Universitätsklinikum Ulm

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Peter Gierschik

Leiter der Toxikologie: Prof. Dr. rer. nat. Holger Barth

Interaktion des Pertussistoxins mit dem Chaperon Hsp90 und Peptidyl-prolyl-*cis*/*trans*-Isomerasen während seiner Aufnahme in Säugetierzellen.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Nina Eberhardt

Geislingen an der Steige

2018

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Holger Barth
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Manfred Frick
Tag der Promotion:	12. Dezember 2019

Teile der vorliegenden Dissertation sind bereits in folgender Publikation mit geteilter Erstautorenschaft im Mai 2018 bei Toxins (Basel) veröffentlicht worden:

ERNST, K*, **EBERHARDT, N***, MITTLER, A-K*, SONNABEND, M, ANASTASIA, A, FREISINGER, S, SCHIENE-FISCHER, C, MALEŠEVIĆ, M, BARTH, H: Pharmacological cyclophilin inhibitors prevent intoxication of mammalian cells with *Bordetella pertussis* toxin. *Toxins (Basel)* **10**: 1–15. (2018). [54] Online verfügbar unter: https://doi.org/10.3390/toxins10050181.

(Veröffentlicht unter der Lizenz Attribution 4.0 International (CC BY 4.0), https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.)

(* geteilte Erstautorenschaft)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis VI

1 Einleitung 1

1.1 Bakterielle Toxine 1

1.2 AB-Toxine 3

1.3 Zelluläre Aufnahme bakterieller AB-Toxine – *short-trip* und *long-trip* Toxine 5

1.4 ADP-ribosylierende Toxine 7

1.5 *Bordetella pertussis* – Produktionsort des Pertussistoxins und Auslöser der Keuchhustenerkrankung 8

1.6 Das Pertussistoxin von *Bordetella pertussis* 14

1.7 Beteiligung zytosolischer Faktoren an der Membrantranslokation ADP-ribosylierender Toxine 20

1.8 Inhibitoren der zytosolischen Faktoren: Radicicol, Cyclosporin A, FK506, VK112, Brefeldin A 23

1.9 Zielsetzung der Arbeit 26

2 Materialien und Methoden 30

2.1 Materialien 30

2.2 Methoden 42

3 Ergebnisse 73

3.1 Aufreinigung und Charakterisierung des C180-Proteins, der S1-Untereinheit des Pertussistoxins 73

3.2 Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin – ohne Inhibitoren 85

3.3 Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin – mit Inhibitoren 96

3.4 Analyse des ADP-Ribosylierungsstatus des Pertussistoxin-Substrates $G_i\alpha$ der CHO-K1-Zellen nach Vergiftung durch Pertussistoxin (Nachribosylierungstest) 114

3.5 Analyse des Einflusses der Inhibitoren auf die Bindung von Pertussistoxin an der Zelloberfläche (Bindungstest) 117

3.6 Analyse des Einflusses der Inhibitoren auf die Enzymaktivität der S1-Untereinheit von Pertussistoxin *in vitro* (Enzymaktivitätstest) 119

3.7 Detektion der S1-Untereinheit von Pertussistoxin im Zytosol von CHO-K1-Zellen (Digitonintest) 122

3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse 130

4 Diskussion 131

4.1 Zellvergiftungsversuche mit Pertussistoxin 133

4.2 Einordnung der pharmakologischen Inhibitoren in den medizinischen Kontext .. 139

4.3 Aufreinigung und Prüfung des C180-Proteins, der S1-Untereinheit des Pertussistoxins 142

4.4 Charakterisierung des Hemmungsmechanismus der Inhibitoren 144

5 Zusammenfassung 155

6 Literaturverzeichnis 157

7 Abbildungsverzeichnis 177

8 Tabellenverzeichnis 181

Danksagung 182

Lebenslauf 183

Abkürzungsverzeichnis

A

A-Protomer	enzymatisch aktive Untereinheit von Pertussistoxin mit ADP-Ribosyltransferase-Aktivität, entspricht der S1-Untereinheit.
AC	Adenylatzyklase (englisch: „adenylate cyclase“): Membrangebundenes Enzym, das ATP zu cAMP umsetzen kann und an der Signaltransduktion beteiligt ist.
ADP	Adenosindiphosphat: Mononukleotid mit energiereichen Phosphatresten, das die Vorstufe von ATP darstellt.
APC	antigenpräsentierende Zelle (englisch: „antigen-presenting cell“): Umfasst Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen, die durch Antigenpräsentation T-Zellen aktivieren.
APS	Ammoniumperoxodisulfat: Salzhaltige, chemische Verbindung.
Arf	Adenosyl-Ribosylierungsfaktor / ADP-Ribosylierungsfaktor: Protein aus der Familie der kleinen GTPasen (Ras-Superfamilie).
ATCC	Zellkulturdatenbank (englisch: „American Type Culture Collection“): Internationale Referenzquelle für Mikroorganismen und Zellkulturlinien.
ATP	Adenosintriphosphat: Mononukleotid mit energiereichen Phosphatresten, das als Energiespeicher in der Zelle dient.
ATPase	Adenosintriphosphatase: Enzym, das ATP in ADP und Phosphat aufspaltet und dadurch Energie für Prozesse in der Zelle liefert.

B

B-Oligomer	B-Untereinheit des Pertussistoxins, die der Bindung / Translokation dient. Besteht aus den Untereinheiten S2, S3, 2 x S4 und S5.
BFA	Brefeldin A: Inhibitor des Proteintransports vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum, baut den Golgi-Apparat ab.
bidest.	doppelt destilliert (lateinisch: „bi“ = „zwei“ / „doppelt“): Beschreibt die zweimalige Destillation von H_2O zur Herstellung von Puffern.
BIS	Bis-Acrylamid: Chemischer Bestandteil von Gelen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese.
bp	Basenpaare: Einheit zur Angabe, wie viele komplementäre Basen in einem DNA- oder RNA-Abschnitt (zum Beispiel einem Gen) enthalten sind.
BrkA	*Bordetella pertussis* Autotransporter BrkA (englisch: „*Bordetella pertussis resistance to killing*“): Virulenzfaktor von *Bordetella pertussis*, der als

	Autotransporter in der äußeren Zellmembran des Erregers Adhärenz und Resistenz gegenüber der Immunantwort des Wirts vermittelt.
BSA	bovines Serumalbumin: Proteinbestandteil aus der Fraktionierung von Rinderblut, das vor allem bei Westernblots benutzt wird.

C

C-Terminus	Carboxy-terminales Ende: Protein-Ende mit einer Aminosäure, die eine freie Carboxygruppe (-COOH) besitzt.
C180-Protein	Aufgereinigtes Protein aus dem Plasmid ptacC180, das für die S1-Untereinheit von Pertussistoxin kodiert.
$C_3H_4N_2$	Imidazol: Heterozyklische, aromatische, organische Verbindung mit zwei Stickstoffatomen, die basisch reagiert.
C2I	Enzymkomponente des C2-Toxins von *Clostridium botulinum*.
C2IN	N-terminaler Anteil der Enzymkomponente C2I des C2-Toxins von *Clostridium botulinum*, das die Translokation der Enzymkomponente C2I oder die fusionierter Enzymuntereinheiten anderer Toxine durch die Translokationskomponente C2IIa des C2-Toxins vermittelt.
C2IN-C3lim	Fusionstoxin aus dem N-terminalen Anteil der Enzymkomponente C2I des C2-Toxins von *Clostridium botulinum* und dem Exoenzym C3 von *Clostridium limosum.*
C2IIa	Aktivierte Bindungs- / Translokationskomponente des C2-Toxins von *Clostridium botulinum*.
C3lim	Exoenzym C3 von *Clostridium limosum*: Sezerniertes Enzym, das ADP-Ribosyltransferase-Aktivität hat.
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat (englisch: „cyclic adenosine monophosphate“): Von ATP abgeleitetes Molekül, das als Second Messenger bei der zellulären Signaltransduktion fungiert und zur Aktivierung von Proteinkinasen führt.
CDT	*Clostridium difficile* Toxin: Toxin von *Clostridium difficile*.
CHO-Zellen	„Chinese Hamster Ovary“-Zellen: Ovarienzellen (Fibroblasten) des chinesischen Hamsters, *Cricetulus griseus*, die eine eukaryotische, adhärente Zelllinie bilden (ATCC Nr. CCL-61) und für Zellkulturversuche verwendet werden.
CO_2	Kohlenstoffdioxid: Gasförmige chemische Verbindung aus Kohlenstoff und Sauerstoff.

COP	„Coat Protein“: Familie aus Transportproteinen, die am Proteintransport zwischen Golgi-Apparat und endoplasmatischem Retikulum durch COP-I- und COP-II-Vesikel beteiligt ist.
CsA	Cyclosporin A: Spezifischer pharmakologischer Inhibitor von Cyclophilinen.
CTF	zytosolische Translokationsfaktoren: Ein Komplex aus mehreren Proteinen im Zytosol der Wirtszelle, die an der Translokation von einigen AB-Toxinen beteiligt sind.
CyaA	Adenylatzyklase Toxin (englisch: „Adenylate Cyclase Toxin“): Virulenzfaktor von *Bordetella pertussis*.
CypA	Cyclophilin A: Teil der Gruppe der Cyclophiline, die zu den Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen zählen.

D

d	Durchmesser
Da	Dalton: Maßeinheit der atomaren Masse.
DMEM	„Dulbecco’s Modified Eagle Medium“: Standardisiertes Nährmedium für Zellkulturen.
DMSO	Dimethylsulfoxid: Organisches Lösungsmittel der Klasse der Sulfoxide. Lösungsmittel der Inhibitoren der vorliegenden Arbeit.
DNA / DNS	Desoxyribonukleinsäure: Biomolekül, das Träger der Erbinformation (Gene) ist.
DNT	hitzelabiles Toxin (englisch: „dermonecrotic toxin“): Virulenzfaktor von *Bordetella pertussis*, der als Exotoxin wirkt.
DTA	katalytische Domäne des Diphtherietoxins: A-Domäne des AB-Toxins Diphtherietoxin, die die Enzymfunktion innehat.
DTT	Dithiothreitol: Chemische Verbindung, die Disulfidbrücken reduziert.

E

ECDC	„European Centre for Disease Prevention and Control“: Europäisches Zentrum für die Prävention und Kontrolle von Krankheiten, Agentur der Europäischen Union zur Bekämpfung von Infektionskrankheiten.
ECL	Chemolumineszenz (englisch: „Enhanced Chemiluminescence“): Chemische Reaktion, die elektromagnetische Strahlung im Bereich des ultravioletten und sichtbaren Lichts emittiert.
EDTA	Ethylendiamintetraacetat: Chemische Verbindung, Komplexbildner für

	mindestens zweiwertige Kationen.
EE	frühe Endosomen (englisch: „early endosomes“): Endosomen, die sich eher in der Zellperipherie befinden.
EEA_1	frühes Endosomen Antigen 1 (englisch: „early endosomes antigen 1“): Marker für frühe Endosomen.
EF-2	Elongationsfaktor 2: Protein, das an der Translokation beteiligt ist und dafür Energie durch die Hydrolyse von GTP bereitstellt.
ELISA	„Enzyme Linked Immunosorbent Assay“: Ein auf Antikörpern basierendes Nachweisverfahren.
ER	endoplasmatisches Retikulum: Zellorganell aus Membran-Netzwerken.
F	
FCS	fetales Kälberserum (englisch: „Fetal Calf Serum“): Serum von Kuhfeten, das Hauptbestandteil vieler Nährmedien zur Zellkultivierung ist.
FHA	filamentöses Hämagglutinin: Virulenzfaktor von *Bordetella pertussis*, der als Adhäsin dient.
FK506	Tacrolimus: Spezifischer pharmakologischer Inhibitor von FK506-Bindeproteinen.
FKBP	FK506-Bindeprotein: Teil der Gruppe der FK506-Bindeproteine, die zu den Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen zählen.
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer: Physikalischer Prozess der Energieübertragung, bei dem die Energie eines angeregten Farbstoffs (Donor) auf einen nicht angeregten Farbstoff übertragen wird (Akzeptor).
G	
G-Aktin	globuläres Aktin: Strukturprotein des Zytoskeletts, das in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Globuläres Aktin liegt als einzelnes Monomer vor, durch Polymerisation können daraus Filamente entstehen.
G-Protein	GTP-bindendes Protein: Heterotrimeres Protein, das die Signaltransduktion von Rezeptoren zu Second Messengern übernimmt, als Energielieferant dient GTP.
$G_{i/o}$-Protein	inhibitorisches heterotrimeres G-Protein: Hemmung der Adenylatzyklase.
GABA	γ-Aminobuttersäure (englisch: „Gamma-aminobutyric acid“): Wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter.
GDP	Guanosindiphosphat: Mononukleotid mit energiereichen Phosphatresten, das die Vorstufe von GTP darstellt.

GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (englisch: „G protein-coupled receptor“): Membrangebundener Rezeptor, der Signale über G-Proteine weiterleitet.
GRP94	Glukose-reguliertes-Protein94: Hsp90-Isoform des endoplasmatischen Retikulums.
GTP	Guanosintriphosphat: Mononukleotid mit energiereichen Phosphatresten, das als Energiespeicher in der Zelle dient.
GTPase	Guanosintriphosphatase: Enzym, das GTP in GDP und Phosphat aufspaltet und dadurch Energie für Prozesse in der Zelle liefert.

H

H^+-ATPase	vesikuläre Protonenpumpe: Pumpt unter ATP-Verbrauch H^+-Ionen von einem Kompartiment in ein anderes.
H_2O	Wasser: Es wurde Leitungswasser oder destilliertes Wasser verwendet.
H_2O_2	Wasserstoffperoxid: Chemische Verbindung mit stark oxidierender Wirkung.
H_3PO_4	Phosphorsäure: Anorganische Säure.
HA9	Spezifischer pharmakologischer Inhibitor von Hsp70.
HAM’s F-12	F-12 Nutrient Medium: Serumfreies Medium zur Kultivierung von CHO-Zellen.
HCl	Chlorwasserstoff: Gasförmige Verbindung, Salzsäure in H_2O.
HeLa-Zellen	„*Henrietta Lacks*“-Zellen: Humane, epitheliale Zervixadenokarzinom-Zellen, die eine eukaryotische, adhärente Zelllinie bilden (ATCC Nr. CCL-2) und für Zellkulturversuche verwendet werden.
HPLC bidest.	steril destilliertes H_2O.
HRP	Meerrettich-Peroxidase (englisch: „Horseradish Peroxidase“): Markerenzym, das die Chemolumineszenz-Reaktion des Luminols katalysiert.
Hsp70	Hitzeschockprotein70: Teil der Familie der Hitzeschockproteine, einer Untergruppe der Chaperone, mit einem Molekulargewicht von 70 kDa.
Hsp90	Hitzeschockprotein90: Teil der Familie der Hitzeschockproteine, einer Untergruppe der Chaperone, mit einem Molekulargewicht von 90 kDa.

I

IAP	inselzellaktivierendes Protein: Veralteter Begriff für das die Inselzellen des Pankreas stimulierende – heute als Pertussistoxin bekannte – Protein.
IfSG	Infektionsschutzgesetz: Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten, regelt zum Beispiel die Meldepflicht von Krankheiten.

IL	Interleukin: Gruppe von Botenstoffen (Zytokinen) des Immunsystems, die von Leukozyten und Makrophagen sezerniert werden. Sie haben unterschiedliche Funktionen und werden durchnummeriert, zum Beispiel IL-2.
IPTG	Isopropylthiogalaktose: Künstlicher Induktor des Laktose-Operons in *Escherichia coli*.

J

J774-Zellen	Murine Makrophagen aus dem Tumor einer weiblichen BALB/c Maus, die als semi-adhärente Zelllinie bei Zellkulturversuchen Anwendung finden.

K

KCl	Kaliumchlorid: Kaliumsalz der Salzsäure.
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat: Kaliumsalz der Phosphorsäure, reagiert in H_2O sauer und wird zur Herstellung von Pufferlösungen verwendet.

L

LB	Luria-Bertani: Medium für Bakterienkulturen.
LD_{50}	letale Dosis 50: Dosis eines Stoffes, bei der die Hälfte der untersuchten Population letale Effekte zeigt.
LE	späte Endosomen (englisch: „late endosomes“): Endosomen, die sich in der Nähe des Zellkerns befinden.
LF	Letaler Faktor: Enzymkomponente des Letaltoxins, ein AB-Toxin von *Bacillus anthracis*, das eine Metalloprotease als Enzymfunktion hat.
LF_NDTA	Fusionstoxin aus dem N-terminalen Anteil des Letalen Faktors (LF) des Letaltoxins von *Bacillus anthracis* und der katalytischen Domäne (A-Domäne) von Diphtherietoxin von *Corynebacterium diphtheriae*.
LPS	Lipopolysaccharide: Bestandteil der äußeren Membran von Bakterien, pyrogen.

M

MEM	Minimum Essential Medium: Nährmedium für die Kultivierung von Zellen, das weniger Nährstoffe als DMEM enthält.
MES	Morpholinoethansulfonsäure: Synthetisch hergestellte Puffersubstanz, zum Beispiel für schwach sauer gepufferte Kultivierungsmedien für Bakterien.
$MgCl_2$	Magnesiumdichlorid: Magnesiumsalz der Salzsäure.
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (englisch: „Major Histocompatibility Complex“): Gruppe von Genen, die bei der Immunerkennung eine Rolle spielen.

MM28412	Nicht-zellgängige Variante des Cyclophilin-Inhibitors VK112.
MTS	Dimethylthiazolyl-Carboxymethoxyphenyl-Sulfophenyl-Tetrazolium: Farbstoff, der in lebenden Zellen in Abhängigkeit von deren Enzymaktivität zu Formazan reduziert wird und als Maß für die Stoffwechselaktivität gemessen werden kann.

N

N	Nukleus: Kern, Zellkern.
N-Terminus	Amino-terminales Ende: Protein-Ende mit einer Aminosäure, die eine freie Aminogruppe ($-NH_2$) besitzt.
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat: Natriumsalz der Phosphorsäure, wird vor allem zur Herstellung von Pufferlösungen verwendet.
NaCl	Natriumchlorid: Natriumsalz der Salzsäure.
NAD^+	Nikotinamidadenindinukleotid: Coenzym, das an zahlreichen Redoxreaktionen des Stoffwechsels der Zelle beteiligt ist.
NaOH	Natriumhydroxid: Hygroskopischer Feststoff, der sich in H_2O zur stark alkalisch reagierenden Natronlauge löst.
NECA	N-Ethylcarboxamidoadenosin: Spezifischer pharmakologischer Inhibitor von GRP94.
NFAT	„nuclear factor of activated T-cells": Transkriptionsfaktor in T-Lymphozyten.
NH_4Cl	Ammoniumchlorid: Ammoniumsalz der Salzsäure, kann zur Herstellung von Pufferlösungen verwendet werden.

O

OD	optische Dichte: Maß für die Transmission von Licht durch ein Medium.

P

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese: Biochemische Methode zur Auftrennung von Molekülen.
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (englisch: „Phosphat Buffered Saline"): Biochemische Pufferlösung.
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween (englisch: „Phosphat Buffered Saline + Tween"): Biochemische Pufferlösung, die vor allem als Waschlösung eingesetzt wird.
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (englisch: „Polymerase Chain Reaction"): *In vitro* Methode zur Vervielfältigung von DNA.

PDI	Protein-Disulfid-Isomerase: Enzym des endoplasmatischen Retikulums.
PFA	Paraformaldehyd: Fixierlösung für Gewebe oder Zellkulturen.
PNS	post-nuklearer Überstand (englisch: „post-nuclear supernatant“): Überstand ohne Zellkerne nach Zentrifugation von lysiertem Zellmaterial.
POD	Peroxidase: Enzym, das die Reduktion von Peroxiden katalysiert.
PPIase	Peptidyl-Prolyl-*cis*/*trans*-Isomerase: Enzym, das die *cis*/*trans*-Isomerisierung von Prolin-Peptid-Bindungen katalysiert, da Prolin in einem Protein nur in einer Konformation eingebaut werden kann.
PRN	Pertactin: Virulenzfaktor von *Bordetella pertussis*, der der Bindung an die Zellen des Respirationstrakts dient.
ptacC180	Plasmid zur Gewinnung des C180-Proteins, der S1-Untereinheit von Pertussistoxin.
PTX	Pertussistoxin: Virulenzfaktor von *Bordetella pertussis*, der als Adhäsin und Exotoxin mit ADP-Ribosyltransferase-Aktivität dient.

R

Rad	Radicicol: Spezifischer pharmakologischer Inhibitor von Hsp90.
RKI	Robert Koch-Institut: Bundesinstitut für Infektionskrankheiten und nicht übertragbare Krankheiten, Sitz der STIKO.
rpm	Umdrehungen pro Minute (UpM) (englisch: „revolutions per minute“): Angelsächsische Einheit der Rotationsgeschwindigkeit als Anzahl der Umdrehungen in einem Zeitraum von 60 Sekunden.

S

S1 bis S5	Untereinheiten von Pertussistoxin. S1 entspricht dem A-Protomer und hat die Enzymfunktion in Form der ADP-Ribosyltransferase, S2 bis S5 bilden das B-Oligomer, das der Bindung / Translokation des Toxins dient.
SDS	Natriumdodecylsulfat (englisch: „sodium dodecyl sulfate“): Anionisches Tensid, das als Detergens eingesetzt wird.
SPR	Oberflächenplasmonresonanz (englisch: „surface plasmon resonance“): Methode, die die Detektion von Molekülen bei Bindung an eine Oberfläche erlaubt und dadurch Protein-Protein-Interaktionen sichtbar machen kann.
STIKO	Ständige Impfkommission: Teil des RKI, gibt für Deutschland Impfempfehlungen in Form des Impfkalenders ab.
Strep-POD	Streptavidin-Peroxidase: Bindet spezifisch an Biotin, wird zur Detektion

	von Biotin-markierten Proteinen mittels HRP verwendet.
T	
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer: Puffergemisch, das unter anderem bei der Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt wird.
TcdA	*Clostridium difficile* Toxin A: Toxin von *Clostridium difficile*.
TcdB	*Clostridium difficile* Toxin B: Toxin von *Clostridium difficile*.
TCEP	Tris-Carboxyethyl-Phosphin: Verbindung, die als Reduktionsmittel dient.
TCF	trachealer Kolonisierungsfaktor (englisch: „tracheal colonization factor“): Virulenzfaktor von *Bordetella pertussis*, der die Bindung an die Zellen des Respirationstrakts vermittelt.
TCR	T-Zellrezeptor (englisch: „T-cell receptor“): Proteinkomplex auf der T-Zell-Oberfläche, der der Erkennung von auf MHC-Molekülen präsentierten Antigenen dient.
TCT	Trachea-Zytotoxin (englisch: „tracheal cytotoxin“): Virulenzfaktor von *Bordetella pertussis*, der als Endotoxin den Zilienschlag der Zellen einschränkt.
TEMED	Tetramethylethylendiamin: Chemische Verbindung aus der Gruppe der aliphatischen Amine, die als Polymerisationskatalysator eingesetzt wird.
TGN	*trans*-Golgi-Netzwerk: Dem endoplasmatischen Retikulum abgewandte Seite des Golgi-Apparates mit konkaver Form.
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan: Primäres Amin mit drei alkoholischen Hydroxygruppen, das als Puffersubstanz im alkalischen Bereich dient.
tRNA / tRNS	Transfer-Ribonukleinsäure: Vermittelt bei der Translation die richtige Aminosäure zum entsprechenden Codon für das zu erstellende Protein.
U	
UE	Untereinheit: Teil eines Ganzen.
UV	ultraviolett: elektromagnetische Strahlung mit kürzerer Wellenlänge als für den Menschen sichtbares Licht.
V	
VK112	Spezifischer pharmakologischer Inhibitor von Cyclophilinen. Cyclosporin A Derivat ohne immunsuppressive Wirkung.
W	
WHO	Weltgesundheitsorganisation (englisch: „World Health Organization“)

1 Einleitung

1.1 Bakterielle Toxine

Der Begriff des Toxins (lateinisch: „toxicum“ = das Gift) beschreibt eine Untergruppe der Gifte und bezieht sich auf solche biologischen oder organischen Ursprungs, zum Beispiel von Bakterien, Pilzen, Pflanzen oder Tieren. Die Toxinwirkung besteht in der Störung physiologischer Stoffwechselabläufe von Organismen, was zu akuten oder chronischen Vergiftungszuständen oder anderen Krankheitsbildern führen kann.

Bakterielle Toxine spielen als Pathogenitätsfaktoren vor allem in der Humanmedizin eine wichtige Rolle als Auslöser von zahlreichen Erkrankungen, welche teilweise schwerste Verläufe haben können, wie bei Cholera, Diphtherie und Tetanus (Schmitt *et al.* 1999; Akker *et al.* 2000). Durch Hygienemaßnahmen und Impfungen ist zwar die Inzidenz dieser Erkrankungen in bestimmten Ländern, wie zum Beispiel in Deutschland, zurückgegangen – wenn sie auftreten sind sie jedoch trotz moderner, hoher medizinischer Versorgungsstandards, wie Intensiv- und Antibiotikatherapie, meist nur schwer behandelbar und weiterhin mit hoher Letalität verbunden (Galazka 2000; Barth und Stiles 2008, 2010; Wagner *et al.* 2012). Der Schädigung des Wirtsorganismus liegen dabei unterschiedliche Pathomechanismen zu Grunde. Bakterielle Toxine können in Endotoxine und Exotoxine unterteilt werden, die im Folgenden genauer beschrieben werden.

1.1.1 Endotoxine

Endotoxine sind aus Lipopolysacchariden (LPS) aufgebaut und fester Bestandteil der äußeren Hülle von gramnegativen Bakterien (Lüderitz *et al.* 1973; Caroff und Karibian 2003). Sie werden entweder durch Vesikel oder beim Zerfall der Bakterien, zum Beispiel auch iatrogen durch eine Antibiotikatherapie, freigesetzt und können dabei in kurzer Zeit in großen Mengen auftreten. LPS sind sehr hitzestabil und enthalten das Lipid A, welches mit Rezeptoren auf Zellen des Immunsystems interagiert und im Körper eine unspezifische Immunantwort induzieren kann – in Form einer Aktivierung des Komplementsystems und einer Sezernierung von Entzündungsmediatoren, der sogenannten angeborenen Immunität (Bhakdi 1998; Beutler *et al.* 2003). Dies kann zu Entzündungsreaktionen mit Fieber, der Aktivierung von Endothelzellen mit konsekutiver Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten (Thrombusbildung), der Aktivierung des Blutgerinnungssystems (Verbrauchs-koagulopathie) und einer Vasodilatation (Schock) führen und stellt ein Ungleichgewicht aus Entzündung, Blutgerinnung und Lyse dar (Raetz und Whitfield 2002).

1.1.2 Exotoxine

Exotoxine sind dagegen thermolabil und bestehen aus Proteinen, die von grampositiven und gramnegativen lebenden Bakterien aktiv sezerniert werden. Danach können die Exotoxine ihre Wirkung auch in Abwesenheit der Bakterien entfalten. Die genetische Information für ihre Synthese liegt auf Plasmiden oder dem Kernäquivalent. Sie sind immunogen, hinterlassen aber keine lang anhaltende Immunität. Durch Inaktivierung mittels Hitze oder Formalin können aus den Exotoxinen Toxoide gewonnen werden, die man als Impfstoffe einsetzen kann – Beispiele dafür sind Impfungen gegen Tetanus und Diphtherie (Montecucco und Schiavo 1994; Schmitt *et al.* 1999). Die Gruppe der Exotoxine lässt sich nach ihrer Wirkungsweise in drei Untergruppen einteilen (Bhakdi 1998).

1.1.2.1 Porenbildende Exotoxine

Die Gruppe der porenbildenden Exotoxine wirkt direkt an der Plasmamembran durch Schädigung oder Destabilisierung derselben. Dies kann enzymatisch erfolgen, zum Beispiel durch Phospholipasen, wie bei α-Toxin von *Clostridium perfringens* und bei Streptolysin-O von *Streptococcus pyogenes* (Bhakdi *et al.* 1985; Songer 1997; Timmer *et al.* 2009) oder durch Polymerbindungen, die die Membranoberfläche der Zielzellen perforieren, wie beim α-Toxin von *Staphylococcus aureus* (Lowy 1998).

1.1.2.2 Superantigene / Superantigentoxine

Die Gruppe der Superantigene oder Superantigentoxine stimuliert körpereigene antigenpräsentierende Immunzellen (APCs) und T-Zellen direkt, da sie in der Lage sind Kontakt zwischen dem T-Zellrezeptor (TCR) und dem Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) herzustellen und somit keine Antigenprozessierung benötigen. Als Folge kommt es zu einer übermäßigen Abwehrreaktion mit Fieber, Blutdruckabfall und Hautausschlag, was bis zu einem toxischen Schock mit Schädigungen der Organsysteme bis zum Multiorganversagen führen kann, wobei für die Symptome das Immunsystem selbst und nicht die direkte Wirkung des Toxins verantwortlich ist. Ursachen für schwere Verläufe sind meist Toxine von *Staphylococcus aureus* und Streptokokken (Marrack und Kappler 1990; Schlievert *et al.* 2000; Proft und Fraser 2003).

1.1.2.3 AB-Exotoxine

Die AB-Toxine als Untergruppe der bakteriellen Exotoxine sind die für die vorliegende Arbeit relevanten und werden unter „Einleitung“ (1.2) ausführlich beschrieben.

1.2 AB-Toxine

Die Gruppe der AB-Toxine umfasst Proteine mit vielerlei unterschiedlichen Funktionen, deren Wirkungsort das Zytosol ihrer Zielzellen ist. Ihre schädigende Wirkung vermitteln sie durch ihre Enzymfunktion, die eine hohe Substratspezifität aufweist. Schon einzelne Toxinmoleküle können für eine Vergiftung ausreichen (Barth und Stiles 2008, 2010). Dies macht die AB-Toxine zu den potentesten bekannten Giften mit hoher medizinscher Relevanz.

AB-Toxine bestehen schematisch betrachtet aus zwei funktionell verschiedenen Einheiten – A und B (Lubran 1988). A enthält dabei jeweils den enzymatisch aktiven Teil des Toxins, der im Zytosol das Substrat modifiziert. B ist der Teil des Toxins, der die Bindung an Zellen und die Aufnahme des Toxins in das Zytosol, die sogenannte Translokation, übernimmt. Dafür bindet B meist an einen selektiven Rezeptor auf der Zelloberfläche und sorgt somit für die spezifische Rezeptor-vermittelte Aufnahme durch Endozytose des Toxins (Sandvig und Olsnes 1984). A gelangt danach über weitere Schritte ins Zytosol der Zielzelle und interagiert dort mit dem für A spezifischen Substrat, was bestimmte zelluläre Reaktionen nach sich zieht beziehungsweise ziehen kann und konsekutiv Folgen für den Gesamtorganismus haben kann. Abbildung 1 zeigt schematisch den Aufbau eines AB-Toxins und dessen Aufnahme in seine Zielzelle.

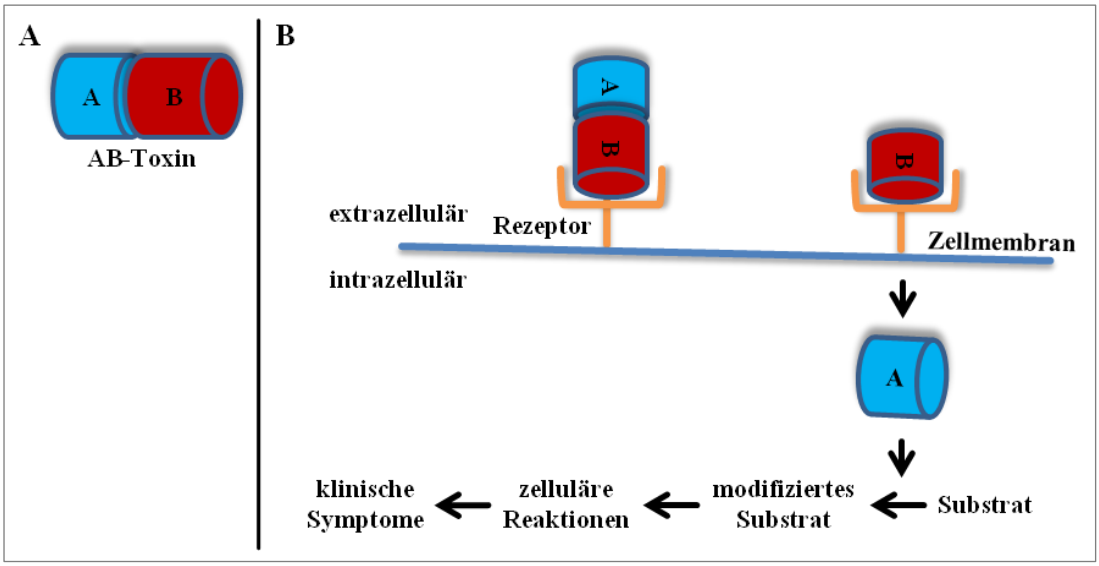


Abbildung 1: Allgemeines Schema von AB-Toxinen und ihrer Aufnahme in die Zielzelle. A: Schematisches AB-Toxin. **B:** Das AB-Toxin bindet mit B an den extrazellulären Rezeptor. B translociert A über die Zellmembran ins Zytosol, wo dieses sein spezifisches Substrat modifiziert. Dies führt zu zellulären Reaktionen, die sich im Gesamtorganismus als klinische Symptome manifestieren können.

Ein klassisches Beispiel für AB-Toxine ist das Tetanusneurotoxin von *Clostridium tetani*, an dem kurz die typischen Eigenschaften der AB-Toxine skizziert werden sollen: Tetanustoxin wird von dem ubiquitär vorkommenden Erreger *Clostridium tetani*, der vor allem Wunden besiedelt, produziert und gelangt hämatogen oder retrograd entlang von Nervenbahnen zu den Neuronen im Vorderhorn des Rückenmarks, in welche es eindringt. Dort spaltet es durch sein Enzym, eine Zink-Endopeptidase, proteolytisch Synaptobrevin, ein Protein, das zur Freisetzung inhibitorischer Neurotransmitter wie Glycin und γ-Aminobuttersäure (GABA) in inhibitorischen Interneuronen benötigt wird. Als Folge kommt es zu einer massiven Übererregung der Muskulatur mit spastischen Lähmungen, die auch die Atemmuskulatur betreffen können. Therapeutisch kann dieses Stadium nur symptomatisch mittels Intensivtherapie behandelt, eine Elimination des sich im Blutkreislauf befindenden Tetanustoxins durch Antikörper versucht und die weitere Toxinproduktion durch eine Sanierung der infizierten Wunde unterbunden werden. Präventiv gibt es eine Tetanus-Toxoid-Impfung. Tetanustoxin gilt als das zweitstärkste bakterielle Toxin nach Botulinumtoxin und hat im Tierversuch mit Mäusen eine letale Dosis LD_{50} von unter einem Nanogramm. (Montecucco und Schiavo 1994; Turton *et al.* 2002). Das Beispiel zeigt die typischen Eigenschaften von bakteriellen AB-Exotoxinen, die schon in geringsten Mengen schwerwiegende, schlecht therapierbare Erkrankungen auslösen können.

AB-Toxine können nach unterschiedlichen Punkten eingeteilt werden, wobei sich die Nomenklatur („Komponente“, „Domäne“, „Untereinheit“, …) der funktionellen A- und B-Einheiten ändern kann:

- nach Anzahl der zugrundeliegenden Proteine auf welchen A und B lokalisiert sind:
  - auf einem Protein = sogenannte einkettige AB-Toxine aus A- und B-Domäne:
    Diphtherietoxin von *Corynebacterium diphtheriae* (Collier 1975), clostridiale Neurotoxine wie Tetanustoxin von *Clostridium tetani* und Botulinumtoxin von *Clostridium botulinum* (Montecucco und Schiavo 1994).
  - auf zwei individuellen, nicht miteinander verbundenen Proteinen = sogenannte binäre AB-Toxine aus A- und B-Komponente:
    Letaltoxin und Ödemtoxin von *Bacillus anthracis*, CDT-Toxin von *Clostridium difficile*, C2-Toxin von *Clostridium botulinum* (Abrami *et al.* 2004; Barth *et al.* 2004; Stiles *et al.* 2011).

- nach Anzahl der A- und B-Untereinheiten:
  - AB_5-Exotoxine = diese Toxine bestehen aus einer A-Untereinheit und einer B-Untereinheit, die ihrerseits wiederum aus fünf Teilen besteht: Choleratoxin von *Vibrio cholerae* (Merritt *et al.* 1994), Pertussistoxin von *Bordetella pertussis* (Locht *et al.* 2011).
- nach ihrer Enzymfunktion:
  - Adenosindiphosphat-(ADP)-Ribosyltransferasen: Diphtherietoxin von *Corynebacterium diphtheriae* (Collier 1975), Pertussistoxin von *Bordetella pertussis* (Katada und Ui 1982b), Choleratoxin von *Vibrio cholerae* (Majoul *et al.* 1996), C2-Toxin von *Clostridium botulinum* (Ueda und Hayaishi 1985; Aktories *et al.* 1986).
  - Metalloprotease: Letaltoxin von *Bacillus anthracis* (Collier und Young 2003).
  - Glykosyltransferasen: TcdA und TcdB von *Clostridium difficile* (Barth und Stiles 2010).
  - Proteasen: Neurotoxine wie Tetanustoxin von *Clostridium tetani* und Botulinumtoxin von *Clostridium botulinum* (Montecucco und Schiavo 1994).
- nach ihren Substraten:
  - G-Proteine: Pertussistoxin von *Bordetella pertussis* (Katada und Ui 1982a), Choleratoxin von *Vibrio cholerae* (Lubran 1988; Aktories 2011).
  - Aktin: C2-Toxin von *Clostridium botulinum*, Iota-Toxin von *Clostridium perfringens*, CDT-Toxin von *Clostridium difficile* (Aktories *et al.* 1986; Stiles und Wilkins 1986; Simpson *et al.* 1989; Aktories *et al.* 2011).
  - Elongationsfaktor 2 (EF-2): Diphtherietoxin von *Corynebacterium diphtheriae* (Collier 1975; Kochi und Collier 1993).

1.3 Zelluläre Aufnahme bakterieller AB-Toxine – *short-trip* und *long-trip* Toxine

Die zelluläre Aufnahme von bakteriellen AB-Toxinen kann grob in vier Schritte eingeteilt werden: 1. Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, 2. Internalisierung, 3. Membrantranslokation und 4. Modifizierung des Substrates (Montecucco *et al.* 1994). Aufgrund der Nutzung unterschiedlicher Proteintransportwege können die AB-Toxine in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden: die *short-trip* und die *long-trip* Toxine.

Zuerst binden die Toxine beider Gruppen mit ihrem B-Anteil an einen selektiven Rezeptor auf der Zelloberfläche und werden danach durch Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert. Der Toxin-Rezeptor-Komplex befindet sich dann in einem frühen Endosom.

Bei den *short-trip* Toxinen, wie Diphtherietoxin und C2-Toxin, wird die Translokation des Enzyms (A-Anteil) aus den frühen Endosomen ins Zytosol durch Ansäuerung mittels einer vesikulären Protonenpumpe (H^+-ATPase) ausgelöst (Sandvig und Olsnes 1980, 1981; Barth *et al.* 2000). Die Änderung des pH-Wertes führt auch zu einer Konformationsänderung der Toxine durch Freilegung der hydrophoben Proteinbereiche, was eine Einlagerung des aktivierten B-Anteils in die Membran der Endosomen erlaubt (Barth *et al.* 2000; Falnes und Sandvig 2000; Blöcker *et al.* 2003; Barth und Stiles 2008). Die Ansäuerung kann durch Bafilomycin A1 als spezifischer Inhibitor der vesikulären H^+-ATPase gehemmt werden (Werner *et al.* 1984).

Im Gegensatz dazu gehen die Vesikel mit dem Toxin-Rezeptor-Komplex bei den *long-trip* Toxinen, wie Choleratoxin (Majoul *et al.* 1996; Majoul *et al.* 1998) und Shiga-Toxin von *Shigella dysenteria* (Falnes und Sandvig 2000; Sandvig und van Deurs 2002), von frühen in späte Endosomen über und wandern dann retrograd – entgegen der Proteinbiosynthese – durch das *trans*-Golgi-Netzwerk und den Golgi-Apparat bis zum endoplasmatischen Retikulum. Dort erfolgt die Translokation des Enzyms ins Zytosol. Der retrograde Weg der *long-trip* Toxine kann durch Brefeldin A blockiert werden, das den antegraden und retrograden Proteintransport zwischen dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat unterbindet und zum Zerfall des Golgi-Apparates führt (Klausner *et al.* 1992; Chardin und McCormick 1999).

Einzelne Toxine benutzen einen Zwischenweg zwischen *short-trip* und *long-trip* Toxinen, wie das Iota-Toxin (Gibert *et al.* 2007), welches im Zustand zwischen frühen und späten Endosomen transloziert oder die Anthrax-Toxine, die aus späten Endosomen translozieren (Abrami *et al.* 2004; Gibert *et al.* 2007). Eine schematische Darstellung des Aufnahmemechanismus von *short-trip* und *long-trip* Toxinen mit Beispielen zeigt Abbildung 2.

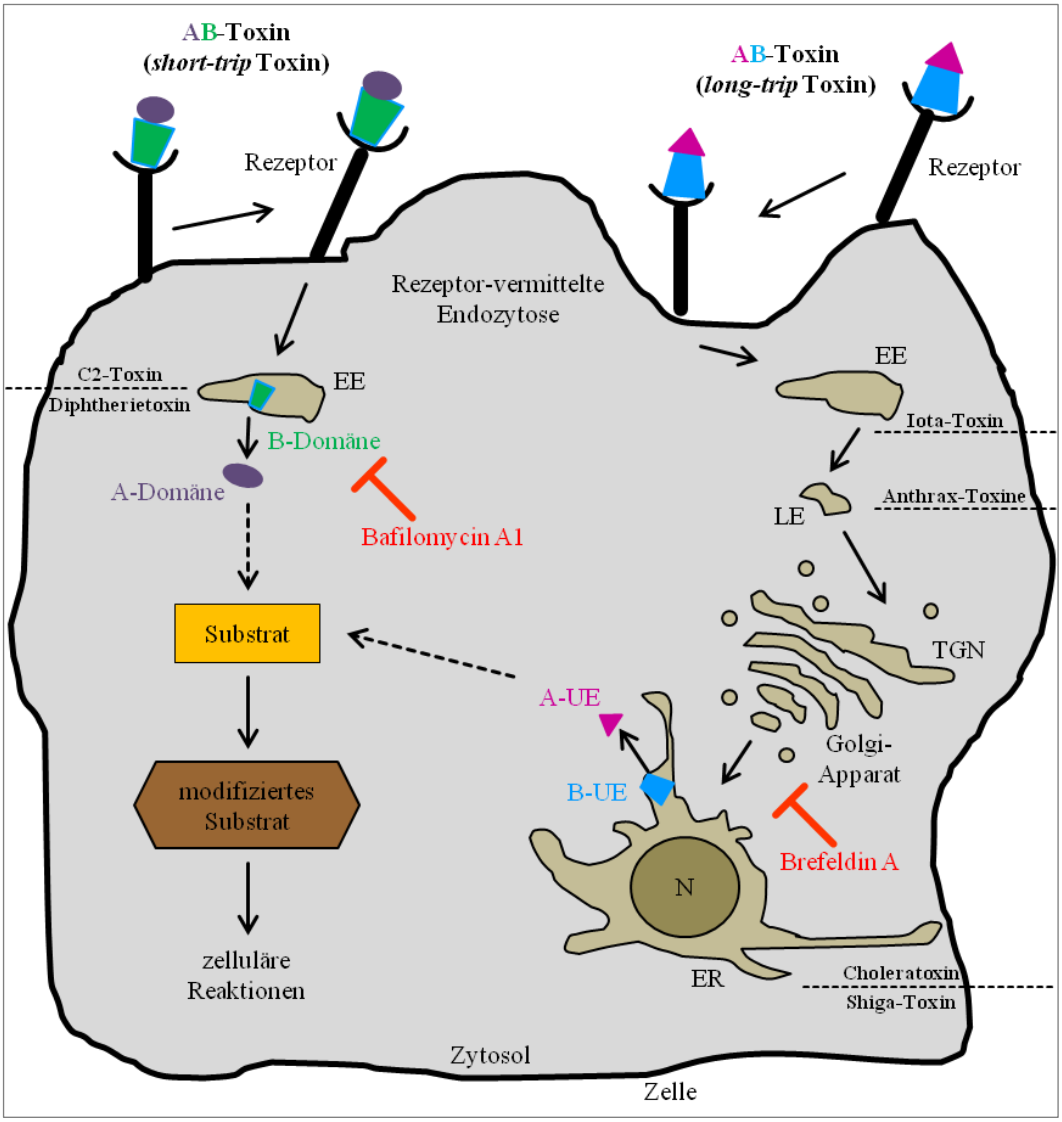


Abbildung 2: Aufnahmemechanismus von AB-Toxinen – *short-trip* und *long-trip* Toxine. (nach Barth und Stiles 2010) Die *short-trip* und *long-trip* Toxine binden mit ihrem B-Anteil an ihre Rezeptoren und werden durch Rezeptor-vermittelte Endozytose internalisiert. Danach unterscheiden sich die Wege dieser zwei Gruppen. Die A-Domänen der *short-trip* Toxine werden mittels Ansäuerung aus frühen Endosomen (EE) transloziert und gelangen so ins Zytosol. Die A-Untereinheiten (UE) der *long-trip* Toxine befinden sich initial auch in frühen Endosomen, wandern dann aber retrograd über späte Endosomen (LE), *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) und Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum (ER), aus welchem sie ins Zytosol transloziert werden. Dort modifizieren die A-Domänen und A-Untereinheiten ihre Substrate, was zu zellulären Reaktionen führen kann. Bafilomycin A1 hemmt spezifisch die Ansäuerung der frühen Endosomen bei den *short-trip* Toxinen. Brefeldin A hemmt den Transport vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum bei *long-trip* Toxinen. Beispiele für Translokationsorte verschiedener Toxine sind randständig links und rechts angegeben. N = Nukleus.

1.4 ADP-ribosylierende Toxine

Nach der Translokation des Enzyms (A-Anteil) der Toxine über die Zellmembran und intrazelluläre Membranen befindet es sich im Zytosol. Dort ist auch das spezifische Substrat, das nun vom enzymatisch aktiven Toxinanteil modifiziert wird. Toxine, die als Enzym eine ADP-Ribosyltransferase haben, katalysieren die kovalente Übertragung eines

ADP-Ribose-Restes von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) auf ihr Substrat (Ueda und Hayaishi 1985; Shall 1995; Masignani *et al.* 2000). Durch diese Modifizierung kann das Substrat seine eigentliche Funktion meist nicht mehr ausführen, was sich in zellulären und systemischen Reaktionen widerspiegelt.

1.5 *Bordetella pertussis* – Produktionsort des Pertussistoxins und Auslöser der Keuchhustenerkrankung

1.5.1 Bordetella pertussis

Bordetella pertussis ist ein circa 0,8 x 0,5 µm kleines, unbewegliches, kokkoides, bekapseltes, aerobes gramnegatives Stäbchen, das einzeln oder in Paaren auftritt, weltweit endemisch ist und nur beim Menschen vorkommt. Dort besiedelt es das zilientragende Epithel des Respirationstraktes, auf welchem es sich vermehrt und dadurch sowohl zu lokalen Gewebeschäden an der Mukosa führt (Entzündungen und Nekrosen), als auch seine lokalen und systemischen Wirkungen auf die immunologischen Abwehrkräfte entfaltet. Dabei trägt vor allem die Abschwächung der Immunantwort des Organismus maßgeblich zur Erhaltung und zum Überleben des Bakteriums bei (Johnson und Sneath 1973; Wirsing von König *et al.* 2002).

1.5.2 Toxine und Virulenzfaktoren von *Bordetella pertussis*

Um sein Überleben und seine Vermehrung sicherzustellen, verfügt *Bordetella pertussis* über eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, die man grob in Adhäsine und Toxine unterteilen kann (siehe auch Abbildung 3). Durch seine Kapsel wird das Bakterium zudem vor der Inaktivierung durch Komplementfaktoren geschützt. Zu den Adhäsinen, die dem Bakterium helfen, sich an Strukturen des Wirtsorganismus anzuheften, zählen das filamentöse Hämagglutinin (FHA) und das Pertussistoxin (PTX). Zusätzlich sind an der äußeren Membran weitere Proteine zur Bindung an die Wirtszellen vorhanden, wie Pertactin (PRN), der tracheale Kolonisierungsfaktor (TCF) und der *Bordetella pertussis* Autotransporter BrkA. *Bordetella pertussis* verfügt sowohl über Endo- als auch über Exotoxine. Zu den Endotoxinen zählt das Trachea-Zytotoxin (TCT), das aus Peptidoglykanen der Zellwand gebildet wird, den Zilienschlag der Zellen einschränkt und somit zur Ausbreitung des Erregers beiträgt. Zu den Exotoxinen zählen das Pertussistoxin, das unter „Einleitung“ (1.6) genauer charakterisiert werden soll, und das Adenylatzyklase Toxin (CyaA), welches in die Wirtszellen eindringen, den cAMP-Spiegel erhöhen und dadurch den physiologischen Zellstoffwechsel beeinträchtigen kann (Hewlett und Gray 2000),

sowie hitzelabiles Toxin, dem eine hautnekrotisierende Wirkung zugeschrieben wird. Das Bakterium *Bordetella pertussis* verfügt zudem an seiner Oberfläche über weitere zur Pathogenität beitragende Membranproteine, wie Lipopolysaccharide (LPS) und Fimbrien (Berg *et al.* 1999).

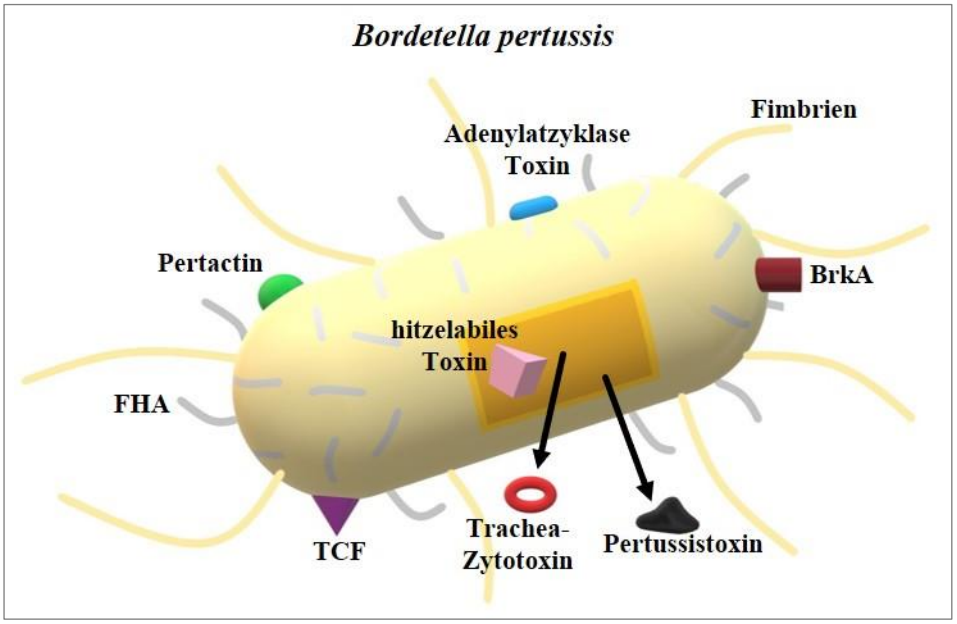


Abbildung 3: Schematische Darstellung von *Bordetella pertussis* und seinen Virulenzfaktoren. (nach Weiss 1997) BrkA = *Bordetella pertussis* Autotransporter, FHA = filamentöses Hämagglutinin, TCF = trachealer Kolonisierungsfaktor.

1.5.3 Humanmedizinische Bedeutung von *Bordetella pertussis*

1.5.3.1 Pertussis / Keuchhusten

Bordetella pertussis ist der Auslöser des Krankheitsbildes Pertussis / Keuchhusten. Andere *Bordetellen* können ein ähnliches Krankheitsbild mit milderem Verlauf hervorrufen. Ihre Virulenzfaktoren sind Gegenstand aktueller Forschung. Durch die Entschlüsselung ihres Genoms konnten die für Pertussistoxin kodierenden Gene nachgewiesen werden, allerdings werden diese nicht exprimiert und das Toxin daher nicht gebildet. Die Schwere des Keuchhustenverlaufs bei *Bordetella pertussis* hängt somit maßgeblich vom gebildeten und sezernierten Pertussistoxin ab (Aricò und Rappuoli 1987; Marchitto *et al.* 1987).

1.5.3.2 Infektionsweg und klinischer Verlauf

Keuchhusten ist eine hochansteckende Erkrankung, die aerogen durch Tröpfcheninfektion und engen Kontakt mit einer infektiösen Person übertragen werden kann. Überdies ist der Erreger in der Lage, einige Tage außerhalb des Wirtsorganismus zu überleben, was eine Infektion über kontaminierte Gegenstände nicht ausschließt. Ein dauerhafter Trägerstatus

ohne Symptome scheint nicht ausgebildet zu werden; lediglich Personen im nahen Umfeld von Infizierten können vorrübergehend eine Kolonisation ihres Nasenrachenraumes durch *Bordetella pertussis* aufweisen (He *et al.* 1999; Klement *et al.* 2003). Die Inkubationszeit kann zwischen sechs und 20 Tagen variieren. Ansteckungsgefahr besteht ab dem Ende der Inkubationszeit und kann auch noch die ersten drei Wochen im Stadium convulsivum vorhanden sein. Die klinische Symptomatik bei Erstinfektion kann sich über mehrere Wochen bis Monate erstrecken und wird in drei Stadien eingeteilt:

- **Stadium catarrhale**: Das Stadium catarrhale dauert ein bis zwei Wochen und ist durch grippeähnliche Symptome wie Schnupfen, Heiserkeit, leichter Husten, Schwächegefühl und fehlendes oder nur leicht erhöhtes Fieber gekennzeichnet.
- **Stadium convulsivum**: Über vier bis sechs Wochen schließt sich das Stadium convulsivum an und ist durch die krankheitstypischen Hustenanfälle, das sogenannte Stakkatohusten, mit inspiratorischem Stridor gekennzeichnet. Direkt danach folgt das namensgebende Keuchen, welches durch die plötzliche Inspiration gegen die noch geschlossene Glottis entsteht. Die Attacken treten vor allem nachts gehäuft auf und können zum Hervorwürgen von zähem Schleim und anschließendem Erbrechen führen. Die Körpertemperatur bleibt meist normal oder ist allenfalls mäßig erhöht. Starke Temperaturerhöhungen sprechen eher für eine Sekundärinfektion mit anderen Erregern.
- **Stadium decrementi**: Im Stadium decrementi lassen die Hustenanfälle in den folgenden sechs bis zehn Wochen nach.

Der typische Krankheitsverlauf in Stadien mit den charakteristischen Symptomen tritt vor allem bei Kleinkindern auf – selten bei Jugendlichen und Erwachsenen (Postels-Multani *et al.* 1995). Durch ihren unerkannten Trägerstatus spielen diese eine wichtige Rolle als Überträger und Infektionsquelle besonders für Säuglinge (Franco *et al.* 2004), welche das höchste Risiko für die Entwicklung schwerwiegender Komplikationen wie Atemstillstände (Apnoen) und Hospitalisierungen haben (Mattoo und Cherry 2005; Surridge *et al.* 2007; Wendelboe *et al.* 2007a). Auch die Zahl der Todesfälle ist unter der Gruppe der ungeimpften Säuglinge unter sechs Monaten am höchsten (Wendelboe *et al.* 2007b; Domenech de Cellès *et al.* 2016; WHO 2016). Häufig kommt es bei einer Infektion mit *Bordetella pertussis* zu Superinfektionen mit weiteren bakteriellen Erregern des Respirationstraktes, wie *Haemophilus influenzae* oder *Streptococcus pneumoniae*. Sie können sich aufgrund der reduzierten Immunabwehr leichter ausbreiten, was die Entwicklung von schweren Pneumonien begünstigt – wovon bis zu zehn Prozent der Säuglinge und ältere Erkrankte betroffen sind (Serres *et al.* 2000). Auch wurde das

Auftreten von Otitiden, Sinusitiden, Inkontinenz, Hernien und Rippenfrakturen beschrieben, sowie schwere Komplikationen wie subkonjunktivale und zerebrale Blutungen, zerebrale Krampfanfälle und Enzephalopathien (Heininger *et al.* 1997).

1.5.3.3 Diagnostik, Therapie, Prävention und Meldepflicht

Die Diagnose „Keuchhusten“ kann meist bereits klinisch gestellt werden. Die nationalen und internationalen Empfehlungen von Einrichtungen der Krankheitsüberwachung und Krankheitsprävention, wie das Robert Koch-Institut (RKI) und das European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), empfehlen jedoch eine Laborbestätigung anzustreben, um gezielte Präventionsmaßnahmen ergreifen und begründen zu können (Robert Koch-Institut (RKI) 2014; European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2018) – auch bei nachgewiesenem Impfstatus gegen *Bordetella pertussis*. Die Wahl der geeigneten Labordiagnostik hängt vom Krankheitsstadium ab und umfasst Kultur, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und die Serodiagnostik mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), einem Antikörper-basierten Nachweisverfahren, das hierbei ausschließlich Pertussistoxin als Antigen enthält (Guiso *et al.* 2011a).

Die Therapie bei Keuchhusten erfolgt hauptsächlich symptomatisch durch den Ausgleich von Flüssigkeitsverlusten, häufigere, kleinere Mahlzeiten bei ausgeprägten Hustenanfällen und die stationäre Aufnahme von Säuglingen mit Apnoen oder Betroffenen mit Superinfektionen. Die Gabe von Antibiotika beeinflusst die Dauer und die Schwere der Keuchhustenerkrankung meist nicht, da die Antibiotika dafür bereits sehr früh eingesetzt werden müssten. Jedoch kommt einer antibiotischen Therapie durch die Limitierung der Ansteckungsfähigkeit bis auf etwa fünf Tage nach Einnahmebeginn trotzdem eine hohe Bedeutung zu und kann daher als sinnvolle und effektive Ausbreitungsprävention eingesetzt werden. Dazu eignen sich erfahrungsgemäß Makrolidantibiotika, vor allem Erythromycin, gegen welche nur selten Resistenzen beobachtet werden; alternativ kann Cotrimoxazol eingesetzt werden (Altunaiji *et al.* 2007).

Für die Primärprävention steht in Deutschland ein von der Ständigen Impfkommission (STIKO) empfohlener Pertussis-haltiger Kombinationsimpfstoff zur Verfügung, mit welchem bereits im Alter ab zwei Monaten eine Grundimmunisierung vorgenommen werden kann (Robert Koch-Institut (RKI) 2018). Die aktive Immunisierung kann mit zellulären Vakzinen, Ganzkeimimpfstoffen aus Lysaten von inaktivierten *Bordetella pertussis* Zellen, oder mit azellulären Vakzinen erfolgen, die aus Gemischen von *Bordetella pertussis* Komponenten bestehen. Nach aktueller Datenlage scheint eine

Eradikation von Pertussis – entgegen der Erfahrungen mit anderen impfpräventablen Erkrankungen – nicht möglich, da die vermittelte Immunität durch eine durchgemachte Infektion oder die vollständige Impfung nicht lange anhält und eine Neuinfektion nicht sicher verhindern kann. Für Deutschland empfiehlt die STIKO daher eine frühzeitige Grundimmunisierung im Säuglingsalter, Auffrischimpfungen im Vorschulalter und Nachimpfungen für alle Personen (Jugendliche und Erwachsene), besonders auch für gefährdete Altersgruppen oder Personen mit hoher Infektionsgefahr wie medizinisches Personal, um einen Kohortenschutz aufzubauen (Robert Koch-Institut (RKI) 2018). Des Weiteren sollte eine Chemoprophylaxe mit Makroliden für Kontaktpersonen und mögliche Infizierte erfolgen, um Krankheitsausbrüchen vorzubeugen (Dodhia und Miller 1998).
Pertussis tritt in Deutschland das ganze Jahr über auf und zeigt einen Häufigkeitsgipfel im Herbst und Winter. Trotz hoher Impfquoten können zyklische Anstiege der Infektionsraten beobachtet werden. Um genauere epidemiologische Daten über Pertussis erheben und das medizinische Wissen über die Erkrankung ausbauen zu können, wurde am 29. März 2013 in Deutschland eine Meldepflicht gemäß Infektionsschutzgesetz (IfSG) eingerichtet, wonach Krankheitsverdacht, Erkrankung und Tod an Pertussis namentlich meldepflichtig sind, sowie der direkte und indirekte Nachweis von *Bordetella pertussis* und *Bordetella parapertussis* bei Hinweisen auf eine akute Infektion (§§ 6 und 7 (1) Nr. 1 IfSG) (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz 2000). Außerdem sind Ausbrüche in Gemeinschaftseinrichtungen (vor allem solche mit Säuglingen und Kleinkindern) meldepflichtig. Diese Maßnahmen resultieren aus dem Wissen über die Gefährlichkeit der Erkrankung als Schritt in der Ausbruchsprävention.
Für 2016 wurden beispielweise für Deutschland insgesamt 13.437 Pertussis-Fälle gemeldet, wovon 12.984 bestätigt werden konnten (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) 2018).

1.5.3.4 Bedeutung von Pertussis weltweit

Weltweit betrachtet stellt Pertussis ein großes und weitverbreitetes Gesundheitsproblem dar (Galazka 1992; WHO 2016), da nach Schätzungen der WHO von 2008 jährlich immer noch mehr als 16 Millionen Menschen daran erkranken. Der Großteil (circa 95 Prozent) lebt in Entwicklungsländern, in welchen die Impfung meist nicht zur Verfügung steht und selbst die symptomatische Versorgung nur unzureichend gewährleistet werden kann. Die Anzahl der Todesfälle, vor allem bei Säuglingen unter sechs Monaten, liegt bei etwa 200.000 pro Jahr – 1990 waren es noch über 300.000 (Galazka 1992). Sowohl für die

Anzahl der Erkrankungsfälle als auch für die Angaben zu den Todesfällen wird eine hohe Dunkelziffer aufgrund unzuverlässiger Registrierung vermutet (Gabutti und Rota 2012). Die WHO berichtete hierzu 2013 von etwa 63.000 Todesfällen weltweit durch Pertussis bei Kindern unter fünf Jahren, jedoch mit tendenziell wieder ansteigenden Zahlen trotz einer vorhandenen Impfung (WHO 2016).

1.5.3.5 Bedeutung der Erforschung von Pertussis und seinen Pathomechanismen

Die aktuellen epidemiologischen Daten über das Auftreten von Pertussis und seiner Mortalität weltweit zeigen zusammen mit der historischen Entwicklung in Deutschland und anderen westlichen Industrienationen, dass Pertussis damals wie heute eine ernstzunehmende Erkrankung ist. Zwar zählt sie hier nicht mehr, wie noch zu Beginn des 20. Jahrhunderts, zu einer der häufigsten kindlichen Todesursachen (damals etwa 20.000 Todesfälle pro Jahr) – was vor allem auf die Einführung der Impfung, verbesserte Lebensbedingungen allgemein und die Weiterentwicklung der medizinischen Standards zurückzuführen ist. Jedoch treten trotz aller Präventionsmaßnahmen nach wie vor neue Erkrankungswellen auf, die besonders bei den vulnerablen Gruppen, wie Säuglingen, immer noch bei etwa zwei von 1.000 Erkrankten zum Tode führen (Guiso *et al.* 2011b). Gerade diese Fälle zeigen, dass wir trotz einer gut ausgebauten Gesundheitsversorgung mangels einer kausalen Therapie schwere Verläufe von Pertussis nicht ausreichend behandeln können. Die Impfung stellt einerseits eine gute Präventionsmaßnahme dar – was allerdings die Impfbereitschaft der Bevölkerung zwingend voraussetzt (Galazka 1992) –, kann aber andererseits vor allem die gefährdetsten Gruppen aufgrund der unzureichenden Immunantwort nicht ausreichend schützen und vermittelt keine lang anhaltende Immunität. Da die Therapie auch bei hohen medizinischen Standards nur aus supportiven Maßnahmen besteht, würde aus medizinischer Sicht weiterhin die Entwicklung und Etablierung einer kausalen Therapie eine Verbesserung der Versorgung Erkrankter darstellen und wäre ein erstrebenswertes Ziel. Durch die weitere Erforschung des Erregers *Bordetella pertussis* und seiner Virulenzfaktoren – vor allem des Pertussistoxins – könnten somit nicht nur Beiträge wissenschaftlich-orientierter Art, sondern eventuell auch neue Impulse und Ansätze für die Keuchhustentherapie in der Humanmedizin entstehen.

1.6 Das Pertussistoxin von *Bordetella pertussis*

1.6.1 Aufbau des Pertussistoxins

Pertussistoxin ist ein etwa 105 kDa großes, multimerisches Protein, das zu den AB-Exotoxinen zählt (Tamura *et al.* 1982) und nach heutigem Wissensstand als eines der komplexesten bakteriellen Proteintoxine gilt (Locht *et al.* 2011). Es wird von *Bordetella pertussis* produziert und sezerniert und kann sowohl an Zellen gebunden als auch frei in der extrazellulären Flüssigkeit vorkommen.

Pertussistoxin ist ein Polypeptid, das aus insgesamt sechs Untereinheiten besteht, die nach ihrem abnehmenden Molekulargewicht durchnummeriert wurden. Die verschiedenen Untereinheiten sind S1 (~ 26 kDa), S2 (~ 22 kDa), S3 (~ 22 kDa), S4 (~ 12 kDa) und S5 (~ 11 kDa) – wobei die Untereinheit S4 je Toxinmolekül zweimal vorkommt (Kaslow und Burns 1992). Entsprechend der AB-Toxin-Klassifikation lautet die Nomenklatur für Pertussistoxin „A-Protomer“ und „B-Oligomer“ beziehungsweise „Untereinheiten“. Das A-Protomer entspricht der S1-Untereinheit und trägt die Enzymfunktion des Toxins. Das B-Oligomer ist aus den Untereinheiten S2, S3, 2 x S4 und S5 aufgebaut und für die Bindung und Translokation des A-Protomers zuständig. (Durch die Zusammensetzung des B-Oligomers aus fünf Untereinheiten wird Pertussistoxin auch als AB_5-Exotoxin bezeichnet.)

Eine Analyse der Kristallstruktur ergab, dass das Pertussistoxin eine pyramidenförmige Struktur mit dem B-Oligomer als dreieckiger Basis und einer Pyramidenspitze durch das A-Protomer einnimmt, was in Abbildung 5 dargestellt ist (Stein *et al.* 1994a). Eine Behandlung mit Harnstoff führt zur Abdissoziation des A-Protomers vom B-Oligomer und zu dessen Zerfall in drei Teile: ein S2-S4 Dimer, ein S3-S4 Dimer und ein S5 Monomer, das die beiden Dimere zusammenhält (Tamura *et al.* 1982). Abbildung 4 zeigt dies schematisch. Das A-Protomer ist mit seinem C-terminalen Ende in der Mitte der dreieckigen Basis an fünf α-Helices verankert, wobei je eine α-Helix von jeder Untereinheit des B-Oligomers stammt (Stein *et al.* 1994a).

Die Untereinheiten S2 und S3 weisen außerdem eine hohe Sequenzähnlichkeit auf und können in Mutanten von nativem Pertussistoxin durch die jeweils andere Untereinheit ersetzt werden (Locht und Keith 1986; Nicosia *et al.* 1986).

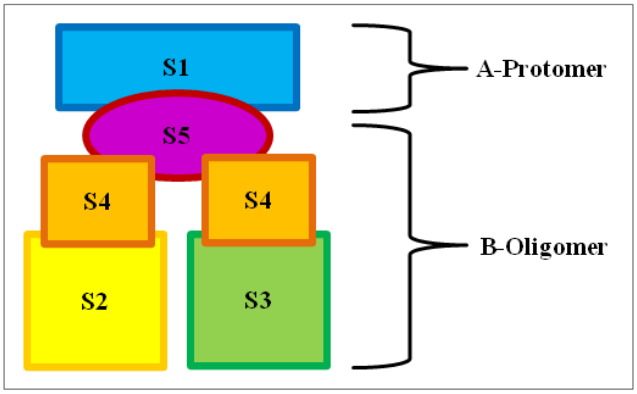


Abbildung 4: Strukturelle Organisation von Pertussistoxin. (modifiziert nach Mangmool und Kurose 2011, veröffentlicht unter der Lizenz Attribution 3.0 Unported (CC BY 3.0), https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/) Pertussistoxin besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten – wobei S4 zweimal auftritt –, die in der typischen AB-Struktur angeordnet sind. Das A-Protomer entspricht der S1-Untereinheit, ist enzymatisch aktiv und bildet die Spitze des Toxins. Das B-Oligomer bildet die Basis und besteht aus den zwei Dimeren S2-S4 und S3-S4, die über S5 zusammengehalten werden.

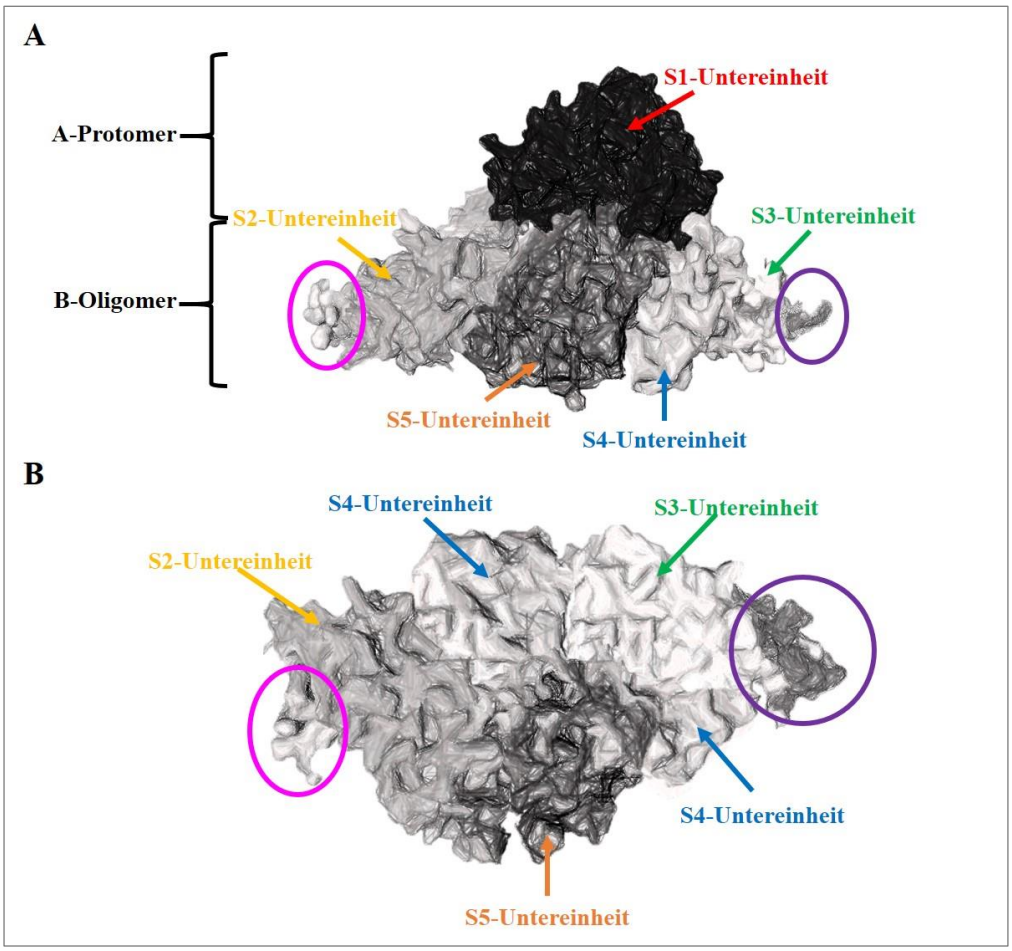


Abbildung 5: Schematische Struktur von Pertussistoxin. (angelehnt an Locht *et al.* 2011) **A:** Seitansicht und **B:** Aufsicht von unten. Die verschiedenen Untereinheiten sind farblich beschriftet, Kohlenhydrat-Erkennungsdomänen an S2 und S3 sind in Pink beziehungsweise Violett umkreist.

