, G. 1989. Uptake of phenylalanine into isolated barley vacuoles is driven by both tonoplast adenosine triphosphatase and pyrophosphatase. *Plant Physiol.* 89, 1388-1393.
- HOOS, A. and LEVEY, D. L. 2003. Vaccination with heat shock protein-peptide complexes: From basic science to clinical applications. *Vaccines*. 2, 369-379.
- HORST, I., LINDNER, A., KRUGER, M., GINDELE, H. R., and STING, R. 1997. Prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in Germany. Conclusions for the control of enzootic pneumonia in pigs. *Tierärztl. Umsch.* 52, 508-&.
- ILLING, K. 1979. Das klinische Bild experimenteller *Mycoplasma bovis*-Mastitiden beim Rind. *Arch. exp. Veterinärmed.* 33, 945-948.
- JAATTELA, M. and WISSING, D. 1992. Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann. Med.* 24, 249-258.

- JACOBS, E. 1997. Mycoplasma infections of the human respiratory tract. Wien. Klein. Wochenschr. 109, 574-577.
- JACOBS, E., WATTER, T., SCHAEFER, H. E., and BREDT, W. 1991. Comparison of host responses after intranasal infection of guinea pigs with *Mycoplasma genitalium* or with *Mycoplasma pneumoniae*. Microb. Pathog. 10, 221-229.
- JASPER, D. E. 1977. Mycoplasma and mycoplasma mastitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 170, 1167-1172.
- JASPER, D. E. 1981. Bovine mycoplasmal mastitis. Adv. Vet. Sci. Comp. Med. 25, 121-159.
- JASPER, D. E., BOOTHBY, J. T., and THOMAS, C. B. 1987. Pathogenesis of bovine mycoplasma mastitis. Isr. J Med. Sci. 23, 625-627.
- JASPER, D. E., JAIN, N. C., and BRAZIL, L. H. 1966. Clinical and laboratory observations on bovine mastitis due to mycoplasma. J. Am. Vet. Med. Assoc. 148, 1017-1029.
- JOHANSSON, K. E., HELDTANDER, M. U., and PETTERSSON, B. 1998. Characterization of mycoplasmas by PCR and sequence analysis with universal 16S rDNA primers. Methods Mol. Biol. 104, 145-165.
- KARBE, E., NIELSEN, S. W., und HELMBOLDT, C. F. 1967. Pathologie der experimentellen Mykoplasmen-Mastitis beim Rind. Zentralbl. Veterinärmed. B 14, 7-31.
- KAUFMANN, S. H. E. 1990. Heat shock proteins and the immune response. Immunol. Today 11, 129-136.
- KAUFMANN, S. H. E. 1992. The cellular immune response to heat shock proteins. Experientia (Basel) 48, 640-643.
- KEELER, C. L., HNATOW, L. L., WHETZEL, P. L., and DOHMS, J. E. 1996. Cloning and characterization of a putative cytoadhesin gene (mgc1) from *Mycoplasma gallisepticum*. Infect. Immun. 64, 1541-1547.
- KELLY, S. and YENARI, M. A. 2002. Neuroprotection: Heat shock proteins. Curr. Med. Res. Opin. 18 Suppl. 2, 55-60.
- KENNY, G. E. 1979. Antigenic determinants. In: M. F. Barile and S. Razin (Hrsg.), The mycoplasmas Academic Press, New York, San Francisco, USA, S. 351-385.
- KIESSLING, R., GRONBERG, A., IVANYI, J., SODERSTROM, K., FERM, M., KLEINAU, S., NILSSON, E., and KLARESKOG, L. 1991. Role of Hsp60 during autoimmune and bacterial inflammation. Immunol. Rev. 121, 91-111.
- KING, K. W. and DYBVIG, K. 1994. Mycoplasmal cloning vectors derived from plasmid pkmk1. Plasmid 31, 49-59.
- KIRCHHOFF, H. 1982. *Acholeplasma* and *Mycoplasma* species in the genital-tract of cattle, horses and swine. Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr. 95, 121-125.
- KIRCHHOFF, H. 1988. Mykoplasmen beim Schwein. In: Aktuelles zur Verhütung und Bekämpfung übertragbarer Tierkrankheiten. DVG, Fachgruppe Tierseuchenrecht, Hannover, S. 74-87.
- KIRCHHOFF, H. 1992. Motility. In: Maniloff J., McElhaney R.N., Finch L.R., and Baseman J. (Hrsg.), Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA. S. 289-306
- KIRCHHOFF, H. and BINDER, A. 1986. Investigations about the occurrence of *Mycoplasma bovis* and other mycoplasma species in cattle of the northern part of Germany. Zentralbl. Veterinärmed. B, 33, 68-72.

- KIRCHHOFF, H., BINDER, A., RUNGE, M., MEIER, B., JACOBS, R., and BUSCHE, K. 1989. Pathogenetic mechanisms in the *Mycoplasma arthritidis* polyarthritis of rats. *Rheumatol. Int.* 9, 193-196.
- KIRCHHOFF, H. and FLOSSDORF, J. 1987. Determination of the guanine-plus-cytosine content of *Mollicutes* by isopycnic gradient centrifugation. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37, 454-455.
- KIRCHHOFF, H., HEITMANN, J., AMMAR, A., HERMANN, W., and SCHULZ, L. C. 1983. Studies of polyarthritis caused by *Mycoplasma arthritidis* in rats. 1. Detection of the persisting mycoplasma antigen by the enzyme immune assay (EIA) and conventional culture technique. *Zentralbl. Bakteriol. A*, 254, 129-138.
- KIRCHHOFF, H., HEITMANN, J., DUBENKROPP, H., and SCHMIDT, R. 1984. Antigenic cross-reactions between *Mycoplasma arthritidis* and rat tissues. *Vet. Microbiol.* 9, 237-248.
- KIRCHHOFF, H. and RUNGE, M. 1998. 100 years mycoplasmas - pathogenicity for domestic and farm animals. *Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.* 111, 387-392.
- KIRKPATRICK, B. C. and SMART, C. D. 1995. Phytoplasmas: Can phylogeny provide the means to understand pathogenicity? *Adv. Bot. Res.* 21, 187-212.
- KITA, M., OHMOTO, Y., HIRAI, Y., YAMAGUCHI, N., and IMANISHI, J. 1992. Induction of cytokines in human peripheral blood mononuclear cells by mycoplasmas. *Microbiol. Immunol.* 36, 507-516.
- KLUMPP, M. and BAUMEISTER, W. 1998. The thermosome: Archetype of group II chaperonins. *FEBS Lett.* 430, 73-77.
- KOBISCH, M., BLANCHARD, B., and LE POTIER, M. F. 1993. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: Duration of the disease and resistance to reinfection. *Vet. Res.* 24, 67-77.
- KOBISCH, M. and FRIIS, N. F. 1996. Swine mycoplasmoses. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 15, 1569-1605.
- KOGA, T., WAND-WÜRTTENBERGER, A., DEBRUYN, J., MUNK, M. E., SCHOEL, B., and KAUFMANN, S. H. E. 1989. T cells against a bacterial heat shock protein recognize stressed macrophages. *Science* 245, 1112-1115.
- KOTANI, H. and McGARRITY, G. J. 1985. Rapid and simple identification of mycoplasmas by immunobinding. *J. Immunol. Methods* 85, 257-267.
- KRAUSE, D. C. 1996. *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: Unravelling the tie that binds. *Mol. Microbiol.* 20, 247-253.
- KRAUSE, D. C. and TAYLOR-ROBINSON, D. 1992. Mycoplasmas which infect humans. In: Maniloff J., McElhaney R.N., Finch L.R., and J. B. Baseman (Hrsg.), *Mycoplasmas: Molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, S. 417-444
- KRÜGER, M. 1985. Biologische und biochemische Charakterisierung der Zellmembran von *Mycoplasma arthritidis* ISR1 und eines toxischen Membranfaktors. Dissertation, Fachbereich Biologie, Universität Hannover.
- KRÜGER, M., PATEL, B., and KIRCHHOFF, H. 1984. Toxic properties of the *Mycoplasma arthritidis* ISR1 membrane. *Ann. Microbiol. (Paris) A*, 135, 103-109.
- KWOK, A. Y., SU, S. C., REYNOLDS, R. P., BAY, S. J., AV-GAY, Y., DOVICH, N. J., and CHOW, A. W. 1999. Species identification and phylogenetic relationships based on partial Hsp60 gene sequences within the genus *Staphylococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 (3), 1181-1192.

- KYRIAKIS, S. C., ALEXOPOULOS, C., VLEMMAS, J., SARRIS, K., LEKKAS, S., KOUTSOVITI-PAPADOPOULOU, M., and SAOULIDIS, K. 2001. Field study on the efficacy of two different vaccination schedules with HYORESP in a *Mycoplasma hyopneumoniae*-infected commercial pig unit. *J. Vet. Med. B*, 48, 675-684.
- LABER, G., WALZL, H., und SCHÜTZE, E. 1975. Klinische und histopathologische Befunde bei der Mykoplasmen-Polyarthrits der Ratte. I. Der Ablauf dder Infektion in den ersten 8 Tagen. *Zentralbl. Bakteriol. A*, 230, 385-397.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- LAMB, D. J., EL SANKARY, W., and FERNS, G. A. 2003. Molecular mimicry in atherosclerosis: A role for heat shock proteins in immunisation. *Atherosclerosis* 167, 177-185.
- LAMB, D. J. and FERNS, G. A. 2002. The magnitude of the immune response to heat shock protein-65 following BCG immunisation is associated with the extent of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 165, 231-240.
- LAMB, J. R., BAL, V., MENDEZ-SAMPERIO, P., MEHLERT, A., SO, A., ROTHBARD, J., JINDAL, S., YOUNG, R. A., and YOUNG, D. B. 1989. Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. *Int. Immunol.* 1, 191-196.
- LAMBERT, M. 1987. Contagious agalactia of sheep and goats. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot.* 6, 699-711.
- LAMONT, R. F., ANTHONY, F., MYATT, L., BOOTH, L., FURR, P. M., and TAYLORROBINSON, D. 1990. Production of prostaglandin E2 by human amnion *in vitro* in response to addition of media conditioned by microorganisms associated with chorioamnionitis and preterm labor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 162, 819-825.
- LANDRY, J., CHRETIEN, P., BERNIER, D., NICOLE, L. M., MARCEAU, N., and TANGUAY, R. M. 1982. Thermotolerance and heat shock proteins induced by hyperthermia in rat liver cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 8, 59-62.
- LANGER, T. and NEUPERT, W. 1991. Heat shock proteins Hsp60 and Hsp70: Their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 167, 3-30.
- LASZLO, A. and LI, G. C. 1985. Heat-resistant variants of Chinese hamster fibroblasts altered in expression of heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8029-8033.
- LEFEVRE, P. C., BREARD, A., ALFAROUK, I., and BURON, S. 1987. *Mycoplasma* species F 38 isolated in Chad. *Vet. Rec.* 121, 575-576.
- LEONG, A. S. and GILHAM, P. N. 1989. The effects of progressive formaldehyde fixation on the preservation of tissue antigens. *Pathology* 21, 266-268.
- LI, G. C. 1983. Induction of thermotolerance and enhanced heat shock protein synthesis in Chinese hamster fibroblasts by sodium arsenite and by ethanol. *J. Cell Physiol.* 115, 116-122.
- LI, G. C. and MAK, J. Y. 1985. Induction of heat shock protein synthesis in murine tumors during the development of thermotolerance. *Cancer Res.* 45, 3816-3824.
- LI, M. and WONG, S. L. 1992. Cloning and characterization of the groESL operon from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174, 3981-3992.
- LIBEREK, K., MARSZALEK, J., ANG, D., GEORGOPOULOS, C., and ZYLICZ, M. 1991. *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 2874-2878.
- LINDL, T. und BAUER, J. 1987. Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

- LINDQUIST, S. 1986. The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55, 1151-1191.
- LINDQUIST, S. and CRAIG, E. A. 1988. The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22, 631-677.
- LIU, B., DEFILIPPO, A. M., and LI, Z. 2002. Overcoming immune tolerance to cancer by heat shock protein vaccines. *Mol. Cancer Ther.* 1, 1147-1151.
- LO, S. C., HAYES, M. M., TULLY, J. G., WANG, R. Y., KOTANI, H., PIERCE, P. F., ROSE, D. L., and SHIH, J. W. 1992. *Mycoplasma penetrans* sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 357-364.
- LOHMANN-MATTHES, M. L. 1989. Interaction of macrophages and cytokines. *Curr. Opin. Immunol.* 2, 33-38.
- LUDWIG, W. and SCHLEIFER, K. H. 1994. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 15, 155-173.
- MADANAT, A., ZENDULKOVA, D., and POSPISIL, Z. 2001. Contagious agalactia of sheep and goats. A review. *Acta Vet. BRNO* 70, 403-412.
- MAES, D., VERDONCK, M., DELUYKER, H., and DE KRUIF, A., 1996. Enzootic pneumonia in pigs. *Vet. Q.* 18, 104-109.
- MAKHOUL, N., MERCHAV, S., TATARSKY, I., and NAOT, Y. 1987. Mycoplasma induced *in vitro* production of interleukin-2 and colony-stimulating activity. *Isr. J. Med. Sci.* 23, 480-484.
- MANOLUKAS, J. T., BARILE, M. F., CHANDLER, D. K. F., and POLLACK, J. D. 1988. Presence of anaplerotic reactions and transamination, and the absence of the tricarboxylic-acid cycle in *Mollicutes*. *J. Gen. Microbiol.* 134, 791-800.
- MARCONI, C., NEIMARK, H., RAGOZZINO, A., LAUER, U., and SEEMÜLLER, E. 1999. Chromosome sizes of phytoplasmas composing major phylogenetic groups and subgroups. *Phytopathology* 89, 805-810.
- MARE, C. J. and SWITZER, W. P. 1965. New species: *Mycoplasma hyopneumoniae* - a causative agent of virus pneumoniae. *Vet. Med.* 60, 841-846.
- MATTSSON, J. G., GERSDORF, H., GÖBEL, U. B., and JOHANSSON, K. E. 1991. Detection of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA. *Mol. Cell. Probes* 5, 27-35.
- MATTSSON, J. G., GUSS, B., and JOHANSSON, K. E. 1994. The phylogeny of *Mycoplasma bovis* as determined by sequence analysis of the 16S rRNA gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 115, 325-328.
- MAYER, M. P., RUDIGER, S., and BUKAU, B. 2000. Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates. *Biol. Chem.* 381, 877-885.
- McMULLIN, T. W. and HALLBERG, R. L. 1988. A highly evolutionarily conserved mitochondrial protein is structurally related to the protein encoded by the *Escherichia coli groEL* gene. *Mol. Cell. Biol.* 8, 371-380.
- MEHINDATE, K., AL DACCAR, R., RINK, L., MECHERI, S., HEBERT, J., and MOURAD, W. 1994. Modulation of *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen-induced cytokine gene-expression by dexamethasone and interleukin-4. *Infect. Immun.* 62, 4716-4721.
- MESEGUER, M. A., BAQUERO, F., and BRICIO, M. T. 1996. Kinetics of TNF- α release by murine peritoneal macrophage cells stimulated with different preparations of *Mycoplasma pneumoniae*. *IOM Letters* 4, 144-145.

- MESEGUER, M. A., MARTINEZ-FERRER, M., BURGALETA, C., REDONDO, C., and ALVAREZ, A. 1998. Effect of challenge with opsonized *Mycoplasma pneumoniae* on the TNF- α and IL-1 β production by human macrophages. IOM Letters 5, 144-145.
- MESEGUER, M. A., PACHECO, A., BAQUERO, F., and BRICIO, M. T., 1994. Induction of tumor necrosis factor-alpha by *Mycoplasma pneumoniae* on human alveolar macrophages. IOM Letters 3, 652-653.
- MIERNYK, J. A. and HAYMAN, T. G. 1996. ATPase activity and molecular chaperone function of the stress 70 proteins. Plant Physiol. 110, 419-424.
- MILES, R. J. 1992. Catabolism in *Mollicutes*. J. Gen. Microbiol. 138, 1773-1783.
- MILES, R. J., WADHER, B. J., HENDERSON, C. L., and MOHAN, K. 1988. Increased growth yields of *Mycoplasma* spp. in the presence of pyruvate. Lett. Appl. Microbiol. 7, 149-151.
- MINION, F. C., LEFKOWITZ, E. J., MADSEN, M. L., CLEARY, B. J., SWARTZELL, S. M., and MAHAIRAS, G. G. 2004. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. J. Bacteriol. 186, 7123-7133.
- MINOTA, S., CAMERON, B., WELCH, W. J., and WINFIELD, J. B. 1988a. Autoantibodies to the constitutive 73 kD member of the Hsp70 family of heat shock proteins in systemic lupus erythematosus. J. Exp. Med. 168, 1475-1480.
- MINOTA, S., KOYASU, S., YAHARA, I., and WINFIELD, J. 1988b. Autoantibodies to the heat-shock protein Hsp90 in systemic lupus erythematosus. J. Clin. Invest. 81, 106-109.
- MOGK, A., MAYER, M. P., and DEUERLING, E. 2001. Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential. Biol. unserer Zeit 3, 182-192.
- MOGK, A., MAYER, M. P., and DEUERLING, E. 2002. Mechanisms of protein folding: Molecular chaperones and their application in biotechnology. Chembiochem 3, 807-814.
- MOGK, A., TOMOYASU, T., GOLOUBINOFF, P., RUDIGER, S., RODER, D., LANGEN, H., and BUKAU, B. 1999. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: Prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. EMBO Journal 18, 6934-6949.
- MORGAN, C., POLLARD, J. W., and STANLEY, E. R. 1987. Isolation and characterization of a cloned growth factor dependent macrophage cell line, BAC1.2F5. J. Cell. Physiol. 130, 420-427.
- MÜHLRADT, P. F., KIESS, M., MEYER, H., SÜSSMUTH, R., and JUNG, G., 1997. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from *Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. J. Exp. Med. 185, 1951-1958.
- MÜHLRADT, P. F., KIESS, M., MEYER, H., SÜSSMUTH, R., and JUNG, G. 1998. Structure and specific activity of macrophage-stimulating lipopeptides from *Mycoplasma hyorhinis*. Infect. Immun. 66, 4804-4810.
- MULTHOFF, G., BOTZLER, C., and ISSELS, R. 1998. The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response. Biol. Chem. 379, 295-300.
- MUNK, M. E., SCHOEL, B., MODROW, S., KARR, R. W., YOUNG, R. A., and KAUFMANN, S. H. E. 1989. T lymphocytes from healthy individuals with specificity to self-epitopes shared by the mycobacterial and human 65-kilodalton heat shock protein. J. Immunol. 143, 2844-2849.
- MUNRO, S. and PELHAM, H. R. 1986. An Hsp70-like protein in the ER: Identity with the 78 kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. Cell 46, 291-300.
- MURRAY, P. J. and YOUNG, R. A. 1992. Stress and immunological recognition in host-pathogen interactions. J. Bacteriol. 174, 4193-4196.

