

Untersuchungen zur Funktion und Struktur von
„Macrophage-Infectivity-Potentiator“(Mip)-Proteinen der
intrazellulären bakteriellen Parasiten
Legionella pneumophila und *Chlamydia pneumoniae*

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität

von

Diplom-Biologen André Vogel

geboren am 22.07.1968 in Potsdam-Babelsberg

Dekan: Professor Dr. Jochen Lehmann

Gutachter: Professor Dr. Rolf Hilgenfeld
Professor Dr. Gunter Fischer
Professor Dr. Jörg Hacker

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2005

Tag der Promotion: 06.06.2005

Inhaltsverzeichnis

<u>Abkürzungen</u>	viii
<u>1. Einleitung</u>	1
1.1. Intrazelluläre Parasiten	1
1.1.1. Überblick	1
1.1.2. <i>Legionella</i>	3
1.1.3. <i>Chlamydia</i>	7
1.1.4. <i>Trypanosoma</i>	9
1.2. Peptidyl-Prolyl-<i>cis/trans</i>-Isomerasen	12
1.2.1. Charakterisierung der Enzymklasse	12
1.2.2. Einteilung der Isomerasen	13
1.2.3. Wechselwirkungspartner der Isomerasen	17
<u>1.3. Mip-Proteine</u>	18
1.3.1. Das Mip-Protein aus <i>Legionella pneumophila</i>	18
1.3.2. Das Mip-Protein von Chlamydien	20
1.3.3. Das Mip-Protein von <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.3.4. Weitere intrazelluläre Pathogene, für die Mip-ähnliche Proteine nachgewiesen werden konnten	23
1.3.5. Mip-ähnliche Proteine in nichtintrazellulären Pathogenen	24
1.3.6. Mip-ähnliche Proteine in <i>Escherichia coli</i>	24
<u>1.4. Ziele der Arbeit</u>	25
<u>2. Materialien und Methoden</u>	27
<u>2.1. Proteinpräparationen</u>	27
2.1.1. Isolierung des wtMip-Proteins von <i>Legionella pneumophila</i>	27
2.1.2. Präparation von Mip 49	28
2.1.3. Präparation des Mip-Proteins von <i>Chlamydia pneumoniae</i>	29
<u>2.2. Alphabetische Liste der verwendeten Chemikalien</u>	30

<u>2.3. Methoden</u>	33
2.3.1. Dialyse	33
2.3.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen	33
2.3.3. Filtration von Proteinlösungen	34
2.3.4. Bestimmung der Chaperon-ähnlichen Aktivität im Citrat-Synthase-Aggregationsassay	34
2.3.4.1. Experimente mit dem wtMip-Protein von <i>Legionella pneumophila</i>	34
2.3.4.2. Untersuchungen an der C-terminalen Mutante F202Y	35
2.3.4.3. Bestimmung der Chaperon-ähnlichen Aktivität für das Mip-Protein von <i>Chlamydia pneumoniae</i>	35
2.3.4.4. Konzentrationsabhängigkeit der Chaperon-ähnlichen Aktivität des CpMip	35
2.3.4.5. Versuche mit hitzeinkubiertem Mip-Protein von <i>Chlamydia pneumoniae</i>	36
2.3.4.6. Experimente zum Einfluß von CpMip auf bestehende Proteinaggregate	36
2.3.4.7. Untersuchung von FK506	37
2.3.4.8. Inhibition der Chaperon-ähnlichen Aktivität durch DTT	37
2.3.4.9. Kontrollexperiment zum Ausschluß der Aggregation von Citrat-Synthase oder CpMip durch DTT	38
2.3.5. Experimente zur Chaperon-ähnlichen Aktivität des Mip-Proteins von <i>Chlamydia pneumoniae</i> im NdeI-Testsystem	38
2.3.5.1. Bestätigung der Ergebnisse des Citrat-Synthase-Aggregationsassays	38
2.3.5.2. Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen NdeI und CpMip	39
2.3.6. Gel-Elektrophoretische Untersuchungen an Mip-Proteinen	40
2.3.6.1. Experimente mit dem Mip-Protein von <i>Legionella pneumophila</i>	40

2.3.6.1.1. Einfluß von oxidierenden Bedingungen auf das Laufverhalten des Mip-Proteins von <i>Legionella pneumophila</i> im nativen Gel	40
2.3.6.1.2. Experimente mit dem N-terminalen Fragment Mip 49	41
2.3.6.1.3. Denaturierende Gel-Elektrophorese des Mip-Proteins von <i>Legionella pneumophila</i> nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid und „Crosslinking“ durch DMP	42
2.3.6.1.4. Kontrollexperiment zum „Crosslinking“ mit der C-terminalen Mutante Y185A	43
2.3.6.1.5. SDS-Gel-Elektrophorese des oxidierten <i>LpMip</i> -Proteins nach Inkubation mit MsrA und „Crosslinking“	43
2.3.6.2. Untersuchungen am Mip-Protein von <i>Chlamydia pneumoniae</i>	44
2.3.6.2.1. Einfluß reduzierender Bedingungen auf das Laufverhalten des <i>CpMip</i> im nativen Gel	44
2.3.6.2.2. Denaturierende Gel-Elektrophorese des Mip-Proteins von <i>Chlamydia pneumoniae</i> unter reduzierenden Bedingungen	45
2.3.7. CD-spektroskopische Messungen	45
2.3.8. Kristallisation	47
2.3.9. Diffraktionsdatensammlung	47
<u>2.4. Theoretische Grundlagen ausgewählter experimenteller Untersuchungen</u>	48
2.4.1. Erläuterungen zur CD-Spektroskopie	48
2.4.2. Prinzipien der Röntgenstrukturanalyse	50
<u>3. Ergebnisse</u>	54
<u>3.1. In-silico-Untersuchungen zur Charakterisierung der Mip-Proteine</u>	54
3.1.1. Vergleich der dreidimensionalen Struktur des Mip-Proteins von <i>Legionella pneumophila</i> und DsbC aus <i>Escherichia coli</i>	54

3.1.2. Analyse des erweiterten „Methionin-Zippers“ im Mip-Protein von <i>Legionella pneumophila</i>	57
3.1.3. Sequenzvergleich der Mip-Proteine von <i>Legionella pneumophila</i> und <i>Chlamydia pneumoniae</i>	61
3.1.4. Theoretische Untersuchungen zur Veränderung des CD-Spektrums in Abhängigkeit von verschiedenen Konformationsänderungen der N-terminalen Domäne des Mip-Proteins von <i>Legionella pneumophila</i>	63
3.1.5. Analyse der prokaryotischen Signalsequenz in der N-terminalen Domäne des Mip-ähnlichen Proteins von <i>Trypanosoma cruzi</i>	66
<u>3.2. Untersuchungen zur Chaperon-Aktivität der Mip-Proteine von <i>Legionella pneumophila</i> und <i>Chlamydia pneumoniae</i></u>	66
3.2.1. Charakterisierung der Mip-Proteine im Citrat-Synthase-Aggregationsassay	66
3.2.1.1. Untersuchungen am Mip-Protein von <i>Legionella pneumophila</i>	67
3.2.1.2. Experimente mit dem Mip-Protein von <i>Chlamydia pneumoniae</i>	69
3.2.2. Experimente zur Bestätigung der Chaperon-ähnlichen Aktivität des Mip-Proteins von <i>Chlamydia pneumoniae</i> im NdeI-Testsystem	73
3.2.2.1. Untersuchung der Mip-Proteine von <i>Legionella pneumophila</i> und <i>Chlamydia pneumoniae</i>	73
3.2.2.2. Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen dem Mip-Protein von <i>Chlamydia pneumoniae</i> und NdeI	74
3.2.3. Untersuchungen zur Inhibition der Chaperon-ähnlichen Aktivität des CpMip-Proteins	76
<u>3.3. Gel-Elektrophoretische Untersuchungen an den Mip-Proteinen von <i>Legionella pneumophila</i> und <i>Chlamydia pneumoniae</i></u>	79

3.3.1. Experimente mit dem Mip-Protein aus <i>Legionella pneumophila</i> zur Identifizierung von Strukturveränderungen durch oxidierende Bedingungen	79
3.3.1.1. Native Gel-Elektrophorese mit wtMip	79
3.3.1.2. Untersuchungen am N-terminalen Fragment Mip 49	80
3.3.1.3. Denaturierende Gel-Elektrophorese des <i>LpMip</i> -Proteins nach Inkubation unter oxidierenden Bedingungen und Quervernetzung durch DMP	81
3.3.1.4. Denaturierende Gel-Elektrophorese des oxidierten <i>LpMip</i> nach Inkubation mit MsrA-Aktivität und Quervernetzung	84
3.3.2. Untersuchungen am Mip-Protein von <i>Chlamydia pneumoniae</i> nach Inkubation unter reduzierenden Bedingungen	85
3.3.2.1. Native Gel-Elektrophorese mit <i>CpMip</i>	85
3.3.2.2. Denaturierende Gel-Elektrophorese des Mip-Proteins nach Inkubation unter reduzierenden Bedingungen	86
3.3.3.1. Native Gel-Elektrophorese des Mip-Proteins von <i>Chlamydia pneumoniae</i> nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen	87
3.3.3.2. Einfluß von Octyl- β -D-glucoopyranosid auf die Aggregation des <i>CpMip</i> -Proteins	88
<u>3.4. CD-Spektroskopische Untersuchungen</u>	89
3.4.1. CD-Spektroskopische Untersuchungen des Mip-Proteins von <i>Legionella pneumophila</i> bei verschiedenen Temperaturen	89
3.4.2. CD-Spektroskopische Untersuchungen am oxidierten Mip-Protein von <i>Legionella pneumophila</i>	90
3.4.3. CD-spektroskopische Untersuchung der isolierten Helix 2 der N-terminalen Domäne	92
3.4.4. CD-spektroskopische Untersuchung der isolierten Verbindungshelix zwischen N-terminaler (Dimerisierungs-) und FKBP-ähnlicher Domäne des Mip-Proteins von <i>Legionella pneumophila</i>	94

<u>3.5. Kristallographische Untersuchungen</u>	95
3.5.1. Kristallisation verschiedener Mutanten des Mip-Proteins von <i>Legionella pneumophila</i>	95
3.5.1.1. S15A	95
3.5.1.2. A37F	96
3.5.1.3. Y185A	96
3.5.1.4. Mutante F202Y	97
3.5.2. Diffraktionsdatensammlung und Prozessierung	100
3.5.3. Untersuchungen zu Unterschieden in den Dimensionen der Elementarzelle	103
3.5.4. Strukturbestimmung für die Mutanten	104
3.5.4.1. Überblick	104
3.5.4.2. S15A	107
3.5.4.3. A37F	109
3.5.4.4. Y185A	111
3.5.4.5. F202Y	113
3.5.6. Untersuchung möglicher Umordnungen im aktiven Zentrum des Mip-Proteins in Folge Mutation konservierter Reste in der FKBP-ähnlichen Domäne	116
3.5.7. Vergleich des durch Zn-Ionen vermittelten Kristallkontaktes in verschiedenen Mip-Mutanten	117
3.5.8. Identifizierung weiterer Zn-Ionen in der Kristallstruktur des Mip-Proteins von <i>Legionella pneumophila</i>	119
<u>4. Diskussion</u>	121
<u>4.1. Kristallographische Untersuchungen der C-terminalen Mutanten Y185A und F202Y</u>	121
<u>4.2. Kristallographische Untersuchungen der N-terminalen Mutanten S15A und A37F</u>	130
<u>4.3. Untersuchungen zur Chaperon-ähnlichen Aktivität der Mip-Proteine</u>	139

<u>4.4. Monomerisierung der Mip-Proteine von <i>Legionella pneumophila</i> und <i>Chlamydia pneumoniae</i> durch oxidierende bzw. reduzierende Bedingungen</u>	146
<u>5. Zusammenfassung</u>	155
<u>6. Literaturverzeichnis</u>	156
<u>7. Anhang</u>	183

Abkürzungen

Aminosäuren	Standardabkürzungen (Ein- und Dreibuchstabencode)
ATP	Adenosintriphosphat
B-Faktor	kristallographischer Temperaturfaktor, beschreibt Flexibilität
CCD	charge coupled device
CD	Circulardichroismus
CHES	2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure
CpMip	Mip-Protein aus <i>Chlamydia pneumoniae</i>
CS	Citrat-Synthase
CuK α	charakteristische Röntgenstrahlung durch Anregung der K-Schale von Cu
Cyp A	Cyclophilin A
Cyp B	Cyclophilin B
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DMP	Pimelindiimidsäure-dimethylester-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EB	elementary body
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
Fc	berechnete Elektronendichte
FKBP	FK506 binding protein
Fo	experimentell bestimmte Elektronendichte
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gdn-HCl	Guanidiniumhydrochlorid
GSH	reduziertes Glutathion
GTP	Guanidintriphosphat
GTPase	GTP spaltendes Enzym
hFKBP	humanes FKBP
hMsrA	humane MsrA
HEPES	2-[4-(2 Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure

HIV-1	Human Immunodeficiency Virus 1
HI-1-Viren	„Human-Immunodeficiency-1“-Viren
Hsp	heat shock protein
IF	insert in the flap
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IP ₃	Inositol-Triphosphat
KatA	Katalase-Peroxidase A
KatB	Katalase-Peroxidase B
k _{cat}	katalytische Umsatzrate
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
LGV	Lymphgranulum venerum
LMW	low molecular weight
<i>LpMip</i>	Mip-Protein aus <i>Legionella pneumophila</i>
LPS	Lipopolysacharid
MAD	multiple wavelength anomalous dispersion
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat
min	Minuten
Mip	Macrophage infectivity potentiator
Mip 49	Fragment des <i>LpMip</i> , 49 N-terminale Aminosäuren
mRNA	messenger RNA
MsrA	Methioninsulfoxidreduktase A
MsrB	Methioninsulfoxidreduktase B
NdeI	Restriktionsenzym aus <i>Neisseria denitrificans</i>
O β DG	Octyl- β -D-glucopyranosid
ORF	open reading frame
PEG	Polyethylenglykol
PDB	Protein Data Bank
PDB ID	PDB-Identifikation
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
RB	reticulate body
ROS	reactive oxygen species
RP-HPLC	reversed phase high pressure liquid chromatography
rpm	rounds per minute

SDS	Natriumdodecylsulfat
sHsp	small heat shock protein
TFA	Trifluorethanol
TLC	thin layer chromatography
TMAE	Trimethylaminoethyl
U	units
UV-Licht	ultraviolettes Licht
v/v	volume per volume
wtMip	Wildtyp-Mip
w/v	weight per volume

Zur besseren Übersichtlichkeit wurden zahlreiche zusammengesetzte Wörter in dieser Arbeit durch einen Bindestrich getrennt.

1. Einleitung

1.1. Intrazelluläre Parasiten

1.1.1. Überblick

Der intrazelluläre Lebensraum stellt eine attraktive ökologische Nische für zahlreiche Parasiten dar. So schließen die erforderlichen Anpassungen viele Konkurrenten aus: Die ursprüngliche Bindung an die Wirtszelle sowie die Initiierung der nachfolgenden Aufnahme sind Herausforderungen für einen intrazellulären Mikroorganismus. Darüberhinaus muß der Parasit unter schwierigen Umweltbedingungen überleben bzw. sich sogar vermehren und die infizierte Zelle wieder verlassen (Black *et al.*, 2000). Die Integration in einen anderen Organismus ermöglicht auch die Reduktion eigener StoffwechsellLeistungen. So ist *Chlamydia trachomatis* nicht in der Lage, Purin- und Pyrimidin-Nucleotide *de novo* zu synthetisieren (Tipples & McClarty, 1993). Verschiedene Aminosäuren sind für das Wachstum von *Legionella pneumophila* auf chemisch definierten Medien essentiell (Tesh & Miller, 1981).

Die Adhäsion an die Wirtszelle kann bei *Mycobacterium tuberculosis* über verschiedene Moleküle vermittelt werden; so ist die Wechselwirkung mit Mannose- und Komplementrezeptoren beschrieben worden (Ernst, 1998). Für die extrapulmonale Dissemination scheint dagegen ein Hämagglutinin-Adhäsion des Bakteriums von Bedeutung zu sein. Dieses bindet an Heparin (Pethe *et al.*, 2001). In der Amöbe *Hartmanella vermiformis* wurde ein Lectin als Rezeptor für Legionellen identifiziert. Dieses kann durch Galaktose/N-Acetylgalaktose inhibiert werden (Venkataraman *et al.*, 1997). Nach der Adhäsion des Bakteriums kommt es zur Dephosphorylierung verschiedener Proteine des Zytoskeletts (Venkataraman *et al.*, 1998). Dagegen binden die Bakterien an Monozyten mit Hilfe des MOMP (major outer membrane protein) sowie den Komplementrezeptoren CR1 und CR3. An dieser Wechselwirkung sind ebenfalls die Faktoren C3b und C3bi des Wirtes beteiligt (Payne & Horwitz, 1987; Bellinger-Kawahara & Horwitz, 1990). Aber auch die Aufnahme von opsonierten Legionellen über Fc-Rezeptoren ist möglich (Husmann & Johnsons, 1992). Außerdem findet sich auf der Oberfläche von *Legionella pneumophila* ein Protein mit Lektin-ähnlichen Eigenschaften. Dieses

ermöglicht die Infektion von Makrophagen in Abwesenheit von Serum (Gibson *et al.*, 1994).

Pathogene gelangen in Säugerzellen durch Phagozytose oder einen vom Parasiten gesteuerten Mechanismus. So ist z.B. der Einzeller *Toxoplasma gondii* während des Eintritts in die Wirtszelle apikal orientiert und stülpt die Plasmamembran aktiv ein. Außerdem kommt es nur zu geringfügigen Veränderungen im Cytoskelett der befallenen Zelle (Sibley, 1995). Dabei wird der aufgenommene Organismus von der Wirtszelle immer durch eine membranbegrenzte Vakuole umgeben (Garcia-del Portillo & Finlay, 1995). Das so entstandene Phagosom kann nun in seiner Reifung behindert werden, um das Überleben bzw. die Entwicklung des Parasiten zu ermöglichen. So verringert z.B. *Mycobacterium tuberculosis* die Ansäuerung der Vakuole durch die Sekretion von Glutamin-Synthetase. Dieses Enzym erhöht den pH-Wert über die Veränderung der Ammoniak-Konzentration (Harth *et al.*, 1994). *Chlamydia psittaci* verhindert das Verschmelzen mit Lysosomen (Garcia-del Portillo & Finlay, 1995).

Das Bakterium *Legionella pneumophila* verzögert, im Gegensatz zu anderen pathogenen *Legionella*-Arten, die Bildung des Phagolysosoms sowie dessen Ansäuerung (Horwitz & Maxfield, 1984; Sturgill-Koszycki & Swanson, 2000). Andere Mikroorganismen können das Phagosom durch Lyse mit Hilfe von Enzymen oder Toxinen verlassen. *Listeria*, *Shigella* und *Trypanosoma* gehören zur Gruppe dieser sogenannten zytoplasmatischen Parasiten (Garcia-del Portillo & Finlay, 1995). Außerdem sind *Listeria* und *Shigella* in der Lage, die Polymerisation von Actin an einem ihrer Pole zu induzieren. Damit entsteht ein Gerüst, das ihnen die Bewegung im Zytoplasma sowie die Infektion benachbarter Zellen erleichtert. *Coxiella burnetti* oder verschiedene *Leishmania*-Arten besitzen die Fähigkeit, in einer stark sauren Umgebung und in Anwesenheit von Hydrolasen zu überleben. Leider ist nur wenig über diese Anpassung der Parasiten an ihre unwirtliche Umgebung bekannt (Garcia-del Portillo & Finlay, 1995).

Das Verlassen der Wirtszelle stellt ebenfalls eine wichtige Leistung des Mikroorganismus' dar. So konnte für *Toxoplasma gondii* durch Behandlung mit einem Calcium-Ionophor dieser abschließende Schritt im Lebenszyklus des

Parasiten ausgelöst werden. Die Veränderung der intrazellulären Calcium-Konzentration muß ein wichtiges Signal für den Parasiten sein (Black *et al.*, 2000; Endo *et al.*, 1982). *Legionella pneumophila* exprimiert in der postexponentiellen Wachstumsphase eine Aktivität, die in der Lage ist, die Membran des Phagosoms sowie der infizierten Zelle zu lysieren (Alli *et al.*, 2000).

Offensichtlich ist der Lebenszyklus eines intrazellulären Parasiten durch eine Vielzahl von besonderen Wechselwirkungen zwischen Wirtszelle und Krankheitserreger geprägt. Eine genaue Kenntnis der molekularen Interaktionen zwischen Pathogen und Wirtszelle bietet eine Grundlage für die Entwicklung neuer spezifischer Antiinfektiva.

1.1.2 Legionella

Legionellen sind fakultativ intrazelluläre, stäbchenförmige, Gram-negative Bakterien. Sie sind unipolar begeißelt und leben ubiquitär in aquatischen Lebensräumen, wo sie sich in Protozoen (z.B. *Acanthamoeba* und *Hartmanella*) vermehren (Brand & Hacker, 1997). Die Anpassung an das intrazelluläre Milieu von phagozytierenden Protozoen ermöglicht es dem Parasiten, auch menschliche Makrophagen (Horwitz & Silverstein, 1981a; Horwitz & Silverstein, 1981b; Kishimoto *et al.*, 1981) und Monozyten (Horwitz & Silverstein, 1980; Horwitz & Silverstein, 1983) erfolgreich zu infizieren (Harb *et al.*, 2000). Daneben können auch „nichtprofessionelle“ phagozytierende Zellen (z.B. alveoläre Epithelzellen des Typs I und II) zur Vermehrung genutzt werden (Mody *et al.*, 1993; Cianciotto *et al.*, 1995a).

Für die massenhafte Vermehrung und Übertragung von Legionellen auf den Menschen sind vorwiegend „technische Vektoren“ wie Klimaanlage und Duschen verantwortlich (Brand & Hacker, 1997). Nachfolgend kann es zur Entstehung der gefürchteten Legionärskrankheit kommen. Die Inkubationszeit liegt zwischen zwei und zehn Tagen. Danach treten hohes Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen sowie schmerzhaftes Atmen und Husten auf. Diese Symptome sind Ausdruck einer schweren Pneumonie. Bis zu 30 % Prozent der unbehandelten Patienten sterben an der Erkrankung (Brand & Hacker, 1997; Alexander &

Raettig, 1998). Für die Diagnose hat sich der Nachweis von Legionellen-Antigen im Urin mittels Immunchromatographie bewährt (Ewig *et al.*, 2002).

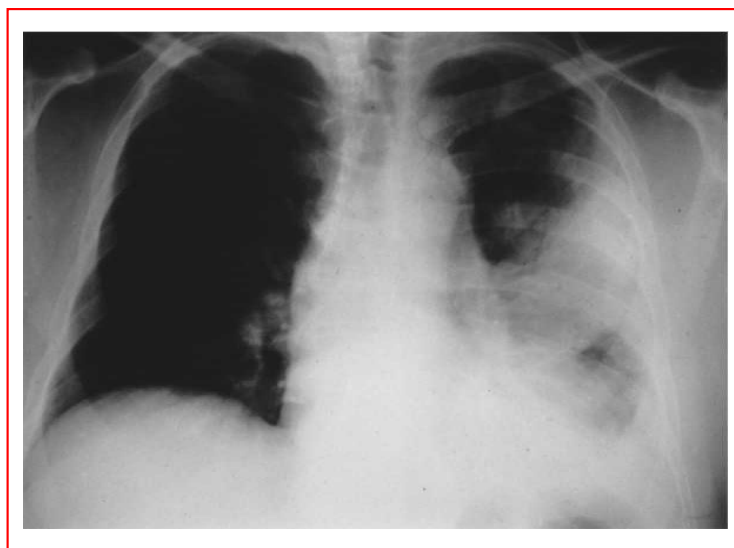


Abbildung 1.1.: Röntgenaufnahme der Lunge bei der Legionärskrankheit. Die linksseitige Verschattung ist klar zu erkennen. Das Bild wurde freundlicherweise von Dr. Lück (TU Dresden) zu Verfügung gestellt.

Daneben ist nach Infektion mit Legionellen auch eine leichte, selbstlimitierende Form eines Atemweginfektes, das so genannte Pontiac-Fieber, möglich (Brand & Hacker, 1997). Außerdem konnte die isolierte Infektion des Darms mit Symptomen, wie sie für einen akuten Schub einer Colitis ulcerosa typisch sind, nachgewiesen werden (Schmidt *et al.*, 1989). Zur Behandlung der Legionellen-Infektion werden vor allem membrangängige Makrolid-Antibiotika und Flurochinolone (Gyrase-Hemmer) eingesetzt (Ewig *et al.*, 2002; Haranaga *et al.*, 2002). Eine Übertragung von Mensch zu Mensch ist bisher nicht beobachtet worden (Brand & Hacker, 1997).

Legionella pneumophila besitzt mit einem Anteil von rund 92 % aller klinischen Isolate der durch Legionellen verursachten Lungenentzündungen eine herausragende Bedeutung als Krankheitserreger. Dabei dominiert die Serogruppe 1 mit 84 %. Interessanterweise werden in Australien und Neuseeland in 30 % der Fälle Bakterien der Art *Legionella longbeacheae* isoliert. Die Patienten hatten engen Kontakt mit durch diese Mikroorganismen kontaminierte Blumenerde (Roig & Rello, 2003). Außerdem scheinen verschiedene „*Legionella*-like amoebal

pathogens“ (LLAP) für einzelne Krankheitsfälle verantwortlich zu sein. Diese Bakterien vermehren sich ausschließlich in Amöben und stehen den Legionellen phylogenetisch nahe. Aber sie besitzen ein eigenes Resistenzprofil gegenüber den verschiedenen Antibiotika. So können Flurochinolone zur Behandlung von Infektionen durch z.B. *Parachlamydia acanthamoeba* nicht verwendet werden (Roig & Rello, 2003).

Die Aufnahme von *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 (Philadelphia) in die Wirtszelle erfolgt durch „coiling“-Phagozytose. Dabei wird das Bakterium durch ein Pseudopodium spiralförmig umschlossen. Andere pathogene *Legionella*-Arten (sogar andere Vertreter derselben Serogruppe) zeigen diese Besonderheit nicht. Auch für weitere intrazelluläre Pathogene konnte diese Art der Aufnahme in die Wirtszelle beobachtet werden (Dowling *et al.*, 1992; Garcia-del Portillo & Finlay, 1995; Cheng *et al.*, 1999). Selbst nach der Phagozytose von Quarzsand in Makrophagen fanden sich Fingerabdruck-ähnliche Strukturen in den phagozytierenden Zellen (Behrendt *et al.*, 1987). Somit handelt es sich bei der „coiling“-Phagozytose wahrscheinlich um die allgemeine Konsequenz einer gestörten Aufnahme (Rittig *et al.*, 1998).

Initial kommt es nach der Aufnahme von *Legionella pneumophila* und *Legionella micdadei* zum oxidativen „Burst“ in Monozyten und polymorphkernigen Leukozyten, der jedoch bald von einer Inaktivierung dieser Zellen abgelöst wird (Dowling *et al.*, 1992). In der infizierten Zelle wird danach für *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 (Philadelphia) die Phagosomenreifung inhibiert. Das Verschmelzen mit Lysosomen ist verzögert und verschiedene molekulare Marker von Phagolysosomen sind erst spät nachweisbar (Sturgill-Koszycki & Swanson, 2000). Wahrscheinlich trägt dieser Mechanismus zu einer größeren Virulenz im Vergleich zu anderen *Legionella*-Arten bei (Dowling *et al.*, 1992). Für *Legionella pneumophila* wurde die Assoziation des replikativen Phagosoms mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum und Mitochondrien nachgewiesen (Horwitz, 1983; Swanson & Isberg, 1995). Die aufgenommenen Legionellen teilen sich intrazellulär. Nach dem Erreichen der postexponentiellen Wachstumsphase kommt es zur Expression einer zytolytischen Aktivität. Auf diesem Wege entkommen die Parasiten der erschöpften Wirtszelle (Alli *et al.*, 2000). In der frühen Phase der

Infektion konnte auch die durch Caspase-3 vermittelte Induktion einer Apoptose nachgewiesen werden (Arakaki *et al.*, 2002).

Zahlreiche molekulare Faktoren tragen zur Virulenz der Legionellen bei: LvgA scheint ein Bestandteil der äußeren Membran zu sein und vermittelt eine verringerte Empfindlichkeit gegenüber dem antimikrobiellen Peptid H β D-2 (humanes β -Defensin 2) (Edelstein *et al.*, 2003). β -Defensine wirken als Chemokine für adaptive Immunzellen (Schutte & McCray Jr., 2002). Eine sekretierte Phospholipase A (plaA-Gen) zerstört die Phospholipide der Alveolenoberfläche (Flieger *et al.*, 2000). Das Produkt des plaB-Gens vermittelt die zellassoziierte lipolytische Aktivität (Flieger *et al.*, 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, daß die phasenvariable Expression des LPS auf der Oberfläche der Bakterien die Anpassung und die Replikation der Bakterien fördert (Lüneberg *et al.*, 1998).

Die Produkte der Gene des *icm/dot*-Systems führen zu einer Pore in der Wirtsmembran. Die Proteine bilden ein Typ-IV-Sekretionssystem und ermöglichen so die Ausbildung des replikativen Phagosoms (Kirby & Isberg, 1998; Cianciotto, 2001; Roy, 2002). Außerdem sind sie für die Induktion der Apoptose in humanen Makrophagen notwendig (Zink *et al.*, 2002). Daneben existieren weitere Sekretionssysteme in Gram-negativen Bakterien. Der ABC-Transporter (Typ I) ist in der Lage, Substrate direkt über die innere und äußere Membran zu exportieren. Bei der Typ-II-Sekretion ist die Sec-Translocase für den Transport durch die innere Membran verantwortlich. Danach wird eine N-terminale Signalsequenz abgespalten und das Protein mit Hilfe weiterer Faktoren (Sekreton) durch das Periplasma und die äußere Membran bewegt (Stathopoulos *et al.*, 2000). Der Transport von Chaperon-gebundenen Substraten durch das zylindrische Injektosom (durchspannt innere und äußere Membran sowie das Periplasma) ist für die Typ-III-Sekretion charakteristisch (Smith & Hultgren, 2001).

In Legionellen scheint ein Htr-A-Homologes als „Stressprotein“ für die korrekte Faltung von verschiedenen Effektoren von Bedeutung zu sein (Pedersen *et al.*, 2001). Das Hsp60-Chaperonin auf der Oberfläche von *Legionella pneumophila* kann die Fusion von Phagosomen mit Lysosomen inhibieren (Garduno *et al.*,

1998). Für die Rep-Helikase wird eine wichtige Funktion bei der Reparatur von Mutationen unter den schwierigen intrazellulären Umweltbedingungen vermutet (Harb & Abu Kwaik, 2000). Aber auch Mutanten für *ptsP* (Phosphoenolpyruvatphosphotransferase) zeigen ein verringertes Wachstum in Lungen-Makrophagen des Meerschweinchens. In *Escherichia coli* kodiert das orthologe Gen für einen Sensor, der den C- und N-Stoffwechsel miteinander verbindet (Higa & Edelstein, 2001). Es ist interessant, daß bestimmte Gen-Loci allein für die Infektion von Makrophagen, nicht aber von Amöben, notwendig sind. Somit können Protozoen als ursprüngliche Wirte von *Legionella pneumophila* angesehen werden. Im Laufe der Zeit wurden zusätzliche Gene für das Überleben in Makrophagen erworben (Gao *et al.*, 1998).

Das Mip-Protein stellt einen wichtigen Virulenzfaktor für Legionellen dar. Es besitzt die katalytische Aktivität einer Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase. In dieser Arbeit wurden die atomaren Strukturen von Mutanten dieses Moleküls bestimmt. Außerdem konnten Untersuchungen zur Chaperon-ähnlichen Aktivität und der Dissoziation des biologisch aktiven Dimers in Abhängigkeit vom Redoxzustand der Umgebung durchgeführt werden. Für eine genaue Charakterisierung des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* sei auf das Kapitel „1.3.1. Das Mip-Protein aus *Legionella pneumophila*“ verwiesen.

1.1.3 Chlamydia

Chlamydien sind unbewegliche, Gram-negative Bakterien, die einen obligat intrazellulären Lebenszyklus besitzen. Sie sind nicht in der Lage, ATP zu synthetisieren. Die Wirtszelle muß diese Energiequelle bereitstellen. Die Parasiten durchlaufen einen einzigartigen Entwicklungszyklus (Black, 1997): Zunächst adhären „ruhende“ Elementarkörperchen (EB) an empfängliche Wirtszellen. Nach Bildung der parasitophoren Vakuole und Aufnahme in die Zelle wandeln sich die kompakten Elementarkörperchen in die Retikularkörperchen (RB) um. Diese sind größer und in der Lage, sich zu teilen, aber nicht infektiös. Mit der abschließenden Kondensation der Chlamydien (Elementarkörperchen werden wieder gebildet) und dem Entlassen aus der infizierten Wirtszelle ist der

Vermehrungszyklus geschlossen (Scidmore-Carlson & Hackstadt, 2000; Raulston & Wyrick, 2000).

Zur Zeit werden vier verschiedene *Chlamydia*-Arten unterschieden. *Chlamydia trachomatis* wird weiter in verschiedene Serovare unterteilt. Die Serovare A bis C verursachen das Trachom (Einschlusskonjunktivitis), eine Hauptursache für Erblindung in Entwicklungsländern. Die Serovare D bis K können zu Entzündungen der Harnröhre führen. Außerdem verursacht das Biovar *Lymphgranulom venerum* (Serovare L1, L2 und L3) eine invasive sexuell übertragbare Erkrankung, den weichen Schanker. Infektionen mit *Chlamydia pneumoniae* und *Chlamydia psittaci* können zu schweren Pneumonien führen. Eine besondere Gefahr besteht in der möglichen Verbreitung dieser Erreger durch mononukleäre Leukozyten über die Blutbahn. Dies kann zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen führen (Raulston & Wyrick, 2000; Alexander & Raettig, 1998). In letzter Zeit wird eine chronische Infektion durch *Chlamydia pneumoniae* mit der Entstehung von Arteriosklerose und der Alzheimer-Erkrankung in Verbindung gebracht (Wolf *et al.*, 2003; Balin & Appelt, 2001). Hauptreservoir für *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia pneumoniae* ist der Mensch. *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia pecorum* können verschiedene Wirte, einschließlich des Menschen, infizieren (Raulston & Wyrick, 2000). Zur Behandlung von Chlamydien-Infektionen eignen sich vor allem Tetrazykline sowie Makrolide (Alexander & Raettig, 1998).

Die Mechanismen, über den Chlamydien an die Wirtszelle adhären, sind wenig verstanden (Wuppermann *et al.*, 2001). Wahrscheinlich sind an der initialen Bindung Heparinmoleküle beteiligt. Diese könnten gleichzeitig an Membranproteine der Bakterien als auch des Wirtes binden. Aber auch eine Funktion eines Maltose-Oligosacharids des MOMP (major outer membrane protein) der Bakterien wird diskutiert (Scidmore-Carlson & Hackstadt, 2000). Daneben soll auch das Omp2-Protein von *Chlamydia psittaci* für die Adhäsion von Bedeutung sein (Ting *et al.*, 1995). Die Aufnahme erfolgt über Phagozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose. Auch ein Mikrofilament-abhängiger „Zipper“-Mechanismus ist beschrieben worden (Scidmore-Carlson & Hackstadt, 2000). Anschließend kommt es zur Phosphorylierung verschiedener Wirtsproteine, die mit dem Cytoskelett

assoziiert sind (Fawaz *et al.*, 1997). Die parasitophore Vakuole von Chlamydien verschmilzt nicht mit Lysosomen; es konnten keine endozytotischen Marker-moleküle nachgewiesen werden (Heinzen *et al.*, 1996; Taraska *et al.*, 1996). Zusätzlich sind in der Vakuolenmembran Lipide des Golgi-Apparates vorhanden. Somit etablieren die Parasiten wohl ein exozytotisches Vesikel. Dabei kommt es zur Inhibierung der Membranfusion (Scidmore-Carlson & Hackstadt, 2000).

Chlamydien besitzen sehr verschiedene Virulenzfaktoren. So konnte für beide Biovare von *Chlamydia trachomatis* sowie für *Chlamydia psittaci* ein zum Mip-Protein von Legionellen verwandtes Protein nachgewiesen werden (Lundemose *et al.*, 1991, 1992; Rockey *et al.*, 1996). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich unter anderem mit der biochemischen Charakterisierung des Mip-ähnlichen Proteins von *Chlamydia pneumoniae*. Diese Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase gehört zur Familie der FK506-Bindeproteine.

Außerdem konnte eine proteolytische Aktivität mit der Fähigkeit, verschiedene Transkriptionsfaktoren abzubauen, identifiziert werden. Zwei Eukaryoten-ähnliche Serin/Threonin-Kinasen der Parasiten interferieren wahrscheinlich mit Signalwegen der Wirtszelle (Verma & Maurelli, 2003).

1.1.4. Trypanosoma

Trypanosomen gehören zusammen mit den Gattungen *Leishmania* und *Endotrypanum* zu den parasitierenden Kinetoplastiden in Säugetieren. Kinetoplastiden sind gekennzeichnet durch ein spezielles Organell in der Nähe zur Basis des Flagellums. Das Kinetoplastid enthält DNA und ist Bestandteil des mitochondrialen Systems (Cox, 1994). In Mittel- und Südamerika wird durch *Trypanosoma cruzi* die Chagas-Krankheit hervorgerufen. Die Zahl der Kranken wird in Lateinamerika auf 15-20 Millionen geschätzt (Alexander & Raettig, 1998).

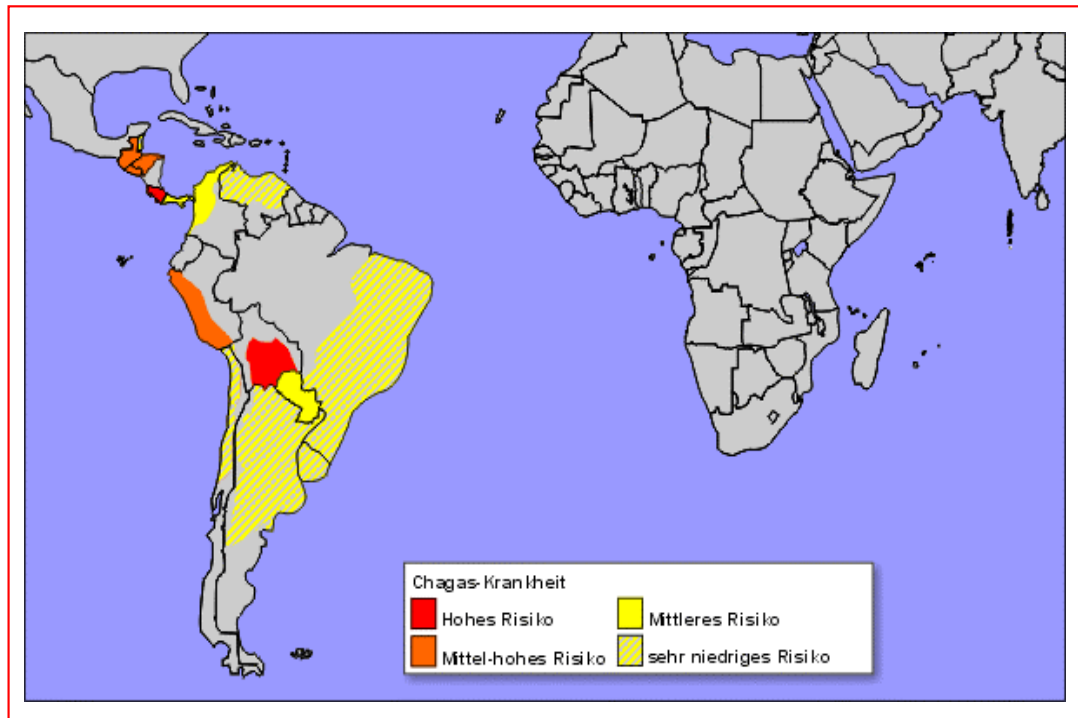


Abbildung 1.2.: Die Verbreitung der Chagas-Krankheit in Süd- und Mittelamerika und das daraus folgende Infektionsrisiko (Apotheke Schreier + Büger, 1998 - 2002). Die Verwendung dieser Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Herrn Büger, Nürnberg.

Übertragen wird die Erkrankung durch *Triatoma*-Raubwanzen. Wenn die Wanze infiziertes Blut aufgenommen hat, vermehren sich die Parasiten in der epimastigoten Form im Mitteldarm der Wanzen. Danach gelangen metazyklische Trypomastigoten mit dem Kot der Insekten in kleine Wunden oder auf Schleimhäute (z.B. Bindehaut) des Menschen. Die Trypomastigoten infizieren Zellen am primären Infektionsort, differenzieren sich in Amastigoten und teilen sich durch Zweiteilung. Anschließend erfolgt die Umwandlung in Trypomastigoten. In dieser Form kann der Parasit in die Blutbahn gelangen und erneut Zellen infizieren.

In der akuten Phase der Chagas-Krankheit kommt es oft zu einer schweren Myokarditis. Durch freiwerdende Endotoxine und die Zerstörung vagaler Ganglien werden Extrasystolen und paroxysmale Tachykardien beobachtet. In der nachfolgenden chronischen Phase kommt es durch weitere Freisetzung von Neurotoxinen zu Herzerweiterungen, Megakolon, Megaösophagus und Bronchiektasen. Häufig versterben die Patienten an Herzversagen oder Embolien. In der akuten Phase werden Nitrofuranylpräparate zur Behandlung verwendet. Für das

chronische Stadium konnte bisher keine Therapie etabliert werden (Alexander & Raettig, 1998).

Die wichtigsten Erreger der afrikanischen Trypanosomiasis, *Trypanosoma gambiense* und *Trypanosoma rhodiense*, werden durch die Tsetsefliege übertragen. Es kommt zur generalisierten Infektion und schließlich zur chronischen Meningoenzephalitis. Die Erkrankung führt meist im tiefen Koma („Schlafkrankheit“) zum Tode. Im Frühstadium wird Suraminatrium, bei *Trypanosoma gambiense* auch Pentamidin, zur Behandlung eingesetzt. Später werden Tryparsamid und Melarsoprol verwendet (Alexander & Raettig, 1998).

Trypanosoma cruzi nutzt verschiedene Mechanismen, um ein breites Spektrum von Wirtszellen zu infizieren. Für Herzmuskelzellen dienen β -adrenerge Rezeptoren als Adhäsionsmolekül. Dabei wird über die Bindung an diese membranständigen Moleküle auch die Kontraktilität des Herzens erhöht. Dies könnte eine Ursache für die bei der Chagas-Krankheit auftretenden Herzrhythmusstörungen sein (Scharfstein *et al.*, 2000; Joensen *et al.*, 2003). Bei der Aufnahme des eukaryotischen Parasiten in die Wirtszelle spielt die Rekrutierung von Lysosomen eine wichtige Rolle (Tardieux *et al.*, 1992). Daneben existiert ein weiterer Aktin-unabhängiger Aufnahmemechanismus. Hier kommt es zur Bildung von Vakuolen durch die Wirtszellmembran. Diese sind mit Produkten der Phosphoinositol-3'-Kinase (Klasse I) angereichert und weisen erst spät lysosomale Marker auf (Woolsey *et al.*, 2003). Schließlich entkommt *Trypanosoma cruzi* der parasitophoren Vakuole durch eine vom Kinetoplastiden exprimierte lytische Aktivität. Außerdem wird Neuraminidase gebildet. Dieses Enzym ist durch Abspaltung von Neuraminsäureresten in der Lage, die Membran der Wirtsvakuolen weiter zu destabilisieren (Hall, 1993).

Das „Complement-Regulatory-Protein“ (CRP) stellt ein membranständiges Molekül von *Trypanosoma cruzi* dar. Es besitzt die Fähigkeit, die Komponenten C3b und C4b der Komplementkaskade zu binden und diese so zu inaktivieren. Somit stellt es einen wichtigen Virulenzfaktor dar (Beucher *et al.*, 2003). Das Protein Tc52 besitzt strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten zur Familie der Thioredoxin- bzw. Glutaredoxin-ähnlichen Proteine. „Knockout“-Mutanten eines

Allels zeigten im Mausmodell eine deutlich verringerte Pathogenität (Garzon *et al.*, 2003). Außerdem ist *Trypanosoma cruzi* über die Expression einer Prolin-Racemase in der Lage, die Mitose von B-Zellen zu stimulieren. Dies ist besonders interessant, da im Mausmodell der Chagas-Krankheit eine verringerte Lymphozyten-Aktivität mit einer Resistenz gegenüber der Infektion bzw. einer Kardiomyopathie verbunden ist (Reina-San-Martin *et al.*, 2000).

Interessanterweise wird auch ein Mip-ähnliches Protein durch *Trypanosoma cruzi* ins umgebende Medium sezerniert (Moro *et al.*, 1995). Das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* kann die Aufgaben dieses Moleküls in Kinetoplastiden komplementieren (Pereira *et al.*, 2002). Leider war es nicht möglich, dieses Protein in meine biochemischen Untersuchungen mit einzubeziehen. Trotzdem wurde das bereits erlangte Wissen über das Mip-Protein von *Trypanosoma cruzi* an vielen Stellen dieser Arbeit verwendet. Dies ermöglichte neue Einsichten über die Klasse der Mip-Proteine.

1.2. Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen

1.2.1. Charakterisierung der Enzymklasse

Zu den Faltungshelferproteinen gehören verschiedene Klassen von Enzymen sowie die Chaperone. Enzyme sind durch eine hohe bimolekulare Geschwindigkeitskonstante und eine geringe Stabilität des Michaelis-Menten-Komplexes gekennzeichnet. Sie verändern die Produktzusammensetzung nicht. (Fischer, 1996; Fersht, 1984). Dies gilt auch für die Disulfid- und Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen. Disulfid-Isomerasen sind in der Lage, den Austausch von Disulfid-Brücken zu katalysieren (Stryer, 1996). Sie können so die korrekte Faltung eines Proteins beschleunigen.

Die Isomerisierung der Peptidbindung zwischen der Iminosäure Prolin und der vorangehenden Aminosäure stellt ebenfalls einen langsamen Schritt in der Proteinfaltung dar. Sie wird durch Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerasen katalysiert (Fischer *et al.*, 1984). Der genaue Mechanismus der Isomerisierung ist noch immer unklar. Wahrscheinlich wird die entsprechende Peptidbindung nicht gespalten; es entsteht kein kovalent an das Enzym gebundenes Intermediat. Die Peptidyl-Prolyl-

cis/trans-Isomerasen verzerren nach Bindung des Substrates in eine hydrophobe Tasche die X-Pro-Imidbindung „out-of-plane“. Dadurch wird die Resonanz minimiert und die C-N-Bindung besitzt nun überwiegend Einfachbindungscharakter. Eine Rotation um diese quasi-Einfachbindung erfordert eine deutlich geringere Aktivierungsenergie (Schreiber, 1991; Galat & Metcalfe, 1995).

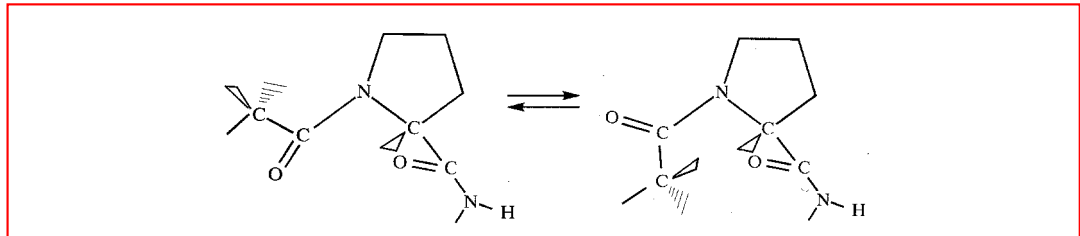


Abbildung 1.3.: Schematische Darstellung der Isomerisierung einer X-Pro-Peptidbindung (aus Fischer, 1994)

Die Isomerisierung der Proteinkette spielt eine wichtige Rolle beim „Membrane Channelling“ sowie dem Proteintransport (Fischer & Schmid, 1990; Hacker & Fischer, 1993). Daneben konnte auch die isomerspezifische Erkennung von Substraten, z.B. für Proteasen und Kinasen, beobachtet werden (Fischer *et al.*, 1984; Weiwad *et al.*, 2000). Für das hsp70-Chaperon DnaK ist eine Aktivität als sekundäre Amid-Peptidbindungsisomerase (APIase) beschrieben worden. Diese Enzyme beschleunigen spezifisch die *cis/trans*-Isomerisierung von Nicht-Prolin-Peptidbindungen (Schiene-Fischer *et al.*, 2002). Eine solche Funktion konnte für Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen bisher nicht gezeigt werden (Scholz *et al.*, 1998).

1.2.2. Einteilung der Isomerasen

Bis heute können drei verschiedene Familien von Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen in Pro- und Eukaryoten unterschieden werden. Sie besitzen verschiedene Aminosäuresequenzen und unterscheiden sich in ihren aktiven Zentren (Göthel & Marahiel, 1999). Nachfolgend werden die verschiedenen Familien mit ihren spezifischen Inhibitoren vorgestellt. Cyclophiline werden durch das Undecapeptid Cyclosporin A inhibiert. Es wird von verschiedenen Fungi imperfecti, z.B. *Tolypocladium inflatum*, synthetisiert (Borel, 1989). Acht Stränge

eines β -Faltblattes bilden in dieser Proteinfamilie ein „ β -Barrel“. Diese sind über „Loops“ und drei α -Helices miteinander verbunden (Göthel & Marahiel, 1999).

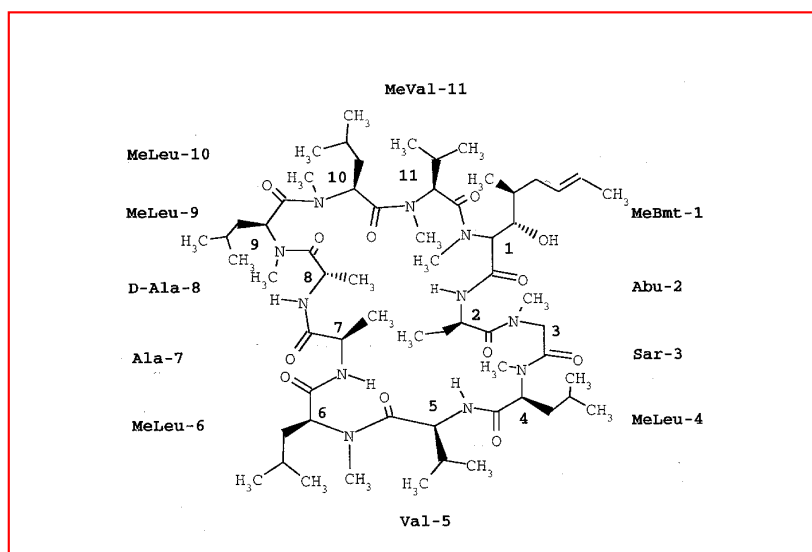


Abbildung 1.4.: Die Struktur des zyklischen Peptids Cyclosporin A (aus Fischer, 1994).

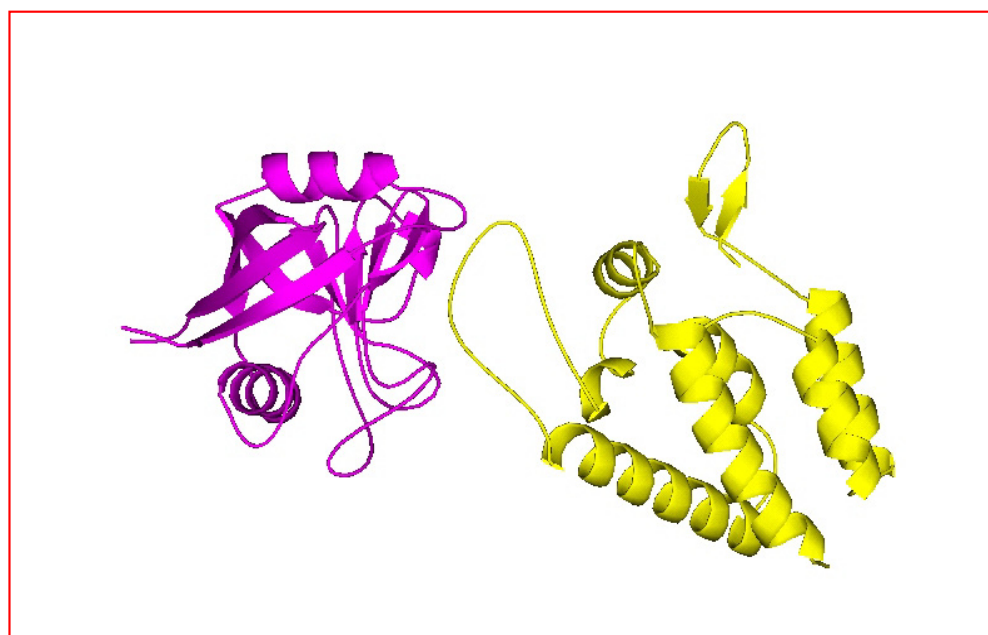


Abbildung 1.5.: Die Struktur des humanen Cyclophilins A (violett), gebunden an die N-terminale Domäne des Capsid-Proteins von HIV-1 (gelb) (Gamble *et al.*, 1996). PDB ID: 1AK4 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Das Bild wurde mit PYMOL (DeLano, 2002) generiert.

Die FK506-Bindeproteine (FKBPs) können durch die Polyketide FK506 und Rapamycin in ihrer Isomerase-Aktivität gehemmt werden. Beide Substanzen

wurden in verschiedenen *Streptomyces*-Arten gefunden (Göthel & Marahiel, 1999).

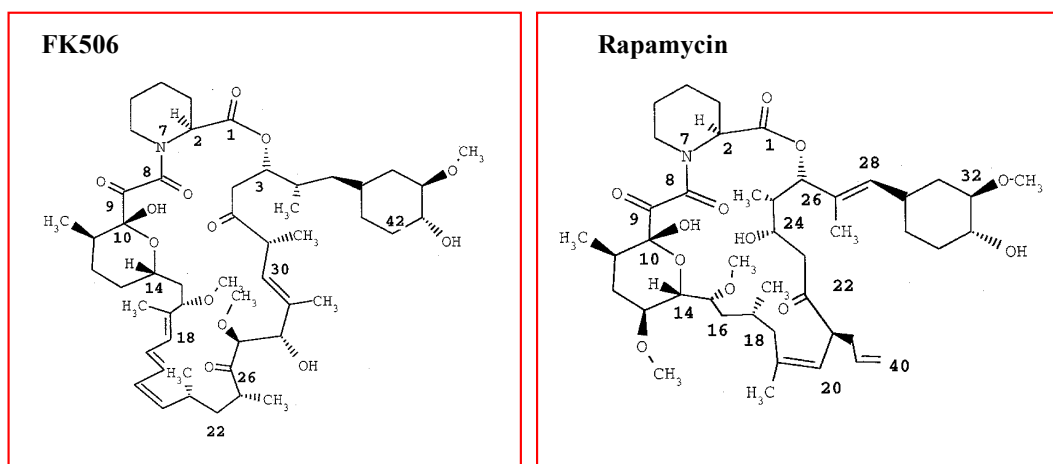


Abbildung 1.6.: Die chemische Natur von FK506 und Rapamycin (aus Fischer, 1994).

Die Struktur dieser Proteine stellt ein fünfsträngiges antiparalleles β -Faltblatt dar, das um eine α -Helix angeordnet ist (Michnik *et al.*, 1991; Göthel & Marahiel, 1999).

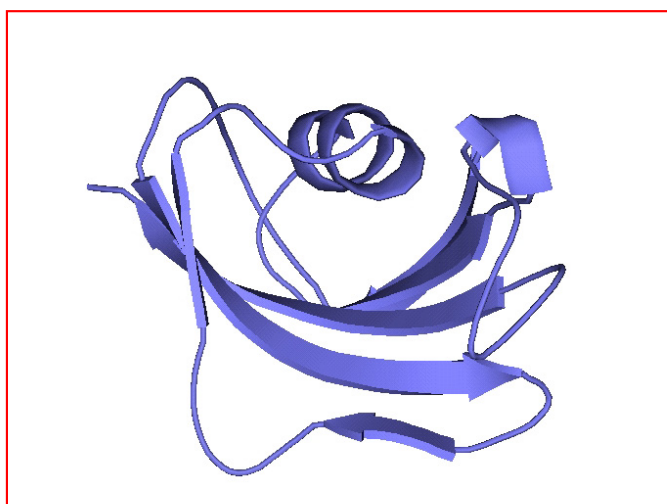


Abbildung 1.7.: Tertiärstruktur des FKBP12-Proteins von *Bos taurus* (Wilson *et al.*, 1995). PDB ID: 1FKK (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Das Bild wurde mit PYMOL (DeLano, 2002) generiert.

Das Trigger-Faktor-Protein von *Escherichia coli* besteht aus drei Domänen (Zarnt *et al.*, 1997). Die zentrale Faltungseinheit zeigt eine Sequenzähnlichkeit zu den FK506-Bindeproteinen (Callebaut & Moron, 1995) und besitzt eine hohe Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität. Jedoch kann der Trigger-Faktor

nicht durch FK506 inhibiert werden (Stoller *et al.*, 1995). Daher wird dieses Protein oft als einziger Vertreter einer eigenen Unterfamilie innerhalb der FK506-Bindeproteine angesehen. Daneben zeigt der Trigger-Faktor Chaperoneigenschaften und ist mit dem Ribosom über die N-terminale Domäne assoziiert (Lecker *et al.*, 1989; Stoller *et al.*, 1995; Hestekamp *et al.*, 1997). Das homologe Protein aus *Thermus thermophilus* scheint für seine Funktion als Chaperon Zn^{2+} -Ionen zu benötigen (Suno *et al.*, 2004).

Die Parvuline bzw. Parvulin-ähnliche Domänen sind eine Gruppe relativ kleiner Proteine. Vier antiparallele Stränge eines β -Faltblatts werden von vier α -Helices umgeben (Göthel & Marahiel, 1999).



Abbildung 1.8.: Das Bild zeigt die Struktur der Isomerase-Domäne von hPin1 in Lösung (Bayer *et al.*, 2003). PDB ID: 1NMW (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Das Bild wurde mit PYMOL (DeLano, 2002) generiert.

Der Gerbstoff Juglon (5-Hydroxy-1,4-naphthochinon) aus der Walnuß ist ein spezifischer, irreversibler Inhibitor für Parvuline. Juglon bindet kovalent an Cystein-Reste und stört so wahrscheinlich die Geometrie im aktiven Zentrum durch partielles Entfalten des Enzyms (Hennig *et al.*, 1998).

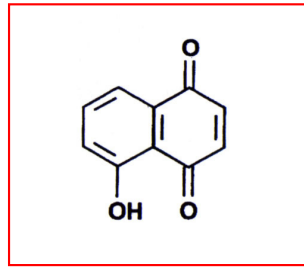


Abbildung 1.9.: Der Gerbstoff Juglon aus der Walnuß (aus Göthel & Marahiel, 1999).

1.2.3. Wechselwirkungspartner der Isomerasen

Die Effektoren der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen sind vielfältig. Für die notwendigen Wechselwirkungen ist die enzymatische Aktivität nicht immer von Bedeutung. Immunophiline können im Komplex mit Cyclosporin A bzw. FK506 die Phosphatase Calcineurin inhibieren. Dadurch wird die Dephosphorylierung von NF-AT_p verhindert. NF-AT_p kann nicht mehr in den Nucleus wandern und dort den Jun/Fos/NF-AT-Transkriptionskomplex für die Interleukin-2-mRNA etablieren. Somit wird insbesondere die Sekretion von Interleukin-2 verhindert. Dieses Cytokin stimuliert jedoch die Mitose in prozytotoxischen T-Zellen, B-Zellen und T-Helfer-Zellen. Daher wird nach Applikation von Cyclosporin A oder FK506 die zelluläre und humorale Immunantwort geschwächt (Fischer 1994; Stryer, 1996). Rapamycin inhibiert im Komplex mit FKBP12 die Funktion von mTor (mammalian target of rapamycin). Dieses Protein stellt eine Serin/Threonin-Kinase mit Ähnlichkeit zur Phosphatidylinositol-3'-Kinase dar (Huang *et al.*, 2003). Cyclosporin A, FK506 und Rapamycin können zur Begrenzung der Immunantwort z.B. nach Organtransplantationen angewendet werden. FK506 wird außerdem zur Behandlung der Neurodermitis eingesetzt (Boguniewicz, 2003).

Das menschliche Parvulin Pin1 sowie das homologe Protein aus der Hefe Ess1 dienen als Regulatoren im mitotischen Zellzyklus. Mangel an diesen Proteinen führt zu seiner Arretierung (Lu *et al.*, 1996). FKBP12 ist in der Lage, die EGF-Rezeptor-Autophosphorylierung zu inhibieren. Dies geschieht über die Stimulierung einer Phosphatase, die an den EGF-Rezeptor gekoppelt ist (Lopez-Illasaca *et al.*, 1998). Außerdem konnten Komplexe von hFKBP12 und hFKBP12.6 mit IP₃- und Calcium-Kanälen/Ryanodin-Rezeptoren nachgewiesen werden (Jayaraman *et al.*, 1992; Timerman, 1995). Das Protein SurA (Parvulin) aus *Escherichia coli* ist

an der Faltung membranständiger und extrazytoplasmatischer Proteine beteiligt (Bitto & McKay, 2003). Cyp A und Cyp B binden an das Gag-Polyprotein von HI-1-Viren (Luban *et al.*, 1993). Außerdem kommt es zur spezifischen Aufnahme von Cyclophilin A in die Virionen (Franke *et al.*, 1994). Die Komplexbildung kann durch Cyclosporin verhindert werden, und das Immunophilin ist für die Infektiosität der Viren essentiell (Franke & Luban, 1996). Das Protein scheint für die Isomerisierung der Peptidbindung Gly-89-Pro-90 in der N-terminalen Domäne des Capsid-Proteins und einer damit verbundenen Konformationsänderung verantwortlich zu sein (Bosco *et al.*, 2002). Darüberhinaus konnte auch eine Wechselwirkung zwischen Cyp A und dem Vpr-Protein des Virus gezeigt werden (Zander *et al.*, 2003).

Eine Reihe von Bakterien, adaptiert an das Leben in Säugern, ist in der Lage, (membranständige) FK506-Bindeproteine (FKBPs) zu synthetisieren. Dies trifft insbesondere für intrazelluläre Parasiten zu. Hierzu gehören z.B. *Legionella ssp.* und *Chlamydia ssp.* (Hacker & Fischer, 1993). Aber auch für Trypanosomen konnte ein Mip-ähnliches Protein nachgewiesen werden. Diese Eukaryoten sezernieren das Protein jedoch in das sie umgebende Medium (Moro *et al.*, 1995).

1.3. Mip-Proteine

1.3.1 Das Mip-Protein aus *Legionella pneumophila*

Wie bereits erwähnt, stellt das Mip-Protein einen Virulenzfaktor für die *Legionellaceae* dar (Cianciotto *et al.*, 1989, 1990a, 1990b; Engleberg *et al.*, 1989; Riffard *et al.*, 1996). Bakterien, die dieses Protein nicht exprimieren können (Deletionsmutanten), zeigen eine deutlich verminderte Virulenz nach der intratrachealen Inokulation im Meerschweinchen-Tiermodell. Diese kann durch die um den Faktor 80 reduzierte Aufnahme in alveoläre Makrophagen erklärt werden (Cianciotto *et al.*, 1989). Daneben spielt wohl auch die verringerte Infektionsrate für Lungenepithelien vom Typ I und II eine Rolle (Cianciotto *et al.*, 1995b). Die Cokultivierung von Protozoen mit Mip⁻-Mutanten führt zu einer dramatisch (1000-fach) verringerten Zahl von lebensfähigen intrazellulären Legionellen. Interessanterweise ist dabei die Fähigkeit, an Amöben zu binden, nicht beeinträchtigt (Cianciotto & Fields, 1992).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit Hilfe der Immuno-Gold-Technik konnten die Lokalisation des Mip-Proteins an der Oberfläche von extrazellulär gewachsenen Legionellen bestätigen. Außerdem wurde das Protein in multilamellären Strukturen von infizierten Amöben nachgewiesen (Helbig *et al.*, 2001). Das Mip-Protein wird in *Legionella pneumophila* während der intrazellulären Replikation konstitutiv exprimiert (Köhler *et al.*, 2000). Jedoch konnte in MonoMac6-Zellen eine kurzzeitige Verringerung der Transkriptionsaktivität unmittelbar nach der Infektion beobachtet werden (Wieland *et al.*, 2002).

