

5. Diskussion

5.1 GFP, ein neuer Reporter in *Legionella*

Die bislang zur Verfügung stehenden Methoden zur Analyse der Wechselwirkung von Legionellen und deren Wirtsorganismen benötigen entweder Fixierungsschritte oder sind durch Bestimmung von CFU-Werten sehr Zeit-intensiv. Durch die Etablierung des Reportergens *gfp* in *Legionella* wurde die Möglichkeit geschaffen, die Interaktion des fakultativ intrazellulären Pathogens *L. pneumophila* innerhalb verschiedener Wirtszellen *in vivo* zu untersuchen (Köhler *et al.*, 2000). Der Vorteil von GFP gegenüber anderen Reportern wie *lux* oder *lacZ* ist die Unabhängigkeit seiner Funktionalität von zusätzlichen Kofaktoren bzw. Kosubstraten. GFP faltet sich spontan und selbstständig in Gegenwart von Sauerstoff zu einer sehr stabilen „ β -barrel“-Struktur und ist nach entsprechender Anregung leicht mittels Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen. Die Bildung des Fluorophors im Zentrum des Proteins wird durch die autokatalytische Oxidation eines Tyrosin-haltigen Tripeptids im wildtypischen GFP vermittelt (Yang *et al.*, 1996; Ormö *et al.*, 1996; Reid & Flynn, 1997; Margolin, 2000).

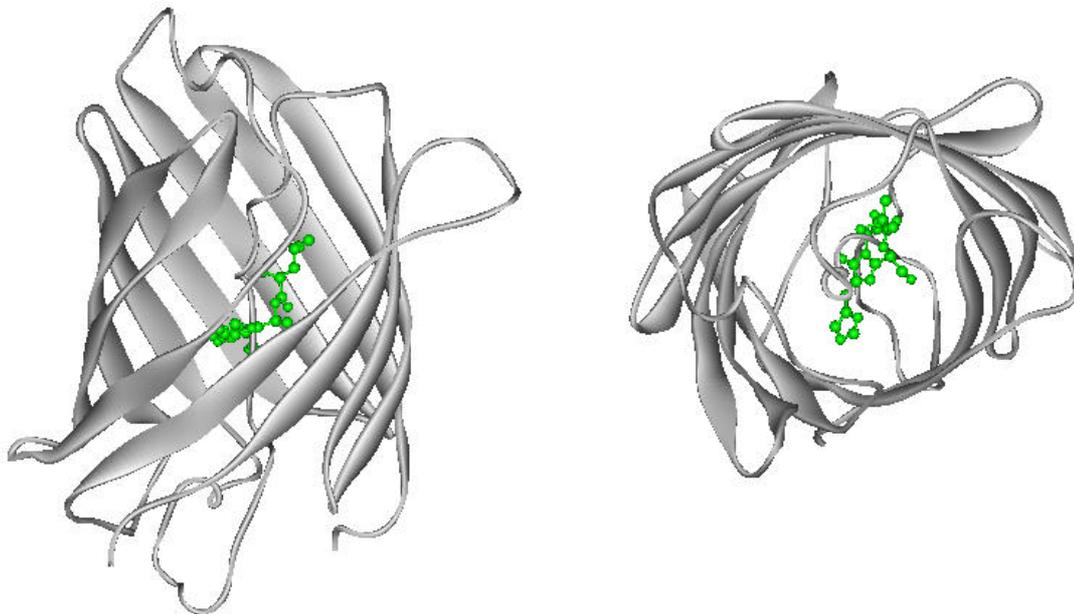


Abb. 38): Modell der Röntgenkristallstruktur des Green Fluorescent Protein (GFP) aus der marinen Qualle *Aequorea victoria*. Die an der Bildung des Fluorophors beteiligten Aminosäuren S⁶⁵-G⁶⁷ (im Wildtyp GFP) sind grün gekennzeichnet. Das zylindrische Protein, das sich über 42 Å erstreckt und einen Durchmesser von 24 Å besitzt, besteht aus 11 β -Faltblattstrukturen, die eine zentrale α -Helix, in der das Fluorophor lokalisiert ist, umfassen (verändert nach Ormö *et al.*, 1996).

Durch die Einführung von Mutationen innerhalb verschiedener Bereiche des 238 AS großen Proteins wurden sowohl die Fluoreszenzeigenschaften, die Faltungskinetiken als auch seine Löslichkeit im Vergleich zum WT-GFP wesentlich verbessert (Übersicht in: Margolin, 2000). Im Gegensatz zu anderen Reporter-gen-Methoden erfordert GFP keinerlei Permeabilisierung oder Zellyse, wodurch artifizielle Effekte weitgehend ausgeschlossen werden. Dieser Vorteil erlaubt das *in vivo* Monitoring intrazellulärer Pathogene in ihren Wirtsorganismen. Die Vielzahl der Beispiele für den erfolgreichen Einsatz von GFP zum Monitoring der intrazellulären Genexpression sowie der subzellulären Proteinlokalisierung in Prokaryoten wie *E. coli*, *Mycobacteria*, *Bartonella henselae*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella ssp.*, *Yersinia*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* und *Proteus mirabilis* bestätigten die Validität und Effektivität dieses Reporter-gens (Dhandayuthapani *et al.*, 1995; Kremer *et al.*, 1995; Webb *et al.*, 1995; Valdivia & Falkow, 1996; Valdivia *et al.*, 1996; Jacobi *et al.*, 1998; Josenhans *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 1998; Bubert *et al.*, 1999).

Durch die Konstruktion des GFP-Expressionsvektors pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip}) wurde die Möglichkeit geschaffen, das intrazelluläre Überleben von *L. pneumophila* in verschiedenen Wirtszellen auf Einzelzellebene zu untersuchen (Köhler *et al.*, 2000; Hägele *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurde durch den Einsatz Fluoreszenz-gestützter Methoden wie der FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorter) und der Spektrofluorimetrie die Quantifizierung der Genexpression und der intrazellulären Vermehrung in *Legionella* etabliert. Diese Methode findet nun alternativ zum klassischen Invasionsassay bei der Quantifizierung der bakteriellen Aufnahme in Wirtszellen Verwendung. Die Vorteile dieser Methode liegen in der Schnelligkeit, da keine CFU-Bestimmung und somit keine Inkubation auf Agarplatten mehr benötigt wird und der genauen Quantifizierung des Anteils infizierter Amöben. Selbst auf die Durchführung einer Gentamicin-Behandlung kann verzichtet werden, da über Einstellung der Schwellenwerte (FSC und SSC) nur solche Partikel erfasst werden, die die Größe einer Amöbenzelle aufweisen. Durch den Einsatz von FACS-Analysen konnten die invasiven Charakteristika unterschiedlich virulenter *Legionella*-Stämme im Infektionsmodell mit *A. castellanii* quantifiziert und deutlich voneinander unterschieden werden.

Ein wichtiges Kriterium für die Quantifizierung der bakteriellen Aufnahme ist, dass die GFP-exprimierenden Legionellen einen vergleichbaren Anteil grünfluoreszierender Bakterien aufweisen. Für die Expression von GFP in Mycobakterien und *Bartonella henselae* wurde gezeigt, dass nicht alle Bakterien einer GFP-exprimierenden Population eine stabile Grünfluoreszenz zeigen. Quantitative Angaben wurden jedoch nicht gemacht (Kremer *et al.*,

