Universitätsklinikum Ulm
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Prof. Dr. Peter Gierschik

Biochemische Charakterisierung einer Rezeptorvariante des Protektiven Antigens von *Bacillus anthracis* zur Entwicklung eines Makrophagen/Monozyten-selektiven Transporters

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät Ulm

Sabine Albrecht
Worms

2016

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Gutachter:	Prof. Dr. Holger Barth
2. Gutachter:	Prof. Dr. Markus Huber-Lang
Tag der Promotion:	16.11.17

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Bakterielle Toxine 1

1.2 AB-Toxine 1

1.3 ADP-ribosylierende Toxine 2

1.4 Die Anthrax-Toxine von *Bacillus anthracis* 3

1.4.1 Struktur der Anthrax-Toxine 4

1.4.2 Zelluläre Aufnahme der Anthrax-Toxine 5

1.4.3 Das Fusionsprotein LF_NDTA 7

1.4.4 Aufnahme His_6-markierter Proteine über PA_{63} in das Zytosol von Zellen 8

1.5 Das *Photorhabdus luminescens*-Toxin TccC3 9

1.6 Das Toxin C3bot1 von *Clostridium botulinum* 10

1.7 Die Chimäre mPA-C3bot1E174Q 11

1.8 Zielsetzung der Arbeit 12

2 Material und Methoden 14

2.1 Material 14

2.1.1 Chemikalien 14

2.1.2 Verbrauchsmaterialen 15

2.1.3 Geräte 16

2.1.4 Eukaryotische Zelllinien 17

2.1.5 Nährmedien 17

2.1.6 Antibiotika 18

2.1.7 Lösungen und Puffer 18

2.1.8 Toxine 20

2.1.9 Antikörper für Western Blot Analysen 21

2.1.10 Molekulargewichtsmarker 21

2.1.11 Verwendete Software 21

2.2 Methoden 23

2.2.1 Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien 23

2.2.2 Zytotoxizitätsexperimente 24

2.2.3 Kompetitionsversuch mit C3bot1E174Q 24
2.2.4 MTS basierte Zell-Viabilitätsmessung 26
2.2.5 Probenherstellung für das mPA-C3bot1E174Q-Bindungsassay 26
2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 27
2.2.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit dem Western Blot 29
2.2.8 Strippen von Nitrozellulose-Membranen 30
2.2.9 Statistik 30
3 Ergebnisse 31
3.1 Western Blot zum Nachweis der Identität von mPA-C3bot1E174Q 31
3.2 Funktionalität von mPA-C3bot1E174Q als Transporter in J774A.1 Maus-Makrophagen 32
3.3 Selektivität von mPA-C3bot1E174Q 34
3.4 Transport His_6-markierter Proteine mit mPA-C3bot1E174Q in das Zytosol von Makrophagen 37
3.5 Western Blot zum Nachweis der Bindung von mPa-C3bot1E174Q an J774A.1-, CHO-K1-, HeLa- und Vero-Zellen 39
4 Diskussion 42
4.1 Diskussion Kompetitionsversuch 46
5 Zusammenfassung 47
6 Literaturverzeichnis 49
Anhang 54
Abbildungsverzeichnis 55
Tabellenverzeichnis 56

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
ANTXR1	Anthrax-Toxin-Rezeptor 1
ANTXR2	Anthrax-Toxin-Rezeptor 2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	*American type culture collection*
ATP	Adenosintriphosphat
B.anthracis	*Bacillus anthracis*
bidest	Doppelt destilliert
C3bot1	C3 Transferase von *C. botulinum*
C3cer	C3 Transferase aus *B. cereus*
C3lim	C3 Transferase aus *C. limosum*
C3stau	C3Transferase aus *S. aureus*
C. diphtheriae	*Corynebacterium diphtheriae*
C.botulinum	*Clostridium botulinum*
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cm^2	Quadratzentimeter
C-Terminus	Carboxy-terminales Proteinende
DT	Diphtherie-Toxin
DTA	Enzymdomäne des Diphtherie-Toxins von *C. diphtheriae*
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	*Enhanced Chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ödem-Faktor des Anthrax-Toxins aus *B. anthracis*
EF-2	Elongationsfaktor 2
ER	Endoplasmatisches Retikulum

F-Aktin	Filamentöses Aktin
FCS	*Fetal Calf Serum*
G-Aktin	Globuläres Aktin
HCl	Salzsäure
kDa	Kilo Dalton
LF	Letaler Faktor (Enzymkomponente des Anthrax-Toxin-Komplexes von *B. anthracis*)
LPS	Lipopolysaccharide
mA	Milli-Ampere
MAP-Kinase	*Mitogen-Activated Protein*-Kinase
MEM	*Minimum Essential Media*
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
N-Terminus	Amino-terminales Proteinende
PA	Protektives Antigen (Bindungs-/Transportkomponente der Anthrax-Toxine von *B. anthracis)*
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
PBS-T	*Phosphate Buffered Saline* + Tween® 20
POD	Peroxidase
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGP	Sammelgelpuffer
TEMED	N N,N',N' – Tetramethylethylendiamin
TGP	Trenngelpuffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v-ATPase	Vesikuläre Protonenpumpe

1 Einleitung

1.1 Bakterielle Toxine

Für eine Vielzahl schwerer Erkrankungen beim Menschen, wie Milzbrand, Tetanus oder Diphtherie, sind bakterielle Toxine verantwortlich. Sie stellen wichtige Pathogenitätsfaktoren dar, die den Wirtsorganismus schädigen und dadurch für die spezifischen systemischen Symptome der jeweiligen Krankheit verantwortlich sind. Man unterteilt sie in Endo- und Exotoxine.

Bei den Endotoxinen handelt es sich um Lipopolysaccharide, die in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien enthalten sind. Sie werden bei der Lyse der Bakterien, z.B. bei einer Antibiotikatherapie, freigesetzt und verteilen sich mit dem Blut über den Körper. Die Lipopolysaccharide bewirken durch Modulation von Immunzellen eine vermehrte Zytokinproduktion und können auf diese Weise Entzündungsreaktionen mit Fieber auslösen.

Die Exotoxine werden im Gegensatz zu den Endotoxinen sowohl von lebenden grampositiven als auch gramnegativen Bakterien produziert und in ihr Umgebungsmedium sezerniert. Auch nach der Abtötung der Bakterien können die Toxine ihre pathogene Wirkung entfalten. Dabei können sie unterschiedliche Ziele in Eukaryotenzellen haben. So existieren Toxine, die auf die Zytoplasmamembran abzielen und durch Porenbildung deren Lyse verusachen (Bhakdi et al. 1985). Im Gegensatz dazu schädigen die meisten medizinisch relevanten Exotoxine ihre eukaryotischen Zielzellen, indem sie im Zytosol ein Substrat spezifisch modfizieren (Barth et al. 2004). Diese sogenannten AB-Toxine binden spezifisch an Rezeptoren auf der Zelloberfläche und werden anschließend in das Zellinnere aufgenommen.

1.2 AB-Toxine

Die Wirkungsweise der bakteriellen Exotoxine vom AB-Typ beruht auf dem Vorhandensein von mindestens zwei verschiedenen Domänen: der B-Domäne, welche für die Rezeptorbindung und den Transport der A-Domäne in das Zytosol

der Zielzelle verantwortlich ist und der enzymatisch aktiven A-Domäne, die im Zytosol ihr spezifisches Substrat modifiziert (Barth et al. 2008). Diese funktionellen Domänen können entweder auf einem einzigen Protein lokalisiert sein (einkettige AB-Toxine) wie z.B. bei dem Diphtherie-Toxin (Collier 1975) oder auf zwei separaten Proteinen. In diesem Fall spricht man von binären AB-Toxinen und den beiden Domänen als Komponenten. Ein Beispiel für binäre AB-Toxine ist das Anthrax-Toxin von *Bacillus anthracis* (Barth et al. 2004).

Bei der Aufnahme bakterieller AB-Toxine in ihre Zielzellen unterscheidet man zwei zelluläre Transportwege, die als „short trip“ bzw. „long trip“ bezeichnet werden. Die Toxine beider Gruppen binden über ihre B-Domäne an die Zielzellen, werden Rezeptor-vermittelt endozytiert und gelangen durch diesen Mechanismus in die frühen Endosomen. Die Anthrax-Toxine und das TccC3-Toxin von *Photorhabdus luminescens* gehören zu den „short trip“ Toxinen (Barth et al. 2004) (Lang et al. 2010). Bei diesen Toxinen erfolgt die Translokation der A-Domäne nach der Ansäuerung durch eine vesikuläre H^+-ATPase (v-ATPase) aus den frühen Endosomen in das Zytosol. Die „long trip“ Toxine hingegen werden in Vesikeln von den frühen Endosomen über das trans-Golgi-Netzwerk und den Golgi-Apparat retrograd zum Endoplasmatischen Retikulum transportiert und erst dort in das Zytosol transloziert. Ein Beispiel hierfür ist das Cholera-Toxin von *Vibrio cholerae* (Sandvig et al. 2002)

1.3 ADP-ribosylierende Toxine

Die meisten AB-Toxine schädigen ihre Zielzellen durch die Modifikation intrazellulärer Proteine (Barth et al. 2004). Dabei handelt es sich bei der A-Domäne oft um eine ADP-Ribosyltransferase, welche ADP-Ribose aus Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD^+) kovalent auf eine Aminosäure ihres Zielsubstrates überträgt (Ueda und Hayaishi 1985), (Shall 1995). Für die Zytotoxizitätsversuche der vorliegenden Arbeit wurden die ADP-Ribosyltransferasen des Diphtherie-Toxins und des *Photorhabdus luminescens*-Toxins verwendet. Die enzymatische Komponente DTA des Diphtherie-Toxins ADP-ribosyliert den Elongationsfaktor 2 (EF-2), wodurch

es zur Hemmung der Proteinsynthese der Zielzelle und so zu deren Apoptose kommt (Fendrick, 1992). Das *Photorhabdus luminescens* Toxin TccC3 ADP-ribosyliert Threonin an der Stelle 148 des Aktins und induziert so dessen Polymerisation und Zusammenlagerung (Lang et al. 2010).

1.4 Die Anthrax-Toxine von *Bacillus anthracis*

Bacillus anthracis ist ein grampositives, obligat aerobes Stäbchenbakterium, dessen natürlicher Lebensraum der Erdboden vor allem in Südeuropa und Südamerika ist. Es besitzt die Fähigkeit unter widrigen Bedingungen sehr umweltresistente Sporen auszubilden. Diese Endosporen werden meist oral von Herbivoren über das Futter aufgenommen und keimen, von Makrophagen transportiert, in den Lymphknoten zu Bakterien. Über das Lymphsystem breiten die Bakterien sich auch in das vaskuläre System aus und verursachen ein schweres septisches Krankheitsbild. Die Pathogenitätsfaktoren von *Bacillus anthracis* sind eine antiphagozytäre Kapsel sowie der Anthrax-Toxin-Komplex, wobei die Symptome des Krankheitsbildes Milzbrand (Anthrax) im Wesentlichen von dem Toxin-Komplex verursacht werden. Über engen Kontakt mit infizierten Tieren und durch mit Sporen kontaminierter Nahrung kann auch der Mensch sich infizieren. Dabei entscheidet die Eintrittspforte (Haut, Lunge oder Darm) der Anthrax-Sporen, um welche Art von Milzbrand es sich handelt und damit kann die Schwere der Infektion abgeschätzt werden. Während Hautmilzbrand bei rechtzeitiger Antibiotikatherapie eine günstige Prognose aufweist, können Lungen- und Darmmilzbrand in einer fulminanten Sepsis enden.

1.4.1 **Struktur der Anthrax-Toxine**

Bacillus anthracis produziert drei Proteine, die zusammen den Anthrax-Toxin-Komplex bilden. Er besteht aus dem Protektive Antigen (PA_{83}), dem Ödem-Faktor (EF) und dem Letalen Faktor (LF).

PA_{83} ist ein 83 kDa großes Protein, das LF und EF als Transportprotein in Säugetierzellen dient (Bossier und Mock 2001). PA_{83} besteht aus vier zusammenhängenden Domänen, wobei sich die erste Domäne N-Terminal befindet. Diese besitzt eine charakteristische Sequenz für die proteolytische Aktivierung zu PA_{63} (Klimpel et al. 1992) (Bossier und Mock 2001). Bei dieser Aktivierung werden durch die N-terminale Abspaltung eines 20 kDa Fragmentes die Bindestellen für LF und EF zugänglich (Gordon und Leppla 1994), (Cunningham et al. 2002). Die zweite Domäne ist an der Membran-Insertion beteiligt, Domäne III an der Oligomerisierung des rezeptorgebundenen PA_{63} zur Prä-Pore (Mogridge et al. 2001). Domäne IV bindet mit Hilfe der Domäne II an die Anthrax-Rezeptoren ANTXR1 und ANTXR2 (Lacy et al. 2004), (Bradley et al. 2001). In Abbildung 1 ist PA_{83} schematisch dargestellt.

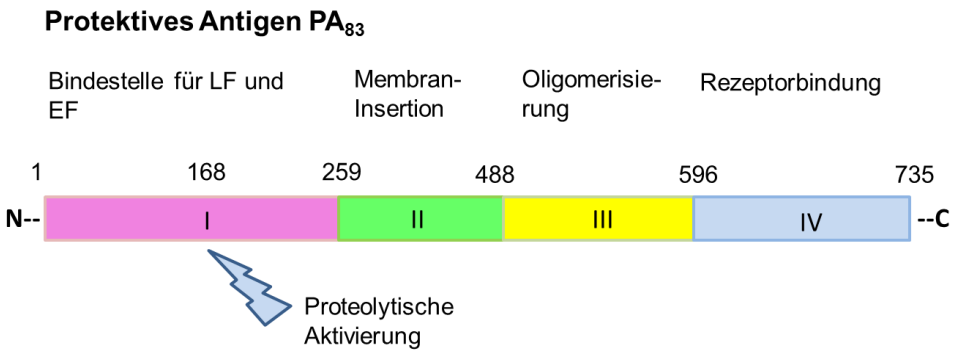


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Protektiven Antigens PA_{83} von *Bacillus anthracis* nach (Barth et al. 2004)
PA_{83} besteht aus vier Domänen. Bei der Toxinaufnahme in die Zellen ist Domäne IV für die Bindung an die Anthraxtoxinrezeptoren zuständig, woraufhin es N-terminal zur proteolytischen Abspaltung eines 20 kDa Fragmentes in Domäne I kommt, es entsteht PA_{63}. Dadurch wird die Bindestelle für LF und EF zugänglich. Domäne III ist an der Oligomerisierung der gebundenen PA_{63} zur Prä-Pore beteiligt und Domäne II vermittelt die Membraninsertion der Prä-Pore in die Membran der frühen Endosomen.

Bei LF (83 kDa) handelt es sich um eine der zwei enzymatischen Komponenten des Anthrax Toxins. LF ist eine Zink-abhängige Metalloprotease (Bossier und Mock 2001), die die meisten *Mitogen-activated Protein*-Kinasen-Kinasen an deren N-terminalen Ende spaltet, sodass keine MAP-Kinasen-Aktivierung mehr stattfinden kann (Duesbery et al. 1998), (Vitale et al. 2000). Die MAP-Kinasen-Kaskaden sind mehrstufige Signalwege, die in Säugetierzellen an der Vermittlung von Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose beteiligt sind. Kann durch die Spaltung der MAP-Kinasen-Kinasen keine Signalvermittlung mehr stattfinden, folgt die Apoptose der Zelle (Vitale et al. 1999). Der Letale Faktor besteht ebenfalls aus vier funktionellen Domänen: Domäne I ist die Adapterdomäne für PA_{63} und wird auch als LF_N bezeichnet, Domäne II und III sind für die Substraterkennung in der Zelle zuständig und Domäne IV enthält die katalytische Domäne (Pannifer et al. 2001).

Die zweite enzymatische Komponente ist der Ödem-Faktor (EF, 89 kDa), eine Calcium-/Calmodulin-abhängige Adenylatcyclase. Sie bildet aus Adenosintriphosphat (ATP) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und erhöht so dessen intrazelluläre Konzentration (Leppla 1982). Dies führt zum Ausströmen von Wasser aus den Zellen und verursacht das bei Anthrax-Infektionen beobachtete Gewebsödem. Zudem werden intrazelluläre Signalwege durch das Wasserungleichgewicht und das Überangebot von cAMP gestört (Ascenzi et al. 2002).

1.4.2 **Zelluläre Aufnahme der Anthrax-Toxine**

Beim Anthrax-Toxin handelt es sich um ein besonderes AB-Toxin, da die Transportkomponente PA_{83} zwei verschiedene enzymatische Komponenten (LF, EF) in eukaryotische Zielzellen befördert.