1.6.2 Enzymfunktion des Pertussistoxins

Das Pertussistoxin zählt zur Gruppe der ADP-ribosylierenden Toxine, da es als Enzym eine ADP-Ribosyltransferase hat (Katada und Ui 1982a). Die Enzymfunktion wird durch das A-Protomer beziehungsweise die S1-Untereinheit vermittelt. Als Substrate dienen inhibitorische heterotrimere G-Proteine, sogenannte $G_{i/o}$-Proteine (Bokoch *et al.* 1983), die dabei jeweils an ihrer α-Untereinheit durch die Übertragung eines ADP-Ribose-Rests von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) an einen Cystein-Rest (Cystein-351) der α-Untereinheit modifiziert werden (siehe Schema in Abbildung 6) (Hsia *et al.* 1985).

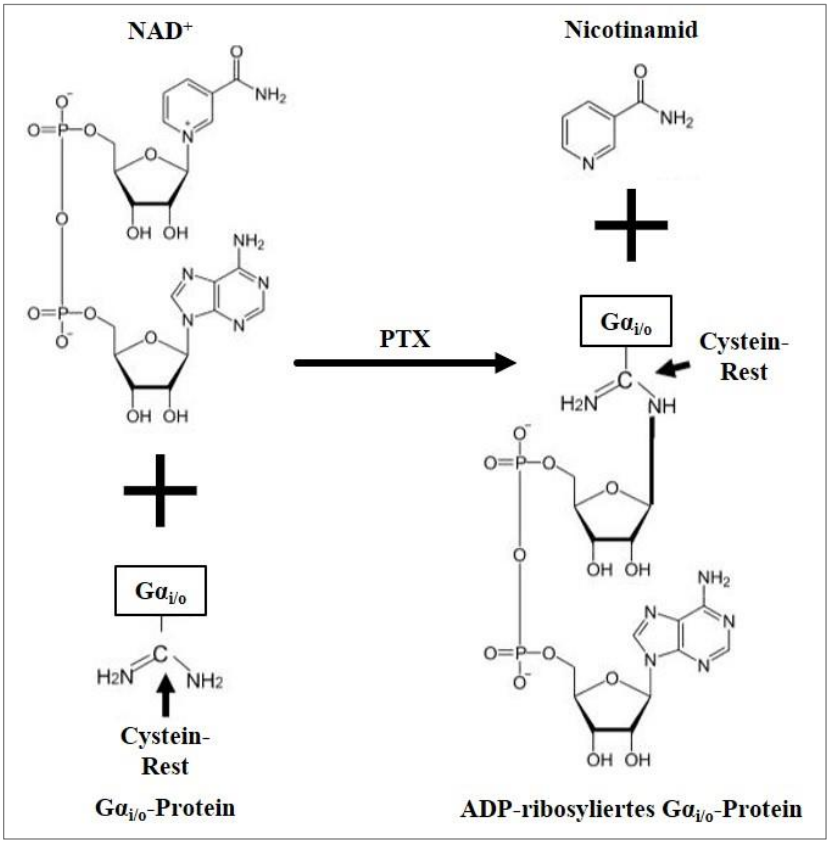


Abbildung 6: Schematische Darstellung der ADP-Ribosylierung der α-Untereinheit eines heterotrimeren $G_{i/o}$-Proteins durch Pertussistoxin. Pertussistoxin (PTX) katalysiert die Abspaltung einer C-N-Bindung zwischen einem Kohlenstoffatom der Ribose und einem Stickstoffatom von Nicotinamid (NAD^+) und überträgt den ADP-Ribose-Rest auf ein Akzeptor-Molekül (hier auf die α-Untereinheit von $G_{i/o}$ an einem Cystein-Rest an der Position Cystein-351).

Die Modifizierung der α-Untereinheit der $G_{i/o}$-Proteine hindert $G_{i/o}α$ daran, seine physiologische Funktion auszuführen, die in der Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität (AC) besteht, was die Konzentration des Second Messengers cAMP intrazellulär auf niedrigem Niveau hält. Die ADP-Ribosylierung dieser inhibitorischen $G_{i/o}α$-Untereinheit durch Pertussistoxin führt in der betroffenen Zelle zu einer Hemmung der Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität und somit konsekutiv zu einer ansteigenden Konzentration von

cAMP mit den daraus resultierenden unphysiologischen Effekten (Locht *et al.* 2011). Abbildung 7 B zeigt die Interaktion von Pertussistoxin mit den $G_{i/o}$-Proteinen. Zum Vergleich ist in Abbildung 7 A die physiologische Situation dargestellt.

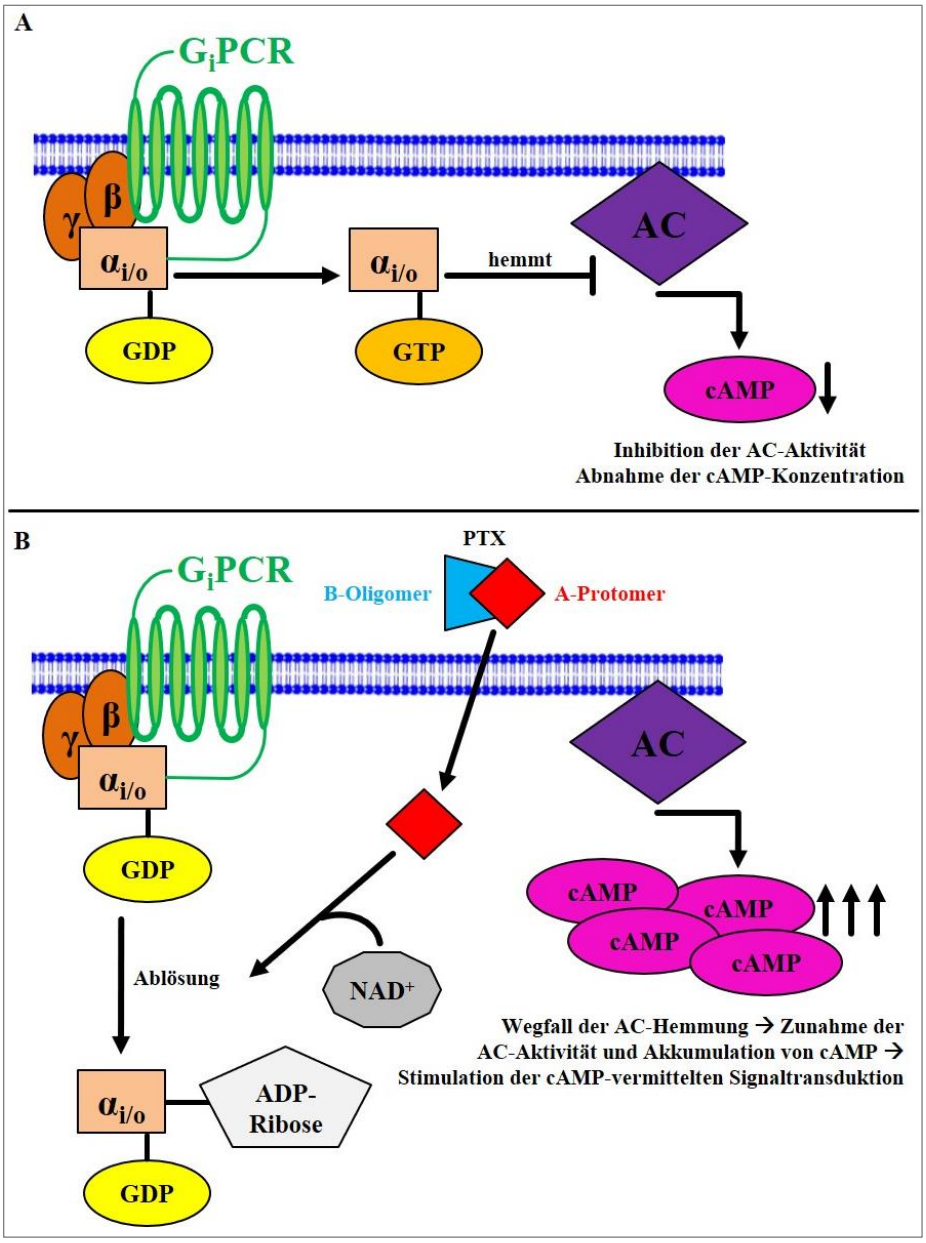


Abbildung 7: Auswirkungen der ADP-Ribosylierung der $G_{i/o}$-Proteine durch Pertussistoxin. A: Physiologische Situation. Die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors (GPCR) durch extrazelluläre Liganden, wie beispielsweise Hormone, führt zu einer Dissoziation des heterotrimeren G-Protein-Komplexes in eine $G_{i/o}\alpha$- und eine βγ-Untereinheit. Durch den Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) kann Energie für die Aktivierung des inhibitorischen G-Proteins ($G_{i/o}\alpha$) bereitgestellt werden, das dadurch die Adenylatzyklase-Aktivität (AC) inhibiert. Die Konzentration an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) nimmt daraufhin ab. **B:** Unphysiologische Situation unter Anwesenheit des A-Protomers von Pertussistoxin. Sobald das A-Protomer von Pertussistoxin (PTX) im Zytosol der Wirtszelle vorliegt, überträgt es einen ADP-Ribose-Rest von Nikotinamidadenindinukleotid (NAD^+) auf die $G_{i/o}\alpha$-Untereinheit, die dadurch inaktiviert wird. Der hemmende Effekt auf die Adenylatzyklase-Aktivität tritt nicht ein und sie produziert cAMP. Dies führt zu erhöhten intrazellulären cAMP-Konzentrationen und der Aktivierung cAMP-vermittelter Signaltransduktionswege.

Die meisten pathologischen Effekte bei einer Intoxikation mit Pertussistoxin lassen sich auf die Akkumulation von cAMP zurückführen (Locht *et al.* 2011; Mangmool und Kurose 2011). Da G-Proteine an vielen verschiedenen Vorgängen im Körper an der Signaltransduktion beziehungsweise dem Signalling beteiligt sind und es vom Zelltyp abhängt, welche Auswirkungen eine Erhöhung der cAMP-Konzentration hat, erklären sich die sehr unterschiedlichen zellulären und systemischen Reaktionen bei einer Vergiftung mit Pertussistoxin. Dazu zählen beispielsweise eine Mobilisierung von Lymphozyten (Lymphozytose) (Bagley *et al.* 2002), eine vermehrte Produktion von Insulin und eine Sensibilisierung gegenüber Histamin. Diese gänzlich verschiedenen Effekte wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten entdeckt und erst im Laufe der Zeit dem gleichen Toxin zugeordnet, was die historisch erwachsenen verschiedenartigen Bezeichnungen des Toxins erklärt, wie zum Beispiel „inselzellaktivierendes Protein“ (IAP); heute sollte jedoch statt all dieser Begriffe die Bezeichnung „Pertussistoxin“ verwendet werden (Pittman 1979).

1.6.3 Zellulärer Aufnahmemechanismus des Pertussistoxins

1.6.3.1 Bindung an die Zielzellen

Nach der Produktion und Freisetzung durch *Bordetella pertussis* kann das Pertussistoxin mit vielen verschiedenen Zielzellen interagieren, was die Vergiftung fast aller Säugetierzellen durch Pertussistoxin und die vielseitigen biologischen Reaktionen erklärt. Spezifische Rezeptoren konnten bisher nicht nachgewiesen werden. Die Bindung erfolgt an Glykoproteine, darunter auch Haptoglobine und Fetuine (Armstrong *et al.* 1988), und an Glykolipide (Hausman und Burns 1993), deren Größe zwischen 43 kDa und 200 kDa variieren kann (Rogers *et al.* 1990; el Bayâ *et al.* 1995). Für die Toxinerkennung sind bestimmte Zuckerreste wichtig, aber allein nicht ausreichend; fehlt die Kohlenhydrat-Sequenz NeuAcα(2,6)-Galβ4GlcNAc sind die Zellen gegenüber Pertussistoxin resistent (Brennan *et al.* 1988). Für die Bindung an die Kohlenhydrate gibt es mindestens zwei Stellen an den Untereinheiten S2 und S3, die bei beiden Untereinheiten eine ähnliche Sequenz haben und die Aminosäuren Tyrosin-102, Serin-104 und Arginin-125 beinhalten. Deletionen oder Substitutionen in diesen Bereichen beeinträchtigen die Bindung (Stein *et al.* 1994b). Der genaue Mechanismus der Bindung von Pertussistoxin ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch wird die Bindung jeweils durch das B-Oligomer vermittelt.

1.6.3.2 Aufnahme in die Zielzellen

Der genaue Aufnahmemechanismus von Pertussistoxin ist noch nicht restlos geklärt. Durch die Hemmung verschiedener Schritte im Proteintransport der Zelle beziehungsweise bestimmter Zellorganellen konnte der Aufnahmeweg für *long-trip* Toxine bestätigt werden (Xu und Barbieri 1995; el Bayâ *et al.* 1997). Nach der Bindung des B-Oligomers an einen Rezeptor auf der Zielzelle, wird das Toxin durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen und befindet sich in Coated Pits. Es transloziert dann nicht aus sauren Endosomen, sondern gelangt zum *trans*-Golgi-Netzwerk und wandert retrograd durch den Golgi-Apparat, was durch Brefeldin A und in manchen Fällen auch temperaturabhängig gehemmt werden kann, und gelangt zum endoplasmatischen Retikulum. An Peptid-getaggtem Pertussistoxin konnten entsprechende biochemische Modifikationen von beiden Organellen nachgewiesen werden (Plaut und Carbonetti 2008). Bei der Aufnahme scheint es außerdem durch Ammoniumchlorid (NH_4Cl) oder Chloroquin hemmbare pH-sensitive Schritte zu geben und solche, die teilweise durch Mikrotubulus-Hemmstoffe wie Nocodazol inhibiert werden können (Xu und Barbieri 1995, 1996). Eine schematische Darstellung des Aufnahmeweges von Pertussistoxin ist in Abbildung 8 dargestellt.

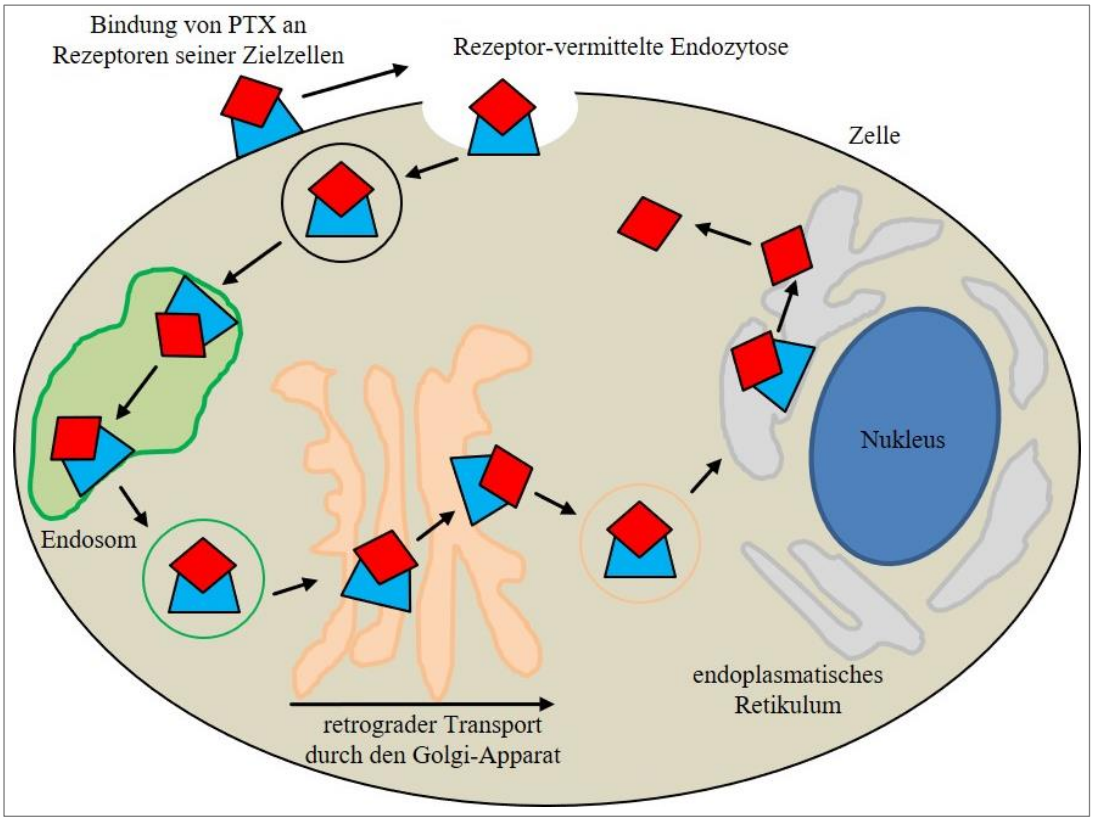


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Aufnahmewegs von Pertussistoxin. (angelehnt an Locht *et al.* 2011) Die S1-Untereinheit von Pertussistoxin (PTX) ist in rot eingefärbt, das B-Oligomer in blau / grün. Die von Pertussistoxin durchlaufenen Zellorganellen sind beschriftet und der Weg des Toxins durch Pfeile markiert. Die Translokation der S1-Untereinheit erfolgt aus dem endoplasmatischen Retikulum.

Der genaue Ort, an welchem die S1-Untereinheit ins Zytosol transloziert, konnte bisher noch nicht eindeutig bestimmt werden. Pertussistoxin verfügt über keine klar identifizierbare Translokationsdomäne auf seinem B-Oligomer. S1 kann dafür an Doppellipidschichten binden und möglicherweise direkt mit der Membran der Zielzelle interagieren und so seine Translokation selbst vermitteln (Hausman und Burns 1992). Für das endoplasmatische Retikulum als Translokationsort sprechen außer den Hinweisen durch Organell-typische Modifikationen an Peptid-getaggtem Pertussistoxin auch, dass die Bindung von ATP, was außer im Zytosol nur im endoplasmatischen Retikulum vorkommt (Burns und Manclark 1986), am Toxin die Bindung zwischen S1 und dem B-Oligomer destabilisiert und zu einer Freisetzung der S1-Untereinheit vom Holotoxin führt (Hazes *et al.* 1996; Hazes und Read 1997). Im endoplasmatischen Retikulum gibt es zudem Protein-Disulfid-Isomerasen (PDI), welche möglicherweise die intramolekulare Disulfidbrücke von S1 spalten und dadurch die Ablösung der Untereinheit vom Holotoxin unterstützen (Braakman *et al.* 1992). Es wird angenommen, dass die Translokation von S1 einen Entfaltungsschritt beinhaltet. Dass das Pertussistoxin im endoplasmatischen Retikulum nicht abgebaut wird, wird auf einen Mangel an Lysin-Resten, welche normalerweise die Substrate der Ubiquitinylierung darstellen, zurückgeführt. Allein ist die S1-Untereinheit allerdings thermisch instabil und kann dann auch Ubiquitin-unabhängig in Proteasomen abgebaut werden (Hazes *et al.* 1996). Jedoch kann eine Interaktion mit NAD die S1-Struktur stabilisieren (Pande *et al.* 2006).

1.7 Beteiligung zytosolischer Faktoren an der Membrantranslokation ADP-ribosylierender Toxine

Bei den Untersuchungen zu ADP-ribosylierenden Toxinen wurde in den vergangenen Jahren von mehreren Arbeitsgruppen, darunter der Arbeitsgruppe Barth, festgestellt, dass nicht allein der B-Anteil der Toxine für die Translokation des A-Anteils ins Zytosol verantwortlich ist. Vor allem für die ADP-ribosylierenden *short-trip* Toxine wie das C2-Toxin, das Iota-Toxin, das CDT (Haug *et al.* 2003; Haug *et al.* 2004; Kaiser *et al.* 2009; Kaiser *et al.* 2011; Kaiser *et al.* 2012) und das Diphtherietoxin (Ratts *et al.* 2003) – aber auch für das *long-trip* Toxin Choleratoxin (Taylor *et al.* 2010) – konnte gezeigt werden, dass für die Translokation eine Entfaltung des Enzymteils stattfinden muss. Damit dieser anschließend im Zytosol wieder enzymatisch aktiv sein kann, muss er im Zytosol rückgefaltet werden. Für diese Proteinfaltungs- und -rückfaltungsprozesse, sowie den Transport der Proteine über Membranen, machen sich die Toxine verschiedene

zytosolische Faktoren der Wirtszelle zu Nutze beziehungsweise benötigen sie essentiell. Diese werden auch von zellulären Proteinen zur Ausbildung ihrer dreidimensionalen Struktur und zum Transport derselben über Membranen benötigt, weshalb sie auch Proteinfaltungshelfer beziehungsweise Proteinfaltungshelferenzyme genannt werden (Macario 1995; Dobson 2003). Ihre genaue Funktion ist jedoch noch nicht restlos aufgeklärt und verstanden. Untergruppen dieser Enzyme sind Chaperone und Immunophiline, zu welchen Cyclophiline, FK506-Bindeproteine und Parvuline zählen (Galat 2003).
In der Arbeitsgruppe Barth konnte in den vergangenen Jahren erstmals gezeigt werden, dass neben Hsp90 auch Hsp70 sowie Mitglieder der Cyclophiline und FK506-Bindeproteine an der Membrantranslokation ADP-ribosylierender Toxine beteiligt sind (Kaiser *et al.* 2009; Dmochewitz *et al.* 2011; Kaiser *et al.* 2011; Kaiser *et al.* 2012; Ernst *et al.* 2015; Barth und Ernst 2016; Ernst *et al.* 2016; Ernst *et al.* 2017b; Ernst *et al.* 2017a; Schuster *et al.* 2017).

Im Folgenden werden die für die vorliegende Arbeit relevanten Proteinfaltungshelfer-enzyme beschrieben.

1.7.1 Das Hitzeschockprotein90

Das Hitzeschockprotein90 (Hsp90) zählt zur Familie der Hitzeschockproteine und ist aufgrund seines Molekulargewichts von 90 kDa einer ihrer größeren Vertreter. Diese Proteine zählen zu den Chaperonen, welche Enzyme sind, die bei der korrekten Faltung von Proteinen entsprechend der Vorgabe durch deren Primärstruktur helfen und verhindern, dass neu synthetisierte Proteine durch Fehlfaltungen funktionsuntüchtig werden, aggregieren und damit den physiologischen Ablauf in der Zelle beeinträchtigen. Die Interaktion mit den Proteinen ist dabei sehr spezifisch und erfordert einen hohen Einsatz an ATP, was die Wichtigkeit dieses Prozesses für die Zelle hervorhebt. Hitzeschockproteine werden vor allem dann synthetisiert, wenn die Zellen vermehrtem Zellstress ausgesetzt sind, wie beispielsweise unphysiologisch hohen Temperaturen, oxidativem Stress (zum Beispiel UV-Strahlung) oder zellschädigenden Substanzen (zum Beispiel Ethanol, Schwermetalle). Sie dienen dabei der Erhaltung der Sekundärstruktur der Proteine und schützen sie somit vor Denaturierung; bei nicht mehr funktionsfähigen Proteinen beschleunigen sie den Abbau über das Proteasom. Hsp90 macht 1 bis 2 % des gesamten löslichen Zellproteins aus und ist eines der am häufigsten vorkommenden

Proteine der Zelle. Es ist sowohl an der Faltung neuer Proteine beteiligt (Freeman und Morimoto 1996), als auch an der Rückfaltung ungefalteter oder entfalteter Proteine (Schneider *et al.* 1996; Schumacher *et al.* 1996) zum Beispiel nach dem Transport über Membranen, welcher meist nur in entfaltetem Zustand stattfinden kann, und trägt somit dazu bei, Aggregationen zu vermeiden (Wiech *et al.* 1992; Jakob *et al.* 1995). Ihm wird dabei vor allem die Fähigkeit zugeschrieben, Proteine in einem „faltungskompetenten" Zustand zu halten. Überdies konnte eine Beteiligung von Hsp90 beim Proteintransport durch den Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum nachgewiesen werden (Little *et al.* 1994). Hsp90 besteht aus drei Domänen – einer N-terminalen ATPase-Domäne, einer Mitteldomäne und einer C-terminalen Dimerisierungsdomäne. Für seine Faltungsfunktion durchläuft Hsp90 unter Hydrolyse von ATP über die intrinsische ATPase-Aktivität eine Konformationsänderung, welche auch im Substrat von Hsp90 zu einer Konformationsänderung führt (Pratt und Toft 2003). Für AB-Toxine konnte eine Beteiligung von Hsp90 an der Translokation der Enzymanteile verschiedener Toxine durch den Einsatz von spezifischen pharmakologischen Hsp90-Inhibitoren gezeigt werden – zuerst für die Enzymdomäne DTA des Diphtherietoxins in rekombinanten DTA-Fusionstoxinen *in vitro* (Ratts *et al.* 2003) und für das binäre C2-Toxin (Haug *et al.* 2003), später auch für die Translokation von Iota-Toxin und CDT-Toxin aus Endosomen und für das Choleratoxin (Haug *et al.* 2003; Haug *et al.* 2004; Kaiser *et al.* 2009; Taylor *et al.* 2010; Kaiser *et al.* 2011). Jedoch ist noch nicht klar, welcher Mechanismus der Interaktion zwischen Hsp90 und den einzelnen Enzymanteilen auf molekularer Ebene zu Grunde liegt. Wird Hsp90 gehemmt, verbleiben diese Toxine in den Endosomen beziehungsweise im endoplasmatischen Retikulum und translozieren ihre Enzymanteile nicht in das Zytosol der Zielzelle. Erste Hinweise auf die vermutliche Beteiligung von Hsp90 nicht nur an der Membrantranslokation selbst, sondern auch an der Rückfaltung der Enzyme, die meist nur im entfalteten Zustand über Membranen transportiert werden können, konnten Burress *et al.* 2014 vor kurzem für die Interaktion mit Choleratoxin finden.

1.7.2 Die FK506-Bindeproteine

Die FK506-Bindeproteine (FKBPs) sind eine Untergruppe der Peptidyl-Prolyl-*cis*/*trans*-Isomerasen (PPIasen), die die *cis*/*trans*-Isomerisierung von Prolin-Peptid-Bindungen katalysieren (Fischer *et al.* 1984; Fischer und Bang 1985; Lang *et al.* 1987; Bang und Fischer 1991; Schmid 1993; Schmid *et al.* 1993). Normalerweise liegen Aminosäuren im ungefalteten Zustand aus energetischen Gründen nur in der *trans*-Konformation vor

(Wedemeyer *et al.* 2002). Prolin liegt als einzige Aminosäure ungefaltet sowohl in der *trans*- als auch in der *cis*-Konformation vor, kann aber in ein natives Protein nur in einer Konformation eingebaut werden, sodass für den Erhalt eines funktionellen Proteins eine Isomerisierung stattfinden muss. Diese Reaktion verbraucht mit etwa 83 kJ/mol relativ viel Energie und benötigt, um genügend schnell durchgeführt werden zu können, die PPIasen als Katalysatoren (Lilie *et al.* 1993; Wedemeyer *et al.* 2002). Die große Bedeutung der PPIasen für die Proteinfaltung zum nativen, funktionellen Protein zeigt sich darin, dass die Isomerisierung oft den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt während der Faltung darstellt (Kim und Baldwin 1982; Göthel und Marahiel 1999). FK506-Bindeproteine liegen normalerweise als Dimere vor. Zur ihrer Gruppe gehören auch Proteine, die an Transkriptionsvorgängen und der Signaltransduktion beteiligt sind (Kang *et al.* 2008). Kaiser *et al.* 2012 konnten zeigen, dass FK506-Bindeproteine an der Translokation der Enzymkomponente des C2-Toxins beteiligt sind.

1.7.3 Das Cyclophilin A

Das Cyclophilin A (CypA) ist ein Isoenzym aus der Gruppe der Cyclophiline, die ebenfalls eine Proteinfamilie von Proteinfaltungshelferenzymen ist und auch den PPIasen zugerechnet werden. Cyclophilin A wird auch Peptidyl-prolyl-Isomerase A genannt und kommt reichlich im Zytosol von Säugetierzellen vor, aber auch in Zellorganellen wie dem endoplasmatischen Retikulum. Es hat ein Molekulargewicht von 17,7 kDa und weist eine β-Fass-Struktur aus zwei α-Helices und einem β-Faltblatt auf (Wang und Heitman 2005). Die Arbeitsgruppe Barth konnte für Cyclophilin A erstmals zeigen, dass es für die Aufnahme des C2-Toxins, des Iota-Toxins und des CDT in die Zielzellen benötigt wird, um die Enzymkomponenten der Toxine über Membranen zu translozieren (Kaiser *et al.* 2009; Kaiser *et al.* 2011). Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe deuten stark darauf hin, dass dabei Cyclophilin A den gleichen Schritt vermittelt wie Hsp90 und die FK506-Bindeproteine.

1.8 Inhibitoren der zytosolischen Faktoren: Radicicol, Cyclosporin A, FK506, VK112, Brefeldin A

Um die Beteiligung der zuvor beschriebenen zytosolischen Faktoren bei der Translokation des Enzymanteils der Toxine zu untersuchen, können diese durch den Einsatz spezifischer pharmakologischer Inhibitoren in ihrer Wirkung gehemmt werden und die Effekte auf die Vergiftung durch die Toxine unter ihrer Ausschaltung beobachtet werden. Mit Hilfe

solcher Inhibitoren konnten bereits die Beteiligung der zuvor genannten zytosolischen Faktoren bei der Translokation der oben genannten Toxine aufgedeckt werden.

1.8.1 Radicicol

Radicicol (Rad), alias Monorden, ein Makrolidantibiotikum aus dem Pilz *Monosporium bonorden* (Delmotte und Delmotte-Plaquee 1953), ist ein spezifischer Hsp90-Inhibitor, der mit nanomolarer Affinität an die N-terminale ATP-Bindetasche von Hsp90 bindet und so die Interaktion mit dessen natürlichen Substraten verhindert (Schulte *et al.* 1998). Typische Substrate sind zum Beispiel Steroidrezeptoren (Nathan und Lindquist 1995; Johnson *et al.* 1996; Pratt *et al.* 1996), Tyrosinkinasen (Brugge *et al.* 1983; Brugge 1986) oder Serin-Threonin-Kinasen (Stancato *et al.* 1993; Wartmann und Davis 1994) – diese werden aufgrund der Blockade der Bindung an Hsp90 abgebaut.

1.8.2 Cyclosporin A

Cyclosporin A (CsA), ein zyklisches Undecapeptid aus elf Aminosäuren aus den Schlauchpilzen *Tolypocladium inflatum* und *Cylindrocarpon lucidum*, ist ein spezifischer Inhibitor von Cyclophilinen, vor allem von Cyclophilin A (Borel *et al.* 1976; Fruman *et al.* 1994; Borel 2002). Cyclosporin weist eine Cyclophilin-Bindungsstelle auf, durch welche es an Cyclophiline bindet und mit ihnen einen Komplex bildet (Fischer *et al.* 1984; Handschumacher *et al.* 1984). Zunächst hemmt dies deren PPIase-Aktivität (Fischer *et al.* 1989). Weiterhin bindet der entstandene Komplex in aktivierten T-Lymphozyten mit dem Cyclosporin-Teil an die Calcium- / Calmodulin-abhängige Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin (Clipstone und Crabtree 1992). Diese verhindert im Zytosol die Bindung von Calcineurin an den NFAT, ein Gen-regulierendes Protein, und konsekutiv die Dephosphorylierung von NFAT, wodurch NFAT nicht in den Zellkern translozieren kann (Liu *et al.* 1991). Somit werden weniger Zytokine wie Interleukin-2 (IL-2) produziert und die Aktivierung von T-Helferzellen reduziert (Flanagan *et al.* 1991; Schreiber *et al.* 1991; Fruman *et al.* 1992). Dies vermindert beziehungsweise unterdrückt die Immunantwort. In der Humanmedizin wird Cyclosporin A daher als Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin, um Abstoßungsreaktionen zu minimieren, aber auch bei Autoimmunerkrankungen eingesetzt.

1.8.3 Tacrolimus / FK506

Tacrolimus / FK506, ein Makrolidantibiotikum aus dem grampositiven Bakterium *Streptomyces tsukubaensis*, ist ein spezifischer Inhibitor von FK506-Bindeproteinen und hemmt deren PPIase-Aktivität. FK506 hat ein Molekulargewicht von 8,2 kDa und ist äußerst hydrophob, was seine Anwendungsmöglichkeiten limitiert. FK506 zählt wie das oben beschriebene Cyclosporin A zu den sogenannten Calcineurin-Inhibitoren und greift auf gleichartige Weise in das Signalling und die Aktivierung von T-Zellen und damit in die Immunmodulation ein (Bierer *et al.* 1993; Thomson *et al.* 1995). FK506 lagert sich dabei an ein FK506-Bindeprotein an, bildet einen Komplex und lagert diesen an Calcineurin an, was dessen Aktivität hemmt. Konsekutiv wird die Zytokinproduktion vermindert und die Immunantwort nimmt ab. In der Humanmedizin wird FK506 daher auch als Immunsuppressivum zur Vermeidung einer Abstoßungsreaktion nach Organtransplantationen verwendet, aber auch bei einigen Autoimmunerkrankungen alternativ zu Glukokortikoiden.

1.8.4 VK112

VK112, ein Cyclosporin-Derivat, ist ein spezifischer Inhibitor von Cyclophilinen (Prell *et al.* 2013), der von der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Cordelia Schiene-Fischer von der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle an der Saale unter der Leitung von Prof. Dr. Gunter Fischer synthetisiert und unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt wurde. VK112 hemmt wie Cyclosporin A Cyclophiline (Ernst *et al.* 2015), ist jedoch aufgrund einer Modifikation der Seitenkette nicht dazu in der Lage mit Calcineurin zu interagieren und hat daher keine immunsuppressive Wirkung.

1.8.5 Brefeldin A

Brefeldin A (BFA), ein Makrolidantibiotikum aus Pilzen wie *Eupenicillium brefeldianum,* wurde initial isoliert, um es als antiviralen Arzneistoff einzusetzen. Heute wird es aufgrund seines Wirkmechanismus vor allem bei biologischen und medizinischen Untersuchungen des Proteintransportes eingesetzt (Chardin und McCormick 1999). Brefeldin A hemmt sogenannte Adenosyl- beziehungsweise ADP-Ribosylierungsfaktoren (Arfs) aus der Familie der kleinen GTPasen (Ras-Superfamilie) (Patton *et al.* 2000). Kleine GTP-beladene G-Proteine der Arf-Familie organisieren im endoplasmatischen Retikulum Coat Proteine (COPs), die bei der Auswahl notwendiger Transportmoleküle helfen und als Gerüst für die Vesikelabschnürung wirken. Beim anterograden Transport werden COP-I-

Vesikel vom endoplasmatischen Retikulum abgeschnürt und in den Golgi-Apparat eingelagert (Zisternenreifung); beim retrograden Transport werden Proteine in COP-II-Vesikeln zur Wiederverwendung vom Golgi-Apparat zurück ins endoplasmatische Retikulum transportiert. Für die Bildung der Vesikel wird das GTP der Arfs benötigt. Brefeldin A hemmt Arf und löst dadurch die COP-I-Vesikel auf (Helms und Rothman 1992; Ktistakis *et al.* 1992), lässt den Golgi-Apparat kollabieren und lagert die betroffenen Proteine wieder im endoplasmatischen Retikulum ein, was den Proteintransport inhibiert. Außerdem blockiert Brefeldin A den GDP-GTP-Austausch bei Arf und stabilisiert es GDP-gebunden, wodurch Arf keine neue Energie für die Vesikelbildung bereitstellen kann (Klausner *et al.* 1992; Ktistakis *et al.* 1992; Chardin und McCormick 1999).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

1.9.1 Hintergrund

In der Arbeitsgruppe Barth konnte durch den Einsatz spezifischer pharmakologischer Inhibitoren bereits für mehrere *short-trip* Toxine gezeigt werden, dass an der Membrantranslokation der jeweiligen Enzymanteile das Chaperon Hsp90 und die PPIasen Cyclophilin A und Cyclophilin 40 und die FK506-Bindeproteine 51/52 beteiligt sind – wie unter „Einleitung“ (1.7 und 1.8) beschrieben – was Abbildung 9 exemplarisch für das binäre C2-Toxin zeigt. Neueste Ergebnisse der Arbeitsgruppe konnten ähnliche Bedingungen für das Diphtherietoxin aufzeigen (Schuster *et al.* 2017). All diese Proteine haben die Gemeinsamkeit, dass sie ADP-Ribosyltransferasen sind. Im Gegensatz dazu konnte beim binären Letaltoxin, einer Metalloprotease, keine Beteiligung von Cyclophilin A und Hsp90 festgestellt werden (Dmochewitz *et al.* 2011).

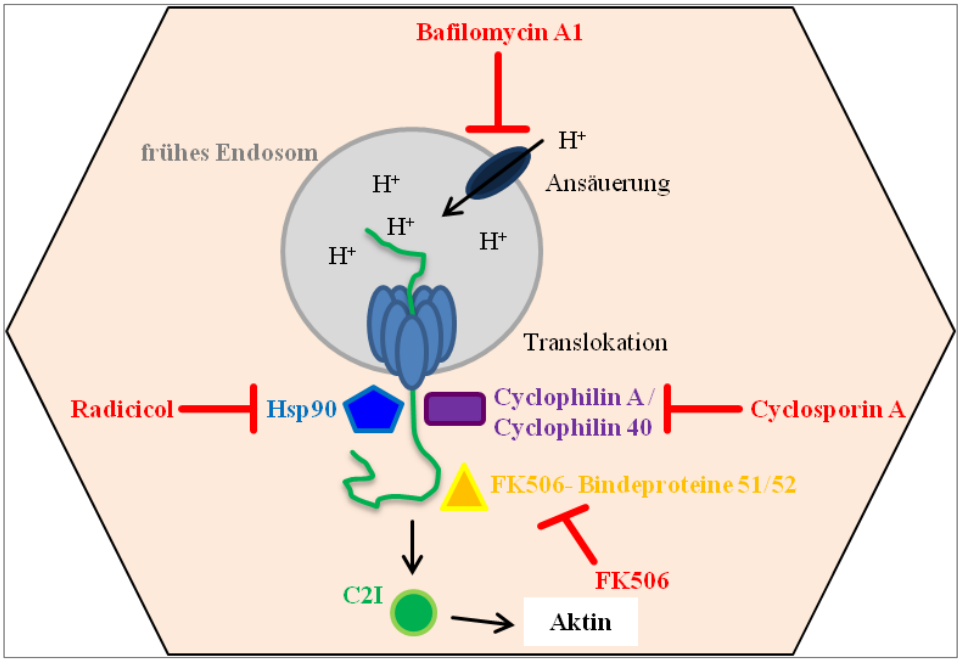


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Membrantranslokation der Enzymkomponente C2I des binären C2-Toxins von *Clostridium botulinum* über endosomale Membranen. Dargestellt sind ein frühes Endosom, in dessen Membran sich die Translokationskomponente des C2-Toxins aufgrund der Ansäuerung mittels einer vesikulären H^+-ATPase einlagert (inhibierbar durch Bafilomycin A1) und eine Pore für den Übertritt der entfalteten Enzymkomponente C2I formt. C2I transloziert mit Hilfe von Hsp90, der FK506-Bindeproteine 51/52 und Cyclophilin A und Cyclophilin 40 ins Zytosol und wird durch die Proteinfaltungshelferenzyme rückgefaltet. C2I modifiziert anschließend im Zytosol sein Substrat Aktin, was zum Abbau des Zytoskeletts der vergifteten Zelle führt und sich in einer Abrundung derselben widerspiegelt. Durch den Einsatz der spezifischen pharmakologischen Inhibitoren Radicicol, FK506 und Cyclosporin A kann die Translokation von C2I inhibiert und die Intoxikation der Zelle verhindert werden.

Das in der vorliegenden Arbeit zu untersuchende Pertussistoxin hat mit den bisher in der Arbeitsgruppe untersuchten Toxinen gemeinsam, dass es zu den AB-Toxinen zählt und eine ADP-Ribosyltransferase ist. Es zählt jedoch zu den *long-trip* Toxinen, die aus dem endoplasmatischen Retikulum und nicht aus sauren Endosomen translozieren. Für solche Toxine konnte bisher für Choleratoxin eine Beteiligung von Hsp90 an der Translokation nachgewiesen werden (Taylor *et al.* 2010; Burress *et al.* 2014). Choleratoxin und Pertussistoxin sind beide *long-trip* Toxine, ähnlich aufgebaut (AB_5-Toxine) und weisen auch auf Genebene in ihrer Enzymuntereinheit einige Gemeinsamkeiten auf (Locht und Keith 1986; Nicosia *et al.* 1986; Locht *et al.* 2000).

Die bisherigen Erkenntnisse über den Membrantransport von ADP-ribosylierenden Toxinen durch die Interaktion mit Proteinfaltungshelferenzymen scheinen darauf hinzudeuten, dass diese Interaktion spezifisch für ADP-ribosylierende Toxine ist. Dies führte zu der Hypothese, dass auch Pertussistoxin für seine Translokation diese Proteine benötigt.

1.9.2 Ziele der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte die Translokation des A-Protomers von Pertussistoxin im Hinblick auf eine Interaktion mit dem Chaperon Hsp90 und den PPIasen, FK506-Bindeproteine und Cyclophiline, durch den Einsatz spezifischer pharmakologischer Inhibitoren gegen diese Proteine näher untersucht und eine gegebenenfalls auftretende Hemmung genauer charakterisiert werden (siehe auch Abbildung 10). Als „Ziel“ sollten neue Hinweise über die Aufnahme beziehungsweise Translokation von Pertussistoxin gewonnen werden. Die Wirkung der spezifischen pharmakologischen Inhibitoren könnte darüber hinaus auch eine Bedeutung für die klinische Pharmakologie haben, da die genaue Charakterisierung der toxinhemmenden Wirkung einen wichtigen ersten Schritt für die Entwicklung eines neuen pharmakologischen Ansatzes für die Behandlung von Pertussis auf Toxinebene darstellt. Dies könnte als Basis für die Etablierung einer kausalen Therapie gegen Pertussis dienen. Da nach aktuellem medizinischem Verständnis immunsuppressive Medikamente wie Cyclosporin A bei einer Infektion mit toxinproduzierenden Bakterien aufgrund der verminderten Verteidigung des Organismus gegen die Erreger als kontraindiziert oder sogar schädlich gelten, sollte hier auch das nicht-immunsuppressive Cyclosporin-Derivat VK112 getestet werden (Ernst *et al.* 2015).

Zur Umsetzung des Arbeitszieles sollten zunächst Vergiftungsexperimente mit kultivierten CHO-K1-Zellen durchgeführt werden, um geeignete Versuchsbedingungen auf der Grundlage der beschriebenen morphologischen Veränderung von CHO-K1-Zellen bei einer Vergiftung durch Pertussistoxin, dem sogenannten Clustering (Hewlett *et al.* 1983), zu etablieren. Dabei wurden als Variation sowohl Versuche mit *adhärenten* als auch mit *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen durchgeführt, um zwei verschiedene Testsysteme anwenden zu können, in welchen in einem weiteren Schritt die pharmakologischen Inhibitoren getestet werden sollten. Als Vergleichsinhibitor sollte Brefeldin A eingesetzt werden, da dessen inhibitorischer Effekt bei *long-trip* Toxinen bekannt ist (Donta *et al.* 1993) und sein Hemmungsmechanismus durch den Abbau des Golgi-Apparates unabhängig von den Chaperonen und PPIasen wirkt.

Anschließend sollte in Folgeexperimenten der Einfluss der Inhibitoren auf die unterschiedlichen Schritte der Vergiftung von Zellen durch Pertussistoxin genauer charakterisiert werden – im Hinblick auf die Beeinflussung des ADP-Ribosylierungsstatus des Substrats $G_i\alpha$ (Nachribosylierungstest), die Bindung des Toxins an seine Zielzellen

(Bindungstest), die Enzymaktivität der S1-Untereinheit *in vitro* (Enzymaktivitätstest) und die Beeinflussung der Aufnahme der S1-Untereinheit ins Zytosol (Digitonintest).

Für den Nachribosylierungs- und den Enzymaktivitätstest wurde die S1-Untereinheit isoliert benötigt und sollte daher aus einem Plasmid aufgereinigt und vor der Verwendung auf Funktionsfähigkeit geprüft werden. Dieser Teil sollte begleitend zu den oben genannten Versuchen durchgeführt werden, die den Fokus der Arbeit darstellen.

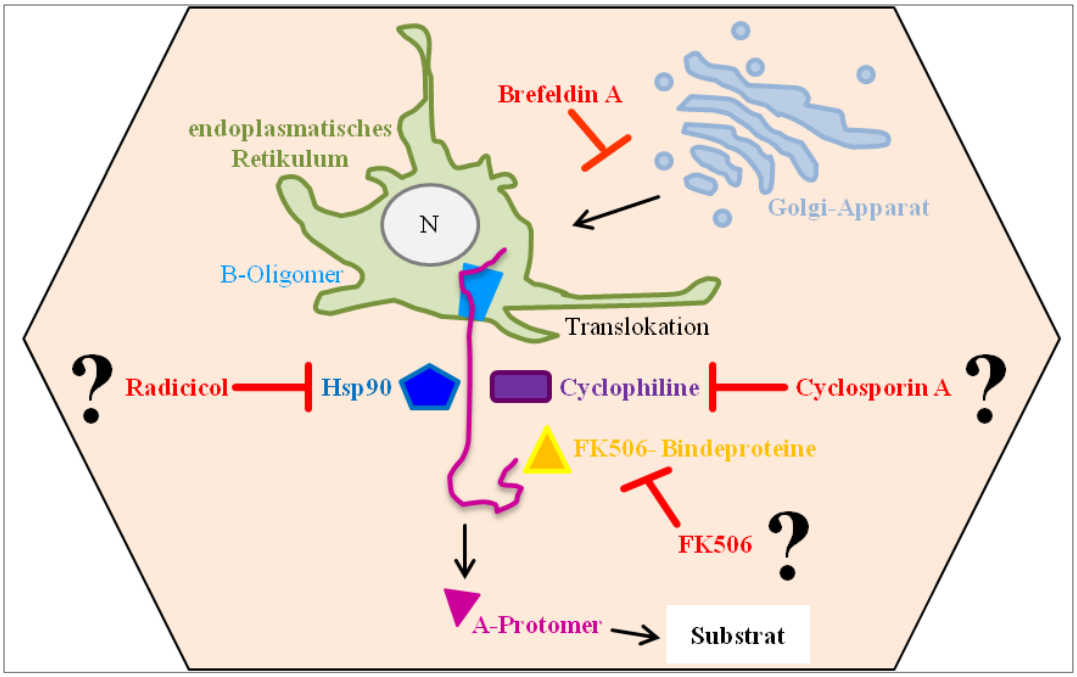


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese: Wird die Translokation des A-Protomers von Pertussistoxin über die Membran des endoplasmatischen Retikulums durch Hsp90, FK506-Bindeproteine und / oder Cyclophiline beeinflusst? Es sollte untersucht werden, ob die Inhibitoren Radicicol, FK506 und Cyclosporin A durch die Hemmung der zytosolischen Faktoren einen Einfluss auf die Translokation des A-Protomers von Pertussistoxin aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol haben und damit die Beteiligung des Chaperons Hsp90 und der PPIasen, FK506-Bindeproteine und Cyclophiline, nachgewiesen werden. Brefeldin A sollte als Referenzsubstanz für die Inhibitoren eingesetzt werden, da es durch die Hemmung des Proteintransports vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum in ein anderes, von den zu testenden Inhibitoren unabhängiges System eingreift und seine Wirksamkeit bei Pertussistoxin bereits belegt ist. N = Nukleus.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid/Bis-Acrylamid (BIS) 30 %

Adenosintriphosphat (ATP)

Agarose

Aktivkohle

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Ampicillin

Bacto-Agar

Bacto-Hefeextrakt

Bacto-Trypton

Biotin-Nikotinamidadenindinukleotid (Biotin-NAD^+)

Bovines Serumalbumin (BSA)

Bromphenolblau

Chlorwasserstoff (HCl)

Complete®

Coomassie Brilliant Blue G250

Coomassie Brilliant Blue R250

Cumarsäure

Digitonin

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)

Dithiothreitol (DTT)

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Eisessig

Ethanol (99,8 %)

Ethidiumbromid

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

F-12 Nutrient Medium (HAM's F-12)

Fetales Kälberserum (FCS)

Glukose-Monohydrat

Glycerin / Glycerol (> 99,5 %)

Glycin

Imidazol ($C_3H_4N_2$)

Isopropanol / Propan-2-ol

Isopropylthiogalaktose (IPTG)

Kaliumchlorid (KCl)

Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)

Lithiumacetat

Luminol

Magnesiumdichlorid ($MgCl_2$)

Methanol

Methionin

Milchpulver

Minimum Essential Medium (MEM)

Morpholinoethansulfonsäure (MES)

Natriumazid (10 %)

Natriumchlorid (NaCl)

Natriumdodecylsulfat-Pellets (SDS-Pellets)

Natriumhydroxid (NaOH)

Natrium-Pyruvat

Ortho-Phosphorsäure (85 %)

Paraformaldehyd (PFA)

Penicillin

Phosphorsäure (H_3PO_4)

Ponceau-S

Streptavidin-Peroxidase (Strep-POD)

Streptomycin

Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Tris

Tris-Carboxyethyl-Phosphin (TCEP)

Trypsin

Trypton

Tween® (Polysorbat-20)

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (30 %)

Xylencyanol

Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:
Alfa Aesar GmbH & Co. KG (Karlsruhe); AppliChem (Darmstadt); Fluka (Buchs, Schweiz); ForMedium (Hunstanton, Norfolk, Großbritannien); GIBCO (Karlsruhe); Invitrogen (Karlsruhe); Merck (Darmstadt); Promega (Mannheim); Roche (Mannheim); Carl Roth (Karlsruhe); Sigma-Aldrich (München); usb (Cleveland, Ohio, USA); VWR International (Darmstadt).

2.1.2 Lösungen und Puffer

Alle Puffer wurden mit *Aqua bidest.* auf das angegebene Volumen und – falls nicht anders vermerkt – gegebenenfalls mit HCl und NaOH auf den angegebenen pH-Wert eingestellt.

ADP-Ribosylierungspuffer (Ansatz für 200 ml)

1 M Tris-HCl (pH 7,5)	4 ml
EDTA	0,0584 g
1 M DTT	200 µl
1 M $MgCl_2$	1 ml

Vor Gebrauch wird 1 x Complete® zugegeben.

ADP-Ribosylierungspuffer für das C180-Protein (Ansatz für 5 ml)
(nach Xu und Barbieri 1996)

0,1 mM Tris-HCl (pH 7,6)	500 µl
20 mM DTT	100 µl
0,1 µM ATP	55,5 nl

Bradford-Reagens (Ansatz für 1 l)

Coomassie Brilliant Blue G250	400 mg
Ethanol (99,8 %)	209 ml
Ortho-Phosphorsäure (85 %)	500 ml

Coomassie wird zunächst in Ethanol gelöst und über Nacht gerührt. Anschließend werden 500 ml ortho-Phosphorsäure (85 %) dazugegeben und es wird noch einmal eine Stunde gerührt. Die Lösung wird filtriert und dunkel und kühl gelagert.

Coomassie

Färbelösung (Ansatz für 1 l)

Coomassie Brilliant Blue R250	2,5 g
Methanol	450 ml
Eisessig	100 ml

Zuerst wird Coomassie in Methanol gelöst und für mindestens zwei Stunden gerührt; danach werden *Aqua bidest.* und Eisessig hinzugefügt und eine weitere Stunde gerührt.

Entfärbelösung (Ansatz für 1 l)

Methanol	450 ml
Eisessig	100 ml

Digitoninlösung (Ansatz für 1 ml)

Digitonin	1 mg
1 x PBS	1 ml

ECL

Lösung A (Ansatz für 5 ml)

1 M Tris-HCl (pH 9,0)	500 µl
250 mM Luminol (gut resuspendiert)	50 µl
90 mM Cumarsäure (gut resuspendiert)	22 µl

Lösung B (Ansatz für 5 ml)

1 M Tris-HCl (pH 9,0)	500 µl
30 % H_2O_2	50 µl

Die Lösungen A und B werden lichtgeschützt aufbewahrt.

Vor dem Gebrauch werden die Lösungen A und B zu gleichen Teilen sorgfältig mit der Pipette vermischt. Das Gemisch wird auf die Membran gegeben und für eineinhalb Minuten lichtgeschützt inkubiert.

6 x Gel-Loading-Puffer (Ansatz für 15 ml)

100 mM Tris (pH 7,6)	1,5 ml
Bromphenolblau	4,5 mg
Xylencyanol	4,5 mg
Glycerol	9 ml
1 mM EDTA	900 µl

Luria-Bertani-Agar (LB-Agar) für Platten (Ansatz für 500 ml)

Bacto-Agar	8,5 g
1 x Luria-Bertani-Medium	500 ml

Der Luria-Bertani-Agar wird autoklaviert und ab 50 °C werden Antibiotika zugegeben.

10 x Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) (Ansatz für 1 l)

Bacto-Trypton	100 g
Bacto-Hefeextrakt	50 g
NaCl	100 g

Die Lösung wird autoklaviert und ab 50 °C werden gegebenenfalls Antibiotika zugegeben.

1 x Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) (Ansatz für 500 ml)

10 x Luria-Bertani-Medium	50 ml
Aqua bidest. (autoklaviert)	450 ml

5 x Laemmli-Probenpuffer (Ansatz für 50 ml)

0,625 M Tris-HCl (pH 6,8)	8 ml
20 % (m/v) SDS	25 ml
99,9 % Glycerin	17 ml
Bromphenolblau	0,1 g

Vor Gebrauch wird 10 % 1 M DTT zugegeben.

MES-Puffer (Ansatz für 100 ml)

20 mM MES	390,4 mg
0,3 M NaCl	1753,2 mg

Der pH-Wert wird auf 5,0 eingestellt.

10 x PBS (Ansatz für 1 l)

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na_2HPO_4	1,44 g
KH_2PO_4	0,24 g

Der pH-Wert wird auf 6,8 eingestellt.

1 x PBS-T (Ansatz für 10 l)

10 x PBS	1 l
Tween®	10 ml

PFA 4 %-ig (Ansatz für 100 ml)

PFA	4 g
5 M NaOH	3 – 4 Tropfen
10 x PBS	10 ml
HCl	einige Tropfen

75 ml *Aqua bidest.* werden im Becherglas vorgelegt, unter Rühren auf 60 °C erhitzt, mit PFA und drei bis vier Tropfen 5 M NaOH versetzt und bis zur Klärung der Lösung gerührt. 10 ml 10 x PBS werden ohne Wärmezufuhr zugesetzt und der pH-Wert wird mit HCl auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wird auf 100 ml mit *Aqua bidest.* aufgefüllt.

1 x Ponceau-S (Ansatz für 1 l)

Ponceau-S	2 g
Eisessig	50 ml

Das Gemisch muss gut gerührt werden.

Sammelgelpuffer (Ansatz für 1 l)

Tris-HCl	60,1 g

Der pH-Wert wird auf 6,8 eingestellt.

10 x SDS-Laufgelpuffer (Ansatz für 2 l)

Tris	66 g
Glycin	288 g

1 x SDS-Laufgelpuffer (Ansatz für 5 l)

10 x SDS-Laufpuffer	500 ml
SDS	5 g

Stripping-Puffer

Stripping-Puffer A (Ansatz für 1 l)

Glycin	15,03 g
NaCl	29,22 g

Der pH-Wert wird auf 2,0 eingestellt.

Stripping-Puffer B (Ansatz für 1 l)

Tris	60,57 g

Der pH-Wert wird auf 11,0 eingestellt.

50 x TAE-Puffer (Ansatz für 1 l)

Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
0,5 M EDTA (pH 8,0)	100 ml

1 x TAE-Puffer (Ansatz für 1 l)

50 x TAE-Puffer	20 ml

Towbin-Puffer (Ansatz für 2 l)

10 x SDS	200 ml
Methanol	400 ml

Trenngelpuffer (Ansatz für 1 l)

Tris-HCl	181,7 g

Der pH-Wert wird auf 8,8 eingestellt.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Blotting Papier; Macherey-Nagel (Düren)

Corex-Röhrchen; Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA)

CryoPure Gefäß 1,8 ml; Sarstedt (Nümbrecht)

Drigalskispatel

Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml); Sarstedt (Nümbrecht)

Entwickler und Fixierer, RTU60; Adefo-Chemie (Dietzenbach)

Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml); Eppendorf (Hamburg)

Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate; Millipore (Schwalbach)

Küvetten (Plastik); Sarstedt (Nümbrecht)

Medical X-ray Film Cronex 5, 100 NIF; AGFA (Köln)

Micro Bio-SpinTM Chromatography Columns; BIO-RAD (München)

Nitrozellulose-Transfer-Membran für Western-Blot-Analysen; Whatman (Dassel)

NucleoBond® PC 100 Kit; Macherey-Nagel (Düren)

NucleoSpin® Extract II; Macherey-Nagel (Düren)

NucleoSpin® Plasmid; Macherey-Nagel (Düren)

Pipettenspitzen; Sarstedt (Nümbrecht); Greiner BIO-One (Solingen)

Röhre 13 ml / Tube 13 ml; Sarstedt (Nümbrecht)

Spritzenkanüle (18G); B. Braun (Melsungen)

Vivaspin Säulen, 0,5 ml concentrator; VivaScience, Sartorius AG (Göttingen)

Zellkulturflaschen (75 cm^2, 150 cm^2); TPP (Trasadingen, Schweiz)

Zellkulturplatten (6-Well, 12-Well, 24-Well, 96-Well); TPP (Trasadingen, Schweiz)

Zellkulturschalen (d = 10 cm); TPP (Trasadingen, Schweiz)

Zellschaber (25 cm); TPP (Trasadingen, Schweiz); Sarstedt (Nümbrecht)

Zentrifugenbecher; Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA)

Zentrifugenglasröhrchen; Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA)

Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml); TPP (Trasadingen, Schweiz)

2.1.4 Geräte

Beckman J2-HS Centrifuge; Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA)

Bio-Dot® Microfiltration Apparatus; BIO-RAD (München)

Blocel Milli-Q; Millipore (Schwalbach)

Blotter Perfect Blue Semi-Dry; peqLab Biotech GmbH (Erlangen)

Blotter (Wet); peqLab Biotech GmbH (Erlangen)

Brutschrank; Binder (Tuttlingen)

Brutschrank 5 5060 E; Heraeus (Hanau)

CERTOMAT® BS-1 Inkubationsschüttler; Sartorius AG (Göttingen)

Electrophoresis Power Supply EPS 301; Amersham Biosciences (Freiburg)

Electrophoresis Power Supply EPS 601; Amersham Biosciences (Freiburg)

Feinwaage; Sartorius (Göttingen)

FIREBOY eco (Bunsenbrenner); INTEGRA Biosciences GmbH (Fernwald)

Folienschweißgerät Folio FS 3602; Severin (Sundern)

Gelkammer Hoefer SE 600 Ruby; Amersham Biosciences (Freiburg)

Gelkammer peqLab 45-2010-I; peqLab Biotech GmbH (Erlangen)

Gene Quant *pro*; Amersham Biosciences (Freiburg)

Jenoptik ProgRes C10 CCD Kamera (Jena)

Kühlschrank; Liebherr-International Deutschland GmbH (Biberach an der Riss)

Magnetrührer IKA-RET basic C; IKA Werke (Staufen)

Magnetrührer IKA-REO basic C; IKA Werke (Staufen)

Megafuge 1,0; Heraeus (Hanau)

Mikroskop Axiovert 40 CFL; Zeiss (Jena)

Mikrozentrifuge; Carl Roth (Karlsruhe)

Minigel-Twin; Biometra (Göttingen)

Multikanalpipette; Brand (Wertheim)

Optima TLX Ultrazentrifuge; Beckman Coulter (Fullerton, Kalifornien, USA)

pH-Meter ino Lab pH 720; WTW (Weilheim)

Pipetten pipetman (0,5 µl bis 1000 µl); Gilson (Limburg)

Plattformschüttler; Heidolph (Schwalbach)

Sicherheitswerkbank HERAsafe; Heraeus (Hanau)

Sonifier® B-12; BRANSON Ultrasonics Corporation (Danbury, Connecticut, USA)

Sorvall Ultrazentrifuge OTD50B; Thermo Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

Spektrometer DU 640; Beckmann Coulter (Fullerton, Kalifornien, USA)

Thermo-Boy Wasserbad; MGW Lauda (Lauda-Königshofen)

Thermocycler TGradient 96; Biometra (Göttingen)

Thermomixer Comfort; Eppendorf (Hamburg)

Tiefkühlschrank HERAfreeze HFU-Top; Heraeus (Hanau)

Überkopfschüttler Bio Rotator RS-Multi; BioSan (Riga, Lettland)

Überkopfschüttler REAX 2; Heidolph (Schwabach)

Waage Kern; Kern & Sohn GmbH (Balingen)

Wasserbad; Bender & Hobein (Bruchsal)

Wet-Blot Kammer; HSI (San Francisco, Kalifornien, USA)

Wippe Duomax 1030; Heidolph (Schwabach)

Zählkammer Neubauer; LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)

Zentrifuge 5415 D und 5417 R; Eppendorf (Hamburg)

2.1.5 Gewebekulturzellen

CHO-K1-Zellen: Ovarienzellen (Fibroblasten) des chinesischen Hamsters, *Cricetulus griseus*, die eine eukaryotische, adhärente Zelllinie bilden; ATCC Nr. CCL-61.

Nährmedium (CHO-Medium):

DMEM (+ 10 % FCS)	250,0 ml
HAM's F-12	250,0 ml
Penicillin / Streptomycin	5,0 ml
1 mM Na-Pyruvat	2,5 ml

Die CHO-K1-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert.

HeLa-Zellen: Humane, epitheliale Zervixadenokarzinom-Zellen (HeLa sp.) (*Henrietta Lacks*), die eine eukaryotische, adhärente Zelllinie bilden; ATCC Nr. CCL-2.

Nährmedium: MEM (+ 10 % FCS)

Natriumhydrogencarbonat	1,5 g/l
Na-Pyruvat	1 mM
L-Glutamin	2 mM
nicht-essentielle Aminosäuren	0,1 mM
Penicillin / Streptomycin	10 mg/ml

Die HeLa-Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert.

2.1.6 Bakterien

- kompetente *Escherichia coli* BL21
- kompetente *Escherichia coli* DH5α

Die kompetenten *Escherichia coli* Stämme erhielt unsere Arbeitsgruppe aus der Abteilung der Pharmakologie des Universitätsklinikums Ulm.

2.1.7 Antibiotika

Ampicillin

Penicillin

Streptomycin

2.1.8 Molekulargewichtsmarker

DNA-Molekulargewichtsmarker:

- SmartLadder – 200 to 10.000 bp; Eurogentec (Seraing, Belgien)

Protein-Molekulargewichtsmarker:

- Prestained Protein Ladder; Fermentas (St. Leon-Rot)
- LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis; GE Healthcare (Solingen)

2.1.9 Antikörper für Westernblot-Analysen

Die eingesetzten Antikörper wurden in den angegebenen Verhältnissen in PBS-T verdünnt.

- Streptavidin-Peroxidase (Strep-POD) (Verdünnung 1:2.500); Roche (Mannheim)

Primäre Antikörper:

- Maus anti-S1 Untereinheit von *Bordetella pertussis* Pertussistoxin Antikörper (monoklonal, IgG_1) (Verdünnungen: 1:2.500; 1:1.000 und 1:500); Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
- Maus anti-His-tag Antikörper „Penta His Antibody“ (monoklonal, IgG_1) (Verdünnung: 1:1.000); QIAGEN (Venlo, Niederlande)
- Maus anti-Hsp90α/β (F-8) Antikörper (monoklonal, IgG_{2a}) (Verdünnungen: 1:500, 1:250); Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
- Kaninchen anti-$G_i\alpha_3$ Antikörper (Verdünnung 1:1.000); Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard Karls Universität Tübingen im Rahmen einer Kooperation
- Kaninchen anti-EEA_1 Antikörper (Verdünnung 1:1.000); Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)

Sekundäre Antikörper:

- Ziege anti-Kaninchen IgG HRP (Verdünnung 1:2.500); Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)
- Ziege anti-Maus IgG HRP (Verdünnung 1:2.500); Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)

2.1.10 Toxine

Tabelle 1: Verwendete Toxine.

Toxin	Ursprung	Herkunft / Hersteller
Pertussistoxin (PTX)	*Bordetella pertussis*	Sigma-Aldrich (München)
C180-Protein	*Bordetella pertussis*	Das rekombinante Toxin wurde als His-tag-Protein in *Escherichia coli* Expressionsstämmen exprimiert und aufgereinigt. Das Plasmid ptacC180 wurde unserer Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Joseph T. Barbieri vom Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA zur Verfügung gestellt.

2.1.11 Inhibitoren der Toxinfreisetzung

- (+)-Brefeldin A: in DMSO gelöst, lichtgeschützte Lagerung bei -20 °C; Calbiochem® Merck (Darmstadt)
- Cyclosporin A: in Ethanol gelöst, lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C; Fluka (München)
- FK506 monohydrate: in Ethanol gelöst, lichtgeschützte Lagerung bei -20 °C; Sigma-Aldrich (München)
- FK506 monohydrate: in DMSO gelöst, lichtgeschützte Lagerung bei -20 °C; Sigma-Aldrich (München)
- Radicicol: in Ethanol gelöst, lichtgeschützte Lagerung bei -20 °C; Sigma-Aldrich (München)

Der folgende Inhibitor wurde in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Cordelia Schiene-Fischer von der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung in Halle an der Saale hergestellt und unserer Arbeitsgruppe im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt.

- VK112: in DMSO gelöst, lichtgeschützte Lagerung bei -20 °C

Für die Versuche wurden die Inhibitoren entweder in CHO-Medium oder in PBS verdünnt und – sofern nicht anders angegeben – in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt.

2.1.12 Softwares

Für die Auswertung und grafische Darstellung der gewonnenen Daten im Rahmen dieser Arbeit und die Niederschrift des vorliegenden Dokuments wurden folgende Softwares verwendet:

Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems Inc.); Citavi (Versionen 3 bis 6) (Wädenswil, Schweiz); GraphPad Prism4 & 5 (GraphPad Software, Inc.); ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) 1,46r (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) mit Cell Counter; Microsoft Excel 1997-2003 & 2007; Microsoft PowerPoint 1997-2003 & 2007; Microsoft Word 1997-2003, 2007, 2010 & 2016.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von CHO-K1-Zellen

Die eukaryotischen CHO-K1-Zellen sind Ovarienzellen des chinesischen Hamsters, *Cricetulus griseus*, und wachsen in Kultur adhärent. Sie wurden in Zellkulturflaschen mit CHO-Medium bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Das CHO-Medium ist serumhaltig und beinhaltet DMEM und HAM's F-12 zu gleichen Teilen, 10 % FCS und 1 mM Natrium-Pyruvat und wurde mit den Antibiotika Penicillin und Streptomycin (1:100) versetzt. Für die Arbeit mit den Zellen wurde es im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt. Die Zellen wurden alle zwei bis vier Tage passagiert und entsprechend der Kultivierungszeit in Zellkulturflaschen mit 75 oder 150 cm^2 ausgesät. Um die Zellen zu passagieren wurde zuerst das Medium abgesaugt und einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen. Für das enzymatische Detachment wurden 2 ml der Protease Trypsin auf die Zellen gegeben und bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Nach mikroskopischer Kontrolle der Zellablösung wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe von 8 ml CHO-Medium gestoppt und die Flüssigkeit in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Dies wurde für fünf Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert, sodass das Trypsin-Medium-Gemisch oberhalb des Pellets sauber abgesaugt werden konnte, um alle Trypsinreste zu entfernen. Die Zellen wurden in 10 ml frischem CHO-Medium resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden 10 µl in eine Neubauer Zählkammer gegeben und die Zellzahl durch mikroskopische Auszählung bestimmt (siehe Abbildung 11). Hierbei wurden jeweils vier Quadrate à 16 Kleinquadrate ausgezählt und daraus der Mittelwert gebildet. Somit konnte das jeweilige benötigte Volumen für die gewünschte Zellzahl bestimmt werden (siehe Abbildung 11) und die Zellen je nach Experiment in 6-, 12-, 24- oder 96-Well-Zellkulturplatten ausgesät und für ein oder zwei Tage kultiviert werden. Für die Erhaltungskultur wurden die Zellen im

Verhältnis 1:3 für zwei Tage und 1:4 oder 1:5 für drei Tage gesplittet, das entsprechende Volumen der Suspension in eine neue Zellkulturflasche überführt und mit CHO-Medium auf 10 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden 15 bis 20 Mal passagiert, um unphysiologische Reaktionen der Primärkultur-Zellen gering zu halten.

A

$$Zellzahl\ pro\ ml\ = \frac{gezählte\ Zellen}{4} \times 10^4$$

B

$$Volumen\ x = \frac{(gewünschte\ Zellzahl\ \times 1.000)}{Zellzahl\ pro\ ml}$$

Abbildung 11: Bestimmung von Zellzahl und Volumen mit der Neubauer Zählkammer. A: Zellzahlbestimmung. **B:** Volumenbestimmung.

2.2.2 Herstellung von CHO-K1-Zelllysat

Zur Herstellung von CHO-K1-Zelllysat wurden CHO-K1-Zellen in Zellkulturschalen (d = 10 cm) ausgesät und mit CHO-Medium bis zu konfluentem Wachstum kultiviert. Vor der Herstellung des Lysates wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in ADP-Ribosylierungspuffer mit einem Zellschaber abgekratzt und mit einer Spritzenkanüle durch zehnmaliges Aufziehen lysiert. Für die Gewinnung des Lysates wurden die Zellen für zehn Minuten bei 14.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert; für die Gewinnung von post-nuklearem Überstand (PNS) wurden die Zellen für fünf Minuten bei 3.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Die Proteinkonzentration der Überstände wurde jeweils durch eine Proteinbestimmung nach Bradford ermittelt.

2.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der quantitativen Proteinbestimmung nach Bradford (auch Bradford-Test) macht man sich die Eigenschaft des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 zu Nutze, der sich besonders an basische und unpolare Seitenketten von Proteinen anlagert und so Komplexe mit den Proteinen bildet. Der Proteinnachweis erfolgt kolorimetrisch durch eine Zunahme des Absorptionsmaximums von 465 nm bei ungebundenem Coomassie Brilliant Blue G250 auf 595 nm beim Farbstoff-Protein-Gemisch. Die Absorptionszunahme korreliert mit der Proteinkonzentration, wodurch diese photometrisch bestimmt werden kann. Um mit Hilfe der gemessenen optischen Dichte bei 595 nm eine Proteinkonzentration zu erhalten, muss eine Eichgerade mit einem Standardprotein, zum Beispiel BSA, vorhanden sein. Die Eichgerade wird durch die Auftragung der Messung von definierten Konzentrationen gegen die eingesetzten Proteinkonzentrationen in einem Diagramm erstellt. Mit der

Geradengleichung der Ausgleichsgeraden können dann aus den gemessenen optischen Dichten der unbekannten Proteinlösung die gesuchten Proteinkonzentrationen berechnet werden. Diese müssen dafür im linearen Bereich der Eichgerade liegen.
Die Bestimmungsgrenze beim Bradford-Test liegt bei 0,05 – 0,5 µg Protein / ml Lösung und die Bestimmung kann durch Substanzen wie SDS und Triton-X-100 gestört werden.