1995; Lee & Falkow, 1998). Dieses Phänomen lässt sich auch durch eine wiederholte Vereinzelung stark fluoreszenter Kolonien nicht umgehen. Da eine starke GFP-Expression die Zellen osmosensitiv werden lässt, kann es durchaus möglich sein, dass sich einige Zellen durch die Inaktivierung der GFP-Expression vor der Lyse schützen (B. Cormack, pers. Mitteilung). In mit pRK10(pBC(*gfp*)P_{mip}) transformierten Legionellen, die Chloramphenicol resistent waren aber keine Grünfluoreszenz zeigten, konnte dies auf die selektive Deletion der Mip-Promoter-Region zurückgeführt werden. Auch Lee und Falkow (1998) konnten Mutationen im Promoterbereich für *B. henselae* feststellen, die eine veränderte GFP-Fluoreszenzexpression zur Folge hatten. Der prozentuale Anteil der als grünfluoreszierend erkannten Bakterien, der in dieser Arbeit verwendeten GFP-exprimierenden *Legionella*-Stämme liegt zwischen 82-97 % der Gesamtpopulation. Wie FACS-Analysen zeigten (vgl. 4.3), ist dabei der Anteil fluoreszierender Bakterien unabhängig von dem verwendeten Promoter. Für den *Legionella* Stamm *L.p.*JR32, in dem die GFP-Expression entweder über den *mip*- bzw. den von *Listeria* stammenden *sod*-Promoter gesteuert wird, konnte kein Unterschiede bezüglich der Anzahl grünfluoreszierender Bakterien festgestellt werden. In beiden Fällen wurden über 96 % der Bakterien als grünfluoreszent detektiert. Im Gegensatz dazu ergab sich in spektrofluorimetrischen Messungen, dass die *sod*-Promoteraktivität im Vergleich zum *mip*-Promoter um den Faktor 10 erhöht ist. Wie Sadosky *et al.* (1994) zeigen konnten ist das Gen für die FeSOD (Superoxid-Dismutase) in *Legionella* essentiell. Bedingt durch das Wachstum auf Agarplatten ist es vorstellbar, dass der *sod*-Promoter zur zusätzlichen Detoxifikation von Sauerstoffradikalen verstärkt exprimiert wird.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, kann die *mip*-Promoter-vermittelte GFP-Expression sowohl bei extra- als auch intrazellulär replizierenden Legionellen detektiert werden. Diese Ergebnisse bestätigen die von Dumais-Pope *et al.* (1993) durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der *in vitro* Expression von Mip, die mittels *mip-lacZ* Reportergenfusion quantifiziert wurde. Die Beobachtung, dass es bei intrazellulär replizierenden Legionellen zu keiner Titration der Grünfluoreszenz innerhalb des replikativen Phagosoms einzelner Wirtzellen kommt, lässt darauf schließen, dass der *Legionella mip*-Promoter auch intrazellulär konstitutiv exprimiert wird. Zusätzlich konnte durch die Verwendung der destabilisierten GFP-Variante (GFPmut3(LVA)), die eine Halbwertszeit von 40 min. besitzt, die konstitutive Expression des *Legionella mip*-Promoters *in vitro* nachgewiesen werden. Hierdurch wird die Notwendigkeit von Mip für das intrazelluläre Überleben in phagozytierenden Zellen, wie sie von verschiedenen Autoren beschrieben wurde, bestätigt (Cianciotto *et al.*, 1992; Wintermeyer *et al.*, 1995; O'Connell *et al.*, 1995; Doyle *et al.*, 1998).

Durch die Analyse der *in vitro* Aktivitäten des *mip*-Promoters konnte ausgeschlossen werden, dass Unterschiede hinsichtlich der Virulenz verschiedener *Legionella*-Stämme durch die variierende Expression des Mip-Proteins begründet sind. Spektrofluorimetrische Messungen ergaben vergleichbare Fluoreszenzwerte für alle getesteten Stämme, in denen die GFP-Expression über den *mip* Promoter gesteuert wird. Darüber hinaus wird deutlich, dass der *mip* Promoter sowohl in virulenten als auch avirulenten Legionellen Stämmen exprimiert wird (Ratcliff *et al.*, 1997; Doyle *et al.*, 1998). Diese Daten stimmen mit der Beobachtung überein, dass die Aminosäuresequenz des Mip-Proteins innerhalb verschiedener *Legionella* ssp. hoch konserviert ist (Ludwig *et al.*, 1994; Ratcliff *et al.*, 1997).

Bislang wurde für die Untersuchung der Genregulation in *Legionella* Reporter wie *lacZ* oder *lux* verwendet. Durch Messung der β -Galaktosidase-Aktivität konnte gezeigt werden, dass der *Legionella hel* Locus ausschließlich intrazellulär exprimiert wird (McClain *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurde die induzierte Expression spezifischer *Legionella*-Antigene während der Infektion phagozytischer Zellen beschrieben (Abu Kwaik & Engleberg, 1994; Susa *et al.*, 1996). Diese Methoden erfordern allesamt die Lyse der Wirtszelle. Durch die Verwendung von GFP wird das Monitoring der Genregulation bzw. der Virulenzgen-Expression bei *Legionella* innerhalb intakter Wirtszellen *in vivo* und in „Echtzeit“ ermöglicht. So konnte die Expression des *flaA*-Gens beim Übergang zur stationären Phase vor Beginn der Wirtszelllyse durch das Auftreten von GFP-vermittelter Fluoreszenz detektiert werden (Hammer & Swanson, 1999). Durch den Einsatz von DFI (differential fluorescence induction) wäre die Identifizierung von in *Legionella* nur intrazellulär exprimierten oder besonders regulierten Genen, wie es bereits für *Salmonella typhimurium* beschrieben wurde, möglich (Valdivia & Falkow, 1996; Valdivia & Falkow, 1997a,b; Dhandayuthapani *et al.*, 1998). Durch deren Identifikation wären Rückschlüsse auf die an der Interaktion beteiligten Gene möglich.

Wie Arbeiten von Cirillo *et al.* zeigten, führt die intrazelluläre Replikation von Legionellen in Protozoen zu einer vermehrten Invasivität und damit zu einer gesteigerten Virulenz in verschiedenen Modellsystemen (Cirillo *et al.*, 1994, 1999). Die Vermehrung bzw. Persistenz von Legionellen innerhalb von Amöben hängt mit großer Wahrscheinlichkeit mit der Übertragung der Legionärskrankheit zusammen (Brieland *et al.*, 1996, 1997a,b; Berk *et al.*, 1998). Vor allem die an der bakteriellen Aufnahme beteiligten Mechanismen protozoischer Wirte sind bislang unzureichend charakterisiert. Durch den kombinierten Einsatz von FACS-Analysen und GFP-markierten Legionellen ist es möglich, den Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Phagozytose verschiedener Wirtsorganismen schnell und ohne zeitaufwendige Bestimmung der

CFU-Werte zu analysieren. Hierbei wurden die mittels FACS-Analyse generierten Ergebnisse durch die parallele Bestimmung der CFU-Werte validiert.

Durch die Verwendung von Cytochalasin D, einem Inhibitor der Mikrofilament-abhängigen Phagozytose, konnte kein Einfluss auf die Phagozytoserate von *A. castellanii* und *H. vermiformis* festgestellt werden, so dass hier vorwiegend Mikrofilament-unabhängige Mechanismen an der Aufnahme beteiligt sein müssen. Dagegen wird die Aufnahme von Legionellen in Makrophagen durch die Verwendung von Cytochalasin D vollständig reprimiert (King *et al.*, 1991; Harb *et al.*, 1998). Dies wird durch die in Makrophagen hauptsächlich zu beobachtende Art der Aufnahme von *Legionella*, der „coiling“-Phagozytose“, die Mikrofilament-abhängig ist, begründet (Horwitz, 1984, Venkataraman, *et al.*, 1998).

Wie gezeigt werden konnte, wird durch die Applikation von Cycloheximid, einem Inhibitor der eukaryotischen Proteinbiosynthese, die Phagozytose in *H. vermiformis* vollständig reprimiert. Arbeiten von Venkataraman *et al.* zeigen, dass die Aufnahme von Legionellen in *H. vermiformis* durch Rezeptor-vermittelte Endozytose über die Dephosphorylierung eines 170 kDa großen Lektins bewerkstelligt wird, dessen Expression von einer intakten Proteinbiosynthese abhängt (Venkataraman *et al.*, 1997; Harb *et al.*, 1998). So konnte in Hemmexperimenten mit monovalenten Zuckern wie Galaktose und N-Acetyl-D-Galaktosamin nur eine unvollständige Inhibition der Aufnahme von *Legionella* erreicht werden. Inwieweit die vollständige Inhibition der Phagozytose durch Cycloheximid allein auf die Expression des Lektins oder auf zusätzlich reprimierte Faktoren (Phosphatase-Aktivität) zurückzuführen ist, kann durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht abschließend bewertet werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt, wird die Phagozytoserate in *A. castellanii* durch die Verwendung von Cycloheximid dagegen um 50 % reduziert. Im Gegensatz dazu konnte für *A. polyphaga* nur ein geringer Einfluss auf die Phagozytoserate festgestellt werden (Harb *et al.*, 1998). Demzufolge unterscheiden sich sogar eng verwandte Amöben-Arten wie *A. castellanii* und *A. polyphaga* in der Sensitivität gegenüber Phagozytose-Inhibitoren und in Folge dessen wahrscheinlich auch in den verwendeten Aufnahme-Mechanismen. Im Gegensatz dazu ist die durch Cycloheximid inhibierte Neusynthese eukaryotischer Proteine für die Phagozytose in Makrophagen nicht relevant (King *et al.*, 1991; Abu Kwaik *et al.*, 1994).