Hierzu bindet PA_{83} entweder an den Anthrax-Toxin-Rezeptor 1 oder 2 (ANTXR1/2) auf der Oberfläche der Zielzellen (Bradley et al. 2001). Die extrazelluläre PA-Bindungsdomäne der beiden Rezeptoren besitzt Homologien zur van-Willebrand-Faktor-Domäne A (Bradley et al. 2001) und zu Integrin I (Liu et al. 2003). Bei der

Bindung von PA_{83} an einen der beiden Rezeptoren wird das Protektive Antigen proteolytisch durch die Serinprotease Furin aktiviert, indem ein 20kDa großes Fragment N-Terminal abgespalten wird (Beauregard, 2000). Das entstandene PA_{63} bildet spontan Heptamere mit anderen PA_{63}-Proteinen (Milne et al. 1995), die als Prä-Poren bezeichnet werden. Die durch die proteolytische Aktivierung zugänglich gewordenen Bindestellen (Gordon und Leppla 1994) können nun im Prä-Poren-Zustand bis zu drei LF/EF- Moleküle binden (Mogridge et al. 1992). Durch die Bindung des Anthrax-Toxin-Komplexes (PA_{63}, LF und/oder EF) an die Zielzellen wird eine Umorganisation der *lipid rafts* innerhalb der Zellmembran ausgelöst und es findet anschließend eine Clathrin-abhängige Endozytose des Komplexes statt, die ihn in die frühen Endosomen transportiert (Abrami et al. 2003). Das Milieu der Endosomen wird durch eine v-ATPase angesäuert, was eine Konformationsänderung der Toxine EF und LF und eine Insertion der Prä-Pore in die Endosomenmembran zur Folge hat (Koehler und Collier 1991) (Krantz et al. 2014). Bei der Bildung der Pore (ungefähr 15Å im Durchmesser) in der Endosomenmembran ensteht eine sogenannte Phi-Klammer, die die Translokation von ungefalteten EF und LF in das Zytosol der Zielzelle katalysiert (Blaustein et al. 1989) (Krantz et al. 2005). In Abbildung 2 ist der Aufnahmemechanismus der Anthrax-Toxine schematisch dargestellt.

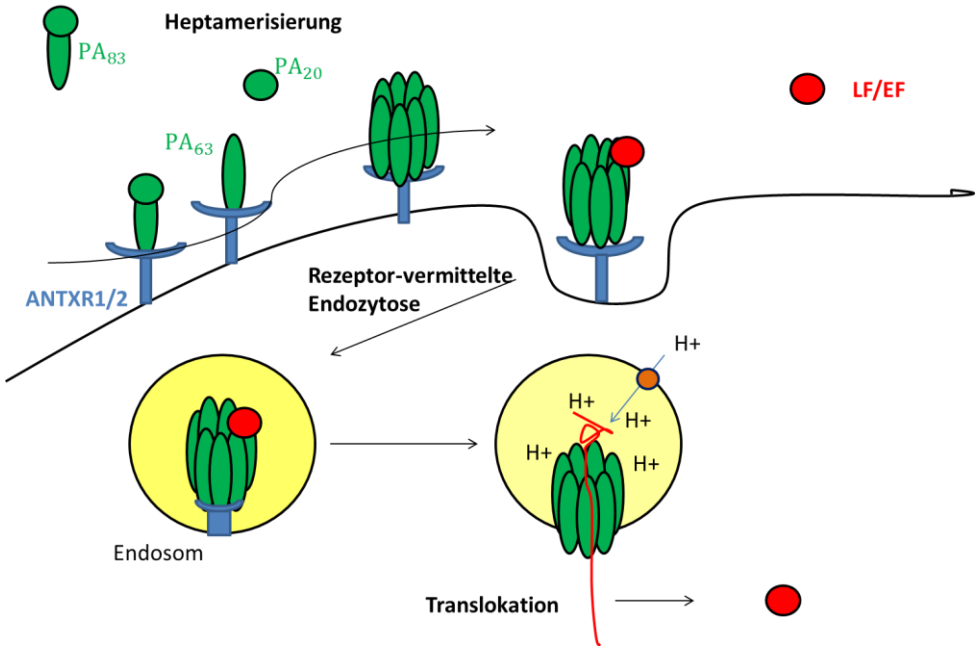


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bindung und Aufnahme des Anthrax-Toxins nach (Barth et al. 2004).
Anthrax-Toxin-Rezeptor 1/2 (ANTXR 1/2), Protektives Antigen (PA), Letaler Faktor (LF), Ödem Faktor (EF). Nach der Bindung von PA_{83} an ANTXR 1/2 kommt es zur proteolytischen Abspaltung eines 20 kDA großen Fragments. Das entstandene PA_{63} bildet mit sechs weiteren die Prä-Pore, die bei der Bindung von LF/EF Rezeptor-vermittelt endozytiert wird. Die Ansäuerung der frühen Endosomen durch eine v-ATPase bewirkt die Insertion der Prä-Pore in die Endosomenmembran und die Entfaltung der Toxine LF/EF. Anschließend erfolgt die Translokation der Toxine durch die entstandene Pore in das Zytosol der Zielzelle.

1.4.3 **Das Fusionsprotein LF_NDTA**

Das Fusionsprotein LF_NDTA besteht aus den funktionellen Domänen von zwei Protein-Toxinen. Hierbei handelt es sich um die ersten 255 Aminosäuren der N-terminalen LF-Domäne (LF_N), die an den N-Terminus der ersten 190 Aminosäuren der enzymatisch aktiven Komponente des Diphtherie-Toxins (DTA) gebunden wurde (Milne et al.1995). Das Toxin für die Zellexperimente dieser Arbeit wurde von Dr. J.R. Collier (Harvard Medical School, Boston USA) hergestellt und der AG Barth zur Verfügung gestellt. In Abbildung 3 ist die Struktur von LF_NDTA schematisch dargestellt.

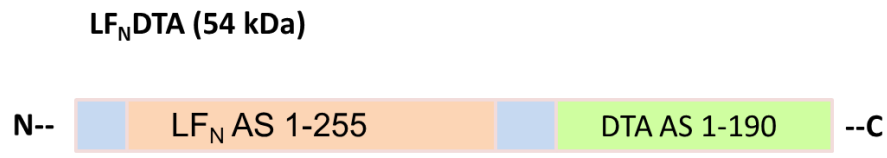


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Fusionstoxins LF_NDTA nach (Milne et al. 1995)
Die Protein-Chimäre besteht aus den ersten 255 N-terminalen Aminosäuren des Letalen Faktors (LF_N) und den ersten 190 N-terminalen Aminosäuren der enzymatisch aktiven Komponente des Diphtherie-Toxins (DTA). Die blauen Bereiche stellen Linker-Aminosäuren dar.

Die für die Fusion verwendete LF_N ist in der Lage an PA_{63} zu binden und wird wie das native LF internalisiert und transloziert, besitzt aber nicht dessen enzymatische Aktivität (Arora und Leppla 1993). Wird DTA kovalent an LF_N gebunden, erfolgt die Aufnahme der Protein-Chimäre ebenfalls durch die Interaktion von LF_N und PA_{63}, was dem typischen Aufnahmemechanismus der Anthrax-Toxine entspricht (Milne et al. 1995). Im Zytosol spaltet DTA NAD^+ in Nicotinamid und ADP-Ribose und überträgt dann die ADP-Ribose auf den nur im Elongationsfaktor 2 (EF-2) vorkommenden Aminosäurerest Diphthamid. Durch diese Mono-ADP-Ribosylierung von EF-2 wird die Proteinsynthese der Zielzelle gehemmt und verursacht deren Apoptose (Chung und Collier 1977) (Sitikov et al. 1984) (Giovane et al. 1985) (Corda und Girolamo 2003).

LF_NDTA eignet sich gut für die Detektion eines erfolgten Transportes durch die Chimäre mPa-C3bot1E174Q in das Zytosol, da die durch LF_NDTA verursachte Zellabrundung mikroskopisch und der Zelltod biochemisch mit einem MTS-Viabilitätstest festgestellt werden können. Im Gegensatz dazu ist ein Nachweis der gespaltenen MAP-Kinasen-Kinasen durch natives LF aufwändiger.

1.4.4 Aufnahme His_6-markierter Proteine über PA_{63} in das Zytosol von Zellen

Die AG Benz konnte 2012 in einer Studie belegen, dass durch die Addition von sechs Histidinen (His_6) die Affinität von EF und LF zu PA_{63} erhöht werden kann. Außerdem konnte die Translokation über das PA_{63} von C2I von *C. botulinum* durch eine N-terminale His_6-Markierung gesteigert werden. Die Ursache hierfür ist

vermutlich die Interaktion der positiven Ladung der His_6-Markierung, die ähnlich wie die positiven Ladungen von LF und EF mit der negativen Ladung im Vestibül der durch PA_{63} geformten Pore interagiert (Neumeyer et al. 2006) (Neumeyer et al. 2006) (Beitzinger et al. 2012). Vermutet wird, dass die Addition einer His_6-Markierung an das N-terminale Ende von Proteinen eine Translokation über das Protektive Antigen PA_{63} des Anthrax Toxins wie bei C2I in vorherigen Versuchen in das Zytosol der Zielzellen ermöglicht.

1.5 Das *Photorhabdus luminescens*-Toxin TccC3

Photorhabdus luminescens ist ein entomopathogenes Bakterium, das in Gedärmen von Nematoden lebt (Forst et al. 1997) (Ffrench-Constant et al. 2003). Die Nematoden besiedeln Insektenlarven und setzen *P. luminescens* durch Regurgitation frei. Anschließend vermehrt sich das Bakterium rapide und sezerniert Toxine, die die Insektenlarve töten. Sie dient als Nahrungsquelle für *P. luminescens* und die Nematoden.

Das ABC Toxin Tc aus *Photorhabdus luminescens* gehört zu den potentesten Proteintoxinen. Es besteht aus den drei Komponenten TcA, TcB und TcC (Bowen 1998) (Waterfield et al. 2001). Bei TcA handelt es sich um die Binde- und Translokationskomponente (Ffrench-Constant et al. 2006), TcC ist die enzymatisch-aktive Komponente und TcB bildet eine Verbindung zwischen TcA und TcC (Lang et al. 2010).

Die enzymatische Komponente TcC kommt in zwei Formen vor: TccC3 und TccC5. Für TccC3 ist TcdA1 die Transportkomponente. Sie bindet als eine pentamere Prä-Pore bestehend aus α-Helices als Komplex mit TcdB2 (TcB) und TccC3 an noch unbekannte Rezeptoren und wird anschließend über Endozytose in die Zielzellen aufgenommen. Die Prä-Pore aus TcdA1 wird bis zur pH-Veränderung in den Endosomen von einem Kokon aus TcdB2 und TccC3 umgeben. Beim Absinken des pH-Wertes wird die wie eine Vuvuzela geformte zentrale Pore freigesetzt und anschließend in die Endosomemembran injiziert. TccC3 und TcdB2 werden in die Pore gezogen und dabei vermutlich entfaltet.

Danach erfolgt ihre Translokation in das Zytosol, in dem die enzymatisch aktive Komponente ihr Zielsubstrat modifiziert (Gatsogiannis et al. 2013), (Meusch et al. 2014).

Die Komponenten TccC3 und TccC5 sind ADP-Riboslytransferasen mit den Substraten Aktin und Rho A im Zytosol ihrer Zielzellen. TccC3 ADP-ribosyliert Threonin 148 des Aktins und verringert so die Affinität von Thymosin β4 zu Aktin. Dies führt zu Aktinpolimerisation und –zusammenlagerung (Lang et al. 2010). Morphologisch ist dies bei HeLa- und J774A.1-Zellen durch eine Zellabrundung im Versuchsverlauf erkennbar. In den Versuchen dieser Arbeit wurde TccC3 mit einer His_6-Markierung genutzt.

1.6 Das Toxin C3bot1 von *Clostridium botulinum*

Gram-positive Bakterien wie *Staphylococcus aureus* (C3stau), *Bacillus cereus* (C3cer), *Clostridium limosum* (C3lim) und *Clostridium botulinum* (C3bot1,2) produzieren ungefähr 25kDa große Protein-Toxine. Sie werden als C3-Transferasen zusammengefasst, da sie alle die G-Proteine Rho A, -B, und -C mono-ADP-ribosylieren und dadurch inaktivieren (Sekine et al. 1989). In humanen Monozyten bewirkt Rho eine Herunterregulierung des Zellwachstums und führt bei dessen Inaktivierung durch C3-Transferasen durch kortikale Aktinaggregation zu flachen Zellen mit filopodien-artigen Ausläufern und kugeligen Einschlüssen im Zytosol (Aepfelbacher et al. 1996).

C. botulinum ist ein anaerobes Stäbchenbakterium, das wie *B. anthracis* im Erdboden lebt und zur Bildung von umweltresistenten Sporen fähig ist. Es sind sieben verschiedene Stämme (A-G) bekannt, die alle Exotoxine produzieren. Zu den wichtigsten zählen das Neurotoxin C1, das binäre Toxin C2 und die strukturverwandten Toxine C3bot1 und C3bot2. Das Toxin C3bot1 wurde zuerst in Stämmen vom Typ C und D nachgewiesen (Aktories et al. 1987), (Aktories et al. 1988), (Rubin et al. 1988). Es katalysiert intrazellulär den Transfer von ADP-Ribose aus NAD^+ auf den Aminosäurerest Asparagin-41 von Rho A, B und C (Sekine et al. 1989), (Vogelsgesang et al. 2007).

In früheren Versuchen konnten Epithelzellen und Fibroblasten C3bot1 nicht aufnehmen, jedoch konnte durch manuelles Einbringen des Toxins in das Zytosol die Modifikation des Zielsubstrates festgestellt werden (Chardin et al. 1989), (Paterson et al. 1990) (Ridley und Hall 1992) (Rubin et al. 1988). In der AG Barth konnte gezeigt werden, dass C3bot1 und C3lim selektiv in das Zytosol von Monozyten/Makrophagen aufgenommen werden, aber nicht in andere Zelllinien (Fahrer et al. 2010). Bis heute ist nicht viel über den Aufnahmemechanismus der C3-Toxine bekannt und auch eine Transport-/Translokationsdomäne sowie ein spezifischer Rezeptor für C3-Transferasen sind bis jetzt nicht gefunden worden.

Das aktive Zentrum von C3bot1 enthält eine NAD^+-Bindestelle und einen sogenannten *ARTT-loop*, welcher größtenteils für die Substraterkennung zuständig ist. Er beinhaltet unter anderem ein für die enzymatische Aktivität wichtiges katalytisches Glutamat $C3bot1^{E174}$. Dieses bindet ADP-Ribose aus NAD^+ und stabilisiert das Stadium des Ribose-Transfers. Wird das Glutamat $C3bot1^{E174}$ durch eine andere Aminosäure ersetzt, so findet keine ADP-Ribosylierung von Rho A mehr statt und C3bot1 wird enzymatisch inaktiv (Aktories 1995) (Bohmer et al. 1996) (Han et al. 2001).

1.7 Die Chimäre mPA-C3bot1E174Q

Das Fusionsprotein mPA-C3bot1E174Q ist eine Protein-Chimäre, die aus zwei zusammengesetzten Domänen verschiedener Bakterientoxine besteht. Es besitzt N-Terminal eine PA_{83}-Variante, die durch die Einführung der Mutationen N682A und D683A in Domäne IV keine Bindung an die Anthrax-Rezeptoren 1 und 2 mehr ermöglicht, jedoch die Ausbildung der Prä-Pore sowie die Membran-Insertion in den frühen Endosomen nicht behindert wird (Mechaly et al. 2012). Ein 8-Aminosäuren-Linker verbindet die PA_{83}-Variante C-Terminal mit der Mutante C3bot1E174Q. Durch den Austausch von Glutamat zu Glutamin an der Stelle 174 ist C3bot1 enzymatisch inaktiv (Bohmer et al. 1996), kann jedoch noch selektiv an Monozyten/Makrophagen binden und wird in diese aufgenommen (Dmochewitz et al. 2013). Die Chimäre mPA-C3bot1E174Q wurde von Dr. A. J. McCluskey

(Harvard Medical School, Boston USA) mit der Sortase-Methode hergestellt (McCluskey et al. 2013) und der AG Barth im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. In Abbildung 4 ist die Proteinchimäre schematisch dargestellt.