Die C-terminale Domäne des Virulenzfaktors besitzt eine Homologie zu den FK506-Bindeproteinen (FKBPs). Daher war der Nachweis einer Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität, wie sie für diese Proteinfamilie typisch ist, keine Überraschung. Diese enzymatische Aktivität kann durch FK506 gehemmt werden (Engleberg *et al.*, 1989; Fischer *et al.*, 1992). Jedoch scheint die Isomerase-Aktivität allein für die Funktion des Mip-Proteins als Virulenzfaktor im Tiermodell von Bedeutung zu sein. So zeigen *Legionella*-Stämme mit deutlich reduzierter Isomerase-Aktivität des Mip-Proteins (D142L mit 5,3 % Restaktivität und Y185A mit 0,6 % Restaktivität) keine verringerte Überlebensrate in *Acanthamoeba castellanii* (Wintermeyer *et al.*, 1995). Im Tiermodell konnte für einen *Legionella*-Stamm mit der Mip-Mutante D142L annähernd Wildtyp-ähnliches Wachstum festgestellt werden. Dagegen war die Mutante Y185A nicht in der Lage, die Funktion des Wildtyp-Mip-Proteins vollständig zu komplementieren (Köhler, 2000). Zusätzlich wurde der Einfluß verschiedener monoklonaler Antikörper gegen die C-terminale Domäne untersucht, die in der Lage waren, in der Nähe des aktiven Zentrums zu binden. Diese konnten zumeist auch die Initiierung und frühe Etablierung der intrazellulären Infektion von *Acanthamoeba castellanii* und menschlichen U937-Zellen beeinträchtigen. Offensichtlich ist allein ein zugängliches aktives Zentrum des Mip-Proteins für die monozelluläre Infektion von Bedeutung (Helbig *et al.*, 2003).

Das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* ist ein Dimer mit einem Molekulargewicht von rund 48 kDa (Schmidt *et al.*, 1995). Es bildet ein ungewöhnliches, V-förmiges, „zangenartiges“ Molekül (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001) (siehe Abbildung 1.10.). Die N-terminale Domäne eines Monomers besteht

aus zwei antiparallelen α -Helices und vermittelt die Dimerisierung vorwiegend über hydrophobe Wechselwirkungen. Dabei wird ein untypisches antiparalleles „Four-Helix-Bundle“ mit einem Inklinationswinkel von 45° gebildet. Ein besonderes Merkmal stellt in dieser Struktur der „erweiterte Methionin-Zipper“ dar. Drei Methionin-Reste eines Monomers (Met-38, Met-42, Met-46) interagieren mit zwei Methionin-Resten (Met-38', Met-42') und einem hydrophoben Rest (Val-33') des anderen Monomers. Dabei sind die interagierenden Helices, im Gegensatz zum bekannten „Leucin-Zipper“, antiparallel angeordnet. Daran schließt sich eine 65 Å lange, freistehende α -Helix an. In der C-terminalen, FKBP-ähnlichen Domäne formen sechs β -Stränge ein antiparalleles Faltblatt, über dem eine kurze α -Helix liegt. Der erste β -Strang ist im menschlichen FKBP12 nicht vorhanden, wohl aber in FKBP59, das wie das Mip-Protein N-terminal zur Isomerasedomäne zusätzliche Reste aufweist (Crăescu *et al.*, 1996).

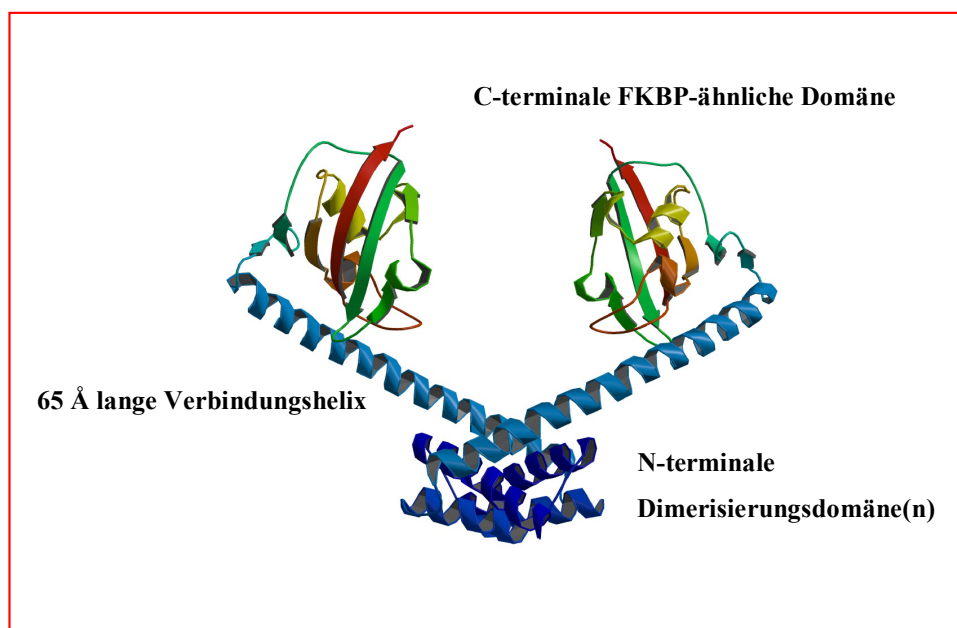


Abbildung 1.10.: Das Bild zeigt die Struktur des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001). PDB ID: 1FD9 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Das Bild wurde mit MolScript (Kraulis, 1991) und Raster3D (Merritt & Bacon, 1997) generiert.

1.3.2. Das Mip-Protein von Chlamydien

Für LGV- sowie Trachom-Biovar von *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia psittaci* konnte ein Mip-ähnliches Protein nachgewiesen werden (Lundemose *et*

al., 1991, 1992; Rockey *et al.*, 1996). Außerdem gehen Lundemose *et al.* aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit für beide Biovare auch von der Existenz eines *mip*-ähnlichen Gens in *Chlamydia pneumoniae* aus (Lundemose *et al.*, 1992). Wahrscheinlich ist das Protein, wenn auch nur in geringer Konzentration, in der äußeren Membran der Bakterien lokalisiert oder wird in das umgebende Medium abgegeben (Lundemose *et al.*, 1992). Interessanterweise stellt das Mip-ähnliche Protein von *Chlamydia trachomatis* ein Lipoprotein dar. Palmitinsäure wird in das rekombinante Protein eingebaut und die Aminosäuresequenz des Mip-ähnlichen Proteins von *Chlamydia trachomatis* enthält eine Erkennungssequenz für Signalpeptidase II, wie in prokaryotischen Lipoproteinen. Das modifizierte Cystein ist der erste Aminosäurerest des prozessierten Proteins (Lundemose *et al.*, 1993b).

Das Mip-ähnliche-Protein von *Chlamydia trachomatis* besitzt ebenfalls Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität. Diese Funktion kann durch FK506 und Rapamycin inhibiert werden. Vorbehandlung von *Chlamydia trachomatis* mit FK506 oder Rapamycin reduziert die Infektiosität für McCoy-Zellen um 30 %. Daher wird auch für das Mip-ähnliche Protein von Chlamydien eine Funktion als Virulenzfaktor vermutet. Im Gegensatz zu Legionellen scheint die Isomerasefunktion dabei eine wichtige Rolle zu spielen (Lundemose *et al.*, 1993a).

1.3.3. Das Mip-Protein von *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi sezerniert ein Protein ins umgebende Medium, dessen Gensequenz Homologie zu den bakteriellen Mip-Proteinen besitzt. Jedoch werden zwischen einer prokaryotischen Signalsequenz und der Region mit Homologie zu den eukaryotischen FK506-Bindeproteinen deutlich weniger Aminosäurereste eingeschlossen. Außerdem besitzt das Mip-Protein von *Trypanosoma cruzi* eine C-terminale Erweiterung von 19 Aminosäureresten. Diese besitzen zumeist polaren Charakter. Im Southern Blot konnte die Existenz von nur einer Kopie für das Mip-Gen nachgewiesen werden (Moro *et al.*, 1995). Dies überrascht, sind doch die meisten Gene dieses Organismus in sich wiederholenden Clustern zusammenhängender Kopien organisiert (Garcia-Salcédo *et al.*, 1994).

Für das Mip-Protein von *Trypanosoma cruzi* konnte ebenfalls eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase-Aktivität gezeigt werden. Diese ist durch FK506 und L-685,818 (Antagonist von FK506 ohne die Fähigkeit der T-Zell-Aktivierung) bei nanomolaren Konzentrationen inhibierbar. Durch Zusatz von heterologem *Trypanosoma*-Mip zu HeLa- und Affenepithelzellen konnte die Infektionsrate für Säugerzellen deutlich erhöht werden. Im Gegensatz dazu sind Antikörper der Maus gegen das Mip-ähnliche Protein sowie FK506 und L-685,818 in der Lage, die Infektionsrate durch Trypanosomen zu verringern. Jedoch ist FK506 ein deutlich wirksamerer Inhibitor für die Infektion als L-685,818, besitzt aber ein geringeres Vermögen, die Isomerase-Aktivität zu hemmen. Offensichtlich spielt auch bei Trypanosomen nicht nur die enzymatische Aktivität für die erfolgreiche Infektion der Wirtszelle eine Rolle (Moro *et al.*, 1995). Darüberhinaus konnte in einem Invasionsassay gezeigt werden, daß das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* die Funktion des *Trypanosoma*-Mip übernehmen kann (Pereira *et al.*, 2002).

Neue Erkenntnisse brachte die Aufklärung der atomaren Struktur des Mip-Proteins von *Trypanosoma cruzi*: Der Virulenzfaktor ist ein monomeres Protein. Er besitzt keine N-terminale Dimerisierungsdomäne. Die N-terminal zur FKBP-Domäne lokalisierte α -Helix ist im Vergleich zum Mip-Protein von *Legionella pneumophila* verkürzt. Außerdem besitzt das Mip-homologe Protein in *Trypanosoma cruzi* eine zusätzliche, exponierte α -Helix, die das Molekül C-terminal erweitert (Pereira *et al.*, 2002). Die Struktur der FKBP-homologen Domäne besitzt große Ähnlichkeit zum entsprechenden Bereich des *Legionella*-Mip-Proteins.

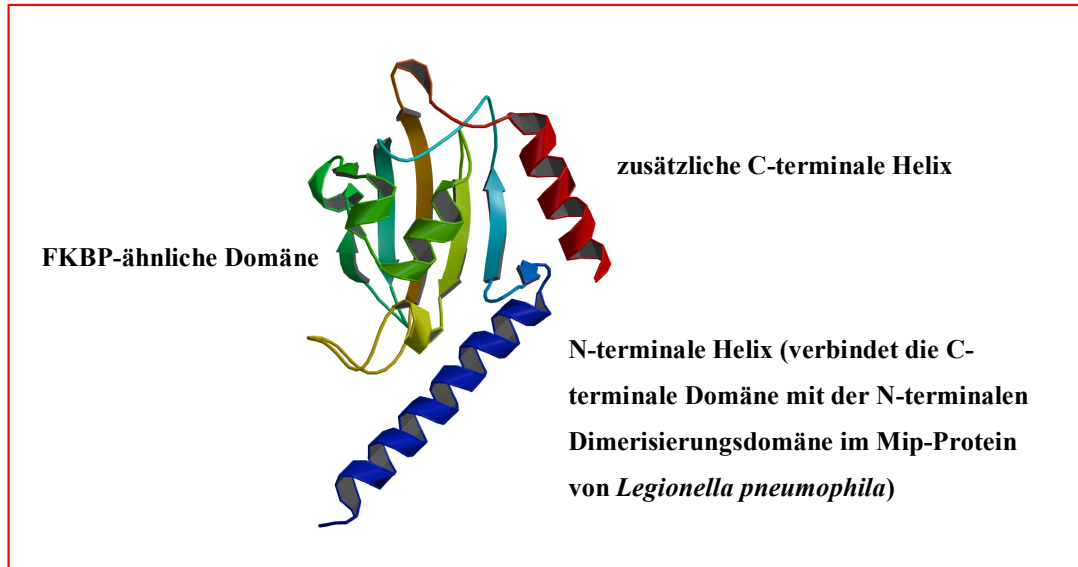


Abbildung 1.11.: Tertiärstruktur des Mip-ähnlichen Proteins von *Trypanosoma cruzi* (Pereira *et al.*, 2002). PDB ID: 1JVW (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Das Bild wurde mit MolScript (Kraulis, 1991) und Raster3D (Merritt & Bacon, 1997) generiert.

1.3.4. Weitere intrazelluläre Pathogene, für die Mip-ähnliche Proteine nachgewiesen werden konnten

Homologe zum Mip-Protein von *Legionella pneumophila* wurden auch in der Familie der Rickettsien nachgewiesen (Cianciotto *et al.*, 1995a). *Coxiella burnetti*, ein obligat intrazelluläres Bakterium und Erreger des Q-Fiebers, sekretiert wahrscheinlich ein entsprechendes Protein in das umgebende Medium (Mo *et al.*, 1995; Alexander & Raettig, 1998). Interessanterweise hemmt dieser Parasit nicht die Phagosom-Lysosom-Fusion. Der Stoffwechsel des Parasiten scheint sogar durch die Ansäuerung des Phagolysosoms aktiviert zu werden (Hackstadt & Williams, 1981).

Mit Hilfe eines spezifischen Mip-Antiserums und Immuno-Blot-Analyse konnte das Vorhandensein eines Mip-ähnlichen Proteins auch für verschiedene *Ehrlichia*-Arten gezeigt werden (Cianciotto *et al.*, 1995a). Auch in *Salmonella typhimurium*, dem Erreger der Salmonellose, wird ein Mip-ähnliches Protein (FkpA) exprimiert. Versuche mit Caco-2- und J774.A1-Zellen lieferten keine Unterschiede für die initiale Aufnahmezeit zwischen Wildtyp-Bakterien und Bakterien mit inaktiviertem *fkpA*-Gen. Jedoch zeigen FkpA-negative Mutanten ein deutlich

verringertes Überlebensvermögen in den ersten Stunden nach der Infektion (Horne *et al.*, 1997). Dieser Effekt konnte durch die Mutation der Proteine SurA und HtrA noch verstärkt werden. Beide sind an der Faltung bzw. dem Abbau von Proteinen im Periplasma beteiligt (Humphreys *et al.*, 2003).

Für *Aeromonas hydrophila* konnte ebenfalls ein ORF mit 40 % Identität bezüglich der Aminosäuresequenz für das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* bzw. 46 % Sequenzidentität zum FkpA-Protein von *Escherichia coli* nachgewiesen werden (Wong *et al.*, 1997). Aeromonaden verursachen besonders bei Kindern Darminfektionen; die intrazelluläre Aufnahme dieses Krankheitserregers konnte nachgewiesen werden (Isonhood & Drake, 2002). Die Expression des entsprechenden Proteins wurde im Western-Blot mit Antiserum gegen das Mip-Protein von *Legionella longbeacheae* bestätigt. Jedoch führte die Inaktivierung des Gens für das Mip-ähnliche Protein nicht zu einer verringerten Virulenz dieser Bakterien im Mausmodell. Es ist daher möglich, daß das entsprechende FkpA-Protein für Aeromonaden keinen Virulenzfaktor darstellt (Wong *et al.*, 1997).

1.3.5. Mip-ähnliche Proteine in nichtintrazellulären Pathogenen

Für *Rochalimea quintana* (verursacht das „Fünftagefieber“) konnten ebenfalls Gensequenzen gefunden werden, die mit Sonden für das Mip-Protein im Southern-Blot hybridisieren. Für diesen Parasiten ist noch nicht endgültig geklärt, ob der Lebenszyklus eine intrazelluläre Phase beinhaltet (Cianciotto *et al.*, 1995a). Außerdem hat die Datenbanksuche Mip-verwandte Proteine für *Neisseria spp.*, *Streptomyces ssp.* und *Pseudomonas aeruginosa* vorausgesagt (Cianciotto *et al.*, 1995a).

1.3.6. Mip-ähnliche Proteine in *Escherichia coli*

In *Escherichia coli* sind bisher zwei Mip-ähnliche Proteine identifiziert worden, FkpA und FklB (Horne & Young, 1995; Rahfeld *et al.*, 1996). FkpA ist im periplasmatischen Raum der Gram-negativen Bakterien lokalisiert und besitzt Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase- (Missiakas *et al.*, 1996) sowie Chaperon-Aktivität (Bothmann & Plückthun, 2000; Ramm & Plückthun, 2000; Arie *et al.*,

2001). Der durch Hitzeschock induzierbare σ -Faktor, σ^E , kontrolliert die Transkription von FkpA sowie RpoH_{P3}, RpoE_{P2}, der Disulfid-Isomerase DsbC, der Protease DegP und weiteren Proteinen in der Form eines Regulons (Danese & Silhavy, 1997; Dartigalongue *et al.*, 2001).

Im RNaseT1-Rückfaltungsassay zeigt FkpA einen um den Faktor 100 höheren k_{cat}/K_M -Wert als mit einem kurzen Tetrapeptid als Substrat. Die C-terminale (FKBP-homologe) Domäne allein besitzt eine deutlich reduzierte Chaperon- und Isomerase-Aktivität. Wahrscheinlich ist für die volle Aktivität des Proteins die korrekte Positionierung von verschiedenen Polypeptid-Bindestellen über die Dimerisierung notwendig. Außerdem kann die Chaperon-Aktivität nicht durch FK520 inhibiert werden. Daher ist anzunehmen, daß beide Aktivitäten in verschiedenen Bereichen der C-terminalen Domäne lokalisiert sind (Ramm & Plückthun, 2001).

1.4. Ziele der Arbeit

Die „Macrophage-Infectivity-Potentiator“-Proteine finden sich bei verschiedenen intrazellulären Parasiten, wie z.B. Legionellen, Chlamydien und Trypanosomen. Sie stellen Virulenzfaktoren dieser Organismen dar. Aber auch in *Escherichia coli* wird ein verwandtes Protein (FkpA) exprimiert.

Bisher wurden zahlreiche molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt, um den Mechanismus zu verstehen, über den diese Moleküle zur Infektion der eukaryotischen Wirtszelle beitragen. Auch die detaillierte Charakterisierung der Isomerasefunktion diente dieser Aufgabe. Seit kurzem sind zudem die Kristallstrukturen der Mip-Proteine von *Legionella pneumophila* und *Trypanosoma cruzi* bekannt. Leider lieferten die Ergebnisse der bisherigen Experimente keine überzeugende Erklärung für die Funktion als Virulenzfaktor.

Lebewesen müssen zahlreiche Aufgaben, zum Teil sogar gleichzeitig, erfüllen. So ist es für intrazelluläre Bakterien z.B. notwendig, Nahrung aufzunehmen, Wirtsreaktionen abzuwehren, sich u.U. selbst gegen Parasiten zu behaupten sowie sich zu vermehren. Diese Aufgaben sind eng miteinander gekoppelt; sie stehen über vielfältige Wechselwirkungen auf eine Weise miteinander in Beziehung, die das Überleben ermöglichen.

Die dafür notwendige Komplexität eines Lebewesens spiegelt sich bereits auf der molekularen Ebene wider: Viele, wenn nicht die Mehrzahl der Proteine, besitzen mehrere Funktionen. Die Bindung von Effektoren zum Zwecke der Regulation von Molekülen stellt ein Beispiel für eine Zusatzaufgabe dar. Aber auch die Beeinflussung der Struktur von Proteinen durch den pH-Wert oder oxidierende oder reduzierende Bedingungen ermöglicht die Integration von Umweltbedingungen. Es ist wahrscheinlich, daß auch die Mip-Proteine der verschiedenen intrazellulären Parasiten neben der PPIase-Aktivität weitere Funktionen besitzen.

In der vorliegenden Arbeit konnten die bekannten Strukturen als Grundlage genutzt werden, um neue Funktionen der Mip-Moleküle zu identifizieren. Dabei sollte eine „Ähnlichkeit“ zu anderen Proteinen in der „dreidimensionalen Form“ als Hinweis für eine möglicherweise ebenfalls ähnliche Funktion dienen. Die vermuteten neuen Eigenschaften der Mip-Moleküle waren zu überprüfen. Außerdem galt es, ungewöhnliche Einzelheiten in den bekannten Strukturen der Mip-Proteine zu erkennen und für die Planung von Experimenten zur funktionellen Charakterisierung zu nutzen.

Der Nachweis neuer Funktionen der Mip-Proteine kann unmittelbar zum Verständnis der Rolle dieser Moleküle in der intrazellulären Infektion beitragen. Gleichzeitig sollte die praktisch bereits erfolgte Lokalisation der Funktion die rationale Suche nach Wirkstoffen wesentlich erleichtern. Darüberhinaus stellt die Suche nach Eigenschaften eines Proteinmoleküls über die Strukturähnlichkeit zu einem anderen Protein vielleicht eine neue generelle Möglichkeit für die Identifizierung einer bisher unbekannt Funktionen dar. Die vorliegende Arbeit kann als ein erster, vorsichtiger Versuch zur Bewertung dieses Vorgehens angesehen werden.

Außerdem sollte das Strukturwissen über das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* durch die Röntgenstrukturanalyse verschiedener Mutanten dieses Proteins erweitert werden. Dabei kann das biochemische Wissen wieder zu einer Verbesserung der Qualität von Kristallen beitragen.

2. Materialien und Methoden

Berechnungen am Computer sowie die Generierung der verschiedenen Bilder erfolgten mit Hilfe einer O2-Workstation (Silicon Graphics).

Sequenzen verschiedener Proteine wurden mit Hilfe der Datenbank „Swiss-Prot/TrEMBL“ (Boeckmann *et al.*, 2003; <http://www.expasy.org/sprot/>) ermittelt.

Auf Strukturwissen konnte durch die „Protein-Data-Bank“ (PDB) (Bermann *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>) zurückgegriffen werden.

Für vergleichende Analysen der Sekundärstrukturen wurde das Programm „DSSP“ genutzt (Kabsch & Sander, 1983).

2.1. Proteinpräparationen

Alle Proteine wurden freundlicherweise von Dr. Thilo Kamphausen, Dr. Bettina König und Katja Knauth (Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle) zu Verfügung gestellt. Trotzdem soll hier ihre Präparation noch einmal kurz zusammengefaßt werden:

2.1.1. Isolierung des wtMip-Proteins von *Legionella pneumophila* (Schmidt, 1998)

- Kultur des *E. coli*-Stammes DH5 α mit dem Vektor pBLL106 zentrifugiert
- erhaltenes Pellet durch „French-Press“ aufgeschlossen und mit 0,1 % Benzonase und 1 % Triton X-100 versetzt
- Ultrazentrifugation
- Überstand auf DEAE-Säule aufgetragen, Mip-Protein befindet sich im Durchlauf (Säulenpuffer: 2 mM Tricin pH 8,5)
- nächster Reinigungsschritt durch Kombination von TMAE- und Fractogel-TSK-Blue-Säule (Säulenpuffer: 2 mM Tricin pH 8,5), Protein mittels Gradienten von 0-2 M KCl in 2 mM Tricin pH 8,5 abgelöst
- vereinigte Fraktionen mit Ammoniumsulfat zu 35 % gesättigt

- erhaltenes Volumen auf Propyl-Säule aufgetragen (Säulenpuffer: 2 mM Tricin pH 8,5; 35 % Ammoniumsulfat), durch langsame Verringerung der Salzkonzentration Sammlung des Mip-Proteins in wenigen Fraktionen möglich
- Dialyse gegen 2 mM Tricin pH 8,5
- letzte Reinigung durch Fractogel-TSK-Green-Säule (Säulenpuffer: 2 mM Tricin pH 8,5), Eluierung des *LpMip* durch einen Gradienten von 0-3 M KCl in 2 mM Tricin pH 8,5
- Umpufferung des Mip-Proteins in 20 mM HEPES pH 7,0

Die Präparation der Mutanten S15A, A37F, Y185A, F202Y erfolgte in gleicher Weise wie das wtMip-Protein von *Legionella pneumophila* (persönliche Mitteilung Beate Rappsilber, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle). Die Expression erfolgte im Stamm DH5 α von *Escherichia coli*. Verwendete Vektoren sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt (Köhler, 2000).

Mutante	Vektor
S15A	pRK 115 (Köhler, 2000)
A37F	pRK 116 (Köhler, 2000)
Y185A	pEWMS 205-A (Wintermeyer, 1994)
F202Y	unbekannt

2.1.2. Präparation von Mip 49 (Knauth, 2001)

- Induktion des Stammes DH5 α von *Escherichia coli* mit dem Vektor pKK1 durch IPTG
- nach der Zentrifugation der Kultur erhaltenes Pellet durch „French-Press“ aufgeschlossen
- Zugabe von 0,1 % Benzonase sowie 1 % Triton X-100 und Ultrazentrifugation
- erster Reinigungsschritt des Überstandes mit DEAE-Säule (Säulenpuffer: 10 mM MES pH 6,0); Elution durch Gradienten von 0-1 M NaCl in 10 mM MES pH 6,0
- vereinigte Fraktionen mit Ammoniumsulfat zu 35 % gesättigt

- erhaltene Lösung auf Fractogel-Propyl-Säule aufgetragen (Säulenpuffer: 10 mM HEPES pH 7,0; 35 % Ammoniumsulfat), Ablösung des Proteins durch Verringerung der Salzkonzentration
- Dialyse gegen 10 mM HEPES pH 7,0
- RP-HPLC mit Hilfe einer ET/250/10 Nukleosil 500-5 C3 bzw. ET/125/4 Nukleosil 500-5 C3 Säule (ursprüngliche Bedingungen: 1 % Acetonitril (0,08 % TFA) in Wasser (0,09 % TFA), Elution des Proteins durch Erhöhung der Acetonitril-Konzentration auf 80 %
- Entsalzung der Proteinlösung durch „Fast-Desalting“ PC 3.2/10-Säule und SMART-System (Äquilibriumspuffer: 10 mM Natriumphosphat pH 7,5)

2.1.3. Präparation des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* (persönliche Mitteilung Beate Rappsilber, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle)

- Induktion des Stamms M15 von *Escherichia coli* mit dem Vektor pBKcp5.1 durch IPTG
- Zentrifugation der Kulturbrühe sowie Aufschluß des erhaltenen Pellets mit Hilfe einer „French-Press“-Prozedur
- Ultrazentrifugation nach Versetzen mit 0,1 % Benzonase und 1 % Triton X-100
- Überstand auf DEAE-Säule aufgetragen (Säulenpuffer: 20 mM MES pH 6,0; 1 mM DTT), Protein durch Gradienten von 0-1 M NaCl in 20 mM MES pH 6,0; 1 mM DTT abgelöst
- Dialyse gegen 20 mM MES pH 6,0
- zweiter Reinigungsschritt mit DEAE-Säule
- Dialyse gegen 20 mM MES pH 6,0
- vereinigte Fraktionen mittels Fractogel-TSK-Blue-Säule weiter gereinigt (Säulenpuffer: 20 mM MES pH 6,0; 1 mM DTT), Eluierung des CpMip durch Gradienten von 0-3 M KCl in 20 mM MES pH 6,0; 1 mM DTT
- erhaltene Proteinlösung zu 35 % mit Ammoniumsulfat gesättigt
- letzter Reinigungsschritt durch Propyl-Säule (Säulenpuffer: 20 mM HEPES pH 6,0
- 1 mM DTT, 35 % Ammoniumsulfat), Isolierung des Proteins durch Verringerung der Ammoniumsulfatkonzentration in einem Gradienten

- Umpufferung des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* in 20 mM HEPES pH 7,0

2.2. Alphabetische Liste der verwendeten Chemikalien

Agarose für DNA/RNA Elektrophorese f. d. Molekularbiologie (MERCK)

Ammoniumformiat > 99 % (NT) Trockensubstanz (Fluka)

Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat, Cacodylat Puffersubstanz für biochemische Zwecke (MERCK)

Citrat-Synthase aus Schweineherzen, EC 2.3.3.1 (Roche); das Enzym wurde in 35 mM HEPES pH 7,8 umgepuffert

Catalase aus Rinderleber; Kristallsuspension, EC 1.11.1.6 (MERCK); umgepuffert in 20 mM HEPES pH 7,0

Coomassie-Färbelösung 0,1 % : 1 PhastGel-Blue-Tablette (Pharmacia) in 80 ml Wasser unter Zugabe von 120 ml Methanol pro analysi (MERCK) gelöst. Weitere Verdünnung im Verhältnis 1:1 mit 20 % Essigsäure 100 % zur Analyse in Wasser.

2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure, CHES Puffersubstanz (Merck)

Desoxycholsäure Natriumsalz (Fluka)

Dimethylsulfoxid, DMSO getrocknet (MERCK)

Dithiothreitol, DTT für biochemische Zwecke (MERCK)

DNA-Molekulargewichtsmarker III (Boehringer)

DNA-Probenpuffer: 200 mM EDTA Titriplex III für die Molekularbiologie (MERCK), 40 % v/v Glycerin wasserfrei, reinst (MERCK), 0,004 % w/v Bromphenolblau (CHEMAPOL)

Entfärbelösung für Proteingele: 30 % v/v Methanol pro analysi (MERCK), 10 % v/v Essigsäure 100 % zur Analyse (MERCK) in Wasser

Ethidiumbromid

FK506 (Fujisawa Pharmaceutical Co.)

Glutardialdehyd, 50 %-Lösung in Wasser zur Synthese (MERCK)

Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel, GAPDH EC 1.2.1.12 (Roche); das Protein wurde in 35 mM HEPES pH 7,8 umgepuffert

Harnstoff für biochemische Zwecke (MERCK)

2-[4-(2 Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure; HEPES Puffersubstanz (MERCK)

L-Isoleucin für biochemische Zwecke (Merck)

Konservierungslösung für Proteingele: 10 % v/v Essigsäure zur Analyse (MERCK), 10 % v/v Glycerin wasserfrei, reinst (MERCK) in Wasser

LMW-Kalibrierungskit für die SDS-Elektrophorese (Amersham Biosciences)

L-Lysin > 99 % (TLC) (SIGMA)

Methioninsulfoxidreduktase A, MsrA, vom Menschen

2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat, MES Puffersubstanz (MERCK)

10x NEB-Puffer 4 (BioLabs), enthält: 50 mM Kaliumacetat, 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Magnesiumacetat, 1mM Dithiothreitol (pH 7,9)

Octyl- β -D-glucoopyranosid, O β DG für biochemische Zwecke (MERCK)

L-Ornithin Monohydrochlorid für biochemische Zwecke (MERCK)

Hochflüssiges Paraffin-Öl (MERCK), getrocknet für 30 Minuten in einer rotierenden Vakuumzentrifuge (Leybold 17702) bei 333 K

pBR-322-Vektor (Boehringer), Konzentration: 0,25 μ g/ μ l

4-(2-Aminoethyl)benzolsulfonylfleurid Hydrochlorid, Pefabloc SC für die Biochemie (MERCK)

Peptid PEAMAKGMQDAMS-NH₂, lyophilisiert (Dr. Greiner, Institut für Biochemie; Friedrich-Schiller-Universität, Jena)

Peptid TEQQM KDVLN KFQKD LMAKR TAEFN KKADE NKVKG EAFLT ENKNK, lyophilisiert (SynPep, USA)

Phosphat-Puffer: 50 mM oder 100 mM Kaliumhydrogenphosphat zur Analyse (MERCK) in Wasser wurden mit 50 mM bzw. 100 mM di-Kalium-dihydrogenphosphat-Trihydrat zur Analyse (MERCK) in H₂O auf ein pH-Wert von 7,8 eingestellt.

Pimelindiimidsäure-dimethylester-dihydrochlorid, DMP (Fluka)

Polyethylenglykol 8000, PEG-8000 (Fluka)

Restriktionsenzym von *Neisseria denitrificans*, NdeI (BioLabs)

SDS-Probenpuffer: 8 M Harnstoff für biochemische Zwecke (MERCK), 2 % w/v Natrium-dodecylsulfat Reag. Ph Eur (MERCK), 10 % v/v Glycerin wasserfrei, reinst (Merck) und 0,004 % w/v Bromphenolblau (CHEMAPOL) in Wasser

L-Threonin für biochemische Zwecke (MERCK)

Tris-Acetat-Puffer: 40 mM Tris für die Molekularbiologie (MERCK), 20 mM Natriumacetat pro analysi (MERCK), pH-Wert eingestellt mit Essigsäure 100 % zur Analyse (MERCK) auf 7,6

L-Valin für biochemische Zwecke (MERCK)

Wasser, deionisiert mit Milli-Qplus 185 (Millipore)

Wasserstoffperoxid, 30 % v/v medizinisch, reinst, stabilisiert (MERCK)

Zinkacetat Dihydrat (Fluka)

Zinkchlorid (Fluka)

2.3. Methoden

2.3.1. Dialyse

Für die Dialyse konnten „Slide-A-Lyzer“-Kassetten von PIERCE, USA (Molekulargewichtsgrenze: 3.500, 7.000 oder 10.000 Da) verwendet werden. Die Proteinlösungen wurden zunächst für 3 bis 6 Stunden und anschließend über Nacht gegen jeweils das mindestens tausendfache Probenvolumen der neuen Pufferlösung dialysiert. Die Temperatur betrug 4°C.

2.3.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Proteinlösungen wurden in ihrem Puffer, der gleichzeitig als Leerwert diente, verdünnt. Die Extinktion mußte bei 280 nm sowie 310 nm in HELLMMA-Präzisionsküvetten aus Quarzglas (SUPRASIL) bestimmt werden. Dabei wurde das Spektrophotometer UV 160A von Shimadzu verwendet. Für das MsrA-Protein konnte die Messung in 20 mM HEPES pH 7,0 durchgeführt werden. Als Leerwert diente in diesem Falle das entsprechende Volumen der filtrierten Proteinlösung in 20 mM HEPES pH 7,0. Die

Extinktionskoeffizienten der Proteine bei 280 nm konnten mit Hilfe des Programmes „ProtParam“ als Bestandteil der Datenbank „Swiss-Prot/TrEMBL“ (Boeckmann *et al.*, 2003; <http://www.expasy.org/sprot/>) ermittelt werden (Gill & Hippel, 1989). Sie waren die Grundlage für die Konzentrationsbestimmungen. Zuvor war der Meßwert für 280 nm noch um die Extinktion bei 310 nm, als Maß für eine unspezifische Trübung der Proteinlösung, korrigiert worden. Alle Cystein-Reste wurden als oxidiert angenommen. Für die Mutanten des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* sowie das N-terminale Fragment Mip 49 konnten die ursprüngliche Konzentrationen der Proteinpräparation (bestimmt an der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle) verwendet werden.

2.3.3. Filtration von Proteinlösungen

Zur Aufkonzentrierung von Proteinen sowie Gewinnung des ursprünglichen Puffers mußten verschiedene Präparationen filtriert werden. Dazu wurden „Ultrafree-CL-PLGC-10,000-NMWL“ (MILLIPORE)-, „Ultrafree-CL-PLGC-5,000-NMWL“ (MILLIPORE)-, „BioMax-5-5,000-NMWL“ (MILLIPORE)- sowie „VIVASPIN-0,5-ml-Concentrator“ (VIVA-SCIENCE)-Filter (10.000 kDa) verwendet. Die notwendige Zentrifugation erfolgte bei 4°C mit 400–2000 rpm für verschiedene Zeiträume. Dabei wurden die Geräte „Labfuge 400 R“ (Rotordurchmesser 15 cm) und „Biofuge pico“ (Rotordurchmesser 11 cm) der Firma Heraeus verwendet.

2.3.4. Bestimmung der Chaperon-ähnlichen Aktivität im Citrat-Synthase Aggregationsassay

2.3.4.1. Experimente mit dem wtMip-Protein von *Legionella pneumophila*

14,5 µl Citrat-Synthase-Lösung (Konzentration des Monomers: 70 µM) in 35 mM HEPES pH 7,8 wurden mit 897 µl 35 mM HEPES pH 7,8 sowie 48 µl des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* (Konzentration des monomeren Proteins: 214 µM) in 20 mM HEPES pH 7,0 versetzt. Anschließend wurde die Probe auf ein Volumen von 1000 µl mit 20 mM HEPES pH 7,0 ergänzt und bei 45°C inkubiert. Zum Vergleich diente ein Ansatz ohne Mip-Protein, allein mit 20 mM HEPES pH 7,0. Als Kontrollen konnten die getrennten Inkubationen von Citrat-Synthase (bei 20°C) bzw. des Mip-

Proteins von *Legionella pneumophila* (bei 45°C) genutzt werden. Für alle vier Ansätze wurde die Extinktion bei 360 nm zu verschiedenen Zeiten gemessen.

2.3.4.2. Untersuchungen an der C-terminalen Mutante F202Y

14,5 µl Citrat-Synthase-Lösung (Konzentration des Monomers: 70 µM) in 35 mM HEPES pH 7,8 wurden mit 897 µl 35 mM HEPES pH 7,8 sowie 23 µl der Mutante F202Y des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* (Konzentration des monomeren Proteins: 447 µM) in 20 mM HEPES pH 7,0 versetzt. Dieser Ansatz mußte, wie bereits für das ursprüngliche Experiment mit dem Wildtyp-Mip-Protein beschrieben, mit 20 mM HEPES pH 7,0 auf ein Volumen von 1000 µl ergänzt werden. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 45°C. Zur Kontrolle diente bei diesem Experiment eine Probe mit Citrat-Synthase und wtMip-Protein (48 µl bei einer Konzentration von 214 µM für das Mip-Monomer). Als Vergleich wurden Ansätze nur mit Citrat-Synthase bzw. der Mutante F202Y mitgeführt. Diese wurden ebenfalls bei 20°C bzw. 45°C inkubiert. Für die Lösungen wurde der zeitliche Verlauf für die Extinktion bei 360 nm bestimmt.

2.3.4.3. Bestimmung der Chaperon-ähnlichen Aktivität für das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae*

Dazu wurden 9,1 µl Citrat-Synthase (Proteinkonzentration: 112 µM) in 35 mM HEPES pH 7,8 zusammen mit 10 µl CpMip (Konzentration: 1254 µM) in 20 mM HEPES pH 7,0 sowie 903 µl 35 mM HEPES pH 7,8 versetzt. Nachfolgend war es nötig, den Ansatz mit 20 mM HEPES pH 7,0 auf ein Volumen von 1000 µl zu ergänzen und bei 45°C zu inkubieren. Zum Vergleich dienten Proben mit Citrat-Synthase in der oben beschriebenen Konzentration sowie den Puffern. Die Inkubation dieser Kontrollen erfolgte bei 20°C sowie 45°C. Von allen drei Ansätzen mußte die Extinktion bei 360 nm als Maß für die Menge der aggregierten Citrat-Synthase zu verschiedenen Zeiten gemessen werden.

2.3.4.4. Konzentrationsabhängigkeit der Chaperon-ähnlichen Aktivität des CpMip

Zu diesem Zweck wurden 9,1 µl Citrat-Synthase (Proteinkonzentration: 112 µM) in 35 mM HEPES pH 7,8 zusammen mit 2 µl bzw. 5 µl CpMip (Konzentration:

1254 μM) in 20 mM HEPES pH 7,0 sowie 903 μl 35 mM HEPES pH 7,8 bei 45°C inkubiert. Zuvor waren die einzelnen Ansätze noch mit 20 mM HEPES pH 7,0 auf ein Volumen von 1000 μl gebracht worden. Als Kontrolle diente in diesem Experiment eine Probe ohne CpMip; allein mit Citrat-Synthase in der oben eingesetzten Konzentration sowie den entsprechenden Puffern. Diese wurde ebenfalls bei 45°C gehalten. Die Werte für die Extinktion bei 360 nm wurden graphisch dargestellt.

2.3.4.5. Versuche mit hitzeinkubiertem Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae*

15 μl *Chlamydia*-Mip-Protein-Lösung (Konzentration: 1 mM in 20 mM HEPES pH 7,0) wurden zunächst zusammen mit 120 μl 20 mM HEPES pH 7,0 für 10 Minuten auf 100°C erhitzt. Bei der nachfolgenden Zentrifugation der Lösung für 10 Minuten bei 13.000 rpm (Durchmesser des Rotors: 11 cm, „Biofuge pico“-Zentrifuge von Heraeus) sollten möglicherweise entstandene große Proteinaggregate entfernt werden. Diese hätten die notwendigen Trübungsmessungen beeinträchtigen können.

Schließlich wurden 90 μl der so erhaltenen Proteinlösung zusammen mit 9,1 μl Citrat-Synthase (112 μM in 35 mM HEPES pH 7,8) sowie 903 μl 35 mM HEPES pH 7,8 inkubiert. Zur Kontrolle diente ein entsprechender Ansatz, bei dem das *Chlamydia*-Mip-Protein zuvor für 10 Minuten bei 20°C gehalten worden war. Außerdem wurde eine Probe mit 9,1 μl Citrat-Synthase (112 μM in 35 mM HEPES pH 7,8) und 903 μl 35 mM HEPES pH 7,8 sowie 90 μl 20 mM HEPES pH 7,0 mitgeführt. Für alle drei Proben wurde bei 45°C die Extinktion (Wellenlänge: 360 nm) der Lösung zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

2.3.4.6. Experimente zum Einfluß von CpMip auf bestehende Proteinaggregate

Im einzelnen wurden 13 μl Citrat-Synthase (Proteinkonzentration: 76 μM) in 35 mM HEPES pH 7,8 zusammen mit 898 μl 35 mM HEPES pH 7,8 sowie 67,5 μl 20 mM HEPES pH 7,0 für 70 Minuten bei 45°C inkubiert. Während dieses Zeitraumes wurde die Extinktion der Lösung bei 360 nm bereits fortlaufend bestimmt. Danach erfolgte die Zugabe von 22,5 μl auf 45°C vorgewärmtes CpMip-Protein (Konzentration: 446 μM) in 20 mM HEPES pH 7,0. In zwei Kontrollansätzen wurde Citrat-Synthase zusammen mit

den bereits beschriebenen Pufferlösungen bei 20°C und 45°C gehalten. Danach erfolgte die Zugabe von 22,5 µl 20 mM HEPES pH 7,0 (45°C). Schließlich mußten weitere Bestimmungen der Extinktion bei 360 nm für die einzelnen Lösungen durchgeführt werden.

2.3.4.7. Untersuchung von FK506

Dazu wurden 13 µl Citrat-Synthase (Proteinkonzentration: 76 µM) in 35 mM HEPES pH 7,8 zusammen mit 10 µl *CpMip*-Lösung (Konzentration des Proteins: 446 µM, Pufferbedingungen 20 mM HEPES pH 7,0), 798 µl 35 mM HEPES pH 7,8 und 100 µl FK506 in DMSO (440 µM) bei 45°C inkubiert. Diese Probe war zuvor mit 20 mM HEPES pH 7,0 auf ein Volumen von 1000 µl gebracht worden. Ein weiterer Ansatz unterschied sich allein durch das Fehlen von FK506. Bei diesem dienten allein 100 µl DMSO zu Vergleichszwecken. Daneben wurden Kontrollproben ohne das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* bei 45°C bzw. 20°C untersucht. Sie enthielten nur 13 µl Citrat-Synthase (Proteinkonzentration: 76 µM) in 35 mM HEPES pH 7,8 und 798 µl 35 mM HEPES pH 7,8 sowie 100 µl DMSO. Natürlich mußte das Volumen dieser Ansätze ebenfalls mit 20 mM HEPES pH 7,0 auf 1000 µl ergänzt werden. Nachfolgend wurde die Extinktion der Lösungen bei 360 nm zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

2.3.4.8. Inhibition der Chaperon-ähnlichen Aktivität durch DTT

13 µl Citrat-Synthase (Konzentration des Monomers: 76 µM) in 35 mM HEPES pH 7,8 wurden mit 22,5 µl *CpMip* (Proteinkonzentration: 446 µM; Pufferbedingungen 20 mM HEPES pH 7,8), 10 µl 500 mM DTT in 20 mM HEPES pH 7,0 sowie 898 µl 35 mM HEPES pH 7,8 versetzt. Danach mußte der Ansatz mit 20 mM HEPES pH 7,0 auf ein Volumen von 1000 µl ergänzt und bei 45°C inkubiert werden. Im Vergleichsansatz wurden die 10 µl 500 mM DTT in 20 mM HEPES pH 7,0 allein durch den Puffer ersetzt. Außerdem konnte eine Kontrolle mit 13 µl Citrat-Synthase (Konzentration: 76 µM) in 35 mM HEPES pH 7,8 und 898 µl 35 mM HEPES pH 7,8; ergänzt auf ein Volumen von 1000 µl mit 20 mM HEPES pH 7,0 untersucht werden. Dieser Ansatz enthielt ebenfalls 5 mM DTT. Auch für diese Probe ohne Chaperon-ähnliche Aktivität wurde die Extinktion für 360 nm bei 45°C bestimmt.

2.3.4.9. Kontrollexperiment zum Ausschluß der Aggregation von Citrat-Synthase oder CpMip durch DTT

Je 13 µl Citrat-Synthase (Konzentration: 76 µM) in 35 mM HEPES pH 7,8; 898 µl 35 mM HEPES pH 7,8; ergänzt mit 20 mM HEPES pH 7,0 auf 1000 µl, wurden bei 20°C bzw. 45°C inkubiert. Daneben mußte ein Ansatz mit 13 µl Citrat-Synthase (Protein-konzentration: 76 µM) in 35 mM HEPES pH 7,8 und 10 µl 500 mM DTT (in 20 mM HEPES pH 7,0) bei 45°C gehalten werden. Auch diese Probe war zuvor mit 20 mM HEPES pH 7,0 auf ein Volumen von 1000 µl gebracht worden. Außerdem wurden 22,5 µl CpMip (Konzentration: 446 µM) in 20 mM HEPES pH 7,0 zusammen mit 10 µl 500 mM DTT in 20 mM HEPES pH 7,0 und 911 µl 35 mM HEPES pH 7,0 mit 20 mM HEPES pH 7,0 auf 1000 µl ergänzt. Dieser Ansatz mußte bei 45°C inkubiert werden. Schließlich wurde der zeitliche Verlauf der Extinktion bei 360 nm aller vier Lösungen bestimmt.

Die Bestimmung der Trübung in den Ansätzen des Aggregationsassays wurde in Einmal-Küvetten aus Polystyrol (ROTH) sowie „Semi-Micro“-Küvetten von BIO-RAD durchgeführt. Um Verdunstungsverlusten vorzubeugen, mußten diese mit Parafilm verschlossen werden. Die Extinktionsmessungen bei 360 nm erfolgten mit Hilfe eines Spektrophotometers UV 160A von Shimadzu. Die Inkubation der Proben bei 37°C wurde in einem Brutschrank der Marke Jouan durchgeführt.

2.3.5. Experimente zur Chaperon-ähnlichen Aktivität des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* im NdeI-Testsystem

2.3.5.1. Bestätigung der Ergebnisse des Citrat-Synthase-Aggregationsassays

Zunächst wurden 10 U NdeI (0,5 µl) zusammen mit 1 µl *Chlamydia*-Mip-Protein-Lösung (1,05 mM in 20 mM HEPES pH 7,0 verdünnt 1:10 mit 20 mM HEPES pH 7,0) und 6,5 µl Wasser für eine Stunde bei 50°C inkubiert. Zum Vergleich diente eine Probe mit 10 U NdeI (0,5 µl), 1 µl *Legionella*-Mip-Protein (320 µM in 20 mM HEPES pH 7,0 verdünnt 1:2 mit 20 mM HEPES pH 7,0) sowie 6,5 µl Wasser. Gleichzeitig konnte eine Kontrolle mitgeführt werden, bei der die *Chlamydia*-Protein-Lösung durch den 1:10 mit 20 mM HEPES pH 7,0 verdünnten Puffer der Proteinpräparation ersetzt worden war.

Daneben wurde in einer Probe NdeI auch mit 1 µl 20 mM HEPES pH 7,0 sowie 6,5 µl Wasser inkubiert. Ein solcher Ansatz diente auch als „Positivkontrolle“. In diesem Falle war das Restriktionsenzym jedoch für eine Stunde auf Eis gehalten worden. In der „Negativkontrolle“ wurde die NdeI-Lösung durch Wasser ersetzt und mit 6,5 µl Wasser sowie 1 µl 20 mM HEPES pH 7,0 ergänzt.

Nachfolgend wurden alle Proben mit 1 µl 10x NEB-Puffer 4 (Restriktionspuffer für NdeI) sowie 1 µl pBR-322-Vektor (0,25 µg/ml) ergänzt. Nach der einstündigen Inkubation bei 37°C sowie Zugabe von 2 µl DNA-Probenpuffer konnten die Ansätze elektrophoretisch aufgetrennt und die dabei entstandenen Banden durch Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.3.5.2. Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen NdeI und CpMip

10 U NdeI (0,5 µl) wurden zusammen mit 1 µl *Chlamydia*-Mip-Protein-Lösung (1,05 mM in 20 mM HEPES pH 7,0 verdünnt 1:10 mit 20 mM HEPES pH 7,0) und 1 µl GAPDH (Proteinkonzentration: 188 µM) in 35 mM HEPES pH 7,8 versetzt. Anschließend wurde der Ansatz mit 4,5 µl Wasser ergänzt und bei 50°C für eine Stunde inkubiert. Als Vergleich diente eine Probe, bei der die GAPDH-Proteinlösung durch 1 µl 35 mM HEPES pH 7,8 ersetzt worden war. Außerdem wurden 10 U NdeI (0,5 µl) zusammen mit 1 µl 20 mM HEPES pH 7,0 und 35 mM HEPES pH 7,8 sowie 4,5 µl Wasser für eine Stunde bei 50°C bzw. auf Eis inkubiert. In einem letzten Ansatz sollten 0,5 µl Wasser mit 1 µl 20 mM HEPES pH 7,0; 1 µl 35 mM HEPES pH 7,8 und 4,5 µl Wasser als „Negativkontrolle“ verwendet werden. Diese wurde ebenfalls für eine Stunde auf Eis gehalten. Danach mußten der Vergleichsansatz sowie die verschiedenen Kontrollen mit 1 µl GAPDH (Proteinkonzentration: 188 µM) in 35 mM HEPES pH 7,8 ergänzt werden. Die Probe mit GAPDH während der Inkubation bei 50°C wurde dagegen nur mit 1 µl 35 mM HEPES pH 7,0 versetzt.

Schließlich erfolgte die Zugabe von 1 µl 10x NEB-Puffer 4 sowie 1 µl pBR 322 (0,25 µg/ml). Während der sich anschließenden einstündigen Inkubation bei 37°C wurde der (noch) vorhandenen nukleolytischen Aktivität erlaubt, den zugesetzten Vektor zu schneiden. Nach Zugabe von 2 µl DNA-Probenpuffer erfolgte die Auftrennung der

Proben im Agarose-Gel und abschließend die Detektion einzelner Banden durch den Nachweis von Ethidiumbromid im UV-Licht.

Für die Inkubation bei 50°C und 37°C konnte ein Thermomixer 5437 (Eppendorf) verwendet werden. Die Auftrennung von Plasmid-DNA erfolgte in einem 1 %-Agarose-Gel. Dabei wurde Tris-Acetat-Puffer verwendet. Die Proben konnten unter Verwendung einer „Mini-Sub-DNA-Cell“ (BIO-RAD) analysiert werden. Die verwendete Spannung betrug 80 V, die Separationsdauer 1 Stunde. Die Gele wurden in einer wäßrigen Ethidiumbromid-Lösung für 15 Minuten gefärbt. Anschließend konnte ein Überschuß an der interkalierenden Substanz durch Spülen in reinem Wasser (5-10 Minuten) entfernt werden. Für die Dokumentation der Ergebnisse wurde eine „EAGLE-EYE“-Bildintegrations- und Speichereinheit (STRATAGENE) verwendet. Als Vergleich wurden 2 µl DNA-Molekulargewichtsmarker in 8 µl Wasser mitgeführt.

2.3.6. Gel-Elektrophoretische Untersuchungen an Mip-Proteinen

2.3.6.1. Experimente mit dem Mip-Protein von *Legionella pneumophila*

2.3.6.1.1. Einfluß von oxidierenden Bedingungen auf das Laufverhalten des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* im nativen Gel

Je 4 µl der folgenden Ansätze wurden in einem nativen 7,5 %-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde Coomassie-gefärbt.

Probe 1:

- 6 µl Mip-Protein von *Legionella pneumophila* in 20 mM HEPES pH 7,0 (Proteinkonzentration: 3 mg/ml) + 1 µl H₂O
- Inkubation für 6 Stunden bei 37°C
- Zugabe von 1 µl H₂O sowie 1 µl hMsrA-Puffer
- Inkubation für 30 Minuten bei 20°C

Probe 2:

- 6 µl Mip-Protein von *Legionella pneumophila* in 20 mM HEPES pH 7,0 (Proteinkonzentration: 3 mg/ml) + 1 µl H₂O₂-Lösung (30 % v/v verdünnt 1:20 mit H₂O)

- Inkubation für 6 Stunden bei 37°C
- Zugabe von 1 µl H₂O sowie 1 µl hMsrA-Puffer
- Inkubation für 30 Minuten bei 20°C

Probe 3:

- 6 µl Mip-Protein von *Legionella pneumophila* in 20 mM HEPES pH 7,0 (Protein-konzentration: 3 mg/ml) + 1 µl H₂O₂-Lösung (30 % v/v verdünnt 1:20 mit H₂O)
- Inkubation für 6 Stunden bei 37°C
- Zugabe von 1 µl 2 M DTT in H₂O sowie 1 µl hMsrA-Puffer
- Inkubation für 30 Minuten bei 20°C

Probe 4:

- 6 µl Mip-Protein von *Legionella pneumophila* in 20 mM HEPES pH 7,0 (Protein-konzentration: 3 mg/ml) + 1 µl H₂O₂-Lösung (30 % v/v verdünnt 1:20 mit H₂O)
- Inkubation für 6 Stunden bei 37°C
- Zugabe von 1 µl 2 M DTT in H₂O sowie 1 µl hMsrA (13,4 mg/ml)
- Inkubation für 30 Minuten bei 20°C

Probe 5:

- 6 µl 20 mM HEPES pH 7,0 mit 1 µl H₂O₂-Lösung (30 % v/v verdünnt 1:20 mit H₂O) und 1 µl 2 M DTT in H₂O sowie 1 µl hMsrA (13,4 mg/ml)

2.3.6.1.2. Experimente mit dem N-terminalen Fragment Mip 49

Für Untersuchungen am N-terminalen Fragment Mip 49 wurden je 4 µl der folgenden Ansätze in einem „High-Density“-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt.

Probe 1:

- 6 µl Mip 49 (20 µM) + 1 µl H₂O inkubiert für 6 Stunden bei 37°C

Probe 2:

- 6 µl Mip 49 (20 µM) + 1 µl H₂O₂-Lösung (30 % v/v verdünnt 1:20 mit H₂O) inkubiert für 6 Stunden bei 37°C

Probe 3:

- 6 µl Mip 49 (20 µM) + 1 µl H₂O

Anschließend wurde das Proteinfragment durch das Einwirken einer 12,5 % wäßrigen Glutardialdehyd-Lösung für 10 Minuten bei 20°C fixiert. Danach wurde das Gel Coomassie-gefärbt

2.3.6.1.3. Denaturierende Gel-Elektrophorese des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid und „Crosslinking“ durch DMP

Je 4 µl der folgenden Ansätze wurden in einem 12,5 %-Polyacrylamid-Gel unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Nachfolgend mußte eine Coomassie-Färbung durchgeführt werden.

Probe 1:

- 5 µl Mip-Protein von *Legionella pneumophila* in 20 mM HEPES pH 7,0 (Protein-konzentration: 7,7 mg/ml) + 1 µl H₂O₂-Lösung (30 % v/v verdünnt 1:20 mit H₂O) inkubiert für 17 Stunden bei 37°C
- Zugabe von 5 µl 50 mM DMP in 100 mM CHES pH 9,2
- Inkubation für 1 Stunde bei 20°C

Probe 2:

- 5 µl Mip-Protein von *Legionella pneumophila* in 20 mM HEPES pH 7,0 (Protein-konzentration: 7,7 mg/ml) + 1 µl H₂O inkubiert für 17 Stunden bei 37°C
- Zugabe von 5 µl 50 mM DMP in 100 mM CHES pH 9,2
- Inkubation für 1 Stunde bei 20°C

Beide Ansätze wurden mit 5 µl SDS-Probenpuffer ergänzt.

2.3.6.1.4. Kontrollexperiment zum „Crosslinking“ mit der C-terminalen Mutante Y185A

Um den Nachweis zu führen, daß Wasserstoffperoxid das „Crosslinking“ des *LpMip*-Proteins nicht behindert, wurden die folgenden Kontrollen ausgeführt:

Probe 1:

- 2 µl der C-terminalen Mutante Y185A in 20 mM HEPES pH 7,0 (Proteinkonzentration: 9,4 mg/ml) + 1 µl H₂O₂-Lösung (30 % v/v verdünnt 1:20 mit Wasser)
- Inkubation für 24 Stunden bei 37°C
- Zugabe von 1 µl H₂O sowie 4 µl 50 mM DMP in 100 mM CHES pH 9,2
- Inkubation für 1 Stunde bei 20°C

Probe 2:

- 2 µl der C-terminalen Mutante Y185A in 20 mM HEPES pH 7,0 (Proteinkonzentration: 9,4 mg/ml) + 1 µl H₂O
- Inkubation für 24 Stunden bei 37°C
- Zugabe von 1 µl H₂O₂-Lösung (30 % v/v verdünnt 1:20 mit Wasser) sowie 4 µl
- 50 mM DMP in 100 mM CHES pH 9,2
- Inkubation für 1 Stunde bei 20°C

Beide Proben wurden mit 2 µl SDS-Probenpuffer (ohne Mercaptoethanol) ergänzt und je 4 µl der so erhaltenen Ansätze unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Nach der Elektrophorese konnte das 12,5 %-Polyacrylamid-Gel Coomassie-gefärbt werden.

2.3.6.1.5. SDS-Gel-Elektrophorese des oxidierten *LpMip*-Proteins nach Inkubation mit MsrA und „Crosslinking“

In diesem Versuch wurden verschiedene Proben in einem 12,5 %-SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch untersucht. Dazu mußten zunächst 20 µl Mip-Protein von *Legionella pneumophila* in 20 mM HEPES pH 7,0 (Proteinkonzentration: 12,2 mg/ml) mit 2 µl 30 % v/v H₂O₂ für 17 Stunden bei 37°C oxidiert werden. Nachfolgend konnte

diese Probe mit 1 µl Catalase (Proteinkonzentration: 30,3 mg/ml) in 20 mM HEPES pH 7,0 bei 20°C für 10 Minuten inkubiert werden. Schließlich erfolgte eine Aufteilung des Ansatzes:

Probe 1:

- 5 µl oxidiertes Mip-Protein + 1 µl hMsrA (13,4 mg/ml) + 2 µl 2 M DTT in H₂O inkubiert für 30 Minuten bei 20°C
- Zugabe von 20 µl 50 mM DMP in 100 mM CHES pH 9,2
- erneute Inkubation für 1 Stunde bei 20°C

Probe 2:

- 5 µl oxidiertes Mip-Protein + 1 µl hMsrA (13,4 mg/ml) + 2 µl H₂O inkubiert für 30 Minuten bei 20°C
- Zugabe von 20 µl 50 mM DMP in 100 mM CHES pH 9,2
- erneute Inkubation für 1 Stunde bei 20°C

Beide Proben mußten abschließend mit 10 µl SDS-Probenpuffer (ohne Mercaptoethanol) versetzt werden. Je 4 µl der Ansätze wurden aufgetrennt. Außerdem sollten die entstandenen Proteinbanden durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht werden.

2.3.6.2. Untersuchungen am Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae*

2.3.6.2.1. Einfluß reduzierender Bedingungen auf das Laufverhalten des CpMip im nativen Gel

Je 3 µl des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* in 20 mM HEPES pH 7,0 (Proteinkonzentration: 11,9 mg/ml) wurden mit 3 µl 5 bzw. 10 mM DTT in 20 mM HEPES pH 7,0 für 30 Minuten bei 20°C inkubiert. Zum Vergleich ein Ansatz mit dem Mip-Protein und 20 mM HEPES pH 7,0. Von diesen Proben wurden je 4 µl auf ein natives 12,5 %-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und im elektrischen Feld aufgetrennt. Abschließend wurde das Gel Coomassie-gefärbt.

2.3.6.2.2. Denaturierende Gel-Elektrophorese des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* unter reduzierenden Bedingungen

5 µl des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* in 20 mM HEPES pH 7,0 (Proteinkonzentration: 11,9 mg/ml) wurden mit 5 µl 5 mM DTT in 20 mM HEPES pH 7,0 für 10 min bei 20°C inkubiert. Gleichzeitig mußte ein entsprechender Ansatz des Proteins ohne Dithiothreitol mitgeführt werden. Beide Proben wurden mit 10 µl SDS-Probenpuffer (ohne Mercaptoethanol) versetzt. Nachfolgend konnten je 4 µl des denaturierten Proteins elektrophoretisch aufgetrennt werden. Das 12,5 %-Polyacrylamid-Gel wurde Coomassie-gefärbt.

Die native und denaturierende Gel-Elektrophorese (nach Laemmli, 1970) von Proteinen erfolgte mit vorgefertigten „Phast-Gel“-Polyacrylamid-Gelen der Firma Amersham Biosciences sowie den zugehörigen Puffer-„Strips“. Die Proben wurden auf einen Probenkamm mit einer Aufnahmekapazität von 6 x 4 µl aufgetragen. Für die Gel-Elektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wurde 4 µl eines Molekulargewichtsmarker für Proteine mitgeführt. Anschließend konnte das „Pharmacia-LKB-PhastSystem“ zur halbautomatischen elektrophoretischen Trennung der Ansätze sowie Coomassie-Färbung der Gele verwendet werden. Bei der nativen Elektrophorese des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* wurde das Gel nach der Auftragung der Proben um 180° gedreht. Der isoelektrische Punkt dieses Moleküls liegt über dem pH-Wert des Trennungsmediums. Daher wandert das Protein unter diesen Bedingungen von der Kathode zur Anode.

2.3.7. CD-spektroskopische Messungen

Für diese Untersuchungen konnte ein Spektropolarimeter J-710 (JASCO) genutzt werden. Die verwendeten Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm (JASCO und HELLMMA) wurden von einem Stickstoffstrom umspült. Die Parameter der Messungen sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt:

Bandbreite: 1 nm
Antwortzeit: 8 Sekunden
Empfindlichkeit: Standard
Meßbereich: 260 nm –190 nm
Daten-„Pitch“: 1 nm
Meßgeschwindigkeit: 10 nm / min
Akkumulationen: 3

Wenn nicht anders erwähnt, konnten die Spektren bei Raumtemperatur aufgenommen werden.

Bei den temperaturabhängigen Messungen waren zunächst 500 µl *LpMip*-Protein-Lösung (Proteinkonzentration 1,9 mg/ml; Puffer: 20 mM HEPES pH 7,0) mit 500 µl 100 mM Phosphat-Puffer pH 7,8 ergänzt und nachfolgend gegen 100 mM Phosphat-Puffer dialysiert worden. Die anschließende Konzentrationsbestimmung ergab einen Wert von 0,9 mg/ml Protein in Phosphat-Puffer. Nachdem dieser Ansatz nochmals 1:3 mit Phosphat-Puffer pH 7,8 verdünnt worden war, konnten CD-Spektren des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* bei 20°C, 30°C, 40°C, 50°C sowie 60°C aufgenommen werden. Die Probe wurde für 10 Minuten gegen die entsprechende Temperatur equilibriert.

Für den Vergleich des oxidierten und „nativen“ Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* wurden 50 µl Mip-Protein von *Legionella pneumophila* (Proteinkonzentration 2,1 mg/ml) mit 5 µl 30 % v/v H₂O₂ in H₂O für 17 Stunden bei 20°C inkubiert. Die hohe Wasserstoffperoxid-Konzentration sollte für eine möglichst vollständige Oxidation des Mip-Proteins sorgen. Zum Vergleich diente ein Ansatz des Mip-Proteins, der mit Wasser versetzt worden war. Zur Kontrolle wurden nach der Inkubation je 4 µl beider Proben auf ein natives 7,5 %-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Die verbleibenden Proteinlösungen wurden jeweils mit 200 µl 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,8 verdünnt und gegen 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,8 dialysiert. Damit sollte insbesondere vorhandenes Wasserstoffperoxid entfernt werden. Nachdem beide Ansätze

auf das Volumen der Küvette für die CD-Messungen ergänzt worden waren, mußten die Proteinkonzentrationen der zu untersuchenden Proben bestimmt werden. Sie betrug für das mit Wasserstoffperoxid inkubierte Mip 0,2 mg/ml. Für den Kontrollansatz wurde eine Proteinkonzentration von 0,3 mg/ml gefunden. Von den nun in Phosphat umgepufferten Proben wurden CD-Spektren aufgenommen.

