# Universität Ulm

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Prof. Dr. Peter Gierschick

# Charakterisierung des zellulären Transports His-markierter Proteine über das PA-Transportsystem

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

2019

Josefine Fischer

geboren in Halberstadt

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

- 1. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Barth
- 2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Barth

Tag der Promotion: 07.06.2019

# I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Abkürzungsverzeichnis	. III
1. Einleitung	1
1.1 AB-Toxine	2
1.2 Weitere Toxine	5
1.3 Ziel dieser Arbeit	6
2. Material und Methoden	8
2.1 Material	8
2.1.1 Geräte	8
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	9
2.1.3 Chemikalien	. 11
2.1.4 Zelllinien und Bakterienstämme	15
2.1.5 Plasmide	15
2.1.6 Antikörper	16
2.1.7 Computerprogramme	16
2.1.8 Puffer	17
2.2 Methoden	. 18
2.2.1 Passagieren von Zellen	. 18
2.2.2 Aufreinigung von His-PTS1 (C180)	19
2.2.3 Aktivitätsassay	24
2.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford	. 26
2.2.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26

2.2.6 Proteinfärbung nach Coomassie	. 28
2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach SDS-PAGE	28
2.2.8 Westernblot	29
2.2.9 Immunoblot	29
2.2.10 Vergiftungsexperimente	. 31
2.2.11 Bindungsassay	. 32
2.2.12 Kompetitionsassay	. 33
2.2.13 Immunfluoreszensmikroskopie	. 33
3. Ergebnisse	35
3.1 Aufreinigung von His-PTS1 (C180)	. 35
3.2 Vergiftungsexperimente	. 42
3.3 Bindungsassay	. 49
3.4 Kompetitionsassay	. 50
3.5 Immunfluorenszenzmikroskopie	. 51
4. Diskussion	. 53
5. Zusammenfassung	58
6. Literaturverzeichnis	59

I. Danksagung	V
V. Lebenslauf	/I

# II. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
АТР	Adenosintriphosphat
B. anthracis	Bacillus anthracis
B. cereus	Bacillus cereus
B. pertussis	Bordetella pertussis
BSA	Bovines Serumalbumin
C3bot1E174Q	enzymatisch inaktives C3-Toxin von C. botulinum
C3mPA	C3-Toxin von <i>C. botulinum,</i> an ein mutiertes PA gekoppelt
сАМР	cyclisches Adenosinmonophosphat
C. botulinum	Clostridium botulinum
СНО	Chinese hamster ovary
C. limosum	Clostridium limosum
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTA	Diphtherietoxin A
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EF	Ödemfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum
G	Gravitation
GTP	Guanosintriphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein III

His	Histidin
His-PTS1	His-markierte S1-Untereinheit des Pertussistoxins
HRP	Horseradish Peroxidase
HSP90	Heat Shock Protein 90
lgG	Immunglobulin G
IMAC	Immobilized metal-affinity chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid
LB	Lysogeny Broth
LF	Letalfaktor
МАРКК	Mitogen-activated-protein-Kinase-Kinase
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NTA	Nitrilotriessigsäure
РА	Protektives Antigen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PBS-T	Phosphate buffered saline + 0,1 % Tween-20
PFA	Paraformaldehyd
РТ	Pertussistoxin
rpm	rounds per minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
Strep-POD	Streptavidin-Peroxidase

# 1. Einleitung

Bakterientoxine spielen seit langer Zeit eine lebensbedrohliche Rolle im Dasein von Menschen und Tieren. Schon in der Bibel wurden Krankheiten erwähnt, welche wahrscheinlich durch toxinbildende Bakterien ausgelöst wurden (Schwartz, 2009). Während des zweiten Weltkrieges experimentierten die Engländer mit Sporen eines Bakteriums auf einer schottischen Insel mit der Idee einer bakteriologischen Kriegsführung. Jahrzehntelang war diese Insel unbewohnbar. Bis heute hört man immer wieder von diesem Erreger als potentielle biologische Waffe. So auch 2001 als Briefe, die Bakteriensporen enthielten, an verschiedene Regierungsbeamte und Nachrichtensender verschickt wurden. Damals starben 5 Menschen (Klingst, Zeit, 2008).

Die Rede ist von *Bacillus anthracis*. Die Krankheiten, die es auslöst, wie Lungen- und Darmmilzbrand, waren früher fast immer tödlich und enden auch heute noch zur Hälfte letal (Duale Reihe: Medizinische Mikrobiologie, 2009).

Trotz der schädlichen Wirkung und der potentiellen Gefahr sind Wissenschaftler auf die Idee gekommen, die komplexe Wirkweise der Toxine im Positiven zu nutzen. So ist die Überlegung, diese Toxine in einer Art zu verändern, dass sie statt eines krankheitserregenden Teils ihres Toxins ganz andere Moleküle in das Innere ihrer Zielzellen transportieren. Man könnte es sich wie ein trojanisches Pferd vorstellen. Das Toxin muss so verändert werden, dass es nicht mehr schädlich ist. Es soll nur noch als Transporter für ein anderes Molekül dienen, welches es dann an den Ort bringt, an dem es sonst seine krankheitsauslösende Untereinheit ablädt. Das Molekül könnte so in die Lage versetzt werden, die Funktion der betroffenen Zelle zu beeinflussen. Würde man nun einen gesamten Organismus betrachten, wäre es vorstellbar, Krankheitsverläufe positiv zu modifizieren. Ein Beispiel wäre Immunzellen in ihrer Funktion zu hemmen und somit bei Autoimmunprozessen die Entzündungsreaktion milder ausfallen zu lassen.

Ein weiteres Anwendungsgebiet ist schon heute die Onkologie. Hier ist jedoch das Ziel, die jeweiligen Zellen zu schädigen und zwar die Tumorzellen. Dabei wurden bereits erste Erfolge erzielt z. B. beim kutanen T-Zell-Lymphom. Fuentes et al. konnten 2015 in einer Fallbeschreibung von drei verschiedenen Personen eine

1

erfolgreiche Erhaltungstherapie mit an Interleukin-2 gekoppeltem Diphterietoxin, ebenso ein AB-Toxin, vorstellen. Die Theorie dahinter besagt, dass ein an Interleukin-2 gekoppeltes Diphterietoxin an den Interleukin-2-Rezeptor auf betroffenen Lymphozyten bindet und endozytiert wird. Intrazellulär verändert es als ADP-Ribosyltransferase den Elongationsfaktor-2 und hemmt dadurch die Proteinsynthese. Die Behandlung führte zu einem vielfach längeren Überleben der behandelten Personen als es bisher mit herkömmlichen Chemotherapieschemata (z. B. CHOP-Cyclophosphamid, Hydroxydaunorubicin, Vincristin, Prednisolon) möglich war.

Die Idee des trojanischen Pferdes wird in dieser Arbeit aufgegriffen. Es existiert bereits eine Mutante des Anthraxtoxins, welche in ihrer Rezeptorspezifität verändert wurde, sodass sie an Monozyten und Makrophagen bindet. Diese Mutante soll in dieser Arbeit darauf untersucht werden, ob sie andere Moleküle in die genannten Zellen transportieren kann. Sie nennt sich C3E174QmPA (C3mPA).

#### **1.1 AB-Toxine**

AB-Toxine sind Pathogenitätsfaktoren, die von Bakterien wie *Bacillus anthracis*, aber auch von *Clostridium botulinum* und *Bordetella pertussis* produziert werden. Die Toxine dieser drei Vertreter der AB-Toxin-produzierenden Bakterien sind wichtiger Bestandteil dieser Arbeit und werden weiter unten noch spezifischer aufgeführt.

Wie der Name sagt, bestehen AB-Toxine aus zwei Teilen. Die A-Untereinheit entspricht dem enzymatischen Teil, der spezifische Substrate innerhalb der Zielzelle verändert und damit auch ihre Funktion beeinflusst. Die B-Untereinheit vermittelt die Bindung an die Zielzelle und die Translokation der enzymatischen Komponente in die Zelle (Barth et al. 2004). Bevor die Komponenten an eine Zelle binden, liegen sie meist von einander gelöst vor. Außerdem muss die B-Einheit zuerst proteolytisch gespalten werden. Dies kann gelöst oder bereits an die Zelle gebunden geschehen. Dabei besitzen die Zielzellen einen bestimmten Rezeptor, an den die B-Einheit bindet. Ist dies geschehen, formt sich eine B-Einheit mit mehreren anderen zusammen zu einer Präpore, an die sich nun A-Untereinheiten anlagern können. Dieser gesamte Komplex wird in die Zelle endozytiert. Bei *C. botulinum* und *B. anthracis* wird das jeweilige Toxin in Endosomen aufgenommen. Wird das Innere des Endosoms angesäuert, formt sich die Präpore zur Pore und kann eine oder mehrere A-Untereinheiten ins Zytosol transportieren. Dies wird als "Short-Trip" bezeichnet (siehe Abb. 1).



Abb. 1: Schematische Darstellung der Internalisierung von AB-Toxinen am Beispiel von Anthrax-Toxin. Protektives Antigen (PA83) wird gespalten und der größere Teil des Proteins (PA63) bindet an die Antrax-Rezeptoren ANTXR1 und ANTXR2 (türkiser Halbkreis) an der Zelloberfläche (hellblauer Balken). Daraufhin lagern sich sieben weitere PA63 an und bilden so als Heptamer die Präpore, an die sich die A-Komponenten (hier nur Letalfaktor (LF) gezeigt) anlagern können. Der Komplex wird internalisiert und befindet sich nun in einem Endosom (weißer Kreis). Dieses wird über Protonenpumpen angesäuert, wodurch die Präpore sich zur Pore formt und die A-Komponente in das Zytosol (blaugraue Fläche) schleust.

Das Pertussis-Toxin (PT) dagegen beschreitet den sogenannten "Long-Trip". Es wird retrograd über den Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum (ER) bis ins Zytosol transportiert (Locht et al. 2011). Dort angekommen können die Enzymuntereinheiten der Toxine ihre jeweilige Enzymaktivität entfalten.

#### Anthrax-Toxin von B. anthracis

Das Anthrax-Toxin besitzt zwei Besonderheiten (Barth et al. 2004). Zum einen umfasst die A-Untereinheit zwei verschiedene Proteine, zum anderen kann die B-Untereinheit einmal vor der Bindung an die Zielzelle gespalten werden (wie bei anderen AB-Toxinen), aber auch nach der Bindung durch zellgebundene FurinProteasen. Die bindende Untereinheit des Anthrax-Toxins ist das Protektive Antigen (PA). Letalfaktor (LF) oder Ödemfaktor (EF) entsprechen der A-Komponente. PA kann demnach zwei verschiedene Proteine binden und ins Zytosol transportieren. LF spaltet dort verschiedene Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase-Kinasen (MAPKK) und inaktiviert sie, was u. a. zur Ausschüttung von Zytokinen und letztendlich zur Zelllyse führt. EF dagegen ist nicht letal für die betroffene Zelle. Es bindet an Calmodulin, was zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und damit zu einem Anstieg des zellulären zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) führt. Sind Leukozyten betroffen, wird dadurch die Proliferation und Phagozytose gehemmt, sowie die Sezernierung von Zytokinen getriggert.

#### C2-Toxin von C. botulinum

Das C2-Toxin gehört zu den von *C. botulinum* produzierten Toxinen, vermittelt jedoch im Gegensatz zu einigen anderen clostridialen Toxinen keinen neurotoxischen Effekt. Es kann stattdessen Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts, Nekrosen, Hämorrhagie, sowie Ödeme von Lunge und Darm bewirken (Barth et al. 2004). Die A-Untereinheit wird hier C2I genannt und bewirkt eine ADP-Ribosylierung von Aktin. Die Aktin-Polymerisation wird hierdurch gestört, was zu Veränderung der Zellmorphologie, Zellfunktion und letztendlich zum Zelltod führt. Die B-Untereinheit heißt hier C2II.

#### Pertussis-Toxin von B. pertussis

PT unterscheidet sich in einigen Punkten von den typischen AB-Toxinen, wie dem Anthrax-Toxin und C2. Zum einen besitzt es keinen spezifischen Rezeptor an der Zelloberfläche, sondern kann an verschiedene Strukturen, wie Glykoproteine oder -lipide binden. Die Bindung wird durch den B-Pentamer vermittelt, welcher aus S2, S3, zweimal S4 und S5 besteht. Es erfolgt ein retrograder Transport zum Golgi-Apparat und zum ER. Im ER dissoziiert die S1-Untereinheit (PTS1) vom B-Komplex durch die Bindung von ATP und die Spaltung von Disulfid-Brücken (Locht et al. 2011). Ein weiterer Unterschied ist, dass der folgende Transport ins Zytosol unabhängig vom B-Heptamer stattfindet. РТ besitzt somit keine Translokationseinheit wie andere AB-Toxine. Ziele der S1-Untereinheit sind verschiedene Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine), die durch das bakterielle Enzym ADP-ribosyliert und damit inhibiert werden. Dadurch kann das G-Protein die Adenylatzyklase nicht mehr inhibieren, was zu erhöhten cAMP-Spiegeln führt. PT stört so intrazelluläre Prozesse, was unter anderem zu einer Modulation der Immunantwort des betroffenen Organismus führt. Es hemmt z.B. die Migration von Makrophagen (Brito et al. 1997). Orozco-Morales et al. (2011) konnten beobachten, dass bei einer mit PT behandelten Rattenpopulation mit Glia-Tumoren ein Rückgang des Tumorvolumens sowie von u. a. CD4-positiven Zellen zu verzeichnen war.

#### 1.2 Weitere in dieser Arbeit benutzte Toxine

Zwei weitere Toxine wurden hier genutzt, welche nicht zu den AB-Toxinen gehören. Beim C3-Toxin konnte man auch mit Strukturanalysen bisher keine Bindungs- oder Translokationsdomäne finden. Das Tc-Toxin dagegen besteht nicht nur aus den Komponenten A und B, sondern besitzt noch eine Dritte, die C-Komponente.