- MUTO, A. 1987. The genome structure of *Mycoplasma capricolum*. *Isr. J. Med. Sci.* 23, 334-341.
- NEEDLEMAN, S. B. and WUNSCH, C. D. 1970. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.
- NEIDHARDT, F. C., VANBOGELEN, R. A., and VAUGHN, V. 1984. The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 18, 295-329.
- NEIMARK, H. C. and LANGE, C. S. 1990. Pulse-field electrophoresis indicates full-length mycoplasma chromosomes range widely in size. *Nucleic Acids Res.* 18, 5443-5448.
- NELSON, R. J., ZIEGELHOFFER, T., NICOLET, C., WERNER-WASHBURNE, M., and CRAIG, E. A. 1992. The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell* 71, 97-105.
- NEUHAUS-STEINMETZ, U., XU, C., FRACELLA, F., OBERHEITMANN, B., RICHTER-LANDSBERG, C., and RENSING, L. 1994. Heat shock response and cytotoxicity in C6 rat glioma cells: Structure-activity relationship of different alcohols. *Mol. Pharmacol.* 45, 36-41.
- NICHOLAS, R. 1998. The veterinary significance of mycoplasmas. *Methods Mol. Biol.* 104, 17-23.
- NICHOLAS, R. A. J. and BASHIRUDDIN, J. B. 1995. *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* (small colony variant): The agent of contagious bovine pleuropneumonia and member of the "Mycoplasma mycoides cluster". *J. Comp. Pathol.* 113, 1-27.
- NICHOLAS, R. A. J. and AYLING, R. D. 2003. *Mycoplasma bovis*: Disease, diagnosis, and control. *Res. Vet. Sci.* 74, 105-112.
- NOLL, A. and AUTENRIETH, I. B. 1996. Immunity against *Yersinia enterocolitica* by vaccination with *Yersinia* Hsp60 immunostimulating complexes or *Yersinia* Hsp60 plus interleukin-12. *Infect. Immun.* 64, 2955-2961.
- NOLL, A., BUCHELER, N., BOHN, E., and AUTENRIETH, I. B. 1997. Microbial heat shock proteins as vaccine. *Behring Inst. Mitt.* 87-98.
- NOVER, L. 1990a. Molecular cell biology of the heat stress response. II. *Naturwissenschaften* 77, 359-365.
- NOVER, L. 1990b. Molecular cell biology of the heat stress response. Part I. *Naturwissenschaften* 77, 310-316.
- NOVER, L. and SCHARF, K. D., 1997. Heat stress proteins and transcription factors. *Cell Mol. Life Sci.* 53, 80-103.
- OLSEN, G. J. and WOESE, C. R. 1993. Ribosomal RNA: A key to phylogeny. *FASEB J.* 7, 113-123.
- OSTERMANN, J., VOOS, W., KANG, P. J., CRAIG, E. A., NEUPERT, W., and PFANNER, N. 1990. Precursor proteins in transit through mitochondrial contact sites interact with hsp70 in the matrix. *FEBS Lett.* 277, 281-284.
- PARCELLIER, A., GURBUXANI, S., SCHMITT, E., SOLARY, E., and GARRIDO, C. 2003. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 505-512.
- PEETERMANS, W. E., RAATS, C. J., LANGERMANS, J. A., and VAN FURTH, R. 1994. Mycobacterial heat-shock protein 65 induces proinflammatory cytokines but does not activate human mononuclear phagocytes. *Scand. J. Immunol.* 39, 613-617.
- PELHAM, H. 1988. Heat-shock proteins. Coming in from the cold. *Nature* 332, 776-777.

- PERRIN, J., MULLER, M., ZANGGER, N., and NICOLET, J. 1994. *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC (large colony type) infection in wild goat kids (*Capra aegagrus cretica*) in the zoo of Berne (Switzerland). Schweiz. Arch. Tierheilkd. 136, 270-274.
- PETTERSSON, B., TULLY, J. G., BÖLSKE, G., and JOHANSSON, K. E. 2000. Updated phylogenetic description of the *Mycoplasma hominis* cluster (Weisburg et al. 1989) based on 16S rDNA sequences. Int. J. Syst. Evolut. Microbiol. 50, 291-301.
- PFÜTZNER, H. 1984. *Mycoplasma bovis* infection of cattle. Monatsh. Veterinärmed. 39, 217-220.
- PFÜTZNER, H. and BLAHA, T. 1995. The etiologic and economic importance of *Mycoplasma hyopneumoniae* in the respiratory-disease complex of pigs. Tierärztl. Umsch. 50, 759-&.
- PFÜTZNER, H. and SACHSE, K. 1996. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders in cattle. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. 15, 1477-1494.
- PIETSCH, K. and JACOBS, E. 1993. Characterization of the cellular-response of spleen-cells in Balb/C mice inoculated with *Mycoplasma pneumoniae* or the P1-protein. Med. Microbiol. Immunol. 182, 77-85.
- PLESSET, J., PALM, C., and McLAUGHLIN, C. S. 1982. Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 1340-1345.
- POCKLEY, A. G. 2003. Heat shock proteins as regulators of the immune response. Lancet 362, 469-476.
- POLLA, B. S. 1988. A role for heat shock proteins in inflammation? Immunol. Today 9, 134-137.
- POLLA, B. S. and KANTENGWA, S. 1991. Heat shock proteins and inflammation. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 167, 93-105.
- POLLACK, J. D., WILLIAMS, M. V., and McELHANEY, R. N. 1997. The comparative metabolism of the *Mollicutes* (mycoplasmas): The utility for taxonomic classification and the relationship of putative gene annotation and phylogeny to enzymatic function in the smallest free-living cells. Crit. Rev. Microbiol. 23, 269-354.
- RASCHKE, W. C., BAIRD, S., RALPH, P., and NAKOINZ, I. 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. Cell 15, 261-267.
- RAWADI, G. 2000. *Mycoplasma fermentans* interaction with monocytes/macrophages: Molecular basis. Microbes Infect. 2, 955-964.
- RAWADI, G., RAMEZ, V., LEMERCIER, B., and ROMAN-ROMAN, S. 1998. Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by *Mycoplasma fermentans* membrane lipoproteins in murine macrophages: Involvement in cytokine synthesis. J. Immunol. 160, 1330-1339.
- RAWADI, G. and ROMAN-ROMAN, S. 1996. Mycoplasma membrane lipoproteins induce proinflammatory cytokines by a mechanism distinct from that of lipopolysaccharide. Infect. Immun. 64, 637-643.
- RAZIN, S. 1979. Membrane proteins. In: M. F. Barile and S. Razin (Hrsg.), The mycoplasmas. Academic Press, New York, USA, S. 289-322.
- RAZIN, S. 1981. Mycoplasmas - the smallest pathogenic procaryotes. Isr. J. Med. Sci. 17, 510-515.
- RAZIN, S. 1985. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (*Mollicutes*). Microbiol. Rev. 49, 419-455.
- RAZIN, S. 1992. Peculiar properties of mycoplasmas - the smallest self-replicating prokaryotes. FEMS Microbiol. Lett. 100, 423-431.

- RAZIN, S. 1997a. Comparative genomics of mycoplasmas. Wien. klein. Wochenschr. 109, 551-556.
- RAZIN, S. 1997b. The minimal cellular genome of mycoplasma. Indian J. Biochem. Biophys. 34, 124-130.
- RAZIN, S. and JACOBS, E. 1992. Mycoplasma adhesion. J. Gen. Microbiol. 138, 407-422.
- RAZIN, S., YOGEV, D., and NAOT, Y. 1998. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1094-1156.
- REAL, F., DENIZ, S., ACOSTA, B., FERRER, O., and POVEDA, J. B. 1994. Caprine contagious agalactia caused by *Mycoplasma agalactiae* in the Canary Islands. Vet. Rec. 135, 15-16.
- REILLY, G. A., BALL, H. J., CASSIDY, J. P., and BRYSON, T. D. 1993. First reported isolation of *Mycoplasma bovis* from pneumonic calves in Northern Ireland. Vet. Rec. 133, 550-551.
- RES, P. C., SCHAAR, C. G., BREEDVELD, F. C., VAN EDEN, W., VAN EMBDEN, J. D., COHEN, I. R., and DE VRIES, R. R. 1988. Synovial fluid T cell reactivity against 65 kD heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis. Lancet 2, 478-480.
- RETZLAFF, C., YAMAMOTO, Y., HOFFMAN, P. S., FRIEDMAN, H., and KLEIN, T. W. 1994. Bacterial heat shock proteins directly induce cytokine mRNA and interleukin-1 secretion in macrophage cultures. Infect. Immun. 62, 5689-5693.
- RINK, L., NICKLAS, W., LUHM, J., KRUSE, R., and KIRCHNER, H. 1996. Induction of a proinflammatory cytokine network by *Mycoplasma arthritidis*-derived superantigen (MAS). J. Interferon Cytokine Res. 16, 861-868.
- RITOSSA, F. 1996. Discovery of the heat shock response. Cell Stress Chaperones. 1, 97-98.
- ROBERTS, D. D., OLSON, L. D., BARILE, M. F., GINSBURG, V., and KRIVAN, H. C. 1989. Sialic acid-dependent adhesion of *Mycoplasma pneumoniae* to purified glycoproteins. J. Biol. Chem. 264, 9289-9293.
- RODRIGUEZ, F., BRYSON, D. G., BALL, H. J., and FORSTER, F. 1996. Pathological and immunohistochemical studies of natural and experimental *Mycoplasma bovis* pneumonia in calves. J. Comp. Pathol. 115, 151-162.
- ROSENGARTEN, R. and WISE, K. S. 1991. The Vlp system of *Mycoplasma hyorhinis* - combinatorial expression of distinct size variant lipoproteins generating high-frequency surface antigenic variation. J. Bacteriol. 173, 4782-4793.
- ROSS, R. F. 1992. Mycoplasmal diseases. In: A. D. Leman, R. D. Click, R. H. Mengeling, R. H. C. Penny, E. Scholl, and B. Straw (Hrsg.), Diseases of swine. Iowa State University Press, Ames, USA, S. 537-551.
- ROSS, R. F. 1999. Mycoplasmal diseases. In: A. D. Leman, B. Straw, W. L. D. S. Mengeling, and D. J. Taylor (Hrsg.), Diseases of swine. 8. Aufl. Iowa State University Press, Ames, USA, S. 495-509.
- ROTTEM, S. 2003. Interaction of mycoplasmas with host cells. Physiol. Rev. 83, 417-432.
- RUHNKE, H. L., THAWLEY, D., and NELSON, F. C. 1976. Bovine mastitis in Ontario due to *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*. Can. J. Comp. Med. 40, 142-148.
- RUNGE, M. 2001. Mykoplasmeninfektionen. In: H. Behrens, M. Ganter, and T. Hiepe (Hrsg.), Lehrbuch der Schafkrankheiten, 4 Aufl., Parey Buchverlag, Berlin, S. 269-274.
- RUNGE, M., BINDER, A., GURR, E., FISCHER, M., MEIER, J., and KIRCHHOFF, H. 1990. Epitope-sharing between *Mycoplasma arthritidis* and chondrocytes demonstrated by monoclonal antibodies. Zentralbl. Bakterirol. 273, 531-538.

- RUSANGANWA, E., SINGH, B., and GUPTA, R. S. 1992. Cloning of Hsp60 (GroEL) operon from *Clostridium perfringens* using a polymerase chain reaction based approach. *Biochim. Biophys. Acta* 1130, 90-94.
- SANDERS, S. L., WHITFIELD, K. M., VOGEL, J. P., ROSE, M. D., and SCHEKMAN, R. W. 1992. Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell* 69, 353-365.
- SANGER, F., NICKLEN, S., and COULSON, A. R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- SCHATZMANN, E., KELLER, H., GREEST, P., LORENZ, D., and BURRI, W. 1996. Feldstudie mit einer Vakzine gegen die Enzootische Pneumonie der Schweine. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 138, 483-489.
- SCHEIDT, A. B., MAYROSE, V. B., VAN ALSTINE, W. G., CLARK, L. K., CLINE, T. R., and EINSTEIN, M. E. 1994. The effects of vaccinating pigs for mycoplasmal pneumonia in a swine herd affected by enzootic pneumonia. *Swine Health and Production* 2, 7-11.
- SCHERM, B., GERLACH, G. F., and RUNGE, M. 2002. Analysis of heat shock protein 60 encoding genes of mycoplasmas and investigations concerning their role in immunity and infection. *Vet. Microbiol.* 89, 141-150.
- SCHNEIDER, B., GIBB, K. S., and SEEMULLER, E. 1997. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas. *Microbiology* 143 (10), 3381-3389.
- SCHWARZBAUM, S., HALPERN, R., and DIAMOND, B. 1984. The generation of macrophage-like cell lines by transfection with SV40 origin defective DNA. *J. Immunol.* 132, 1158-1162.
- SHINNICK, T. M. 1991. Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 167, 145-160.
- SHINNICK, T. M., VODKIN, M. H., and WILLIAMS, J. C. 1988. The *Mycobacterium tuberculosis* 65-kilodalton antigen is a heat shock protein which corresponds to common antigen and to the *Escherichia coli* GroEL protein. *Infect. Immun.* 56, 446-451.
- SMITH, T. F. and WATERMAN, M. S. 1981. Overlapping genes and information theory. *J Theor. Biol.* 91, 379-380.
- SOMERSON, N. L., CHANOCK, R. M., and TAYLOR-ROBINSON, D. 1963. Hemolysin production as an aid in identification and quantitation of Eaton agent (*Mycoplasma pneumoniae*). *Am. J. Hyg.* 77, 122-&.
- SØNDERGARD-ANDERSEN, J., JENSEN, J. S., ULDUM, S. A., and LIND, K., 1990. Heat-shock protein in *Mycoplasma pneumoniae* shown by immunoblotting to be related to the bacterial common antigen. *J Infect. Dis.* 161, 1039-1040.
- SOUTHERN, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.
- STALHEIM, O. H. V. and PROCTOR, S. J. 1976. Experimentally induced bovine abortion with *Mycoplasma agalactiae* subsp. *bovis*. *Am. J. Vet. Res.* 37, 879-883.
- STIPKOVITS, L. 1990. What about *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae*. *Pigs* 6, 27-29.
- STIPKOVITS, L., ROMVARY, J., MESZAROS, J., and ROZSA, J. 1979. Importance of mycoplasma infection in genital diseases of cattle. *Wien. tierärztl. Monatsschr.* 66, 52-56.
- STULLE, K., BINDER, A., SOMMER, G., and KIRCHHOFF, H. 1988. Immunological reaction of rat tissue cells with antiserum against *Mycoplasma arthritidis* membranes in indirect immunofluorescence test. *Zentralbl. Veterinärmed. B*, 35, 713-715.

- SUBCOMMITTEE ON TAXONOMY OF MYCOPLASMATALES. 1970. Minutes of the meeting. Int. J. Syst. Bacteriol. 21, 151-153.
- SUBRAMANIAM, S., BERGONIER, D., POUMARAT, F., CAPAUL, S., SCHLATTER, Y., NICOLET, J., and FREY, J. 1998. Species identification of *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* based on the *uvrC* genes by PCR. Mol. Cell Probes 12, 161-169.
- SULAIMAN, I. M., MORGAN, U. M., THOMPSON, R. C., LAL, A. A., and XIAO, L. 2000. Phylogenetic relationships of Cryptosporidium parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (Hsp70) gene. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2385-2391.
- SUSTACKOVA, H., CHAMBERS, C. A., HOZUMI, N., KANDEL, R. A., QUINN, P. A., and CRUZ, T. F. 1995. Effect of *Mycoplasma arthritidis* superantigen on enzymatically induced arthritis in mice. Clin. Exp. Immunol. 99, 352-358.
- TAKATA, T., WAI, S. N., TAKADE, A., SAWAE, Y., ONO, J., and AMAKO, K. 1995. The purification of a GroEL-like stress protein from aerobically adapted *Campylobacter jejuni*. Microbiol. Immunol. 39, 639-645.
- THACKER, E. L., HALBUR, P. G., ROSS, R. F., THANAWONGNUWECH, R., and THACKER, B. J. 1999. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. J. Clin. Microbiol. 37, 620-627.
- THACKER, E. L., THACKER, B. J., BOETTCHER, T. B., and JAYAPPA, H. 1998. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. Swine Health and Production 6, 107-112.
- THACKER, E. L., THACKER, B. J., and JANKE, B. H. 2001. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. J. Clin. Microbiol. 39, 2525-2530.
- THIAUCOURT, F. and BÖLSKE, G. 1996. Contagious caprine pleuropneumonia and other pulmonary mycoplasmoses of sheep and goats. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. 15, 1397-1414.
- THIRKILL, C. E., MUCHMORE, H. G., HYDE, R. M., and SCOTT, L. V. 1981. Immunological reactions of rabbit anti-*Mycoplasma arthritidis* serum with *in vitro* cultivated rat synovial-cells. In Vitro 17, 405-411.
- THOMAS, A., SACHSE, K., FARNIR, F., DIZIER, I., MAINIL, J., and LINDEN, A. 2003. Adherence of *Mycoplasma bovis* to bovine bronchial epithelial cells. Microb. Pathog. 34, 141-148.
- THOMAS, L. H., HOWARD, J., and PARSONS, K. R. 1985. Pathological and immunological response of calves to *Mycoplasma bovis*. J. Med. Microbiol. 19, R18-R19.
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., and GIBSON, T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673-4680.
- THOMPSON, S. J., ROOK, G. A., BREALEY, R. J., VAN DER, Z. R., and ELSON, C. J. 1990. Autoimmune reactions to heat-shock proteins in pristane-induced arthritis. Eur. J. Immunol. 20, 2479-2484.
- TISSIERES, A., MITCHELL, H. K., and TRACY, U. M. 1974. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: Relation to chromosome puffs. J. Mol. Biol. 84, 389-398.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T., and GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350-4354.
- TRACY, K. J. and A. CERAMI. 1990. The biology of cachectin/tumor necrosis factor. In: A. Habenicht (Hrsg.), Growth factors, differentiation factors, and cytokines Springer-Verlag, Berlin.