2.3.8. Kristallisation

Bei der Kristallisation im „hängenden Tropfen“ wurden VDX-Kristallisationsplatten (HAMPTON RESEARCH) genutzt. Die Inkubation der Ansätze erfolgte in Inkubationsschränken der Firma EHRET bzw. einem bei 20°C klimatisiertem Raum. Bei dieser Methode wird das Protein zusammen mit einem Fällungsmittel (z.B. Ammoniumsulfat oder Polyethylenglykol) auf der Unterseite eines silikonisierten Deckgläschens (HAMPTON RESEARCH) luftdicht über einer Reservoirolösung inkubiert. Diese enthält das Fällungsmittel in einer wesentlichen höheren Konzentration. Der Abschluß von der Umgebung wird durch die Verwendung eines Silikongels („Dow Corning high vacuum grease“ von DOW CORNING oder „bayer silicone“ von BAYER) gewährleistet. Die gerichtete Diffusion von Lösungsmittelmolekülen vom Kristallisationstropfen in die Reservoirolösung führt über einen längeren Zeitraum zu einer kontinuierlichen Erhöhung der Fällungsmittelkonzentration. Unter günstigen Umständen kommt es in Folge zur Nukleation und Kristallisation der biologischen Makromoleküle.

2.3.9. Diffraktionsdatensammlung

Für Untersuchungen der Kristalle der N-terminalen Mutanten S15A und A37F sowie der Mutante Y185A (Mutation in der C-terminalen Domäne des Mip-Proteins) konnte ein Röntgengenerator mit rotierender Anode (Arbeitsspannung: 40 kV, Stromstärke von 100 mA) (ENRAF NONIUS FR591) verwendet werden. Die dabei genutzte CuK α -Strahlung hatte eine Wellenlänge von 1,54 Å. Außerdem wurde zur Detektion eine Bildplatte (marresearch) verwendet. Für das Beugungsexperiment an einem Kristall der C-terminalen Mutante F202Y konnte die Strahlungsquelle BM14 am ESRF in Grenoble genutzt werden. Dieser Meßplatz war mit einer CCD-Kamera (marresearch) ausgestattet. Die verwendete Synchrotronstrahlung hatte eine Wellenlänge von 0,98 Å und zeichnet sich allgemein durch eine hohe Intensität aus. Sie entsteht nicht durch die Anregung

unterer Elektronenschalen, sondern die Beschleunigung von Elektronen auf einer Kreisbahn. Dies ermöglicht auch die Nutzung elektromagnetischer Strahlung eines breiten Frequenzspektrums an diesem Teilchenbeschleuniger (Helliwell, 1998).

Während der Datensammlung wurden die Kristalle im Stickstoffstrom bei 100 K gehalten („Cryo-Jet-Streamer“ von OXFORD CRYOSYSTEMS). Zuvor waren sie in getrocknetem Paraffin-Öl von oberflächlich anhaftendem Kristallisationspuffer befreit worden. (Riboldi-Tunnicliffe & Hilgenfeld, 1999). Dabei wurden vorgefertigte „Cryo-Loops“ von HAMPTON RESEARCH verwendet. Außerdem konnte durch wiederholtes Entfernen aus dem Stickstoffstrom sowie vorsichtiges Eintauchen in getrocknetes Paraffin-Öl die Kristallqualität in allen Fällen deutlich verbessert werden („Reannealing“) (Panjkar *et al.*, 2000). Der Kristall für die Mutante S15A wurde in einem abschließenden Schritt sogar für 5 Minuten im Öl belassen. Im Hause (rotierende Anode) mußten Mip-Kristalle 20 Minuten bis 1 Stunde pro Bild der Röntgenstrahlung ausgesetzt werden. Am Synchrotron verringerte sich die Expositionszeit auf Sekunden. Der Kristall wurde bei jeder Aufnahme um einen Winkel von 1 Grad gedreht.

2.4. Theoretische Grundlagen ausgewählter experimenteller Untersuchungen

2.4.1. Erläuterungen zur CD-Spektroskopie

Bei der CD-Spektroskopie, als Teilgebiet der optischen Spektroskopie, wird der Effekt des Circular dichroismus genutzt: Rechts und links zirkular polarisiertes Licht einer bestimmten Wellenlänge kann durch eine optische aktive Substanz in unterschiedlichem Maße absorbiert werden (Holtzhauer, 1996). Absorbiert eine Probe im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums, so erscheint sie folglich in zwei Farben, je nachdem ob sie von rechts oder links zirkular polarisiertem Licht durchstrahlt wird.

Optisch aktive Substanzen besitzen unsymmetrische Zentren bzw. die Chiralität wird ihnen durch die Umgebung aufgeprägt. In einem Protein stellt die Peptidbindung ein mögliches Chromophor dar. Diese ist durch ungleiche Substituenten in seiner Symmetrie verzerrt (Ausnahme: Glycin) und wird somit chiral (Holtzhauer, 1996). Außerdem können verschiedene Peptidbindungen über die Sekundärstruktur miteinander in Wechselwirkungen treten. Diese besitzt ebenfalls eine „Händigkeit“ (Yang *et al.*, 1986). Somit beeinflusst die Sekundärstruktur den Circular dichroismus für die verschiedenen

Übergangszustände der Peptidbindung. CD-Spektren werden zumeist zwischen 190 nm und 260 nm aufgenommen. In einem CD-Spektrum wird die Elliptizität gegen die Wellenlänge aufgetragen. Die Elliptizität (Θ) kann wie folgt berechnet werden:

$$\Theta = \text{konst } 1000 \Delta A \text{ [mdeg]}$$

$$\text{konst} = \ln 10 \cdot 180 / 4\pi$$

dabei ist ΔA die Differenz der Absorptionen für links und rechts zirkular polarisiertes Licht ($\Delta A = A_L - A_R$) (Holtzhauer, 1996).

Um die Abhängigkeit des CD-Spektrums von der Sekundärstruktur zu untersuchen, können Modellpeptide betrachtet werden, die sich unter verschiedenen Bedingungen vollständig in eine rechtsgängige α -Helix, das β -Faltblatt bzw. ein Zufallsknäuel umwandeln. Poly-Lysin bildet bei neutralem pH-Wert ein Zufallsknäuel, unter basischen Bedingungen (pH 10,8) eine α -Helix. Nach Erwärmung für 15 min auf 52°C und anschließender Abkühlung auf 25°C unter basischen Bedingungen (pH 11,1) liegt das Polypeptid als β -Faltblatt vor. Die rechtsgängige α -Helix zeigt in diesem Wellenlängenbereich zwei Minima bei 208-210 nm und 222 nm sowie ein ausgeprägtes Maximum bei einer Wellenlänge von 191-193 nm. Das β -Faltblatt ist durch ein breites Minimum bei 216-218 nm sowie ein Maximum zwischen 195 nm und 200 nm charakterisiert. Für das Zufallsknäuel konnte ein typisches Minimum bei 200 nm sowie eine schwache positive „Schulter“ um 220 nm bestimmt werden (Yang *et al.*, 1986).

Im einfachsten Falle kann man sich das CD-Spektrum eines Proteins als Linearkombination der Grenzspektren reiner Sekundärstrukturen vorstellen. Dabei müssen die notwendigen Faktoren aus dem Anteil der α -Helix, dem β -Faltblatt und dem Zufallsknäuel an der Gesamtstruktur ermittelt werden. Das Spektrum der „ β -Turns“ zeigt zwei Maxima bei 205 bzw. 225 nm (Chang *et al.*, 1978). Oft wird jedoch der Einfluß von „ β -Turns“ sowie der wesentlich selteneren „ γ -Turns“ auf das CD-Spektrum eines Proteins nicht berücksichtigt (Chang *et al.*, 1978; Yang *et al.*, 1986). Außerdem ist es möglich, CD-Spektren von Proteinen zu nutzen, deren atomare Struktur bereits bestimmt wurde. Damit ist auch der Anteil der verschiedenen Sekundärstrukturen im Molekül bekannt. Mit diesem Wissen und der Annahme, daß das CD-Spektrum eines Proteins als

Linearkombination der Spektren reiner Sekundärstrukturen betrachtet werden kann, ist eine Berechnung der reinen Grenzspektren möglich (Chang *et al.*, 1978). Berechnete Referenzspektren der α -Helix, des β -Faltblatts und des Zufallsknäuels sowie von „ β -Turns“ sind in der folgenden Abbildung zusammengefaßt.

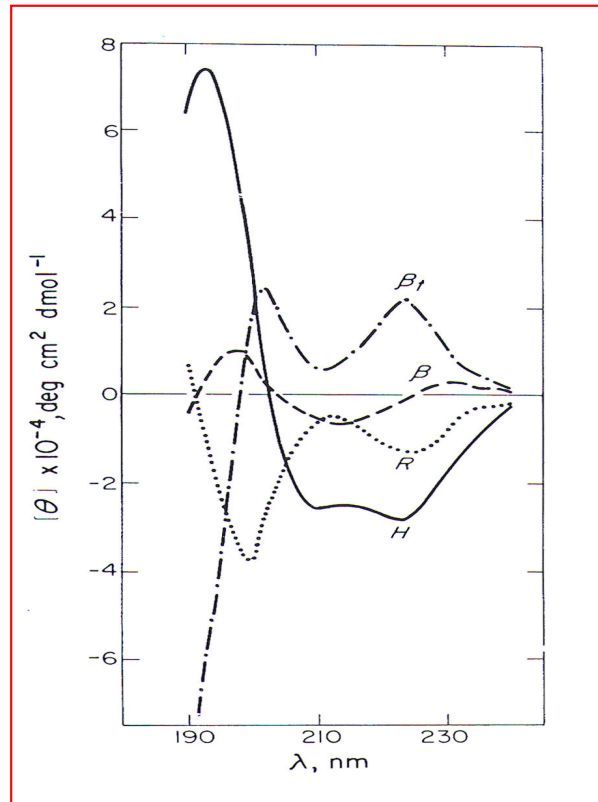


Abbildung 2.1.: Referenzspektren verschiedener Sekundärstrukturen eines Proteins (*H*: α -Helix, *β*: β -Faltblatt, *R*: Zufallsknäuel, *β_T*: „ β -Turns“). Für die Berechnung der Spektren wurden 10 (α -Helix) bzw. 20 Proteine (β -Faltblatt, Zufallsknäuel und „ β -Turns“) genutzt (Chang *et. al.*, 1978).

2.4.2. Prinzipien der Röntgenstrukturanalyse

In der Röntgenstrukturanalyse von Molekülen macht man sich die Beugung von Röntgenstrahlung an Materie zu Nutze. Anschaulich kann man sich diesen Vorgang als Anregung der Elektronenhülle von Atomen mittels kurzwelliger elektromagnetischer Strahlung und die unmittelbare ungerichtete Emission von Röntgenquanten vorstellen. Dabei ist nach dem Huygenschen Prinzip jeder Punkt der Elektronenwolke Ausgangspunkt für eine neue kugelförmige Elementarwelle (Thier, 1968). Effektiv interferieren jedoch nur die Quanten, deren elektrische bzw. magnetische Vektoren in die gleiche Richtung weisen. Dies geschieht für alle dazu im Rechten Winkel angeordneten

Ebenen eines Moleküls. Die Wellenlänge der genutzten Röntgenstrahlung liegt dabei in der Größenordnung des Abstandes von Atomen. Damit wird die räumliche (Elektronenhüllen)Struktur in der in jede Richtung ausgesandte Gesamtröntgenstrahlung „verschlüsselt“. Mit Hilfe von um das Molekül angeordneten Röntgenmikroskopen sollte sich ein dreidimensionales Abbild des Moleküls (oder besser dessen Elektronendichteverteilung) bestimmen lassen.

Leider stößt die Herstellung von Linsen und Spiegeln für Röntgenstrahlung auf große technische Schwierigkeiten. Außerdem ist die Intensität der in alle Richtungen gestreuten elektromagnetischen Strahlung bei der Nutzung von konventionellen Röntgenquellen nur sehr gering. Für eine erfolgreiche Messung muß die Anregung mit großer Intensität geschehen. Dies könnte z.B. durch die Verwendung von Röntgenlasern erreicht werden. Daneben ist die Beugung an einer großen Zahl von Molekülen denkbar. Um störende Interferenzen zu vermeiden, sollten sich idealerweise alle Moleküle am selben Ort und in der gleichen Orientierung befinden (Rhodes, 1993). Dies ist natürlich unmöglich. Einen Ausweg bietet der Kristall.

Jeder Kristall ist so organisiert, daß er sich allein durch Verschiebung (Translation) eines bestimmten Volumenelementes vollständig aufbauen läßt. Dieses muß nicht mit dem zu untersuchenden Molekül übereinstimmen. Die Richtung und Größe möglicher Translationen sind dabei durch die Orientierung bzw. Länge der Achsen dieser sogenannten Elementarzelle vorgegeben. Zahlreiche Ebenenscharen im Kristall teilen alle drei Achsen der Elementarzelle in Abschnitte, deren ganzzahliges Vielfache wieder die gesamte Länge einer entsprechenden Dimensionsachse ergeben. An diesen Ebenen wird unter einem bestimmten Winkel einfallendes Röntgenlicht durch Beugung scheinbar reflektiert. Ein Reflex entsteht. Dieser Zusammenhang kann durch die BRAGG-Bedingung beschrieben werden: Die gebeugten und in gleiche Richtung emittierten Strahlen besitzen einen Gangunterschied, der einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge des verwendeten Röntgenlichts entspricht. Praktisch ist die Ebenenschar verschmolzen. Für alle anderen Ebenenscharen im Kristall kommt es zur Auslöschung. Stets lassen sich nämlich für diese Ebenenscharen zwei Ebenen finden, deren reflektierte Röntgenstrahlen einen Gangunterschied von 180° aufweisen.

Somit wird letztlich die Intensität der gebeugten Röntgenstrahlung auf Kosten einer Ebenen- und Richtungsauswahl dramatisch erhöht. Diese Auswahl (Gesamtheit der Reflexe) ist aber immer noch groß genug, um die Struktur eines Moleküls mit atomarer Genauigkeit zu bestimmen. Mathematisch stellt die Streuung am Kristall eine Fourier-Transformation dar (Rhodes, 1993; Ladd & Palmer, 1994; Dunitz, 1995):

$$F_{hkl} = \int \int \int \rho(x, y, z) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dx dy dz$$

(Rhodes, 1993).

F_{hkl} ist ein sogenannter Strukturfaktor, $\rho(x,y,z)$ beschreibt die Elektronendichte im Punkt (x,y,z) und $e^{2\pi i(hx+ky+lz)}$ eine dreidimensional harmonische Funktion mit der Frequenz h,k,l . Die Elektronendichteverteilung der Elementarzelle kann folglich durch entsprechende Rücktransformation bei Kenntnis von Intensität bzw. Amplitude und Phase aller Reflexe berechnet werden:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

(Rhodes, 1993).

Die Intensität eines Reflexes kann unmittelbar gemessen werden. Daraus kann die Amplitude $|F_{hkl}|$ berechnet werden. Für die Bestimmung der Phase gibt es verschiedene Methoden, z.B. den „Molekularen Ersatz“ (Rhodes, 1993; Ladd & Palmer, 1994).

Die Qualität der gemessenen Reflexen wird zumeist durch den R_{merge} -Faktor beschrieben. Dabei werden Abweichungen von der mittleren Intensität für alle Reflexe praktisch aufsummiert und zur Summe der Intensitäten der gemessenen Reflexe ins Verhältnis gesetzt. I_i stellt die Intensität des Reflexes hkl in der i -ten Messung dar. \bar{I} beschreibt die mittlere Intensität des Reflexes hkl für alle Messungen. Ein möglichst kleiner Wert scheint die Voraussetzung für eine erfolgreiche Strukturbestimmung zu sein.

$$R_{merge} = 100 \sum_{hkl} \sum_i |I_i - \bar{I}| / \sum_{hkl} \sum_i I_i$$

Jedoch wächst diese Zahl immer bei einer Zunahme der Anzahl von Reflexen, insbesondere bei einer größeren Redundanz der gemessenen Daten. Diese führt dagegen zu einer höheren Genauigkeit der experimentellen Werte. Für eine sinnvolle Normierung werden daher zusätzliche Faktoren eingeführt. So ist die Berechnung des „Redundancy-Independent“- R_{merge} -Faktors (R_{rim}) bzw. „Precision-Indicating“- R_{merge} -Faktors (R_{pim}) möglich (Weiss & Hilgenfeld, 1997).

$$R_{rim} = 100 \sum_{hkl} \sqrt{N / (N-1)} \sum_i |I_i - \bar{I}| / \sum_{hkl} \sum_i I_i$$

$$R_{pim} = 100 \sum_{hkl} \sqrt{1 / (N-1)} \sum_i |I_i - \bar{I}| / \sum_{hkl} \sum_i I_i$$

N stellt die Anzahl der Messungen für den Reflex hkl dar.

Zur Beurteilung der Qualität einer Struktur haben sich der kristallographische R-Faktor bzw. R_{free} -Faktor bewährt. Beim R-Faktor werden die „Längenunterschiede“ zwischen den Reflexen des Beugungsexperimentes und den aus der Struktur berechneten Vektoren aufsummiert. Anschließend wird diese Zahl zur Gesamtheit der gemessenen Reflexe ins Verhältnis gesetzt. Der R_{free} -Faktor wird nur auf Grundlage einer Auswahl von Reflexen (z.B. 10 %), gegen die nicht verfeinert wurde, bestimmt. Die Berechnung erfolgt in gleicher Weise (Brünger, 1992; Rhodes, 1993):

$$R_{factor} = 100 \sum \left(\|F_o\| - \|F_c\| \right) / \sum \|F_o\|$$

3. Ergebnisse

3.1. In-silico-Untersuchungen zur Charakterisierung der Mip-Proteine

3.1.1. Vergleich der dreidimensionalen Struktur des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* und DsbC aus *Escherichia coli*

Seit einiger Zeit ist die dreidimensionale atomare Struktur des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* aufgeklärt. Das Protein ist ein Homodimer mit einer ungewöhnlichen V-Form (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001). Die Einzelheiten sind im Kapitel „1.3.1. Das Mip-Protein aus *Legionella pneumophila*“ beschrieben. DsbC ist eine periplasmatische Disulfid-Isomerase aus *Escherichia coli*. Dieses Enzym katalysiert die Umlagerung von Disulfid-Brücken, die durch DsbA während der Faltung von Proteinen eingeführt worden sind (Sone *et al.*, 1997). Außerdem besitzt es Chaperon-Eigenschaften, unabhängig von seiner Isomerase-Aktivität. DsbC ist in der Lage, die Reaktivierung von durch GdnHCl-denaturierter GAPDH zu beschleunigen und die Aggregation des Enzyms während der Rückfaltung zu verringern (Chen *et al.*, 1999).

Die Kristallstruktur zeigt, daß DsbC ebenfalls ein Homodimer mit einem Molekulargewicht, ähnlich dem Mip-Protein von *Legionella pneumophila*, von etwa 46 kDa ist. Außerdem erinnert die räumliche Organisation des DsbC-Moleküls in überraschender Weise an die „Form“ des „Macrophage-Infectivity-Potentiator“-Proteins aus *Legionella pneumophila* (Abbildungen 3.1.1. und 3.1.2.): Auch in diesem Protein wird die Dimerisierung ausschließlich über die N-terminale Domäne vermittelt. Dabei ist jedoch zu bemerken, daß die Dimerisierungsdomäne in DsbC überwiegend aus β -Faltblättern gebildet wird; die N-terminale Domäne im Mip-Protein ist ausschließlich α -helikal organisiert. Danach folgt in beiden Moleküle eine von jedem Monomeren nach „außen“ weisende Verbindungshelix in die C-terminale Domäne. Während im Mip-Protein von *Legionella pneumophila* diese Domäne Homologie zu den FK506-Bindeproteinen aufweist, besitzt sie in DsbC die Struktur des Thioredoxins (McCarthy *et al.*, 2000; Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001).

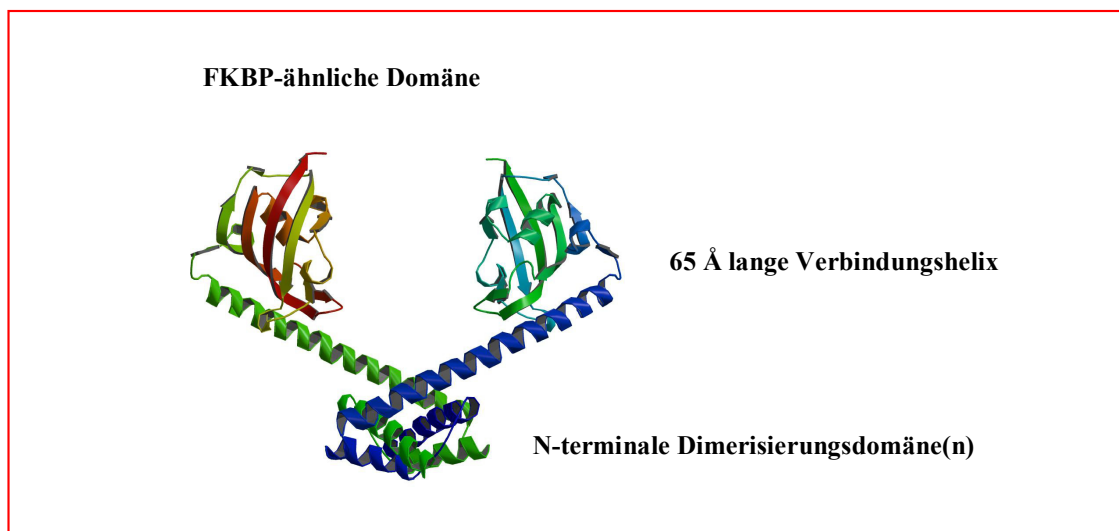


Abbildung 3.1.1.: Dreidimensionale Struktur des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001). PDB ID: 1FD9 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Das Bild wurde mit „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) erstellt.

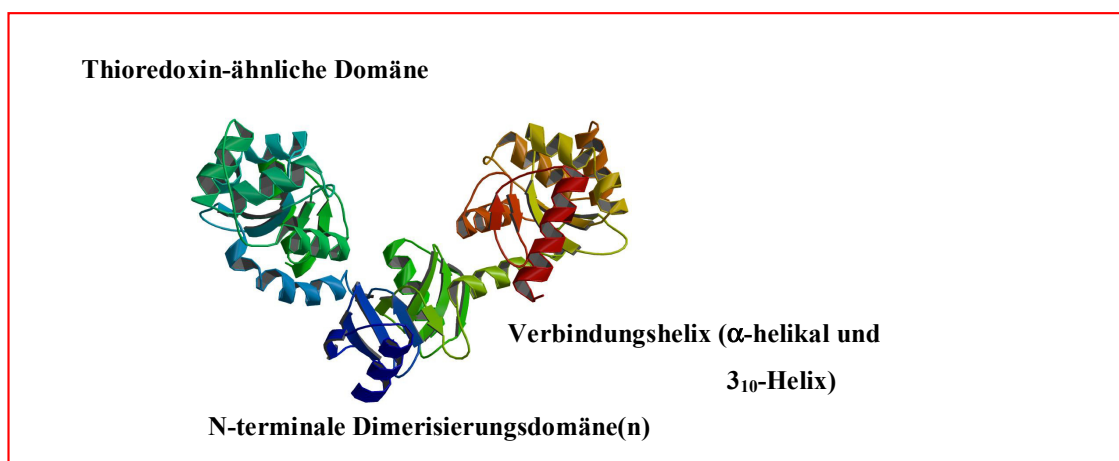


Abbildung 3.1.2.: Dreidimensionale Struktur von DsbC aus *Escherichia coli* (McCarthy *et al.*, 2000). PDB ID: 1EEJ (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Für die Generierung des Bildes wurden die Programme „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) verwendet.

Obwohl die Verbindungshelix zwischen der N- und C-terminalen Domäne im DsbC-Protein wesentlich kürzer ist (45 α -helikale Reste im Mip-Protein gegenüber 16 α -helikalen Resten und vier Reste in einer 3_{10} -Helix in DsbC) weisen die FK506- bzw. Thioredoxin-ähnlichen Domänen in beiden Dimeren den gleichen Abstand auf. In DsbC wird die geringere Länge der Verbindungshelices durch einen größeren Winkel zwischen diesen ausgeglichen. Dies wird in der Abbildung 3.1.3. deutlich.

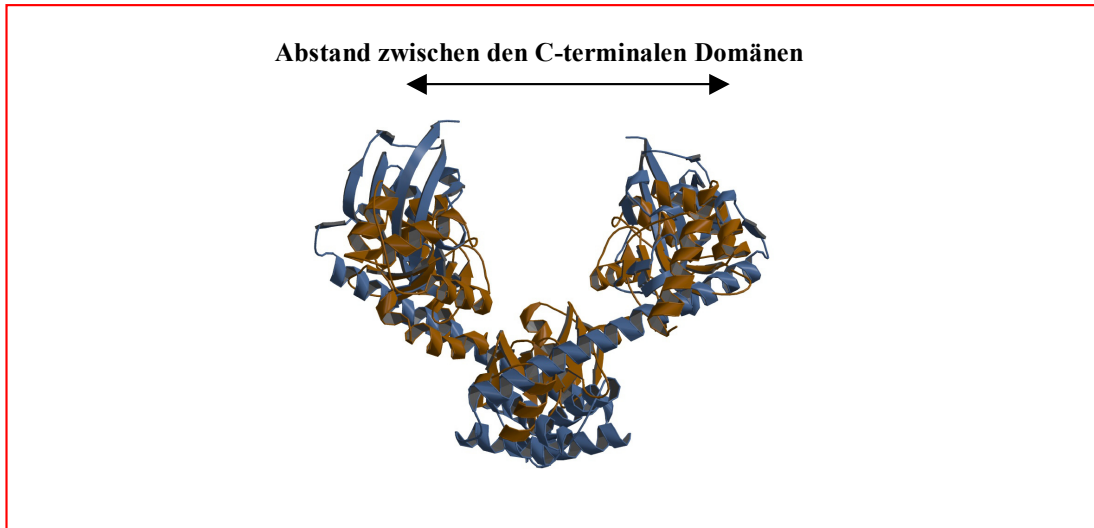


Abbildung 3.1.3.: Überlagerung der dreidimensionalen Struktur von Mip (blau) und DsbC (braun). PDB IDs: 1FD9 und 1EEJ (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Die Orientierung der Moleküle erfolgte mit dem Programm „ALIGN“ (Cohen, 1997). Das Bild wurde mit Hilfe von „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) generiert.

Die Ähnlichkeit in der „Form“ (relative Position der einzelnen Domänen zueinander) zwischen der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase Mip von *Legionella pneumophila* und der Disulfid-Isomerase bzw. dem Chaperon DsbC ist verblüffend. Natürlich bestimmt die dreidimensionale Struktur eines Proteins wesentlich seine Eigenschaften und damit mögliche Funktionen. Proteine mit einer ähnlichen (ungewöhnlichen) „Form“ könnten gleichartige Eigenschaften bzw. Funktionen besitzen. Daher wurde für das „Macrophage-Infectivity-Potentiator“-Protein neben der enzymatischen auch eine chaperonartige Aktivität vermutet. Diese Hypothese mußte in biochemischen Experimenten im Rahmen dieser Arbeit geprüft werden. Interessanterweise zeigten die bei der Röntgenstrukturanalyse verwendeten Kristalle von DsbC Variationen in einer Dimension der Elementarzelle. Diese wurden durch eine unterschiedliche Krümmung der Verbindungshelix zwischen der N- und C-terminalen Domäne verursacht (McCarthy *et al.*, 2000). Es ist bemerkenswert, daß auch für das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* aufgrund dieser Flexibilität eine Nichtisomorphie für verschiedene Kristalle beobachtet werden konnte.

3.1.2. Analyse des erweiterten „Methionin-Zippers“ im Mip-Protein von *Legionella pneumophila*

Ein besonderes strukturelles Ensemble im Mip-Protein von *Legionella pneumophila* stellt sicher der erweiterte „Methionin-Zipper“ dar. Dieser wird über die Dimerisierung gebildet. Helix 1 und 2 der N-terminalen Domäne beider Monomere formen zusammen ein ungewöhnliches, da um 45° „verkantetes“ und vollständig antiparalleles, „Four-Helix-Bundle“. In einer Ebene dieses „Bundle“ stehen sich Methionin-Seitenketten der Helix 2 direkt gegenüber. Außerdem kommt es zu Wechselwirkungen zwischen Met-46 des einen und Val-33' des anderen Monomers. Damit entsteht der Eindruck eines um eine Helixwindung verschobenen dreizähligen „Methionin-Zippers“. Dies ist in den Abbildungen 3.1.4. und 3.1.5. verdeutlicht. Das Schwefel-Atom der Seitenkette von Met-46 ist vom umgebenden Medium frei zugänglich (Abbildung 3.1.7.).

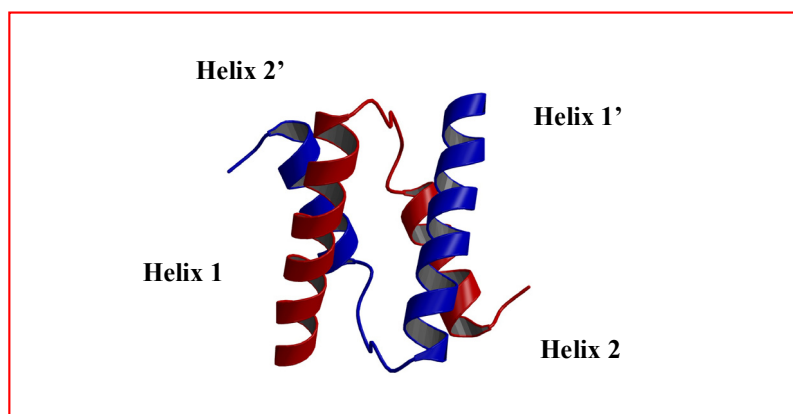


Abbildung 3.1.4.: Blick auf die N-terminale Domäne des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* PDB ID: 1FD9 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Das „Four-Helix-Bundle“ ist deutlich zu erkennen. Für die Darstellung konnten „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) verwendet werden.

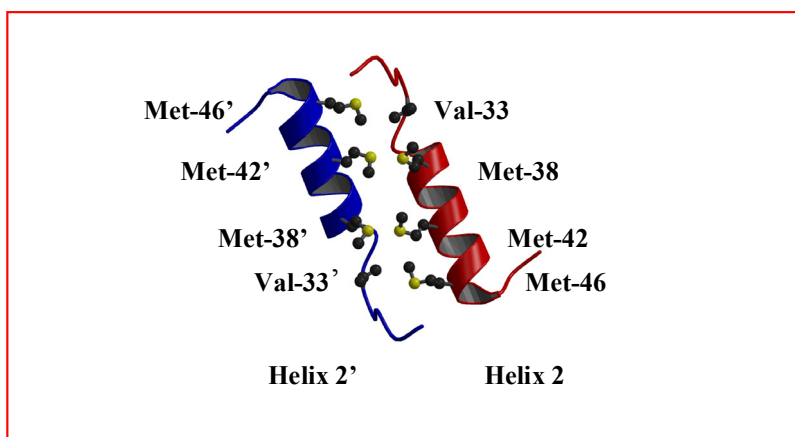


Abbildung 3.1.5.: Der „Methionin-Zipper“ in der N-terminalen Domäne wird zwischen den Helices 2 beider Monomere ausgebildet. PDB ID: 1FD9 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Das Bild wurde mit den Programmen „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) generiert.

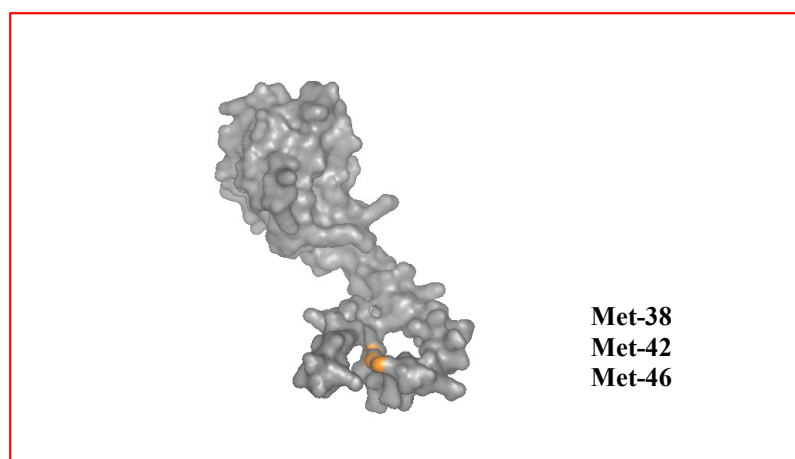


Abbildung 3.1.6.: Raumfüllendes Modell des monomeren Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* PDB ID: 1FD9 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Die Schwefel-Atome des „Zippers“ (Met-38, Met-42 und Met-46) sind in Orange dargestellt. Das Programm „PyMOL“ (DeLano, 2002; <http://www.pymol.org>) ist für diese Darstellung verwendet worden.

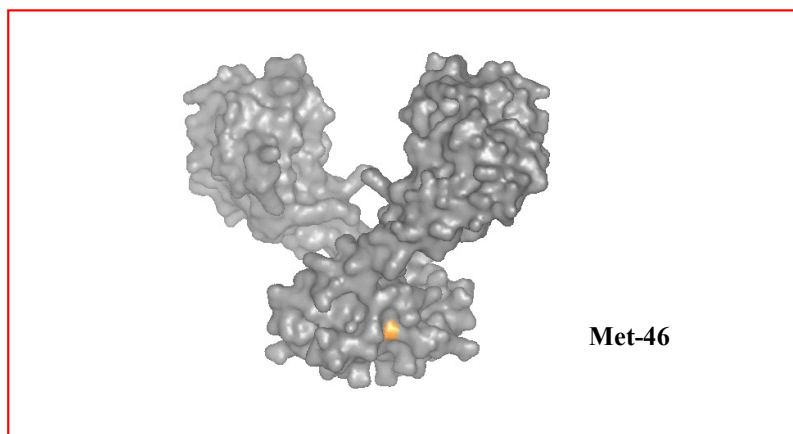
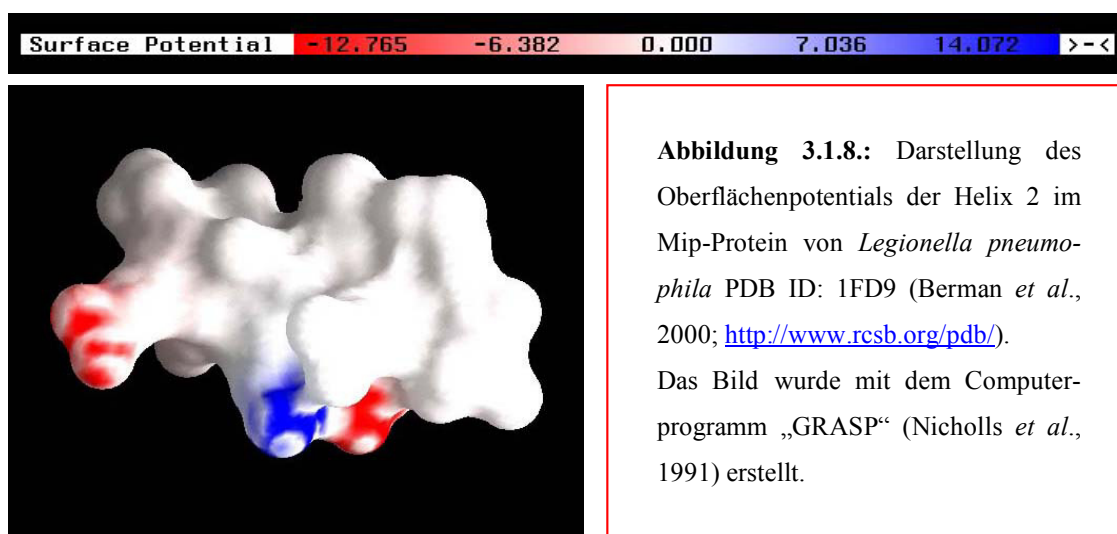


Abbildung 3.1.7.: Das dimere, biologisch aktive Mip-Protein von *Legionella pneumophila* in raumfüllender Darstellung, generiert mit Hilfe von „PyMOL“ (DeLano, 2002; <http://www.pymol.org>). PDB ID: 1FD9 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Das Schwefel-Atom des Methionin-Restes 46 ist Orange dargestellt. Das Atom ist offensichtlich vom umgebenden Medium aus zugänglich. Met-46 ist Bestandteil des „Methionin-Zippers“.

In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß das dimere Mip-Protein vorwiegend über hydrophobe Wechselwirkungen der Helix 1 und 2, auch der Methionin-Reste, zusammengehalten wird. Eine mögliche Oxidation der Schwefel-Atome für die Reste Met-38, Met-42 und Met-46 verringert die Hydrophobizität der entsprechenden Seitenketten. Dies müßte eine Reduktion der Wechselwirkungen zwischen den Monomeren zur Folge haben. Die eingeführten Sauerstoff-Atome könnten die Dimerisierung auch sterisch behindern. Außerdem ist Helix 2 eine amphipathische Helix (Abbildung 3.1.8.). Die Methionin-Reste sind am Aufbau der hydrophoben Seite beteiligt. Somit kann es ebenfalls zur Destabilisierung der Sekundärstruktur durch die Oxidation kommen. Dieses sollte ebenfalls zu einer Erhöhung der Dimerisierungsenthalpie und damit Destabilisierung des Dimers führen. Somit könnte der erweiterte „Methionin-Zipper“ einen „Schalter“ für den Wechsel des Mip-Protein von *Legionella pneumophila* zwischen der dimeren und monomeren Form in Abhängigkeit vom Redoxzustand der Umgebung darstellen. Dieses mußte in nachfolgenden Experimenten untersucht werden. Offensichtlich können über den oligomeren Zustand eines Proteins weitere Funktionen beeinflußt bzw. reguliert werden.



Interessanterweise werden auch im DsbC-Protein über die Dimerisierung vier Methionin-Reste zueinander bzw. zu weiteren hydrophoben Resten in räumliche Nähe gebracht. Dieses ist in den Abbildungen 3.1.9. und 3.1.10. dargestellt.

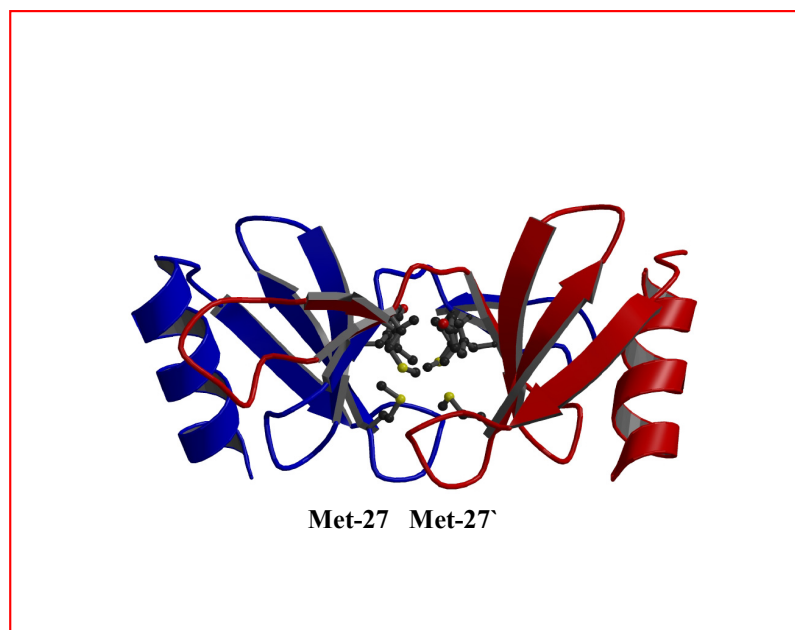


Abbildung 3.1.9.: „Seitenansicht“ der Dimerisierungsdomänen von DsbC. In der Dimerisierungsebene des DsbC-Dimers von *Escherichia coli* stehen sich zwei Methionin-Reste (Met-27 und Met-27') unmittelbar gegenüber. PDB ID: 1EEJ (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) dienten für die Erstellung des Bildes.

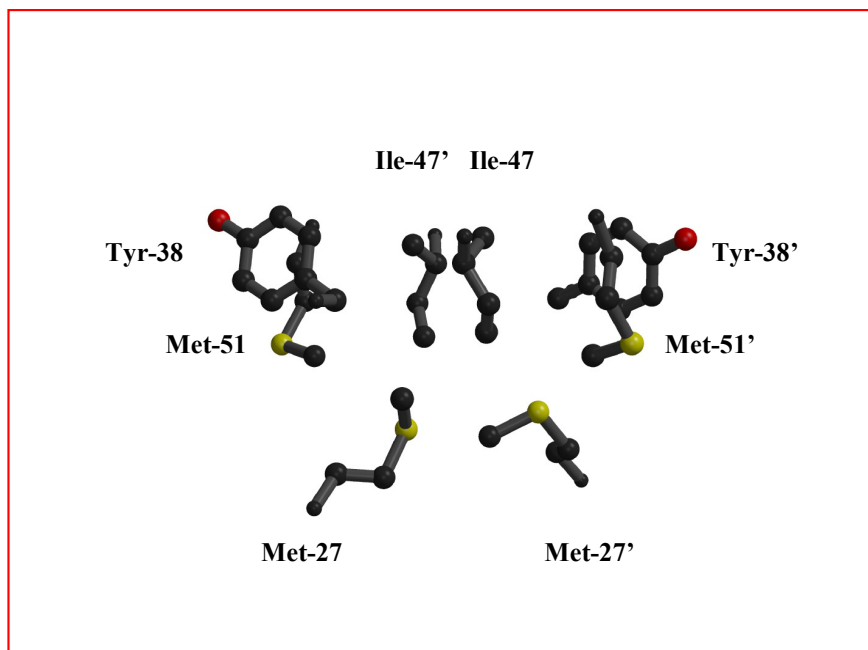


Abbildung 3.1.10.: Neben der Interaktion der Reste Met-27 und Met-27' kommt es zur Ausbildung von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Met-51 und Tyr-38 (Met-51' und Tyr-38') des einen sowie Ile-47' (Ile-47) des anderen Monomers. PDB ID: 1EEJ (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Die „Seitenansicht“ der Abbildung 3.1.10. wurde um 45° gedreht. Zur Vereinfachung sind nur die Seitenketten der erwähnten Aminosäurereste vergrößert dargestellt. Wiederum wurden „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) verwendet.

3.1.3. Sequenzvergleich der Mip-Proteine von *Legionella pneumophila* und *Chlamydia pneumoniae*

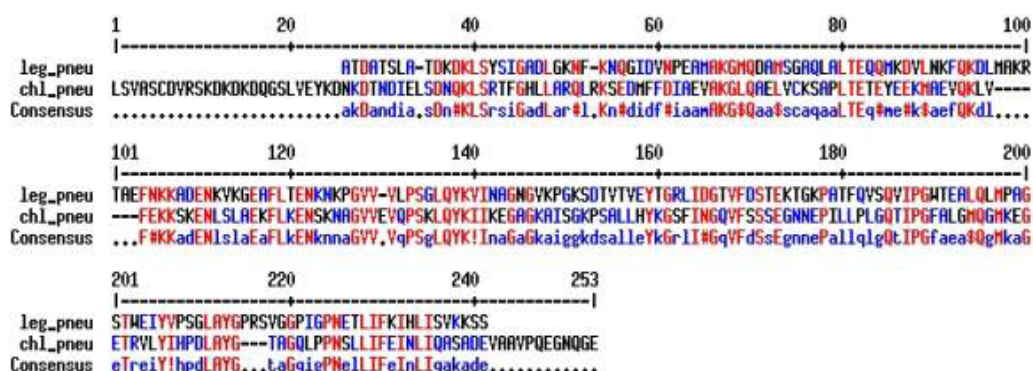


Abbildung 3.1.11.: Sequenzalignment zwischen den Mip-Proteinen von *Legionella pneumophila* und *Chlamydia pneumoniae*. Der Primärstrukturvergleich wurde mit Hilfe des Programmes „MultAlin“ (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) durchgeführt (Corpet, 1988).

Es ist bemerkenswert, daß sich im Mip-Protein von *Legionella pneumophila* nicht ein einziger Cystein-Aminosäurerest findet. Das Mip-ähnliche Protein von *Chlamydia pneumoniae* ist im Vergleich zum verwandten Molekül aus *Legionella pneumophila* N- und C-terminal erweitert. Außerdem besitzt es keinen „Methionin-Zipper“. Dafür finden sich an den entsprechenden Positionen in der Sequenz andere hydrophobe Reste: Phe-60, Val-65, Leu-69, Leu-73. Deren Modifizierung durch reaktive Sauerstoffspezies ist weitaus seltener (Stadtman & Levine, 2003). Für das Mip-ähnliche Protein von *Chlamydia pneumoniae* könnte somit die „Dissoziation“ des Dimers durch Oxidation keine Bedeutung besitzen.

Auch in anderen *Legionella*-Arten findet man den Austausch von Methionin-Resten gegen andere hydrophobe Reste. So ist z.B. in *Legionella drancourtii* oder *Legionella lytica* Met-38 gegen einen Leucin-Rest substituiert. In *Legionella waltersii* sind Met-38 und Met-46 durch Leucin bzw. Isoleucin ersetzt. Dies hat eine Datenbanksuche mit der Sequenz der Helix 2, PEAMAKGMQDAMS, unter Verwendung des Programmes „NCBI BLAST2“ (<http://www.expasy.org/tools/blast/>) ergeben (Altschul *et al.*, 1997). Das Mip-ähnliche Protein von *Chlamydia pneumoniae* besitzt zwei Cystein-Reste in der N-terminalen Domäne: Cys-6 und Cys-75. Cys-6 ist vermutlich Bestandteil einer „Lipoprotein-Attachment-Site“. Bei der Motivsuche mit dem Programm „PROSITE“ (<http://www.expasy.org/prosite/>) konnte eine entsprechende Sequenz im Molekül identifiziert werden. So befindet sich der Aminosäurerest Cys-6 an der Position 15-35 des Vorläufermoleküls. Außerdem finden sich zwei Arg-Aminosäurereste unter den ersten sieben Resten des translatierten Proteins (Hayashi & Wu, 1990; Hulo *et al.*, 2004). Cys-75 liegt an der Dimerisierungsfläche eines möglichen Dimers, wie die Modellierung eines Monomers dieses Proteins mit Hilfe des Computerprogramms „SWISS-MODEL“ (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>) ergeben hat (Schwede *et al.*, 2003). Dies wird durch die Abbildung 3.1.12. erkennbar.

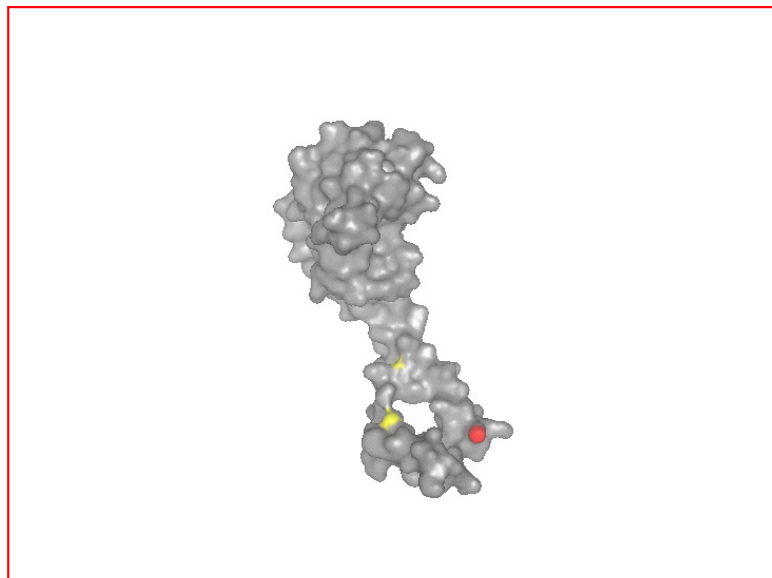


Abbildung 3.1.12.: Raumfüllendes Modell des Mip-ähnlichen Proteins von *Chlamydia pneumoniae*. Das Modell umfaßt lediglich die Reste 49 (Ala) bis 230 (Asp). Methionin-Reste in der N-terminalen Domäne sind in Gelb, Cys-75 in Rot dargestellt. Bei der Darstellung wurde das Programm „PyMOL“ (DeLano, 2002; <http://www.pymol.org>) verwendet.

Es ist möglich, daß auch der oligomere Zustand des Mip-ähnlichen Proteins aus *Chlamydia pneumoniae* durch den Red-Ox-Zustand des umgebenden Mediums bestimmt wird. In diesem Falle sollten jedoch reduzierende Bedingungen zur Monomerisierung durch die Lösung einer Disulfidbrücke führen.

3.1.4. Theoretische Untersuchungen zur Veränderung des CD-Spektrums in Abhängigkeit von verschiedenen Konformationsänderungen der N-terminalen Domäne des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila*

Eine mögliche Oxidation der Methionin-Reste im „Zipper“ führt offensichtlich zu einer Verringerung des amphipathischen Charakters der Helix 2 in der N-terminalen Domäne. Dies könnte zum Verlust der helikalen Struktur in diesem Bereich des Moleküls führen. Ausgehend von dieser Veränderung sind weitere Umordnungen in der Dimerisierungsdomäne denkbar. Somit sollte es in Abhängigkeit von der Art und dem Umfang der Reorganisation im Mip-Molekül zu Veränderungen im CD-Spektrum kommen. Eine theoretische sowie quantitative Analyse dieser Veränderung wurde mit Hilfe des Computerprogrammes „k2d“ (<http://www.embl-heidelberg.de/~andrade/k2d/>) versucht (Andrade *et al.*, 1993; Merelo *et al.*, 1994). Es gestattet die Generierung von

CD-Spektren zwischen 200 nm und 240 nm. Dazu muss allein der Anteil der α -helikalen und β -faltblattartigen Struktur im Proteinmolekül bekannt sein. Der Rest wird als „Random-Coil“ in die Berechnung miteinbezogen. Für das Mip-Molekül von *Legionella pneumophila* wurden fünf Spektren, gezeigt in der Abbildung 3.1.13., generiert. Ihre Parameter sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt. Als Grundlage diente die Analyse der Struktur des Mip-Proteins (Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2001) bezüglich des Anteils verschiedener Sekundärstrukturen mit Hilfe von „DSSP“ (Kabsch & Sander, 1983).

Annahme	Anteil α -Helix	Anteil β -Faltblatt
„natives“ Mip	0,408 (87 Reste)	0,206 (44 Reste)
Helix 2 entfaltet zu „Random-Coil“	0,347 (74 Reste)	0,206 (44 Reste)
gesamte N-terminale Domäne stellt „Zufallsknäuel“ dar	0,253 (54 Reste)	0,206 (44 Reste)
Helix 2 wird durch Sulfoxidation zu β -Faltblatt	0,347 (74 Reste)	0,268 (57 Reste)
die N-terminale Domäne wandelt sich vollständig in β -Faltblatt um	0,253 (54 Reste)	0,361 (77 Reste)

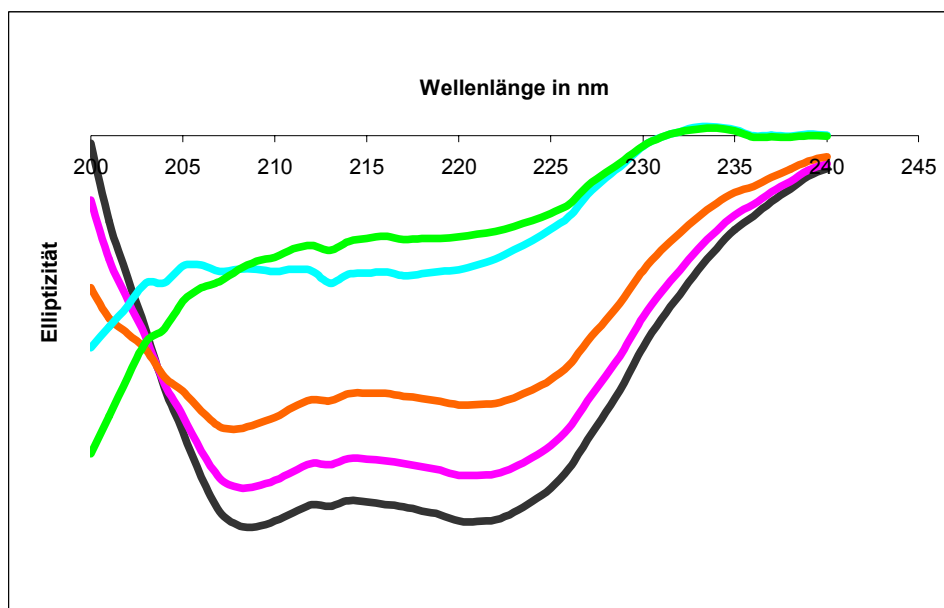


Abbildung 3.1.13.: Theoretische CD-Spektren für das Mip-Protein von *Legionella pneumophila*:

- entsprechend der durch die Röntgenstrukturanalyse bestimmten Struktur
- mit entfalteter Helix 2 („Random-Coil“)
- mit der gesamten N-terminalen Domäne als „Zufallsknäuel“
- für eine β -Faltblatt-artige Helix 2
- im Falle der vollständigen Umwandlung der Dimerisierungsdomäne in ein β -Faltblatt

Die Möglichkeit der Strukturveränderungen in der Verbindungshelix zwischen der Dimerisierungs- und der FKBP-ähnlichen Domäne wurde nicht betrachtet. Untersuchungen an einem N-terminal verkürzten Fragment [Mip⁽⁷⁷⁻²¹³⁾] hatten keine Hinweise auf eine Veränderung der Sekundärstruktur im Rest der langen Helix durch den Verlust der Dimerisierungsdomäne ergeben (Köhler *et al.*, 2003). Somit erscheint eine Beeinflussung der Struktur der Verbindungshelix durch Veränderungen in der N-terminalen Domäne unwahrscheinlich.

Eine erkennbare relative Intensitätszunahme für das Minimum bei 208-210 nm tritt nur bei vollständiger Umwandlung der N-terminalen Domäne in ein „Random-Coil“ auf. Auch eine leichte Verschiebung des „Nulldurchganges“ (hin zu einer niedrigeren Wellenlänge) kann in diesem Falle vermutet werden. Die Entstehung von β -Faltblatt-artigen Strukturen führt dagegen zu CD-Spektren mit einem völlig verschiedenen Charakter.

3.1.5. Analyse der prokaryotischen Signalsequenz in der N-terminalen Domäne des Mip-ähnlichen Proteins von *Trypanosoma cruzi*

Bereits Moro *et al.* erwähnen eine prokaryotische Signalsequenz im Mip-ähnlichen Protein von *Trypanosoma cruzi* (Moro *et al.*, 1995). Bei der Motivsuche mittels „PROSITE“ (<http://www.expasy.org/prosite/>) wurde im Vorläufermolekül die Sequenz einer „Lipoprotein-Attachment-Site“ identifiziert. Der erste Aminosäurerest im translatierten Protein stellt ein Methionin dar. Außerdem findet sich in der Position 13 für das unprozessierte Molekül ein Cystein-Rest. Daneben ist mit Arg-3 eine positiv geladene Aminosäure innerhalb der ersten sieben Reste vorhanden (Hayashi & Wu, 1990; Hulo *et al.*, 2004).

3.2. Untersuchungen zur Chaperon-Aktivität der Mip-Proteine von *Legionella pneumophila* und *Chlamydia pneumoniae*

Das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* zeigt eine verblüffende Ähnlichkeit in der räumlichen Organisation zum Chaperon DsbC von *Escherichia coli* (Chen *et al.*, 1999; McCarthy *et al.*, 2000; Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2001). Beide Moleküle sind Dimere mit einem ähnlichen Molekulargewicht. Außerdem weisen sie eine ungewöhnliche V-Form auf. Daher sollte auch für verschiedene Mip-Proteine geprüft werden, ob sie Chaperon-Aktivität besitzen.

3.2.1. Charakterisierung der Mip-Proteine im Citrat-Synthase-Aggregationsassay

Zum Nachweis einer Chaperon- bzw. Chaperon-ähnlichen Aktivität stellt ein Citrat-Synthase-Aggregationsassay eine etablierte Methode dar (Buchner *et al.*, 1998). Citrat-Synthase ist ein dimeres mitochondriales Protein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 50 kDa. Das Molekül ist ein natürliches Substrat von GroE (Horwich *et al.*, 1993), α -helikal organisiert und wird bei höheren Temperaturen schnell inaktiviert. Die vorangehenden strukturellen Veränderungen führen zu unspezifischen hydrophoben Wechselwirkungen und letztlich zur Aggregation des Proteins (Jakob *et al.*, 1995). Es kommt zu einer Trübung der Lösung (Lichtstreuung). Diese kann leicht mit einem Spektrophotometer verfolgt werden. Molekulare Chaperone sind nun in der Lage, diesen

Prozess zu inhibieren, indem sie die Konzentration von partiell entfalteten Intermediaten durch deren Bindung gering halten (Buchner *et al.*, 1991, Kiefhaber *et al.*, 1991).

3.2.1.1. Untersuchungen am Mip-Protein von *Legionella pneumophila*

1 μM Citrat-Synthase wurden zusammen mit 10 μM Mip-Protein von *Legionella pneumophila* bei 45°C inkubiert. Zum Vergleich diente ein Ansatz ohne Mip-Protein; als Kontrollen die Inkubationen von Citrat-Synthase (20°C) bzw. des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* (Inkubationstemperatur: 45°C). Der zeitliche Verlauf der Extinktionen für die verschiedenen Ansätze ist in der Abbildung 3.2.1. dargestellt.

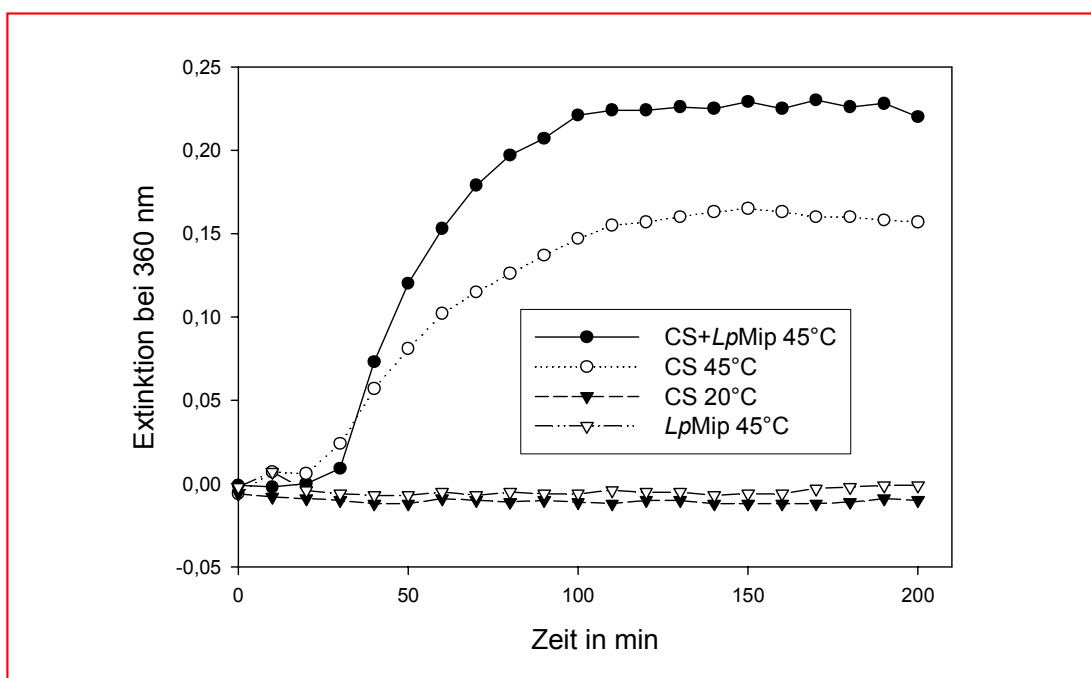


Abbildung 3.2.1.: Zeitlicher Verlauf der Aggregation von Citrat-Synthase mit und ohne Mip-Protein von *Legionella pneumophila*, inkubiert bei 45°C. Als Maß dient die Extinktion der Lösungen bei 360 nm. Kontrollansätze: Inkubation von Citrat-Synthase bei 20°C sowie *LpMip* bei 45°C. Das Verhältnis von Citrat-Synthase zu *LpMip* betrug 1:10.

Offensichtlich ist das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* in der verwendeten Konzentration nicht in der Lage, die Aggregation von Citrat-Synthase zu verringern. Im Gegenteil, es kommt sogar zur Zunahme der Extinktion bei 360 nm unter dem Einfluß von *LpMip*, die als Maß für die Menge des denaturierten Proteins in diesem Ansatz dient. Dieser Effekt kann nicht durch aggregiertes Mip-Protein erklärt werden, da es im Ansatz

allein mit dem Mip-Protein von *Legionella pneumophila* bei 45°C zu keiner Extinktionserhöhung kommt.

Das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* stellt eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase dar. Diese Enzyme beschleunigen die Isomerisierung einer Peptidyl-Prolyl-Imidbindung während der Proteinfaltung. Es ist denkbar, daß diese Fähigkeit auch zu einer effektiveren Entfaltung von Citrat-Synthase bei erhöhter Temperatur beiträgt. Somit könnte eine Chaperon-artige Aktivität maskiert werden. Zum Ausschluß dieses Mechanismus' sollte die *LpMip*-Mutante F202Y mit einer Isomeraserestaktivität von 0,9 % (persönliche Mitteilung von Dr. Thilo Kamphausen, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle) im Aggregationsassay untersucht werden. 1 µM Citrat-Synthase konnten mit 10 µM der *LpMip*-Mutante F202Y bei 45°C versetzt werden. In einem Vergleichsansatz wurden 1 µM Citrat-Synthase mit 10 µM wtMip bei 45°C inkubiert. Außerdem sollten zwei Kontrollen allein mit „Condensing-Enzyme“ bei 45°C bzw. 20°C mitgeführt werden. Die Ergebnisse der Trübungsmessungen sind in Abbildung 3.2.2. zusammengefaßt.

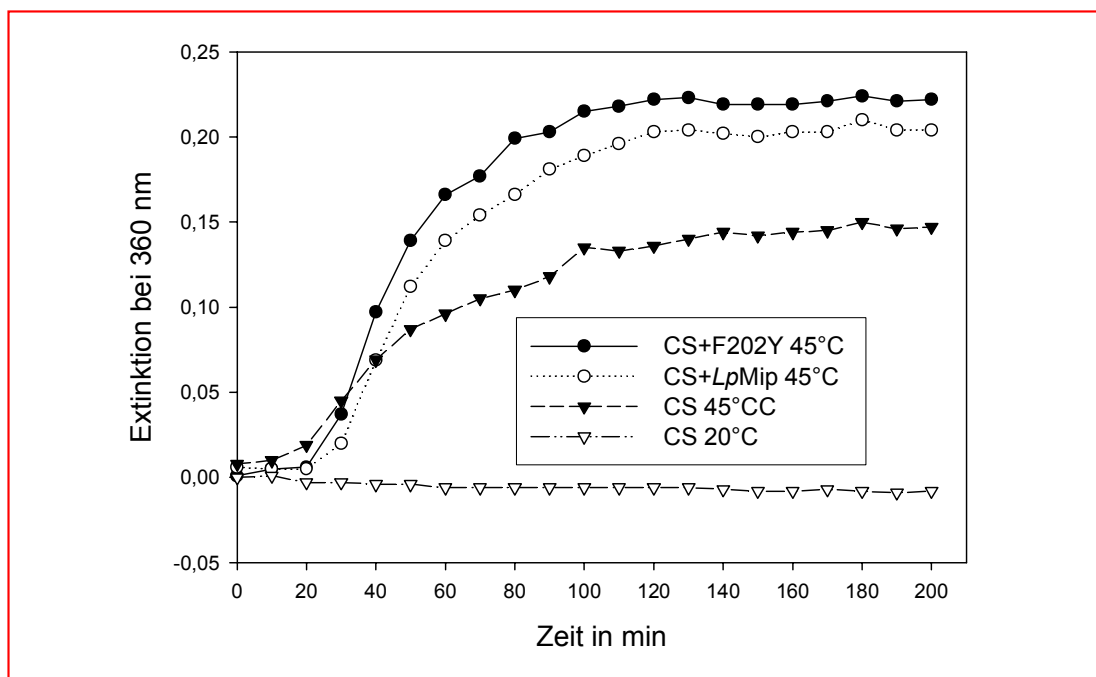


Abbildung 3.2.2.: Trübung von Ansätzen mit Citrat-Synthase und der Mutante F202Y des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* sowie wtMip-Protein, inkubiert bei 45°C. Die Konzentration der Citrat-Synthase betrug 1 µM. Die Mutante F202Y sowie das Wildtyp-Mip-Protein wurden in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Kontrollen: Citrat Synthase bei 45°C bzw. 20°C.