#### C3-Toxin

C3 wird von *C. botulinum, C. limosum, B. cereus* sowie *Staphylokokkus aureus* sezerniert. Der Aufnahmemechanismus in Zellen ist bis heute nicht bekannt. Da C3 erst in hoher Konzentration und unter langer Inkubationszeit von verschiedenen Zelltypen aufgenommen wird, wurde vermutet, dass es durch unspezifische Pinozytose internalisiert wird. 2010 konnten Fahrer et al. zeigen, dass wahrscheinlich Monozyten und Makrophagen das primäre Ziel für das C3-Toxin sind, da es in diese Zelllinien viel effektiver aufgenommen wird. Die Arbeitsgruppe um Fahrer vermutet hierbei eine spezifische Endozytose als Aufnahmemechanismus, ähnlich der von AB-Toxinen, da sie weiterhin zeigen konnte, dass Bafilomycin A1 (ein Inhibitor der Ansäuerung von Endosomen) die Aufnahme verringert. Rohrbeck et al. haben 2017 gezeigt, dass Integrin und Vimentin an der Zelloberfläche Rezeptoren für C3 sind.

C3 ist ein Inhibitor von Rho-GTPasen und deshalb für die Erforschung Rhovermittelter Zellfunktionen sehr wertvoll. Die ADP-Ribosylierung von Rho-A, -B und - C durch C3 führt zur Hemmung von intrazellulären Signalwegen und zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts der betroffenen Zelle. In Leukozyten z.B. werden dadurch Migration, Adhäsion und Phagozytose gestört (Barth et al. 2015). In Neuronen dagegen fördert C3 durch die Hemmung vom RhoA das Axonwachstum (Niederost et al., 2002). Direkte Injektionen von C3 in verletzte Nerven konnte sogar eine axonale Regeneration im zentralen Nervensystem erzeugen (Lehmann et al., 1999).

#### Tc-Toxin von Photorhabdus luminescens

Die Tc-Toxin-Familie ist nur eine Gruppe von Toxinen dieses Bakteriums. Zu den Komplexen gehören immer die TcA-, TcB- und TcC-Komponenten. Das Modell für die Aufnahme in Zellen entspricht dem "Short-Trip" der AB-Toxine. TcA ist für die Zellbindung und Translokation verantwortlich. Es bildet an der Zelloberfläche einen Hepta- oder Pentamer und wird zusammen mit TcB und TcC endozytiert. Die Funktion von TcB ist noch nicht ganz verstanden. Da es sich nach Formen der Pore aus TcA in eine Tasche dieser Pore legt, vermuteten Gatsogiannis et al. 2016, dass es zur Stabilisierung der Pore dient. Lang et al. konnten 2010 mit Hilfe von PA nachweisen, dass die TcC-Komponente, genauer gesagt TccC3, die enzymatische Aktivität vermittelt. TccC3 ADP-ribosyliert Aktin führt zu und einer Aktinpolymerisation und Cluster-Bildung.

#### 1.3 Ziel dieser Arbeit

Blanke et al. (1996) und Beitzinger et al. (2012) haben in ihren Versuchen zum PA-Transport gezeigt, dass sich sogar Proteine durch PA in Zellen transportieren lassen, die kaum Ähnlichkeit zum ursprünglichen Anthrax-Toxin aufweisen. Möglich und sogar sehr effektiv wurde dies durch die Verwendung eines His-Tags. Dieser, nicht nur zur Aufreinigung von Proteinen sehr nützliche Anhang von meist sechs Histidinen, vollbringt den Transport durch die Pore vermutlich über seine sechsfach positive Ladung. Das Innere der PA-Pore ist mehrfach negativ geladen, wodurch sie miteinander interagieren. Das Protein, welches in den folgenden Versuchen über PA transportiert werden soll, ist die enzymatische Komponente des Pertussistoxins: PTS1. Dazu wurde es mit einem His-Tag versehen, durch E. coli exprimiert und danach mit Hilfe des His-Tags aufgereinigt.

PTS1 bzw. His-PTS1 verhindert, von Makrophagen aufgenommen, deren Migration, was bei verschiedenen entzündlichen Krankheiten einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf haben könnte (Meade et al. 1984). Zum Beispiel wäre es ein großer Fortschritt bei der Behandlung der rheumatischen Arthritis, könnte man ein Einwandern von Makrophagen und somit eine durch diese Zellen hervorgerufene Ausweitung der Entzündung verhindern. Um His-PTS1 in Zellen zu transportieren, ist eine Transporteinheit nötig. Die Transportkomponente des PT kommt dabei nicht in Frage, da es dann zusammen mit PTS1 Keuchhusten auslösen würde. Daher ist es das Ziel, auf PA auszuweichen. Nun ist noch zu bedenken, dass PTS1 einzig in Makrophagen eingeschleust werden soll, um Schäden an anderen Zellen zu vermeiden. Doch PA-Rezeptoren sind auf fast allen Zellen zu finden.

Hier kommt nun das oben genannte C3-Toxin ins Spiel. In geringen Mengen wird es nur von Makrophagen und Monozyten aufgenommen. Um das His-PTS1 nun zielgerichtet in diese Zellen zu transportieren, wurde ein C3-Toxin benutzt, welches keine intrinsische Aktivität besitzt, um nicht mit PTS1 zu interferieren: C3bot1E174Q. Dieses wurde an die Bindungsstelle von mPA gekoppelt. MPA ist eine Mutante des PAs, bei der zwei Mutationen in die Bindungsdomäne eingefügt wurden, um die Bindung an die Anthrax-Rezeptoren von Zellen zu verhindern. So wurde ein Komplex aus C3bot1E174Q und mPA erschaffen, der einerseits durch die Bindungsdomäne des C3 selektiv auf Makrophagen binden und andererseits seine Fracht mit Hilfe der PA-Pore in deren Zytosol schleusen soll. Die Fracht ist, wie oben erläutert, His-PTS1 (Fahrer et al. 2010, Mechaly et al. 2012).

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich diese interessante Theorie im Labor umsetzen lässt.

# 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

## 2.1.1 Geräte

Die für diese Arbeit benutzten Geräte und deren Hersteller sind in Tabelle 1 gelistet.

Tabelle 1: Benutzte Geräte und deren Hersteller

Gerät	Hersteller
Bio Rotator RS Multi	Biosan, Riga
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
Certomat BS-1	Sartorius AG, Göttingen
Converter	Branson Sonic Power Company, Danbury
Electrophoresis Power Supply – EPS 601	Amersham Bioscience, Freiburg
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Folienschweißgerät Folio	Severin, Sundern
Glasplatte 20 x 10 cm	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Konfokalmikroskop LSM 710	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Magnetrührer RET basic C	OKA, Staufen
Micro Centrifuge	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop-Kamera ProgRes C10 plus	Jenoptik, Jena
PerfectBlue Doppelgelsystem Twin ExW S	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PerfectBlue Semi-Dry Elektroblotter	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

pH-Meter ino Lab pH 720	WTW, Weilheim
Pipetboy	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Pipetten Pipetman	Gilson, Middleton
Pipette Reference	Eppendorf, Hamburg
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach
Plattformschüttler Unimax 2010	Heidolph, Schwabach
Reagenzglasschüttler Reax top	Heidolph, Schwabach
Scanner	Epson, Tokio
Sicherheitswerkbank HERAsafe HS 12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Sicherheitswerkbank LaminAir HA 2448	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Spektrometer DU 640	Beckman Coulter GmbH, Brea
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vacuboy	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Waage Kern EG 2200 – 2 MM	KERN & SOHN GmbH, Balingen
Wasserbad AL 18	Lauda, Königshofen
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge J2-HS	Beckman Coulter, Brea

# 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2 sind die für die Arbeit benötigten Materialien gelistet.

Tabelle 2: Benutzte Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Blotting-Papier MN 827 B	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Cover slips	Menzel, Braunschweig
Entwickler, Fixierer RTU 60	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach
Immobilon <sup>™</sup> Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore Corporation, Billerica
Medical X Ray Film AGFA	Agfa HealthCare, Mortsel
Mikrotiterplatten	TPP, Trasadingen
Mikrotiterplatten (96-Well)	Corning Incorporated, Corning
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf
Nitrocellulose Blotting Membrane Amersham	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala
Objektträger	VWR, Radnor
Parafilm M	Bemis Company Inc., Neenah
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Schlauchfolie	HAT-Verpackungen, Esslingen

Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Spritze BD Plastipak <sup>TM</sup>	Becton Dickinsons, New Jersey
Sterican Einmal-Injektions-Kanüle	B. Braun, Melsungen
UV-Küvette	Sarsted, Nümbrecht
Whatman Nitrocellulosemembran Protran BA 85	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala
Zellkulturschalen 100	TPP, Trasadingen
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht

# 2.1.3 Chemikalien

Die für die Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller

Chemikalie	Hersteller
6-Biotin-17-NAD	R&D Systems, Minneapolis
Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agar Agar SERVA	Serva, Heidelberg
Albumin Fraction V	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin sodium salt	Serva, Heidelberg
Aqua-Poly/Mount	Polysciences Inc., Warrington

BactoTM Tryptone	Becton Dickinson, New Jersey
Bromphenolblau-Na-Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BSA	GIBCO® life technologies, Karlsruhe
C3bot von <i>C. botulinum</i>	AG Barth, Uni Ulm
C3bot1E174Q	AG Barth, Uni Ulm
C3mPA	John Collier, Harvard Medical School
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na2HPO4 x 2H2O)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Merck KGaA, Darmstadt
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO® life technologies, Karlsruhe
Eisessig	VWR, Darmstadt
EDTA Dinatriumsalz-Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	VWR, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	GIBCO® life technologies, Karlsruhe
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Hefeextrakt Servabacter	Serva, Heidelberg

His-C2I	AG Barth, Uni Ulm
His-PTS1 von Bordetella pertussis	Aviva systems biology, San Diego
His-TccC3	Alexander E. Lang, Uni Freiburg
Hoechst	Invitrogen-Molecular Probes, Eugene
HSP90	Prof. Dr. Johannes Buchner, Faculty of Chemistry, TU Munich
Imidazol	Merck-Schuchard, Hohenbrunn
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
LFnDTA	John Collier, Harvard Medical School
Luminol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Marker für Molekulargewicht, unstained	GE Healthcare Life Sciences, Uppsala
Marker für Molekulargewicht, prestained	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Milli-Q	Merck Millipore, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem GmbH, Darmstadt

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 1 H <sub>2</sub> O)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumpyruvat 100 mM (100x)	GIBCO® life technologies, Karlsruhe
Nickel-NTA Agarose beads	Qiagen, Hilden
Ortho-Phosphorsäure 85 % (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
PA von <i>B. anthracis</i>	John Collier, Harvard Medical School
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Penicillin-Streptomycin	GIBCO® life technologies, Karlsruhe
Pertussistoxin von Bordetella pertussis	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ponceau S	AppliChem GmbH, Darmstadt
Salzsäure (HCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Streptavidinperoxidase-Konjugat	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Talon CellThru Resin	Clontech Laboratories Inc., Mountain View
Tetramethylethylendiamin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton® X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypsin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trypsininhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30 %	J.T. Baker, Griesheim

## 2.1.4 Zelllinien und Bakterienstämme

Die benutzten Zelllinien und Bakterienstämme zeigt Tabelle 4.

Tabelle 4: Zelllinien und Bakterienstämme

Zellinien (ATCC)/Bakterienkultur	Informationen
CHO-K1 (CCL-61)	Ovarienzellen des chinesischen Zwerghamsters
Escherichia coli BL-21	
J774A.1 (TIB-67)	adhärente Mausmakrophagen
RAW 264.7 (TIB-71)	durch das Abelson-Leukämie-Virus veränderte Mausmakrophagen

## 2.1.5 Plasmide

In dieser Arbeit wurde das Plasmid in Tabelle 5 benutzt:

Tabelle 5: Plasmid und deren Hersteller

Plasmid	Hersteller
ptacC180	Dr. Joseph Barbieri, Medical College of Wisconsin

## 2.1.6 Antikörper

In Tabelle 6 sind alle benötigten Antikörper gelistet.

Tabelle 6: Antikörper und deren Hersteller

# Antikörper

## Hersteller

AlexaFlour 488 goat-α-rabbit IgG (grün)	Invitrogen-Molecular Probes, Eugene
AlexaFlour 647 goat-α-rabbit IgG (rot)	Invitrogen-Molecular Probes, Eugene
Bordetella pertussis-Toxin S1 IgG, Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas
C. botulinum-C3-Toxin IgG, Hase	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas
Goat-α-mouse IgG HRP-Konjugat	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas
Goat-α-rabbit IgG HRP-conjugate	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas
Penta-His-IgG, Maus	Qiagen, Hilden

## 2.1.7 Computerprogramme

Tabelle 7 listet die genutzten Programme.

Tabelle 7: Programme	
Programm	Unternehmen
Adobe Photoshop CS3 7.0	Adobe Systems Inc., San Jose
AxioVision Rel. 4.7	Zeiss, Göttingen
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, San Diego
ImageJ 1.4.3.67	National Institutes of Health, Bethesda
Microsoft Office 10, Starter	Microsoft Corp., Washington

### 2.1.8 Puffer

Die Puffer sind bei der jeweiligen Methode aufgeführt, bei der sie verwendet werden. Sie werden mit zweifach destilliertem Wasser zum in Klammern angegebenen Zielvolumen aufgefüllt, soweit nicht anders beschrieben.

# 2.2 Methoden

### 2.2.1 Passagieren von Zellen

### J774A.1

Eine Petrischale mit J774A.1 wird aus dem Wärmeschrank (37 °C) genommen und in die Sterilbank gestellt. Als erstes wird das Medium (DMEM, s. Tab. 8) komplett abgesaugt. 10 ml 37 °C-warmes PBS werden hinzugegeben, um die Zellen zu waschen, welches wieder komplett abgesaugt wird. Nun werden 10 ml einer Mischung aus DMEM, 10% FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, die ebenfalls vorher auf 37 °C erwärmt wurde, auf die Zellen gegeben. Die Zellen werden mit einem Zellschaber von der Platte gelöst. Dabei sollte man darauf achten, dass man über jede Stelle nur einmal schabt, um die Zellen nicht zu zerstören. Die gelösten Zellen werden dann mit einer Glaspipette zehn- bis 15mal im hinzugegeben Medium resuspendiert. Ein Teil der Zellsuspension und ein Teil frisches Medium werden nun im gewünschten Verhältnis in eine neue Schale gegeben. Je nachdem, wie lange man sie wachsen lassen möchte, werden sie zum nächsten Tag 1:2, über 2 Tage 1:3/1:4 und über 3 Tage 1:6/1:8 je nach Zelldichte gesplittet. Danach werden sie wieder bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % im Wärmeschrank aufbewahrt.