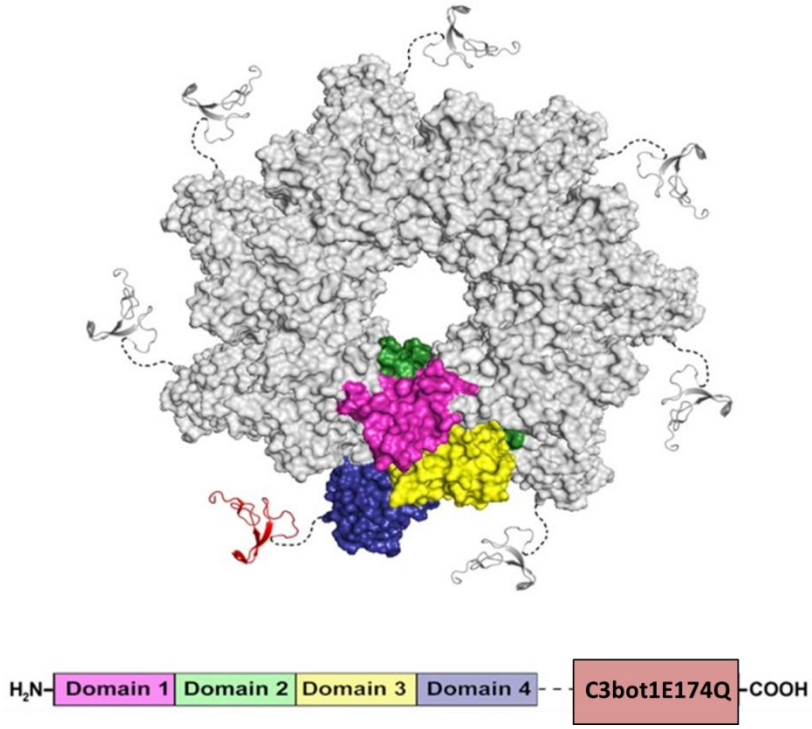


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Chimäre mPA-C3bot1E174Q nach (Mechaly et al. 2012)
Die Chimäre besteht N-Terminal aus den vier Domänen von PA_{83} und C-Terminal aus der enzymatisch inaktiven Mutante C3bot1E174Q. Durch Mutationen in Domäne VI von PA_{83} ist keine Bindung mehr an die Anthrax-Rezeptoren 1 und 2 mehr möglich. Die gestrichelte Linie stellt einen 8-Aminosäuren-Linker (SPGHKTQP) dar. Abgebildet ist ein Heptamer aus zusammengelagerten mPa-C3bot1E174Q.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Makrophagen/Monozyten sind an vielen Immunprozessen im Körper beteiligt. Sie sind in jedem Körpergewebe anzutreffen und entscheidend für Antikörperpräsentation, Wundheilung und Phagozytose von Zelldetritus und Bakterien. Auch bei Lungenkontusion nach stumpfen Thoraxtrauma oder bei Verbrennungen spielen sie eine wichtige Rolle (Niesler et al. 2014). Ein pharmakologischer Zugriff auf diese Schlüsselzellen in der Immunantwort des

Körpers ist für die Beeinflussung der Regeneration nach z.B. stumpfen Thoraxtrauma deshalb erstrebenswert.

In der AG Barth konnte 2010 erstmals gezeigt werden, dass C3bot1 aus *C. botulinum* selektiv an Makrophagen/Monozyten bindet und spezifisch über frühe Endosomen in deren Zytosol aufgenommen wird (Fahrer et al. 2010). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass enzymatisch-inaktives C3bot1 als Transporter für Makrophagen/Monozyten genutzt werden kann (Dmochewitz et al. 2013) (Lillich et al. 2012). Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Untersuchung und Charakterisierung der Chimäre mPA-C3bot1E174Q als ein weiterer möglicher Transporter für Makrophagen/Monozyten.

Durch die Fusion des bindungsunfähigen mPA-Teils an eine Mutante des C3bot1-Toxins soll ein selektiver Proteintransporter für Makrophagen/Monozyten entstehen. Hierbei vermittelt der C3bot1E174Q-Anteil idealerweise die spezifische Bindung an die Makrophagen/Monozyten und der mPA-Anteil ermöglicht anschließend durch Porenbildung den Transport von Proteinen in deren Zytosol. Für die Testung des erfolgten Transportes durch die mPA-Pore in das Zytosol der Zielzellen wird in der vorliegenden Arbeit das Toxin LF_NDTA als Reporterenzym verwendet, das bei der Modifikation seines Substrates im Zytosol der Zellen eine Zellabrundung und den Tod dieser auslöst. Bei den Zytotoxizitätsexperimenten zur Untersuchung der Funktionalität der Protein-Chimäre an J774A.1-Zellen (murine Makrophagen/Monozyten) und der Zellselektivität an Epithelzellen und Fibroblasten (Vero, HeLa, CHO-K1) dienen diese Morphologieänderung und die biochemische Feststellung des fehlenden Stoffwechsels als Beweis für den erfolgten Transport.

Außerdem wurde untersucht, ob Proteine mit einer His_6-Markierung über die PA-Pore der Chimäre transportiert werden können, so wie es bei der Wild-Typ PA-Pore möglich ist (Beitzinger et al. 2012). Hierfür wird das Toxin His_6-TccC3 benutzt, welches ebenfalls durch Zellabrundung und Zelltod den erfolgreichen Transport anzeigt. Abschließend sollte die Bindung von mPA-C3bot1E174Q an die Zielzellen durch einen Kompetitionsversuch mit C3bot1E174Q-Überschuss und einen speziellen Bindungsversuch bei 4°C näher klassifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 **Chemikalien**

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	**Bezugsquelle**
Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bromphenolblau-Na-Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CellTiter $96^{®}AQ_{ueous}$ One Solution Reagent	Promega, Madison USA
Coomassie Brilliant Blue G250	Merck KGaA, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R250	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Merck KGaA, Darmstadt
Eisessig	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Fetales Kälberserum (FCS)	GIBCO® life technologies, Karlsruhe
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
KCl	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Luminol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
$MgCl_2$	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Na_2HPO_4 x $2H_2O$	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt

Chemikalie	Bezugsquelle
Natriumdodecylsulfat (SDS) - Pellets	SERVA Electrophoresis GmbH
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
p-Coumarsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ponceau S	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris-HCl	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypsin	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Trypsininhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tween® 20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Wasserstoffperoxid (H_2O_2) 30 %	J.T. Baker, Griesheim

2.1.2 **Verbrauchsmaterialen**

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialen

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Blotting Papier MN827B	Mackerey-Nagel GmbH& co Kg, Düren Deutschland
Entwickler und Fixierer, RTU 60	Adefo-Chemie GmbH, Dietzenbach
Immobilion™ Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore Corporation, Billerica (USA)
Medical X-Ray Film Cronex5	Agfa HealthCare, Mortsel Belgien
Pasteurpipetten aus Glas	Brand, Wertheim Deutschland
Pipettenspitzen divers	Sarstedt, Nürmbrecht Deutschland
Probenröhrchen 50ml	Sarstedt, Nürmbrecht Deutschland
Reaktionsgefäße divers	Eppendorf, Hamburg Deutschland
Schlauchfolie Stärke 100µm	HT, Esslingen Deutschland
Serologische Pipette 5ml, 10ml	Sarstedt, Nürmbrecht Deutschland
Whatman Nitro-Zellulose Membran Protran BA85	GE HealthCare, Uppsala Schweden
Zellkulturschale 100	TPP, Trasadingen Schweiz
Zellkulturtestplatte 12/ 24/ 96 well	TPP, Trasadingen Schweiz
Zellschaber 25cm, grau	Sarstedt, Nürmbrecht Deutschland

2.1.3 **Geräte**

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	**Bezugsquelle**
Brutschrank	Binder, Tuttlingen
EL 340 Microplate Reader	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
Electrophoresis Power Supply - EPS 601	Amersham Bioscience, Freiburg
Glasplatte ausgeschnitten 20 x 10 cm	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Glasplatte normal 20 x 10 cm	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Magnetrührer RET basic C	IKA, 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
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
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vacuboy	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald
Waage Kern EG 2200 - 2MM	KERN & SOHN GmbH, Balingen
Wasserbad AL 18	Lauda, Königshofen

Gerät	Bezugsquelle
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg

2.1.4 **Eukaryotische Zelllinien**

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten eukaryotischen Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsspezies	Gewebe	Morphologie	ATCC
CHO-K1	Chinesischer grauer Zwerghamster *(Cricetulus griseus)*	Ovar	Fibroblasten	CCL-61
HeLa	*Homo Sapiens*	Zervix Adenokarzinom	Epithelzellen	CCL-2
J774A.1	Hausmaus *(Mus musculus)*	Retikulumzell-sarkom, Aszites	Makrophagen/ Monozyten	TIB-67
Vero	Grüne Meerkatze *(Chlorocebus sp.)*	Niere	Epithelzellen	CCL-81

2.1.5 **Nährmedien**

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Nährmedien und deren Zusätze

Zelllinie	Nährmedium	Hersteller	Zusatzstoffe
CHO-K1	CHO-Medium	Gibco, Karlsruhe	DMEM Hams F-12 1% Penicillin, Streptamycin
HeLa, Vero	MEM	Gibco, Karlsruhe	2mM L-Glutamat 10% FCS 1mM Na-Pyruvat 0,1mM nicht essentielle Aminosäuren 1% Penicillin, Streptamycin
HeLa, Vero	MEM serumfrei	Gibco, Karlsruhe	Ohne 10% FCS
Zelllinie	**Nährmedium**	**Hersteller**	**Zusatzstoffe**
J774A.1	DMEM	Gibco, Karlsruhe	4mM L-Glutamat 1,5g/l Na-Pyruvat

			4,5g/l Glucose 10% FCS 1% Penicillin, Streptamycin
J774A.1	DMEM serumfrei	Gibco, Karlsruhe	Ohne 10% FCS

2.1.6 **Antibiotika**

Penicillin
Streptomycin

2.1.7 **Lösungen und Puffer**

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung

Puffer	**Chemikalie**	**Konzentration**	**Menge**
10xSDS-Laufgelpuffer	Tris Glycin H_2O	1,19 M 439,6 mM	66 g 288 g ad. 2 l
1xPBS	NaCl KCl Na_2HPO_4-Dihydrat KH_2PO_4 H_2O	137 nM 2,7 nM 8 mM 1,8 mM	8 g 0,2 g 1,44 g 0,24 g ad. 1 l
1xSDS-Laufgelpuffer	10xSDS-Laufgelpuffer SDS H_2O	0,1 %	500 ml 5 g ad. 5 l
Puffer	**Chemikalie**	**Konzentration**	**Menge**
5 xLämmli Probenpuffer	1 M Tris-HCl (pH 6,8)	312,5 mM	15,6 ml

	SDS Glycerin Bromphenolblau DTT H_2O	10 % 50 % 0,015 % 10 %	5 g 25 ml 0,0075 g 5 ml ad. 50 ml
Coomassie-Entfärbelösung	Methanol Eisessig H_2O	45 % 10 %	450 ml 100 ml ad. 1 l
Coomassie-Färbelösung	Coomassie Brilliant Blue R250 Methanol Eisessig H_2O	3 mM 45 % 10 %	2,5 g 450 ml 100 ml ad. 1 l
Lösung A ECL	1 M Tris-HCl (pH 9,0) 250 mM Luminol 90 mM Coumarsäure H_2O	100 mM 2,5 mM 0,396 mM	500 µl 50 µl 22 µl ad. 5 ml
Lösung B ECL	1 M Tris-HCl (pH 9,0) 30 % H_2O_2 H_2O	100 mM 0,3 %	500 µl 50 µl ad. 5 ml
PBS-T	10xPBS Tween® 20 H_2O	0,1 %	1 l 10 ml ad. 10 l
Ponceau S-Färbelösung	Ponceau S Essigsäure H_2O	2,63 mM 5 %	2 g 50 ml ad. 1 l
Puffer	**Chemikalie**	**Konzentration**	**Menge**
Sammelgelpuffer	Tris-HCl (pH 6,8) H_2O	0,5 M	60,6 g ad. 1 l

Strippuffer A	Glycin NaCl	15g 29,2g	ad. 1l auf pH 2 einstellen
Strippuffer B	Tris	60,57g	ad 1l auf pH 11 einstellen
Towbin-Puffer	10xSDS-Laufgelpuffer Methanol H_2O	20 %	200 ml 400 ml ad. 2 l
Trenngelpuffer	Tris-HCl (pH 8,8) H_2O	1,5 M	181,8 g ad. 1 l
Tris-HCl	Tris H_2O	1 M	121 g ad. 1 l

2.1.8 **Toxine**

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Toxine

Toxin/ Toxinkomponente	**Ursprungsorganismus**	**Bezugsquelle**
LF_NDTA	enzymatisch inaktiver Letaler Faktor (LF) aus *Bacillus anthracis,* enzymatische Komponente des Diphtherie-Toxins (DTA) aus *Corynebacterium diphtheriae*	AG Collier, Harvard USA
mPA_{63}C3botE174Q	Fusionsprotein bestehend aus einer Mutante von PA_{63} und der C3-Mutante C3bot1E174Q	AG Collier, Harvard USA
Toxin/ Toxinkomponente	**Ursprungsorganismus**	**Bezugsquelle**
PA_{63}	*Bacillus anthracis*	Als PA_{83} von AG Collier, Harvard USA, anschließende Aktivierung durchTrypsin in der AG Barth
C3botE174Q	Inaktive Mutante von C3bot1 aus *Clostridium botulinum* bei der an 174.	AG Collier, Harvard USA

	Stelle die Aminosäure Glutaminsäure gegen Glutamin ausgetauscht wurde	
His_6TccC3	*Photorhabdus luminescens,* mit His-Markierung	AG Aktories, Freiburg

2.1.9 **Antikörper für Western Blot Analysen**

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Antikörper zur Proteindetektion

Name	Epitop	Ursprungsspezies	Bezugsquelle
rabbit-anti-C3bot1	C3bot1	*rabbit*	Pineda, Berlin
mouse-anti-β-Aktin	β-Aktin	*mouse*	SIGMA, Saint-Louis, Missouri, USA
Goat-anti-*rabbit* IgG HRP:sc-2004	*rabbit*	*goat*	Santa Cruz Biotechnology inc., Dallas, USA
Goat-anti-mouse IgG HRP:sc-2302	mouse	goat	Santa Cruz Biotechnology inc., Dallas, USA

2.1.10 **Molekulargewichtsmarker**

Tabelle 9: Verwendeter Molekulargewichtmarker

Marker	Bezugsquelle
PageRuler Prestained Protein Ladder	(Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA)

2.1.11 **Verwendete Software**

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop CS3 7.0, Elements 10	Adobe Systems Inc., San Jose (Kalifornien)
AxioVision Rel. 4.7	Zeiss, Göttingen
GraphPad Prism 4.03	Statcon, Witzenhausen

GraphPad Prism 5.01	Statcon, Witzenhausen
ImageJ 1.4.3.67	National Institutes of Health, Bethesda (Maryland)
Microsoft® Office 2010	Microsoft Corp., Washington

2.2 Methoden

2.2.1 **Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien**

In dieser Arbeit wurde mit vier verschiedenen Zelllinien gearbeitet. Es handelt sich um murine Monozyten/Makrophagen-ähnliche Zellen (J774A.1), humane Epitehlzellen (HeLa-Zellen), Fibroblasten-ähnliche Zellen des *Cricetulus griseus* (CHO-K1 Zellen) und eine weitere Epithelzelllinie aus *Chlorocebus sp.* (Vero-Zellen). Die benutzten Zelllinien wachsen in Kultur adhärent.

Die J774A.1 Zellen wurden in 10 cm großen Plastikkulturschalen bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank kultiviert und wurden alle zwei bis drei Tage passagiert, jedoch nie mehr als 25 Passagen pro Zellcharge. Hierzu wurde zunächst das Medium von den Zellen abgesaugt und diese dann mit 8 ml sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und 2 ml serumhaltiges DMEM auf die Zellen gegeben. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen dann vorsichtig in einer Richtung von der Platte gelöst. Nach anschließender fünffacher Resuspension wurden nun weitere 8 ml DMEM hinzugegeben und erneut resuspendiert. Mithilfe einer Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt, was wichtig für das Aussäen in die unterschiedlich großen Loch-Platten war. Außerdem wurde eine Erhaltungskultur der Zellcharge angefertigt.

Die CHO-K1-, Vero- und HeLa- Zellen wurden ebenfalls alle zwei oder drei Tage passagiert. Bei ihrer Kultivierung wurde nach dem Waschschritt mit PBS 2 ml 0,25%ige Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und dann 2 Minuten bei RT inkubiert, um die Zellen von der Kulturschale zu lösen. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden 8 ml serumhaltiges Medium entsprechend der Zelllinie (siehe Tabelle 5) auf die Zellen gegeben. Die Vero- und HeLa-Zellen konnten nach dem fünfmaligen Resuspensieren und der Zellzahlbestimmung ausgesät werden, während die CHO-K1-Zellen dazwischen 5 Minuten mit 1000 rpm zentrifugiert wurden und ein neues Medium erhielten.

Alle Arbeiten mit den Zellen wurden steril unter einer Sicherheitsbank durchgeführt.

2.2.2 **Zytotoxizitätsexperimente**

Zur Feststellung der Selektivität von mPA-C3bot1E174Q für Makrophagen wurden Zytotoxizitätsexperimente an Vero-, HeLa- (beides Epithelzelllinien), CHO-K1- (Fibroblasten) und J774A.1-Zellen (murine Makrophagen) durchgeführt. Es sollte gezeigt werden, dass mPA-C3bot1E174Q LF_NDTA nur in J774A.1 Zellen transportiert und dadurch eine Zellabrundung bewirkt. Außerdem wurde His_6-TccC3 mit mPA-C3bot1E174Q an J774A.1 getestet.