Interessanterweise resultierte die gleichzeitige Verwendung von Cytochalasin D und Cycloheximid in *A. castellanii* in einer weiteren Reduktion der Aufnahme um 10 %. Wie die Autoren um Venkataraman zeigen konnten, wird ein geringer Anteil der Phagozytoseleistungen auch in Amöben über „coiling“-Phagozytose“ bewerkstelligt, die in Makrophagen durch Cytochalasin D hemmbar ist (Venkataraman *et al.*, 1998). Aufgrund der bereits vorhandenen

Inhibition durch Cycloheximid und der zusätzlichen Applikation von Cytochalasin D können zuvor noch verfügbare alternative Wege der bakteriellen Aufnahme nun durch Cytochalasin D gehemmt werden, wodurch sich der zusätzliche Einfluss erklären lässt.

Die Verwendung von Methylamin, einem Inhibitor der adsorptiven Pinozytose bzw. der Rezeptor vermittelten Endozytose, führte zur vollständigen Inhibition der bakteriellen Aufnahme bei *H. vermiformis*, während die Phagozytose in *A. castellanii* bei Einsatz von maximalen Konzentration (200 mM) dagegen nur gering beeinflusst wurde. Methylamin inhibiert die plasmamembranständige Transglutaminase, ein Enzym, das an der Aggregation von Ligand-Rezeptor-Komplexen beteiligt ist und für die Rezeptor-vermittelte Pinozytose in Fibroblasten und Makrophagen benötigt wird (King *et al.*, 1991). Demnach bestätigen diese Ergebnisse ebenfalls die Rezeptor-abhängige Endozytose in *H. vermiformis*. Durch den geringen Einfluss den Methylamin auf die bakterielle Aufnahme in *A. castellanii* hat, ist es denkbar, dass die Phagozytose von *Legionella* in *A. castellanii* über andere Rezeptoren bzw. einen Rezeptor-unabhängigen Mechanismus verläuft. Dies bedeutet, dass *A. castellanii* wahrscheinlich mehr als nur einen Mechanismus für die bakterielle Aufnahme verwendet, während diese bei *H. vermiformis* ausschließlich auf Rezeptor-vermittelte Endozytose beschränkt ist. Diese Ergebnisse bestätigen die postulierte Heterogenität der Aufnahmemechanismen bei verwandten Protozoenwirten (Harb *et al.*, 1998). Durch die Verwendung weiterer Inhibitoren wie z.B. Wortmanin, Nocodazol oder Monodansylcadavarin könnten die an der Internalisierung von *Legionella* beteiligten Mechanismen bzw. Signalketten identifiziert werden.

Wie gezeigt werden konnte, spielt die Tyrosin-spezifische Protein-Phosphorylierung bei der bakteriellen Invasion von HeLa- bzw. Epithelzellen durch die intrazellulären Pathogene *C. trachomatis*, *Salmonella typhimurium*, *S. flexneri* und *L. monocytogenes* eine entscheidene Rolle (Rosenshine *et al.*, 1994; Birkelund *et al.*, 1994; Dehio *et al.*, 1995; Finlay & Cossart, 1997; Ireton & Cossart, 1998). Durch den Einsatz von Tyrosin-Kinase- und Protein-Kinase C-Inhibitoren konnte die Aufnahme von *Legionella* in Monozyten teilweise blockiert und somit auf eine Beteiligung dieser für die Aktin-Polymerisierung wichtigen Signalwege während der Phagozytose geschlossen werden. Die Veränderung des Protein-Phosphorylierungsmusters während der Phagozytose von Legionellen durch humane Monozyten ist jedoch nicht Virulenz-assoziiert, sondern vielmehr ein generelles Ereignis bei der CR3-Rezeptor-vermittelten Phagozytose (Coxon *et al.*, 1998). Auch die von Susa und Marre (1999) durchgeführten Experimente in nicht-professionell phagozytierenden (MRC-5) Epithelzellen lassen eine durch *Legionella* induzierte Phosphorylierung von Proteinen als nicht Virulenz-assoziiert gelten.

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Bindung („attachment“) von *L. pneumophila* an *H. vermiformis* eine reversible Tyrosin-Dephosphorylierung verschiedener Wirtszellproteine, wie Paxillin, pp125^{FAK} (Focal Adhesion Kinase), Vinculin und des bereits erwähnten 170 kDa großen Lektins, das Homologie zu den α 2-Integrinen aufweist, induziert (Venkataraman *et al.*, 1997, 1998). Integrine sind heterodimere Transmembran-Rezeptoren, die an der Signalübertragung von der extrazellulären zur zellulären Matrix beteiligt sind und durch Phosphorylierung aktiviert werden (Ireton & Cossart, 1998). Da die zytoskeletalen Proteine in nicht infizierten Hartmannellen phosphoryliert vorliegen, spekulieren die Autoren, dass durch die Tyrosin-Dephosphorylierung des Lektins und anderer zytoskeletaler Proteine eine durch das „attachment“ vermittelte lokale Desintegration des Zytoskeletts erfolgt, die die Invasion von *Legionella* ermöglicht (Venkataraman *et al.*, 1998). Unterstützt wird diese Hypothese durch den nicht vorhandenen Effekt von Cytochalasin D auf die bakterielle Aufnahme in *H. vermiformis*, *A. polyphaga* und *A. castellanii* (Gao *et al.*, 1997; Abu Kwaik *et al.*, 1998c; Venkataraman *et al.*, 1998; Harb *et al.*, 1998, Köhler *et al.*, 2000). Weiterhin postulierten die Autoren, dass die von *L. pneumophila* für die Invasion von Amöben eingesetzten Mechanismen verschieden von denen anderer intrazellulärer Pathogene bei der Invasion von eukaryotischen Wirtszellen verwendeten Mechanismen sind. Interessanterweise kann in diesem Zusammenhang für den bei *Yersinia* ssp. zu beobachtenden Mechanismus der Anti-Phagozytose, der eine Internalisierung verhindert, die durch YopH vermittelte Dephosphorylierung von p130^{Cas} und FAK (Focal Adhesion Kinase) beobachtet werden (Black & Bliska, 1997; Persson *et al.*, 1997; Ireton & Cossart, 1998).

Für den Mechanismus der bakteriellen Invasion werden zwei grundsätzliche Modelle, bezeichnet als Zipper- und Trigger-Mechanismen, diskutiert (Swanson & Baer, 1995). Im Zipper-Modell benötigt die Internalisierung von Partikeln bzw. Bakterien die kontinuierliche Interaktion zwischen Opsonin und Rezeptoren, wie für *Y. pseudotuberculosis* und *Listeria monocytogenes* gezeigt (Isberg *et al.*, 1996; Finlay & Cossart, 1997). Dagegen erlaubt das Trigger-Modell nach initialem Kontakt (trigger) die vollständige Ingestion der zu phagozytierenden Partikel bzw. Bakterien (Swanson & Bear, 1995). Die Autoren um Venkataraman postulieren für die Aufnahme von *L. pneumophila* in den Protozoen *H. vermiformis* einen Mechanismus nach dem Trigger-Modell, wie für *Salmonella typhimurium* und *Shigella flexneri* beobachtet (Finlay & Cossart, 1997; Ireton & Cossart, 1998; Venkataraman *et al.*, 1998). Für das Verständnis und die Aufklärung bakterieller Pathogenität und in diesem Zusammenhang der komplexen Interaktion von Legionellen mit ihren Wirtsorganismen bedarf es einer Analyse, die beide Seiten, Parasit und auch Wirt, mit einschließt. Die Verwendung der genetisch gut charakterisierten und manipulierbaren sozialen Amöbe *Dictyostelium discoideum* als Wirtsorganismus ermöglicht die

differenzierte Betrachtung und Aufklärung der an dieser Interaktion beteiligten Signalketten (Hägele *et al.*, 2000; Solomon *et al.*, 2000). So können z.B. *Dictyostelium*-Mutanten eingesetzt werden, die Mutationen im Zytoskelett besitzen, um den Einfluss einzelner Wirtszellproteine auf die Invasivität von *Legionella* zu untersuchen.