Tabelle 8: Zusammensetzung von Dulbecco's Modified Eagle Medium und Phosphate buffered saline

### Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

DMEM 1x + GlutaMAX™	500 ml	
Natriumpyruvat	0,75 g	6,82 mM
Glucose	2,25 g	12,5 mM

### 10x Phosphate buffered saline (PBS) (ad 1 l)

NaCl	8 g	137 mM
KCl	0.2 g	2.7 mM
Na2HPO4+2xH <sub>2</sub> O	1.44 g	8 mM
KH2PO4	0.24 g	1.8 mM

#### CHO-Zellen

Eine Petrischale mit CHO-Zellen wird aus dem Wärmeschrank genommen und in die Sterilbank gestellt. Das CHO-Medium wird abgesaugt. Die Zellen werden mit 10 ml warmem PBS (37 °C) gewaschen, welches wieder abgesaugt wird. Jetzt werden 2 ml kaltes Trypsin (0,25 %) auf die Zellen gegeben, um sie abzulösen. Dies wird unter dem Mikroskop überprüft. Nun werden 10 ml Medium zu den Zellen gegeben, um das Trypsin zu inhibieren und die Zellen darin zu resuspendieren. Die gelösten Zellen werden mit Medium in ein Zentrifugenröhrchen gegeben. Dieser wird 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Dadurch bildet sich am Boden des Zentrifugenröhrchens ein Pellet. Das Medium mit Trypsin wird wieder abgesaugt, ohne das Pellet mit abzusaugen und das Zentrifugenröhrchen mit 10ml frischem Medium gefüllt. Hierin wird das Pellet nun gelöst. Die Zellen werden im gewünschten Verhältnis gesplittet (2 Tage: 1:6, 3 Tage: 1:15), in eine neue Petrischale gegeben und mit Medium auf 10 ml aufgefüllt. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Wärmeschrank aufbewahrt.

Tabelle 9: Zusammensetzung Chinese hamster ovary (CHO)-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium = DMEM, Fetales Kälberserum = FCS)

CHO-Medium

DMEM + 10 % FCS	250 ml	
Ham`s F-12	250 ml	
Natriumpyruvat	55 mg	1 mM
Penicillin/Streptomycin	5 ml	2 %

#### 2.2.2 Aufreinigung von His-PTS1 (C180)

#### His-Tag

Zur Aufreinigung von PTS1 wird ein His-Tag benutzt. Dazu wird PTS1 rekombinant mit sechsmal Histidin verbunden. Histidin ist die Aminosäure mit der stärksten Interaktion zu Metallionen. Das wird in der Immobilized metal-affinity chromatography (IMAC) ausgenutzt. Eine Matrix aus dem Chelatbildner Nitrilotriessigsäure (NTA) bildet mit Metallen, in diesem Versuch mit Nickel-Ionen, Komplexe und immobilisiert sie somit. Wird das Protein mit dem His-Tag auf die Matrix mit den Nickel-Ionen gegeben, bindet es hochaffin an diese und kann nun durch Zugabe von zuerst niedermolekularem Imidazol von unspezifisch gebundenen Proteinen gereinigt werden. Erhöht man die Konzentration des Imidazols, kann der His-Tag wieder gelöst werden (Terpe K, 2003).

#### Expression von His-PTS1 (C180) durch E. coli BL21

Wichtig ist hier zu sagen, dass das Plasmid PTAC 180 nicht für das ganze PTS1-Protein kodiert sondern nur für den 180 Aminosäuren langen C-Terminus des PTS1, das sogenannte C180-Peptid. Barbieri und Cortina konnten 1988 zeigen, dass diese Länge für die enzymatische Aktivität ausreichend ist.

Für die Transformation werden die E. coli-Bakterien mit 300 ng des Plasmids PTAC 180 und Calciumchlorid für 30 min auf Eis inkubiert. Durch einen Hitzeschock bei 42 °C für 90 s sollen sich die Membranen der E. coli öffnen und das Plasmid noch effektiver aufgenommen werden. Dann folgen zwei Minuten auf Eis, worauf die Bakterien in LB-Medium ohne Ampicillin aufgenommen und bei 37 °C für eine Stunde inkubiert werden. Ein Drigalski-Spatel wird abgeflammt, bevor mit diesem die E. coli auf einer vorgewärmten Agar-Platte verstrichen werden. Die Platten werden bei 37 °C im Brutschrank über Nacht aufbewahrt. Mit einer Pipettenspitze werden einzelne Kolonien abgeschabt und in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gelöst. Es folgt die Inkubation im Schüttelinkubator bei 37 °C für 6 h. Ein Milliliter dieser Lösung wird nun in 200 ml LB-Medium + Ampicillin suspendiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Hauptkultur aus 200 ml der Vorkultur und 6 l LB-Medium + Ampicillin auf drei große Erlenmeyerkolben verteilt und wieder bei 37 °C in den Schüttelinkubator gestellt. Nach etwa drei Stunden sollte die erste Messung der optischen Dichte erfolgen. Wenn diese kleiner als 0,6-0,8 sein sollte, wird empfohlen, die Kultur weiter wachsen zu lassen. Sollte die Dichte hoch genug sein, kann die Induktion der Proteinexpression mit 1 mM Isopropyl-β-D-1thiogalactopyranosid (IPTG) für 5,5 h im Schüttelinkubator bei 20 °C erfolgen. Dann folgt das Zentrifugieren der Kultur mit 5000 rpm für 10 min bei 4 °C. Der Überstand kann verworfen und das Pellet bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 10: Zusammensetzung Lysogeny Broth (LB) -Medium

1x LB-Medium (ad 0.5 l)

BactoTM Tryptone	5 g	1 %
Hefeextrakt Servabacter	2.5 g	0.5 %
NaCl	5 g	1 %

#### Zellaufschluss

Für einen Versuch wurden Pellets mit His-PTS1 (C180) produzierenden E. coli genutzt, die von einer Doktorandin der Arbeitsgruppe schon vorbereitet wurden waren. Für darauf folgende Versuche wurden diese Kulturen neu produziert. Ein Pellet entspricht etwa 1 l Kultur. Die tiefgefrorenen Pellets müssen langsam aufgetaut und mit 10 ml Lysispuffer resuspendiert werden. Der Zellaufschluss erfolgt mit Ultraschall für 10 s, worauf eine Pause von einer Minute folgt, während der die Proben auf Eis gestellt werden. Dieses Vorgehen wird zehnmal wiederholt. Danach werden die Proben für 25 min bei 4 °C mit 12.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in Zentrifugenröhrchen gefüllt und später für die Ni-NTA-Säule benötigt. Ein Teil wird bei -20 °C für die folgende SDS-PAGE gelagert.

Tabelle 11: Herstellung des Lysispuffers

Lysispuffer (ad 1 l)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O	6,9 g	50 mM
NaCl	17,54 g	300 mM
Imidazol	0,34 g	5 mM
Tween	2 ml	0,2 %
Glycerin	100 ml	10 %

Die Mischung wird mit Milli-Q auf 900 ml aufgefüllt. Der pH-Wert wird mit 5 N NaOH auf 8 eingestellt. Das Ganze wird mit Milli-Q auf 1 l aufgefüllt. Nun wird es autoklaviert. Tabelle 12: Herstellung der Wasch- und Elutionspuffer. Alle folgenden Puffer werden mit Milli-Q auf 450 ml aufgefüllt, mit 5 N NaOH auf pH 8 eingestellt und dann mit Milli-Q auf 500 ml aufgefüllt. Danach wird der Puffer autoklaviert.

Histidin-Waschpuffer I mit Glycerin (ad 0,5 l)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O	3,45 g	50 mM
NaCl	8,77 g	300 mM
Imidazol	0,68 g	20 mM
Glycerin	50 ml	10%

Histidin-Waschpuffer I ohne Glycerin (ad 0,5 l)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O	3,45 g	50 mM
NaCl	8,77 g	300 mM
Imidazol	0,68 g	20 mM

Histidin-Waschpuffer II (ad 0,5 l)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O	3,45 g	50 mM
NaCl	8,77 g	300 mM
Imidazol	1,36 g	40 mM

Histidin-Elutionspuffer (ad 0,5 l)

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> +H <sub>2</sub> O	3,45 g	50 mM
NaCl	4,39 g	150 mM
Imidazol	8,50 g	250 mM

Vorbereitung und Ni-NTA-Beads

Die Ni-NTA-Beads werden in Ethanol geliefert. In diesem werden sie nun resuspendiert. Von der Lösung mit den Beads wird 1 ml auf eine Säule gegeben. Die Beads sollen sich absetzen, dann kann man die Ethanol-Lösung ablaufen lassen. Als nächstes werden die Beads mit 6 ml Elutionspuffer (s. Tab. 12) gespült, den man dazu auf die Säule gibt und wieder ablaufen lässt. Dann werden sie mit 6ml sterilem MilliQ, sowie zweimal mit 6 ml Lysispuffer (s. Tab. 11) gespült. Die Säule wird nun unten verschlossen. 17 ml vom Überstand des Zellaufschlusses werden auf die Beads gegeben. Die Säule wird nun zuerst bei Raumtemperatur für 1,75 h, dann über Nacht bei 4 °C im Rotator gelagert.

#### Aufreinigung mittels Nickel-NTA-Säule

Zuerst müssen die Beads der Säulen von unspezifischen Bindungen befreit werden. Dazu lässt man einmal Lysispuffer durch die Säule laufen. Danach wird die Säule mit Lysispuffer bei 4 °C 20 min geschwenkt. Es folgen vier Waschgänge mit Waschpuffer I mit Glycerin, vier mit Waschpuffer I ohne Glycerin und fünf mit Waschpuffer II (s. Tab. 12). Zum Lösen von His-PTS1 (C180) von den Beads wird dreimal Elutionslösung (s. Tab. 12) auf die Beads gegeben. Jeder Waschschritt wird in Mikroreaktionsgefäßen aufgefangen. Falls nötig, werden die Proben bei 4 °C gelagert.

#### Probenvisualisierung mit SDS-Page und Gelfärbung (siehe 2.2.5 und 2.2.6)

Vier Waschschritte und jeder der Elutionsschritte werden auf ein Gel aufgetragen für die SDS-PAGE. Das Gel wird danach mit Coomassie Blue gefärbt. Nach dem Entfärben wird es auf eine Membran geblottet und mit Ponceau S gefärbt. Die Membran wird über Nacht bei 4 °C auf der Wippe mit Milch geblockt.

### Umpuffern der Elution

Die drei Elutionsschritte werden in einer permeablen Membran vereinigt und mit einem Rührfisch bei 4 °C über Nacht in PBS gehängt.

#### Immundetektion (siehe 2.2.8 und 2.2.9)

Die Membran, die über Nacht in Milch geblockt wurde, wird nun mit PBS-T gewaschen. Ein PTS1-Antikörper (mouse- $\alpha$ -PTS1) wird auf die Folie gegeben und für

eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Wippe gestellt. Die Blotmembran wird nun dreimal mit PBS-T gewaschen. Darauf folgt die Inkubation mit einem Maus-Antikörper (goat- $\alpha$ -mouse) für eine Stunde auf der Wippe, worauf wieder ein Waschgang mit PBS-T folgt. Die präparierte Membran wird in der Dunkelkammer mit einer Detektionsflüssigkeit getränkt. Ein Film wird je nach Stärke der Abstrahlung für eine gewisse Zeit auf die Membran gelegt. Danach wird er entwickelt, fixiert, mit Wasser gespült und anschließend getrocknet. Nach Übertragen des Markers von der Membran auf den Film, können die sichtbaren Banden nach Vorhandensein in bestimmten Fraktionen und Größe beurteilt werden.

Die Blotmembran wurde danach gestrippt und nach dem gleichen Vorgehen mit einem His-Antikörper detektiert.

#### Konzentrationsbestimmung

Es werden eine Verdünnungsreihe mit BSA-Standard und eine mit PTS1 hergestellt, die durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch anschließende Färbung mit Coomassie sichtbar gemacht werden. Das Gel wird dann eingescannt. Mit Hilfe von Photoshop wird die Konzentration des PTS1 bestimmt (siehe 2.2.5).

#### 2.2.3 Aktivitätsassay

Um zu bestimmen, ob das aufgereinigte His-PTS1 (C180) enzymatisch aktiv ist, wird die ADP-Ribosylierung von G-Proteinen mit Hilfe von NAD-Biotin und Streptavidin-Peroxidase (Strep-POD) nachgewiesen. Hierzu ist die Herstellung von Zelllysat nötig, um G-Proteine bereitzustellen. Es werden sechs Zellkulturschalen mit CHO-Zellen aus dem Brutschrank genommen und einmal mit PBS gewaschen und abgesaugt. Zu einer Schale werden 500 µl ADP-Ribosylierungspuffer (s. Tab. 13) hinzu gegeben. Die Zellen werden nun abgekratzt und im Puffer in die nächste Schale pipettiert. Aus dieser werden die Zellen wieder abgekratzt und in die nächste Schale überführt. Dieses wird wiederholt, bis sich alle Zellen in einer Schale befinden. Diese werden nun in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis mit einer sterilen Nadel immer wieder aufgezogen, um die Zellen durch die Scherkräfte zu permeabilisieren. Danach wird das Gefäß fünf Minuten bei 4 °C mit 3.000 rpm zentrifugiert. Im Überstand befindet sich nun das Zelllysat. Von diesem muss als nächstes die Konzentration für die weitere Verwendung bestimmt werden. Dazu bietet sich die Proteinbestimmung nach Bradford (siehe 2.2.4) an. Das Zelllysat kann danach aliquotiert und bei -20 °C gelagert werden.