Dazu wurden $5x10^5$ Zellen der einzelnen Zelllinien auf eine 96-Loch-Platte ausgesät. Am Anfang der Toxinbehandlung wurde das serumhaltige Medium von den Zellen abgesaugt und je Loch durch 100µl serumfreies Medium mit Toxinen ersetzt. Es wurden jeweils 3 Ansätze mit der Kombination aus mPA-C3bot1E174Q mit Toxin und die im Versuch verwendeten Einzelkomponenten auf die Lochplatte aufgetragen. Als Kontrollen dienten nur mit serumfreien Medium behandelte Zellen und solche, die Wildtyp PA_{63} zusammen mit LF_NDTA/His_6-TccC3 erhielten. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Die Laufzeit der Versuche betrug jeweils 72 Stunden. Nach 24 Stunden wurde das Medium mit den enthaltenen Proteinen entfernt und durch serumhaltiges Medium ersetzt. Ein weiterer Wechsel des serumhaltigen Mediums fand aufgrund des MTS-Tests nach 48 Stunden statt. Der Fortschritt der Vergiftung wurde nach 6, 24, 48 und 72 Stunden fotographisch dokumentiert und nach Morphologie ausgewertet. Die Kontrolle mit Wildtyp PA_{63} und LF_NDTA diente als Positiv-Kontrolle, da es die für die Vergiftung typische Zellabrundung aufwies.

2.2.3 **Kompetitionsversuch mit C3bot1E174Q**

Zur Analyse der Bindung von mPA-C3bot1E174Q an die murinen Makrophagen J774A.1 wurde ein Kompetitionsversuch mit einem 100-fachen Überschuss an C3bot1E174Q zu mPA-C3bot1E174Q durchgeführt. C3bot1E174Q bindet an die Oberfläche von J774A.1-Zellen ohne eine Zellabrundung zu bewirken (Böhmer, 1996) (Aktories K. J., 1995). mPA-C3bot1E174Q und C3bot1E174Q sollten um die

Bindung an den J774A.1 Zellen konkurrieren und so zeigen, dass mPA-C3bot1E174Q spezifisch über den C3-Anteil an die Makrophagen bindet.

Für den Versuch wurden die J774A.1-Zellen in eine 24-Loch-Platte für den nächsten Tag ausgesät. Zunächst wurde eine Hälfte der Loch-Platte nach dem Absaugen des Kulturmediums mit 200 µl serumhaltigen Medium und einer C3bot1E174Q Konzentration von 10 µM 10 Minuten auf Eis (4 °C) inkubiert. Die andere Hälfte der Loch-Platte bekam 200 µl serumhaltiges Medium und wurde auf die gleiche Weise inkubiert. Danach erhielten alle Ansätze auf der Loch-Platte 200 µL serumfreies Medium und Proteine wie in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11 Versuchsansätze des Kompetitionsversuches:
Zuerst bekamen die Ansätze 1-3 200 µl serumhaltiges Medium mit C3bot1E174Q mit einer Konzentration von 10 µM, die Ansätze 4-6 erhielten nur 200 µl serumhaltiges Medium. Nach 10 min Inkubation auf Eis erhielten alle Ansätze 200 µl serumfreies Medium und je nach Probe His_6TccC3 (1,56 nM), PA_{63} (1,59nM) und mPA-C3botE174Q (100 nM). X bedeutet in dem Ansatz enthalten.

Ansätze	1	2	3	4	5	6
		200µl	serumhaltiges	Medium		
C3bot1E174Q	X	X	X	-	-	-
		200µl	Serumfreies	Medium		
His_6-TccC3	-	X	X	-	X	X
PA_{63}	-	-	X	-	-	X
mPA-C3botE174Q	-	X	-	-	X	-

Ansatz 1 diente für Ansatz 2 als Negativ-Kontrolle, Ansatz 3 als Positiv-Kontrolle. Für Ansatz 5 diente Ansatz 4 als Negativ- und Ansatz 6 als Positivkontrolle. Die Konzentration von mPA-C3bot1E174Q betrug 100 nM, sodass ein Kompetitionsverhältnis um die C3-Toxin-Bindestelle von 1:100 mit C3bot1E174Q entstehen sollte. Die Laufzeit in diesem Versuch betrug 72 Stunden, wobei nach 24 Stunden die Proteine durch einen Wechsel zu serumhaltigen Medium entfernt wurden. Der Vergiftungsverlauf der Zellen wurde anhand der Morphologie nach 6, 24, 48 und 72 Stunden fotographisch festgehalten.

2.2.4 **MTS basierte Zell-Viabilitätsmessung**

Bei der MTS-basierten Zell-Viabilitätsmessung handelt es sich um eine etablierte Methode zur kolorimetrischen Bestimmung der Lebendzellzahl anhand deren Stoffwechselaktivität. Dazu wurden 10 µl MTS-Lösung der Firma Promega zu den 100 µl Zellprobe auf einer 96-Loch-Platte gegeben. Anschließend wurde die Platte bei 37°C und 5% CO_2 für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Die Lösung enthielt den Farbstoff (3-(4,5)-Dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-Tetrazol (MTS), welcher während der Inkubationszeit von den lebenden Zellen in wasserlösliches Formazan umgesetzt wurde. Außerdem enthielt die Lösung Phenazinethosulfat (PMS), welches das wasserlösliche Formazan unter Verbrauch von NADH und NADPH reduzierte. Dadurch wurde das Formazan außerhalb der Zellen sichtbar und absorbierte Licht mit einer Wellenlänge von 490 nm. Dies wurde mit Hilfe des Elisa Plate Readers nach der Inkubationszeit detektiert. Da tote Zellen den MTS Farbstoff nicht umsetzen können, entspricht die Menge des umgesetzten Formazans proportional der Anzahl lebender Zellen. Der MTS-Test hat den besonderen Vorteil, dass es Zellen nicht schädigt und deshalb wiederholt in einem Versuch angewendet werden kann (Buttke, 1993) (Cory, 1991). In dieser Arbeit wurde der MTS-Test bei den Zytotoxizitätsexperimenten nach 48 und 72 Stunden angewandt. Dies bot die Möglichkeit den Verlauf der Zellzahl während des Versuches zu verfolgen. Zusätzlich diente die mehrfache Anwendung als Kontrolle um unterschiedliche Zelldichten in den verschiedenen Ansätzen zu erkennen, die das Endergebnis hätten verfälschen können. Nach dem 48 Stunden Test wurde das Medium gewechselt, um den Farbstoff von den Zellen zu entfernen.

2.2.5 **Probenherstellung für das mPA-C3bot1E174Q-Bindungsassay**

Das Bindungs-Assay sollte die Bindung von mPA-C3bot1E174Q an CHO-K1-, Vero-, HeLa- und J774A.1-Zellen durch Western Blot-Analyse evaluieren. Dazu wurden je Zelllinie $1x10^6$ Zellen auf eine 12-Loch-Platte für den folgenden Tag ausgesät. Das serumhaltige Medium wurde am Anfang des Versuchs durch 500 µl kaltes, serumfreies Medium ersetzt und es folgten 5 Minuten Inkubation auf Eis

(4°C). Zu den Zellen wurde anschließend mPA-C3bot1E174Q gegeben, sodass eine finale Konzentration von 5 µg/ml erreicht wurde. Nur mit serumfreiem Medium behandelte Zellen dienten später als Kontrollzellen. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten wieder auf Eis inkubiert und abschließend 3-mal mit PBS gewaschen. Um die Zellen aufzuschließen, wurden 100 µl 5-fach Lämmli-Probenpuffer mit 10% DTT (Dithiothreitol), der zuvor 5 Minuten bei 95°C gekocht wurde, auf die Zellen gegeben. Das DTT reduzierte und zerstörte die Disulfidbrücken und auf diese Weise die Faltung der Proteine. Mit einer Pipettenspitze wurden daraufhin die Zellen aus den Ansätzen der Lochplatte geschabt, abgesaugt und in Eppendorfgefäße gegeben. Diese Proben wurden zunächst bei 95°C unter Schütteln gekocht und nachfolgend ca. 3 Minuten auf Eis gestellt. Zuletzt wurde jede Probe anzentrifugiert, um sie vor dem Auftragen in ein Polyacrylamid-Gel zu sammeln.

2.2.6 **SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE ist eine Methode nach Lämmli, um Proteine ihrer Größe nach elektrophoretisch aufzutrennen (Lämmli 1970). Die Matrix der Polyacrylamid-Gele begünstigt die Auftrennung durch das unterschiedlich starke Zurückhalten der Proteine. Kleine Proteine wandern aufgrund dessen im elektrischen Feld weiter als große Proteine. Das Detergenz SDS überdeckt die Eigenladung der Proteine mit einer negativen Ladung, die die Wanderung zur Anode erst möglich macht.

Mit den Proben wurde immer ein Größenstandard aufgetragen. Die großen Polyacrylamid-Gele für das mPA-C3bot1E174Q-Bindungs-Assay liefen 3 Stunden bei 90 mA, die kleinen Gele für den Nachweis von C3bot1E174Q in der Protein-Chimäre liefen eine Stunde bei 25 mA und jeweils 300 V. In und Tabelle 13 sind die Pipettierschemata, der in dieser Arbeit verwendeten 12,5% Gele, aufgeführt.

Tabelle 12: Zusammensetzung der verwendeten Sammel- und Trenngele vier kleiner Gele

Substanz	Trenngel (12,5%)	Sammelgel (6%)
H_2O [ml]	7,9	5,3
Trenngelpuffer [ml]	6,2	-
Sammelgelpuffer [ml]	-	2,5
10 % SDS [µl]	273	100
Acrylamid [ml]	10,4	2
10 % APS [µl]	248	100
TEMED [µl]	20	13

Tabelle 13 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele eines großen Gels

Substanz	Trenngel (12,5%)	Sammelgel (6%)
H_2O [ml]	10,45	8
Trenngelpuffer [ml]	8,25	-
Sammelgelpuffer [ml]	-	3,1
10 % SDS [µl]	363	125
Acrylamid [ml]	13,75	2,5
10 % APS [µl]	330	125
TEMED [µl]	22	12,5

Nach der SDS-PAGE und nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurde das Gel für 30 Minuten bei RT in einer Coomassie-brilliant-blau-Lösung geschwenkt. Dadurch wurden die Proteine unspezifisch blau angefärbt. Anschließend wurde es mit einer Entfärber-Lösung behandelt, sodass die Proteinbanden noch deutlich blau gefärbt waren, der Hintergrund jedoch farblos wurde. Dies diente als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Geltaschen mit den Zellproteinen.

2.2.7 **Immunologischer Nachweis von Proteinen mit dem Western Blot**

Die von der SDS-PAGE nach der Größe aufgetrennten, vom SDS-Puffer noch negativ geladenen Proteine wurden in einer Wet-Blot-Apparatur mittels elektrischen Transfers auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Anschließend konnten diese Proteine durch Inkubation mit einem spezifischen Antikörper detektiert werden. Dazu wurden zuerst 4 Stücke Blotting-Papier und ein Stück Nitrozellulose-Membran jeweils von der Größe des Polyacrylamid-Gels mit Towblin-Puffer angefeuchtet. Anschließend wurden diese mit dem Gel, wie in Abbildung 5 gezeigt, in eine Wet-Blot-Apparatur geschichtet.

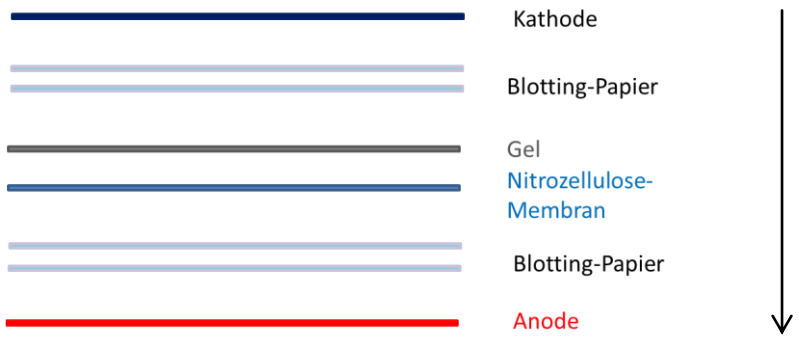


Abbildung 5: Aufbau und Schichtung bei einem Wet-Blot
Das Gel und die Nitrozellulose-Membran werden zwischen mit Towblin-Puffer angefeuchtetem Blotting-Papier platziert. Durch das Anlegen einer Spannung wandern die negativ geladenen Proteine von dem Gel Richtung Anode und werden so auf die Membran immobilisiert.

Der elektrische Transfer auf die Nitrozellulose-Membran erfolgte bei 4°C über Nacht (10 Stunden) bei 125 mA und 60 V. Anschließend wurde die Membran bei RT für 30 Minuten mit Ponceau S gefärbt. Ponceau S färbte ähnlich Coomassie-brilliant-blau Proteine unspezifisch an. Dies erlaubte Rückschlüsse auf die Effizienz der Proteinübertragung. Danach wurde die Membran 30 Minuten mit 5% Milchpulver in PBS-T geblockt und nach einem Waschschritt mit dem primären Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert. Es folgten 3 Waschschritte mit PBS-T für je 6 Minuten, bevor die Membran mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei RT inkubiert wurde. Nach 3 weiteren 6 minütigen Waschschritten erfolgte die Detektion mit Hilfe einer ECL-Lösung. Der Sekundärantikörper enthielt eine Meerrettichperoxidase, welche die Chemolumineszenzreaktion des im ECL

enthaltenen Luminols katalysierte. Das entstandene Lichtsignal wurde mit einem Röntgenfilm detektiert.

2.2.8 **Strippen von Nitrozellulose-Membranen**

Das „Strippen“ von Nitrozellulose-Membranen ist ein Verfahren, um bereits mit Antikörpern behandelte Membranen für eine neue Detektion mit Antikörpern zugänglich zu machen. Diese Methode wurde in dieser Arbeit verwendet, um nach der Detektion mit anti-C3bot1E174Q-Antikörpern nochmals mit anti-Hsp90-Antikörpern eine Ladekontrolle zu erhalten. Hierfür wurde die bereits behandelte Membran mit Wasser abgeschwenkt und anschließend für 5 Minuten im Stripping-Puffer A geschüttelt. Danach erfolgten 10 Waschschritte mit H_2O und eine Inkubation mit Stripping-Puffer B für 10 Minuten unter Schütteln. Der Stripping-Puffer A war sauer und der Stripping-Puffer B basisch. Durch die Behandlung wurden Protein-Protein-Interaktionen zerstört, was die Entfernung der zuvor verwendeten Antikörper von den auf der Nitrozellulose-Membran befindlichen Proteinen bewirkte. Nach weiteren 10 Waschschritten mit H_2O und einer Stunde Inkubation mit 5% Milchpulver auf PBS-T war die Membran für eine neue Antikörperbehandlung bereit.

2.2.9 **Statistik**

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mindestens zweimal unabhängig voneinander mit jeweils drei Versuchsansätzen (n=3) durchgeführt. Die abgebildeten Diagramme wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism 4.03 und 5.01 erstellt und die angegebenen Mittelwerte ± Standartabweichung mit dem in der Software verfügbaren Student’s t-Test ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Western Blot zum Nachweis der Identität von mPA-C3bot1E174Q

Zu Anfang dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob die Protein-Chimäre, die aus einer in der Rezeptorbindedomäne mutierten Variante des Protektiven Antigens und einer enzymatisch inaktiven Variante des C3-Toxins zusammengesetzt wurde, während der Zytoxizitätsversuche zur Testung der Selektivität der Chimäre und des Bindeversuches stabil bleibt. Außerdem musste bestätigt werden, dass C3bot1E174Q in mPa-C3bot1E174Q enthalten war. Dazu wurden je 5 ng von C3bot1E174Q, C3bot1E174Q und PA_{63} elektrophoretisch durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch elektrischen Transfer auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Die übertragenen Proteine wurden mit anti-C3bot-Antikörper detektiert. In Abbildung 6 ist das Ergebnis des Western-Blots dargestellt.

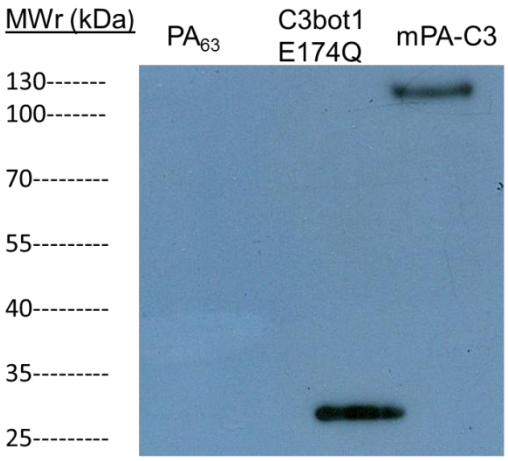


Abbildung 6: Western Blot zum Nachweis der Identität von mPA-C3bot1E174Q
Es wurden je 5 ng Proteine pro Komponente in die Taschen des Gels aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit anti-C3bot. C3bot1E174Q läuft auf einer Höhe von 30 kDa, mPA-C3bot1E174Q (mPA-C3) auf einer Höhe zwischen 110-130 kDa. Dies würde dem Molekulargewicht (Mwr) von C3bot1E174Q (30 kDa) und PA_{83} (83 kDa) entsprechen.