- TRYON, V. V. and BASEMAN J.B. 1992. Pathogenic determinants and mechanisms. In: Maniloff J., McElhaney R.N., Finch L.R., and J. B. Baseman (Hrsg.), *Mycoplasmas. Molecular biology and pathogenesis*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA, S. 457-471.
- TSOULFA, G., ROOK, G. A., VAN EMBDEN, J. D., YOUNG, D. B., MEHLERT, A., ISENBERG, D. A., HAY, F. C., and LYDYARD, P. M. 1989. Raised serum IgG and IgA antibodies to mycobacterial antigens in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 48, 118-123.
- TULLY, J. G., BOVE, J. M., LAIGRET, F., and WHITCOMB, R. F. 1993. Revised taxonomy of the Class *Mollicutes* - proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated *Mollicutes* to ordinal rank (*Entomoplasmatales* ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (*Entomoplasmataceae* fam. nov.) from helical species (*Spiroplasmataceae*), and emended descriptions of the order *Mycoplasmatales*, family *Mycoplasmataceae*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 378-385.
- VAN DEN BROEK, M. F., HOGERVORST, E. J., VAN BRUGGEN, M. C., VAN EDEN, W., VAN DER, Z. R., and VAN DEN BERG, W. B. 1989. Protection against streptococcal cell wall-induced arthritis by pretreatment with the 65-kD mycobacterial heat shock protein. *J. Exp. Med.* 170, 449-466.
- VAN DER ZEE R., ANDERTON, S. M., PRAKKEN, A. B., LIESBETH PAUL, A. G., and VAN EDEN, W. 1998. T cell responses to conserved bacterial heat-shock-protein epitopes induce resistance in experimental autoimmunity. *Semin. Immunol.* 10, 35-41.
- VAN EDEN, W. 1990. Heat-shock proteins in autoimmune arthritis: A critical contribution based on the adjuvant arthritis model. *APMIS* 98, 383-394.
- VAN EDEN, W., HOGERVORST, E. J., HENSEN, E. J., VAN DER, Z. R., VAN EMBDEN, J. D., and COHEN, I. R. 1989. A cartilage-mimicking T-cell epitope on a 65kD mycobacterial heat-shock protein: Adjuvant arthritis as a model for human rheumatoid arthritis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 145, 27-43.
- VAN EDEN, W., THOLE, J. E., VAN DER, Z. R., NOORDZIJ, A., VAN EMBDEN, J. D., HENSEN, E. J., and COHEN, I. R. 1988. Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331, 171-173.
- VONSKI, M. S., G. V. ASTVATZATURIAN, E. JACOBS, and BORCHSENIUS, S. N. 1992. Western blot analysis of heat shock proteins in mycoplasmas. *IOM Letters* 331.
- WALLGREN, P., BESKOW, P., FELLSTROM, C., and RENSTROM, L. H. 1994. Porcine lung lesions at slaughter and their correlation to the incidence of infections by *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* during the rearing period. *Zentralbl. Veterinärmed. B*, 41, 441-452.
- WANG, Y. and ZHANG, Z. 2000. Comparative sequence analyses reveal frequent occurrence of short segments containing an abnormally high number of non-random base variations in bacterial rRNA genes. *Microbiology* 146 (11), 2845-2854.
- WARD, J. R. and JONES, R. S. 1962. Pathogenesis of mycoplasmal (PPLO) arthritis in rats. *Arthr. Rheum.* 5, 163-175.
- WASHBURN, L. R., COLE, B. C., GELMAN, M. I., and WARD, J. R. 1980. Chronic arthritis of rabbits induced by mycoplasmas. 1. Clinical, microbiologic, and histologic features. *Arthr. Rheum.* 23, 825-836.
- WASHBURN, L. R. and RAMSAY, J. R. 1989. Experimental induction of arthritis in Lew rats and antibody-response to four *Mycoplasma arthritidis* strains. *Vet. Microbiol.* 21, 41-55.
- WATSON, K. 1990. Microbial stress proteins. *Adv. Microb. Physiol* 31, 183-223.
- WEIGT, U., LINDENA, J., HEITMANN, J., and KIRCHHOFF, H. 1981. *Mycoplasma bovis* infection in a dairy herd .1. Clinical aspects. *Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.* 94, 349-353.

- WEISBURG, W. G., TULLY, J. G., ROSE, D. L., PETZEL, J. P., OYAIZU, H., YANG, D., MANDELCO, L., SECHREST, J., LAWRENCE, T. G., VANETTEN, J., MANILOFF, J., and WOESE, C. R. 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas - basis for their classification. *J. Bacteriol.* 171, 6455-6467.
- WELCH, W. J. 1992. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* 72, 1063-1081.
- WELCH, W. J. 1993. How cells respond to stress. *Sci. Am.* 268, 56-64.
- WELCH, W. J. and FERAMISCO, J. R. 1982. Purification of the major mammalian heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 257, 14949-14959.
- WETZSTEIN, M., DEDIO, J., and SCHUMANN, W. 1990. Complete nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis dnaK* gene. *Nucleic Acids Res.* 18, 2172.
- WHITESELL, L., BAGATELL, R., and FALSEY, R. 2003. The stress response: Implications for the clinical development of Hsp90 inhibitors. *Curr. Cancer Drug Targets* 3, 349-358.
- WHITTLESTONE, P. 1979. Porcine mycoplasmas, In: J. G. Tully and R. F. Whitcomb (Hrsg.), *The mycoplasmas: Human and animal mycoplasmas*. Academic Press, New York, San Francisco, USA, S. 133-176.
- WICK, G., KNOFLACH, M., and XU, Q. 2004. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 361-403.
- WISE, K. S. and WATSON, R. K. 1985. Mycoplasma components Antigenically related to cytoskeletal elements of animal cells. *Fed. Proc.* 44, 1922.
- WOESE, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221-271.
- WOESE, C. R. 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 97, 8392-8396.
- WOGLOM, W. H. and WARREN, J. 1938. A pyrogenic filterable agent in albino rat. *J. Exp. Med.* 68, 513-528.
- WOLGEMUTH, C. W., IGOSHIN, O., and OSTER, G. 2003a. Mechanochemical motor filaments and bacterial motility. *Biophys. J.* 84, 571.
- WOLGEMUTH, C. W., IGOSHIN, O., and OSTER, G. 2003b. The motility of mollicutes. *Biophys. J.* 85, 828-842.
- XU, Q. 2003. Infections, heat shock proteins, and atherosclerosis. *Curr. Opin. Cardiol.* 18, 245-252.
- YE, F. C., LAIGRET, F., CARLE, P., and BOVE, J. M. 1995. Chromosomal heterogeneity among various strains of *Spiroplasma citri*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 729-734.
- YENARI, M. A. 2002. Heat shock proteins and neuroprotection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 513, 281-299.
- YOGEV, D., ROSENGARTEN, R., and WISE, K. S. 1993. Variation and genetic control of surface-antigen expression in mycoplasmas - the Vlp system of *Mycoplasma hyorhinis*. *Zentralbl. Bakteriol.* 278, 275-286.
- YOGEV, D., SELA, S., BERCOVIER, H., and RAZIN, S. 1990. Nucleotide sequence and codon usage of the elongation factor Tu (EF-Tu) gene from *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 4, 1303-1310.
- YOUNG, D., LATHIGRA, R., HENDRIX, R., SWEETSER, D., and YOUNG, R. A. 1988. Stress proteins are immune targets in leprosy and tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4267-4270.
- YOUNG, R. A. and ELLIOTT, T. J. 1989. Stress proteins, infection, and immune surveillance. *Cell* 59, 5-8.

ZHANG, Q. J., YOUNG, T. F., and ROSS, R. F. 1994. Glycolipid receptors for attachment of *Mycoplasma hyopneumoniae* to porcine respiratory ciliated cells. Infect. Immun. 62, 4367-4373.

ZHANG, Q. J., YOUNG, T. F., and ROSS, R. F. 1995. Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. Infect. Immun. 63, 1013-1019.

ZIMMERMAN, S. B. and TRACH, S. O. 1991. Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 222, 599-620.

ZYLICZ, M., LEBOWITZ, J. H., MCMACKEN, R., and GEORGOPOULOS, C. 1983. The DnaK protein of *Escherichia coli* possesses an ATPase and autophosphorylating activity and is essential in an *in vitro* DNA replication system. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6431-6435.

9 ANHANG

9.1 Rohdaten

9.1.1 Vergleich der Basensequenz der *hsp60*-Genabschnitte der untersuchten Mykoplasmen mit *hsp60*-Gensequenzen anderer Mykoplasmen- und Bakterienspezies

- 1: *M. arthritidis*
- 2: *M. bovis*
- 3: *M. agalactiae*
- 4: *M. hyopneumoniae*
- 5: *M. pneumoniae*
- 6: *M. genitalium*
- 7: *C. perfringens*
- 8: *B. subtilis*
- 9: *E. coli*

[illegible][illegible][illegible]

1	A	A	C	G	A	T	G	G	A	G	T	G	A	C	C	A	T	C	G	C	T	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	A	A	C	T	A	A	C	T	G	A	T	C	C	T	T	T	A	G	A	200
2	A	A	C	G	A	T	G	G	A	G	T	G	A	C	C	A	T	C	G	C	T	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	A	A	C	T	A	A	C	T	G	A	T	C	C	T	T	T	A	G	A	
3	A	A	C	G	A	T	G	G	A	G	T	G	A	C	C	A	T	C	G	C	T	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	A	A	C	T	A	A	C	T	G	A	T	C	C	T	T	T	A	G	A	
4	A	A	C	G	A	T	G	G	A	G	T	G	A	C	C	A	T	C	G	C	T	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	A	A	C	T	A	A	C	T	G	A	T	C	C	T	T	T	A	G	A	
5	A	A	C	G	A	T	G	G	A	G	T	G	A	C	C	A	T	C	G	C	T	A	A	G	G	A	A	A	T	T	G	A	A	C	T	A	A	C	T	G	A	T	C	C	T	T	T	A	G	A	
6	A	A	C	G	A	T	G	G	G	G	T	T	A	C	A	A	T	C	G	C	A	A	A	G	G	A	A	A	T	A	G	A	A	C	T	T	A	G	T	G	A	T	C	C	A	G	T	T	G	A	
7	A	A	T	G	A	T	G	G	G	T	T	A	C	A	A	T	C	A	A	G	A	A	G	A	A	A	T	T	A	G	A	A	C	T	T	G	A	A	G	A	T	G	C	T	T	T	A	T	G	A	
8	A	A	T	G	A	T	G	T	T	A	C	A	C	A	A	T	C	G	C	T	A	A	G	G	A	A	A	T	T	C	A	G	C	T	A	G	A	A	G	A	C	A	G	A	C	A	G	T	T	G	A
9	A	A	A	T	G	A	T	G	T	T	T	C	C	G	T	T	G	C	T	C	G	T	G	A	A	A	T	C	G	A	A	C	T	G	A	A	G	A	C	A	A	G	T	T	C	G	A				

1	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	C	T	A	A	G	G	T	T	A	T	T	T	C	G	G	T	A	G	C	T	G	C	T	G	T	A	T	C	T	A	C	C	A	A	T	G	A	T	A	250
2	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	C	T	A	A	G	G	T	T	A	T	T	T	T	C	G	G	T	A	G	C	T	G	C	T	G	T	A	T	C	T	A	C	C	A	A	T	G	A	T	A
3	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	C	T	A	A	G	G	T	T	A	T	T	T	T	C	G	G	T	A	G	C	T	G	C	T	G	T	A	T	C	T	A	C	C	A	A	T	G	A	T	A
4	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	C	T	A	A	G	G	T	T	A	T	T	T	T	C	G	G	T	A	G	C	T	G	C	T	G	T	A	T	C	T	A	C	C	A	A	T	G	A	T	A
5	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	C	T	A	A	G	G	T	T	A	T	T	T	T	C	G	G	T	A	G	C	T	G	C	T	G	T	A	T	C	T	A	C	C	A	A	T	G	A	T	A
6	A	A	A	T	A	T	T	G	G	T	G	C	T	A	A	G	G	T	T	A	T	T	T	C	A	G	T	T	G	C	T	G	C	A	G	T	G	T	C	A	A	C	T	A	A	T	G	A	C	A	
7	A	A	A	T	A	T	G	G	G	A	G	C	T	C	A	A	C	T	T	G	T	A	A	A	A	G	A	A	G	T	A	G	C	T	A	C	A	A	A	G	A	C	T	A	A	T	G	A	T	G	
8	A	A	A	C	A	T	T	G	G	T	G	C	T	A	A	G	C	T	T	G	T	T	G	C	T	A	G	A	G	T	A	G	C	C	A	G	C	A	A	A	C	A	A	C	G	A	C	G			
9	A	A	A	T	A	T	T	G	G	T	G	C	T	A	A	G	C	A	T	T	G	T	T	G	A	A	A	G	A	A	G	T	T	G	C	T	C	T	A	A	A	G	C	A	A	A	C	G	A	C	G

1	T	T	G	C	T	G	G	G	G	A	C	G	G	T	A	C	T	A	C	C	A	C	T	G	C	T	A	C	C	A	T	C	T	T	G	G	C	A	C	A	G	G	A	A	A	T	G	A	C	T	300				
2	T	T	G	C	T	G	G	G	G	A	C	G	G	T	A	C	T	A	C	C	A	C	T	G	C	T	A	C	C	A	T	C	T	T	G	G	C	A	C	A	G	A	A	A	T	G	A	C	T						
3	T	T	G	C	T	G	G	G	G	A	C	G	G	T	A	C	T	A	C	C	A	C	T	G	C	T	A	C	C	A	T	C	T	T	G	G	C	A	C	A	G	G	A	A	A	T	G	A	C	T					
4	T	T	G	C	T	G	G	G	G	A	C	G	G	T	A	C	T	A	C	C	A	C	T	G	C	T	A	C	C	A	T	C	T	T	G	G	C	A	C	A	G	G	A	A	A	T	G	A	C	T					
5	T	T	G	C	T	G	G	G	G	A	C	G	G	T	A	C	T	A	C	C	A	C	T	G	C	T	A	C	C	A	T	C	T	T	G	G	C	A	C	A	G	G	A	A	A	T	G	A	C	T					
6	T	T	G	C	T	G	G	G	G	A	C	T	G	T	A	C	T	A	C	C	A	C	T	G	C	T	A	C	C	A	T	C	T	T	T	G	G	C	A	C	A	G	G	A	A	A	T	G	A	C	T				
7	T	T	G	C	T	G	G	G	G	A	C	T	G	T	A	C	T	A	C	C	A	C	T	G	C	T	A	C	C	A	T	C	T	T	T	A	G	C	A	C	A	G	G	A	A	A	T	G	A	C	T				
8	T	T	G	C	T	G	G	G	G	A	C	T	G	T	A	C	T	A	C	C	A	C	T	G	C	T	A	C	C	A	T	C	T	T	T	A	G	C	T	C	A	A	G	G	C	A	A	T	G	A	C	T			
9	T	T	G	C	T	G	G	G	G	A	C	T	G	T	A	C	T	A	C	C	A	C	T	G	C	T	A	C	C	A	T	C	T	T	T	A	G	C	T	C	A	A	G	G	C	A	A	T	G	A	C	T			
	C	T	G	C	A	G	G	C	T	G	A	C	G	T	A	C	C	A	C	C	A	C	T	G	C	T	A	C	A	A	C	C	G	T	T	C	A	C	T	G	G	C	T	C	A	G	G	C	T	A	T	G	A	C	T

1	A	A	C	C	G	T	G	G	T	G	T	G	G	A	A	G	C	T	G	T	T	A	A	T	A	A	T	G	G	C	G	C	T	A	A	T	C	C	A	G	T	T	A	A	T	G	T	C	C	G	350	
2	A	A	C	C	G	T	G	G	T	G	T	G	G	A	A	G	C	T	G	T	T	A	A	T	A	A	T	G	G	C	G	C	T	A	A	T	C	C	A	G	T	T	A	A	T	G	T	C	C	G		
3	A	A	C	C	G	T	G	G	T	G	T	G	G	A	A	G	C	T	G	T	T	A	A	T	A	A	T	G	G	C	G	C	T	A	A	T	C	C	A	G	T	T	A	A	T	G	T	C	C	G		
4	A	A	C	C	G	T	G	G	T	G	T	G	G	A	A	G	C	T	G	T	T	A	A	T	A	A	T	G	G	C	G	C	T	A	A	T	C	C	A	G	T	T	A	A	T	G	T	C	C	G		
5	A	A	C	C	G	T	G	G	T	G	T	G	G	A	A	G	C	T	G	T	T	A	A	T	A	A	T	G	G	C	G	C	T	A	A	T	C	C	A	G	T	T	A	A	T	G	T	C	C	G		
6	A	A	C	C	G	T	G	G	T	G	T	G	G	A	A	G	C	T	G	T	T	A	A	T	A	A	T	G	G	C	G	C	T	A	A	T	C	C	A	G	T	T	A	A	T	G	T	C	C	G		
7	A	A	C	C	G	T	G	T	A	T	T	T	G	A	A	A	T	T	A	T	C	A	A	T	A	A	A	A	T	G	G	C	T	A	A	T	C	C	T	T	G	T	T	A	A	C	A	T	C	C	G	
8	A	G	A	G	A	A	G	G	A	T	T	A	A	A	A	A	T	G	T	A	A	C	A	G	C	A	A	G	G	G	G	G	C	A	A	T	C	C	T	T	A	T	T	A	A	G	A	T	A	A	G	
9	C	G	T	G	A	A	G	G	C	C	T	T	A	A	A	A	A	C	G	T	T	A	A	C	A	G	C	A	A	G	G	C	G	C	T	A	A	C	C	C	T	T	A	G	G	C	A	T	G	C	C	G
	A	C	T	G	A	A	G	G	T	C	T	G	A	A	A	G	C	T	T	G	C	T	G	C	G	G	G	C	A	T	G	A	A	C	C	C	G	A	T	G	G	A	C	C	T	G	A	A				

1 CCGTG G G A T T G A A G A T G C T A G T C A G T T A A T T - A T T A C T G A G T T A G A T A A G 400
2 CCGTG G G A T T G A A A A T G C T A G T C G G T T G G T T - A T T A C T G A G T G G A T G A G
3 CCGTG G G A T T G A A G A T G C T A G T C A G T T A A T T - A T T A C T G A G T T A G A T A A G
4 CCGTG G G A T T G A A G A T G C T A G T C A G T T A A T T - A T T A C T G A G T T A G A T A A G
5 CCGTG G G A T T G A A G A T G C T A G T C A G T T A A T T - A T T A C T G A G T T A G A T A A G
6 C A G G G T A T T G A A G A T G C A A G C T T A C T T A A T T - A T T A A A G A A C T T G A A A A G
7 A A A T G G A A T T A A A A C T G C A G T T G A A A A A G C T - G T A G A G G A A A T A C A A A A A
8 T A A A G G G A T G G A A C A A G C T G T A G C G G T T G C G - A T C G A A A A C T T A A A A G A A
9 A C G T G G T A T C G A C A A A G C G G T T A C C G C T G C A - G T T G A A G A A C T G A A A G C G

1 C G T T T C C A A - - A A A G A T T A A T A C C A A C G A A G A A A T C G A G C A A G T T G C A G C G 450
2 C G T T T C C G C T T A G A G A T T A A T A C C G A C G A A G A A A T C G A G C A A G T T G C A G C G
3 C G T T T C C A A - - A A A G A T T A A T A C C A A C G A A G A A A T C G A G C A A G T T G C A G C G
4 C G T T T C C A A - - A A A G A T T A A T A C C A A C G A A G A A A T C G A G C A A G T T G C A G C G
5 C G T T T C C A A - - A A A G A T T A A T A C C A A C G A A G A A A T C G A G C A A G T T G C A G C G
6 T A C T C T A A A - - A A A A A T T A A T A C T A A C G A A G A A G A T A G A A A C A A G T T G C A G C T
7 A T T T C T A A A - - G C C T G T A A A T G G A A A A G A A G A C A T A G C T A G A G T T G C T G C A
8 A T T T C T A A A - - G C C A A T C G A A G G C A A A G A G T C T A T C G C T C A G G T T G C T G C G
9 C T G T C C G T - - A C C A T G C T C T G A C T C T A A A G C G A T T G C T C A G G T T G G T A C C