Für den Aktivitätsassay werden fünf Ansätze für SDS-PAGE und Westernblot hergestellt. In alle wird 9,5 μl CHO-Lysat gegeben, in vier davon 1 μl Biotin-NAD und in drei Reaktionsgefäße verschiedenen Toxine: 60 ng C2I als Kontrolle, 170 ng PTS1 (gekauft) als zweite Kontrolle und 170 ng His-PTS1 (C180). Jeder Ansatz wird mit Barbieri-Puffer auf 25 µl aufgefüllt. Da NAD die Reaktion startet, wird es in den Deckel der Gefäße pipettiert und ganz zum Schluss durch leichtes zentrifugieren den Ansätzen hinzugefügt. Der Ansatz mit C2I wird 30 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Die anderen Proben werden bei 21 °C für 30 min inkubiert. Danach werden alle Proben für 10 min bei 95 °C mit 6,25 µl 1x Lämmli+DTT gekocht. SDS-PAGE und Westernblot werden mit diesen Proben durchgeführt. Die G-Proteine, an die nun durch die ADP-Ribosylierung Biotin-NAD gebunden ist, werden mit Strep-POD in 1:2500 Verdünnung nachgewiesen. Dazu lässt man die Blotmembran eine Stunde in Strep-POD auf der Wippe inkubieren und wäscht sie danach dreimal für sechs Minuten mit PBS-T. Bindet Strep-POD am Biotin auf der Membran, kann mit ECL ein Lichtsignal auf der Membran erzeugt werden, was per Röntgenfilm aufgenommen wird.

Tabelle 13: Zusammensetzung Adenosindiphosphat (ADP) - Ribosylierungspuffer und Phosphate buffered Saline mit Tween (PBS-T)

ADP-Ribosylierungspuffer (modifiziert nach Dr. J. Barbieri) (ad 10ml)

Adenosintriphosphat	0,51 μg	0,1 μM
Dithiothreitol	30,85 mg	20 mM
Tris	0,12 mg	0,1 mM

1x PBS-T (ad 10 l)

10x PBS	11	10 %
Tween 20	10 ml	0,1 %

### 2.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Das Lysat wird 1:500 mit autoklaviertem Wasser und Bradford-Lösung (Wasser: Bradford = 1:4) verdünnt und je 1 ml davon in zwei Küvetten gefüllt. In eine dritte Küvette wird 1 ml PBS als Kontrolle gefüllt. Die Konzentration wird nun photometrisch bestimmt und von beiden Proben der Mittelwert errechnet. Die Ergebnisse dürfen dabei nicht mehr als 10 % variieren.

Tabelle 14: Zusammensetzung Bradford-Lösung

Bradf	ford-Lösung (ad 100ml)		
	Coomassie Brilliant Blue	10 mg	0,117 mM
	G250		
	Ethanol	5 ml	5 %
	85 % H3PO4	10 ml	8,5 %

### 2.2.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch die SDS-PAGE werden Proteine der Größe nach aufgetrennt. Dazu werden die Proteine vorher durch Erhitzen denaturiert und dann ein elektrisches Feld angelegt. Währenddessen befinden sie sich im Laufpuffer (s. Tab. 15), welcher SDS enthält. SDS ist negativ geladen, bindet an die Proteine und verdeckt ihre Eigenladung. Dadurch sind alle Proteine negativ geladen und wandern zum Pluspol. Durch das Aufkochen der Proben verlieren sie ihre Sekundärstruktur, was zu besserer Auftrennbarkeit führt.

Die verwendeten Gele werden vorher in der Arbeitsgemeinschaft gegossen. Sie bestehen aus einem Trenngel mit 12,5 % SDS und einem Sammelgel mit 6 % SDS (s. Tab. 15). Die zu untersuchenden Proben werden mit 5x SDS-Lämmli-Puffer (s. Tab. 15), bei 95°C für 5 min gekocht. An die Gele wird dann eine Spannung von 300 V mit 45 mA angelegt für etwa eine Stunde. Hierbei wird ein SDS-Laufpuffer verwendet. Tabelle 15: Zusammensetzung von Natriumdodecylsulfat (SDS) -Laufpuffer, 5x SDS-Lämmli-Puffer und von Gelen für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

1x SDS-Laufpuffer

Glycin	31,8 g	190 mM
Tris	3,27 g	27 mM
SDS	5 g	0,1 %

# 5x SDS-Lämmli-Puffer (ad 50 ml)

Tris-HCl	15,6 ml	31	2,5 mM
SDS	5 g	10	%
Glycerin	25 ml	25	%
Bromphenolblau	7,5 mg	0,0	015 %
Dithiothreitol	5 ml	3,7	′5 %
Gele für die SDS-PAGE	Laufgel	Laufgel	Sammelgel
	10 %	12,5 %	6 %
H <sub>2</sub> O	13,2 ml	10,45 ml	8 ml
Laufgelpuffer	8,25 ml	8,25 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	3,1 ml
10 % SDS	363 µl	363 µl	125 µl
Acrylamid : Bisacrylamid	11 ml	13,75 ml	2,5 ml
30 % (37,5 : 1)			
10 % Ammonium-	330 µl	330 µl	125 µl
peroxidsulfat			
Tetramethylethylendiamin	22 µl	22 µl	12,5 µl

#### 2.2.6 Proteinfärbung nach Coomassie

Coomassie Färbelösung (ad 1 l)

Nach der Laufzeit können die Proteine auf dem Gel mit Coomassie Brilliant Blue G-250 sichtbar gemacht werden. Es enthält Triphenylmethanfarbstoff, welcher sich an basische Seitenketten von Aminosäuren anlagert und diese somit unspezifisch anfärbt. Um die Masse der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können, wird ein "unstained" Marker mit auf das Gel gegeben. Dieser lässt sich ebenfalls mit Coomassie (s. Tab. 16) färben.

Nach der SDS-PAGE wird das Gel in einer Schale mit Coomassie bedeckt bis zur gewünschten Farbintensität (etwa 20 min) auf der Wippe inkubiert. Zum Entfärben wird es fünf Minuten mit Entfärbelösung (s. Tab. 16) auf der Wippe gewaschen.

Tabelle 16: Zusammensetzung der Coomassie Färbelösung und der Coomassie Entfärbelösung

Coomassie	Brilliant	Blue		
R250			2,5 g	(3 mM)
Methanol			450 ml	(45 %)
Eisessig			100 ml	(10 %)

Coomassie Entfärbelösung (ad 1	l)	
Methanol	450 ml	(45 %)
Eisessig	100 ml	(10 %)

### 2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach SDS-PAGE

Auf das Gel werden eine Verdünnungsreihe mit BSA und eine mit dem gewünschten Protein aufgetragen. Nach der Auftrennung wird es mit Coomassie gefärbt und dann mit Hilfe von Photoshop eingescannt und weiter verarbeitet. Dazu wird die Farbintensität der Banden relativ zum Hintergrund gemessen. Mit diesen Werten wird eine Standartkurve des BSAs erstellt und mit diesen wiederum können die Konzentrationen der verschiedenen Verdünnungen des Proteins bestimmt werden. Der Durchschnitt dieser wird als Konzentration festgelegt.

#### 2.2.8 Westernblot

Hierbei werden die Proteine vom Gel der SDS-PAGE auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dies geschieht durch das Anlegen eines elektrischen Feldes senkrecht zur Fläche des Gels, bzw. der Membran, wobei beide in Towbin-Puffer (s. Tab. 17) getränkt sind. Dieser enthält SDS, um die Ladung der Proteine entsprechend der SDS-PAGE zu überlagern. Die Übertragung benötigt eine Spannung von 12 V und eine Stromstärke von 1 mA/cm<sup>2</sup> über etwa eine Stunde. Zur Überprüfung des Transfers kann die Membran mit Ponceau-S-Lösung (s. Tab. 17) reversibel gefärbt werden.

Tabelle 17: Zusammensetzung von Towbin-Puffer und Ponceau-S-Lösung (Natriumdodecylsulfat = SDS)

Towbin-Puffer (ad 21)		
10x SDS Laufpuffer	200 ml	
Methanol	400 ml	20 %
Ponceau-S-Lösung (ad 1 l)		
Ponceau S	2 g	2,63 mM
Eisessig	50 ml	5 %

### 2.2.9 Immunoblot

. .

Im Anschluss an den Westernblot können die Proteine auf der Membran mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Zuerst muss die Membran mit 5 %-Milchpulver-Lösung geblockt werden, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen und die Ponceau-Färbung zu lösen. Danach wird die Membran dreimal mit PBS-T auf der Wippe für jeweils sechs Minuten gewaschen. Daraufhin kann der in PBS-T gelöste Primärantikörper auf die Membran gegeben werden. Der Antikörper verbleibt eine Stunde mit der Membran auf der Wippe. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Membran mit PBS-T auf der Wippe für jeweils sechs Minuten, kann der ebenfalls in PBS-T gelöste, passende Sekundärantikörper für eine Stunde auf die Membran gegeben werden. Dann folgt ein erneuter Waschgang mit PBS-T für dreimal sechs Minuten auf der Wippe. Die Sekundärantikörper sind mit Meerettich-Peroxidase gekoppelt und können so zur Chemielumineszenzdetektion genutzt werden. Dazu wird eine Detektionslösung (ECL, s. Tab. 18) benötigt, welche Luminol enthält, was unter Reaktion mit der Peroxidase Licht emittiert. Dieses Licht kann auf Röntgenfilmen festgehalten und somit die gesuchten Strukturen detektiert werden. Die Membran wird in der Dunkelkammer mit ECL benetzt und dann ein Röntgenfilm aufgelegt. Die zwei Lösungen A und B des ECLs werden direkt vorher 1:1 gemischt. Je nach Leuchtstärke wird der Film für eine gewisse Zeit auf der Membran belassen. Zum Entwickeln des Films schwenkt man diesen zuerst im Entwickler, dann in Wasser, im Fixierer und wieder in Wasser. Dann wird er zum Trocknen aufbewahrt.

Will man die Membran noch mit einem anderen Antikörper detektieren, muss sie gestrippt werden. Dazu wird sie zuerst in Stripping-Puffer A für fünf Minuten auf die Wippe gestellt, 20x mit Wasser gewaschen, dann mit Stripping-Puffer B für zehn Minuten auf der Wippe inkubiert und wieder 20x mit Wasser gewaschen (s. Tab. 18). Dann folgt eine Stunde Blocken mit 5 %-er Milchpulver-Lösung. Im Anschluss kann ein neuer Antikörper benutzt werden.

Tabelle 18: Zusammensetzung von Enhanced Chemiluminescence (ECL) – Lösung und Stripping-Puffer

ECL Lösung A	(ad	5	ml	)
--------------	-----	---	----	---

	Tris-HCl (pH 9)	500 µl	100 mM
	Luminol	50 µl	2,5 mM
	p-Coumarinsäure	22 µl	0,396 mM
ECL L	ösung B (ad 5 ml)		
	Tris-HCL (pH 9)	500 µl	100 mM
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 µl	0,3 %
Stripp	ing-Puffer A (ad 1 l, pH 2)		
	Glycin	15,03 g	200,2 mM
	NaCl	29,22 g	0,5 M
Stripp	ing-Puffer B (ad 1 l, pH 11)		
	Tris	60,57 g	0,5 M

#### 2.2.10 Vergiftungsexperimente

Um die Wirkung von Bindungs- und Enzymuntereinheit der verschiedenen Toxine zu testen, wurden Vergiftungsexperimente durchgeführt.

#### J774A.1 / RAW 264.7

Die Zellen werden gewaschen und gelöst, wie in 2.2.1 beschrieben. Von der Zellsuspension gibt man nun 10µl in eine Neubauer Zählkammer und zählt die vorhandenen Zellen. Die Zahl wird durch 4 geteilt und ergibt dann die Anzahl an Zellen x10<sup>4</sup> / ml. Bei J774A.1 und RAW 264.7 werden etwa 3x10<sup>5</sup> Zellen pro Mikrotiterplatte benötigt, wenn man die Zellen noch 2 Tage auf der Platte wachsen lässt. Die gewünschte Anzahl an Zellen wird nun mit DMEM auf 13 ml aufgefüllt und auf einer Mikrotiterplatte verteilt. Die Platte wird im Wärmeschrank aufbewahrt. Nach zwei Tagen wird auf einer Sterilbank das Medium der Platte abgesaugt und je nach Well-Anzahl eine bestimmte Menge neues Medium hinzugegeben. Die auf Eis liegenden Toxine werden nun nach einem selbst gewählten Schema, einzeln und in Kombination, abhängig von der gewünschten Menge des Toxins und des verwendeten Mediums in die Wells pipettiert. Je nach Toxin und dessen Konzentration können die Vergiftungsreaktionen nach unterschiedlicher Zeit auftreten. Ebenfalls möchte man den Verlauf der Vergiftung verfolgen, weshalb die Wells in bestimmten Zeitabständen immer wieder unter dem Mikroskop fotografiert werden. Dazu werden pro Well also pro Toxin-Kombination drei Bilder aufgenommen. Die Bilder werden mit dem Programm ImageJ ausgewertet, indem man die normalen und die Zellen mit Vergiftungsmorphologie zählt. Die Ergebnisse werden dann mit Graphpad so ausgewertet, dass aus den Zählergebnissen der drei Bilder einer Toxin-Kombination ein Mittelwert gebildet wird. Dieser wird zum Vergleich mit den anderen Kombinationen im Balkendiagramm dargestellt.

#### CHO-Zellen

Die Zellen werden, wie in 2.2.1 beschrieben, mit Trypsin aus der Kulturschale gelöst und zentrifugiert. In der Neubauer Zählkammer werden die Zellen aus 10  $\mu$ l Zellsuspension gezählt und die gewünschte Anzahl mit 13 ml CHO-Medium verdünnt auf einer Platte ausgesät. Normalerweise ergeben 3-4 x10<sup>5</sup> Zellen pro Platte, die noch zwei Tage im Brutschank wachsen, einen guten Zellrasen für die Versuche. Wie bei J774A.1 wird das Medium vor der Vergiftung erneuert. Die verwendeten Toxine werden die ganze Zeit über auf Eis gelagert. Die Zellen werden ebenfalls unter dem Mikroskop in bestimmten Zeitabständen fotografiert. Die Auswertung erfolgt visuell. Es wird nur unterschieden, ob die Zellen als Zellrasen bestehen bleiben oder dieser sich auftrennt und sich Cluster bilden.

#### 2.2.11 Bindungsassay

Um zu untersuchen, ob C3mPA an die Zelloberfläche von J774A.1 binden kann, wurde ein Bindungsassay durchgeführt.