Um die Proteinkonzentrationen der vorliegenden Arbeit zu bestimmen, wurde mit der in Abbildung 12 dargestellten Eichgeraden gearbeitet. Ihre Geradengleichung ist y = 0,0186x und war für die verwendete Bradford-Reagens mit BSA-Standards bestimmt, was Tabelle 2 wiedergibt.

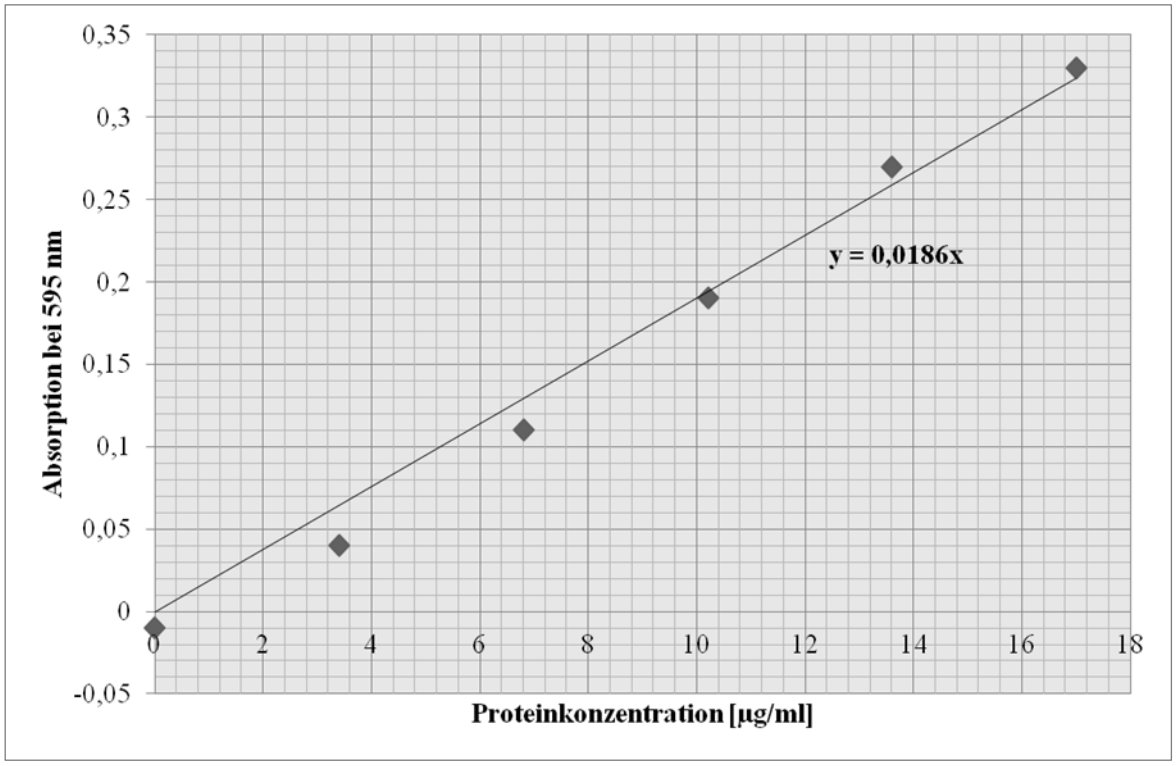


Abbildung 12: Verwendete Eichgerade für die Proteinbestimmung nach Bradford. Auf der x-Achse sind die BSA-Standard-Proteinkonzentrationen in µg/ml aufgetragen; auf der y-Achse ist die Absorption bei 595 nm verzeichnet. Die gemessenen Absorptionswerte der BSA-Standard-Proben wurden in das Diagramm eingetragen und es wurde eine Ausgleichsgerade = Eichgerade eingefügt. Diese hat die Steigung y = 0,0186x, welche für die Bestimmung der Proteinkonzentration unbekannter Proben eingesetzt werden kann.

Tabelle 2: Verwendetes Pipettierschema für die Proteinbestimmung nach Bradford. Die verwendete BSA-Proteinstammlösung ist 0,34 mg/ml beziehungsweise 340 µg/ml konzentriert. In Zeile 1 sind die eingesetzten µl der Stammlösung (BSA), in Zeile 5 sind die dazu entsprechenden Proteinkonzentrationen in µg/ml angegeben. Diese werden für die Bestimmung der Eichgerade auf die x-Achse abgetragen. Für die Messung wird jede Probe mit 200 µl Bradford-Reagens versetzt und auf 1 ml mit *Aqua bidest.* aufgefüllt.

Stammlösung (BSA) [µl]	0	10	20	30	40	50
H_2O [µl]	800	790	780	770	760	750
Bradford-Reagens [µl]	200	200	200	200	200	200
Proteinkonzentration [µg/ml]	0	3,4	6,8	10,2	13,6	17

Um die Proteinkonzentration der Zelllysate zu bestimmen, wurden in einer Küvette jeweils 10 µl der Probe mit 200 µl Bradford-Reagens und 790 µl *Aqua bidest.* gemischt und für zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben wurden gegen einen Leerwert gemessen, bei dem die 10 µl der Probe durch 10 µl *Aqua bidest.* ersetzt wurden. Für eine möglichst genaue Proteinkonzentration, wurden Mehrfachbestimmungen mit mehreren Ansätzen aller Proben gemacht (mindestens Zweifachbestimmungen). Mit Hilfe der Eichgeraden wurden anschließend die Proteinkonzentrationen berechnet. Der Faktor der eingesetzten Verdünnung (= 100 bei 10 µl Probe auf 1 ml Gesamtvolumen) wurde durch Multiplikation des Ergebnisses aus der Geradengleichung berücksichtigt.

2.2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode zur Trennung von Molekülen aus einem Proteingemisch, bei der die Trennung nach Größe oder Ladung erfolgen kann. Dazu müssen die Moleküle durch ein Gel wandern, das in einer ionischen Pufferlösung liegt und an welches eine elektrische Spannung angelegt wird. Je nach Größe, Ladung und Konformation der Moleküle wandern diese unterschiedlich schnell und unterschiedlich weit im Gel. Mit einem Vergleichsmolekül, dessen Größe oder Ladung bekannt ist, oder mit einem normierten Standard können die Moleküle dann verglichen werden.

In den beschriebenen Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt (Laemmli 1970) um Proteine nach ihrer Größe zu trennen. Dazu werden Polyacrylamid-Gele eingesetzt, deren Vernetzungsgrade Proteine abhängig von ihrem Molekulargewicht unterschiedlich stark zurückhalten. Sie werden vor allem zur Trennung kleiner Proteine genutzt. Durch das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteine denaturiert und bekommen durch Komplexbildung eine negative Gesamtladung (Anionen), wodurch sie nach dem Anlegen einer elektrischen Spannung das Gel Richtung Anode

(positiv geladene Elektrode) durchwandern. Der Anteil an Polyacrylamid wird an die Größe des aufzutrennenden Proteins angepasst. Hier wurden jeweils 12,5 %-ige Polyacrylamid-Gele verwendet – je nach Trennstrecke kleine, „peqLab“ oder große Gele (siehe auch Tabelle 3). Für eine sauberere Auftrennung wurden diskontinuierliche SDS-PAGE gemacht, mit einer Zweiteilung des Gels in Sammel- und Trenngel, um die Proben nach dem Auftragen zuerst im Sammelgel zu fokussieren und anschließend im Trenngel nach Größe zu trennen; eine schematische Darstellung des Prozesses zeigt Abbildung 13. Für eine gute Vergleichbarkeit beim Nachweis der Proteine wurde bei den Proben darauf geachtet, dass gleiche Mengen an Gesamtprotein eingesetzt wurden, was anschließend durch Protein-Färbungen geprüft wurde.

Die jeweiligen Proben wurden vor dem Auftragen ins Gel mit einer entsprechenden Menge 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT, das der Reduktion von Disulfidbrücken dient, versetzt und für zehn Minuten bei 95 °C gekocht – beim Nachribosylierungs- und beim Enzymaktivitätstest für fünf Minuten bei 100 °C. Die Auftrennung der Proben zusammen mit einem Größenstandard (Prestained Protein Ladder; Fermentas (St. Leon-Rot)) erfolgte anschließend in einem 1 x SDS-Laufpuffer bei kleinen und „peqLab“ für eine und bei großen Gelen für zwei Stunden bei 300 V, 100 W und je nach Gel mit den entsprechenden mA. Die verwendeten Gele sind in Tabelle 3 genauer charakterisiert.

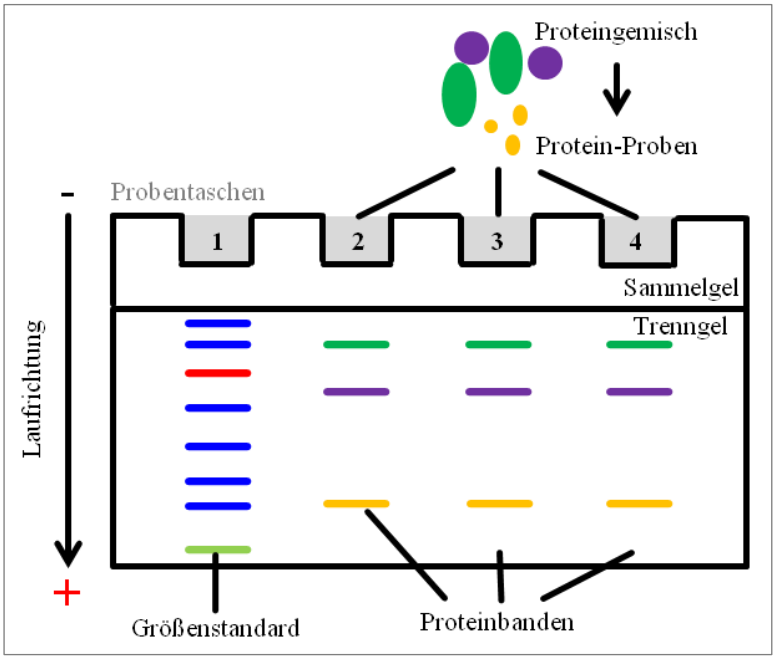


Abbildung 13: Schema der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Der Größenstandard und die Protein-Proben aus Proteingemischen werden jeweils in separate Probentaschen geladen, die sich im Sammelgel befinden und in dem sie nach Anlegen der Spannung fokussiert werden. Im Trenngel laufen die mit SDS versetzten, negativ-geladenen Proteine dann zur Anode (positiv geladene Elektrode) und werden anhand ihrer Größe aufgetrennt. Die Größe der Fragmente kann mit Hilfe des aufgetragenen Größenstandards bestimmt werden.

Tabelle 3: Übersicht über Natriumdodecylsulfat-Gele. Die Tabelle zeigt die Größe und Dicke der drei verschiedenen verwendeten SDS-Gele inklusive der entsprechenden angelegten Spannung für die Gelelektrophorese und dem jeweiligem Pipettierschema für das Trenn- und Sammelgel.

	kleines Gel		**„peqLab“ Gel**		**großes Gel**	
Größe [cm]	8,5 x 6		17,5 x 8		18 x 13	
Dicke [mm]	1,5		0,8		1,5	
Spannung [mA]	25		37		45	
	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 6 %	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 6 %	Trenngel 12,5 %	Sammelgel 6%
H_2O [ml]	3,975	1,3	4	4	10,45	6,675
Trenngelpuffer [ml]	3,075	-	3,1	-	8,25	-
Sammelgelpuffer [ml]	-	0,625	-	1,9	-	3,125
10 % SDS [µl]	136,5	25	136,5	75	363	125
Acrylamid/BIS 30 % [ml], Verhältnis (37,5/1)	5,175	0,5	5,2	1,5	13,75	2,5
10 % APS [µl]	123,75	25	124	75	330	125
TEMED [µl]	10	3,25	12,5	8,5	22	12,5
Isopropanol / Propan-2-ol	Einige Tropfen werden nach dem Gießen des Trenngels darauf gegeben, um Luftblasen und eine ungerade Kante zu vermeiden. Die Substanz wird vor dem Gießen des Sammelgels mittels Blotting-Papier abgenommen.					

2.2.5 Coomassie-Färbung von Proteinen

Der Farbstoff Coomassie färbt Proteine unspezifisch an, indem er sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren der aufgetrennten Proteine anlagert. Damit können nach einer SDS-PAGE die aufgetrennten Proteine visualisiert und gegebenenfalls quantifiziert werden.

Nach der SDS-PAGE wurden die jeweiligen Gele der Versuche dieser Arbeit in einer Coomassie Färbelösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Anschließend wurden die Gele in der Entfärbelösung entfärbt, sodass der Hintergrund annähernd farblos war und nur noch die Proteinbanden angefärbt waren.

2.2.6 Westernblots

Das Blotten ist eine Methode, mit der man Moleküle auf eine Membran übertragen kann – beim Westernblot sind diese Moleküle Proteine. Im Anschluss können die Proteine auf der Membran mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

In den beschriebenen Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden die Proteine nach ihrer Größe durch SDS-PAGE aufgetrennt und dann mit Hilfe einer *Semi-Dry*-Blot Apparatur oder einer *Wet*-Blot Apparatur durch elektrischen Transfer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die angelegte Spannung bewirkt dabei die Wanderung der Proteine im elektrischen Feld Richtung Anode (Pluspol). Der *Semi-Dry*-Blot wurde hierbei für kleinere Proteine gewählt, der *Wet*-Blot für größere. Nach dem Blotten wurden die Proteine durch Antikörper – zum Beispiel Strep-POD bei Biotin-markierten Proteinen – sichtbar gemacht und konnten so im Anschluss mittels ECL auf Röntgenfilmen detektiert werden.

2.2.6.1 *Semi-Dry*-Blot

Beim *Semi-Dry*-Blot wurden das Blotting-Papier und die Membran in Towbin-Puffer angefeuchtet, anschließend in der *Semi-Dry*-Blot Apparatur mit dem Gel geschichtet und einmal mit einer Walze überstrichen, um für die Übertragung hinderliche Luftblasen zu entfernen. Abbildung 14 stellt eine schematische Darstellung des *Semi-Dry*-Blots dar.

Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur bei 300 V, 100 W und 1 mA/cm^2.

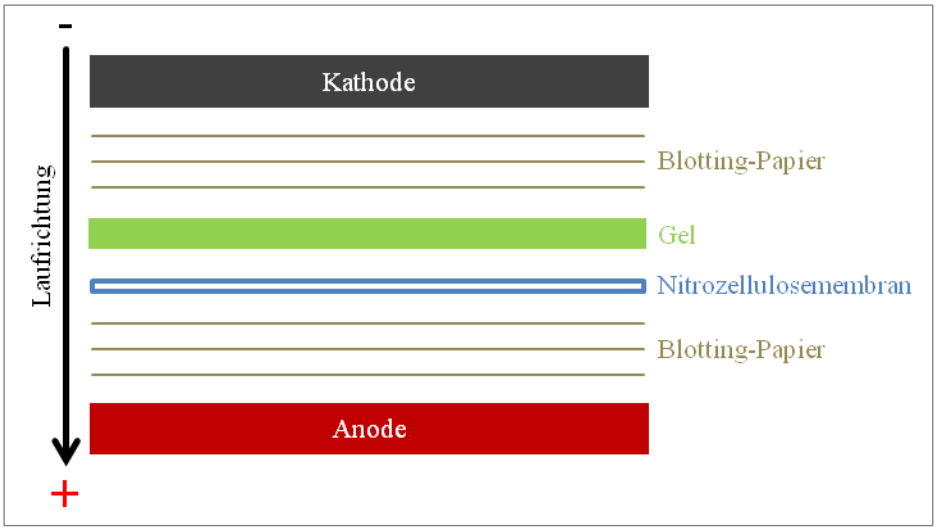


Abbildung 14: Aufbau und Schichtung des *Semi-Dry*-Blots. Richtung Anode wird die Nitrozellulosemembran auf Blotting-Papier geschichtet. Auf die Membran wird das Gel gelegt und Richtung Kathode mit Blotting-Papier überschichtet. Die Membran und das Blotting-Papier werden in Towbin-Puffer angefeuchtet. Die negativ geladenen Proteine wandern durch die angelegte elektrische Spannung aus dem Gel Richtung Anode (horizontaler Transfer) und werden auf der Nitrozellulosemembran immobilisiert.

2.2.6.2 *Wet*-Blot

Beim *Wet*-Blot (auch *Tank*-Blot genannt) wurden das Blotting-Papier und die Membran mit dem Gel in der Blot-Kassette geschichtet und anschließend in die mit Puffer gefüllte Blot-Kammer verbracht. Abbildung 15 zeigt das *Wet*-Blot-Verfahren schematisch.

Der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte über Nacht (zehn bis zwölf Stunden) bei 4 °C bei 300 V, 100 W und 0,5 – 1,5 mA/cm^2.

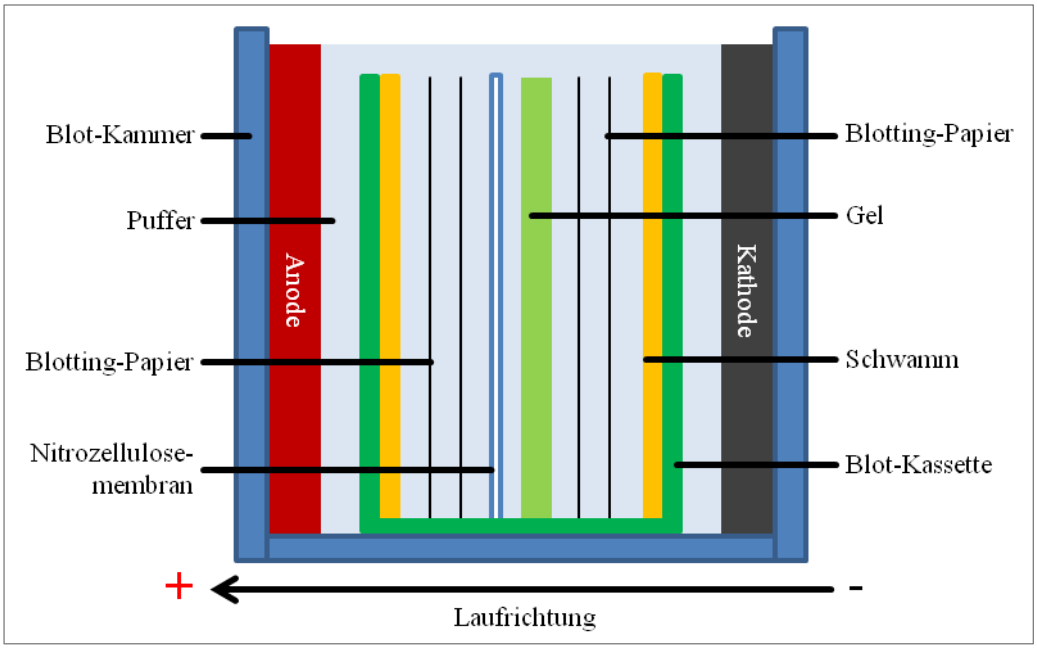


Abbildung 15: Aufbau und Schichtung des *Wet*-Blots / *Tank*-Blots. In die mit einem Schwamm ausgestattete Blot-Kassette wird Richtung Anode die Nitrozellulosemembran auf Blotting-Papier geschichtet. Auf die Membran wird das Gel gelegt und Richtung Kathode mit Blotting-Papier überschichtet. Die Blot-Kassette wird dann in die mit Puffer gefüllte Blot-Kammer verbracht. Die negativ geladenen Proteine wandern durch die angelegte elektrische Spannung aus dem Gel Richtung Anode (vertikaler Transfer) und werden auf der Nitrozellulosemembran immobilisiert.

2.2.7 Ponceau-S-Färbung von Proteinen

Der Farbstoff Ponceau-S färbt Proteine unspezifisch und reversibel an, indem er sich an die positiv-geladenen Aminogruppen der Aminosäuren der in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine anlagert und dadurch deren Visualisierung ermöglicht. Somit kann geprüft werden, ob die Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen wurden.

Nach dem Westernblot wurden die jeweiligen Membranen mit einer Ponceau-S-Lösung für zehn Minuten bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert und anschließend mit H_2O der überschüssige Farbstoff abgewaschen, um sicher zu stellen, dass der Proteintransfer stattfand. Danach wurde die Membran mit H_2O vollständig entfärbt.

2.2.8 Spezifische Proteinnachweise

Um einzelne Proteine auf Membranen von Westernblots nachzuweisen, können spezifische Antikörper gegen diese Proteine eingesetzt werden. Diese Antikörper können entweder direkt, zum Beispiel durch eine Chemolumineszenz-Reaktion, oder indirekt, über einen sekundären Antikörper mit Chemolumineszenz, einen Röntgenfilm belichten und so die Proteine sichtbar machen. Bei der Verwendung von Sekundärantikörpern können auch kleinere Mengen Protein detektiert werden beziehungsweise kann bei gleicher Proteinmenge ein stärkeres Signal erreicht werden, da mehrere Sekundärantikörper an einen Primärantikörper binden können. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 16.

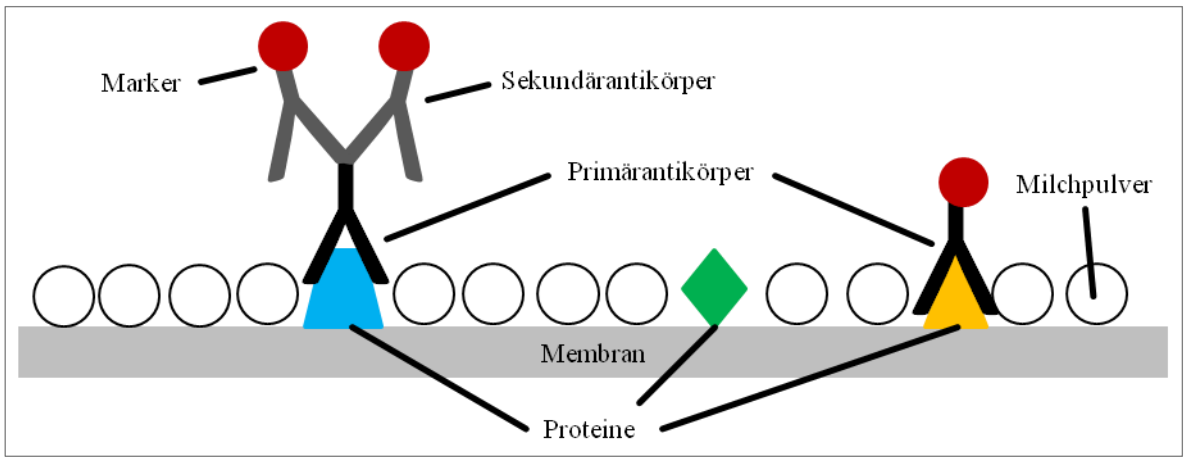


Abbildung 16: Proteinnachweis durch spezifische Antikörper. Gegen die zu detektierenden Proteine auf der Westernblot-Membran werden spezifische Antikörper eingesetzt. Dabei kann es sich entweder um Primärantikörper mit Marker für die Detektion handeln (rechts) oder um Primärantikörper ohne Marker, die dann durch einen Sekundärantikörper mit Marker für die Detektion markiert werden (links). Mehrere Sekundärantikörper können an einen Primärantikörper binden, somit stehen mehr Marker für die Detektion zur Verfügung und schwächere Signale können dadurch verstärkt und detektierbar werden.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden die Nitrozellulosemembranen nach dem Westernblot für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Wippe mit 5 % Milchpulver in PBS-T blockiert, um freie Bindungsstellen auf der Blot-Membran abzusättigen und eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Danach wurden die Membranen kurz in H_2O geschwenkt und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert.

2.2.8.1 Spezifische Proteinnachweise durch Streptavidin-Peroxidase-Detektion

Streptavidin ist ein von der Bakterienspezies *Streptomyces avidinii* produziertes Protein, das jeweils ein Molekül Biotin binden kann. Diese Interaktion ist sehr spezifisch und stark, weshalb es zur Detektion von mit Biotin-markierten Proteinen eingesetzt wird. Dazu kann es beispielsweise mit der Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt werden, die ihrerseits

eine Chemolumineszenz-Reaktion katalysiert und somit die Detektion der Biotin-markierten Proteine auf Röntgenfilmen ermöglicht.
In einigen Versuchen dieser Arbeit wurde Biotin-markiertes NAD^+ als Substrat für die Enzymreaktionen des Toxins eingesetzt und darüber die zu detektierenden Proteine mit Biotin markiert. Nach dem Westernblot wurde die jeweilige Membran auf der Wippe bei Raumtemperatur für eine Stunde mit einer Streptavidin-Peroxidase-Lösung (Strep-POD) inkubiert (Verdünnung 1:2.500 in PBS-T) und anschließend dreimal für fünf Minuten in PBS-T auf dem Plattformschüttler gewaschen. Durch die Behandlung der Membran mit ECL konnten dann die entstehenden Signale auf einem Röntgenfilm detektiert und somit die Biotin-markierten Proteine spezifisch sichtbar gemacht werden.

2.2.8.2 Spezifische Proteinnachweise durch Westernblot-Analysen

Bei einigen Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden Proteine durch Westernblot-Analysen nachgewiesen respektive der Aufenthalt in bestimmten Zellkompartimenten untersucht. Dazu wurden gegen die zu untersuchendenden Proteine spezifische Primärantikörper eingesetzt, die wiederum durch einen spezifischen Sekundärantikörper markiert wurden, der eine Chemolumineszenz-Reaktion (HRP) katalysierte und dadurch den Proteinnachweis erlaubte. Nach dem Westernblot wurden dafür die entsprechenden Membranen bei Raumtemperatur auf der Wippe für eine Stunde mit dem in PBS-T verdünnten Primärantikörper inkubiert und anschließend dreimal für fünf Minuten auf dem Plattformschüttler in PBS-T gewaschen, um ungebundene Primärantikörper zu entfernen. Die Membranen wurden dann bei den gleichen Bedingungen mit dem entsprechenden in PBS-T verdünnten Sekundärantikörper inkubiert und danach nochmals gleichartig gewaschen. Im Anschluss wurden sie mit ECL behandelt und die entstehenden Signale auf einem Röntgenfilm detektiert, was die spezifische Sichtbarmachung der markierten Proteine ermöglichte.

2.2.9 Strippen von Membranen

Die Methode des Membranstrippings wird angewendet, um eine bereits mit Antikörpern inkubierte (und detektierte) Membran von den Antikörpern zu befreien, um eine erneute Inkubation und anschließende Detektion, entweder mit den gleichen oder anderen Antikörpern, zu ermöglichen. Somit können auch verschiedene Proteine auf einer Membran sichtbar gemacht werden, zum Beispiel als interne Kontrollen zum Protein-mengenvergleich oder als Nachweis von Proteinen aus bestimmten Zellkompartimenten.

Es stehen verschiedene Methoden zur Antikörperentfernung von der Membran zur Verfügung. Die Membranen der vorliegenden Arbeit wurden mit einer Säure-Base-Methode gestrippt. Dazu wurden die Membranen zu Beginn kurz in H_2O gewaschen und für fünf Minuten mit dem Stripping-Puffer A (sauer) inkubiert. Es folgten zehn kurze Waschschritte in H_2O und die Inkubation mit Stripping-Puffer B (basisch) für zehn Minuten. Daran schlossen sich erneut zehn kurze Waschschritte in H_2O an. Zum Schluss wurde die Membran wieder in 5 % Milchpulver blockiert – wie direkt nach dem Westernblot – und wurde so der neuen Inkubation mit Antikörpern zugänglich gemacht.

2.2.10 Aufreinigung und Charakterisierung des C180-Proteins, der S1-Untereinheit des Pertussistoxins

Für die *in vitro* Versuche zum Nachribosylierungstest („Material und Methoden“ (2.2.13)) und zum Enzymaktivitätstest („Material und Methoden“ (2.2.15)) der vorliegenden Arbeit, wurde die enzymatisch aktive Untereinheit von Pertussistoxin, S1, isoliert vom B-Oligomer benötigt, da die Aktivierung des Holotoxins nicht gelang – was bei *in vitro* Experimenten oftmals ein problematischer Schritt sein kann. Daher sollte hier direkt nur die Enzymuntereinheit eingesetzt werden. Für deren Gewinnung wurde unserer Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Joseph T. Barbieri vom Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA sein selbst hergestelltes Plasmid ptacC180 zur Verfügung gestellt, das die Gensequenz der S1-Untereinheit von Pertussistoxin enthält und für das C180-Protein mit His-tag kodiert. Das C180-Protein besteht aus den ersten 180 N-terminalen Aminosäureresten, die für die enzymatische Aktivität des Holotoxins verantwortlich sind (Barbieri *et al.* 1989). Das rekombinante Toxin wurde für diese Arbeit nach der Vorgehensweise von Barbieri *et al.* 1989 und nach dem Arbeitsgruppen-internen Versuchsprotokoll für die Aufreinigung von His-tag-Protein unter der Nutzung von *Escherichia coli* Expressionsstämmen hergestellt.

2.2.10.1 Plasmidextraktion

Das Plasmid wurde der Arbeitsgruppe auf Löschpapier zugesandt. Zu Beginn wurden Teile davon in drei Eppendorfgefäße überführt, die unterschiedliche Volumina an *Aqua bidest.* (autoklaviert) enthielten. Durch 20-minütige Inkubation wurde das Plasmid in Lösung gebracht und das Löschpapier durch 5-minütige Zentrifugation bei 5.000 rpm abgetrennt.

2.2.10.2 Plasmidtransformation in *Escherichia coli* DH5α zur Plasmidvervielfachung

Für die Plasmidvervielfachung wurden kompetente *Escherichia coli* DH5α zur Plasmidtransformation gewählt, da diese besonders effektiv freie DNA aufnehmen und für die Anwendung rekombinanter DNA-Methoden einige nützliche Mutationen in Enzymen aufweisen, sodass viele Plasmidkopien bei niedriger Mutationsrate erzeugt werden können. Es wurden drei Ansätze kompetenter DH5α auf Eis aufgetaut und mit jeweils 30 µl einer der Plasmidlösungen für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Für den Aufschluss der Bakterien wurden die Proben bei 42 °C im Wasserbad für 90 Sekunden geschwenkt, was die Zellmembranen löchrig macht, sodass die Plasmide in die Zellen gelangen können. Danach wurden die Proben auf Eis gelagert. Es wurde 1 ml des Bakterienmediums 1 x LB-Medium je Ansatz zugegeben, das Trypton, NaCl und Hefe zur Ernährung der Bakterien enthält. Die Proben wurden bei 37 °C bei 350 rpm im Heizblock für eine Stunde inkubiert.

Für das Ausplattieren wurden sechs mit Ampicillin versetzte Agarplatten angewärmt. Das Antibiotikum Ampicillin wurde gewählt, um die plasmidtragenden Bakterien zu selektionieren, da das Plasmid auch für eine Ampicillinresistenz kodiert. Auf drei Agarplatten wurden mit einem mit Ethanol und Bunsenbrenner sterilisierten Drigalskispatel jeweils 200 µl der Ansätze verteilt. Der Rest der Ansätze wurde für fünf Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 µl 1 x LB-Medium resuspendiert und ebenfalls ausplattiert.

Das Bakterienwachstum erfolgte über Nacht im Brutschrank. Am nächsten Tag wurden einzelne gewachsene Bakterienkolonien aus dem Agar mit Pipettenspitzen ausgestochen und in vier Röhrchen mit jeweils 3 ml 1 x LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt. Diese wurden bis zum Abend bei 37 °C im Inkubationsschüttler bei 250 rpm inkubiert, in vier mit 50 ml 1 x LB-Medium und Ampicillin vorgelegten Erlenmeyerkolben überführt und abermals über Nacht bei 37 °C unter Schütteln bei 250 rpm inkubiert.

Am Folgetag wurde der Inhalt der Erlenmeyerkolben in eisgekühlte Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4.000 g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert; der Überstand wurde verworfen, das Pellet entspricht der Bakterien-„Ernte“.

2.2.10.3 Plasmidisolierung und Plasmidreinigung

Für die Plasmidisolierung und -reinigung wurde das NucleoBond® PC 100 Kit von Macherey-Nagel (Düren) verwendet, das für eine „Midi“-Präparation ausgelegt ist. Der

Inhalt des Kits und die Zusammensetzung der darin enthaltenen Puffer sind in Tabelle 4 aufgeführt. Die Plasmidreinigung erfolgte nach der Anleitung für „high-copy“-Plasmide.

Tabelle 4: Inhalt des Kits NucleoBond® PC 100 Kit von Macherey-Nagel (Düren) und Zusammensetzung der darin enthaltenen Puffer.

Inhalt des NucleoBond® PC 100 Kits von Macherey-Nagel (Düren)	Zusammensetzung der aufgeführten Puffer
Resuspension Buffer S1 (Puffer S1)	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A pH 8,0
Lysis Buffer S2 (Puffer S2)	200 mM NaOH 1% SDS
Neutralization Buffer S3 (Puffer S3)	2,8 M KAc pH 5,1
Equilibration Buffer N2 (Puffer N2)	100 mM Tris 15 % Ethanol 900 mM KCl 0,15 % Triton X-100 Mit H_3PO_4 auf pH 6,3 eingestellt.
Wash Buffer N3 (Puffer N3)	100 mM Tris 15 % Ethanol 1,15 M KCl Mit H_3PO_4 auf pH 6,3 eingestellt.
Elution Buffer N5 (Puffer N5)	100 mM Tris 15 % Ethanol 1 M KCl Mit H_3PO_4 auf pH 8,5 eingestellt.
RNase A (lyophilized)	in 1 ml Resuspension Buffer S1 gelöst
NucleoBond® AX 100 Columns (Säulen)	
NucleoBond® Folded Filters (Filterpapiere)	
Plastic Washers (Ringhalterungen)	
User Manual	

Die Zelllyse erfolgt beim NucleoBond® Kit in alkalischem Milieu und SDS. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in 4 ml Puffer S1 + RNase A resuspendiert, womit das alkalische Milieu herstellt wird. Anschließend wurden 4 ml des SDS-haltigen Puffer S2 zugegeben, durch Kippen vermischt und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Puffer S1 und S2 denaturieren chromosomale und Plasmid-DNA. Bei 4 °C wurden 4 ml vorgekühlter Puffer S3 zugegeben, durch Kippen vermischt und für fünf Minuten inkubiert, wodurch Material ausflockt. Dabei handelt es sich um chromosomale DNA und weitere Zellkomponenten, die durch das in Puffer S3 enthaltene Kaliumacetat ausgefällt werden. Außerdem neutralisiert es das Lysat und die Plasmid-DNA kann in ihre *supercoil* Struktur zurückkehren und bleibt in Lösung. Auf einem Erlenmeyerkolben wurden anschließend die Säulen mittels Ringhalterung befestigt und mit 2,5 ml Puffer N2 äquilibriert, damit die Plasmid-DNA an das Anionen-Austauscher-Harz der Säule binden und so extrahiert werden kann. Mit Puffer N2 wurden auch die Filterpapiere angefeuchtet, auf die Säulen gegeben und das zugegebene Bakterienlysat darüber gefiltert. Die Säulen wurden mit jeweils 10 ml Puffer N3 gewaschen, um nur die Plasmid-DNA an der Säule gebunden vorliegend zu haben. Diese wurde im Abschluss mit 5 ml Puffer N5 eluiert und durch die Zugabe von 3,5 ml Isopropanol bei Raumtemperatur präzipitiert. Es wurden 2 ml 70 %-igen Ethanols zugegeben und bei 15.000 g für zehn Minuten zentrifugiert, um alle Inhaltsstoffe der Puffer zu entfernen. Das Ethanol wurde abgegossen und die Röhrchen für fünf bis zehn Minuten umgedreht zum Trocknen aufgestellt. Das Pellet wurde dann in 50 µl *HPLC bidest.*, steril destilliertem H_2O, gelöst, um die optische Dichte (OD) der Lösung zu bestimmen, die einen Anhalt für den DNA-Gehalt der Lösung gibt – dabei sollte der Quotient zwischen Leerwert und Probe zwischen 1,6 und 1,8 liegen. Die Proben wurden in einem Verhältnis von 1:50 in *Aqua bidest.* verdünnt und bei 260 nm gemessen, wobei 1 OD bei 260 nm 50 µg Plasmid-DNA/ml entspricht. Alle Proben enthielten zwischen 110 und 160 ng/µl DNA und die Quotienten lagen im angestrebten Normbereich. Die Proben wurden über Nacht eingefroren.

2.2.10.4 DNA-Gelelektrophorese zur Prüfung der Intaktheit des Plasmids

Um zu prüfen, ob die Plasmide intakt sind, wurde ein 1 %-iges DNA-Gel mit 1 g Agarose auf 100 ml 1 x TAE-Puffer gemacht und für eine Stunde bei 100 V eine Gelelektrophorese durchgeführt. Damit können Nukleinsäurefragmente der DNA nach Anlegen eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach aufgetrennt werden; kleinere Fragmente laufen dabei schneller durch das Gel als größere. Hierzu wurden 10 µl der Proben und ein DNA-Größenstandard (SmartLadder – 200 to 10.000 bp; Eurogentec (Seraing, Belgien)) aufgetragen, um anschließend die Anzahl der Basenpaare der DNA-Fragmente bestimmen zu können. Die hiermit ermittelte Plasmidgröße stimmte für das Plasmid ptacC180 mit den Angaben von Barbieri *et al.* 1989 überein.

2.2.10.5 Plasmidtransformation in *Escherichia coli* BL21 zur Proteinexpression

Für die Proteinexpression wurden zur Plasmidtransformation kompetente *Escherichia coli* BL21 gewählt. BL21 sind dazu besonders gut geeignet, da diesen Stämmen extra Kopien von einigen tRNA-Genen vorliegen, wodurch Proteine in größeren Mengen schneller synthetisiert werden können.

Es wurden 50 µl kompetente BL21 auf Eis aufgetaut und mit 3 µl des am Vortrag gewonnenen ptacC180 inkubiert. Zum Aufschluss wurden die Proben für 90 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad geschwenkt und wieder auf Eis gelagert. 10 ml 1 x LB-Medium wurden zugegeben und für eine Stunde bei 37 °C im Heizblock unter Schütteln bei 350 rpm inkubiert. $^{1}/_{10}$ (1 ml) beziehungsweise $^{9}/_{10}$ (9 ml) der Lösung wurden auf mit Ampicillin beimpften Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von diesen Platten wurde dann ein Klon in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 ml 1 x LB-Medium überführt und bei 37 °C unter Schütteln bei 250 rpm inkubiert. Über Nacht wurde der Ansatz im Kühlschrank gelagert.

2.2.10.6 Expression und Aufreinigung des C180-Proteins

Vorkultur und Glycerol-Stock

An Tag 1 wurde aus der gewachsenen Kultur eine Vorkultur angeimpft. Dazu wurden 5 ml der Kultur in einen Erlenmeyerkolben mit 50 ml 1 x LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben, um eine Ausbeute von einem Liter zu erhalten. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C im Schüttler bei 250 rpm inkubiert. Von dieser wurde ein Glycerol-Stock angelegt, um bei weiteren Aufreinigungen damit neue Vorkulturen animpfen zu können. Hierzu wurden in ein Kryoröhrchen 800 µl 1 x LB-Medium mit Ampicillin vorgelegt und mit 800 µl 50 x Glycerol (Glycerol 1:1 mit *Aqua bidest.* verdünnt) versetzt, damit die Zellen beim Einfrieren nicht platzen, und bei -80 °C eingefroren.

Hauptkultur

An Tag 2 wurde die Hauptkultur angeimpft. Dazu wurden 50 ml der Vorkultur auf 1 l 1 x LB-Medium mit 1 ml 100 µg/ml Ampicillin gegeben und im Erlenmeyerkolben bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nach zwei Stunden wurde zum ersten Mal photometrisch die optische Dichte bei 595 nm als Maß für das Bakterienwachstum bestimmt. Hierfür wurde eine Leerprobe mit 1 ml 1 x LB-Medium und 1 ml der Probe aus der Hauptkultur gemessen. Bei einer optischen Dichte von 0,7 bis 0,8 wurde mit 1 M IPTG (in *Aqua bidest.*) induziert und bei 30 °C über Nacht inkubiert. Die Induktion mit IPTG dient der

Aktivierung von Promotoren, sodass eine Überexpression der Proteine stattfindet, wodurch ein höherer Anteil des gewünschten Proteins aus dem Ansatz gewonnen werden kann.

Proteinernte

An Tag 3 erfolgte die Proteinernte durch mehrmalige Zentrifugation bei 5.000 rpm für zehn Minuten bei 4 °C in zwei Zentrifugenbechern. Die Pellets wurden in 5 ml 1 x PBS (5 mM Imidazol + 1 x Complete® Proteasehemmer) resuspendiert, ineinander überführt und in einem Corex-Röhrchen gesammelt. Im Anschluss erfolgte die Sonifizierung strikt auf Eis für dreimal 30 Sekunden mit jeweils 30 Sekunden Pause dazwischen, um die Zellen zu lysieren. Davon wurden für eine Westernblot-Analyse der Aufreinigung des C180-Proteins 100 µl in ein separates Eppendorfgefäß übernommen. Die sonifizierten Bakterien wurden bei 12.000 rpm für 30 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, um die Zellmembranen abzutrennen. In der Zwischenzeit wurde 1 ml Talon Beads (1 ml je Liter Kultur) in zwei Zentrifugenröhrchen vorbereitet. Der Überstand der Proteinzentrifugation wurde auf die Talon Beads gegeben und die Zentrifugenröhrchen wurden dreimal bei 700 g für zwei Minuten zentrifugiert. Dabei binden die gesuchten Proteine an die Beads und können so vom restlichen Überstand separiert werden. Dazwischen wurde jeweils der Überstand abgenommen und 4 ml 1 x PBS (5 mM Imidazol + 1 x Complete®) zugegeben, um die Beads zu waschen. Insgesamt wurde dreimal gewaschen und zentrifugiert. Die Zentrifugenröhrchen wurden anschließend zusätzlich mit Parafilm abgedeckt und über Nacht im Überkopfschüttler bei 4 °C aufbewahrt.

Elution

An Tag 4 erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für zwei Minuten bei 700 g, wovon der Überstand abgenommen und davon 100 µl für die Westernblot-Analyse separiert wurden. Die Beads wurden zweimal mit 2 ml 1 x PBS (5 mM Imidazol + 1 x Complete®) gewaschen und zentrifugiert. Nach dem ersten Waschen wurden 100 µl für die Westernblot-Analyse abgenommen. Danach wurde mit der Eluierung (Volumen 1:1 mit Beads (= 500 µl)) begonnen und alle Fraktionen in separaten Zentrifugenröhrchen gesammelt. Die Salzkonzentration der Fraktionen nimmt hierbei zu und die Proteinaufreinigung wird immer reiner.

- PBS 10 mM Imidazol + Complete® auf Beads, 15 Minuten im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur, Zentrifugation für zwei Minuten bei 700 bis 1.400 g, Überstand = 10 mM Imidazol Elution.

- PBS 50 mM Imidazol + Complete® auf Beads, 15 Minuten im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur, Zentrifugation für zwei Minuten bei 700 bis 1.400 g, Überstand = 50 mM Imidazol Elution.
- PBS 100 mM Imidazol + Complete® auf Beads, 15 Minuten im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur, Zentrifugation für zwei Minuten bei 700 bis 1.400 g, Überstand = 100 mM Imidazol Elution.
- PBS 150 mM Imidazol + Complete® auf Beads, 15 Minuten im Überkopfschüttler bei Raumtemperatur, Zentrifugation für zwei Minuten bei 700 bis 1.400 g, Überstand = 150 mM Imidazol Elution.

Regeneration der Beads

Die eingesetzten Beads wurden mit 2 ml MES-Puffer, einem synthetischen pH-Puffer, regeneriert, indem sie für zwei Minuten bei 700 bis 1.400 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen wurde. Die Beads wurden in 20 % reinem Ethanol (8 ml *Aqua bidest.* + 2 ml reines Ethanol) mit Natriumazid (1:200) im Kühlschrank gelagert, um das Wachstum von Pilzen zu verhindern und die Beads für eine weitere Aufreinigung verwenden zu können.

Umpufferung und Lagerung des gewonnenen C180-Proteins

An Tag 5 fand die Umpufferung mit Hilfe von Vivaspin Säulen, 0,5 concentrator (VivaScience, Sartorius AG (Göttingen)), statt. Die Säulen wurden in einem 2 ml Eppendorfgefäß gelagert, zweimal mit 500 µl 1 x PBS gewaschen und für 20 Minuten bei 10.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Nacheinander wurden die Aufreinigungsfraktionen (10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM Imidazol Elution) geladen (jeweils 500 µl) und für 20 Minuten bei 10.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Das aufzureinigende Protein bindet dabei an die Säule, die Überstände wurden jeweils verworfen. Danach wurden die Säulen zweimal mit 1 x PBS unter Zentrifugation gewaschen, um anhaftende Salze zu entfernen, und die Protein-Fraktion wurde in etwa 75 µl PBS durch Auf- und Abpipettieren von der Säule gelöst. Das Volumen des Proteins wurde durch Aufziehen in der Pipette bestimmt. Davon wurden 35 µl abgenommen, um ein Konzentrationsgel zu machen und die Proteinkonzentration zu bestimmen. Der Rest des Volumens des aufgereinigten C180-Proteins wurde 1:1 mit dem Kryoprotektivum Glycerin versetzt (das Holotoxin lagert ebenfalls in Glycerin) und bei -20 °C eingefroren. Zum Schluss wurde die Säule mit 500 µl 1 x PBS und 5 µl Natriumazid (1:100) inkubiert, kurz zentrifugiert und im Kühlschrank gelagert, um sie bei einer weiteren Aufreinigung wiederverwenden zu können.

2.2.10.7 Prüfung der Aufreinigung des C180-Proteins mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Um zu prüfen, ob das Verfahren zur Aufreinigung des C180-Proteins Erfolg hatte und die Fraktionen mit zunehmender Behandlung weniger Nebenprodukte und mehr C180-Protein enthielten, wurden Proben der während der Aufreinigung abgenommenen Fraktionen für eine SDS-PAGE verwendet und einer Coomassie-Färbung unterzogen. Da bei einer Coomassie-Färbung Proteine unspezifisch angefärbt werden, eignet sich diese Methode, um zu zeigen, welche Menge an Proteinen in den einzelnen Fraktionen vorhanden ist und welche molekulare Masse die einzelnen enthaltenen Proteine haben.

Dazu wurden von allen gesammelten Fraktionen während der Aufreinigung 5 µl mit 5 µl 1 x PBS versetzt und mit 2,5 µl 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT bei 95 °C für zehn Minuten gekocht. Die Proben wurden in ein Gel aufgetragen und eine SDS-PAGE gemacht. Das Gel wurde anschließend in einer Coomassie Färbelösung gefärbt und danach in einer Entfärbelösung solange entfärbt, bis nur noch die Proteinbanden gefärbt waren, nicht aber der Hintergrund.

2.2.10.8 Prüfung der spezifischen Erkennung des C180-Proteins durch Antikörper

Die Prüfung, ob das C180-Protein von Antikörpern erkannt wird, sollte als weitere Kontrolle für die Expression und Aufreinigung des gewünschten Produktes dienen, und als Kontrolle, ob die in den Versuchen bei Pertussistoxin verwendeten Antikörper auch für den Nachweis des C180-Proteins verwendet werden können.

Dazu wurden – wie unter „Material und Methoden“ (2.2.10.7) beschrieben – von allen gesammelten Fraktionen während der Aufreinigung 5 µl mit 5 µl 1 x PBS versetzt und mit 2,5 µl 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT bei 95 °C für zehn Minuten gekocht. Anschließend wurden die Proben in ein Gel aufgetragen und eine SDS-PAGE gemacht, ein Westernblot angeschlossen und geprüft, ob die Fraktionen von Antikörpern erkannt werden. Dazu wurden ein anti-S1-PTX (1:2.500) und ein anti-His-tag Antikörper (1:1.000) eingesetzt. Die Membranen wurden mit industriell hergestelltem ECL detektiert.

2.2.10.9 Proteinkonzentrationsbestimmung des C180-Proteins

Um die Proteinkonzentration des aufgereinigten C180-Proteins zu bestimmen, wurde ein Konzentrationsgel angefertigt, bei dem als Vergleichssubstanz ein BSA-Standard in verschiedenen Mengen aufgetragen wurde. Der BSA-Standard ist in einer Konzentration von 0,1 µg/µl = 100 ng/µl in *Aqua bidest.* angesetzt. Es wurden Proben mit 125, 250, 500,

750 und 1.000 ng hergestellt und mit 1 x PBS auf ein Gesamtvolumen von 20 µl je Ansatz aufgefüllt. Vom aufgereinigten C180-Protein wurden 0,5, 1, 2, 5, 10 und 15 µl eingesetzt und ebenfalls mit 1 x PBS auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Alle Proben wurden anschließend mit 5 µl 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT versetzt und für zehn Minuten bei 95 °C gekocht. Die Proben wurden mit einem Proteinmarker (LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis; GE Healthcare (Solingen)) in ein Gel aufgetragen und einer SDS-PAGE unterzogen. Das Gel wurde im Anschluss in der Coomassie Färbelösung gefärbt und solange in der Entfärbelösung entfärbt, bis der Hintergrund keinen Farbstoff mehr enthielt und nur noch die Proteinbanden angefärbt waren. In diesem Zustand wurde das Gel gescannt. Mit der Software Adobe Photoshop 7.0 wurde der Scan in Graustufen ausgegeben und invertiert, um die Intensitäten der gefärbten Proteinbanden und des Hintergrunds zu ermitteln. Die Intensitäten des BSA-Standards wurden bei 66 kDa und die des C180-Proteins bei circa 20 kDa des Proteinmarkers ermittelt. Die Werte wurden mit Microsoft Excel 1999-2003 & 2007 verarbeitet. Es wurden die Differenzen der Intensität der Banden des BSA-Standards und des C180-Proteins mit den jeweiligen Hintergrundwerten bestimmt. Um eine Kalibriergerade zu erhalten und über ihre Geradengleichung die Proteinkonzentration des C180-Proteins bestimmen zu können, wurden in einem Diagramm auf der x-Achse die BSA-Standards in ng abgetragen und auf der y-Achse die Intensität. Die Geradengleichung der Kalibriergerade wurde ermittelt. Um die Proteinkonzentration des C180-Proteins zu bestimmen, wurde die Differenz seiner Intensität und dem dazugehörigen Hintergrund durch den ermittelten Kalibriergeraden-Wert geteilt. Daraus ergab sich die Konzentration in ng/µl. Da die Signale bei 10 und 15 µl des C180-Proteins übersättigt waren, wurden sie bei der Ermittlung der Proteinkonzentration ausgeschlossen, um Verzerrungen des Mittelwerts zu vermeiden.

2.2.10.10 Prüfung der Enzymaktivität des C180-Proteins *in vitro*

Um zu prüfen, ob das C180-Protein auch enzymatisch aktiv ist und die gleiche Reaktion wie die S1-Untereinheit des Holotoxins katalysiert – nämlich die ADP-Ribosylierung von $G_i\alpha$ – wurde die Enzymaktivität *in vitro* mit CHO-K1-Lysat und CHO-K1-PNS und beiden Toxinen analysiert.

Dazu wurden auf Eis 40 µg des CHO-K1-Lysates beziehungsweise des CHO-K1-PNS mit 1 µl Biotin-NAD^+ (10 µM) und 1,25 µl C180-Protein (entspricht 170 ng) beziehungsweise 1,5 µl Pertussistoxin (entspricht 300 ng) in Eppendorfgefäße gegeben und mit ADP-Ribosylierungspuffer für das C180-Protein auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt.

Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Ansatz mit Lysat respektive PNS ohne Toxin angesetzt. Die Proben wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 6,25 µl 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT zugegeben und für fünf Minuten bei 100 °C gekocht. Die Proben wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch einen Westernblot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Membran wurde mit Strep-POD (1:2.500) inkubiert, um das eingesetzte Biotin spezifisch sichtbar machen zu können und damit einen Hinweis auf die Enzymaktivität zu bekommen. Die Detektion erfolgte mittels selbstgemachtem ECL.

2.2.11 Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin

Bei den Vergiftungsexperimenten wurden zunächst CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin vergiftet, mit dem Ziel der Etablierung der Versuchsbedingungen. Anschließend wurde unter diesen Bedingungen der Einfluss des Hsp90-Inhibitors Radicicol, des FK506-Binde-protein-Inhibitors FK506 und der Cyclophilin-Inhibitoren Cyclosporin A respektive VK112 auf die Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin analysiert. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Kontrollzellen eingesetzt, als Positivkontrolle der Inhibitor Brefeldin A. Sein inhibitorischer Effekt bei *long-trip* Toxinen durch den Abbau des Golgi-Apparates ist bereits bekannt und wirkt durch einen anderen Mechanismus als die zu untersuchenden Inhibitoren. Daher eignet er sich als „unabhängige“ Kontrolle für diese.

2.2.11.1 Vergiftungsexperimente ohne Inhibitoren

Bei den Vergiftungsexperimenten ohne Inhibitoren wurden verschiedene Zellzahlen auf 12- und 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät und für einen oder zwei Tage in CHO-Medium kultiviert. Die Zellen wurden zu Versuchsbeginn einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen, mit 500 beziehungsweise 250 µl (12- beziehungsweise 24-Well-Zellkulturplatte) frischem Nährmedium versorgt und dann durch verschiedene Mengen Pertussistoxin vergiftet. Die Morphologie der CHO-K1-Zellen wurde in definierten Zeitabständen beobachtet und fotografisch dokumentiert.

2.2.11.2 Vergiftungsexperimente mit Inhibitoren

Nach der Etablierung der Versuchsbedingungen wurden bei den Vergiftungsexperimenten mit Inhibitoren zwei verschiedene Vergiftungstests zur Analyse des Einflusses der Inhibitoren auf die Vergiftung von CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin durchgeführt: Beim

Vergiftungstest 1 wurde nur mit *adhärenten* CHO-K1-Zellen gearbeitet. Im Gegensatz dazu wurden die Zellen beim Vergiftungstest 2 während des Experiments durch Trypsin abgelöst und im *nicht-adhärenten* Zustand vergiftet (siehe auch Abbildungen 17 und 18).

Beim **Vergiftungstest 1** wurden die Zellen entweder „dünn“ oder „dicht" auf 12- oder 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät und für einen oder zwei Tage in CHO-Medium kultiviert. Vor Versuchsbeginn wurden die einzelnen Behandlungen in Eppendorfgefäßen vorbereitet: Die Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt und die dazu nötigen Verdünnungen entweder in CHO-Medium oder 1 x PBS hergestellt. Davon wurden entsprechende Volumina in die Eppendorfgefäße überführt, in die auf 37 °C vorgewärmtes CHO-Medium vorgelegt wurde. Zu Versuchsbeginn wurden die Zellen einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen. In die Wells wurden dann 500 beziehungsweise 250 µl (12- beziehungsweise 24-Well-Zellkulturplatte) des entsprechenden vorgemischten CHO-Medium-Inhibitor-Gemisches gegeben respektive nur CHO-Medium für die Negativ- und Positivkontrollen mit unbehandelten Kontrollzellen und vergifteten Zellen ohne Inhibitor. Die unterschiedlich behandelten Zellen wurden für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann wurde Pertussistoxin in einer Konzentration von 10 ng/ml zugegeben und für eineinhalb bis zwei Stunden inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und durch das gleiche Volumen von frischem CHO-Medium ersetzt. Nach 18 bis 24 Stunden wurde die Zellmorphologie untersucht und das Ergebnis fotografisch dokumentiert. Abbildung 17 zeigt den Versuchsablauf schematisch.

Der **Vergiftungstest 2** wurde aus der Methode des CHO-Zell-Tests von Pootong *et al.* 2007 abgeleitet und für die zu testenden pharmakologischen Inhibitoren dieser Arbeit modifiziert und wie im Folgenden beschrieben durchgeführt.
Beim Vergiftungstest 2 wurden 5 x 10^5 Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten (2 ml je Well) ausgesät und für zwei Tage in CHO-Medium kultiviert. Zu Versuchsbeginn wurden die Inhibitoren in einer Konzentration von 10 µM zugegeben, welche zuvor gegebenenfalls in den nötigen Verdünnungen entweder in CHO-Medium oder 1 x PBS vorbereitet wurden. Nach der 30- bis 45-minütigen Vorinkubation wurde das CHO-Medium-Inhibitor-Gemisch abgesaugt und die Zellen einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen. Um die Zellen in eine 96-Well-Zellkulturplatte transferieren zu können, wurden 200 µl Trypsin je Well zugegeben und die Ablösung mikroskopisch verifiziert. Die Trypsinreaktion wurde durch die Zugabe von 800 µl CHO-Medium je Well gestoppt. Die Zellsuspensionen wurden in separate

Eppendorfgefäße überführt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur bei 1.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Pellet in 1 ml CHO-Medium resuspendiert. Mit Hilfe der Multikanalpipette wurden die einzelnen Suspensionen der verschiedenen Behandlungen in eine 96-Well-Zellkulturplatte überführt (100 µl je Well), welche zuvor je Well mit 100 µl CHO-Medium (Negativkontrolle) beziehungsweise 100 µl eines CHO-Medium-Toxin-Gemisches (Pertussistoxin 10 ng/ml) präpariert worden war. Die Zellkulturplatte wurde für 18 bis 24 Stunden im Inkubator belassen. Die Morphologie der CHO-K1-Zellen wurde dann mikroskopisch untersucht und fotografisch dokumentiert. Um am Mikroskop optimal fokussieren zu können, wurde die Flüssigkeit aus den Wells abgekippt und durch 50 bis 100 µl CHO-Medium oder PBS ersetzt. Einige Zellkulturplatten wurden mit PFA fixiert, um ohne weitere Veränderungen die Ergebnisse besser fotografisch festhalten zu können. Abbildung 18 zeigt den Versuchsablauf schematisch.

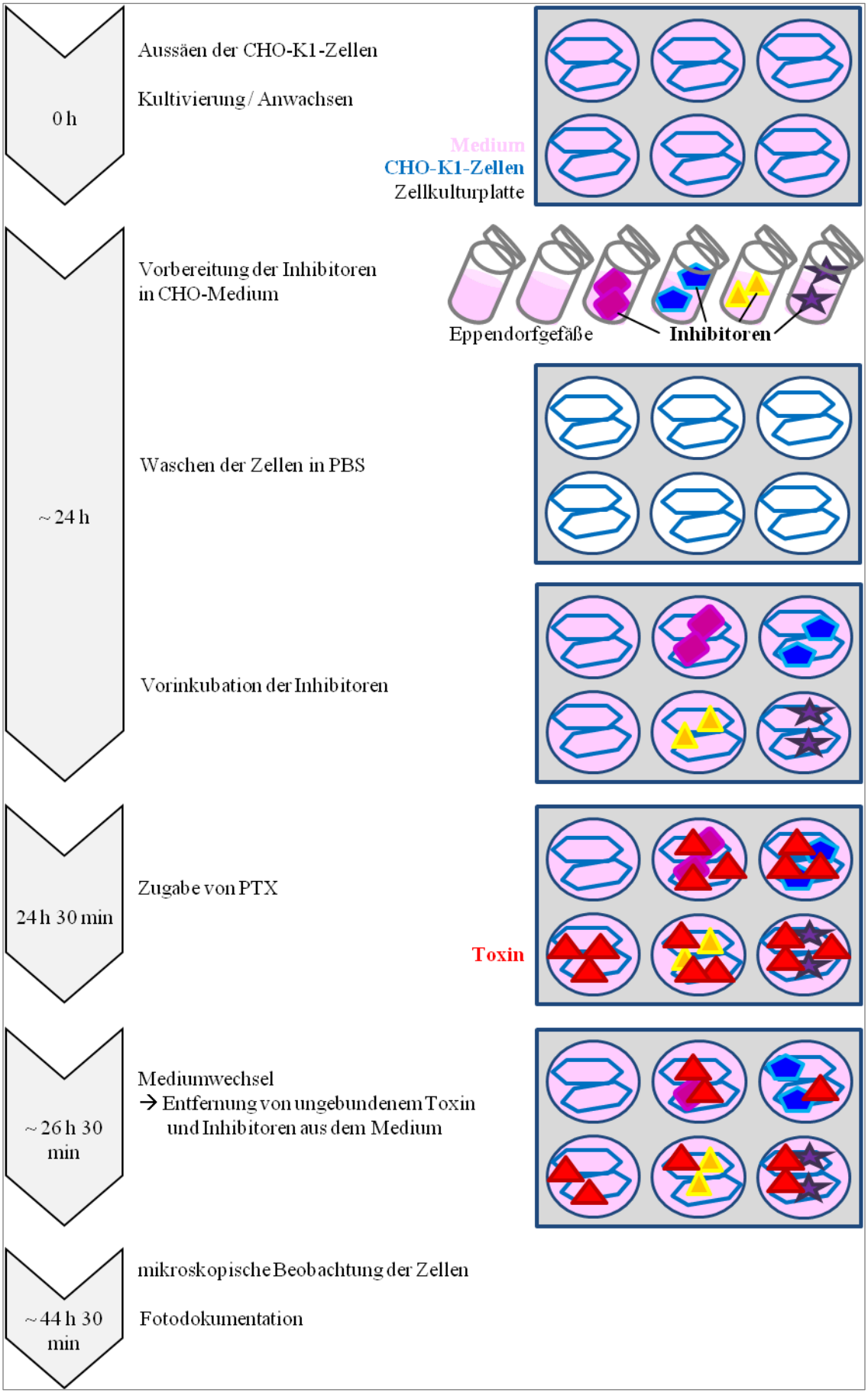


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Vergiftungstests 1. PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, PTX = Pertussistoxin.

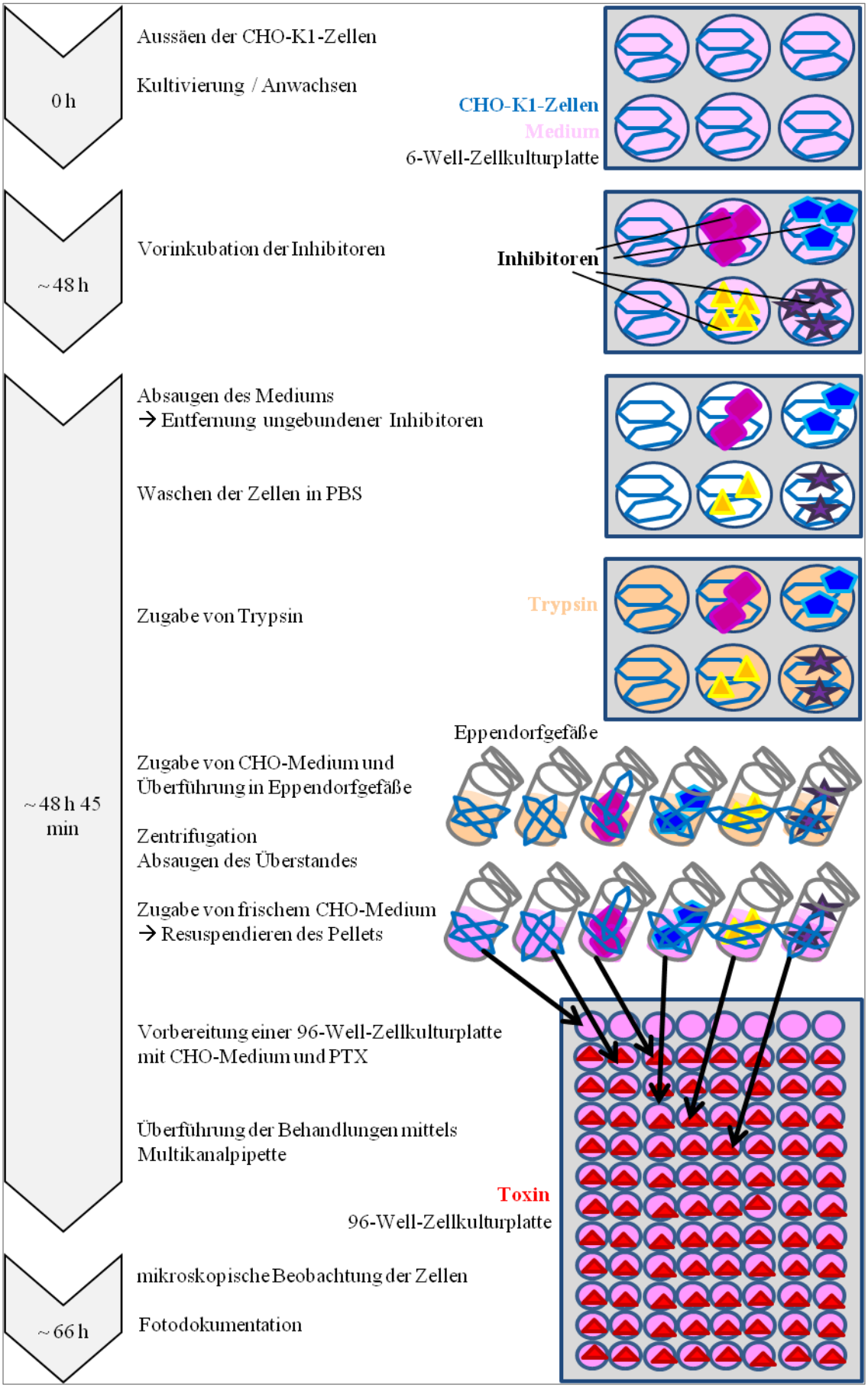


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Vergiftungstests 2. PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, PTX = Pertussistoxin.

2.2.11.3 Vergiftungsversuche mit den Lösungsmitteln der Inhibitoren

Die verwendeten Inhibitoren bei den Vergiftungsversuchen sind in Lösungsmitteln gelöst, die potentiell einen Einfluss auf die Vergiftung haben können, sogenannte Eigeneffekte. Diese Effekte könnten entweder synergistisch mit dem Toxin sein, was zu einer stärkeren Vergiftung unter dem Einsatz des Inhibitors führen würde, oder das Lösungsmittel könnte – unabhängig von der eigentlichen inhibitorischen Substanz – inhibitorische Effekte zeigen und somit zusätzlich hemmend wirken beziehungsweise der Grund für eine Hemmung sein und nicht die Substanz selbst.

Die Lösungsmittel der eingesetzten Inhibitoren, nämlich Ethanol für Radicicol, FK506 und Cyclosporin A, sowie Dimethylsulfoxid für FK506, Brefeldin A und VK112 wurden auf derartige Eigeneffekte bei der Vergiftung von CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin im Rahmen der Vergiftungsversuche untersucht. Dazu wurden die Lösungsmittel wie die Inhibitoren gehandhabt und zur Vorinkubation der Zellen für 30 Minuten ins Medium gegeben. Die eigesetzten Konzentrationen entsprachen dabei mindestens den höchsten verwendeten Konzentrationen im Medium bei den Versuchen mit Inhibitoren. An den Versuchsbedingungen oder dem Versuchsablauf wurde sonst nichts verändert.

2.2.11.4 Kontrollversuche mit den Inhibitoren und deren Lösungsmittel ohne Toxin

Die verwendeten Inhibitoren bei den Vergiftungsversuchen und deren Lösungsmittel wurden auch unabhängig vom Toxin auf morphologische Effekte auf CHO-K1-Zellen geprüft, um sicher zu gehen, dass mögliche Morphologieänderungen bei der Vergiftung mit Pertussistoxin auch tatsächlich dem Toxin zuzuschreiben sind. Hierfür wurden Inhibitoren und Lösungsmittel in den gleichen Konzentrationen wie bei den Vergiftungsversuchen eingesetzt und behandelt. Lediglich der Vergiftungsschritt wurde ausgelassen.

2.2.11.5 Quantifizierungsmethode der Vergiftungstests

Bei der mikroskopischen Beobachtung der Vergiftungstests zeigte sich die Tendenz, dass unter der Behandlung mit Pertussistoxin zum Beobachtungszeitpunkt nach 18 bis 24 Stunden weniger CHO-K1-Zellen vorhanden waren als zum Beispiel bei den unbehandelten Kontrollzellen. Dies führte zu der Idee, die Vergiftungstests durch Auszählen der Zellen zu quantifizieren und so einen statistischen Vergleich zu ermöglichen. Von besonderem Interesse war hierbei, ob ein Unterschied zwischen den mit Inhibitor behandelten Zellen und den unbehandelten Kontrollzellen respektive den mit Pertussistoxin vergifteten Zellen besteht und ob dieser statistisch signifikant ist.

Dafür wurden pro Well jeweils drei repräsentative Bildausschnitte (technische Replikate) ausgewählt und fotografisch festgehalten. Je nach Versuch wurden außerdem mehrere Wells gleichbehandelt, wodurch sich eine höhere Anzahl an Bildern und Werten je Behandlung ergab (die Anzahl der Werte ist bei den Abbildungen jeweils mit „n =“ angegeben). Auf den Bildern wurden alle adhärenten Zellen, also auch adhärente abgerundete Zellen, gezählt. Von den ausgezählten Zellzahlen je Well wurde anschließend der Mittelwert ± Standardabweichung bestimmt. Für die Berechnung der Signifikanzen wurde der Student’s t-test für zwei unabhängige Proben herangezogen. Die Angaben bedeuten dabei „ns“ = „nicht signifikant“, „*“ = „$p < 0,05$“, „**“ = „$p < 0,01$“ und „***“ = „$p < 0,0005$“. Die Angaben für die nur mit Pertussistoxin behandelten Zellen beziehen sich dabei auf die Werte der Kontrollzellen, die Angaben für die mit Inhibitor und Toxin behandelten Zellen beziehen sich auf die Werte der nur mit Pertussistoxin behandelten Zellen. Für die grafische Darstellung wurden relative Zellzahlen gewählt. Um diese angeben zu können, wurden die unbehandelten Kontrollzellen als Vergleichsparameter herangezogen und als 100 % festgesetzt – die anderen Behandlungen wurden anteilig an diesen 100 % ausgegeben.

Die Zählung der Zellen erfolgte unter Zuhilfenahme des Programmtools Cell Counter von ImageJ, die prozentualen Anteile wurden in Microsoft Excel 1999-2003 & 2007 berechnet, die grafische Darstellung und statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism4 & 5.

2.2.12 Fixierung von Zellen durch Paraformaldehyd

Paraformaldehyd (PFA) wird zur Fixierung von Zellen und Geweben genutzt. Hier wurde es bei den Vergiftungsversuchen (Vergiftungstest 2) verwendet, um die vergifteten Zellen der mikroskopischen Beobachtung besser zugänglich zu machen.

Dazu wurden die Zellen nach der Entfernung des Mediums mit 50 µl einer 4 %-igen PFA-Lösung je Well (96-Well-Zellkulturplatte) für 20 bis 30 Minuten inkubiert. Nach der Fixierung wurde die Platte gut von PFA befreit. Die Zellen wurden dann je Well mit 50 µl 1 x PBS bedeckt, welches zuvor mit Natriumazid (1:200) versetzt wurde, um das Wachstum von Pilzen zu verhindern. Die Zellkulturplatte wurde so haltbar gemacht, um sie einige Tage im Kühlschrank lagern und mehrfach beobachten zu können.

2.2.13 Analyse des ADP-Ribosylierungsstatus des Pertussistoxin-Substrates $G_i\alpha$ der CHO-K1-Zellen nach Vergiftung durch Pertussistoxin (Nachribosylierungstest)

Durch die Analyse des ADP-Ribosylierungsstatus von $G_i\alpha$ als Substrat von Pertussistoxin sollte untersucht werden, ob die beobachtbaren morphologischen Veränderungen aus den Zelltests bei der Vergiftung von CHO-K1-Zellen mit einer verminderten Umsetzung des Substrats $G_i\alpha$ unter Einsatz der Inhibitoren einhergehen. Bei diesem Versuch wird die enzymatische Reaktion, die ADP-Ribosylierung von $G_i\alpha$, des Zellversuchs mit denselben Zellen nochmals *in vitro* durchgeführt (= Nachribosylierung). Dabei werden bei den mit Inhibitor behandelten Zellen aus den Zelltests stärkere Signale, also mehr Substratumsatz, erwartet als bei den mit Pertussistoxin vergifteten Zellen ohne Inhibitor, da deren Substrat bereits bei den Zelltests ADP-ribosyliert wurde und somit bei der Nachribosylierung nicht mehr als Substrat zur Verfügung steht.