1 A T C T C T T T C C G - - - G T T C C A A G G A A A T T G G G A A G C T G A T T G C T C A A G C T A T 500
2 A T C T C T T T C C G - - - G T T C C A A G G A A A T T G G G A A G C T G A T T G C T C A A G C T A T
3 A T C T C T T T C C G - - - G T T C C A A G G A A A T T G G G A A G C T G A T T G C T C A A G C T A T
4 A T C T C T T T C C G - - - G T T C C A A G G A A A T T G G G A A G C T G A T T G C T C A A G C T A T
5 A T C T C T T T C C G - - - G T T C C A A G G A A A T T G G G A A G C T G A T T G C T C A A G C T A T
6 A T C T C T T T C A G - - - G T T C T A A A A G A A A T T G G T A A A A C T G A T C G C T C A A G C A A T
7 A T T T C A G C A G - - - C T G A T G A A A A A A T T G G T A A A G T T A A T T G C A G A T G C T A T
8 A T C T C T G C T G - - - C T G A T G A A G G A A G T C G G A A G C C T T A T C G C T G A A G C A T
9 A T C T C C G C T A A C T C C G A C G A A A C C G T A A G T A A A C T G A T C G C T G A A G C A T

1 G G C C T T A G T T G G T A A A A A C G G T G T C A T T A C C A C C G A T G A T G C T A A G A C G A 550
2 G G C C T T A G T T G G T A A A A A C G G T G T C A T T A C C A C C G A T G A T G C T A A G A C G A
3 G G C C T T A G T T G G T A A A A A C G G T G T C A T T A C C A C C G A T G A T G C T A A G A C G A
4 G G C C T T A G T T G G T A A A A A C G G T G T C A T T A C C A C C G A T G A T G C T A A G A C G A
5 G G C C T T A G T T G G T A A A A A C G G T G T C A T T A C C A C C G A T G A T G C T A A G A C G A
6 G G C T T T A G T T G G T A A A A A T G G C G T G A T A A C A A C T G A T G A T G C A A A A C C A
7 G G A A A A G T A G G A A A T G A A G A G T T A T A A C T G T A G A A G A A T C T A A A T C A A
8 G G A G C G T A G G A A A C G A C G G C G T T A T C A C A A T C G A A G A G T C T A A A G G C T
9 G G A C A A A G T C G G T A A A G A A G G C G T T A T C A C C G T T G A A G A C G G T A C C G G T C

1 T T A A C A C T A C C C T A G A A A C C A C T G A A A G G G A T T G A G T T T A A A G G T A C T T A C 600
2 T T A A C A C T A C C C T A G A A A C C A C T G A A A G G G A T T G A G T T T A A A G G T A C T T A C
3 T T A A C A C T A C C C T A G A A A C C A C T G A A A G G G A T T G A G T T T A A A G G T A C T T A C
4 T T A A C A C T A C C C T A G A A A C C A C T G A A A G G G A T T G A G T T T A A A G G T A C T T A C
5 T T A A C A C T A C C C T A G A A A C C A C T G A A A G G G A T T G A G T T T A A A G G T A C T T A C
6 T T A A T A C A A C A C A T T A G A A A C C A C T G A A A G G A A T T G A A T T T A A A G G A C A T A T
7 T G G G A A C T G A G T T A G A T T G T T G T T G A A A G G T A T G C A A T T T G A T A G G G G A T A T
8 T C A C A A C T G A G C T T G A A A G T T G T T G A A A G G T A T G C A A T T C G A C C G C G G A T A T
9 T G C A G G A C G A A C T G G A C G T G G T T G A A A G T A T G C A G T T C G A C C G T G G C T A C

1 G C T T C C C C T T A C A T G G T T A G C G A T C A A G A A A A A T G G A A G T G G T G T T A G A 650
2 G C T T C C C C T T A C A T G G T T A G C G A T C A A G A A A A A A T G G A A G T G G T G T T A G A
3 G C T T C C C C T T A C A T G G T T A G C G A T C A A G A A A A A A T G G A A G T G G T G T T A G A
4 G C T T C C C C T T A C A T G G T T A G C G A T C A A G A A A A A A T G G A A G T G G T G T T A G A
5 G C T T C C C C T T A C A T G G T T A G C G A T C A A G A A A A A A T G G A A G T G G T G T T A G A
6 G C A T C A C C T T A T A T G G T T A G T G A T C A A G A A A A A A T G G A A G T T G T T T T A G A
7 G T A T C A G C T T A T A T G G T T A C T G A T A C T G A A A A A A T G G A A G C T G T T T T A G A
8 G C G T C T C C T T A C A T G G T A A C T G A C T C T G A T A A G A T G G A A G C G G T T C T T G A
9 C T G T C T C C T T A C T T C A T C A A C A A G C G G A A A C T G G C G C A G T A G A A C T G G A

1 C C A A C C G A A G A T C T T G G T C A G T G C G A T G A A G A T T A A C A C C A T T A A G G A A A 700
2 C C A A C C G A A G A T C T T G G T C A G T G C G A T G A A G A T T A A C A C C A T T A A G G A A A
3 C C A A C C G A A G A T C T T G G T C A G T G C G A T G A A G A T T A A C A C C A T T A A G G A A A
4 C C A A C C G A A G A T C T T G G T C A G T G C G A T G A A G A T T A A C A C C A T T A A G G A A A
5 C C A A C C G A A G A T C T T G G T C A G T G C G A T G A A G A T T A A C A C C A T T A A G G A A A
6 A C A A C C T A A A A T C T T A G T A A G C T C T T T A A A A T T A A C A C A A T T A A A G A A A
7 T A A T C C A T T A G T A T T A A T A A C A G A T A A G A A A A T A A G C A A T A T A C A A G A T T
8 C A A T C C T T A C A T C T A A T C A A G A C A A A A A A T C A C A A A C A T T C A A G A A A
9 A A G C C C G T T C A T C T G C T G G C T G A C A A A G A A A T C T C A A C A T C C G C G A A A

1 T C T T A C C G T T A C T A G A A G G T A G C A T G G A A A A C G G T A A C C C A C T G T T A A T C 750
2 T C T T A C C G T T A C T A G A A G G T A G C A T G G A A A A C G G T A A C C C A C T G T T A A T C
3 T C T T A C C G T T A C T A G A A G G T A G C A T G G A A A A C G G T A A C C C A C T G T T A A T C
4 T C T T A C C G T T A C T A G A A G G T A G C A T G G A A A A C G G T A A C C C A C T G T T A A T C
5 T C T T A C C G T T A C T A G A A G G T A G C A T G G A A A A C G G T A A C C C A C T G T T A A T C
6 T T C T T C C G C T T T T A G A A G G T A G T G T T G A A A A T G G T A A T C C A T T A T T A A T T
7 T A T T A C C A T T A C T T G A G C A A A T A G T T C A A G C A G G T A A A A A C T T T T A A T A
8 T C C T T C C T G T G C T T G A G C A G G T T G T T C A G C A A G G C A A A C C A T T G C T T C T G
9 T G C T G C C G T T C T G G A A G C T G T T G C C A A A G C A G G C A A A C C G C T G C T G A T C

1 G T G G C A C C T G A C T T T G C T G A A G A A G T G G T A A C T A C T T T A G C G G T G A A C A A 800
2 G T G G C A C C T G A C T T T G C T G A A G A A G T G G T A A C T A C T T T A G C G G T G A A C A A
3 G T G G C A C C T G A C T T T G C T G A A G A A G T G G T A A C T A C T T T A G C G G T G A A C A A
4 G T G G C A C C T G A C T T T G C T G A A G A A G T G G T A A C T A C T T T A G C G G T G A A C A A
5 G T G G C A C C T G A C T T T G C T G A A G A A G T G G T A A C T A C T T T A G C G G T G A A C A A
6 G T T G C A C C T G A C T T T G C A G A A G A A G T T G T T A C T A C T T T A G C A G T T A A T A A
7 A T A G C T G A T G A T A T A G A A G G C G A A G C T A T T G A C A C A T T A G T T G T T A A T A A
8 A T C G C T G A G A T G T T G A A G G C G A A G C A C T T G C T A C A C T T G T T G T G A A C A A
9 A T C G C T G A A G A T G T A G A A G G C G A A G C G C T G G C A A C T G C T G T T G T T A A C A C

1 G C T T C G C G G T A C C A T T A A T G T A G T T G C T G T T A A A T G T A A C G A A T A C G G G G 850
2 G C T T C G C G G T A C C A T T A A T G T A G T T G C T G T T A A A T G T A A C G A A T A C G G G G
3 G C T T C G C G G T A C C A T T A A T G T A G T T G C T G T T A A A T G T A A C G A A T A C G G G G
4 G C T T C G C G G T A C C A T T A A T G T A G T T G C T G T T A A A T G T A A C G A A T A C G G G G
5 G C T T C G C G G T A C C A T T A A T G T A G T T G C T G T T A A A T G T A A C G A A T A C G G G G
6 A C T C A G G G C A C C A T T A A T G T G T T G C T G T T A A A T G T A A T G A A T T G G T G
7 A T T A A G A G G A C A C T T T A C T T G T T G T G A A G T A A A G C A C C T G G A T T T G G T G
8 A C T T C G C G G C A C A T T C A A C G C A G T G C T G T T A A A G C T C C T G G T T T C G G T G
9 C A T T C G T G G C A T C G T G A A A G T C G C T G C G G T T A A A G C A C C G G G C T T C G G C G

1 A A C G C C A A A A G G C A G C T T T G G A A G A T T T A G C C A T T A G T A C T G G C A C C T T A 900
2 A A C G C C A A A A G G C A G C T T T G G A A G A T T T A G C C A T T A G T A C T G G C A C C T T A
3 A A C G C C A A A A G G C A G C T T T G G A A G A T T T A G C C A T T A G T A C T G G C A C C T T A
4 A A C G C C A A A A G G C A G C T T T G G A A G A T T T A G C C A T T A G T A C T G G C A C C T T A
5 A A C G C C A A A A G G C A G C T T T G G A A G A T T T A G C C A T T A G T A C T G G C A C C T T A
6 A A C G T C A A A A A G C A G C T T T A G A A G A T T T A G C A A T T A G T A G T G G A A C C T T A
7 A T A G A A G A A A A G A A A T G T T A C A A G A T A T A G C T A C T T T A A C A G G A G G C G T T
8 A T C G C C G T A A A G C A A T G C T T T G A A G A C A T C G C T G T C C T T A C T G G C G G A G A A
9 A T C G T C G T A A A G C T A T G C T G C A G A T A T C G C A A C C C T G A C T G G C G G T A C C

1 G C T T A C A A C A A T G A A C T A G G T G G T G G C T T T A A G G A T G T G A C T G T A A A C C A 950
2 G C T T A C A A C A A T G A A C T A G G T G G T G G C T T T A A G G A T G T G A C T G T A A A C C A
3 G C T T A C A A C A A T G A A C T A G G T G G T G G C T T T A A G G A T G T G A C T G T A A A C C A
4 G C T T A C A A C A A T G A A C T A G G T G G T G G C T T T A A G G A T G T G A C T G T A A A C C A
5 G C T T A C A A C A A T G A A C T A G G T G G T G G C T T T A A G G A T G T G A C T G T A A A C C A
6 G C A T A T A A T A C C G A A A T T A A T A G T G G T T T A A A G A T G T T A C T G T T G A T A A
7 G T T A T A T C T G A T G A A G T A G G C G G A G A C T T A A A A G A A G C T A C A T T A G A T A T
8 G T C A T C A C A G A A G A T C T T G G C C T T G A C C T G A A A T C T A C T C A A A T C G C T C A
9 G T G A T C T C T G A A G A T C G G T A T G G A G C T G G A A A A A G C A A C C C T G G A A G A

1 C T T A G G G G A A G C T C G C C G T G T G C A A G T A G C C A A A G A A A A A C C A C G G T T A 1000
2 C T T A G G G G A A G C T C G C C G T G T G C A A G T A G C C A A A G A A A A A C C A C G G T T A
3 C T T A G G G G A A G C T C G C C G T G T G C A A G T A G C C A A A G A A A A A C C A C G G T T A
4 C T T A G G G G A A G C T C G C C G T G T G C A A G T A G C C A A A G A A A A A C C A C G G T T A
5 C T T A G G G G A A G C T C G C C G T G T G C A A G T A G C C A A A G A A A A A C C A C G G T T A
6 T T T A G G T G A T G C T A G A A A G G T T C A A A T A G C T A A A A G A A A A A C T A C T G T T A
7 G C T T G G A G A A G C T G A A A G T G T T A A G G T A C T A A A G A A A A G T A C T A C A A T A G
8 A T T G G G A C G C G C T T C T A A A G T T G T C G T T A C T A A A G A A A A C A C A C A A T C G
9 C C T G G G T C A G G C T A A A C G T G T T G T G A T C A A C A A A G A C A C C A C C A T A T C A

1 T T G G T G G T A A A G G G T T C T A A G G A A A C G A T C C A A A A A C A C C T T G A C C T T C T A 1050
2 T T G G T G G T A A A G G G T T C T A A G G A A A C G A T C C A A A A A C A C C T T G A C C T T C T A
3 T T G G T G G T A A A G G G T T C T A A G G A A A C G A T C C A A A A A C A C C T T G A C C T T C T A
4 T T G G T G G T A A A G G G T T C T A A G G G A A A C G A T C C A A A A A C A C C T T G A C C T T C T A
5 T T G G T G G T A A A G G G T T C T A A G G A A A C G A T C C A A A A A C A C C T T G A C C T T C T A
6 T T G G T G G T A A A G G G C A A T A A G A T A A A A T C A A A A A G C A T G T T G A A C T T C T A
7 T T A A T G G A A G A A C T C A G A A G A G A T A A A A A T A G A A T T A A C C A A A T A
8 T T G A A G G C G C T G G C G A A A C A G A C A A A A T T T C T G C C C G T G T G A C T C A A A T C
9 T C G A T G G C G T G G G T G A A G A A G C T G C A A T C C A G G G C C G T G T T G C T C A G A T C

1 A A T G G T C G T T T A A A G C A A A C T A C C G A A A A G T A C G A T A C C G A T C T G T T A A A 1100
2 A A T G G T C G T T T A A A G C A A A C T A C C G A A A A G T A C G A T A C C G A T C T G T T A A A
3 A A T G G T C G T T T A A A G C A A A C T A C C G A A A A G T A C G A T A C C G A T C T G T T A A A
4 A A T G G T C G T T T A A A G C A A A C T A C C G A A A A G T A C G A T A C C G A T C T G T T A A A
5 A A T G G T C G T T T A A A G C A A A C T A C C G A A A A G T A C G A T A C C G A T C T G T T A A A
6 A A C G G A A G A T T A A A A C A A A C C A C T G A C A A G T A T G A T T C T G A T T T A A T T A A
7 A A A T T A C A A T T A G A A G C T A C T A C T T C T G A A T T T G A C A A A G A A A A A T T A C A
8 C G C G C T C A A G T G G A A G A A A C A A C T T C T G A A T T C G A C A G A G A A A A A T T A C A
9 C G T C A G C A G A T T G A A G A A G C A A C T T C T G A C T A C G A C C G T G A A A A A C T G C A

1 G G A A C G G A T T G C C C A C C T C A G T C A A G G G G T A G C T G T A G T A C G G G T T G G T G 1150
2 G G A A C G G A T T G C C C A C C T C A G T C A A G G G G T A G C T G T A G T A C G G G T T G G T G
3 G G A A C G G A T T G C C C A C C T C A G T C A A G G G G T A G C T G T A G T A C G G G T T G G T G
4 G G A A C G G A T T G C C C A C C T C A G T C A A G G G G T A G C T G T A G T A C G G G T T G G T G
5 G G A A C G G A T T G C C C A C C T C A G T C A A G G G G T A G C T G T A G T A C G G G T T G G T G
6 A G A A A G A A T T G C T T A T T T A A G T C A A G G T G T T G C T G T T A T C C G T G T T G G T G
7 A G A A A G A T T A G C T A A A T T A G C A G G T G G G G T T G C A G T G G T T A A G G T T G G A G
8 A G A G C G T C T T G C T A A A C T T G C T G G C G G C G T A G C T G T C A T C A A A G T C G G C G
9 G G A A C G C G T A G C G A A A C T G G C A G G C G G C G T T G C A G T T A T C A A A G T G G G T G

1 G T G C T A C G G A A C T A G C A C A A A A G A G T T A A A A C T C C G C A T T G A A G A T G C C 1200
2 G T G C T A C G G A A C T A G C A C A A A A G A G T T A A A A C T C C G C A T T G A A G A T G C C
3 G T G C T A C G G A A C T A G C A C A A A A G A G T T A A A A C T C C G C A T T G A A G A T G C C
4 G T G C T A C G G A A C T A G C A C A A A A G A G T T A A A A C T C C G C A T T G A A G A T G C C
5 G T G C T A C G G A A C T A G C A C A A A A G A G T T A A A A C T C C G C A T T G A A G A T G C C
6 G T G C A A C T G A A C T C G C A C A A A A G A A T T A A A A C T C A G A A T C G A A G A C G C T
7 C T G C C A C T G A A A C A G A G C T T A A G G T A A G T T A A G A T C G A A G A T G C C
8 C T G C G A C T G A A A C T G A G C T G A A A G A G C T A A A C T T C G C A T C G A A G A C G C C
9 C T G C T A C C G A A G T T G A A A T G A A A G A G A A A A A G C A C G C G T T G A A G A T G C C

1 T T A A A C T C G A C T A A G G C A G C T G T T G A A G A A G T G A T T A T T T C C G G G G G T G G 1250
2 T T A A A C T C G A -
3 T T A A A C T C G A C T A A G G C A G C T G T T G A A G A A G T G A T T A T T T C C G G G G G T G G
4 T T A A A C T C G A C T A A G G C A G C T G T T G A A G A A G T - - - - - - - - - - - - - - - -
5 T T A A A C T C G A C T A A G G C A G C T G T T G A A G A A G G G A T T A T T T C C G G G G G T G G
6 T T A A A T T C C A C C A A A A G C T G C A G T T G A A G A A G G G A T T A T C G C C T G G A G G T G G
7 T T A G C A G C T A C A A A G G C A G C T G T T G A A G A A G G A A T A G T T C C A A G G T G G T G G
8 T T G A A C T C A A C T C G C G C A G C T G T T G A A G A A G G C A T C G T A T C C G G T G G T G G
9 C T G C A C G C G A C C C G T G C T G C G G T A G A A G A A G C G T G G T T G C T G G T G G T G G