Zu erkennen ist, dass sowohl bei C3bot1E174Q als auch bei der Protein-Chimäre mPA-C3 ein Signal entstanden ist. Dies zeigt, dass in beiden C3bot1E174Q enthalten ist. Das Protektive Antigen diente in diesem Versuch als Negativ-Kontrolle, da es kein C3bot enthält und deshalb auch kein Signal erzeugt. C3bot1E174Q wurde zum einen als Positiv-Kontrolle eingesetzt und zum anderen

zur Einordnung des Molekulargewichtes von mPA-C3bot1E174Q verwendet. Die Protein-Chimäre enthält C3bot1E174Q, das etwa auf Höhe 30 kDa läuft und eine PA-Mutante mit einem Molekulargewicht von 83 kDa. Das Molekulargewicht der Chimäre lag in diesem Versuch zwischen 100 und 130 kDa, was dem zu erwartenden Molekulargewicht für mPA-C3bot1E174Q entspricht. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Kopplung von C3bot1E174Q an mPA in den Zytotoxizitätsversuchen stabil ist.

3.2 Funktionalität von mPA-C3bot1E174Q als Transporter in J774A.1 Maus-Makrophagen

Des Weiteren wurde untersucht, ob mPA-C3bot1E174Q über den C3bot1E174Q-Teil an Zellen binden kann, und ob das mutierte Protektive Antigen in diesem Fusionsprotein als Transporter funktional ist. Um dies festzustellen, wurde mPA-C3bot1E174Q zusammen mit dem rekombinanten Fusionstoxin LF_NDTA auf den murinen Makrophagen J774A.1 getestet. Die durch das DTA verursachte ADP-Ribosylierung von EF-2 und die damit erfolgte Zellabrundung vergifteter Zellen diente als spezifischer Nachweis des erfolgreichen Transportes von LF_NDTA durch mPA-C3bot1E174Q in das Zytosol der Makrophagen. Die Konzentration von mPA-C3bot1E174Q betrug 100nM und für LF_NDTA 15nM. Die Konzentrationen für die Positivkontrolle betrugen für PA_{63} 10nM und für LF_NDTA 15nM. Der Verlauf der Vergiftung wurde über 72 Stunden mikroskopisch verfolgt und fotographisch dokumentiert. Zusätzlich erfolgte nach 72 Stunden ein abschließender Zellviabilitäts-Test. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.

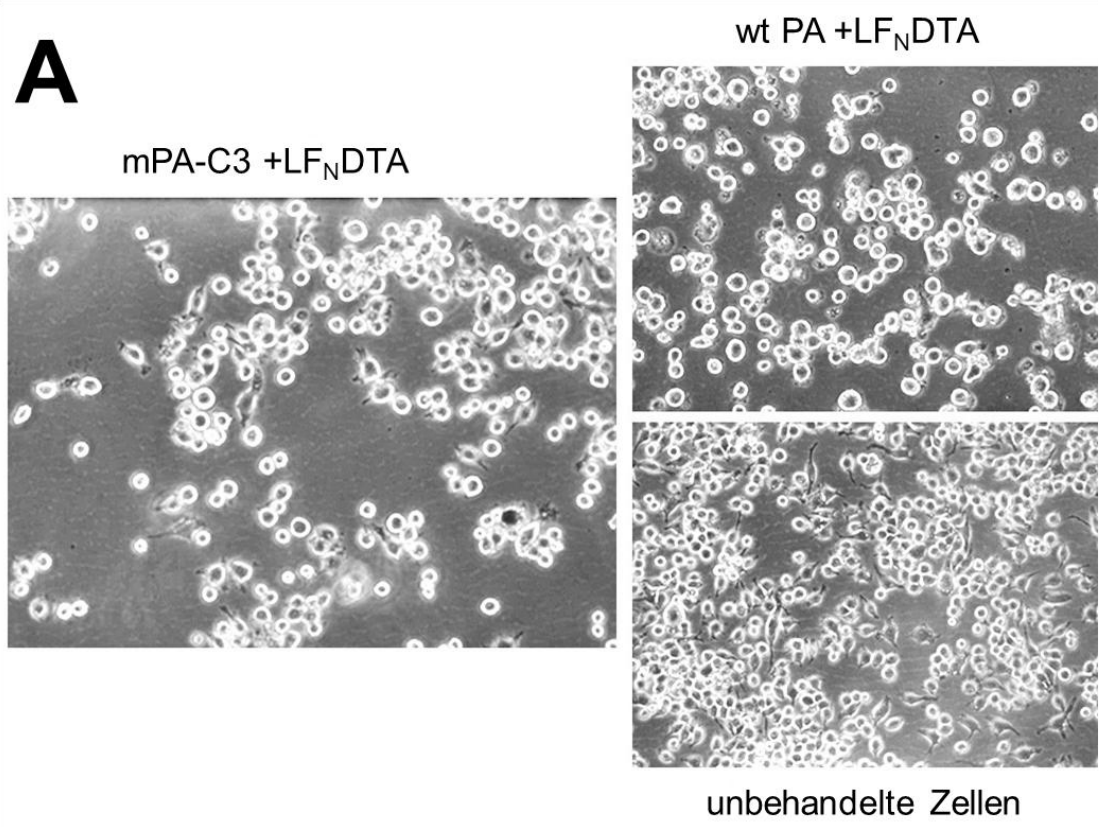


Abbildung 7: Ergebnisse des Zytotoxizitätsversuchs mit mPA-C3bot1E174Q und LF$_N$DTA an J774A.1 Zellen.

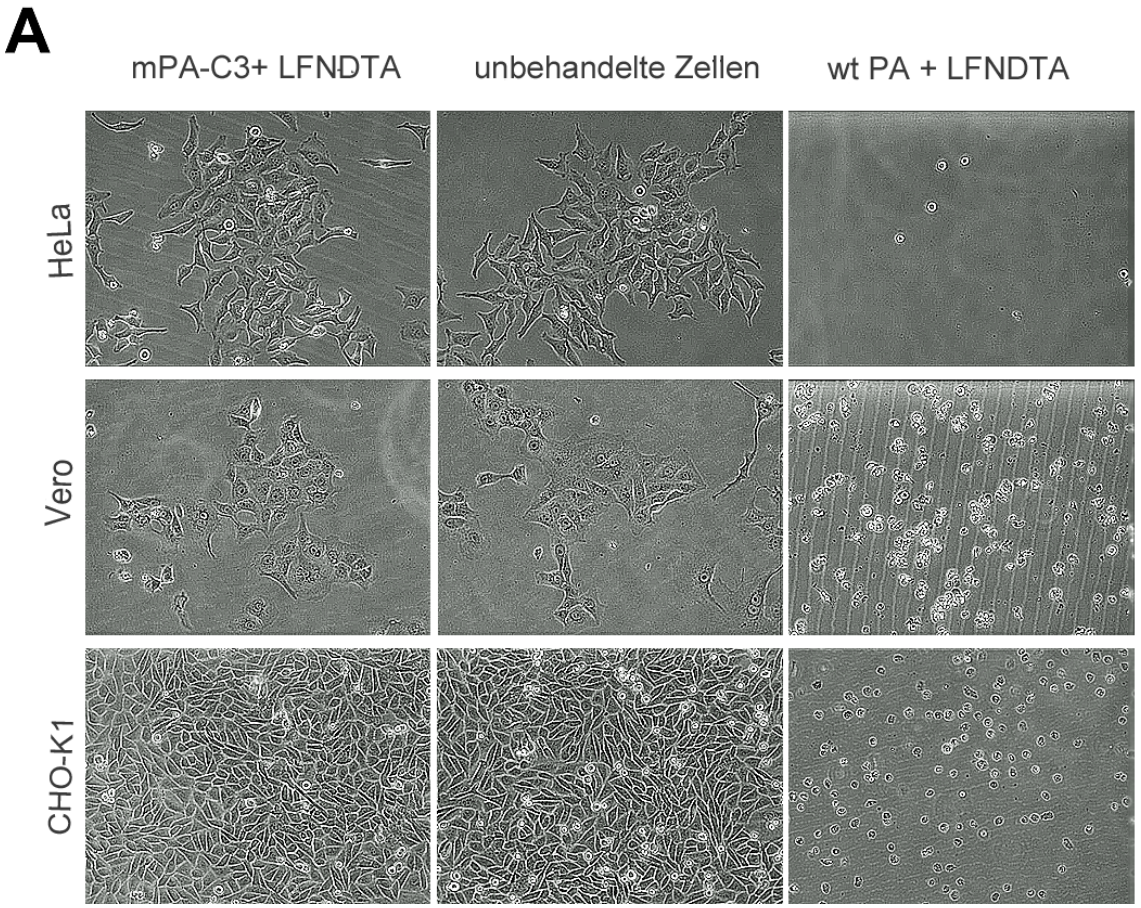
Die J774A.1-Zellen wurden 24h mit der Chimäre mPA-C3bot1E174Q (100 nM) und 15 nM LF$_N$DTA behandelt, danach wurde das serumhaltige Medium mit den Toxinen entfernt und anschließend erfolgte eine Inkubation mit serumhaltigem Medium. Als Positiv-Kontrolle dienten Zellen, die mit PA$_{83}$ (wt-PA) und LF$_N$DTA behandelt wurden. Die unbehandelten Zellen dienten als Negativ-Kontrolle. **A**. Abgebildet sind mikroskopische Zellbilder von J774A.1-Zellen nach 48h des Vergiftungsversuches. Mit mPA-C3bot1E174Q+ LF$_N$DTA behandelte Zellen weisen gleich der Positiv-Kontrolle Zellabrundungen und eine geringere Zelldichte auf. Hinweis: Bei den Zellbildern handelt es sich um die gleiche Vergrößerung, mPA-C3+ LF$_N$DTA wurde zur Veranschaulichung der Morphologie größer dargestellt. **B**. Ergebnisse des Zellviabilitätstests mit MTS nach 72h. Mit mPA-C3bot1E174Q+ LF$_N$DTA behandelte Zellen haben ähnlich der Positiv-Kontrolle eine geringere Stoffwechselaktivität. Die Diagrammbalken zeigen den Mittelwert (n=3) der Absorption, die bei 490 nm im Plattenlesegerät detektiert wurde ± Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mit dem

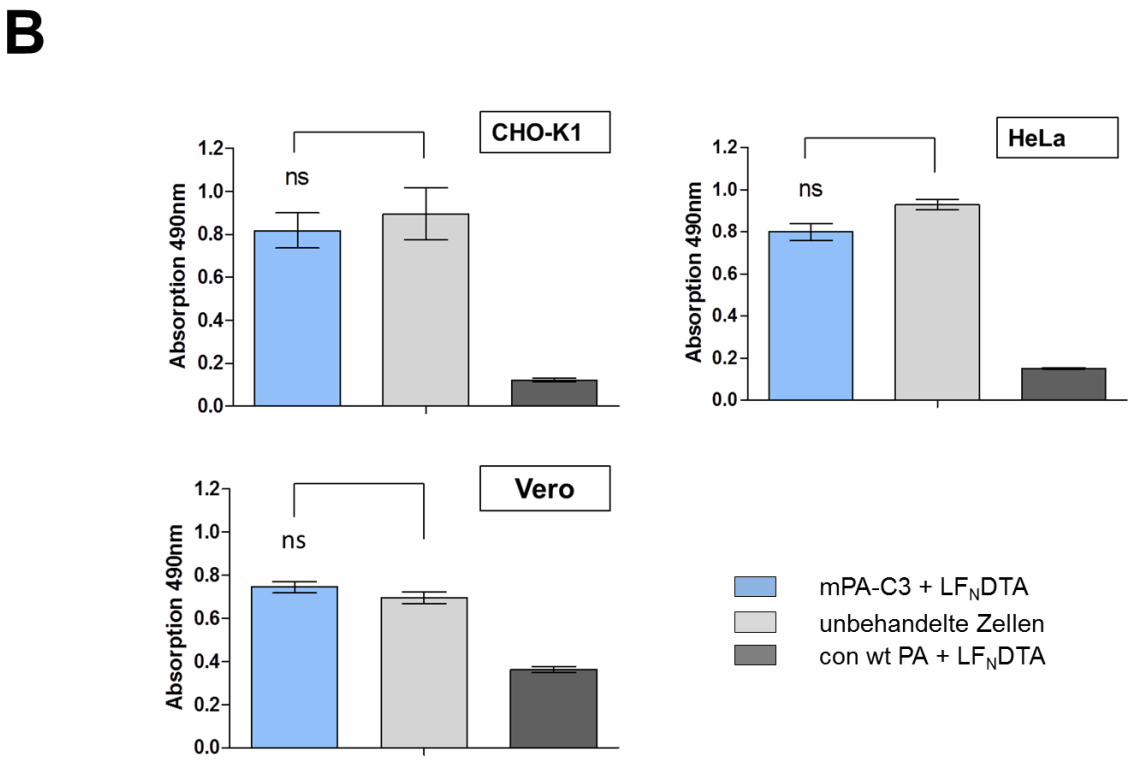
Student's t-Test ermittelt und bezieht sich auf die Negativ-Kontrolle (ns: nicht signifikant; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.005$, ***: $p < 0.0005$).

Abbildung 7A zeigt mikroskopische Zellbilder von J774A.1-Zellen nach 48h des Vergiftungsversuches. Ähnlich der Positiv-Kontrolle weist auch der Versuchsansatz mit mPA-C3bot1E174Q und LF_NDTA eine verringerte Zellzahl und deutlich abgerundete Zellen auf. Im Vergleich dazu ist die Zelldichte der Negativ-Kontrolle, welche aus unbehandelten Zellen besteht, viel höher und es gibt nur ein paar wenige abgerundete Zellen. In Abbildung 7B ist das Ergebnis des Zellviabilitätstests mit MTS nach 72h an J774A.1-Zellen dargestellt. Je mehr MTS-Farbstoff umgesetzt wurde, desto höher war die vom Plattenmessgerät bei 490 nm gemessene Absorption. Da nur lebende Zellen zum MTS-Umsatz fähig sind, bedeutet eine hohe Absorption eine große Anzahl an lebenden Zellen. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Absorptionswert der Zellen, welche mit mPA-C3bot1E174Q+LF_NDTA behandelt wurden, geringer ist als der der unbehandelten Zellen. Die beiden Ergebnisse der Versuche deuten darauf hin, dass ein Transport des LF_NDTAs in die murinen Makrophagen stattgefunden hat. Da auch LF_NDTA in der Konzentration von 15 nM und mPA-C3bot1E174Q in der Konzentration 100 nM alleine auf den Makrophagen getestet und kein Effekt festgestellt wurde (hier nicht dargestellt), kann von einem Transport von LF_NDTA durch mPA-C3bot1E174Q ausgegangen werden.

3.3 Selektivität von mPA-C3bot1E174Q

Nachdem der Transport von LF_NDTA durch mPA-C3bot1E174Q in die murinen Makrophagen J774A.1 gezeigt wurde, wurde weiterführend mPA-C3bot1E174Q an Epithel- (HeLa- und Vero-Zellen) und Fibroblastenzellen (CHO-K1-Zellen) getestet. Auch hier betrug die Konzentration von mPA-C3bot1E174Q 100 nM und für LF_NDTA 15 nM. Gleich dem Versuch an den J774A.1-Zellen wurde der Versuch fotographisch dokumentiert und es erfolgte abschließend nach 72 Stunden ein Zellviabilitätstest mit MTS. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.





Legende Abb.8 folgt auf S.36

Abbildung 8: Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche von mPA-C3bot1E174Q mit LF_NDTA an Vero-, HeLa- und CHO-K1-Zellen nach 72h

Die J774A.1-Zellen wurden 24h mit der Chimäre mPA-C3bot1E174Q (100 nM) und 15 nM LF_NDTA behandelt, danach wurde das serumhaltige Medium mit den Toxinen entfernt und anschließend erfolgte eine Inkubation mit serumhaltigem Medium. Als Positiv-Kontrolle dienten Zellen, die mit PA_{83} (wt-PA) und LF_NDTA behandelt wurden. Die unbehandelten Zellen dienten als Negativ-Kontrolle. **A**. Abgebildet sind mikroskopische Zellbilder von Vero-,HeLa- und CHO-K1-Zellen nach 72h des Zytotoxizitätsversuches. Die mit mPA-C3bot1E174Q+LF_NDTA behandelten Zellen der getesteten Zelllinien zeigen keine Zellabrundung, sondern gleichen den unbehandelten Zellen. **B**. Abgebildet sind die Ergebnisse des Zellviabilitätstest mit MTS nach 72h. Zu sehen ist, dass bei jeder getesteten Zellart die Absorption der mit mPA-C3bot1E174Q+ LF_NDTA behandelten Zellen etwa der Absorption der unbehandelten Zellen entspricht. Die Diagrammbalken zeigen den Mittelwert (n=3) der Absorption, die bei 490nm im Elisa Plate Reader detektiert wurde ± Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-Test ermittelt und bezieht sich auf die Negativ-Kontrolle (ns: nicht signifikant).