Durch die Mutante F202Y, mit einer dramatisch reduzierten PPIase-Aktivität, kommt es, wie beim wtMip-Protein, zu einer Zunahme der Extinktion bei 360 nm während der Inkubation mit Citrat-Synthase. Die Mutante selbst aggregiert nicht bei 45°C, da eine Trübung im Kontrollansatz (allein mit F202Y) nicht beobachtet werden konnte.

3.2.1.2. Experimente mit dem Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae*

Das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* stellt ein Homologes des bisher untersuchten Moleküls aus *Legionella pneumophila* dar. Es weist, insbesondere im C-terminalen Bereich, eine hohe Sequenzidentität auf. Somit sollte dieses Protein eine ähnliche dreidimensionale Struktur wie das *LpMip* besitzen. Aus diesem Grunde scheint auch eine Übereinstimmung in der Form zum DsbC-Chaperon von *Escherichia coli* wahrscheinlich. Die Hypothese, daß die ungewöhnliche dreidimensionale Organisation dieses Moleküls eine Chaperon-ähnliche Aktivität ermöglicht, sollte daher auch am Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* überprüft werden.

Dazu war es notwendig, 1 µM Citrat-Synthase zusammen mit 12 µM des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* bei 45°C zu inkubieren. Zum Vergleich dienten Proben allein mit Citrat-Synthase (Inkubationstemperatur: 45°C bzw. 20°C). Wiederum wurde die Extinktion bei 360 nm als Maß für die Menge des aggregierten Citrat-Synthase-Proteins verwendet (Abbildung 3.2.3.).

Das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* ist im ungefähr zehnfachen Überschuß in der Lage, die Aggregation von Citrat-Synthase bei 45°C vollständig zu verhindern. Es zeigt somit Chaperon-ähnliche Eigenschaften.

Im folgenden sollten verschiedene Konzentrationen des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* auf ihre Fähigkeit untersucht werden, die Aggregation von Citrat-Synthase bei erhöhter Temperatur zu inhibieren.

Dazu wurden 1 µM Citrat-Synthase mit 6 µM bzw. 2 µM *CpMip* versetzt. Zur Kontrolle wurde eine Probe ohne Mip-Protein verwendet. Die Inkubationstemperatur betrug 45°C. Der Verlauf der Extinktion bei 360 nm ist durch die Kurven der Abbildung 3.2.4. dargestellt.

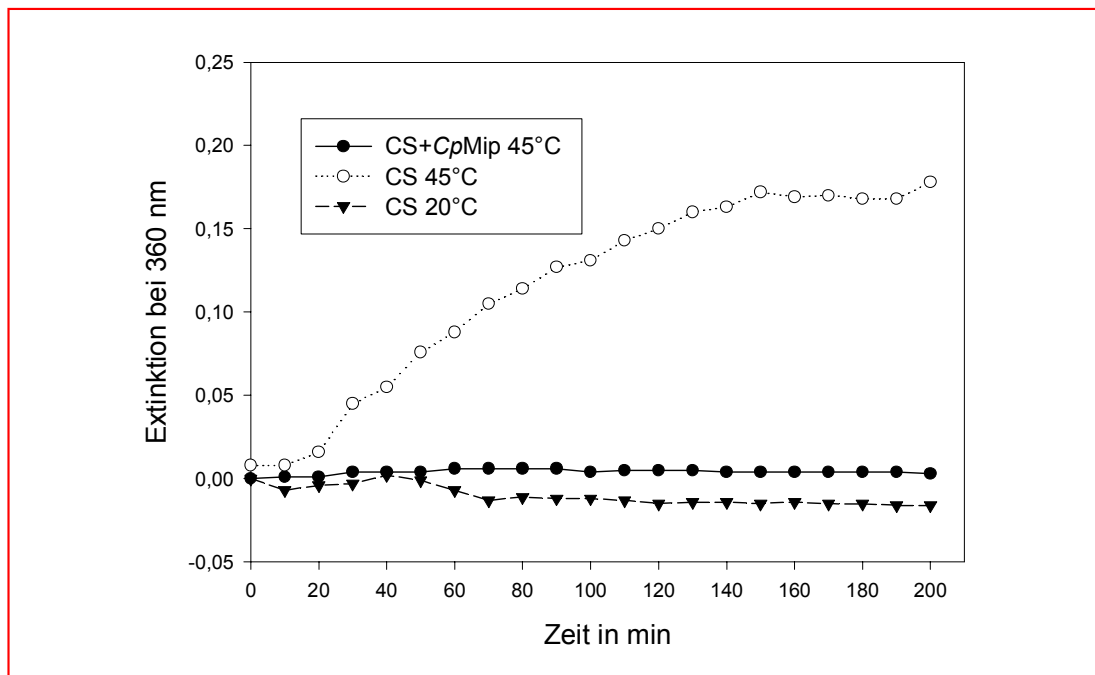


Abbildung 3.2.3.: Einfluß des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* auf die Aggregation von Citrat-Synthase bei 45°C. Die Konzentration der Citrat-Synthase betrug 1 µM. CpMip wurde im Überschuß von etwa 12 µM eingesetzt. Die Kontrollansätze enthielten allein Citrat-Synthase und wurden bei 20°C bzw. 45°C inkubiert.

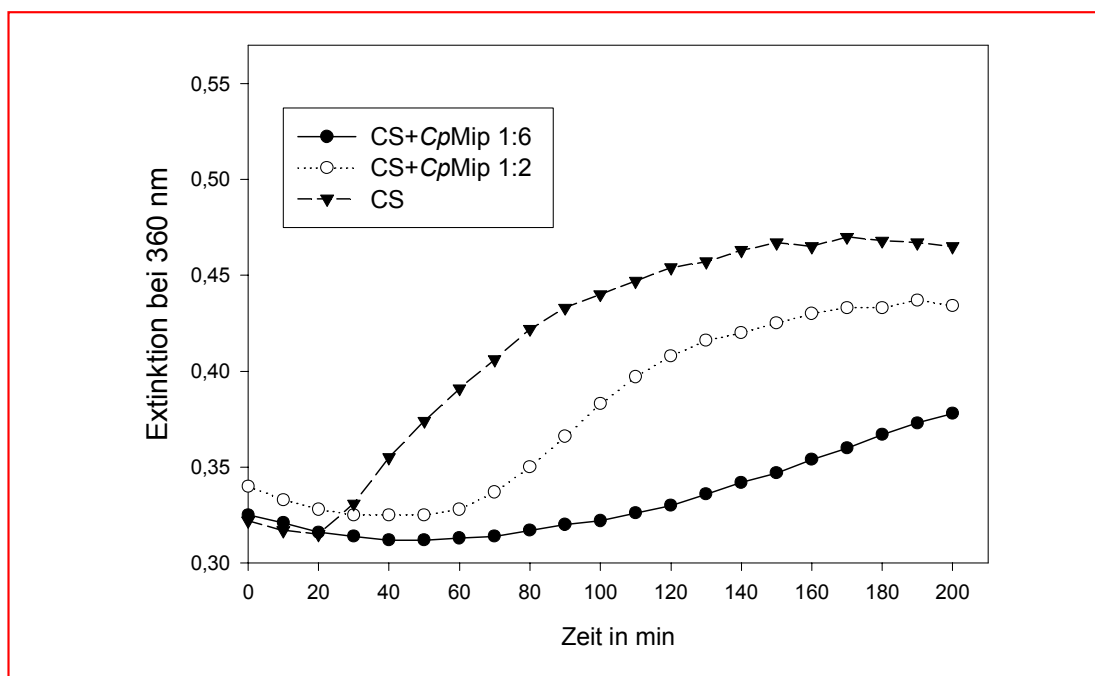


Abbildung 3.2.4.: Untersuchungen zur Verhinderung der Aggregation von Citrat-Synthase bei 45°C durch verschiedene Konzentrationen des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae*. Das Verhältnis Citrat-Synthase zu CpMip betrug 1:2 bzw. 1:6. Im Kontrollansatz war kein CpMip vorhanden.

Die Aggregation von Citrat-Synthase bei 45°C (gemessen durch die Extinktionszunahme bei 360 nm) zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Konzentration des eingesetzten Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* innerhalb der untersuchten Größenordnung.

Zur weiteren Kontrolle konnte hitzeinkubiertes Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* auf seine Fähigkeit untersucht werden, die Aggregation von Citrat-Synthase bei erhöhter Temperatur zu verhindern. Durch die Erwärmung auf 100°C sollte es zu einem Verlust der Struktur und damit auch seiner Chaperon-ähnlichen Funktion kommen. 1 µM Citrat-Synthase mußten mit 10 µM hitzeinkubiertem (erwärmt für 10 Minuten auf 100°C und abzentrifugiert) *Chlamydia*-Mip-Protein versetzt werden. Zum Vergleich wurde in einem Ansatz CpMip verwendet, daß für 10 Minuten bei 20°C gehalten worden war. Außerdem wurde eine Probe allein mit Citrat-Synthase mitgeführt. Für alle drei Ansätze wurden bei 45°C die Extinktionen (Wellenlänge: 360 nm) zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.2.5. zusammengefaßt.

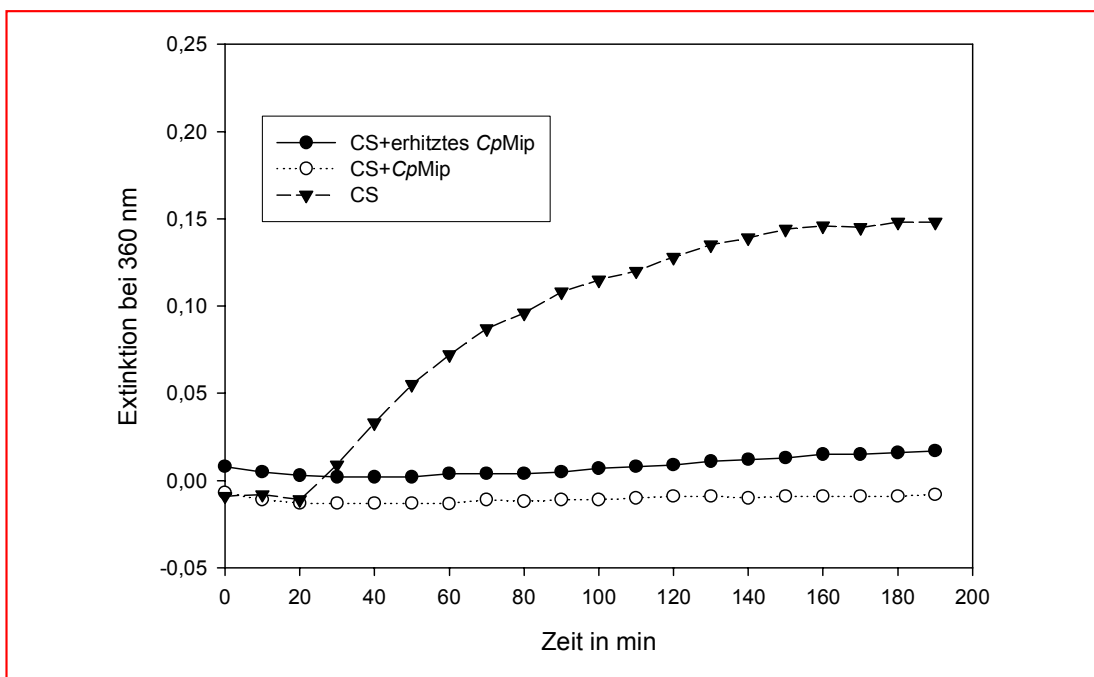


Abbildung 3.2.5.: Aggregation von Citrat-Synthase in Gegenwart von hitzeinkubiertem Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae*. Zur Kontrolle wurden Proben mit bei 20°C gehaltenem CpMip sowie Puffer verwendet. Das Verhältnis von CpMip- zu Citrat-Synthase-Monomeren betrug 10:1.

Offensichtlich zeigt auch das für 10 Minuten auf 100°C erhitzte Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* Chaperon-artige Aktivität. Dieses Ergebnis war zunächst sehr

überraschend. Interessanterweise konnte nach der Erwärmung und Zentrifugation des CpMip keine Proteinaggregation abgetrennt werden.

In den vorangegangenen Experimenten war es bisher nur möglich, eine sogenannte „Haltefunktion“ für das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* nachzuweisen. Ein Chaperon sollte darüber hinaus zur Renaturierung unphysiologischer Proteinstrukturen beitragen. In einem weiteren Versuch sollte diese Eigenschaft für das CpMip untersucht werden. Im einzelnen wurden zwei Ansätze mit 1 µM Citrat-Synthase für 70 Minuten bei 45°C inkubiert. Während dieses Zeitraumes wurde die Extinktion der Lösung bei 360 nm bereits fortlaufend bestimmt. Danach erfolgte die Zugabe von 10 µM vorgewärmtem Mip-Protein aus *Chlamydia pneumoniae*. In der Kontrolle mußte allein der Puffer des vermuteten Chaperons verwendet werden. Außerdem wurde eine Probe mit Citrat Synthase bei 20°C mitgeführt. Diese war mit Puffer ergänzt worden. Weitere Messung der Extinktionen bei 360 nm für die einzelnen Lösungen zeigten leider, daß das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* nicht in der Lage ist, thermisch denaturierte Citrat-Synthase wieder zu renaturieren (Abbildung 3.2.6.).

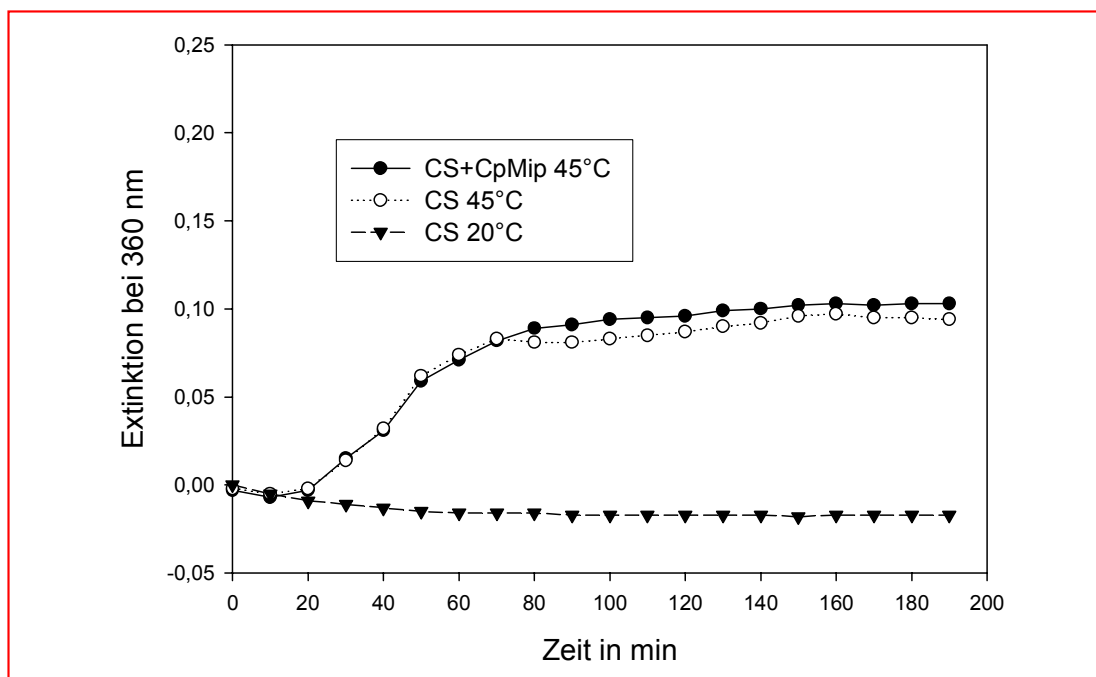


Abbildung 3.2.6.: Bestimmung der Fähigkeit zur Renaturierung von thermisch denaturierter Citrat-Synthase durch CpMip. Die Zugabe des vermuteten Chaperons erfolgte nach 70 Minuten. Ein Kontrollansatz bei 45°C wurde mit 20 mM HEPES pH 7,0 ergänzt. Weiter wurde Citrat-Synthase bei 20°C inkubiert. In diesem Falle erfolgte die Zugabe von Mip-Protein. Die Konzentration von Citrat Synthase betrug 1 µM und von CpMip 10 µM.

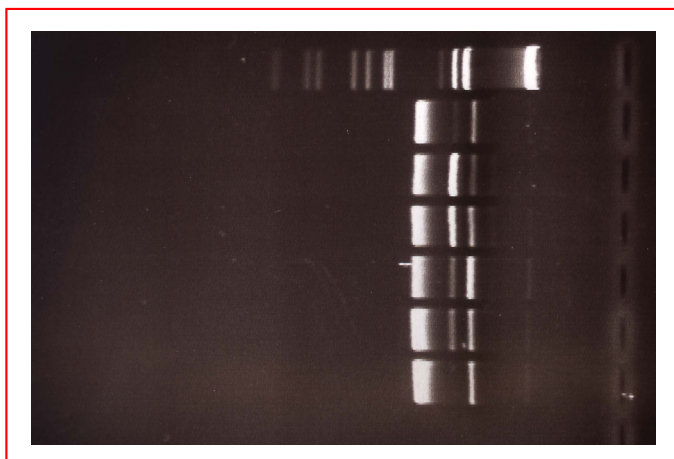
Außerdem zeigen beide bei 45°C inkubierte Ansätze eine verringerte Citrat-Synthase-Aggregation. Dies könnte eine Folge der Durchmischung in den Lösungen nach Zugabe des CpMip-Proteins bzw. der Puffer-Lösung sein.

3.2.2. Experimente zur Bestätigung der Chaperon-ähnlichen Aktivität des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* im NdeI-Testsystem

NdeI ist ein Restriktionsenzym aus *Neisseria denitrificans*. Der zirkuläre Vektor pBR-322 enthält eine Schnittstelle für dieses Enzym und sollte daher durch die nukleolytische Aktivität linearisiert werden. Dieses kann durch Elektrophorese der DNA nachgewiesen werden. NdeI wird durch Inkubation bei höheren Temperaturen inaktiviert. Das kann jedoch durch die Anwesenheit verschiedener Chaperone, wie z.B. α -Crystallin verhindert werden (Hess & FitzGerald, 1998; Santhoshkumar & Sharma, 2001). Mit weiteren Experimenten sollte die Chaperon-ähnliche Aktivität des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* durch Inkubation mit NdeI bei 50°C bestätigt werden.

3.2.2.1. Untersuchung der Mip-Proteine von *Legionella pneumophila* und *Chlamydia pneumoniae*

Dafür wurden 10 U NdeI zusammen mit 100 pmol *Chlamydia*-Mip-Protein für 1 Stunde bei 50°C inkubiert. Zum Vergleich diente ein Ansatz mit 10 U NdeI sowie 160 pmol *LpMip*-Protein. Gleichzeitig konnte eine Kontrolle mitgeführt werden, bei der die Protein-Lösung durch den ursprünglichen Puffer der CpMip-Proteinpräparation ersetzt worden war. Daneben wurde in einer Probe NdeI mit 20 mM Hepes pH 7,0 inkubiert. Ein analoger Ansatz diente auch als „Positivkontrolle“. In diesem Falle war das Restriktionsenzym jedoch für eine Stunde auf Eis gehalten worden. In der „Negativkontrolle“ wurde die NdeI-Lösung durch Wasser ersetzt. Nachfolgend wurden alle Proben mit 0,25 ng pBR-322-Vektor ergänzt. Nach der einstündigen Inkubation bei 37°C konnten die Ansätze elektrophoretisch aufgetrennt und die dabei entstandenen Banden durch Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die in diesem Experiment entstandenen Bandenmuster sind in der Abbildung 3.2.7. zu sehen.



Marker
 NdeI 50°C
 NdeI auf Eis
 NdeI+CpMip 50°C
 NdeI +LpMip 50°C
 NdeI+ filtrierter Puffer CpMip
 ohne NdeI

Abbildung 3.2.7.: Aktivitätstest von NdeI nach Inkubation bei 50°C mit CpMip sowie dem Mip-Protein von *Legionella pneumophila*. Zur Kontrolle wurde der Effekt verschiedener Puffer auf die NdeI-Inaktivierung untersucht. Außerdem mußte ein Ansatz auf Eis gehalten werden. Die mittlere Bande entspricht dem durch NdeI geschnittenen und somit linearem Vektor.

Allein für das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* sowie den Ansatz, der auf Eis inkubiert worden ist, kann eine kräftige Bande für den linearen Vektor nachgewiesen werden. Verschiedene Puffer sowie das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* sind offensichtlich nicht in der Lage, die Aktivität des Restriktionsenzym NdeI während der Inkubation bei 50°C zu bewahren.

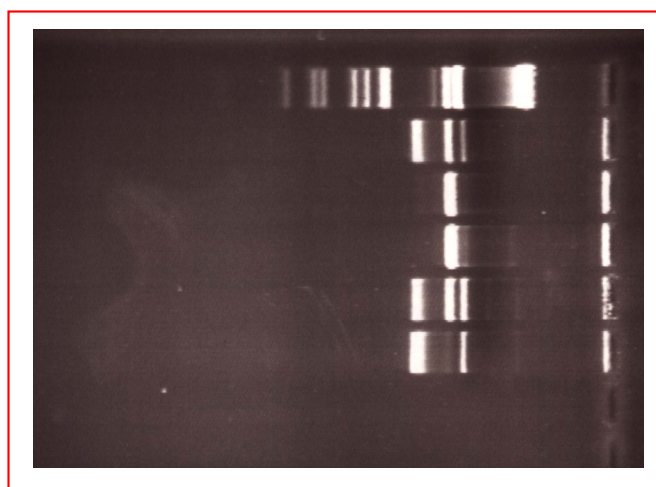
3.2.2.2. Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen dem Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* und NdeI

In einem weiteren Experiment sollte die Art der Wechselwirkung zwischen dem CpMip-Protein und NdeI im Testsystem besser charakterisiert werden. Dazu konnte ein bekanntes Chaperon-Substrat, GAPDH, verwendet werden. Bei einer Chaperon-Substrat-Wechselwirkung zwischen dem Mip-Protein und NdeI sollte ein Überschuß an GAPDH während der Inkubation bei 50°C in der Lage sein, NdeI vom CpMip zu verdrängen. Eine verringerte Aktivität des Restriktionsenzym wäre die Folge.

Dafür mußten 10 U NdeI zusammen mit 100 pmol *Chlamydia*-Mip-Protein und 188 nmol GAPDH versetzt werden. Anschließend wurde der Ansatz bei 50°C für 1 Stunde inkubiert. Als Vergleich diente eine Probe, bei der GAPDH durch die entsprechende Pufferlösung ausgetauscht worden war. Außerdem wurden 10 U NdeI zusammen mit

20 mM Hepes pH 7,0 (Puffer des *CpMip*-Proteins) und 35 mM Hepes pH 7,8 (Puffer von GAPDH) bei 50°C bzw. auf Eis inkubiert. In einem letzten Ansatz sollte Wasser mit 20 mM Hepes pH 7,0 und 35 mM Hepes pH 7,8 als „Negativkontrolle“ versetzt werden. Diese Probe wurde ebenfalls für eine Stunde auf Eis gehalten. Danach war es notwendig, den Vergleichsansatz sowie die verschiedenen Kontrollen mit GAPDH zu ergänzen. Die Probe mit GAPDH während der Inkubation bei 50°C wurde dagegen nur mit 35 mM Hepes pH 7,0 (Puffer von GAPDH) versetzt.

Schließlich erfolgte die Zugabe von 0,25 ng pBR 322. Während der sich anschließenden einstündigen Inkubation bei 37°C wurde einer vorhandenen nukleolytischen Aktivität erlaubt, den zugesetzten Vektor zu schneiden. Danach erfolgte die Auftrennung der Proben im Agarose-Gel und abschließend die Detektion einzelner Banden durch Ethidiumbromid im UV-Licht. Das eingescannte Agarose-Gel ist in der Abbildung 3.2.8. zu sehen.



Marker
 NdeI 50°C
 NdeI auf Eis
 NdeI+CpMip 50°C
 NdeI+CpMip+GAPDH 50°C
 ohne NdeI

Abbildung 3.2.8.: Ergebnis eines Aktivitätstests für das Restriktionsenzym NdeI nach der Inkubation bei 50°C in Anwesenheit von *CpMip*. Dabei wurde der Einfluß des Chaperon-Substrats GAPDH untersucht. In den Kontrollansätzen sollte ausschließlich NdeI bei 50°C bzw. auf Eis inkubiert werden. Außerdem wurde ein Ansatz ohne Restriktionsenzym mitgeführt. Die Bande mit mittlerer Laufgeschwindigkeit entspricht dem linearen Vektor.

Wie bereits beschrieben, ist das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* in der Lage, das Restriktionsenzym NdeI vor der Inaktivierung bei 50°C zu schützen. Dies beweist das Auftreten einer kräftigen Bande für den linearen Vektor im Gel. Die Zugabe des Chaperon-Substrats GAPDH im Überschuß kann diesen protektiven Effekt aufheben.

3.2.3. Untersuchungen zur Inhibition der Chaperon-ähnlichen Aktivität des *CpMip*-Proteins

FK506 stellt einen Inhibitor der Isomerase-Aktivität des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* dar. Aus diesem Grunde lag es nahe, dieses Makrolid auf seine Fähigkeit zu untersuchen, die Chaperon-ähnliche Aktivität des verwandten Proteins aus *Chlamydia pneumoniae* zu beeinflussen.

Dazu wurden 1 μM Citrat-Synthase zusammen mit 4 μM *CpMip* und 44 μM FK506, gelöst in DMSO, bei 45°C inkubiert. Ein Vergleichsansatz unterschied sich durch das Fehlen von FK506. Daneben wurde in Kontrollexperimenten die Aggregation von Citrat-Synthase in Gegenwart von DMSO bei 45°C bzw. 20°C untersucht. Von allen Proben mußte die Extinktion bei 360 nm zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.2.9. dargestellt.

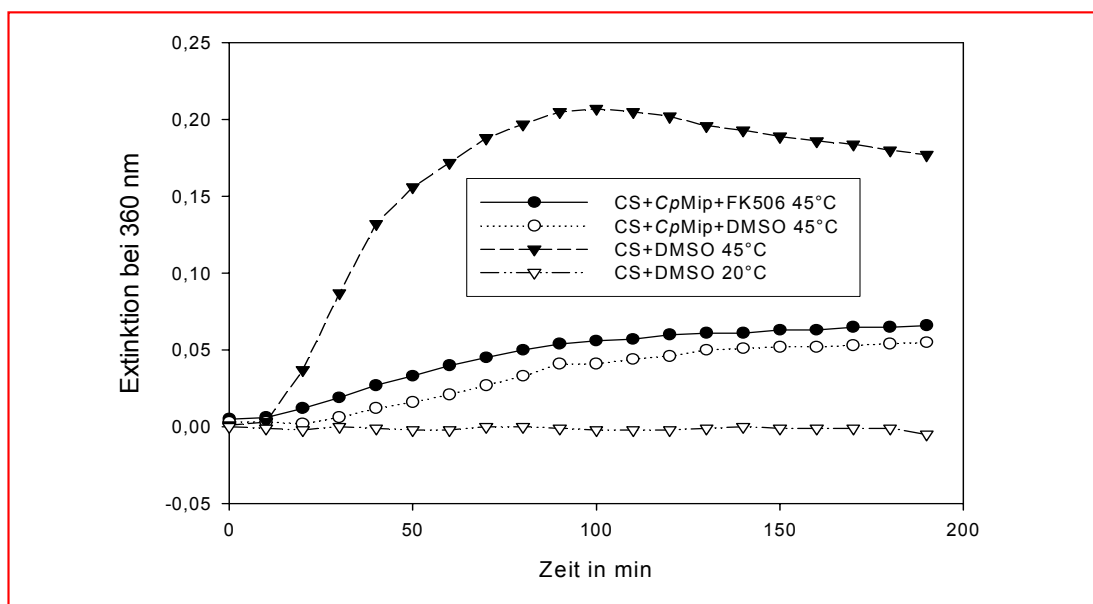


Abbildung 3.2.9.: Experiment zur Untersuchung des Effekts von FK506 im Citrat-Synthase-Aggregationsassay. Bewußt wurde eine Konzentration des *CpMip*-Proteins gewählt (4 μM), die die Aggregation nicht vollständig verhindert. Damit sollten auch geringe Veränderungen in der Chaperon-ähnlichen Aktivität nachgewiesen werden. Konzentration von Citrat-Synthase: 1 μM . FK506 wurde im 11-fachen Überschuß zum Mip-Protein verwendet.

Die Ansätze mit FK506 in DMSO und DMSO (inkubiert bei 45°C) unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt in ihrer Extinktion bei 360 nm. Damit ist FK506 nicht in der Lage, die Chaperon-ähnliche Aktivität des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* in diesem

Testsystem zu inhibieren. Es überrascht nicht, daß das Lösungsmittel DMSO selbst in der Lage ist, die Aggregation von Citrat-Synthase bei 45°C zu beeinflussen.

Durch reduzierende Bedingungen ist es möglich, den oligomeren Zustand des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* zu beeinflussen. In einem weiteren Experiment sollte daher geklärt werden, ob die „Dissoziation“ des Moleküls auch mit Veränderungen in der Chaperon-ähnlichen Aktivität einhergeht.

Zu diesem Zweck konnten 1 µM Citrat Synthase mit 10 µM CpMip und 5 mM DTT bei 45°C versetzt werden. Zum Vergleich diente ein entsprechender Ansatz ohne reduzierendes Zuckerthiol. Außerdem sollte eine Kontrolle allein mit Citrat-Synthase untersucht werden. Dieser Ansatz enthielt kein DTT und wurde ebenfalls bei 45°C inkubiert. Auch für diese Probe ohne Chaperon-ähnliche Aktivität wurde der zeitliche Verlauf der Extinktion (bei 360 nm) bei 45°C bestimmt (Abbildung 3.2.10.).

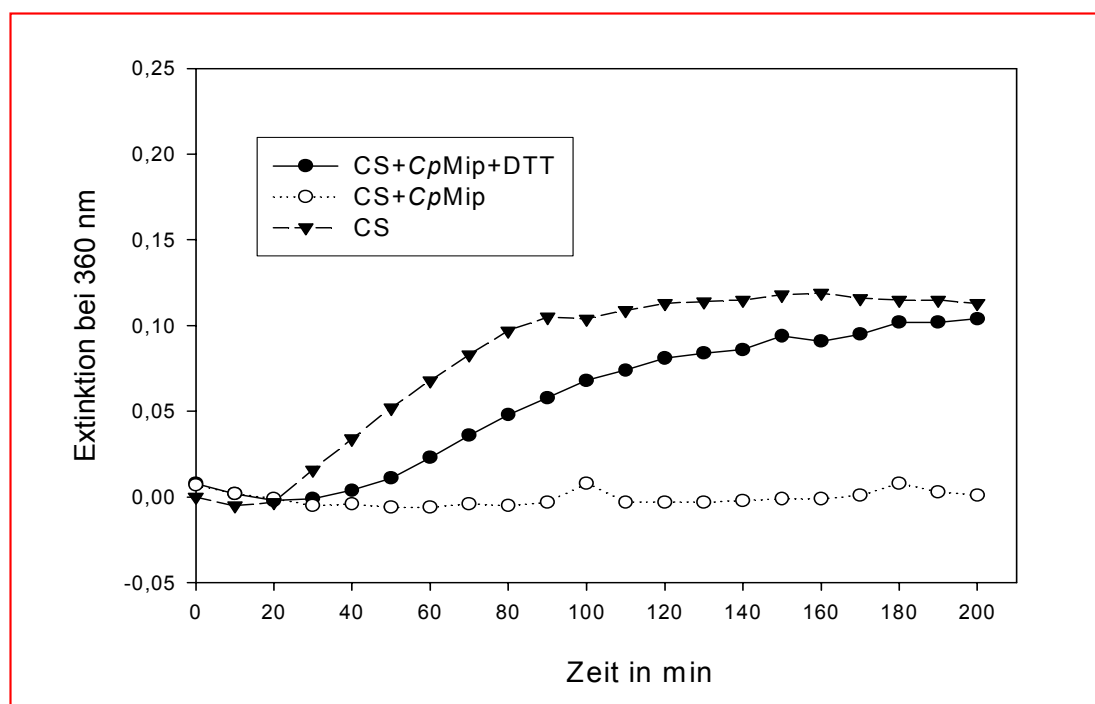


Abbildung 3.2.10.: Inkubation von Citrat-Synthase (1 µM) mit dem Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* (10 µM) bei 45°C unter reduzierenden Bedingungen (5 mM DTT). Als Kontrollen dienen Ansätze ohne DTT bzw. ohne CpMip und DTT.

Offensichtlich kommt es unter reduzierenden Bedingungen zu einer Verringerung der Chaperon-ähnlichen Aktivität des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae*. Dies

beweist die Extinktionszunahme bei 360 nm im Vergleich zum Ansatz ohne DTT. Jedoch ist die Fähigkeit des Moleküls, die Aggregation von Citrat-Synthase bei 45°C zu verhindern, nicht vollständig verlorengegangen. Die Trübung der Citrat-Synthase-Lösung ohne *CpMip* ist noch immer deutlich stärker.

Um auszuschließen, daß die Extinktionszunahme unter reduzierenden Bedingungen durch eine Denaturierung des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* bzw. eine verstärkte Aggregation von Citrat-Synthase hervorgerufen wird, waren weitere Untersuchungen notwendig.

Dazu wurden 1 µM Citrat-Synthase bei 20°C bzw. 45°C untersucht. Daneben mußte ein Ansatz mit 1 µM des Enzyms und 5 mM DTT bei 45°C gehalten werden. Außerdem wurden 10 µM *CpMip* in Gegenwart von 5 mM DTT (Temperatur: 45°C) inkubiert. Die Abbildung 3.2.11. zeigt den zeitlichen Verlauf der Extinktion bei 360 nm für alle vier Lösungen.

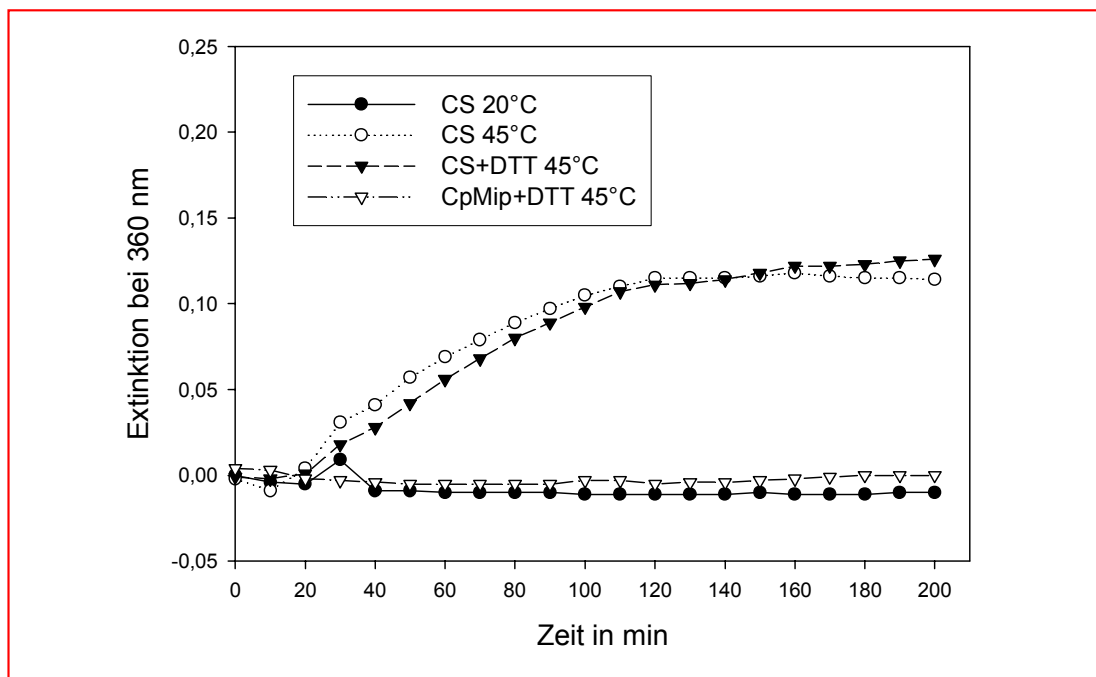


Abbildung 3.2.11.: Kontrolluntersuchung zur Bestimmung des Einflusses reduzierender Bedingungen auf die Aggregation von Citrat-Synthase und *CpMip* bei 45 °C.

Die Extinktionsverläufe bei 360 nm für die Proben mit Citrat-Synthase (inkubiert bei 45°C) unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen sind praktisch gleich.

Für das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* konnte unter reduzierenden Bedingungen bei 45°C keine Proteinaggregation nachgewiesen werden.

3.3. Gel-Elektrophoretische Untersuchungen an den Mip-Proteinen von *Legionella pneumophila* und *Chlamydia pneumoniae*

3.3.1. Experimente mit dem Mip-Protein aus *Legionella pneumophila* zur Identifizierung von Strukturveränderungen durch oxidierende Bedingungen

Der erweiterte „Methionin-Zipper“ stellt ein ungewöhnliches strukturelles Element in der Dimerisierungsdomäne des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* dar. Die Oxidation von beteiligten Resten könnte zu einer Konformationsänderung sowie Monomerisierung des *LpMip*-Proteins führen. Zur deren Identifizierung sollten verschiedene Gel-Elektrophorese-Experimente durchgeführt werden.

3.3.1.1. Native Gel-Elektrophorese mit wtMip

Bei der nativen Gel-Elektrophorese werden Moleküle auf Grund ihrer Größe bzw. Form sowie Ladung aufgetrennt. Im Falle einer Konformationsänderung oder Monomerisierung des Mip-Proteins durch die Sulfoxidation von Methionin-Resten sollte dies mit dieser Methode nachweisbar sein. MsrA ist in Anwesenheit von GSH oder DTT in der Lage, sulfoxidierte Methionin-Reste spezifisch wieder zu reduzieren.

In drei Proben wurden je 12 µg Mip-Protein mit 0,2 % v/v Wasserstoffperoxid für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Gleichzeitig mußte zu Vergleichszwecken *LpMip* unter den o.g. Bedingungen mit Wasser versetzt werden. Die Ansätze mit dem vermutlich nun oxidierten Mip wurden nachfolgend entweder mit 13,4 µg MsrA, 2 µmol DTT oder dem Puffer der MsrA-Präparation sowie 2 µmol DTT bzw. dem Puffer der Proteinpräparation und Wasser ergänzt. Auch für die Vergleichsprobe erfolgte eine Zugabe von MsrA-Puffer und Wasser. Nach einer weiteren Inkubation für 30 Minuten bei 20°C konnten die verschiedenen Ansätze elektrophoretisch aufgetrennt werden. Außerdem wurde eine Probe mitgeführt, bei der 13,4 µg MsrA unmittelbar vor der nativen Gel-Elektrophorese mit 0,2 % v/v Wasserstoffperoxid und 2 µmol DTT versetzt worden waren. Die nach der Auftrennung und Coomassie-Färbung erhaltenen Banden sind in der Abbildung 3.3.1. dargestellt.

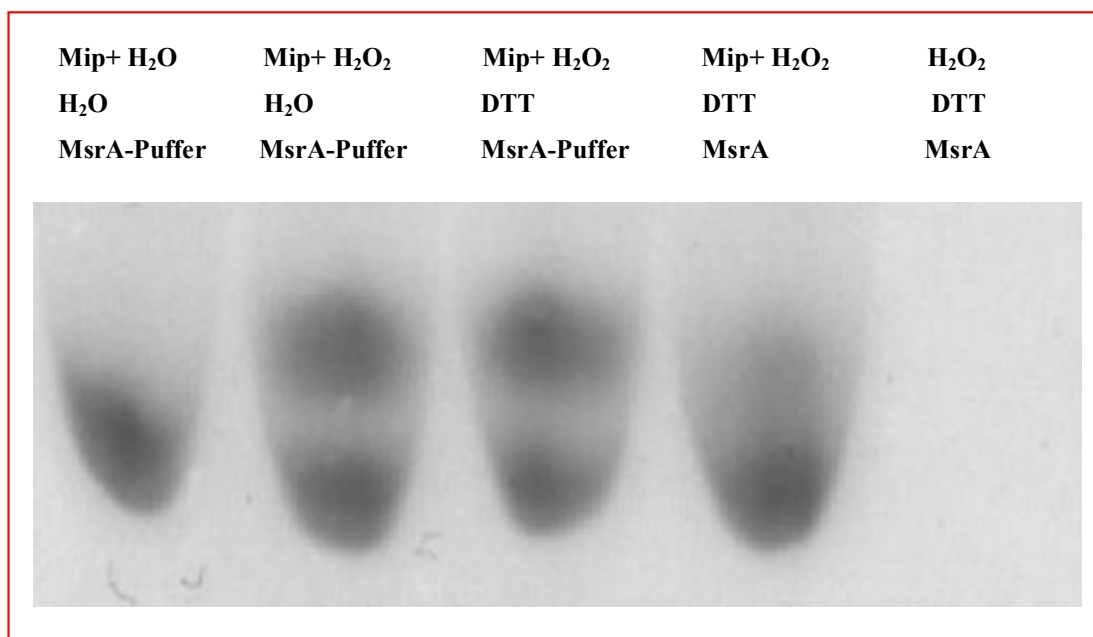


Abbildung 3.3.1.: Native Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* nach der Inkubation mit H₂O₂ und MsrA-Aktivität sowie verschiedener Kontrollansätze.

Durch die Einwirkung von Wasserstoffperoxid auf das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* kommt es zum Auftreten einer zusätzlichen Proteinbande mit verringerter Laufgeschwindigkeit im nativen Gel. Sulfoxidierte Methionin-Reste müssen die Grundlage dafür sein. Konnte doch durch Inkubation mit MsrA-Aktivität das ursprüngliche Laufverhalten des Proteins überwiegend wieder hergestellt werden. Die Sulfoxidierung von Methionin-Resten führt keine Ladung in das Molekül ein. Somit kann nur eine Konformationsänderung das Auftreten der neuen Bande im nativen Gel erklären.

3.3.1.2. Untersuchungen am N-terminalen Fragment Mip 49

Das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* enthält neben Met-38, Met-42 und Met-46 weitere Methionin-Reste (Met-58, Met-70 und Met-169). Diese sind C-terminal vom „Zipper“ lokalisiert. Die beschriebenen Veränderungen nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid könnten daher auch durch diese Aminosäuren vermittelt werden. Daher sollte das N-terminale Fragment Mip 49 (besteht aus den N-terminalen 49 Aminosäuren) bzgl. des Laufverhaltens im nativen Gel nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid

untersucht werden. Dieses Molekül besteht allein aus den ersten 49 Aminosäureresten des *LpMip*.

Im einzelnen wurden 120 pmol Mip 49 unter 0,2 % v/v H₂O₂ für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Vergleich diente ein Ansatz, bei dem das Fragment mit Wasser ergänzt worden war. Außerdem sollte eine Probe von Mip 49 ohne Inkubation mitgeführt werden. Nach der elektrophoretischen Auftrennung mußte das Proteinfragment vor der Coomassie-Färbung mit Glutardialdehyd im Gel fixiert werden. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in der Abbildung 3.3.2. zu sehen.

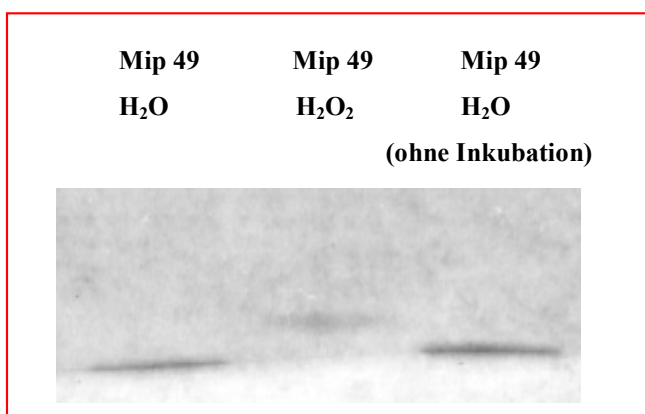


Abbildung 3.3.2.: Veränderung der Laufgeschwindigkeit des *LpMip*-Fragmentes Mip 49 im nativen Gel nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid.

Das Proteinfragment Mip 49 zeigt ebenfalls eine verringerte Laufgeschwindigkeit im nativen Gel nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid. Dies macht eine Strukturveränderung durch die Reste des „Methionin-Zippers“ wahrscheinlich.

3.3.1.3. Denaturierende Gel-Elektrophorese des *LpMip*-Proteins nach Inkubation unter oxidierenden Bedingungen und Quervernetzung durch DMP

Die bisher unter nativen Bedingungen ausgeführten Experimente gestatten nur den allgemeinen Nachweis einer Strukturveränderung durch die Sulfoxidation von Methionin-Resten. Zum Nachweis der Monomerisierung ist eine Untersuchung des Proteins in Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat und Harnstoff möglich. Bei dieser Methode kommt es zur Auftrennung von Molekülspecies in Abhängigkeit vom Molekulargewicht. Dabei wird das Protein jedoch auch denaturiert. Da das Dimere für

das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* über nichtkovalente Wechselwirkungen gebildet wird, mußte der oligomere Zustand vor der Gel-Elektrophorese durch die kovalente Quervernetzung mittels Pimelindiimidsäure-dimethylester-dihydrochlorid (DMP) konserviert werden. Dieses bifunktionelle Reagenz verbindet kovalent räumlich assoziierte primäre Aminogruppen (Köhler, 2000).

38 µg Mip-Protein von *Legionella pneumophila* wurden mit 0,25 % v/v H₂O₂ für 17 Stunden bei 37°C inkubiert. In der Vergleichsprobe mußte das LpMip allein mit Wasser versetzt werden. Danach wurden beide Ansätze mit 23 mM DMP ergänzt. Die Quervernetzung erfolgte für eine Stunde bei 20°C unter basischen Bedingungen. Schließlich konnte nach Zugabe von SDS-Probenpuffer die Auftrennung der Proben sowie eine Coomassie-Färbung des erhaltenen Polyacrylamid-Gels erfolgen. Abbildung 3.3.3. zeigt das erhaltene Bandenmuster.

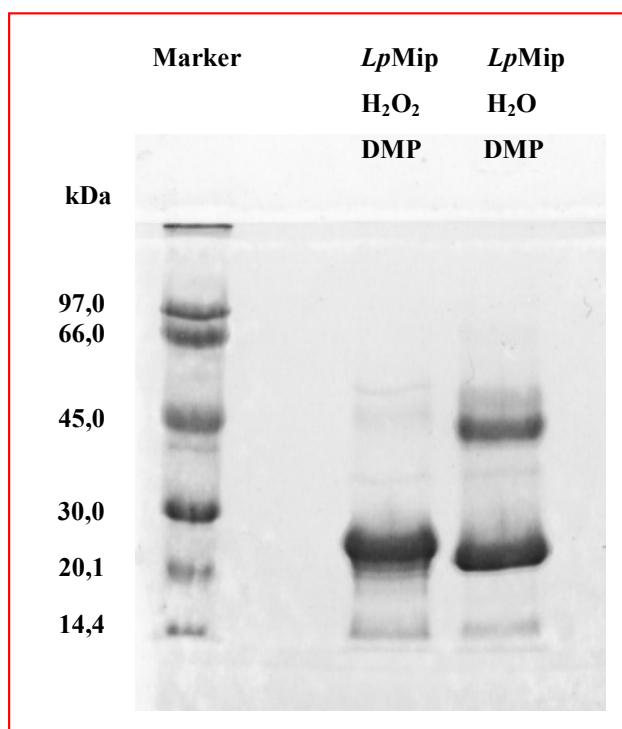


Abbildung 3.3.3.: Denaturierende Gel-Elektrophorese des wtMip-Proteins von *Legionella pneumophila* nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid bzw. Wasser und „Crosslinking“ mittels DMP. Die linke Spur zeigt den Molekulargewichtsmarker.

Offensichtlich führt die Inkubation unter oxidierenden Bedingungen zu einer Abnahme der Dimerkonzentration für das Mip-Protein von *Legionella pneumophila*.

In einem Kontrollversuch mußte überprüft werden, ob Wasserstoffperoxid selbst in der Lage ist, die Vernetzungsreaktion durch DMP zu beeinträchtigen.

Daher wurden in einem weiteren Experiment 19 µg der *LpMip*-Mutante Y185A mit 0,5 % v/v Wasserstoffperoxid für 24 Stunden bei 37°C versetzt. Die Vergleichs-inkubation (Y185A mit Wasser für 24 Stunden bei 37°C) mußte vor der Vernetzung beider Proben durch DMP (25 mM) mit H₂O₂ ergänzt werden. Das Ergebnis der denaturierenden Gel-Elektrophorese beider Ansätze ist in der Abbildung 3.3.4. dargestellt.

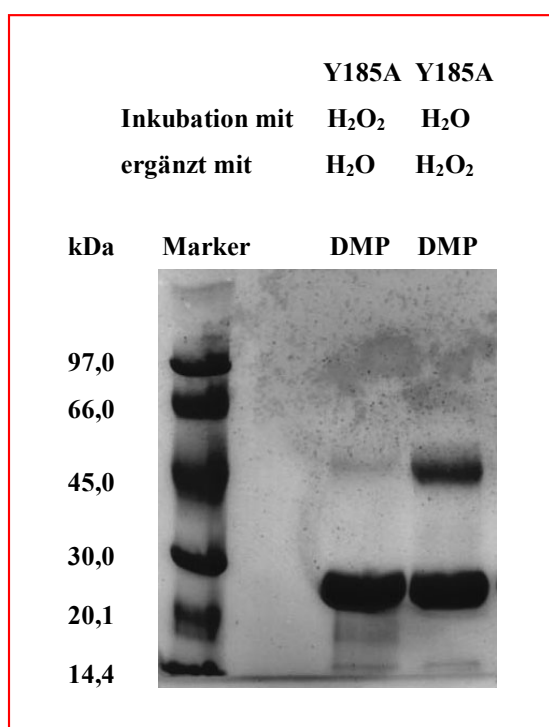


Abbildung 3.3.4.: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel für die Mutante Y185A nach Quervernetzung in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Die mittlere Spur zeigt das mutierte Mip-Protein nach längerer Inkubation unter oxidierenden Bedingungen. In der linken Spur wurde der Molekulargewichtsmarker aufgetrennt.

Die Quervernetzung wird durch Anwesenheit von Wasserstoffperoxid nicht wesentlich beeinträchtigt. Zugleich konnte mit diesem Experiment auch die Dimerisierung der C-terminalen Mutante Y185A bestätigt werden. Dabei führt die längere Inkubation unter oxidierenden Bedingungen, wie beim Wildtyp-Protein, zum Verlust der dimeren Struktur.

3.3.1.4. Denaturierende Gel-Elektrophorese des oxidierten *LpMip* nach Inkubation mit MsrA-Aktivität und Quervernetzung

Zum Nachweis, daß die Monomerisierung tatsächlich durch die Sulfoxidation von Methionin-Resten vermittelt wird, wurde wieder humanes MsrA verwendet.

Zunächst mußten 244 µg Mip-Protein von *Legionella pneumophila* mit 3 % H₂O₂ für 17 Stunden bei 37°C möglichst vollständig oxidiert werden. Danach erfolgte durch die Zugabe von 3 µg Catalase ein Abbau des vorhandenen Wasserstoffperoxids. Der erhaltene Ansatz wurde geteilt. Eine Probe sollte mit 13,4 µg MsrA und 4 µmol DTT für 30 Minuten bei 20°C inkubiert werden. In der Kontrolle fehlte DTT. Abschließend konnte die Quervernetzung in 36 mM DMP unter basischen Bedingungen durchgeführt (1 Stunde bei 20°C) werden. Beide Ansätze wurden unter denaturierenden Bedingungen in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt (Abbildung 3.3.5.).

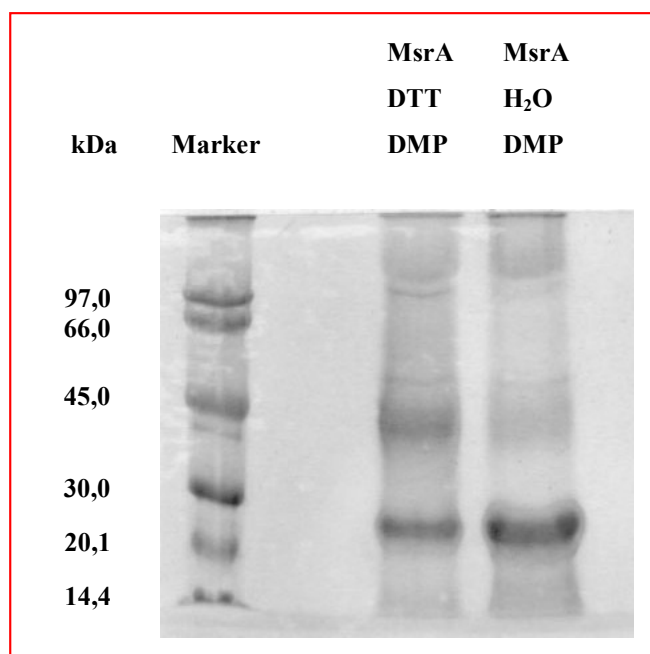


Abbildung 3.3.5.: Denaturierende Gel-Elektrophorese von oxidiertem *LpMip*-Protein nach Inkubation mit MsrA-Aktivität sowie Quervernetzung. Die rechte Spur diente als Kontrolle. Hier konnte MsrA durch das Fehlen von DTT keine Methionin-Reste reduzieren. Außerdem ist der Molekulargewichtsmarker zu sehen.

Offensichtlich ist MsrA in der Lage, die Konzentration des dimeren Mip-Proteins nach Inkubation unter oxidierenden Bedingungen wieder zu erhöhen. Somit muß die

Monomerisierung des Moleküls tatsächlich auf die Sulfoxidation von Methionin-Resten zurückzuführen sein.

3.3.2. Untersuchungen am Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* nach Inkubation unter reduzierenden Bedingungen

In der N-terminalen Dimerisierungsdomäne des *Chlamydia*-Mip-Proteins sind zwei Cystein-Reste lokalisiert. Dies ermöglicht eine Veränderung der (oligomeren) Struktur unter reduzierenden Bedingungen und sollte im folgenden untersucht werden.

3.3.2.1. Native Gel-Elektrophorese mit CpMip

36 µg des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* wurden mit 2,5 mM bzw. 5 mM DTT für 30 Minuten bei 20°C inkubiert. Zum Vergleich diente ein Ansatz mit dem Mip-Protein ohne DTT. Beide Proben mußten unter nativen Bedingungen in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden. Dieses wurde Coomassie-gefärbt. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in der Abbildung 3.3.6. dargestellt.

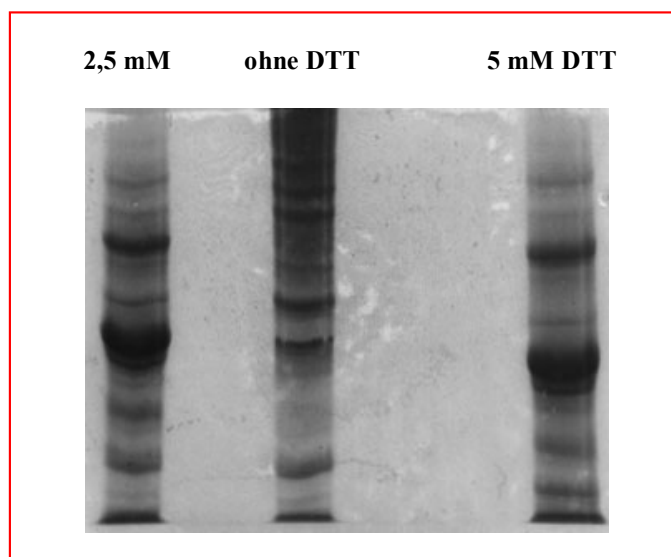


Abbildung 3.3.6.: Native Gel-Elektrophorese des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* nach Inkubation unter reduzierenden Bedingungen.

Im nativen Polyacrylamid-Gel werden für das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* zahlreiche Banden, insbesondere mit einer geringen Laufgeschwindigkeit, beobachtet. Wahrscheinlich lagern sich (bei der verwendeten hohen Proteinkonzentration) Mip-

Moleküle zu Aggregaten unterschiedlicher Größe zusammen. Durch die Verwendung von DTT kann diese „Aggregation“ verringert werden: Insbesondere kommt es für eine einzelne Bande mit größerer Laufgeschwindigkeit zur Intensitätszunahme. Dagegen können langsame Molekülspecies unter reduzierenden Bedingungen kaum noch nachgewiesen werden.

3.3.2.2. Denaturierende Gel-Elektrophorese des Mip-Proteins nach Inkubation unter reduzierenden Bedingungen

60 µg CpMip konnten mit 2,5 mM DTT für 10 min bei 20°C inkubiert werden. In einem Kontrollansatz war kein DTT vorhanden. Beide Proben wurden danach mit SDS-Probenpuffer versetzt und die denaturierten Proteine elektrophoretisch aufgetrennt. Das Polyacrylamid-Gel wurde Coomassie-gefärbt. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in der Abbildung 3.3.7. gezeigt.

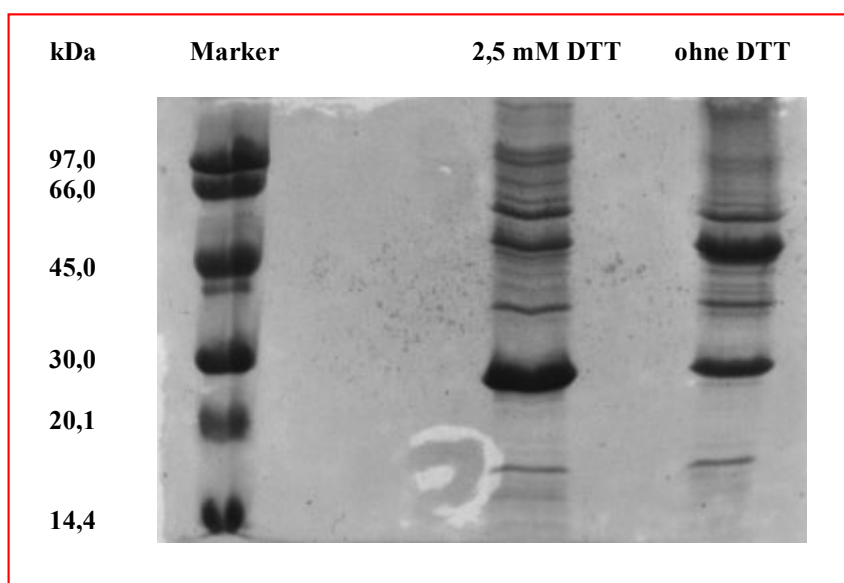


Abbildung 3.3.7.: SDS-Gel-Elektrophorese des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* nach Inkubation unter reduzierenden bzw. leicht oxidierenden Bedingungen. In der linken Spur ist der Molekulargewichtsmarker aufgetrennt.

Die verwendete Proteinpräparation weist Verunreinigungen auf. Trotzdem wird deutlich, daß das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* unter denaturierenden Bedingungen überwiegend als Dimeres vorliegt. Durch Zugabe von DTT verschwindet die Dimerbande (Molekulargewicht von ca. 60 kDa) fast vollständig. Dafür nimmt die Bande für das monomere Protein, korrespondierend zu einem Molekulargewicht von etwa

30 kDa, an Intensität zu. Somit sind in der untersuchten Proteinpräparation Disulfid-Brücken zwischen Monomeren des Mip-Proteins ausgebildet. „Höhere“ Aggregate (z.B. Trimere) durch die Ausbildung von kovalenten Bindungen konnten nicht nachgewiesen werden.

3.3.3.1. Native Gel-Elektrophorese des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen

Für Chaperone ist die „Dissoziation“ von durch Selbstaggregation bedingten großen Proteinaggregaten bei höheren Temperaturen beschrieben worden (Haslbeck *et al.*, 1999). Es sollte untersucht werden, ob dieser Effekt auch beim CpMip beobachtet werden kann, da für dieses Molekül eine „Haltefunktion“ nachgewiesen wurde .

Je 5 µl Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* (30 mg/ml in 20 mM HEPES pH 7,0 verdünnt 1:10 mit 20 mM HEPES pH 7,0) wurden für eine Stunde bei 4°C bzw. 45°C inkubiert und anschließend auf ein natives 12,5 %-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Proteinproben wurden im elektrischen Feld aufgetrennt und das Gel abschließend Coomassie-gefärbt. Das Ergebnis dieses Experimentes ist in Abbildung 3.3.8. dargestellt.

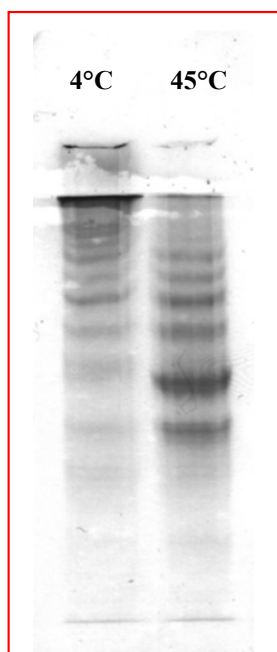


Abbildung 3.3.8.: Native Gel-Elektrophorese des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* nach Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen.

Die Inkubation des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* bei 45°C führt nicht zur Aggregation. Im Gegenteil, es kommt zu einer Intensitätszunahme für Banden mit geringer Laufgeschwindigkeit, wie für Chaperone beobachtet.

3.3.3.2. Einfluß von Octyl- β -D-glucopyranosid auf die Aggregation des CpMip-Proteins

Chaperone binden häufig über hydrophobe Bindungsstellen ihre Substrate. Daher sollte ein Detergenz eine mögliche Selbstaggregation dieser Proteine verringern.

Je 3 μ l *Chlamydia*-Mip-Protein (30 mg/ml in 20 mM HEPES pH 7,0 verdünnt 1:10 mit 20 mM HEPES pH 7,0) wurden mit 3 μ l Octyl- β -D-glucopyranosid-Lösung (14 mg in 1 ml H₂O) bzw. 3 μ l Wasser versetzt. Unmittelbar danach erfolgte die Auftrennung der Proben durch native Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. Das 12,5 %-Gel mußte danach Coomassie-gefärbt werden. Das erhaltene Bandenmuster ist in der Abbildung 3.3.9. zu sehen.

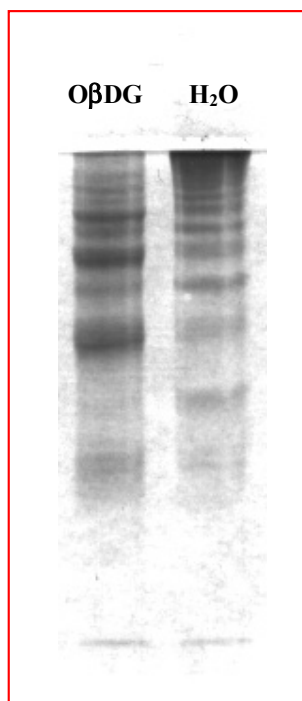


Abbildung 3.3.9.: Veränderungen im Bandenmuster durch ein Detergenz für das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* nach nativer Gel-Elektrophorese.

Octyl- β -D-glucopyranosid führt zu einer Veränderung des Bandenmusters im nativen Gel. Wahrscheinlich löst dieses Detergenz große Aggregate, wie der „Verlust“ von

Banden mit geringer Laufgeschwindigkeit zeigt. Die Wechselwirkungen zwischen einzelnen *CpMip*-Species sollten daher, wie für viele Chaperone oder Chaperon-ähnliche Moleküle typisch, einen hydrophoben Charakter besitzen.