Die Zellen werden dazu mit C3mPA und C3bot als Kontrolle behandelt. Dies geschieht für 30 min auf Eis, da eine Aufnahme in die Zelle vermieden werden soll. Unter 4 °C ist die Internalisation in Zellen sehr gering. Nun wird jedes Well zweimal mit 1 ml PBS gewaschen, um die nicht gebundenen Toxinanteile zu entfernen. Dann wird 50 µl heißes Lämmli auf die Zellen gegeben und diese sofort abgekratzt und in je ein Reaktionsgefäß überführt. Die Proben werden nochmals für fünf Minuten gekocht und ein Gel für die SDS-PAGE damit beladen. Nach dem Blotten wird das Gel mit Coomassie und die Membran mit Ponceau gefärbt und eingescannt. Nun wird die Membran zehnmal mit PBS-T gewaschen. Danach kann der Primärantikörper, rabbit- $\alpha$ -C3 1:3000 verdünnt, für eine Stunde auf der Wippe die Membran inkubieren. Es folgen drei Waschschritte mit PBS-T für jeweils fünf Minuten auf der Wippe, bevor der Sekundärantikörper, goat- $\alpha$ -rabbit 1:2500, ebenfalls für eine Stunde wippend auf die Membran gegeben wird. Die Membran wird dann wieder wie vorher gewaschen und anschließen mit ECL in der Dunkelkammer detektiert.

#### 2.2.12 Kompetitionsassay

Um zu untersuchen, ob C3mPA an den C3-Rezeptoren bindet, wurden C3bot1E174Q und C3mPA zusammen und einzeln auf J774A.1 gegeben und dann im Westernblot nachgewiesen.

J774A.1-Zellen werden zwei Tage vor dem Versuch auf einer Platte mit 4 x10<sup>5</sup> Zellen ausgesät. C3bot1E174Q wird auf Eis aufgetaut und fünf Minuten mit maximaler Geschwindigkeit bei 4 °C zentrifugiert. Das Medium wird ausgetauscht gegen serumfreies Medium, bevor C3bot1E174Q in zwei Wells gegeben wird. Dieses darf 10 min auf Eis binden. Dann wird C3mPA in eines der beiden vorherigen Wells und in ein weiteres ohne C3bot1E174Q gegeben. Die Chimäre darf 30 min lang auf Eis binden. Nun werden alle Wells mit PBS fünfmal gewaschen. Die Zellen werden in 50 µl Lämmli pro Well nach dem Abschaben suspendiert und in Reaktionsgefäße überführt. Nach dem Herstellen von zwei Kontrollen werden alle Proben für 10 min gekocht und dann wird ein Gel damit beladen. Nach der SDS-PAGE wird das Gel mit Coomassie und nach dem Westernblot die Membran mit Ponceau gefärbt und gescannt. Die Membran wird mit gelöstem Milchpulver entfärbt und geblockt und anschließend mit PBS-T gewaschen. Nun folgt die Hinzugabe des Primär- und Sekundärantikörpers und Waschen mit PBS-T wie im Versuch davor (siehe 2.2.9). Die Antikörperverdünnungen sind hier allerdings: rabbit- $\alpha$ -C3: 1:5000 und goat- $\alpha$ -rabbit: 1:10.000.

### 2.2.13 Immunfluoreszensmikroskopie

Diese Untersuchungsmethode soll Aufschluss darüber geben, ob sich C3mPA nach Inkubation von J774A.1 innerhalb der Zellen befindet. Sie soll also zeigen, ob die Chimäre nur an der Zelloberfläche bindet, wie im vorherigen Versuch untersucht oder ob sie auch die Fähigkeit besitzt, endozytiert oder ins Zytosol aufgenommen zu werden. Dazu werden J774A.1-Zellen auf eine Platte ausgesät, die vorher mit Coverslips bestückt wurde. Sie werden mit C3mPA und C3bot1E174Q in halb- bis stündlichem Abstand behandelt, damit die Aufnahme der Proteine im Verlauf sichtbar ist.

Die Zellen werden mit 0,5 ml kaltem PBS gewaschen und mit 0,5 ml 4 %-igem PFA für 20 min fixiert. Nach einem zweiten Waschschritt mit 0,5 ml PBS werden sie mit 0,45 ml 0,4 %-igem Triton-X für 10 min im Dunklen permeabilisiert. Es folgen drei weitere Waschschritte mit je 0,5 ml PBS und dann eine Behandlung mit 0,5 ml 100 mM Glycin für drei Minuten, um die Eigenfluoreszenz der Zellen zu unterdrücken. Nach drei weiteren Waschschritten wird 0,5 ml in PBS-T gelöstes, 5%iges Milchpulver in jedes Well gegeben und dann für 1 h im Brutschrank inkubiert. Als nächstes werden die Coverslips aus den Wells geholt und in eine feuchte Kammer gelegt. Diese besteht aus einer Kulturschale, in die ein gefaltetes und mit Wasser getränktes Papiertuch gelegt wird. Über dieses wird Parafilm gelegt. Nun werden die Coverslips mit 90  $\mu$ l des ersten Antikörpers, rabbit- $\alpha$ -C3, in einer Verdünnung von 1:200 für 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach werden die Glasplättchen einmal mit PBS gewaschen und wieder in die feuchte Kammer gelegt. Es folgt die Inkubation für eine Stunde unter Ausschluss von Licht mit dem Sekundärantikörper: goat-αrabbit. Dieser ist auf 1:200 verdünnt und für die Aufnahme mit dem Fluoreszenzmikroskop mit Alexa 647 versehen. Wieder sollte einmal mit PBS gewaschen werden. Auf die Coverslips wird dann für 10 min im Dunklen Hoechst, 1:10000 in PBS verdünnt, gegeben, um die Kerne der Zellen zu färben. Nun wird noch einmal mit PBS gewaschen, bevor die Coverslips mit Aqua-Poly/Mount auf die Objektträger geklebt werden. Diese müssen nun über Nacht im Dunklen bei Raumtemperatur trocknen. Danach können die Proben bei 4 °C gelagert werden. Innerhalb der nächsten Tage werden sie unter dem Konfokalmikroskop angesehen und fotografiert.

# 3 Ergebnisse

#### 3.1 Aufreinigung von His-PTS1 (C180)

Bei der Aufreinigung von His-PTS1 (C180) aus E. coli-Zelllysat sind verschiedene Waschschritte und mehrere Elutionen durchgeführt und die Eluate aufgefangen wurden. Das Ziel war, das gewünschte Peptid von Fremdproteinen zu reinigen und daraufhin von den Beads zu lösen. Es wurden mehrere Schritte dieser Aufreinigung als Proben durch SDS-PAGE aufgetrennt. Das Protein im Gel wurde mit Coomassie gefärbt, um die Reinheit der Proben beurteilen zu können (Abb. 2 a). Von einem zweiten Gel wurden die Proteine per Westernblot auf eine Membran übertragen. Anschließend wurden sie unspezifisch mit Ponceau S gefärbt, um die gleichmäßige Übertragung zu beurteilen (Abb. 2 b). Danach wurde die Membran separat mit Antikörpern gegen PTS1 und gegen His detektiert (Abb. 3). In der Coomassie- und Ponceau-Färbung waren viele Protein-Banden im Zelllysat zu erkennen, was durch die Waschschritte aber schnell abnahm. Im Eluat schien nur wenig Protein von den Beads gelöst worden zu sein. Doch in der Eluat-Fraktion 2 bei etwa 21 kDa erschien eine Bande. Bei 21 kDa würde die Bande von His-PTS1 (C180) erwartet werden. Es gab eine zweite Bande oberhalb dieser. Sie entsprach wahrscheinlich einer Verunreinigung, die anscheinend auch an die Beads gebunden und sich erst bei der Elution gelöst hatte. Auf dem Röntgenfilm zur Detektion von His-PTS1 (C180) zeigten sich viele unspezifische Bindungen im Zelllysat (Abb. 3 a). Im Verlauf der Aufreinigung wurden am ehesten die Banden von His-PTS1 (C180) immer deutlicher und damit vermutlich reiner. Jedoch bedeutete ihre Sichtbarkeit auch, dass His-PTS1 (C180) schon während der Waschschritte verloren ging. Die Detektion mit dem His-Antikörper zeigte das gleiche Bild (Abb. 3 b).



b)

Abb. 2 (a-b): Darstellung des Proteins aus der ersten Aufreinigung durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließende Coomassie- (a) und Ponceau-Färbung (b).

Mehrere Schritte der Aufreinigung wurden aufgefangen und mit SDS-PAGE aufgetrennt. Das Peptid im Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Die Bande bei etwa 21 kDa in der 2. Elution könnte der gesuchten Histidin-markierten Untereinheit des Pertussistoxins His-PTS1 (C180) (s. Pfeil) entsprechen. Die andere ist wahrscheinlich eine Verunreinigung. Die nach dem Blotten mit Ponceau S gefärbte Membran zeigt das gleiche Bild.



b)

Abb. 3 (a-b): Darstellung der Histidin-markierten Untereinheit des Pertussistoxins His-PTS1 (C180) aus der ersten Aufreinigung im Immunoblot zuerst mit einem  $\alpha$ -PTS1- (a), danach mit einem  $\alpha$ -His-Antikörper (b).

Im Immunoblot zeigt sich schon ein His-PTS1 (C180)-Verlust (grauer Kasten) während der Waschschritte. Doch in der Elution löst sich erneut eine größere Menge des gesuchten Proteins. Warum sich His-PTS1 (C180) als Doppelbande darstellt, ist unklar. (*Escherichia coli = E. coli*)

#### Konzentrationsbestimmung von His-PTS1 (C180)

Es wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA, sowie mit His-PTS1 (C180) hergestellt. Die Proben wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und eingescannt. Die Auswertung der Farbintensität mit Photoshop und Berechnung eines Konzentrationsgradienten ergab eine Konzentration von 72,29 ng/μl.

#### Aktivitätsbestimmung von His-PTS1 (C180)

Zuerst wurde ein CHO-Zelllysat, wie in 2.2.3 beschrieben, hergestellt. Dessen Konzentration wurde nach Bradford mit einem Photometer bestimmt (siehe 2.2.4). Da die Werte stark variierten, wurde die Messung nach erneutem Pipettieren wiederholt. Letztendlich ergab die Berechnung eine Konzentration von 4,2 µg/µl. Mit diesem Wert konnten nun die Proben wie in 2.2.3 für die SDS-PAGE hergestellt werden. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit Ponceau gefärbt. Die Banden und damit die Menge der Proteine erschienen sehr gleichmäßig, abgesehen natürlich vom Zelllysat der E. coli. Die Detektion mit Strep-POD zeigte in der Positivkontrolle mit gekauftem His-PTS1 (C180) und auch im Gesamtprotein der E. coli eine Bande bei etwa 40 kDa, was ADP-ribosylierten G-Proteinen entsprechen könnte. Es war keine Bande der gleichen Masse beim aufgereinigten His-PTS1 (C180) zu finden, was bedeutet hätte, dass es keine Aktivität besaß (Abb. 4). Um diesen Verlust zwischen Gesamtprotein und Eluat zu untersuchen, sollte dieser Versuch erneut mit einigen der Waschschritte zusätzlich untersucht werden, sowie eine Probevergiftung mit His-PTS1 (C180) auf CHO-Zellen durchgeführt werden (siehe 3.2, Abb. 10). Eventuell reichte die Aktivität für eine sichtbare Intoxikation der Zellen, auch wenn sie im Westernblot nicht nachweisbar war.



Abb. 4: Nachweis der Aktivität der Histidin-markierten Untereinheit des Pertussistoxin His-PTS1 (C180) im Westernblot mit Streptavidin-Peroxidase (Strep-POD) und Biotin.

Es wurde zuerst ein Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zelllysat vorbereitet. Mit diesem wurden verschiedene Proben hergestellt: 1. mit *C. botulinum*–Toxin C2I, 2. mit gekauftem His-PTS1, 3. mit dem Lysat der *Escherichia coli* (*E. coli*), 4. mit dem aufgereinigten His-PTS1 (C180) (Elution) und 5. Negativkontrollen mit einmal Biotin-Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) und zuletzt CHO-Lysat allein. Diese wurden mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und im Westernblot mit Strep-POD detektiert. PTS1 zeigte eine eindeutige Bande bei etwa 40 kDa. Bei dieser Masse würde man Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) (s. Pfeile) erwarten, die mit Hilfe von NAD und durch His-PTS1 Adenosindiphosphat(ADP)-ribosyliert wurden. Auch im *E. coli*-Zelllysat gab es eine Bande mit der erwarteten Masse von 40 kDa. In der Elution war dagegen keine solche Bande zu finden.

Eine erneute SDS-PAGE und ein Westernblot wurden durchgeführt mit mehreren Waschschritten. Es gab Banden bei 40 kDA, also auf Höhe des G-Proteins, bis zum Waschschritt 3 (Waschpuffer I mit Glycerin). Bei Waschschritt 6 (Waschpuffer I ohne Glycerin) war schon keine Aktivität mehr nachweisbar. Das heißt, die Aktivität ging bei der Aufreinigung verloren. Daher wurde entschieden, eine erneute Aufreinigung ohne den Waschpuffer I mit Glycerin durchzuführen.

Zur zweiten Aufreinigung wurde kein vorhandenes Peptid verwendet, sondern His-PTS1 (C180) in *E. coli* neu exprimiert. Die erneute Aufreinigung mit Ni-NTA-Beads wurde den Ergebnissen der vorherigen Aufreinigung angepasst. Es wurden weniger Waschschritte durchgeführt und der Waschpuffer I mit Glycerin weggelassen. Die Coomassie-Färbung des SDS-PAGE-Gels zeigte zwar ein weniger reines Protein, dafür war diesmal im Aktivitätsassay eine Aktivität, also eine Bande bei 40 kDa, im Eluat sichtbar (Abb. 5 a). Dagegen konnte im nachfolgenden Immunoblot kein Nachweis eines His-Tags bei His-PTS1 (C180) (Masse 21 kDa) gefunden werden. Der His-Tag in der Positivkontrolle mit gekauftem His-PTS1 (C180) war dagegen gut identifizierbar.

Weitere Versuche der Aufreinigung mit Talon- statt Nickel-NTA-Beads oder weitere Modifikationen des Aufreinigungsprotokolls erbrachten keine Verbesserung der Ergebnisse.



b)

Abb. 5 (a-b): Nachweis der Aktivität der Histidin (His)-markierten Untereinheit des Pertussistoxin His-PTS1 (C180) aus der zweiten Aufreinigung (a) und Nachweis des Vorhandenseins des His-getaggten Peptids durch  $\alpha$ -His-Antikörper (b).