5.2 Mip::GFP-Fusionsproteine

Für die Induktion der durch Pathogene erzeugten zellulären Veränderungen ist oftmals die Sekretion von Effektormolekülen verantwortlich. Durch die Erzeugung einer translationalen Proteinfusion von Mip und GFP sollte das Monitoring einer eventuell stattfindenden Proteintranslokation von Mip innerhalb der Wirtszelle ermöglicht werden. Dazu wurden verschiedene C-terminale Fusionen erzeugt und in ihrer Stabilität und Funktionalität untersucht. In Westernblot-Analysen konnte keine ausreichende Stabilität der Fusionsproteine festgestellt werden. Neben einer Fusionsproteinbande ergaben sich zahlreiche Degradationsbanden. Die direkte C-terminale Fusion von Mip mit GFP sowohl mit und ohne GFP-Startcodon resultierte nicht in der gewünschten Proteinstabilität. Basierend auf Überlegungen, dass die Instabilität der Fusion durch eine sterische Behinderung beider Proteine während der Faltung begründet ist, wurde versucht, durch Insertion verschiedener kurzer Linkersequenzen (4-5 AS) die Flexibilität in diesem Bereich zu erhöhen, um die ungestörte Faltung beider Proteine zu ermöglichen. Obwohl diese Linkersequenzen bei der Konstruktion von Fusionsproteinen in *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* und *E. coli* erfolgreich verwendet wurden, ließen sich weiterhin, trotz Zusatz von Protease-Inhibitoren, starke Degradationsbanden in Westernblot-Analysen detektieren (Webb *et al.*, 1995; Lewis & Errington, 1996; Ma *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1998).

Für die Lokalisation von Mip ist bekannt, dass es über einen Typ II-Sekretion-vermittelten Transport ins Periplasma und zur äußeren Membran gelangt (Engleberg *et al.*, 1989). In Westernblot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die erzeugten Fusionsproteine beim Transport bzw. Processing über die Cytoplasmamembran hinweg degradiert und nicht dem nativen Mip analog lokalisiert und somit nicht funktionell sind. Als wahrscheinlich gilt in diesem Zusammenhang, dass aufgrund der Dimerisierung des Mip-Proteins die unabhängige Faltung beider Proteine nicht möglich ist und es so zur strukturellen Desintegrität der Fusionsproteine kommt. Nach Transformation von *L. pneumophila* JR32-2 mit dem Fusionsproteinvektor pRK78 konnte eine perlschnurartige Verteilung begrenzt konzentrierter GFP-Fluoreszenzen innerhalb des Bakteriums beobachtet werden. Dies ist wahrscheinlich auf die Bildung von „inclusion bodies“ zurückzuführen und spiegelt nicht die native Lokalisation des Mip-Proteins innerhalb des Bakteriums wieder. Für die cytoplasmatischen *E. coli* Proteine FtsZ, FtsA, ZipA, FtsK,

MinE, MinD und SeqA und die *Bacillus* Proteine SpoIVA und Pro- σ^E konnten funktionelle Fusionen mit GFP erzeugt und die Dynamik der Lokalisation bei der Septenbildung während der Zellteilung bzw. der Sporulation eindrucksvoll dokumentiert werden (Lewis & Errington, 1996; Ma *et al.*, 1996; Hale & de Boer, 1997, 1999; Ju *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 1998; Raskin & de Boer, 1999; Onogi *et al.*, 1999; Margolin, 2000). Auch die Fusion von YopE einem Aktin-Cytotoxin von *Yersinia*, mit GFP und dessen über Typ III-Sekretion-vermittelte Translokation in eukaryotische Zielzellen konnte nachgewiesen werden (Jacobi *et al.*, 1998). Fusionen von GFP mit dem gesamten YopE (219 AS) waren jedoch instabil, so dass maximal 138 Aminosäurereste C-terminal mit GFP fusioniert werden konnten (Jacobi, pers. Mitteilung). Auch die Menge des translozierten YopE-GFP-Fusionsprotein war geringer verglichen mit der des nativen YopE. Die Autoren spekulierten, dass aufgrund der Größe von GFP (24 Å x 42 Å) die Translokation durch das *Yersinia* YscC Sekretin (geschätzter Durchmesser ca. 50 Å) beeinträchtigt wird (Jacobi *et al.*, 1998).

Ein weiterer, die Stabilität des Mip::GFP-Fusionsprotein in *Legionella* beeinflussender Faktor könnte die hohe Kopienzahl des für die Fusion verwendeten high copy Plasmids pBC KS sein. Versuche, die Kopienzahl durch die Verwendung von mid- bzw. low copy-Plasmiden zu reduzieren oder die Mip::GFP-Fusionsproteinkonstrukte chromosomal zu integrieren, erwiesen sich als nicht praktikabel, da dies mit dem Verlust der Signalstärke verbunden war. Versuche einer N-terminalen Fusion von Mip und GFP, in der die von Mip stammende Signalsequenz zuerst vor GFP kloniert wurde, resultierten bereits bei diesem Schritt im völligen Verlust der GFP-vermittelten Fluoreszenz. Als wahrscheinlich gilt, dass aufgrund der besonderen Quartärstruktur von Mip (Homodimer) eine Fusion mit GFP nicht möglich ist. Darüber hinaus konnte bislang kein über die Cytoplasmamembran sekretiertes „full length“ Protein stabil mit GFP in Prokaryoten fusioniert werden.

5.3 Strukturelle und funktionale Charakteristika des *Legionella* Mip-Proteins

Das *Legionella* Mip (macrophage infectivity potentiator)-Protein gehört zur Enzymfamilie der FK506 bindenden Proteine und besitzt eine Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase)-Aktivität. PPIasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme und konnten bislang aus allen untersuchten Organismen und Geweben isoliert werden (Galat, 2000). Ihre *in vivo* Funktion ist allerdings weitgehend ungeklärt. Besonders die funktionale Aufklärung der in Prokaryoten entdeckten PPIasen ist unzureichend und bedarf einer genaueren Analyse. In der vorliegenden Arbeit wurden neue Einblicke für das Mip-Protein, einen für die Virulenz von Legionellen wichtigen Faktor, innerhalb verschiedener Modellsysteme gewonnen.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass für die Etablierung der vollständigen Virulenz von *L. pneumophila* in monozellulären Systemen (*Acanthamoeba*, U937-Zellen und Monozyten) die Isomerase-Aktivität des Mip-Proteins nicht notwendig ist (Wintermeyer *et al.*, 1995). In Experimenten von Schmidt *et al.* wurde das Mip-Protein auf der Legionellen-Oberfläche als Dimer detektiert (Schmidt *et al.*, 1994, 1995). Durch die erst kürzlich gelungene Aufklärung der Röntgenkristall-Struktur des *Legionella*-Mip-Proteins wurde seine homodimere Struktur bestätigt (Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2000). Die Dimerisierung des Proteins wird über nicht-kovalente Kontakte der Monomer-Untereinheiten innerhalb der N-terminalen Mip Domäne vermittelt. Die Teil-Deletion dieser Domäne führte zur Entstehung von Protein-Monomeren. Ein Einfluss der Monomerisierung auf die Isomerase-Aktivität des Mip-Proteins gegenüber Peptidsubstraten konnte dabei nicht festgestellt werden (Fanghänel, 1998). Durch die Erzeugung heterodimerer Mip-Proteine, die sich aus Wildtyp- und site-spezifisch veränderten Mip-Proteinen (Isomerase-Restaktivität 2%) zusammensetzten, konnte die funktionale Unabhängigkeit der sich gegenüberliegenden PPIase aktiven C-terminalen Domänen nachgewiesen werden (Schmidt, 1998).