3.4. CD-Spektroskopische Untersuchungen

3.4.1. CD-Spektroskopische Untersuchungen des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* bei verschiedenen Temperaturen

Allein das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* zeigte in zwei verschiedenen Testsystemen Chaperon-artige Aktivität. Für das homologe Protein aus *Legionella pneumophila* konnte keine „Haltefunktion“ nachgewiesen werden. Im verwendeten *in-vitro*-Testsystem wurden das Molekül bei 45°C bzw. 50°C untersucht. Unter diesen Bedingungen könnte es im *LpMip* zu einer dramatischen Konformationsänderung mit Verlust seiner Funktion kommen. Um dieses auszuschließen, sollten CD-Spektren für das Protein bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen werden.

Für das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* wurden CD-Spektren bei 20°C, 30°C, 40°C, 45°C, 50°C sowie 60°C aufgenommen. Die Proteinkonzentration betrug 0,3 mg/ml. Als Puffer wurden 100 mM Phosphat pH 7,8 verwendet. Die Spektren sind in der Abbildung 3.4.1. zusammengefaßt.

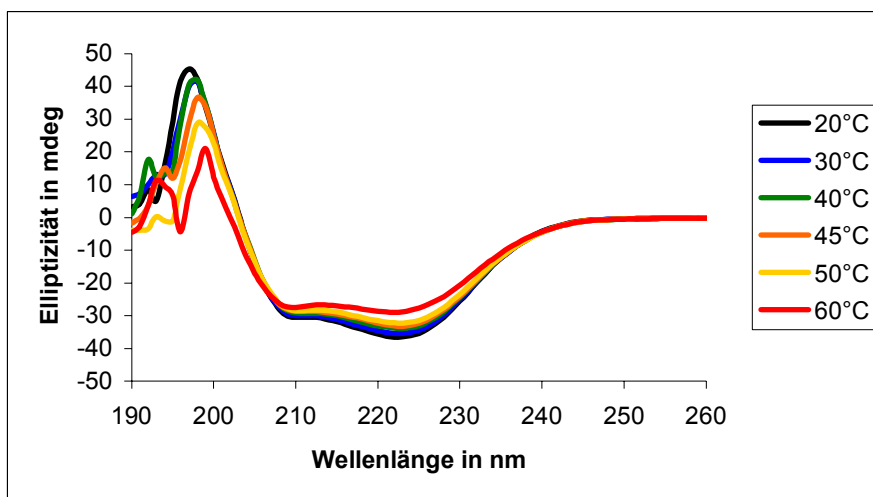


Abbildung 3.4.1.: CD-Spektren des Mip-Proteins im fernen UV, aufgenommen bei unterschiedlichen Temperaturen (Proteinkonzentration: 0,3 mg/ml; Pufferbedingungen: 100 mM Phosphat pH 7,8).

Die Intensität der Extrema in den verschiedenen CD-Spektren verringert sich kontinuierlich mit zunehmender Temperatur. Zu einer deutlichen Verschiebung des „Nulldurchganges“ hin zu einer kürzeren Wellenlänge kommt es jedoch erst bei einer Temperatur von 60°C. Somit kann weder bei 45°C noch bei 50°C eine dramatische Strukturveränderung im Mip-Protein von *Legionella pneumophila* angenommen werden.

3.4.2. CD-Spektroskopische Untersuchungen am oxidierten Mip-Protein von *Legionella pneumophila*

Die Inkubation des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* unter oxidativen Bedingungen führt zur Monomerisierung sowie einer bemerkenswerten Verringerung der Laufgeschwindigkeit im nativen Gel. Für eine Charakterisierung der zugrunde liegenden Strukturveränderungen, konnten die Unterschiede im CD-Spektrum zwischen dem „nativen“ und dem oxidierten Molekül genutzt werden.

105 µg Mip-Protein von *Legionella pneumophila* (Proteinkonzentration 2,1 mg/ml) wurden mit 3 % v/v H₂O₂ für 17 Stunden bei 20°C inkubiert. Die hohe Wasserstoffperoxid-Konzentration sollte für eine möglichst vollständige Oxidation des Mip-Proteins sorgen. Zum Vergleich diente ein Ansatz des Mip-Proteins, der mit Wasser versetzt worden war.

Zur Kontrolle wurden nach der Inkubation Proben der beiden Ansätze in einem nativen Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Coomassie-Färbung fand sich für die Inkubation mit H₂O₂ eine Bande mit geringer Laufgeschwindigkeit, wie sie für das sulfoxidierte Mip-Protein typisch ist. Nichtoxidiertes Protein konnte praktisch nicht mehr nachgewiesen werden. Leider zeigte die Bande für das sulfoxidierte Mip eine schwächere Intensität im Vergleich zum Protein, das mit Wasser inkubiert worden war. Dafür konnte am Auftragungsort noch Protein nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich eine zusätzliche, sehr schwache Bande mit einer größeren Laufgeschwindigkeit (Abbildung 3.4.2.).

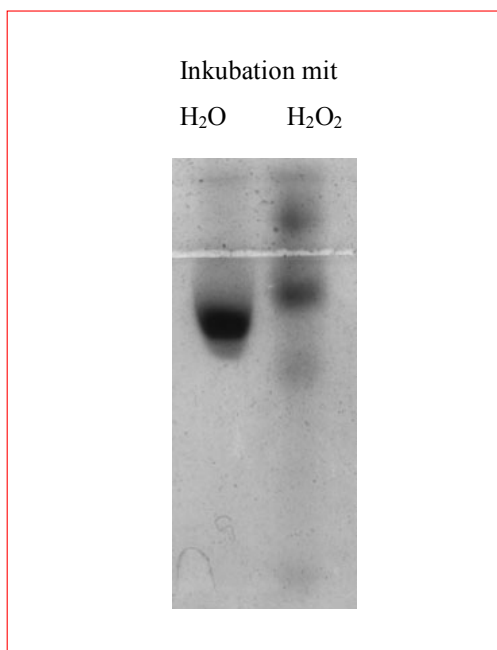


Abbildung 3.4.2.: Native Gel-Elektrophorese des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* nach der Inkubation mit Wasserstoffperoxid bzw. Wasser.

Die verbleibenden Proteinlösungen wurden verdünnt und gegen 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,8 dialysiert. Nachfolgend mußte für beide Ansätze die Proteinkonzentration bestimmt werden. Sie betrug für das mit Wasserstoffperoxid inkubierte Mip etwa 0,2 mg/ml. Für den Kontrollansatz wurde eine Proteinkonzentration von 0,3 mg/ml nachgewiesen. Von den nun in Phosphat umgepufferten Proben wurden CD-Spektren bei 20°C aufgenommen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.4.3.a und 3.4.3.b dargestellt.

Abbildung 3.4.3.a

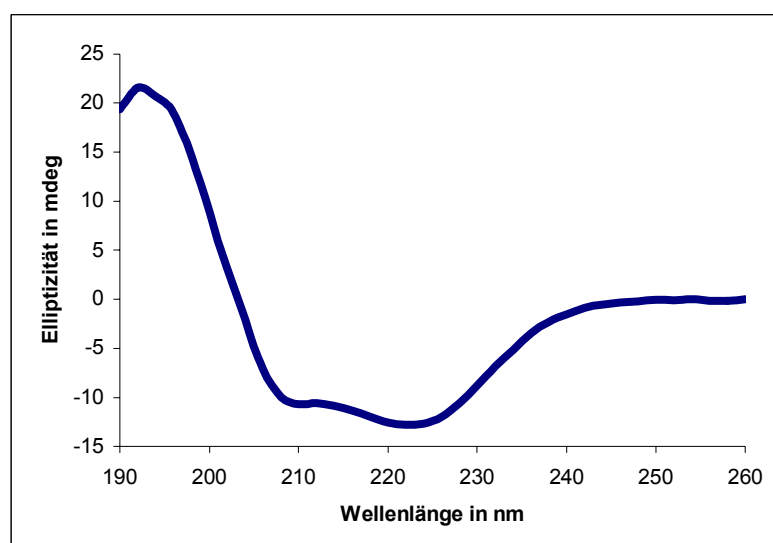
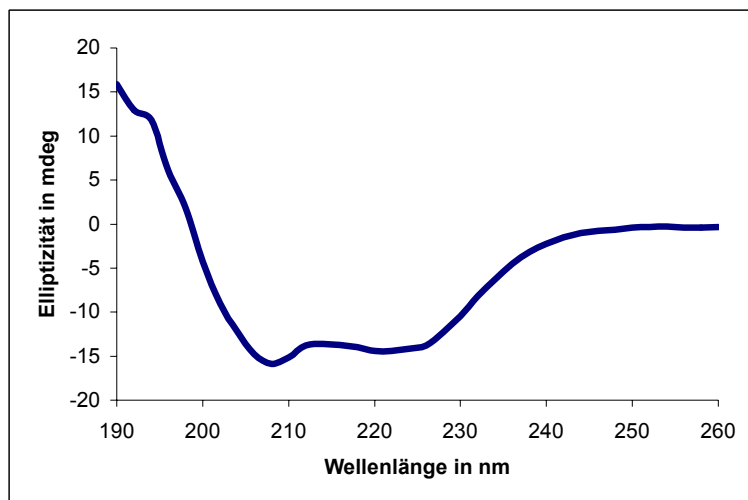


Abbildung 3.4.3.b



Abbildungen 3.4.3.: CD-Spektren des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* im UV: **a)** inkubiert mit Wasser; **b)** inkubiert mit Wasserstoffperoxid. Die Proteinkonzentration betrug für die vorher mit Wasserstoffperoxid inkubierte Probe 0,19 mg/ml. Im Kontrollansatz konnte 0,30 mg/ml *LpMip* nachgewiesen werden. Als Puffer wurden 50 mM Phosphat pH 7,8 verwendet.

Die CD-Spektren des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* nach der Inkubation mit Wasser bzw. Wasserstoffperoxid unterscheiden sich nur wenig. Das CD-Spektrum des Mip-Proteins besitzt ein Maximum bei 191-193 nm sowie Minima bei 222 nm und 208-210 nm, typisch für Moleküle mit überwiegend α -helikaler Struktur (Yang *et al.*, 1986). Nach der Oxidation verringert sich die Intensität des Maximums bei geringer Wellenlänge und das Minimum bei 208-210 nm dominiert. Außerdem verschiebt sich der „Nulldurchgang“ der Funktion hin zu niedrigerer Wellenlänge. Dies läßt auf eine Zunahme des Anteils von „Random-Coil“-Struktur auf Kosten des α -helikalen Anteils schließen.

3.4.3. CD-spektroskopische Untersuchung der isolierten Helix 2 der N-terminalen Domäne

Zwischen den Helices 2 beider Monomere wird im dimeren Mip-Protein von *Legionella pneumophila* der erweiterte „Methionin-Zipper“ ausgebildet. Seine Oxidation führt wahrscheinlich zur „Dissoziation“ des Dimers sowie einer strukturellen Umordnung im Molekül. Dabei ist es denkbar, daß die isolierte Helix 2 auf Grund ihres amphipathischen Charakters bereits die entsprechende Sekundärstruktur ausbildet. Die Sulfoxidation von

Methionin-Resten (Zunahme der Polarität) stört diese Organisation. In diesem Falle sollte durch Inkubation unter oxidierenden Bedingungen ein Wechsel von der helikalen zur „Random-Coil“- oder auch β -Faltblatt-artigen Struktur im CD-Spektrum zu verfolgen sein.

0,5 mg des 13mer-Peptids PEAMAKGMQDAMS-NH₂ (Sequenz entspricht der Helix 2 im Mip-Protein von *Legionella pneumophila*) wurden in 1000 μ l 50 mM Phosphat pH 7,8 gelöst. Anschließend wurde von dieser Lösung ein CD-Spektrum aufgenommen. Dieses ist in der Abbildung 3.4.4. zu sehen.

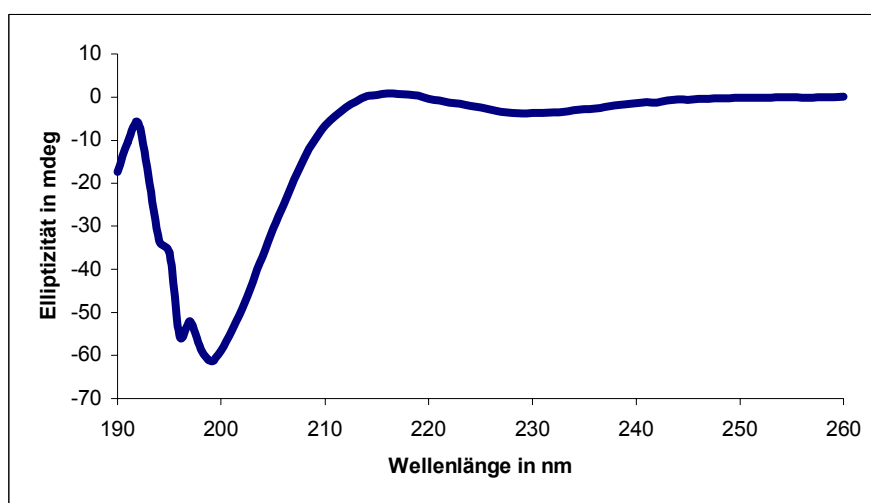


Abbildung 3.4.4.: CD-Spektrum eines Peptids entsprechend der Sequenz der Helix 2 des *LpMip*-Proteins. PDB ID: 1FD9 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Es war in 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,8 gelöst. Die Peptidkonzentration betrug 0,5 mg/ml.

Das Spektrum weist ein ausgeprägtes Minimum bei einer Wellenlänge von etwa 200 nm auf, wie es für ein „Random-Coil“ charakteristisch ist (Yang *et al.*, 1986). Außerdem zeigt sich ein angedeutetes breites Minimum bei größerer Wellenlänge. Die größte Intensität erreicht dieses bei einer Wellenlänge von ungefähr 230 nm. Offensichtlich ist die isolierte Helix 2 ein „Zufallsknäuel“.

3.4.4. CD-spektroskopische Untersuchung der isolierten Verbindungshelix zwischen N-terminaler (Dimerisierungs-) und FKBP-ähnlicher Domäne des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila*

Im Mip-Protein von *Legionella pneumophila* verbindet eine extrem lange (65 Å) α -Helix die N-terminale Dimerisierungs- mit der C-terminalen FKBP-ähnlichen Domäne. Um zu untersuchen, ob diese Helix eine intrinsische Fähigkeit zur Ausbildung ihrer Sekundärstruktur besitzt, mußte die isolierte Aminosäuresequenz mit Hilfe der CD-Spektroskopie untersucht werden.

0,5 mg des 45mer-Peptids TEQQM KDVLN KFQKD LMAKR TAEFN KKADE NKVKG EAFLT ENKNK (entsprechend der Sequenz der langen Verbindungshelix zwischen N-terminaler und FKBP-ähnlicher Domäne im Mip-Protein von *Legionella pneumophila*) wurden in 1000 μ l 50 mM Phosphat pH 7,8 gelöst. Nachfolgend wurde diese Probe im CD-Spektrophotometer vermessen. Das bei 25°C erhaltene Spektrum ist in der Abbildung 3.4.5. gezeigt.

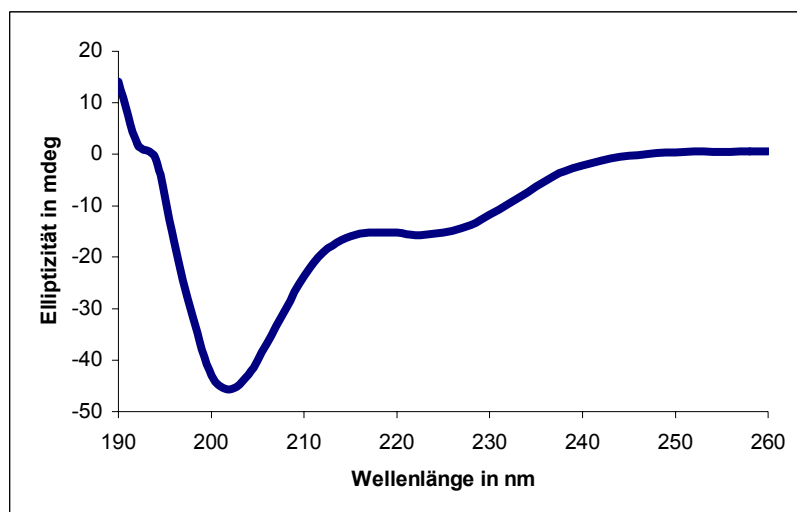


Abbildung 3.4.5.: CD-Spektrum der isolierten Verbindungshelix zwischen Dimerisierungs- und FKBP-ähnlicher Domäne. PDB ID: 1FD9 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Die Peptidkonzentration betrug 0,5 mg/ml in 50 mM Phosphat-Puffer pH 7,8. Das Spektrum wurde bei 25°C aufgenommen.

Das Spektrum zeigt ein breites Minimum bei einer Wellenlänge von ungefähr 200 nm. Dies ist typisch für eine „Random-Coil“-Struktur (Yang *et al.*, 1986). Jedoch findet sich

keine positive Bande bei 220 nm. Bei einer Wellenlänge von 222 nm existiert eine negative „Schulter“ mit geringer Intensität. Somit ist die isolierte lange Verbindungshelix nicht in der Lage, eine α -helikale Struktur auszubilden.

3.5. Kristallographische Untersuchungen

3.5.1. Kristallisation verschiedener Mutanten des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila*

3.5.1.1. S15A

Für die Kristallisation der Mutante S15A wurde die Methode des „hängenden Tropfens“ genutzt. 2 μ l Protein (12,5 mg/ml) in 20 mM HEPES pH 7,0 wurden mit dem gleichen Volumen 100 mM MES pH 6,5; 18 % w/v PEG 8000; 500 mM Zink-Acetat und 3 mM NaN_3 als Reservoirlösung versetzt. Außerdem befanden sich im Ansatz noch 3 mM Pefabloc, ein Serin-Protease-Inhibitor. Die Kristalle wuchsen bei 10°C innerhalb von zwei Wochen zu einer beeindruckenden Größe heran. Die Abbildung 3.5.1. zeigt einen Kristall mit Abmessungen von 1100 μ m x 400 μ m x 400 μ m .

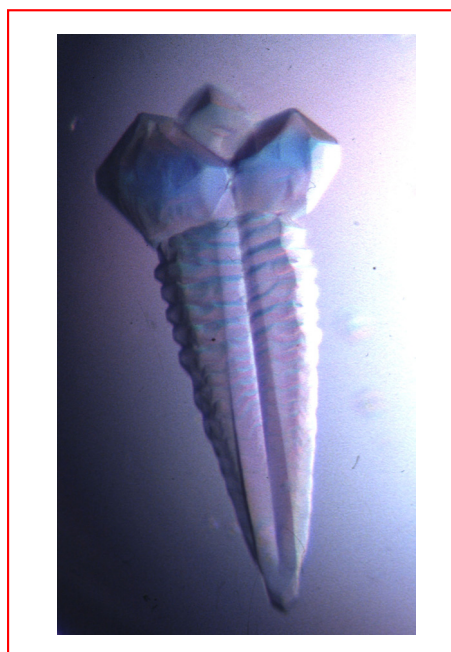


Abbildung 3.5.1. Großer „zahnförmiger“ Kristall der Legionella-Mip-Mutante S15A, genutzt für die Diffraktionsdatensammlung; Reflexe waren bis zu einer Auflösung von 2,4 Å nachweisbar.

3.5.1.2. A37F

Kristalle der N-terminalen Mip-Mutante A37F wurden ebenfalls mit Hilfe der „Hanging-Drop“-Technik gezüchtet. Der Kristallisationstropfen enthielt 2 μ l Protein (13,6 mg/ml) in 20 mM HEPES pH 7,0 sowie 2 μ l Reservoirlösung (100 mM Cacodylat pH 6,5; 18 % w/v PEG 8000; 500 mM Zink-Acetat und 3 mM NaN_3). Innerhalb von vier bis fünf Wochen wuchsen Kristalle in zwei verschiedenen Formen heran. Die zahlreichen prismaförmigen Strukturen blieben klein. Daneben kam es zur Bildung großer (400 μ m x 200 μ m x 200 μ m) Kristalle mit langgezogener tetragonaler Form. Ein typischer Kristallisationsansatz ist in der Abbildung 3.5.2. gezeigt.

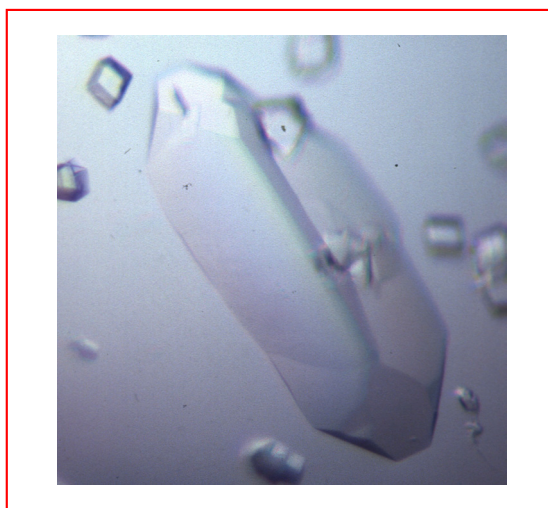


Abbildung 3.5.2.: Kristalle der Mip-Mutante A37F; der große tetragonale Kristall wurde für die Röntgenstrukturanalyse verwendet, da er bis zu einer Auflösung von 2,5 Å Röntgenstrahlen beugte.

3.5.1.3. Y185A

Die C-terminale-Mutante Y185A konnte unter ähnlichen Bedingungen wie das mutierte Mip-Protein S15A kristallisiert werden. Jedoch befand sich kein Serin-Protease-Inhibitor Pefabloc im Ansatz. Außerdem mußte die Temperatur auf 15°C bzw. 20°C erhöht werden. Im „hängenden Tropfen“ wurden 2 μ l Protein (9,5 mg/ml) in 20 mM HEPES pH 7,0 oder 2 μ l 100 mM MES pH 6,5; 18 % w/v PEG 8000; 500 mM Zink-Acetat und 3 mM NaN_3 als Reservoirlösung inkubiert. Nach zwei Monaten waren die Kristalle bis zu einer Größe von 250 μ m x 150 μ m x 150 μ m herangewachsen. Dabei war auffällig, daß sich zunächst zahlreiche Mikrokristalle im Ansatz bildeten, deren Zahl sich mit der Zeit verringerte; wobei die restlichen an Größe gewannen. Ähnliches konnte für andere

Mutanten sowie das native Mip nicht beobachtet werden. Die Qualität dieser Kristalle war deutlich schlechter, streuten sie doch nur bis zu einer Auflösung von 3 Å. Abbildung 3.5.3. zeigt das typische Erscheinungsbild der Kristalle der C-terminalen Mutante Y185A.

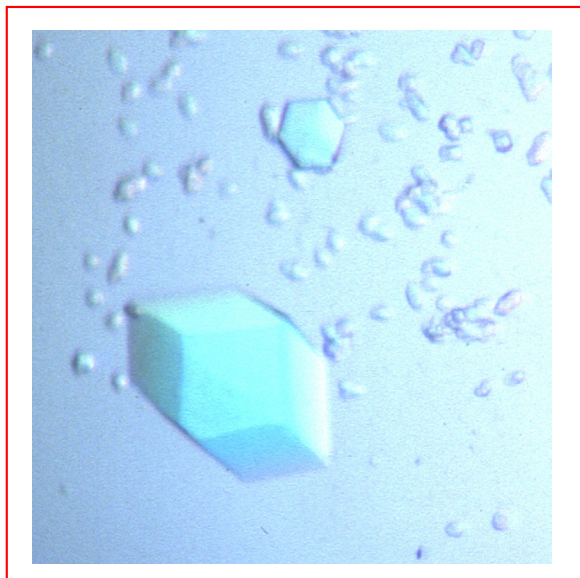


Abbildung 3.5.3.: Typische Kristalle der C-terminalen Mutante Y185A des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila*.

3.5.1.4. Mutante F202Y

Kristalle der C-terminalen Mutante F202Y wurden ebenfalls nach der Methode des „hängenden Tropfens“ bei 15°C gezüchtet. Sie erreichten eine Größe von 300 µm x 100 µm x 100 µm innerhalb einer Woche. Dafür wurden 2 µl Protein (10,38 mg/ml in 20 mM HEPES pH 7,0) mit 2 µl Reservoirlösung inkubiert. Die Reservoirlösung enthielt 100 mM MES pH 6,5; 18 % w/v PEG 8000; 500 mM Zink-Acetat und 3 mM NaN₃. Im Falle des vermessenen Kristalls wurden zusätzlich 20 mM Harnstoff verwendet. In der Abbildung 3.5.4. ist die ungewöhnliche Form der Kristalle zu sehen.

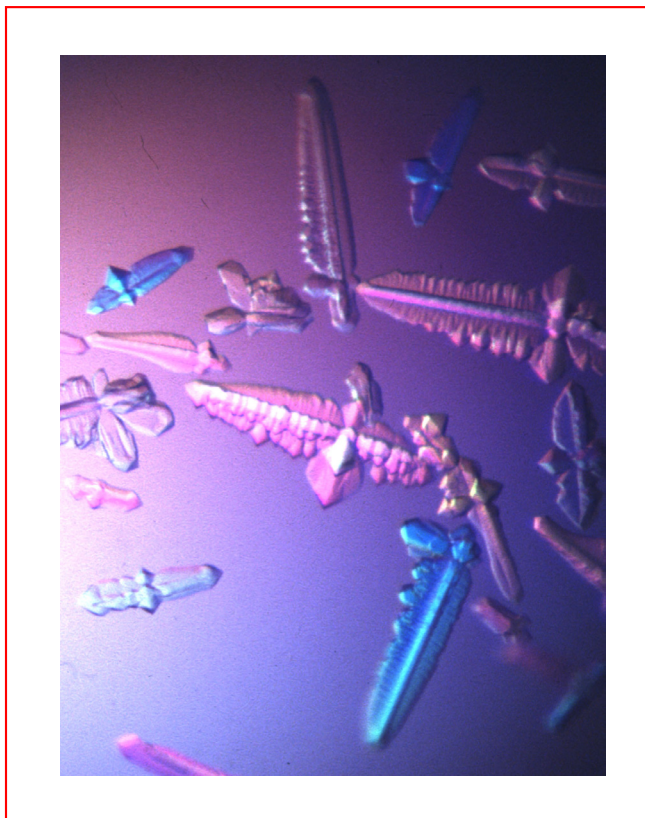


Abbildung 3.5.4.: Kristalle der C-terminalen Mutante F202Y.

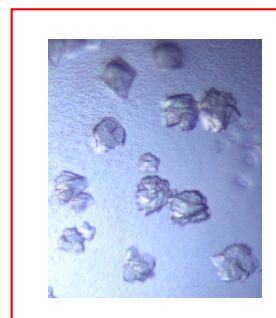
Das Wildtyp-Mip-Protein von *Legionella pneumophila* sowie die verschiedenen Mutanten konnten nur in Anwesenheit von Zink-Acetat kristallisiert werden. Einer der wichtigsten Kristallkontakte wird über die FKBP-ähnlichen Domänen von zwei benachbarten Dimeren ausgebildet. Zwei Zink-Ionen vermitteln dabei über Glu-130 und His-205 einer C-terminalen Domäne sowie Glu-164' des Nachbarmoleküls diese Wechselwirkung. Die genannten Aminosäurereste sowie mehrere Wassermoleküle stellen Liganden dar (Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2001). Die Funktion des Acetat-Ions konnte bisher nicht bestimmt werden.

Nach erneuter Inspektion der Elektronendichte für den beschriebenen Kristallkontakt lag die Vermutung nahe, daß beide Zink-Ionen nicht durch ein Wassermolekül sondern die Carboxylgruppe dieses Acetat-Ions „verbrückt“ werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden weitere Kristallisationsansätze ausgeführt. In diesen wurde Zink-Acetat durch Zink-Chlorid und verschiedene andere Substanzen ersetzt, die Carboxylgruppen enthalten. Unter diesen Bedingungen konnten wieder Kristalle für die Mutante A37F des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* erhalten werden. Die „hängenden

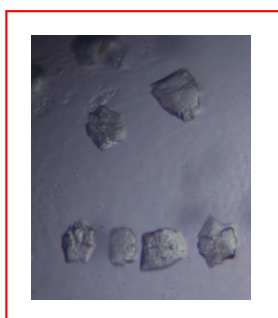
Tropfen“ in den folgenden Kristallisationsversuchen wurden mit den gleichen Volumina (1 μ l bzw. 2 μ l) Protein- (13,6 mg/ml in 20 mM HEPES pH 7,0) und Reservoirlösung angesetzt. Die Reservoirlösung enthielt 100 mM MES pH 6,5; 500 mM $ZnCl_2$, 18 % PEG 8000, 3 mM NaN_3 sowie verschiedene Carboxylgruppen enthaltende Substanzen in der angegebenen Konzentration.



~ 400 mM Ammoniumformiat



~ 40 mM L-Isoleucin
(schwer löslich)



~ 60 mM L-Valin
(schwer löslich)



~ 7 mM Desoxycholsäure-
Na-Salz (fast unlöslich)

Abbildung 3.5.5.: Kristallisationsansätze der Mutante A37F (Mip-Protein von *Legionella pneumophila*) mit $ZnCl_2$ und weiteren Carboxylgruppen enthaltenden Substanzen.

Weiterhin konnte das Protein mit L-Lysin, L-Ornithin, L-Threonin, und Anthranilsäure kristallisiert werden. Leider blieben die meisten Kristalle klein und wiesen schon bei Betrachtung unter dem Mikroskop eine unregelmäßige Struktur auf. In Diffraktionsexperimenten beugten sie die Röntgenstrahlen nie besser als bis zu einer Auflösung von 10 Å – 7 Å. Somit führte der Austausch von Acetat gegen andere Moleküle, die Carboxylgruppen besitzen, nicht zu einer Verbesserung der Kristallqualität. Die essentielle Bedeutung für das Acetat-Ion in der Kristallisation (involviert in den Zink-

Ionen-vermittelten Kristallkontakt zwischen benachbarten Mip-Dimeren) konnte jedoch bestätigt werden.

3.5.2. Diffraktionsdatensammlung und Prozessierung

Die Diffraktionsdatensammlung wurde für die Kristalle der N-terminalen Mutanten (A37F und S15A) sowie der C-terminale Mutante Y185A im Hause durchgeführt. Allein für einen Proteinkristall der Mutante F202Y (Mutation im aktiven Zentrum der FKBP-ähnlichen Domäne) wurde das Beugungsexperiment an der ESRF in Grenoble durchgeführt. Dabei konnte die Strahlungsquelle BM14 genutzt werden. Während der Datensammlung wurden die Kristalle im Stickstoffstrom bei 100 K gehalten. Dabei diente getrocknetes Paraffin-Öl als „Cryoprotectant“ (Riboldi-Tunnicliffe & Hilgenfeld, 1999). Sie besaßen ohne Ausnahme eine schlechte intrinsische Qualität. Dies wird durch die Beugung von Röntgenstrahlung bis zu einer Wellenlänge von maximal 2,4 Å sowie ihre hohe Mosaizität deutlich. Daher konnte auch durch den Einsatz von Synchrotronstrahlung nur in einem Fall eine Verbesserung der Diffraktionsdaten erreicht werden. Der notwendige Transport der Kristalle verschlechterte ihre Qualität meist zusätzlich. Die gewählten Abstände von der Röntgenquelle zum Detektor ermöglichten die Messung aller nachweisbaren Reflexe bei maximaler Auflösung. Die Werte sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Mutante	Abstand Röntgenquelle-Detektor	höchstmögliche Auflösung („Kante“ der Bild- bzw. CCD-Platte)
S15A	~ 180 mm	2,27 Å
A37F	~ 200 mm	2,44 Å
Y185A	~ 266 mm	3,03 Å
F202Y*)	~ 149 mm	2,27 Å

*) Der Kristall der Mutante F202Y wurde am Synchrotron bei einer Wellenlänge von 0,98 Å vermessen.

Auf Grundlage der gesammelten Daten wurden mit Hilfe der Auto-Indizierungs-Funktion des Programmes „DENZO“ (Otwinowski & Minor, 1997) die Raumgruppe sowie die ungefähren Dimensionen der Elementarzelle bestimmt. Die Kristalle der verschiedenen Mip-Mutanten waren alle primitiv tetragonal organisiert.

Anschließend wurden die erhaltenen Daten durch das Computerprogramm „DENZO“ (Otwinowski & Minor, 1997) in den folgenden Grenzen integriert:

Mutante	obere Grenze der Integration in Å	untere Grenze der Integration in Å
S15A	20	2,3
A37F	25	2,5
Y185A	25	3,1
F202Y	25	2,4

Letztlich konnten die so erhaltenen Intensitäten für die einzelnen Reflexe durch das Programm „SCALEPACK“ (Otwinowski & Minor, 1997) skaliert werden. Die Statistik der Datensammlung ist in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt. Für notwendige Berechnungen wurde das Programm „rmerge“ genutzt (Weiss & Hilgenfeld, 1997).

Mutante	S15A	A37F	Y185A ¹	F202Y ²
Raumgruppe	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2	P4 ₃ 2 ₁ 2
Elementarzellparameter ³	a = b = 78,02 Å c = 103,61 Å	a = b = 77,95 Å c = 103,66 Å	a = b = 80,74 Å c = 103,53 Å	a = b = 81,21 Å c = 103,58 Å
Auflösung	20,0 Å - 2,4 Å	25,0 Å - 2,7 Å	25,0 Å - 3,1 Å	25,0 Å - 2,5 Å
Zahl aller Reflexe	82 635	43 118	106 955	111 769
Zahl einzelner Reflexe	12 988	8 744	6 578	12 108
Redundanz	6,3	4,9	16,3	9,2
I/σ	14,2	10,9	22,5	21,5

äußerste Schale	2,49 Å - 2,40 Å	2,80 Å - 2,70 Å	3,21 Å - 3,10 Å	2,59 Å - 2,50 Å
I/σ in äußerster Schale	2,4	2,8	3,3	4,5
Vollständigkeit	99,6 %	94,7 %	99,8 %	100 %
Vollständigkeit in äußerster Schale	99,4 %	91,3 %	98,1 %	100 %
R _{merge}	9,3 %	11,8 %	10,3 %	9,0 %
R _{pim}	3,9 %	5,6 %	2,6 %	3,1 %
R _{rim}	10,1 %	13,1 %	10,6 %	9,5 %
R _{merge} in äußerster Schale	52,9 %	52,3 %	45,6 %	44,2 %
R _{pim} in äußerster Schale	24,4 %	26,8 %	14,5 %	15,4 %
R _{rim} in äußerster Schale	58,5 %	59,1 %	48,1 %	46,8 %
Zahl zurückgewiesener Reflexe	157	85	294	199

¹Für die Mutante Y185A wurden von einem Kristall zwei Datensätze mit unterschiedlicher Expositionszeit (1 Stunde bzw. 20 Minuten) aufgenommen.

²Der Kristall für die Mutante F202Y wurde bei einer Wellenlänge von 0,98 Å am Synchrotron vermessen.

³Die Winkel der Elementarzelle α , β und γ sind für die Raumgruppe P4₃2₁2 gleich groß und besitzen einen Wert von 90°.

3.5.3. Untersuchungen zu Unterschieden in den Dimensionen der Elementarzelle

Bei den Dimensionen der Elementarzelle konnten größere Unterschiede beobachtet werden. Es bestätigte sich der Eindruck, daß für die Größe von $a = b$ zwei Werte möglich sind. Meist besitzen die Kristalle eine größere Ausdehnung in Richtung der a - bzw. b -Achse von etwa 81 Å. Seltener finden sich Elementarzellen mit einer Länge von 77 Å – 78 Å in beiden Dimensionen, die dann Röntgenstrahlen zumeist etwas besser beugen. Die Länge der c -Achse weist kaum Schwankungen auf. Dieser Zusammenhang ist in den folgenden Grafiken verdeutlicht. Dabei ist jede der vom Mip-Protein bestimmten atomaren Strukturen (z.B. Mutanten und Komplexe) als Punkt repräsentiert. Seine Position definieren die Länge der Elementarzelle in den unterschiedlichen Dimensionen sowie die „Auflösung“ mit der die Struktur bestimmt werden konnte.

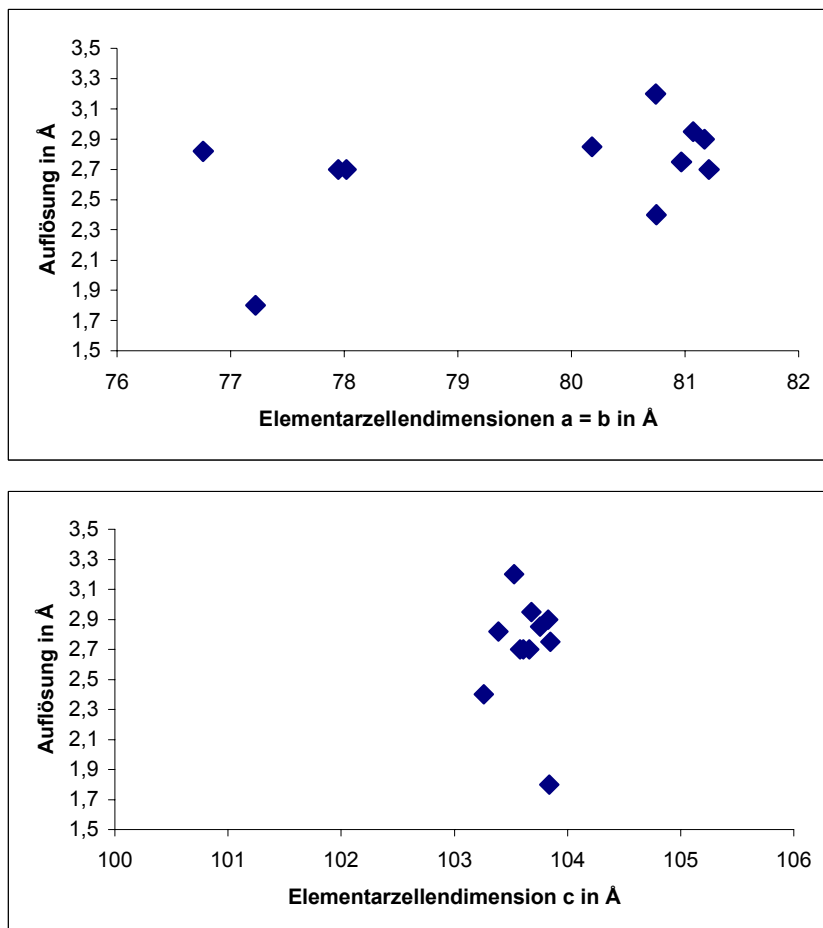


Abbildung 3.5.6.: Zusammenhang zwischen der Auflösung verschiedener Mip-Strukturen und den Dimensionen der Elementarzelle. Die Zahlen wurden von Alan Riboldi-Tunnicliffe zur Verfügung gestellt oder stammen aus dieser Arbeit.

3.5.4. Strukturbestimmung für die Mutanten

3.5.4.1. Überblick

Für die Strukturen des Mip-FK506-Komplexes sowie der C-terminalen Mutanten Y131F und Y185F konnten keine Veränderungen der allgemeinen Struktur im Vergleich zum Wildtyp-Mip-Protein von *Legionella pneumophila* gezeigt werden (Riboldi-Tunnicliffe, 2000). Außerdem wurde für die Kristalle der Mutanten S15A, A37F, Y185 und F202Y ebenfalls eine primitiv tetragonale Organisation mit den Elementarzeldimensionen von etwa 80 Å x 80 Å x 104 Å nachgewiesen. Daher war es naheliegend, als ersten Schritt bei der Strukturbestimmung eine „Rigid-Body“-Verfeinerung durch das Programm „CNS 1.1“ (Brünger *et al.*, 1998) zu nutzen. Dabei sollten zunächst geringfügige Verschiebungen einzelner Strukturelemente gegeneinander nicht berücksichtigt werden.

Für die N-terminalen Mutanten A37F sowie S15A wurde eine gestreckte Verbindungshelix zwischen der Dimerisierungs- und FKBP-ähnlichen Domäne angenommen. Kristalle dieser Proteine wiesen eine kürzere a- bzw. b-Achse für die Elementarzelle auf. Es konnte gezeigt werden, daß beide Eigenschaften miteinander korrelieren. Kristalle des Wildtyp-Mip-Proteins mit einer gestreckten Helix (Elementarzeldimensionen: a = b = 77,22 Å; c = 103,84 Å) waren in der Lage, Röntgenstrahlen bis zu einer Auflösung von 1,8 Å zu beugen. (Riboldi-Tunnicliffe, 2000).

Im Gegensatz dazu wurde für die C-terminalen Mutanten Y185A und F202Y ein Suchmodell mit leicht gekrümmter Verbindungshelix verwendet. Die Aufnahme eines MAD-Datensatzes für das Mip-Protein durch Riboldi-Tunnicliffe *et al.* erfolgte an einem Kristall mit dem Vermögen Röntgenstrahlen nur bis zu einer Auflösung von 2,4 Å zu streuen. Seine Elementarzellen wiesen eine deutlich längere a- bzw. b-Achse auf. Außerdem besaß das Protein eine gekrümmte α -Helix zwischen der N- und C-terminalen Domäne (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001).

Bereits nach dem initialen Schritt der Strukturlösung wurden für die Mutanten R-Faktoren von etwa 35 % erreicht. Nachfolgend erfolgte die Modifizierung und Verfeinerung der Modelle mit Hilfe der Programme „O“ (Jones *et al.*, 1991) und „CNS 1.1“ (Brünger *et al.*, 1998). Dabei war insbesondere die „Rigid-Body“-Verfeinerung nach Festlegung starrer Molekülsegmente, die gegeneinander bewegt

werden konnten, erfolgreich. Diese definierten Molekülbereiche sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefaßt.

Reste	10-29	30-34	35-47	48-54	55-97	98-212
Strukturelement	Helix 1	„Loop“-Region	Helix 2	„Loop“-Region	lange „Linker“-Helix	„Loop“-Region und FKBP-ähnliche Domäne

Die Auswahl der Segmente erfolgte nach Analyse der Struktur des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* mit Hilfe von „DSSP“ (Kabsch & Sander, 1983). Offensichtlich ist eine große Variabilität in der Orientierung der verschiedenen Elemente der Mip-Struktur in unterschiedlichen Kristallen vorhanden.

In der nachfolgenden Tabelle ist die Verfeinerungsstatistik für die vier Mutantenstrukturen dargestellt.

Mutante	S15A	A37F	Y185A	F202Y
Auflösung der verwendeten Reflexe	15,0 Å – 2,7 Å	25,0 Å – 2,7 Å	15,0 Å – 3,2 Å	15,0 – 2,7 Å
„Cutoff“ von Daten	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt	nicht durchgeführt
Anzahl der Reflexe in der Verfeinerungs-/Arbeitsmenge	8231 / 925	7837 / 937	5300 / 643	8901 / 1032
R-Faktor	26,08 %	26,81 %	31,25 %	26,26 %
R _{free}	28,99 %	27,14 %	32,45 %	28,56 %

Luzzati-Koordinaten-Fehler (Å)	0,40	0,41	0,58	0,43
Kreuzvalidierter Luzzati-Koordinaten-Fehler (Å)	0,46	0,42	0,61	0,47
Anzahl Aminosäurereste in der asymmetrischen Einheit	205	206	196	203
Anzahl Wassermoleküle in der asymmetrischen Einheit	75	63	26	47
Anzahl Ionen in der asymmetrischen Einheit	5 Zn- 3 Acetat-Ionen	5 Zn- 2 Acetat-Ionen	4 Zn- 5 Acetat-Ionen	4 Zn- 4 Acetat-Ionen
Durchschnitt B-Faktoren	37,28 Å ²	33,82 Å ²	95,45 Å ²	64,97 Å ²
Minimum B-Faktoren	14,58 Å ²	32,57 Å ²	33,11 Å ²	23,79 Å ²
Maximum B-Faktoren	94,77 Å ²	43,46 Å ²	160,02 Å ²	107,41 Å ²
R.M.S.-Abweichungen Bindungslänge	0,009 Å	0,006 Å	0,019 Å	0,011 Å
R.M.S.-Abweichungen Bindungswinkel	1,37°	1,45°	1,88°	1,63°
R.M.S.-Abweichungen Diederwinkel	22,52°	22,61°	21,19°	22,42°

R.M.S.- Abweichungen	0,95 Å ² /	0,46 Å ² /	1,76 Å ² /	2,03 Å ² /
B-Faktoren	1,20 Å ²	0,47 Å ²	1,81 Å ²	2,84 Å ²
Haupt-/ Seitenkette				
Ramachandran- Analyse				
Kern- φ-ψ-Region	94,2 %	94,8 %	88,8 %	87,8 %
erlaubte Region	5,8 %	4,6 %	10,0 %	11,0 %
mögliche Region	0	0,6 %	1,2 %	0,6 %
verbotene Region	0	0	0	0,6 %

3.5.4.2. S15A

Im Wildtyp-Protein bildet Ser-15 über das Oγ-Atom eine Wasserstoffbrücke zum N-Atom der Amidbindung von Asn-34' (anderes Monomer). Durch Austausch des Serin-Restes sollte versucht werden, die Dimerisierungseigenschaften des Mip-Moleküls zu verändern. Mögliche strukturelle Veränderungen, die durch die Substitution gegen einen Alanin-Rest bewirkt worden waren, mußten untersucht werden. Dabei ist jedoch zu bemerken, daß die Dimerbildung im Mip-Protein von *Legionella pneumophila* vorwiegend über hydrophobe Wechselwirkungen geschieht.

Für diese Mutante wurde ein Modell der Aminosäurereste 6-212 erstellt. Dabei konnten keine Veränderungen in der allgemeinen Struktur des dimeren Proteins nachgewiesen werden. Die Konturierung der 3Fo-2Fc-Elektronendichtekarte bei 1σ zeigt eine Unterbrechung für die Peptidbindung zwischen den Resten 155 und 156. Außerdem konnte Val-190 in diesem Experiment nicht lokalisiert werden. Für den Aminosäurerest Gly-191 ist die Elektronendichte nur schlecht definiert. Das verfeinerte Modell weist einen R-Faktor von 26,08 % und einen R_{free} von 28,99 % auf. Die Temperaturfaktoren der N-terminalen Domäne sowie für Bereiche der langen Verbindungshelix zeigen hohe Werte. Trotzdem konnte zumeist auch für die Seitenketten in diesen Teilen des Moleküls eine überzeugende Elektronendichte bestimmt werden. Darüberhinaus war es möglich, für dieses Molekül eine gestreckte Helix zwischen der N-terminalen und C-terminalen Domäne nachzuweisen (Elementarzeldimensionen: a = b = 78,02 Å; c = 103,61 Å). Die

Erstellung der 1Fo-1Fc-Elektronendichtekarte (Konturierung -3σ) beweist die entsprechende Mutation.

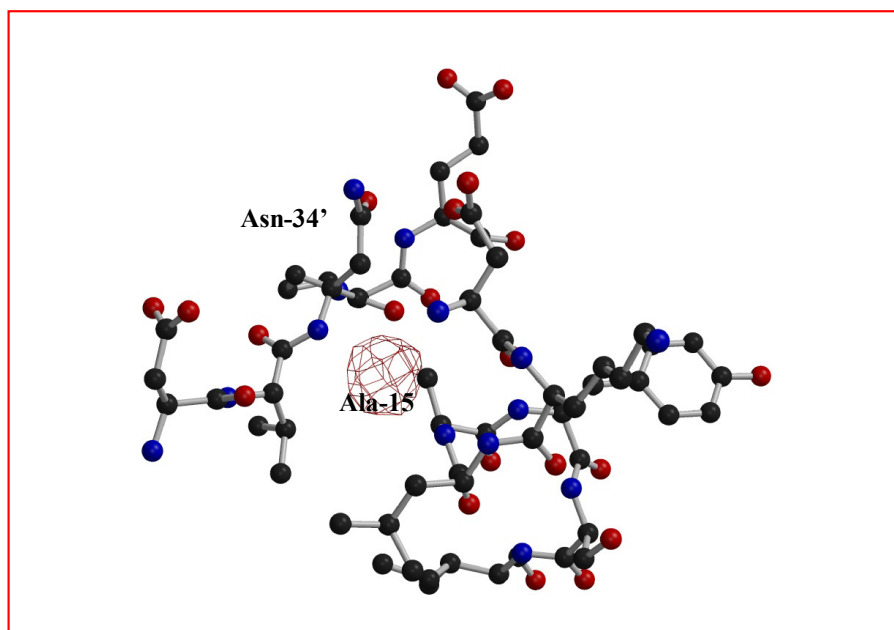


Abbildung 3.5.7.: Die 1Fo-1Fc-Elektronendichtekarte (rot) um den Aminosäurerest 15. Sie wurde mit dem Wildtyp-Mip-Protein als Modell berechnet und bei -3σ konturiert. Das Bild wurde mit den Programmen „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) erstellt.

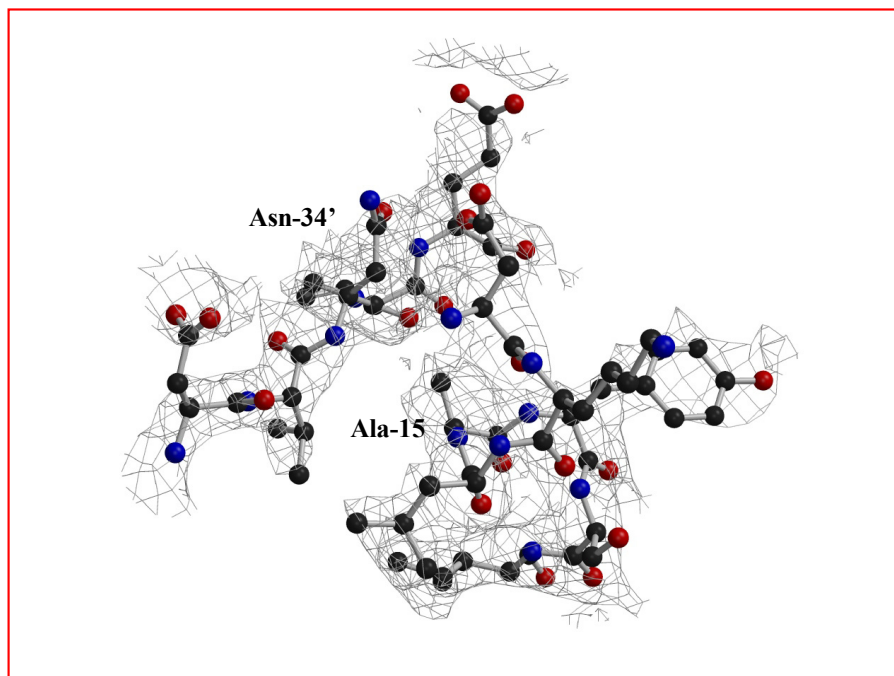


Abbildung 3.5.8.: 3Fo-2Fc-Elektronendichtekarte um die Mutation S15A. Außerdem wurden die zu Ser-15 im Wildtyp-Protein in räumliche Nachbarschaft befindlichen Aminosäurereste dargestellt. Für die Abbildung wurden die Programme „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) verwendet.

Wie durch die 3Fo-2Fc-Elektronendichtekarte deutlich wird, ändert sich die Orientierung der Reste 15 bzw. 34' durch die Mutation nicht (Abbildung 3.5.8.). Die Methylgruppe des Alanins weist weiterhin zum Amidstickstoff von Asn-34', auch wenn eine Wasserstoffbrücke nun nicht mehr ausgebildet werden kann.

3.5.4.3. A37F

Der Aminosäurerest Ala-37 ist Bestandteil der Helix 2 im Mip-Protein von *Legionella pneumophila*. Diese Helix ist maßgeblich an der Dimerisierung über hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt. In diesem Zusammenhang wird durch sie auch der „Methionin-Zipper“ gebildet. Durch Einführung einer raumfordernden Seitenkette sollte es zur Behinderung der Wechselwirkungen zwischen den N-terminalen Domänen der Monomere kommen. Vielleicht wird die Dimerisierung des Moleküls vollständig verhindert.

Das Strukturmodell für die Mutante A37F enthält die Reste 6-212. Bei der Verfeinerung konnte ein R-Faktor von 26,81 % sowie R_{free} von 27,14 % erreicht werden. Die 3Fo-2Fc-Elektronendichtekarte zeigt bei einer Konturierung von 1σ über dem Mittelwert eine durchgehende Dichte für Hauptkettenatome der Reste 6-189 sowie 192 bis 212. Auch für die Aminosäure 190 konnte Elektronendichte nachgewiesen werden. Die Mip-Mutante ist weiterhin ein dimeres Molekül und besitzt eine nahezu identische allgemeine Struktur wie das Wildtyp-Protein. Sie weist eine gestreckte Verbindungshelix zwischen der N-terminalen Dimerisierungs- und der C-terminalen FKBP-ähnlichen Domäne auf. Dies ist mit einer geringeren Ausdehnung der Elementarzelle für die Kristalle in Richtung der a- und b-Achse (77,95 Å) verbunden. Die Temperaturfaktoren für Atome in der N-terminalen Domäne sowie der 65 Å langen Helix sind nur mäßig höher im Vergleich zu Resten in der FKBP-Domäne. Die Mutation konnte durch Berechnung der 1Fo-1Fc-Elektronendichtekarte mit Hilfe des Wildtyp-Proteins als Modell bei einer Konturierung von 3σ bestätigt werden. Sie ist in der Abbildung 3.5.9. dargestellt.

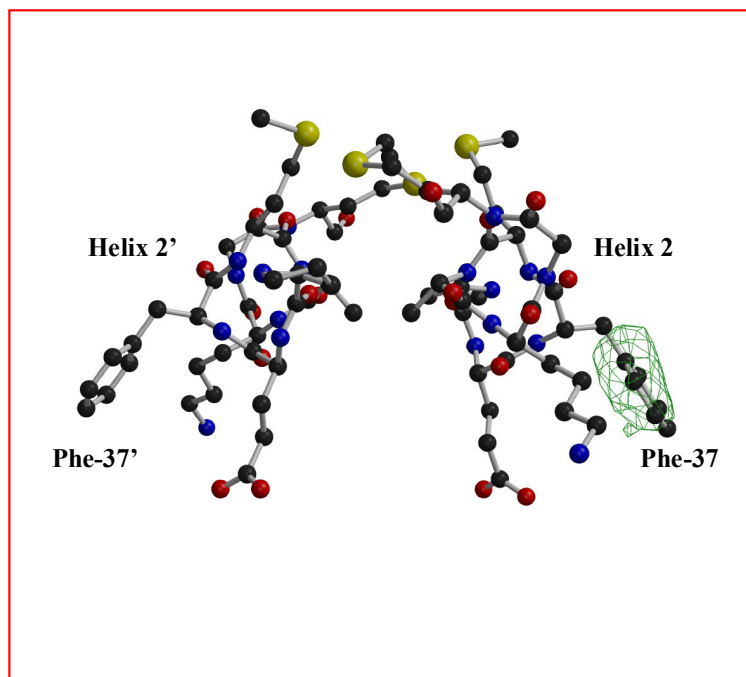


Abbildung 3.5.9.: Blick auf bei der Dimerisierung interagierenden Reste der Helix 2 beider Monomere für die Mutante A37F. Für eine Helix ist die 1Fo-1Fc-Elektronendichtekarte um den Rest Phe-37 dargestellt. Sie wurde mit dem Wildtyp-Protein als Modell berechnet und bei 3σ konturiert. Das Bild konnte mit Hilfe der Programme „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) generiert werden.

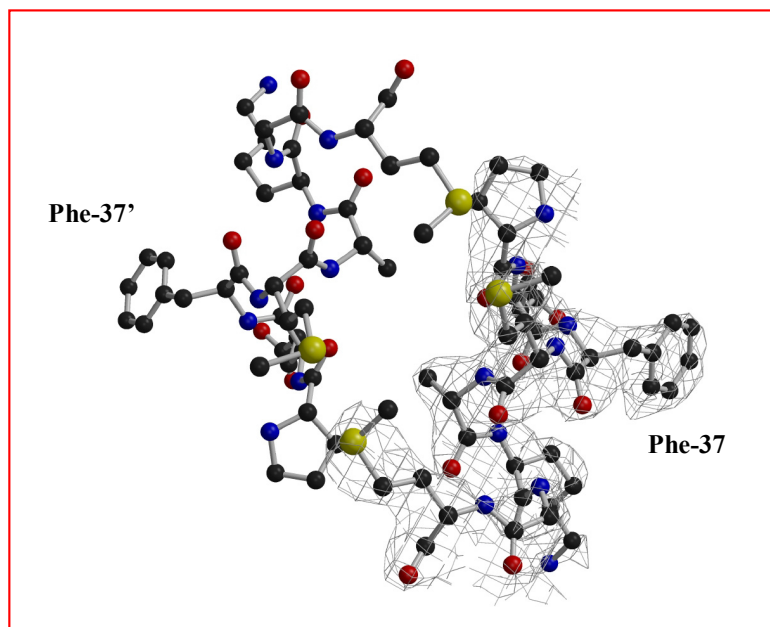


Abbildung 3.5.10.: Darstellung von Resten der Helix 2 in der „Aufsicht“. Die 3Fo-2Fc-Elektronendichtekarte ist nur für ein Monomeres dargestellt und bei 1σ konturiert. Wiederum wurden die Programme „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) genutzt.

Wie das Modell für die Mutante A37F des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* zeigt, weist der aromatische Ring des Phenylalanin-Restes nicht die Dimerisierungsebene des Moleküls. Das wird insbesondere durch die 3Fo-2Fc-Elektronendichtekarte deutlich (Abbildung 3.5.10.). Somit kann es zu keiner sterischen Behinderung der Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Monomeren kommen.

3.5.4.4. Y185A

Der Rest Tyr-185 gehört zu den konservierten Aminosäureresten im aktiven Zentrum der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase. Die Mutation Y185A führt zu einer dramatisch verringerten PPIase-Aktivität (0,6 % gegenüber dem Wildtyp-Protein) (Wintermeyer *et al.*, 1995). Durch die Röntgenstrukturanalyse sollte geklärt werden, inwieweit strukturelle Veränderungen in dieser Mutante für den Aktivitätsverlust verantwortlich sind.

Das Strukturmodell für die Mutante Y185A konnte nur bis zu einer Auflösung von 3,2 Å verfeinert werden. Die Kristalle beugten die Röntgenstrahlen nur schlecht. Insbesondere die N-terminale Domäne sowie Teile der 65 Å langen Helix weisen extrem hohe B-Faktoren auf. Die 3Fo-2Fc-Elektronendichte besitzt bei einer Konturierung von 1 σ Lücken im Bereich der Peptidbindung zwischen den Resten 46 und 47 bzw. 61 und 62. Außerdem konnte der Met-58 nicht lokalisiert werden. Die Seitenketten der meisten Aminosäuren sind schlecht definiert. Dies wird an der Abbildung 3.5.11. deutlich. Hier ist für die Helix 2 im Mip-Protein von *Legionella pneumophila* die 3Fo-2Fc-Elektronendichtekarte dargestellt.

Dagegen sind für die C-terminale Domäne alle Hauptkettenatome durch die experimentell bestimmte Elektronendichte definiert, mit Ausnahme einer umfangreichen „Loop“-Region. Diese umfaßt die Reste 185-191. Bereits für die Seitenkette von Ala-185 kann keine 3Fo-2Fc-Elektronendichte bei 1 σ nachgewiesen werden. Für die Aminosäuren Pro-187 und Ser-189 finden sich isolierte Bereiche von Elektronendichte. Der Rest Gly-192 ist dann wieder eindeutig definiert. Die beschriebene „Loop“-Region kann in der Abbildung 3.5.12. betrachtet werden. Außerdem ist die 3Fo-2Fc-Elektronendichte dargestellt.

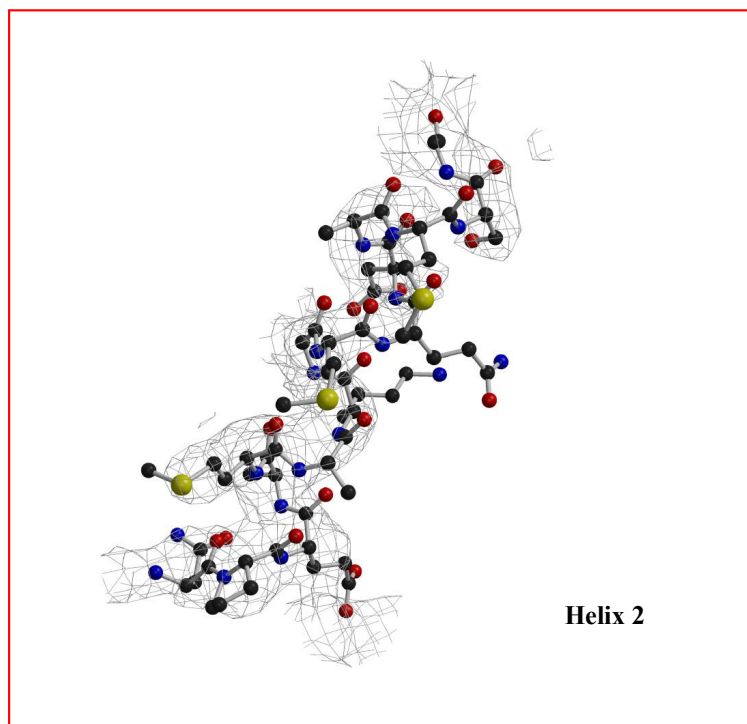


Abbildung 3.5.11.: 3Fo-2Fc-Elektronendichtekarte für die Helix 2 des Mip-Monomers für die Mutante Y185A. Die Konturierung erfolgte bei 1σ . Die Abbildung konnte mit den Programmen „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) generiert werden.

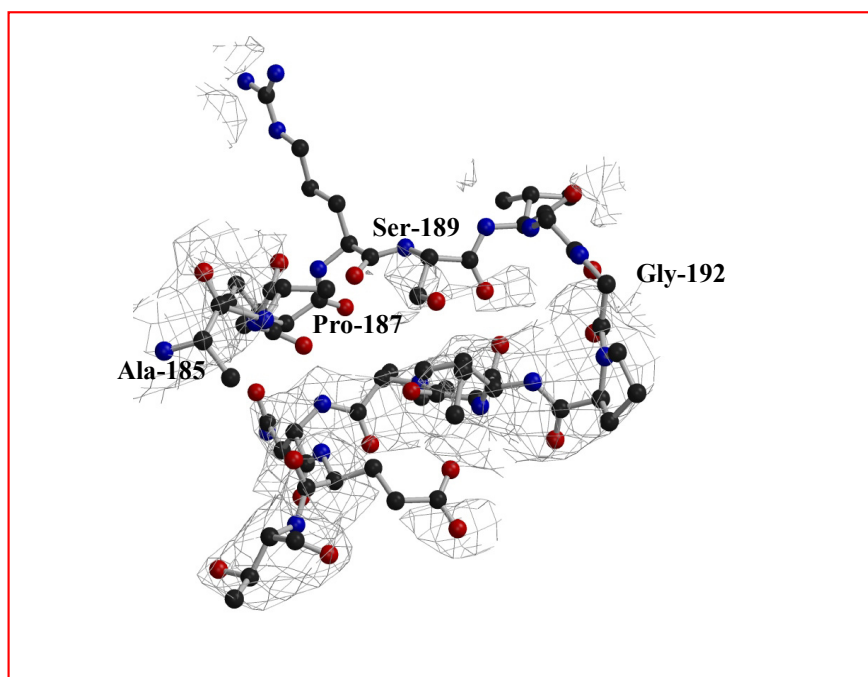


Abbildung 3.5.12.: 3Fo-2Fc-Elektronendichte bei 1σ für die Reste der „Loop“-Region von Ala-185 bis Thr-199. Für die Darstellung wurden die Programme „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) verwendet.

Die Mutation konnte eindeutig durch die Berechnung der 1Fo-1Fc-Elektronendichte bei -3σ nachgewiesen werden (Abbildung 3.5.13.). Dabei diente das Wildtyp-Mip-Protein als Modell.