Die zweite Aufreinigung wurde mit weniger Waschschritten durchgeführt. Die einzelnen Schritte wurden aufgefangen und mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Zum Aktivitätsnachweis wurde das Peptid in Chinese Hamster Ovary-Zelllysat mit Biotin-Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) und Streptavidin-Peroxidase (Strep-POD) inkubiert. PTS1 kann Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) Adenosindiphosphat(ADP)-ribosylieren mit Hilfe von NAD. Durch die Biotinverknüpfung kann es mit Strep-POD nachgewiesen werden. Die Detektion zeigt eine Bande bei 40 kDa, die erwartete Masse für die genannten G-Proteine (s. Pfeil).

His-PTS1 (C180) dagegen konnte mit einem  $\alpha$ -His-Antikörper auf dem gestrippten Aktivitätsblot nicht nachgewiesen werden. His-PTS1 (C180) besitzt eine Masse von etwa 21 kDa. Im Blot zeigte sich keine prominente Bande bei diesem Wert.

#### 3.2 Untersuchung der Funktion von C3mPA in Zellversuchen

In den Experimenten sollte untersucht werden, ob und wie effektiv Proteine über C3mPA transportiert werden können. Die Versuche wurden mit J774A.1- und RAW 264.7-Makrophagen durchgeführt, da C3 von diesen Zellen effektiv gebunden und aufgenommen wird (Barth et al. 2015).

Um die Bindungs- und Transportfähigkeit von C3mPA beurteilen zu können, wurden die Versuche immer zusammen mit anderen, schon bekannten Toxinen, durchgeführt. So zeigten die Versuche, dass PA verschiedene enzymatische Komponenten, ob verwandt oder nicht, sehr effektiv in die Zellen schleuste und zu einer charakteristischen Morphologieänderung führte. Makrophagen imponieren rund bis oval mit einer glatten Oberfläche und können zarte Ausläufer bilden. Nach Kontakt des Zellinneren mit einem Chimärenprotein aus Letalfaktor und Diphtherietoxin A (LFnDTA) werden sie kleiner und die Oberfläche rauer und unregelmäßiger. Wurde das Histidin-markierte C. botulinum-Toxin His-C2I verwendet, vergrößerten sie sich, wurden flacher, entrundeten und konfluierten (Abb. 6). Ebenfalls schien sich die Brechung des Lichts vom Mikroskop in den Zellen zu ändern. Weiterhin fanden sich Zelltrümmer und eine verringerte Zellzahl in einigen Positivkontrollen vor allem nach langer Beobachtungszeit. Wurde C3mPA verwendet statt PA, zeigte sich fast nie eine der typischen Morphologieänderungen. Zum Beispiel in Abbildung 6 bei J774A.1 mit C3mPA+His-C2I kann man hauptsächlich gesunde Makrophagen beobachten, aber auch einige, die etwas von der C2I-Morphologie besitzen. Allerdings ist dies C2I. wahrscheinlich ein Eigeneffekt von Auch in dem Well ohne Transportkomponente wie PA, scheint His-C2I einige Zellen vergiftet zu haben. Der Effekt war bei Zugabe von C3mPA nicht größer. In Abbildung 7 werden die Vergiftungsreaktionen miteinander verglichen, nach dem Auszählen der Zellen mit ImageJ und der Auswertung mit Graphpad. Die Auswertungen zeigten, dass die Chimäre C3mPA den Erwartungen nicht entsprach. Anscheinend konnte sie keine der enzymatischen Komponenten, also weder LFnDTA, noch His-C2I, in die Zellen transportieren, da kaum mehr Zellen als in der Kontrolle vergiftet wurden. Eindeutig ist, dass es nie die Transportkapazität der anderen B-Komponenten erreichte.

Nach den Versuchen mit LFnDTA und His-C2I, wurde noch eine weitere A-Komponente getestet. Als nächstes wurden J774A.1 mit His-TccC3 in Verbindung mit

42

PA oder C3mPA inkubiert. Die mit His-TccC3 inkubierten Makrophagen veränderten sich ähnlich derer mit His-C2I-Intoxikation. Sie zeigten sich flacher, entrundet und bildeten zusätzlich kleine Abschnürungen an der Zellmembran. Doch auch hier konnte C3mPA keinen Transport in die Zellen nachweisen. Teilweise war die Anzahl der vergifteten Zellen mit His-TccC3 allein größer als mit der Chimäre C3mPA zusammen.

Eine weitere Überlegung war, ob die J774A.1-Zelllinie der Grund dafür sein könnte, dass die Vergiftungen mit C3mPA nicht funktionierten. Daher wurden die Versuche mit RAW 264.7-Makrophagen wiederholt, deren Morphologie der J774A.1-Morphologie sehr ähnlich ist. Jedoch ergaben die Versuche die gleichen Ergebnisse wie mit J774A.1 (Abb. 9).

Ein weiterer interessanter Versuch war, ob sich das wie in 2.2.2 beschrieben präparierte His-PTS1 (C180) in die Zellen transportieren lässt und eine Vergiftungsmorphologie hervorrufen kann. Doch hier zeigte sich weder mit PA noch mit C3mPA eine Morphologieänderung der Makrophagen (Abb. 10). Laut Locht et al. (1995) führt die Inkubation mit Pertussistoxin zu einer Hemmung der Migration. Diese konnte in diesem Versuchsaufbau nicht nachvollzogen werden. Jedoch scheint es dagegen keine makroskopisch sichtbare Veränderung der Zellen zu geben. Ein später durchgeführter Vergiftungsversuch zeigte, dass auch PT als Holotoxin keine Änderung der Morphologie in J774A.1 verursacht (Daten nicht gezeigt) und deshalb wahrscheinlich auch PA+His-PTS1 (C180) eine solche nicht auslösen kann. Daher wurden CHO-Zellen für weitere Versuche mit PT und His-PTS1 (C180) verwendet. Bei Kontakt mit PT bilden die CHO-Zellen Cluster, was schon 1995 von Locht et al. beschrieben wurde, und wir in dem Versuch bestätigen konnten. Diese Reaktion hatten wir auch bei His-PTS1 (C180) zusammen mit PA erwartet. Doch bei den damit inkubierten Zellen waren keine Cluster zu erkennen (Abb. 10).



J774A.1 ohne Toxin



J774A.1 mit PA+LFnDTA



J774A.1 mit PA+His-C2I



J774A.1 mit C3mPA+LFnDTA



J774A.1 mit C3mPA+His-C2I

Abb. 6: Analyse der Morphologie von J774A.1-Makrophagen mit Phasenkontrastmikroskopie nach Inkubation mit einem Chimärenprotein aus Letalfaktor und Diphtherietoxin A (LFnDTA) bzw. dem Histidin-markiertem *C. botulinum*-Toxin His-C2I.

Die Zellen wurden in Mikrotiterplatten in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) zwei Tage wachsen gelassen und anschließend mit verschiedenen Toxinen über mehrere Tage inkubiert und unter dem Mikroskop fotografiert. Hier gezeigt sind die Zellen nach 24 h Inkubation mit 100 nM C3mPA (Chimäre aus Clostridien-Toxin C3 und Protektivem Antigen(PA)), 200 nM His-C2I, 15 nM LFnDTA und 10 nM PA.



Abb. 7: Quantitative Auswertung der Morphologieänderung von J774A.1-Makrophagen nach Inkubation mit einem Chimärenprotein aus Letalfaktor und Diphtherietoxin A (LFnDTA) bzw. *C. botulinum*-Toxin His-C2I.

Die in Abb. 6 gezeigten Zellbilder wurden im Anschluss mit ImageJ ausgezählt, mit Graphpad ausgewertet und graphisch dargestellt. Die enzymatischen Komponenten LFnDTA und C2I bewirkten zu fast 100% eine typische Morphologieänderung von J774A.1, wenn Protektives Antigen (PA) anwesend war. Bei Inkubation mit einer enzymatischen Komponente zusammen mit einer Chimäre aus Clostridien-Toxin C3 und Protektivem Antigen (C3mPA) änderte sich die Morphologie bei 0 % bis 25 % der Zellen.



J774A.1 mit C3mPA+His-TccC3



J774A.1 mit PA+His-TccC3



Abb. 8: Auswertung der Morphologieänderung von J774A.1-Makrophagen nach Inkubation mit einem Histidin-markierten Toxin von *Photorhabdus luminescens* (His-TccC3).

Die Zellen wurden mit 2,5 x10<sup>5</sup> Zellen auf eine Platte ausgesät und zwei Tage wachsen gelassen. Dann wurden das Medium gewechselt und die Toxine dazugegeben. C3mPa (Chimäre aus Clostridien-Toxin C3 und Protektivem Antigen): 800 nM, His-TccC3: 100 ng/ml, PA (Protektives Antigen): 500 ng/ml. Die Zellen wurden nach 4 h Inkubationszeit fotografiert. PA+His-TccC3 zeigte eine eindeutige Vergiftungsmorphologie. Die anderen Kombinationen waren vergleichbar mit der Kontrolle. Die Aufnahmen der Zellen wurden mit ImageJ und Graphpad ausgewertet. Es ergab sich das folgende Bild: PA+His-TccC3 vergiftete sehr schnell, die anderen Kombinationen auch nach längerer Inkubationszeit kaum. His-TccC3 allein zeigte nach 24h einen starken Eigeneffekt, sogar stärker als mit C3mPA zusammen.



Abb. 9: Auswertung der Morphologieänderung von RAW 264.7-Makrophagen nach 8 h Inkubation mit einem Histidin-markierten Toxin von *Photorhabdus luminescens* (His-TccC3).

Die Zellen wurden zwei Tage vorher mit 3x10<sup>5</sup> Zellen auf einer Platte ausgesät. Nach dem Mediumwechsel wurden 400 nM C3mPA (Chimäre aus Clostridien-Toxin C3 und Protektivem Antigen), 100 ng/ml His-TccC3 und 500 ng/ml PA (Protektives Antigen) hinzugefügt. Nach 8 h Inkubationszeit zeigte sich Folgendes: Mit PA+His-TccC3 veränderten die RAW 264.7-Zellen ihre Morphologie, wogegen die mit C3mPA+His-TccC3 inkubierten Zellen keine eindeutige Reaktion zeigten. Dies bestätigte auch die Auswertung mit ImageJ und Graphpad (unten rechts).



CHO ohne Toxin



CHO mit PA+His-PTS1 (C180)



CHO mit PT



J774A.1 mit PA+His-PTS1 (C180)

Abb. 10: Beobachtung von Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen und J774A.1-Makrophagen nach Inkubation mit Pertussistoxin (PT) oder der Histidin-markierten Untereinheit des Pertussistoxins (His-PTS1).

CHO-Zellen wurden zwei Tage vor der Vergiftung mit 3 x10<sup>5</sup> Zellen/Platte ausgesät. Sie wurden nach 27 h Inkubation mit 1 oder 10 µg/ml His-PTS1 (C180) und 500 ng/ml PA (Protektives Antigen) oder 10 ng/ml PT allein inkubiert und dann unter dem Mikroskop fotografiert. Die Inkubation mit PT bewirkte eine Häufung der CHO-Zellen. Andere Kombinationen ergaben keinen Unterschied zur Kontrolle, in der ein dichter Zellrasen zu erkennen ist. Rechts unten: 3 x10<sup>5</sup> J774A.1/Platte wurden nach 2 Tagen Wachstum und 5 h Inkubation mit PA und His-PTS1 (C180) (5 µl der Aufreinigung) fotografiert.

#### 3.3 Untersuchung der Bindung von C3mPA an die Oberfläche von J774A.1

Um herauszufinden, warum C3mPA die anderen Toxinbestandteile nicht oder nur gering transportierte, wurden weitere Versuche durchgeführt. Zuerst wurde die Frage gestellt, ob C3mPA überhaupt an J774A.1 binden kann. Um dies zu beantworten, wurde ein Bindungsassay durchgeführt.

Dazu wurden J774A.1 mit C3mPA oder C3bot auf Eis inkubiert, damit die Zellen die Toxine nicht aufnehmen, sondern nur auf der Oberfläche binden. Vor dem Abkratzen der Zellen wurden sie noch mit PBS gespült, um nicht gebundenes Toxin zu entfernen. Mit den inkubierten Zellen und den Toxinen einzeln als Positivkontrollen wurden Proben für die SDS-PAGE hergestellt und aufgetrennt. Der daraufhin durchgeführte Westernblot zeigte, dass C3mPA, sowie C3bot, an J774A.1 binden konnte. In den Proben mit Zellen waren eindeutig einzelne Banden auf der gleichen Höhe wie in den Positivkontrollen zu sehen. Bei C3bot entsprach dies 25 kDa. C3mPA lief etwas höher als erwartet bei etwa 100 kDa, statt 88 kDa. Eventuell hatte hier eine beginnende Polymerisation stattgefunden.



Abb. 11: Untersuchung der Bindung der Chimäre aus Clostridien-Toxin C3 und Protektivem Antigen (C3mPA) an die Oberfläche von J774A.1-Makrophagen durch Immunoblot.

J774A.1 wurden mit C3mPA oder mit *C. botulinum*-Toxin C3bot auf Eis inkubiert, da die Zellen bei einer Temperatur unter 4 °C die Toxine kaum aufnehmen, sondern hauptsächlich auf der Oberfläche binden. Die Zellen wurden gespült, um nicht gebundenes Toxin zu entfernen. Die inkubierten Zellen und die Toxine (einzeln als Positivkontrollen) wurden durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. Der Westernblot mit C3-Antikörper (rabbit- $\alpha$ -C3 1:3000, goat- $\alpha$ -rabbit 1:2500) zeigte, dass C3mPA an J774A.1 gebunden hat. C3mPa hat eine Masse von etwa 88 kDa.