Hierfür wurden die CHO-K1-Zellen aus den Vergiftungsversuchen mit einem Zellschaber in ADP-Ribosylierungspuffer für das C180-Protein auf Eis abgekratzt und in Eppendorfgefäße überführt. Es wurden 30 µl je Well bei 12-Well- und 40 µl des ADP-Ribosylierungspuffers je zwei Wells bei 24-Well-Zellkulturplatten verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Spritzenkanüle durch zehnmaliges Aufziehen lysiert und kurz anzentrifugiert. In neue Eppendorfgefäße wurden jeweils 22,75 µl der lysierten Zellen überführt, die dann mit 1 µl Biotin-NAD^+ (10 µM) und 1,25 µl C180-Protein (entspricht 170 ng) versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden zu den Proben 6,25 µl 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT zugegeben und alle Proben für fünf Minuten bei 100 °C gekocht. Nach einer SDS-PAGE und einem Westernblot wurde die Membran mit Strep-POD (1:2.500) inkubiert, um spezifisch das Biotin-markierte $G_i\alpha$ mit industriell hergestelltem ECL detektieren zu können.

2.2.14 Analyse des Einflusses der Inhibitoren auf die Bindung von Pertussistoxin an der Zelloberfläche (Bindungstest)

Durch die Analyse des Einflusses der Inhibitoren auf die Bindung von Pertussistoxin an der Zelloberfläche sollte untersucht werden, ob die Wirkung der Inhibitoren darin liegt, dass das Toxin bereits an der Zelloberfläche weniger oder nicht mehr binden und somit weniger Toxin in die Zelle gelangen kann.

Für den Bindungstest nach der Methode wie bei Bronnhuber *et al.* 2014 beschrieben wurden 2,5 x 10^6 CHO-K1-Zellen für einen Tag in 12-Well-Zellkulturplatten konfluent

kultiviert. Wie bei den Vergiftungsversuchen wurden die Zellen für 30 Minuten mit den Inhibitoren (10 µM) vorinkubiert und anschließend für 15 Minuten auf 4 °C gekühlt. Es wurden statt 500 µl CHO-Medium 500 µl serumfreies MEM benutzt. Als Vergleich wurden einige Wells unbehandelt belassen (Negativkontrolle) und einige Wells nur mit Pertussistoxin behandelt (Positivkontrolle). Es wurden 500 ng/ml Pertussistoxin zugegeben und für 30 Minuten auf 4 °C inkubiert. Die Temperatur lässt dabei das Toxin binden, es kann jedoch nicht internalisiert werden, da die Endozytosevorgänge bei niedrigen Temperaturen eingestellt werden. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit kaltem 1 x PBS gewaschen und in 60 µl auf 95 °C erhitztem 2,5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT (5 x Laemmli-Probenpuffer verdünnt mit gleichem Anteil an *Aqua bidest.*) aus den Wells gelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 95 °C, wurde eine SDS-PAGE mit Westernblot gemacht. Die Membran wurde mit einem anti-S1-PTX Antikörper inkubiert (1:2.500) und mit industriell hergestelltem ECL detektiert.
Um für die Laufhöhe der S1-Untereinheit im Westernblot einen Vergleich zu haben, wurde zusätzlich eine Positivkontrolle mit dem reinen Holotoxin auf das Gel aufgetragen. Für die Herstellung wurde Pertussistoxin in 1 x PBS verdünnt, um eine Konzentration von 20 ng/µl Toxin zu erreichen. Die Proben wurden anschließend mit der entsprechenden Menge 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT versetzt und für zehn Minuten bei 95 °C gekocht.

2.2.15 Analyse des Einflusses der Inhibitoren auf die Enzymaktivität der S1-Untereinheit von Pertussistoxin *in vitro* (Enzymaktivitätstest)

Durch die Analyse des Einflusses der Inhibitoren auf die Enzymaktivität der S1-Untereinheit von Pertussistoxin sollte untersucht werden, ob die inhibitorische Wirkung der eingesetzten Inhibitoren auf einer Beeinflussung der Enzymaktivität von S1 beruht und diese beispielsweise herabgesetzt wird. Dieser Enzymaktivitätstest ist ein *in vitro* Versuch.
Für das Experiment wurden 40 µg CHO-K1-PNS als Zelllysat verwendet. Dieses wurde – wie bei den Vergiftungsversuchen – mit den Inhibitoren (10 µM) und den Lösungsmitteln in entsprechender Konzentration für 30 Minuten vorinkubiert. Als Negativkontrolle wurde das PNS-Zelllysat unbehandelt belassen, als Positivkontrolle nur mit Toxin inkubiert. Auf Eis wurden zu den Proben 1 µl Biotin-NAD^+ (10 µM) und 1,25 µl C180-Protein (entspricht 170 ng) zugegeben. Das fehlende Volumen auf ein Gesamtvolumen von 25 µl wurde mit ADP-Ribosylierungspuffer für das C180-Protein aufgefüllt. Es wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 6,25 µl 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT zugegeben und für fünf Minuten bei 100 °C gekocht. Danach wurden eine

SDS-PAGE und ein Westernblot durchgeführt, wobei die Membran mit Strep-POD (1:2.500) inkubiert wurde, um spezifisch das Biotin-markierte $G_i\alpha$ mit selbstgemachtem ECL detektieren zu können.

2.2.16 Detektion der S1-Untereinheit von Pertussistoxin im Zytosol von CHO-K1-Zellen (Digitonintest)

Der Digitonintest wurde nach der Methode von (Więdłocha *et al.* 2005) durchgeführt, um den zeitlichen Verlauf des Eintreffens der S1-Untereinheit von Pertussistoxin im Zytosol zu analysieren und den Einfluss der Inhibitoren darauf zu untersuchen. Man macht sich dazu die Fähigkeit der Substanz Digitonin zur Permeabilisierung von Zellmembranen zu Nutze, bei der es sich um ein nicht-ionisches Detergens handelt, das Poren in der Zellmembran erzeugt. So können das Zytosol und die darin enthaltenen Moleküle entsprechend ihrer Größe in die Digitoninlösung ausströmen, womit Zytosol und membrangebundene Teile separiert werden können. Die Porengröße ist dabei so beschaffen, dass Endosomen normalerweise nicht passieren können. Abbildung 19 stellt eine allgemeine Übersicht zum Ablauf des Digitonintests dar.

Für den Versuch wurden 2,5 x 10^6 CHO-K1-Zellen für einen Tag in 12-Well-Zellkulturplatten bis zu sehr dichtem, konfluentem Wachstum kultiviert. Die Zellen wurden dabei wie bei den Vergiftungsversuchen beschrieben behandelt, es wurde lediglich das CHO-Medium durch 500 µl MEM ersetzt. Für den Zeitverlauf der Aufnahme von S1 ins Zytosol über eine, zwei und drei Stunden wurden die Zellen ohne Inhibitoren belassen und nur durch 500 ng/ml Pertussistoxin vergiftet. Für die Testung der Inhibitoren wurden diese wieder für 30 Minuten in der gleichen Konzentration (10 µM) vorinkubiert und anschließend die Zellen mit 500 ng/ml Pertussistoxin vergiftet (Zeitwerte für eine und zwei Stunden). Für die verschiedenen Stundenwerte (eine, zwei und drei Stunden respektive eine und zwei Stunden) wurde in die jeweiligen Wells erst nach der entsprechenden Zeit das Toxin zugegeben, sodass die Vergiftungsreaktion in allen Wells zur gleichen Zeit gestoppt werden konnte. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wurden dreimal mit kaltem 1 x PBS gewaschen, um ungebundenes oder nicht internalisiertes Toxin zu entfernen. Für die Permeabilisierung der Zellmembran wurden pro Well 125 µl der Digitoninlösung (20 µg/ml in 1 x PBS) zugegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen bei 4 °C auf Eis für weitere 25 Minuten inkubiert, um auch die zytosolischen Proteine einschließlich der dort vermuteten respektive sich befindenden S1-Untereinheit des Pertussistoxins zu

extrahieren. Im Anschluss an die Inkubation wurde der Überstand abgenommen (Zytosolfraktion) und in Eppendorfgefäße überführt. Die verbliebenen Zellen (Membranfraktion) wurden mit kaltem 1 x PBS gewaschen.

Die Zytosolfraktion wurde für fünf Minuten bei 2.000 rpm zentrifugiert, um sicher Endosomen oder andere Membranbestandteile zu entfernen. Es wurden jeweils 110 µl in neue Eppendorfgefäße überführt, mit der entsprechenden Menge (40 µl) 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT versetzt und für zehn Minuten bei 95 °C gekocht.

Die Membranfraktion wurde durch auf 95 °C erhitzen 2,5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT (5 x Laemmli-Probenpuffer verdünnt mit gleichem Anteil an *Aqua bidest*.) aus den Wells (je 100 µl) gelöst und ebenfalls bei 95 °C für zehn Minuten gekocht.

Um für eine Westernblot-Analyse einen Vergleich für die Laufhöhe der S1-Untereinheit zu haben, wurde eine Positivkontrolle mit dem Holotoxin herstellt. Dazu wurde Pertussistoxin in 1 x PBS verdünnt, um eine Konzentration von 20 ng/µl Toxin zu erreichen. Die Proben wurden anschließend mit der entsprechenden Menge 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT versetzt und für zehn Minuten bei 95 °C gekocht.

Beide Fraktionen wurden separat mit jeweils einer der Holotoxin-Positivkontrollen in ein Gel aufgetragen, woran sich eine SDS-PAGE und ein Westernblot anschlossen. Die Membranen wurden danach bei der 50 kDa Markierung der Größenstandard-Banden durchgeschnitten, um mehrere Proteine pro Probe parallel nachweisen zu können.

Die Membranhälften kleiner 50 kDa wurden mit einem anti-S1-PTX Antikörper inkubiert. Für die Membranfraktion wurde der Antikörper in einer Verdünnung von 1:2.000 verwendet, für die Zytosolfraktion wurde die Verdünnung den erwarteten geringen Mengen des Proteins angepasst und mit 1:2.000, 1:1.000 oder 1:500 gearbeitet.

Die Membranhälften größer 50 kDa wurden nacheinander mit zwei verschiedenen Antikörpern inkubiert, um Proteine nachzuweisen, die interne Kontrollen darstellen. Es wurde ein anti-Hsp90 Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 verwendet, um die eingesetzten Proteinmengen innerhalb der Fraktionen auf Vergleichbarkeit zu prüfen. Das Protein Hsp90 eignet sich hierzu, da es in jeder Zelle in gleicher Menge vorhanden ist. Außerdem wurde ein anti-EEA_1 Antikörper in einer Verdünnung von 1:1.000 verwendet. Das Protein EEA_1 kommt in frühen Endosomen vor und kann hier ebenfalls als Marker eingesetzt werden, ob die Fraktionen erfolgreich getrennt wurden und keine Endosomen beziehungsweise vergleichbare Mengen an Endosomen in der Zytosolfraktion waren.

Alle Membranen wurden mit industriell hergestelltem ECL detektiert. Die Membranhälften größer 50 kDa wurden anschließend immer mit Stripping-Puffer A und B gestrippt und mit

dem jeweils anderen Antikörper inkubiert und detektiert. Die Membranen der Zytosolfraktion wurden meistens gestrippt und nochmals mit dem gleichen Antikörper detektiert.

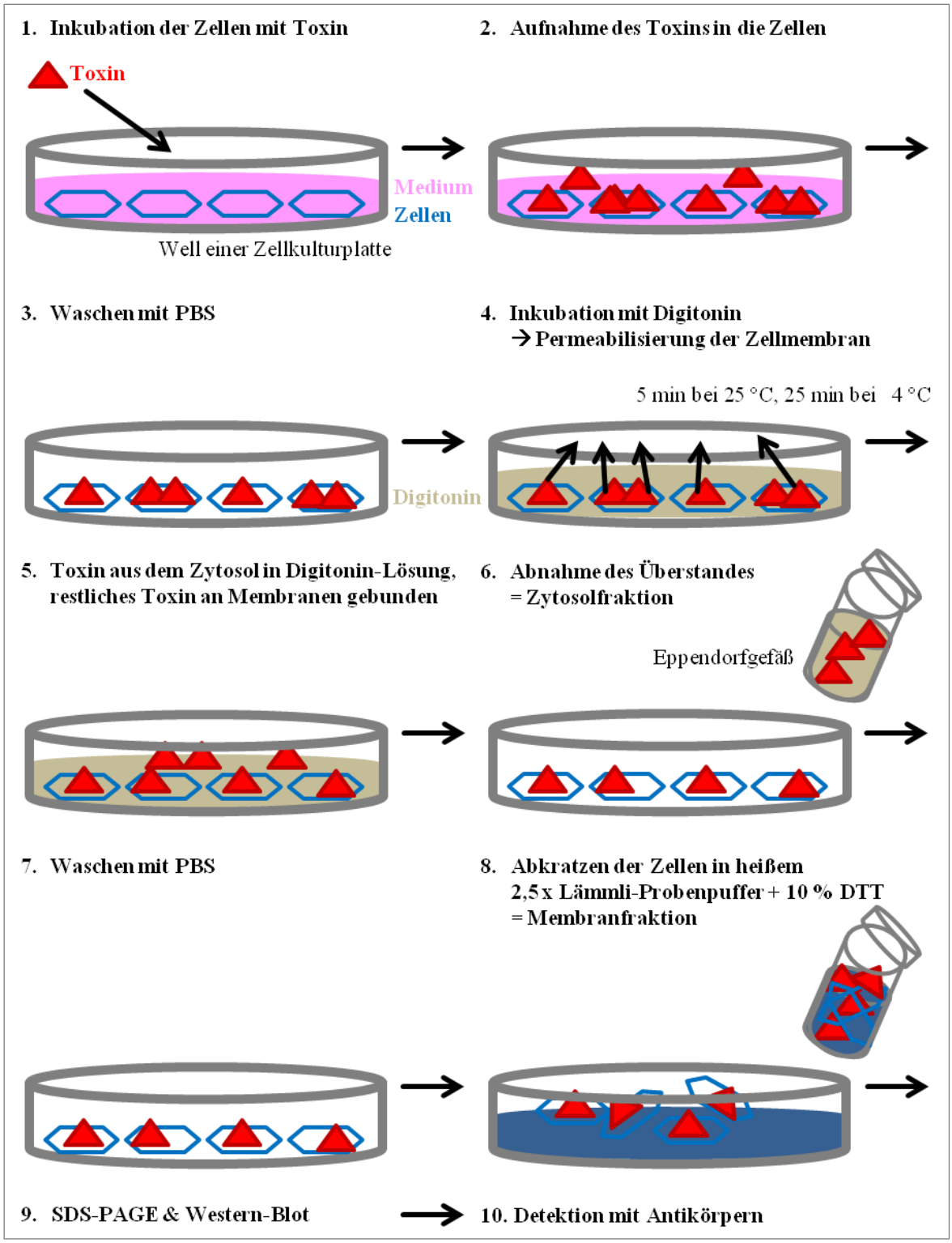


Abbildung 19: Allgemeines Schema des Digitonintests. DTT = Dithiothreitol, PBS = Phosphat-gepufferte Salzlösung, SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

3 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Aufnahmemechanismus von Pertussistoxin in Säugetierzellen genauer zu charakterisieren, insbesondere die Interaktion des Toxins mit wirtszelleigenen zytosolischen Faktoren wie dem Chaperon Hsp90 und den Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen), wie den FK506-Bindeproteinen und den Cyclophilinen. Dazu wurden in Zellexperimenten spezifische pharmakologische Inhibitoren gegen diese Faktoren eingesetzt – Radicicol gegen Hsp90, FK506 gegen FK506-Bindeproteine und Cyclosporin A gegen Cyclophiline – und geprüft, ob die Vergiftung der Zellen durch Pertussistoxin durch diese Inhibitoren beeinflusst wird. Des Weiteren sollte der Mechanismus einer auftretenden Hemmung genauer charakterisiert werden.
Im Folgenden sind die Ergebnisse der verschiedenen durchgeführten Versuche dargestellt.

3.1 Aufreinigung und Charakterisierung des C180-Proteins, der S1-Untereinheit des Pertussistoxins

Die enzymatisch aktive Untereinheit von Pertussistoxin, S1, wurde für die *in vitro* Versuche zum Nachribosylierungstest („Ergebnisse“ (3.4)) und zum Enzymaktivitätstest („Ergebnisse“ (3.6)) der vorliegenden Arbeit isoliert vom B-Oligomer benötigt, um diese Versuche durchführen zu können, da eine Aktivierung der Enzymuntereinheit aus dem Holotoxin heraus nicht gelungen war. Herr Prof. Dr. Joseph T. Barbieri vom Medical College of Wisconsin, Milwaukee, USA stellte unserer Arbeitsgruppe für die Gewinnung der S1-Untereinheit sein selbst hergestelltes Plasmid ptacC180 zur Verfügung, das die Gensequenz der S1-Untereinheit von Pertussistoxin enthält und für das C180-Protein mit His-tag kodiert. Das C180-Protein besteht dabei aus den ersten 180 N-terminalen Aminosäureresten, die für die enzymatische Aktivität des Holotoxins verantwortlich sind (Barbieri *et al.* 1989).
Um aus dem Plasmid das rekombinante Toxin für die Versuche dieser Arbeit zu gewinnen, wurde nach der Vorgehensweise von Barbieri *et al.* 1989 und nach dem Arbeitsgruppen-internen Versuchsprotokoll für die Aufreinigung von His-tag-Protein unter der Nutzung von *Escherichia coli* Expressionsstämmen verfahren. Die genaue Vorgehensweise erfolgte wie unter „Material und Methoden“ (2.2.10) beschrieben. Im Folgenden werden die Ergebnisse der DNA-Gelelektrophorese zur Prüfung der Intaktheit des Plasmids (Abbildung 20), der Prüfung der Aufreinigung des C180-Proteins und der Prüfung auf spezifische

Antikörpererkennung des C180-Proteins (Abbildungen 21 bis 23), des Konzentrationsgels zur Proteinkonzentrationsbestimmung (Abbildungen 24 und 25, Tabellen 5 und 6) und der Prüfung der Enzymaktivität des C180-Proteins *in vitro* (Abbildung 26) gezeigt.

3.1.1 DNA-Gelelektrophorese zur Prüfung der Intaktheit des Plasmids

Das Plasmid ptacC180 wurde zu Beginn in *Escherichia coli* DH5α transformiert, um viele Plasmidkopien herzustellen. Diese Plasmide wurden dann mit Hilfe des NucleoBond® PC 100 Kit von Macherey-Nagel (Düren) nach der Anleitung für „high-copy"-Plasmide mit einer „Midi"-Präparation isoliert und aufgereinigt. Nach der Präzipitation der Plasmide wurde zum einen die optische Dichte der Proben gemessen, um einen Anhalt für den DNA-Gehalt der Lösungen zu bekommen – diese lagen im erwarteten Bereich und die Quotienten im Normbereich. Zum anderen wurde mittels DNA-Gelelektrophorese geprüft, ob die Größe der gewonnenen Plasmide mit der von Barbieri *et al.* 1989 angegebenen übereinstimmte.

Dazu wurde ein 1 %-iges DNA-Gel mit 1 g Agarose auf 100 ml 1 x TAE-Puffer angefertigt und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Es wurden 10 µl der Proben und ein DNA-Größenstandard (SmartLadder – 200 to 10.000 bp; Eurogentec (Seraing, Belgien)) aufgetragen, um anschließend die Anzahl der Basenpaare der DNA-Fragmente bestimmen zu können. Abbildung 20 zeigt ein Abbild des DNA-Gels unter UV-Licht.

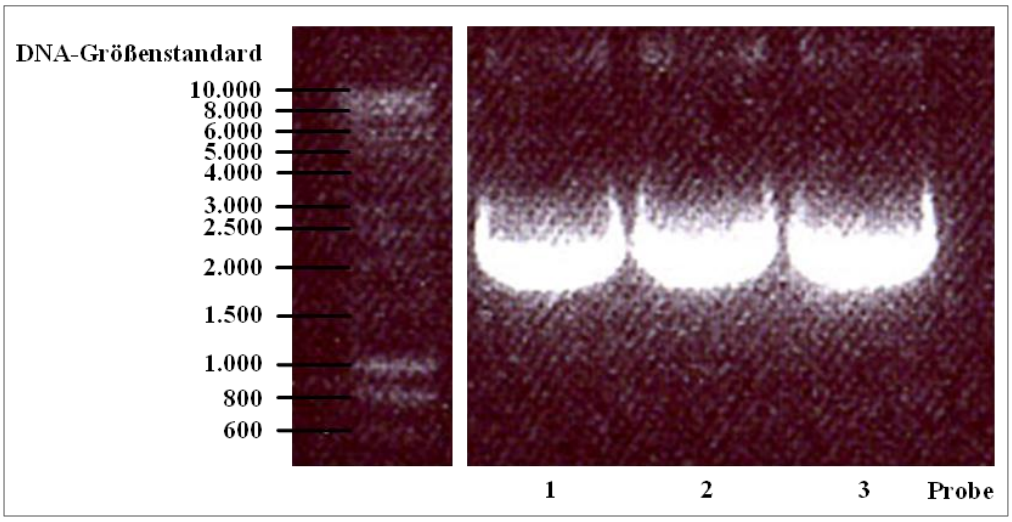


Abbildung 20: DNA-Gel zur Prüfung der Intaktheit des Plasmids ptacC180 nach Transformation und Aufreinigung. Von den aus der Präzipitation gewonnenen Plasmiden (Proben 1 bis 3) wurden jeweils 10 µl mit Gel-Loading-Puffer versetzt, auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und für 1h bei 100 V in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Abbildung zeigt die mit UV-Licht sichtbar gemachten DNA-Banden (rechts) und den aufgetragenen DNA-Größenstandard [bp] (links).

Das Ergebnis in Abbildung 20 zeigt, dass die drei Proben alle auf derselben Höhe des DNA-Größenstandards liefen, nämlich zwischen 2.500 und 3.000 bp. Barbieri *et al.* 1989 beschreiben, dass sie mit Vektoren arbeiteten, die zwischen 2.300 und 2.686 bp groß waren. Das Plasmid ptacC180 enthält die genetische Information für 180 Aminosäuren, wobei eine Aminosäure durch drei Basenpaare kodiert wird – für 180 Aminosäuren ergibt dies 540 bp. Addiert man dazu die Größe der Vektoren, so muss das gesuchte Plasmid etwa bei 3.000 bp sein. Das DNA-Gel zeigt, dass die drei getesteten Proben im Bereich der beschriebenen Größe der Plasmide lagen. Dieses Ergebnis bestätigte, dass es sich bei den Proben um die gesuchten Plasmide handelte und, dass diese nach Transformation und Aufreinigung intakt waren.

3.1.2 Prüfung der Aufreinigungsfraktionen des C180-Proteins

Nach der ersten Transformation in *Escherichia coli* DH5α und anschließenden Präzipitation des Plasmids ptacC180 erfolgte eine erneute Transformation in *Escherichia coli* BL21 zur Proteinexpression. Aus der daraus erstellten Hauptkultur wurde das C180-Protein aufgereinigt. Während der Aufreinigung wurde von einigen Zwischenschritten eine kleine Menge der Fraktionen als Probe zurückbehalten, um diese auf zunehmende Reinheit und spezifische Antikörpererkennung zu testen.

3.1.2.1 Prüfung der Aufreinigung des C180-Proteins mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Die Prüfung, ob das Verfahren zur Aufreinigung des C180-Proteins erfolgreich war und ob mit jeder weiterbehandelten Fraktion mehr C180-Protein und weniger andere Proteine enthalten waren, wurde mittels SDS-PAGE der während der Aufreinigung abgenommenen Fraktionen und einer angeschlossenen Coomassie-Färbung des Gels vorgenommen. Die Coomassie-Färbung färbt Proteine unspezifisch an und eignete sich daher, zu zeigen, wie viel Protein in den einzelnen Fraktionen vorhanden war und welche molekulare Masse diese hatten respektive, dass mit fortgeschrittener Aufreinigung weniger Nebenprodukte und mehr C180-Protein vorhanden waren.

Von allen gesammelten Fraktionen während der Aufreinigung wurden dazu die Proben gekocht und einer SDS-PAGE unterzogen. Das Gel wurde in einer Coomassie Färbelösung gefärbt und danach entfärbt, sodass nur noch die Proteinbanden gefärbt waren, nicht aber der Hintergrund. Abbildung 21 zeigt das in Coomassie gefärbte Gel.

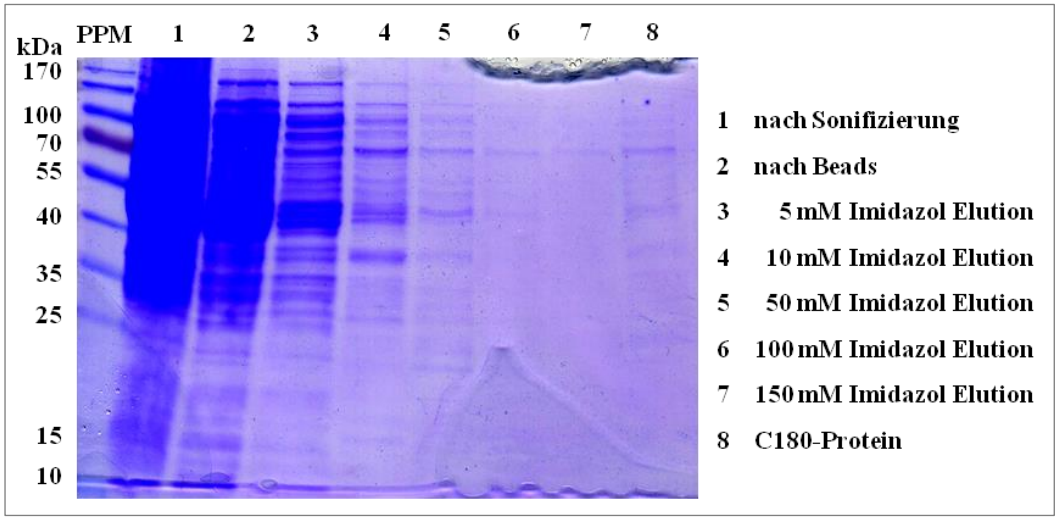


Abbildung 21: Coomassie-Färbung des Gels zur Prüfung der Aufreinigung des C180-Proteins. Jeweils 5 µl der Proben der Aufreinigungsfraktionen (1 bis 8) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit einer Coomassie-Färbung behandelt. Dabei wurden die Fraktionen chronologisch aufgetragen: links bei Beginn der Aufreinigung (1), rechts verwendungsfertiges C180-Protein (8). Um die Molekülmassen einschätzen zu können, wurde ein Proteinmarker mit aufgetragen. PPM = Prestained Protein Marker.

Das Ergebnis in Abbildung 21 zeigt, dass das Verfahren zur Aufreinigung dahingehend erfolgreich war, dass nach jedem Schritt der Aufreinigung weniger Nebenprodukte vorhanden waren und die Fraktionen reiner wurden. Besonders bei den ansteigenden Imidazol Elutionen konnte eine starke Filterung beobachtet werden. Auf der Höhe von etwa 25 kDa, auf der die S1-Untereinheit und damit auch das C180-Protein erwartet wurde, gab es eine Proteinbande. Diese war zwar schwach, deutete aber dennoch darauf hin, dass das gewünschte Protein vorhanden war. Für das verwendungsfertige C180-Protein wurden die Imidazol Fraktionen vereinigt, um genügend Versuchsmaterial extrahieren zu können. Daher wurde hier wieder mehr Protein angefärbt, da durch die Fraktionsvereinigung auch wieder mehr Nebenprodukte enthalten waren.

3.1.2.2 Prüfung der spezifischen Erkennung des C180-Proteins durch Antikörper

Ob das C180-Protein von Antikörpern erkannt wird, sollte als weitere Kontrolle für die Expression und Aufreinigung des gewünschten Produktes dienen und als Kontrolle, ob die in den Versuchen bei Pertussistoxin verwendeten Antikörper auch für den Nachweis des C180-Proteins verwendet werden können.

Dazu wurde jede Probe aus den gesammelten Fraktionen während der Aufreinigung gekocht und anschließend eine SDS-PAGE und ein Westernblot gemacht. Um einen Anhaltspunkt für die verschiedenen Mengen an Protein je Probe zu haben, wurde die Membran reversibel in Ponceau-S gefärbt und das Ergebnis eingescannt (siehe Abbildung 22). Nach Entfärbung wurde die Membran anschließend zuerst mit einem anti-S1-PTX (1:2.500) und

nach einem Membranstripping mit einem anti-His-tag Antikörper (1:1.000) inkubiert. Die Membranen wurden mit ECL detektiert und sind in Abbildung 23 dargestellt.

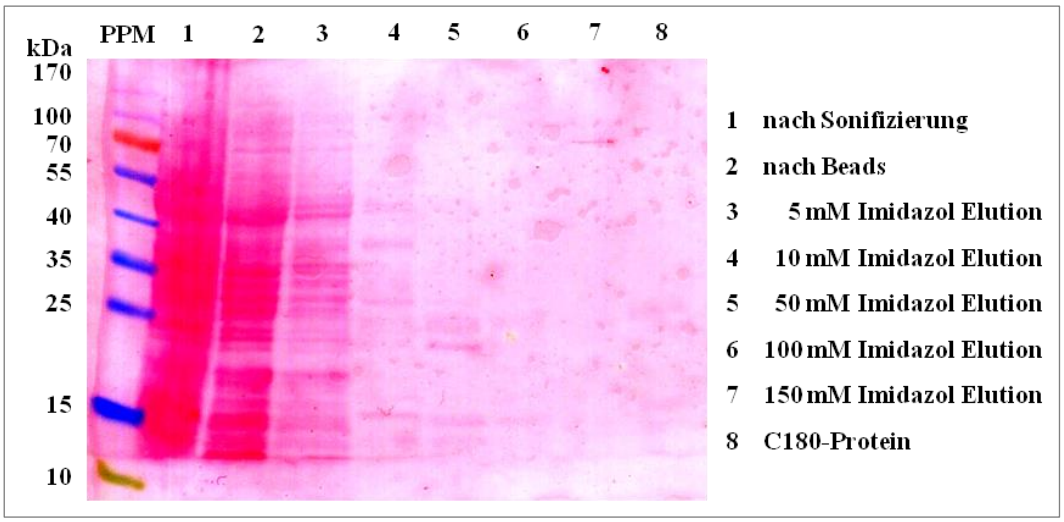


Abbildung 22: Ponceau-S-Färbung der Membran zur Prüfung der spezifischen Erkennung des C180-Proteins durch Antikörper. Jeweils 5 µl der Proben der Aufreinigungsfraktionen (1 bis 8) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch einen Westernblot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde mit einer Ponceau-S-Färbung behandelt, um alle Proteine anzufärben. Um die Molekülmassen einschätzen zu können, wurde ein Proteinmarker mit aufgetragen. PPM = Prestained Protein Marker.

Die Ponceau-S-Färbung in Abbildung 22 zeigt, dass in den ersten drei Fraktionen der Aufreinigung viel Protein enthalten war und in den Fraktionen vier bis acht im Vergleich nur sehr wenig.

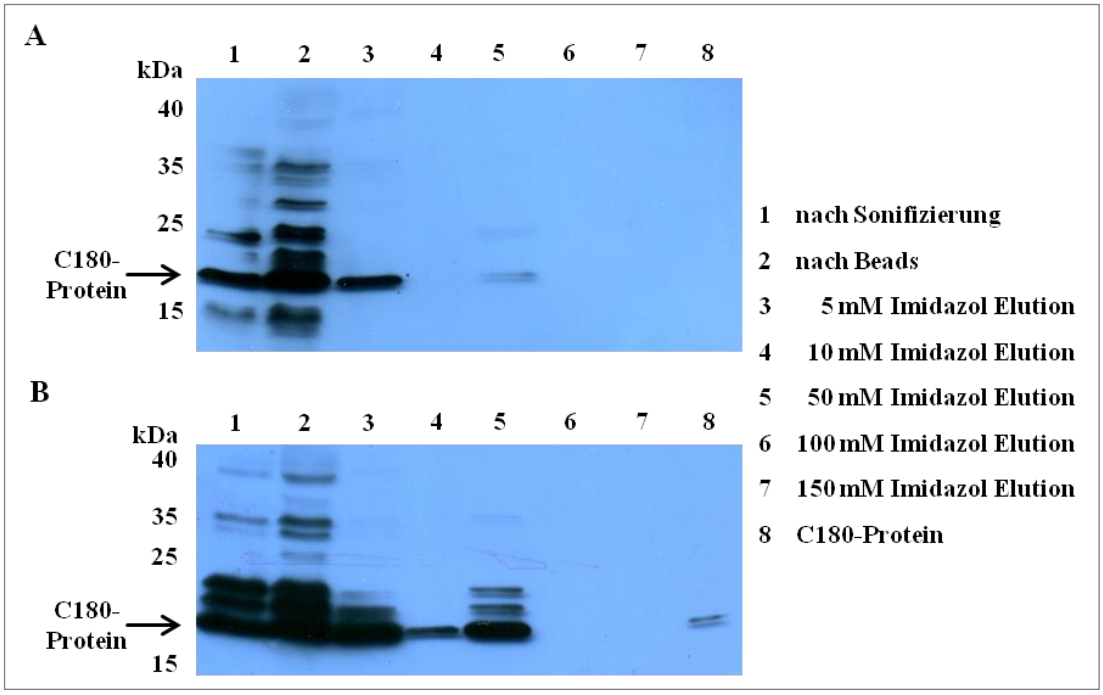


Abbildung 23: Westernblot-Analyse zur Prüfung der spezifischen Erkennung des C180-Proteins durch Antikörper. Jeweils 5 µl der Proben der Aufreinigungsfraktionen (1 bis 8) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch einen Westernblot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. **A:** Die Membran wurde mit einem anti-His-tag Antikörper (1:1.000) inkubiert und mit industriell hergestelltem ECL detektiert. **B:** Die Membran wurde mit einem anti-S1-PTX Antikörper (1:2.500) inkubiert und mit industriell hergestelltem ECL detektiert.

Die Westernblot-Analysen mit einem anti-His-tag und einem anti-S1-PTX Antikörper in der Abbildung 23 A und B zeigen, dass das aufgereinigte C180-Protein von beiden Antikörpern erkannt wurde. Da in den Fraktionen erheblich unterschiedliche Proteinmengen vorhanden waren (wie durch die Ponceau-S-Färbung in Abbildung 22 gezeigt), war die Signalintensität der detektierten Banden sehr unterschiedlich. Der anti-S1-PTX Antikörper erkannte auch die Fraktion 8, die dem fertig aufgereinigten und für die Versuche verwendeten C180-Protein entsprach. Die Molekülmasse des Proteins entsprach zudem der von Barbieri *et al.* 1989 angegebenen.

3.1.3 Konzentrationsgel zur Proteinkonzentrationsbestimmung des C180-Proteins

Um bei Versuchen mit dem aufgereinigten C180-Protein dieses in einer geeigneten Konzentration einsetzen zu können, wurde seine Proteinkonzentration mittels eines Konzentrationsgels und dessen Auswertung bestimmt.

Dazu wurden auf ein Gel verschiedene Mengen des C180-Proteins (0,5, 1, 2, 5, 10 und 15 µl) und als Vergleich verschiedene Mengen (125, 250, 500, 750 und 1.000 ng) eines BSA-Standards mit bekannter Konzentration in 1 x PBS in einem Gesamtvolumen von 20 µl aufgetragen. Um im Anschluss die Molekülmassen bestimmen zu können, wurde ein

Proteinmarker mit aufgetragen. Nach einer SDS-PAGE wurde das Gel in einer Coomassie Färbelösung gefärbt und im Anschluss solange entfärbt, bis der Hintergrund vollkommen entfärbt war und nur noch die Proteinbanden angefärbt waren. Das Gel wurde gescannt und mittels Intensitätsmessung mit der Software Adobe Photoshop 7.0 ausgewertet. Die Intensitäten wurden beim BSA-Standard bei 66 kDa und beim C180-Protein bei etwa 20 kDa des Proteinmarkers ermittelt (Abbildung 24).

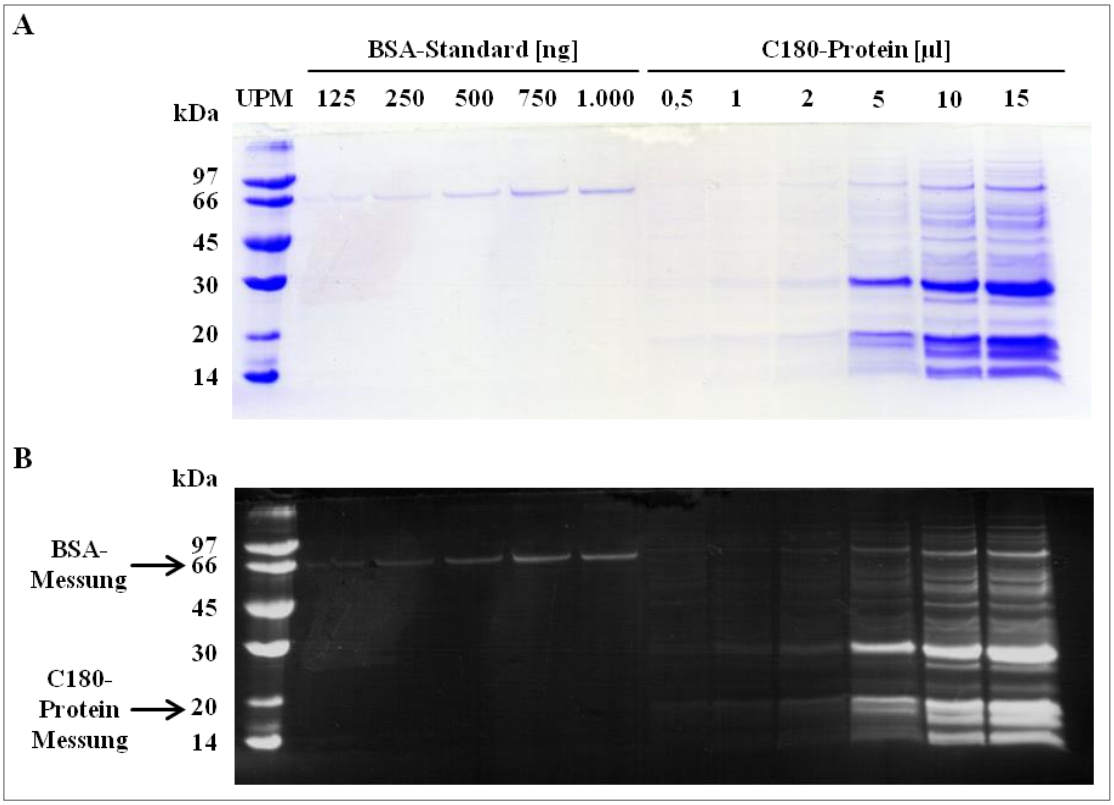


Abbildung 24: Konzentrationsgel zur Proteinkonzentrationsbestimmung des C180-Proteins. Auf ein Gel wurden 125, 250, 500, 750 und 1.000 ng eines BSA-Standards als Vergleichssubstanz und 0,5, 1, 2, 5, 10 und 15 µl des aufgereinigten C180-Proteins neben einem Proteinmarker aufgetragen und über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde einer Coomassie-Färbung unterzogen und entfärbt bis der Hintergrund klar wurde. **A:** Konzentrationsgel in Coomassie-Färbung. **B:** Mit Adobe Photoshop 7.0 invertiertes Bild des Konzentrationsgels zur Ermittlung der Banden-Intensitäten. Es wurde jeweils die Intensität der Bande und die des umgebenden Hintergrunds ermittelt – für BSA bei 66 kDa, für C180-Protein bei etwa 20 kDa. BSA = bovines Serumalbumin, UPM = Unstained Protein Marker.

Die ermittelten Intensitätswerte wurden mit Microsoft Excel 1999-2003 & 2007 verarbeitet und sind in Tabelle 5 aufgelistet. In einem Diagramm wurden auf der x-Achse die eingesetzten BSA-Standards in ng abgetragen und auf der y-Achse die zugehörigen Intensitäten. Daraus wurde eine Kalibriergerade erstellt und deren Geradengleichung ($y = 0{,}0663x$) bestimmt (Abbildung 25). Mit deren Hilfe konnte dann die Proteinkonzentration des C180-Proteins bestimmt werden, wie in Tabelle 6 aufgelistet. Dazu wurde die Differenz aus den Intensitäten der Proteinbanden des C180-Proteins und den zugehörigen

Intensitäten des Hintergrundes gebildet und durch den ermittelten Wert der Geradengleichung geteilt. Der Wert dieses Quotienten wurde anschließend durch das eingesetzte Volumen an C180-Protein dividiert, um die Proteinkonzentration in ng/µl zu erhalten. Da die Signale der Proteinbanden bei 10 und 15 µl des C180-Proteins übersättigt waren, wurden diese bei der Ermittlung der Proteinkonzentration ausgeschlossen, um Verzerrungen des Mittelwerts zu vermeiden. Somit betrug die ermittelte Konzentration des aufgereinigten C180-Proteins 357 ng/µl. Mit diesem Protein wurden die Versuche der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

Tabelle 5: Gemessene Intensitäten aus dem Konzentrationsgel zur Bestimmung der Proteinkonzentration des C180-Proteins. Die Tabelle zeigt in Spalte 1 die eingesetzten Mengen an BSA-Standard [ng] (oberer Tabellenteil) und C180-Protein [µl] (unterer Tabellenteil), in Spalte 2 die gemessenen Intensitäten (I) der zugehörigen Proteinbanden, in Spalte 3 die gemessenen Intensitäten des zugehörigen Hintergrundes (H) und in Spalte 4 die Differenz der Intensitätswerte der Banden und des Hintergrundes (I – H).

BSA [ng]	Intensität (I)	Hintergrund (H)	Differenz (I – H)
0	0	0	0
125	39,98	25,27	14,71
250	44,49	20,1	24,39
500	49,25	16,26	32,99
750	72,35	17,59	54,76
1.000	76,96	17,1	59,86
C180-Protein [µl]	**Intensität (I)**	**Hintergrund (H)**	**Differenz (I – H)**
0,5	31,93	16,59	15,34
1	36,93	16,62	20,31
2,5	49,4	20,61	28,79
5	187,53	26,69	160,84

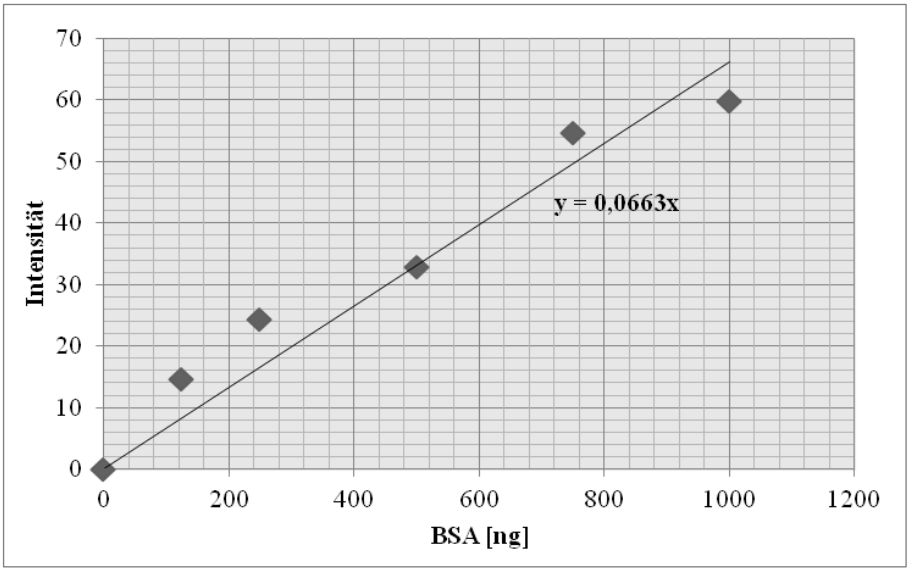


Abbildung 25: Kalibriergerade des BSA-Standards aus dem Konzentrationsgel zur Bestimmung der Proteinkonzentration des C180-Proteins. Auf der x-Achse wurden die BSA-Standards in ng abgetragen, auf der y-Achse die zugehörigen gemessenen Intensitäten. Es wurde eine Kalibriergerade eingefügt. Ihre Geradengleichung lautete: y = 0,0663x. Mit ihr konnte die Proteinkonzentration des C180-Proteins errechnet werden. BSA = bovines Serumalbumin.

Tabelle 6: Ermittlung der Proteinkonzentration des C180-Proteins. Die Tabelle enthält in Spalte 1 die eingesetzten µl des C180-Proteins, Spalte 2 zeigt den Quotienten aus der Differenz der Intensität der gemessenen Proteinbande und der Intensität des Hintergrunds (siehe Tabelle 5) geteilt durch den ermittelten Wert der Geradengleichung der Kalibriergeraden des BSA-Standards. Spalte drei gibt die errechnete Proteinkonzentration in ng/µl an und entspricht dem Quotienten „Spalte 2 / Spalte 1“. Die unterste Zeile gibt die ermittelte Proteinkonzentration des aufgereinigten C180-Proteins an. Der Wert entspricht dem Mittelwert der bestimmten Konzentrationen.

C180-Protein [µl]	Intensität – Hintergrund / y	Konzentration [ng/µl]
0,5	231,37	462,7
1	306,33	306,3
2,5	434,24	173,7
5	2425,94	485,2
Mittelwert der errechneten Konzentrationen		**357,0**

3.1.4 Prüfung der Enzymaktivität des C180-Proteins *in vitro*

Die Prüfung der Enzymaktivität des C180-Proteins wurde ausgeführt, um festzustellen, ob das soweit offenbar intakte Protein auch die erwartete Reaktion der ADP-Ribosylierung von $G_i\alpha$ katalysiert. Dies wurde *in vitro* mit CHO-K1-Lysat und CHO-K1-PNS im Vergleich zum Holotoxin Pertussistoxin analysiert.

Hierfür wurden auf Eis Proben mit Lysat respektive PNS mit 1 µl Biotin-NAD^+ (10 µM) und 1,25 µl C180-Protein (entspricht 170 ng) respektive 1,5 µl Pertussistoxin (entspricht 300 ng) vorbereitet und mit ADP-Ribosylierungspuffer für das C180-Protein auf ein einheitliches Gesamtvolumen aufgefüllt. Jeweils ein Ansatz mit Lysat respektive PNS

wurde als Negativkontrolle ohne Toxin belassen. Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben gekocht. Danach wurden eine SDS-PAGE und ein Westernblot angeschlossen. Die Membran wurde mit Strep-POD (1:2.500) inkubiert und das Biotin-markierte $G_i\alpha$ mittels ECL detektiert. Abbildung 26 zeigt das Ergebnis.

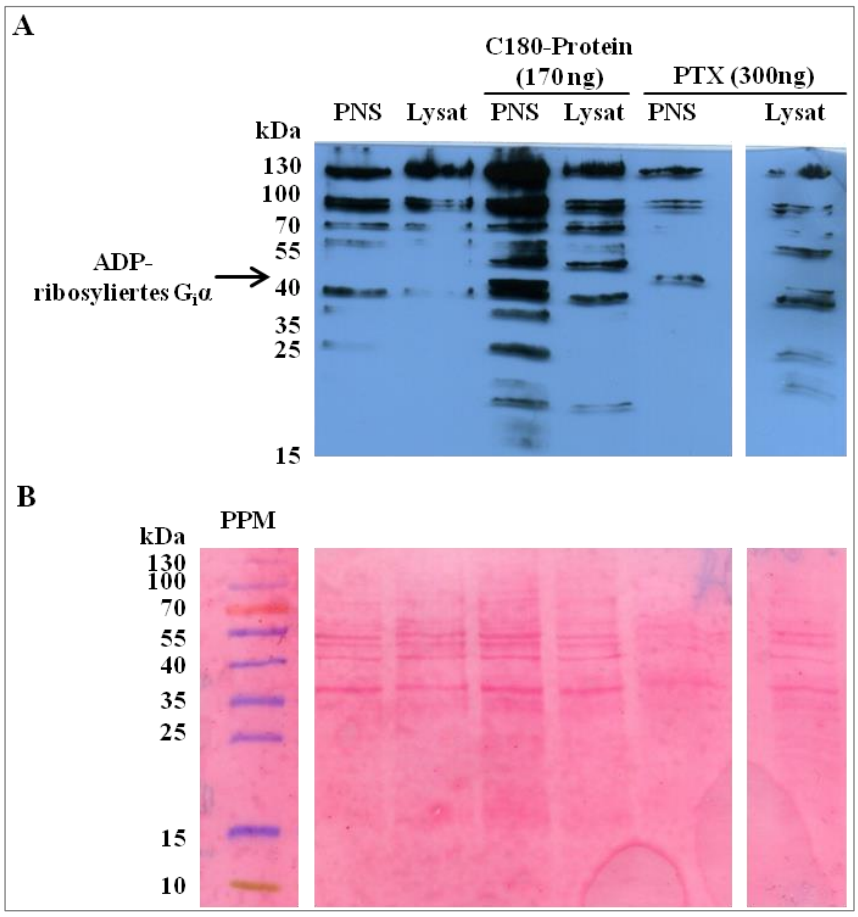


Abbildung 26: Prüfung der Enzymaktivität des C180-Proteins *in vitro*. Jeweils 40 µg des CHO-K1-PNS beziehungsweise -Lysates wurden mit 1 µl Biotin-NAD^+ (10 µM) und 1,25 µl C180-Protein (entspricht 170 ng) respektive 1,5 µl Pertussistoxin (PTX) (entspricht 300 ng) versetzt beziehungsweise als Negativkontrolle ohne Toxin belassen. Die Proben wurden mit ADP-Ribosylierungspuffer auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 6,25 µl 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT wurden die Proben für fünf Minuten bei 100 °C gekocht und in einer SDS-PAGE aufgetrennt. **A:** Mit selbstgemachtem ECL detektierte Membran der Westernblot-Analyse mit Strep-POD (1:2.500). Laufhöhe des ADP-ribosylierten $G_i\alpha$ auf etwa 41 kDa. **B:** Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulosemembran zum Nachweis vergleichbarer Proteinmengen. PPM = Prestained Protein Marker.

Die Abbildung 26 zeigt, dass die Proben mit Toxin, im Unterschied zu den nicht mit Toxin behandelten Negativkontrollen mit PNS respektive Lysat, eine prominente Bande auf der Höhe von 41 kDa aufwiesen. Diese Laufhöhe entspricht dem ADP-ribosylierten $G_i\alpha$. Die Reaktion funktionierte offenbar beim PNS besser, bei dem das Substrat $G_i\alpha$ vermehrt vorhanden ist und daher vermehrt umgesetzt werden kann, was zu deutlicheren Signalen führte. Des Weiteren zeigt die Abbildung 26, dass bei vergleichbaren eingesetzten Protein-

mengen das C180-Protein bei einer geringeren Konzentration mehr Substrat umsetzte als das Holotoxin. Jedoch setzten beide Toxine das gleiche Substrat um, wodurch für die Aufreinigung des C180-Proteins in dieser Arbeit die Enzymaktivität des C180-Proteins als erwiesen und die Menge von 170 ng für Versuche als geeignet angenommen wurde.

Die Ergebnisse der Aufreinigung des C180-Proteins, der S1-Untereinheit von Pertussistoxin, legen nahe, dass sowohl die Plasmidextraktion, -transformation und die Proteinexpression als auch die Proteinaufreinigung des C180-Proteins gelungen waren. Das C180-Protein wurde sowohl von einem anti-His-tag als auch von einem anti-PTX-S1 Antikörper erkannt. Die Proteinkonzentration der in den Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendeten Aufreinigungsfraktion des C180-Proteins betrug 357 ng/µl. Das C180-Protein war enzymatisch aktiv und ADP-ribosylierte das Substrat $G_i\alpha$ entsprechend dem Holotoxin.

3.1.5 Prüfung der Laufhöhe des Pertussistoxin-Substrates $G_i\alpha$ bei CHO-K1-Zellen

Um sowohl für die Prüfung der Enzymaktivität des C180-Proteins *in vitro* im Zuge der Aufreinigung als auch in den *in vitro* Versuchen zum Nachribosylierungstest („Ergebnisse“ (3.4)) und zum Enzymaktivitätstest („Ergebnisse“ (3.6)) der vorliegenden Arbeit eine Referenz zu haben, ob die angenommene und beschriebene Laufhöhe bei 41 kDa auch für CHO-K1-Zellen gilt, sollte in einem von Pertussistoxin oder C180-Protein unabhängigen Versuch die Laufhöhe durch einen anti-$G_i\alpha$ Antikörper sichtbar gemacht werden.
Dafür wurde CHO-K1-Zelllysat und zum Vergleich HeLa-Zelllysat (Gewinnung analog zur Herstellung des CHO-K1-Zelllysates wie unter „Material und Methoden“ (2.2.2) beschrieben) verkocht und einer SDS-PAGE unterzogen. Im Westernblot wurde zuerst mit einem anti-$G_i\alpha_3$ Antikörper (1:1.000) inkubiert und nach dem Waschen mit dem sekundären Antikörper (1:2.500). Die Detektion wurde mit ECL durchgeführt und ist in Abbildung 27 abgebildet.

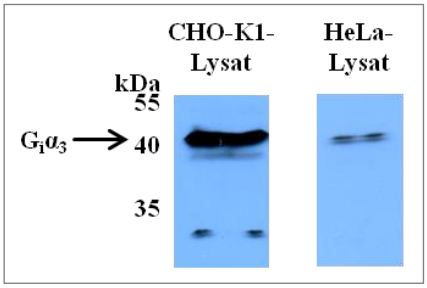


Abbildung 27: Prüfung der Laufhöhe des Pertussistoxin-Substrates $G_i\alpha$ bei CHO-K1-Zellen. 50 µg CHO-K1-Zelllysat beziehungsweise HeLa-Zelllysat wurden mit entsprechenden Mengen 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT versetzt und für zehn Minuten bei 95 °C gekocht. Die Proben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit einem anti-$G_i\alpha_3$ Antikörper (1:1.000) inkubiert. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:2.500) wurde die Membran mit industriell hergestelltem ECL detektiert. Die Laufhöhe des $G_i\alpha$ liegt bei etwa 41 kDa.

Die Abbildung 27 zeigt, dass sowohl bei der Auftrennung von CHO-K1-Zelllysat als auch bei der Auftrennung von HeLa-Zelllysat mit einem anti-$G_i\alpha_3$ Antikörper das entsprechende Protein in den jeweiligen Lysaten detektiert werden konnte. Die Laufhöhe entsprach dabei für beide Zelllysate dem in der Literatur bei Xu und Barbieri 1996 angegebenen Wert von 41 kDa. Bei gleichen eingesetzten Proteinmengen schien das CHO-K1-Zelllysat mehr Substrat $G_i\alpha$ zu enthalten. Dies könnte eine mögliche Erklärung darstellen, warum die Vergiftung von HeLa-Zellen durch Pertussistoxin weniger stark ausfällt als die der CHO-K1-Zellen. Aufgrund der Ergebnisse dieses Versuches kann eine prominente detektierbare Bande auf der Höhe von 41 kDa bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit als die Bande für $G_i\alpha$, also das Substrat von Pertussistoxin, angenommen werden.

3.2 Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin – ohne Inhibitoren

Bei den Vergiftungsversuchen wurden zu Beginn CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin vergiftet, um geeignete Versuchsbedingungen zu etablieren und zelluläre Reaktionen zu beobachten. Dabei dienten unbehandelte Kontrollzellen als Negativkontrolle. Bei diesen Versuchen sollten die geeignete Konzentration an Toxin, die geeignete Zellzahl, die optimale Zellbehandlung und Toxininkubationszeit bestimmt werden, um unter diesen geeigneten Bedingungen anschließend den Einfluss der pharmakologischen Inhibitoren auf die Vergiftung der CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin untersuchen zu können.
Im Folgenden sind die Ergebnisse der Vergiftungsexperimente von CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin ohne Inhibitoren dargestellt.

3.2.1 Morphologieänderungen von CHO-K1-Zellen bei der Vergiftung durch Pertussistoxin

Bei den Experimenten zu Morphologieänderungen von CHO-K1-Zellen bei der Vergiftung mit Pertussistoxin sollten die Veränderungen der Zellmorphologie der CHO-K1-Zellen untersucht werden und geprüft werden, ob die in der Literatur bei Hewlett *et al.* 1983 beschriebenen typischen Cluster reproduzierbar und damit für die spätere Testung der Inhibitoren geeignet sind. Dabei wurden Versuche mit dünn- und dicht-ausgesäten CHO-K1-Zellen gemacht und jeweils die morphologischen Zellveränderungen nach einer Inkubation mit Pertussistoxin nach verschiedenen Zeitabschnitten fotografisch festgehalten.

3.2.1.1 Dünn-ausgesäte Zellen – Clustering

Für Vergiftungen von CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin, die „dünn“ ausgesät wurden, das heißt die vereinzelt liegen und keinen konfluenten Zellrasen bilden, wird das Phänomen des Clusterings nach Hewlett *et al.* 1983 beschrieben. Mit diesem Begriff werden rundliche Zellanhäufungen benannt, die sich in Anwesenheit von Pertussistoxin bilden.
Für die Vergiftungsexperimente zur Morphologieänderung bei dünn-ausgesäten Zellen wurden 4 x 10^5 CHO-K1-Zellen für einen Tag in einer 24-Well-Zellkulturplatte kultiviert. Als Negativkontrolle wurden CHO-K1-Zellen unbehandelt belassen (Kontrollzellen), die anderen Zellen wurden mit 1 µg/ml Pertussistoxin inkubiert. Die Vergiftung der Zellen wurde nach verschiedenen Zeitpunkten beobachtet und fotografisch dokumentiert. Abbildung 28 zeigt exemplarisch die aufgetretenen morphologischen Veränderungen.

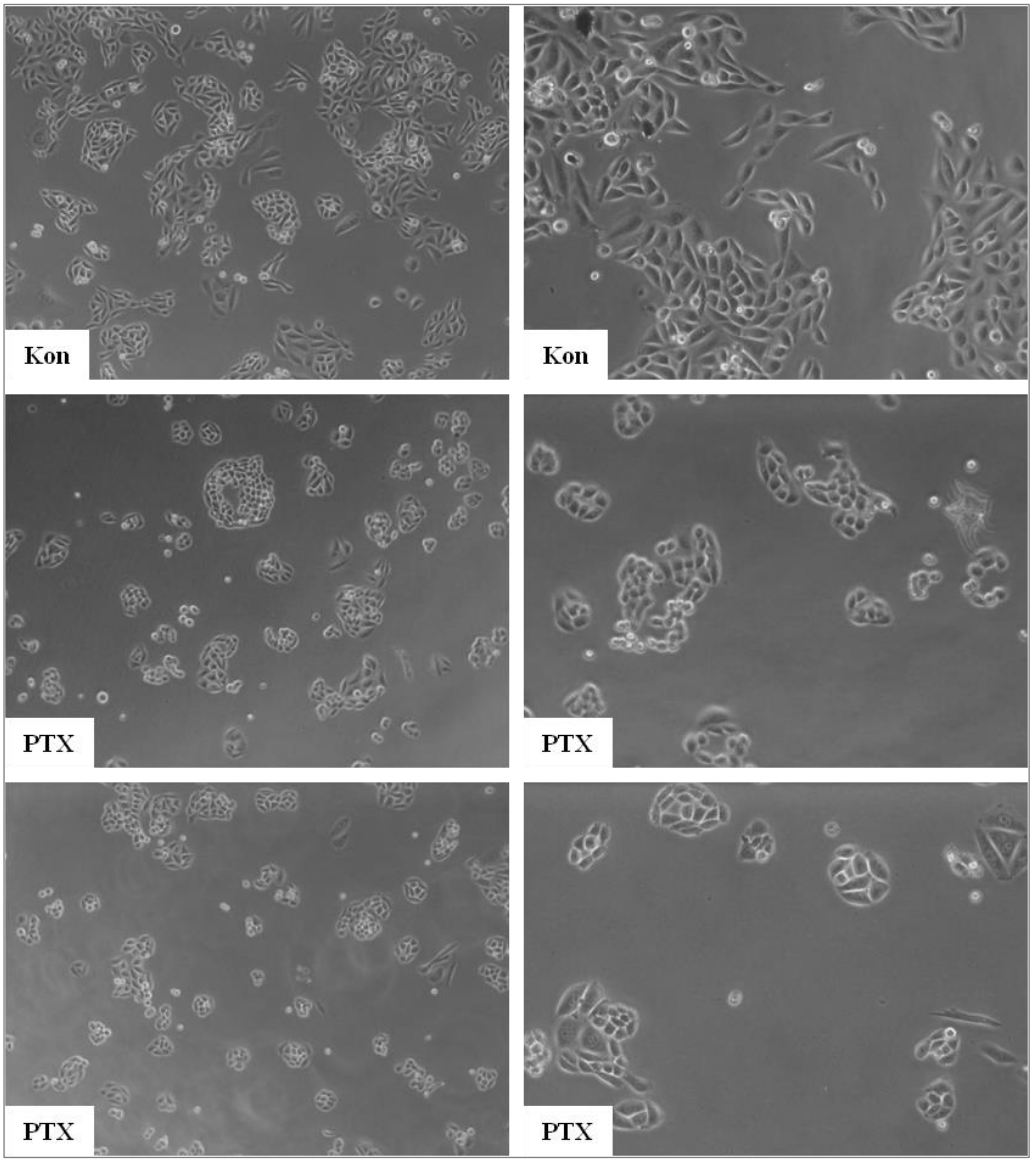


Abbildung 28: Morphologieänderung von dünn-ausgesäten CHO-K1-Zellen bei der Vergiftung mit Pertussistoxin (Clustering). Die 4 x 10^5 CHO-K1-Zellen wurden für einen Tag in einer 24-Well-Zellkulturplatte kultiviert und zu Versuchsbeginn mit frischem CHO-Medium bedeckt. Die Zellen wurden mit 1 µg/ml Pertussistoxin (PTX) inkubiert beziehungsweise als Kontrollzellen (Kon) unbehandelt belassen. Die Morphologie der Zellen ist auf den Fotos exemplarisch für den Zeitwert nach 24 Stunden dargestellt. Die linke Spalte wurde mit 10-facher Vergrößerung aufgenommen, die rechte Spalte mit 20-facher Vergrößerung.

Das Ergebnis des Vergiftungsexperiments mit dünn-ausgesäten CHO-K1-Zellen und Pertussistoxin in Abbildung 28 zeigt, dass im Vergleich zu den zum Beobachtungs-zeitpunkt nach 24 Stunden dichteren unbehandelten Kontrollzellen die mit Toxin behandelten Zellen weniger dicht waren und die für Pertussistoxin typischen Cluster zeigten. Die dünn-ausgesäten CHO-K1-Zellen lagerten sich dabei zu rundlichen Zellanhäufungen zusammen, was als Clustering beschrieben ist. Das Experiment zeigte, dass unter diesen Versuchsbedingungen bei dünn-ausgesäten Zellen das Clustering

reproduziert werden konnte und damit die gewählten Bedingungen für weitere Experimente zur Testung der Inhibitoren im Zellversuch herangezogen werden konnten.

3.2.1.2 Dicht-ausgesäte Zellen – Aufreißen des Zellrasens

Bei Vergiftungen mit Pertussistoxin von CHO-K1-Zellen, die „dicht“ ausgesät wurden, das heißt, die einen subkonfluenten Zellrasen bilden, tritt das Phänomen des Aufreißens der Monolayerstruktur der Zellen auf. Unter diesem Begriff wird das Auseinanderweichen von Zellen unter Auflösung des subkonfluenten Zellrasens verstanden. In Anwesenheit von Pertussistoxin bilden sich dann ebenfalls Cluster.

Für die Vergiftungsexperimente zur Morphologieänderung bei dicht-ausgesäten Zellen wurden 1 x 10^6 CHO-K1-Zellen für einen Tag in einer 24-Well-Zellkulturplatte kultiviert. Als Negativkontrolle wurden CHO-K1-Zellen unbehandelt belassen (Kontrollzellen), die anderen Zellen wurden mit 10 ng/ml Pertussistoxin inkubiert. Die Vergiftung der Zellen wurde nach 24 Stunden beobachtet und fotografisch dokumentiert. Abbildung 29 gibt exemplarisch die auftretenden morphologischen Veränderungen wieder.

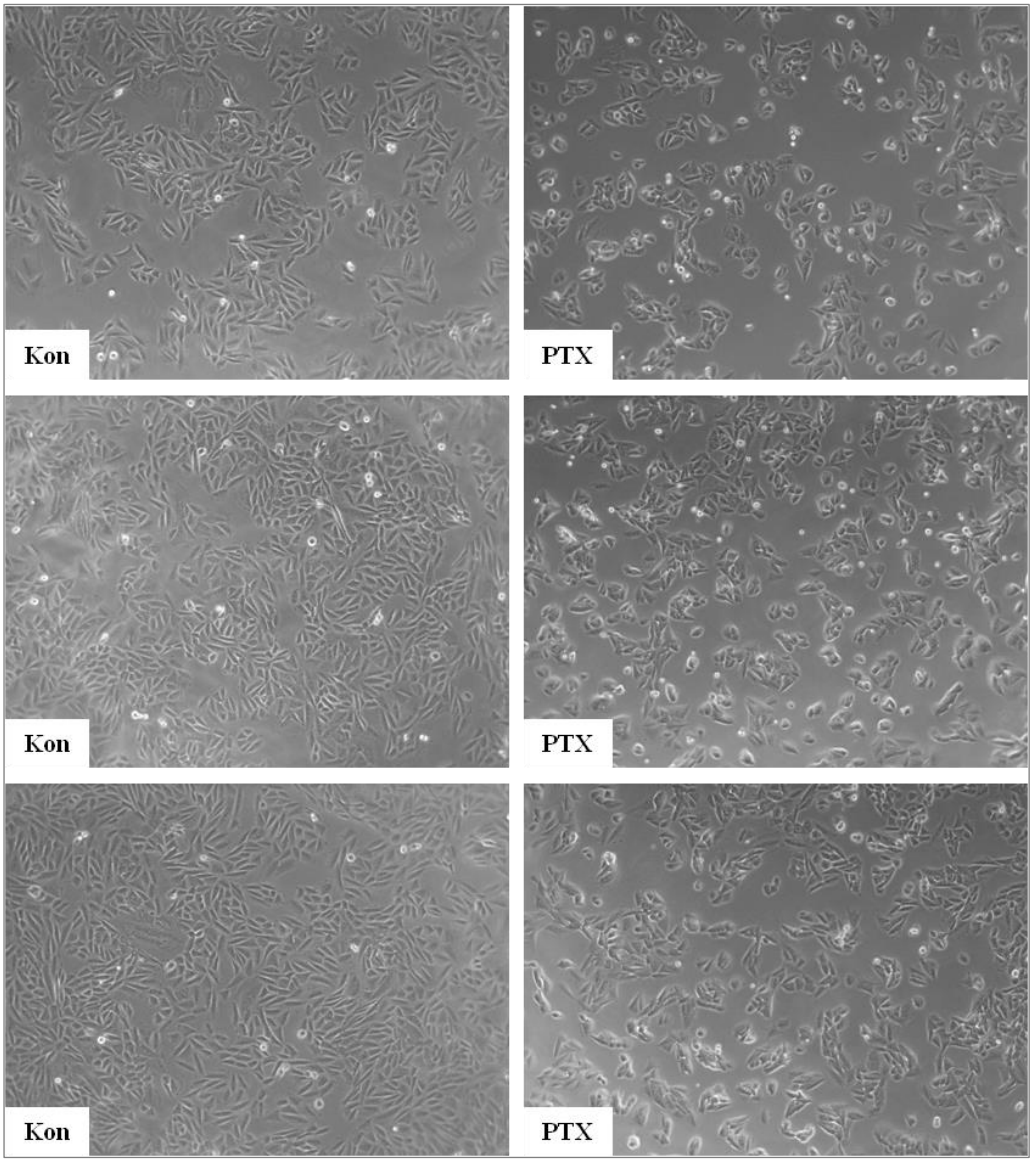


Abbildung 29: Morphologieänderung von dicht-ausgesäten CHO-K1-Zellen bei der Vergiftung mit Pertussistoxin (Aufreißen des Zellrasens). Die 1 x 10^6 CHO-K1-Zellen wurden für einen Tag in einer 24-Well-Zellkulturplatte kultiviert, zu Versuchsbeginn einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen und mit 250 µl frischem CHO-Medium bedeckt. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml Pertussistoxin (PTX) inkubiert beziehungsweise als Kontrollzellen (Kon) unbehandelt belassen. Die Morphologie der Zellen ist auf den Fotos exemplarisch für den Zeitwert nach 24 Stunden dargestellt und wurde auf 10 x Vergrößerung unter dem Mikroskop aufgenommen.

Das Ergebnis des Vergiftungsexperiments mit dicht-ausgesäten CHO-K1-Zellen und Pertussistoxin in Abbildung 29 zeigt, dass die unbehandelten Kontrollzellen zum Beobachtungszeitpunkt nach 24 Stunden dichter und subkonfluent gewachsen waren. Im Vergleich dazu zeigte sich bei den mit Pertussistoxin vergifteten Zellen kein subkonfluenter Zellrasen, sondern vereinzelte und in Gruppen liegende Zellen, die sich in Clustern zusammen gelagert hatten, was das für Pertussistoxin typische Aufreißen des Zellrasens darstellt.

3.2.2 Vergiftung von CHO-K1-Zellen mit abnehmender Konzentration an Pertussistoxin

Der Vergiftungsversuch von CHO-K1-Zellen mit abnehmender Konzentration an Pertussistoxin wurde durchgeführt, um eine geeignete Konzentration an Pertussistoxin für die Vergiftungsversuche zu ermitteln. Des Weiteren sollte der Versuch Hinweise auf die morphologischen Veränderungen unter einer Vergiftung mit geringsten Konzentrationen an Toxin liefern, um die toxische Potenz von Pertussistoxin zu demonstrieren.

Dafür wurden 3 x 10^5 CHO-K1-Zellen für zwei Tage in einer 24-Well-Zellkulturpatte kultiviert. Zu Versuchsbeginn wurde das Medium gewechselt und ein Well als Negativkontrolle ohne Toxin belassen. Elf weitere Wells wurden mit Toxin behandelt, wobei ins erste Well 1 µg/ml Toxin gegeben wurde und in jedes weitere Well eine 1:10 Verdünnung des vorherigen Wells. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C inkubiert, ihre Morphologie in definierten Zeitabständen beobachtet und fotografisch dokumentiert. Abbildung 30 zeigt exemplarisch die Morphologie der Zellen nach 24 Stunden.