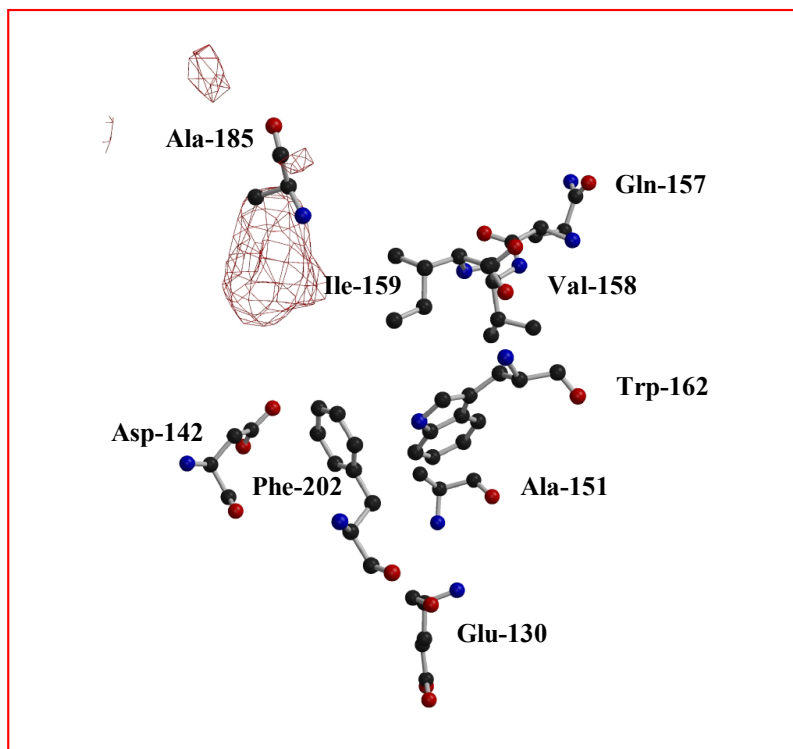


Abbildung 3.5.13.: Die bei -3σ konturierte 1Fo-1Fc-Elektronendichte (rot) um den Rest Ala-185. Zur Bestätigung der Mutation wurde das Wildtyp-Mip als Modell verwendet. Außerdem sind alle weiteren in den FKBP-Bindeproteine konservierten Aminosäurereste dargestellt. Dazu gehören auch Aminosäuren, deren Mutation keinen Einfluß auf die Isomerase-Aktivität hatte (Wintermeyer *et al.*, 1995). Verwendete Programme: „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997).

3.5.4.5. F202Y

Auch der Rest Phe-202 im Mip-Protein von *Legionella pneumophila* gehört zu den konservierten Aminosäuren in den FK506-Bindeproteinen (Wintermeyer *et al.*, 1995). Wahrscheinlich bildet der aromatische Ring der Seitenkette zusammen mit weiteren Aminosäuren eine schwache orientierende Wechselwirkung mit dem Substrat. Diese besitzt vorwiegend hydrophoben Charakter (Fischer *et al.*, 1993). Die Mutation F202Y führt zu einer Reduzierung der PPIase-Aktivität im Mip-Protein auf 0,9 % (persönliche Mitteilung Dr. Thilo Kamphausen, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle). Für ein besseres Verständnis der Rolle dieses Restes bei der Isomerisierung könnte die Kristallstruktur dieser Mutante dienen.

Das Strukturmodell umfaßt wiederum die Reste 9-212. Im Kristall weisen die Mip-Moleküle eine gekrümmte Verbindungshelix zwischen der Dimerisierungs- und der FKBP-ähnlichen Domäne auf. Dies ist mit einer größeren Ausdehnung der Elementarzelle in Richtung der a- bzw. b-Achse verknüpft (81,21 Å). Wie bereits für die Mutante Y185A beobachtet, zeigt auch die N-terminale Domäne dieses Proteins nur eine schlecht definierte Elektronendichte, insbesondere für Seitenkettenatome. So konnte z.B. für Asp-10 keine Elektronendichte bei einer Konturierung von 1σ beobachtet werden. Außerdem war es nicht möglich, die Carbonylgruppe von Met-58 sowie den Amidstickstoff bzw. das C α -Atom des Restes 59 zu lokalisieren. Erst mit der Aminosäure Met-65 verbessert sich die Qualität der 3Fo-2Fc-Elektronendichtekarte deutlich. In den Abbildungen 3.5.14. und 3.5.15. sind die Positionen der konservierten Reste für die FKBP-ähnlichen Domäne dargestellt.

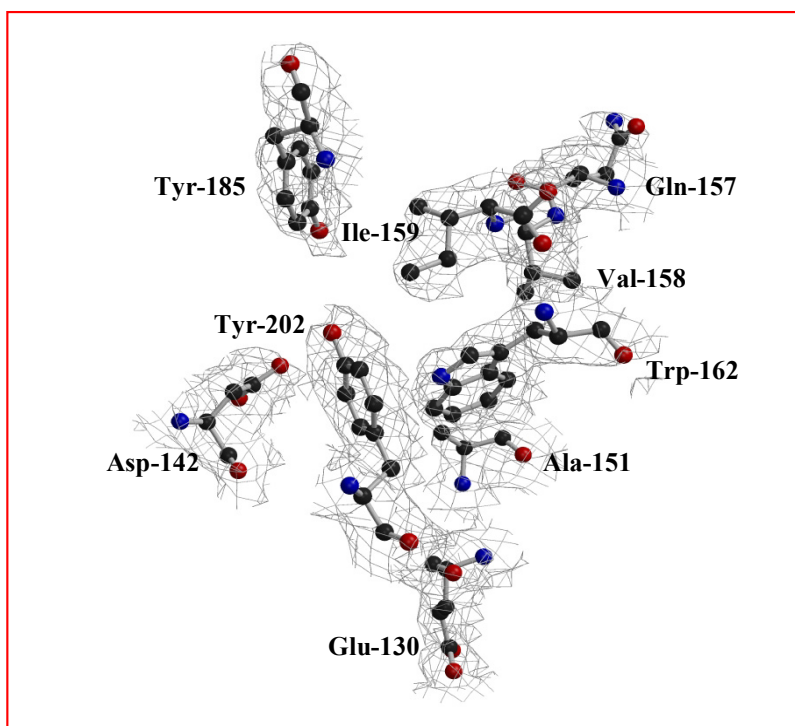


Abbildung 3.5.14.: Die Reste Glu-130, Asp-142, Ala-151, Gln-157, Val-158, Ile-159, Trp-162, Tyr-185 und Tyr-202 mit der sie umgebenden 3Fo-2Fc-Elektronendichtekarte. Diese wurde bei 1σ konturiert. Das Bild wurde unter Verwendung der Programme „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) erstellt.

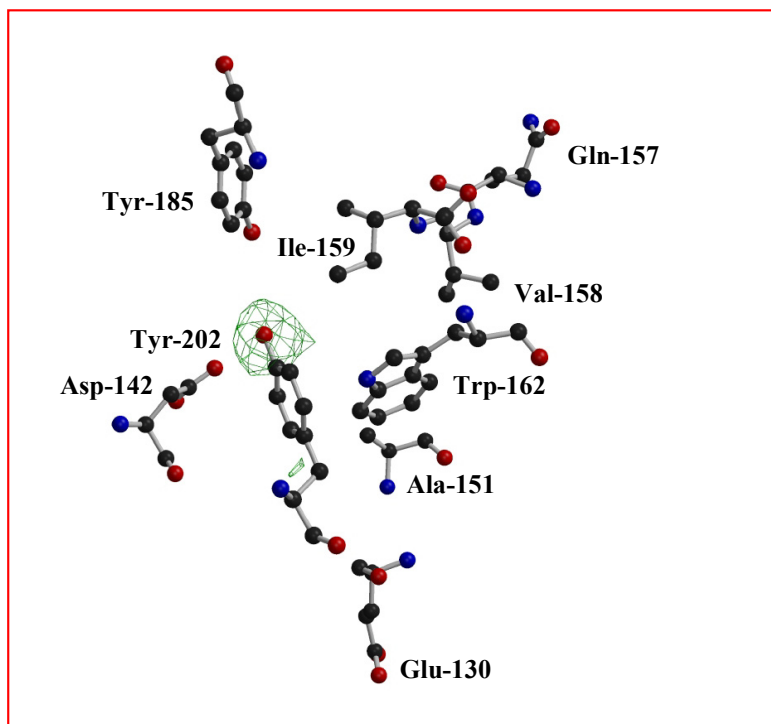


Abbildung 3.5.15.: 1Fo-1Fc-Elektronendichtekarte für den Rest Tyr-202 (grün). Die Konturierung erfolgte bei 3σ und die Berechnung mit Hilfe des Wildtyp-Proteins als Modell. Das Bild wurde mit Hilfe der Programme „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) generiert.

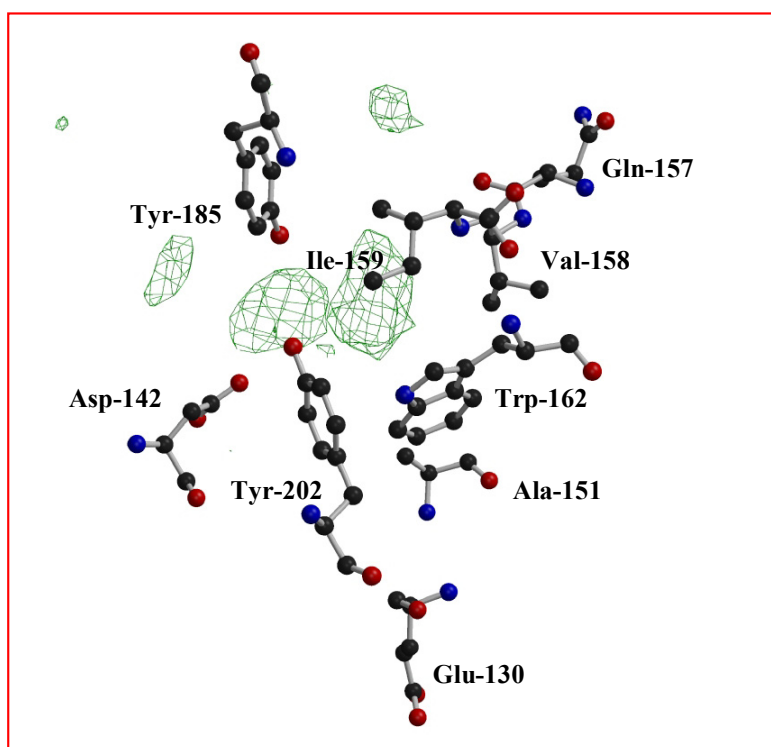


Abbildung 3.5.16.: Die bei 3σ konturierte 1Fo-1Fc-Elektronendichte um den Aminosäurerest Tyr-202 (grün). Außerdem sind die weiteren konservierten Reste der FK506-Bindeproteine dargestellt. Verwendete Programme: „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997).

Interessanterweise finden sich für diese Mutante um den Rest Tyr-202 Bereiche ungeklärter positiver Elektronendichte. Diese befinden sich in relativ großem Abstand (4 Å – 5 Å) zur OH-Gruppe des Tyr-202 und anderen polaren Gruppen bzw. zueinander. Das wird in der Abbildung 3.5.16. deutlich.

3.5.6. Untersuchung möglicher Umordnungen im aktiven Zentrum des Mip-Proteins in Folge Mutation konservierter Reste in der FKBP-ähnlichen Domäne

Durch die Mutationen Y185A oder F202Y sind Verschiebungen für die an der Wechselwirkung mit FK506 beteiligten Reste möglich. Zum Nachweis wurden die C-terminalen Domänen der Mutanten durch das Programm „ALIGN“ (Cohen, 1997) mit der FKBP-Domäne des Wildtyp-Proteins zur Deckung gebracht. Diese umfassen die Reste 124-212. Anschließend konnten die Positionen der Reste Glu-130, Asp-142, Ala-151, Gln-157, Val-158, Ile-159, Trp-162, Tyr-185 und Phe-202 zwischen Mutante und Wildtyp-Mip verglichen werden. Zur Kontrolle dienten die N-terminalen Mutanten S15A sowie A37F. Die Positionen der o.g. Reste für die Mutanten S15A, A37F, Y185A und F202Y sowie das Wildtyp-Mip-Protein sind in der Abbildung 3.5.17. dargestellt.

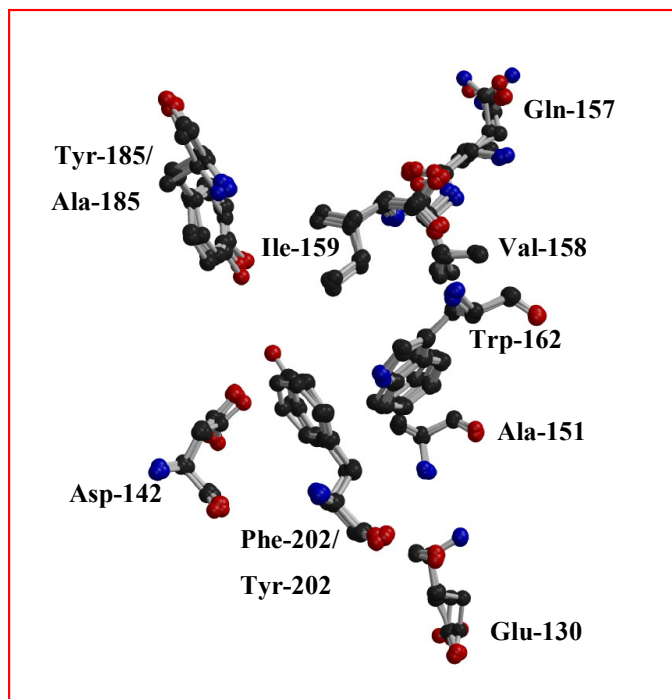


Abbildung 3.5.17.: Überlagerung der an der Wechselwirkung mit FK506 beteiligten Reste für die Mutanten S15A, A37F, Y185A und F202Y sowie das Wildtyp-Mip (Hacker & Fischer, 1993; Wintermeyer *et al.*, 1995). Darstellung generiert unter Verwendung der Programme „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997)

Offensichtlich kommt es durch die Mutationen in der C-terminalen Domäne (Y185A, F202Y) zu keinen Umordnungen für die betrachteten Aminosäurereste. Wie erwartet, konnten auch für die Mutanten S15A und A37F keine Veränderungen nachgewiesen werden.

3.5.7 Vergleich des durch Zn-Ionen vermittelten Kristallkontaktes in verschiedenen Mip-Mutanten

In der Kristallstruktur des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* kommt es zur Ausbildung eines durch zwei Zn-Ionen (Zn-301 und Zn-302) vermittelten Kristallkontaktes. Diese Wechselwirkung wird durch die FKBP-Domänen von im Gitter benachbarter Dimeren vermittelt. Dabei „verbrückt“ ein Acetat-Ion (Act-501) beide Metall-Ionen. Außerdem koordinieren die Seitenketten von His-205 und Glu-164' des symmetrieverwandten Moleküls (Bindung an Zn-302) sowie Glu-130 (Bindung an Zn-301). Daneben scheint auch Lys-123' in den meisten Elementarzellen mit Zn-301 in Wechselwirkung zu stehen. Die primäre Aminogruppe dieses Restes kann jedoch auch gegen Wasser substituiert sein. Zusätzlich bindet ein weiteres Wassermolekül. In den Strukturen der C-terminalen Mutanten ist dieses gegen einen Acetat-Rest (Act-503) ersetzt. Zn-302 bildet eine koordinative Bindung mit Act-502. Diese Acetat-Ion wird über ein Wassermolekül durch das O γ -Atom von Ser-106' positioniert. Außerdem finden sich in unmittelbare Nähe zu diesem Kristallkontakt weitere Acetat-Reste (Act-504 bzw. Act-505) und Wassermoleküle. Diese scheinen mit Thr-144 in Kontakt zu stehen. Im folgenden sind die Kristallkontakte für die einzelnen Mutanten zusammen mit der berechneten 3Fo-2Fc-Elektronendichte in den Abbildungen 3.5.18. bis 3.5.21. dargestellt. Bei den Abbildungen wurden die Programme „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) verwendet.

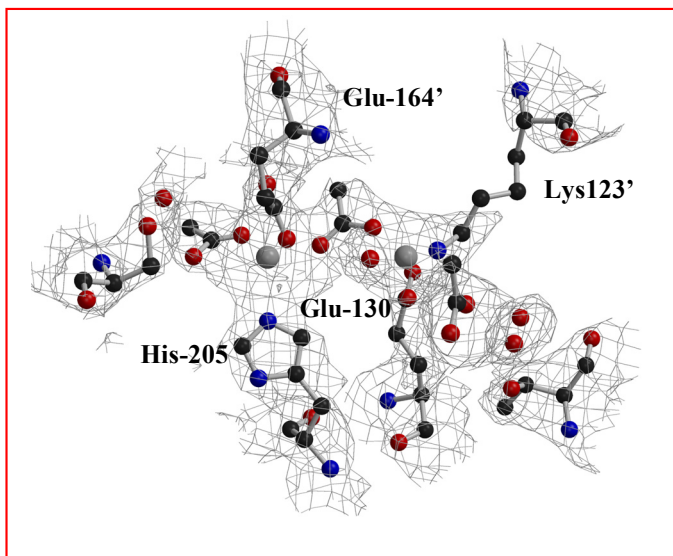


Abbildung 3.5.18.: Kristallkontakt in S15A.

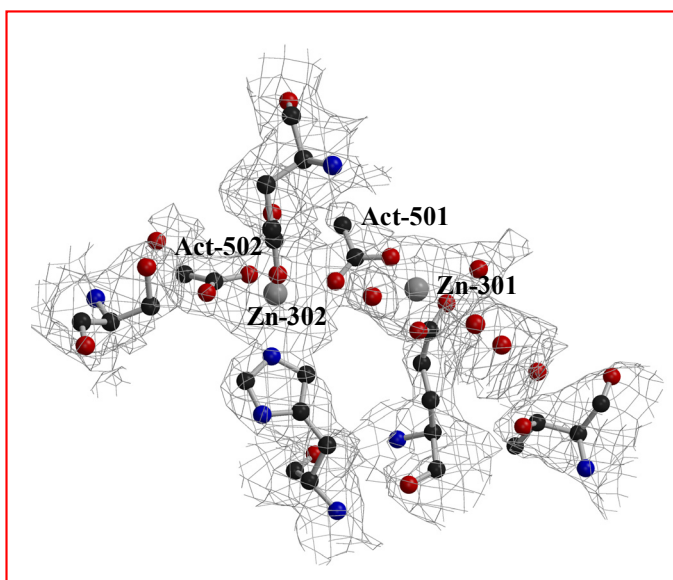


Abbildung 3.5.19.: Der durch Zn-Ionen vermittelte Kristallkontakt in der Mutante A37F.

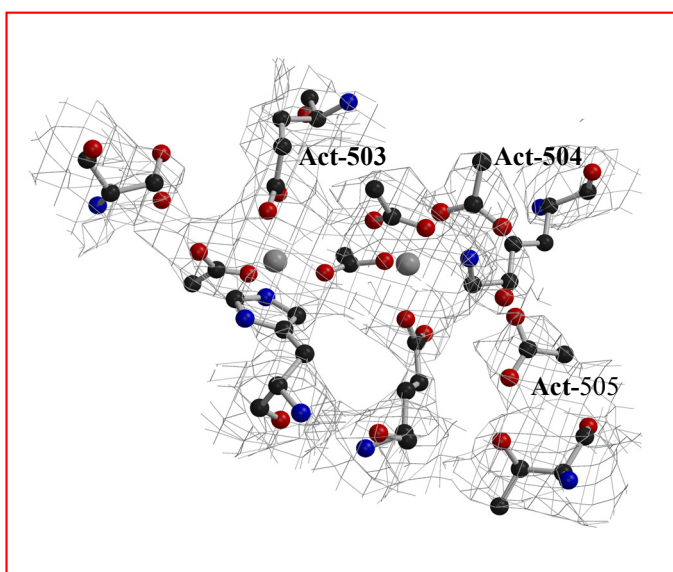


Abbildung 3.5.20.: Der Acetat-Rest 504 entspricht der Elektronendichte für die Mutante Y185A. Jedoch scheint das Molekül einen zu geringen Abstand zu Resten, wie Act-503, aufzuweisen.

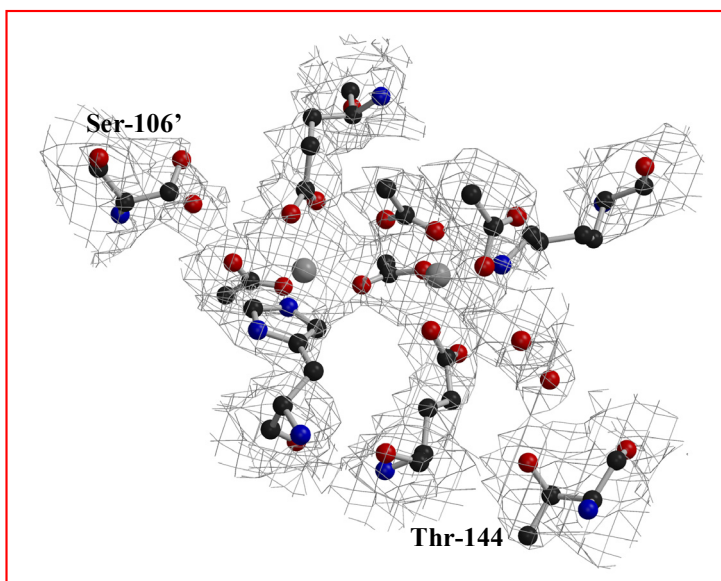


Abbildung 3.5.21.: Die Organisation des entsprechenden Kristallkontaktes in der Mutante F202Y.

3.5.8. Identifizierung weiterer Zn-Ionen in der Kristallstruktur des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila*

In der Struktur des Mip-Proteins konnten weitere Zn-Ionen mit einer Besetzung von 0,5 durch eine positive 1Fo-1Fc-Elektronendichte nach der Verfeinerung mit Wasser identifiziert werden. Sie sind grundsätzlich in der Nachbarschaft von sauren Seitenketten lokalisiert. Bei einer Konzentration von 500 mM Zn-Ionen im Kristallisationsansatz, die während der Kristallbildung weiter zunimmt, überrascht dieses Ergebnis nicht. Im einzelnen befinden sich Zn-Ionen wahrscheinlich in der Nähe von Seitenketten folgender Aminosäuren:

Mutante	Reste
S15A	Glu-36, Asp-44, Glu-89
A37F	Asp-10, Asp-21, Glu-55
Y185A	Asp-82, Glu-83
F202Y	Asp-82, Glu-83

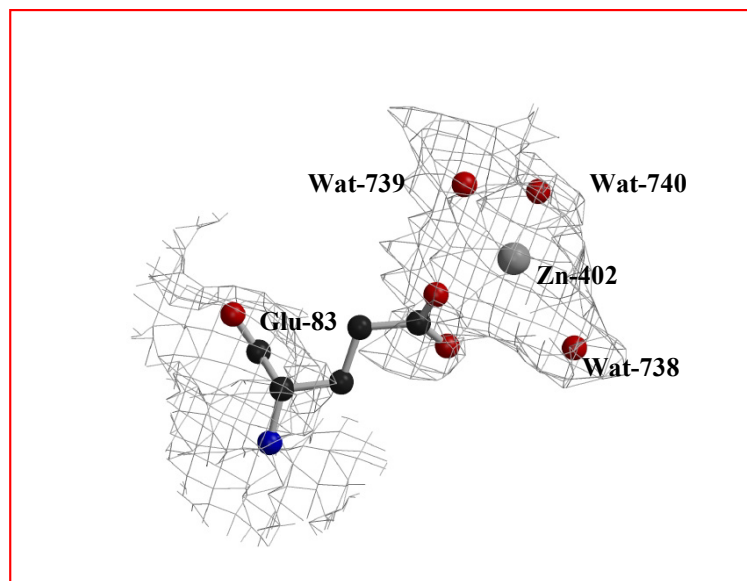


Abbildung 3.5.22.: Vermutetes Zn-Ion in der Umgebung von Glu-83 (Mutante F202Y). Die Besetzung beträgt 0,5. Außerdem ist die 3Fo-2Fc-Elektronendichtekarte bei 1σ für Glu-83 sowie koordinierende Wassermoleküle dargestellt. Die Darstellung erfolgte mit den Programmen „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) sowie „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997).

4. Diskussion

4.1. Kristallographische Untersuchungen der C-terminalen Mutanten Y185A und F202Y

Das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* besitzt die katalytische Aktivität einer Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (Fischer *et al.*, 1992). Dabei weist die C-terminale Domäne die Organisation der FK506-Bindeproteine auf (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001). Für die C-terminalen Mutanten Y185A und F202Y konnte eine dramatisch reduzierte Isomeraseaktivität von 0,6 % (Wintermeyer *et al.*, 1995) bzw. 0,9 % (persönliche Mitteilung Dr. Thilo Kamphausen, Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle) beobachtet werden. Daher lag es nahe, beide Moleküle mit der Röntgenstrukturanalyse zu untersuchen. Damit sollten strukturelle Veränderungen identifiziert werden, die den Verlust der katalytischen Aktivität erklären können.

Die Struktur der Mutante Y185A konnte leider nur bis zu einer Auflösung von 3,2 Å bestimmt werden. Außerdem weist das Modell für den kristallographischen R-Faktor (31,25 %) sowie den R_{free} (32,45 %) nach der Verfeinerung hohe Werte auf. Insbesondere für die N-terminale Domäne dieses Proteins wurden außerordentlich hohe B-Faktoren (zum Teil größer als 120) gefunden. Offensichtlich zeigt dieser Bereich des Moleküls eine ausgeprägte Flexibilität bzw. Variabilität. Dieses war mit einer Ausdehnung der Elementarzelle für den Kristall in Richtung der a- und b-Achse von 80,74 Å verbunden. Die Kristalle der Mutante waren primitiv tetragonal organisiert (Raumgruppe: $P4_32_12$). Durch die Berechnung der 1Fo-1Fc-Elektronendichte konnte der Austausch der Aminosäure Tyrosin gegen Alanin an der Stelle 185 zweifelsfrei gezeigt werden. Die allgemeine Struktur der C-terminalen Domäne veränderte sich durch die Substitution nur wenig. Jedoch konnte für einen Teilbereich der „Flap“-Region zwischen den Faltblättern 2 und 3 keine Elektronendichte bestimmt werden. Dieser umfaßt die Aminosäuren 185-191. Wahrscheinlich kommt es für diese Region des Moleküls zu einer größeren Beweglichkeit auf Grund der Mutation.

Im wtMip-Protein stabilisieren hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Ring von Tyr-185 und Ile-194 die „Flap“-Region. Außerdem kommt es zu

Kontakten mit den apolaren Seitenketten von Ala-184 und Ile-159. Dieses ist in der Abbildung 4.1. dargestellt.

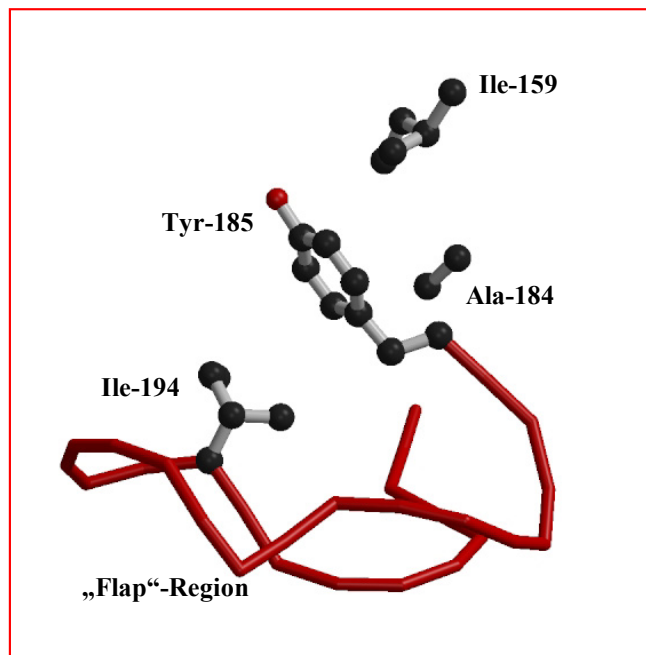


Abbildung 4.1.: Wechselwirkungen zwischen Tyr-185 und Ile-194 der „Flap“-Region sowie Ala-184 und Ile-159 für das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001). PDB ID: 1FD9 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Bei der Darstellung wurden die Programme „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) verwendet.

Durch die Mutation Y185A kommt es zu einer Verringerung der Kontaktfläche sowie zur Zunahme des Abstandes zwischen den erwähnten Seitenketten (Abbildung 4.2.). Dies hat unausweichlich eine Schwächung der hydrophoben Wechselwirkungen zur Folge. Dadurch könnte es zu einer größeren Beweglichkeit der „Flap“-Region mit dem Verlust einer definierten Struktur kommen. Dieses wird durch die fehlende Elektronendichte für die Reste 185-191 angezeigt.

Interessanterweise ist dieser Kontakt auch in der Kristallstruktur für FKBP12 (*Bos taurus*) zu finden (Wilson *et al.*, 1995). Hier kommt es zu Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten von Tyr-82 mit Ile-90 über Ile-91 sowie mit Ala-81 und Ile-56. Das macht die Abbildung 4.3. deutlich. Die Aminosäuren Ile-90 und Ile-91 sind wieder Bestandteil der „Flap“-Region.

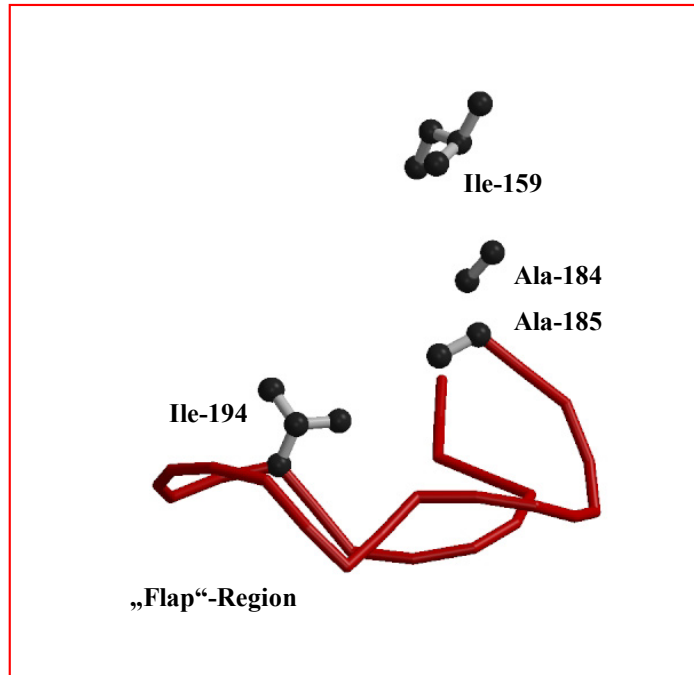


Abbildung 4.2.: Relative Positionen der Aminosäuren Ala-185, Ile-194, Ala-184 und Ile-159 zueinander für die Mutante Y185A. Das Bild wurde mit „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) erstellt.

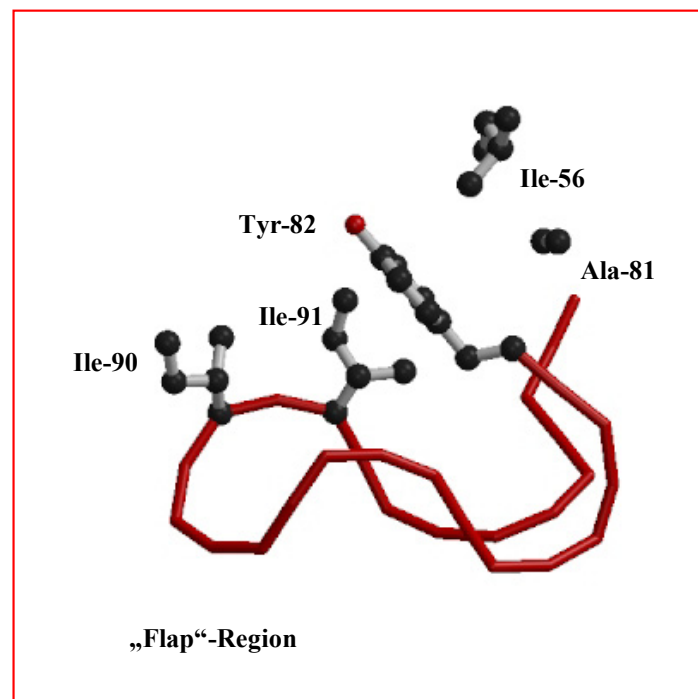


Abbildung 4.3.: Stabilisierende Wechselwirkungen für die „Flap“-Region von Ile-90 über Ile-91 mit Tyr-82 im FKBP12 von *Bos taurus* (Wilson *et al.*, 1995). Außerdem sind die Reste Ile-56 und Ala-81 gezeigt. PDB ID: 1FKK (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Die Darstellung konnte mit Hilfe von „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) generiert werden.

Diese Art der Stabilisierung kann sogar in der Struktur der Isomerase-Domäne vom „Trigger-Faktor“ aus *Mycoplasma genitalium* wiedergefunden werden. Dabei ist anzumerken, daß zwischen den FK506-Bindeproteinen und der Domäne des „Trigger-Faktors“ nur eine Sequenzidentität von 27 % besteht. Trotzdem weist das Protein die typische Organisation der FKBP's auf. Jedoch fehlt der Strang 1 für das beherrschende β -Faltblatt. Außerdem konnte für Teile der „Flap“-Region die Sekundärstruktur einer 3_{10} -Helix gefunden werden (Vogtherr *et al.*, 2002).

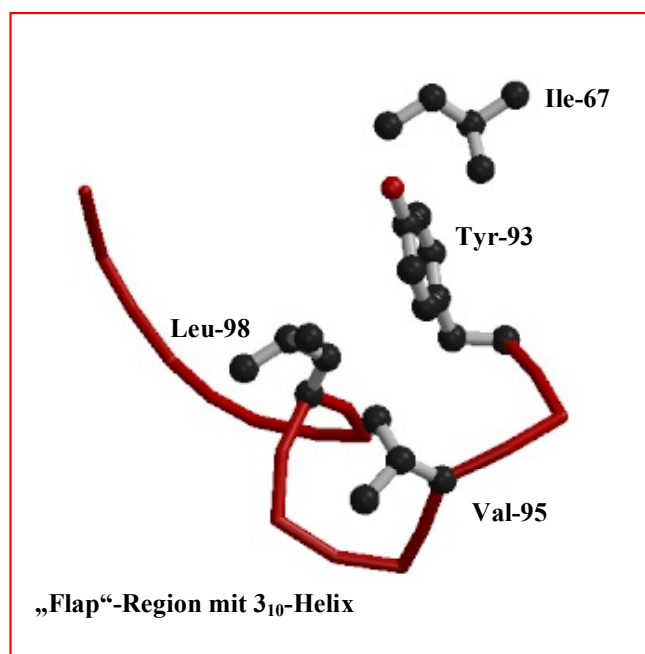


Abbildung 4.4.: Organisation der Kontakte zwischen Tyr-93 und Val-95 bzw. Leu-98 sowie zwischen Ile-67 und Tyr-93 im „Trigger-Faktor“-Protein von *Mycoplasma genitalium* (Vogtherr *et al.*, 2002). PDB ID: 1HXV (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Das Bild wurde mit den Programmen „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) erstellt.

Die Konservierung dieser stabilisierenden Wechselwirkungen trotz geringer Sequenzidentität zu anderen FK506-Bindeproteinen und sogar Modifizierungen der Sekundärstruktur in der „Flap“-Region unterstreicht ihre Bedeutung.

Unterschiede in den „Flap“-Regionen werden zusammen mit Variationen im 40s-„Bulge“-Strukturelement als „Fingerabdrücke“ verschiedener FKBP's betrachtet. Sie modulieren die Oberfläche des Proteins um das aktive Zentrum (Vogtherr *et al.*, 2002). Beide Bereiche weisen in der Familie der F506-Bindeproteine eine hohe Variabilität auf, wobei Speciesunterschiede eher gering ausfallen (Van Duyne *et al.*, 1991; Van Duyne *et*

al., 1993; Galat, 2000). Die „Flap“-Region spielt eine wichtige Rolle bei Wechselwirkungen mit anderen Proteinen. So konnten im ternären Komplex von FKBP-FK506 und Calcineurin zahlreiche Kontakte zwischen den Ketten A bzw. B der Phosphatase und der „Flap“-Region identifiziert werden (Griffith *et al.*, 1995). Nach Austausch der Aminosäure Ile-90 gegen Lysin kam es zu einer um den Faktor 2600 verringerten Affinität für Calcineurin (Futer *et al.*, 1995). Auch diese Mutation führt offensichtlich zum Verlust der stabilisierenden Wechselwirkung für die „Flap“-Region. Für das Drei-Domänen-Protein „Trigger-Faktor“ wird ein Beitrag der variablen Molekülbereiche bei der intramolekularen Organisation oder gar der Wechselwirkung mit GroEL vermutet (Vogtherr *et al.*, 2002).

Ein besonders interessantes Beispiel stellt die Struktur des Proteins FKBP17 vom Archebakterium *Methanococcus thermolithotrophicus* dar. Bei diesem Protein ist die „Flap“-Region extrem zur „IF“-Domäne erweitert. Diese besteht selbst aus einem viersträngigen β -Faltblatt und einer α -Helix (Suzuki *et al.*, 2003). Zusätzlich zur Isomerase-Aktivität besitzt dieses Protein Chaperon-ähnliche Eigenschaften. Dabei führt eine Deletionsmutante für den „IF“-Bereich des Moleküls zum Verlust der „Haltefunktion“ (Furutani *et al.*, 2000). Trotz der Erweiterung „Flap“-Region und dem Erwerb einer neuen Funktion konnten stabilisierende hydrophobe Kontakte von Tyr-84 mit Leu-138 bzw. Ile-58 und Ala-83 und Tyr-84 für die neue Domäne identifiziert werden. Außerdem scheint es zur Ausbildung einer Wasserstoffbrücke zwischen His-136 und Tyr-84 zu kommen. Die Organisation ist in der Abbildung 4.5. gezeigt.

Außerdem konnte die Wechselwirkung von Peptid-Substraten mit der „Flap“-Region gezeigt werden. Dabei scheint dieses Element eine Substratspezifität zu vermitteln (Patzelt *et al.*, 2001). Es ist möglich, daß die Mutation Y185A für das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* die Bindungseigenschaften für das Testsubstrat Suc-Ala-Phe-Pro-Phe-4-nitroanilid (Wintermeyer *et al.*, 1995) dramatisch verändert. Damit kann das Peptid nicht mehr isomerisiert werden.

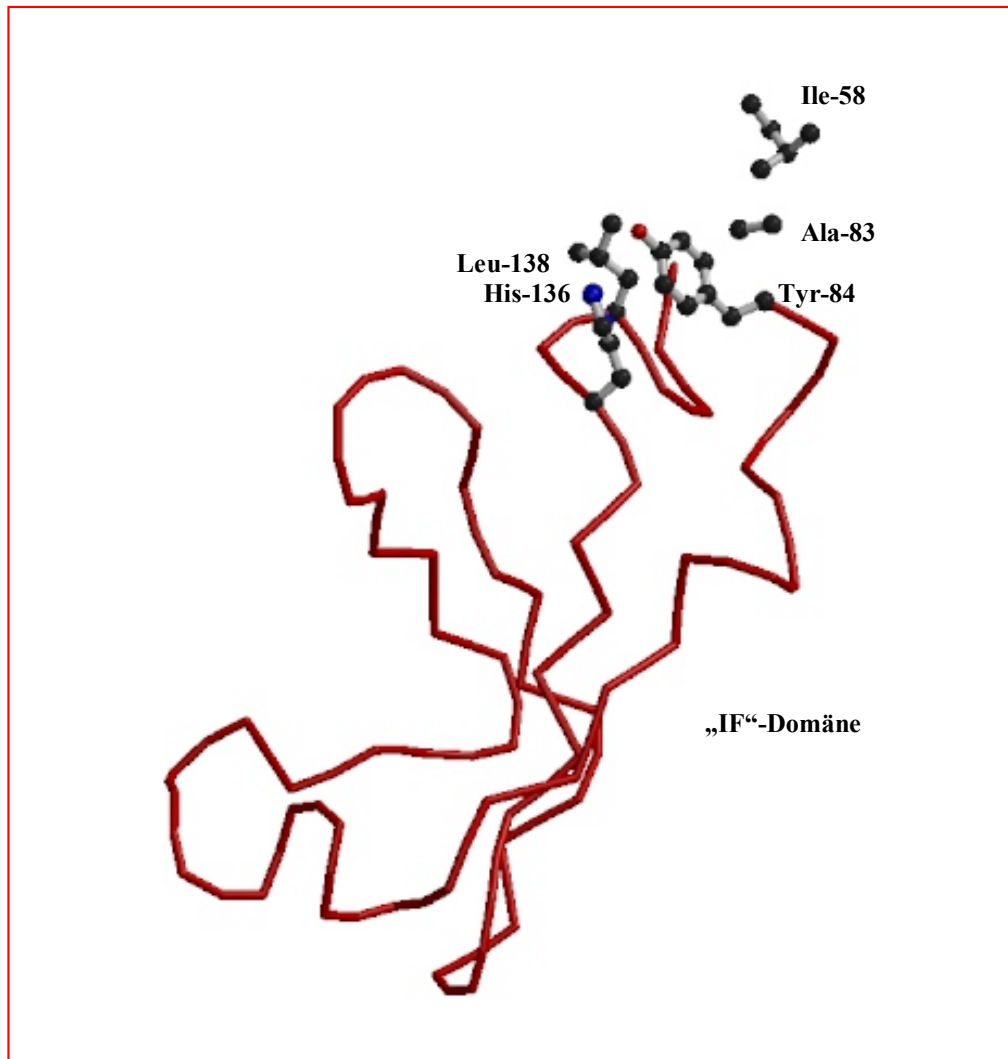


Abbildung 4.5.: Wechselwirkungen zwischen Tyr-84 und Leu-138 bzw. Ile-58 und Ala-83 im FKBP17 von *Methanococcus lithotrophicus* (Suzuki *et al.*, 2003). Außerdem ist die Orientierung des polaren Ringes von His-136 zu der OH-Gruppe von Tyr-84 dargestellt. PDB ID: 1IX5 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Mit Hilfe von „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) konnte das Bild generiert werden.

Daneben wird eine direkte Beteiligung des Restes Tyr-185 an der katalytischen Aktivität der FKBP-Bindeproteine diskutiert. So soll das Sauerstoff-Atom der OH-Gruppe durch Wechselwirkungen mit der Carbonyl-Sauerstoff-Funktion einer zu isomerisierenden Peptidbindung zu einer Destabilisierung des Grundzustandes für das Substrat führen (Fischer *et al.*, 1993). Nach Verlust der Seitenkette von Tyr-185 ist dieser Kontakt natürlich nicht mehr möglich. Es kommt zum Verlust der katalytischen Aktivität ohne Umordnungen im aktiven Zentrum.

Die Struktur der Mutante F202Y konnte bis zu einer Auflösung von 2,7 Å bestimmt werden. Der für die Strukturlösung verwendete Datensatz wurde dabei am Synchrotron in Grenoble aufgenommen. Für das Modell weisen insbesondere Atome der Dimerisierungsdomäne und der langen Verbindungshelix zwischen der N- und C-terminalen Domäne hohe B-Faktoren auf. Die Kristalle waren auch für dieses Molekül primitiv tetragonal organisiert und die Elementarzellen zeigten eine „lange“ a- bzw. b-Achse von 81,21 Å. Dies ist eine leichte Zunahme im Vergleich zur Mutante Y185A.

Wahrscheinlich existieren in den Kristallen des Mip-Proteins Elementarzellen mit zwei unterschiedlichen Ausdehnungen in Richtung der a- oder b-Achse (ungefähr 78 Å sowie 81 Å). In Abhängigkeit davon weisen Teilbereiche des Moleküls eine verschiedene Orientierung auf. Es ist verständlich, daß diese Kristalle auf Grund der fehlenden einheitlichen Ordnung die Röntgenstrahlung nur schlecht beugen. Somit konnte auch bisher keine Struktur mit einer „mittleren“ Länge der Elementarzelle in Richtung der a- bzw. b-Achse bestimmt werden. Derartige Kristalle sollten einen etwa gleich großen Anteil an beiden Elementarzellen und damit ein hohes Maß an innerer Unordnung aufweisen. Durch „Reannealing“ scheint es möglich zu sein, einen Einfluß auf die Anteile unterschiedlich orientierter Mip-Protein-Moleküle zu nehmen. Die meisten Elementarzellen weisen nach dieser Prozedur nun gleiche Ausdehnungen auf. Damit vergrößert oder verkleinert sich die „mittlere“ Elementarzelle. Die Abweichung vom Mittelwert beschreibt in diesem Falle eine Zunahme der inneren Ordnung. Somit wird verständlich, warum eine Zunahme der Länge für die a- bzw. b-Achse der Elementarzelle im Kristall der Mutante F202Y zu einer deutlichen Verbesserung der Auflösung führen konnte. Die untersuchten N-terminalen Mutationen S15A und A37F scheinen eine Konformation des Mip-Proteins zu stabilisieren, die zu einer kürzeren Ausdehnung der Elementarzelle in Richtung der a- bzw. b-Achse führen. Dies könnte für weitere Strukturuntersuchungen an diesem Molekül, z.B. der C-terminalen Domäne, von großer Bedeutung sein. Die Einführung der Mutationen S15A oder A37F sollte zu einer reproduzierbar höheren Qualität der gezüchteten Kristalle führen.

Wieder konnte die Mutation F202Y durch die Berechnung der 1Fo-1Fc-Elektronendichte eindeutig nachgewiesen werden. Im aktiven Zentrum der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase kommt es zu keinen Umordnungen von Aminosäureresten. Es kann daher

angenommen werden, daß die Modifizierung des aromatischen Ringes zu seinem Funktionsverlust führt.

Für die FK506-Bindeproteine wird die Stabilisierung des Übergangszustandes eines Substrats durch eine schwache Wechselwirkung zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff der Imidbindung und aromatischen Resten des Enzyms angenommen (Fischer *et al.*, 1993). Dazu gehört auch Phe-99 in FKBP12. Diesem Rest entspricht Phe-202 im Mip-Protein von *Legionella pneumophila*. Durch die Mutation F202Y wird letztlich im Ringsystem der Aminosäure ein Wasserstoff-Atom polarisiert. Es ist leicht vorstellbar, daß nun die Wechselwirkung zwischen der aromatischen Aminosäure sowie dem Carbonyl-Sauerstoff der Imidbindung verstärkt wird. Damit wird der Übergangszustand praktisch fixiert. Die enzymatische Aktivität ist verhindert.

Interessanterweise findet sich im aktiven Zentrum des mutierten Proteins eine Kette von 3 „Peaks“ positiver Elektronendichte. Diese besitzen einen Abstand von 5,9 Å und eine Intensität von 4 σ bzw. 5 σ . Bereits Riboldi-Tunnicliffe hat eine Öffnung des aktiven Zentrums für die Mutation Y185F beschrieben (Riboldi-Tunnicliffe, 2000). Als deren Folge soll der Zugang von 7 Wassermolekülen zu diesem Bereich des Moleküls möglich sein. Dabei folgen die Moleküle der Konformation von gebundenem FK506. Bemerkenswerterweise kommt es zu keinen Kontakten mit dem Protein. In der Struktur für die Mutante F202Y weisen die Zentren der ungeklärten Elektronendichte eine Distanz von mindestens 4 Å – 5 Å zur OH-Gruppe des Tyr-202 und anderen polaren Gruppen des Mip-Moleküls auf. Somit können ebenfalls keine Wasserstoffbrücken ausgebildet werden. Allerdings zeigt die für die Umgebung berechnete 3Fo-2Fc-Elektronendichte eine „knotig schlauchartige“ Form (Abbildung 4.6.).

Damit liegt die Vermutung nahe, daß ein kettenförmiges Molekül in dieser überwiegend hydrophoben Umgebung bindet. Vielleicht handelt es sich dabei um ein kurzes Polyethylenglykol-Fragment. Diese Substanz wurde in hoher Konzentration als Fällungsmittel bei der Kristallisation verwendet.

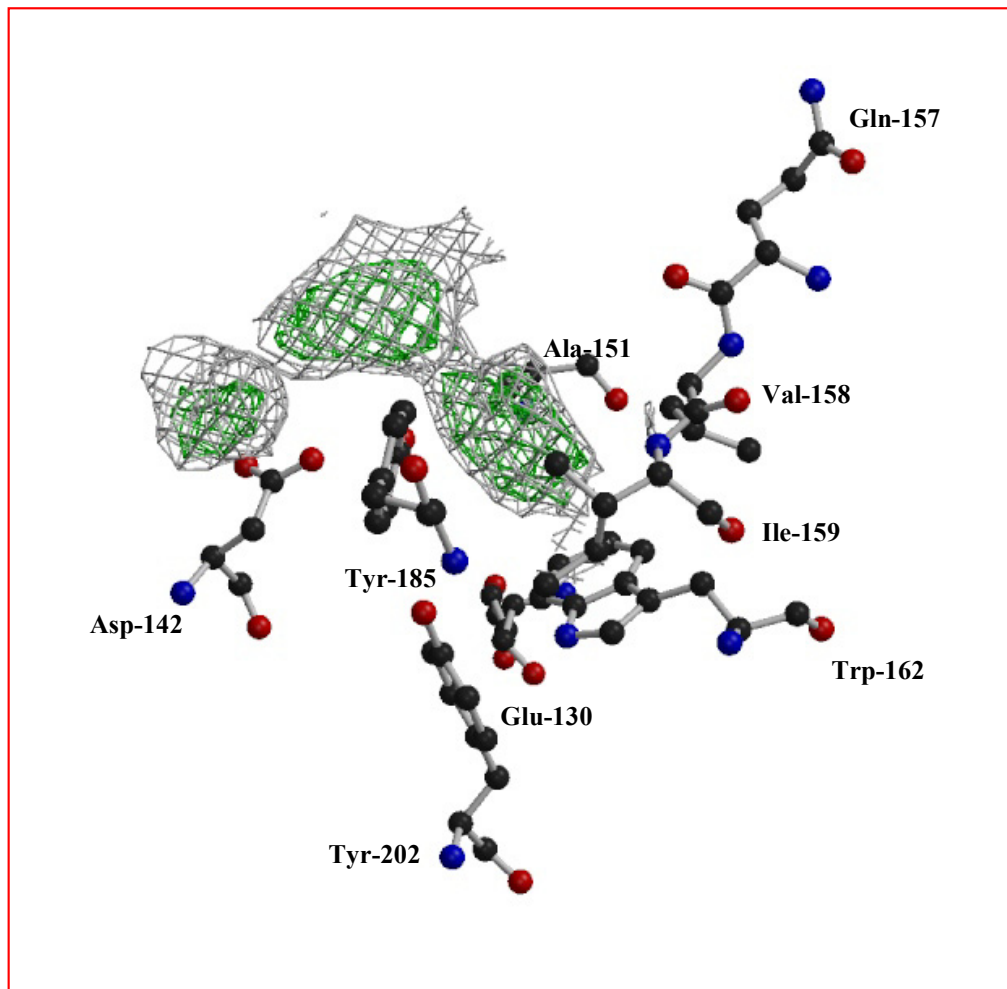


Abbildung 4.6.: Ungeklärte 3Fo-2Fc-Elektronendichte (grau) im aktiven Zentrum der Mip-Mutante F202Y von *Legionella pneumophila*. Die 1Fo-1Fc-Elektronendichte ist in Grün dargestellt. Die „knotig schlauchartige“ Form ist klar zu erkennen. Bei der Darstellung wurden die Programme „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) verwendet.

Die Bindung von Polyethylenglykol in der Nähe des aktiven Zentrums ist auch für die Kristallstruktur der Isomerase Pin1 beobachtet worden (Ranganathan *et al.*, 1997). Dieses Enzym gehört zur Familie der Parvuline. Jedoch weist es trotz fehlender Sequenzhomologie eine überraschend ähnliche dreidimensionale Organisation wie die FK506-Bindeproteine auf. Außerdem findet sich auch in diesem Protein eine hydrophobe Bindungstasche für das Substrat. Problematisch ist jedoch der große Abstand zwischen den einzelnen Zentren der Elektronendichte in für die Mutante F202Y. In der Struktur von Pin1 weisen die Sauerstoff-Atome von PEG (sind die elektronenreichsten Atome in dieser Verbindung) nur einen Abstand von etwa 3 Å auf. Außerdem ist völlig unklar, wie

die Mutation die Bindung eines Polyethylenglykol-Fragmentes ermöglichen könnte. Für eine Klärung dieser Fragen scheint das Strukturmodell mit einer höheren Auflösung die Voraussetzung zu sein.

4.2. Kristallographische Untersuchungen der N-terminalen Mutanten S15A und A37F

Die N-terminale Domäne im Mip-Protein von *Legionella pneumophila* ist α -helikal organisiert. Dabei wird über die Dimerisierung ein ungewöhnliches „Four-Helix-Bundle“ gebildet. Die Helices weisen eine antiparallele Orientierung auf und sind um einen Winkel von 45° gegeneinander verschoben. Interessanterweise ist eine Vielzahl von Wechselwirkungen an der Organisation der Dimerisierungsdomäne(n) beteiligt. So kommt es zu hydrophoben Kontakten zwischen der Helix 1 und der Helix 2' (anderes Monomer) bzw. Helix 2 und Helix 2'. Außerdem stehen apolare Reste der Helix 1 und Helix 3' (lange Verbindungshelix zwischen der N- und C-terminalen Domäne des anderen Monomers) miteinander in Wechselwirkung. Aber auch die „Loop“-Region zwischen der Helix 1 und 2 scheint an hydrophoben Kontakten zur Helix 3 beteiligt zu sein. Dadurch wird eine nanomolare Dissoziationskonstante für das Molekül erreicht (Schmidt *et al.*, 1994). Wasserstoffbrücken und elektrostatische Anziehung spielen nur eine geringe Rolle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die N-terminalen Mutanten S15A und A37F mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse untersucht. Dabei konnten die Strukturen bis zu einer Auflösung von 2.7 \AA bestimmt werden. Die Kristalle der Proteine waren primitiv tetragonal organisiert ($P4_32_12$) und wiesen eine kurze a- bzw. b-Achse für die Elementarzelle auf ($78,02 \text{ \AA}$ für S15A und $77,95 \text{ \AA}$ für A37F). Außerdem erreichten sie für das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* eine ungewöhnliche Größe. So konnte für die Mutante S15A ein Kristall mit Abmessungen von $1100 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$ gezüchtet werden. Mit diesem wurde auch die Datensammlung durchgeführt. Die Modelle weisen eine gestreckte Verbindungshelix zwischen der N- und C-terminalen Domäne auf. Außerdem wurden relativ niedrige B-Faktoren für die Kristallstrukturen beider N-terminalen Mutanten gefunden. Das trifft insbesondere für Bereiche des Moleküls zu, die an der Dimerisierung beteiligt sind.

Im dimeren wtMip-Protein wird zwischen dem $O\gamma$ -Atom von Ser-15 und dem Amidstickstoff von Asn-34' (anderes Monomer) eine Wasserstoffbrücke ausgebildet. Dies ist in der Abbildung 4.7. dargestellt. Durch die Mutation S15A wird die Wechselwirkung verhindert.

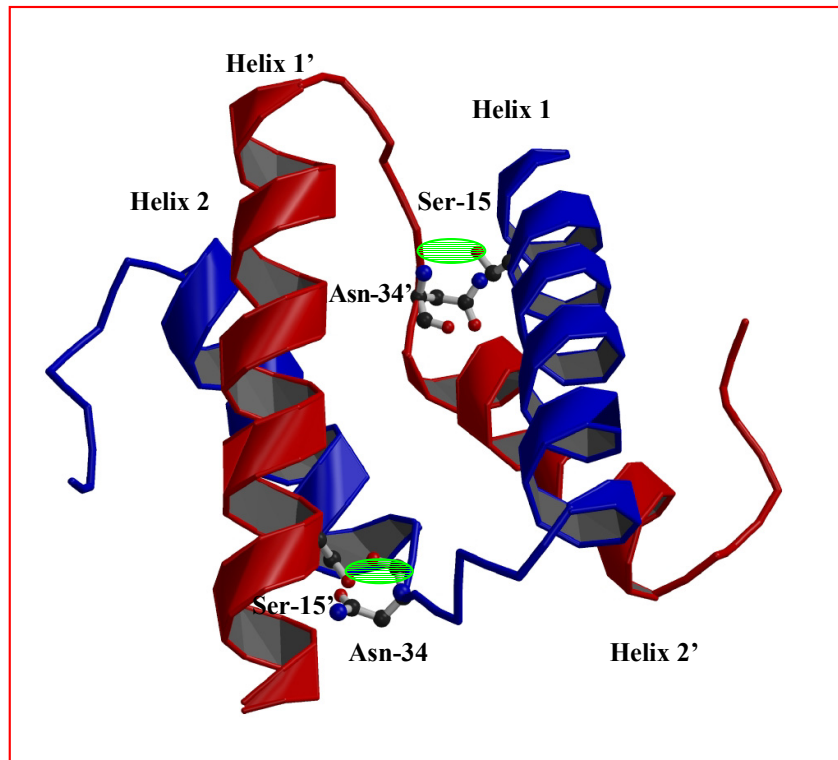


Abbildung 4.7.: Wechselwirkungen zwischen Ser-15 und Asn-34' (bzw. Ser-15' und Asn-34) der Dimerisierungsdomänen im Mip-Protein von *Legionella pneumophila* (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001). PDB ID: 1FD9 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Das Bild wurde mit „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) erstellt. Für die Reste Asn-34 und Asn-34' sind die Haupt- und Seitenkettenatome gezeigt.

Der mutierte Aminosäurerest befindet sich in der Helix 1. Offensichtlich führt der Verlust der Wasserstoffbrücke zu Repositionierungen in der Dimerisierungsdomäne. Der Inklinationwinkel zwischen Helix 1 und Helix 2' (bzw. Helix 1' und Helix 2) vergrößert sich geringfügig. Es ist anzunehmen, daß sich beide Helices gegenseitig über hydrophobe Wechselwirkungen bei der Ausbildung ihrer Sekundärstruktur stabilisieren. Da die Kontaktfläche nun verkleinert ist, kommt es letztlich zu einer Destabilisierung, was durch die Verkürzung von Helix 1 (bzw. Helix 1') deutlich wird. Dies führt wiederum zu einer Umordnung in der nachfolgenden „Loop“-Region und der Verschiebung der Seitenkette von Ile-31. Die Abbildungen 4.8. und 4.9. können dies verdeutlichen.

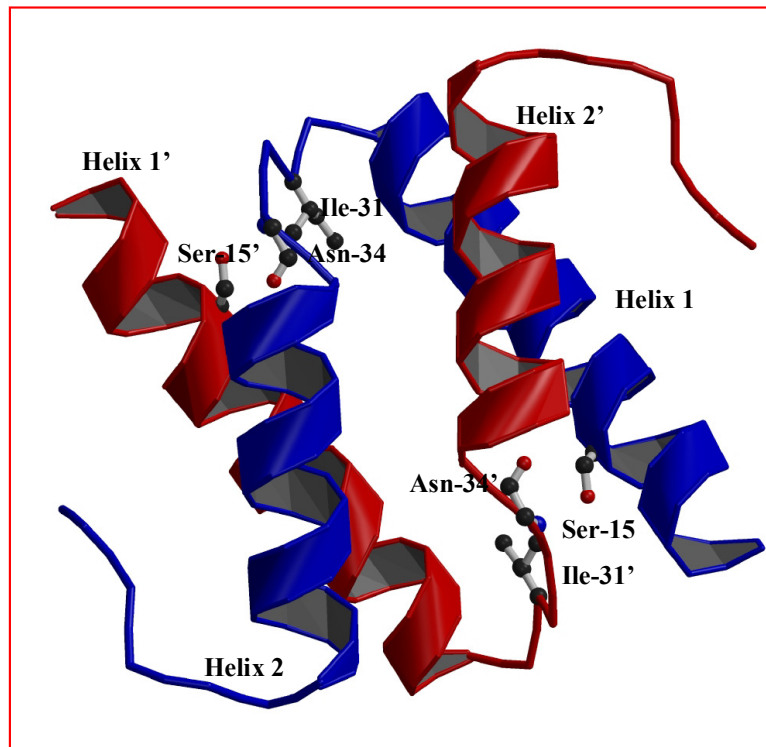


Abbildung 4.8.: Dimerisierungsdomäne(n) im Mip-Protein von *Legionella pneumophila* (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001). PDB ID: 1FD9 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Für die Reste 15 und 31 (bzw. 15' und 31') sind die Seitenketten gezeigt. Außerdem ist für Asn-34 (bzw. Asn-34') die Hauptkette in der „Ball-and-Stick“-Darstellung hervorgehoben. Bei der Darstellung wurden die Programme „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) verwendet.

Die Aminosäure Ile-31 befindet sich wiederum in räumlicher Nähe zu apolaren Resten der langen Verbindungshelix (Helix 3) zwischen der N- und C-terminalen Domäne (Leu-62, Phe-65 und Leu-69). Somit kann die Umorientierung der Seitenkette von Ile-31 zu strukturellen Konsequenzen für die Helix 3 führen. Die entsprechenden Kontakte sind für das wtMip-Protein und die Mutante S15A in den Abbildungen 4.10. und 4.11. dargestellt.

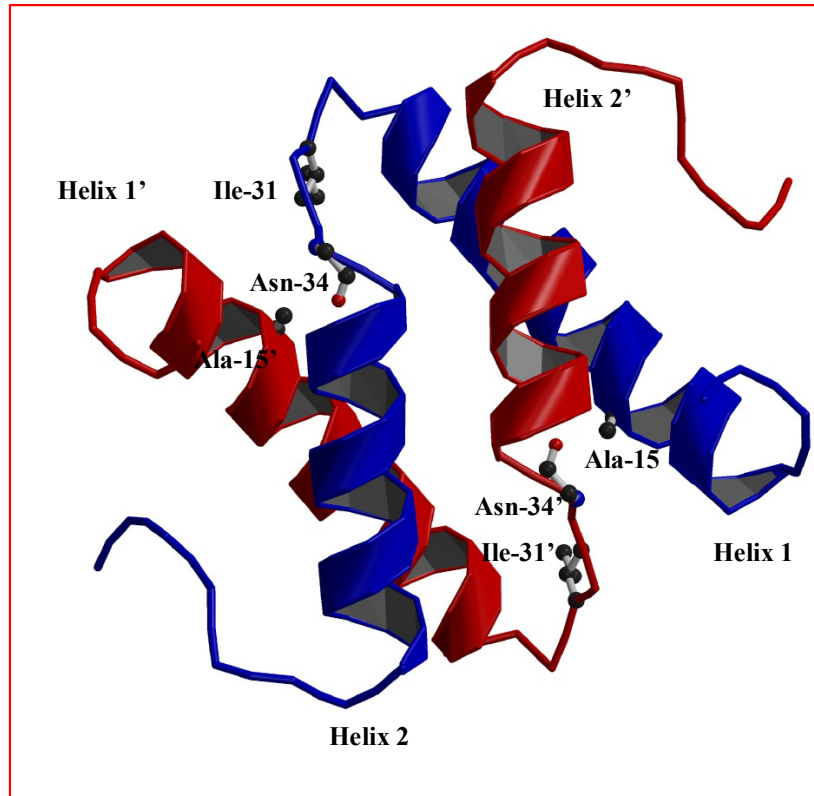


Abbildung 4.9.: Dimerisierungsdomäne(n) für die Mip-Mutante S15A. Der vergrößerte Inklinationswinkel sowie die Verkürzung der Helix 1 (Helix 1') sind zu erkennen. Für Ala-15 und Ile-31 (Ala-15' und Ile-31') wurden die Seitenketten, für Asn-34 (Asn-34') die Hauptkette dargestellt. Das Bild konnte mit Hilfe von „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) erstellt werden.