#### 3.4 Untersuchung der Bindungsspezifität von C3mPA an der Zelloberfläche

Um die spezifische Bindung von C3mPA an Zellen zu untersuchen, wurde folgender Versuch durchgeführt. J774A.1 wurden zuerst mit C3bot1E174Q, einem inaktivierten C3-Toxin, im Überschuss und dann mit C3mPA inkubiert. Die Chimäre sollte nicht mehr binden können, da alle Bindungsstellen mit C3bot1E174Q gesättigt sein sollten. Wie der Westernblot in Abbildung 12 zeigte, war es gelungen, diese Überlegung zu verifizieren. C3bot1E174Q hat eine Masse von etwa 25 kDa und C3mPA von etwa 88 kDa. Die Zellen, auf die zuerst C3bot1E174Q und danach C3mPA gegeben wurde, enthalten nur C3bot1E174Q, da alle Bindungsstellen besetzt waren und C3mPA mit PBS wieder abgewaschen wurde. Die Probe, die nur J774A.1 enthielt, zeigte keine Proteine, die mit dem C3-Antikörper kreuzreagierten und damit das Ergebnis verfälschen konnten.



Abb. 12: Analyse der Bindung der Chimäre aus Clostridientoxin C3 und Protektivem Antigen (C3mPA) in Kompetition mit einem bestimmten, inaktivem Abschnitt des Clostridientoxins C3 (C3bot1E174Q) auf J774A.1-Makrophagen im Immunoblot mit  $\alpha$ -C3-Antikörper.

J774A.1 wurden mit verschiedenen Toxinen inkubiert: 10  $\mu$ M C3bot1E174Q, 100 nM C3mPA und einmal zuerst mit 10  $\mu$ M C3bot1E174Q und dann zusammen mit 100 nM C3mPA. C3mPA war in der dritten genannten Probe nicht darstellbar, da alle Bindungsstellen mit C3bot1E174Q gesättigt waren und C3mPA im nächsten Schritt von den Zellen abgewaschen werden konnte. Die Positivkontrollen, in denen sich allein das jeweilige Toxin befand, sollten zur Verifikation der Toxine in den Zellfraktionen dienen. Die Proben wurden mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und anschließend im Immunoblot mit einem  $\alpha$ -C3- Antikörper (rabbit- $\alpha$ -C3 1:5000 und goat- $\alpha$ -rabbit 1:10000) detektiert.

# 3.5 Darstellung der Internalisierung von C3mPA in J774A.1 mit Immunfluoreszenzmikroskopie

Als nächsten Schritt galt es herauszufinden, ob C3mPA von den J774A.1 nicht nur gebunden, sondern auch aufgenommen wurde. J774A.1 wurden mit C3mPA und als Kontrolle mit C3bot1E174Q inkubiert, dann auf Glasplättchen fixiert und zum Schluss mit fluoreszierenden Antikörpern für die Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht. Der gewählte Antikörper sollte C3 in rot markieren. Es wurde davon ausgegangen, dass bereits nach einer Stunde eine Aufnahme in die Zellen stattfindet. Zu sehen war allerdings, dass sich die mit C3mPA oder C3bot1E174Q inkubierten Zellen nach einer Stunde Inkubation kaum von der Negativkontrolle ohne Toxine unterschieden (s. Abb. 13). In allen drei Proben, also auch in der Negativkontrolle, war das Zytosol vergleichbar rot gefärbt. Eventuell gab es Kreuzreaktionen des Antikörpers mit Zellbestandteilen, weswegen auch die Negativkontrolle rot markiert war. Nach 2 h Inkubation wurde das C3-Signal in den Proben mit C3bot1E174Q und C3mPA stärker als in der Kontrolle. Offensichtlich war eine längere Inkubationszeit nötig, um die Toxine in nachweisbarem Maße aufzunehmen. J774A.1 waren also in der Lage, C3mPA zu internalisieren.

Der Versuch wurde mit einem anderen  $\alpha$ -C3-Antikörper wiederholt, der grün fluoresziert. Es zeigte sich hierbei problematisch, dass Hoechst zur Anfärbung des Zellkerns in einer ähnlichen Wellenlänge emittierte wie der C3-Antikörper. Es konnte nicht eindeutig beurteilt werden, ob das Signal vom C3-Antikörper oder von der Hoechst-Färbung stammte.

In diesem Versuch konnte nicht beurteilt werden, ob sich C3mPA im Zytosol oder in Endosomen befand. Die diffuse Verteilung des Signals um den Zellkern herum könnte auf eine Verteilung im Zytoplasma schließen lassen.



Abb. 13: Darstellung der Internalisierung der Chimäre aus Clostridien-Toxin C3 und Protektivem Antigen (C3mPA) in J774A.1-Makrophagen mit dem Fluoreszenzmikroskop.

J774A.1 wurden mit 3 x10<sup>5</sup> Zellen ausgesät und mit 3 µg/ml C3bot1E174Q (einem bestimmten, inaktivem Abschnitt des Clostridientoxins C3) oder 3 µg/ml C3mPA jeweils für 0,5, 1 und 2 h inkubiert. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd, Triton X und Glycin behandelt und dann in eine feuchte Kammer übertragen. Dort wurden sie mit rabbit- $\alpha$ -C3 (1:200) und mit einem fluoreszierenden goat- $\alpha$ rabbit-Antikörper (1:200) inkubiert. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. Danach konnten die behandelten J774A.1 unter dem Fluoreszenzmikroskop dargestellt werden. Nach 2 h Inkubation mit den Toxinen C3bot1E174Q und C3mPA verstärkte sich das rote C3-Signal um den Zellkern.

# 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich His-gekoppelte Proteine über PA und die PA-Chimäre C3mPA transportieren lassen. Die Ergebnisse von Beitzinger et al. (2012) konnten bestätigt werden, dass Wildtyp-PA His-C2I effektiv in Zellen transportieren kann. Auch ein zweites His-gekoppeltes Protein, His-TccC3, zeigte im Vergiftungsversuch, dass es sich schnell über PA in die jeweiligen Zellen transportieren ließ und seine enzymatische Aktivität entfalten konnte. Für das zu untersuchende Protein His-PTS1 konnte ein Transport über Wildtyp-PA jedoch nicht gezeigt werden. Weiterhin konnte ein Transport über den zu untersuchenden Transporter C3mPA für keines der His-getaggten Proteine nachgewiesen werden.

Bei der ersten Aufreinigung schien His-PTS1 (C180) seine Aktivität verloren zu haben. Es ist zumindest nicht gelungen, diese im Westernblot mit Biotin-NAD und Strep-POD nachzuweisen. Dies könnte vielleicht daran liegen, dass zu wenig Protein in der Elution gesammelt werden konnte, da schon während der Waschschritte His-PTS1 (C 180) verloren zu gehen schien. Wobei hier auch die Frage gestellt werden muss, warum sich der His-Tag schon bei geringer Imidazol-Konzentration von der Ni-NTA-Matrix gelöst hat. Andererseits könnte die Ursache der fehlenden Aktivität auch im His-Tag selber liegen. Es ist vorstellbar, dass der Tag die Funktion beeinträchtigt, obwohl dies aufgrund der geringen Größe unwahrscheinlich erscheint. Eventuell ist der His-Tag aber auch von PTS1 (C 180) zum Beispiel durch Enzyme der E. coli-Bakterien abgespalten worden, was den Verlust des (His-)PTS1 schon während der Waschschritte erklären könnte. Was diese These erhärtet, ist der nicht nachweisbare His-Tag in der zweiten Aufreinigung. In der Elution zeigte sich im Westernblot mit dem His-Antikörper kein Signal auf der erwarteten Höhe, weswegen vermutet wurde, dass dieser abgespalten worden war. Ob dieser durch bakterielle Proteasen der E. coli oder durch die Aufreinigung abgespalten wurde, konnte im Rahmen der durchgeführten Experimente nicht beurteilt werden. Im Westernblot der ersten Aufreinigung war ein Signal mit der erwarteten Masse von His-PTS1 von etwa 21 kDa mit dem His-Antikörper zu finden, allerdings ist es im Nachhinein fraglich, ob dieses Signal nicht noch vom vorherigen Immunoblot mit PTS1-Antikörper stammte. Eventuell wurde die Bindung zum PTS1-Antikörper mit dem Stripping-Puffer nicht

ausreichend gelöst. In der zweiten Aufreinigung konnte dann doch eine Aktivität im Westernblot nachgewiesen werden. Allerdings befanden sich im Eluat viele Verunreinigungen, da weniger Waschschritte durchgeführt wurden. Ein weiteres Problem war, wie schon weiter oben beschrieben, dass kein His-Tag nachzuweisen war, was den Transport über die PA-Pore unmöglich macht.

In Vergiftungsexperimenten konnte keine Funktion der aufgereinigten, enzymatischen Komponente des Pertussistoxins gezeigt werden. Die Kombination mit PA transportierte im gleichen Versuch andere A-Untereinheiten in die CHO-Zellen, da eine morphologische Veränderung der Zellen zu beobachten war. Daher ist davon auszugehen, dass PA funktionierte, aber His-PTS1 keine enzymatische Aktivität vermittelte.

Die zweite Herangehensweise an das Thema war, die Möglichkeiten des PA-Transports zu untersuchen. Um den Transport zu modulieren und spezifizieren, wurde, wie in der Einleitung genannt, C3mPA hergestellt. Es sollte gezielt an Makrophagen und Monozyten binden und Proteine über die PA-Pore in das Zytosol transportieren. Dazu wurden verschiedene Vergiftungsversuche durchgeführt und A-Untereinheiten verschiedener Toxine mit C3mPA kombiniert. Jedoch konnten die Enzyme, wie His-C2I und His-TccC3, nie ihre Wirkung entfalten, wie sie es in den Kontrollen mit PA taten. Das heißt, es wurde keine vergleichbare Änderung der Zellmorphologie beobachtet. Auch eine Modifikation der Versuche in der Toxinkonzentration oder eine Änderung des Zelltyps (J774A.1, RAW 264.7) erbrachte keine Verbesserung der Ergebnisse.

Dmochewitz et al. war es 2013 gelungen, eine Chimäre aus C3bot1E174Q und C2I in *E. coli* herzustellen und zu reinigen. Im Zellexperiment zeigten die mit der Chimäre inkubierten J774A.1 und RAW264.7 die typische C2I-Vergiftungsmorphologie. Das heißt, wahrscheinlich war C2I durch die Bindung an C3bot1E174Q ins Zytoplasma transportiert worden.

Nun wurde beim Transport von His-getaggten Proteinen über C3mPA noch ein Schritt weiter gegangen. Es müssen mehr Voraussetzungen zutreffen, damit dieser Versuch erfolgreich ist. Wenn von der eben genannten Publikation ausgegangen wird, funktioniert die Bindung und Internalisierung von C3 als Chimäre. Weitere Voraussetzungen wären dann, dass PA mit dem daran gebundenen C3

54

oligomerisieren und eine funktionstüchtige Pore bilden kann. Weiterhin muss das His-getaggte Protein an PA gebunden haben, um sich in demselben Endosom zu befinden. Danach muss es dem His-getaggten Protein gelingen, durch die PA-Pore ins Cytosol zu gelangen.

In der Arbeit von Zahav et al. von 2017 wird beschrieben, dass der Transport über ein chimäres PA eindeutig möglich war. Es wurde zum einen eine PA-Mutante hergestellt, die z. B. an EGF (Epidermal growth factor) gebunden wurde für die Rezeptorspezifität. Zum anderen wurde die PA-bindende Domäne von LF mit dem enzymatisch aktiven Teil des TccC3-Toxins gekoppelt (LFN-C3). In Zellversuchen zeigten Zellen, die mit EGF-gekoppeltem mPA in Kombination mit LFN-C3 inkubiert wurden, eine Vergiftungsmorphologie. Zellen mit einer hohen EGF-Rezeptor-Dichte waren viel stärker betroffen als an andere Zellen. Hieraus kann wahrscheinlich geschlossen werden, dass 1. die mPA-Chimäre rezeptorspezifisch war, 2. in Chimärenform eine funktionsfähige Pore bilden konnte, über die 3. LFN-C3 in das Zytosol geschleust wurde und 4. war der Teil von TccC3 mit Bindung an LFN weiter aktiv. In diesem Versuch trafen anscheinend alle o. g. Voraussetzungen zu. Warum diese Kombination erfolgreich war im Gegensatz zu der in vorliegender Arbeit, ist bisher unklar.

Was bei der Auswertung der Zellmorphologie in dieser Arbeit teilweise auffiel, war, dass die mit C3mPA+A-Komponente vergifteten Zellen vermehrt größere Vakuolen ausbildeten. Bei Kombinationen mit PA+A-Komponente konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden. Eine Vermutung hierzu ist, dass C3mPA und das jeweilige Enzym von den Zellen endozytiert werden, weshalb sich die sichtbaren Vakuolen bilden, dann aber aus einem noch unbekannten Grund in den Endosomen verbleiben. Die A-Komponenten wandern danach nicht in das Zytosol und gelangen daher nicht zu ihrem Substrat und lösen deshalb auch nicht die typische Morphologieänderung aus. Eine weitere Beobachtung war, dass His-TccC3 bei längerer Inkubation (spätestens nach 24 h) einen starken Eigeneffekt zeigte. Das heißt, dass die Zellen die typische Vergiftungsmorphologie annahmen, obwohl keine Transportkomponente vorhanden war. Anscheinend wurde His-TccC3 von den Zellen aufgenommen und gelangte ins Zytosol. Ähnliches konnten Khandia et al. 2017 für LF zeigen. LF konnte in ihren Versuchen wie gewohnt in Kombination mit PA seine intrazelluläre Wirkung entfalten. Weiterhin wurde jedoch beobachtet, dass LF auch eigenständig und PA-unabhängig seine Wirkung auf Tumorzellen vermittelt. Sie untersuchten u. a. primäre duktale Mammakarzinom-Zellen. Sie konnten jedoch nicht klären, ob LF durch rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen wird und intrazellulär an Enzyme bindet oder ob es an transmembranäre Enzyme von extrazellulär bindet, welche die Wirkung durch Signaltransduktion nach intrazellulär verlagern. Auf Letzteres weist zumindest hin, dass der transmembranäre c-MET-Rezeptor eine starke Affinität LF gegenüber zeigte.

Interessanterweise war dieser Effekt, wenn His-TccC3 zusammen mit C3mPA inkubiert wurde, in mehreren Versuchen sichtlich verringert. Es erweckte den Eindruck, als ob C3mPA die Aufnahme der A-Komponente ins Zytosol nicht nur nicht unterstützen, sondern sogar verhindern würde. Was auch zu der Annahme passen würde, dass C3mPA und die jeweilige A-Komponente in den Endosomen "stecken bleiben".