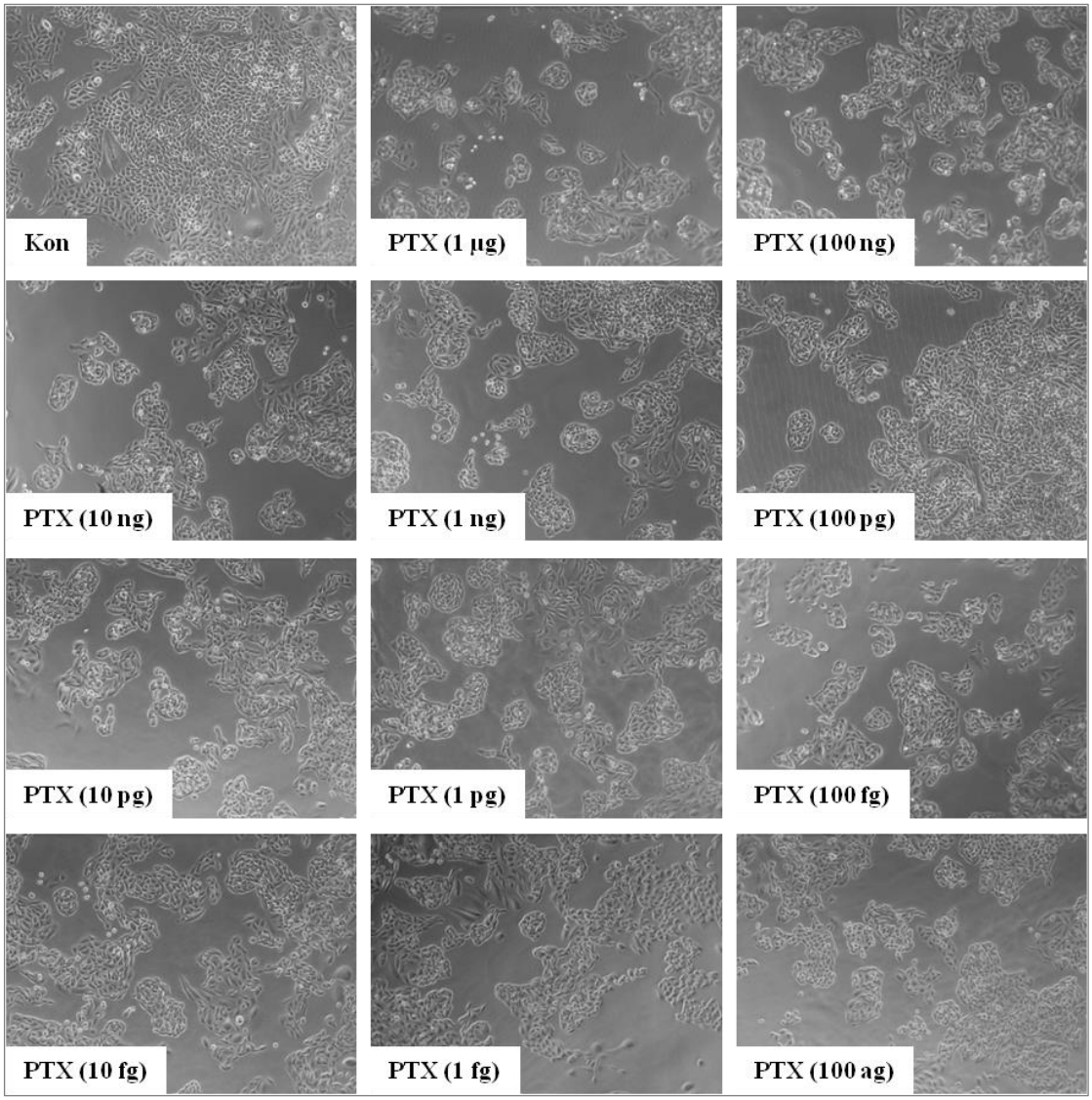


Abbildung 30: Vergiftung von CHO-K1-Zellen mit abnehmender Konzentration an Pertussistoxin. Die 3 x 10^5 CHO-K1-Zellen wurden für zwei Tage in einer 24-Well-Zellkulturplatte kultiviert und zu Versuchsbeginn mit frischem CHO-Medium versorgt. Ein Well wurde als Negativkontrolle unbehandelt belassen (Kon). Die restlichen Wells wurden mit Pertussistoxin (PTX) in absteigender Konzentration vergiftet (Toxinmenge jeweils angegeben). Die Verdünnungsreihe wurde mit 1 µg/ml Pertussistoxin begonnen und davon wurden 1:10 Verdünnungen in das jeweils darauffolgende Well für zehn weitere Wells gemacht. Hier ist exemplarisch die fotografische Dokumentation nach 24 Stunden auf 10 x Vergrößerung unter dem Mikroskop dargestellt. ag = Attogramm = 10^{-18}.

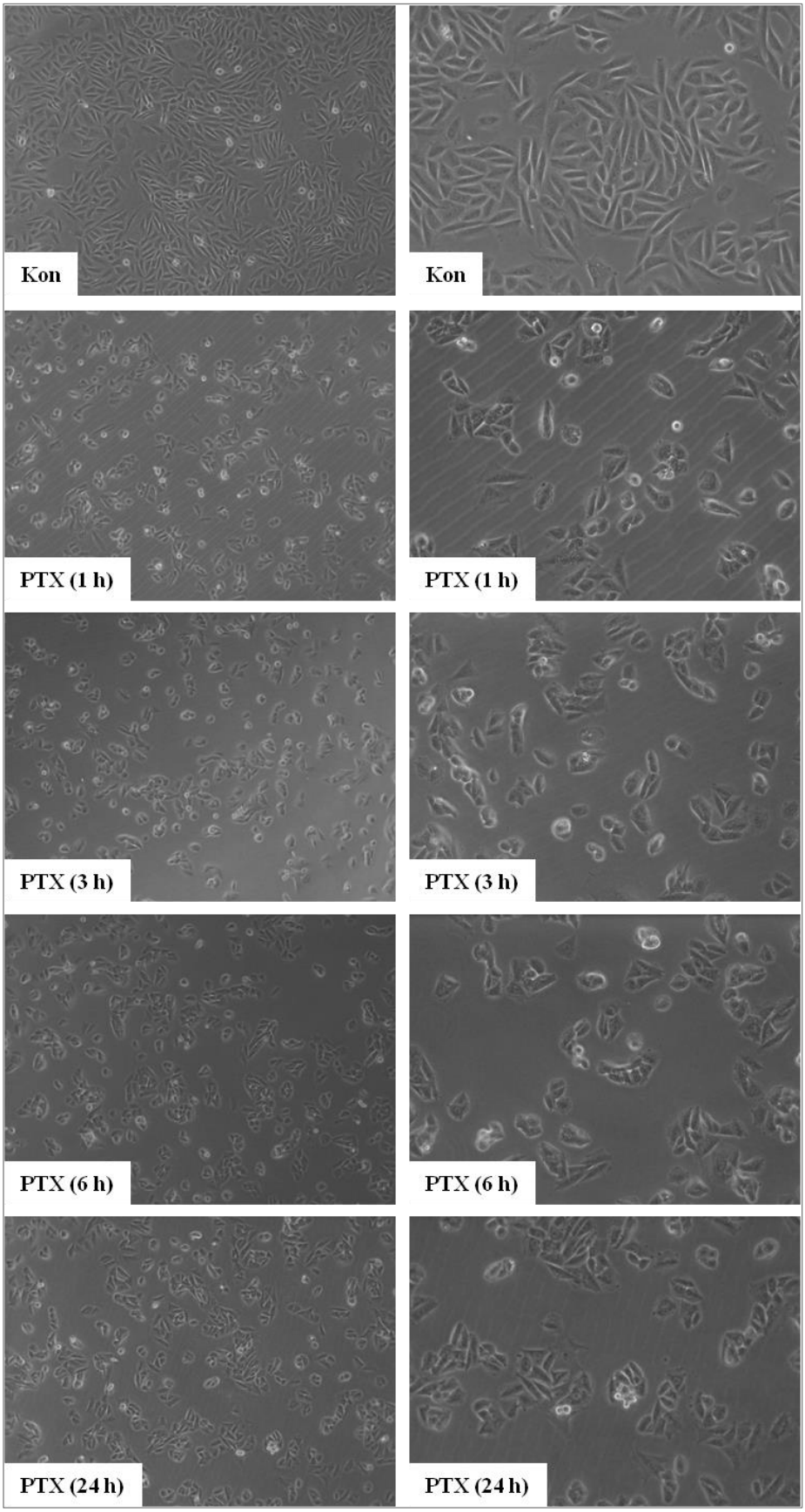
Das Vergiftungsexperiment von CHO-K1-Zellen mit abnehmender Konzentration an Pertussistoxin in Abbildung 30 zeigt, dass ausgehend von 1 µg/ml Pertussistoxin bis zu einer Menge von 100 ag Pertussistoxin alle CHO-K1-Zellen nach einer Beobachtungszeit von 24 Stunden die typische Morphologie der Cluster zeigten, die auf eine Vergiftung der CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin hindeutet. Das Experiment zeigte somit, dass auch geringste Konzentrationen des Toxins ausreichten, um die Zellen zu vergiften und die typische Morphologieänderung zu bewirken. Die toxische Potenz von Pertussistoxin war

also sehr hoch. Aus diesem Experiment wurden 10 ng/ml Pertussistoxin als Konzentration für die Vergiftungsexperimente mit Inhibitoren bestimmt.

3.2.3 Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin nach zeitabhängiger Toxinentfernung

Das Vergiftungsexperiment von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin nach zeitabhängiger Toxinentfernung wurde durchgeführt, um zu sehen, ob der allgemeine Zellzustand der CHO-K1-Zellen nach einer kürzeren Toxininkubationszeit zum Beobachtungszeitpunkt nach 24 Stunden besser ist und weniger abgerundete Zellen vorhanden sind als unter einer Toxineinwirkung von 24 Stunden. Außerdem sollte der Versuch Hinweise darauf geben, ob eine Toxinentfernung sich auf die Vergiftung auswirkt und gegebenenfalls wie, respektive ob es eine Zeitspanne gibt, für die die Zellen mindestens mit dem Toxin inkubiert werden müssen, um anschließend morphologisch sichtbare Vergiftungszeichen zu entwickeln.

Für das Experiment wurden 1 x 10^6 CHO-K1-Zellen für einen Tag in einer 24-Well-Zellkulturpatte kultiviert. Einige Wells wurden als Negativkontrolle ohne Toxinbehandlung belassen. Die restlichen Wells wurden mit 10 ng/ml Pertussistoxin behandelt und für eine, drei, sechs und 24 Stunden mit dem Toxin inkubiert. Nach diesen Zeiten wurde das Medium mit Toxin entfernt und die Zellen mit frischem CHO-Medium bedeckt. Die Zellen wurden nach 24 Stunden auf ihre Morphologie untersucht und die Ergebnisse fotografisch dokumentiert. Abbildung 31 zeigt für alle Zeitwerte zwei Aufnahmen in unterschiedlicher Vergrößerung.



Fortsetzung der Abbildung 31 auf Seite 93.

Fortsetzung der Abbildung 31 von Seite 92.

Abbildung 31: Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin nach zeitabhängiger Toxinentfernung. Die 1 x 10^6 CHO-K1-Zellen wurden für einen Tag in einer 24-Well-Zellkulturplatte kultiviert und zu Versuchsbeginn einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen und mit 250 µl frischem CHO-Medium bedeckt. Als Negativkontrolle wurden Zellen unbehandelt belassen (Kon). Die restlichen Wells wurden jeweils mit 10 ng/ml Pertussistoxin (PTX) vergiftet und für die angegebenen Zeiten mit Toxin inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurde das Toxin mit Medium entfernt und frisches Medium zugegeben Die fotografische Dokumentation erfolgte nach 24 Stunden auf 10 x Vergrößerung (linke Spalte) und 20 x Vergrößerung (rechte Spalte) unter dem Mikroskop.

Das Vergiftungsexperiment von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin nach zeitabhängiger Toxinentfernung in Abbildung 31 zeigt, dass nach allen Inkubationszeiten (nach einer, drei, sechs und 24 Stunden), nach welchen Pertussistoxin durch Medienwechsel entfernt worden war, Cluster sichtbar waren, also Vergiftungszeichen auftraten. Anhand der Morphologie ließ sich kein Unterschied in der Inkubationszeit erkennen. Das heißt, dass auch eine einstündige Inkubationszeit mit Pertussistoxin genügte, um nach 24 Stunden die typische Morphologie der Cluster bei CHO-K1-Zellen erkennen zu können und sich nicht wie bei den unbehandelten Kontrollzellen ein Zellrasen ohne Cluster ausbildete. Bezüglich der Frage des besseren allgemeinen Zellzustandes der CHO-K1-Zellen wurde aus diesem Experiment der Schluss gezogen, dass das Toxin nach ein bis zwei Stunden durch Medienwechsel für weitere Versuche von den Zellen entfernt werden sollte, da die CHO-K1-Zellen dann weniger stark abrunden bei weiterhin sichtbaren Vergiftungszeichen.

3.2.4 Vergiftung von *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin

Um eine zweite Methode für die Testung der pharmakologischen Inhibitoren zu etablieren, wurden in Vorversuchen auch die morphologischen Veränderungen einer Vergiftung mit Pertussistoxin auf *nicht-adhärente* CHO-K1-Zellen untersucht und beobachtet, ob es dabei Gemeinsamkeiten beziehungsweise Unterschiede zu einer Vergiftung von *adhärenten* CHO-K1-Zellen gibt.

Hierzu wurde der Vergiftungstest 2 (ohne Inhibitoren) als Versuchsprotokoll genutzt, der unter „Material und Methoden“ (2.2.11.2) ausführlich beschrieben ist. Dieser wurde nach dem CHO-Zell-Test von Pootong *et al.* 2007 abgeleitet und für die Testung der pharmakologischen Inhibitoren weiterentwickelt und abgewandelt.

Bei diesem Vergiftungstest wurden zuerst 5 x 10^5 CHO-K1-Zellen in einer 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät und für zwei Tage in CHO-Medium kultiviert. Zu Versuchsbeginn wurden die Zellen gewaschen und mit Trypsin behandelt, um die Zellen abzulösen und in eine 96-Well-Zellkulturplatte transferieren zu können. Die Trypsinreaktion wurde durch die Zugabe von CHO-Medium gestoppt, die

Zellsuspensionen in separate Eppendorfgefäße überführt, zentrifugiert und die Pellets in frischem CHO-Medium resuspendiert. Mit Hilfe der Multikanalpipette wurden die Zellen dann in eine 96-Well-Zellkulturplatte überführt, in welche zuvor je Well CHO-Medium (Negativkontrolle) beziehungsweise ein CHO-Medium-Toxin-Gemisch mit 10 ng/ml Pertussistoxin vorgelegt worden war. Nach 18 bis 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen auf ihre Morphologie mikroskopisch untersucht und fotografisch dokumentiert. Einige dieser Bilder sind exemplarisch in den Abbildungen 32 und 33 dargestellt.

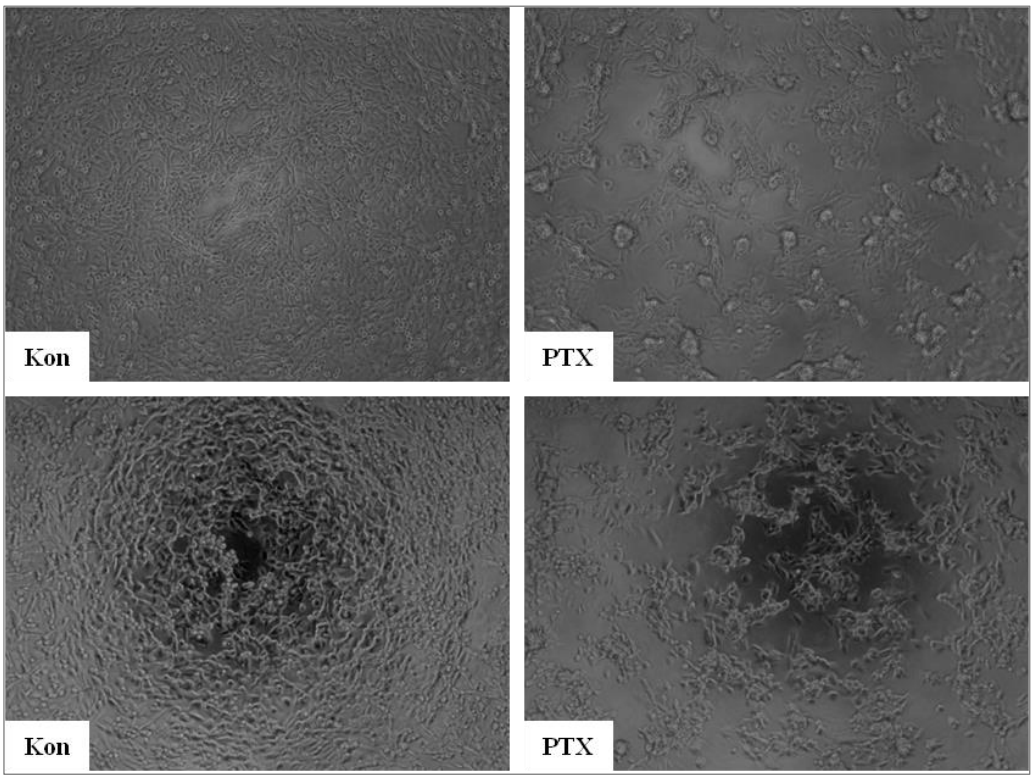


Abbildung 32: Vergiftung von *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin (Vergiftungstest 2). 5 x 10^5 CHO-K1-Zellen wurden für zwei Tage in einer 6-Well-Zellkulturplatte kultiviert und zu Versuchsbeginn einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 200 µl Trypsin je Well abgelöst, sodass die Zellen im Medium schwammen. Die Trypsinreaktion wurde durch die Zugabe von 800 µl CHO-Medium gestoppt, die Zellen in Eppendorfgefäße überführt und für fünf Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml frischem CHO-Medium resuspendiert und mit der Multikanal-pipette wurden die *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen auf eine 96-Well-Zellkulturplatte überführt. Diese Zellkulturplatte war zuvor mit 100 µl CHO-Medium je Well (Negativkontrolle) beziehungsweise mit 100 µl eines CHO-Medium-Toxin-Gemisches (10 ng/ml Pertussistoxin (PTX)) vorbereitet worden. Die Morphologie der Zellen wurde nach 24 Stunden untersucht und fotografisch dokumentiert: Übersichtsaufnahmen auf 5 x Vergrößerung (obere Zeile) und Detailaufnahmen auf 10 x Vergrößerung (untere Zeile).

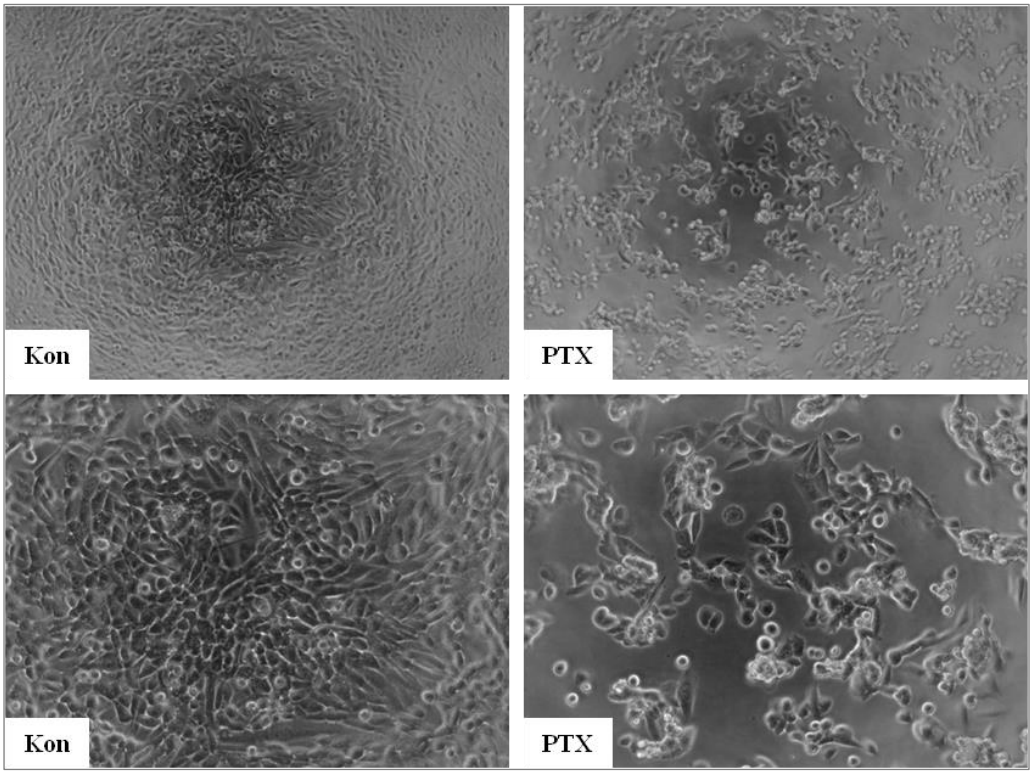


Abbildung 33: Vergiftung von *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin (Vergiftungstest 2). 5 x 10^6 CHO-K1-Zellen wurden für einen Tag in einer 6-Well-Zellkulturplatte kultiviert und zu Versuchsbeginn einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann mit 200 µl Trypsin je Well abgelöst, sodass die Zellen im Medium schwammen. Die Trypsinreaktion wurde durch die Zugabe von 800 µl CHO-Medium gestoppt, die Zellen in Eppendorfgefäße überführt und für fünf Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml frischem CHO-Medium resuspendiert und mit der Multikanalpipette wurden die *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen auf eine 96-Well-Zellkulturplatte überführt. Diese Zellkulturplatte war zuvor mit 100 µl CHO-Medium je Well (Negativkontrolle) beziehungsweise mit 100 µl eines CHO-Medium-Toxin-Gemisches (10 ng/ml Pertussistoxin (PTX)) vorbereitet worden. Die Morphologie der Zellen wurde nach 24 Stunden untersucht und fotografisch dokumentiert: Übersichtsaufnahmen auf 10 x Vergrößerung (obere Zeile) und Detailaufnahmen auf 20 x Vergrößerung (untere Zeile).

Die Ergebnisse der morphologischen Veränderungen von *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen bei einer Vergiftung mit Pertussistoxin zeigen die Abbildungen 32 und 33. Dabei zeigt sich vor allem bei Abbildung 32 durch die weniger starke Vergrößerung bei der Aufnahme das für Pertussistoxin typische Clustering mit mehr 3D-Effekt, da die Zellen zum Zeitpunkt der Vergiftung nicht adhärent waren. Die Abbildung 32 zeigt des Weiteren, dass bei der Vergiftung *nicht-adhärenter* CHO-K1-Zellen auch abgerundete Zellen unter dem Einfluss von Pertussistoxin Cluster gebildet hatten. Im Vergleich dazu hatten die unbehandelten Kontrollzellen keine Cluster gebildet und es waren mehr Zellen zu erkennen. Diese Tendenz wird auch von Abbildung 33 bestätigt, bei der in der Detailaufnahme mit 20 x Vergrößerung der Unterschied der Zellzahl von unbehandelten Kontrollzellen zu mit Pertussistoxin vergifteten Zellen deutlicher sichtbar war. Hier hatten

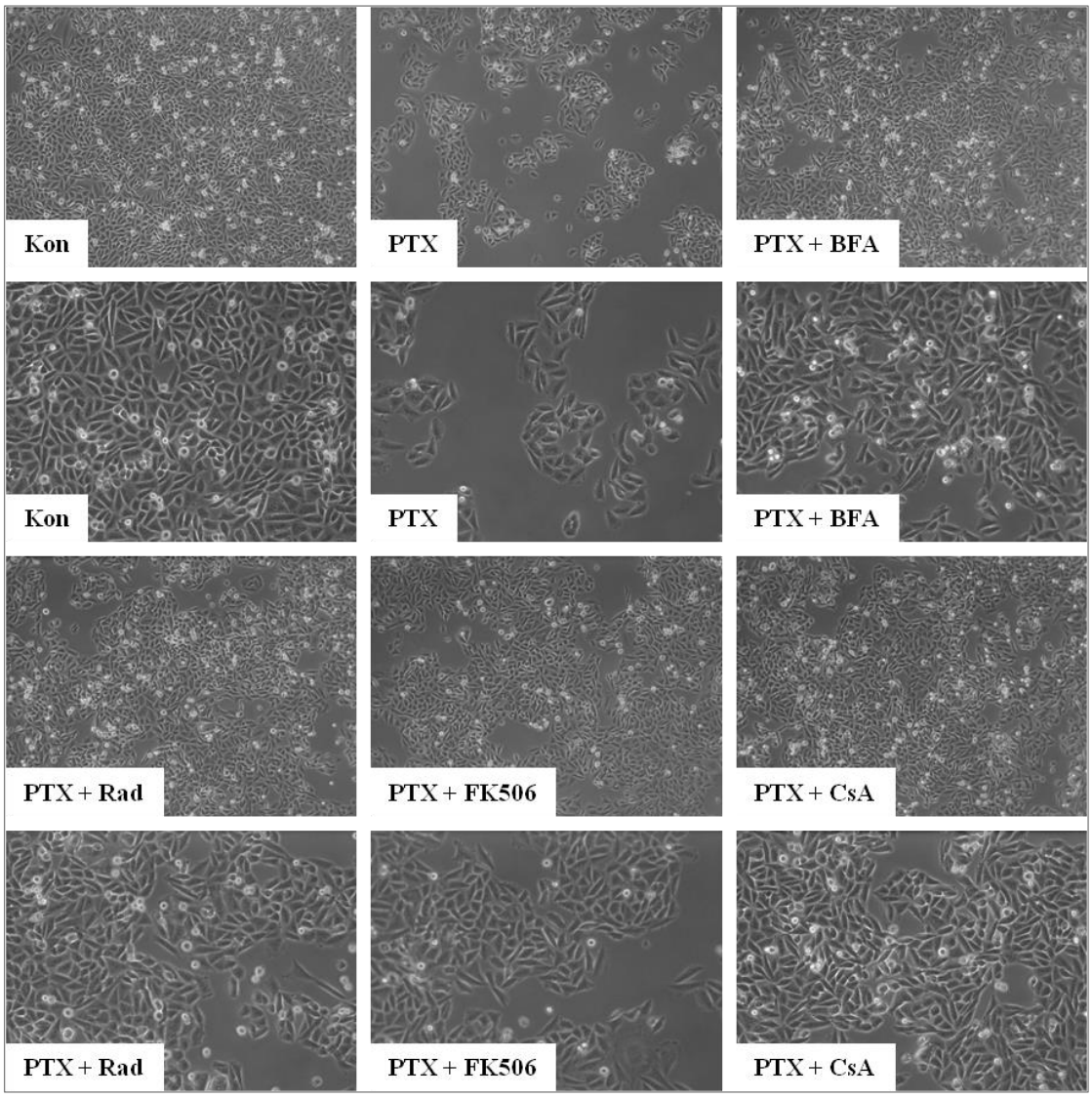
die mit Pertussistoxin vergifteten Zellen keinen Zellrasen ausgebildet, sondern lagen in den typischen Clustern vor.
Da auch bei diesem Ansatz mit *nicht-adhärenten* Zellen eindeutige Unterschiede in der Morphologie von CHO-K1-Zellen nach der Vergiftung mit Pertussistoxin sichtbar waren, sollte dieser Ansatz auch zur Testung der pharmakologischen Inhibitoren verwendet werden.

3.3 Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin – mit Inhibitoren

Das Ziel der Vergiftungsexperimente von CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin und dem Einsatz der pharmakologischen Inhibitoren war es, zu prüfen, ob die Inhibitoren einen hemmenden Effekt auf die Vergiftung der Zellen durch Pertussistoxin haben. Als Inhibitoren wurden Radicicol, das Hsp90 inhibiert, FK506, das FK506-Bindeproteine inhibiert, und Cyclosporin A, das Cyclophiline inhibiert, eingesetzt. Bei den Versuchen dienten unbehandelte Kontrollzellen als Negativkontrolle und nur mit Pertussistoxin behandelte Zellen als Positivkontrolle. Als weitere Kontrolle und Referenzsubstanz für die Inhibitoren wurde der Inhibitor Brefeldin A verwendet, da sein inhibitorischer Effekt auf die Aufnahme von Pertussistoxin bereits etabliert ist.
Es wurden zwei verschiedene Vergiftungstests eingesetzt, wie unter „Material und Methoden“ (2.2.11.2) ausführlich beschrieben: Vergiftungstest 1 mit *adhärenten* Zellen und Vergiftungstest 2 mit *nicht-adhärenten* Zellen, der nach der Methode des CHO-Zell-Tests von Pootong *et al.* 2007 abgeleitet und für die Testung der pharmakologischen Inhibitoren modifiziert worden war. Es wurden diese beiden Vergiftungstests für die Fragestellung gewählt, da *nicht-adhärente* Zellen auf den Einfluss von Substanzen in anderer Weise reagieren können als *adhärente* Zellen, da sie suszeptibler sind. Außerdem sollten mit einem zweiten, unterschiedlichen Versuchsansatz die Ergebnisse des Vergiftungstests 1 geprüft werden.
Im Rahmen der beiden Versuchsprotokolle wurden jeweils für die Lösungsmittel der Inhibitoren in Anwesenheit von Pertussistoxin toxische Eigeneffekte auf die CHO-K1-Zellen oder ein inhibitorischer Effekt auf die Vergiftung ausgeschlossen, sowie Effekte der inhibitorischen Substanzen und deren Lösungsmittel auf CHO-K1-Zellen in Abwesenheit von Pertussistoxin. Die entsprechenden Ergebnisse dieser Kontrollversuche sind unter „Ergebnisse“ (3.3.4 und 3.3.5) dargestellt.

3.3.1 Einfluss der pharmakologischen Inhibitoren auf die Vergiftung von *adhärenten* CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin (Vergiftungstest 1)

Beim Vergiftungstest 1 sollte der Einfluss der Inhibitoren auf *adhärente* Zellen untersucht werden, die wahlweise „dünn“ oder „dicht“ ausgesät und für einen oder zwei Tage in CHO-Medium kultiviert wurden. Zu Versuchsbeginn wurden die Zellen gewaschen und mit den Inhibitoren in einer Konzentration von 10 µM für 30 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurde Pertussistoxin in einer Konzentration von 10 ng/ml zugegeben, für eineinhalb bis zwei Stunden inkubiert und durch einen Medienwechsel entfernt. Nach 18 bis 24 Stunden wurden die Zellen auf ihre Morphologie untersucht und das Ergebnis fotografisch dokumentiert. Zur quantitativen Bestimmung der Morphologie-unterschiede wurden die Gesamtzellzahlen der Bilder ermittelt und statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 34 dargestellt.



Fortsetzung der Abbildung 34 auf Seite 98.

Fortsetzung der Abbildung 34 von Seite 97.

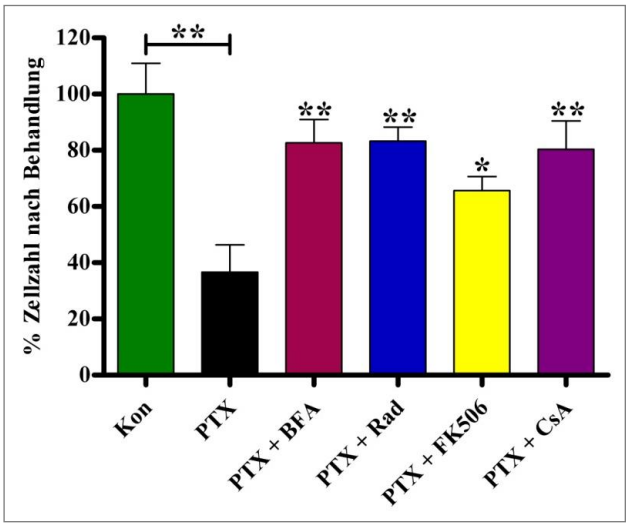


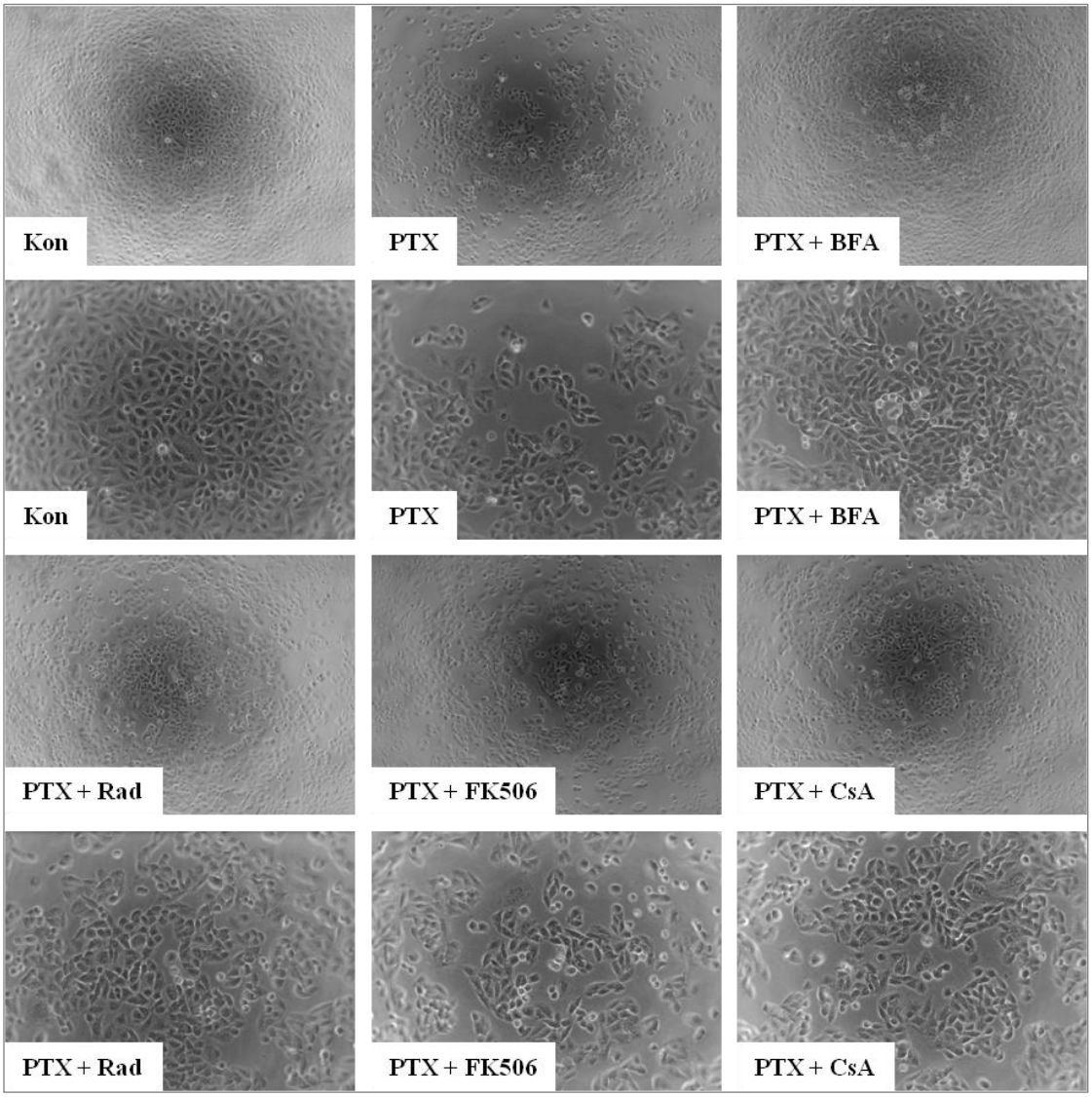
Abbildung 34: Einfluss der pharmakologischen Inhibitoren Brefeldin A, Radicicol, FK506 und Cyclosporin A auf die Vergiftung von *adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin (Vergiftungstest 1). 2,5 x 10^5 CHO-K1-Zellen wurden für zwei Tage in einer 12-Well-Zellkulturplatte kultiviert und für 30 Minuten mit 10 µM der Inhibitoren Brefeldin A (BFA), Radicicol (Rad), FK506 und Cyclosporin A (CsA) vorinkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen unbehandelt belassen (Kon), als Positivkontrolle wurden Zellen nur mit Pertussistoxin (PTX) vergiftet. Nach der Vorinkubation wurde 10 ng/ml Pertussistoxin zugegeben und für 75 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und mit 500 µl frischem CHO-Medium bedeckt. Die Morphologie der Zellen wurde nach 18 Stunden untersucht und fotografisch dokumentiert. Übersichtsaufnahmen auf 10 x Vergrößerung (erste und dritte Zeile) und Detailaufnahmen auf 20 x Vergrößerung (zweite und vierte Zeile). Für die quantitative Analyse wurden die Gesamtzellzahlen der Zellbilder auf 20 x Vergrößerung bestimmt und statistisch ausgewertet. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n = 3). Für die Bestimmung der Signifikanzen wurde der Student's t-test für zwei unabhängige Proben verwendet. Der Wert der mit Pertussistoxin behandelten Zellen bezieht sich auf den Vergleich mit den Kontrollzellen, der Wert für die mit Inhibitor und Toxin behandelten Zellen bezieht sich auf den Vergleich mit den mit Pertussistoxin behandelten Zellen („ns" = „nicht signifikant", „*" = „$p < 0,05$", „**" = „$p < 0,01$" und „***" = „$p < 0,0005$"). Für die grafische Darstellung in relativen Zellzahlen wurden die unbehandelten Kontrollzellen als Vergleichswert auf 100 % festgesetzt, die anderen Behandlungen wurden anteilig an diesen 100 % ausgegeben.

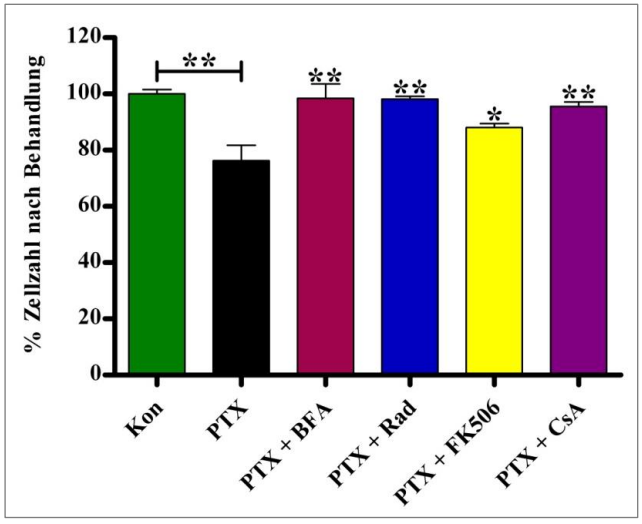
Die morphologischen Veränderungen, die sich bei der Vergiftung von *adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin unter Verwendung der pharmakologischen Inhibitoren zeigten, sind in Abbildung 34 dargestellt. Sowohl in den Übersichtsaufnahmen bei 10 x Vergrößerung als auch in den Detailaufnahmen bei 20 x Vergrößerung ließ sich erkennen, dass im Vergleich zu einem fast konfluenten Zellrasen bei den unbehandelten Kontrollzellen kein dichter Zellrasen bei den mit Pertussistoxin vergifteten Zellen auftrat. Dort fanden sich weniger Zellen, die in den für Pertussistoxin typischen Clustern vorlagen. Zellen, die vor der Vergiftung mit Brefeldin A behandelt worden waren, zeigten dagegen ein vergleichbares Wachstum wie die Kontrollzellen. Im Vergleich zu den mit Pertussistoxin behandelten Zellen zeigten sich kaum Cluster in Anwesenheit von Brefeldin A und Pertussistoxin. Die eingesetzten und zu testenden Inhibitoren Radicicol, FK506 und Cyclosporin A führten bei der Vergiftung mit Pertussistoxin morphologisch zu einem

ähnlichen Bild wie der Inhibitor Brefeldin A. Es waren dabei mehr Zellen vorhanden und weniger Cluster als bei den mit Pertussistoxin behandelten Zellen ohne Inhibitoren. Dieser Effekt war bei den Inhibitoren Radicicol und Cyclosporin A etwas stärker ausgeprägt als für FK506. Die morphologischen Veränderungen spiegelten sich auch in der quantitativen Analyse der ausgezählten Gesamtzellzahlen wider. Im Vergleich zu den Kontrollzellen fand bei der Vergiftung von CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin eine signifikante Zellzahlreduktion statt. Unter dem Einsatz von Brefeldin A und den Testsubstanzen Radicicol, FK506 und Cyclosporin A bei der Vergiftung mit Pertussistoxin waren mehr Zellen vorhanden als bei den mit Pertussistoxin inkubierten Zellen ohne Inhibitoren. Die Inhibitoren hatten somit einen Hemmeffekt auf die Wirkung von Pertussistoxin, der aber die Vergiftung nicht vollständig verhinderte, sondern deutlich verzögerte. Das morphologisch etwas weniger dichte Zellbild bei FK506 und Pertussistoxin spiegelte sich auch quantitativ durch eine etwas geringere Zellzahl und eine damit verbundene schwächere Signifikanz wider. Jedoch verzögerte auch FK506 die Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin eindeutig.

3.3.2 Einfluss der pharmakologischen Inhibitoren auf die Vergiftung von *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin (Vergiftungstest 2)

Beim Vergiftungstest 2 sollte der Einfluss der Inhibitoren auf *nicht-adhärente* Zellen bei der Vergiftung mit Pertussistoxin untersucht werden. Dafür wurden zuerst für zwei Tage kultivierte, adhärente CHO-Zellen mit den Inhibitoren in einer Konzentration von 10 µM für 30 bis 45 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurden diese Zellen mit Trypsin abgelöst und in eine 96-Well-Zellkulturplatte überführt, in die zuvor CHO-Medium ohne beziehungsweise mit Pertussistoxin in einer Konzentration von 10 ng/ml vorgelegt worden war. Nach 18 bis 24 Stunden wurden die Zellen auf ihre Morphologie untersucht und das Ergebnis fotografisch dokumentiert. Zur quantitativen Bestimmung der Morphologieunterschiede wurden die Gesamtzellzahlen der Bilder ermittelt und statistisch ausgewertet. Um die Zellen besser unter dem Mikroskop beobachten zu können, wurden sie teilweise in PFA fixiert. Die Versuchsergebnisse sind in Abbildung 35 dargestellt.





Fortsetzung der Abbildung 35 auf Seite 101.

Fortsetzung der Abbildung 35 von Seite 100.

Abbildung 35: Einfluss der pharmakologischen Inhibitoren Brefeldin A, Radicicol, FK506 und Cyclosporin A auf die Vergiftung von *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin (Vergiftungstest 2). 5 x 10^5 CHO-K1-Zellen wurden für zwei Tage in einer 6-Well-Zellkulturplatte kultiviert und zu Versuchsbeginn mit 10 µM der Inhibitoren für 30 Minuten vorinkubiert. Die Zellen wurden dann einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen und durch 200 µl Trypsin je Well abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde durch die Zugabe von 800 µl CHO-Medium gestoppt, die Zellen in Eppendorfgefäße überführt und für fünf Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml frischem CHO-Medium resuspendiert und mit der Multikanalpipette wurden die *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen auf eine 96-Well-Zellkulturplatte überführt. In diese Zellkulturplatte wurden zuvor mit 100 µl CHO-Medium je Well (Negativkontrolle) beziehungsweise mit 100 µl eines CHO-Medium-Toxin-Gemisches mit 10 ng/ml Pertussistoxin (PTX) vorgelegt. Bevor die Morphologie der Zellen nach 24 Stunden untersucht und fotografisch dokumentiert wurde, wurden die Zellen in 4 % PFA fixiert. Die Übersichtsaufnahmen sind auf 10 x Vergrößerung (erste und dritte Zeile) und die Detailaufnahmen auf 20 x Vergrößerung (zweite und vierte Zeile) gemacht. Für die quantitative Analyse wurden die Gesamtzellzahlen der Zellbilder auf 20 x Vergrößerung bestimmt und statistisch ausgewertet (hier sind die Zellzahlen eines äquivalenten Versuchs abgebildet, bei dem die Zellen nicht durch PFA fixiert wurden). Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n = 3). Für die Bestimmung der Signifikanzen wurde der Student's t-test für zwei unabhängige Proben verwendet. Der Wert der mit Pertussistoxin behandelten Zellen bezieht sich auf den Vergleich mit den Kontrollzellen, der Wert für die mit Inhibitor und Toxin behandelten Zellen bezieht sich auf den Vergleich mit den mit Pertussistoxin behandelten Zellen („ns" = „nicht signifikant", „*" = „$p < 0{,}05$", „**" = „$p < 0{,}01$" und „***" = „$p < 0{,}0005$"). Für die grafische Darstellung in relativen Zellzahlen wurden die unbehandelten Kontrollzellen als Vergleichswert auf 100 % festgesetzt, die anderen Behandlungen wurden anteilig an diesen 100 % ausgegeben.

Die morphologischen Veränderungen, die sich bei der Vergiftung von *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin unter Verwendung der pharmakologischen Inhibitoren zeigten, sind in Abbildung 35 dargestellt. Dabei fiel sowohl in den Übersichtsaufnahmen bei 10 x Vergrößerung als auch in den Detailaufnahmen bei 20 x Vergrößerung auf, dass bei den mit Pertussistoxin behandelten Zellen im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrollzellen kein subkonfluenter Zellrasen auftrat, sondern weniger Zellen vorhanden waren und „clusterartige" Strukturen auftraten. Mit Brefeldin A vorbehandelte Zellen zeigten bei der Vergiftung ein ähnliches Bild wie die Kontrollzellen, was die Hemmung dieser Substanz gegenüber Pertussistoxin zeigt. Die Zellen, die mit Radicicol beziehungsweise Cyclosporin A und Pertussistoxin inkubiert worden waren, zeigten eine ähnliche Morphologie wie Brefeldin A und Pertussistoxin und wiesen deutlich mehr Zellen und weniger Cluster als mit Pertussistoxin behandelte Zellen ohne Inhibitor auf. Für FK506 und Pertussistoxin war dieser Effekt etwas weniger stark ausgeprägt, jedoch zeigte sich auch hier ein Bild, das mehr der Behandlung mit Brefeldin A und Pertussistoxin, als der Behandlung mit Pertussistoxin allein ähnelte. Die morphologischen Veränderungen wurden auch durch die quantitative Analyse der ausgezählten Gesamtzellzahlen wiedergegeben. Die unter Pertussistoxin auftretende Zellzahlreduktion im Vergleich zu den Kontrollzellen war signifikant. Beim Einsatz von Brefeldin A, Radicicol, FK506 und Cyclosporin A zusammen mit Pertussistoxin waren mehr Zellen vorhanden als bei den mit

Pertussistoxin vergifteten Zellen ohne Inhibitor. Im Vergiftungstest 2 zeigte sich somit ein vergleichbares Ergebnis für *nicht-adhärente* CHO-K1-Zellen bei der Vergiftung mit Pertussistoxin wie bereits der Vergiftungstest 1 für *adhärente* Zellen gezeigt hatte. Der Vergiftungstest zeigte, dass alle verwendeten Inhibitoren auch die Vergiftung von *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin verzögern konnten.

3.3.3 Einfluss des pharmakologischen Inhibitors VK112 auf die Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin

Bei diesem Versuch sollte der Einfluss des pharmakologischen Inhibitors VK112 auf die Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin in direktem Vergleich zu Cyclosporin A untersucht werden, für das zuvor hemmende Effekte in den Zelltests gezeigt werden konnten. VK112 als Cyclosporin A Derivat inhibiert ebenfalls die Aktivität von Cyclophilinen jedoch ohne immunsuppressive Wirkung, da es im Gegensatz zu Cyclosporin A nicht mit Calcineurin interagieren und somit dessen Signaltransduktionswege nicht aktivieren kann.

Um den Einfluss von VK112 auf die Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin zu untersuchen, wurde mit dem Vergiftungstest 1 mit *adhärenten* Zellen gearbeitet, bei dem die Zellen zu Versuchsbeginn für 30 Minuten bei 37 °C mit den Inhibitoren in einer Konzentration von 10 µM vorinkubiert wurden. Anschließend wurde Pertussistoxin in einer Konzentration von 10 ng/ml zugegeben, für eineinhalb bis zwei Stunden im Medium belassen und anschließend durch einen Medienwechsel entfernt. Nach 18 bis 24 Stunden wurden die Zellen auf ihre Morphologie untersucht und das Ergebnis fotografisch dokumentiert. Zur quantitativen Bestimmung der Morphologieunterschiede wurden die Gesamtzellzahlen der Bilder ermittelt und statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 dargestellt.

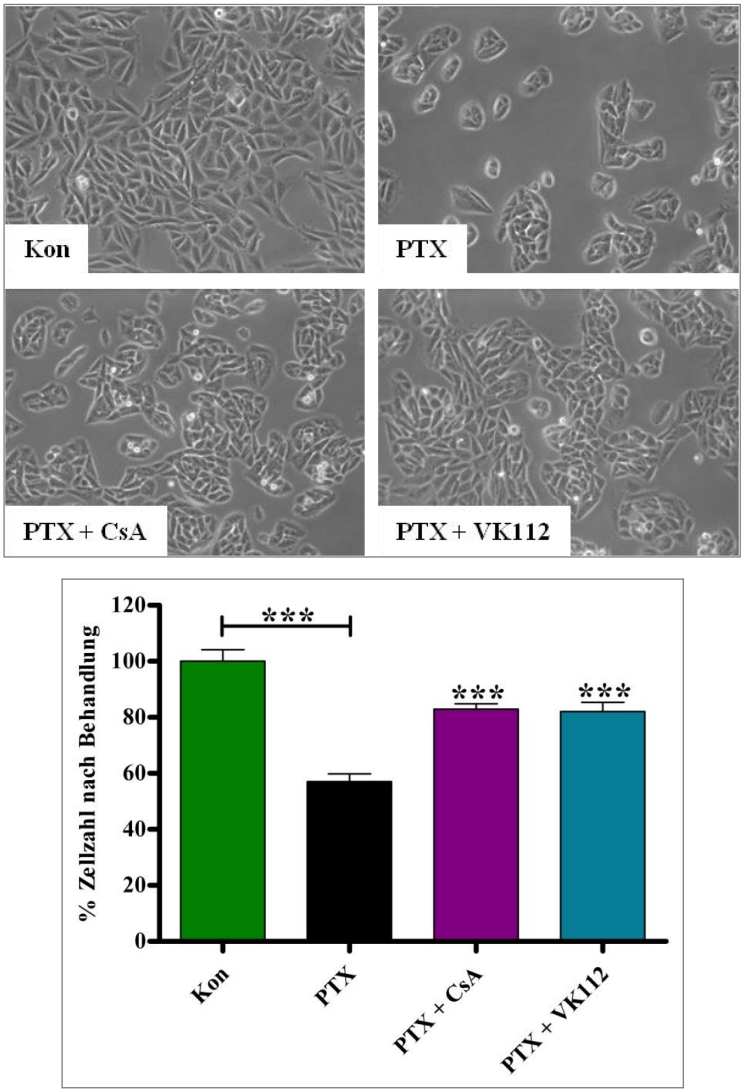


Abbildung 36: Einfluss des pharmakologischen Inhibitors VK112 auf die Vergiftung von *adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin (Vergiftungstest 1). (basierend auf Ernst *et al.* 2018) 1 x 10^6 CHO-K1-Zellen wurden für einen Tag in zwei 12-Well-Zellkulturplatten kultiviert, zu Versuchsbeginn einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 10 µM des Inhibitors VK112 und als Vergleich mit 10 µM des Inhibitors Cyclosporin A (CsA) vorinkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen unbehandelt belassen (Kon), als Positivkontrolle wurden Zellen nur mit Pertussistoxin (PTX) vergiftet. Nach der Vorinkubation wurden 10 ng/ml Pertussistoxin zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Die Behandlungen wurden entfernt und die Zellen mit 500 µl frischem CHO-Medium bedeckt. Die Morphologie der Zellen wurde nach 18 Stunden untersucht und fotografisch auf 20 x Vergrößerung dokumentiert. Für die quantitative Analyse wurden die Gesamtzellzahlen der Zellbilder bestimmt und statistisch ausgewertet (hier sind die Zellzahlen eines äquivalenten Versuchs abgebildet, bei dem eine höhere Anzahl an gleichen Behandlungen (n = 9) vorlag). Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n = 9). Für die Bestimmung der Signifikanzen wurde der Student's t-test für zwei unabhängige Proben verwendet. Der Wert der mit Pertussistoxin behandelten Zellen bezieht sich auf den Vergleich mit den Kontrollzellen, der Wert für die mit Inhibitor und Toxin behandelten Zellen bezieht sich auf den Vergleich mit den mit Pertussistoxin behandelten Zellen („ns" = „nicht signifikant", „*" = „$p < 0,05$", „**" = „$p < 0,01$" und „***" = „$p < 0,0005$"). Für die grafische Darstellung in relativen Zellzahlen wurden die unbehandelten Kontrollzellen als Vergleichswert auf 100 % festgesetzt, die anderen Behandlungen wurden anteilig an diesen 100 % ausgegeben.

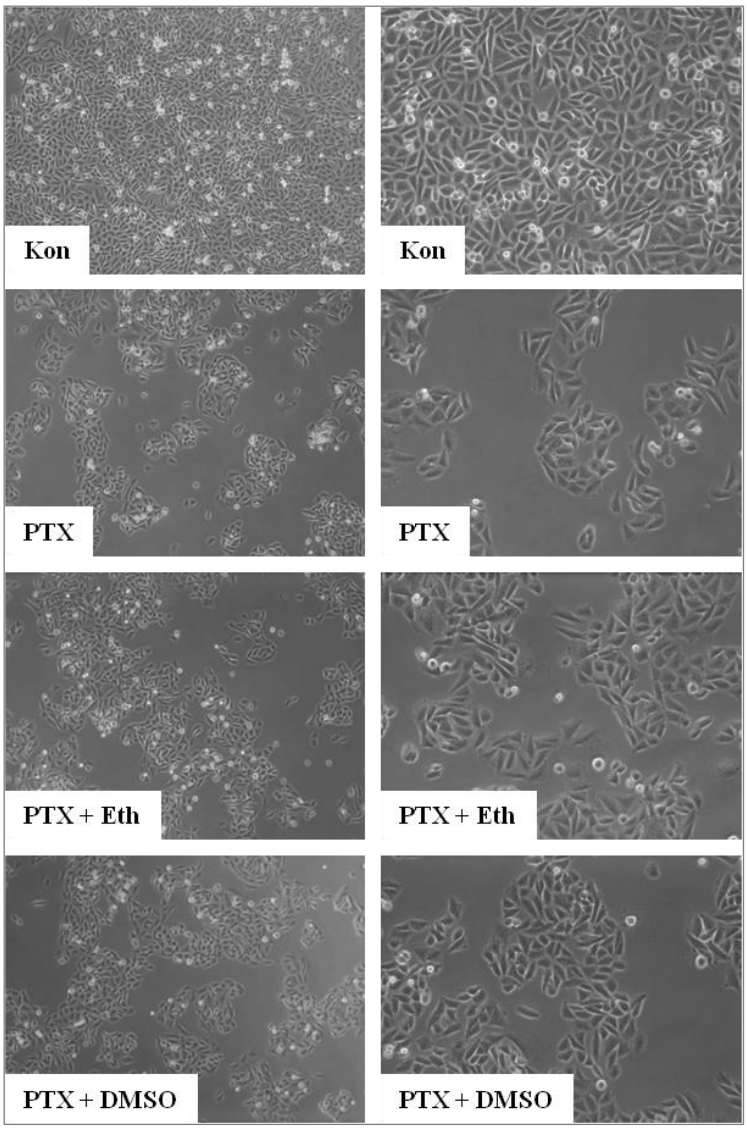
Die Abbildung 36 zeigt den Einfluss des nicht-immunsuppressiven Cyclosporin A Derivats VK112 im Vergleich zum immunsuppressiven Cyclosporin A auf die Vergiftung von *adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin. Auf den Bildern mit 20 x Vergrößerung

ließ sich ein deutlicher morphologischer Unterschied zwischen unbehandelten Kontrollzellen mit einem subkonfluenten Zellrasen im Vergleich zu mit Pertussistoxin vergifteten Zellen beobachten, die eher vereinzelt lagen und die typischen Cluster bildeten. Bei dem zu testenden pharmakologischen Inhibitor VK112 und dem Inhibitor Cyclosporin A im Vergleich zeigten sich bei der Vergiftung Unterschiede zu den mit Pertussistoxin vergifteten Zellen ohne Inhibitoren. Es waren mehr Zellen erkennbar, die deutlich dichter wuchsen und weniger Cluster bildeten. Jedoch war der Unterschied zwischen der Behandlung mit Pertussistoxin allein und den Behandlungen mit Pertussistoxin und den Inhibitoren hier nicht so deutlich. In der quantitativen Analyse zeigte sich aber, dass sich die Werte der ausgezählten Gesamtzellzahlen von einer Behandlung mit Pertussistoxin zu den Behandlungen von Pertussistoxin mit Inhibitoren doch deutlicher unterschieden und die Werte höchst signifikant waren. Im Vergleich zu den Kontrollzellen fand bei der Vergiftung von CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin eine signifikante Zellzahlreduktion statt, unter der Behandlung mit den Inhibitoren konnten signifikant mehr Zellen nach der Behandlung gezählt werden. Der inhibitorische Effekt entsprach hierbei wieder einer Vergiftungsverzögerung und keiner kompletten Hemmung der Toxinwirkung. Bei einem Vergleich der Werte für VK112 und Cyclosporin A fiel auf, dass diese sehr ähnliche Werte und auch bei den Zellbildern ähnliche Morphologie aufwiesen. Daraus ließ sich ableiten, dass die beiden Inhibitoren eine Vergiftung von *adhärenten* CHO-K1-Zellen im Zellversuch vergleichbar stark hemmten. Da VK112 aufgrund einer Veränderung einer Seitenkette im Gegensatz zu Cyclosporin A nicht mit Calcineurin, sondern nur mit den Cyclophilinen interagieren kann, bewies dieser Versuch, dass bei vergleichbarer Hemmung von VK112 und Cyclosporin A auch die Wirkung von Cyclosporin A über dessen Interaktion mit den PPIasen und nicht durch Calcineurin vermittelt wurde.

3.3.4 Einfluss der Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid auf die Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin

Die Lösungsmittel Ethanol für Radicicol, FK506 und Cyclosporin A sowie Dimethylsulfoxid für FK506, Brefeldin A und VK112 sollten sowohl bei *adhärenten* Zellen im Vergiftungstest 1 als auch bei *nicht-adhärenten* Zellen im Vergiftungstest 2 separat untersucht werden, um mögliche toxische Eigeneffekte dieser Lösungsmittel auf die CHO-K1-Zellen oder einen inhibitorischen Effekt auf die Vergiftung mit Pertussistoxin auszuschließen und abzusichern, dass die inhibitorischen Effekte auf Radicicol, FK506, Cyclosporin A und VK112 zurückzuführen waren und nicht auf deren Lösungsmittel.

Um dies zu prüfen, wurden die Lösungsmittel im Ablauf der Vergiftungstests 1 und 2 wie die Inhibitoren behandelt und zur Vorinkubation der Zellen für 30 Minuten ins Medium gegeben. Die eingesetzten Konzentrationen entsprachen hierbei immer mindestens den höchsten verwendeten Konzentrationen im Medium, die zuvor bei den Versuchen mit den Inhibitoren angewendet worden waren. Die Morphologie der Zellen wurde fotografisch dokumentiert, zur quantitativen Analyse die Gesamtzellzahlen bestimmt und statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse zeigen die Abbildungen 37 bis 39.



Fortsetzung der Abbildung 37 auf Seite 106.

Fortsetzung der Abbildung 37 von Seite 105.

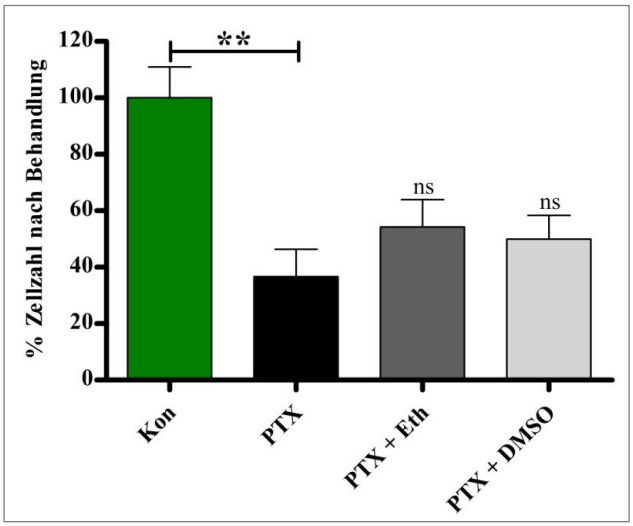
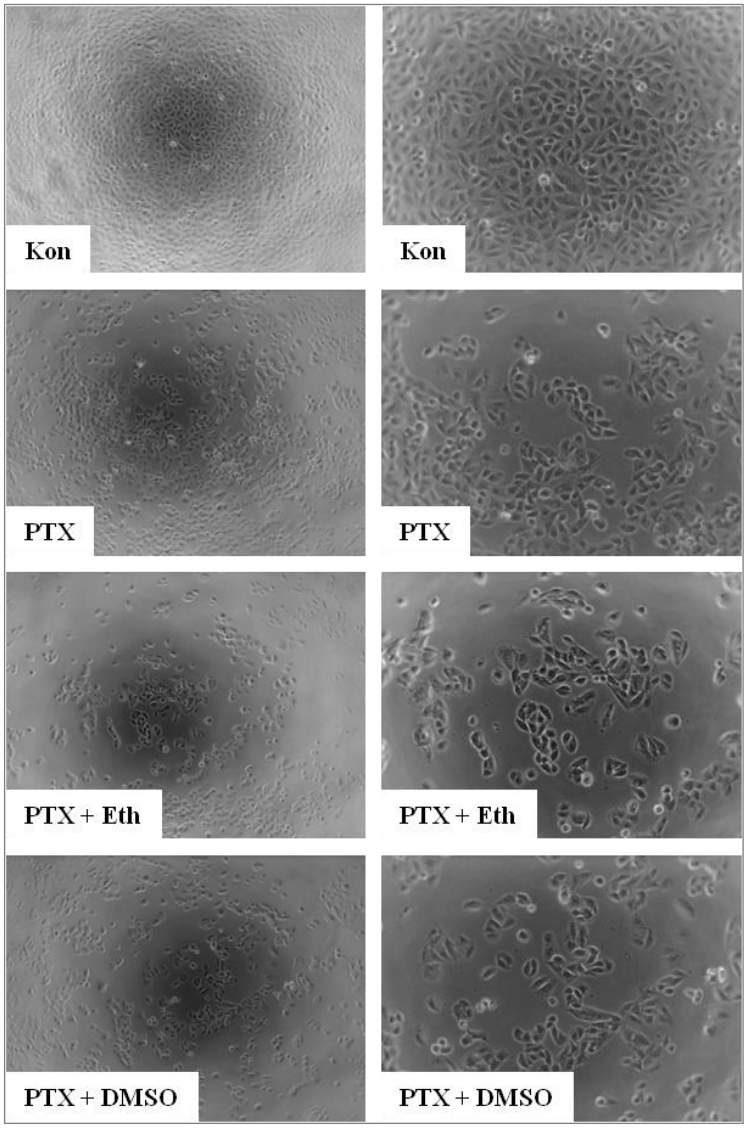
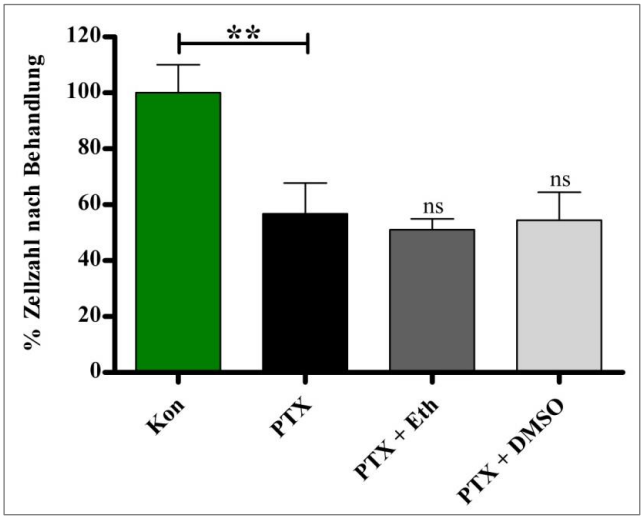


Abbildung 37: Einfluss der Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid auf die Vergiftung von *adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin (Vergiftungstest 1). 2,5 x 10^5 CHO-K1-Zellen wurden für zwei Tage in einer 12-Well-Zellkulturplatte kultiviert und für 30 Minuten mit jeweils 1 µl/ml der Lösungsmittel Ethanol (Eth) und Dimethylsulfoxid (DMSO) vorinkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen unbehandelt belassen (Kon), als Positivkontrolle wurden Zellen nur mit Pertussistoxin (PTX) vergiftet. Nach der Vorinkubation wurden 10 ng/ml Pertussistoxin zugegeben und für 75 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und mit 500 µl frischem CHO-Medium bedeckt. Die Morphologie der Zellen wurde nach 18 Stunden untersucht und fotografisch dokumentiert. Übersichtsaufnahmen auf 10 x Vergrößerung (linke Spalte) und Detailaufnahmen auf 20 x Vergrößerung (rechte Spalte). Für die quantitative Analyse wurden die Gesamtzellzahlen der Zellbilder auf 20 x Vergrößerung bestimmt und statistisch ausgewertet. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n = 3). Für die Bestimmung der Signifikanzen wurde der Student's t-test für zwei unabhängige Proben verwendet. Der Wert der mit Pertussistoxin behandelten Zellen bezieht sich auf den Vergleich mit den Kontrollzellen, der Wert für die mit Lösungsmittel und Toxin behandelten Zellen bezieht sich auf den Vergleich mit den mit Pertussistoxin behandelten Zellen („ns" = „nicht signifikant", „*" = „$p < 0,05$", „**" = „$p < 0,01$" und „***" = „$p < 0,0005$"). Für die grafische Darstellung in relativen Zellzahlen wurden die unbehandelten Kontrollzellen als Vergleichswert auf 100 % festgesetzt. Die anderen Behandlungen wurden anteilig an diesen 100 % ausgegeben. (Zellbilder für Kon und PTX aus Versuch unter „Ergebnisse" (3.3.1 Abbildung 34).)





Fortsetzung der Abbildung 38 auf Seite 108.

Fortsetzung der Abbildung 38 von Seite 107.

Abbildung 38: Einfluss der Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid auf die Vergiftung von *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin (Vergiftungstest 2). 5 x 10^5 CHO-K1-Zellen wurden für zwei Tage in einer 6-Well-Zellkulturplatte kultiviert und zu Versuchsbeginn für 30 Minuten mit jeweils 1 µl der Lösungsmittel Ethanol (Eth) und Dimethylsulfoxid (DMSO) vorinkubiert. Die Zellen wurden dann einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen und durch 200 µl Trypsin je Well abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde durch die Zugabe von 800 µl CHO-Medium gestoppt, die Zellen in Eppendorfgefäße überführt und für fünf Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml frischem CHO-Medium resuspendiert und mit der Multikanalpipette wurden die *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen auf eine 96-Well-Zellkulturplatte überführt. In diese Zellkulturplatte wurden zuvor 100 µl CHO-Medium je Well (Negativkontrolle) beziehungsweise 100 µl eines CHO-Medium-Toxin-Gemisches mit 10 ng/ml Pertussistoxin vorgelegt. Bevor die Morphologie der Zellen nach 24 Stunden untersucht und fotografisch dokumentiert wurde, wurden die Zellen in 4 % PFA fixiert. Die Übersichtsaufnahmen sind auf 10 x Vergrößerung (linke Spalte) und die Detailaufnahmen auf 20 x Vergrößerung (rechte Spalte) gemacht. Für die quantitative Analyse wurden die Gesamtzellzahlen der Zellbilder auf 20 x Vergrößerung bestimmt und statistisch ausgewertet. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n = 3). Für die Bestimmung der Signifikanzen wurde der Student's t-test für zwei unabhängige Proben verwendet. Der Wert der mit Pertussistoxin behandelten Zellen bezieht sich auf den Vergleich mit den Kontrollzellen, der Wert für die mit Lösungsmittel und Toxin behandelten Zellen bezieht sich auf den Vergleich mit den mit Pertussistoxin behandelten Zellen („ns" = „nicht signifikant", „*" = „$p < 0,05$", „**" = „$p < 0,01$" und „***" = „$p < 0,0005$"). Für die grafische Darstellung in relativen Zellzahlen wurden die unbehandelten Kontrollzellen als Vergleichswert auf 100 % festgesetzt, die anderen Behandlungen wurden anteilig an diesen 100 % ausgegeben. (Zellbilder für Kon und PTX aus Versuch unter „Ergebnisse" (3.3.2 Abbildung 35).)

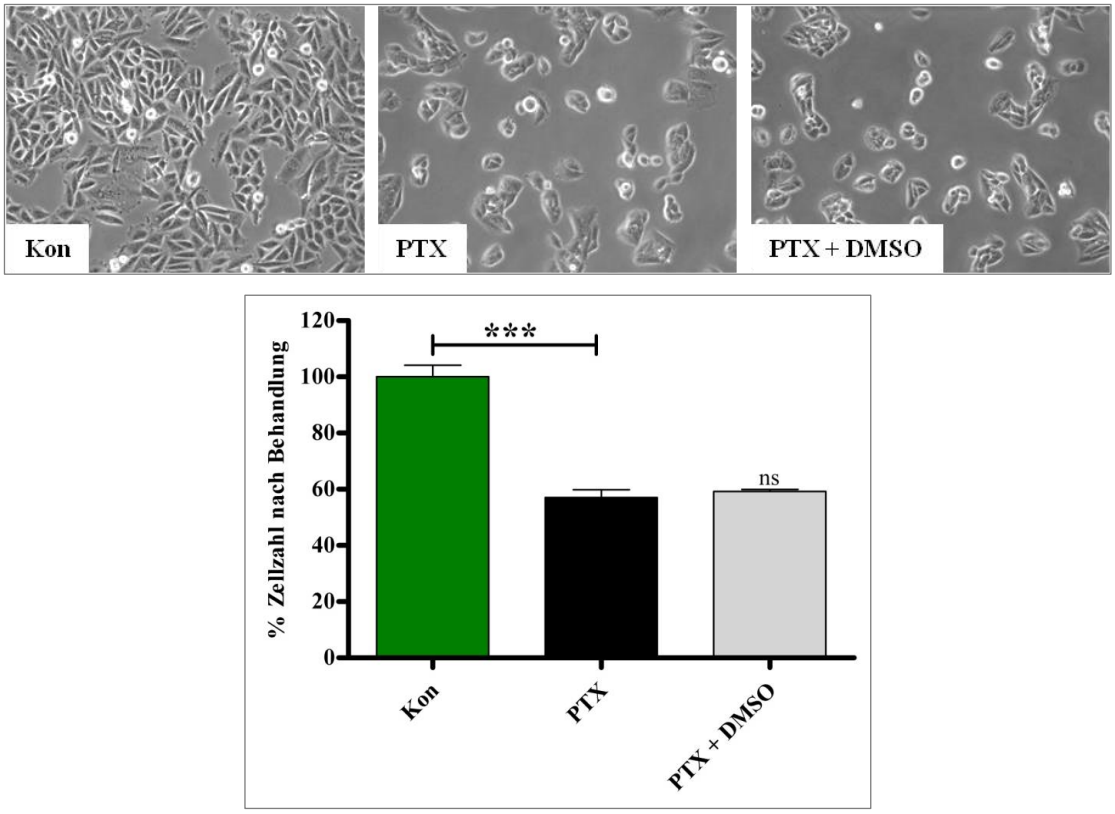


Abbildung 39: Einfluss des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid auf die Vergiftung von *adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin (Vergiftungstest 1). 1 x 10^6 CHO-K1-Zellen wurden für einen Tag in zwei 12-Well-Zellkulturplatten kultiviert, zu Versuchsbeginn einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 2 µl des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) vorinkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen unbehandelt belassen (Kon), als Positivkontrolle wurden Zellen nur mit Pertussistoxin (PTX) vergiftet. Nach der Vorinkubation wurden 10 ng/ml Pertussistoxin zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Die Behandlungen wurden entfernt und die Zellen anschließend mit 500 µl frischem CHO-Medium bedeckt. Die Morphologie der Zellen wurde nach 18 Stunden untersucht und fotografisch auf 20 x Vergrößerung dokumentiert. Für die quantitative Analyse wurden die Gesamtzellzahlen der Zellbilder bestimmt und statistisch ausgewertet. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n = 9). Für die Bestimmung der Signifikanzen wurde der Student's t-test für zwei unabhängige Proben verwendet. Der Wert der mit Pertussistoxin behandelten Zellen bezieht sich auf den Vergleich mit den Kontrollzellen, der Wert für die mit Lösungsmittel und Toxin behandelten Zellen bezieht sich auf den Vergleich mit den mit Pertussistoxin behandelten Zellen („ns" = „nicht signifikant", „*" = „$p < 0,05$", „**" = „$p < 0,01$" und „***" = „$p < 0,0005$"). Für die grafische Darstellung in relativen Zellzahlen wurden die unbehandelten Kontrollzellen als Vergleichswert auf 100 % festgesetzt. Die anderen Behandlungen wurden anteilig an diesen 100 % ausgegeben.