Durch die in dieser Arbeit gelungene Komplementation eines Mip-negativen *Legionella*-Stammes mit monomerem Mip-Protein wurde die differenzierte Unterscheidung zwischen dem Einfluss der PPIase-Aktivität und der Homodimerisierung auf die Virulenz von *Legionella pneumophila* ermöglicht. Die *in cis*-Komplementation des Mip-negativen Genotyps mit monomerem Mip (*L.p.* JR32-2.4) schloss eine mögliche Vektor-Titration bei der Durchführung von Invasionsassays in *A. castellanii* aus. Die Ergebnisse bestätigten, dass die Isomerase-Aktivität im monozellulären System nicht benötigt wird. Eine Wiederherstellung wildtypischen Wachstumsverhalten konnte trotz vorhandener Isomerase-Aktivität nicht beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wurde in den von Wintermeyer *et al.* durchgeführten Versuchen eine vollständige Komplementation des Mip-negativen Phänotyps unabhängig der *in vitro* Isomerase-Restaktivität (2 - 6.2 %) beobachtet (Wintermeyer *et al.*, 1995). Darüber hinaus ist zu beachten, dass die Restaktivitäten, der durch site-spezifische Mutagenese erzeugten Mip-Proteinvarianten, *in vitro* bei 10°C und unter Verwendung von artifiziellen Oligopeptidsubstraten erhalten wurden. Untersuchungen, in denen die PPIase-Aktivität durch die Immunsuppressiva FK506 und Rapamycin gehemmt wurde, zeigten ebenfalls, dass die PPIase-Aktivität für das Infektionsgeschehen im monozellulären Modellsystem nicht notwendig ist (B. Bubert pers. Mitteilung; Fanghänel, 1998). Im Gegensatz dazu konnte durch Inhibitionsstudien eine Beteiligung der PPIase-Aktivität Mip homologer Proteine an der Infektiosität für *Trypanosoma cruzi* und *Chlamydia trachomatis* nachgewiesen werden (Lundemose *et al.*, 1993b; Moro *et al.*,

1995). In den Inhibitionsstudien und den von Wintermeyer *et al.* (1995) durchgeführten Experimenten kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Inhibition der Isomerase-Aktivität nicht vollständig verläuft bzw. die verbleibende Isomerase-Restaktivität ausreichend für die effiziente Invasion der Zielzellen ist. Wie Arbeiten von Helbig zeigten, resultierte eine Ko-Inkubation von Legionellen mit monoklonalen Anti-Mip Antikörpern, die im aktiven Zentrum des Mip-Proteins binden und die PPIase-Aktivität des Proteins hemmen, in einer reduzierten Invasion in *A. castellanii* (J. Helbig, pers. Mitteilung). Hierbei wird wahrscheinlich durch die Blockierung des aktiven Zentrums die Bindung eines möglichen Substrats vollständig verhindert, so dass ähnliche Effekte wie bei einer Mip-Deletion zu beobachten sind. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, wird obwohl die vollständige PPIase-Aktivität in einem monomeren Mip-Protein vorhanden ist, keine Komplementation des Mip-negativen Phänotyps in *A. castellanii* erreicht. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Aktivität monomeren Mip-Proteins gegenüber Proteinsubstraten in RNase T1-Rückfaltungsassays im Vergleich zum dimeren Mip-Protein extrem reduziert ist (J. Fanghänel, pers. Mitteilung). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die homodimere-Struktur des Proteins und nicht die Isomerase-Aktivität entscheidend für die Ausbildung der vollen Virulenz von *L. pneumophila* in *A. castellanii* ist.

Dimerisierungs- und Oligomerisierungsprozesse scheinen generelle Mechanismen für die Regulation zellulärer Prozesse zu sein. Der dimere Zustand des Mip-Proteins ist dabei als Ereignis innerhalb einer Signalkette durchaus vorstellbar. Generell werden extrazelluläre Signale durch Oberflächen-Rezeptoren aufgenommen und in Richtung Zellkern weitergeleitet. Für Zelloberflächen-Rezeptoren ist bekannt, dass sie erst durch eine Liganden-induzierte Dimerisierung aktiviert werden (Klemm *et al.*, 1998). Eines der häufigsten Dimerisierungs-Ereignisse innerhalb der Signaltransduktion ist die Dimerisierung von Transkriptionsfaktoren (Klemm *et al.*, 1998). Für den in *V. cholerae* an der Regulation von Virulenzgenen beteiligten Transkriptionsaktivator ToxR wird die Bildung von Homo- und Heterodimeren mit einem weiteren regulatorischen Protein, ToxS, beschrieben (Ottemann & Mekalanos, 1996). Weiterhin binden Hormone, Cytokine und Wachstumsfaktoren an Zelloberflächen-Rezeptoren, auch hier sind Dimerisierungsprozesse an der Signalübertragung sowohl extra- als auch intrazellulär beteiligt. Die aktive Form eines Rezeptors ist meist die eines Dimers, resultierend in einer Vergrößerung der Interaktionsoberfläche, wodurch eine effektivere Übertragung des Signals bzw. der Information erfolgen kann. Auch die Liganden selbst sind oftmals Dimere und besitzen somit mindestens zwei Oberflächen für eine effektive Rezeptor-Interaktion. Aufgrund der

homodimeren Mip-Struktur ist es wahrscheinlich, dass ein putatives Substrat ebenfalls symmetrisch aufgebaut ist (Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2000). Bis heute ist allerdings kein Substrat bzw. eukaryotischer Interaktionspartner für das *Legionella* Mip identifiziert wurden. Die Bedeutung der Protein-Dimerisierung für Virulenzprozesse wird für verschiedene Organismen beschrieben. OMPLA (outer membrane phospholipase A) ist ein integrales Membranprotein, das in *E. coli* an der Sekretion und in *Campylobacter* und *Helicobacter pylori*-Stämmen an der Virulenz beteiligt ist. Die Aktivität wird über eine reversibel verlaufende Dimerisierung des Proteins reguliert (Snijder *et al.*, 1999). Für das periplasmatische Protein HDEA wird eine Vermittlung bei der Säure-Toleranz bei pathogenen Enterobakterien (*Shigella* und *E. coli*) beschrieben. Die Aktivierung verläuft hier über einen pH-induzierten Dimer-Monomer Übergang, was zur Verhinderung der Aggregation Säure-denaturierter Proteine im Periplasma führt (Gajiwala & Burley, 2000). Der native Zustand des NS1-Proteins in Flaviviren ist der eines hitzelabilen Dimers. Durch Einführung einer singulären site-spezifischen Mutation wird die Dimerisierung unterbunden und das Virus ist deutlich attenuiert, in der frühen Replikation und der Virulenz im Mäusemodell (Hall *et al.*, 1999). Wie bereits erwähnt, konnten ähnliche Effekte eines nur noch monomeren Mip exprimierenden *Legionella* Stammes JR32-2.4 auf die intrazelluläre Vermehrung in *A. castellanii* festgestellt werden. Inwieweit hier das Fehlen des dimeren Zustands des Mip-Proteins regulatorische Signalwege beeinflusst, bleibt noch aufzuklären.

Neben dem dimeren Zustand ist auch die freie Zugänglichkeit des aktiven Zentrums des Mip-Proteins für die Virulenz wichtig, was, wie bereits erwähnt, durch die Blockierung mit monoklonalen Antikörpern gezeigt werden konnte (J. Helbig, pers. Mitteilung). In diesen Experimenten ist jedoch eine Unterscheidung zwischen der Beteiligung des aktiven Zentrums oder der Isomerase-Aktivität, an den zu beobachtenden Effekten nicht möglich. Dies wurde erst durch die Konstruktion und Expression der monomeren Mip-Proteinvariante in *Legionella* ermöglicht.

Die Entdeckung, dass bakterielle PPIasen katalytisch an der Proteinfaltung periplasmatischer und extracytoplasmatischer Proteine in *Enterobacteriaceae* wie *E. coli* beteiligt sind, ist ein erster Hinweis auf ihre *in vivo* Funktion und scheint ein wichtiges Kriterium ihres Wirkens zu sein (Missiakas *et al.*, 1996, 1997a,b; Dartigalongue *et al.*, 1998). Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die effiziente Faltung von mindestens drei Membranproteinen (OmpA, OmpF und LamB) durch die PPIase SurA katalysiert wird und dies zum Überleben von *E. coli* in der stationären Phase beiträgt (Lazar & Kolter, 1996; Lazar *et al.*, 1998). Die zusätzliche Deletion einer

weiteren PPIase, PpiD, war letal. Für beide PPIasen wird die Notwendigkeit der Isomerase-Aktivität postuliert (Dartigalongue *et al.*, 1998). Auch für das Mip-Protein wäre die Beteiligung an Proteinfaltungsprozessen im Periplasma durchaus vorstellbar. In diesem Zusammenhang konnte für die im Periplasma von *E. coli* lokalisierte Isomerase FkpA eine Chaparon-Aktivität festgestellt werden, die unabhängig der PPIase-Aktivität zu sein scheint (Ramm & Plückthun, 2000). Inwieweit auch das Mip-Protein eine mögliche Chaparon-Aktivität besitzt, die unabhängig der PPIase-Aktivität ist, kann zu diesem Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

Die Aufklärung der *in vivo* Funktion prokaryotischer PPIasen wird weiterhin durch eine teilweise funktionale Komplementation dieser Enzyme untereinander erschwert, wodurch eine Zuweisung der durch die Deletion verursachten Phänotypen nicht immer eindeutig ist. Die Existenz weiterer periplasmatischer PPIasen in *L. pneumophila*, die die Funktion von Mip komplementierend übernehmen, kann zur Zeit nicht ausgeschlossen werden. Versuche, eine vitale *mip*- und *lcy*- (cytoplasmatisches *Legionella*-Cyclophilin) Doppelmutante in *Legionella* zu konstruieren, blieben bis lang ohne Erfolg. Dies könnte durch eine eventuelle Letalität dieser Doppeldeletion, wie für die beiden PPIasen SurA und PpiD in *E. coli* gezeigt wurde, erklärt werden.