In Abbildung 8A sind Zellbilder von HeLa-, Vero- und CHO-K1-Zellen nach 72 Stunden des Zytotoxizitätsversuches dargestellt. Die Positiv-Kontrolle zeigt deutliche Zellabrundungen, die jedoch nicht bei den mit mPA-C3bot1E174Q und LF_NDTA inkubierten Zellen auftraten. Die so behandelten Zellen sind vielmehr in Morphologie und Dichte mit den unbehandelten Zellen der Negativ-Kontrolle vergleichbar. Dies galt für HeLa-, Vero- und CHO-K1-Zellen. Abbildung 8B veranschaulicht die Ergebnisse des Zellviabilitätstests mit MTS an den drei Zelllinien nach 72 Stunden. Zu erkennen ist, dass bei jeder Zelllinie die Absorptionen der mit mPA-C3bot1E174Q und LF_NDTA behandelten Zellen mit der Absorption der Negativ-Kontrollen vergleichbar sind. Die Ergebnisse der beiden Versuche zeigen, dass weder HeLa-, Vero- noch CHO-K1-Zellen in diesem Versuch vergiftet wurden. Sie weisen keine für LF_NDTA behandelte Zellen typische Morphologieänderung auf und die Zellviabilität war durch die Zugabe der Toxine nicht verringert. Dies weist darauf hin, dass durch mPA-C3bot1E174Q kein LF_NDTA in die HeLa-, Vero- und CHO-K1-Zellen transportiert wurde. Die Chimäre ist somit Monozyten/Makrophagen-selektiv.

3.4 Transport His_6-markierter Proteine mit mPA-C3bot1E174Q in das Zytosol von Makrophagen

Nachdem der Transport von LF_NDTA durch mPA-C3bot1E174Q gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob mit Hilfe von mPA-C3bot1E174Q andere Proteine in die murinen Makrophagen J774A.1 transportiert werden können. Um dies festzustellen, wurde mPA-C3bot1E174Q zusammen mit His_6-TccC3 auf J774A.1-Zellen getestet. Der Histidin-Rest sollte hierbei dem *Photorhabdus* Toxin TccC3 den Transport durch mPA-C3bot1E174Q in das Zytosol ermöglichen. TccC3 ADP-ribosyliert Aktin in der Zielzelle, wodurch es ebenfalls zu einer Zellabrundung kommt. Diese galt als Nachweis eines erfolgten Transportes von His_6-TccC3 durch mPA-C3bot1E174Q in die J774A.1-Zellen. Die Konzentration von mPA-C3bot1E174Q betrug 100 nM und von His_6-TccC3 1,56 nM. Die Konzentrationen für die Positiv-Kontrolle betrugen für PA_{63} 1,59 nM und für His_6-TccC3 1,56 nM. Der Vergiftungsverlauf wurde wieder mikroskopisch fotografiert. Abschließend erfolgte nach 72 Stunden ein Zellviabilitäts-Test zur Messung der Stoffwechselaktivität. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

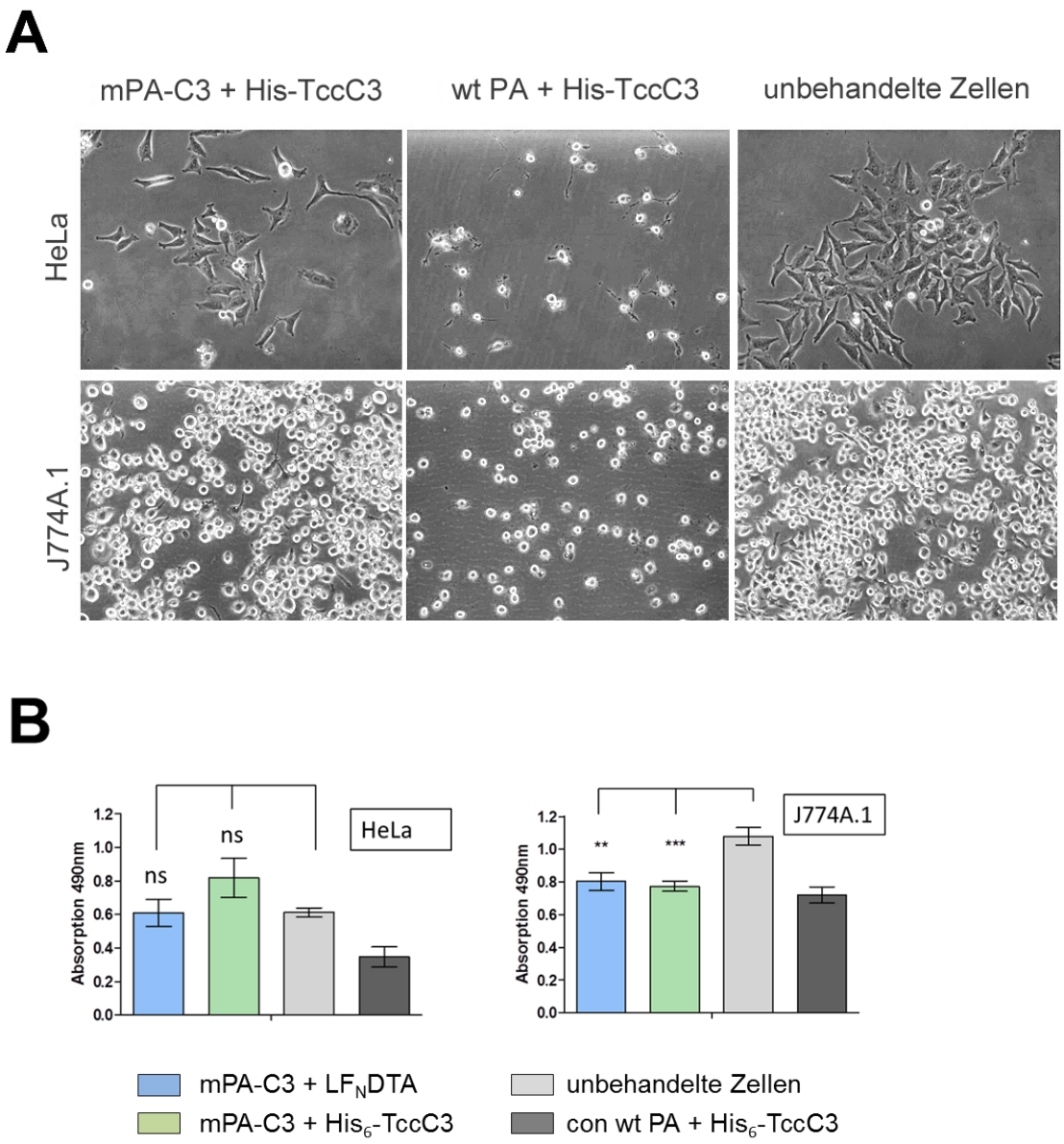


Abbildung 9: Ergebnisse des Zytotoxizitätsversuchs von mPA-C3bot1E174Q mit His$_6$-TccC3 an HeLa- und J774A.1-Zellen nach 72h

Die Zellen wurden 24h mit His$_6$-TccC3/LF$_N$DTA und mPA-C3 (mPA-C3bot1E174Q) behandelt, danach wurde das serumhaltige Medium mit den Toxinen entfernt und anschließend erfolgte eine Inkubation mit serumhaltigem Medium. Die mPa-C3bot1E174Q Konzentration in Kombination mit 15nM LF$_N$DTA betrug 100nM. Die Konzentrationen betrugen für mPA-C3bot1E174Q 100nM, His$_6$-TccC3 1,56 nM. Als Positiv-Kontrolle dienten Zellen, die mit PA$_{83}$ (1,59nM) und His$_6$-TccC3 (1,56 nM) behandelt wurden. Bei der Negativ-Kontrolle handelt es sich um unbehandelte Zellen. **A**. Abgebildet sind mikroskopische Zellbilder von HeLa- und J774A.1- Zellen nach 72h des Zytotoxizitätsversuches. Die mit mPA-C3bot1E174Q und His$_6$-TccC3 behandelten HeLa-Zellen gleichen den Zellen der Negativ-Kontrolle, während die gleich behandelten J774A.1-Zellen eine geringere Zelldichte und Zellabrundungen zeigen. **B**. Abgebildet sind die Ergebnisse des Zellviabilitätstest mit MTS nach 72h. Bei den HeLa-Zellen entspricht die Absorption der mit mPA-C3bot1E174Q+His$_6$-TccC3 behandelten Zellen etwa der Absorption der Negativ-Kontrolle. Im Gegensatz dazu ist bei den mit mPA-C3bot1E174Q+ His$_6$-TccC3 behandelten J774A.1-Zellen die Absorption sehr viel geringer als bei der Negativ-Kontrolle. Die Diagrammbalken zeigen den

Mittelwert (n=3) der Absorption, die bei 490nm im Elisa Plate Reader detektiert wurde ± Standartabweichung. Die Signifikanz wurde mit dem Student's t-test ermittelt und bezieht sich auf die Negativ-Kontrolle (ns: nicht signifikant; *: $p < 0.05$, **: $p < 0.005$, ***: $p < 0.0005$).

In Abbildung 9A gibt die Morphologieveränderungen während des Zytotoxizitätstests an HeLa- und J774A.1-Zellen wieder. Die HeLa-Zellen, die mit mPA-C3bot1E174Q und His_6-TccC3 behandelt wurden, zeigen keine Zellabrundung. Sie gleichen den unbehandelten Zellen der Negativ-Kontrolle. Im Vergleich dazu weisen die mit mPA-C3bot1E174Q und His_6-TccC3 behandelten Zellen eine Zellabrundung und eine leicht verringerte Zelldichte auf. In Abbildung 9B sind die Ergebnisse des Zellviabilitätstests der HeLa- und J774A.1-Zellen dargestellt. Bei den HeLa-Zellen entspricht die Absorption der mit mPA-C3bot1E174Q und Toxin behandelten Zellen etwa der Absorption der Negativ-Kontrolle. Bei den J774A.1-Zellen, die mit mPA-C3bot1E174Q und Toxin behandelt wurden, ist eine deutliche Minderung der Zellviabilität zu erkennen. Interessanterweise ist die Absorption der mit mPA-C3bot1E174Q und His_6-TccC3 behandelten Zellen niedriger als die von mit mPA-C3bot1E174Q und LF_NDTA behandelten Zellen. Zusammengenommen zeigen die beiden Versuche, dass His_6-TccC3 durch mPA-C3bot1E174Q in die murinen Makrophagen transportiert wurde, jedoch nicht in die humanen Epithelzellen.

3.5 Western Blot zum Nachweis der Bindung von mPa-C3bot1E174Q an J774A.1-, CHO-K1-, HeLa- und Vero-Zellen

Nachdem die selektive Wirkung von mPA-C3bot1E174Q auf Makrophagen/Monozyten nachgewiesen werden konnte, sollte die Bindung der Chimäre an Zellen genauer klassifiziert werden. Hierfür wurden HeLa-, Vero-, J774A.1- und CHO-K1-Zellen anfangs mit kaltem, serumfreien Medium für 5 Minuten auf Eis (4°C) inkubiert und erhielten dann 2,5 µg mPA-C3bot1E174Q pro Ansatz. Die folgende Inkubation bei 4°C erlaubte die Bindung von mPA-C3bot1E174Q an die Oberfläche der Zellen, jedoch nicht die Internalisierung. Anschließend wurden die Zellen in einem Western Blot auf das Vorhandensein von mPA-C3bot1E174Q analysiert. Die übertragenen Proteine wurden mit anti-

C3bot1 und anti-β-Aktin detektiert. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse des Bindeversuches dargestellt.

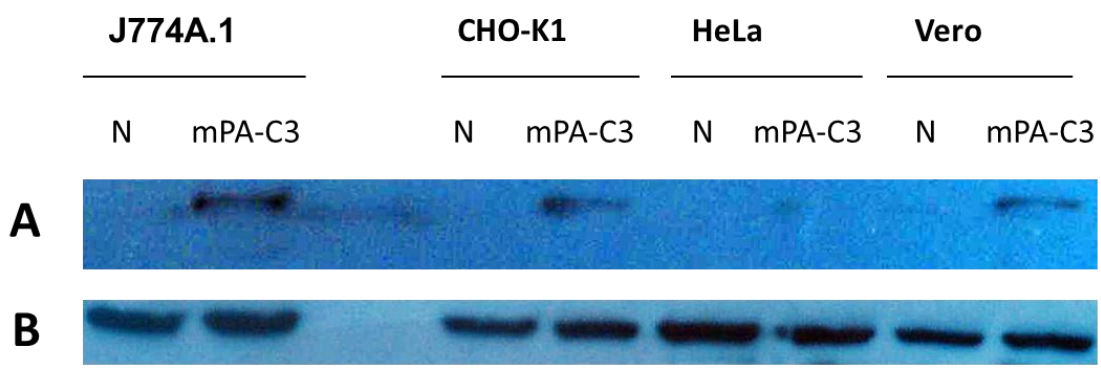


Abbildung 10: Western Blot zum Nachweis der Bindung von mPA-C3bot1E174Q an J774A.1-, CHO-K1-, HeLa- und Vero-Zellen
Die mit kaltem Medium behandelten Zellen erhielten pro Ansatz 2,5 µg mPA-C3bot1E174Q (mPA-C3) und wurden danach bei 4°C auf Eis für 5 Minuten inkubiert. Die mit N bezeichneten Proben sind unbehandelte Zellen, die auf gleiche Weise inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen, um nicht oder schwach gebundenes mPA-C3bot1E174Q von den Zellen zu entfernen. Die Proben wurden mit 5-fach Lämmli-Probenpuffer mit 10% DTT gekocht, mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. **A**. Die übertragenen Proteine wurden mit anti-C3bot1 detektiert, die Laufhöhe beträgt zwischen 110 und 130 kDa. Zu erkennen ist, dass eine größere Menge mPA-C3bot1E174Q an die J774A.1 Zellen gebunden hat als an die anderen Zelllinien. Eine Bindung an CHO-K1-, Vero-, HeLa-Zellen (hier nur schwach) hat jedoch stattgefunden. **B**. Es handelt sich hierbei um die Nitrozellulose-Membran von A, die gestrippt und anschließend mit anti-β-Aktin detektiert wurde. Diese Ladekontrolle zeigt, dass die übertragenen Proteine in der Menge ungefähr gleich waren.

Abbildung 10 stellt die Ergebnisse des Bindungsversuches an J774A.1-, CHO-K1-, Vero- und HeLa-Zellen dar. Abbildung 10A zeigt, dass die Chimäre mPA-C3bot1E174Q an alle Zelltypen bindet, am stärksten jedoch an die J774A.1-Zellen. Die Detektion von Aktin in Abbildung 10B diente dem Nachweis der übertragenen Proteine von dem Western Blot auf die Blotting-Membran, um die Proteinladung der Versuchsansätze miteinander vergleichen zu können. Es ist zu erkennen, dass die Menge der übertragenen Proteine bei allen getesteten Zelllinien in etwa gleich war, eine vermehrte Beladung der Tasche des J774A.1-Ansatzes konnte ausgeschlossen werden. An die Monozyten/Makrophagen bindet in diesem Versuch verhältnismäßig mehr mPA-C3bot1E174Q als an die HeLa-, Vero-, und CHO-K1-Zellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Chimäre mPA-C3bot1E174Q eine selektive Wirkung auf Monozyten/ Makrophagen besitzt. Sie fungiert als Transporter für LF_NDTA und das His_6-markierte Protein His-TccC3 in die Monozyten/Makrophagen J774A.1. Zusätzlich konnte im Vergleich zu HeLa-, Vero-, und CHO-K1-Zellen eine verstärkte Bindung von mPA-C3bot1E174Q an J774A.1-Zellen festgestellt werden.

4 Diskussion

Bereits 2010 konnte in der AG Barth gezeigt werden, dass C3bot1 und C3lim selektiv in das Zytosol von Makrophagen/Monozyten aufgenommen werden (Fahrer et al. 2010). Auch Fusionsproteine aus enzymatisch inaktiven C3bot1E174Q und dem Biotin-bindenden Protein Streptavidin oder C2I zeigten bei Folgeuntersuchungen in der AG Barth eine Selektivität für Makrophagen/Monozyten, was die Anwendung von C3bot1E174Q als Transportsysteme für Proteine belegt (Lillich et al. 2012) (Christow et al. 2013) (Dmochewitz et al. 2013). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung, ob mPA-C3bot1E174Q einen weiteren selektiven Transporter für Proteine in Makrophagen/Monozyten darstellt.

Hierfür wurde die Proteinchimäre mPA-C3bot1E174Q mit LF_NDTA als Reporterenzym auf Makrophagen/Monozyten (J774A.1), Epithelzellen (Vero, HeLa) und Fibroblasten (CHO-K1) angewendet. Bereits nach 48 Stunden konnten erste Zellabrundungen bei den Makrophagen J774A.1 festgestellt werden und auch das Ergebnis des Zellviabilitätstests zeigte den Zelltod der mit Chimäre und LF_NDTA behandelten Makrophagen. Dies bestätigte den erfolgten Transport von LF_NDTA in das Zytosol der J774A.1-Zellen. Im Gegensatz dazu konnte bei den Epithelzelllinien Vero und HeLa und bei der Fibroblastenzelllinie CHO-K1 selbst nach 72 Stunden kein Effekt festgestellt werden. Auch die Behandlung der J774A.1 mit den Einzelkomponenten LF_NDTA bzw. mPA-C3bot1E174Q zeigte keine morphologischen oder zytotoxischen Veränderungen. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass der Transport von LF_NDTA spezifisch über die Chimäre mPA-C3bot1E174Q in das Zytosol der J774A.1-Zellen erfolgt ist. Das Ausbleiben einer Vergiftung der anderen Zelllinien passte zu Ergebnissen früherer Versuche, bei denen nur durch das artifizielle Einbringen von C3-Toxinen in das Zytosol von HeLa-, Vero- und CHO-K1-Zellen eine Vergiftung dieser Zelllinien bewirkt werden konnte (Chardin et al. 1989) (Paterson et al. 1990) (Ridley und Hall 1992) (Rubin et al. 1988). Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die von A. J. McCluskey (Harvard Medical School) hergestellte Protein-Chimäre mPa-C3bot1E174Q als selektiver Transporter für Toxine in kultivierte J774A.1 Makrophagen/Monozyten wirkt.