1 T A T T G C T T T A C T T A A C G T A T C C A C T A T C C T C A A T G A C A G T A A G T T G G C T G 1300
2 -
3 T A T T G C T T T A C T T A A C G T A T C C A C T A T C C T C A A T G A C A G T A A G T T G G C T G
4 -
5 T A T T G C T T T A C T T A A C G T A T C C A C T A T C C T C A A T G A C A G T A A G T T G G C T G
6 T G T T G G T T T A T T A A A T G C T T C T T G T G T T T T A A C T A A C A G T A A A C T A A A G
7 A A C A G C T T A C G T A A A T G T A A T A A A T - - - - - G - - A A - - - - - - - - - -
8 T A C A G C G C T T G T A A A C G T A T A T A A C - - - - - A - - A A - - - - - - - - - -
9 T G T T G C G C T G A T C C G C G T A G C G T C T - - - - - A - - A A - - - - - - - - - -

1 A C A A G T A C A A G G C A G A A A C T A G T G C G G A A A A C C T C A A G G A A A T C C T G G T T 1350
2 -
3 A C A A G T A C A A G G C A G A A A C T A G T G C G G A A A A C C T C A A G G A A A T C C T G G T T
4 -
5 A C A A G T A C A A G G C A G A A A C T A G T G C G G A A A A C C T C A A G G A A A T C C T G G T T
6 A A C G A T A T G A A A A T G A A A C T A G T G T T G A A A A C A T T A A A G A A A T C C T A C T T
7 - - - - - - - - - - G T G G C A A A A T T A A C T T C T G A T A T T C A A G A T G A A C A A - - - G T T
8 - - - - - - - - - - G T C G C T G C A G T T G A A G C T G A A G G C G A T G C T C A A A - - - - - C A
9 - - - - - - - - - - C T G G C T G A C C T G C G T G G T C A G A A C G A A G A C C A G A A C - - - G T G

1 G G T T A T G A A A T T G T G C G T A A G T C A C T A G A A G C A C C A G T G C G C C A A A T T A T 1400
2 -
3 G G T T A T G A A A T T G T G C G T A A G T C A C T A G A A G C A C C A G T G C G C C A A A T T A T
4 -
5 G G T T A T G A A A T T G T G C G T A A G T C A C T A G A A G C A C C A G T G C G C C A A A T T A T
6 G G T T T T G A A A T T G T G C A A A G T C T C T A G A A G C A C C A G C G C G T C A A A T T A T
7 G G T A T A A A T A T A T T G T A A G A G A C T T T A G A A G A A C C T A T G A G A C A A A T A G C
8 G G T A T C A A C A T C G T G C T T C G C G C G C T T G A A G A G C C A A T C C G T C A A A T C G C
9 G G T A T C A A A G T T G C A C T G C G T G C A A T G G A A G C T C C G C T G C G T C A G A T C G T

```

1  T G A A A A C T C C G G G G T T A A C C C A G T T A A A G T A T T T G C A G A A C T A C G C A G T G 1450
2  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
3  T G A A A A C T C C G G G G T T A A C C C A G T T A A A G T A T T T G C A G A A C T A C G C A G T G
4  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
5  T G A A A A C T C C G G G G T T A A C C C A G T T A A A G T A T T T G C A G A A C T A C G C A G T G
6  T C A A A A C T C A G G A G T T G A C C C A G T T A A A A T T C T C A G T G A A A T T G A A A A A T G
7  T C A T A A C G C A G G A T T A G A A G G T T C A G T T A T A A T A G A A A A A G T T A A A A A T A
8  A C A C A A C G C T G G C C T T G A A G G A T C T G T C A T C G T T G A G C G C C T C A A A A A C G
9  A T T G A A C T G C G G C G A A G A A C C G T C T G T T G T T G C T A A C A C C G T T A A A G G C G

```

```

1  A A G C T G A T G G T G T T G G T T T T G A T G C T G A A A C C A A A A A G A A G G T C G A C A T G 1500
2  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
3  A A G C T G A T G G T G T T G G T T T T G A T G C T G A A A C C A A A A A G A A G G T C G A C A T G
4  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
5  A A G C T G A T G G T G T T G G T T T T G A T G C T G A A A C C A A A A A G A A G G T C G A C A T G
6  A A A A A A C T G G T G T T G G C T T T G A T G C T G A G A C T A A A A A G A A G G T T G A T A T G
7  G T G A T G C A G G T G T A G G A T T T G A T G C T T T A A G A G G A G A A T A T A A A G A T A T G
8  A A G A A A T C G G C G T A G G C T T C A A C G C T G C A A C T G G C G A A T G G G T A A A C A T G
9  G C G A C G G C A A C T A C G G T T A C A A C G C A G C A A C C G A A G A A T A C G G C A A C A T G

```

```

1  A T C C G C A G C G G T A T T A T T G A C C C T A C T A A G G T A A C C A A A A C T G C A C T C G A 1550
2  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
3  A T C C G C A G C G G T A T T A T T G A C C C T A C T A A G G T A A C C A A A A C T G C A C T C G -
4  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
5  A T C C G C A G C G G T A T T A T T G A C C C T A C T A A G G T A A C C A A A A C T G C A C T C G A
6  A T T G C A A A T C G G A A T C A T T G A T C C C A C C A A A A G T A A C T A A A A C T G C A C T T G A
7  A T T A A A G C A G G A A T A G T T G A T C C A A C T A A A G G T T A C A A G A T C A G C T C T T C A
8  A T C G A A A A A G G T A T C G T T G A C C C A A C A A A A G T T A C A C G C T C A G C T C T T C A
9  A T C G A C A T G G G T A T C C T G G A T C C A A C C A A A A G T A A C T C G T T C T G C T C T G C A

```

```

1  A A A A G C T G C A T C A G T A G G T T A A G G A A T T G T T - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 1600
2  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
3  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
4  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
5  A A A A G C T G C A T C A G T A G C A A G T T C C T T A A T T A C C A C C A G C G T T G C T G T G T
6  A A A A G C T G C T T C T G T A G C T A G T T C A T T A A T T A C T A C T A A A T G T T G C T G T G T
7  A A A T G C A G C A T C A G T A G C A T C A A C A T T C T T A A C A A C A G A G G C T G T G T A G
8  A A A C G C T G C T G T C T G T A G C T G C A A T G T T C T T A A C A A C A G A A G C T G T T G T C G
9  G T A C G C A G C T T C T G T G C T G G C C T G A T G A T C A C A C C A G A A T G C A T G G T A

```

```

1  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 1650
2  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
3  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
4  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
5  A T G A T A T T A A G G A A A A C A A G G A A G G T A G C T T C C A A G A A T A G - - - - - - - - - - - -
6  A T G A T G T T A A A G A G A G A A A A G A T A A C T C C T T T T C A G A A T A A - - - - - - - - - - - -
7  C A G A T A T T C C A G A A A A A G A A A T G C C T C A - - A G G T G C A G G T A T G G G A A T G
8  C T G A C A A G C C A G A A A G A A A C G G T G G C G G C G C A G G A A T G C C T G A - - T A T G
9  C C G A C C T G C C G A A A A A C G A T G C A G C T G A C T T A G G C G C T G C T G G C G G T A T G

```

```

1  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 1683
2  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
3  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
4  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
5  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
6  - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
7  G A C G G A A T G T A T T A A - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
8  G G C G G C A T G G G C G G T A T G G G T G G A A T G A T G T A A
9  G G C G G C A T G G G T G G C A T G G G C G G C A T G A T G T A A

```

9.1.2 Vergleich der Basensequenz der *hsp70*-Genfragmente der untersuchten Mykoplasmen mit *hsp70*-Gensequenzen anderer Mykoplasmen- und Bakterienspezies

- 1: *M. arthritidis*
- 2: *M. bovis*
- 3: *M. agalactiae*
- 4: *M. hyopneumoniae*
- 5: *M. pneumoniae*
- 6: *M. genitalium*
- 7: *M. capricolum*
- 8: *C. perfringens*
- 9: *B. subtilis*
- 10: *E. coli*

1 - - - - - 50
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 A T G A G T A C A G A T A A C G G C T T A A T T A T C G G C A T T G A C C T T G G T A C C A C T A A
6 A T G A G T G C A G A C A A A G A A A A A A T T A T T G G C A T T A G A C C T T A G G A A C T A C C A A A
7 - - - - - A T G G C - - - - - A A A A A A A A A A T T A T T G G C A T T A G A C C T T A G G A A C T A C C A A A
8 - - - - - - - - - - A T G A G T A A A A A T T A T T C G G C A T T A G A C C T T A G G A A C T A C C A A A
9 - - - - - - - - - - - G T G A G T A A A A G T T A T T C G G C A T T A G G A A C T A C C A A A
10 - - - - - - - - - - A T G G G T A A A A T A A T T G G T A T C G A C C T T G G G T A C T A C C A A

1 - - - - - 100
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 C T C C T G T G T G T C G G T C A A T G G A A G A A T G G A C G C C C A G T A G T T G T T G G A A A A C C
6 T T C C T T G T G T T T C A G T T A A T G G A A G G T G G G A G A C C C T A T T A T T T T A G A A A A A T C
7 T T C A G T T G T T T C A G T T A A T G G A A G G T G G A G A A C C C A G T A G T T A T T C A C T A A C T
8 T T C A T G C G T A G C T G T T A T G G A A G G T G G A G A A C C C A G T A G T T A T T C A C T A A C T
9 C T C A T G T G T G G C A G T G C T T G A A A G G C G G C G A G C C C T A A A A G T T A T T G C T A A C G
10 C T C T T G T G T A G C G A T T A T G A T G G C A C C A C T C C T C G C G T G C T G G A G A A C G

1 - - - - - 150
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 C T G A A G G T A A A A C G C A C C A C C C T T C G A A T T G T T T C T T A C A - - - A G A A C A A C
6 C T G A A G G T A A A A A G A A C A A C A C C C T T C C A A T T G T T T C C T A T A - - - A A A A C A A T
7 C T G A A G G T C A A A A G A A C A C T A C C C A A G T G T T G C T T T A - - - A A A A A T T C A
8 C A G A A G G T G C T A G A A C A C T C C A T C A G T A G T T T C A T T C C A A G C A A C C G G A
9 C T G A A G G A A A C C G C A C A A C G C C A T C A G T T G T T G C A T T T A - - - A A A A C G G C
10 C C G A A G G C G A T C G C A C C A C G C C T T C T A T C A T T G C C T A T A C C C A G G A T G G T

1 - - - - - 200
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 G A A A T T A T T G T G G G T G A T G C T G C G A A A A C G G C A A A T G G T A A C T A A C C C T A A
6 G A A A T T A T A G T A G G T G A T G C T G C T A A A A A G A C A G A T G G T T A C A A A C C C G A A
7 G A T A T T A T T G T T G G T G G A G C T G C T A A A A C G T C A A A G C T G T A A C T A A A T C C A A A
8 G A A A G A T T A G T A G G T C A A A G T G C T A A A A A G A C A A A G C A A T A A C A A A C C C T G A
9 G A A C G T C A A G T A G G G G A A A G T G G C T A A A A C G C C A A T C T A T T A C A A A C C C T A A
10 G A A A C T C T A G T T G G T C A G C C G G C T A A A A C G T C A G G C A G T G G A C G A A C C G C A

1 - - - - - 250
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 T A C T A T T G T T T C C - - - A T T A A A G C G T T T A A T G G G T - - - - -
6 T A C C A T T G T C T C C - - - A T C A A A G A G G T T G A T G G G T - - - - -
7 T G T T G T T C A A T C A - - - A T A A A A A T C A A A A A T G G G A - - - - -
8 C A A A A C A A A A T G T C A A A T A A A A A G A C A C A T G G G A - - - - -
9 C A C A A T T A T G T C T - - - A T C A A A C G T C A T A T G G G T - - - - -
10 A A A C A C T C T G T T T G C G A T T A A A A C G C C T G A T T G G T C G C C G C T T C C A G G A C G

1 - - - - - 300
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 - - - - - A C C T C C A A T
6 - - - - - A C C T C A A A T
7 - - - - - A C T A C T T C T
8 - - - - - A C T G A C
9 - - - - - A C T G A T
10 A A G A A G T A C A G C G T G A T G T T T C C A T C A T G C C G T T C A A A A T T A T T G C T G C T

1 - - - - - 350
2 - - - - -
3 - - - - -
4 - - - - -
5 A A G G T A A C C G T T A A A G A A T C C T G A T G G T T C T A C C A A A G A A G T T A A C T C C T G A
6 A A A G T A A A A G T C C A A A A T G C T G A T G G T A C A A C T A A G G A A T T A A A G T C C C T G A
7 A A A G T T A A T T T A G A A G G A - - - - - A A A G A A T T A T A G T C C C A G A
8 T A T A A - - - - - A G T T A A A T A G A T G G A A A A G A T T T A T C T C C A C A
9 T A T A A - - - - - A G T T G A A A A T T G A A G G A A A G G A T T A C C A C C A C A
10 G A T A A C G G C G A C G C A T G G G T C G A A G T T A A A G G C C A G A A A A T G G C A C C G C C

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

1	G	G	T	G	G	A	G	G	A	A	C	A	T	T	T	G	A	C	G	T	T	T	C	A	A	T	T	T	A	G	A	A	A	T	G	G	A	A	A	A	T	G	G	C	G	-	-	-	-	650	
2	G	G	T	G	G	A	G	G	A	A	C	A	T	T	T	G	A	C	G	T	T	T	C	A	A	A	T	T	T	A	G	A	A	A	A	T	G	G	A	A	A	A	T	G	G	C	G	-	-	-	-
3	G	G	T	G	G	A	G	G	A	A	C	A	T	T	T	G	A	C	G	T	T	T	C	A	A	A	T	T	T	A	G	A	A	A	A	T	G	G	A	A	A	A	T	G	G	C	G	-	-	-	-
4	G	G	T	G	G	A	G	G	A	A	C	A	T	T	T	G	A	C	G	T	T	T	C	A	A	A	T	T	T	A	G	A	A	A	A	T	G	G	A	A	A	A	T	G	G	C	G	-	-	-	-
5	G	G	T	G	G	A	G	G	A	A	C	A	T	T	T	G	A	C	G	T	T	T	C	A	A	A	T	T	T	A	G	A	A	A	A	T	G	G	A	A	A	A	T	G	G	C	G	-	-	-	-
6	G	G	T	G	G	A	G	G	A	A	C	A	T	T	T	G	A	C	G	T	T	T	C	A	A	A	T	T	T	A	G	A	A	A	A	T	G	G	A	A	A	A	T	G	G	C	G	-	-	-	-
7	G	G	T	G	G	A	G	G	A	A	C	A	T	T	T	G	A	C	G	T	T	T	C	A	A	A	T	T	T	A	G	A	A	A	A	T	G	G	A	A	A	A	T	G	G	C	G	-	-	-	-
8	G	G	T	G	G	A	G	G	A	A	C	A	T	T	T	G	A	C	G	T	T	T	C	A	A	A	T	T	T	A	G	A	A	A	A	T	G	G	A	A	A	A	T	G	G	C	G	-	-	-	-
9	G	G	T	G	G	A	G	G	A	A	C	A	T	T	T	G	A	C	G	T	T	T	C	A	A	A	T	T	T	A	G	A	A	A	A	T	G	G	A	A	A	A	T	G	G	C	G	-	-	-	-
10	G	G	T	G	G	A	G	G	A	A	C	A	T	T	T	G	A	C	G	T	T	T	C	A	A	A	T	T	T	A	G	A	A	A	A	T	G	G	A	A	A	A	T	G	G	C	G	-	-	-	-

[illegible]

1 G T G A T G A T T G G A G A T A A T G C A A T T G T T A A A T T G A A T - - - G G T T G A A G A A A T T 750
2 A T T G A T G A T T G A G A C T A A A T T G A A A T T G A A T T - - - G G T T G A A G A A A T T
3 G G G A T G A C T T G A G A C T A A A T T G A A A T T G A A T T - - - A A T T G A A T T A A A T T C
4 G G G A T G A C T T G G G A C T A A A T T G A A A T T G A A T T - - - T G T T A A A A A A A T T C
5 G T G A T G A C T T G G G A C T A A A T T G A A A T T G A A T T C T T A G C G C A C A T T G C C
6 G T G A T G A T T T G G A T A A C A A G A T C A T T G A A T T A T A T C T C A G C C T A C A T T G C C
7 G A G A T A A T T T T T G A T G A A G A A A T T A T C A A A T T G A T T - - - A C T A G G T A A A A T T
8 G A G A T G A C T T T T G A C C A A A G A A A T T A T A G A T T A T A T - - - A G C T G A A G A C T T T
9 G G G A C G A T T T T T G A C C A A G T T A T C A T C G A T C A T C T - - - G G T G T C T G A A T T C
10 G T G A A G A C T T T C G A C A G C C G T C T G A T C A A C T A T C T - - - G G T T G A A G A A A T T C

1 A A A A A T A A A T A C A A C T A T A A C C C A G A A A C T G A A A A A A T G G C A A T G G C A A G 800
2 A A A A A T A A A T A C A A C T A T A A C C C A G A A A C T G A A A A A A T G G C A A T G G C A A G
3 A A A A A A A G A C T A T A A A A C A G A T G T T A C C A A C A A A A A A T G G C A A T G G C T C G
4 A A A G A A A A A T A T T G A T T T T G A T C C A A A A G T G A T A A A A T G G C G C T T A C A A G
5 C A A G A A C A C A A T T G G G C T T A A A C T T G T C C A A A T G A C A A A G A T G G C T A T G C A A C G
6 A A A G A A C A C C A G G G T T T A A A C T T A T C A A A A G A T A A G A T G G C T A T G C A A C G
7 A A A G C T G A A T A C A A T A T T G A T T T A T C T A A A A G A A A A A T G G C T T T A C A A A G
8 A A A G G T G A A A A C G G A A T T G A T T T A A G A C A A A G A T A A A A T G G C T C T T C A A A G
9 A A A A A A A A A C G G C A T T G A T T T G T C A A A A G A C A A A A T G G C G C T T C A G C G
10 A A G A A A G A T C A G G G C A T T G A C C T G C G C A A C G A T C C G C T G G C A A T G C A G C G

1 A C T A A A A G A A G A A G C T G A A A A G A G C A A A A A T T A C T C T T T C T G A A A G T A T G G 850
2 A C T A A A A G A A G A A G C T G A A A A G A G C A A A A A T T A C T C T T C T G A A A G T A T G G
3 T T A A A A G C G G C A G C T G A A A A A G C A A A A A T T G A C T T A T C T A G T T C A C A A C
4 A C T T A A A G A A G A G G C T G A A A A A A C C A A A A T T A A T C T T T C A A A T C A A A G T G
5 C T T A A A G A A G C G G C T G A A A C G T G C T A A A G A T T G A A C T T T C C G C C C A A C T A G
6 G C T T A A A A G A G C A G C T G A A A C G T G C T A A A G A T T G A A C T T T C C G C T C A A C T T G
7 A T T A A A A G A T G A A G C T G A A A A A G C A A A A A T T A A T T T A T C T A G C C A A T T A G
8 A T T A A A A G A A G C T C G T C A A A A A A G C T A A A A A T T G A T T A T C A T C A C A C T C
9 T T T G A A A A G C G C A G C T G A A A A A G C G A A A A A A G A T C T T T C C G G C G T A T C T T
10 C C T G A A A A G C G G C A G A A A A A G C G A A A A T C G A A A C T G T C T T C C G C T C A G C