Die morphologischen Veränderungen, die sich bei der Vergiftung von *adhärenten* und *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin unter Verwendung der Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid zeigten, sind in den Abbildungen 37 bis 39 dargestellt. Für *adhärente* Zellen ließ sich vor allem in den Übersichtsaufnahmen der Abbildung 37 bei 10 x Vergrößerung deutlich erkennen, dass im Vergleich zu den Kontrollzellen unter der Vergiftung mit Pertussistoxin und unter der Vergiftung mit Pertussistoxin und den Lösungsmitteln kein annähernd subkonfluenter Zellrasen sichtbar war, sondern weniger Zellen und die für Pertussistoxin typischen Cluster. Beim morphologischen Vergleich der Bilder von Pertussistoxin und Pertussistoxin mit Lösungsmitteln ließ sich in den

Übersichtsaufnahmen bei 10 x Vergrößerung kein deutlicher Unterschied feststellen. Bei den Detailaufnahmen bei 20 x Vergrößerung waren etwas mehr Zellen unter der Behandlung mit den Lösungsmitteln sichtbar. Dies zeigte auch die quantitative Analyse der ausgezählten Gesamtzellzahlen. Jedoch waren diese Werte für die Lösungsmittel statistisch nicht signifikant und in Zusammenschau mit den erhobenen Werten bei den Versuchen mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid des Inhibitors VK112 (siehe Abbildung 39) auf die typischerweise bei Versuchen auftretenden intra- und interindividuellen Schwankungen zurückzuführen. Dies und die fehlenden Unterschiede in der Morphologie bei größeren Ausschnitten sprachen dafür, dass die Vergiftung von CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin mit und ohne Zugabe der Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid vergleichbar verlaufen war. Somit waren die Lösungsmittel nicht für die Verzögerung der Zellvergiftung, die beim Einsatz der pharmakologischen Inhibitoren beobachtet werden konnte, verantwortlich, sondern die Inhibitorsubstanzen selbst. Abbildung 38 zeigt, dass dies ebenso für die Vergiftung von *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin galt.

3.3.5 Effekte der pharmakologischen Inhibitoren und der Lösungsmittel auf CHO-K1-Zellen in Abwesenheit von Pertussistoxin

Die eingesetzten Inhibitoren Radicicol, FK506, Cyclosporin A, Brefeldin A und VK112 sowie deren Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid als solche könnten bereits die Morphologie der CHO-K1-Zellen ändern – wie schon bei den Versuchen zum Einfluss der Lösungsmittel unter „Ergebnisse“ (3.3.4) beschrieben – beispielsweise durch zytotoxische Effekte. Um eine Morphologieänderung durch die eingesetzten Substanzen *per se* ohne Einfluss des Toxins auszuschließen, wurden die Inhibitoren und die Lösungsmittel separat ohne Toxin im Versuchsablauf des Vergiftungstests 1 mit *adhärenten* und des Vergiftungstests 2 mit *nicht-adhärenten* Zellen getestet. Dabei wurden jeweils alle Schritte bis auf die Vergiftung mit Pertussistoxin durchgeführt. Die Zellen wurden im Verlauf auf ihre Morphologie hin untersucht und durch Bestimmung der Gesamtzellzahlen einer quantitativen Analyse unterzogen und statistisch ausgewertet. Die Abbildungen 40 bis 42 zeigen die Ergebnisse.

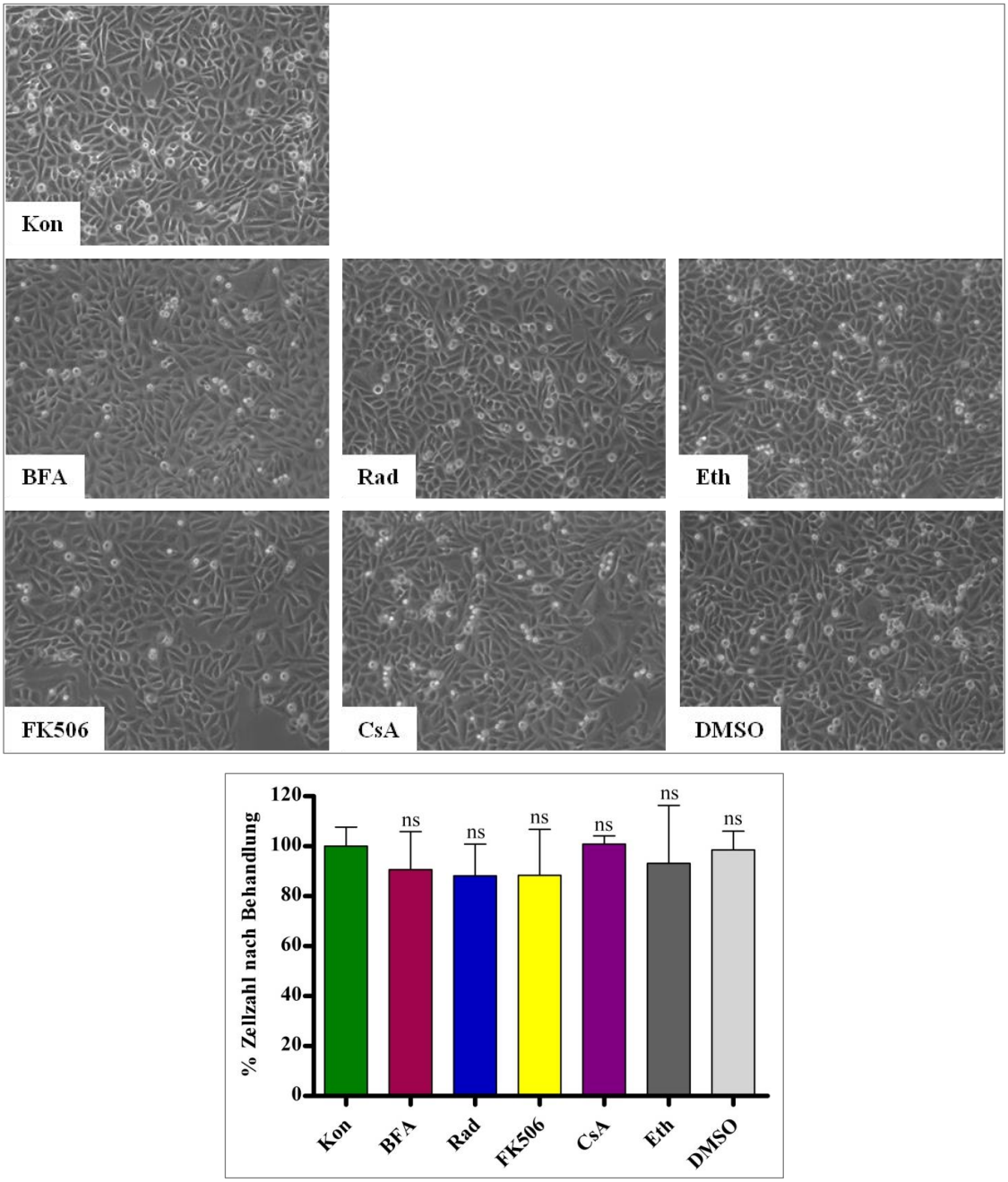
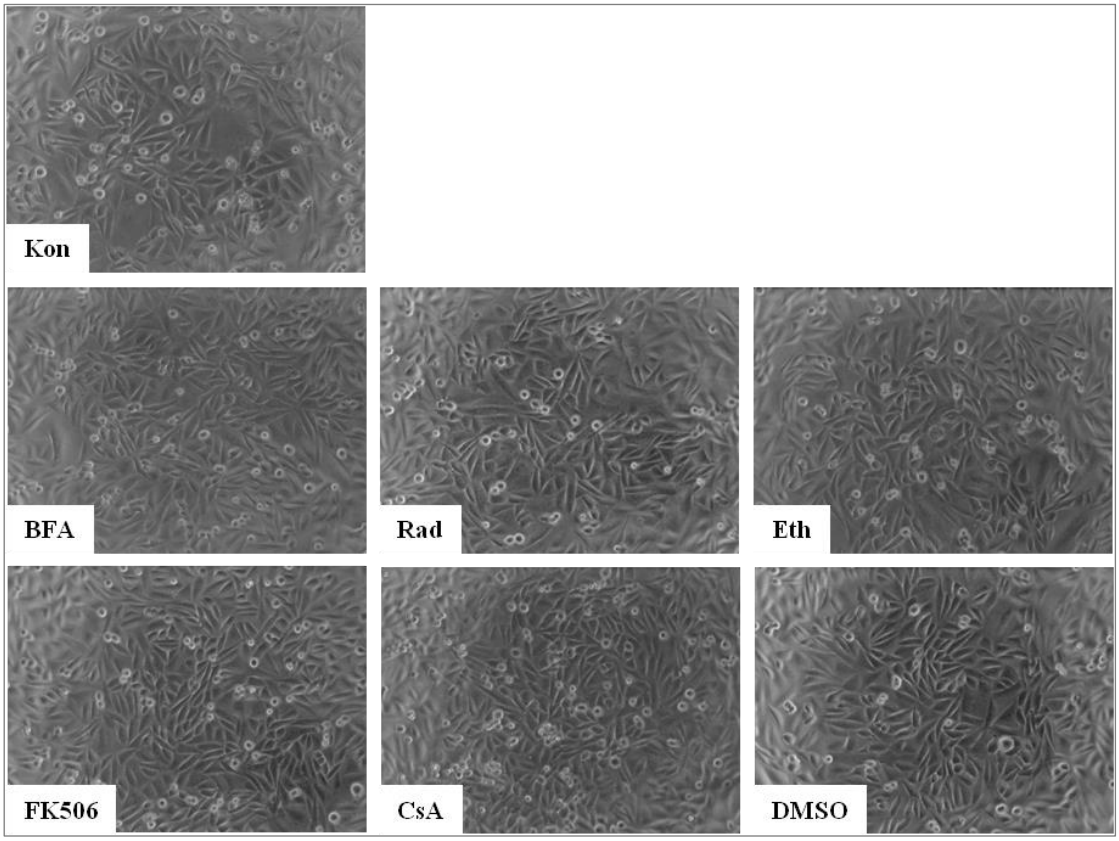


Abbildung 40: Effekte der pharmakologischen Inhibitoren Brefeldin A, Radicicol, FK506 und Cyclosporin A und der Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid auf *adhärente* CHO-K1-Zellen in Abwesenheit von Pertussistoxin. 2,5 x 10^5 CHO-K1-Zellen wurden für zwei Tage in einer 12-Well-Zellkulturplatte kultiviert und für 30 Minuten mit 10 µM der pharmakologischen Inhibitoren Brefeldin A (BFA), Radicicol (Rad), FK506 und Cyclosporin A (CsA) und jeweils 1 µl der Lösungsmittel Ethanol (Eth) und Dimethylsulfoxid (DMSO) vorinkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen unbehandelt belassen (Kon). Die Behandlungen wurden für weitere 75 Minuten auf den Zellen belassen, anschließend wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS gewaschen und mit 500 µl frischem CHO-Medium bedeckt. Die Morphologie der Zellen wurde nach 18 Stunden untersucht und fotografisch dokumentiert. Hier sind exemplarisch die Detailaufnahmen auf 20 x Vergrößerung dargestellt. Für die quantitative Analyse wurden die Gesamtzellzahlen der Zellbilder bestimmt und statistisch ausgewertet. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n = 3). Die Signifikanzen wurden mit dem Student's t-test für zwei unabhängige Proben bestimmt und beziehen sich auf den Wert der unbehandelten Kontrollzellen („ns" = „nicht signifikant", „*" = „$p < 0,05$", „**" = „$p < 0,01$" und „***" = „$p < 0,0005$"). Für die grafische Darstellung in relativen Zellzahlen wurden die unbehandelten Kontrollzellen als Vergleichswert auf 100 % festgesetzt. Die anderen Behandlungen wurden anteilig an diesen 100 % ausgegeben. (Zellbilder für Kon aus Versuch unter „Ergebnisse" (3.3.1 Abbildung 34 und 3.3.4 Abbildung 37).)



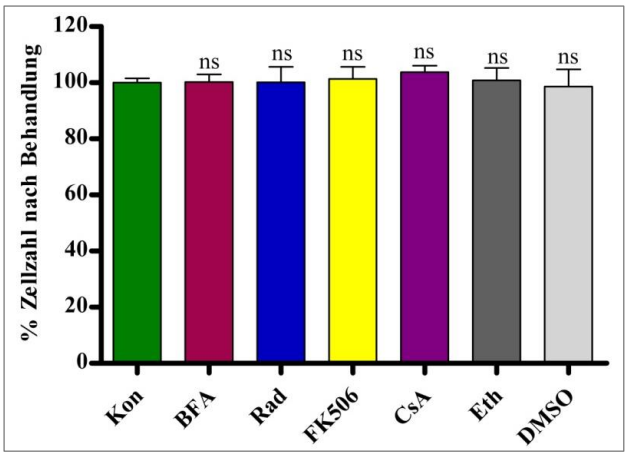


Abbildung 41: Effekte der pharmakologischen Inhibitoren Brefeldin A, Radicicol, FK506 und Cyclosporin A und der Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid auf *nicht-adhärente* CHO-K1-Zellen in Abwesenheit von Pertussistoxin. 5 x 10^6 CHO-K1-Zellen wurden für zwei Tage in 6-Well-Zellkulturplatten kultiviert und zu Versuchsbeginn für 30 Minuten mit 10 µM der Inhibitoren BFA, Rad, FK506 und CsA und 1 µl der Lösungsmittel Ethanol (Eth) und Dimethylsulfoxid (DMSO) vorinkubiert. Als Negativkontrolle (Kon) wurden Zellen unbehandelt belassen. Nach der Vorinkubation wurden die Zellen dann einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen und durch 350 µl Trypsin je Well abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde durch die Zugabe von 1.000 µl CHO-Medium gestoppt, die Zellen in Eppendorfgefäße überführt und für fünf Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml frischem CHO-Medium resuspendiert und mit der Multikanalpipette wurden die *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen auf eine 96-Well-Zellkulturplatte überführt. In diese Zellkulturplatte wurden zuvor 100 µl CHO-Medium je Well vorgelegt. Die Morphologie der Zellen wurde nach 24 Stunden untersucht und fotografisch dokumentiert. Hier sind exemplarisch die Detailaufnahmen auf 20 x Vergrößerung dargestellt. Für die quantitative Analyse wurden die Gesamtzellzahlen der Zellbilder bestimmt und statistisch ausgewertet. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n = 3). Die Signifikanzen wurden mit dem Student's t-test für zwei unabhängige Proben bestimmt und beziehen sich auf den Wert der unbehandelten Kontrollzellen („ns" = „nicht signifikant", „*" = „$p < 0{,}05$", „**" = „$p < 0{,}01$" und „***" = „$p < 0{,}0005$"). Für die grafische Darstellung in relativen Zellzahlen wurden die unbehandelten Kontrollzellen als Vergleichswert auf 100 % festgesetzt, die anderen Behandlungen wurden anteilig an diesen 100 % ausgegeben.

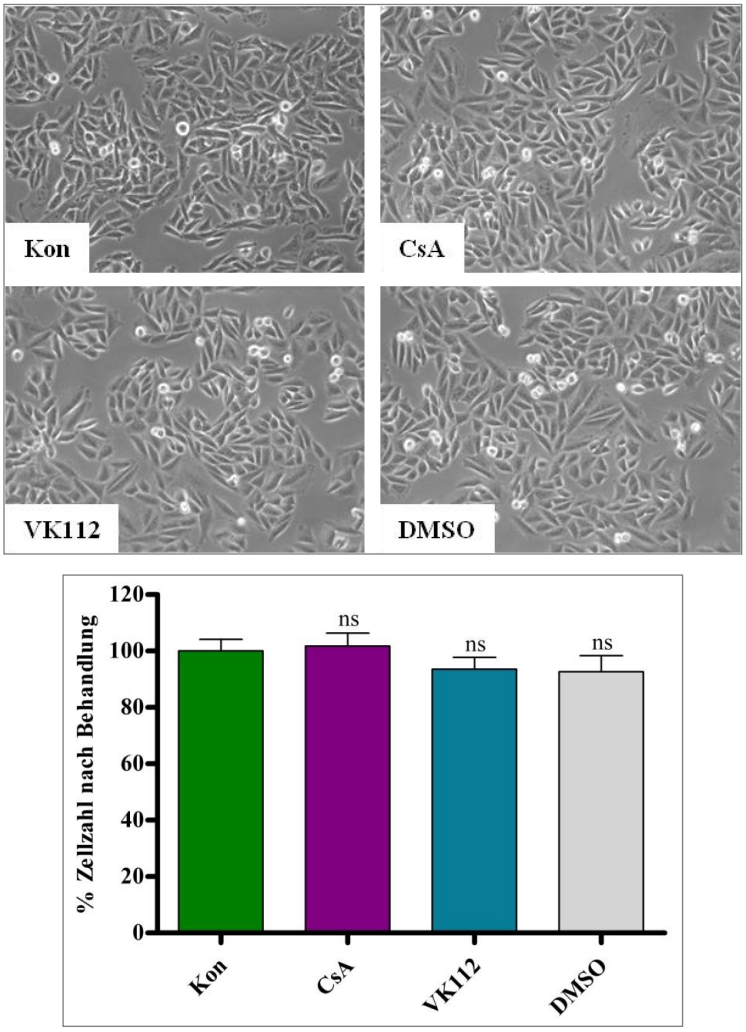


Abbildung 42: Effekte des pharmakologischen Inhibitors VK112 und des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid auf *adhärente* CHO-K1-Zellen in Abwesenheit von Pertussistoxin. 1 x 10^6 CHO-K1-Zellen wurden für einen Tag in zwei 12-Well-Zellkulturplatten kultiviert, zu Versuchsbeginn einmal mit kaltem 1 x PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 10 µM des Inhibitors VK112 und als Vergleich mit 10 µM des Inhibitors Cyclosporin A (CsA) und 2 µl des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid (DMSO) vorinkubiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen unbehandelt belassen (Kon). Nach der Vorinkubation wurden die Zellen für eine weitere Stunde inkubiert. Die Behandlungen wurden entfernt und die Zellen anschließend mit 500 µl frischem CHO-Medium bedeckt. Die Morphologie der Zellen wurde nach 18 Stunden untersucht und fotografisch auf 20 x Vergrößerung dokumentiert. Für die quantitative Analyse wurden die Gesamtzellzahlen der Zellbilder bestimmt und statistisch ausgewertet. Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n = 9). Die Signifikanzen wurden mit dem Student's t-test für zwei unabhängige Proben bestimmt und beziehen sich auf den Wert der unbehandelten Kontrollzellen („ns" = „nicht signifikant", „*" = „$p < 0,05$", „**" = „$p < 0,01$" und „***" = „$p < 0,0005$"). Für die grafische Darstellung in relativen Zellzahlen wurden die unbehandelten Kontrollzellen als Vergleichswert auf 100 % festgesetzt, die anderen Behandlungen wurden anteilig an diesen 100 % ausgegeben.

Die Effekte der eingesetzten Inhibitoren Radicicol, FK506, Cyclosporin A, Brefeldin A und VK112 und deren Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid auf die Morphologie von *adhärenten* und *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen in Abwesenheit von Pertussistoxin sind in den Abbildungen 40 bis 42 dargestellt. Dabei zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen, dass weder die zu testenden pharmakologischen Inhibitoren noch deren Lösungsmittel allein unter den Versuchsbedingungen Effekte auf *adhärente*

CHO-K1-Zellen hatten, die sich auf die Morphologie der Zellen ausgewirkt hätten (Abbildungen 40 und 42). Bei höheren Konzentrationen der Inhibitoren und der Lösungsmittel waren vermehrt abgerundete Zellen aufgetreten. Um diese unerwünschten morphologischen Effekte zu vermeiden, wurden die Konzentrationen der Inhibitoren nicht über 25 µM eingesetzt. Auch die quantitative Analyse der ausgezählten Gesamtzellzahlen ergab für alle Behandlungen – abgesehen von normalen Schwankungen – vergleichbare Werte wie bei den unbehandelten Kontrollzellen und zeigte, dass keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen bestanden. Abbildung 41 zeigt, dass dies ebenso für *nicht-adhärente* CHO-K1-Zellen galt. Aufgrund der unerwünschten morphologischen Effekte bei höheren Konzentrationen im Vergiftungstest 1, wurden höhere Konzentrationen beim Vergiftungstest 2 nicht verwendet oder getestet.

3.4 Analyse des ADP-Ribosylierungsstatus des Pertussistoxin-Substrates $G_i\alpha$ der CHO-K1-Zellen nach Vergiftung durch Pertussistoxin (Nachribosylierungstest)

Die Analyse des ADP-Ribosylierungsstatus von $G_i\alpha$ als Substrat von Pertussistoxin sollte zeigen, ob die beobachtbaren morphologischen Veränderungen aus den Zelltests bei der Vergiftung von CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin in An- und Abwesenheit der Inhibitoren mit einem veränderten ADP-Ribosylierungsstatus des Pertussistoxin-Substrats $G_i\alpha$ einhergingen. Der Versuch stellt eine *in vitro* Wiederholung der enzymatischen Reaktion der ADP-Ribosylierung von $G_i\alpha$ des Zellversuchs mit denselben Zellen dar, weshalb man auch von „Nachribosylierung“ spricht. Bei den mit Inhibitoren behandelten Zellen aus den Zelltests werden dabei stärkere Signale erwartet, also mehr Substratumsatz, als bei den mit Pertussistoxin vergifteten Zellen ohne Inhibitor, da deren Substrat bereits bei den Zelltests zum Teil ADP-ribosyliert wurde und somit bei der Nachribosylierung nicht mehr als Substrat zur Verfügung steht.

Für den Versuch wurden die CHO-K1-Zellen aus den Vergiftungsversuchen in ADP-Ribosylierungspuffer für das C180-Protein aufgenommen und lysiert. Zu den Proben wurden jeweils 1 µl Biotin-NAD^+ (10 µM) und 1,25 µl C180-Protein (entspricht 170 ng) gegeben und für eine Stunde inkubiert. Danach wurden sie gekocht und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Im Westernblot wurden die Membranen mit Strep-POD (1:2.500) inkubiert, um spezifisch das Biotin-markierte $G_i\alpha$ mit ECL detektieren zu können. Abbildungen 43 und 44 zeigen die Ergebnisse der Nachribosylierungstests.

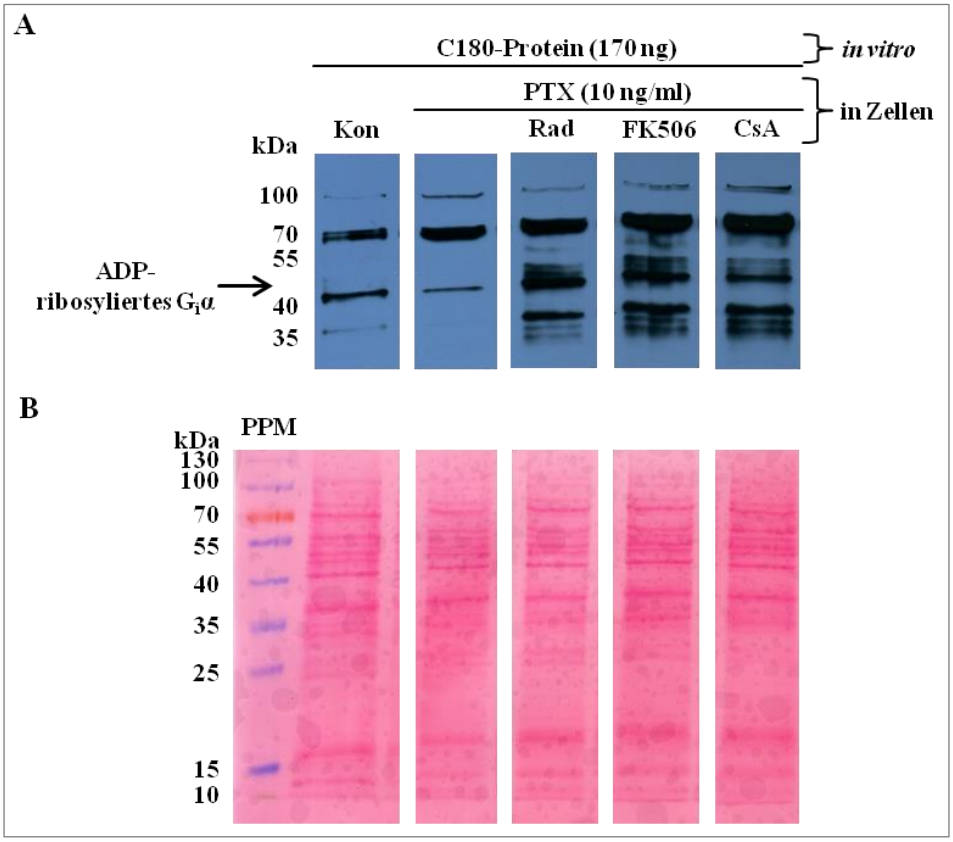


Abbildung 43: Analyse des Einflusses der Inhibitoren Radicicol, FK506 und Cyclosporin A auf den ADP-Ribosylierungsstatus von $G_i\alpha$ der CHO-K1-Zellen nach Vergiftung mit Pertussistoxin (Nachribosylierungstest). Die Zellen, die in den Vergiftungsversuchen mit 10 ng/ml Pertussistoxin und mit 10 µM der Inhibitoren Radicicol (Rad), FK506 und Cyclosporin A (CsA) behandelt worden waren, wurden in ADP-Ribosylierungspuffer abgekratzt und zu jeweils 22,75 µl Zelllysaten verarbeitet. Auf Eis wurden 1 µl Biotin-NAD^+ (10 µM) und 1,25 µl C180-Protein (entspricht 170 ng) zugegeben. Als Positivkontrolle für die Inhibitoren dienten die Kontrollen (Kon) aus den Vergiftungsversuchen ohne Toxin und ohne Inhibitoren und als Negativkontrolle die nur mit Toxin behandelten Zellen aus den Vergiftungsversuchen. Die Proben wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 6,25 µl 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT bei 100 °C für fünf Minuten gekocht. Es wurden eine SDS-PAGE und ein Westernblot angeschlossen. **A:** Mit industriell hergestelltem ECL detektierte Membran des Westernblots mit Strep-POD (1:2.500). Die Laufhöhe des Substrats $G_i\alpha$ ist bei etwa 41 kDa markiert. **B:** Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulosemembran zum Nachweis vergleichbarer Proteinmengen. PPM = Prestained Protein Marker.

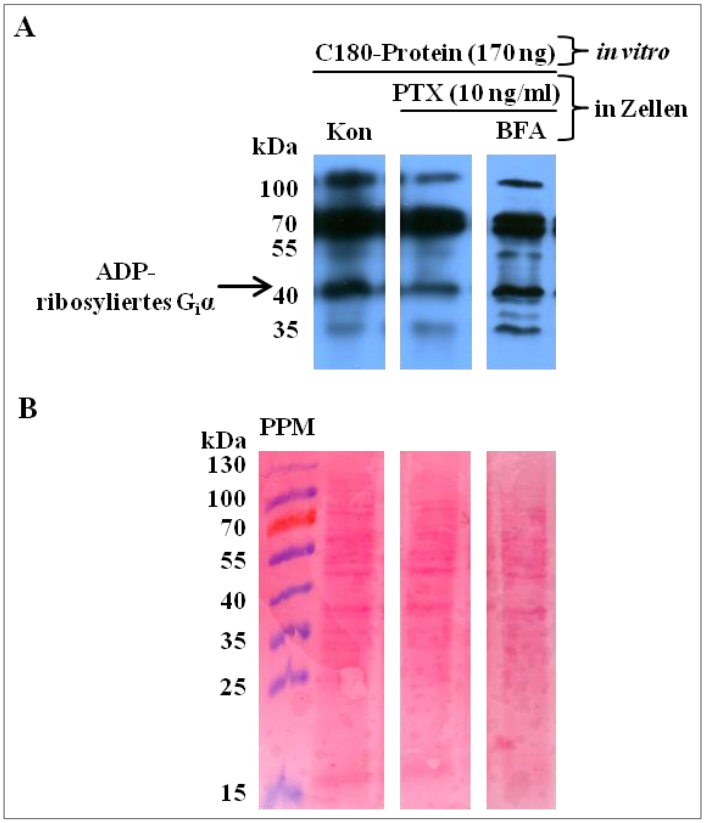


Abbildung 44: Analyse des Einflusses des Inhibitors Brefeldin A auf den ADP-Ribosylierungsstatus von $G_i\alpha$ der CHO-K1-Zellen nach Vergiftung mit Pertussistoxin (Nachribosylierungstest). Die Zellen, die in den Vergiftungsversuchen mit 10 ng/ml Pertussistoxin und mit 10 µM des Inhibitors Brefeldin A (BFA) behandelt worden waren, wurden in ADP-Ribosylierungspuffer abgekratzt und zu jeweils 22,75 µl Zelllysaten verarbeitet. Als Positivkontrolle für die Inhibitoren dienten die Kontrollen (Kon) aus den Vergiftungsversuchen ohne Toxin und ohne Inhibitoren und als Negativkontrolle die nur mit Toxin behandelten Zellen. Auf Eis wurden 1 µl Biotin-NAD^+ (10 µM) und 1,25 µl C180-Protein (entspricht 170 ng) zugegeben. Die Proben wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 6,25 µl 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT bei 100 °C für fünf Minuten gekocht. Es wurden eine SDS-PAGE und ein Westernblot angeschlossen. **A:** Mit industriell hergestelltem ECL detektierte Membran des Westernblots mit Strep-POD (1:2.500). Die Laufhöhe des Substrats $G_i\alpha$ ist bei etwa 41 kDa markiert. **B:** Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulosemembran zum Nachweis vergleichbarer Proteinmengen. PPM = Prestained Protein Marker.

Die Abbildungen 43 und 44 zeigen, dass bei allen mit C180-Protein inkubierten Proben eine prominente Bande bei 41 kDa vorkam, was der Laufhöhe des Substrats $G_i\alpha$ entspricht – wie unter „Ergebnisse“ (3.1.5) beschrieben. Bei den im Vergiftungsversuch unbehandelten Kontrollzellen trat – wie erwartet – eine stärkere Bande bei 41 kDa auf, da bei diesen Zellen das Substrat von Pertussistoxin, $G_i\alpha$, noch nicht während des Vergiftungsversuches ADP-ribosyliert worden war. Bei den im Vergiftungsversuch mit Pertussistoxin behandelten Zellen trat hier eine schwächere Bande auf, da das Substrat $G_i\alpha$ bereits bei den Vergiftungsversuchen zum Teil ADP-ribosyliert worden war und daher bei der Nachribosylierung nicht mehr zur Verfügung stand. Sowohl beim Vergleichsinhibitor Brefeldin A als auch bei den zu testenden Inhibitoren Radicicol, FK506 und Cyclosporin A mit Pertussistoxin traten in der Nachribosylierung mit dem C180-Protein stärkere Signale

bei 41 kDa auf als bei den mit Pertussistoxin vergifteten Zellen ohne Inhibitor aus den Vergiftungsversuchen bei vergleichbaren Proteinmengen in allen Ansätzen. Dies sprach dafür, dass die eingesetzten Inhibitoren während der Vergiftung der Zellen durch Pertussistoxin dazu geführt hatten, dass weniger $G_i\alpha$ im Zytosol ADP-ribosyliert worden war, was die Ergebnisse der Vergiftungsversuche bestätigte.

3.5 Analyse des Einflusses der Inhibitoren auf die Bindung von Pertussistoxin an der Zelloberfläche (Bindungstest)

Die Analyse des Einflusses der Inhibitoren auf die Bindung von Pertussistoxin an der Zelloberfläche wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Inhibitoren die Bindung von Pertussistoxin an der Zellmembran beeinträchtigen beispielsweise dahingehend, dass weniger Toxin binden und dadurch weniger Toxin in die Zelle gelangen kann, womit weniger Toxin in der Zelle für eine Vergiftung zur Verfügung stünde. Die in den Vergiftungsversuchen beobachteten morphologischen Veränderungen unter dem Einsatz der Inhibitoren sollten hier in Bezug auf die Interaktion von Pertussistoxin und den Inhibitoren an der Zellmembran / Zelloberfläche geprüft werden, um den Hemmungsmechanismus der Inhibitoren genauer zu charakterisieren.
Für den Bindungstest wurden CHO-K1-Zellen bis zu konfluentem Wachstum in 12-Well-Zellkulturplatten kultiviert und für 30 Minuten mit 10 µM der Inhibitoren und Lösungsmittel in entsprechender Konzentration vorinkubiert beziehungsweise unbehandelt belassen für eine Negativkontrolle ohne weitere Behandlung und eine Positivkontrolle mit Pertussistoxin allein. Im Anschluss wurden die Zellen für 15 Minuten auf 4 °C gekühlt und bei dieser Temperatur mit 500 ng/ml Pertussistoxin vergiftet. Bei 4 °C kann das Toxin lediglich an die Zellmembran binden, jedoch nicht internalisiert werden, da die Endozytosevorgänge bei niedrigen Temperaturen eingestellt werden. Nach 30 Minuten wurde das Medium mit ungebundenem Toxin und Inhibitoren entfernt, die Zellen gewaschen und abgelöst. Die Proben wurden anschließend gekocht, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und einer Westernblot-Analyse mit einem anti-S1-PTX Antikörper (1:2.500) unterzogen. Um für die Laufhöhe der S1-Untereinheit von Pertussistoxin im Westernblot einen Vergleich zu haben, wurde ins Gel zusätzlich eine Positivkontrolle mit verdünntem Pertussistoxin aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit ECL und ist in Abbildung 45 abgebildet.

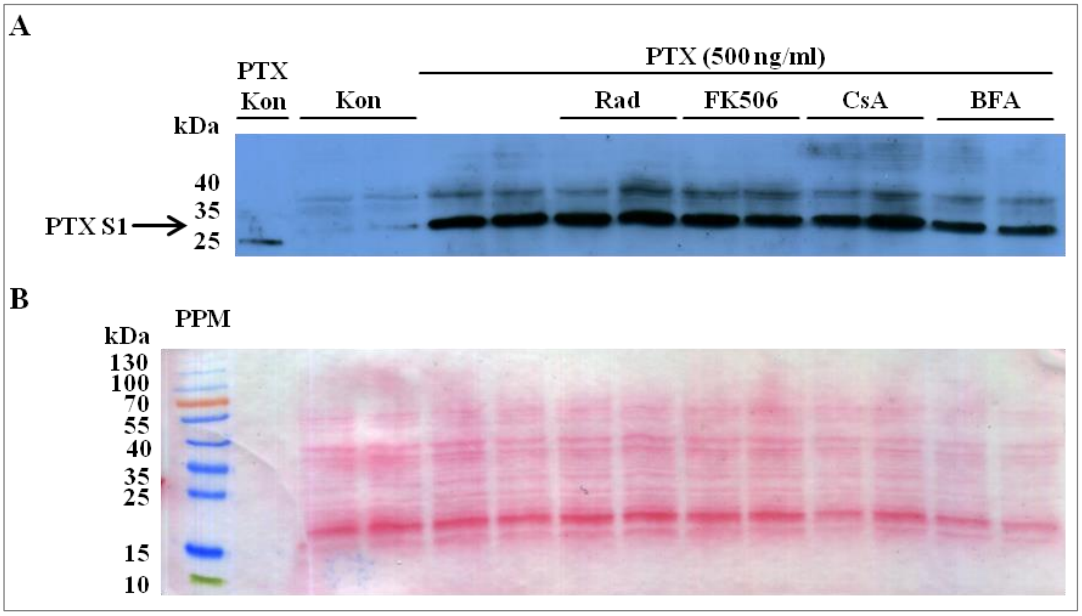


Abbildung 45: Analyse des Einflusses der Inhibitoren Radicicol, FK506, Cyclosporin A und Brefeldin A auf die Bindung von Pertussistoxin an der Zelloberfläche (Bindungstest). Die CHO-K1-Zellen wurden mit 10 µM der Inhibitoren Radicicol (Rad), FK506, Cyclosporin A (CsA) und Brefeldin A (BFA) vorinkubiert beziehungsweise unbehandelt belassen (Negativkontrolle (Kon)) oder nur mit Toxin behandelt (Positivkontrolle (PTX)). Sie wurden für 15 Minuten auf 4 °C gekühlt und bei dieser Temperatur für 30 Minuten mit 500 ng/ml Pertussistoxin inkubiert. Jede Behandlung wurde doppelt in zwei verschiedenen Wells ausgeführt (Doppelwerte). Die Zellen wurden in 2,5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT gelöst und einer SDS-PAGE zugeführt, an die ein Westernblot angeschlossen wurde. Als Laufhöhenkontrolle für die S1-Untereinheit wurde eine Positivkontrolle mit verdünntem Toxin eingesetzt (PTX Kon). **A:** Mit industriell hergestelltem ECL detektierte Membran der Westernblot-Analyse mit einem anti-PTX-S1 Antikörper (1:2.500). Laufhöhe der S1-Untereinheit etwa bei 27 kDa. **B:** Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulosemembran zum Nachweis gleicher Proteinmengen. PPM = Prestained Protein Marker.

Das Ergebnis des Bindungstests in Abbildung 45 zeigt, dass bei vergleichbaren Proteinmengen in der Ponceau-S-Färbung etwa gleich starke Signale bei der Detektion der S1-Untereinheit von Pertussistoxin im Westernblot auftraten, sowohl bei der Positivkontrolle mit alleiniger Toxinbehandlung als auch bei der Vorinkubation mit den Inhibitoren – einschließlich der Inhibitor-Positivkontrolle Brefeldin A. Die Laufhöhe der Proben war der der Toxinprobe vergleichbar. Bei den unbehandelten Kontrollzellen trat kein spezifisches Signal auf dieser Laufhöhe auf. Damit konnte eine Beeinflussung der Bindung von Pertussistoxin an die Zellmembran / Zelloberfläche durch die Inhibitoren ausgeschlossen und ihr Hemmungsmechanismus nicht darauf zurückgeführt werden.

3.6 Analyse des Einflusses der Inhibitoren auf die Enzymaktivität der S1-Untereinheit von Pertussistoxin *in vitro* (Enzymaktivitätstest)

Der *in vitro* Versuch zur Analyse des Einflusses der Inhibitoren auf die Enzymaktivität der S1-Untereinheit von Pertussistoxin (Enzymaktivitätstest) sollte prüfen, ob die Enzymaktivität der S1-Untereinheit durch die Inhibitoren beeinflusst wird und deren inhibitorische Wirkung auf Pertussistoxin in einer Herabsetzung seiner Enzymaktivität besteht.
Beim Enzymaktivitätstest wurde als Zelllysat CHO-K1-PNS verwendet und für 30 Minuten mit 10 µM der Inhibitoren beziehungsweise Lösungsmittel vorinkubiert. Zum Vergleich wurde das PNS-Zelllysat als Negativkontrolle unbehandelt belassen und als Positivkontrolle nur mit Toxin inkubiert. Auf Eis wurden zu den Proben 1 µl Biotin-NAD^+ (10 µM) und 1,25 µl C180-Protein (entspricht 170 ng) zugegeben und mit ADP-Ribosylierungspuffer für das C180-Protein auf ein einheitliches Gesamtvolumen aufgefüllt. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Proben gekocht, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit Strep-POD (1:2.500) inkubiert, um spezifisch das Biotin-markierte $G_i\alpha$ mit ECL detektieren zu können. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 46 und 47 dargestellt.

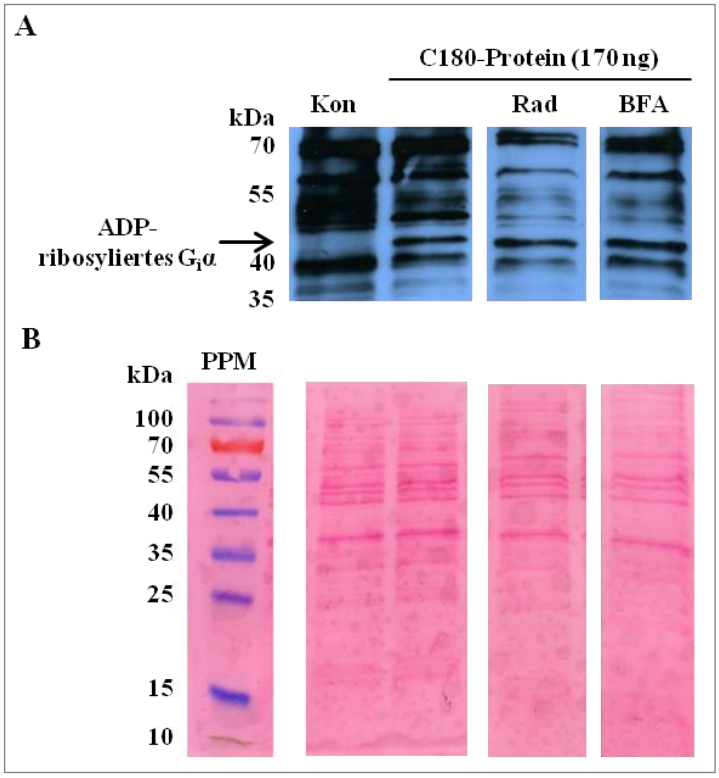


Abbildung 46: Analyse des Einflusses der Inhibitoren Radicicol und Brefeldin A auf die Enzymaktivität der S1-Untereinheit von Pertussistoxin *in vitro* (Enzymaktivitätstest). 40 µg des CHO-K1-PNS wurden mit 10 µM der Inhibitoren Radicicol (Rad) und Brefeldin A (BFA) für 30 Minuten vorinkubiert. Auf Eis wurden 1 µl Biotin-NAD^+ (10 µM) und 1,25 µl C180-Protein (entspricht 170 ng) zugegeben und mit ADP-Ribosylierungspuffer auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurde PNS ohne Toxin und ohne Inhibitoren (Kon) belassen und als Positivkontrolle nur mit Toxin inkubiert. Die Proben wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 6,25 µl 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT bei 100 °C für fünf Minuten gekocht. Es wurden eine SDS-PAGE und ein Westernblot angeschlossen. **A:** Mit selbstgemachtem ECL detektierte Membran des Westernblots mit Strep-POD (1:2.500). Die Laufhöhe des Substrats $G_i\alpha$ ist bei etwa 41 kDa markiert. **B:** Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulosemembran zum Nachweis vergleichbarer Proteinmengen. PPM = Prestained Protein Marker.

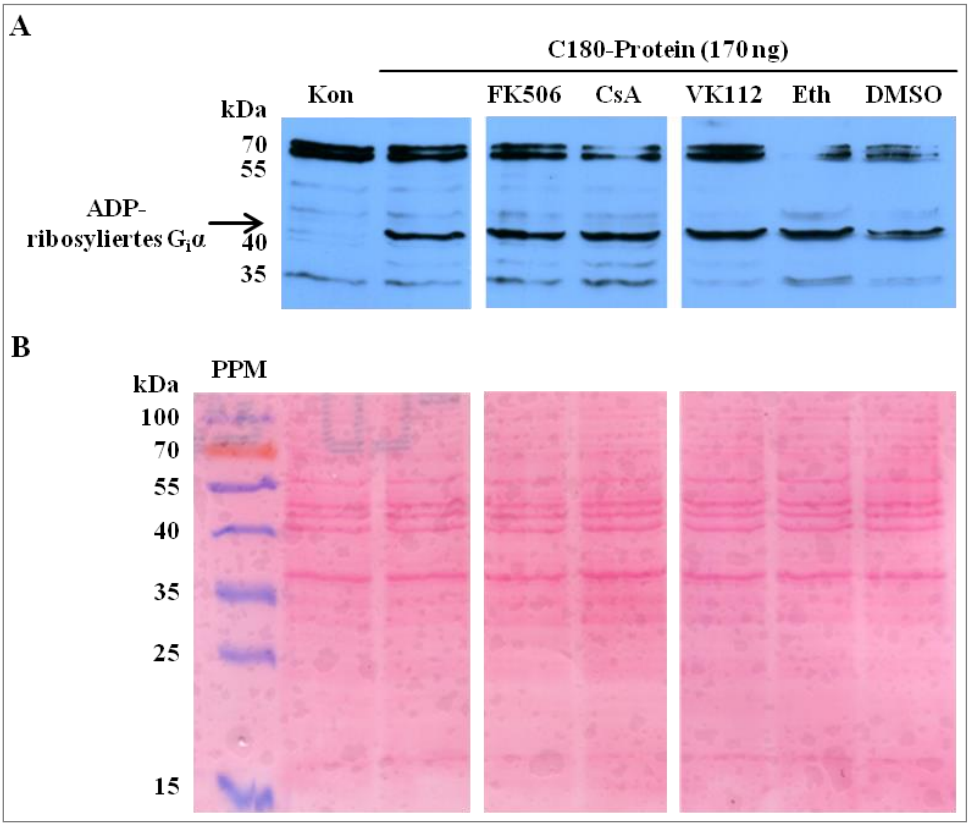


Abbildung 47: Analyse des Einflusses der Inhibitoren FK506, Cyclosporin A und VK112 sowie der Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid auf die Enzymaktivität der S1-Untereinheit von Pertussistoxin *in vitro* (Enzymaktivitätstest). 40 µg des CHO-K1-PNS wurden mit 10 µM der Inhibitoren FK506, Cyclosporin A (CsA) und VK112 beziehungsweise mit den Lösungsmitteln Ethanol (Eth) und Dimethylsulfoxid (DMSO) in entsprechender Konzentration für 30 Minuten vorinkubiert. Auf Eis wurden 1 µl Biotin-NAD^+ (10 µM) und 1,25 µl C180-Protein (entspricht 170 ng) zugegeben und mit ADP-Ribosylierungspuffer auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurde PNS ohne Toxin und ohne Inhibitoren belassen (Kon) und als Positivkontrolle nur mit Toxin inkubiert. Die Proben wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 6,25 µl 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT bei 100 °C für fünf Minuten gekocht. Es wurden eine SDS-PAGE und ein Westernblot angeschlossen. **A:** Mit selbstgemachtem ECL detektierte Membran des Westernblots mit Strep-POD (1:2.500). Die Laufhöhe des Substrats $G_i\alpha$ ist bei etwa 41 kDa markiert. **B:** Ponceau-S-Färbung der Nitrozellulosemembran zum Nachweis vergleichbarer Proteinmengen. PPM = Prestained Protein Marker.

Die Abbildungen 46 und 47 zeigen, dass bei allen mit Toxin inkubierten Proben eine prominente Bande bei 41 kDa vorkam, was der Laufhöhe des Substrats $G_i\alpha$ entspricht – wie unter „Ergebnisse“ (3.1.5) beschrieben. Bei der Negativkontrolle ohne Toxin kam diese Bande nicht vor. Außerdem zeigen die Abbildungen 46 respektive 47, dass die eingesetzten Inhibitoren Radicicol und Brefeldin A beziehungsweise FK506, Cyclosporin A und VK112 in Anwesenheit des Toxins keine Änderung der Signalintensität der Bande bei 41 kDa verursacht hatten, ebenso nicht die getesteten Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid. Dies ließ darauf schließen, dass weder die Inhibitoren – einschließlich der verwendeten Referenzsubstanz Brefeldin A – noch die Lösungsmittel die Enzymaktivität des C180-Proteins beeinflusst hatten. Der Hemmungsmechanismus der

Inhibitoren bestand demnach nicht in der Beeinflussung der Enzymaktivität von Pertussistoxin.

3.7 Detektion der S1-Untereinheit von Pertussistoxin im Zytosol von CHO-K1-Zellen (Digitonintest)

Mit dem Digitonintest sollten Hinweise auf den zeitlichen Verlauf der Aufnahme der S1-Untereinheit in das Zytosol von CHO-K1-Zellen gewonnen und geprüft werden, ob die Inhibitoren diesen Verlauf beeinflussen, um weitere Hinweise auf deren Wirkmechanismus zu erhalten. Bei diesem Versuch wird das nicht-ionische Detergens Digitonin eingesetzt, um Poren in Zellmembranen zu bilden, durch welche das Zytosol und darin enthaltene Moleküle extrahiert werden können. Dadurch kann eine Trennung von zytosolischen und membrangebundenen Bestandteilen erreicht werden, was deren anschließende separate Untersuchung ermöglicht.

Beim Digitonintest wurden 2,5 x 10^6 CHO-K1-Zellen in 12-Well-Zellkulturplatten bis zur Konfluenz kultiviert und danach wie bei den Vergiftungsversuchen respektive unter „Material und Methoden“ (2.2.16) beschrieben behandelt, wobei lediglich das CHO-Medium durch 500 µl MEM ersetzt wurde.

Vor der Behandlung mit Digitonin wurde das Medium abgesaugt und die Zellen gewaschen, um ungebundenes oder nicht internalisiertes Toxin zu entfernen. Für die Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen für fünf Minuten bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert und danach weitere 25 Minuten bei 4 °C auf Eis, um auch die zytosolischen Proteine einschließlich der dort vermuteten respektive sich befindenden S1-Untereinheit des Pertussistoxins zu extrahieren. Anschließend wurde der Überstand abgenommen (Zytosolfraktion) und in Eppendorfgefäße überführt. Die verbliebenen Zellen (Membranfraktion) wurden gewaschen.

Um aus der Zytosolfraktion sicher Endosomen oder andere Membranbestandteile zu entfernen, wurde diese zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfgefäße überführt und die Proben gekocht. Die extrahierten Zellen der Membranfraktion wurden abgelöst und ebenfalls gekocht. Um im Westernblot für die Laufhöhe der S1-Untereinheit von Pertussistoxin einen Vergleich zu haben, wurde ins Gel zusätzlich eine Positivkontrolle mit verdünntem Pertussistoxin aufgetragen.

Zytosol- und Membranfraktionen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblots analysiert. Um parallel mehrere Proteine pro Probe nachweisen zu können, wurden die Membranen vor der Antikörperinkubation bei der 50 kDa Markierung der

Größenstandard-Banden durchgeschnitten: Die Membranhälften kleiner 50 kDa wurden mit einem anti-S1-PTX Antikörper in verschiedenen Verdünnungen inkubiert, um auch die erwarteten geringeren Mengen des Proteins in der Zytosolfraktion detektieren zu können. Auf den Membranhälften größer 50 kDa sollten die Proteine Hsp90 und EEA_1 detektiert werden, die interne Kontrollen darstellen. Diese Membranhälften wurden daher sowohl mit einem anti-Hsp90 als auch mit einem anti-EEA_1 Antikörper inkubiert. Da das Protein Hsp90 in jeder Zelle in gleicher Menge vorhanden ist, eignet es sich als Kontrolle, um die eingesetzten Proteinmengen innerhalb der Fraktionen auf Vergleichbarkeit zu prüfen. Das Protein EEA_1 kommt in frühen Endosomen vor und sollte hier als Marker dienen, ob die Fraktionen erfolgreich getrennt wurden und keine beziehungsweise vergleichbare Mengen an Endosomen in der Zytosolfraktion waren. Da Pertussistoxin nicht aus frühen Endosomen transloziert, wurden in diesem experimentellen Ansatz vergleichbare Mengen an EEA_1 in der Zytosolfraktion akzeptiert und ebenfalls als Proteinmengenvergleich genutzt.

3.7.1 Zeitlicher Verlauf der Aufnahme der S1-Untereinheit von Pertussistoxin ins Zytosol

Für die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Aufnahme der S1-Untereinheit von Pertussistoxin ins Zytosol wurden die Zellen ohne Inhibitoren belassen und nur durch 500 ng/ml Pertussistoxin vergiftet. Für die Untersuchung der Zeitwerte nach einer, zwei und drei Stunden wurde in die jeweiligen Wells erst nach der entsprechenden Zeit das Toxin zugegeben, sodass die Vergiftungsreaktion in allen Wells zur gleichen Zeit gestoppt werden konnte. Abbildung 48 zeigt die Ergebnisse des Versuchs.

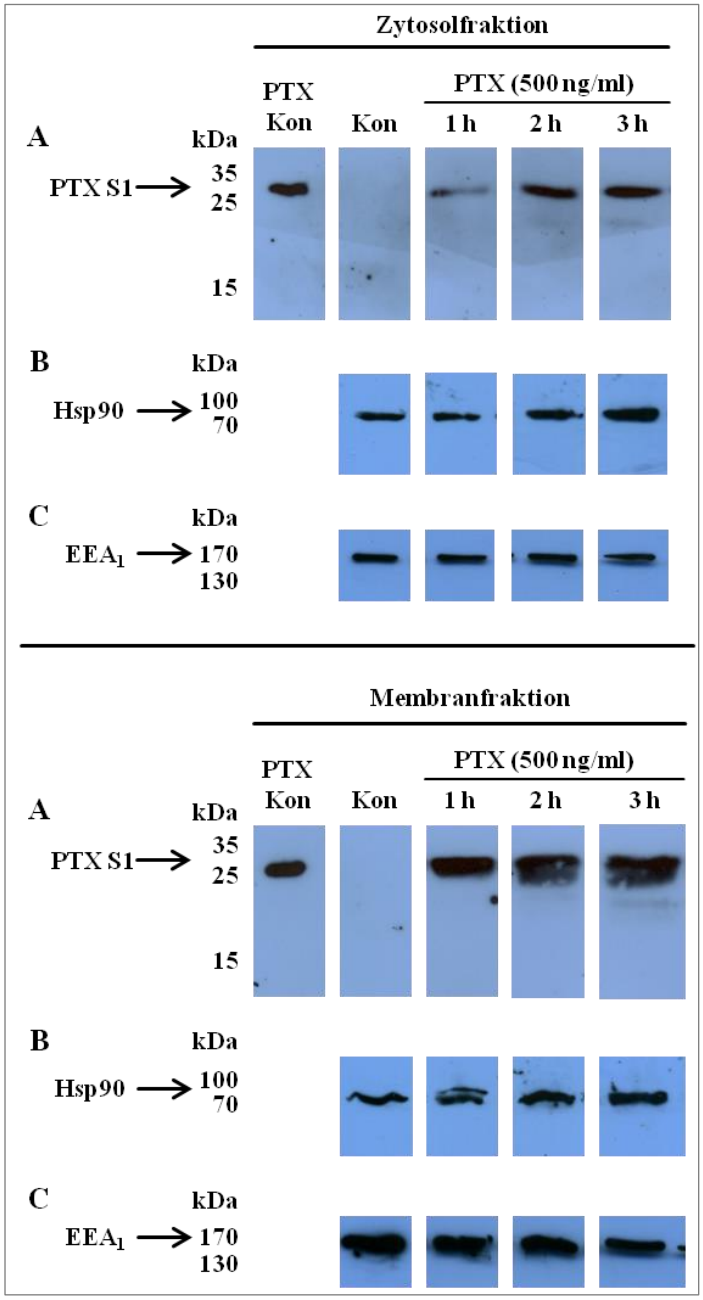


Abbildung 48: Analyse des zeitlichen Verlaufs der Aufnahme der S1-Untereinheit von Pertussistoxin ins Zytosol (Digitonintest). Die CHO-K1-Zellen wurden mit 500 ng/ml Pertussistoxin (PTX) vergiftet beziehungsweise unbehandelt belassen (Negativkontrolle (Kon)). Das Toxin wurde für eine, zwei und drei Stunden (1 h, 2 h und 3 h) inkubiert, die Reaktion danach gestoppt, die Zellen gewaschen und dann mit einer Digitoninlösung für fünf Minuten bei Raumtemperatur und für weitere 25 Minuten bei 4 °C abgedunkelt inkubiert, um das Zytosol und darin enthaltene Proteine zu extrahieren (Zytosolfraktion). Nach Zentrifugation bei 2.000 rpm für fünf Minuten wurden die Überstände mit 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT versetzt und bei 95 °C für zehn Minuten gekocht. Die extrahierten Zellen wurden mit 2,5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT aus den Wells gelöst (Membranfraktion) und für zehn Minuten bei 95 °C gekocht. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Als Laufhöhenkontrolle für S1 diente eine Positivkontrolle mit verdünntem Toxin (PTX Kon). **A:** Mit industriell hergestelltem ECL detektierte Membranen der Westernblot-Analysen mit einem anti-PTX-S1 Antikörper (beide Fraktionen 1:2.000). Laufhöhe der S1-Untereinheit etwa bei 27 kDa. **B:** Mit industriell hergestelltem ECL detektierte Membranen der Westernblot-Analysen mit einem anti-Hsp90 Antikörper (beide Fraktionen 1:500) zum Nachweis gleicher Proteinmengen innerhalb der Fraktionen. Laufhöhe von Hsp90 bei etwa 90 kDa. **C:** Mit industriell hergestelltem ECL detektierte Membranen der Westernblot-Analysen mit einem anti-EEA_1 Antikörper (beide Fraktionen 1:1.000) als Marker für frühe Endosomen zur Prüfung, ob in der Zytosolfraktion keine oder zumindest vergleichbare Signale für frühe Endosomen auftreten und die Trennung der Fraktionen erfolgreich war. Laufhöhe von EEA_1 bei etwa 180 kDa.

Das Ergebnis der Analyse des zeitlichen Verlaufs der Aufnahme der S1-Untereinheit von Pertussistoxin ins Zytosol (Digitonintest) in Abbildung 48 zeigt, dass in der Zytosolfraktion zunehmende Mengen der S1-Untereinheit von einer bis zu drei Stunden detektierbar waren, also unterschiedlich viel S1 über die Zeit ins Zytosol gelangt war. In der Membranfraktion waren die Mengen an S1 weitgehend vergleichbar. In beiden Fraktionen gab es keine Signale für die S1-Untereinheit bei unbehandelten Kontrollzellen. Das Laufverhalten des S1-Signals stimmte mit der S1-Laufkontrolle mit verdünntem Pertussistoxin überein. Um diese Signalintensitäten von unterschiedlichen eingesetzten Proteinmengen abgrenzen zu können, wurde in beiden Fraktionen im Westernblot ein anti-Hsp90 Antikörper eingesetzt und die Signalintensitäten für Hsp90 verglichen, das in jeder Zelle in gleicher Menge vorhanden ist. Für eine valide Aussage sollten diese innerhalb einer Fraktion weitgehend vergleichbar sein, was hier gegeben war. Um eine gelungene Trennung der Fraktionen zu prüfen, wurde in beiden Fraktionen im Westernblot ein anti-EEA_1 Antikörper eingesetzt, um frühe Endosomen zu detektieren. Hierbei sollte in der Zytosolfraktion kein EEA_1 beziehungsweise vergleichbare Signalintensitäten für EEA_1 auftreten, was in diesem Versuch gegeben war. Da es sich bei Pertussistoxin um ein *long-trip* Toxin handelt, das nicht aus frühen Endosomen transloziert, stört die Anwesenheit der Endosomen in diesem experimentellen Ansatz nicht.
Der Versuch zeigte, dass die Aufnahme der S1-Untereinheit ins Zytosol zeitabhängig war und nach etwa zwei bis drei Stunden den maximalen Wert erreicht hatte.

3.7.2 Untersuchung des Einflusses der Inhibitoren auf die Aufnahme der S1-Untereinheit von Pertussistoxin ins Zytosol

Für die Testung der Inhibitoren im Digitonintest wurden diese – wie bei den Vergiftungsversuchen – in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt und für 30 Minuten im Medium belassen bevor die Zellen mit 500 ng/ml Pertussistoxin vergiftet wurden. Die Einwirkungszeit des Toxins betrug hierbei eine und zwei Stunden, was aufgrund der Ergebnisse des Digitonintests zum zeitlichen Verlauf der Aufnahme der S1-Untereinheit gewählt worden war. Die Ergebnisse des Digitonintests mit Inhibitoren sind in den Abbildungen 49 und 50 dargestellt.

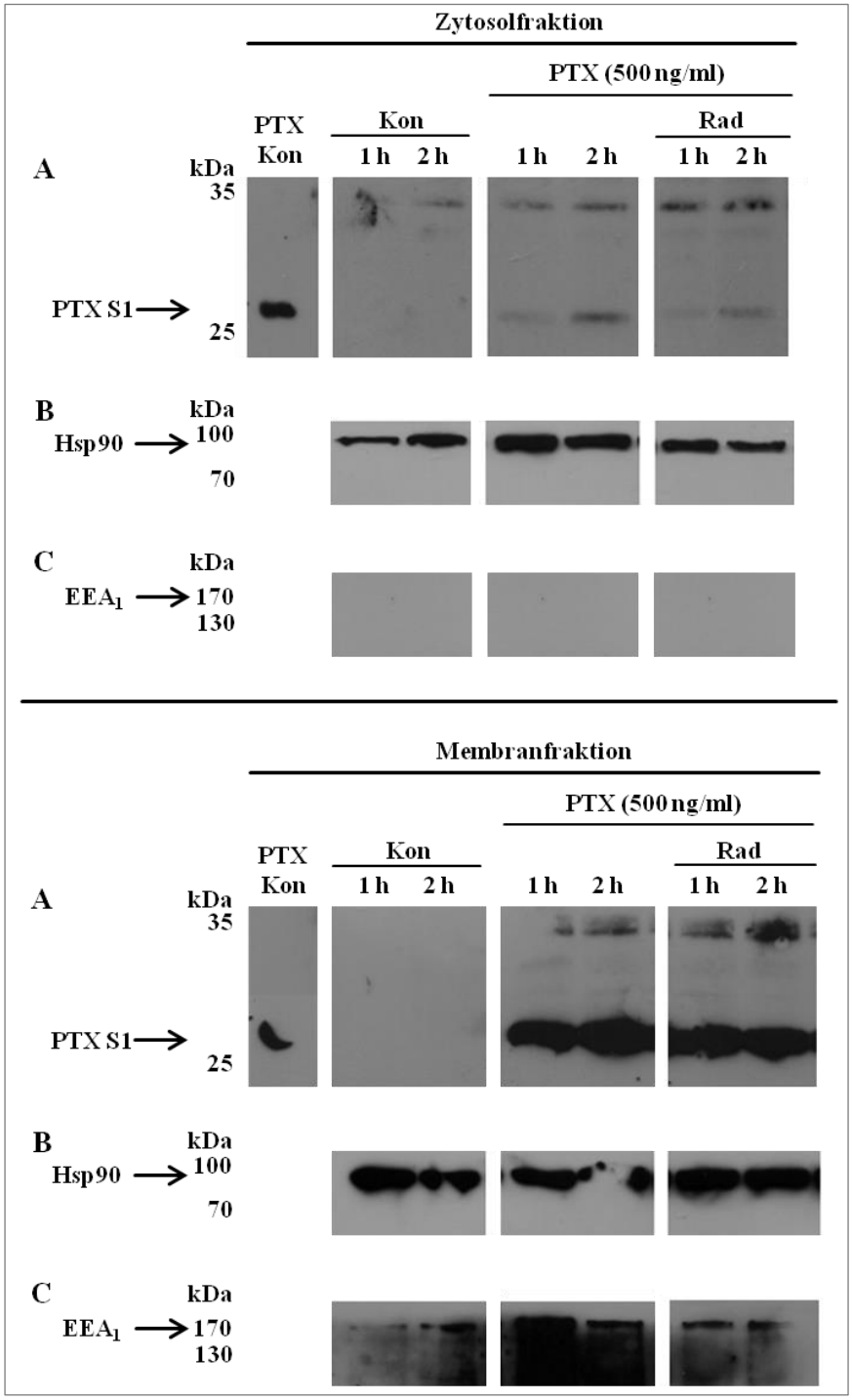


Abbildung 49: Untersuchung des Einflusses des Inhibitors Radicicol auf die Aufnahme der S1-Untereinheit von Pertussistoxin ins Zytosol (Digitonintest). Die CHO-K1-Zellen wurden mit 10 µM des Inhibitors Radicicol (Rad) vorinkubiert beziehungsweise unbehandelt belassen (Negativkontrolle (Kon)) oder nur mit Toxin behandelt (Positivkontrolle Pertussistoxin (PTX)). Für die Vergiftung wurden 500 ng/ml Pertussistoxin eingesetzt und das Toxin für eine und zwei Stunden (1 h und 2 h) inkubiert, die Reaktion danach gestoppt, die Zellen gewaschen und dann mit einer Digitoninlösung für fünf Minuten bei Raumtemperatur und für weitere 25 Minuten bei 4 °C abgedunkelt inkubiert, um das Zytosol und darin enthaltene Proteine zu extrahieren (Zytosolfraktion). Nach Zentrifugation bei 2.000 rpm für fünf Minuten wurden die Überstände mit 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT versetzt und bei 95 °C für zehn Minuten gekocht. Die extrahierten Zellen wurden mit 2,5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT aus den Wells gelöst (Membranfraktion) und für zehn Minuten bei 95 °C gekocht. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Als Laufhöhenkontrolle für S1 diente eine Positivkontrolle mit verdünntem Toxin (PTX Kon). **A:** Mit industriell hergestelltem ECL detektierte Membranen der Westernblot-Analysen mit einem anti-PTX-S1 Antikörper (beide Fraktionen 1:2.000). Laufhöhe der S1-Untereinheit etwa bei 27 kDa. **B:** Mit industriell

hergestelltem ECL detektierte Membranen der Westernblot-Analysen mit einem anti-Hsp90 Antikörper (beide Fraktionen 1:500) zum Nachweis gleicher Proteinmengen innerhalb der Fraktionen. Laufhöhe von Hsp90 bei etwa 90 kDa. **C:** Mit industriell hergestelltem ECL detektierte Membranen der Westernblot-Analysen mit einem anti-EEA_1 Antikörper (beide Fraktionen 1:1.000) als Marker für frühe Endosomen zur Prüfung, ob in der Zytosolfraktion keine oder zumindest vergleichbare Signale für frühe Endosomen auftreten und die Trennung der Fraktionen erfolgreich war. Laufhöhe von EEA_1 bei etwa 180 kDa.

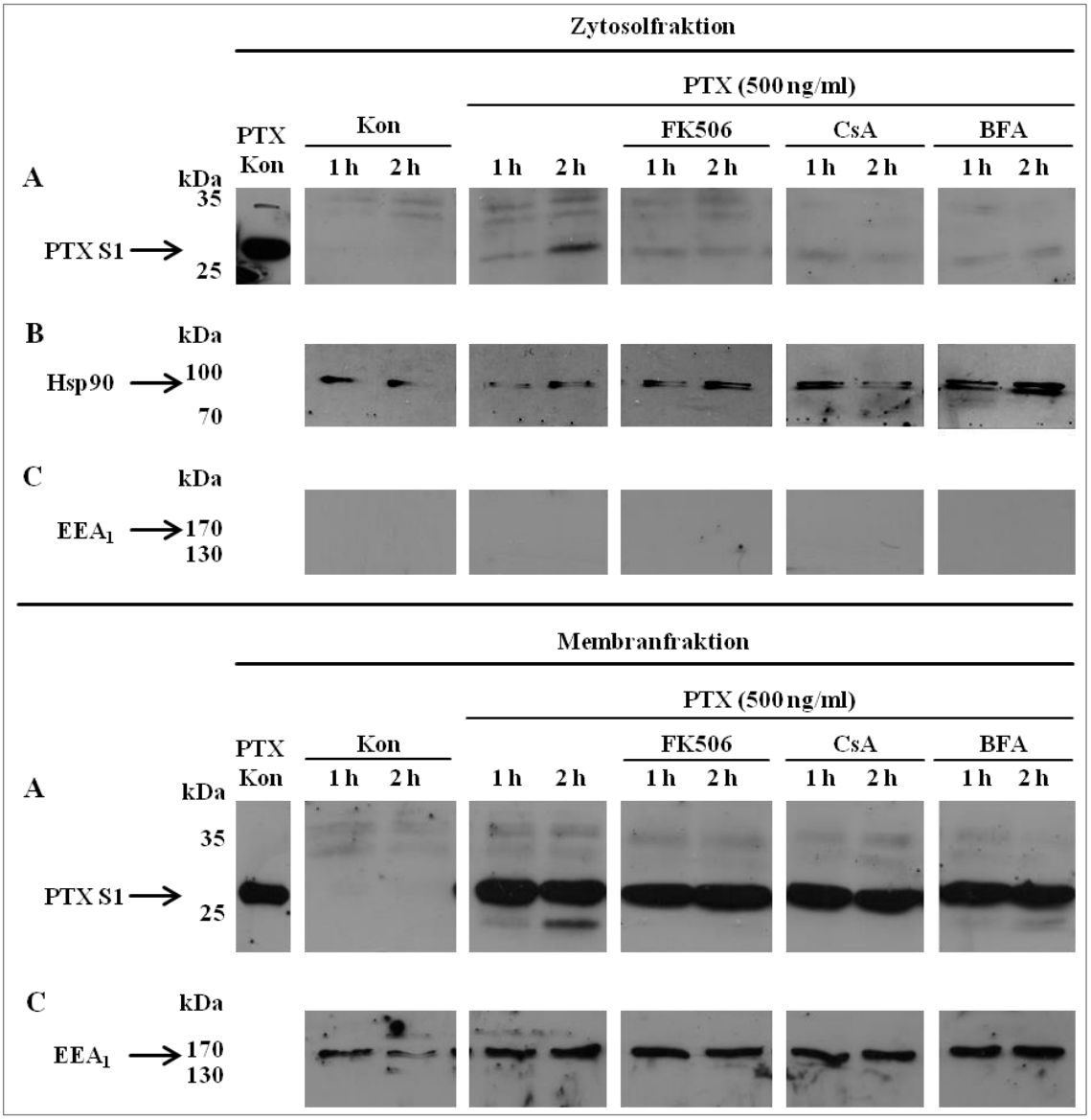


Abbildung 50: Untersuchung des Einflusses der Inhibitoren FK506, Cyclosporin A und Brefeldin A auf die Aufnahme der S1-Untereinheit von Pertussistoxin ins Zytosol (Digitonintest). Die CHO-K1-Zellen wurden mit 10 µM der Inhibitoren FK506, Cyclosporin A (CsA) und Brefeldin A (BFA) vorinkubiert beziehungsweise unbehandelt belassen (Negativkontrolle (Kon)) oder nur mit Toxin behandelt (Positivkontrolle Pertussistoxin (PTX)). Für die Vergiftung wurden 500 ng/ml Pertussistoxin eingesetzt und das Toxin für eine und zwei Stunden (1 h und 2 h) inkubiert, die Reaktion danach gestoppt, die Zellen gewaschen und dann mit einer Digitoninlösung für fünf Minuten bei Raumtemperatur und für weitere 25 Minuten bei 4 °C abgedunkelt inkubiert, um das Zytosol und darin enthaltene Proteine zu extrahieren (Zytosolfraktion). Nach Zentrifugation bei 2.000 rpm für fünf Minuten wurden die Überstände mit 5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT versetzt und bei 95 °C für zehn Minuten gekocht. Die extrahierten Zellen wurden mit 2,5 x Laemmli-Probenpuffer + 10 % DTT aus den Wells gelöst (Membranfraktion) und für zehn Minuten bei 95 °C gekocht. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Als Laufhöhenkontrolle für S1 diente eine Positivkontrolle mit verdünntem Toxin (PTX Kon). **A:** Mit industriell hergestelltem ECL detektierte Membranen der Westernblot-Analysen mit einem anti-PTX-S1 Antikörper (Zytosolfraktion 1:500, Membranfraktion 1:2.000). Laufhöhe der S1-Untereinheit etwa bei 27 kDa. **B:** Mit industriell hergestelltem ECL detektierte Membran der Westernblot-Analyse mit einem anti-Hsp90 Antikörper (1:500) zum Nachweis gleicher Proteinmengen innerhalb der Fraktion. Laufhöhe von Hsp90 bei etwa 90 kDa. **C:** Mit industriell hergestelltem ECL detektierte Membranen der Westernblot-Analysen mit einem anti-EEA_1 Antikörper (beide Fraktionen 1:1.000) als Marker für frühe Endosomen zur Prüfung, ob in der Zytosolfraktion keine oder zumindest vergleichbare Signale für frühe Endosomen auftreten und die Trennung der Fraktionen erfolgreich war. Laufhöhe von EEA_1 bei etwa 180 kDa.

Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses des Inhibitors Radicicol beziehungsweise der Inhibitoren FK506, Cyclosporin A und Brefeldin A auf die Aufnahme der S1-Untereinheit von Pertussistoxin ins Zytosol (Digitonintest) in den Abbildungen 49 und 50 zeigen, dass in der Zytosolfraktion unterschiedlich starke Signale für die S1-Untereinheit im Westernblot für eine Behandlung mit Pertussistoxin und mit Pertussistoxin und den Inhibitoren detektierbar waren. Für die Werte nach zwei Stunden waren die Signalintensitäten sowohl beim Toxin als auch bei den Behandlungen mit Toxin und Inhibitoren höher als bei den Werten nach einer Stunde. Jedoch waren die Signalintensitäten für die Behandlungen mit Pertussistoxin und Radicicol beziehungsweise FK506, Cyclosporin A und Brefeldin A jeweils geringer als für Pertussistoxin allein. Unter der Behandlung mit den genannten Inhibitoren schien also nach der gleichen Zeit weniger S1 im Zytosol angekommen zu sein als bei der Behandlung mit Toxin ohne Inhibitoren. In den Membranfraktionen konnten unabhängig von den unterschiedlichen Behandlungen keine Unterschiede für die verschiedenen Stundenwerte detektiert werden. Bei allen Fraktionen gab es keine Signale für die S1-Untereinheit bei unbehandelten Kontrollzellen. Die Laufhöhe stimmte jeweils mit der S1-Laufkontrolle mit verdünntem Pertussistoxin überein. Der Nachweis vergleichbarer eingesetzter Proteinmengen wurde beim Versuch in Abbildung 49 für beide Fraktionen und beim Versuch in Abbildung 50 für die Zytosolfraktion durch Westernblot-Analysen gegen Hsp90 erbracht. Eine gelungene Trennung der Fraktionen wurde für beide Versuche in den Abbildungen 49 und 50 durch Westernblot-Analysen gegen EEA_1 bestätigt. In den Zytosolfraktionen traten hierbei keine Signale auf, was dafür sprach, dass diese weitgehend frei von frühen Endosomen waren. In den Membranfraktionen waren die Signalintensitäten in etwa vergleichbar. Dies bewies im Versuch in Abbildung 50 zudem, dass vergleichbare Proteinmengen in der Membranfraktion eingesetzt worden waren.

Die Digitonintests zeigten in Anwesenheit der Inhibitoren Radicicol, FK506, Cyclosporin A und der Referenzsubstanz Brefeldin A, dass unter ihrem Einfluss bei einer Vergiftung mit Pertussistoxin weniger der S1-Untereinheit im Zytosol detektierbar war respektive ankam als bei einer Vergiftung ohne Inhibitoren. Dies ist ein sehr starker Hinweis darauf, dass die getesteten Inhibitoren die Aufnahme der S1-Untereinheit von Pertussistoxin ins Zytosol von CHO-K1-Zellen hemmten, was die Annahme, dass die gehemmten Chaperone und PPIasen bei der Aufnahme der S1-Untereinheit von Pertussistoxin in das Zytosol eine entscheidende Funktion besitzen, unterstützt.

3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend stellen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wichtige neue Erkenntnisse über die zelluläre Aufnahme von Pertussistoxin in das Zytosol seiner Zielzellen dar.

Es wurden erstmals Hinweise auf die Beteiligung verschiedener zellulärer Faktoren, wie des Chaperons Hsp90 und der PPIasen, wie der FK506-Bindeproteine und der Cyclophiline, an der Aufnahme von Pertussistoxin in das Zytosol lebender Zellen in Zellversuchen gefunden. Dies gelang durch den Einsatz der spezifischen pharmakologischen Inhibitoren Radicicol, FK506 und Cyclosporin A in zwei Zellmodellen mit *adhärenten* und *nicht-adhärenten* Zellen und durch die Analyse der durch Pertussistoxin vermittelten Morphologieänderung der Zellen. Außerdem konnte erstmals eine hemmende Wirkung des nicht-immunsuppressiven Cyclophilin-Inhibitors VK112 bei Zellvergiftungen mit Pertussistoxin beobachtet werden.

Der den pharmakologischen Inhibitoren zu Grunde liegende Hemmungsmechanismus konnte durch weitere Experimente genauer charakterisiert werden: Es zeigte sich, dass unter Einsatz der Inhibitoren weniger $G_i\alpha$, als zelluläres Substrat von Pertussistoxin, in den Zellen ADP-ribosyliert wurde. Die Inhibitoren beeinflussten dabei weder die Enzymaktivität des Toxins noch seine Bindung an die zellulären Rezeptoren seiner Zielzellen. Der wichtigste Befund war, dass alle getesteten Inhibitoren die Aufnahme der S1-Untereinheit von Pertussistoxin in das Zytosol hemmten. Dies bedeutete, dass die gehemmten zellulären Faktoren wie das Hsp90, die FK506-Bindeproteine und die Cyclophiline am Transport der katalytischen Untereinheit von Pertussistoxin in das Zytosol entscheidend beteiligt waren.

4 Diskussion

Das Pertussistoxin von *Bordetella pertussis* löst die Keuchhustenerkrankung (Pertussis) aus und zählt zu den AB_5-Exotoxinen. Als sogenanntes *long-trip* Toxin wird es durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zielzellen aufgenommen und durchläuft anschließend retrograd verschiedene sekretorische Zellorganellen, um letztlich seine enzymatisch aktive Untereinheit aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol der Zielzellen zu translozieren. Im Zytosol angekommen wirkt die Enzymuntereinheit von Pertussistoxin, das sogenannte A-Protomer beziehungsweise die S1-Untereinheit, als ADP-Ribosyltransferase und modifiziert *in vivo* die α-Untereinheit von membrangebundenen $G_{i/o}$-Proteinen mit unterschiedlichen zellulären und systemischen Folgen.

Für verschiedene ADP-ribosylierende AB-Toxine konnte bereits gezeigt werden, dass entgegen früherer Annahmen (Oh *et al.* 1999) für die Aufnahme des Enzymanteils der Toxine nicht allein der Bindungs- / Translokationsanteil verantwortlich ist, sondern, dass die Toxine zusätzlich auf zytosolische Faktoren der Zielzelle angewiesen sind. Erste Hinweise darauf wurden für die Enzymdomäne DTA des Diphtherietoxins von *Corynebacterium diphtheriae* in rekombinanten DTA-Fusionstoxinen *in vitro* gefunden (Lemichez *et al.* 1997; Ratts *et al.* 2003), wobei die beteiligten Faktoren jedoch zunächst nicht bekannt waren. Später konnte für die Translokation des Diphtherietoxins aus sauren Endosomen ins Zytosol *in vitro* die Interaktion mit einem Komplex aus zytosolischen Translokationsfaktoren (CTF) identifiziert werden, zu welchen unter anderem das Chaperon Hsp90 und die Thioredoxinreduktase, sowie Cofaktoren wie ATP zählen (Ratts *et al.* 2003). Seither konnte die Beteiligung von Hsp90 auch bei der Translokation weiterer AB-Toxine wie dem C2-Toxin von *Clostridium botulinum*, dem Iota-Toxin von *Clostridium perfringens*, dem CDT-Toxin von *Clostridium difficile* und dem Choleratoxin von *Vibrio cholerae* nachgewiesen werden (Haug *et al.* 2003; Haug *et al.* 2004; Barth und Kaiser 2009; Taylor *et al.* 2010; Kaiser *et al.* 2011; Burress *et al.* 2014). Für die C2-, Iota- und CDT-Toxine konnte außerdem eine Interaktion mit Cyclophilin A (Barth und Kaiser 2009; Kaiser *et al.* 2009; Kaiser *et al.* 2011), mit Cyclophilin 40 (Ernst *et al.* 2015) und für das C2-Toxin auch eine Interaktion mit dem FK506-Bindeprotein 51 (Kaiser *et al.* 2012) bei der Translokation gezeigt werden. Cyclophiline und FK506-Bindeproteine zählen zur Gruppe der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) (Schiene-Fischer 2014). Durch weitere Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Hsp90 und die PPIasen dabei den Membrantransport der Enzymanteile der Toxine aus den Endosomen in das Zytosol der

Zielzelle unterstützen (Kaiser *et al.* 2009; Kaiser *et al.* 2011; Kaiser *et al.* 2012). Für einige ADP-ribosylierende Toxine, wie Diphtherie-, Iota, C2- und CDT-Toxin, konnte zwischenzeitlich zudem eine Beteiligung von Hsp70 bei der Translokation nachgewiesen werden (Ernst *et al.* 2016; Schuster *et al.* 2017). Interessanterweise haben alle zuvor genannten Toxine die Gemeinsamkeit, dass sie ADP-Ribosyltransferasen sind. Für Toxine mit anderen Enzymfunktionen, wie beispielsweise für die Metalloprotease Letaltoxin von *Bacillus anthracis* (Zornetta *et al.* 2010; Dmochewitz *et al.* 2011) sowie für die Glykosyltransferasen TcdA und TcdB von *Clostridium difficile* (Kaiser *et al.* 2012), konnte keine Beteiligung der zuvor genannten zytosolischen Faktoren nachgewiesen werden. Durch die Fusion des N-terminalen Anteils der Enzymkomponente des Anthrax-Letaltoxins, dem Letalen Faktor (LF_N), und der Enzymdomäne des Diphtherietoxins (DTA) zum Fusionstoxin LF_NDTA konnte wieder eine Beteiligung von Hsp90 und Cyclophilin A an der Translokation der DTA-Enzymdomäne nachgewiesen werden (Dmochewitz *et al.* 2011). Für das Fusionstoxin C2IN-C3lim (Barth *et al.* 1998) konnten Kaiser *et al.* 2012 zeigen, dass FK506-Bindeproteine zwar an der Translokation der Enzymkomponente C2I des C2-Toxins von *Clostridium botulinum* beteiligt sind, nicht jedoch an der Translokation des enzymatisch inaktiven N-terminalen Anteils C2IN. C3lim ist das sezernierte Exoenzym C3 von C*lostridium limosum*, dessen Enzymfunktion in einer ADP-Ribosyltransferase liegt, das aber nicht spezifisch in Zellen aufgenommen werden kann. Durch die Fusion von C3lim und C2IN kann C3lim durch die Nutzung der C2-Translokationskomponente in Zellen eingebracht werden. Dabei konnte für das Fusionstoxin wieder eine Beteiligung der FK506-Bindeproteine beobachtet werden (Kaiser *et al.* 2012).

All diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Enzymanteil der Toxine eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit den zytosolischen Faktoren innehat und vermutlich auch definiert, welche Wirtszellfaktoren an der Translokation beteiligt sind.

Auf dieser Hypothese basiert die Annahme, dass auch für das in der vorliegenden Arbeit zu untersuchende Pertussistoxin – ebenfalls eine ADP-Ribosyltransferase – diese Aufnahmebedingungen gelten, obwohl es sich dabei um ein *long-trip* Toxin handelt, das aus dem endoplasmatischen Retikulum und nicht aus sauren Endosomen transloziert. Auch die kürzlich beschriebene Beteiligung von Hsp90 bei der Translokation von Choleratoxin (Taylor *et al.* 2010; Burress *et al.* 2014), das ebenfalls aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol gelangt und mit Pertussistoxin einige strukturelle Gemeinsamkeiten

und Sequenzhomologien der Enzymuntereinheit auf Genebene aufweist (Locht und Keith 1986; Nicosia *et al.* 1986), lässt einen vergleichbaren Aufnahmemechanismus der beiden Toxine vermuten.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Translokation des A-Protomers beziehungsweise der S1-Untereinheit von Pertussistoxin mit Hilfe spezifischer pharmakologischer Inhibitoren gegen Hsp90 und die PPIasen, wie die Cyclophiline und die FK506-Bindeproteine, im Hinblick auf eine Interaktion mit diesen Faktoren untersucht und dadurch Hinweise auf deren Beteiligung an der Toxinaufnahme gewonnen werden. In einem weiteren Schritt sollte der Mechanismus, der einer Hemmung der Toxinwirkung durch die pharmakologischen Inhibitoren zu Grunde liegt, genauer charakterisiert werden, um somit Hinweise auf die Wirkungsweise der zytosolischen Faktoren zu erhalten.

4.1 Zellvergiftungsversuche mit Pertussistoxin

Die Zellvergiftungsversuche der vorliegenden Arbeit basieren auf den von Hewlett *et al.* 1983 erstmals beschriebenen morphologischen Veränderungen von CHO-Zellen bei einer Vergiftung mit Pertussistoxin, den sogenannten Clustern. Der Begriff beschreibt dabei das Bild von eng, meist in rundlicher Form aneinandergelagerten Zellen. CHO-Zellen zeigen bei einer Vielzahl von Toxinen typische Veränderungen. Cluster treten jedoch spezifisch bei einer Inkubation mit Pertussistoxin auf (Marchitto *et al.* 1987). Der dem Clustering zugrundeliegende Mechanismus konnte bisher nicht restlos aufgeklärt werden und es bleibt offen, ob die ADP-Ribosylierung der $G_{i/o}\alpha$-Proteine daran beteiligt ist. Für das eng verwandte Choleratoxin konnte eine spezifische längliche Ausdehnung, ein sogenanntes Stretching, von CHO-Zellen bei ihrer Vergiftung beobachtet werden, das auf die erhöhten intrazellulären cAMP-Level zurückgeführt werden konnte, die aus der ADP-Ribosylierung der α-Untereinheiten von G_s-Proteinen mit Verbleib des G-Proteins im aktiven Zustand und damit permanenter Aktivierung der Adenylatzyklase durch Choleratoxin resultieren (Hsie und Puck 1971; Hewlett *et al.* 1983). Interessant ist, dass CHO-Zellen, die gleichzeitig mit Choleratoxin und Pertussistoxin vergiftet werden, sowohl das Choleratoxin-spezifische Stretching als auch das Pertussistoxin-spezifische Clustering zeigen und die beiden Mechanismen offenbar nicht antagonistisch, sondern synergistisch wirken (Hewlett *et al.* 1983).

DeBault *et al.* 1976 konnten zeigen, dass mit Pertussistoxin inkubierte kultivierte Zellen vermehrt Mikrovilli an ihrer Oberfläche ausbilden und Bläschen (sogenannte „Blebs“), Lamellipodien sowie Filopodien zeigen. All diese Veränderungen tragen möglicherweise

zu einer vermehrten Zell-Zell-Interaktion und einer Agglutination bei und könnten damit eine Ursache der ausgebildeten Cluster darstellen.

Auf der Basis der entstehenden Cluster konnten in der vorliegenden Arbeit für die Zellvergiftungsversuche von CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin in einem ersten Schritt geeignete Versuchsbedingungen für die Testung der pharmakologischen Inhibitoren etabliert werden. Für andere Zellreihen, wie beispielsweise HeLa-Zellen oder J774-Makrophagen konnten in Vorversuchen keine (spezifischen) Morphologieänderungen bei einer Vergiftung mit Pertussistoxin festgestellt werden. Dadurch und durch die Tatsache, dass CHO-K1-Zellen im Vergleich zu anderen Zellreihen relativ schnell – innerhalb von 12 bis 16 Stunden – und langanhaltend – über 48 bis 72 Stunden – auf eine Vergiftung mit Pertussistoxin reagieren (Hewlett *et al.* 1983), wurden die Versuche nur an CHO-K1-Zellen durchgeführt. In einem zweiten Schritt wurden dann die spezifischen pharmakologischen Inhibitoren gegen die zytosolischen Faktoren eingesetzt, um so eine Beteiligung dieser bei der Aufnahme des A-Protomers von Pertussistoxin ins Zytosol zu untersuchen. Als Referenzsubstanz für die Inhibitoren wurde dabei der Inhibitor Brefeldin A eingesetzt, der durch den Abbau des Golgi-Apparates in ein anderes System eingreift als die zu testenden Inhibitoren (Klausner *et al.* 1992; Chardin und McCormick 1999). Seine Wirksamkeit ist bereits für einige *long-trip* Toxine, wie Choleratoxin, hitzelabiles Enterotoxin von *Escherichia coli* (Donta *et al.* 1993; Nambiar *et al.* 1993; Orlandi *et al.* 1993) und Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa*, bekannt, die alle ebenfalls aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol translozieren (Yoshida *et al.* 1991). Xu und Barbieri 1995 setzten Brefeldin A außerdem bereits erfolgreich bei Pertussistoxin ein.

Als erstes wichtiges Zwischenergebnis konnte in den Versuchen der vorliegenden Arbeit damit erstmals gezeigt werden, dass alle getesteten Inhibitoren, wie Radicicol, das Hsp90 inhibiert, Cyclosporin A (respektive VK112 – siehe unten), das Cyclophiline inhibiert, und FK506, das FK506-Bindeproteine inhibiert, einen Hemmeffekt auf die Vergiftung von Pertussistoxin hatten – ähnlich der Referenzsubstanz Brefeldin A. Dieser trat dabei sowohl bei *adhärenten* CHO-K1-Zellen als auch bei *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen auf. Die Vergiftung der eingesetzten CHO-K1-Zellen wurde durch die Inhibitoren nicht komplett blockiert, aber signifikant gehemmt, was sich sowohl morphologisch als auch quantitativ durch Auszählung der Gesamtzellzahlen zeigen ließ.

In weiteren Versuchen konnte zum einen ausgeschlossen werden, dass die Inhibitoren und ihre Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid in Abwesenheit von Pertussistoxin einen

Effekt auf die Zellen hatten und zum anderen, dass die Lösungsmittel allein die Vergiftung durch Pertussistoxin hemmten. Der Hemmeffekt war somit eindeutig auf die inhibitorischen Substanzen selbst zurückzuführen und die morphologischen Veränderungen der Zellen auf die Inkubation mit Pertussistoxin.

Interessanterweise konnte bei allen Versuchen beobachtet werden, dass bei den mit Toxin behandelten Zellen zum Beobachtungszeitpunkt weniger Zellen sichtbar waren, als bei den unbehandelten Kontrollzellen. Nach Auszählung mehrerer Versuche zeigte sich, dass der Zellzahlunterschied jeweils signifikant war und sich nur durch die unterschiedliche Behandlung erklären ließ. Für die mit Inhibitor und Pertussistoxin behandelten Zellen ergaben sich jeweils Werte zwischen denen der Kontrollzellen und den mit Pertussistoxin vergifteten Zellen ohne Inhibitoren. Daher wurde eine Auszählung der Gesamtzellzahlen bei den einzelnen Behandlungen herangezogen, um die erhobenen Daten zu quantifizieren. Hewlett *et al.* 1983 wendeten für die Beurteilung der Cluster eine Auswertung durch zwei Beobachter an, die für die auf einem Bild auftretenden Cluster Punkte verteilten. Die gewählte Methode der Auszählung der Zellzahlen erschien hier für die Testung der Inhibitoren geeigneter, da sie weniger subjektiv ist als eine Bewertung der Cluster und berücksichtigt, dass beim Einsatz der Inhibitoren zwar deutlich weniger, aber weiterhin noch Cluster sichtbar waren. Ob beziehungsweise wie eine Vergiftung mit Pertussistoxin sich auf die Zellteilung von kultivierten Zellen auswirkt, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Der auftretende Hemmeffekt beim Einsatz der Inhibitoren im Sinne einer Vergiftungsverzögerung kann in den Zellversuchen zum einen dadurch erklärt werden, dass die Substanzen über die Zeit nicht fest an ihren Zielstrukturen gebunden bleiben, sondern abdissoziieren und somit ihre hemmende Wirkung nachlässt. Zum anderen wäre eine Inaktivierung der Inhibitoren im Inneren der Zellen eine Möglichkeit, die den gewissen Wirkungsverlust erklären könnte. Außerdem ist denkbar, dass die Blockade einer Gruppe der zytosolischen Faktoren im Zeitverlauf durch eine andere Gruppe kompensiert wird – zum Beispiel könnten FK506-Bindeproteine die Aufgabe der Cyclophiline teilweise übernehmen oder der Ausfall von Hsp90 durch Hsp70 teilkompensiert werden, da die beiden Chaperone oft kooperativ wirken (Schumacher *et al.* 1996). Um dies zu prüfen, könnten die Versuche beispielsweise mit mehreren Inhibitoren gleichzeitig durchgeführt und dadurch mehrere der zytosolischen Faktoren in einem Ansatz blockiert werden. Für Pertussistoxin könnten des Weiteren Versuche mit einem Hsp70-spezifischen Inhibitor

gemacht werden, wie zum Beispiel mit HA9 aus der Arbeitsgruppe Schiene-Fischer (Halle an der Saale), um eine Beteiligung von Hsp70 an der Aufnahme des A-Protomers von Pertussistoxin zu untersuchen (Glück 2017). Hierbei konnte zwischenzeitlich in der Arbeitsgruppe eine Interaktion zwischen Pertussistoxin und Hsp70 festgestellt werden, wobei spezifische pharmakologische Hsp70-Inhibitoren die Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin hemmen (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Barth, Publikation in Vorbereitung).

Für die zytosolischen Faktoren wie beispielsweise das Hsp90 wird zudem diskutiert, ob es seine Funktion erst als Teil eines Komplexes mit anderen Proteinen wie Hsp70, Hop, Hsp40 und p23 ausüben kann (Young *et al.* 2001; Pratt und Toft 2003, 2003; Li *et al.* 2012) Zusammen mit den Ergebnissen, dass bei einer gleichzeitigen Hemmung mehrerer zytosolischer Faktoren, wie zum Beispiel des Hsp90 und der Cyclophiline bei einer Vergiftung mit C2-Toxin, deutlich weniger Vergiftungserscheinungen auftraten (Kaiser *et al.* 2009), führte dies zu der Hypothese, dass möglicherweise eine Art Komplex aus zytosolischen Translokationsfaktoren (CTF) die Aufnahme der Enzymanteile der Toxine ins Zytosol katalysiert. Das Vorhandensein eines solchen Translokationskomplexes für die verschiedenen Toxine muss jedoch erst noch weiter untersucht werden.

Für die PPIasen gilt darüber hinaus, dass die Isomerisierung von Peptid-Bindungen in den Zellen auch ohne sie ablaufen kann – nur eben langsamer –, sodass deren Hemmung nicht zu einer kompletten Vergiftungsblockierung führen muss. Für einige AB-Toxine im Allgemeinen konnte außerdem bereits nachgewiesen werden, dass sie sehr potente Gifte sind, bei welchen schon ein Molekül, zum Beispiel beim Diphtherietoxin, ausreichen kann, um eine Zelle erfolgreich zu vergiften (Yamaizumi *et al.* 1978). Bereits bei der Etablierung der Versuchsbedingungen für Pertussistoxin in der vorliegenden Arbeit ließ sich zeigen, dass selbst geringste Mengen an Toxin und auch eine Entfernung desselben aus dem Zytosol kurze Zeit nach der initialen Zugabe noch zu den beschriebenen Clustern als Vergiftungserscheinungen führten. Daher kann davon ausgegangen werden, dass bereits ein minimales Nachlassen der Inhibitorwirkung dazu führt, dass die Vergiftung in ihrem Verlauf nicht mehr komplett blockiert werden kann. Diese These wird auch durch die Ergebnisse mit dem Inhibitor Brefeldin A gestützt, bei dem ebenfalls einzelne Cluster nach der Behandlung mit Pertussistoxin auftraten.

Ein Zeitverlauf der hemmenden Wirkung der Inhibitoren konnte für die Vergiftung von Pertussistoxin nicht direkt nachgewiesen werden, da es dabei zwei wesentliche Unter-

schiede zu den bisher in der Arbeitsgruppe untersuchten Toxinen gibt, die diese Untersuchung erschweren: Zum einen vergiftet Pertussistoxin die Zellen wesentlich langsamer, wobei erste morphologische Veränderungen erst nach etwa zwölf bis 16 Stunden auftreten (Hewlett *et al.* 1983) – im Gegensatz dazu kann bei Toxinen wie dem C2-Toxin oder dem Diphtherietoxin schon nach relativ kurzer Zeit von etwa ein bis drei Stunden ein morphologischer Effekt festgestellt werden. Zum anderen sind die auftretenden Cluster durch ihr variables Aussehen zu Beginn schwerer zu identifizieren und insgesamt schwerer zu quantifizieren als beispielsweise die klar erkennbare Abrundung von HeLa-Zellen bei der Vergiftung durch C2-Toxin, die auf der Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts beruht (Reuner *et al.* 1987; Aktories und Wegner 1992; Barth und Aktories 2011). Um die Hemmung der Vergiftung zeitabhängig zu analysieren, wäre es daher vermutlich günstiger, ein anderes Verfahren auszuwählen, das nicht die mikroskopische Zellmorphologie als Analysekriterium nutzt. Eventuell ließe sich auf der Basis der bereits gewonnen Erkenntnisse ein Zellviabilitätstest, zum Beispiel unter Verwendung des MTS-Reagens, durchführen oder ein diesem ähnliches Verfahren, das dann in einem zweiten Schritt die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Vergiftung in An- und Abwesenheit der Inhibitoren zulassen würde.

Das MTS-Reagens ist ein Farbstoff, der in lebenden Zellen in Abhängigkeit von deren Dehydrogenasen-Enzymaktivität zu Formazan reduziert wird. Dies führt zu einem Farbumschlag, der photometrisch bestimmt werden kann und ein Maß für die Stoffwechselaktivität darstellt, was wiederum Rückschlüsse auf die Zellviabilität ermöglicht. Der Farbstoff behindert dabei nicht die Stoffwechselprozesse selbst. Mit Hilfe des MTS-Reagens konnten bei Zellviabilitätstests bereits für das Diphtherietoxin (Schuster 2017) und das C2-Toxin gezeigt werden, dass die Inhibitoren nicht nur die morphologischen Veränderungen der Zellen hemmten, sondern auch tatsächlich das Überleben der Zellen verlängerten, wobei Zelltod das Ende der Vergiftung bei diesen beiden Toxinen darstellt. Die Zeitwerte der Vergiftungsversuche und der Messungen mit dem MTS-Reagens unterschieden sich dabei um mehrere Stunden, was dafür spricht, dass die morphologischen Veränderungen dem Zelltod vorausgehen. Für das C2-Toxin stellt dies primär die morphologische Zellabrundung von HeLa-Zellen durch die ADP-Ribosylierung von monomerem, globulärem Aktin (G-Aktin) und der konsekutiven Depolymerisation der Aktinfilamente und erst sekundär der verzögernd eintretende Zelltod durch Apoptose (Heine *et al.* 2008) dar. Beim Diphtherietoxin scheint dies die frühe Wirkung auf das Aktin-Zytoskelett und die später einsetzende zytotoxische Wirkung der ADP-

Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 (EF-2), die die Proteinbiosynthese blockiert, zu repräsentieren (Varol *et al.* 2012).

Für Pertussistoxin müssten zuerst Untersuchungen ohne die Inhibitoren gemacht werden, um zu sehen, wie die Zellviabilität von CHO-K1-Zellen im Laufe der Vergiftung ausfällt und ob eine Messung mit dem MTS-Reagens für die Veränderungen sensitiv genug ist, da nach bisherigem Kenntnisstand eine Vergiftung mit Pertussistoxin nicht zum Zelltod führt, sondern die Zellteilung hemmt, was aber prinzipiell auch mit dem MTS-Reagens detektiert werden kann. Zwischenzeitlich durchgeführte Experimente konnten dabei für Pertussistoxin lediglich mit Brefeldin A, der genutzten Inhibitor-Referenzsubstanz, einen protektiven Effekt bei der Vergiftung von CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin aufweisen, nicht jedoch für die zu testenden Inhibitoren (Glück 2017). Möglicherweise haben diese einen zu geringen Hemmeffekt oder die Messung mit dem MTS-Reagens ist hierbei nicht sensitiv genug.

Eventuell könnten ähnliche Messungen mit sich ändernden Parametern, wie beispielsweise dem cAMP-Spiegel durchgeführt werden, der durch die Enzymfunktion von Pertussistoxin beeinflusst wird. Dazu müsste jedoch zuvor durch weitere Versuche noch ausgeschlossen werden, dass die eingesetzten Inhibitoren einen direkten Einfluss auf die Adenylatzyklase und folglich auf die Produktion von cAMP haben, was allerdings sehr unwahrscheinlich sein dürfte. Für diese Fragestellung wendeten (Taylor *et al.* 2010) beim Choleratoxin einen Versuch mit Forskolin an, einer chemischen Verbindung, die direkt die Adenylatzyklase ohne Beteiligung der G-Proteine stimulieren kann. Dabei konnte gezeigt werden, dass der spezifische Hsp90-Inhibitor Geldanamycin die Forskolin-induzierte cAMP-Konzentrationserhöhung nicht beeinflusst und der Hemmungsmechanismus somit auf der Interaktion mit Hsp90 beruht. Auf dieser Basis konnte die Arbeitsgruppe dann bei Choleratoxin die Veränderung des cAMP-Spiegels mit einem enzymgekoppelten Immunadsorptionstest sichtbar machen, bei dem [^{125}J]cAMP als Kompetitorantigen mit dem entstehenden cAMP um die Antikörper auf der Testplatte konkurriert (Massey *et al.* 2009; Taylor *et al.* 2010). Durch eine Farbreaktion kann so unterschieden werden, ob viel cAMP aus den Zellen oder viel Kompetitorantigen gebunden ist, was Rückschlüsse auf den cAMP-Spiegel ermöglicht. (Taylor *et al.* 2010) konnten damit zeigen, dass die im Zellversuch auftretende Hemmung der Vergiftung mit Choleratoxin durch den Hsp90-spezifischen Inhibitor Geldanamycin auch mit einem verminderten cAMP-Anstieg einherging.

Für eine Beobachtung der Vergiftung mit Ausbildung der Cluster im Zeitverlauf im Allgemeinen und dem Zellverhalten bei einer Vergiftung durch Pertussistoxin in An- und Abwesenheit der Inhibitoren im Speziellen, wäre zusätzlich auch eine Video-Dokumentation interessant, um den eher langsamen Vergiftungsverlauf effektiv beobachten zu können. Diese Methode könnte zudem neue Aufschlüsse über die bisher nicht restlos geklärte Clusterbildung im Sinne einer Zellwanderung, einer verminderten Zellteilung oder spezifischen morphologischen Zwischenstadien liefern. Bei dem eher schnell wirkenden und daher leicht unter dem Mikroskop beobachtbaren Toxin von *Photorhabdus luminescens*, das erst kürzlich in der Arbeitsgruppe untersucht wurde, konnte als Zwischenstadium zum Beispiel ein Blebbing beobachtet werden, bevor die Zellabrundung durch die Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts auftrat (Lang *et al.* 2014). Für eine Video-Dokumentation bei Pertussistoxin müssten allerdings Inkubator ähnliche Zustände während der langen Beobachtungszeit gewährleistet werden, da die CHO-K1-Zellen in der Zeit zwischen dem Vergiftungsstart und dem Beobachtungszeitpunkt bei 37 °C inkubiert worden waren und sensibel auf Temperaturschwankungen und weitere Unterbrechungen beziehungsweise Änderungen der Inkubationsbedingungen reagiert hatten, da sonst potentiell eine Beobachtungsverzerrung auftreten könnte.

Durch die Vergiftungsversuche mit den Inhibitoren Radicicol, FK506 und Cyclosporin A konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Hsp90, FK506-Bindeproteine und Cyclophiline an der Aufnahme des A-Protomers von Pertussistoxin ins Zytosol beteiligt sind, wobei der genaue Hemmungsmechanismus noch aufgeklärt werden muss.

4.2 Einordnung der pharmakologischen Inhibitoren in den medizinischen Kontext

Nach der erfolgreichen Hemmung der Vergiftung von CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin durch Cyclosporin A, welches die PPIase-Aktivität der Cyclophiline blockiert, wurde auch VK112 bei gleichen Versuchsbedingungen getestet. Beide Substanzen sind Cyclophilin-spezifische Inhibitoren, jedoch weist Cyclosporin A zusätzlich zu seiner Hemmung der PPIase-Aktivität eine immunsuppressive Wirkung über Calcineurin in T-Zellen auf. Dies limitiert den möglichen Einsatz von Cyclosporin A als Medikament bei einer Infektion mit toxinproduzierenden Bakterien. Nach aktuellem medizinischem Verständnis wäre die Abschwächung oder Ausschaltung des Immunsystems des Wirtsorganismus bei einer bakteriellen Infektion eher kontraproduktiv, da die abgeschwächte Immunantwort den

Bakterien nichts entgegen setzten könnte und eine körpereigene, effektive Bekämpfung derselben reduzieren würde. Die Gabe eines solchen Medikaments gilt daher aktuell als kontraindiziert.

Mit der Synthese von VK112 ist es der Arbeitsgruppe Schiene-Fischer gelungen, ein Cyclosporin A Derivat herzustellen, das lediglich die PPIase-Aktivität der Cyclophiline hemmt, aber nicht über den Calcineurin-Weg wirkt und somit keine immunsuppressive Wirkung hat (Prell *et al.* 2013).

Ein weiteres wichtiges Ergebnis, das in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, ist, dass der Inhibitor VK112 die Vergiftung von CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin ebenfalls deutlich verzögerte, was sich wiederum sowohl morphologisch als auch durch die Auszählung der Gesamtzellzahlen nachweisen ließ. Da sich die inhibitorische Wirkung von VK112 auf die PPIase-Aktivität beschränkt und nicht über den Calcineurin-Weg wirkt, kann aus den vergleichbaren Ergebnissen der Vergiftungsversuche mit Pertussistoxin und VK112 beziehungsweise Cyclosporin A geschlossen werden, dass auch Cyclosporin A über die Blockade der PPIase-Aktivität die Vergiftung von Pertussistoxin hemmt. Entgegen der bisherigen Erfahrungen mit VK112 in unserer Arbeitsgruppe, musste für die Hemmung der Vergiftung durch Pertussistoxin die Konzentration von VK112 nicht erhöht werden. Für die zuvor untersuchten Toxine wie das C2-Toxin, das Iota-Toxin und das Diphtherietoxin trat ein für VK112 und Cyclosporin A vergleichbarer Hemmeffekt nur auf, wenn VK112 in höheren Konzentrationen als Cyclosporin A eingesetzt wurde (Ernst *et al.* 2015; Schuster 2017; Schuster *et al.* 2017). Als Gründe für diese Beobachtungen wurden die optimierten Synthesebedingungen und bekannte geeignete Stabilisatoren für das kommerziell erhältliche Cyclosporin A diskutiert. Ein weiterer Grund könnte die Modifikation sein, die die immunsuppressive Wirkung ausschaltet und dadurch eventuell auch zu einer verminderten Wirksamkeit gegenüber Cyclophilinen führt und entsprechend durch den Einsatz höherer Konzentrationen kompensiert werden muss. In allen getesteten Fällen konnte die inhibitorische Wirkung von VK112 jedoch in den Zellvergiftungsexperimenten festgestellt werden. Der Grund für die Wirkung in niedrigeren Konzentrationen bei Pertussistoxin ist aktuell unbekannt – könnte aber beispielsweise in dem unterschiedlichen Aufnahmemechanismus des Toxins begründet liegen oder in einer anderen Gewichtung der Relevanz der zytosolischen Faktoren bei der Translokation des A-Protomers im Gegensatz zu den bisher untersuchten Toxinen.

VK112 als nicht-immunsuppressives Cyclosporin A Derivat ist ein vielversprechender Kandidat für die Entwicklung wirksamer Medikamente zur Behandlung von mit toxinproduzierenden Bakterien infizierten Patienten. Der Vorteil von VK112 als Ansatz für neue potentielle Medikamente läge darin, dass es direkt auf Toxinebene wirkt und – wie bereits erwähnt – durch die fehlende immunsuppressive Wirkkomponente nicht die körpereigene Immunantwort zur Abwehr der Bakterien mindert oder stört. Mit einer Wirkung auf Toxinebene könnte auch noch eine pharmakologische Anwendung erfolgen, wenn die Bekämpfung der toxinproduzierenden und -sezernierenden Bakterien beispielsweise bei Multiresistenzen gegen Antibiotika nicht oder nicht mehr möglich ist. Solche Medikamente könnten zudem eingesetzt werden, um Nebenwirkungen zu lindern, wenn aufgrund einer Antibiotikatherapie durch die iatrogen induzierte Lyse der Bakterien mit einer größeren Menge an freiwerdenden Toxinen zu rechnen ist.
Derartige nicht-immunsuppressive Substanzen, die die Aufnahme der Toxine inhibieren, könnten beispielsweise bei Erkrankungen durch Diphtherietoxin eingesetzt werden, bei dem erst kürzlich eine Beteiligung von Cyclophilinen bei der Toxinaufnahme nachgewiesen werden konnte (Schuster 2017; Schuster *et al.* 2017). Unterstützend könnten diese Inhibitoren auch bei der Behandlung der pseudomembranösen Colitis durch *Clostridium difficile* wirken, da das CDT-Toxin einen wichtigen Faktor bei besonders schweren Verläufen dieser Erkrankung darstellt.

Für eine Erkrankung an Keuchhusten durch eine Intoxikation mit Pertussistoxin wäre VK112 oder ein vergleichbarer Inhibitor insbesondere interessant, da es für Pertussis bisher keine kausale Therapie gibt. Der Einsatz von Antibiotika bringt – egal bei welcher Resistenzlage – dem Infizierten keinen Nutzen, da Antibiotika die Erkrankungssymptome nicht lindern und die Erkrankungszeit nicht verkürzen können. Lediglich die Infektiosität kann durch eine Antibiotikaeinnahme auf einige Tage reduziert werden. Vor dem Hintergrund, dass die Gabe von Antibiotika nur die toxin-produzierenden Bakterien bekämpfen kann, erscheint dies nachvollziehbar. Diese Art von Medikament ist nicht in der Lage bereits sezernierte Toxinmoleküle zu binden und zu neutralisieren. Die Synthese von Antikörpern gegen Pertussistoxin wurde bereits in experimentellen Versuchen ausprobiert und als wirksam getestet (Pootong *et al.* 2007), aber Antisera stehen zurzeit in Deutschland nicht zur Verfügung und werden nicht als etablierte Therapie angesehen. Zudem können körperfremde Antikörper auch zu Nebenwirkungen wie allergischen Schocks führen. Eine Impfung ist vorhanden, wirksam und wird auch von der Ständigen Impfkommission in

Deutschland empfohlen, kann aber aufgrund der fehlenden Immunantwort gerade die vulnerabelste Gruppe, nämlich die Säuglinge, die die meisten und schlimmsten Symptome und Komplikationen haben (Wendelboe *et al.* 2007a; Cantey *et al.* 2014; WHO 2016), nicht schützen. Somit wäre die Etablierung einer kausalen Therapie, die noch dazu am auslösenden Faktor ansetzte, eine begrüßenswerte Verbesserung der Versorgung von an Pertussis erkrankten Patienten.

In der Arbeitsgruppe von Dr. Felix Hausch (Max-Planck-Institut München) wurden inzwischen auch nicht-immunsuppressive Inhibitoren der FK506-Bindeproteine entwickelt, deren Wirksamkeit ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe getestet werden soll. Für erste Untersuchungen dazu könnten Toxine, wie das Iota-, das C2-, das CDT- und das Diphtherietoxin, geeignet sein, für die eine Beteiligung von FK506-Bindeproteinen bereits gezeigt werden konnte (Kaiser *et al.* 2012; Schuster 2017; Schuster *et al.* 2017) und deren Aufnahmemechanismen bereits genauer charakterisiert worden sind. In weiteren Untersuchungen könnten diese Inhibitoren dann auch bei Pertussistoxin angewendet und auf ihre Wirksamkeit untersucht werden (Vollmer 2015), da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch auf eine Beteiligung von FK506-Bindeproteinen bei der Aufnahme von Pertussistoxin hindeuten (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Barth, Publikation in Vorbereitung).
Für ein anderes ebenfalls nicht-immunsuppressives Cyclosporin A Derivat konnte bereits eine gute orale Bioverfügbarkeit in Tiermodellen nachgewiesen werden. Der Inhibitor hemmt *in vitro* die RNA-Replikation von Hepatitis C Viren (Hopkins *et al.* 2010).

4.3 Aufreinigung und Prüfung des C180-Proteins, der S1-Untereinheit des Pertussistoxins

Für die *in vitro* Versuche der vorliegenden Arbeit, den Nachribosylierungstest und den Enzymaktivitätstest, sollte zunächst das Holotoxin Pertussistoxin verwendet werden, um einzelne Aspekte der Vergiftungshemmung durch die Inhibitoren isoliert zu untersuchen. „*In vitro*“ bedeutet dabei, dass die Versuche nicht an lebenden, intakten Zellen, sondern an Zelllysat durchgeführt wurden, das selbst keine Stoffwechselprozesse mehr aufweist, die Reaktionen beeinflussen können. Für die durchgeführten *in vitro* Versuche ist bekannt, dass es Schwierigkeiten mit der Aktivierung der Enzymuntereinheit aus dem Holotoxin geben kann, wodurch sich diese nicht von der Bindungs- / Translokationsuntereinheit ab-

lösen und enzymatisch aktiv werden kann oder die Reaktion nur mit großer Zeitverzögerung auftritt, da beispielsweise essentielle Cofaktoren nicht in ausreichendem Maß vorhanden sind. Dies ist unter anderem ein Grund, weshalb die Vergiftungsbedingungen *in vitro* nicht direkt mit denen *in vivo* vergleichbar sind, bei welchen außerdem zusätzlich die Zellstoffwechselvorgänge weiterhin aktiv sind.

Auch bei der vorliegenden Arbeit war die Aktivität des Holotoxins Pertussistoxin bei Vorversuchen nicht ausreichend, weshalb es in den eigentlichen Versuchen nicht direkt eingesetzt werden konnte. Um die Reaktionsverzögerung bis zur Aktivierung der Enzymuntereinheit zu reduzieren, wurde zunächst versucht, das Holotoxin zu aktivieren – wie in der Literatur für Pertussistoxin beschrieben (Nürnberg 2000) mit einer Mischung aus ATP, das die Bindung zwischen dem A-Protomer und dem B-Oligomer destabilisiert, DTT, das der Reduktion von Disulfidbrücken dient, und Tris-HCl (pH 8,0) als Puffersubstanz. ATP und DTT sollen dabei die Funktion von ATP und Glutathion *in vivo* übernehmen. Jedoch ließ sich damit kaum eine verbesserte Toxinaktivierung erreichen.

Aus diesem Grund sollte die S1-Untereinheit von Pertussistoxin isoliert vom B-Oligomer gewonnen werden, die *in vitro* direkt – ohne eine weitere Aktivierung – mit ihren Substraten interagieren kann. Zu diesem Zweck wurde für die oben genannten Versuche das rekombinante C180-Protein aus dem Plasmid ptacC180 gewonnen, das für die ersten 180 N-terminalen Aminosäurereste des A-Protomers kodiert, die für dessen enzymatische Aktivität verantwortlich sind (Barbieri *et al.* 1989). Das C180-Protein wurde nach der Vorgehensweise von Barbieri *et al.* 1989 und nach dem Arbeitsgruppen-internen Versuchsprotokoll für die Aufreinigung von His-tag-Proteinen in *Escherichia coli* Expressionsstämmen exprimiert, aufgereinigt und auf seine Aktivität getestet. Von der in der Literatur beschriebenen Vorgehensweise wurde teilweise abgewichen, da die eingesetzten Reagenzien nicht alle zur Verfügung standen beziehungsweise sich die Methoden seit der Publikation und dem Zeitpunkt der Versuchsdurchführung weiterentwickelt hatten.

Wichtige Zwischenergebnisse für das für die vorliegende Arbeit aufgereinigte C180-Protein waren, dass es sowohl von einem anti-His-tag Antikörper als auch einem anti-S1-PTX Antikörper in Westernblots erkannt wurde. Seine Enzymfunktion wurde zudem durch die *in vitro* ADP-Ribosylierung von $G_i\alpha$ erfolgreich nachgewiesen. Dazu wurde ebenfalls – wie oben für das Holotoxin beschrieben – mit einem speziellen ADP-Ribosylierungspuffer nach Xu und Barbieri 1996 gearbeitet, der die oben erwähnten toxinaktivierenden Substanzen enthält.

Bei der Interpretation der Versuchsergebnisse mit dem C180-Protein muss natürlich bedacht werden, dass zwar die Enzymfunktion des Proteins mit der des A-Protomers des Holotoxins Pertussistoxin übereinstimmt, jedoch zum Beispiel jegliche Interaktion mit dem B-Oligomer dabei ausgeblendet wird und nicht nachgestellt werden kann. Die Ergebnisse dürfen daher nicht ausnahmslos auf das A-Protomer übertragen werden.

4.4 Charakterisierung des Hemmungsmechanismus der Inhibitoren

Wie eingangs dargestellt, besteht die Hypothese, dass ADP-ribosylierende Toxine zytosolische Faktoren, wie Hsp90 und die PPIasen, für ihre Membrantranslokation benötigen, wofür zum Beispiel für das C2-Toxin die spezifischen Interaktionspartner Cyclophilin A und das FK506-Bindeprotein 51 bereits identifiziert werden konnten (Kaiser *et al.* 2009; Kaiser *et al.* 2012). Dies legt zwar die Vermutung nahe, dass diese Faktoren auch von Pertussistoxin für die Membrantranslokation benötigt werden, jedoch musste zunächst durch weitere Versuche geprüft werden, ob die Inhibitoren dieser Faktoren andere Schritte, wie zum Beispiel die Aufnahme von Pertussistoxin in Zellen hemmen.

4.4.1 Bindung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der Inhibitoren Radicicol, FK506 und Cyclosporin A auf die Rezeptorbindung von Pertussistoxin untersucht. Dabei zeigte sich als wichtiges Zwischenergebnis kein Effekt auf die Rezeptorbindung von Pertussistoxin durch die Inhibitoren. Im Vergleich zu der mitgeführten Inhibitor-Positivkontrolle Brefeldin A trat kein Unterschied bei den zu testenden Inhibitoren auf. Der den Inhibitoren zugrundeliegende Hemmungsmechanismus beruht daher nicht auf der verminderten Bindung von Pertussistoxin an die Zellen.

Der Versuch könnte durch den Einsatz nicht-zellgängiger Derivate der Inhibitoren untermauert werden. Für den Inhibitor VK112 gibt es eine solche nicht-zellgängige Variante, den Inhibitor MM28412, der beim Diphtherietoxin in diesem Versuchsaufbau zu keinerlei Hemmeffekt führte (Schuster 2017; Schuster *et al.* 2017), wohl aber der zellgängige Inhibitor VK112, was dafür spricht, dass dieser einen Schritt im Inneren der Zelle inhibiert. Außerdem könnte die Rezeptorbindung von Pertussistoxin auch mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Mit Hilfe dieser Methode konnten Haug *et al.* 2003 den Einfluss von Geldanamycin, das wie Radicicol ein spezifischer pharmakologischer Hsp90-Inhibitor ist, auf die Bindung des C2-Toxins an seinen Rezeptor untersuchen.

4.4.2 Aktivierung des Toxins

Ob die eingesetzten Inhibitoren Auswirkungen auf die Aktivierung von Pertussistoxin haben, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, da sich Pertussistoxin als Holotoxin wie unter „Diskussion“ (4.3) beschrieben nicht so aktivieren ließ, dass es in Versuchen einsetzbar gewesen wäre. Hätte dies funktioniert, hätten Vergiftungsversuche mit dem aktivierten Pertussistoxin gemacht und mit den bereits durchgeführten Vergiftungsexperimenten mit nicht aktiviertem Toxin verglichen werden können. Wäre dabei unter dem Einsatz der Inhibitoren keine Hemmung der Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch das aktivierte Pertussistoxin mehr auftreten, läge deren inhibitorische Wirkung in der Hemmung der Toxinaktivierung. Aus den Ergebnissen der Versuche der vorliegenden Arbeit, vor allem des Digitonintests (siehe unten), scheint die Hemmung dieses Schrittes allerdings nicht sehr wahrscheinlich, da dabei gezeigt werden konnte, dass weniger der S1-Untereinheit im Zytosol ankam, eine ADP-Ribosylierung des Substrats trat aber weiterhin auf. Zudem könnte die Effektivität des Toxins bei diesem Versuch ein Problem darstellen, da wie zuvor bereits dargestellt, selbst geringste Mengen an Toxin für sehr kurze Inkubationszeiten ausreichten, um trotzdem nach einigen Stunden Cluster als Vergiftungserscheinungen auszulösen. Da eine vollständige pharmakologische Hemmung der Toxinaktivierung vermutlich nicht zu gewährleisten ist, könnten wenige oder einzelne Toxinmoleküle trotzdem zu den morphologisch sichtbaren Veränderungen führen und der Hemmungsmechanismus so nicht sicher bestätigt oder ausgeschlossen werden. Selbst ein Vergleich, ob die Vergiftung dann langsamer stattfindet als mit nicht-aktiviertem Pertussistoxin, könnte bei diesem Toxin aufgrund der relativ langsamen Vergiftung zu morphologisch nicht erfassbaren Änderungen führen.

4.4.3 ADP-Ribosylierungsstatus des Pertussistoxin-Substrates $G_i\alpha$

Durch die *in vitro* Analyse des ADP-Ribosylierungsstatus der $G_i\alpha$-Proteine aus den Vergiftungsversuchen an CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin und den Inhibitoren konnte als weiteres wichtiges Zwischenergebnis gezeigt werden, dass unter dem Einsatz der Inhibitoren in den Zelltests weniger Substrat $G_i\alpha$ durch das Toxin umgesetzt wurde. Dies spiegelt sich bei der *in vitro* Analyse dadurch wider, dass die Zellen aus den Vergiftungsversuchen als Lysat *in vitro* ein zweites Mal mit dem Toxin in Form des C180-Proteins inkubiert werden (= Nachribosylierung), wobei nur noch nicht im Zelltest umgesetztes Substrat bei dieser Reaktion zur Verfügung steht. Dabei zeigte sich für alle initial mit Inhibitor und Pertussistoxin behandelten Zellen, sowie für die unbehandelten Kontroll-

zellen, dass in der Nachribosylierung *in vitro* noch deutlich mehr Substrat zur Verfügung stand als bei den initial nur mit Pertussistoxin behandelten Zellen. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass unter den Inhibitoren weniger Substrat durch Pertussistoxin umgesetzt wurde und sind damit im Einklang mit den Ergebnissen anderer Toxine, wie beispielsweise denen des C2-Toxins (Kaiser *et al.* 2009; Kaiser *et al.* 2012).

4.4.4 Enzymaktivität der S1-Untereinheit von Pertussistoxin *in vitro*

Durch den *in vitro* Enzymaktivitätstest wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Inhibitoren Radicicol, FK506 und Cyclosporin A beziehungsweise VK112 und deren Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid einen hemmenden Effekt auf die ADP-Ribosylierung der α-Untereinheiten von G_i-Proteinen durch die Enzymuntereinheit von Pertussistoxin haben. Dazu wurde das aufgereinigte C180-Protein eingesetzt und als Zellmaterial PNS-Zelllysat verwendet, sogenannter post-nuklearer Überstand, bei dem lediglich die Zellkerne entfernt werden und die meisten Zellorganellen sowie die Membranen enthalten bleiben. Dies ist vor dem Hintergrund, dass das A-Protomer *in vivo* nach seiner Translokation an der zytosolischen Seite von Membranen gebunden bleiben soll und daher nur membrangebundene $G_{i/o}$-Proteine ADP-ribosyliert (Xu und Barbieri 1995), von Bedeutung. Lösliche Substrate, die beispielsweise in PNS auftreten, können *in vitro* ADP-ribosyliert werden, nicht jedoch *in vivo* (Locht *et al.* 2011). Dies stimmt mit dem bisherigen Wissen überein, dass alle physiologisch relevanten PTX-Substrate membrangebundene $G_{i/o}$α-Proteine sind. Für den vorliegenden Versuch spielt dies jedoch eine untergeordnete Rolle, da es hauptsächlich um die Prüfung der Enzymaktivität selbst ging.

Dabei konnte als weiteres wichtiges Zwischenergebnis gezeigt werden, dass die genannten Inhibitoren und deren Lösungsmittel in den eingesetzten Konzentrationen keinen Einfluss auf die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität des C180-Proteins hatten.

Diese Ergebnisse passen zu denen anderer, in der Arbeitsgruppe untersuchter Toxine. Beispielsweise beeinflusst der Inhibitor Cyclosporin A nicht die ADP-Ribosylierung von Aktin durch das C2-Toxin und damit nicht dessen Enzymaktivität (Kaiser *et al.* 2009).

Die bis zu diesem Punkt diskutierten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass durch die Inhibitoren Radicicol, FK506 und Cyclosporin A beziehungsweise VK112 eine Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin gehemmt wurde. Der dieser Hemmung zugrundeliegende Mechanismus konnte dabei weder durch eine verminderte

Bindungsfähigkeit noch durch eine Beeinflussung der Enzymaktivität des Toxins erklärt werden. Aus den Ergebnissen der Nachribosylierung ließ sich zudem schließen, dass die genannten Inhibitoren so wirkten, dass die S1-Untereinheit ihr Substrat $G_i\alpha$ nicht in gleichem Maße ADP-ribosylieren konnte wie in Abwesenheit der Inhibitoren. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Inhibitoren verhindern, dass die S1-Untereinheit im Zytosol ihre Substrate erreicht – höchstwahrscheinlich durch die Hemmung des Translokationsschritts. Dies konnte für andere ADP-ribosylierende Toxine wie das C2-Toxin bereits nachgewiesen werden (Kaiser *et al.* 2009; Kaiser *et al.* 2012).

4.4.5 Translokation: Translokationstest und Digitonintest

Für die bisher untersuchten *short-trip* Toxine, wie das C2-Toxin und das Diphtherietoxin, gibt es bereits ein etabliertes Zellmodell, bei dem der eigentliche Translokationsschritt der Toxine an lebenden Zellen nachvollzogen werden kann. Dabei macht man sich die Aufnahmeeigenschaften der *short-trip* Toxine zu Nutze, die aus frühen, angesäuerten Endosomen translozieren. Dieser Schritt im physiologischen Aufnahmemechanismus solcher Toxine kann durch den Inhibitor Bafilomycin A1 inhibiert werden, der die Ansäuerung der Endosomen als Auslöser für die Translokation verhindert. Außerdem wird der Versuch auf Eis durchgeführt, da dabei die Toxine zwar an die Zellen binden, aber nicht endozytiert werden können. Durch die beiden Mechanismen können die Toxine nicht auf natürlichem Wege in die Zellen gelangen. Durch die Zugabe von saurem, 37 °C warmem Medium wird nun extrazellulär ein saures Milieu hergestellt, sodass die eigentlich in den Endosomen ablaufenden Prozesse, wie strukturelle Konformationsänderungen, an der Zelloberfläche stattfinden und die Toxintranslokation direkt über die Zellmembran erfolgt mit einer nachfolgenden, beobachtbaren Vergiftungsreaktion. Durch die Verwendung der Inhibitoren in diesem Versuchsablauf kann bei einer weiterhin auftretenden Hemmung nun auf deren Beteiligung am Translokationsschritt geschlossen werden. Hieraus folgt, dass die durch die Inhibitoren blockierten zytosolischen Faktoren Interaktionspartner für das getestete Toxin sind und an dessen Membrantranslokation entscheidend beteiligt sind.

Da Pertussistoxin aber zu den *long-trip* Toxinen zählt und seine S1-Untereinheit daher nicht aus sauren Endosomen, sondern aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol transloziert (Xu und Barbieri 1995; el Bayâ *et al.* 1997), kann das bestehende Translokationsmodell hier nicht so verwendet werden, um den Translokationsschritt direkt nachzuvollziehen. Um ein entsprechendes Modell zu etablieren, müsste zuerst mehr über die

Translokationsbedingungen im endoplasmatischen Retikulum bekannt sein, die bisher noch nicht restlos aufgeklärt sind (Locht *et al.* 2011), und zudem die Möglichkeit bestehen, diese an der Zelloberfläche zu imitieren. Da dieses Modell für Pertussistoxin nicht genutzt werden konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit auf eine andere etablierte Methode nach (Więdłocha *et al.* 2005) zurückgegriffen, dem sogenannten Digitonintest, der die Detektion von ins Zytosol gelangten Toxinmolekülen durch die Extraktion der Zytosolfraktion erlaubt. Dabei nutzt man die Eigenschaften des Detergens Digitonin, Zellmembranen zu permeabilisieren und dort Poren zu bilden, durch welche das Zytosol und darin enthaltene kleinere Moleküle aus den Zellen entweichen können. Dies ermöglicht die anschließende isolierte Untersuchung zytosolischer Proteine. Die Methode wurde bereits für verschiedene Toxine angewandt (Kaiser *et al.* 2009; Taylor *et al.* 2010).

In einem ersten Versuch zur Aufnahme von Pertussistoxin in das Zytosol seiner Zielzellen konnte als Zwischenergebnis des Digitonintests gezeigt werden, dass bereits nach einer Stunde Inkubationszeit die S1-Untereinheit des Pertussistoxins im Zytosol nachweisbar war, obwohl morphologisch noch keine Vergiftungserscheinungen sichtbar waren. Dies ist plausibel und erklärt, warum auch bei kurzer Toxininkubation und anschließender Toxinentfernung aus dem Medium Cluster bei den Zellen entstehen. Für die entsprechenden Membranfraktionen der extrahierten Zellen ließen sich im Verhältnis zur Zytosolfraktion sehr starke Signale für Pertussistoxin nachweisen, was mit der Annahme, dass das Toxin sich in Zellorganellen mit Membranen befindet respektive an Membranen gebunden vorliegt, übereinstimmt.

Unter dem Einsatz der Inhibitoren Radicicol, FK506 und Cyclosporin A war eine Zunahme der detektierbaren S1-Untereinheit des Pertussistoxins im Zytosol nach zwei Stunden im Vergleich zu einer Stunde zu verzeichnen. Jedoch war für alle Zeitwerte weniger Toxin im Zytosol nachweisbar, als bei Zellen, die mit Pertussistoxin in Abwesenheit der Inhibitoren inkubiert worden waren. Als wichtigstes Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass die durch die Inhibitoren blockierten zytosolischen Faktoren an der Aufnahme der S1-Untereinheit des Toxins ins Zytosol beteiligt sind. In früheren Arbeiten konnte das zum Beispiel schon für die Enzymkomponente C2I des C2-Toxins nachgewiesen werden, die für ihre Translokation in das Zytosol auf Hsp90, Cyclophiline und FK506-Bindeproteine angewiesen ist (Kaiser *et al.* 2009). In Anwesenheit der mitgeführten Inhibitor-Positivkontrolle Brefeldin A zeigten sich vergleichbare Ergebnisse wie bei den getesteten Inhibitoren. Dass bei allen eingesetzten inhibitorischen Substanzen noch Pertussistoxin im Zytosol detektierbar war, könnte zum

Beispiel dadurch erklärt werden, dass die Methode des Digitonintests nicht absolut sauber zwischen Zytosol- und Membranfraktion trennt. Sollte Pertussistoxin ausschließlich aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol translozieren, wäre eine weitere Möglichkeit, die Digitoninfraktionen mit einem Antikörper gegen ein für das endoplasmatische Retikulum spezifisches Protein, wie zum Beispiel die lösliche Protein-Disulfid-Isomerase (PDI), zu inkubieren, welches dann nur in der Membranfraktion auftreten dürfte (Taylor *et al.* 2010). Die Ergebnisse, dass bei Brefeldin A ebenfalls noch Toxin im Zytosol nachweisbar ist, könnten aber auch ein weiterer Hinweis darauf sein, dass Pertussistoxin nicht nur durch den retrograden Weg, wie er für die *long-trip* Toxine beschrieben ist und durch Brefeldin A gehemmt werden kann, in das Zytosol seiner Zielzellen gelangt, sondern, wie in der Literatur beschrieben und diskutiert, eventuell auch an anderen Stellen zumindest teilweise oder unter besonderen Bedingungen, wie der Blockade seines Hauptaufnahmeweges, vermehrt ins Zytosol gelangen kann. Die Komplexität seines Aufnahmemechanismus wird in einem aktuellen Review zu Pertussistoxin von Locht *et al.* 2011 unter Berücksichtigung der durch verschiedenste Untersuchungsmethoden gewonnenen Hinweise zusammengefasst (siehe auch „Einleitung“ (1.6.3)). Darunter sind Versuche mit Elektronenmikroskopie (Plaut und Carbonetti 2008) und Zellvergiftungsversuche unter Inhibition von Zellorganellen und des Proteintransports in der Zelle. Hierbei beschreiben (Xu und Barbieri 1995, 1996) beispielsweise auch, dass es für den Inhibitor Nocodazol, der den Aufbau von Mikrotubuli hemmt, sowohl davon abhängige als auch davon unabhängige Aufnahmewege für Pertussistoxin gibt. Dies könnte entsprechend auch für die zytosolischen Faktoren gelten beziehungsweise deren Blockade könnte zur Nutzung anderer, alternativer Aufnahmemechanismen führen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch eine Untersuchung der verschiedenen Isoformen der zytosolischen Faktoren, zum Beispiel der Hsp90-Isoform GRP94 des endoplasmatischen Retikulums, die durch den spezifischen pharmakologischen Inhibitor NECA gehemmt werden kann (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Barth). Für das mit Pertussistoxin verwandte Choleratoxin konnten Taylor *et al.* 2010 jedoch keinen Einfluss des GRP94 bei der Translokation der Enzymuntereinheit von Choleratoxin nachweisen, lediglich die Beteiligung des zytosolischen Hsp90. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus Versuchen mit anderen Toxinen überein, bei welchen die Chaperone und PPIasen im Zytosol bei der Translokation beteiligt sind.

Eine weitere Möglichkeit die Beteiligung der zytosolischen Faktoren an der Translokation von Pertussistoxin nachzuweisen, bestünde in der Fluoreszenzmikroskopie, bei der durch

Antikörper sowohl das Toxin selbst als auch die Zellorganellen, vor allem das endoplasmatische Retikulum, markiert und sichtbar gemacht werden könnten. Dadurch ließe sich der Effekt der Inhibitoren bei der Zellvergiftung direkt visuell zeigen, wobei man den Großteil der S1-Untereinheit im endoplasmatischen Retikulum erwarten würde und weniger im Zytosol. Erste Ergebnisse der durchgeführten konfokalen Fluoreszenzmikroskopie in unserer Arbeitsgruppe konnten diese Hypothese bereits untermauern und bestätigen die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse, dass die Inhibitoren die Aufnahme der S1-Untereinheit ins Zytosol hemmen (Vollmer 2015; Ernst *et al.* 2018).

4.4.6 Interaktion von Pertussistoxin mit einzelnen zytosolischen Faktoren

Die oben genannten Methoden wie der Translokationstest und der Digitonintest können in Kombination mit den Inhibitoren zwar Aussagen darüber machen, dass zum Beispiel Cyclophiline an der Aufnahme des Enzymanteils der Toxine ins Zytosol beteiligt sind, sie erlauben jedoch keine genaue Aussage darüber, welcher zytosolische Faktor beziehungsweise welche zytosolischen Faktoren im Einzelnen mit dem Toxin interagieren. Da dieses Wissen unter anderem zur Herstellung neuer Inhibitoren und potentiell neuer Medikamente zur Behandlung der jeweiligen ausgelösten Erkrankungen essentiell ist, wäre es wichtig, die Interaktionspartner genau benennen zu können. Dafür gibt es einige etablierte Verfahren, mit welchen auch die direkte Interaktion der zytosolischen Faktoren mit der S1-Untereinheit von Pertussistoxin *in vitro* und in lebenden Zellen näher analysiert werden könnte. Dazu zählen Versuche, bei welchen Fluoreszenz-markierte Versionen der zytosolischen Faktoren in CHO-K1-Zellen transfiziert und mit Fluoreszenz-markiertem Pertussistoxin vergiftet werden könnten. Eine Interaktion zwischen den beiden Fluoreszenz-markierten Interaktionspartnern könnte dann mit dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) detektiert werden. Dies ist eine biophysikalische Methode auf Molekülebene, mit welcher sehr sensitiv Protein-Protein-Wechselwirkungen analysiert und nachgewiesen werden können. Vorstellbar wäre auch die Untersuchung der *in vitro* Interaktion von Pertussistoxin und den zytosolischen Faktoren durch isothermische Titrationskalorimetrie, bei welcher Bindungsprozesse von kleinen Molekülen untersucht und thermodynamisch charakterisiert werden können, was Rückschlüsse auf deren Interaktion zulässt. Außerdem stünde die Methode der Oberflächenplasmonresonanz (SPR) für eine Analyse der Interaktion zwischen Pertussistoxin und den zytosolischen Faktoren zur Verfügung. Für Choleratoxin konnte dabei eine Bindung und Interaktion mit Hsp90 nachgewiesen werden, die zum einen ATP-abhängig ist, zum anderen bei 37 °C auftritt

sowie durch den spezifischen pharmakologischen Hsp90-Inhibitor Geldanamycin gehemmt werden kann (Taylor *et al.* 2010). Dass das Toxin bei 37 °C in einem ungefalteten Zustand vorliegt, stützt auch die Hypothese, dass die zytosolischen Faktoren bei der Rückfaltung der Enzymanteile nach der Translokation derselben ins Zytosol beteiligt sind. Dabei wurde His-getaggtes Choleratoxin an die Analyseplatte für His-tags gebunden und mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert, die wiederum mit entsprechenden Antikörpern markiert wurden und die Bindung somit messbar machten (Pande *et al.* 2007). Ein vergleichbarer Versuchsaufbau wäre für Pertussistoxin beispielsweise mit dem C180-Protein möglich, das über einen His-tag verfügt und die Enzymuntereinheit von Pertussistoxin darstellt.

Für die *short-trip* Toxine existiert zudem eine Methode (Tamayo *et al.* 2008), bei welcher die Translokation der Toxine direkt aus den Endosomen *in vitro* nachvollzogen werden kann, wobei durch die Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen einzelne Isoformen der zytosolischen Faktoren, wie zum Beispiel Cyclophilin A aus der Gruppe der Cyclophiline, deren Beteiligung nachgewiesen werden kann. Für den Versuch werden in einem ersten Schritt die Endosomen mit Toxin beladen und dann mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. In einem zweiten Schritt erfolgt die Translokation des Toxins *in vitro* und die Untersuchung desselben. Für Pertussistoxin müsste die Methode entsprechend abgeändert werden und die endoplasmatischen Retikula abzentrifugiert und die typischen Translokationsbedingungen, die bisher noch nicht vollständig aufgeklärt sind, *in vitro* nachgestellt werden. Für C2I des C2-Toxins und für DTA des Diphtherietoxins beziehungsweise des Fusionstoxins LF_NDTA konnte mit Hilfe dieser Methode bereits Cyclophilin A als Interaktionspartner aus der Gruppe der Cyclophiline identifiziert werden (Kaiser *et al.* 2009; Dmochewitz *et al.* 2011), was überdies durch die Tatsache gestützt wird, dass Cyclophilin A der häufigste in Säugetierzellen exprimierte und der einzige in menschlichen Geweben nachweisbare Vertreter der Cyclophiline ist und bevorzugt durch den Inhibitor Cyclosporin A inhibiert wird, zu dem es die höchste Bindungsaffinität hat (Handschumacher *et al.* 1984; Wang und Heitman 2005).

Eine weitere interessante Methode stellt die Co-Präzipitation dar, mit der zytosolische Bindungspartner der Toxine in lebenden, intakten Zellen gefunden werden können. Dabei werden Biotin-markiertes Toxin und daran gebundene Proteine mit Hilfe von Streptavidin-markierten Sepharose-Beads co-präzipitiert. Für die S1-Untereinheit von Pertussistoxin könnten damit die einzelnen Interaktionspartner aus den Gruppen der Cyclophiline und FK506-Bindeproteine durch entsprechende Antikörper identifiziert werden. Mit dieser

Methode konnten in unserer Arbeitsgruppe bereits einige Interaktionspartner beispielsweise des C2-, des Iota- und des CDT-Toxins identifiziert werden (Kaiser *et al.* 2009; Ernst *et al.* 2015). Für die S1-Untereinheit von Pertussistoxin konnte hierbei zwischenzeitlich eine Interaktion mit Cyclophilin A und Cyclophilin 40 sowie mit dem FK506-Bindeprotein 51 gezeigt werden, nicht jedoch mit Hsp90 (Vollmer 2015).

Um spezifisch die Interaktion einzelner zytosolischer Faktoren mit Pertussistoxin nachzuweisen, könnte auch die Dot-Blot-Methode genutzt werden. Dabei handelt es sich um eine *in vitro* Methode, bei welcher die zu untersuchenden zytosolischen Faktoren auf einer Nitrozellulosemembran durch Vakuum immobilisiert und anschließend mit den Biotin-markierten Enzymuntereinheiten der Toxine inkubiert werden. Die Biotin-markierten Toxine können so spezifisch durch Strep-POD detektiert werden. Die Selektivität und Spezifität dieses Verfahren wurde bereits bei der Enzymkomponente des Anthrax-Letaltoxins, dem Letalen Faktor, nachgewiesen, für den bei den oben genannten experimentellen Bedingungen keine Interaktion mit Hsp90 und Cyclophilin A gezeigt werden konnte (Dmochewitz *et al.* 2011). Im Gegensatz dazu konnten für die Enzymkomponenten des Iota-, des CDT- und des C2-Toxins mit diesem Verfahren die Interaktion mit Hsp90 und Cyclophilin A (Kaiser *et al.* 2009; Kaiser *et al.* 2011), sowie Cyclophilin 40 (Ernst *et al.* 2015) und für C2I des C2-Toxins auch eine Interaktion mit dem FK506-Bindeprotein 51 (Kaiser *et al.* 2012) bestätigt werden.

Bei zwischenzeitlich durchgeführten Versuchen mit Pertussistoxin im Dot-Blot konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass die S1-Untereinheit *in vitro* beispielsweise spezifisch an Hsp90 und Hsp70, Cyclophilin A und Cyclophilin 40, sowie an die FK506-Bindeproteine 51 und 52 bindet, nicht jedoch an das FK506-Bindeprotein 12, womit die Spezifität des Systems nachgewiesen ist (Vollmer 2015; Glück 2017; Ernst *et al.* 2018). Diese Ergebnisse sind einerseits eine Bestätigung der gefundenen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und stimmen andererseits mit den bisher bei den *short-trip* Toxinen gefundenen Bindungspartnern überein.