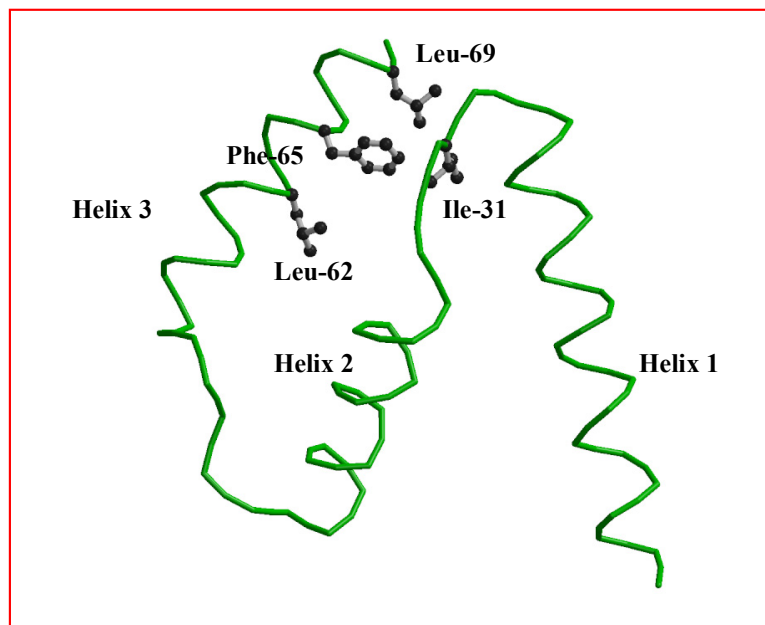
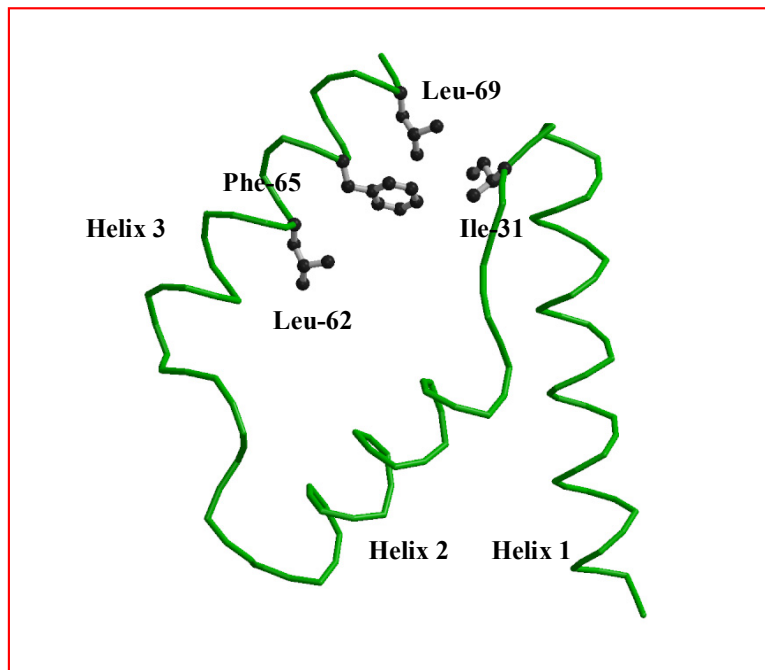


Abbildung 4.10.: Der Kontakt von Ile-31 in der „Loop“-Region zwischen Helix 1 und 2 sowie Leu-62, Phe-65 und Leu-69 in der Helix 3 für das wtMip-Protein von *Legionella pneumophila* (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001). PDB ID: 1FD9 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>).



Abbildungen 4.11.: Wechselwirkungen zwischen Ile-31 sowie Leu-62, Phe-65 und Leu-69 für die Mip-Mutante S15A. Für die Darstellungen 4.10. und 4.11. wurden „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) verwendet.

Offensichtlich kommt es durch die Umorientierung der Seitenkette von Ile-31 zu sterischen Behinderungen für hydrophobe Reste der Helix 3. Dies erfordert eine leichte Verschiebung der langen Verbindungshelix zwischen der N- und C-terminalen Domäne. Sie bewegt sich von der „Loop“-Region zwischen Helix 1 und Helix 2 fort. Es ist nicht unmittelbar einsichtig, wie diese Reorientierung zu einer Streckung der langen Helix führen könnte.

Die Untersuchung der Mutante A37F war die Folge eines Schreibfehlers. Ursprünglich sollte der Rest Ala-39 gegen Phenylalanin im Protein ausgetauscht werden. Die Aminosäure Ala-39 ist Bestandteil der Helix 2 in der N-terminalen Domäne. Dabei stehen sich die Seitenketten von Ala-39 (in Helix 2) und Ala-39' (in Helix 2') durch die Dimerisierung fast unmittelbar gegenüber. Beim Austausch gegen Phenylalanin käme es zum räumlichen „Clash“ zwischen den großen aromatischen Ringen. Dieses ist in der Abbildung 4.12. zu sehen.

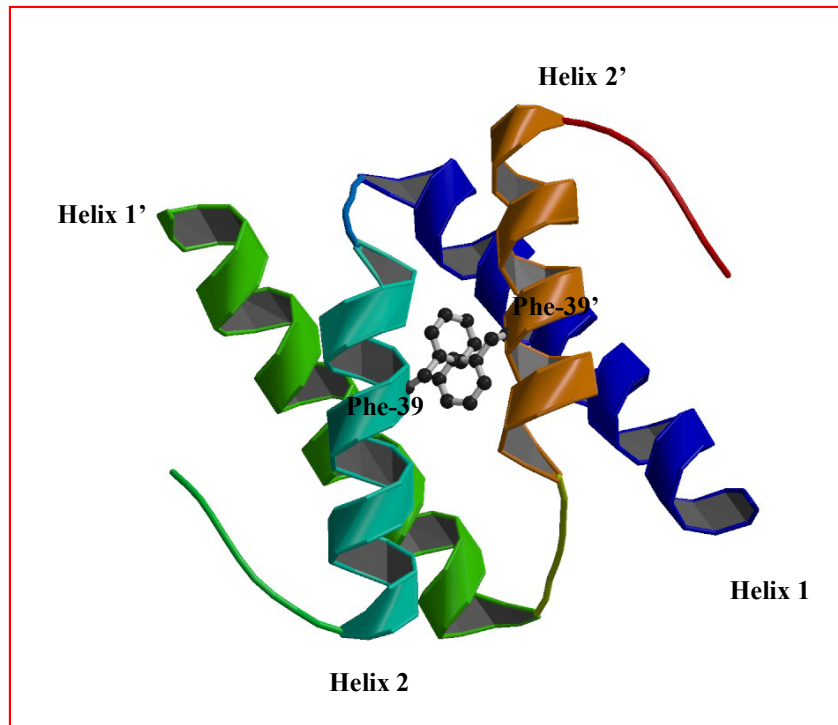


Abbildung 4.12.: Die Mutation A39F führt zu sterischen Problemen in der Dimerisierungsdomäne des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* (Riboldi-Tunncliffe, *et al.* 2001). PDB ID: 1FD9 (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Das Bild wurde mit „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) erstellt. Außerdem konnte das Programm „O“ (Jones *et al.*, 1991) für den Austausch von Ala-39 gegen Phenylalanin verwendet werden.

Die strukturellen Konsequenzen, z.B. mögliche Umordnungen in der Dimerisierungsdomäne, oder sogar der Verlust der dimeren Struktur des *LpMip*-Proteins, hätten durch die Röntgenstrukturanalyse bestimmt werden können.

Wie bereits beschrieben, weisen die Seitenketten des Reste 37 und 37' in der Helix 2 bzw. Helix 2' voneinander fort. Daher kommt es auch für den Austausch von Alanin gegen Phenylalanin an dieser Position zu keinen sterischen Behinderungen in der Dimerisierungsebene. Jedoch konnten für die Mutante A37F geringfügige Veränderungen in der Struktur im Vergleich zum Wildtyp-Protein beobachtet werden. Diese erinnern in überraschender Weise an die Repositionierungen von Sekundärstrukturelementen für die Mutante S15A. Dabei ist eine Erklärung durch neue Wechselwirkungen möglich.

Durch die Mutation befindet sich die polare Seitenkette von Asp-12 (Asp-12') in der Helix 1 (Helix 1') in räumlicher Nähe zum aromatische Ring der Aminosäure Phe-37' (Phe-37). Diese energetisch ungünstige Wechselwirkung führt zu einer Bewegung der Carboxylgruppe für die saure Aminosäure. Gleichzeitig scheint es, wie in der Mutante S15A, zu einer Vergrößerung des Inklinationswinkels zwischen Helix 1 und Helix 2' bzw. Helix 1' und Helix 2 zu kommen (Abbildung 4.13.).

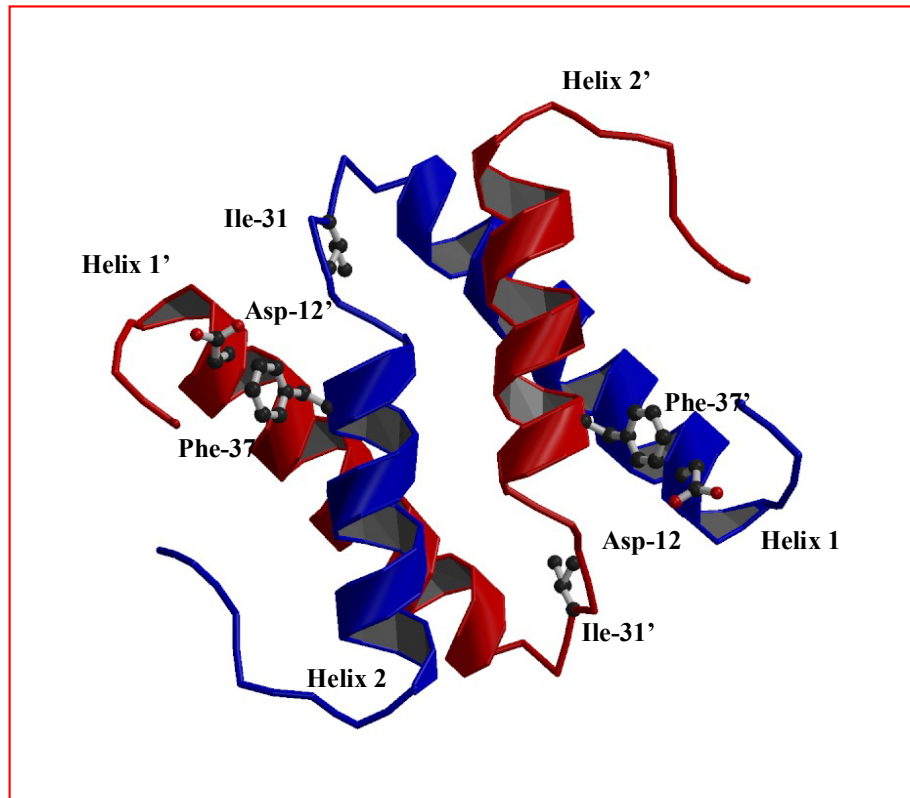


Abbildung 4.13.: Struktur der Dimerisierungsdomäne(n) für die Mutante A37F. Für die Aminosäurereste Asp-12 (Asp-12'), Phe-37 (Phe-37') und Ile-31 (Ile-31') sind die Seitenketten dargestellt. Es wurden die Programme „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) genutzt.

Die Verschiebung von Helix 1 gegenüber Helix 2' (bzw. Helix 1' gegenüber Helix 2) bedingt wieder eine Destabilisierung und damit eine Verkürzung der Helix 1 (Helix 1'). Folgerichtig kommt es zur Umorientierung der Seitenkette von Ile-31 mit den strukturellen Konsequenzen für die lange Verbindungshelix zwischen der N- und C-terminalen Domäne des Mip-Proteins: Durch die räumliche Nähe, insbesondere zwischen Ile-31 und Phe-65, muß sich Helix 3 von der „Loop“-Region zwischen Helix 1 und Helix 2 fortbewegen. Diese Verschiebung ist in der Abbildung 4.14. zu sehen.

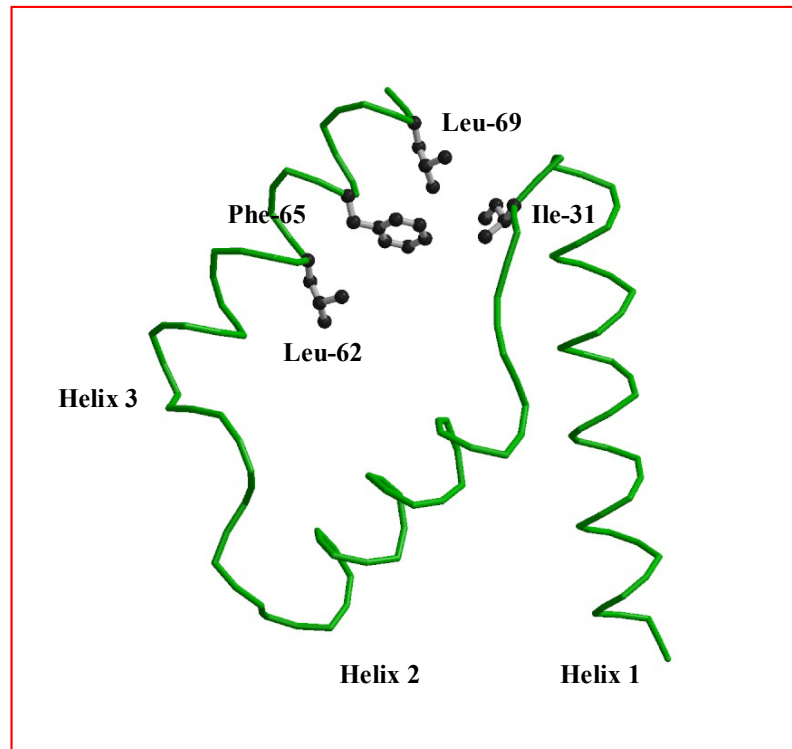


Abbildung 4.14.: Der Kontakt von Ile-31 in der „Loop“-Region zwischen Helix 1 und 2 sowie Leu-62, Phe-65 und Leu-69 in der Helix 3 für die Mip-Mutante A37F von *Legionella pneumophila*. Das Bild konnte mit Hilfe von „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) erstellt werden.

Auch im FkpA-Molekül, dem Mip-Homologen aus *Escherichia coli*, kommt es zu Kontakten der langen Verbindungshelix mit der „Loop“-Region zwischen Helix 1 und Helix 2. Insbesondere scheinen hydrophobe Wechselwirkungen von Ile-47 und Leu-49 mit Phe-80 von Bedeutung zu sein. Jedoch sorgen für dieses Protein zusätzliche hydrophobe Kontakte zur Helix 1' (anderes Monomer) für eine weitere „Öffnung“ des dimeren Proteins (Saul *et al.*, 2004). Dabei befinden sich apolare Seitenketten von Ile-73, Leu-77 und Phe-80 in räumlicher Nähe zu Leu-27' und Ala-29' (Abbildung 4.15.).

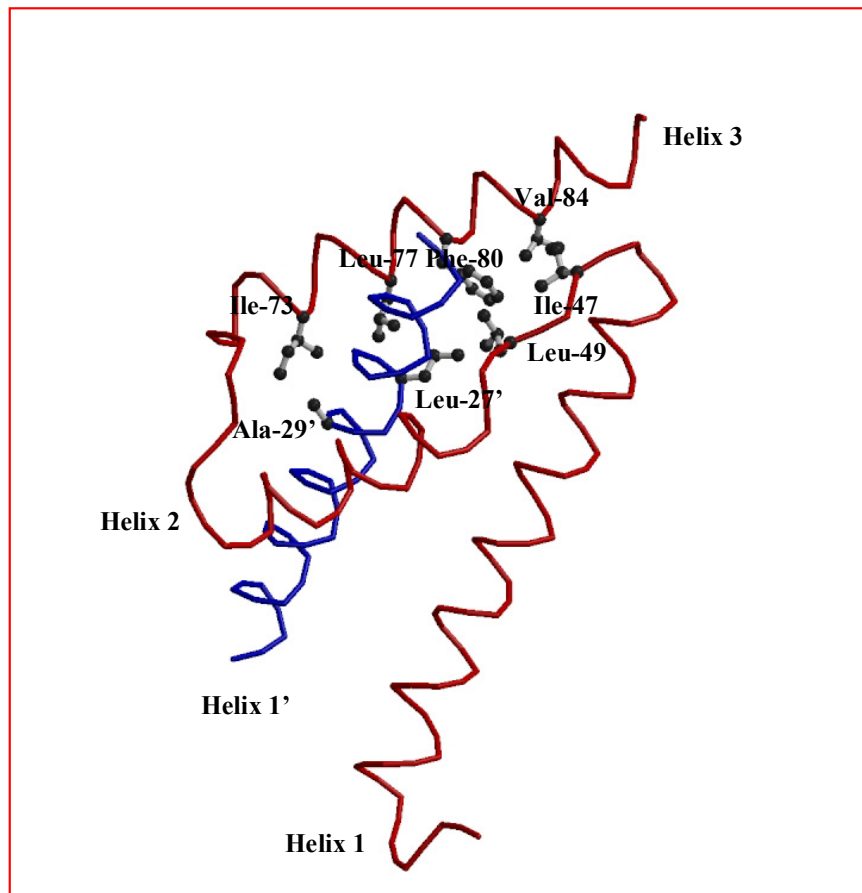


Abbildung 4.15: Hydrophobe Wechselwirkungen der Helix 1' mit der Verbindungshelix zwischen der N- und C-terminalen Domäne im FkpA-Molekül von *Escherichia coli* (Saul *et al.*, 2004). PDB ID: 1Q6U (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Für die Darstellung konnten „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) verwendet werden.

Abschließend muß noch erwähnt werden, daß im FkpA-Molekül ein Methionin-Rest der Helix 1 (bzw. Helix 1') in Wechselwirkung mit einem hydrophoben Rest der Helix 2 (Helix 2') des eigenen Monomers steht. Dabei handelt es sich um Met-35 und Val-54 (bzw. Met-35' und Val-54'). In diesem Falle kann man allerdings nicht mehr von einem „Zipper“ sprechen. Jedoch scheint eine Regulation des dimeren Zustandes, ähnlich wie im DsbC-Dimer, durch die Modifizierung der Methionin-Reste möglich. Das kann über der Red-Ox-Zustand der Umgebung geschehen.

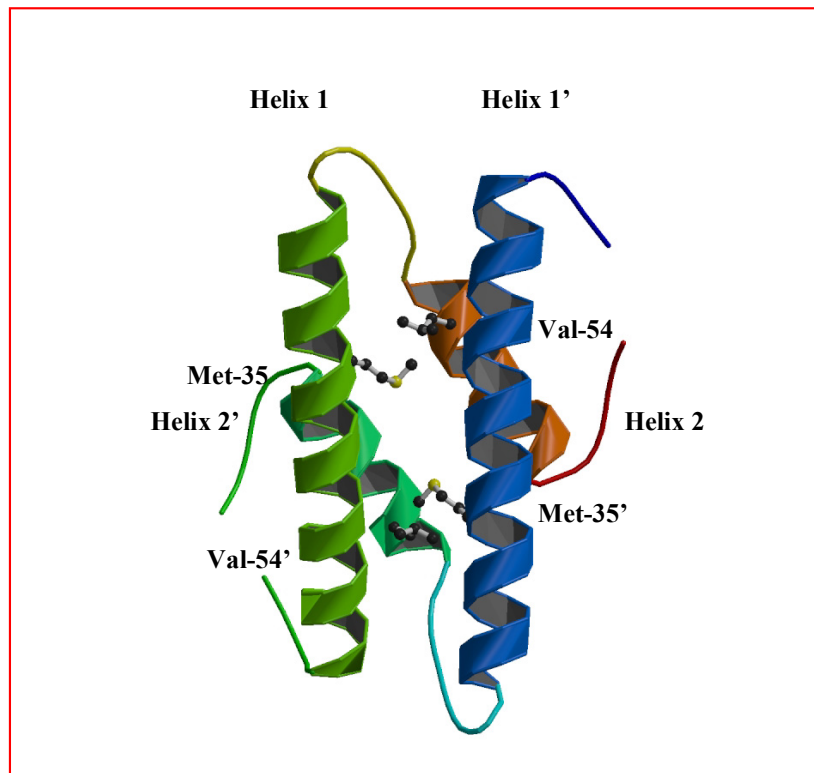


Abbildung 4.16.: Reduzierter „Methionin-Zipper“ im FkpA-Molekül (Saul *et al.*, 2004). PDB ID: 1Q6U (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsborg/pdb/>). Es wurden die Programme „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) genutzt.

4.3. Untersuchungen zur Chaperon-ähnlichen Aktivität der Mip-Proteine

Man findet in verschiedenen Kompartimenten der Zelle eine hohe Konzentration an biologischen Makromolekülen. Das macht die Vermeidung von unerwünschten (hydrophoben) Wechselwirkungen zu einer wichtigen Aufgabe (Mogk *et al.*, 2001). Daher stellt eine Chaperon- bzw. eine Chaperon-ähnliche Aktivität sicher keine Besonderheit von wenigen Proteinen dar. Außerdem wird für verschiedene Enzyme die Kombination mit einer „Haltefunktion“ diskutiert. Das könnte das Ergebnis einer Entwicklung sein, um die molekulare Effizienz zu erhöhen (Wang & Tsou, 1998). Daneben kann eine Chaperon-Aktivität auch für weit verbreitete, also evolutionär „alte“, Proteine als Kofunktion gefunden werden. Dazu zählen die prokaryotischen Elongationsfaktoren G und Tu sowie der Initiationsfaktor 2 (Caldas *et al.*, 1998; Caldas *et al.*, 2000).

Für das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* wurde im Citrat-Synthase-Aggregationsassay sowie im Nde-I-Testsystem eine Chaperon-artige Aktivität („Haltefunktion“) nachgewiesen. Das homologe Molekül aus *Legionella pneumophila* war nicht in der Lage, die Aggregation von „Condensing-Enzyme“ bzw. die Inaktivierung eines Restriktionsenzym bei höherer Temperatur zu verhindern. Im Gegenteil, die Koinkubation von Citrat-Synthase und *LpMip* bei 45°C führte sogar zu einer verstärkten Trübung. Nach Zentrifugation dieser Lösung, konnte jedoch gezeigt werden, daß sich kein Mip-Protein von *Legionella pneumophila* im Präzipitat anreichern ließ. Die ausgeführten CD-Messungen bestätigten, daß es für das Protein bei den zur Charakterisierung genutzten Temperaturen zu keinen dramatischen Konformationsveränderungen kommt. Somit kann eine Inaktivierung durch die genutzten experimentellen Bedingungen weitgehend ausgeschlossen werden.

Das Disulfid-Isomerase DsbC aus *Escherichia coli* besitzt eine überraschende Ähnlichkeit in der dreidimensionalen Organisation zum Mip-Protein aus *Legionella pneumophila*. Beide Moleküle sind Dimere mit einem vergleichbaren Molekulargewicht und besitzen eine offene „V-Form“ (McCarthy *et al.*, 2000; Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2001). Außerdem besitzt das DsbC-Protein auch Eigenschaften eines Chaperons (Chen *et al.*, 1999). Daher wurde für die Mip-Proteine eine identische Funktion vermutet. Daneben konnte auch für das Homologe aus *Escherichia coli*, FkpA, die Fähigkeit gezeigt werden, die Aggregation von Male31 im stöchiometrischen Verhältnis zu verhindern, sowie denaturierte Citrat-Synthase zu reaktivieren (Arie *et al.*, 2001). Außerdem wurde eine Ähnlichkeit in der räumlichen Struktur zu bakteriellen Chaperonen, die an Sekretionsvorgängen beteiligt sind, erkannt.

Das Typ-III-Sekretionssystem von Gram-negativen Bakterien findet sich bei verschiedenen Krankheitserregern von Tieren und Pflanzen und dient dem Transport von Virulenzfaktoren (Wattiau *et al.*, 1996; Hueck, 1998). Es ist *Sec*-unabhängig und besteht aus ungefähr 20 Proteinen. Die meisten seiner Komponenten befinden sich in der inneren Membran. Für den Transport ist eine cytoplasmatische ATPase, die wahrscheinlich ebenfalls mit der Membran assoziiert ist, notwendig. Die meisten der „inneren“ Proteine zeigen eine Ähnlichkeit zum Biosyntheseapparat von Flagellen. Dagegen konnte für eine Komponente der äußeren Membran die Homologie zu PulD gezeigt werden. PulD stellt das Sekretin im Typ-II-Sekretionssystem dar (Hueck, 1998). Das Signal für die Sekretion

von Virulenzfaktoren befindet sich in der N-terminalen Region dieser Moleküle. Jedoch wird es nicht während des Transports abgespalten (Wattiau *et al.*, 1996). Die Effektormoleküle des Typ-III-Sekretionssystem sind oft mit spezifischen Chaperonen assoziiert. So bindet YopE in *Yersinia pestis* an das Chaperon SycE. YopE ist dabei ein selektiver Aktivator von GTPasen der Rho-Familie bei Säugetieren und vermittelt über diesen Mechanismus seine Cytotoxizität (Black & Bliska, 2000). Die Struktur des SycE-Proteins ist in der Abbildung 4.17. zu sehen.

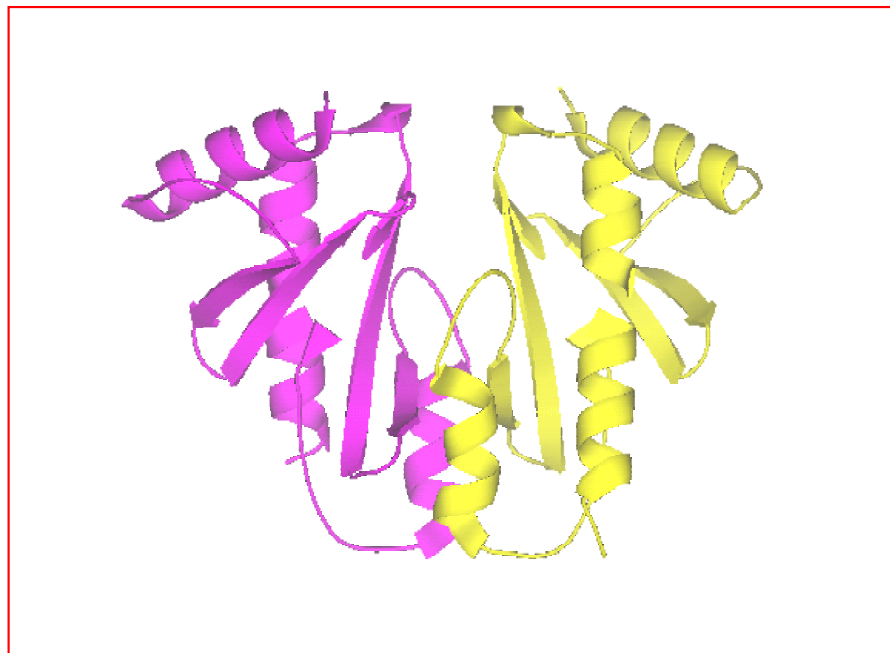


Abbildung 4.17.: Struktur des Chaperons SycE von *Yersinia pestis*. Die Darstellung wurde mit Hilfe von „PyMOL“ (DeLano, 2002; <http://www.pymol.org/>) generiert. PDB ID: 1JYA (Birtalan & Ghosh, 2001; Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>).

CesT ist ein spezifisches Chaperon von enteropathogenen und enterohämorrhagischen *Escherichia coli*. Es bindet das Tir-Protein während des Sekretionsvorganges. Das Tir-Molekül stellt einen Intimin-Rezeptor dar (Luo *et al.*, 2001). Er wird in die Membran der Wirtszelle „eingebaut“ und ermöglicht einen engen Kontakt zwischen Bakterium und Wirt. Dieser ist dann Ausgangspunkt verschiedener Signalprozesse (Delahay *et al.*, 2002).

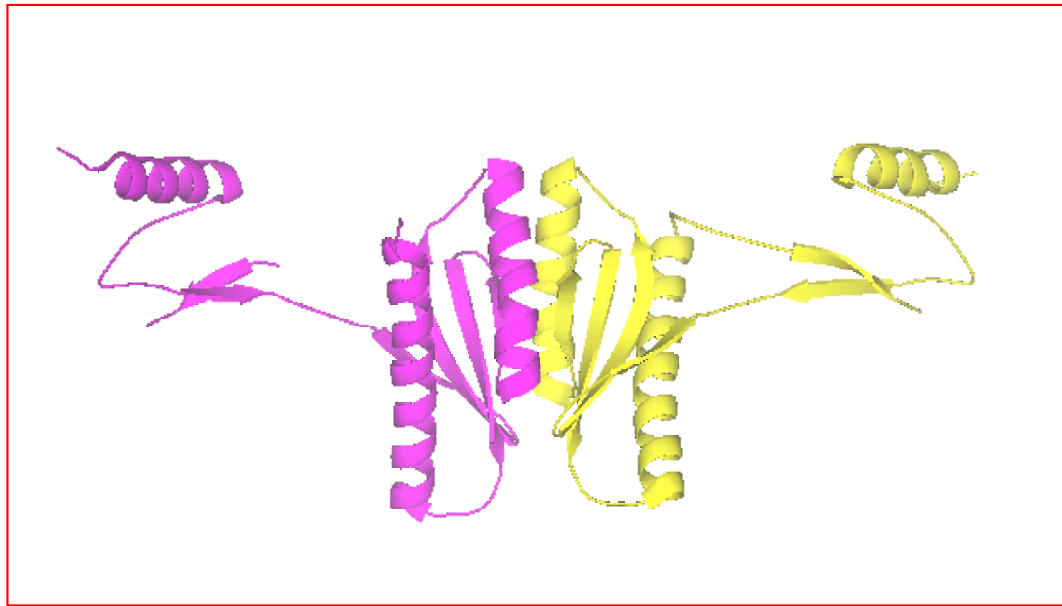


Abbildung 4.18.: Gezeigt wird die räumliche Organisation des CesT-Chaperons von *Escherichia coli*. Für die Darstellung wurde „PyMOL“ (DeLano, 2002; <http://www.pymol.org/>) verwendet. PDB ID: 1K3E (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>).

Die Strukturen der Chaperone SycE und CesT erinnern tatsächlich an das Mip-Protein von *Legionella pneumophila*. Beide Moleküle sind Dimere und weisen eine V- bzw. Y-artige Form auf. Außerdem besitzen sie eine amphipathische Helix. Dies stützte die Vermutung einer Chaperon-Funktion für die Mip-Proteine von *Legionella pneumophila* und *Chlamydia pneumoniae*. Besonders interessant ist der enge Substratbereich von SycE und CesT. Citrat-Synthase und NdeI stellen sicher keine physiologischen Substrate für die Mip-Proteine dar. Es ist daher denkbar, daß für das *LpMip* eine „Haltefunktion“ allein auf Grund einer höheren Spezifität nicht nachgewiesen werden konnte. Die Funktion der Chaperone in der Typ-III-Sekretion könnte im Erhalt eines partiell entfalteten Proteins liegen, um durch den Translokationskanal mit einem Durchmesser von 3 nm zu gelangen (Stebbins & Galán, 2001). In letzter Zeit wird auch eine Funktion der Proteine bei der Synchronisation der Sekretion verschiedener Virulenzfaktoren diskutiert. Durch die Bindung an Chaperone wird den Effektoren ein dreidimensionales Signal aufgeprägt (Birtalan *et al.*, 2002). Ähnliche Funktionen sind auch für die Mip-Proteine von *Legionella pneumophila* und *Chlamydia pneumoniae* vorstellbar.

In diesem Zusammenhang ist die Beobachtung interessant, daß das *LpMip*-Protein an Kollagen IV der extrazellulären Matrix bindet (persönliche Mitteilung Dr. Michael Steinert, Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg). Für Kollagenmonomere (Typ I) aus der Lunge konnte die vollständige Entfaltung bei 37°C innerhalb weniger Tage nachgewiesen werden. Der „Schmelzpunkt“ dieses Proteins liegt unterhalb der menschlichen Körpertemperatur (Leikina *et al.*, 2002). Auch für Kollagen III ist eine lokale Entfaltung wahrscheinlich (Stultz, 2002). Diese Tatsachen machen eine spezifische Chaperon-Substrat-Wechselwirkung zwischen Kollagen IV und dem Mip-Protein von *Legionella pneumophila* möglich.

In jüngster Zeit ist die Kristallstruktur des Mip-homologen Proteins in *Escherichia coli*, FkpA, bestimmt worden (Saul *et al.*, 2004). Sie ist in der Abbildung 4.19. gezeigt.

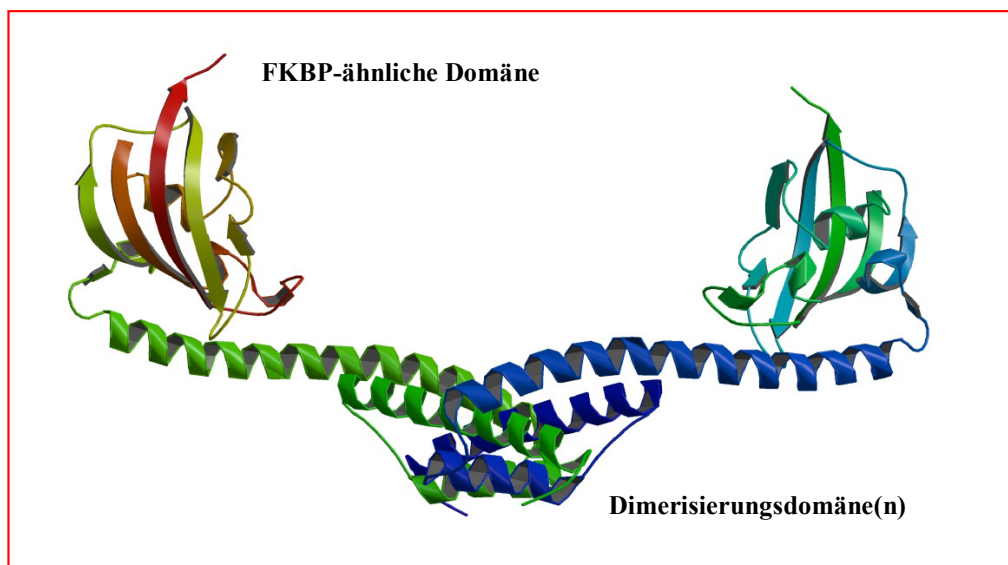


Abbildung 4.19.: Kristallstruktur des FkpA-Proteins aus *Escherichia coli*. PDB ID: 1Q6U (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Das Bild wurde mit den Programmen „BobScript“ (Kraulis, 1991; Esnouf, 1997) und „Raster3D“ (Merritt & Bacon, 1997) erstellt.

Auch FkpA bildet ein V-förmiges dimeres Molekül. Dabei weisen die Verbindungshelices zwischen den N- und C-terminalen Domänen jedoch einen größeren Winkel auf, als im Mip-Protein von *Legionella pneumophila*. Außerdem wurde die Chaperon-Aktivität der N-terminalen Domäne (118 Aminosäuren) untersucht. Dabei zeigte sich, daß dieses Fragment die korrekte Faltung von Male31 *in-vivo* ermöglicht. Außerdem ist es in der Lage, die Reaktivierung von Gdn-HCl-denaturierter Citrat-

Synthese zu stimulieren. Offenbar zeigt die isolierte N-terminale Domäne Chaperon-ähnliche Eigenschaften (Saul *et al.*, 2004). Das steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur Charakterisierung einer Chaperon-ähnlichen Aktivität am Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* im Rahmen dieser Arbeit. Durch den Einfluß von reduzierenden Bedingungen kommt es in diesem Molekül zur Lösung einer Disulfid-Brücke zwischen den Dimerisierungsdomänen. Dies ist mit einer deutlichen Verringerung der Chaperon-ähnlichen Aktivität verbunden.

Birtalan *et al.* konnten die Struktur des Komplexes zwischen SycE und der Bindedomäne von YopE bestimmen (Abbildung 4.20.).

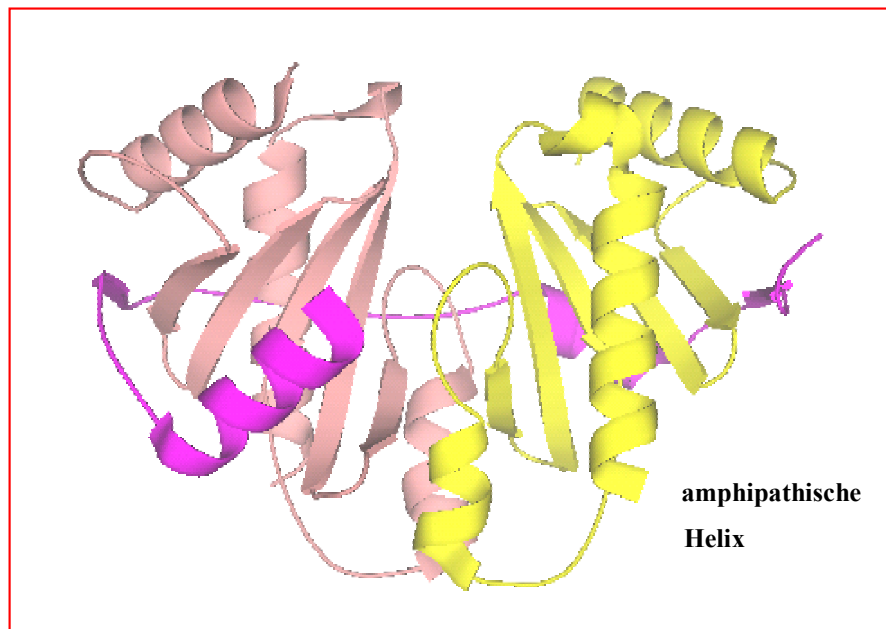


Abbildung 4.20.: Der Komplex zwischen der Bindedomäne von YopE (violett) und seinem Chaperon SycE (Birtalan *et al.*, 2002). PDB ID: 1L2W (Berman *et al.*, 2000; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Für die Darstellung der Struktur wurde das Programm „PyMOL“ (DeLano, 2002; <http://www.pymol.org/>) genutzt.

Die Struktur zeigt eine bemerkenswerte Ähnlichkeit zum Komplex aus SicP, einem weiteren Chaperon der Typ-III-Sekretionsmaschinerie, und der Bindedomäne von SptP. Dies ist besonders überraschend, da weder die Bindedomänen noch die Chaperone eine Sequenzähnlichkeit aufweisen. Die Oberfläche von SycE und SicP bieten konservierte hydrophobe Reste, an denen die untersuchten Peptide in einer nicht-globulären Konformation binden. Ihre Sekundärstrukturelemente sind dagegen erhalten. Dies

erinnert an eine „Molten-Globule“-Konformation. Dabei sind die amphipathischen Helices nicht an der Substratbindung beteiligt. Sie spielen ebenfalls keine Rolle bei der Dimerisierung (Stebbins & Galán, 2001; Birtalan *et al.*, 2002). Aber die Chaperone könnten auf Grund dieses Strukturelementes (bedingen die Y-artige Form) eine größere intramolekulare Beweglichkeit besitzen. Diese Eigenschaft ist sicher bei der Bindung von „Molten-Globule“-Zuständen von Proteinen von Bedeutung, da die Substrate unter diesen Bedingungen selbst eine strukturelle Variabilität aufweisen (Haynie & Freire, 1993).

Die V- bzw. Y-Form der Mip-Proteine (bzw. des FkpA-Homologen aus *Escherichia coli*), vermittelt durch die langen Verbindungshelices zwischen den Dimerisierungs- und FKBP-ähnlichen Domänen, führt sicher ebenfalls zu einer größeren Flexibilität. Diese sollte auch eine Grundlage der Chaperon-ähnlichen Aktivität im Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* und dem FkpA-Molekül bilden. Analog kann für das DsbC-Molekül aus *Escherichia coli* argumentiert werden. Interessanterweise zeigten die bei der Röntgenstrukturanalyse verwendeten Kristalle von DsbC Variationen in einer Dimension der Elementarzelle. Diese wurden durch eine unterschiedliche Krümmung der Verbindungshelix zwischen der N- und C-terminalen Domäne verursacht (McCarthy *et al.*, 2000). Es ist bemerkenswert, daß auch für das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* aufgrund dieser Flexibilität eine Nichtisomorphie für verschiedene Kristalle beobachtet werden konnte.

Außerdem wurde für Citrat-Synthase ein partiell entfalteter Zustand („Molten-Globule“-ähnlich) bei höheren Temperaturen nachgewiesen (Ayed & Duckworth, 1999). Die „Haltefunktion“ für das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* konnte durch einen temperaturabhängigen Aggregationsassay mit diesem Enzym gezeigt werden. Somit stellt die ungewöhnliche V-Form für verschiedene Chaperone bzw. Chaperon-ähnliche Moleküle, verbunden mit einer großen intramolekularen Beweglichkeit, möglicherweise die Folge einer konvergenten Entwicklung dar.

4.4. Monomerisierung der Mip-Proteine von *Legionella pneumophila* und *Chlamydia pneumoniae* durch oxidierende bzw. reduzierende Bedingungen

Das dimere Mip-Protein von *Legionella pneumophila* kann durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid monomerisiert werden. Dies haben „Crosslinking“-Experimente mit nachfolgender elektrophoretischer Auftrennung gezeigt. Für das CpMip wurde ein über Disulfid-Brücken gebildetes Dimer unter denaturierenden Bedingungen nachgewiesen. Diese konnten durch ein chemisches Reduktionsmittel (DTT) gelöst werden. Die Monomerisierung des Mip-Proteins aus Legionellen wird über die Sulfoxidation von Methionin-Resten vermittelt, da MsrA-Aktivität in der Lage gewesen ist, die Konzentration an dimeren Protein wieder zu erhöhen. Dieses Enzym reduziert spezifisch in Anwesenheit von DTT das S-Enantiomer von sulfoxidierten Methionin-Resten (Hoshi & Heinemann, 2001; Kim & Gladyshev, 2004). Im nativen Gel zeigte das oxidierte LpMip eine verringerte Laufgeschwindigkeit. Auch dieser Effekt war, zumindest teilweise, durch Inkubation mit MsrA und DTT wieder umkehrbar. Somit muß auch in diesem Falle die Modifikation von Met-Resten die Grundlage sein. Wahrscheinlich spielen Met-38, Met-42 und Met-46 des erweiterten „Methionin-Zippers“ die entscheidende Rolle, da auch das N-terminale Fragment Mip 49 das gleiche Verhalten zeigt, aber keine weiteren schwefelhaltigen Aminosäuren aufweist.

Die Sulfoxidation von Methionin-Resten führt keine Ladung in das Molekül ein. Daher kann die Verzögerung im nativen Gel nur durch eine Konformationsänderung hervorgerufen werden. Eine (partielle) Entfaltung scheint wahrscheinlich. Offensichtlich können bei einer chemischen Oxidation durch Wasserstoffperoxid sowohl das S- als auch das R-Enantiomer von Methionin-Resten in einem Protein entstehen. Das erklärt möglicherweise das nicht vollständige Verschwinden der Bande für das sulfoxidierte Mip-Protein von *Legionella pneumophila* im nativen Gel. Allein MsrB kann das R-Enantiomer reduzieren, stand aber für Kontrollexperimente nicht zur Verfügung (Grimaud *et al.*, 2001; Kim & Gladyshev, 2004). Durch die native Gel-Elektrophorese konnte eine Aggregation des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* nachgewiesen werden. Dabei waren reduzierende Bedingungen, die Inkubation bei erhöhter Temperatur (45°C) sowie ein Detergenz in der Lage, diese zu verringern.

Die Modifikation von Proteinen über den Red-Ox-Zustand der Umgebung stellt ein häufiges Phänomen dar. Dabei ist die reversible Oxidation von Cystein-Resten ein gut charakterisiertes Signalsystem. Die Oxidation von Methionin-Resten und die mögliche enzymatische Reduktion stellen jedoch einen Aspekt der molekularen Regulation dar, der erst in letzter Zeit in das Interesse rückt (Hoshi & Heinemann, 2001). Dabei spielen Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als Teil des normalen aeroben Lebens sowie Folge verschiedener pathophysiologischer Prozesse die entscheidende Rolle (Halliwell & Gutteridge, 1999; Hoshi & Heinemann, 2001).

„Small-Heat-Shock-Proteins“ (sHsp) besitzen eine Chaperon-artige Aktivität. Sie schützen andere Proteine vor der Aggregation z.B. bei kurzzeitiger Erwärmung. Dies geschieht über Bindung des „Molten-Globule“-Zustandes und somit dem Erhalt eines faltungskompetenten Zustandes (Lindner *et al.*, 1997; Lindner *et al.*, 1998). Diese Eigenschaft konnte für das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* und Citrat-Synthase gezeigt werden. Für das homologe Protein aus *Legionella pneumophila* war es nicht möglich, diese Fähigkeit nachzuweisen. Möglicherweise besitzt dieses Molekül nur eine enge Substratspezifität. Nach dem Sinken der Temperatur kann es nachfolgend zu einer korrekten Faltung der Substrate über ATP-abhängige Systeme kommen (Lee *et al.*, 1997; Lee & Vierling, 2000). Aber auch die irreversible Denaturierung unter oxidativem Streß kann durch sHsp verhindert werden (Härndahl *et al.*, 2001). Interessanterweise bilden kleine Hitzeschockproteine große oligomere Komplexe, wie durch die Kristallstruktur von Hsp16.5 aus *Methanoccus janaschii* gezeigt wurde (Kim *et al.*, 1998). Der Nachweis der Zusammenlagerung zahlreicher CpMip-Moleküle konnte durch native Gel-Elektrophorese geführt werden.

Hsp21 ist in den Chloroplasten höherer Pflanzen lokalisiert (Chen *et al.*, 1990). Der N-terminale Teil dieses Proteins enthält eine amphipathische Helix. Dabei sind konservierte Methionin-Reste am Aufbau der hydrophoben Seite dieses Strukturelementes beteiligt (Met-49, Met-52, Met-55 und Met-59) (Gustavsson *et al.*, 1999; Gustavsson *et al.*, 2001). Die Inkubation des Proteins mit Wasserstoffperoxid führt, wie beim Mip-Protein von *Legionella pneumophila*, zu einer verringerten Laufgeschwindigkeit im nativen Gel und dem Verlust von α -helikaler Sekundärstruktur. Dies wurde durch CD-Spektroskopie nachgewiesen. Außerdem kam es zu einer dramatischen Verringerung der Chaperon-ähnlichen Aktivität (Härndahl *et al.*, 2001). Die Substitution der vier konservierten

Methionin- gegen Leucin-Reste führte zu einer völligen Unempfindlichkeit gegenüber Wasserstoffperoxid, die Chaperon-ähnliche Aktivität blieb erhalten und eine Konformationsänderung konnte ebenfalls nicht mehr gezeigt werden (Gustavsson *et al.*, 2001).

Für das *LpMip*-Protein müssen Untersuchungen an Mutanten durchgeführt werden. Dabei empfiehlt sich der Austausch von Met-38, Met-42 und Met-46 gegen Leucin- bzw. Alanin-Reste. Wie erste Versuche gezeigt haben, scheint es für die Einfachmutante M42A immer noch zur „Dissoziation“ des dimeren Protein unter oxidierenden Bedingungen zu kommen. Interessant wäre auch die Röntgenstrukturanalyse einer derartigen Dreifachmutante. Dabei kann geklärt werden, ob der „Methionin-Zipper“ ein rein regulatorisches Element darstellt oder auch strukturelle Erfordernisse befriedigt. Die Seitenkette von Methionin-Resten ist lang, flexibel und apolar (Richardson & Richardson, 1989). Nach der Sulfoxidierung wird sie weniger beweglich. Außerdem entspricht der Hydrophobizitätsindex des modifizierten Restes dem der positiv geladen Aminosäure Lysin (Black & Mould, 1991; Hoshi & Heinemann, 2001). Dadurch kann es zum Zusammenbruch des amphipathischen Charakters der Helix 2 für das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* kommen. Diese Sequenz könnte als „Kern“ für die Organisation der N-terminalen Domäne dienen, wie die Veränderungen im CD-Spektrum nach der Inkubation unter oxidierenden Bedingungen nahelegen. Diese lassen sich am überzeugend durch eine Entfaltung der gesamten Dimerisierungsdomäne in ein „Random-Coil“ erklären. Leider war es in CD-spektroskopischen Untersuchungen nicht möglich, für die isolierte Sequenz der Helix 2 eine α -helikale Struktur nachzuweisen. Offensichtlich sorgen ergänzende Elemente im *LpMip* für eine Stabilisierung dieser Organisation. Natürlich können auch sterische Gründe beim Verlust der dimeren Struktur durch die oxidative Modifizierung von Methionin-Resten von Bedeutung sein.

Die Regulation von Schlüsselmolekülen über die Red-Ox-Bedingungen der Umgebung ist ein bekanntes Phänomen bei Mikroorganismen. So kommt es unter Einfluß von Superoxid oder NO zu einer Aktivierung des soxRS-Regulons bei *Escherichia coli*. Dabei stellen die SoxS-Proteine verschiedene Transkriptionsfaktoren dar, die Gene für die Resistenz gegenüber oxidativem Stress und Antibiotika aktivieren. SoxR selbst ist ein ungewöhnlicher Transkriptionsfaktor, dessen *in-vitro*-Aktivität durch die Entfernung eines [2Fe-2S]-Zentrums blockiert werden kann. Offensichtlich kommt es über dieses

Element zur Veränderung in der Raumstruktur durch den Einfluß von oxidierenden Bedingungen (Demple, 1996).

Die homodimere Protease von HIV-1 besitzt zwei konservierte Cystein-Reste pro Monomer (Cys-67 und Cys-95). Diese sind jedoch nicht für die katalytische Aktivität essentiell, besitzen aber eine ungewöhnliche Empfindlichkeit für die Oxidation durch Thiole mit niedrigem Molekulargewicht (z.B. Glutathion). Diese kann über Metall-Ionen vermittelt werden. Eine solche Modifikation kann die Aktivität des Enzyms beeinflussen, in Abhängigkeit von Ort und Art der Veränderung (Davis *et al.*, 1996). Wasserstoffperoxid ist in der Lage, die Protease zu inhibieren. Dieser Effekt scheint über Cys-95 vermittelt zu werden. Eine reversible Glutathionylierung unter oxidierenden Bedingungen könnte vorwiegend die Protease in der Form des Gag-Pol-Polyproteins inhibieren. Dabei kommt es zur Verhinderung der Dimerbildung (Davis *et al.*, 2003). Nach Assoziation mit der Zellmembran sollten zelluläre Enzyme, z.B. Thioltransferase, in der Lage sein, das Molekül wieder zu aktivieren. Dieser Mechanismus könnte somit eine Bedeutung für die optimale Regulation der HIV-1-Protease-Aktivität besitzen (Davis *et al.*, 1999). Diese Regulation scheint für eine Vielzahl von Retroviren konserviert zu sein (Davis *et al.*, 2003).

Das „Intracellular-Adhesion-Molecule-1“ (ICAM-1) ist ein Glykoprotein auf der Zelloberfläche und für die Wanderung von Leukozyten sowie deren Rekrutierung bei Entzündungsprozessen von Bedeutung. Gleichzeitig stellt es den Wirtsrezeptor für 90 % aller Serotypen von Rhinoviren dar. Unmittelbar nach der initialen Infektion kommt es zur Produktion von oxidierenden Substanzen (Superoxid-Anion) in der Zelle. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert und der ICAM-1-Rezeptor wird verstärkt exprimiert. Das führt zu einer Vermehrung von Entzündungszeichen in den oberen Luftwegen. Reduzierende Substanzen wie Glutathion sind in der Lage, die Induktion von ICAM-1 zu verringern und bieten möglicherweise eine neue Möglichkeit der Behandlung der häufigen und lästigen Rhinovirus-Infektionen (Papi *et al.*, 2002).

In der Regulierung des oligomeren Zustandes der Mip-Proteine von *Legionella pneumophila* und *Chlamydia pneumoniae* durch den Red-Ox-Zustand der Umgebung gibt es einen bemerkenswerten Unterschied. Das *LpMip*-Protein „dissoziiert“ unter oxidierenden Bedingungen. Im Gegensatz dazu scheint die Lösung von Disulfid-Brücken

unter reduzierenden Bedingungen für die Verringerung der Selbstaggregation des Mip-Proteins aus *Chlamydia pneumoniae* verantwortlich zu sein.

Legionella pneumophila ist ursprünglich ein intrazellulärer Parasit verschiedener Amöben (z.B. *Acanthamoeba* und *Hartmanella*) in aquatischen Habitaten (Brand & Hacker, 1997). Die Infektion von Makrophagen (Horwitz & Silverstein, 1981a; Horwitz & Silverstein, 1981b) sowie Monozyten (Horwitz & Silverstein, 1980; Horwitz & Silverstein, 1983; Harb *et al.*, 2000) und „nicht-professionellen“ phagozytierenden Zellen (Mody *et al.*, 1993; Cianciotto *et al.*, 1995b) stellt eine Sackgasse für die Vermehrung der Bakterien dar. Eine Übertragung der Legionärskrankheit von Mensch zu Mensch ist bisher nicht beobachtet worden (Brand & Hacker, 1997). Somit scheinen alle heute lebenden Legionellen (mit Ausnahme der klinischen Isolate) durch die ausschließliche Vermehrung in Protozoen hervorgegangen zu sein. Die erworbenen molekularen Mechanismen für die Infektion, das intrazelluläre Überleben sowie das Entkommen aus der Wirtszelle sind Anpassungen an diese Organismen.

Für *Acanthamoeba castellanii* konnten klare Parallelen zum oxidativen „Burst“ von Neutrophilen nachgewiesen werden (Brooks & Schneider, 1985). Tatsächlich ist *Legionella pneumophila* während der Phagozytose durch Amöben diesem Streß ausgesetzt (Halablab *et al.*, 1990; Bandyopadhyay *et al.*, 2003). Interessanterweise kommt es nach der Aufnahme von *Legionella pneumophila* und *Legionella micdadei* zum oxidativen „Burst“ in Monozyten und polymorphkernigen Leukozyten. Dieser wird jedoch rasch von einer Inaktivierung der Zellen abgelöst (Dowling *et al.*, 1992). Somit könnte die Oxidation des Mip-Proteins auch für die (evolutionär irrtümliche) Infektion des Menschen von Bedeutung sein. Außerdem kann bei Pneumonien eine erhöhte Konzentration an Reaktiven Sauerstoffspezies im entzündeten Gewebe nachgewiesen werden (Kuwano *et al.*, 2003; Rahman & Kelly, 2003).

Auch die Identifizierung einer Catalase-Peroxidase KatA im Periplasma von *Legionella pneumophila* weist auf eine notwendige Auseinandersetzung des Bakteriums mit oxidativem Streß hin (Amemura-Maekawa *et al.*, 1999). Eine weitere Catalase-Peroxidase, KatB, ist im Cytoplasma lokalisiert. Beide Moleküle sind für die effektive intrazelluläre Replikation essentiell (Bandyopadhyay *et al.*, 2003). Das auf der Oberfläche von *Legionella pneumophila* nachgewiesene Mip-Protein (Helbig *et al.*,

2001) kann also leicht während der intrazellulären Infektion oxidiert und damit monomerisiert werden.

Eine mögliche Aufgabe des *LpMip* könnte im „Abfangen“ von Reaktiven Sauerstoffspezies bestehen. Damit sollten andere Proteine und Membranen geschützt werden. Eine analoge Funktion wird für das Hsp16.3 von *Mycobacterium tuberculosis* diskutiert. Dieses Molekül besitzt wie das Mip-Protein von *Legionella pneumophila* keine Cysteinreste. Deren oxidative Modifizierung würde möglicherweise zu großen unphysiologischen Aggregaten führen (Levine *et al.*, 2000; Abulimiti *et al.*, 2003). Dabei ist zu erwähnen, daß es für das Protein aus Legionellen zu einer kompletten Entfaltung der N-terminalen Domäne durch die Oxidation kommt. Dieses wurde durch CD-Spektroskopie nachgewiesen. Somit wären die sulfoxidierten Methionin-Reste leicht zugänglich und ein enzymatisches „Recycling“ durch Reduktasen denkbar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte diese Hypothese durch Verwendung von humaner Methioninsulfoxidreduktase A bestätigt werden.

In initialen Versuchen war es möglich, eine Beteiligung des *LpMip* an der Bewegung von Legionellen durch die extrazelluläre Matrix nachzuweisen. Eine monomere Mutante des Mip-Proteins war in diesen Untersuchungen besonders aktiv (persönliche Mitteilung Dr. Michael Steinert, Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg). Die Sulfoxidierung und damit Monomerisierung stellt somit u.U. eine Aktivierung dar. Außerdem konnte für das *LpMip* eine Bindung an Kollagen IV der alveolären extrazellulären Matrix nachgewiesen werden (persönliche Mitteilung Dr. Michael Steinert, Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg). Diese wird für das monomere und partiell entfaltete Protein sicher verringert. Natürlich ist auch eine unterschiedliche Beeinflussung von Signalwegen über den Wechsel des Oligomerisierungszustandes denkbar.

α_1 -Antitrypsin kann durch Oxidation der Reste Met-351 und Met-358 inaktiviert werden. Damit ist dieser Inhibitor nicht mehr in der Lage, die Elastase von Neutrophilen zu inhibieren und die alveolare Matrix zu schützen. Dieser Mechanismus spielt wahrscheinlich eine physiologische Rolle bei Entzündungen. Leider kommt es auch durch Zigarettenrauch (enthält Wasserstoffperoxid) zu einer Blockierung von α_1 -Antitrypsin und damit möglicherweise einem Lungenemphysem (Taggart *et al.*,

2000). Vielleicht ist die größere Empfindlichkeit von Rauchern gegenüber einer produktiven *Legionella*-Infektion sogar auf eine Strukturveränderung des Mip-Proteins über den gleichen Mechanismus zurückzuführen.

Das *LpMip*-Protein bildet ein Dimer mit einer nanomolaren Dissoziationskonstante (Schmidt *et al.*, 1994). Damit ist praktisch allein der Rest Met-46 im Mip-Protein von *Legionella pneumophila* vom umgebenden Medium aus zugänglich. Eine mögliche Modifizierung des „Methionin-Zippers“ durch Reaktive Sauerstoffspezies sollte daher von dieser Aminosäure ausgehen. Dabei müßte deren Sulfoxidierung eine Öffnung der Dimerisierungsdomäne bewirken. Nachfolgend wären auch Met-42 und Met-38 angreifbar. Diese Vermutung ist leicht zu überprüfen: Der Austausch von Met-46 z.B. gegen die Aminosäure Leucin sollte genügen, um die „Dissoziation“ des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* unter oxidierenden Bedingungen zu verhindern. Leider besitzt die Oberfläche des Mip-Dimers in der Umgebung dieses Schlüsselrestes einen ausschließlich hydrophoben Charakter. Das erschwert die Entwicklung von kleinen Molekülen, die in der Lage sind, Met-46 spezifisch abzuschirmen. Ein klares Muster von polaren und apolaren Anteilen ist von großem Vorteil, um einen komplementären Inhibitor zu finden. Dieser könnte dann mit einer Funktion des Virulenzfaktors, der Monomerisierung unter oxidierenden Bedingungen, interferieren.

Im Gegensatz zu *Legionella pneumophila* stellt für *Chlamydia pneumoniae* der Mensch das Hauptreservoir dar. Die Übertragung von Mensch zu Mensch ist die Regel (Raulston & Wyrick, 2000). Damit kann das Verhältnis zwischen diesem Krankheitserreger und dem Menschen als Koevolution beschrieben werden. Das respiratorische Endothelium stellt dabei die primäre Zielstruktur dar. Die Infektion von alveolären Makrophagen scheint zur respiratorischen Immunpathologie beizutragen (Redecke *et al.*, 1998). Danach kommt es für den Krankheitserreger möglicherweise durch die systemische Zirkulation sowie eine mögliche transendotheliale Wanderung von „professionell“ phagozytierenden Zellen zur Dissemination im Wirtsorganismus (Maass *et al.*, 2000). Die Infektion von endothelialen Zellen sowie der glatten Muskulatur von Arterien konnte nachgewiesen werden (Kaukoranta-Tolvanen *et al.*, 1994; Gaydos *et al.*, 1996). Dies stellt eine Verbindung zur vermuteten Beteiligung an der Arteriosklerose sowie rheumatischen Erkrankungen her (Saikku *et al.*, 1992; Gran *et al.*, 1993). Chlamydien besitzen einen einzigartigen Infektionszyklus. Die Bakterien infizieren als kompakte

Elementarkörperchen ihre Wirtszelle. Nach der Bildung der parasitophoren Vakuole kommt es zur Bildung der Retikularkörperchen. Diese sind größer, in der Lage sich zu teilen, aber nicht infektiös (Scidmore-Carlson & Hackstadt, 2000; Raulston & Wyrick, 2000).

Es ist interessant festzustellen, daß die rigide Ultrastruktur der Elementarkörperchen durch Cystein-reiche Membranproteine bedingt ist. Diese bilden intra- und intermolekulare Disulfid-Brücken und führen so zum „Crosslinking“ in der Hülle. Dadurch wird, in Analogie zum Peptidoglykan bei Gram-positiven Bakterien, die strukturelle Integrität erhalten (Hatch, 1996). Für ein Protein der äußeren Membran mit einem Molekulargewicht von 70 kDa konnte durch reduzierende Bedingungen die Zugänglichkeit deutlich erhöht werden. Interessanterweise besitzt dieses Molekül wie das *CpMip* eine „Haltefunktion“. Es stellt ein Hitzeschock-Protein dar. Außerdem wurde zunächst eine Funktion als primäres Adhäsion vermutet. Unter *in-vivo*-Bedingungen findet seine Reduktion in der Mikroumgebung der Wirtszelloberfläche statt, jedoch erst nachdem der initiale Kontakt etabliert wurde (Raulston *et al.*, 2002). Diese Situation könnte auch zur Modifizierung des Mip-Proteins von *Chlamydia pneumoniae* führen. Die nachfolgende Konformationsänderung von Hsp70 ist Voraussetzung für eine produktive Infektion (Raulston *et al.*, 2002).

Von besonderer Bedeutung ist dabei, daß eine Oberflächenlokalisierung für das Mip-Protein von *Chlamydia trachomatis* weder durch Immunfluoreszenz noch mit der Immuno-Gold-Technik gezeigt werden konnte. Dagegen war es möglich, die Komplement-abhängige Inhibierung der Infektion mit Hilfe von Antikörpern gegen ein N-terminales Fragment nachzuweisen (Lundemose *et al.*, 1992). Auch Partitionierungsexperimente mit einem Detergenz sowie die Sequenzanalyse deuten auf eine Lokalisation in der äußeren Membran hin (Lundemose *et al.*, 1991). Daher wird auch für dieses Molekül eine „verborgene“ Konformation vermutet (Lundemose *et al.*, 1992).

Bei unterschiedlichen Experimenten im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Chaperon-ähnliche Funktion für das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* gezeigt werden. Diese konnte durch DTT, nicht aber durch FK506, inhibiert werden. Außerdem kam es zur „Dissoziation“ von oligomeren Proteinaggregaten unter reduzierenden Bedingungen. Somit scheint die korrekte Quartärstruktur einen größeren Einfluß als die Zugänglichkeit

der Isomerisierungsbindestelle auf die „Haltefunktion“ zu besitzen. Die beobachteten Strukturveränderungen sollten einen relevanten Regulationsmechanismus darstellen.

Abschließend muß erwähnt werden, daß die biologisch aktive Form des Mip-ähnlichen Proteins aus *Trypanosoma cruzi* ein Monomeres ist. Diesem Molekül fehlt die gesamte N-terminale Dimerisierungsdomäne. Außerdem ist es C-terminal durch eine α -Helix erweitert (Pereira *et al.*, 2001). Es stellt ebenfalls einen Virulenzfaktor für die parasitierenden Kinetoplastiden dar (Moro *et al.*, 1995). Das läßt Spekulationen über das monomere Molekül als aktive Form bei den verschiedenen Parasiten zu.

5. Zusammenfassung

Für das Mip-Protein von *Chlamydia pneumoniae* wurde eine Chaperon-ähnliche Aktivität gezeigt. Als Hinweis auf diese Funktion diente eine Ähnlichkeit in der „Form“ zwischen dem verwandten Protein aus *Legionella pneumophila* und dem Chaperon DsbC aus *Escherichia coli*.

Der „Methionin-Zipper“ in der Dimerisierungsdomäne des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* vermittelt die Monomerisierung des Moleküls unter oxidierenden Bedingungen. Für das homologe Protein aus *Chlamydia pneumoniae* konnte eine „Dissoziation“ unter reduzierenden Bedingungen beobachtet werden. Damit war eine Verringerung der Chaperon-ähnlichen Aktivität verbunden.

Bei der Kristallisation des *LpMip*-Proteins sind neben Zn-Ionen, Moleküle, die Carboxylgruppen enthalten, essentiell. Beide sind am Aufbau eines wichtigen Kristallkontaktes beteiligt.

Für die N-terminale Mutante S15A des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* kommt es durch den Verlust einer Wasserstoffbrücke zur Destabilisierung der Helix 2 in der Dimerisierungsdomäne. Zur gleichen Konsequenz führt die Ausbildung einer energetisch ungünstigen Wechselwirkung durch die Substitution A37F. Über eine Umordnung in der „Loop“-Region zwischen Helix 1 und Helix 2 wird die gestreckte Konformation der Verbindungshelix zwischen der N- und C-terminalen Domäne stabilisiert.

Die C-terminale Mutante Y185A des *LpMip*-Proteins weist eine erhöhte Beweglichkeit in der „Flap“-Region auf. Ursache ist der Verlust von hydrophoben Wechselwirkungen.

Für die C-terminale Mutante F202Y des Mip-Proteins von *Legionella pneumophila* konnten keine strukturellen Umordnungen gefunden werden, die den Verlust der Isomerase-Aktivität erklären. Jedoch wurde im aktiven Zentrum des Moleküls ungeklärte Elektronendichte nachgewiesen.