Die durch PPIasen katalysierten Prozesse zeigen eine duale biologische Rolle mit multiplen Funktionen. Auf der einen Seite katalysieren sie die Isomerisierung einer Peptid-Bindung, auf der anderen Seite sind sie an Prozessen der Signaltransduktion beteiligt (Bothmann & Plückthun, 2000). Die Notwendigkeit von PPIasen für Prozesse wie der Proteinfaltung, der zellulären Signaltransduktion und bei der Zellzyklus-Regulation (Mitose) wurden von verschiedenen Autoren beschrieben (Übersichten in: Göthel & Marahiel, 1999; Zhou *et al.*, 1999; Schiene & Fischer, 2000). Inwieweit hier die katalytischen Eigenschaften entscheidend sind, wird kontrovers diskutiert. Für die *E. coli* PPIase FkpA, das hFKBP52 und Cyp40 konnte ein Chaparon Effekt beobachtet werden, der unabhängig der PPIase-Aktivität der Proteine ist (Bose *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 1996; Ramm & Plückthun, 2000). Im Gegensatz dazu wird dem humanen Cyp18 im Zusammenhang mit einer neurogenerativen Erkrankung eine Beteiligung bei der Eliminierung der durch oxidativen Stress entstehenden, falsch gefalteten Proteinen zugeschrieben. Wie in Versuchen mit Isomerase-defizienten Proteinvarianten von Cyp18 (R55A) gezeigt werden konnte, wird die katalytische Aktivität von Cyp18 zur Erreichung des Wildtyp-Niveaus benötigt (Lee *et al.*, 1999). Auch für die essentielle humane PPIase Pin1, die mit hyperphosphorylierten τ -Protein komplexiert, wird die Notwendigkeit der PPIase-Aktivität für die Interaktion von Mikrotubuli mit diesem Komplex während der Mitose postuliert (Lu *et al.*,

1999). Bedingt durch die hohe Substratspezifität von Pin1 für phosphorylierte Ser/Thr-Probindungen kann die Isomerisierung dieser Peptidbindungen zu Strukturveränderungen innerhalb von Proteinen führen. Infolge dessen kann es zu Aktivitätsveränderung, Dephosphorylierung, Degradation oder Änderung der Lokalisation dieser Proteine innerhalb der Zellen kommen (Zhou *et al.*, 1999). Besonders interessant erscheint in diesem Zusammenhang die Phosphospezifität von Pin1 und ein damit verbundener neuer regulatorischer Signalweg.

Auch die Beteiligung prokaryotischer PPIasen an Prozessen, die zur Modulationen von Signalwegen innerhalb der Immunabwehr führen könnten, ist durchaus denkbar, konnte bislang jedoch nicht nachgewiesen werden. Durch die Verwendung monozellulärer Modellsysteme kann die immunologische Komplexität höherer Organismen nicht simuliert werden. Faktoren, die im monozellulären System keinen oder nur geringen Einfluss haben, können im Tiermodell durchaus entscheidend für die Pathogenität eines Erregers werden. Für das *Legionella* Mip-Protein kann eine duale Rolle seiner PPIase-Aktivität in Bezug auf die Notwendigkeit in monozellulären System und in höheren Organismen festgestellt werden. Im Vergleich zum monozellulären Modellsystem (*A. castellanii*) ist das intrazelluläre Überleben des Mip negativen Stamms *L.p.* PhilI JR32-2 im Tiermodell deutlich reduziert (Cianciotto, 1990b). Durch die *in cis* Komplementation einer Mip-Deletionsmutante mit monomerem Mip (*L.p.* PhilI JR32-2.4) lässt sich wildtypisches Wachstum im Protozoen-Modell nicht rekonstituieren, obwohl der Stamm vollständige Mip Isomerase-Aktivität besitzt. Im Gegensatz dazu erreicht der gleiche Stamm im Tiermodell CFU-Werte, die zwischen den Werten für Wildtyp und Mip-Deletionsmutante liegen. Demnach scheint die Isomerase-Aktivität des *Legionella* Mip-Proteins im Tiermodell benötigt zu werden, da zu mindestens eine Teilkomplementation des Mip negativen Phänotyps erreicht wird. Ein ähnlicher Effekt wie für Mip konnte für der Zink-Metalloprotease (*proA*) im *L. pneumophila* Stamm (AA200) beobachtet werden. Die Deletion hatte keinen Einfluss auf die Invasion und das intrazelluläre Überleben in *Acanthamoeba* und in Meerschweinchen-Makrophagen. Untersuchungen im Tiermodell (Meerschweinchen) zeigten jedoch eine drastische Reduktion der Virulenz (Moffat *et al.*, 1994). Einige der von Edelstein *et al.* (1999) unter Verwendung von STM („signature tagged mutagenesis“) generierten *Legionella*-Mutanten wiesen eine vollständige Vermehrungs-Defizienz im Tiermodell auf. Die intrazelluläre Vermehrung dieser Mutanten im Makrophagen-Modell war dabei nicht gestört. Auch die von Brieland *et al.* durchgeführten Untersuchungen konnten Unterschiede hinsichtlich der Virulenz von *Legionella*-Stämmen im Protozoen-Modell und bei der intrapulmunalen Vermehrung in A/J Mäusen aufzeigen (Brieland *et al.*, 1997a). Die Identifikation von Genloci wie z.B. *milA* (Macrophage-

Specific Infectivity Locus), die Vermehrungsdefekte in Makrophagen besitzen aber keine Bedeutung für die intrazelluläre Vermehrung in Protozoen haben, deuten auf Gene hin, die nur an der intrazellulären Replikation innerhalb von Makrophagen beteiligt sind (Gao *et al.*, 1998a; Harb & Abu Kwaik, 2000).

Somit kann es als wahrscheinlich gelten, dass auch enzymatische Funktionen, wie die PPIase-Aktivität des *Legionella* Mip-Proteins, die im monozellulären System keinen Einfluss auf die Pathogenität haben, durchaus Relevanz im Tiermodell besitzen können. Darüber hinaus wird deutlich, dass auch hier das Dimer die biologisch aktive Form des *Legionella* Mip-Proteins darstellt, da sonst eine vollständige Komplementation der reduzierten intrazellulären Vermehrung hätte statt finden müssen. Diese Ergebnisse werden durch die im Protozoenmodell für das intrazelluläre Überleben ebenfalls notwendigen dimeren Zustand des Mip-Proteins bestätigt.

Ein möglicher Wirkmechanismus für das Mip-Protein wäre die Konkurrenz mit Wirtszell-PPIasen, um putative Interaktionspartner. Aufgrund seiner homodimeren Struktur könnte das *Legionella* Mip einen entropischen Vorteil gegenüber den vorwiegend als Monomer vorliegenden zellulären PPIasen besitzen und so bevorzugt mit dem putativen Substrat interagieren und entsprechende Modulationen induzieren (Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2000). Wie bereits erwähnt, zeigen Daten im RNase T1-Rückfaltungssassay eine für das monomere Mip-Protein extrem reduzierte Aktivität gegenüber Proteinsubstraten. Die Werte sind den für andere als Monomer beschriebenen PPIasen (hFRKBP12) vergleichbar (J. Fanghänel, pers. Mitteilung). Wahrscheinlich kommt es aufgrund der monomeren Mip-Struktur nur zu einer unvollständigen Substratbindung und so zum Verlust des entropischen Vorteils gegenüber den zellulären PPIasen des Wirtsorganismus. Dies würde die Zwischenposition bei der intrazellulären Vermehrung im Tiermodell erklären. Für die Beteiligung der Isomerase-Aktivität am Infektionsgeschehen innerhalb des Tiermodells sprechen auch die unterschiedlichen Zellzahlen, die von *Legionella*-Stämmen erreicht werden, die sich hinsichtlich ihrer *in vitro* Isomerase-Restaktivität unterscheiden. Eine Isomerase-Restaktivität von nur 2% ist demnach ausreichend, um im Vergleich zu einer Mip-Deletionsmutante eine 10-fach höhere Zellzahl im Tiermodell zu erreichen. Mit 6% Restaktivität wird nahezu wildtypisches Wachstum rekonstituiert. Durch den Einsatz eines Tiermodells, das verschiedene Zelltypen und über eine effektive Immunabwehr (Antikörper, Komplement, Interleukine, Interferone, Makrophagen und natürliche Killerzellen) verfügt, wurden wesentlich restriktivere Bedingungen für die intrazelluläre Vermehrung von *Legionella*, im Vergleich zum Protozoen-Modell, geschaffen. Unter diesen Bedingungen kann

die durch Mip katalysierte Isomerisierung einer Prolin-Peptidbindung zu einem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt und damit für die intrazelluläre Etablierung und das Überleben von *L. pneumophila* im Tier wichtig werden.