Die Einführung der Mutationen N682A und D683A in Domäne 4 von PA_{83} der Chimäre ließ keine Bindung an die Anthrax-Rezeptoren 1 und 2 zu, behinderte jedoch nicht die Ausbildung der Prä-Pore oder die Membran-Insertion in die frühen Endosomen. Ebenfalls erhalten war die Transportfunktion für natives LF und EF (Mechaly, 2012). Da das Toxin LF_NDTA wie das native LF an heptamerisiertes PA_{63} binden und endozytiert werden kann (Arora und Leppla 1993), konnte es über die mutierte PA-Pore von mPA-C3bot1E174Q in das Zytosol der Makrophagen/Monozyten J774A.1 transportiert werden. Während die Bindung an die Makrophagen wie in den früheren Versuchen der AG Barth über C3bot1E174Q erfolgte, könnte das in der Protein-Chimäre mPA-C3bot1E174Q enthaltene PA_{83} durch Porenbildung hingegen den Vorteil eines Transportweges für mehrere LF_NDTA-Moleküle auf einmal bieten (Mogridge et al. 1992). Dies ist in Folgeversuchen noch abzuklären.

Des Weiteren konnte im Rahmen dieser Arbeit der Transport des His_6-markierten Toxins TccC3 über mPA-C3bot1E174Q in die Makrophagen/Monozyten J774A.1 gezeigt werden. Dazu wurden J774A.1- und HeLa-Zellen, repräsentativ für eine Nicht-Makrophagen-Zelllinie, mit der Chimäre und His_6-TccC3 behandelt. Der Zellvergiftungsversuch und der Zellviabilitätstest demonstrierten die toxische Wirkung von His_6-TccC3 auf die Makrophagen/Monozyten. Dagegen hatte His-TccC3 in Kombination mit der Chimäre mPA-C3bot1E174Q bei HeLa-Zellen keinen Effekt auf Morphologie und Zellstoffwechsel. Da das Toxin His_6-TccC3 alleine auf J774A.1 nicht in die Zellen aufgenommen wurde, folgte als Schluss, dass die spezifische Aufnahme des His_6-markierten Toxins über die Chimäre mPA-C3bot1E174Q erfolgte. In einer früheren Versuchsreihe der AG Benz konnte die Addition eines His_6-Schwanzes an LF und EF durch die zusätzlich positive Ladung eine verbesserte Bindung an die PA_{63}-Pore bewirken. Durch die N-terminale Bindung von His_6 an C2I aus *C. botulinum* konnte dessen Transport sogar um den Faktor 10 gesteigert werden (Beitzinger et al. 2012). Die Verbesserung des Transportes durch die His-Markierung wurde durch die AG Benz allerdings nur für Proteine gezeigt, die bereits eine Affinität (positive Ladung) für PA_{63} besitzen. Obwohl noch keine Affinität von TccC3 ohne His_6-Markierung zu PA_{63} gezeigt wurde, lag die Vermutung nahe, dass eine Bindung durch die positive Ladung von TccC3 begünstigt ist. Dies könnte für die Chimäre mPA-

C3bot1E174Q bedeuten, dass sie wie das native PA_{63}, ebenfalls Kationen-selektiv ist (Neumeyer et al. 2006) und einen Transport von His_6-markierten Proteinen fördert. Der im Vergleich zu den LF_NDTA-behandelten Zellen stärkere Vergiftungsverlauf der Zellen, die mit der Protein-Chimäre und His_6-TccC3 behandelt wurden, könnte hier erste Hinweise geben. Um diese Vermutung zu bekräftigen, ist der Transport anderer Proteine mit His_6-Schwanz zu untersuchen. In Hinblick auf einen pharmakologischen Einsatz ist zu prüfen, ob auch primär ungeladene oder sogar bis zur Addition der Histidine negativ geladene Proteine transloziert werden können. Auch die Frage nach der maximalen Größe der transportierbaren Proteine könnte Thema von Folgeuntersuchungen sein.

Im weiteren Verlauf wurden Versuche zur näheren Klassifizierung der Bindung von mPA-C3bot1E174Q an die murinen Makrophagen/Monozyten durchgeführt. Bei dem Bindungsversuch bei 4°C wurde die Chimäre an Makrophagen/Monozyten (J774A.1), Fibroblasten (CHO-K1) und an Epithelzelllinien (Vero, HeLa) getestet. Die Chimäre hatte an fast alle Zelllinien gebunden und auch bei mehrmaliger Wiederholung des Versuches änderte sich an diesem Ergebnis nichts. Die Chimäre mPA-C3bot1E174Q scheint an alle der hier getesteten Zelllinien binden zu können, wobei sie nur bei den murinen Makrophagen/Monozyten in Kombination mit LF_NDTA/His_6-TccC3 eine Vergiftung der Zellen bewirkte. Die Bindung der Chimäre an die Zelllinien war in diesen Versuchen derart stabil, dass auch mehrfache Waschschritte mit PBS kein Ablösen der Chimäre von den Zellen bewirkte. Dies könnte für eine spezifische Bindung an einen Rezeptor und/oder eine spezifische Bindung an die Zellmembran der Zellen sprechen. Zurzeit sind noch keine Rezeptoren für die C3-Toxine bekannt und auch der selektive Aufnahmemechanismus in Makrophagen/Monozyten ist nicht gänzlich geklärt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das in der Chimäre enthaltene C3bot1 nicht nur spezifisch an die Oberfläche von Makrophagen/Monozyten bindet, sondern auch an die hier getesteten Epithelzelllinien und Fibroblasten. Weiterhin konnte in der AG Barth festgestellt werden, dass die Bindung an die Oberfläche der Zellen keiner Sättigungskurve folgt (nicht veröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse stützen die Vermutung einer basalen Bindung des C3-Toxins an die Zellmembranen aller getesteten Zelllinien. Da jedoch nur J774A.1-Zellen bei der Behandlung mit LF_NDTA und der Chimäre mPA-C3bot1E174Q Vergiftungen

anzeigten und in Versuchsreihen der AG Barth die Aufnahme des Toxins durch unspezifische Pinozytose ausgeschlossen werden konnte (Fahrer et al. 2010), müssen Makrophagen/Monozyten im Gegensatz zu den getesteten Epithelzelllinien und Fibroblasten einen besonderen Aufnahmemechanismus für C3bot1 besitzen. Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um einen spezifischen Rezeptor, der den Transport von C3-Toxinen in das Zytosol vermittelt. Zum Aufnahmemechanismus des Toxins in das Zytosol der Makrophagen/Monozyten gibt es unterschiedliche Publikationen. 2010 erbrachten die Versuche der AG Barth als Ergebnis die Aufnahme des C3bot1-Toxins in J774A.1-Zellen durch Ansäuerung der frühen Endosomen (Fahrer et al. 2010). Vor kurzem zeigte die AG Just, dass C3-Exoenzyme nicht nur die Ansäuerung der frühen Endosomen für die Aufnahme in das Zytosol der Monozyten/Makrophagen J774A.1 benötigen und nicht streng an Clathrin und Caveolae gebunden sind. Ebenso scheinen Cholesterol und *lipid rafts* keine Bedeutung zu haben. Vielmehr deuten die Ergebnisse der AG Just darauf hin, dass das Filament Vimentin eine zentrale Rolle bei der Internalisierung des C3-Toxins in die Makrophagen/Monozyten J774A.1 und neuronale Zelllinie HT22 spielen könnte (Rohrbeck et al. 2014) (Rohrbeck et al. 2015).

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Untersuchung der Chimäre mPA-C3bot1E174Q als ein neuer selektiver Transporter für Makrophagen/Monozyten. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass die Chimäre mPA-C3bot1E174Q die Toxine LF_NDTA und His-TccC3 in das Zytosol von Makrophagen/Monozyten transportiert, jedoch nicht in Epithelzellen (HeLa-, Vero-Zellen) und auch nicht in Fibroblasten (CHO-K1-Zellen). Außerdem konnte bei der Analyse des Bindeverhaltens der Chimäre über ihren C3bot1E174Q-Anteil eine basale Bindung an alle getesteten Zelllinien festgestellt werden. Da jedoch nur ein Toxintransport durch mPA-C3bot1E174Q in das Zytosol der Makrophagen/Monozyten stattfand, wird hinter dem Aufnahmemechanismus ein Rezeptor vermutet.

Nachdem mPa-C3bot1E174Q in Anbetracht der Größe und Ladung der zu transportierenden Proteine weiter getestet und optimiert wurde, ist ein Einsatz in der Medizin als selektiver Transporter für Makrophagen/Monozyten in der Zukunft

möglich. Hier könnte mPA-C3bot1E174Q bei Lungenkontusion nach stumpfen Thoraxtrauma seine Anwendung finden.

4.1 Diskussion Kompetitionsversuch

Zur Analyse der Bindung von mPA-C3bot1E174Q an die murinen Makrophagen J774A.1 wurde ein Kompetitionsversuch mit einem 100fachen Überschuss an C3bot1E174Q zu mPA-C3bot1E174Q und His_6-TccC3 durchgeführt. Ein Rezeptor für C3bot1 ist bisher nicht bekannt, jedoch wird nach den Versuchen in der AG Barth (Fahrer, 2010) eine Aufnahme durch unspezifische Pinozytose ausgeschlossen und ein Rezeptor hinter dem Aufnahmemechanismus vermutet. Da C3bot1E174Q und die Chimäre mPA-C3bot1E174Q die gleiche Bindedomäne des C3-Toxins besitzen, müssten sie an den gleichen Rezeptor binden. Welches Protein an die Zellen gebunden hat, hätte anhand der Zellabrundung festgestellt werden sollen. Bindet C3bot1E174Q an die Rezeptoren, so erfolgt keine Vergiftung, da es sich hierbei um eine inaktive Mutante des C3-Toxins handelt (Aktories K. J., 1995), (Böhmer, 1996), (Han, 2001). Bindet jedoch die Chimäre an die Zellen, so wird His_6-TccC3 in das Zytosol transportiert und führt zur Vergiftung. Ein Ausbleiben der Zellvergiftung nach Behandlung der J774A.1 mit mPA-C3bot1E174Q und His_6TccC3 und C3bot1E174Q im Überschuss hätte für eine Konkurrenz der beiden Proteine um einen Rezeptor gesprochen, die durch den 100-fachen Überschuss zugunsten von C3bot1E174Q hätte ausfallen müssen. Dies sollte die Existenz des bisher nicht bekannten C3bot1-Rezeptors bestätigen. Der Kompetitionsversuch konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich durchgeführt werden. Aus unbekannten Gründen gingen die Zellen wiederholt zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Versuchsverlauf zu Grunde und das Ergebnis konnte deshalb nicht ausgewertet werden.

5 Zusammenfassung

Bakterielle Exotoxine sind Ursache für eine Vielzahl von Erkrankungen wie z.B. Milzbrand oder Diphtherie. Diese Toxine bestehen aus zwei Komponenten: einer enzymatisch aktiven Komponente (A-Domäne) und einer Komponente für die Bindung an die Zellen und den Transport in das Zytosol (B-Domäne), weshalb man sie auch AB-Toxine nennt. Sie binden selektiv an Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen und werden anschließend Rezeptor-vermittelt endozytiert. Die enzymatische Komponente modifiziert im Zytosol ihr spezifisches Substrat und bewirkt so Veränderungen der Zellmorphologie und des Zellstoffwechsels. Die Arbeitsgruppe Barth erforscht die Verwendung von AB-Toxinen als „Trojanische Pferde“ zum Einbringen von Molekülen in das Zytosol von Zellen in Hinblick auf einen späteren pharmakologischen Nutzen.

Makrophagen/Monozyten sind an vielen Prozessen des Immunsystems beteiligt und auch bei Lungenkontusionen nach stumpfen Thoraxtrauma und Verbrennungen spielen sie eine wichtige Rolle. Dies macht sie als pharmakologisches Ziel sehr interessant. Das Toxin C3bot1 von *C. botulinum* wird selektiv von Makrophagen/Monozyten aufgenommen und bietet sich deshalb als Teil in einem Fusionsprotein für die Bildung eines Makrophagen-selektiven Transporters für Proteine an.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung und Charakterisierung der Protein-Chimäre mPA-C3bot1E174Q als ein möglicher Transporter für Proteine in Makrophagen/Monozyten. Diese Protein-Chimäre besteht aus dem enzymatisch inaktiven C3bot1-Toxin C3bot1E174Q für die Bindung an die Makrophagen/Monozyten und einer Rezeptorvariante von PA_{63} (B-Domäne) des Anthrax-Toxins. Durch die Einführung von Mutationen in PA_{63} wird die Bindung an die auf allen Zellen vorkommenden Anthraxrezeptoren verhindert, jedoch besitzt das mutierte PA_{63} (mPA) noch die Fähigkeit Poren in der Membran der frühen Endosomen auszubilden und ermöglicht so den Transport von Toxinen in das Zytosol der Zielzellen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bewiesen werden, dass mPA-C3bot1E174Q selektiv das Toxin LF_NDTA in die murinen

Makrophagen/Monozyten-Zellen J774A.1 transportiert, jedoch in keine der anderen getesteten Epithelzelllinien (HeLa-, Vero-Zellen) oder Fibroblasten (CHO-K1-Zellen). Außerdem war es möglich das His_6-markierte Toxin TccC3 über mPA-C3bot1E174Q in die murinen Makrophagen/Monozyten J774A.1 zu translozieren. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass mPA-C3bot1E174Q ein geeignetes Transportsystem für Makrophagen/Monozyten darstellt. Nachdem mPa-C3bot1E174Q in Anbetracht der Größe und Ladung der zu transportierenden Proteine weiter getestet und optimiert wurde, ist ein Einsatz in der Medizin als selektiver Transporter für Makrophagen/Monozyten in der Zukunft möglich. Hier könnte mPA-C3bot1E174Q bei Lungenkontusion nach stumpfen Thoraxtrauma seine Anwendung finden.

Bei der Analyse der Bindung von mPA-C3bot1E174Q an die J774A.1-, HeLa-, Vero- und CHO-K1-Zellen ergaben sich Hinweise auf den Aufnahmemechanismus von C3-Toxinen. Es wurde eine basale Bindung von mPA-C3bot1E174Q an alle getesteten Zelltypen festgestellt, jedoch transportierte die Chimäre mPA-C3bot1E174Q nur Proteine in das Zytosol von Makrophagen/Monozyten. Dies könnte auf eine spezifische Membranbindung des C3bot1-Toxins an alle getesteten Zelltypen hindeuten und die Existenz eines nur auf Makrophagen/Monozyten befindlichen Rezeptors für die selektive Toxinaufnahme wahrscheinlich machen.

6 Literaturverzeichnis

1. **Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S. H., van der Goot, G.** (2003): Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *The Journal of Cell Biology* 3: 321–328.
2. **Aepfelbacher, M.; Essler, M.; Huber, E.; Czech, A.; Weber, P. C.** (1996): Rho is a negative regulator of human monocyte spreading. *The* Journal of Immunology 11: 5070–5075.
3. **Aktories, K.; Jung, M., Böhmer, J., Fritz, G., Vandekerckhove, J., Just, I.** (1995): Studies on the active-site structure of C3-like exoenzymes. Involvement of glutamic acid in catalysis of ADP-ribosylation. *Biochimie 77*: 326–332.
4. **Aktories, K.; Rösener, S.; Blaschke, U.; Chhatwal, G. S.** (1988): Botulinum ADP-ribosyltransferase C3. *The FEBS Journal* 2: 445–450.
5. **Aktories, K.; Weller, U.; Chhatwal, G. S.** (1987): Clostridium botulinum type C produces a novel ADP-ribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin. *FEBS Letters* 1: 109–113.
6. **Arora, N.; Leppla, S. H.** (1993): Residues 1-254 of anthrax toxin lethal factor are sufficient to cause cellular uptake of fused polypeptides. *The Journal of Biological Chemistry* 5: 3334–3341.
7. **Ascenzi, P.; Visca, P.; Ippolito, G.; Spallarossa, A.; Bolognesi, M.; Montecucco, C.** (2002): Anthrax toxin. A tripartite lethal combination. *FEBS Letters* 531: 384–388.
8. **Barth, H.; Blöcker, D.; Behlke, J.; Bergsma-Schutter, W.; Brisson, A.; Benz, R.; Aktories, K.** (2000): Cellular Uptake of Clostridium botulinum C2 Toxin Requires Oligomerization and Acidification. *The Journal of Biological Chemestry* 25: 18704–18711.
9. **Barth, H.; Aktories, K.; Popoff, M. R.; Stiles, B. G.** (2004): Binary Bacterial Toxins: Biochemistry, Biology, and Applications of common Clostridium and Bacillus Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68*:* 373–402
10. **Barth, H.; Stiles, B.** (2008): Binary Actin-ADP-Ribosylating Toxins and their Use as Molecular Trojan Horses for Drug Delivery into Eukaryotic Cells. *Current Medicinal Chemistry* 15: 459–469.
11. **Beauregard, K. E.; Collier, R. J.; Swanson, J. A.** (2000): Proteolytic activation of receptor-bound anthrax protective antigen on macrophages promotes its internalization. *Cellular Microbiology* 2: 251–258.
12. **Beitzinger, C., Caroline Stefani, Angelika Kronhardt, Monica Rolando, Gilles Flatau, Emmanuel Lemichez, Roland Benz** (2012): Role of N-Terminal His6-Tags in Binding and Efficient Translocation of Polypeptides into Cells Using Anthrax Protective Antigen (PA). *PLoS ONE* 10: 459–469
13. **Bhakdi, S., J Tranum-Jensen, A Sziegoleit** (1985): Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infection and Immunity* 1: 52–60
14. **Blaustein, R. O.,Koehler T. M. , Collier R. J., Finkelstein A.** (1989): Anthrax toxin: channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipid bilayers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 7*: 2209–2213.
15. **Bohmer, J.; Jung, M.; Sehr, P.; Fritz, G.; Popoff, M.; Just, I.; Aktories, K.** (1996): Active site mutation of the C3-like ADP-ribosyltransferase from Clostridium limosum-analysis of glutamic acid 174. *Biochemistry* 1: 282–289.