1 T T G C T A A T A T T T C T C T A C C A T T C T T G G C C A T G T C A C A A A - - - C A G G A C C A 900
2 T T G C T A A T A T T T C T C T A C C A T T C T T G G C C A T G T C A C A A A - - - C A G G A C C A
3 A A G C T A C A A T T A T G C T T C C A T T T T T A G T T A T G T C A C A A A G G T T C A G G A C C T
4 T T T C T A C A A T T T C T C T A C C A T T T T T A G G A A A T G G G C A A A A - - - A C G G T C C G
5 A A G C A A T T A T C T C T T A C C G T T C T T A A C G G T T A C C G A A A - - - A G G G T C C G
6 A A A C G A T T A T T T C T C T A C C A T T T T T A A C T G T T A C C C A A A - - - A A G G T C C T
7 A A G T T G A A A T T A A T T T A C C A T T T T T A A C T G T T A C A A T G A A A - - - G T G G A C C A
8 A A A C A T T A A A T C A A C T T A C C A T T T A T A A C T G C T G A T G C A A - - - C T G G T C C A
9 C T A C G C A A A T T T C T T T A C C G T T T A T C A C A G C T G G A G A A G - - - C A G G A C C G
10 A G A C C G A C G T T A A C C T G C C A T A C A T C A C T G C A G A C G C G A - - - C C G G T C C G

1 A T T A A T G T C G A A T T G G A A C T A A A A A G A T C G G A G T T T G A A A A A A T G A C T G A 950
2 A T T A A T G T C G A A T T G G A A C T A A A A A G A T C G G A G T T T G A A A A A A T G A C T G A
3 A T T A A T G T T G A A A G C A A C C T T A A A A A G A A T C A A A T T T G A A A A A A T G A C T G
4 A T T A A C G T T G A A C T T T A A G A C T T A A A A G A T C A G A A T T T G A A A A A A T G A C T G
5 G T A A A C G T T G A A C T T T A A G A C T A A C C C G T G C T A A A G T T T G A A A A A A T T A C C A A
6 G T T A A C G T T G A G T T A A A A C T A A C C C G T G C T A A A G T T T G A A G A G T T A A C A A A
7 A T T T C T T T T G C A A C A C T C T A A C A A G A A G T G A A A T T T A A C A A A A T T A C A A A
8 A A A C A C A T T A G A T T G A C A T T A A C A A G A G C T A A A T T C A A T G A A T T A C A C A
9 C T T C A C C T T G A A C T T A C A T T A A C T C G C G C T A A A T T C G A A G A G C T T T C T T C
10 A A A C A C A T T G A A C A T C A A A G T G A C T C G T G C G A A A C T G G A A A G C C T G G T T G A

1 C G A T C T A C T A C A A A G A A C T A A A A A C C A C T A T T A G A T G C A T T A A G C G A A G 1000
2 C G A T C T A C T A C A A A G A A C T A A A A A C C A C T A T T A G A T G C A T T A A G C G A A G
3 G C A T T T A G T T T G A A A G A T G T A G A A A A C C T A T T T G A A A C A G C T T T A G C T G A T G
4 C C A T T T A T C G A T A G A A C T C G C A A A C C A A T T G T T G A T G C T C T A A A A C A A G
5 A C A A T T A C T A G A A C G T A C T C G C A A C C A A T T T C G G A T G T T T T A C G T G A A G
6 A C C A C T A C T T G A A A G A A C A A A A C C C T A T T T C A G A T G T T A T C A G G A G A G
7 A C A T T T A G T T G A A C T T G A C T A A T T C A A C C A G T T T A A A G A T G C T T T A A A T G C T G
8 T G A C T T A G T T G A A A G A A C A A T C A A C A T A A T G A A A G A A G C T T T A A A A T C A G
9 T C A T T T A G T A G A A G C G C A C A A T G G G T C C T G T C C G T C A A G C G C T T C A A G A T G
10 A G A T C T G G T A A A C C G T T C A A T T G A G C C G C T G A A A G T T G C A C T G C A G A C G

1 C A A A A T T A C A A A A T T A A T G A T C T A G A T G A A G T T T T A T T A G T T G G T G G T T C A 1050
2 C T A A A A T T A C A A A A T T T C T G A T T T A G A T G A A G T T T T A T T A G T T G G T G G T T T C A
3 C T A A A A T T T G A G G C T T C A G A T C T T G A T G A A G T T C T C C T T G T A G G T T G G A T C A
4 C C A A A G A T T A A A C C A G A A G A A A T T A A T G A A A T C T T G T T G G T G G T G G A T C G
5 C T A A A G A T T A A A C C T G A A G A G A T T A A T G A A A A T T C T T T T A G T T G G T G G T T C T
6 C T A A A A A A C T C C A A G T G A A A T T A A T G A A A G T T T T A T T A G T T G G T G G T C A
7 G T A A T G T T T C A T T A A A T G A T A T A G A T A A A G T A A T C T T A G T T G G T G G A T C A
8 A G G A C T T T C T G C A A G C G A A A T C G A C A A A G T C A T C C T T G T C G G C G A T C A
9 C T G G C T T G T C G T A T C T G A T A T C G A C G A C G T A T C C T C G T T G G T G G T C A G
10 C T G G C T T G T C G T A T C T G A T A T C G A C G A C G T A T C C T C G T T G G T G G T T C A G

1 A C T A G A A T G C C C G G C T G T T C A A A A A T T A G T T A G C T G A T A C C A T T - - - A A T A A 1100
2 A C T A G A A T G C C C G G C T G T T C A A A A A T T A G T T A G C T G A T A C C A T T - - - A A T A A
3 A C A A G A A T T C C C G G C A G T T C A A C A A T T A G T T A G A G C A T A C T T T A - - - A A T A A
4 A C A A G A A T G C C C A G C A G T T C A A G T C A A T G A G C A T A C T T T A - - - A A T A A
5 A C C C G G G A T G C C C A G C A G T T C A A A A A C T A G T T G G A A T C A A T G G T A C C A G G A C A
6 A C A A G G A T G C C C T G C A G T T C A A A A A G C T A G T T G A A A T C A A T G G T A C C A G G T A A
7 A C A A G A A T A C C C T G C A G T T C A A A A A T T A A A A G T T T C A C T - - - A A T A A
8 A C A A G A A T A C C C A G C A G T T C A A A A A G A A G C T T G T T A A A A C T - - - G G A A A
9 A C T C G T A T C C C T A G C C G T T C A A A A A G A A G C A A A A A A G A A C T - - - G G A A A
10 A C T C G T A T G C C A A T G G T T C A A A A A A A G A A A G T T G C T G A G T T C T T - - - G G T A A

1 A A A A C C T A A C A A T T C C T T T T T A T C C - 1150
2 A A A A C T -
3 A A A A G C C A A C C G T T C A G T T -
4 A A A G C C G G -
5 C A G T C C A A A C C G C T C A A T T T A A C C C G G A T G A G G T G G T A G C C A T T G G G T G C T G
6 A A A A C C A A A C C G T T C A A T T T A A T C C C A G A T G A A G T T G T T G C T A T T G G G C G C T G
7 A G A A C C A A A T A G A T C A A T T A A T C C C A G A T G A A G T T G T T G C T A T T G G G T G C T G
8 A G A A C C T T C A A A A G G A G T T A A C C C A G A T G A A G T G C G T A G C A A T G G G T G C T G
9 A G A A G C G C A T A A A G G C G T A A A C C C G G A T G A A G T T G T A G C G C T T G G T G C T G
10 A G A G C G C G T A A A G A C G T T A A C C C G G A C G A A G C T G T A G C A A T C G G T G C T G

1 - 1200
2 -
3 -
4 -
5 C C A T T C A A A G G G G G G T G T T T T A C G C G G T G A T G T T A A A G G A C G T G T T A C T G T T G
6 C T A T T G C A A A G G T G G A G T T T T A C G C T G G T G A A A G T T A C T G A T A T T T A C T T T A
7 C T A T T C A A A G G C T G G T G T T T A A C T G G T G A T G T T A A A G A C G T A T T A T T A T T A
8 C G A T T C A G G G C G G C G T T A T C A C A G G T G A C G T A A A A G A T G T T G T T C T T C T T G
9 C T G T T C A G G G T G G T G T T C T G A C T G G T G A C G T A A A A G A C G T A C T G C T G C T G
10 C T G T T C A G G G T G G T G T T C T G A C T G G T G A C G T A A A A G A C G T A C T G C T G C T G

1 - 1250
2 -
3 -
4 -
5 G A C G T T A C C C T T T A A A C G C T C G A T T G A A A C C C T T A G G T G G T G T A G C A A C
6 G A T G T A A C C C A T T A A C C C T T T T C G A A A C C T T A G G T G G T G T G G C T A C
7 G A T G T A A C C C A T T A A C C A T T A G G T A T T G A A A C A A T G G G T G G A G T T A G A C
8 G A T G T T A C C C A T T A A C A C A T T A G G T A T T C G A A A C C T T A G G G A G T G T G C A A C
9 G A C G T T A C C C G C T T T C T C T C G G T A T C G A A A C A A T T G G G C G G T G T G A T G A C
10 G A C G T T A C C C G C T G T C T C T G G G T A T C G A A A C A A T G G G C G G T G T G A T G A C

1 - 1300
2 -
3 -
4 -
5 T C C G T T A A A T T A A G C G T A A C A C C A C A T T C C C T G T A A G T A A A G A G T C A A A T C T
6 T C C T T T A A A T T A A A G A A A A T A C A C T A T T C C C A G T A A G T A A A A G T C A A A T C T
7 A A A A T T A A A T T G A A A G A A A T A C A C A T A T T C C C A G C A A A A A A G A C T C A A A T T T
8 T C C A T T A A A T C G A A A G A A A A T A C A C A T A T C C C T G C A A A G A A A G A C T C A A A T A T
9 A A A A C T G A T C G A C C G C A A C A C A G A C A T C C C A A C A A G C A A A T C T C A A G T G T
10 G A C G C T G A T C G C G A A A A A C A C A C A C A T A T C C C G A C C A A G C A C A G C C A G G T G T

1 - 1350
2 -
3 -
4 -
5 T C T C T A C A G C G C A A A G A C A A C C A A G A A T C A G T T G G A T G T G G T G T T G T C A A
6 T T T C A A C T G C A A C A G A T A A T C C A A A C C A G C T G T T G A T A T T A A A T G T T T G T C A A
7 T T T C A A C T G C A A C A G A T A A T C C A A A C C A G C T G T T G A T A T T A A A T G T T T A C A A
8 T G T C A A C T G C A A C A G A T A A C C A A A C A T C A G T T G A A A T T C A C A G T T A C A A
9 T C T C A A C T G C A A C C A A A C C A A A C A G C C A G T T G A T A T C C A T G T T C T T C A A
10 T C T C T A C G C G A A G A C A A C C A G T C G G T A A C A T C C A T G T G C T G C A G

1 - 1400
2 -
3 -
4 -
5 G G G G A A C C C A A T G T G C A C G T G A C A A T C A A A G T C A T T T A G G G T C G C T T T A A C T T
6 G G G G A A A A G A C C A A T G T G C A G C T G A T A A A T A A A G T C A T T T A G G G T C A A A T T
7 G G T G A A A A G A C C A A T G G C A G C T G A T A A A T A A A A C C A T T T A G G G T C A A A T T
8 G G T G A A A A G A C C A A T G T G C A G C C G A C A A A A C C A C T T T A G G G T C A A A T T
9 G G T G A G C G C C A A T G T G C G C C G A C A A A A C C A C T T T A G G G T C A A A T T
10 G G T G A A C G T A A A C G T G C G C C G A T A A A A A A T C T C T G G G T C A G T T C A A C T T

[illegible][illegible]

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

1550

A	C	T	C	A	A	A	A	G	G	A	A	A	A	C	A	G	T	A	T	T	A	C	T	A	T	T	A	G	T	G	A	C	A	C	G	G	C	A	A	C	T	T	G	T	C	T	G	A		
A	C	T	C	A	A	A	A	G	G	A	A	A	A	C	A	G	T	A	T	T	A	C	T	A	T	T	A	G	T	G	A	C	A	C	G	G	C	A	A	C	T	T	G	T	C	T	G	A		
A	C	T	C	A	A	A	A	G	G	A	A	A	A	C	A	G	T	A	T	T	A	C	T	A	T	T	T	A	G	T	G	A	C	A	C	G	G	T	A	A	T	C	T	T	A	A	G	T	G	A
A	C	T	C	G	G	G	A	A	A	G	A	A	G	C	T	A	A	C	T	T	A	C	A	T	A	T	C	A	C	A	G	C	T	T	C	A	C	T	A	A	C	T	T	C	A	G	C	G	A	
A	C	A	G	G	G	A	A	A	G	A	A	C	A	A	T	A	A	C	A	T	T	A	C	A	A	T	C	A	A	A	C	T	C	T	C	T	C	A	A	G	T	C	T	C	A	G	C	G	A	
A	G	C	G	G	T	A	A	A	G	A	G	C	A	A	G	A	A	G	A	T	C	A	C	A	T	C	A	A	A	G	C	T	T	C	T	T	C	T	G	T	C	T	G	A	A	C	G	A		

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

1600

A	G	A	G	G	A	A	A	T	T	C	C	A	A	A	A	G	A	T	G	A	T	T	C	C	G	T	G	A	T	G	C	G	A	A	G	C	C	A	A	C	A	A	G	G	A	G	C	G	T	G	
A	G	A	G	A	G	A	A	T	T	C	C	A	A	A	A	G	A	T	G	A	T	T	C	C	G	T	G	A	T	G	C	G	A	A	G	C	C	A	A	C	A	A	G	G	A	G	C	G	T	G	
A	G	A	G	A	A	A	A	T	T	C	C	A	A	A	A	G	A	T	G	A	T	T	C	C	G	T	G	A	T	G	C	G	A	A	G	C	C	A	A	C	A	A	G	G	A	G	C	G	T	G	
T	G	C	T	G	A	A	A	T	T	C	C	A	A	A	A	G	A	T	G	A	T	T	C	C	G	T	G	A	T	G	C	G	A	A	G	C	C	A	A	C	A	A	G	G	A	G	C	G	T	G	
T	G	C	T	G	A	A	A	T	T	C	C	A	A	A	A	G	A	T	G	A	T	T	C	C	G	T	G	A	T	G	C	G	A	A	G	C	C	A	A	C	A	A	G	G	A	G	C	G	T	G	
A	G	A	A	T	T	C	C	A	A	A	A	G	A	T	G	A	T	T	C	C	G	T	G	A	T	G	C	G	A	T	G	C	G	A	A	G	C	C	A	A	C	A	A	G	G	A	G	C	G	T	G

[illegible]

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

1700

GT TGAAGCACACGATTTAAAGGAGATATCTTCCCAAAGTCCCTGAAAGCGGAAAGGAACTTTCCTC
ATTTAATCATCTATCTGAAAGACTTTCACATTAATTAAGTAAAGTCCCTGAGGTGATTAAGAAATTAGTGC
GTTTATTCCAAACAGACCTAGAGAAACAACTTTTAAATAGAACTTTGGGTGATAAAGAGTTTTCAGC
GTTTATTCCAAACAGACCTCCGTAAAGCAGAGTTTGAAGAGATCTTGAAAGGCAAGCAAGTAACTGCGC

[illegible]

[illegible]

9.1.3 Immunogene Bereiche ausgewählter Hsp60-Proteine

ANTIGENIC von *M. arthritidis* Hsp60

Length 476 residues, score calculated from 4 to 473

Report all peptides over 6 residues

Found 21 hits scoring over 1.00 (true average 1.02)

Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.206 length 13 at residue 27-39

*

Sequence: GAKVISVAAVSTN

27		39

(2) Score 1.192 length 17 at residue 322-338

*

Sequence: KERIAHLSQGVAVVRVG

322		338

(3) Score 1.190 length 10 at residue 226-235

**

Sequence: TINVVAVKCN

226		235

(4) Score 1.183 length 12 at residue 211-222

*

Sequence: AEEVTTLAVNK

211		222

(5) Score 1.175 length 8 at residue 202-209

*

Sequence: PLLIVAPD

202		209

(6) Score 1.151 length 21 at residue 401-421

*

Sequence: KEILVGYEIVRKSLEAPVRQI

401		421

(7) Score 1.144 length 9 at residue 427-435

*

Sequence: VNPVKVFAE

427	435

(8) Score 1.127 length 15 at residue 167-181

*

Sequence: MEVVLDQPKILVSAM

167	181

(9) Score 1.127 length 12 at residue 370-381

*

Sequence: GGGIALLNVSTI

370	381

(10) Score 1.107 length 8 at residue 187-194

*

Sequence: KEILPLLE

187	194

(11) Score 1.100 length 8 at residue 102-109

*

Sequence: EQVAAISS

102	109

(12) Score 1.097 length 7 at residue 267-273

*

Sequence: DVTVNHL

267	273

(13) Score 1.096 length 9 at residue 154-162

*

Sequence: TYASPYMVS

154	162

(14) Score 1.095 length 9 at residue 299-307

*

Sequence: QKHLDLLNG

299	307

(15) Score 1.095 length 14 at residue 115-128

ANTIGENIC von *M. bovis* Hsp60

Length 356 residues, score calculated from 4 to 353

Report all peptides over 6 residues

Found 17 hits scoring over 1.00 (true average 1.02)

Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.206 length 13 at residue 24-36

*

Sequence: GAKVISVAAVSTN

24		36

(2) Score 1.192 length 17 at residue 320-336

*

Sequence: KERIAHLSQGVAVVRVG

320		336

(3) Score 1.190 length 10 at residue 224-233

**

Sequence: TINVVAVKCN

224		233

(4) Score 1.183 length 12 at residue 209-220

*

Sequence: AEEVTTLAVNK

209		220

(5) Score 1.175 length 8 at residue 200-207

*

Sequence: PLLIVAPD

200		207

(6) Score 1.127 length 15 at residue 165-179

*

Sequence: MEVVLDQPKILVSAM

165		179

(7) Score 1.118 length 11 at residue 78-88

*

Sequence: SRLVDYTVGTA

78		88

(8) Score 1.107 length 8 at residue 185-192

*

Sequence: KEILPLLE

185	192

(9) Score 1.100 length 8 at residue 100-107

*

Sequence: EQVAAISS

100	107

(10) Score 1.097 length 7 at residue 265-271

*

Sequence: DVTVNHL

265	271

(11) Score 1.096 length 9 at residue 152-160

*

Sequence: TYASPVMVS

152	160

(12) Score 1.095 length 9 at residue 297-305

*

Sequence: QKHLDLLNG

297	305

(13) Score 1.095 length 14 at residue 113-126

*

Sequence: GKLIQAAMALVGKN

113	126

(14) Score 1.094 length 6 at residue 276-281

*

Sequence: RVQVAK

276	281

(15) Score 1.071 length 13 at residue 240-252

*

Sequence: KAALEDLAISTGT

240	252

(16) Score 1.052 length 6 at residue 46-51

*

Sequence: ATILAQ
 | |
 46 51

(17) Score 1.041 length 7 at residue 343-349

*

Sequence: QKELKLR
 | |
 343 349

ANTIGENIC von *M. agalactiae* Hsp60

Length 487 residues, score calculated from 4 to 484

Report all peptides over 6 residues

Found 22 hits scoring over 1.00 (true average 1.02)