Neben der Annahme, dass die Entwicklung einer Legionellose primär auf die intrazelluläre Replikation innerhalb alveolarer Makrophagen also phagozytischer Zellen zurückzuführen ist, wurde die Fähigkeit von *Legionella* beschrieben, sich auch intrazellulär innerhalb nicht phagozytischer Epithelzellen wie HEp-2-, Vero- und HeLa-Zellen zu replizieren (Mody et al., 1993, Maruta et al., 1998; Garduño et al., 1998c). Hierüber könnte ein Alternativweg der Etablierung einer *Legionella*-Infektion verlaufen. Daten von Cianciotto et al. deuten auf die Beteiligung des Mip-Proteins an der Invasion und effizienten intrazellulären Replikation innerhalb epithelialer Zellen des Typs I und II hin (Cianciotto et al., 1995b). Durch das Vorhandensein nicht-phagozytischer Zellen als putativer Replikationsorte können zuvor nicht benötigte Eigenschaften von Virulenzfaktoren wie z.B. die Isomerase-Aktivität des Mip-Proteins entscheidend zum intrazellulären Überleben beitragen. Über die *in vivo* Funktion von PPIasen intrazellulärer Pathogene wie dem Mip-Protein kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Die periplasmatische bzw. Oberflächen-Lokalisation des Enzyms und seine dimere Struktur rechtfertigen eine mögliche Beteiligung an der Aktivierung von Virulenzfaktoren im Periplasma oder sogar eine direkte Modulation eukaryotischer Wirtsproteine.

5.4 Untersuchungen zur Dimerisierung des Mip-Proteins mittels site-spezifischer Mutagenese

Die durch die Röntgenkristallstrukturanalyse aufgeklärte Struktur zeigte (vgl. Abb. 3), dass das Mip-Protein aus einer C- und N-terminalen Domäne besteht, die über eine lange α -Helix miteinander verbunden sind. Die Dimerisierung des Mip-Proteins wird dabei über nicht kovalente Kontakte der α -Helices $\alpha 1$ und $\alpha 2$ innerhalb der N-terminalen Domäne der jeweiligen Monomer-Untereinheiten bewerkstelligt (vgl. Abb 39). Durch die N-terminale Deletion im monomeren Mip (*L.p.*FKBP_(-20-4,- 80-213)), die die Aminosäuren 5-79 umfasst, wurde zusätzlich ein Teil der langen α -Helix ($\alpha 3$) deletiert. Inwiefern noch andere Funktionen über die N-terminale Domäne des Proteins vermittelt werden, kann bislang nicht beantwortet werden. Aus diesen Gründen sollte versucht werden, die an der Dimerisierung beteiligten Aminosäuren gezielt auszutauschen, dadurch die Dimerisierung des Proteins zu verhindern und Erkenntnisse über die Dimerisierungsdynamik zu erhalten, bzw. einen Einfluss der deletierten N-terminalen Domäne auf die Virulenz auszuschließen. Durch die Röntgenkristallstrukturanalyse des

Legionella-Mip-Proteins war es möglich, die atomaren Abstände der im N-Terminus lokalisierten Aminosäuren zueinander zu bestimmen. Dabei wurden Abstände im Bereich von ca. 3 Å als putativ wechselwirkend eingestuft.

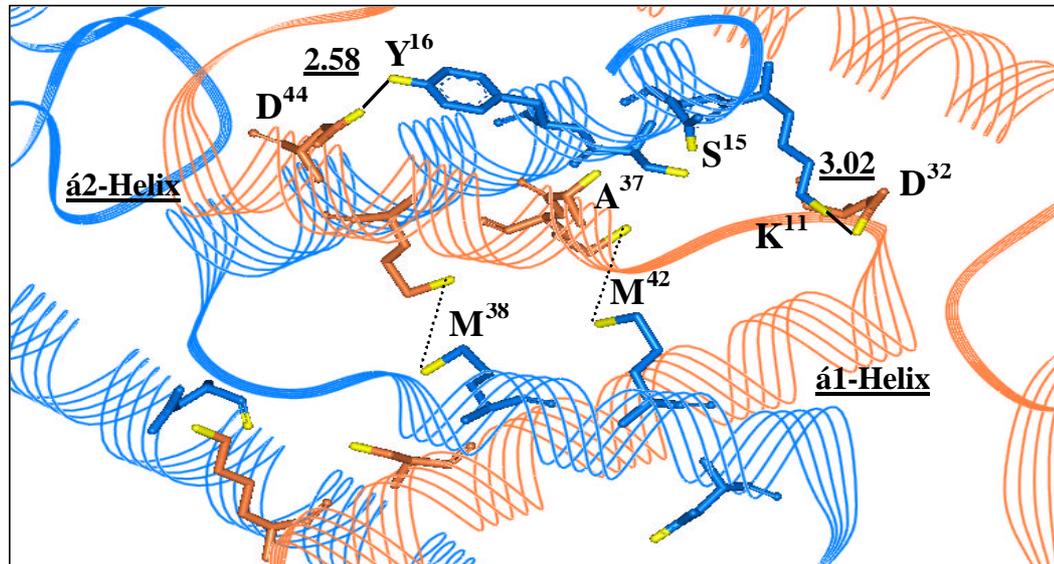


Abb.39): Modell der Röntgenkristallstruktur des *Legionella* Mip-Proteins. Gezeigt ist eine Detailansicht aus der N-terminalen Dimerisierungsregion („Helix-bundle“). Aminosäuren, die durch site-spezifische Mutagenese ausgetauscht wurden, sind gekennzeichnet und die Abstände der funktionalen Gruppen zueinander sind in Å angegeben. Die Monomer-Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$ -Helix) des Proteins sind jeweils in blau bzw. rot gekennzeichnet. Die Aminosäurereste M^{38} und M^{42} der jeweiligen Untereinheit bilden den sogenannten „Methioninzipper“.

Die singulären Austausche $M^{42}A$, $S^{15}A$ und $A^{37}F$ resultierten nicht in einer Destabilisierung des Mip-Proteins und hatten auch keinen meßbaren Einfluss auf die Dimerisierung. Die Proteinvarianten $S^{15}A$ und $A^{37}F$ und $M^{38,42}A$ werden weiterhin stabil in *E. coli* exprimiert und zeigten in Quervernetzungs-Experimenten eine Dimer-Bande. Röntgenkristallstrukturanalysen der Varianten $S^{15}A$ und $A^{37}F$ lassen ebenfalls keinen Effekt auf die Struktur erkennen (A. Vogel, pers. Mitteilung). Die Methioninreste an Position 38 und 42, die jeweils mit den Methioninresten an Position 42 und 38 der entsprechenden antiparallel verlaufenden $\alpha 2$ -Helix des anderen Monomers interagieren, bilden den sogenannten „Methioninzipper“, dessen Hydrophobizität wesentlich zur Dimerisierung beiträgt. Die Methionine wurden zuerst durch die hydrophobe AS Alanin ausgetauscht, aufgrund der verkürzten aliphatischen Seitenketten sollten die hydrophoben Kräfte innerhalb des Dimerisierungs-„Interface“ geschwächt werden. Ein Einfluss dieser Mutation auf die Dimerisierung konnte unter den Testbedingungen jedoch nicht festgestellt werden. Darüber hinaus wird durch den weit unterhalb des nanomolaren Bereiches liegenden

K_D -Wertes (Dissoziationskonstante) des Mip-Proteins die außergewöhnliche Stabilität des Dimers evident (Schmidt, 1998; Riboldi-Tunncliffe *et al.*, 2000).