Um die Ursache zu finden, warum C3mPA in den beschriebenen Versuchen keine Transportfunktion zeigte, wurden weitere Experimente durchgeführt. Als erstes wurde untersucht, ob C3mPA überhaupt an die gewünschten Zellen bindet. Der dazu durchgeführte Bindungsassay ergab, dass C3mPA keine Probleme mit der Bindung an die Zielzellen aufweist. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass C3mPA sehr wahrscheinlich an den C3-Rezeptor bindet, da C3bot1E174Q im Überschuss die Bindung von C3mPA verhindert oder zumindest die Bindung verringert. Als nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob der Komplex aus C3 und mPA in die Zellen aufgenommen werden kann. Dazu war ein komplexerer Versuch nötig. Die Immunfluoreszenz sollte zeigen, ob C3mPA den Weg in die Zelle bewältigen kann. Anhand der Bilder ist es wahrscheinlich, dass es sich nach der Inkubation innerhalb der Zellen befindet. Auch Lillich et al. hatten 2012 in ihren Versuchen mit C3-Streptavidin gezeigt, dass C3, gekoppelt an andere Proteine, das Zytosol der Zielzellen erreichte.

Da die Ergebnisse und die Literatur für die Funktionalität des C3 sprechen, muss der nächste Schritt sein, den PA-Teil im C3mPA zu überprüfen. Wie oben schon erwähnt, ist hier die Frage, ob PA –an ein anderes Protein gekoppelt- noch oligomerisieren kann. Dafür sprechen wie schon oben genannt die Versuche von Zahav et al. Weiterhin haben auch Mechaly et al. 2012 indirekt bewiesen, dass PA sehr wohl Heptamere und damit eine Pore bilden kann. In Zellversuchen und im Westernblot wurde gezeigt, dass Proteine wie LFnDTA über eine an EGF-gekoppelte PA-Mutante ins Zytosol transportiert werden konnten. Daher kann man davon ausgehen, dass die Funktionalität von PA nicht grundsätzlich durch fusionierte Proteine gestört wird.

Die Arbeitsgruppe um Christopher Bachran und Stephen H. Leppla benutzte einen ganz anderen Weg, um PA spezifisch an Zellen binden zu lassen. Durch kleine Veränderungen sollte PA nicht mehr durch Furin-, sondern nur noch durch andere Proteasen z. B. Urokinase oder Matrix-Metalloproteasen gespalten werden (Bachran C, Leppla SH, 2016). So könnten tumorspezifische Proteasen ausgewählt werden, sodass PA nur noch von bestimmten Tumorzellen gespalten und aufgenommen werden kann. Dagegen kommt Furin auf fast allen Zelltypen vor.

Schlussendlich bleiben einige Fragen offen: Befindet sich die Chimäre nach der Internalisierung im Zytosol oder in den Endosomen? Kann PA in Verbindung mit C3E174Q oligomerisieren und eine funktionstüchtige Pore ausbilden? Können Hisgetaggte Proteine über die C3mPA-Pore transportiert werden?

In den oben genannten Veröffentlichungen von Mechaly et al. und Zahav et al. konnte gezeigt werden, dass die Bildung der PA-Pore auch mit einem gekoppelten Protein (jeweils EGF) möglich ist. Allerdings ist diese Beobachtung wahrscheinlich nicht einfach auf C3mPA übertragbar. Weiterhin wurden an LF gekoppelte Proteine transportiert, jedoch keine His-getaggten Proteine. Dabei konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass der Transport von His-getaggten Proteinen über Wildtyp-PA möglich ist. Wo liegt nun der Unterschied zwischen EGF-gekoppeltem PA und C3mPA als Transporter für verschiedene Proteine? Wäre ein Transport von Hisgetaggten Proteinen über die EGF-PA-Chimäre möglich gewesen?

Diese Fragen geben Anlass für weitere interessante Forschung am komplexen und vielversprechenden Gebiet der AB-Toxine und ihrem Nutzen als Transporter von der Zellmembran ins Zytosol und Auslöser spezifischer intrazellulärer Reaktionen.

57

# 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Transport Histidin (His)-markierter Proteine über Protektives Antigen (PA) und an C3 gekoppeltes, mutiertes PA (C3mPA) untersucht. Dabei wurde bestätigt, dass der Transport von His-markierten Proteinen, in dieser Arbeit His-C2I (Toxinanteil von *Clostridium botulinum*) und His-TccC3 (Toxinanteil von *Photorhabdus luminescens*), über PA in das Zytosol effektiv funktioniert. In Zellversuchen mit J774A.1 und RAW 264.7 (zwei Makrophagen-Zelllinien) konnte dies anhand der Morphologieänderung der Zellen nachgewiesen werden. Allerdings konnte dieses Ergebnis nicht auf His-PTS1 (His gekoppelter, enzymatisch aktiver Teil des Pertussistoxins) übertragen werden. Das verwendete und im Verlauf angepasste Aufreinigungsprotokoll erbrachte ein His-PTS1-Peptid, welches entweder keine Aktivität aufwies oder durch weitere Proteine verunreinigt war. Anscheinend ist der sonst viel verwendete His-Tag nicht die optimale Aufreinigungsmethode für PTS1.

Auch der Transport von His-markierten Proteinen über den untersuchten Transporter, die Chimäre C3mPA, konnte im Zellversuch nicht verwirklicht werden. Die mit C3mPA und einer enzymatischen Komponente vergifteten Zellen zeigten keine typische Morphologieänderung wie in den Kontrollen mit Wildtyp-PA. Die daraufhin durchgeführten Versuche sprechen allerdings dafür, dass C3mPA zumindest an den Zielzellen binden kann und die Immunfluoreszenz zeigte, dass es in die Zellen auch aufgenommen wurde. Jedoch müssen noch weitere Versuche durchgeführt werden, um herauszufinden, warum ein Transport über C3mPA unter diesen experimentellen Bedingungen nicht möglich war.

# 6. Literaturverzeichnis

- Bachran C, Leppla SH: Tumor Targeting and Drug Delivery by Anthrax Toxin. Toxins 2016; 8(7):197.
- 2. Barbieri JT, Cortina G: ADP-ribosyltransferase mutations in the catalytic S-1 subunit of pertussis toxin. Infection and Immunity 1988; 56(8): 1934-1941.
- 3. Barth H, Aktories K: New insights into the mode of action of the actin ADPribosylating virulence factors *Salmonella enterica* SpvB and *Clostridium botulinum* C2 toxin. European Journal of Cell Biology 2011; 90(11): 944–950.
- Barth H, Aktories K, Popoff MR, Stiles BG: Binary Bacterial Toxins: Biochemistry, Biology, and Applications of Common *Clostridium* and *Bacillus* Proteins. Microbiology and Molecular Biologie Review 2004; 68(3): 373–402.
- Barth H, Fischer S, Möglich A, Förtsch C: Clostridial C3 Toxins Target Monocytes/Macrophages and Modulate Their Functions. Frontiers in Immunology 2015; 6: 339.
- Beitzinger C, Stefani C, Kronhardt A, Rolando M, Flatau G, Lemichez E, Benz R: Role of N-Terminal His6-Tags in Binding and Efficient Translocation of Polypeptides into Cells Using Anthrax Protective Antigen (PA). PLoS ONE 2012; 7(10): 1-12.
- Brito GA, Souza MH, Melo-Filho AA, Hewlett EL, Lima AA, Flores CA, Ribeiro RA: Role of pertussis toxin A subunit in neutrophil migration and vascular permeability. Infection and Immunity 1997; 65(3): 1114-1118.
- Dmochewitz L, Förtsch C, Zwerger C, Vaeth M, Felder E, Huber-Lang M, Barth H: A Recombinant Fusion Toxin Based on Enzymatic Inactive C3bot1 Selectively Targets Macrophages. PLoS ONE 2013; 8(1), e54517.
- 9. Fahrer J, Kuban J, Heine K, Rupps G, Kaiser E, Felder E, Benz R, Barth H: Selective and specific internalization of clostridial C3 ADP-ribosyltransferases into macrophages and monocytes. Cellular Microbiology 2010; 12: 233–247.
- 10. Fuentes AC, Szwed E, Spears CD, Thaper S, Dang LH, Dang NH: Denileukin Diftitox (Ontak) as Maintenance Therapy for Peripheral T-Cell Lymphomas: Three cases with Susained Remission. Case Reports in Oncological Medicine 2015, 123756.

- Gatsogiannis C, Merino F, Prumbaum D, Roderer D, Leidreiter F, Meusch D, Raunser S: Membrane insertion of a Tc toxin in near-atomic detail. Nature Structural & Molecular Biology 2016; 23(10): 884–890.
- 12. Hof H, Dörries R: Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie 2009, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. S. 340-341.
- 13. Khandia R, Pattnaik B, Rajukumar K, Pateriya A, Bhatia S, Murugkar H, Prakash A, Pradhan H, Dhama K, Munjal A, Joshi S: Anti-proliferative role of recombinant lethal toxin of *Bacillus anthracis* on primary mammary ductal carcinoma cells revealing its therapeutic potential. Oncotarget 2017; 8(22): 35835-35847
- 14. Klingst M, Angriff aus dem Labor, Zeit Nr. 33 (2008)
- 15. Lang AE, Schmidt G, Schlosser A, Hey TD, Larrinua IM, Sheets JJ, Mannherz HG, Aktories K: Photorhabdus luminescens Toxins ADP-Ribosylate Actin and RhoA to Force Actin Clustering. SCIENCE 2010; 327(5969): 1139-1142.
- 16. Lang AE, Schmidt G, Sheets JJ, Aktories K: Targeting of the actin cytoskeleton by insecticidal toxins from *Photorhabdus luminescens*. Naunyn-Schmiedeberg's Archive Pharmacology 2011; 383(3): 227–235.
- Lehmann M, Fournier A, Selles-Navarro I, Dergham P, Sebok A, Leclerc N, Tigyi
   G, McKerracher L: Inactivation of Rho signaling pathway promotes CNS axon regeneration. Journal of Neuroscience 1999; 19(17): 7537–7547.
- Lillich M, Chen X, Weil T, Barth H, Fahrer J: Streptavidin-conjugated C3 protein mediates the delivery of mono-biotinylated RNAse A into macrophages. Bioconjugate Chemistry 2012; 23(7): 1426–1436.
- 19. Locht C, Antoine R: A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. Biochimie 1995; 77(5): 333-340.
- 20. Locht C, Coutte L, Mielcarek N: The ins and outs of pertussis toxin. FEBS Journal 2011; 278(23): 4668–4682.
- 21. Meade BD, Kind PD, Ewell JB, McGrath PP, Manclark CR: In vitro inhibition of murine macrophage migration by Bordetella pertussis lymphocytosispromoting factor. Infection and Immunity 1984; 45 (3): 718–725.
- 22. Meade BD, Kind PD, Manclark CR: Lymphocytosis-promoting factor of Bordetella pertussis alters mononuclear phagocyte circulation and response to inflammation. Infection and Immunity 1984; 46(3): 733–739.

- 23. Mechaly A, McCluskey AJ, Collier RJ: Changing the receptor specificity of anthrax toxin. mBio; 3 (3): 2012.
- 24. Niederöst B, Oertle T, Fritsche J, McKinney RA, Bandtlow CE: Nogo-A and myelin-associated glycoprotein mediate neurite growth inhibition by antagonistic regulation of RhoA and Rac1. Journal of Neuroscience 2002; 22 (23): 10368-10376.
- 25. Orozco-Morales M, Sánchez-García FJ, Guevara-Salazar P, Arrieta O, Hernández-Pedro NY, Sánchez-García A, Perez-Madrigal R, Rangel-López E, Pineda B, Sotelo J: Adjuvant immunotherapy of C6 glioma in rats with pertussis toxin. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 2012; 138(1): 23-33.
- 26. Rohrbeck A, Höltje M, Adolf A, Oms E, Hagemann S, Ahnert-Hilger G, Just I: The Rho ADP-ribosylating C3 exoenzyme binds cells via an Arg–Gly–Asp motif. The Journal of Biological Chemistry 2017; 292: 17668–17680.
- 27. Rohrbeck A, von Elsner L, Hagemann S, Just I: Uptake of Clostridium botulinum
  C3 Exoenzyme into Intact HT22 and J774A.1 Cells. Toxins 2015; 7(2): 380–395.
- 28. Schwartz M: Dr. Jekyll and Mr. Hyde: a short history of anthrax. Molecular Aspects of Medicine 2009; 30(6): 347-355.
- 29. Terpe K: Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. Applied Microbiology and Biotechnology 2003; 60(5): 523–533.
- 30. Wu J, Filutowicz M: Hexahistidine (His6)-tag dependent protein dimerization: a cautionary tale. Acta Biochimica Polonica 1999; 46(3): 591–599.
- 31. Zahaf NI, Lang AE, Kaiser L, Fichter CD, Lassmann S, McCluskey A, Augspach A, Aktories K, Schmidt G: Targeted delivery of an ADP-ribosylating bacterial toxin into cancer cells. Scientific reports 2017; 7: 41252.

# **III. Danksagung**

Ich möchte mich sehr bei meinem Doktorvater Herr Prof. Barth bedanken für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die freundliche und sehr hilfreiche Unterstützung, die ich während der gesamten Promotionszeit von ihm erfahren habe. Bedanken möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich bei Anne, Julian, Katharina, Leonie, Stephan und Ulrike aus meiner Arbeitsgruppe, sowie bei meiner Betreuerin Christina dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten, mir geduldig weitergeholfen und mir so viele Sachen beigebracht haben. Ich habe mich sehr wohl gefühlt.

Ganz besonders dankbar bin ich meinem Laborkollegen Michael, der immer für mich da war, viele Versuche, sowie gute und schlechte Labortage mit mir durchgestanden hat und trotzdem immer freundlich und aufbauend war. Er hat mir sehr viel geholfen. Weiterhin danke ich Dr. Yuzhou Wu für die viele Zeit am Konfokalmikroskop und Norbert für die Hilfe mit den Schlüsseln und Bestellungen.

Zum Schluss möchte ich meinem Freund danken, der mir immer mit wertvollem Rat und Tat zur Seite stand, sowie meinen Eltern für ihr Vertrauen und ihre Geduld und für ihre Muße dies alles zu lesen.

# IV. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.