Entries in score order, max score at "**"

(1) Score 1.206 length 13 at residue 43-55

*

Sequence: GAKVISVAAVSTN

43		55

(2) Score 1.192 length 17 at residue 338-354

*

Sequence: KERIAHLSQGVAVVRVG

338		354

(3) Score 1.190 length 10 at residue 242-251

**

Sequence: TINVVAVKCN

242		251

(4) Score 1.183 length 12 at residue 227-238

*

Sequence: AEEVTTLAVNK

227		238

(5) Score 1.175 length 8 at residue 218-225

*

Sequence: PLLIVAPD

218		225

(6) Score 1.151 length 21 at residue 417-437

*

Sequence: KEILVGYEIVRKSLEAPVRQI

417		437

(7) Score 1.144 length 9 at residue 443-451

*

Sequence: VNPVKVFAE

443		451

(8) Score 1.127 length 15 at residue 183-197
*

Sequence: MEVVLDQPKILVSAM
 | |
 183 197

(9) Score 1.127 length 12 at residue 386-397
*

Sequence: GGGIALLNVSTI
 | |
 386 397

(10) Score 1.107 length 8 at residue 203-210
*

Sequence: KEILPLLE
 | |
 203 210

(11) Score 1.100 length 8 at residue 118-125
*

Sequence: EQVAAISS
 | |
 118 125

(12) Score 1.097 length 7 at residue 283-289
*

Sequence: DVTVNHL
 | |
 283 289

(13) Score 1.096 length 9 at residue 170-178
*

Sequence: TYASPYMVS
 | |
 170 178

(14) Score 1.095 length 9 at residue 315-323
*

Sequence: QKHLDLLNG
 | |
 315 323

(15) Score 1.095 length 14 at residue 131-144
*

Sequence: GKLIQAAMALVGKN
 | |
 131 144

(16) Score 1.094 length 6 at residue 294-299

*

Sequence: RVQVAK

294	299

(17) Score 1.083 length 8 at residue 96-103

*

Sequence: ASQLIITE

96	103

(18) Score 1.079 length 7 at residue 9-15

*

Sequence: QNVILGR

9	15

(19) Score 1.071 length 13 at residue 258-270

*

Sequence: KAALEDLAISTGT

258	270

(20) Score 1.052 length 6 at residue 65-70

*

Sequence: ATILAQ

65	70

(21) Score 1.047 length 9 at residue 374-382

*

Sequence: STKAAVEEG

374	382

(22) Score 1.041 length 7 at residue 361-367

*

Sequence: QKELKLR

361	367

ANTIGENIC von *M. hyopneumoniae* Hsp60

Length 368 residues, score calculated from 4 to 365

Report all peptides over 6 residues

Found 17 hits scoring over 1.00 (true average 1.01)

Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.206 length 13 at residue 30-42

*

Sequence: GAKVISVAAVSTN

| |

30 42

(2) Score 1.192 length 17 at residue 325-341

*

Sequence: KERIAHLSQGVAVVRVG

| |

325 341

(3) Score 1.190 length 10 at residue 229-238

**

Sequence: TINVVAVKCN

| |

229 238

(4) Score 1.183 length 12 at residue 214-225

*

Sequence: AEEVTTLAVNK

| |

214 225

(5) Score 1.175 length 8 at residue 205-212

*

Sequence: PLLIVAPD

| |

205 212

(6) Score 1.127 length 15 at residue 170-184

*

Sequence: MEVVLDQPKILVSAM

| |

170 184

(7) Score 1.107 length 8 at residue 190-197

*

Sequence: KEILPLLE

| |

190 197

(8) Score 1.100 length 8 at residue 105-112
*

Sequence: EQVAAISS
 | |
 105 112

(9) Score 1.097 length 7 at residue 270-276
*

Sequence: DVTVNHL
 | |
 270 276

(10) Score 1.096 length 9 at residue 157-165
*

Sequence: TYASPYMVS
 | |
 157 165

(11) Score 1.095 length 7 at residue 304-310
*

Sequence: HLDLLNG
 | |
 304 310

(12) Score 1.095 length 14 at residue 118-131
*

Sequence: GKLIQAAMALVGKN
 | |
 118 131

(13) Score 1.094 length 12 at residue 281-292
*

Sequence: RVQVPKKKTTVI
 | |
 281 292

(14) Score 1.083 length 8 at residue 83-90
*

Sequence: ASQLIITE
 | |
 83 90

(15) Score 1.071 length 13 at residue 245-257
*

Sequence: KAALEDLAISTGT
 | |
 245 257

(16) Score 1.052 length 6 at residue 52-57

*

Sequence: ATILAQ
 | |
 52 57

(17) Score 1.041 length 7 at residue 348-354

*

Sequence: QKELKLR
 | |
 348 354

(8) Score 1.141 length 9 at residue 451-459

*

Sequence: LRQIVLNCG

451	459

(9) Score 1.136 length 15 at residue 499-513

*

Sequence: VTRSALQYAASVAGL

499	513

(10) Score 1.134 length 14 at residue 19-32

**

Sequence: GNVVLADAVKVTLG

19	32

(11) Score 1.131 length 8 at residue 36-43

*

Sequence: RNVVLDKS

36	43

(12) Score 1.130 length 8 at residue 461-468

*

Sequence: EPSVVANT

461	468

(13) Score 1.127 length 10 at residue 197-206

*

Sequence: RGYLSPYFIN

197	206

(14) Score 1.126 length 14 at residue 212-225

*

Sequence: AVELESPFILLADK

212	225

(15) Score 1.114 length 7 at residue 320-326

*

Sequence: AKRVVIN

320	326

(16) Score 1.103 length 9 at residue 51-59

*

Sequence: K D G V S V A R E

51	59

(17) Score 1.101 length 7 at residue 518-524

*

Sequence: E C M V T D L

518	524

(18) Score 1.088 length 7 at residue 186-192

*

Sequence: E L D V V E G

186	192

(19) Score 1.083 length 10 at residue 396-405

*

Sequence: V E D A L H A T R A

396	405

(20) Score 1.080 length 7 at residue 158-164

*

Sequence: V G K L I A E

158	164

(21) Score 1.079 length 7 at residue 74-80

*

Sequence: V K E V A S K

74	80

(22) Score 1.074 length 9 at residue 343-351

*

Sequence: Q G R V A Q I R Q

343	351

(23) Score 1.072 length 7 at residue 289-295

*

Sequence: L Q D I A T L

289	295

(24) Score 1.050 length 7 at residue 297-303

*

Sequence: GGTVISE

|
297

|
303

9.1.4 Immunogene Bereiche ausgewählter Hsp70-Proteine

ANTIGENIC von *M. arthritidis* Hsp70-Fragment

Length 194 residues, score calculated from 4 to 191

Report all peptides over 6 residues

Found 11 hits scoring over 1.00 (true average 1.01)
Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.176 length 9 at residue 161-169

*

Sequence: LDEVLLVGG

161	169

(2) Score 1.156 length 11 at residue 173-183

**

Sequence: MPAVQKLVDAT

173	183

(3) Score 1.132 length 8 at residue 19-26

*

Sequence: HKILVFDL

19	26

(4) Score 1.126 length 11 at residue 105-115

*

Sequence: VANISLPFLAM

105	115

(5) Score 1.108 length 15 at residue 145-159

*

Sequence: KPLLDALSEAKLQIN

145	159

(6) Score 1.103 length 7 at residue 42-48

*

Sequence: AFQVLST

42	48

(7) Score 1.095 length 6 at residue 31-36

*

Sequence: FDVSIL

31	36

(8) Score 1.094 length 7 at residue 4-10

*

Sequence: AAALAFG

4	10

(9) Score 1.092 length 7 at residue 61-67

*

Sequence: NAIVKTM

61	67

(10) Score 1.073 length 9 at residue 120-128

*

Sequence: PINVELELK

120	128

(11) Score 1.057 length 7 at residue 97-103

*

Sequence: KITLSES

97	103

ANTIGENIC von *M. bovis* Hsp70-Fragment

Length 197 residues, score calculated from 4 to 194

Report all peptides over 6 residues

Found 12 hits scoring over 1.00 (true average 1.01)

Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.176 length 9 at residue 171-179

*

Sequence: LDEVLLVGG
 | |
 171 179

(2) Score 1.156 length 11 at residue 183-193

**

Sequence: MPAVQKLVDAT
 | |
 183 193

(3) Score 1.151 length 6 at residue 4-9

*

Sequence: DVVRII
 | |
 4 9

(4) Score 1.132 length 8 at residue 29-36

*

Sequence: HKILVFDL
 | |
 29 36

(5) Score 1.126 length 11 at residue 115-125

*

Sequence: VANISLPFLAM
 | |
 115 125

(6) Score 1.108 length 15 at residue 155-169

*

Sequence: KPLLDALSEAKLQIN
 | |
 155 169

(7) Score 1.103 length 7 at residue 52-58

*

Sequence: AFQVLST
 | |
 52 58

(8) Score 1.095 length 6 at residue 41-46
 *

Sequence: FDVSIL
 | |
 41 46

(9) Score 1.094 length 7 at residue 14-20
 *

Sequence: AAALAFG
 | |
 14 20

(10) Score 1.090 length 7 at residue 71-77
 *

Sequence: NAIVKWM
 | |
 71 77

(11) Score 1.073 length 9 at residue 130-138
 *

Sequence: PINVELELK
 | |
 130 138

(12) Score 1.057 length 7 at residue 107-113
 *

Sequence: KITLSES
 | |
 107 113

ANTIGENIC von *M. agalactiae* Hsp70-Fragment

Length 200 residues, score calculated from 4 to 197

Report all peptides over 6 residues

Found 12 hits scoring over 1.00 (true average 1.03)

Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.168 length 11 at residue 181-191

*

Sequence: IPAVQQLVESI
 | |
 181 191

(2) Score 1.164 length 10 at residue 169-178

*

Sequence: LDDVILVGGS
 | |
 169 178

(3) Score 1.145 length 10 at residue 114-123

*

Sequence: TIMLPFLVMQ
 | |
 114 123

(4) Score 1.137 length 9 at residue 38-46

*

Sequence: FDVSILELA
 | |
 38 46

(5) Score 1.132 length 9 at residue 25-33

*

Sequence: EQKILVFDL
 | |
 25 33

(6) Score 1.127 length 10 at residue 145-154

*

Sequence: SHLVERCRKP
 | |
 145 154

(7) Score 1.106 length 10 at residue 71-80

*

Sequence: VKTLIDLIKK
 | |
 71 80

(8) Score 1.094 length 11 at residue 12-22
 *

Sequence: AAALAFGLDKV
 | |
 12 22

(9) Score 1.089 length 7 at residue 128-134
 *

Sequence: PISVEAT
 | |
 128 134

(10) Score 1.080 length 7 at residue 49-55
 *

Sequence: TFEVLST
 | |
 49 55

(11) Score 1.056 length 12 at residue 156-167
 *

Sequence: ETALADAKIKIS
 | |
 156 167

(12) Score 1.054 length 9 at residue 104-112
 *

Sequence: KIDLSSSQQ
 | |
 104 112

ANTIGENIC von *M. hyopneumoniae* Hsp70-Fragment

Length 189 residues, score calculated from 4 to 186

Report all peptides over 6 residues

Found 10 hits scoring over 1.00 (true average 1.01)

Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.176 length 9 at residue 162-170

*

Sequence: LDEVLLVGG
 | |
 162 170

(2) Score 1.175 length 8 at residue 20-27

*

Sequence: MKVLVYDL
 | |
 20 27

(3) Score 1.163 length 9 at residue 32-40

*

Sequence: FDVSVLELS
 | |
 32 40

(4) Score 1.145 length 12 at residue 103-114

*

Sequence: NQSVSTVSLPFL
 | |
 103 114

(5) Score 1.112 length 8 at residue 65-72

*

Sequence: VNTLVKKI
 | |
 65 72

(6) Score 1.101 length 12 at residue 146-157

**

Sequence: KPIVDALKQAKI
 | |
 146 157

(7) Score 1.094 length 7 at residue 6-12

*

Sequence: AAALAFG
 | |
 6 12

(8) Score 1.074 length 7 at residue 174-180
 *

Sequence: MPAVQSM
 | |
 174 180

(9) Score 1.073 length 7 at residue 123-129
 *

Sequence: NVELELK
 | |
 123 129

(10) Score 1.073 length 6 at residue 44-49
 *

Sequence: FEVLST
 | |
 44 49

ANTIGENIC von *E. coli* DnaK-Fragment

Length 638 residues, score calculated from 4 to 635

Report all peptides over 6 residues

Found 30 hits scoring over 1.00 (true average 1.01)
Entries in score order, max score at "*"

(1) Score 1.187 length 33 at residue 368-400

*

Sequence: DEAVAIGAAVQGGVLTGDVKDVLLLLDVTPSLG
 | |
 368 400

(2) Score 1.178 length 10 at residue 434-443

*

Sequence: SAVTIHVLQG
 | |
 434 443

(3) Score 1.159 length 12 at residue 136-147

*

Sequence: TEAVITVPAYFN
 | |
 136 147

(4) Score 1.150 length 25 at residue 318-342

*

Sequence: EPLKVALQDAGLSVSDIDDVILVGG
 | |
 318 342

(5) Score 1.142 length 12 at residue 305-316

*

Sequence: LESLVEDLVNRS
 | |
 305 316

(6) Score 1.128 length 8 at residue 481-488

*

Sequence: DGILHVSA
 | |
 481 488

(7) Score 1.121 length 10 at residue 234-243

*

Sequence: SRLINYLVEE
 | |
 234 243

(8) Score 1.112 length 7 at residue 189-195

*

Sequence: TIAVYDL

|
189

|
195

(9) Score 1.104 length 8 at residue 174-181

*

Sequence: AAALAYGL

|
174

|
181

(10) Score 1.104 length 11 at residue 112-122

*

Sequence: PPQISAEVLKK

|
112

|
122

(11) Score 1.102 length 8 at residue 12-19

*

Sequence: TNSCVAIM

|
12

|
19

(12) Score 1.099 length 11 at residue 278-288

*

Sequence: QTDVNLPYITA

|
278

|
288

(13) Score 1.098 length 13 at residue 83-95

*

Sequence: QRDVSIMPFKIIA

|
83

|
95

(14) Score 1.096 length 11 at residue 591-601

* *

Sequence: LAQVSQKLMEI

|
591

|
601

(15) Score 1.087 length 8 at residue 65-72

*

Sequence: TLFAIKRL

|
65

|
72

(16) Score 1.084 length 7 at residue 162-168

*

Sequence: GLEVKRI

162	168

(17) Score 1.083 length 7 at residue 47-53

*

Sequence: ETLVGQP

47	53

(18) Score 1.079 length 7 at residue 350-356

*

Sequence: QKKVAEF

350	356

(19) Score 1.078 length 9 at residue 420-428

*

Sequence: TKHSQVFST

420	428

(20) Score 1.073 length 7 at residue 37-43

*

Sequence: PSIIAYT

37	43

(21) Score 1.072 length 6 at residue 624-629

*

Sequence: DDVVDA

624	629

(22) Score 1.072 length 8 at residue 540-547

*

Sequence: DHLLHSTR

540	547

(23) Score 1.068 length 6 at residue 216-221

*

Sequence: FEVLAT

216	221

(24) Score 1.066 length 7 at residue 471-477

*

Sequence: QIEVTFD
 | |
 471 477

(25) Score 1.061 length 7 at residue 603-609

*

Sequence: QQQHAQQ
 | |
 603 609

(26) Score 1.058 length 8 at residue 201-208

*

Sequence: DISIIEID
 | |
 201 208

(27) Score 1.057 length 10 at residue 566-575

**

Sequence: ESALTALETA
 | |
 566 575

(28) Score 1.053 length 6 at residue 530-535

*

Sequence: EELVQT
 | |
 530 535

(29) Score 1.051 length 7 at residue 270-276

*

Sequence: KIELSSA
 | |
 270 276

(30) Score 1.037 length 6 at residue 24-29

*

Sequence: PRVLEN
 | |
 24 29

9.1.5 Arthritis-Score

Arthritis-Score der Ratten der verschiedenen Tiergruppen an Tag 3, 4, 6, 8, 13 und 16 *p.i.*

Gruppe 1: Infektionskontrolle (Infektion mit *M. arthritidis* ISR1p7)

Tier-Nr.	Tag 3	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 13	Tag 16
31	2,0	7,5	9,0	7,0	E ¹⁾	-
32	2,5	9,0	8,5	8,0	E	-
33	1,0	2,0	4,5	3,5	3,0	3,5
34	4,0	5,0	7,0	7,0	E	-
35	3,0	3,5	4,0	6,0	E	-
36	6,0	16,0	18,0	16,0	E	-
44	4,5	7,0	11,5	10,0	E	-
45	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,5
46	2,0	3,5	6,0	5,5	5,0	4,5
47	0	2,0	3,0	2,5	E	-

¹⁾ Tötung der Ratte

Gruppe 2: Applikation von rekombinanten Hsp60-Fusionsproteinen und Infektion mit *M. arthritidis* ISR1p7

Tier-Nr.	Tag 3	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 13	Tag 16
1	4,5	8,0	12,0	12,0	E ¹⁾	-
2	2,0	4,5	4,5	4,0	2,5	2,5
4	0,5	1,0	1,0	2,0	1,0	1,0
5	0,0	2,0	3,5	3,5	2,0	1,5
6	1,0	3,5	7,0	8,0	7,0	5,5
37	4,5	8,5	10,5	10,5	E	-
38	1,5	2,0	4,0	3,5	3,0	3,0
10	2,0	3,5	6,5	5,0	E	-
11	0,0	0,0	1,5	2,0	1,5	1,0
12	0,0	1,5	2,0	3,0	1,5	1,5
13	1,0	2,5	5,0	7,5	E	-
14	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0
15	0,0	0,0	0,5	0,5	0,5	0,5

¹⁾ Tötung der Ratte

Gruppe 3: Applikation von rekombinantem Hsp70-Fusionsprotein und Infektion mit *M. arthritidis* ISR1p7

Tier-Nr.	Tag 3	Tag 4	Tag 6	Tag 8	Tag 13	Tag 16
17	8,0	15,5	15,0	14,5	E ¹⁾	-
18	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
19	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
21	0,5	0,0	0,5	0,5	E	-
22	3,5	5,0	5,5	6,0	E	-
23	3,5	6,5	5,5	6,0	E	-
24	3,0	7,0	9,0	7,5	6,0	4,0
25	1,5	3,0	5,0	5,5	4,5	3,5
26	5,0	12,5	15,0	12,5	E	-
27	7,0	13,0	14,5	13,0	E	-
28	0,0	4,0	5,5	5,0	E	-
30	5,5	6,0	6,0	6,0	E	-

¹⁾ Tötung der Ratte

9.1.6 ELISA-Aktivität

ELISA-Aktivität der Rattenserum an den Versuchstagen -14, -7, 0, 7 und 21 (Tag 0 ist der Zeitpunkt der Infektion mit *M. arthritidis* ISR1p7; an Tag -14 und -7 erfolgte die Immunisierung der Ratten der Gruppe 2 mit rekombinanten Hsp60-Fusionsproteinen).