Neben hydrophoben Wechselwirkungen sind auch polare Interaktionen wie Ionenbindungen und Wasserstoffbrücken an der Positionierung der α -Helices innerhalb der N-terminalen Domäne beteiligt. Durch die Einführung der zweifachen site-spezifischen Mutation $K^{11}A/D^{32}A$ werden die unterschiedlichen Polaritäten, der sich in den α -Helices $\alpha 1$ bzw. $\alpha 2$ der jeweiligen Monomer-Untereinheiten gegenüberliegenden basischen AS Lysin 11 und der sauren AS Aspartat 32 gegen die aliphatische, ungeladene Seitenkette der AS Alanin ausgetauscht. Die durch die Wegnahme des Ladungsunterschiedes verursachte Destabilisierung des Proteins führte vorwiegend zur Bildung stabiler N-terminaler Fragmente, die hauptsächlich die AS 1-106, 1-108 und 1-113 des reifen Proteins umfassten. In diesem Zusammenhang wäre es denkbar, dass durch die Einführung der Mutation $K^{11}A/D^{32}A$ die Position der langen $\alpha 3$ -Helix (*vgl.* Abb. 3), die wahrscheinlich für die Stabilisierung der C-terminalen Domäne wichtig ist, verändert wird und es so zur proteolytischen Degradation des C-terminalen Proteinfragments während der Aufreinigung kommt. Versuche, ein stabiles C-terminales Fragment beginnend bei AS 107 des reifen Mip-Proteins zu konstruieren waren nicht erfolgreich (Schmidt, 1998). Darüber hinaus wird durch die Konstruktion der N-terminalen Proteinvariante *L.p.FKBP25*_(-20-3, 80-213) deutlich, dass wahrscheinlich erst Fragmente, die einschließlich der AS 80 beginnen eine stabile Konformation einnehmen. Die N-terminalen Fragmente der Variante $K^{11}A/D^{32}A$ zeigten auch weiterhin eine Dimerisierung im Quervernetzungsansatz bei mikromolaren Konzentrationen.

Im Gegensatz dazu resultierte die Einführung der zweifachen Mutation $Y^{16}A/D^{44}A$ in der Entstehung vorwiegend C-terminaler Fragmente. Die Fragmente beginnen mit den AS 71-74 des prozessierten Mip-Proteins und entsprechen damit ungefähr dem durch N-terminale Deletion erzeugten monomeren Mip-Protein. Gelfiltrationsanalysen zeigten, dass diese Fragmente als Monomere eluieren. Hieraus wird ebenfalls deutlich, dass die Dimerisierung des Mip-Proteins ausschließlich über die N-terminale Domäne erfolgt. Weiterhin bestätigten diese Ergebnisse, dass die C-terminale Domäne wahrscheinlich einen Teilbereich der Helix $\alpha 3$ (AS 80-113) zur konformationalen Stabilität benötigt. Wie bereits erwähnt, sind hydrophobe Kräfte innerhalb der N-terminalen Domäne maßgeblich an der Stabilität des dimeren Zustands des Mip-Proteins beteiligt. Deshalb wurde versucht durch die Einführung der sauren Aminosäure Glutamat an Position 38 und 42 („Methioninzipper“) innerhalb der antiparallel verlaufenden $\alpha 2$ -Helices, eine Abstoßung dieser Reste aufgrund der stark negativen Ladung der endständigen α -Carboxylgruppe und damit eine Destabilisierung des Dimers zu erreichen. Im Gegensatz zu den site-spezifischen Mutanten $K^{11}A/D^{32}A$ und $Y^{16}A/D^{44}A$ ist der Anteil an „full length“-Protein für

diese Variante wesentlich größer, was besonders interessant im Hinblick auf eine mögliche Dimerisierungsdefizienz dieser Proteinvariante im intakten Protein ist. Die N-terminale Sequenzanalyse sowie Gelfiltrationsexperimente, die den Einfluss dieser Mutationen auf die Dimerisierung des Mip-Proteins bewerten, stehen noch aus.

Durch die eingeführten Mutationen und deren Effekt auf die Proteinstabilität des Mip-Proteins konnte ihre Beteiligung an der Dimerisierung nachgewiesen werden. Aufgrund der strukturellen Besonderheiten (Helix-bundle) der N-terminalen Mip-Domäne und der darin beteiligten multiplen Wechselwirkungen war es nicht zu erwarten, dass die Einführung einer Punktmutation zur vollständigen Dimerisierungsdefizienz führen würde, wie es für die Triose-Phosphatisomerase gezeigt werden konnte (Borchert *et al.*, 1995; Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2000). Für das *E. coli* FKBP22 konnte ebenfalls ein dimerer Zustand des Proteins nachgewiesen werden (Rahfeld *et al.*, 1996). Sequenzanalysen der N-terminalen Bereiche Mip-homologer FKBP anderer prokaryotischer Pathogene, die ebenfalls stark α -helicale Bereiche aufweisen, lässt vermuten, dass sie ebenfalls Dimere sind und dies ein wichtiges Kriterium ihres Wirkens ist (Rahfeld *et al.*, 1996). Nach Protein-Datenbank-Suche ist die Struktur des *Legionella* Mip-Proteins, mit der N-terminalen Dimerisierungsdomäne, den vier ineinandergreifenden Helices (vgl. Abb. 39) und der daraus resultierenden Homodimeren-Proteinkonformation bislang einzigartig (Riboldi-Tunnicliffe *et al.*, 2000).

5.5 Detektion eines putativen Interaktionspartners

Zur Aufklärung der *in vivo*-Funktion von PPIasen wurde versucht, putative Substrate bzw. Interaktionspartner mittels verschiedener Techniken, wie dem Yeast-Two-Hybrid-System, Koreinigung bzw. Immunpräzipitation und Affinitätschromatographie, zu identifizieren und dadurch Hinweise auf beteiligte Signalwege zu erhalten. Für das hFKBP12 konnte eine Reihe von Interaktionspartnern und damit beteiligte Signalwege innerhalb verschiedener Organismen identifiziert werden. Als Beispiele für Interaktionspartner seien hier die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinphosphatase Calcineurin, die Aspartokinase, der IP3- und Ryanodin-Rezeptor Typ I sowie der TGF- β -Rezeptor Typ I genannt (Cardenas *et al.*, 1994; Cameron *et al.*, 1995; Brillantes *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996; Alarcon & Heitman, 1997; Dolinski *et al.*, 1999).

Durch Quervernetzung und Immunpräzipitation konnte in dieser Arbeit erstmals ein putativer bakterieller Interaktionspartner des *Legionella* Mip-Proteins detektiert werden. Der dabei verwendete Quervernetzer DMP verbindet kovalent primäre Amine über eine maximale Distanz von ca. 9 Å. Demnach ist es denkbar, dass auch N-terminale Bereiche des Mip-Proteins miteinander kovalent verbunden wurden und die detektierte Bande bei 30 kDa nur aus Mip-

Protein besteht. Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da es sonst zur Detektion der restlichen Mip-Fragmente (C-terminal) im Westernblot hätte kommen müssen. Unter den gewählten Testbedingungen konnte dies jedoch nie beobachtet werden. Es wurden jeweils nur die Mip-Monomer bzw. -Dimer und eine zusätzliche 30 kDa Bande als diskrete Banden detektiert. Versuche, die N-terminale Sequenz des Interaktionspartners zu bestimmen, blieben jedoch ohne Erfolg. Neben der N-terminalen Sequenz für das *Legionella* Mip-Protein wurde ein schwacher Hintergrund anderer Aminosäuren identifiziert, dessen randomisierte Sequenzanalyse keinerlei Hinweise auf bekannte Aminosäuresequenzen lieferte. Die Gründe hierfür könnten in einer N-terminalen Blockierung liegen. Als wahrscheinlich gilt auch, dass die Interaktion vorwiegend auf eine räumlich nahe Lokalisierung und nicht auf eine enzymatische Reaktion von Mip und des putativen Interaktionspartners zurückzuführen ist. Bei dem putativen Interaktionspartner könnte es sich um ein kleines Membran-assoziiertes Protein handeln. Überlegungen hinsichtlich der Funktion dieses Proteins wären zu diesem Zeitpunkt rein spekulativ. Die Aufklärung funktionaler Zusammenhänge bakterieller PPIasen von intrazellulären Pathogenen wie *Legionella pneumophila* und deren putativen Zielmolekülen bzw. Substraten innerhalb ihrer Wirtsorganismen steht erst am Anfang der Erforschung.