

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

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 mykoplasmaler 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 Rekonvaleszentenserum 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 dezimale 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 Rekonvaleszentenserien 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> -Polyarthritits 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