16. **Bowen, D.** (1998): Insecticidal Toxins from the Bacterium Photorhabdus luminescens. *Science* 5372: 2129–2132.
17. **Bradley, K. A., Mogridge, J., Mourez, M., Collier, R. J., Young, J. A.** (2001): Indetification of the cellular receptor for anthrax toxin. *Nature* 414: 225–229.
18. **Brossier, F.; Mock, M.** (2001): Toxins of Bacillus anthracis. *Toxicon* 11: 1747–1755.
19. **Buttke, T. M., McCubrey, J. A., Owen, T.C.** (1993): Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *Journal of Immunological Methods* 157: 233–240.
20. **Chardin, P., P Boquet, P Madaule, M R Popoff, E. J. Rubin, D M Gill** (1989): The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *The EMBO Journal* 4: 1087–1092.
21. **Christow, H.; Lillich, M.; Sold, A.; Fahrer, J.; Barth, H.** (2013): Recombinant streptavidin-C3bot for delivery of proteins into macrophages. *Toxicon 75*: 144–147.
22. **Chung, D. W., Collier, R. J.** (1977): The mechanism of ADP-ribosylation of elongation factor 2 catalyzed by fragment A from diphtheria toxin. *Biochimica et Biophysica Acta* 483: 248–257.
23. **Collier, R. J.** (1975): Diphtheria toxin: mode of action and structure. *Bacteriological Reviews* 1: 54–85.
24. **Corda, D.; Di M, G.** (2003): Functional aspects of protein mono-ADP-ribosylation. *The EMBO Journal* 9: 1953–1958.
25. **Cory, A. H., Owen, T. C., Barltrop, J. A., Cory, J. G.** (1991): Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Communications Journal* 3: 207–212.
26. **Cunningham, K., D. Borden Lacy, Jeremy Mogridge, R. John Collier** (2002): Mapping the lethal factor and edema factor binding sites on oligomeric anthrax protective antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 10: 7049–7053.
27. **Dmochewitz, L.; Fortsch, C.; Zwerger, C.; Vaeth, M.; Felder, E.; Huber-Lang, M.; Barth, H.** (2013): A recombinant fusion toxin based on enzymatic inactive C3bot1 selectively targets macrophages. *PLoS ONE* 1: e54517.
28. **Duesbery, N. S.; Webb, C. P.; Leppla, S. H.; Gordon, V. M.; Klimpel, K. R.; Copeland, T. D. et al.** (1998): Proteolytic Inactivation of MAP-Kinase-Kinase by Anthrax Lethal Factor. *Science* 5364: 734–737.
29. **Fahrer, J.; Kuban, J.; Heine, K.; Rupps, G.; Kaiser, E.; Felder, E. et al.** (2010): Selective and specific internalization of clostridial C3 ADP-ribosyltransferases into macrophages and monocytes. *Cellular Microbiology* 2: 233–247.
30. **Fendrick, J. L.; Iglewski, W. J.; Moehring, J. M.; Moehring, T. J.** (1992): Characterization of the endogenous ADP-ribosylation of wild-type and mutant elongation factor 2 in eukaryotic cells. *The FEBS Journal* 1: 25–31.
31. **Ffrench-Constant, R.; Waterfield, N.** (2006): An ABC Guide to the Bacterial Toxin Complexes. *Advances in Applied Microbiology Volume* 58: 169–183. Elsevier, München
32. **Ffrench-Constant, R.; Waterfield, N.; Daborn, P.; Joyce, S.; Bennett, H.; Au, C. et al.** (2003): Photorhabdus: towards a functional genomic analysis of a symbiont and pathogen. *FEMS Microbiology Reviews* 5: 433–456.

33. **Forst, S.; Dowds, B.; Boemare, N.; Stackebrandt, E.** (1997): Xenorhabdus and Photorhabdus spp.: bugs that kill bugs. *Annual Review of Microbiology*: 47–72.
34. **Gatsogiannis, C.; Lang, A. E.; Meusch, D.; Pfaumann, V.; Hofnagel, O.; Benz, R. et al.** (2013): A syringe-like injection mechanism in Photorhabdus luminescens toxins. *Nature* 7442: 520–523.
35. **Giovane, A.; Balestrieri, C.; Quagliuolo, L.; Servillo, L.** (1985): 1-N6-Etheno-ADP-ribosylation of elongation factor-2 by diphtheria toxin. *FEBS Letters* 2: 191–194.
36. **Gordon, V. M.; Leppla, S. H.** (1994): Proteolytic activation of bacterial toxins: role of bacterial and host cell proteases. *Infection and Immunity* 2: 333–340.
37. **Han, S.; Arvai, A. S.; Clancy, S. B.; Tainer, J. A.** (2001): Crystal structure and novel recognition motif of rho ADP-ribosylating C3 exoenzyme from Clostridium botulinum: structural insights for recognition specificity and catalysis. *Journal of Molecular Biology* 1: 95–107.
38. **Klimpel, K. R.; Molloy, S. S.; Thomas, G.; Leppla, S. H.** (1992): Anthrax toxin protective antigen is activated by a cell surface protease with the sequence specificity and catalytic properties of furin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 21: 10277–10281.
39. **Koehler, T. M.; Collier, R. J.** (1991): Anthrax toxin protective antigen. Low-pH-induced hydrophobicity and channel formation in liposomes. *Molecular Microbiology* 6: 1501–1506.
40. **Krantz, B. A.; Melnyk, R. A.; Zhang, S.; Juris, S. J.; Lacy, D. B.; Wu, Z. et al.** (2005): A Phenylalanine Clamp Catalyzes Protein Translocation Through the Anthrax Toxin Pore. *Science* 5735: 777–781.
41. **Krantz, B. A.; Trivedi, A. D.; Cunningham, K.; Christensen, K. A.; Collier, R. J.** (2004): Acid-induced unfolding of the amino-terminal domains of the lethal and edema factors of anthrax toxin. *Journal of molecular biology* 3: 739–756.
42. **Lacy, D. B.; Wigelsworth, D. J.; Melnyk, R. A.; Harrison, S. C.; Collier, R. J.** (2004): Structure of heptameric protective antigen bound to an anthrax toxin receptor: A role for receptor in pH-dependent pore formation. *Proceedings of the National Academy of Science* 36: 13147–13151.
43. **Lämmli, U. K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
44. **Lang, A. E.; Konukiewitz, J.; Aktories, K.; Benz, R.** (2013): TcdA1 of Photorhabdus luminescens: electrophysiological analysis of pore formation and effector binding. *Biophysical Journal* 2: 376–384.
45. **Lang, A. E.; Schmidt, G.; Schlosser, A.; Hey, T. D.; Larrinua, I. M.; Sheets, J. J. et al.** (2010): Photorhabdus luminescens toxins ADP-ribosylate actin and RhoA to force actin clustering. *Science (New York, N.Y.)* 5969: 1139–1142.
46. **Leppla, S. H.** (1982): Anthrax toxin edema factor: A bacterial adenylate cyclase that increases cyclic AMP concentrations of eucaryotic cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 79: 3162–31666.
47. **Lillich, M.; Chen, X.; Weil, T.; Barth, H.; Fahrer, J.** (2012): Streptavidin-conjugated C3 protein mediates the delivery of mono-biotinylated RNAse A into macrophages. *Bioconjugate Chemistry* 7: 1426–1436.
48. **Liu, S.; Leppla, S. H.** (2003): Cell Surface Tumor Endothelium Marker 8 Cytoplasmic Tail-independent Anthrax Toxin Binding, Proteolytic Processing,

Oligomer Formation, and Internalization. *Journal of Biological Chemistry* 7: 5227–5234.
49. **McCluskey, A. J.; Collier, R. J.** (2013): Receptor-directed chimeric toxins created by sortase-mediated protein fusion. *Molecular Cancer Therapeutics* 10: 2273–2281.
50. **Mechaly, A.; McCluskey, A. J.; Collier, R. J.** (2012): Changing the receptor specificity of anthrax toxin. *mBio* 3: e00088-12
51. **Meusch, D.; Gatsogiannis, C.; Efremov, R. G.; Lang, A. E.; Hofnagel, O.; Vetter, I. R. et al.** (2014): Mechanism of Tc toxin action revealed in molecular detail. *Nature* 7494: 61–65.
52. **Milne, J. C.; Blanket, S. R.; Hanna, P. C.; Collier, R. J.** (1995): Protective antigen-binding domain of anthrax lethal factor mediates translocation of a heterologous protein fused to its amino- or carboxy-terminus. *Molecular Microbiology* 4: 661–666.
53. **Mogridge, J.; Cunningham, K.; Lacy, D. B.; Mourez, M.; Collier, R. J.** (2002): The lethal and edema factors of anthrax toxin bind only to oligomeric forms of the protective antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 10: 7045–7048.
54. **Mogridge, J.; Mourez, M.; Collier, R. J.** (2001): Involvement of domain 3 in oligomerization by the protective antigen moiety of anthrax toxin. *Journal of Bacteriology* 6: 2111–2116.
55. **Neumeyer, T.; Tonello, F.; Molin, F. D.; Schiffler, B.; Benz, R.** (2006): Anthrax Edema Factor, Voltage-dependent Binding to the Protective Antigen Ion Channel and Comparison to LF Binding. *Journal of Biological Chemistry* 43: 32335–32343.
56. **Neumeyer, T.; Tonello, F.; Dal Molin, F.; Schiffler, B.; Orlik, F.; Benz, R.** (2006): Anthrax lethal factor (LF) mediated block of the anthrax protective antigen (PA) ion channel: effect of ionic strength and voltage. *Biochemistry* 9: 3060–3068.
57. **Niesler, U.; Palmer, A.; Radermacher, P.; Huber-Lang, M. S.** (2014): Role of alveolar macrophages in the inflammatory response after trauma. *Shock (Augusta, Ga.)* 1: 3–10.
58. **Pannifer, A. D.; Wong, T. Y.; Schwarzenbacher, R.; Renatus, M.; Petosa, C.; Bienkowska, J. et al.** (2001): Crystal structure of the anthrax lethal factor. *Nature* 6860: 229–233.
59. **Paterson, H. F.; Self, A. J.; Garrett, M. D.; Just, I., Aktories, K.; Hall, A.** (1990): Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *Journal of Cell Biology* 111:1001–1007
60. **Ridley, A. J.; Hall, A.** (1992): The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 3: 389–399.
61. **Rohrbeck, A.; Elsner, L.** von; **Hagemann, S.; Just, I.** (2015): Uptake of clostridium botulinum C3 exoenzyme into intact HT22 and J774A.1 cells. *Toxins* 2: 380–395.
62. **Rohrbeck, A.; Schroder, A.; Hagemann, S.; Pich, A.; Holtje, M.; Ahnert-Hilger, G.; Just, I.** (2014): Vimentin mediates uptake of C3 exoenzyme. *PLoS ONE* 6: e101071.
63. **Rubin, E.J.; Gill, D. M.; Boquet, P.; Popoff, M. R.** (1988): Functional modification of a 21-kilodalton G protein when ADP-ribosylated by exoenzyme C3 of Clostridium botulinum. *Molecular and Cellular Biology* 1: 418-26.

64. **Sandvig, K.; Olsnes, S.** (1980): Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *The Journal of Cell Biology* 3: 828–32.
65. **Sandvig, K.; van Deurs, B.** (2002): Transport of protein toxins into cells. Pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Letters* 1: 49–53.
66. **Sekine, A.; Fujiwara, M.; Narumiya, S.** (1989): Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 15: 8602–8605.
67. **Shall, S.** (1995): ADP-ribosylation reactions. *Biochimie* 5: 313–318.
68. **Sitikov, A. S.; Davydova, E. K.; Bezlepkina, T. A.; Ovchinnikov, L. P.; Spirin, A. S.** (1984): Eukaryotic elongation factor 2 loses its non-specific affinity for RNA and leaves polyribosomes as a result of ADP-ribosylation. *FEBS Letters* 2: 406–410.
69. **Ueda, K.; Hayaishi, O.** (1985): ADP-ribosylation. *Annual Review of Biochemistry* 54: 73–100.
70. **Vitale, G.; Bernardi, L.; Napolitani, G.; Mock, M.; Montecucco, C.** (2000): Susceptibility of mitogen-activated protein kinase kinase family members to proteolysis by anthrax lethal factor. *Biochemical Journal* 3: 739–745.
71. **Vitale, G.; Pellizzari, R.; Recchi, C.; Napolitani, G.; Mock, M.; Montecucco, C.** (1999): Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKS and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKS in cultured macrophages. *Journal of Applied Microbiology* 2: 288.
72. **Vogelsgesang, M.; Pautsch, A.; Aktories, K.** (2007): C3 exoenzymes, novel insights into structure and action of Rho-ADP-ribosylating toxins. *Naunyn-Schmiedberg's Archiv of Pharmacology* 374: 347–360.
73. **Waterfield, N. R.; Bowen, D. J.; Fetherston, J. D.; Perry, R. D.; Ffrench-Constant, R. H.** (2001): The tc genes of Photorhabdus. A growing family. *Trends in Microbiology* 4: 185–191.

Anhang

Diese Seite wurden aus Datenschutzgründen entfernt.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Protektiven Antigens PA_{83} von *Bacillus anthracis* nach (Barth et al. 2004) 4
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bindung und Aufnahme des Anthrax-Toxins nach (Barth et al. 2004). 7
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Fusionstoxins LF_NDTA nach (Milne et al. 1995) 8
Abbildung 4 Schematische Darstellung der Chimäre mPA-C3bot1E174Q nach (Mechaly et al. 2012) 12
Abbildung 5: Aufbau und Schichtung bei einem Wet-Blot 29
Abbildung 6: Western Blot zum Nachweis der Identität von mPA-C3bot1E174Q. 31
Abbildung 7: Ergebnisse des Zytotoxizitätsversuchs mit mPA-C3bot1E174Q und LF_NDTA an J774A.1 Zellen. 33
Abbildung 8: Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche von mPA-C3bot1E174Q mit LF_NDTA an Vero-, HeLa- und CHO-K1-Zellen nach 72h 36
Abbildung 9: Ergebnisse des Zytotoxizitätsversuchs von mPA-C3bot1E174Q mit His_6-TccC3 an HeLa- und J774A.1-Zellen nach 72h 38
Abbildung 10: Western Blot zum Nachweis der Bindung von mPA-C3bot1E174Q an J774A.1-, CHO-K1-, HeLa- und Vero-Zellen 40

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien 14
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialen 15
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte 16
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten eukaryotischen Zelllinien 17
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Nährmedien und deren Zusätze 17
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Puffer und deren Zusammensetzung 18
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Toxine 20
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Antikörper zur Proteindetektion 21
Tabelle 9: Verwendeter Molekulargewichtmarker 21
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Software 21
Tabelle 11 Versuchsansätze des Kompetitionsversuches: 25
Tabelle 12: Zusammensetzung der verwendeten Sammel- und Trenngele vier kleiner Gele 28
Tabelle 13 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele eines großen Gels.. 28

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name:	Albrecht
Vorname:	Sabine

Schulischer Werdegang/ Bildungsweg

Grundschule:	Grundschule Am Gautor, 55276 Oppenheim Von 1997- 2001
Weiterführende Schule:	Gymnasium zu St. Katharinen, 55276 Oppenheim Von 2001-2010
Studium der Humanmedizin	seit WS 2010 in Ulm
1. Staatsexamen	Herbst 2012
2. Staatsexamen	Frühjahr 2016
3.Staatsexamen	Mai 2017
Promotion	16.11.17

Forschungsstipendium Experimentelle Medizin 2013/14 für die Promotion im Institut der Toxikologie 89075 Ulm