Gruppe 1: Infektionskontrolle (Infektion mit *M. arthritidis* ISR1p7)

Tier-Nr.	Tag -14	Tag -7	Tag 0	Tag 7	Tag 21
31	3,0	n. u. ¹⁾	3,5	79,4	E ²⁾
32	0	n. u.	0,0	87,2	E
33	0	n. u.	0,8	78,5	100,0
34	0	n. u.	0,0	78,0	E
35	0	n. u.	0,0	70,1	E
36	0	n. u.	0,0	83,7	E
45	0	n. u.	0,0	75,0	94,6
46	0	n. u.	0,0	73,5	89,8
47	0	n. u.	0,0	75,4	E

¹⁾ keine Messung

²⁾ Tötung der Ratte

Gruppe 2: Applikation von rekombinanten Hsp60-Fusionsproteinen und Infektion mit *M. arthritidis* ISR1p7

Tier-Nr.	Tag -14	Tag -7	Tag 0	Tag 7	Tag 21
1	0	0,0	0,8	67,2	E ¹⁾
2	0	30,2	32,5	72,7	92,1
3	0	16,4	23,2	P ²⁾	-
4	17,0	47,9	53,8	82,9	86,3
5	0	13,8	11,2	60,5	75,0
6	0	20,1	19,3	62,0	86,2
37	0	27,4	27,3	73,4	E
38	3,0	10,1	15,6	69,2	89,9
39	0	19,3	20,8	P	-
10	0	20,0	37,4	71,0	E
11	0	7,1	16,6	63,6	82,8
12	0	27,2	30,8	72,5	92,4
13	0	11,0	20,0	75,7	E
14	0	6,7	13,3	58,8	75,0
15	0	33,2	44,4	76,3	83,1

¹⁾ Tötung der Ratte

²⁾ Tötung der klinisch gesunden Ratte an Tag 0 für pathohistologische Untersuchungen

9.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Taxonomie und herausragende Eigenschaften der Klasse <i>Mollicutes</i> (Razin, Yogev, & Naot, 1998b).....	21
Tab. 2: Primer für die Amplifikation von <i>hsp60</i> -Gensequenzen.....	69
Tab. 3: Degenerierte Oligonukleotidprimer zur Amplifikation einer <i>hsp70</i> -Gensequenz.....	70
Tab. 4: Primer für den Basenaustausch im TGA-Basentriplett.....	71
Tab. 5: Plasmidprimer für die Mutagenese-PCR (abgeleitet von pGEX-5X-3).....	71
Tab. 6: Primer für Kontrollsequenzierungen.....	72
Tab. 7: Reaktionsansatz für die Sequenzierung.....	73
Tab. 8: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele.....	85
Tab. 9: Eukaryontische Zellen für die Untersuchungen zum Nachweis von Kreuzreaktionen.....	97
Tab. 11: Arthritis-Score.....	109
Tab. 12: Verlauf des Tierversuchs.....	111
Tab. 13: Ermittlung der Teilungsrate, Generationszeit und logarithmischen Wachstumsphase von <i>M. arthritidis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. hyopneumoniae</i> und <i>M. pneumoniae</i>	112
Tab. 14: Dezimale Reduktionszeit (D) von <i>M. arthritidis</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. hyopneumoniae</i> und <i>M. pneumoniae</i>	115
Tab. 15: DNA- und Aminosäure-Sequenzhomologie der <i>hsp60</i> -Gene von <i>M. agalactiae</i> , <i>M. arthritidis</i> , <i>M. bovis</i> und <i>M. hyopneumoniae</i> sowie weiteren Bakterienspezies.....	123
Tab. 16: DNA und Aminosäure-Sequenzhomologie des <i>hsp70</i> -Genfragments von <i>M. agalactiae</i> , <i>M. arthritidis</i> , <i>M. bovis</i> und <i>M. hyopneumoniae</i> sowie anderen Bakterienspezies.....	125
Tab. 17: ATPase-Aktivität des Hsp60 von <i>M. arthritidis</i> und <i>M. bovis</i>	134
Tab. 18: Anteil lebender und euthanasierter Ratten in den Gruppen 1 bis 4 ab Tag 9 <i>post infectionem</i>	152
Tab. 19: Semiquantitative Bewertung der histopathologischen Veränderungen in den Gelenken nach Infektion mit <i>M. arthritidis</i> ISR1p7: Vergleich der mit rekombinanten Hsp60-Fusionsproteinen immunisierten Ratten mit nicht immunisierten Tieren.....	158

9.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Modell des DnaK-Zyklus: Proteinfaltung durch Hsp70 (DnaK) unter Beteiligung der Cochaperone DnaJ und GrpE (verändert nach MOGK et al. 1999 und, die einzelnen Schritte werden im Text erläutert).....	39
Abb. 2: Modell des GroEL-Zyklus: Proteinfaltung durch Hsp60 (GroEL) unter Beteiligung des Cochaperons GroEL (verändert nach, die einzelnen Schritte werden im Text erläutert)	41
Abb. 3: Wachstumskinetiken von <i>M. arthritidis</i> , <i>M. bovis</i> und <i>M. pneumoniae</i> bei 32 °C und <i>M. hyopneumoniae</i> bei 35 °C	113
Abb. 4: Thermale Inaktivierung von <i>M. arthritidis</i> (1), <i>M. bovis</i> (2), <i>M. hyopneumoniae</i> (3) und <i>M. pneumoniae</i> (4) in der logarithmischen Wachstumsphase nach Temperaturerhöhung.....	114
Abb. 5: Proteinprofil von <i>M. arthritidis</i> (1), <i>M. bovis</i> (2), <i>M. hyopneumoniae</i> (3) und <i>M. pneumoniae</i> (4) nach Hitzeschock	116
Abb. 6: Antigenprofil von <i>M. arthritidis</i> (1), <i>M. bovis</i> (2), <i>M. hyopneumoniae</i> (3), <i>M. pneumoniae</i> (4) und <i>E. coli</i> (5) nach Reaktion mit einem Antiserum gegen Hsp60	117
Abb. 7: Antigenprofil von <i>M. pneumoniae</i> (1), <i>M. arthritidis</i> (2), <i>M. bovis</i> (3), <i>M. hyopneumoniae</i> (4) und <i>E. coli</i> (5) nach Reaktion mit einem Antiserum gegen Hsp70 von <i>M. pneumoniae</i>	118
Abb. 8: Antigenprofil von <i>M. bovis</i> (1), <i>M. arthritidis</i> (2), <i>M. pneumoniae</i> (3) und <i>M. hyopneumoniae</i> (4) nach zweidimensionaler Gelelektrophorese, Westernblot und Reaktion mit einem Antiserum gegen Hsp60	119
Abb. 9: Antigenprofil von <i>M. hyopneumoniae</i> (1) und <i>M. pneumoniae</i> (2) nach zweidimensionaler Gelelektrophorese und Reaktion mit einem Antiserum gegen Hsp70 von <i>M. pneumoniae</i>	120
Abb. 10: Darstellung der zu Sequenzierung ausgewählten Amplifikationsprodukte aus dem <i>hsp60</i> -Gen von <i>M. agalactiae</i> (1), <i>M. hyopeumoniae</i> (2), <i>M. arthritidis</i> (3) und <i>M. bovis</i> (4) in der Agarosegelelektrophorese.....	122
Abb. 11: Darstellung der zur Sequenzierung ausgewählten Amplifikationsprodukte aus dem <i>hsp70</i> -Gen von <i>M. agalactiae</i> (1), <i>M. hyopeumoniae</i> (2), <i>M. arthritidis</i> (3) und <i>M. bovis</i> (4) in der Agarosegelelektrophorese.....	124
Abb. 12: Taxonomische Position verschiedener Mykoplasmen- und Bakterienspezies auf Basis der „neighbour-joining“ Distanz der Nukleinsäuresequenz eines 600 bp großen Genfragments des <i>hsp70</i>	126
Abb. 13: Taxonomische Position verschiedener Mykoplasmen- und Bakterienspezies auf Basis der „neighbour-joining“ Distanz der 200 Aminosäuren großen Sequenz des Hsp70.....	127
Abb. 14: Elutionsprofil des Ganzzelllysates von <i>M. arthritidis</i> nach Kationenaustauscherchromatographie	129

Abb. 15: Elutionsprofil des Ganzzelllysates von <i>M. bovis</i> nach Kationenaustauscherchromatographie	130
Abb. 16: Elutionsprofil Hsp60-haltiger Fraktionen von <i>M. arthritidis</i> nach Immunaффinitätschromatographie	131
Abb. 17: Aufreinigung des Hsp60 von <i>M. arthritidis</i>	132
Abb. 18: Aufreinigung des Hsp60 von <i>M. bovis</i>	133
Abb. 19: Analyse rekombinanter Hsp60-Fusionsproteine von <i>M. arthritidis</i> nach Auftrennung in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit Coomassie-Färbung (A) und Westernblot (B) nach Reaktion mit einem Antiserum gegen Hsp60 von <i>Synechococcus</i> sp. (1:500 in PBS verdünnt). Am linken Bildrand sind die Molekulargewichte des Größenstandards, am rechten Bildrand die Molekulargewichte der rekombinanten Hsp60-Fusionsproteine (57 und 64 kDa) und der Glutathion-S-Transferase (29 kDa) angegeben.	136
Abb. 20: Analyse rekombinanter Hsp70-Fusionsproteine von <i>M. arthritidis</i> und <i>M. bovis</i> nach Auftrennung durch SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung (A) und Westernblot (B) nach Reaktion mit einem Antikörper gegen murines Hsp70 (1:10.000 in PBS verdünnt).	138
Abb. 21: Darstellung des 42 kDa Fusionsproteins nach Mutagenese des <i>hsp70</i> -Genfragmentes von <i>M. arthritidis</i> durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung.	139
Abb. 22: Reaktion von bovinen Rekonvaleszentenseren mit dem rekombinanten MA60-1- (a) und dem rekombinanten MA60-2-GST-Fusionsprotein (b) im Westernblot.	141
Abb. 23: Reaktion von porcinen Rekonvaleszentenseren mit dem rekombinanten MA60-1- (a) und dem rekombinanten MA60-2-GST-Fusionsprotein (b) im Westernblot.	142
Abb. 24: Reaktion von bovinen Rekonvaleszentenseren mit dem rekombinanten MA70- (a) und dem rekombinanten MB70-GST-Fusionsprotein (b) im Westernblot.	143
Abb. 25: Reaktion von porcinen Rekonvaleszentenseren mit dem rekombinanten MA70- (a) und dem rekombinanten MB70-GST-Fusionsprotein (b) im Westernblot.	144
Abb. 26: Antigenprofil von <i>M. hyopneumoniae</i> nach Inkubation mit bronchialalveolärer Lavage Flüssigkeit (BALF)	147
Abb. 27: Antigenprofil von <i>M. hyopneumoniae</i> nach Inkubation mit bronchialalveolärer Lavage-Flüssigkeit (BALF)	148
Abb. 28: Sekretion von Interleukin-6 nach Aktivierung von BAC1.2F5-Zellen mit rekombinanten Hsp60-Peptiden (MA60-1 und MA60-2). Zum Vergleich dienten unstimulierte Zellen (unstimuliert) als Negativkontrolle und mit LPS aktivierte Zellen als Positivkontrolle. Dargestellt sind der Mittelwert, Maximalwert und Minimalwert.	149
Abb. 29: Sekretion von Interleukin-1 β nach Aktivierung von RAW264.7-Zellen mit rekombinanten Hsp60-Peptiden (MA60-1 und MA60-2). Zum Vergleich	

dienten unstimulierte Zellen (unstimuliert) als Negativkontrolle und mit LPS aktivierte Zellen als Positivkontrolle. Dargestellt sind der Mittelwert, Maximalwert und Minimalwert.	150
Abb. 30: Antigenprofil von epithelialen Rattenfibroblasten (1), Rindernierenzellen (2), Schweinenierenzellen (3) und broncho-trachealen Epithelzellen vom Menschen (4) nach Reaktion mit einem Antiserum gegen Hsp60	151
Abb. 31: Arthritis-Score (Medianwert) von Lewis-Ratten nach Infektion mit <i>M. arthritis</i>	153
Abb. 32: Gewichtsentwicklung von Lewis-Ratten nach Infektion mit <i>M. arthritis</i> (Medianwert in Prozent relativ zum Gewicht am Tag der Infektion)	154
Abb. 33: Fibrino-purulente Arthritis mit hochgradiger Infiltration von Entzündungszellen in den erweiterten Gelenkspalt (A, B).....	156
Abb. 34: Chronisch-proliferative Arthritis und Synoviitis: Pannusformation und Destruktion des hyalinen Gelenkknorpels (A), Proliferation von Fibroblasten und Formation von kollagenen Fibrillen in der Gelenkkapsel (B), chronische papilläre Proliferation des Synoviums mit gemischten Entzündungszellinfiltraten (C), Destruktion des hyalinen Knorpels mit chronischer Pannusformation und Proliferation der Synovialis (D).....	157
Abb. 35: Antikörperreaktion von Ratten nach Immunisierung mit rekombinantem Hsp60 (gestrichelte Linie) im Vergleich zur Kontrolltieren (durchgezogene Linie) vor und nach Infektion mit <i>M. arthritis</i> im ELISA.	160
Abb. 36: Phylogenetischer Stammbaum der Mykoplasmen basierend auf 16S rRNA-Sequenzen. Vertreter der nah verwandten Gattungen <i>Clostridium</i> (C.) sind in dem Stammbaum eingeschlossen. <i>Streptococcus</i> (St.) <i>pleomorphus</i> und <i>Eubacterium</i> (E.) <i>biformans</i> repräsentieren Vertreter außerhalb des Mykoplasmenstammbaums stehender Gruppen von Bakterien (verändert nach JOHANNSSON et al. (1998).	171

Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt Frau Prof. Dr. Helga Kirchhoff und Herrn Prof. Dr. Gerald-F. Gerlach.

Frau Prof. Dr. Helga Kirchhoff hat über viele Jahre meine wissenschaftliche Ausbildung gefördert, die Initiierung des Forschungsprojektes ermöglicht und die Arbeiten in der Anfangsphase unterstützt. Auch nach dem Ausscheiden aus dem aktiven Dienst war sie bis zum Abschluß der Habilitationsschrift immer zu Diskussionen bereit und hat wertvolle Anregungen gegeben.

Herr Prof. Dr. Gerald-F. Gerlach hat den Fortgang der Arbeit nach dem Ausscheiden von Frau Prof. Dr. Helga Kirchhoff vielfältig unterstützt. Ohne seine anregenden Vorschläge, seine in Rat und Tat gewährte Hilfe und ständige Diskussionsbereitschaft wäre die Anfertigung dieser Schrift nicht möglich gewesen.

Den ehemaligen Doktorandinnen Frau Dr. Astrid Heckers, geb. Wedde, und Frau Dr. Barbara Scherm sowie Diplomanden danke ich für ihre engagierte Mitarbeit, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Aus dem Kreise der Diplomanden möchte ich mich besonders bei Frau Dr. Ulla Frischmann, geb. Deiters, bedanken, mit der ich die ersten Schritte auf dem bis dahin weitestgehend unbekannten Feld der mykoplasmalen Hitzeschockproteine getan habe, die großes Interesse am Fortgang der Arbeit zeigte und den Abschluß durch konstruktive Diskussionen unterstützt hat.

Frau Prof. Dr. Anja Sterner-Kock (Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin), Herrn PD Dr. Bernd Huchzermeyer (Institut für Botanik der Universität Hannover) und Herrn PD Dr. Andreas Emmendorffer (AG Immunbiologie des Fraunhofer Instituts für Aerosolforschung in Hannover) danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit bei den histopathologischen Untersuchungen, den ATPase-Messungen und dem Nachweis der Zytokinsekretion sowie für die Diskussion der Ergebnisse.

Besonders danke ich auch Herrn Jörg Merkel für die Lösung aller DV-technischer Probleme und seine Geduld.

Bei allen Mitarbeitern des Institut für Mikrobiologie, Zentrum für Infektionsmedizin der Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover möchte ich mich für die Unterstützung und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Hier gilt mein besonderer Dank Frau Rosemarie Schmidt für die freundliche und engagierte technische Unterstützung.

Frau Prof. Dr. Irene Greiser-Wilke danke ich für die freundliche Unterstützung bei den Datenbankanalysen.

Herrn Prof. Dr. Martin Ganter danke ich für die Bereitstellung der BALFs.

Herrn Dr. Ralf Himmelreich (EMBL, Heidelberg) danke ich für die Überlassung des Antiserums gegen das Hsp70 von *M. pneumoniae*.

Herrn Dr. Marcus Schäfer danke ich für die Betrachtung der Habilitationsschrift aus der Sicht des praktischen Tierarztes.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Förderung im Rahmen des Projektes „Charakterisierung der Hitzeschockproteine von Mykoplasmen und Untersuchungen zu deren Bedeutung in der Pathogenese von Mykoplasmeninfektionen" (Ru 459/2-1) und des Graduiertenkollegs „Zell- und Molekularbiologie in der Tiermedizin".

Der Europäischen Union danke ich für die Förderung im Rahmen der COST-Aktion 826 „Ruminants' Mycoplasmoses". Der intensive gedankliche Austausch mit den auf dem Gebiet der Mykoplasmenforschung tätigen europäischen Kollegen, die freundliche und konstruktive Kritik sowie die praktische Unterstützung hat vielfältig zum Gelingen der Arbeit und auch zu einer zuversichtlichen Sichtweise im Hinblick auf die EU beigetragen. Besonders möchte ich mich hier bei Herrn Dr. Francois Thiaucourt und Frau Sophie Lorenzon für die Einarbeitung in das Cycle-Sequencing und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe am CIRAD-EMTV in Montpellier und Herrn Prof. Dr. Frey für die herzliche Aufnahme der Doktorandin Barbara Scherm in seine Arbeitsgruppe an der Universität Bern und die Einführung in die Möglichkeiten der Klonierung und Expression mykoplasmaaler Proteine bedanken.

Bei meiner Familie und insbesondere bei meiner Frau Diana und meinen Kindern Isabel und Elena bedanke ich mich für ihr Verständnis und ihre Geduld.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-079-3