6. Literaturverzeichnis

Abulimiti, A.; Qiu, X.; Chen, J.; Liu, Y.; Chang, Z. (2003) Reversible methionine sulf-oxidation of *Mycobacterium tuberculosis* small heat shock protein Hsp16.3 and its possible role in scavenging oxidant. Biochemical & Biophysical Research Communications **305**: 87-93.

Alexander, M.; Raettig, H. Infektionskrankheiten: Epidemiologie - Klinik - Immunprophylaxe. 5., überarbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1998**.

Alli, O.A.T.; Gao, L.-Y.; Pederson, L.L.; Zink, S.; Radulic, M.; Doric, M.; Abu Kwaik, Y. (2000) Temporal pore formation-mediated egress from macrophages and alveolar epithelial cells by *Legionella pneumophila*. Infection and Immunity **68**: 6431-6440.

Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schäffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research **25**: 3389-3402.

Amemura-Maekawa, J.; Mishima-Abe, S.; Kura, F.; Takahashi, T.; Watanabe, H. (1999) Identification of a novel periplasmic catalase-peroxidase KatA of *Legionella pneumophila*. FEMS Microbiology Letters **176**: 339-344.

Andrade, M.A.; Chacon, P.; Merelo, J.J.; Moran, F. (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. Protein Engineering **6**: 383-390.

Arakaki, N.; Higa, F.; Koide, M.; Tateyama, M.; Saito, A. (2002) Induction of apoptosis of human macrophages *in vitro* by *Legionella lonbeachae* through activation of the caspase pathway. Journal of Medical Microbiology **51**: 159-168.

Ariè, J.-P.; Sassoon, N.; Betton, J.-M. (2001) Chaperone function of FkpA, a heat shock prolyl isomerase, in the periplasm of *Escherichia coli*. Molecular Microbiology **39**: 199-210.

Ayed, A.; Duckworth, H.W. (1999) A stable intermediate in the equilibrium unfolding of *Escherichia coli* citrate synthase. Protein Science **8**: 1116-1126.

Balin, B.J., Appelt, D.M. (2001) Role of infection in Alzheimer's disease. Journal of American Osteopathology Association **101**: S1-6.

- Bandyopadhyay, P.; Byrne, B.; Chan, Y.; Swanson, M.S.; Steinman, H.M. (2003)** Legionella pneumophila catalase-peroxidases are required for proper trafficking and growth in primary macrophages. Infection and Immunity **71**: 4526-4535.
- Bayer, E.; Goettsch, S.; Mueller, J.W.; Griewel, B.; Guiberman, E.; Mayr, L.M.; Bayer, P. (2003)** Structural analysis of the mitotic regulator hPin1 in solution: insights into domain architecture and substrate binding. Journal of Biological Chemistry **278**: 26183-26193.
- Behrendt, H.; Seemayer, N.H.; Braumann, A.; Nissen, M. (1987)** Electron microscopy investigations of the effect of quartz dust DQ 12 on human monocytes/macrophages in vitro. Nordrhein-Westfalen Silicosis Report **16**: 171-183.
- Bellinger-Kawahara, C.; Horwitz, M.A. (1990)** Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of Legionella pneumophila and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. Journal of Experimental Medicine **172**: 1201-1210.
- Berman, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. (2000)** The Protein Data Bank. Nucleic Acids Research **28**: 235-242.
- Beucher, M.; Meira, W.S.; Zegarra, V.; Galvao, L.M.; Chiari, E.; Norris, K.A. (2003)** Expression and purification of functional, recombinant Trypanosoma cruzi complement regulatory protein. Protein Expression and Purification **27**: 19-26.
- Birtalan, S.; Ghosh, P. (2001)** Structure of the Yersinia type III secretory system chaperon SycE. Nature Structural Biology **8**: 974-978.
- Birtalan, S.C.; Phillips, R.M.; Ghosh, P. (2002)** Three-dimensional secretion signals in chaperone-effector complexes of bacterial pathogens. Molecular Cell **9**: 971-980.
- Bitto, E.; McKay, D.B. (2003)** The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins. Journal of Biological Chemistry **278**: 49316-49322.
- Black, S.D.; Mould, D.R. (1991)** Development of hydrophobicity parameters to analyze proteins which bear post- and cotranslational modifications. Analytical Biochemistry **193**: 72-82.

- Black, C.M. (1997)** Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clinical Microbiology Reviews* **10**: 160-184.
- Black, M.W.; Arrizabalaga, G.; Boothroyd, J.C. (2000)** Ionophore-resistant mutants of *Toxoplasma gondii* reveal host cell permeabilization as an early event in egress. *Molecular and Cellular Biology* **20**: 9399-9408.
- Black, D.S.; Bliska, J.B. (2000)** The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Molecular Microbiology* **37**: 515-527.
- Boeckmann, B.; Bairoch, A.; Apweiler, R.; Blatter, M.C.; Estreicher, A.; Gasteiger, E.; Martin, M.J.; Michoud, K.; O'Donovan, C.; Phan, I.; Pilbout, S.; Schneider, M. (2003)** The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003. *Nucleic Acids Research* **31**: 365-370.
- Boguniewicz, M. (2003)** Treatment options and new therapeutic approaches in atopic dermatitis. *Dermatology Nursing* **Aug., Suppl.**: 12-18.
- Borel, J.F. (1989)** The cyclosporins. *Transplantation Proceedings* **21**: 810-815.
- Bosco, D.A.; Eisenmesser, E.Z.; Pochapsky, S.; Sundquist, W.I.; Kern, D. (2002)** Catalysis of *cis/trans* isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**: 5247-5252.
- Bothmann, H.; Plückthun, A. (2000)** The periplasmic *Escherichia coli* peptidylprolyl *cis,trans*-isomerase FkpA. I. Increased functional expression of antibody fragment with and without *cis*-prolines. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 17100-17105.
- Brand, B.; Hacker, J.** The Biology of *Legionella* Infection. In "Host Response to Intracellular Pathogens", edited by S.H.E. Kaufmann, R.G. Landes Company, Austin **1997**.
- Brooks, S.E.; Schneider, D.L. (1985)** Oxidative metabolism associated with phagocytosis in *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Protozoology* **32**: 330-333.
- Brünger, A.T. (1992)** Free *R* value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**: 472-475.

Brünger, A.T.; Adams, P.D.; Clore, G.M.; DeLano, W.L.; Gros, P.; Grosse-Kunstleve, R.W.; Jiang, J.-S.; Kuszewski, J.; Nilges, M.; Pannu, N.S.; Read, R.J.; Rice, L.M.; Simonson, T.; Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR System: a new software suite for macromolecular structure determination. Acta Crystallographica D **54**: 905-921.

Buchner, J.; Schmidt, M.; Fuchs, M.; Jaenicke, R.; Rudolph, R.; Schmid, F.X.; Kiefhaber, T. (1991) GroE facilitates refolding of citrate synthase by suppressing aggregation. Biochemistry **30**: 1586-1591.

Buchner, J.; Grallert, H.; Jakob, U. (1998) Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. Methods in Enzymology **290**: 323-338.

Caldas, T.D.; Yaagoubi, A.E.; Richarme, G. (1998) Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-Tu. Journal of Biological Chemistry **273**: 11478-11482.

Caldas, T.; Laalami, S.; Richarme, G. (2000) Chaperone properties of bacterial elongation factor EF-G and initiation factor IF2. Journal of Biological Chemistry **275**: 855-860.

Callebaut, I.; Mornon, J.-P. (1995) Trigger factor, one of the *Escherichia coli* chaperone proteins, is an original member of the FKBP family. FEBS Letters **374**: 211-215.

Chang, C.T.; Wu, C.-S.C.; Yang, J.T. (1978) Circular dichroic analysis of protein conformation: inclusion of the β -turns. Analytical Biochemistry **91**: 13-31.

Chen, Q.; Lauzon, L.M.; DeRocher, A.E.; Vierling, E. (1990) Accumulation, stability, and localization of a major chloroplast heat-shock protein. Journal of Cell Biology **110**: 1873-1883.

Chen, J.; Song, J.L.; Zhang, S.; Wang, Y.; Cui, D.F.; Wang, C.C. (1999) Chaperone activity of DsbC. Journal of Biological Chemistry **274**: 19601-19605.

Cheng, X.; Cirillo, J.D.; Duhamel, G.E. (1999) Coiling phagocytosis is the predominant mechanism for uptake of the colonic spirochetosis bacterium *Serpulina pilosicoli* by human monocytes. Advances in Experimental Medicine and Biology **473**: 207-214.

Cianciotto, N.P.; Eisenstein, B.I.; Mody, C.H.; Toews, G.B.; Engleberg, N.C. (1989) A *Legionella pneumophila* gen encoding a species-specific surface protein potentiates initiation of intracellular infection. Infection and Immunity **57**: 1255-1262.

- Ciaccioto, N.P.; Bangsberg, J.M.; Eisenstein, B.I.; Engleberg, N.C. (1990a)** Identification of mip-like gens in the genus *Legionella*. *Infection and Immunity* **58**: 2912-2918.
- Ciaccioto, N.P.; Eisenstein, B.I.; Mody, C.H.; Engleberg, N.C. (1990b)** A mutation in the mip gene results in an attenuation of *Legionella pneumophila* virulence. *Journal of Infectious Diseases* **162**: 121-126.
- Ciaccioto, N.P.; Fields, B.S. (1992)** *Legionella pneumophila* mip gene potentiates intracellular infection of protozoa and human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**: 5188-5191.
- Ciaccioto, N.P.; O'Connel, W.; Dasch, G.A.; Mallavia, L.P. (1995a)** Detection of mip-like sequences and Mip-related proteins within the family *Rickettsiaceae*. *Current Microbiology* **30**: 149-153.
- Ciaccioto, N.P.; Stamos, J.K.; Kamp, D.W. (1995b)** Infectivity of *Legionella pneumophila* mip mutant for alveolar epithelial cells. *Current Microbiology* **30**: 247-250.
- Ciaccioto, N.P. (2001)** Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *International Journal of Medical Microbiology* **291**: 331-343.
- Cohen, G.E. (1997)** ALIGN: a program to superimpose protein coordinates, accounting for insertions and deletions. *Journal of Applied Crystallography* **30**: 1160-1161.
- Cox, F.E.G. Parasitic Protozoa**. In "Modern Parasitology", edited by F.E.G. Cox, Blackwell Scientific Publications, Oxford **1994**.
- Corpet, F. (1988)** Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* **16**: 10881-10890.
- Craescu, C.T.; Rouviere, N.; Popescu, A.; Cerpolini, E.; Lebeau, M.C.; Baulieu, E.E.; Mispelter, J. (1996)** Three-dimensional structure of the immunophilin-like domain of FKBP59 in solution. *Biochemistry* **35**: 11045-11052.
- Danese, P.N.; Silhavy, T.J. (1997)** The σ^E and the Cpx signal transduction systems control the synthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes & Development* **11**: 1183-1193.

- Dartigalongue, C.; Missiakas, D.; Raina, S. (2001)** Characterization of the *Escherichia coli* σ^E regulon. Journal of Biological Chemistry **276**: 20866-20875.
- Davis, D.A.; Dorsey, K.; Wingfield, P.T.; Stahl, S.J.; Kaufman, J.; Fales, H.M.; Levine, R.L. (1996)** Regulation of HIV-1 protease activity through cysteine modification. Biochemistry **35**: 2482-2488.
- Davis, D.A.; Yusa, K.; Gillim, L.A.; Newcomb, F.M.; Mitsuya, H.; Yarchoan, R. (1999)** Conserved cysteines of the human immunodeficiency virus type 1 protease are involved in regulation of polyprotein processing and viral maturation of immature virions. Journal of Virology **73**: 1156-1164.
- Davis, D.A.; Brown, C.A.; Newcomb, F.M.; Boja, E.S.; Fales, H.M.; Kaufman, J.; Stahl, S.J.; Wingfield, P.; Yarchoan, R. (2003)** Reversible oxidative modification as a mechanism for regulating retroviral protease dimerization and activation. Journal of Virology **77**: 3319-3325.
- Delahay, R.M.; Shaw, R.K.; Elliott, S.J.; Kaper, J.B.; Knutton, S.; Frankel, G. (2002)** Functional analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system chaperone CesT identifies domains that mediate substrate interactions. Molecular Microbiology **43**: 61-73.
- DeLano, W.L.** The PyMOL User's Manual. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA **2002** (<http://www.pymol.org>).
- Demple, B. (1996)** Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* soxRS oxidative stress regulon – a review. Gene **179**: 53-57.
- Dowling, J.N.; Saha, A.K.; Glew, R.H. (1992)** Virulence factors of the family *Legionellaceae*. Microbiology Reviews **56**: 32-60.
- Dunitz, J.D.** X-ray analysis and the structure of organic molecules. 2nd corrected reprint, Verlag Helvetica Chimica Acta, Basel **1995**.
- Edelstein, P.H.; Baofeng, H.; Higa, F.; Edelstein, M.A.C. (2003)** lygA, a novel *Legionella pneumophila* virulence factor. Infection and Immunity **71**: 2394-2403.
- Endo, T; Sethi, K.K.; Piekarski, G. (1982)** *Toxoplasma gondii*: calcium ionophore A23187-mediated exit of trophozoites from infected murine macrophages. Experimental Parasitology **53**: 179-188.

- Engleberg, N.C.; Carter, C.; Weber, D.R.; Cianciotto, N.P.; Eisenstein, B.I. (1989)** DNA sequence of mip, a Legionella pneumophila gene associated with macrophage infectivity. Infection and Immunity **57**: 1263-1270.
- Ernst, J.D. (1998)** Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. Infection and Immunity **66**: 1277-1281.
- Esnouf, R.M. (1997)** An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced coloring capabilities. Journal of Molecular Graphics and Modelling **15**: 132-134.
- Ewig, S.; Tuschy, P.; Fätkenheuer, G. (2002)** Diagnostik und Therapie der Legionellen-Pneumonie. Pneumologie **56**: 695-703.
- Fawaz, F.S.; van Ooij, C.; Homola, E.; Mutka, S.C.; Engel, J.N. (1997)** Infection with Chlamydia trachomatis alters the tyrosine phosphorylation and/or localization of several host cell proteins including cortactin. Infection and Immunity **65**: 5301-5308.
- Fersht, A. Enzyme structure and mechanism.** W.H. Freeman and Co., New York **1984**.
- Fischer, G.; Bang, H.; Mech, C. (1984)** Nachweis einer Enzymkatalyse für die cis-trans-Isomerisierung der Peptidbindung in prolinhaltigen Peptiden. Biomedica Biochimica Acta **43**: 1101-1111.
- Fischer, G.; Schmid, F.X. (1990)** The mechanism of protein folding. Implications of in vitro refolding models for de novo protein folding and translocation in the cell. Biochemistry **29**: 2205-2212.
- Fischer, G.; Bang, H.; Ludwig, B.; Mann, K.; Hacker, J. (1992)** Mip protein of Legionella pneumophila exhibits peptidyl-prolyl-cis/trans isomerase (PPIase) activity. Molecular Microbiology **6**: 1375-1383.
- Fischer, S.; Michnick, S.; Karplus, M. (1993)** A mechanism for rotamase catalysis by the FK506 binding protein (FKBP). Biochemistry **32**: 13830-13837.
- Fischer, G. (1994)** Peptidyl-Prolyl cis/trans isomerases and their effectors. Angewandte Chemie International Edition **33**: 1415-1436.

- Fischer, G. (1996)** Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen: Prolinspezifische Bindeproteine oder Faltungskatalysatoren? *Biospektrum* **4**: 43-47.
- Flieger, A.; Gongab, S.; Faigle, M.; Mayer, H.A.; Kehrer, U.; Mussotter, J.; Bartmann, P.; Neumeister, B. (2000)** Phospholipase A secreted by *Legionella pneumophila* destroys alveolar surfactant phospholipids. *FEMS Microbiology Letters* **188**: 129-133.
- Flieger, A.; Rydzewski, K.; Banerji, S.; Broich, M.; Heuner, K. (2004)** Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of *Legionella pneumophila*, *plaB*, exhibiting hemolytic activity. *Infection and Immunity* **72**: 2648-2658.
- Franke, E.K.; Yuan, H.E.; Luban, J. (1994)** Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions. *Nature* **372**: 359-362.
- Franke, E.K.; Luban, J. (1996)** Inhibition of HIV-1 replication by cyclosporine A or related compounds correlates with the ability to disrupt the Gag-cyclophilin A interaction. *Virology* **222**: 279-282.
- Furutani, M.; Ideno, A.; Iida, T.; Maruyama, T. (2000)** FK506 binding protein from a thermophilic archaeon, *Methanococcus thermolithotrophicus*, has chaperone-like activity *in vitro*. *Biochemistry* **39**: 453-462.
- Futer, O.; DeCenzo, M.T.; Aldape, R.A.; Livingston, D.J. (1995)** FK506 binding protein mutational analysis. Defining the surface residue contributions to stability of the calcineurin co-complex. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 18935-18940.
- Galat, A.; Metcalfe, S.M. (1995)** Peptidylproline *cis/trans* isomerases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **63**: 67-118.
- Galat, A. (2000)** Sequence diversification of the FK506-binding proteins in several different genomes. *European Journal of Biochemistry* **267**: 4945-4959.
- Gamble, T.R.; Vajdos, F.F.; Yoo, S.; Worthylake, D.K.; Houseweart, M.; Sundquist, W.I.; Hill, C.P. (1996)** Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell* **87**: 1285-1294.

- Gao, L.-Y.; Harb, O.S.; Abu Kwaik, Y. (1998)** Identification of macrophage-specific infectivity loci (*mil*) of *Legionella pneumophila* that are not required for infectivity of protozoa. Infection and Immunity **66**: 883-892.
- Garcia-del Portillo, F.; Finlay, B.B. (1995)** The varied lifestyles of intracellular pathogens within eukaryotic vacuolar compartments. Trends in Microbiology **3**: 373-380.
- Garcia-Salcédo, J.A.; Oliver, J.L.; Stock, R.P.; González, A. (1994)** Molecular characterization and transcription of the histone H2B gene from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. Molecular Microbiology **13**: 1033-1043.
- Garduno, R.A.; Garduno, E.; Hoffman, P.S. (1998)** Surface-associated Hsp60 chaperonin of *Legionella pneumophila* mediates invasion in a HeLa cell model. Infection and Immunity **66**: 4602-4610.
- Garzon, E.; Borges, M.C.; Cordeiro-da-Silva, A.; Nacife, V.; Meirelles Mde, N.; Guilvard, E.; Bosseno, M.F.; Guevara, A.G.; Breniere, S.F.; Ouaiissi, A. (2003)** *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele elicits attenuated Chagas' disease in mice. Immunology Letters **89**: 67-80.
- Gaydos, C.A.; Summersgill, J.T.; Sahney, N.N.; Ramirez, J.A.; Quinn, T.C. (1996)** Replication of *Chlamydia pneumoniae* in vitro in human macrophages, endothelial cells, and aortic artery smooth muscle cells. Infection and Immunity **64**: 1614-1620.
- Gibson, F.C. 3rd; Tzianabos, A.O.; Rodgers, F.G. (1994)** Adherence of *Legionella pneumophila* to U-937 cells, guinea-pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement independent binding mechanism. Canadian Journal of Microbiology **40**: 865-872.
- Gill, S.C.; Hippel, P.H. (1989)** Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Analytical Biochemistry **182**: 319-326.
- Göthel, S.F.; Marahiel, M.A. (1999)** Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. Cellular and Molecular Life Sciences **55**: 423-426.
- Gran, J.T.; Hjetland, R.; Andreassen, A.H. (1993)** Pneumonia, myocarditis and reactive arthritis due to *Chlamydia pneumoniae*. Scandinavian Journal of Rheumatology **22**: 43-44.

- Griffith, J.P.; Kim, J.L.; Kim, E.E.; Sintchack, M.D.; Thomson, J.A.; Fitzgibbon, M.J.; Fleming, M.A.; Caron, P.R.; Hsiao, K.; Navia, M.A. (1995)** X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilin-immunosuppressant FKBP12-FK506 complex. *Cell* **82**: 507-522.
- Grimaud, R.; Ezraty, B.; Mitchell, J.K.; Lafitte, D.; Briand, C.; Derrick, P.J.; Barras, F. (2001)** Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 48915-48920.
- Gustavsson, N.; Harndahl, U.; Emanuelsson, A.; Roepstorff, P.; Sundby, C. (1999)** Methionine sulfoxidation of the chloroplast small heat shock protein and conformational changes in the oligomer. *Protein Science* **8**: 2506-2512.
- Gustavsson, N.; Kokke, B.P.A.; Anzelius, B.; Boelens, W.C.; Sundby, C. (2001)** Substitution of conserved methionines by leucines in chloroplast small heat shock protein results in loss of redox-response but retained chaperone-like activity. *Protein Science* **10**: 1785-1793.
- Hacker, J.; Fischer, G. (1993)** Immunophilins: structure-function relationship and possible role in microbial pathogenicity. *Molecular Microbiology* **10**: 445-456.
- Hackstadt, T.; Williams, J.C. (1981)** Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **78**: 3240-3244.
- Halablab, M.A.; Bazin, M.; Richards, L.; Pacy, J. (1990)** Ultra-structure and localisation of formazan formed by human neutrophils and amoebae phagocytosing virulent and avirulent *Legionella pneumophila*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **2**: 295-301.
- Hall, B.F. (1993)** *Trypanosoma cruzi*: mechanisms for entry into host cells. *Seminars in Cell Biology* **4**: 323-333.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.** Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd edition, Oxford University Press, New York **1999**.
- Haranaga, S.; Toyama, M.; Arakaki, N.; Miyara, T.; Shinzato, T.; Koide, M.; Higa, F.; Tateyama, M.; Saito, A. (2002)** *Legionella pneumophila* pneumonia successfully treated with intravenous ciprofloxacin. *Internal Medicine* **41**: 1024-1028.

Harb, O.S.; Abu Kwaik, Y. (2000) Essential role for the *Legionella pneumophila* Rep helicase homologue in intracellular infection of mammalian cells. Infection and Immunity **68**: 6970-6978.

Harb, O.S.; Gao, L.Y.; Abu Kwaik, Y. (2000) From protozoa to mammalian cells: A new paradigm in the life cycle of intracellular bacterial pathogens. Environmental Microbiology **2**: 251-265.

Härndahl, U.; Kokke, B.P.A.; Gustavsson, N.; Linse, S.; Berggren, K.; Tjerneld, F.; Boelens, W.C.; Sundby, C. (2001) The chaperone-like activity of a small heat shock protein is lost after sulfoxidation of conserved methionines in a surface-exposed amphipathic α -helix. Biochimica et Biophysica Acta **1545**: 227-237.

Harth, G.; Clemens, D.L.; Horwitz, M.A. (1994) Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: extracellular release and characterization of its enzymatic activity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **91**: 9342-9346.

Haslbeck, M.; Walke, S.; Stromer, T.; Ehrnsperger, M.; White, H.E.; Chen, S.; Saibil, H.R.; Buchner, J. (1999) Hsp26: a temperature-regulated chaperone. EMBO Journal **18**: 6744-6751.

Hatch, T.P. (1996) Disulfide cross-linked envelope proteins: the functional equivalent of peptidoglycan in chlamydiae? Journal of Bacteriology **178**: 1-5.

Hayashi, S.; Wu, H.C. (1990) Lipoproteins in bacteria. Journal of Bioenergetics and Biomembranes **22**: 451-471.

Haynie, D.T.; Freire, E. (1993) Structural energetics of the molten globule state. Proteins **16**: 115-140.

Heinzen, R.A.; Scidmore, M.A.; Rockey, D.D.; Hackstadt, T. (1996) Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*. Infection and Immunity **64**: 796-809.

Helbig, J.H.; Lück, P.C.; Steinert, M.; Jacobs, E.; Witt, M. (2001) Immunolocalization of the Mip protein of intracellularly and extracellularly grown *Legionella pneumophila*. Letters in Applied Microbiology **32**: 83-88.

- Helbig, J.H.; König, B.; Knospe, H.; Bubert, B.; Yu, C.; Lück, C.P.; Riboldi-Tunnicliffe, A.; Hilgenfeld, R.; Jacobs, E.; Hacker, J.; Fischer, G. (2003)** The PPIase active site of *Legionella pneumophila* Mip protein is involved in the infection of eukaryotic host cells. *Biological Chemistry* **384**: 125-137.
- Helliwell, J.R. (1998)** Synchrotron radiation and crystallography: the first 50 years. *Acta Crystallographica A* **54**: 738-749.
- Hennig, L.; Christner, C.; Kipping, M.; Schelbert, B.; Rücknagel, K.P.; Grabley, S.; Küllertz, G.; Fischer, G. (1998)** Selective inactivation of parvulin-like peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases by juglone. *Biochemistry* **37**: 5953-5960.
- Hess, J.F.; FitzGerald, P.G. (1998)** Protection of a restriction enzyme from heat inactivation by α -crystallin. *Molecular Vision* **4**:29.
- Hesterkamp, T.; Deuerling, E.; Bukau, B. (1997)** The amino-terminal 118 amino acids of *Escherichia coli* trigger factor constitute a domain that is necessary and sufficient for binding to ribosomes. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 21865-21871.
- Higa, F.; Edelstein, P.H. (2001)** Potential virulence role of the *Legionella pneumophila ptsP* ortholog. *Infection and Immunity* **69**: 4782-4789.
- Holtzhauer, M. (Hrsg.). Methoden in der Proteinanalytik.** Springer Verlag, Berlin **1996**.
- Horne, S.M.; Young, K.D. (1995)** *Escherichia coli* and other species of the *Enterobacteriaceae* encode a protein similar to the family of Mip-like FK506-binding proteins. *Archives of Microbiology* **163**: 357-365.
- Horne, S.M.; Kottom, T.J.; Nolan, L.K.; Young, K.D. (1997)** Decreased intracellular survival of an *fkpA* mutant of *Salmonella typhimurium* Copenhagen. *Infection and Immunity* **65**: 806-810.
- Horwich, A.L.; Low, K.B.; Fenton, W.A.; Hirshfield, I.N.; Furtak, K. (1993)** Folding *in vivo* of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL. *Cell* **74**: 909-917.
- Horwitz, M.A.; Silverstein, S.C. (1980)** Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes. *The Journal of Clinical Investigation* **66**: 441-450.

Horwitz, M.A.; Silverstein, S.C. (1981a) Interaction of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) with human phagocytes. I. *L. pneumophila* resists killing by polymorphonuclear leukocytes, antibody, and complement. Journal of Experimental Medicine **153**: 386-397.

Horwitz, M.A.; Silverstein, S.C. (1981b) Interaction of the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) with human phagocytes. II. Antibody promotes binding of *L. pneumophila* to monocytes but does not inhibit intracellular multiplication. Journal of Experimental Medicine **153**: 398-406.

Horwitz, M.A. (1983) Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. Journal of Experimental Medicine **158**: 1319-1331.

Horwitz, M.A.; Silverstein, S.C. (1983) Intracellular multiplication of Legionnaires' disease bacteria is reversibly inhibited by erythromycin and rifampin. The Journal of Clinical Investigation **71**: 15-26.

Horwitz, M.A.; Maxfield, F.R. (1984) *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. The Journal of Cell Biology **99**: 1936-1943.

Hoshi, T.; Heinemann, S.H. (2001) Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. Journal of Physiology **531**: 1-11.

Huang, S.; Bjornsti, M.A.; Houghton, P.J. (2003) Rapamycins: mechanisms of action and cellular resistance. Cancer Biology & Therapy **2**: 222-232.

Hueck, C.J. (1998) Type III secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiology and Molecular Biology Reviews **62**: 379-433.

Hulo, N.; Sigrist, C.J.A.; Le Saux, V.; Langendijk-Genevaux, P.S.; Bordoli, L.; Gattiker, A.; De Castro, E.; Bucher, P.; Bairoch, A. (2004) Recent improvements to the PROSITE database. Nucleic Acids Research **32** (Database issue): D134-D137.

Humphreys, S.; Rowley, G.; Stevenson, A.; Kenyon, W.J.; Spector, M.P.; Roberts, M. (2003) Role of periplasmic peptidylprolyl isomerases in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence. Infection and Immunity **71**: 5386-5388.

- Husmann, L.K.; Johnson, W. (1992)** Adherence of *Legionella pneumophila* to guinea pig peritoneal macrophages, J774 mouse macrophages, and undifferentiated U937 human monocytes: role of Fc and complement receptors. Infection and Immunity **60**: 5212-5218.
- Isonhood, J.H.; Drake, M. (2002)** *Aeromonas* species in foods. Journal of Food Protection **65**: 575-582.
- Jakob, U.; Lilie, H.; Meyer, I.; Buchner, J. (1995)** Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock *in vivo*. Journal of Biological Chemistry **270**: 7288-7294.
- Jayaraman, T.; Brillantes, A.-M.; Timerman, A.P.; Fleischer, S.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Marks, A.R. (1992)** FK506 binding protein associated with the calcium release channel (ryanodine receptor). Journal of Biological Chemistry **267**: 9474-9477.
- Joensen, L.; Borda, E.; Kohout, T.; Perry, S.; Garcia, G.; Sterin-Borda, L. (2003)** *Trypanosoma cruzi* antigen that interacts with the beta1-adrenergic receptor and modifies myocardial contractile activity. Molecular and Biochemical Parasitology **127**: 169-177.
- Jones, T.A.; Zou, J.-Y.; Cowan, S.W.; Kjeldgaard, M. (1991)** Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. Acta Crystallographica A **47**: 110-119.
- Kabsch, W.; Sander, C. (1983)** Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. Biopolymers **22**: 2577-2637.
- Kaukoranta-Tolvanen, S.S.; Laitinen, K.; Saikku, P.; Leinonen, M. (1994)** *Chlamydia pneumoniae* multiplies in human endothelial cells *in vitro*. Microbial Pathogenesis **16**: 313-319.
- Kiefhaber, T.; Rudolph, R.; Kohler, H.H.; Buchner, J. (1991)** Protein aggregation *in vitro* and *in vivo*: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. Biotechnology (NY) **9**: 825-829.
- Kim, K.K.; Kim, R.; Kim, S.H. (1998)** Crystal structure of a small heat-shock protein. Nature **394**: 595-599.
- Kim, H.Y.; Gladyshev, V.N. (2004)** Methionine sulfoxide reduction in mammals: characterization of methionine-R-sulfoxide reductases. Molecular Biology of the Cell **15**: 1055-1064.

- Kirby, J.E.; Isberg, R.R. (1998)** Legionnaires' disease: the pore macrophage and the legion of terror within. Trends in Microbiology **6**: 256-258.
- Kishimoto, R.A.; White, J.D.; Shirey, F.G.; McGann, V.G.; Berendt, R.F.; Larson, E.W.; Hedlund, K.W. (1981)** In vitro responses of guinea pig peritoneal macrophages to Legionella pneumophila. Infection and Immunity **31**: 1209-1213.
- Knauth, K. (2001)** Untersuchung der Dimerisierungsdomäne des Legionella pneumophila Mip-Proteins. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität, Halle/Wittenberg.
- Köhler, R. (2000)** Entwicklung eines GFP-Reportersystems in Legionella und molekularbiologische Funktionsanalyse des Legionella Mip-Proteins. Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- Köhler, R.; Bubert, A.; Goebel, W.; Steinert, M.; Hacker, J.; Bubert, B. (2000)** Expression and use of the green fluorescent protein as reporter system in Legionella pneumophila. Molecular Genetics and Genomics **262**: 1060-1069.
- Köhler, R.; Fanghänel, J.; König, B.; Luneberg, E.; Frosch, M.; Rahfeld, J.U.; Hilgenfeld, R.; Fischer, G.; Hacker, J.; Steinert, M. (2003)** Biochemical and functional analyses of the Mip protein: influence of the N-terminal half and of peptidylprolyl isomerase activity on the virulence of Legionella pneumophila. Infection and Immunity **71**: 4389-4397.
- Kraulis, P.J. (1991)** MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. Journal of Applied Crystallography **24**: 946-950.
- Kuwano, K.; Nakashima, N.; Inoshima, I.; Hagimoto, N.; Fujita, M.; Yoshimi, M.; Maeyama, T.; Hamada, N.; Watanabe, K.; Hara, N. (2003)** Oxidative stress in lung epithelial cells from patients with idiopathic interstitial pneumonias. European Respiratory Journal **21**: 232-240.
- Ladd, M.F.C.; Palmer, R.A.** Structure determination by X-ray crystallography. Plenum Press, New York **1994**.
- Lämml, U.K. (1970)** Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.

- Lecker, S.; Lill, R.; Ziegelhoffer, T.; Georgopoulos, C.; Bassford, P.J.^{Jr.}; Kumamoto, C.A.; Wickner, W. (1989)** Three pure chaperone proteins of *Escherichia coli* – SecB, trigger factor and GroEL – form soluble complexes with precursor proteins *in vitro*. EMBO Journal **8**: 2703-2709.
- Lee, G.J.; Roseman, A.M.; Saibil, H.R.; Vierling, E. (1997)** A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding competent state. EMBO Journal **16**: 659-671.
- Lee, G.J.; Vierling, E. (2000)** A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 to reactivate a heat-denatured protein. Plant Physiology **122**: 189-197.
- Leikina, E.; Merts, M.V.; Kuznetsova, N.; Leikin, S. (2002)** Type I collagen is thermally unstable at body temperature. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **99**: 1314-1318.
- Levine, R.L.; Moskovitz, J.; Stadtman, E.R. (2000)** Oxidation of methionine in proteins: roles in antioxidant defense and cellular regulation. IUBMB Life **50**: 301-307.
- Lindner, R.A.; Kapur, A.; Carver, J.A. (1997)** The interaction of the molecular chaperone, α -crystallin, with molten globule states of bovine α -lactalbumin. Journal of Biological Chemistry **272**: 27722-27729.
- Lindner, R.A.; Kapur, A.; Mariani, M.; Titmuss, S.J.; Carver, J.A. (1998)** Structural alterations of α -crystallin during its chaperone action. European Journal of Biochemistry **258**: 170-183.
- Lopez-Illasaca, M.; Schiene, C.; Küllertz, G.; Tradler, T.; Fischer, G.; Wetzker, R. (1998)** Effects of FK506-binding protein 12 and FK506 on autophosphorylation of epidermal growth factor receptor. Journal of Biological Chemistry **273**: 9430-9434.
- Lu, K.P.; Hanes, S.D.; Hunter, T. (1996)** A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis. Nature **380**: 544-547.
- Luban, J.; Bossolt, K.L.; Franke, E.K.; Kalpana, G.V.; Goff, S.P. (1993)** Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to cyclophilins A and B. Cell **73**: 1067-1078.

- Lundemose, A.G.; Birkelund, S.; Fey, S.J.; Larson, P.M.; Christiansen, G. (1991)** *Chlamydia trachomatis* contains a protein similar to the *Legionella pneumophila mip* gene product. Molecular Microbiology 5: 109-115.
- Lundemose, A.G.; Rouch, D.A.; Birkelund, S.; Christiansen, G.; Pearce, J.H. (1992)** *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein. Molecular Microbiology 6: 2539-2548.
- Lundemose, A.G.; Kay, J.E.; Pearce, J.H. (1993a)** *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein has peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase activity that is inhibited by FK506 and rapamycin and is implicated in initiation of chlamydial infection. Molecular Microbiology 7: 777-783.
- Lundemose, A.G.; Rouch, D.A.; Penn, C.W.; Pearce, J.H. (1993b)** The *Chlamydia trachomatis* Mip-like protein is a lipoprotein. Journal of Bacteriology 175: 3669-3671.
- Lüneberg, E.; Zähringer, U.; Knirel, Y.A.; Steinmann, D.; Hartmann, M.; Steinmetz, I.; Rohde, M.; Köhl, J.; Frosch, M. (1998)** Phase-variable expression of lipopolysaccharide contributes to the virulence of *Legionella pneumophila*. Journal of Experimental Medicine 188: 49-60.
- Luo, Y.; Bertero, M.G.; Frey, E.A.; Pfuetzner, R.A.; Wenk, M.R.; Creagh, L.; Marcus, S.L.; Lim, D.; Sicheri, F.; Kay, C.; Haynes, C.; Finlay, B.B.; Strynadka, N.C.J. (2001)** Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE. Nature Structural Biology 8: 1031-1036.
- Maass, M.; Gieffers, J.; Solbach, W. (2000)** Atherogenetically relevant cells support continuous growth of *Chlamydia pneumoniae*. Herz 25: 68-72.
- McCarthy, A.A.; Haebel, P.W.; Törrönen, A.; Rybin, V.; Baker, E.N.; Metcalf, P. (2000)** Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. Nature Structural Biology 7: 196-199.
- Merelo, J.J.; Andrade, M.A.; Prieto, A.; Morán, F. (1994)** Proteinotopic feature maps. Neurocomputing 6: 443-454.
- Merritt, E.A.; Bacon, D.J. (1997)** Raster3D: photorealistic molecular graphics. Methods in Enzymology 277: 505-524.

- Michnick, S.W.; Rosen, M.K.; Wandless, T.J.; Karplus, M.; Schreiber, S.L. (1991)** Solution structure of FKBP, a rotamase enzyme and receptor for FK506 and rapamycin. *Science* **252**: 836-839.
- Missiakas, D.; Betton, J.-M.; Raina, S. (1996)** New components of protein folding in extracytoplasmic compartments of *Escherichia coli* SurA, FkpA and Skp/OmpH. *Molecular Microbiology* **21**: 871-884.
- Mo, Y.-Y.; Cianciotto, N.P.; Mallavia, L.P. (1995)** Molecular cloning of a *Coxiella burnetii* gene encoding a macrophage infectivity potentiator (Mip) analogue. *Microbiology* **141**: 2861-2871.
- Mody, C.H.; Paine, R. 3rd; Shahrabadi, M.S.; Simon, R.H.; Pearlman, E.; Eisenstein, B.I.; Toews, G.B. (1993)** *Legionella pneumophila* replicates within rat alveolar epithelial cells. *The Journal of Infectious Disease* **167**: 1138-1145.
- Mogk, A.; Mayer, M.P.; Deuerling, E. (2001)** Molekulare Chaperone und ihr biotechnologisches Potential. *Biologie in unserer Zeit* **31**: 182-192.
- Moro, A.; Ruiz-Cabello, F.; Fernández-Cano, A.; Stock, R.P.; González, A. (1995)** Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase involved in cell infection. *EMBO Journal* **14**: 2483-2490.
- Nicholls, A.; Sharp, K.A.; Honig, B. (1991)** Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* **11**: 281-296.
- Otwinowski, Z.; Minor, W. (1997)** Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods in Enzymology* **276**: 307-326.
- Panjikar, S.; Riboldi-Tunnicliffe, A.; Hilgenfeld, R. (2000)** Novel cryo-cooling techniques. *Acta Crystallographica A* **56** (Supplement): s56.
- Papi, A.; Papadopoulos, N.G.; Stanciu, L.A.; Bellettato, C.M.; Pinamonti, S.; Degitz, K.; Holgate, S.T.; Johnston, S.L. (2002)** Reducing agents inhibit rhinovirus-induced up-regulation of the rhinovirus receptor intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in respiratory epithelial cells. *FASEB Journal* **16**: 1934-1936.

Patzelt, H.; Rüdiger, S.; Brehmer, D.; Kramer, G.; Vorderwulbecke, S.; Schaffitzel, E.; Waitz, A.; Hesterkamp, T.; Dong, L.; Schneider-Mergener, J.; Bukau, B.; Deuerling, E. (2001) Binding specificity of *Escherichia coli* trigger factor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **98**: 14244-14249.

Payne, N.R.; Horwitz, M.A. (1987) Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. Journal of Experimental Medicine **166**: 1377-1389.

Pedersen, L.L.; Radulic, M.; Doric, M.; Abu Kwaik, Y. (2001) HtrA homologue of *Legionella pneumophila*: an indispensable element for intracellular infection of mammalian but not protozoan cells. Infection and Immunity **69**: 2569-2579.

Pereira, P.J.B.; Vega, M.C.; González-Rey, E.; Fernández-Carozo, R.; Macedo-Ribeiro, S.; Gomis-Rüth, F.X.; González, A.; Coll, M. (2002) *Trypanosoma cruzi* macrophage infectivity potentiator has a rotamase core and a highly exposed α -helix. EMBO Reports **3**: 88-94.

Pethe, K.; Alonso, S.; Biet, F.; Delogu, G.; Brennan, M.J.; Loch, C.; Menozzi, F.D. (2001) The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. Nature **412**: 190-194.

Rahfeld, J.-U.; Rücknagel, K.P.; Stoller, G.; Horne, S.M.; Schierhorn, A.; Young, K.D.; Fischer, G. (1996) Isolation and amino acid sequence of a new 22-kDa FKBP-like peptidyl-prolyl *cis/trans*-isomerase of *Escherichia coli*. Similarity to Mip-like proteins of pathogenic bacteria. Journal of Biological Chemistry **271**: 22130-22138.

Rahmann, I.; Kelly, F. (2003) Biomarkers in breath condensate: a promising new non-invasive technique in free radical research. Free Radical Research **37**: 1253-1266.

Ramm, K.; Plückthun, A. (2000) The periplasmic *Escherichia coli* peptidylprolyl *cis/trans*-isomerase FkpA. II. Isomerase-independent chaperone activity *in vitro*. Journal of Biological Chemistry **275**: 17106-17113.

Ramm, K.; Plückthun, A. (2001) High enzymatic activity and chaperone function are mechanistically related features of the dimeric *E. coli* peptidyl-prolyl-isomerase FkpA. Journal of Molecular Biology **310**: 485-498.

Ranganathan, R.; Lu, K.P.; Hunter, T.; Noel, J.P. (1997) Structural and functional analysis of the mitotic rotamase Pin1 suggests substrate recognition is phosphorylation dependent. Cell **89**: 875-886.

Raulston, J.E.; Wyrick, P.B. *Chlamydia*. In "Encyclopedia of Microbiology", 2nd edition, Volume 1 A-C, Editor-in-Chief J. Lederberg, Academic Press, San Diego **2000**.

Raulston, J.E.; Davis, C.H.; Paul, T.R.; Hobbs, J.D.; Wyrick, P.B. (2002) Surface accessibility of the 70-kilodalton *Chlamydia trachomatis* heat shock protein following reduction of outer membrane protein disulfide bonds. Infection and Immunity **70**: 535-543.

Redecke, V.; Dalhoff, K.; Bohnet, S.; Braun, J.; Maass, M. (1998) Interaction of *Chlamydia pneumoniae* and human alveolar macrophages: infection and inflammatory response. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology **19**: 721-727.

Reina-San-Martin, B.; Degrave, W.; Rougeot, C.; Cossan, A.; Chamond, N.; Cordeiro-da-Silva, A.; Arala-Chaves, M.; Coutinho, A.; Minoprio, P. (2000) A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline-racemase. Nature Medicine **6**: 890-897.

Rhodes, G. Crystallography made crystal clear. Academic Press, Inc., San Diego **1993**.

Riboldi-Tunnicliffe, A.; Hilgenfeld, R. (1999) Cryocrystallography with oil – an old idea revived. Journal of Applied Crystallography **32**: 1003-1005.

Riboldi-Tunnicliffe, A. (2000) Crystal structure of the macrophage infectivity potentiator protein, a major virulence factor from *Legionella pneumophila*. Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität, Jena.

Riboldi-Tunnicliffe, A.; König, B.; Jessen, S.; Weiss, M.S.; Rahfeld, J.; Hacker, J.; Fischer, G.; Hilgenfeld, R. (2001) Crystal structure of Mip, a prolyl isomerase from *Legionella pneumophila*. Nature Structural Biology **8**: 779-783.

Richardson, J.S.; Richardson, D.C. Principles and patterns of protein conformation. In "Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation", edited by G.D. Fasman. Plenum Press, New York **1989**.

- Riffard, S.; Vandenesch, F.; Reyrolle, M.; Etienne, J. (1996) Distribution of mip-related sequences in 39 species (48 serogroups) of Legionellaceae. *Epidemiology & Infection* **117**: 501-506.
- Rittig, M.G.; Schröppel, K.; Seack, K.-H.; Sander, U.; N'Diaye, E.-N.; Maridonneau-Parini, I.; Solbach, W.; Bogdan, C. (1998) Coiling phagocytosis of trypanosomatids and fungal cells. *Infection and Immunity* **66**: 4331-4339.
- Rockey, D.D.; Chesebro, B.B.; Heinzen, R.A.; Hackstadt, T. (1996) A 28 kDa major immunogen of Chlamydia psittaci shares identity with Mip proteins of Legionella ssp. and Chlamydia trachomatis – cloning and characterization of the C. psittaci mip-like gene. *Microbiology* **142**: 945-953.
- Roig, J.; Rello, J. (2003) Legionnaires' disease: a rational approach to therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 1119-1129.
- Roy, C.R. (2002) The Dot/Icm transporter of Legionella pneumophila: a bacterial conductor of vesicle trafficking that orchestrates the establishment of a replicative organelle in eukaryotic hosts. *International Journal of Medical Microbiology* **291**: 463-467.
- Saikku, P.; Leinonen, M.; Tenkanen, L.; Linnanmaki, E.; Ekman, M.R.; Manninen, V.; Manttari, M.; Frick, M.H.; Huttunen, J.K. (1992) Chronic Chlamydia pneumoniae infection as a risk factor for coronary heart disease in the Helsinki Heart Study. *Annals of Internal Medicine* **116**: 273-278.
- Santhoshkumar, P.; Sharma, K.K. (2001) Analysis of α -crystallin chaperone function using restriction enzymes and citrate synthase. *Molecular Vision* **7**: 172-177.
- Saul, F.A.; Arié, J.-P.; Vulliez-le Normand, B.; Kahn, R.; Betton, J.-M.; Bentley, G.A. (2004) Structural and functional studies of FkpA from Escherichia coli, a cis/trans peptidyl-prolyl isomerase with chaperone activity. *Journal of Molecular Biology* **335**: 595-608.
- Scharfstein, J.; Schmitz, V.; Morandi, V.; Capella, M.M.A.; Lima, A.P.C.A.; Morrot, A.; Juliano, L.; Müller-Esterl, W. (2000) Host cell invasion by Trypanosoma cruzi is potentiated by activation of bradykinin B₂ receptors. *Journal of Experimental Medicine* **192**: 1289-1299.

- Schiene-Fischer, C.; Habazettl, J.; Schmid, F.X.; Fischer, G. (2002)** The hsp 70 chaperone DnaK is a secondary amide peptide bond *cis-trans* isomerase. *Nature Structural Biology* **9**: 419-424.
- Schmidt, T.; Pfeiffer, A.; Ehret, W.; Keiditsch, E.; Ruckdeschel, G.; Kaess, H. (1989)** *Legionella* infection of the colon presenting as acute attack of ulcerative colitis. *Gastroenterology* **97**: 751-755.
- Schmidt, B.; Rahfeld, J.; Schierhorn, A.; Ludwig, B.; Hacker, J.; Fischer, G. (1994)** A homodimer represents an active species of the peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase FKBP25mem from *Legionella pneumophila*. *FEBS Letters* **352**: 185-190.
- Schmidt, B.; König, S.; Svergun, D.; Volkov, V.; Fischer, G.; Koch, M.H.J. (1995)** Small-angle X-ray solution scattering study on the dimerization of the FKBP25mem from *Legionella pneumophila*. *FEBS Letters* **372**: 169-172.
- Schmidt, B. (1998)** Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen aus *Legionella pneumophila*. Dissertation, Martin-Luther-Universität, Halle/Wittenberg.
- Scholz, C.; Scherer, G.; Mayr, L.M.; Schindler, T.; Fischer, G.; Schmid, F.X. (1998)** Prolyl isomerases do not catalyze isomerization of non-prolyl peptide bonds. *Biological Chemistry* **379**: 361-365.
- Schreiber, S.L. (1991)** Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* **251**: 283-287.
- Schutte, B.C.; MacCray, P.B. Jr. (2002)** β -defensins in lung host defense. *Annual Reviews of Physiology* **64**: 709-748.
- Schwede, T.; Kopp, J.; Guex, N.; Peitsch, M.C. (2003)** SWISS-MODELL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Research* **31**: 3381-3385.
- Scidmore-Carlson, M.; Hackstadt, T.** *Chlamydia* internalization and intracellular fate. In "Subcellular Biochemistry", Volume 33: Bacterial Invasion into Eukaryotic Cells, edited by Oelschlaeger and Hacker, Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York **2000**.
- Sibley, L.D. (1995)** Invasion of vertebrate cells by *Toxoplasma gondii*. *Trends in Cell Biology* **5**: 129-132.

- Smith, C.L.; Hultgren, S.J. (2001) Bacteria thread the needle. *Nature* **414**: 29, 31.
- Sone, M.; Akiyama, Y.; Ito, K. (1997) Differential *in vivo* roles played by DsbA and DsbC in the formation of protein disulfide bonds. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 10349-10352.
- Stadtman, E.R.; Levine, R.L. (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* **25**: 207-218.
- Stathopoulos, C.; Hendrixson, D.R.; Thanassi, D.G.; Hultgren, S.J.; St. Geme 3rd, J.W.; Curtiss 3rd, R. (2000) Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in Gram-negative pathogens: an evolving story. *Microbes and Infection* **2**:1061-1072.
- Stebbins, C.E.; Galán, J.E. (2001) Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **414**: 77-81.
- Stoller, G.; Rücknagel, K.P.; Nierhaus, K.H.; Schmid, F.X.; Fischer, G.; Rahfeld, J.U. (1995) A ribosome-associated peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerase identified as the trigger factor. *EMBO Journal* **14**: 4939-4948.
- Stryer, L. Biochemistry. 4th edition, W.H. Freeman and Company, New York 1995.
- Stultz, C.M. (2002) Localized unfolding of collagen explains collagenase cleavage near imino-poor sites. *Journal of Molecular Biology* **319**: 997-1003.
- Sturgill-Koszycki, S.; Swanson, M.S. (2000) Legionella pneumophila replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *Journal of Experimental Medicine* **192**: 1261-1272.
- Suno, R.; Taguchi, H.; Masui, R.; Odaka, M.; Yoshida, M. (2004) Trigger factor from Thermus thermophilus is a Zn²⁺-dependent chaperone. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 6380-6384.
- Suzuki, R.; Nagata, K.; Yumoto, F.; Kawakami, M.; Nemoto, N.; Furutani, M.; Adachi, K.; Maruyama, T.; Tanokura, M. (2003) Three-dimensional solution structure of an archaeal FKBP with a dual function of peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase and chaperone-like activities. *Journal of Molecular Biology* **328**: 1149-1160.
- Swanson, M.S.; Isberg, R.R. (1995) Association of Legionella pneumophila with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infection and Immunity* **63**: 3609-3620.

Taggart, C.; Cervantes-Laurean, D.; Kim, G., McElvaney, N.G.; Wehr, N.; Moss, J.; Levine, R.L. (2000) Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in α_1 -antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity. Journal of Biological Chemistry **275**: 27258-27265.

Taraska, T.; Ward, D.M.; Ajioka, R.S.; Wyrick, P.B.; Davis-Kaplan, S.R.; Davis, C.H.; Kaplan, J. (1996) The late chlamydial inclusion membrane is not derived from the endocytic pathway and is relatively deficient in host proteins. Infection and Immunity **64**: 3713-3727.

Tardieux, I.; Webster, P.; Ravesloot, J.; Boron, W.; Lunn, J.A.; Heuser, J.E.; Andrews, N.W. (1992) Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. Cell **71**: 1117-1130.

Tesh, M.J.; Miller, R.D. (1981) Amino acid requirements for *Legionella pneumophila* growth. Journal of Clinical Microbiology **13**: 865-869.

Thier, H.-J. (Hrsg.) Brockhaus ABC, Naturwissenschaft und Technik. 9., neuüberarbeitete und erweiterte Auflage, VEB F.A. Brockhaus Verlag, Leipzig 1968.

Timerman, A.P.; Wiederrecht, G.; Marcy, A.; Fleischer, S. (1995) Characterization of an exchange reaction between soluble FKBP-12 and the FKBP-ryanodine receptor complex. Modulation by FKBP mutants deficient in peptidyl-prolyl isomerase activity. Journal of Biological Chemistry **270**: 2451-2459.

Ting, L.-M., Hsia, R.-C.; Haidaris, C.G., Bavoil, P.M. (1995) Interaction of outer envelope proteins of *Chlamydia psittaci* GPIC with the HeLa cell surface. Infection and Immunity **63**: 3600-3608.

Tipples, G.; McClarty, G. (1993) The obligate intracellular bacterium *Chlamydia trachomatis* is auxotrophic for three of the four ribonucleoside triphosphates. Molecular Microbiology **8**: 1105-1114.

Van Duyne, G.D.; Standaert, R.F.; Karplus, P.A.; Schreiber, S.L.; Clardy, J. (1991) Atomic structure of FKBP-FK506, an immunophilin-immunosuppressant complex. Science **252**: 839-842.

Van Duyne, G.D.; Standaert, R.F.; Karplus, P.A.; Schreiber, S.L.; Clardy, J. (1993) Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin. Journal of Molecular Biology **229**: 105-124.

Venkataraman, C.; Haack, B.J.; Bondada, S.; Abu Kwaik, Y. (1997) Identification of a Gal/GalNAc lectin in the protozoan *Hartmanella vermiformis* as a potential receptor for attachment and invasion by the Legionnaires' disease bacterium. Journal of Experimental Medicine **186**: 537-547.

Venkataraman, C.; Gao, L.-Y.; Bondada, S.; Abu-Kwaik, Y. (1998) Identification of putative cytoskeletal protein homologues in the protozoan host *Hartmanella vermiformis* as substrates for induced tyrosine phosphatase activity upon attachment to the Legionnaires' disease bacterium *Legionella pneumophila*. Journal of Experimental Medicine **188**: 505-514.

Verma, A.; Maurelli, A.T. (2003) Identification of two eukaryote-like serine/threonine kinases encoded by *Chlamydia trachomatis* serovar L2 and characterization of interacting partners of Pkn1. Infection and Immunity **71**: 5772-5784.

Vogtherr, M.; Jacobs, D.M.; Parac, T.N.; Maurer, M.; Pahl, A.; Saxena, K.; Rüterjans, H.; Griesinger, C.; Fiebig, K.M. (2002) NMR solution structure and dynamics of the peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase domain of the trigger factor from *Mycoplasma genitalium* compared to FK506-binding protein. Journal of Molecular Biology **318**: 1097-1115.

Wang, C.-C.; Tsou, C.-L. (1998) Enzymes as chaperones and chaperones as enzymes. FEBS Letters **425**: 382-384.

Wattiau, P.; Woestyn, S.; Cornelis, G.R. (1996) Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. Molecular Microbiology **20**: 255-262.

Weiwad, M., Küllertz, G.; Schutkowski, M.; Fischer, G. (2000) Evidence that the substrate backbone conformation is critical to phosphorylation by p42 MAP kinase. FEBS Letters **478**: 39-42.

Weiss, M.S.; Hilgenfeld, R. (1997) On the use of the merging *R* factor as a quality indicator for X-ray data. Journal of Applied Crystallography **30**: 203-205.

- Wieland, H.; Faigle, M.; Lang, F.; Northoff, H.; Neumeister, B. (2002)** Regulation of the *Legionella mip*-promoter during infection of human monocytes. FEMS Microbiology Letters **212**: 127-132.
- Wilson, K.P.; Yamashita, M.M.; Sintchak, M.D.; Rotstein, S.H.; Murcko, M.A.; Boger, J.; Thomson, J.A.; Fitzgibbon, M.J.; Black, J.R.; Navia, M.A. (1995)** Comparative X-ray structures of the major binding protein for the immunosuppressant FK506 (tacrolimus) in unliganded form and in complex with FK506 and rapamycin. Acta Crystallographica D **51**: 511-521.
- Wintermeyer, E. (1994)** Molekular- und zellbiologische Untersuchungen zum Einfluß von „Lly“ und „Mip“ auf die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella pneumophila*. Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- Wintermeyer, E.; Ludwig, B.; Steinert, M.; Schmidt, B.; Fischer, G.; Hacker, J. (1995)** Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of *Legionella pneumophila* in eukaryotic cells. Infection and Immunity **63**: 4576-4583.
- Wolf, S.C.; Mayer, O.; Jurgens, S.; Vontheim, R.; Schultze, G.; Risler, T.; Brehm, B.R. (2003)** *Chlamydia pneumoniae* IgA seropositivity is associated with increased risk for atherosclerotic vascular disease, myocardial infarction and stroke in dialysis patients. Clinical Nephrology **59**: 273-279.
- Wong, C.Y.F.; Heuzenroeder, M.W.; Quinn, D.M.; Flower, R.L.P. (1997)** Cloning and characterization of two immunophilin-like genes, *ilpA* and *fkpA*, on a single 3.9-kilobase fragment of *Aeromonas hydrophila* genomic DNA. Journal of Bacteriology **179**: 3397-3403.
- Woolsey, A.M.; Sunwoo, L.; Petersen, C.A.; Brachman, S.M.; Cantley, L.C.; Burleigh, B.A. (2003)** Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. Journal of Cell Science **116**: 3611-3622.
- Wuppermann, F.N.; Hegemann, J.H.; Jantos, C.A. (2001)** Heparan sulfate-like glycosaminoglycan is a cellular receptor for *Chlamydia pneumoniae*. Journal of Infectious Diseases **184**: 181-187.
- Yang, J.T.; Wu, C.-S. C.; Martinez, H.M. (1986)** Calculation of protein conformation from circular dichroism. Methods in Enzymology **130**: 208-269.

Zander, K.; Sherman, M.P.; Tessmer, U.; Bruns, K.; Wray, V.; Prectel, A.T.; Schubert, E.; Henklein, P.; Luban, J.; Neidleman, J.; Greene, W.C.; Schubert, U. (2003) Cyclophilin A interacts with HIV-1 Vpr and is required for its functional expression. Journal of Biological Chemistry **278: 43202-43213.**

Zarnt, T.; Tradler, T.; Stoller, G.; Scholz, C.; Schmid, F.X.; Fischer, G. (1997) Modular structure of the trigger factor required for high activity in protein folding. Journal of Molecular Biology **271: 827-837.**

Zhong, G.; Fan, P.; Ji, H.; Dong, F.; Huang, Y. (2001) Identification of a chlamydial protease-like activity factor responsible for the degradation of host transcription factors. Journal of Experimental Medicine **193: 935-942.**

Zink, S.D.; Pedersen, L.; Cianciotto, N.P.; Abu Kwaik, Y. (2002) The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. Infection and Immunity **70: 1657-1663.**

Anhang

Danksagung

Ich danke meinen Eltern, Brigitte und Karl-Friedrich Vogel, sowie Großeltern, Erna und Willy Stumm, für ihre verlässliche und unaufdringliche Hilfe. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld für die Überlassung des spannenden Themas und damit der Möglichkeit, auf dem Gebiet der Strukturbiologie arbeiten zu können. Darüberhinaus hat er mich stets ermuntert, eigene Ideen zu entwickeln.

Außerdem möchte ich Dr. Jeroen Mesters, Dr. Manfred Weiss sowie Dr. Gottfried Palm danken. In zahlreichen Diskussionen hatten sie immer ein offenes Ohr für meine fachlichen Sorgen und Nöte.

Ich danke Dr. Bettina König und Dr. Thilo Kamphausen. Sie haben mich stets unkompliziert mit Proteinen versorgt.

Ein besonders großes Dankeschön gilt Barbara Härtl sowie Beate Rappsilber. Ohne ihre praktische Unterstützung bei zahlreichen Experimenten wäre eine Vielzahl von Ergebnisse undenkbar.

Ich danke Dr. Karl-Heinz Gührs für die Aufnahme von Massenspektren sowie die zahlreichen hilfreichen Ratschläge.

Im weiteren muß ich mich auch bei Prof. Dr. Jörg Hacker, Dr. Michael Steinert, Dr. Klaus Heuner sowie Carina Scriwan bedanken. Sie haben mir stets bei meiner Arbeit zur Seite gestanden.

Prof. Dr. Gunter Fischer danke ich für die zahlreichen kritischen Diskussionen, die mir immer halfen, Anfängerfehler zu vermeiden.

Nelson Rodriguez Seivane hat mich unermüdlich am Computer unterstützt.

Ein besonderer Dank gilt auch Astrid Rau und Tom Sicker. Durch ihre Hilfe ist es mir gelungen, Krisen in den vergangenen vier Jahren besser zu überstehen.

Publikation

Steinmetzer, T.; Batdordshjin, M.; Pineda, F.; Seifarth, L.; **Vogel, A.**; Reissmann, S.; Hauptmann, J.; Stuerzebecher, J. (2000) New bivalent thrombin inhibitors with N(alpha)-(methyl)arginine at the P1-position. Biological Chemistry **381**: 603-610

Vorträge

Wittenberger Arbeitstreffen – „Biochemie der Pathogen-Wirtszell-Wechselwirkungen“

12. November – 14. November 2001, Lutherstadt-Wittenberg

Biochemical and structural investigations of the Mip protein

Workshop „Analyse von Proteinkomplexen“ im Rahmen des SFB 604

18. März 2002, Jena

Development of a chaperone assay

IMB-Symposium „Protein Folding – Principles and Pathological Implications“

19. September 2002, Jena

Chaperones in bacterial infection

Abeitstreffen „Biochemie der Pathogen-Wirtszell-Wechselwirkungen“

27. September – 29. September 2002, Kloster Banz

Chaperone function of Mip proteins

Jahrestagung SFB 604

Dezember 2002, Jena

Mip proteins as bacterial virulence factors: Mechanisms and structures of multifunctional complexes with natural compounds and host-cell proteins

Wittenberger Arbeitstreffen – „Biochemie der Pathogen-Wirtszell-Wechselwirkungen“

24. November – 26. November 2003, Lutherstadt-Wittenberg

Red-ox regulation of Mip proteins

Posterbeiträge

2nd Symposium on Protein Structure Analysis for Biomedical Research

30. März – 1. April 2000, Murnau

Vogel, A.; Riboldi-Tunncliffe, A.; Hacker, J.; König, B.; Fischer, G.; Hilgenfeld, R.

Structure determination of two N-terminal domain mutants of the Macrophage Infectivity Potentiator Protein of Legionella pneumophila

5th International Conference on Legionella

26. September – 29. September 2000, Ulm

Vogel, A.; Riboldi-Tunncliffe, A.; Hacker, J.; König, B.; Fischer, G.; Hilgenfeld, R.

Structure determination of the mutant Y185A of the Macrophage Infectivity Potentiator Protein

ICCBM9 – 9th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules

23. März bis 28. März 2002, Jena

Vogel, A.; Riboldi-Tunncliffe, A.; Hacker, J.; König, B.; Fischer, G.; Hilgenfeld, R.

The role of zinc ions in forming crystal contacts: structure of the Macrophage Infectivity Potentiator Protein

1st Meeting of the Joint Research Centers Sonderforschungsbereich 604 and Graduiertenkolleg 768

25. September – 27. September 2003, Jena

Vogel, A.; Kamphausen, T.; Steinert, M.; Hacker, J.; König, B.; Fischer, G.; Hilgenfeld, R.

Red-ox regulation of Mip proteins

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde. Ich versichere weiterhin, daß alle wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet sind.

Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität vorgelegt.

Jena, im Juli 2005

André Vogel

Lebenslauf

Name: Vogel
Vorname: André
Geburtsdatum: 22. Juli 1968
Geburtsort: Potsdam-Babelsberg
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Bildungsweg:

1975 - 1985 19. Polytechnische Oberschule, Berlin-Pankow
1985 - 1987 Erweiterte Oberschule Friedrich List, Berlin-Pankow
1987 Abitur
1989 – 1991 Mathematikstudium an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena
1992 – 1999 Biologiestudium (Hauptfach: Biochemie)
an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena
1995 - 1996 Erasmus-Austauschstudent am King's College, London
1998 – 1999 Anfertigung der Diplomarbeit im Rahmen des Biologiestudiums:
Thema: „Untersuchungen zur Kristallisation von bakteriellen
Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen“
1999 Diplom im Fach Biologie
1999 – 2004 Arbeit an der Dissertation unter Anleitung von Prof. R.Hilgenfeld
am Institut für Molekulare Biotechnologie, Jena
Thema: „Untersuchungen zur Funktion und Struktur von
„Macrophage-Infectivity-Potentiator“-Proteinen der intrazellulären
bakteriellen Parasiten *Legionella pneumophila* und *Chlamydia
pneumoniae*“

seit 2004 „Research-Assistent“ am Trinity College, Dublin

Wehrdienst:

1987 - 1988

weitere Tätigkeiten:

1988 - 1989 Universitätsbibliothek der Humboldt-Universität Berlin

1991 - 1992 Sparkasse Jena

Jena, im Juli 2005

André Vogel