Inzwischen konnte in unserer Arbeitsgruppe durch Fluoreszenzmikroskopie und unter Nutzung der Duolink® PLA Technologie auch eine Interaktion der S1-Untereinheit des Pertussistoxins mit dem Cyclophilin 40 in intakten Zellen durch Antikörpermarkierung nachgewiesen werden, bei welcher sich ein amplifiziertes Fluoreszenzsignal detektieren lässt, wenn sich die beiden Interaktionspartner in unmittelbarer Nähe befinden (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Barth, Publikation in Vorbereitung). Dieses

System wurde bereits erfolgreich für die Untersuchung der Interaktion von C2-Toxin mit Hsp70 in intakten Zellen eingesetzt (Ernst *et al.* 2017a).
In unserer Arbeitsgruppe wurde überdies auf der Basis des sogenannten Split-Ubiquitin-Systems, einer Methode zur *in vivo* Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen (Müller und Johnsson 2008), für das C2-Toxin ein Verfahren entwickelt und etabliert, um dessen Interaktionspartner genauer untersuchen zu können (Ernst 2011). Mit diesem System könnten bei entsprechender Präparation der Enzymanteile anderer Toxine auch diese mit der Methode auf ihre *in vivo* Interaktion mit zytosolischen Faktoren untersucht werden. Damit könnten für die Vergiftungssituation in lebenden Organismen validere Daten erhoben werden als aus den *in vitro* Versuchen. Jedoch ist das Verfahren, bei dem zuerst Fusionsproteine aus dem enzymatisch aktiven Toxinanteil und einem Teil des Ubiquitins auf genetischer Ebene hergestellt werden müssen, sehr aufwändig. Daher sollten bereits Hinweise auf Interaktionspartner *in vitro* vorliegen.

Neuerdings konnte in unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit Prof. Dr. Manfred Frick vom Institut für Allgemeine Physiologie an der Universität Ulm auch ein Versuchsmodell mit humanen primären Lungenepithelzellen zur Untersuchung der Vergiftung mit Pertussistoxin in dessen eigentlichen Zielzellen etabliert werden, was auch in Hinblick auf eine zukünftige Entwicklung neuartiger spezifischer pharmakologischer Inhibitoren zur Behandlung von Pertussis in der Humanmedizin ein essentielles Modell darstellen könnte. Die humanen primären Lungenepithelzellen können dabei als Stammzellen in die verschiedenen Lungenzellen ausdifferenzieren. Hierbei konnte in einem ersten Schritt durch Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden, dass Pertussistoxin nur in die CC10- und Muc5b-positiven Zellen aufgenommen wird, nicht aber in die Zilienzellen (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Barth / Frick, Publikation in Vorbereitung). Für die Basalzellen konnte in weiteren Versuchen gezeigt werden, dass unter der Vergiftung mit Pertussistoxin eine ADP-Ribosylierung des Substrats $G_i\alpha$ von Pertussistoxin auftritt und bei einer Nachribosylierung in den mit Pertussistoxin vergifteten Zellen weniger Substrat zur *in vitro* Nachribosylierung zur Verfügung steht (unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Barth / Frick, Publikation in Vorbereitung). In weiteren Versuchen sollen in diesem Modell nun die pharmakologischen Inhibitoren auf ihre Vergiftungshemmung untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Inhibitoren Radicicol, FK506 und Cyclosporin A respektive VK112 die Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin hemmten. Der dieser Inhibitorwirkung zugrundeliegende Mechanismus konnte durch weitere Experimente genauer eingegrenzt und charakterisiert werden. Die Ergebnisse lieferten starke Hinweise auf eine Beteiligung des Chaperons Hsp90, der PPIasen aus der Gruppe der Cyclophiline und der FK506-Bindeproteine bei der Aufnahme von Pertussistoxin ins Zytosol seiner Zielzellen.

Die vorliegende Arbeit leistet somit nicht nur einen Beitrag zum genaueren Verständnis des molekularen Aufnahmemechanismus von Pertussistoxin, sondern stellt mit ihren Ergebnissen für den pharmakologischen Inhibitor VK112 bei lebenden Zellen auch eine Basis für weiterführende Untersuchungen dar. Der nicht-immunsuppressive Inhibitor könnte dabei der Ausgangspunkt für *in vivo* Versuche sein, in welchen die Wirkung des Inhibitors bei Pertussistoxin-sensitiven Tieren untersucht werden und so letztlich unter Umständen zur Entwicklung und Etablierung einer kausalen Therapie für Pertussis führen könnte, was die Versorgung von an Pertussis erkrankten Patienten verbessern würde.

5 Zusammenfassung

Das Pertussistoxin ist ein AB_5-Exotoxin, das von *Bordetella pertussis* produziert und sezerniert wird und den Auslöser der Infektionskrankheit Pertussis (Keuchhusten) darstellt. Es besteht aus einem A-Protomer, das der S1-Untereinheit entspricht und die Enzymfunktion trägt, und einem B-Oligomer, das aus den Untereinheiten S2, S3, 2 x S4 und S5 besteht und für die Bindung des Toxins an seine Zielzellen und die Translokation des A-Protomers aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytosol der Zielzellen zuständig ist. Zu seinem Translokationsort gelangt Pertussistoxin als *long-trip* Toxin nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose und dem retrograden Transport durch den Golgi-Apparat. Die Enzymfunktion des A-Protomers besteht in einer Adenosindiphosphat-(ADP)-Ribosyltransferase, welche im Zytosol die kovalente Übertragung von ADP-Ribose-Resten auf die α-Untereinheiten von membrangebundenen inhibitorischen heterotrimeren ($G_{i/o}$)-Proteinen katalysiert. Dadurch wird in Zellen die Hemmung der Adenylatzyklase aufgehoben, welche konsekutiv vermehrt zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) herstellt. Dies führt zu unterschiedlichen Reaktionen auf Pertussistoxin sowohl auf zellulärer als auch auf systemischer Ebene.

In der Arbeitsgruppe Barth werden die molekularen Aufnahmemechanismen bakterieller AB-Toxine sowie die Beteiligung von zytosolischen Wirtszellfaktoren an der Translokation der A-Untereinheiten untersucht. Dadurch konnte die Arbeitsgruppe erstmals zeigen, dass das Chaperon Hitzeschockprotein90 (Hsp90) und die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen) der Cyclophilin- und der FK506-Bindeprotein-Familien wichtige Rollen bei der Translokation einiger clostridialer Toxine und des Diphtherietoxins spielen, bei denen es sich ebenfalls um ADP-Ribosyltransferasen handelt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle von Hsp90 und der PPIasen bei der zellulären Aufnahme des Pertussistoxins zu charakterisieren. Dafür wurde die Wirkung der spezifischen pharmakologischen Inhibitoren Radicicol, das Hsp90 hemmt, Cyclosporin A, das Cyclophiline hemmt, und Tacrolimus (FK506), das FK506-Bindeproteine hemmt, auf die Vergiftung von Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) durch Pertussistoxin genauer betrachtet, um zu prüfen, ob die Wirtszellfaktoren an der Toxinaufnahme beteiligt sind.
In der vorliegenden Arbeit konnte dabei erstmals gezeigt werden, dass Radicicol, Cyclosporin A und FK506 die Vergiftung kultivierter CHO-Zellen durch Pertussistoxin deutlich

verzögerten, ebenso das nicht-immunsuppressive Cyclosporin A Derivat VK112. Um die Hypothese, dass dabei die Translokation inhibiert wird, zu bestätigen, wurden weitere Experimente durchgeführt, um die Hemmung genauer zu charakterisieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass weder die Bindung des Toxins an zelluläre Rezeptoren noch seine Enzymaktivität durch die Inhibitoren gehemmt wurden. Die Inhibitoren führten dazu, dass in den Zellen weniger Substrat $G_i\alpha$ von Pertussistoxin ADP-ribosyliert wurde, da weniger des A-Protomers des Toxins im Zytosol angekommen war. In Zusammenschau mit den vorgenannten Ergebnissen ist dies ist ein sehr starker Hinweis darauf, dass die zytosolischen Faktoren an der Translokation des A-Protomers ins Zytosol beteiligt sind. Somit konnte erstmals die Beteiligung von Hsp90, Cyclophilinen – sehr wahrscheinlich von Cyclophilin A – und FK506-Bindeproteinen an der Aufnahme von Pertussistoxin ins Zytosol aufgezeigt werden, was einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis seines Aufnahmemechanismus in Säugetierzellen leistet. Überdies haben die Ergebnisse, insbesondere die des nicht-immunsuppressiven Cyclosporin A Derivats VK112, eine medizinisch-klinische Relevanz, da sie zeigen, dass dieser Inhibitor zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Entwicklung neuartiger, möglicherweise sogar kausaler, Therapiestrategien zur Behandlung von durch Pertussistoxin verursachten Erkrankungen werden könnte.

Die vorliegende Arbeit liefert somit Grundlagen und Anregungen für weitere, vielfältige Versuche zukünftiger Arbeiten, wie die Analyse der Interaktion der einzelnen zytosolischen Faktoren mit Pertussistoxin *in vitro* und in lebenden Zellen.

6 Literaturverzeichnis

1. ABRAMI, L, LINDSAY, M, PARTON, R G, LEPPLA, S H, GOOT, F G VAN DER: Membrane insertion of anthrax protective antigen and cytoplasmic delivery of lethal factor occur at different stages of the endocytic pathway. *J Cell Biol* **166**: 645–651. (2004).

2. AKKER, F VAN DEN, MERRITT, E, HOL, W G J: Structure and function of cholera toxin and related enterotoxins. In: AKTORIES, K, JUST, I (Hrsg.) *Bacterial Protein Toxins*, **vol 145**, Springer, Berlin, Heidelberg, S. 109–131. (2000).

3. AKTORIES, K: Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat Rev Microbiol* **9**: 487–498. (2011).

4. AKTORIES, K, BARMANN, M, OHISHI, I, TSUYAMA, S, JAKOBS, K H, HABERMANN, E: Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature* **322**: 390–392. (1986).

5. AKTORIES, K, LANG, A E, SCHWAN, C, MANNHERZ, H G: Actin as target for modification by bacterial protein toxins. *FEBS J* **278**: 4526–4543. (2011).

6. AKTORIES, K, WEGNER, A: Mechanisms of the cytopathic action of actin-ADP-ribosylating toxins. *Mol Microbiol* **6**: 2905–2908. (1992).

7. ALTUNAIJI, S, KUKURUZOVIC, R, CURTIS, N, MASSIE, J: Antibiotics for whooping cough (pertussis). *Cochrane Database Syst Rev*: CD004404. (2007).

8. ARICÒ, B, RAPPUOLI, R: *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica* contain transcriptionally silent pertussis toxin genes. *J Bacteriol* **169**: 2847–2853. (1987).

9. ARMSTRONG, G D, HOWARD, L A, PEPPLER, M S: Use of glycosyltransferases to restore pertussis toxin receptor activity to asialoagalactofetuin. *J Biol Chem* **263**: 8677–8684. (1988).

10. BAGLEY, K C, ABDELWAHAB, S F, TUSKAN, R G, FOUTS, T R, LEWIS, G K: Pertussis toxin and the adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis* activate human monocyte-derived dendritic cells and dominantly inhibit cytokine production through a cAMP-dependent pathway. *J Leukoc Biol* **72**: 962–969. (2002).

11. BANG, H, FISCHER, G: Slow conformational changes in protein folding can be accelerated by enzymes. *Biomed Biochim Acta* **50**: S137-42. (1991).

12. BARBIERI, J T, MOLONEY, B K, MENDE-MUELLER, L M: Expression and secretion of the S-1 subunit and C180 peptide of pertussis toxin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **171**: 4362–4369. (1989).

13. BARTH, H, AKTORIES, K: New insights into the mode of action of the actin ADP-ribosylating virulence factors *Salmonella enterica* SpvB and *Clostridium botulinum* C2 toxin. *Eur J Cell Biol* **90**: 944–950. (2011).

14. BARTH, H, AKTORIES, K, POPOFF, M R, STILES, B G: Binary bacterial toxins: Biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 373-402, table of contents. (2004).

15. BARTH, H, BLÖCKER, D, BEHLKE, J, BERGSMA-SCHUTTER, W, BRISSON, A, BENZ, R, AKTORIES, K: Cellular uptake of *Clostridium botulinum* C2 toxin requires oligomerization and acidification. *J Biol Chem* **275**: 18704–18711. (2000).

16. BARTH, H, ERNST, K: Chaperones and ADP-ribosylating bacterial toxins. In: GOPALAKRISHNAKONE, P, STILES, B, ALAPE-GIRÓN, A, DUBREUIL, J, MANDAL, M (Hrsg.) *Microbial Toxins.*, *Toxinology.*, Living Reference Work, Springer Netherlands, Dordrecht, S. 1–22. (2016).

17. BARTH, H, HOFMANN, F, OLENIK, C, JUST, I, AKTORIES, K: The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin. *Infect Immun* **66**: 1364–1369. (1998).

18. BARTH, H, KAISER, E: Chaperon-vermittelte Aufnahme bakterieller Proteintoxine in Säugetierzellen. *BIOspektrum (Heidelb.)* **15**: 387–390. (2009).

19. BARTH, H, STILES, B G: Binary actin-ADP-ribosylating toxins and their use as molecular Trojan horses for drug delivery into eukaryotic cells. *Curr Med Chem* **15**: 459–469. (2008).

20. BARTH, H, STILES, B G: 5.06 Protein toxins from bacteria. In: MANDER, L, LIU, H-W (Hrsg.) *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, **volume 5**, Elsevier, Oxford, S. 149–173. (2010).

21. BERG, B M VAN DEN, BEEKHUIZEN, H, WILLEMS, R J L, MOOI, F R, FURTH, R VAN: Role of *Bordetella pertussis* virulence factors in adherence to epithelial cell lines derived from the human respiratory tract. *Infect Immun* **67**: 1056–1062. (1999).

22. BEUTLER, B, HOEBE, K, DU, X, ULEVITCH, R J: How we detect microbes and respond to them: The toll-like receptors and their transducers. *J Leukoc Biol* **74**: 479–485. (2003).

23. BHAKDI, S: Microbial toxins. *Wien Klin Wochenschr* **110**: 660–668. (1998).

24. BHAKDI, S, TRANUM-JENSEN, J, SZIEGOLEIT, A: Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect Immun* **47**: 52–60. (1985).

25. BIERER, B E, HOLLANDER, G, FRUMAN, D A, BURAKOFF, S J: Cyclosporin A and FK506: Molecular mechanisms of immunosuppression and probes for transplantation biology. *Curr Opin Immunol* **5**: 763–773. (1993).

26. BLÖCKER, D, POHLMANN, K, HAUG, G, BACHMEYER, C, BENZ, R, AKTORIES, K, BARTH, H: *Clostridium botulinum* C2 toxin: Low pH-induced pore formation is required for translocation of the enzyme component C2I into the cytosol of host cells. *J Biol Chem* **278**: 37360–37367. (2003).

27. BOKOCH, G M, KATADA, T, NORTHUP, J K, HEWLETT, E L, GILMAN, A G: Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J Biol Chem* **258**: 2072–2075. (1983).

28. BOREL, J F: History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. *Wien Klin Wochenschr* **114**: 433–437. (2002).

29. BOREL, J F, FEURER, C, GUBLER, H U, STAHELIN, H: Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic agent. *Agents Actions* **6**: 468–475. (1976).

30. BRAAKMAN, I, HELENIUS, J, HELENIUS, A: Role of ATP and disulphide bonds during protein folding in the endoplasmic reticulum. *Nature* **356**: 260–262. (1992).

31. BRENNAN, M J, DAVID, J L, KENIMER, J G, MANCLARK, C R: Lectin-like binding of pertussis toxin to a 165-kilodalton Chinese hamster ovary cell glycoprotein. *J Biol Chem* **263**: 4895–4899. (1988).

32. BRONNHUBER, A, MAIER, E, RIEDL, Z, HAJOS, G, BENZ, R, BARTH, H: Inhibitions of the translocation pore of *Clostridium botulinum* C2 toxin by tailored azolopyridinium salts protects human cells from intoxication. *Toxicology* **316**: 25–33. (2014).

33. BRUGGE, J S: Interaction of the Rous sarcoma virus protein pp60src with the cellular proteins pp50 and pp90. *Curr Top Microbiol Immunol* **123**: 1–22. (1986).

34. BRUGGE, J S, YONEMOTO, W, DARROW, D: Interaction between the Rous sarcoma virus transforming protein and two cellular phosphoproteins: Analysis of the turnover and distribution of this complex. *Mol Cell Biol* **3**: 9–19. (1983).

35. BUNDESMINISTERIUM DER JUSTIZ UND FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ: *Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen (Infektionsschutzgesetz), IfSG.* Infektionsschutzgesetz vom 20. Juli 2000 (BGBl. I S. 1045), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 17. Juli 2017 (BGBl. I S. 2615) geändert worden ist. In: Gesetze im Internet. http://www.gesetze-im-internet.de/ifsg/index.html - zuletzt geprüft am: 09.11.2018. (2000).

36. BURNS, D L, MANCLARK, C R: Adenine nucleotides promote dissociation of pertussis toxin subunits. *J Biol Chem* **261**: 4324–4327. (1986).

37. BURRESS, H, TAYLOR, M, BANERJEE, T, TATULIAN, S A, TETER, K: Co- and post-translocation roles for Hsp90 in cholera intoxication. *J Biol Chem* **289**: 33644–33654. (2014).

38. CANTEY, J B, SÁNCHEZ, P J, TRAN, J, CHUNG, W, SIEGEL, J D: Pertussis: A persistent cause of morbidity and mortality in young infants. *J Pediatrics* **164**: 1489-92.e1. (2014).

39. CAROFF, M, KARIBIAN, D: Structure of bacterial lipopolysaccharides. *Carbohydr Res* **338**: 2431–2447. (2003).

40. CHARDIN, P, MCCORMICK, F: Brefeldin A: The advantage of being uncompetitive. *Cell* **97**: 153–155. (1999).

41. CLIPSTONE, N A, CRABTREE, G R: Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**: 695–697. (1992).

42. COLLIER, R J: Diphtheria toxin: Mode of action and structure. *Bacteriol Rev* **39**: 54–85. (1975).

43. COLLIER, R J, YOUNG, J A T: Anthrax toxin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 45–70. (2003).

44. DEBAULT, L E, YOO, T J, JENSEN, K L: Acute effects of *Bordetella pertussis* vaccine *in vitro*. *J Reticuloendothel Soc* **19**: 63–76. (1976).

45. DELMOTTE, P, DELMOTTE-PLAQUEE, J: A new antifungal substance of fungal origin. *Nature* **171**: 344. (1953).

46. DMOCHEWITZ, L, LILLICH, M, KAISER, E, JENNINGS, L D, LANG, A E, BUCHNER, J, FISCHER, G, AKTORIES, K, COLLIER, R J, BARTH, H: Role of CypA and Hsp90 in membrane translocation mediated by anthrax protective antigen. *Cell Microbiol* **13**: 359–373. (2011).

47. DOBSON, C M: Protein folding and misfolding. *Nature* **426**: 884–890. (2003).

48. DODHIA, H, MILLER, E: Review of the evidence for the use of erythromycin in the management of persons exposed to pertussis. *Epidemiol Infect* **120**: 143–149. (1998).

49. DOMENECH DE CELLÈS, M, MAGPANTAY, F M G, KING, A A, ROHANI, P: The pertussis enigma: Reconciling epidemiology, immunology and evolution. *Proc Biol Sci* **283**. (2016).

50. DONTA, S T, BERISTAIN, S, TOMICIC, T K: Inhibition of heat-labile cholera and *Escherichia coli* enterotoxins by brefeldin A. *Infect Immun* **61**: 3282–3286. (1993).

51. EL BAYÂ, A, LINNEMANN, R, OLLESCHIK-ELBHEIM, L VON, ROBENEK, H, SCHMIDT, M A: Endocytosis and retrograde transport of pertussis toxin to the Golgi complex as a prerequisite for cellular intoxication. *Eur J Cell Biol* **73**: 40–48. (1997).

52. EL BAYÂ, A, LINNEMANN, R, OLLESCHIK-ELBHEIM, L VON, SCHMIDT, M A: Identification of binding proteins for pertussis toxin on pancreatic beta cell-derived insulin-secreting cells. *Microb Pathog* **18**: 173–185. (1995).

53. ERNST, K: Molekulare Charakterisierung der Interaktion zwischen binären clostridialen Proteintoxinen, dem Chaperon Hsp70 und zellulären Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. Diplomarbeit. In: Institut für Pharmakologie und Toxikologie am Universtitätsklinikum Ulm, Universität Ulm. (2011).

54. ERNST, K, EBERHARDT, N, MITTLER, A-K, SONNABEND, M, ANASTASIA, A, FREISINGER, S, SCHIENE-FISCHER, C, MALEŠEVIĆ, M, BARTH, H: Pharmacological cyclophilin inhibitors prevent intoxication of mammalian cells with *Bordetella pertussis* toxin. *Toxins (Basel)* **10**: 1–15. (2018).

55. ERNST, K, LANGER, S, KAISER, E, OSSEFORTH, C, MICHAELIS, J, POPOFF, M R, SCHWAN, C, AKTORIES, K, KAHLERT, V, MALESEVIC, M, SCHIENE-FISCHER, C, BARTH, H: Cyclophilin-facilitated membrane translocation as pharmacological target to prevent intoxication of mammalian cells by binary clostridial actin ADP-ribosylated toxins. *J Mol Biol*: 1224–1238. (2015).

56. ERNST, K, LIEBSCHER, M, MATHEA, S, GRANZHAN, A, SCHMID, J, POPOFF, M R, IHMELS, H, BARTH, H, SCHIENE-FISCHER, C: A novel Hsp70 inhibitor prevents cell intoxication with the actin ADP-ribosylating *Clostridium perfringens* iota toxin. *Sci Rep* **6, 20301**: 1–17. (2016).

57. ERNST, K, SCHMID, J, BECK, M, HÄGELE, M, HOHWIELER, M, HAUFF, P, ÜCKERT, A K, ANASTASIA, A, FAULER, M, JANK, T, AKTORIES, K, POPOFF, M R, SCHIENE-FISCHER, C, KLEGER, A, MÜLLER, M, FRICK, M, BARTH, H: Hsp70 facilitates trans-membrane transport of bacterial ADP-ribosylating toxins into the cytosol of mammalian cells. *Sci Rep* **7, 2724**: 1–16. (2017a).

58. ERNST, K, SCHNELL, L, BARTH, H: Host cell chaperones Hsp70/Hsp90 and peptidyl-prolyl *cis/trans* isomerases are required for the membrane translocation of bacterial ADP-ribosylating toxins. *Curr Top Microbiol Immunol* **406**: 163–198. (2017b).

59. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC): Pertussis. In: European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (Hg.) *Annual epidemiological report for 2016*, ECDC, Stockholm. (2018).

60. FALNES, P Ø, SANDVIG, K: Penetration of protein toxins into cells. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 407–413. (2000).

61. FISCHER, G, BANG, H: The refolding of urea-denatured ribonuclease A is catalyzed by peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase. *Biochim Biophys Acta* **828**: 39–42. (1985).

62. FISCHER, G, BANG, H, MECH, C: Determination of enzymatic catalysis for the *cis-trans*-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed Biochim Acta* **43**: 1101–1111. (1984).

63. FISCHER, G, WITTMANN-LIEBOLD, B, LANG, K, KIEFHABER, T, SCHMID, F X: Cyclophilin and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase are probably identical proteins. *Nature* **337**: 476–478. (1989).

64. FLANAGAN, W M, CORTHESY, B, BRAM, R J, CRABTREE, G R: Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* **352**: 803–807. (1991).

65. FRANCO, E, GIAMBI, C, IALACCI, R, MAURICI, M: Pertussis vaccination for adolescents and adults. *Expert Opin Biol Ther* **4**: 1669–1676. (2004).

66. FREEMAN, B C, MORIMOTO, R I: The human cytosolic molecular chaperones Hsp90, Hsp70 (Hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *EMBO J* **15**: 2969–2979. (1996).

67. FRUMAN, D A, BURAKOFF, S J, BIERER, B E: Immunophilins in protein folding and immunosuppression. *FASEB J* **8**: 391–400. (1994).

68. FRUMAN, D A, KLEE, C B, BIERER, B E, BURAKOFF, S J: Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 3686–3690. (1992).

69. GABUTTI, G, ROTA, M: Pertussis: A review of disease epidemiology worldwide and in Italy. *Int J Environ Res Public Health* **9**: 4626–4638. (2012).

70. GALAT, A: Peptidylprolyl *cis*/*trans* isomerases (immunophilins): Biological diversity--targets--functions. *Curr Top Med Chem* **3**: 1315–1347. (2003).

71. GALAZKA, A: Control of pertussis in the world. *World Health Stat Q* **45**: 238–247. (1992).

72. GALAZKA, A: The changing epidemiology of diphtheria in the vaccine era. *J Infect Dis* **181 Suppl 1**: S2-9. (2000).

73. GIBERT, M, MARVAUD, J C, PEREIRA, Y, HALE, M L, STILES, B G, BOQUET, P, LAMAZE, C, POPOFF, M R: Differential requirement for the translocation of clostridial binary toxins: Iota toxin requires a membrane potential gradient. *FEBS Lett* **581**: 1287–1296. (2007).

74. GLÜCK, S: Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Pertussistoxin und zellulären Wirtszellchaperonen bzw. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. Medizinische Dissertation. In: Institut für Phamakologie und Toxikologie am Universitätsklinikum Ulm, Universität Ulm. (2017).

75. GÖTHEL, S F, MARAHIEL, M A: Peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cell Mol Life Sci* **55**: 423–436. (1999).

76. GUISO, N, BERBERS, G, FRY, N K, HE, Q, RIFFELMANN, M, WIRSING VON KÖNIG, C H: What to do and what not to do in serological diagnosis of pertussis: Recommendations from EU reference laboratories. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **30**: 307–312. (2011a).

77. GUISO, N, WIRSING VON KÖNIG, C H, FORSYTH, K, TAN, T, PLOTKIN, S A: The global pertussis initiative: Report from a round table meeting to discuss the epidemiology and detection of pertussis, Paris, France, 11-12 January 2010. *Vaccine* **29**: 1115–1121. (2011b).

78. HANDSCHUMACHER, R E, HARDING, M W, RICE, J, DRUGGE, R J, SPEICHER, D W: Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science* **226**: 544–547. (1984).

79. HAUG, G, AKTORIES, K, BARTH, H: The host cell chaperone Hsp90 is necessary for cytotoxic action of the binary iota-like toxins. *Infect Immun* **72**: 3066–3068. (2004).

80. HAUG, G, LEEMHUIS, J, TIEMANN, D, MEYER, D K, AKTORIES, K, BARTH, H: The host cell chaperone Hsp90 is essential for translocation of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin into the cytosol. *J Biol Chem* **278**: 32266–32274. (2003).

81. HAUSMAN, S Z, BURNS, D L: Interaction of pertussis toxin with cells and model membranes. *J Biol Chem* **267**: 13735–13739. (1992).

82. HAUSMAN, S Z, BURNS, D L: Binding of pertussis toxin to lipid vesicles containing glycolipids. *Infect Immun* **61**: 335–337. (1993).

83. HAZES, B, BOODHOO, A, COCKLE, S A, READ, R J: Crystal structure of the pertussis toxin-ATP complex: A molecular sensor. *J Mol Biol* **258**: 661–671. (1996).

84. HAZES, B, READ, R J: Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells. *Biochemistry* **36**: 11051–11054. (1997).

85. HE, Q, ARVILOMMI, H, VILJANEN, M K, MERTSOLA, J: Outcomes of *Bordetella* infections in vaccinated children: effects of bacterial number in the nasopharynx and patient age. *Clin Diagn Lab Immunol* **6**: 534–536. (1999).

86. HEINE, K, PUST, S, ENZENMULLER, S, BARTH, H: ADP-ribosylation of actin by the *Clostridium botulinum* C2 toxin in mammalian cells results in delayed caspase-dependent apoptotic cell death. *Infect Immun* **76**: 4600–4608. (2008).

87. HEININGER, U, KLICH, K, STEHR, K, CHERRY, J D: Clinical findings in *Bordetella pertussis* infections: Results of a prospective multicenter surveillance study. *Pediatrics* **100**: E10. (1997).

88. HELMS, J B, ROTHMAN, J E: Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF. *Nature* **360**: 352–354. (1992).

89. HEWLETT, E L, GRAY, M C: Adenylyl-cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. In: AKTORIES, K, JUST, I (Hrsg.) *Bacterial Protein Toxins*, **vol 145**, Springer, Berlin, Heidelberg, S. 473–488. (2000).

90. HEWLETT, E L, SAUER, K T, MYERS, G A, COWELL, J L, GUERRANT, R L: Induction of a novel morphological response in Chinese hamster ovary cells by pertussis toxin. *Infect Immun* **40**: 1198–1203. (1983).

91. HOPKINS, S, SCORNEAUX, B, HUANG, Z, MURRAY, M G, WRING, S, SMITLEY, C, HARRIS, R, ERDMANN, F, FISCHER, G, RIBEILL, Y: SCY-635, a novel nonimmunosuppressive analog of cyclosporine that exhibits potent inhibition of hepatitis C virus RNA replication *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**: 660–672. (2010).

92. HSIA, J A, TSAI, S C, ADAMIK, R, YOST, D A, HEWLETT, E L, MOSS, J: Amino acid-specific ADP-ribosylation. Sensitivity to hydroxylamine of cysteine(ADP-ribose)protein and arginine(ADP-ribose)protein linkages. *J Biol Chem* **260**: 16187–16191. (1985).

93. HSIE, A W, PUCK, T T: Morphological transformation of Chinese hamster cells by dibutyryl adenosine cyclic 3':5'-monophosphate and testosterone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 358–361. (1971).

94. JAKOB, U, LILIE, H, MEYER, I, BUCHNER, J: Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock *in vivo*. *J Biol Chem* **270**: 7288–7294. (1995).

95. JOHNSON, J, CORBISIER, R, STENSGARD, B, TOFT, D O: The involvement of p23, Hsp90, and immunophilins in the assembly of progesterone receptor complexes. *J Steroid Biochem Mol Biol* **56**: 31–37. (1996).

96. JOHNSON, R, SNEATH, P H A: Taxonomy of *Bordetella* and related organisms of the families *Achromobacteraceae*, *Brucellaceae*, and *Neisseriaceae*. *Int J Sys Evol Microbiol* **23**: 381–404. (1973).

97. KAISER, E, BÖHM, N, ERNST, K, LANGER, S, SCHWAN, C, AKTORIES, K, POPOFF, M R, FISCHER, G, BARTH, H: FK506-binding protein 51 interacts with *Clostridium*

botulinum C2 toxin and FK506 inhibits membrane translocation of the toxin in mammalian cells. *Cell Microbiol* **14**: 1193–1205. (2012).

98. KAISER, E, KROLL, C, ERNST, K, SCHWAN, C, POPOFF, M R, FISCHER, G, BUCHNER, J, AKTORIES, K, BARTH, H: Membrane translocation of binary actin-ADP-ribosylating toxins from *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* is facilitated by cyclophilin A and Hsp90. *Infect Immun* **79**: 3913–3921. (2011).

99. KAISER, E, PUST, S, KROLL, C, BARTH, H: Cyclophilin A facilitates translocation of the *Clostridium botulinum* C2 toxin across membranes of acidified endosomes into the cytosol of mammalian cells. *Cell Microbiol* **11**: 780–795. (2009).

100. KANG, C B, HONG, Y, DHE-PAGANON, S, YOON, H S: FKBP family proteins: Immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals* **16**: 318–325. (2008).

101. KASLOW, H R, BURNS, D L: Pertussis toxin and target eukaryotic cells: binding, entry, and activation. *FASEB J* **6**: 2684–2690. (1992).

102. KATADA, T, UI, M: ADP ribosylation of the specific membrane protein of C6 cells by islet-activating protein associated with modification of adenylate cyclase activity. *J Biol Chem* **257**: 7210–7216. (1982a).

103. KATADA, T, UI, M: Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 3129–3133. (1982b).

104. KIM, P S, BALDWIN, R L: Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annu Rev Biochem* **51**: 459–489. (1982).

105. KLAUSNER, R D, DONALDSON, J G, LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J: Brefeldin A: Insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* **116**: 1071–1080. (1992).

106. KLEMENT, E, ULIEL, L, ENGEL, I, HASIN, T, YAVZORI, M, ORR, N, DAVIDOVITZ, N, LAHAT, N, SRUGO, I, ZANGVIL, E, COHEN, D: An outbreak of pertussis among young Israeli soldiers. *Epidemiol Infect* **131**: 1049–1054. (2003).

107. KOCHI, S K, COLLIER, R J: DNA fragmentation and cytolysis in U937 cells treated with diphtheria toxin or other inhibitors of protein synthesis. *Exp Cell Res* **208**: 296–302. (1993).

108. KTISTAKIS, N T, LINDER, M E, ROTH, M G: Action of brefeldin A blocked by activation of a pertussis-toxin-sensitive G protein. *Nature* **356**: 344–346. (1992).

109. LAEMMLI, U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685. (1970).

110. LANG, A E, ERNST, K, LEE, H, PAPATHEODOROU, P, SCHWAN, C, BARTH, H, AKTORIES, K: The chaperone Hsp90 and PPIases of the cyclophilin and FKBP families facilitate membrane translocation of *Photorhabdus luminescens* ADP-ribosyltransferases. *Cell Microbiol* **16**: 490–503. (2014).

111. LANG, K, SCHMID, F X, FISCHER, G: Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature* **329**: 268–270. (1987).

112. LEMICHEZ, E, BOMSEL, M, DEVILLIERS, G, VANDERSPEK, J C, MURPHY, J R, LUKIANOV, E V, OLSNES, S, BOQUET, P: Membrane translocation of diphtheria toxin fragment A exploits early to late endosome trafficking machinery. *Mol Microbiol* **23**: 445–457. (1997).

113. LI, J, SOROKA, J, BUCHNER, J: The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim Biophys Acta* **1823**: 624–635. (2012).

114. LILIE, H, LANG, K, RUDOLPH, R, BUCHNER, J: Prolyl isomerases catalyze antibody folding *in vitro*. *Protein Sci* **2**: 1490–1496. (1993).

115. LITTLE, E, RAMAKRISHNAN, M, ROY, B, GAZIT, G, LEE, A S: The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **4**: 1–18. (1994).

116. LIU, J, FARMER, J D, JR, LANE, W S, FRIEDMAN, J, WEISSMAN, I, SCHREIBER, S L: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**: 807–815. (1991).

117. LOCHT, C, ANTOINE, R, VEITHEN, A, RAZE, D: Pertussis toxin: Structure-function relationship. In: AKTORIES, K, JUST, I (Hrsg.) *Bacterial Protein Toxins*, **vol 145**, Springer, Berlin, Heidelberg, S. 167–185. (2000).

118. LOCHT, C, COUTTE, L, MIELCAREK, N: The ins and outs of pertussis toxin. *FEBS J* **278**: 4668–4682. (2011).

119. LOCHT, C, KEITH, J M: Pertussis toxin gene: nucleotide sequence and genetic organization. *Science* **232**: 1258–1264. (1986).

120. LOWY, F D: *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med* **339**: 520–532. (1998).

121. LUBRAN, M M: Bacterial toxins. *Ann Clin Lab Sci* **18**: 58–71. (1988).

122. LÜDERITZ, O, GALANOS, C, LEHMANN, V, NURMINEN, M, RIETSCHEL, E T, ROSENFELDER, G, SIMON, M, WESTPHAL, O: Lipid A: Chemical structure and biological activity. *J Infect Dis* **128**: S17-S29. (1973).

123. MACARIO, A J: Heat-shock proteins and molecular chaperones: implications for pathogenesis, diagnostics, and therapeutics. *Int J Clin Lab Res* **25**: 59–70. (1995).

124. MAJOUL, I V, BASTIAENS, P I, SÖLING, H D: Transport of an external Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) protein from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum: studies with cholera toxin in Vero cells. *J Cell Biol* **133**: 777–789. (1996).

125. MAJOUL, I V, SOHN, K, WIELAND, F T, PEPPERKOK, R, PIZZA, M, HILLEMANN, J, SÖLING, H D: KDEL receptor (Erd2p)-mediated retrograde transport of the cholera toxin A subunit from the Golgi involves COPI, p23, and the COOH terminus of Erd2p. *J Cell Biol* **143**: 601–612. (1998).

126. MANGMOOL, S, KUROSE, H: $G_{i/o}$ protein-dependent and -independent actions of pertussis toxin (PTX). *Toxins (Basel)* **3**: 884–899. (2011).

127. MARCHITTO, K S, SMITH, S G, LOCHT, C, KEITH, J M: Nucleotide sequence homology to pertussis toxin gene in *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *Infect Immun* **55**: 497–501. (1987).

128. MARRACK, P, KAPPLER, J: The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science* **248**: 705–711. (1990).

129. MASIGNANI, V, PIZZA, M, RAPPUOLI, R: Common features of ADP-ribosyltransferases. In: AKTORIES, K, JUST, I (Hrsg.) *Bacterial Protein Toxins*, **vol 145**, Springer, Berlin, Heidelberg, S. 21–44. (2000).

130. MASSEY, S, BANERJEE, T, PANDE, A H, TAYLOR, M, TATULIAN, S A, TETER, K: Stabilization of the tertiary structure of the cholera toxin A1 subunit inhibits toxin dislocation and cellular intoxication. *J Mol Biol* **393**: 1083–1096. (2009).

131. MATTOO, S, CHERRY, J D: Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin Microbiol Rev* **18**: 326–382. (2005).

132. MERRITT, E A, SARFATY, S, AKKER, F VAN DEN, L'HOIR, C, MARTIAL, J A, HOL, W G J: Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor G_{M1} pentasaccharide. *Protein Sci* **3**: 166–175. (1994).

133. MONTECUCCO, C, PAPINI, E, SCHIAVO, G: Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Lett* **346**: 92–98. (1994).

134. MONTECUCCO, C, SCHIAVO, G: Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol Microbiol* **13**: 1–8. (1994).

135. MÜLLER, J, JOHNSSON, N: Split-ubiquitin and the split-protein sensors: chessman for the endgame. *Chembiochem* **9**: 2029–2038. (2008).

136. NAMBIAR, M P, ODA, T, CHEN, C C, KUWAZURU, Y, WU, H C: Involvement of the Golgi region in the intracellular trafficking of cholera toxin. *J Cell Physiol* **154**: 222–228. (1993).

137. NATHAN, D F, LINDQUIST, S: Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase. *Mol Cell Biol* **15**: 3917–3925. (1995).

138. NICOSIA, A, PERUGINI, M, FRANZINI, C, CASAGLI, M C, BORRI, M G, ANTONI, G, ALMONI, M, NERI, P, RATTI, G, RAPPUOLI, R: Cloning and sequencing of the pertussis toxin genes: operon structure and gene duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 4631–4635. (1986).

139. NÜRNBERG, B: Pertussis toxin as a pharmacological tool. In: AKTORIES, K, JUST, I (Hrsg.) *Bacterial Protein Toxins*, **vol 145**, Springer, Berlin, Heidelberg, S. 187–206. (2000).

140. OH, K J, SENZEL, L, COLLIER, R J, FINKELSTEIN, A: Translocation of the catalytic domain of diphtheria toxin across planar phospholipid bilayers by its own T domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 8467–8470. (1999).

141. ORLANDI, P A, CURRAN, P K, FISHMAN, P H: Brefeldin A blocks the response of cultured cells to cholera toxin. Implications for intracellular trafficking in toxin action. *J Biol Chem* **268**: 12010–12016. (1993).

142. PANDE, A H, MOE, D, JAMNADAS, M, TATULIAN, S A, TETER, K: The pertussis toxin S1 subunit is a thermally unstable protein susceptible to degradation by the 20S proteasome. *Biochemistry* **45**: 13734–13740. (2006).

143. PANDE, A H, SCAGLIONE, P, TAYLOR, M, NEMEC, K N, TUTHILL, S, MOE, D, HOLMES, R K, TATULIAN, S A, TETER, K: Conformational instability of the cholera toxin A1 polypeptide. *J Mol Biol* **374**: 1114–1128. (2007).

144. PATTON, W A, VITALE, N, MOSS, J, VAUGHAN, M: Mechanism of cholera toxin ation: ADP-ribosylation factors as stimulators of cholera toxin-catalyzed ADP-ribosylation and effectors in intracellular vesicular trafficking events. In: AKTORIES, K, JUST, I (Hrsg.) *Bacterial Protein Toxins*, **vol 145**, Springer, Berlin, Heidelberg, S. 133–165. (2000).

145. PITTMAN, M: Pertussis toxin: the cause of the harmful effects and prolonged immunity of whooping cough. A hypothesis. *Rev Infect Dis* **1**: 401–412. (1979).

146. PLAUT, R D, CARBONETTI, N H: Retrograde transport of pertussis toxin in the mammalian cell. *Cell Microbiol* **10**: 1130–1139. (2008).

147. POOTONG, A, BUDHIRAKKUL, P, TONGTAWE, P, TAPCHAISRI, P, CHONGSA-NGUAN, M, CHAICUMPA, W: Monoclonal antibody that neutralizes pertussis toxin activities. *Asian Pac J Allergy Immunol* **25**: 37–45. (2007).

148. POSTELS-MULTANI, S, SCHMITT, H J, WIRSING VON KÖNIG, C H, BOCK, H L, BOGAERTS, H: Symptoms and complications of pertussis in adults. *Infection* **23**: 139–142. (1995).

149. PRATT, W B, GEHRING, U, TOFT, D O: Molecular chaperoning of steroid hormone receptors. *EXS* **77**: 79–95. (1996).

150. PRATT, W B, TOFT, D O: Regulation of signaling protein function and trafficking by the Hsp90/Hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* **228**: 111–133. (2003).

151. PRELL, E, KAHLERT, V, RUCKNAGEL, K P, MALESEVIC, M, FISCHER, G: Fine tuning the inhibition profile of cyclosporine A by derivatization of the MeBmt residue. *Chembiochem* **14**: 63–65. (2013).

152. PROFT, T, FRASER, J D: Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol* **133**: 299–306. (2003).

153. RAETZ, C R, H, WHITFIELD, C: Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* **71**: 635–700. (2002).

154. RATTS, R, ZENG, H, BERG, E A, BLUE, C, MCCOMB, M E, COSTELLO, C E, VANDERSPEK, J C, MURPHY, J R: The cytosolic entry of diphtheria toxin catalytic domain requires a host cell cytosolic translocation factor complex. *J Cell Biol* **160**: 1139–1150. (2003).

155. REUNER, K H, PRESEK, P, BOSCHEK, C B, AKTORIES, K: Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin and disorganizes the microfilament network in intact cells. *Eur J Cell Biol* **43**: 134–140. (1987).

156. ROBERT KOCH-INSTITUT (RKI): Epidemiologisches Bulletin, 21. Juli 2014 / Nr. 29. *Epid. Bull.* **2014**: 251-258. (2014).

157. ROBERT KOCH-INSTITUT (RKI): *STIKO Impfempfehlungen 2018/2019, Empfehlungen der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch-Institut*, Börm Bruckmeier, Grünwald, S. 1-136, Stand: August 2018. (2018).

158. ROGERS, T S, COREY, S J, ROSOFF, P M: Identification of a 43-kilodalton human T lymphocyte membrane protein as a receptor for pertussis toxin. *J Immunol* **145**: 678–683. (1990).

159. SANDVIG, K, OLSNES, S: Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. *J Cell Biol* **87**: 828–832. (1980).

160. SANDVIG, K, OLSNES, S: Rapid entry of nicked diphtheria toxin into cells at low pH. Characterization of the entry process and effects of low pH on the toxin molecule. *J Biol Chem* **256**: 9068–9076. (1981).

161. SANDVIG, K, OLSNES, S: Receptor-mediated entry of protein toxins into cells. *Acta Histochem Suppl* **29**: 79–94. (1984).

162. SANDVIG, K, VAN DEURS, B: Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. *FEBS Lett* **529**: 49–53. (2002).

163. SCHIENE-FISCHER, C: Multidomain peptidyl prolyl *cis/trans* isomerases. *Biochim Biophys Acta*. (2014).

164. SCHLIEVERT, P M, JABLONSKI, L M, ROGGIANI, M, SADLER, I, CALLANTINE, S, MITCHELL, D T, OHLENDORF, D H, BOHACH, G A: Pyrogenic toxin superantigen site

specificity in toxic shock syndrome and food poisoning in animals. *Infect Immun* **68**: 3630–3634. (2000).

165. SCHMID, F X: Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**: 123–142. (1993).

166. SCHMID, F X, MAYR, L M, MÜCKE, M, SCHÖNBRUNNER, E R: Prolyl isomerases: role in protein folding. *Adv Protein Chem* **44**: 25–66. (1993).

167. SCHMITT, C K, MEYSICK, K C, O'BRIEN, A D: Bacterial toxins: friends or foes? *Emerg Infect Dis* **5**: 224–234. (1999).

168. SCHNEIDER, C, SEPP-LORENZINO, L, NIMMESGERN, E, OUERFELLI, O, DANISHEFSKY, S, ROSEN, N, HARTL, F U: Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14536–14541. (1996).

169. SCHREIBER, S L, LIU, J, ALBERS, M W, KARMACHARYA, R, KOH, E, MARTIN, P K, ROSEN, M K, STANDAERT, R F, WANDLESS, T J: Immunophilin-ligand complexes as probes of intracellular signaling pathways. *Transplant Proc* **23**: 2839–2844. (1991).

170. SCHULTE, T W, AKINAGA, S, SOGA, S, SULLIVAN, W, STENSGARD, B, TOFT, D O, NECKERS, L M: Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cell Stress Chaperones* **3**: 100–108. (1998).

171. SCHUMACHER, R J, HANSEN, W J, FREEMAN, B C, ALNEMRI, E, LITWACK, G, TOFT, D O: Cooperative action of Hsp70, Hsp90, and DnaJ proteins in protein renaturation. *Biochemistry* **35**: 14889–14898. (1996).

172. SCHUSTER, M, SCHNELL, L, FEIGL, P, BIRKHOFER, C, MOHR, K, ROEDER, M, CARLE, S, LANGER, S, TIPPEL, F, BUCHNER, J, FISCHER, G, HAUSCH, F, FRICK, M, SCHWAN, C, AKTORIES, K, SCHIENE-FISCHER, C, BARTH, H: The Hsp90 machinery facilitates the transport of diphtheria toxin into human cells. *Sci Rep* **7**: 1–14. (2017).

173. SCHUSTER, M J: Das nicht-immunsuppressive Cyclosporin A Derivat VK112 und dessen Wirkung auf die Vergiftung von HeLa-Zellen durch das Diphtherie-Toxin von *Corynebacterium diphtheriae*. Medizinische Dissertation. In: Institut für Phamakologie und Toxikologie am Universitätsklinikum Ulm, Universität Ulm. (2017).

174. SERRES, G DE, SHADMANI, R, DUVAL, B, BOULIANNE, N, DERY, P, DOUVILLE FRADET, M, ROCHETTE, L, HALPERIN, S A: Morbidity of pertussis in adolescents and adults. *J Infect Dis* **182**: 174–179. (2000).

175. SHALL, S: ADP-ribosylation reactions. *Biochimie* **77**: 313–318. (1995).

176. SIMPSON, L L, STILES, B G, ZEPEDA, H, WILKINS, T D: Production by *Clostridium spiroforme* of an iotalike toxin that possesses mono(ADP-ribosyl)transferase activity: identification of a novel class of ADP-ribosyltransferases. *Infect Immun* **57**: 255–261. (1989).

177. SONGER, J G: Bacterial phospholipases and their role in virulence. *Trends Microbiol* **5**: 156–161. (1997).

178. STANCATO, L F, CHOW, Y H, HUTCHISON, K A, PERDEW, G H, JOVE, R, PRATT, W B: Raf exists in a native heterocomplex with Hsp90 and p50 that can be reconstituted in a cell-free system. *J Biol Chem* **268**: 21711–21716. (1993).

179. STEIN, P E, BOODHOO, A, ARMSTRONG, G D, COCKLE, S A, KLEIN, M H, READ, R J: The crystal structure of pertussis toxin. *Structure* **2**: 45–57. (1994a).

180. STEIN, P E, BOODHOO, A, ARMSTRONG, G D, HEERZE, L D, COCKLE, S A, KLEIN, M H, READ, R J: Structure of a pertussis toxin–sugar complex as a model for receptor binding. *Nat Struct Mol Biol* **1**: 591–596. (1994b).

181. STILES, B G, WIGELSWORTH, D J, POPOFF, M R, BARTH, H: Clostridial binary toxins: iota and C2 family portraits. *Front Cell Infect Microbiol* **1**: 11. (2011).

182. STILES, B G, WILKINS, T D: Purification and characterization of *Clostridium perfringens* iota toxin: dependence on two nonlinked proteins for biological activity. *Infect Immun* **54**: 683–688. (1986).

183. SURRIDGE, J, SEGEDIN, E R, GRANT, C C: Pertussis requiring intensive care. *Arch Dis Child* **92**: 970–975. (2007).

184. TAMAYO, A G, BHARTI, A, TRUJILLO, C, HARRISON, R, MURPHY, J R: COPI coatomer complex proteins facilitate the translocation of anthrax lethal factor across vesicular membranes *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5254–5259. (2008).

185. TAMURA, M, NOGIMORI, K, MURAI, S, YAJIMA, M, ITO, K, KATADA, T, UI, M, ISHII, S: Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. *Biochemistry* **21**: 5516–5522. (1982).

186. TAYLOR, M, NAVARRO-GARCIA, F, HUERTA, J, BURRESS, H, MASSEY, S, IRETON, K, TETER, K: Hsp90 is required for transfer of the cholera toxin A1 subunit from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *J Biol Chem* **285**: 31261–31267. (2010).

187. THOMSON, A W, BONHAM, C A, ZEEVI, A: Mode of action of tacrolimus (FK506): molecular and cellular mechanisms. *Ther Drug Monit* **17**: 584–591. (1995).

188. TIMMER, A M, TIMMER, J C, PENCE, M A, HSU, L-C, GHOCHANI, M, FREY, T G, KARIN, M, SALVESEN, G S, NIZET, V: Streptolysin O promotes group A *Streptococcus* immune evasion by accelerated macrophage apoptosis. *J Biol Chem* **284**: 862–871. (2009).

189. TURTON, K, CHADDOCK, J A, ACHARYA, K R: Botulinum and tetanus neurotoxins: structure, function and therapeutic utility. *Trends Biochem Sci* **27**: 552–558. (2002).

190. UEDA, K, HAYAISHI, O: ADP-ribosylation. *Annu Rev Biochem* **54**: 73–100. (1985).

191. VAROL, B, BEKTAS, M, NURTEN, R, BERMEK, E: The cytotoxic effect of diphtheria toxin on the actin cytoskeleton. *Cell Mol Biol Lett* **17**: 49–61. (2012).

192. VOLLMER, M: Pertussis toxin interacts with chaperones and peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerases during its cellular uptake. Masterarbeit. In: Institut für Phamakologie und Toxikologie am Universitätsklinikum Ulm, Universität Ulm. (2015).

193. WAGNER, K S, WHITE, J M, LUCENKO, I, MERCER, D, CROWCROFT, N S, NEAL, S, EFSTRATIOU, A: Diphtheria in the postepidemic period, Europe, 2000-2009. *Emerg Infect Dis* **18**: 217–225. (2012).

194. WANG, P, HEITMAN, J: The cyclophilins. *Genome Biol* **6**: 226. (2005).

195. WARTMANN, M, DAVIS, R J: The native structure of the activated Raf protein kinase is a membrane-bound multi-subunit complex. *J Biol Chem* **269**: 6695–6701. (1994).

196. WEDEMEYER, W J, WELKER, E, SCHERAGA, H A: Proline *cis−trans* isomerization and protein folding. *Biochemistry* **41**: 14637–14644. (2002).

197. WEISS, A: Mucosal immune defenses and the response of *Bordetella pertussis*. *ASM News* **63**: 22–28. (1997).

198. WENDELBOE, A M, HUDGENS, M G, POOLE, C, RIE, A VAN: Estimating the role of casual contact from the community in transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Emerg Themes Epidemiol* **4**: 15. (2007a).

199. WENDELBOE, A M, NJAMKEPO, E, BOURILLON, A, FLORET, D D, GAUDELUS, J, GERBER, M, GRIMPREL, E, GREENBERG, D, HALPERIN, S A, LIESE, J, MUNOZ-RIVAS, F, TEYSSOU, R, GUISO, N, RIE, A VAN: Transmission of *Bordetella pertussis* to young infants. *Pediatr Infect Dis J* **26**: 293–299. (2007b).

200. WERNER, G, HAGENMAIER, H, DRAUTZ, H, BAUMGARTNER, A, ZAHNER, H: Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* **37**: 110–117. (1984).

201. WHO: Pertussis vaccines: WHO position paper, August 2015--Recommendations. *Vaccine* **34**: 1423–1425. (2016).

202. WIECH, H, BUCHNER, J, ZIMMERMANN, R, JAKOB, U: Hsp90 chaperones protein folding *in vitro*. *Nature* **358**: 169–170. (1992).

203. WIĘDŁOCHA, A, NILSEN, T, WESCHE, J, SØRENSEN, V, MAŁECKI, J, MARCINKOWSKA, E, OLSNES, S: Phosphorylation-regulated nucleocytoplasmic trafficking of internalized fibroblast growth factor-1. *Mol Biol Cell* **16**: 794–810. (2005).

204. WIRSING VON KÖNIG, C H, HALPERIN, S A, RIFFELMANN, M, GUISO, N: Pertussis of adults and infants. *Lancet Infect Dis* **2**: 744–750. (2002).

205. XU, Y, BARBIERI, J T: Pertussis toxin-mediated ADP-ribosylation of target proteins in Chinese hamster ovary cells involves a vesicle trafficking mechanism. *Infect Immun* **63**: 825–832. (1995).

206. XU, Y, BARBIERI, J T: Pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of $G_{i\text{-}2}$ and $G_{i\text{-}3}$ in CHO cells is modulated by inhibitors of intracellular trafficking. *Infect Immun* **64**: 593–599. (1996).

207. YAMAIZUMI, M, MEKADA, E, UCHIDA, T, OKADA, Y: One molecule of diphtheria toxin fragment a introduced into a cell can kill the cell. *Cell* **15**: 245–250. (1978).

208. YOSHIDA, T, CHEN, C C, ZHANG, M S, WU, H C: Disruption of the Golgi apparatus by brefeldin A inhibits the cytotoxicity of ricin, modeccin, and Pseudomonas toxin. *Exp Cell Res* **192**: 389–395. (1991).

209. YOUNG, J C, MOAREFI, I, HARTL, F U: Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol* **154**: 267–273. (2001).

210. ZORNETTA, I, BRANDI, L, JANOWIAK, B, DAL MOLIN, F, TONELLO, F, COLLIER, R J, MONTECUCCO, C: Imaging the cell entry of the anthrax oedema and lethal toxins with fluorescent protein chimeras. *Cell Microbiol* **12**: 1435–1445. (2010).

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeines Schema von AB-Toxinen und ihrer Aufnahme in die Zielzelle. 3
Abbildung 2: Aufnahmemechanismus von AB-Toxinen – *short-trip* und *long-trip* Toxine. 7
Abbildung 3: Schematische Darstellung von *Bordetella pertussis* und seinen Virulenzfaktoren. 9
Abbildung 4: Strukturelle Organisation von Pertussistoxin. 15
Abbildung 5: Schematische Struktur von Pertussistoxin. 15
Abbildung 6: Schematische Darstellung der ADP-Ribosylierung der α-Untereinheit eines heterotrimeren $G_{i/o}$-Proteins durch Pertussistoxin. 16
Abbildung 7: Auswirkungen der ADP-Ribosylierung der $G_{i/o}$-Proteine durch Pertussistoxin. 17
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Aufnahmewegs von Pertussistoxin. 19
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Membrantranslokation der Enzymkomponente C2I des binären C2-Toxins von *Clostridium botulinum* über endosomale Membranen. 27
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Arbeitshypothese: Wird die Translokation des A-Protomers von Pertussistoxin über die Membran des endoplasmatischen Retikulums durch Hsp90, FK506-Bindeproteine und / oder Cyclophiline beeinflusst? 29
Abbildung 11: Bestimmung von Zellzahl und Volumen mit der Neubauer Zählkammer. 43
Abbildung 12: Verwendete Eichgerade für die Proteinbestimmung nach Bradford. 44
Abbildung 13: Schema der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. 46
Abbildung 14: Aufbau und Schichtung des *Semi-Dry*-Blots. 48
Abbildung 15: Aufbau und Schichtung des *Wet*-Blots / *Tank*-Blots. 49
Abbildung 16: Proteinnachweis durch spezifische Antikörper. 50
Abbildung 17: Schematische Darstellung des Vergiftungstests 1. 64
Abbildung 18: Schematische Darstellung des Vergiftungstests 2. 65

Abbildung 19: Allgemeines Schema des Digitonintests. 72
Abbildung 20: DNA-Gel zur Prüfung der Intaktheit des Plasmids ptacC180 nach Transformation und Aufreinigung. 74
Abbildung 21: Coomassie-Färbung des Gels zur Prüfung der Aufreinigung des C180-Proteins. 76
Abbildung 22: Ponceau-S-Färbung der Membran zur Prüfung der spezifischen Erkennung des C180-Proteins durch Antikörper. 77
Abbildung 23: Westernblot-Analyse zur Prüfung der spezifischen Erkennung des C180-Proteins durch Antikörper. 78
Abbildung 24: Konzentrationsgel zur Proteinkonzentrationsbestimmung des C180-Proteins. 79
Abbildung 25: Kalibriergerade des BSA-Standards aus dem Konzentrationsgel zur Bestimmung der Proteinkonzentration des C180-Proteins. 81
Abbildung 26: Prüfung der Enzymaktivität des C180-Proteins *in vitro*. 82
Abbildung 27: Prüfung der Laufhöhe des Pertussistoxin-Substrates $G_i\alpha$ bei CHO-K1-Zellen. 84
Abbildung 28: Morphologieänderung von dünn-ausgesäten CHO-K1-Zellen bei der Vergiftung mit Pertussistoxin (Clustering). 86
Abbildung 29: Morphologieänderung von dicht-ausgesäten CHO-K1-Zellen bei der Vergiftung mit Pertussistoxin (Aufreißen des Zellrasens). 88
Abbildung 30: Vergiftung von CHO-K1-Zellen mit abnehmender Konzentration an Pertussistoxin. 90
Abbildung 31: Vergiftung von CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin nach zeitabhängiger Toxinentfernung. 92-93
Abbildung 32: Vergiftung von *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin (Vergiftungstest 2). 94
Abbildung 33: Vergiftung von *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen durch Pertussistoxin (Vergiftungstest 2). 95
Abbildung 34: Einfluss der pharmakologischen Inhibitoren Brefeldin A, Radicicol, FK506 und Cyclosporin A auf die Vergiftung von *adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin (Vergiftungstest 1). 97-98

Abbildung 35: Einfluss der pharmakologischen Inhibitoren Brefeldin A, Radicicol, FK506 und Cyclosporin A auf die Vergiftung von *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin (Vergiftungstest 2). 100-101
Abbildung 36: Einfluss des pharmakologischen Inhibitors VK112 auf die Vergiftung von *adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin (Vergiftungstest 1). 103
Abbildung 37: Einfluss der Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid auf die Vergiftung von *adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin (Vergiftungstest 1). 105-106
Abbildung 38: Einfluss der Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid auf die Vergiftung von *nicht-adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin (Vergiftungstest 2). 107-108
Abbildung 39: Einfluss des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid auf die Vergiftung von *adhärenten* CHO-K1-Zellen mit Pertussistoxin (Vergiftungstest 1). 109
Abbildung 40: Effekte der pharmakologischen Inhibitoren Brefeldin A, Radicicol, FK506 und Cyclosporin A und der Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid auf *adhärente* CHO-K1-Zellen in Abwesenheit von Pertussistoxin. 111
Abbildung 41: Effekte der pharmakologischen Inhibitoren Brefeldin A, Radicicol, FK506 und Cyclosporin A und der Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid auf *nicht-adhärente* CHO-K1-Zellen in Abwesenheit von Pertussistoxin. 112
Abbildung 42: Effekte des pharmakologischen Inhibitors VK112 und des Lösungsmittels Dimethylsulfoxid auf *adhärente* CHO-K1-Zellen in Abwesenheit von Pertussistoxin. 113
Abbildung 43: Analyse des Einflusses der Inhibitoren Radicicol, FK506 und Cyclosporin A auf den ADP-Ribosylierungsstatus von $G_i\alpha$ der CHO-K1-Zellen nach Vergiftung mit Pertussistoxin (Nachribosylierungstest). 115
Abbildung 44: Analyse des Einflusses des Inhibitors Brefeldin A auf den ADP-Ribosylierungsstatus von $G_i\alpha$ der CHO-K1-Zellen nach Vergiftung mit Pertussistoxin (Nachribosylierungstest). 116

Abbildung 45: Analyse des Einflusses der Inhibitoren Radicicol, FK506, Cyclosporin A und Brefeldin A auf die Bindung von Pertussistoxin an der Zelloberfläche (Bindungstest). 118
Abbildung 46: Analyse des Einflusses der Inhibitoren Radicicol und Brefeldin A auf die Enzymaktivität der S1-Untereinheit von Pertussistoxin *in vitro* (Enzymaktivitätstest). 120
Abbildung 47: Analyse des Einflusses der Inhibitoren FK506, Cyclosporin A und VK112 sowie der Lösungsmittel Ethanol und Dimethylsulfoxid auf die Enzymaktivität der S1-Untereinheit von Pertussistoxin *in vitro* (Enzymaktivitätstest). 121
Abbildung 48: Analyse des zeitlichen Verlaufs der Aufnahme der S1-Untereinheit von Pertussistoxin ins Zytosol (Digitonintest). 124
Abbildung 49: Untersuchung des Einflusses des Inhibitors Radicicol auf die Aufnahme der S1-Untereinheit von Pertussistoxin ins Zytosol (Digitonintest). 126-126
Abbildung 50: Untersuchung des Einflusses der Inhibitoren FK506, Cyclosporin A und Brefeldin A auf die Aufnahme der S1-Untereinheit von Pertussistoxin ins Zytosol (Digitonintest). 128

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Toxine..... 41
Tabelle 2: Verwendetes Pipettierschema für die Proteinbestimmung nach Bradford..... 45
Tabelle 3: Übersicht über Natriumdodecylsulfat-Gele..... 47
Tabelle 4: Inhalt des Kits NucleoBond® PC 100 Kit von Macherey-Nagel (Düren) und Zusammensetzung der darin enthaltenen Puffer..... 54
Tabelle 5: Gemessene Intensitäten aus dem Konzentrationsgel zur Bestimmung der Proteinkonzentration des C180-Proteins. 80
Tabelle 6: Ermittlung der Proteinkonzentration des C180-Proteins..... 81

Danksagung

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben …

… Herrn Prof. Dr. Holger Barth für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Bereitstellung des sehr interessanten Themas für meine Dissertation, die engagierte und kompetente Betreuung, die Unterstützung und Förderung der Bewerbung im Promotionsprogramm „Experimentelle Medizin“ sowie die Möglichkeit der Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen.

… Herrn Prof. Dr. Manfred Frick vom Institut für Allgemeine Physiologie der Universität Ulm für seinen Einsatz als Zweitgutachter für die vorliegende Arbeit.

… dem Promotionsprogramm „Experimentelle Medizin“ der „International Graduate School for Molecular Medicine Ulm“ für die Aufnahme als Stipendiatin, die finanzielle Unterstützung, die Ermöglichung der Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen sowie die fachlichen Anregungen und Diskurse.

… unseren Kooperationspartnern für den fachlichen Austausch und die Bereitstellung der Materialien.

… der gesamten Arbeitsgruppe – insbesondere Katharina Ernst, Christina Förtsch, Lydia Dmochewitz, Ulrike Binder und Leonie Schnell – für die angenehme Arbeits-atmosphäre, die Hilfsbereitschaft bei auftretenden Fragen und beim Erlernen der Labortechniken.

… meinen Eltern für die Ermöglichung und Förderung meiner Ausbildung sowie für ihr Interesse und ihre persönliche Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Nina Eberhardt
Geburtstag:	07. Januar 1989
Geburtsort:	Geislingen an der Steige
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Aus- und Weiterbildung

09/2018-11/2018:	Nuklearmedizin-Rotation, Klink für Nuklearmedizin, Bundeswehrkrankenhaus Ulm (Oberstarzt Dr. B. Klemenz)
01/2017-06/2017:	Computertomografie-Rotation, Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Ulm (Prof. Dr. M. Beer)
Seit 02/2016:	**Weiterbildung zum Facharzt für Nuklearmedizin**, Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Ulm (Prof. Dr. A. J. Beer)
12/2015:	**Approbation als Ärztin**
11/2015:	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)
11/2014 – 10/2015:	Praktisches Jahr • Wahltertial im Fachbereich Nuklearmedizin, Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Ulm (Prof. Dr. A. J. Beer) • Fachbereich Innere Medizin & Geriatrie, Kliniken für Innere Medizin, Universitätsklinikum Ulm & Agaplesion Bethesda Klinik Ulm • Fachbereich Chirurgie, Kliniken für Chirurgie, Universitätsklinikum Ulm
10/2014:	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)
10/2012 – 03/2013:	Freisemester für experimentelle Doktorarbeit (Dr. med.), Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Ulm, Arbeitsgruppe Toxikologie (Prof. Dr. H. Barth) im Rahmen des Promotionsprogramms „Experimentelle Medizin“ der International Graduate School in Molecular Medicine Ulm
03/2011:	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Durchschnittsnote: 2,0)
10/2008 – 11/2015:	**Studium der Humanmedizin** an der Universität Ulm
09/1999 – 06/2008:	**Besuch des Rechberg-Gymnasiums** Donzdorf Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Abitur) 06/2008 (Durchschnittsnote: 1,2) Apollinaire-Preis (Französisch) der Robert Bosch Stiftung Schuljahr 2007/2008
09/1995 – 08/1999:	**Besuch der Johann-Georg-Fischer Grundschule** Süßen

Berufliche Laufbahn / Tätigkeiten

Seit 02/2016:	**Assistenzärztin**, Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Ulm (Prof. Dr. A. J. Beer)
04/2015 – 12/2015:	**Wissenschaftliche Hilfskraft im Team der Lehrevaluation**, Studiendekanat der Medizinischen Fakultät, Universität Ulm
04/2014 – 03/2015:	**Wissenschaftliche Hilfskraft im Team eLearning**, Studiendekanat der Medizinischen Fakultät, Universität Ulm
08/2013 – 03/2014:	**Wissenschaftliche Hilfskraft im Team der Lehrevaluation**, Studiendekanat der Medizinischen Fakultät, Universität Ulm

09/2011 – 09/2012: **Wissenschaftliche Hilfskraft im Team der Lehrevaluation**, Studiendekanat der Medizinischen Fakultät, Universität Ulm

10/2010 – 02/2011: **Wissenschaftliche Hilfskraft im makroskopischen Anatomie Kurs als Waschkurstutorin**, Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Ulm

Wissenschaftliche Tätigkeiten

Promotion (Dr. med.)

12/2019: **Promotionsarbeit**: „Interaktion des Pertussistoxins mit dem Chaperon Hsp90 und Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen während seiner Aufnahme in Säugetierzellen." (Gesamtnote: summa cum laude)

10/2012 – 06/2013: **Stipendiatin im Promotionsprogramm „Experimentelle Medizin" der International Graduate School in Molecular Medicine Ulm**

08/2012 – 12/2019: **Experimentelle Doktorarbeit**, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Ulm, Arbeitsgruppe Toxikologie (Prof. Dr. H. Barth)

Weitere Publikationen

1. Fendler WP, Calais J, Allen-Auerbach M, Bluemel C, **Eberhardt N**, Emmett L, Gupta P, Hartenbach M, Hope TA, Okamoto S, Pfob CH, Pöppel TD, Rischpler C, Schwarzenböck S, Stebner V, Unterrainer M, Zacho HD, Maurer T, Gratzke C, Crispin A, Czernin J, Herrmann K, Eiber M. ^{68}Ga-PSMA-11 PET/CT Interobserver Agreement for Prostate Cancer Assessments: An International Multicenter Prospective Study. J Nucl Med. 2017 Oct;58(10):1617-1623. doi: 10.2967/jnumed.117.190827. Epub 2017 Apr 13.
2. Begum N, Thieme A, **Eberhardt N**, Tauber R, Beer AJ, Glatting G, Eiber M, Kletting P. The effect of total tumor volume on the biologically effective dose of tumor and kidneys for ^{177}Lu-labelled PSMA peptides. J Nucl Med. 2018 Jun;59(6):929-933. doi: 10.2967/jnumed.117.203505. Epub 2018 Feb 1.
3. Ernst K*, **Eberhardt N***, Mittler AK*, Sonnabend M, Anastasia A, Freisinger S, Schiene-Fischer C, Malešević M, Barth H. Pharmacological Cyclophilin Inhibitors Prevent Intoxication of Mammalian Cells with *Bordetella pertussis* Toxin. Toxins (Basel). 2018 May 1;10(5). pii: E181. doi: 10.3390/toxins10050181. (* These authors contributed equally. Teil der Promotionsarbeit.)
4. Kletting P, Thieme A, **Eberhardt N**, Rinscheid A, D'Alessandria C, Allmann J, Wester HJ, Tauber R, Beer AJ, Glatting G, Eiber M. Modeling and predicting tumor response in radioligand therapy. J Nucl Med. 2019 Jan;60(1):65-70. doi: 10.2967/jnumed.118.210377. Epub 2018 May 10.
5. Pala A, Reske SN, **Eberhardt N**, Scheuerle A, König R, Schmitz B, Beer AJ, Wirtz CR, Coburger J. Diagnostic accuracy of intraoperative perfusion-weighted MRI and 5-aminolevulinic acid in relation to contrast-enhanced intraoperative MRI and ^{11}C-methionine positron emission tomography in resection of glioblastoma: a prospective study. Neurosurg Rev. 2019 Jun;42(2):471-479. doi: 10.1007/s10143-018-0987-4. Epub 2018 May 28.
6. **Eberhardt N**, Kneer K, Prasad V. Die Wichtigkeit des „Machine Learning" und der Texturanalyse in der Onkologie anhand der Fusionsbildgebung. Der Nuklearmediziner 2019; 42(02): 133-143. doi: 10.1055/a-0943-0020.

Teilnahme an wissenschaftlichen Konferenzen / Kongressen

09.11.2019 **Jahrestagung der Mittelrheinischen Gesellschaft für Nuklearmedizin e. V. (MGN)** in Fulda – Vortrag: **N. Eberhardt** – „Künstliche Intelligenz (KI) in der Nuklearmedizin, Schwerpunkt PET-Hybridbildgebung in der Onkologie".

08.11. – 09.11.2019: **31. Jahrestagung der Südwestdeutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin e. V. (SWDGN)** in Ulm – Vortrag: B. Grüner und **N. Eberhardt** – „Infektfokussuche: Wann eher FDG-PET/CT, wann eher Entzündungsszintigraphie?".

12.10. – 16.10.2019: **Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine (EANM) 2019** in Barcelona, Spanien – ePoster-Beitrag: K. Kneer, J. Steinacker, **N. Eberhardt**, E. Yousefzadeh-Nowshahr, J. Raacke, S. Rüdiger, C. Kropf-Sanchen, M. Beer, V. Prasad, G. Glatting und A. J. Beer – „Image-based biomarkers for resectable NSCLC using F-18-FDG-PET/CT: evaluation of a novel Matlab based algorithm for better characterisation of radiomics features".

22.06. – 25.06.2019: **Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (SNMMI) Annual Meeting 2019** in Anaheim, California, USA – Vortrag: A. Rinscheid*, A. Allmann, J. Allmann, **N. Eberhardt**, M. Eiber, P. Kletting, A. J. Beer und G. Glatting – „Optimal sampling schedules for kidney dosimetry for ^{177}Lu-PSMA therapy". (* präsentierender Autor)

03.04. – 06.04.2019: **57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin (DGN)** in Bremen – Vortrag: N. J. Begum*, A. Thieme, **N. Eberhardt**, R. Tauber, M. Eiber, A. J. Beer, G. Glatting, P. Kletting – „Pharmakokinetik PSMA-spezifischer Liganden in Abhängigkeit von Affinität und Stoffmenge: Eine Simulationsstudie". – Poster-Beiträge: K. Kneer, **N. Eberhardt***, C. S. Lsson, A. Boos, C. Otto, G. Glatting, C. Beltinger, M. Beer, V. Prasad und A. J. Beer – „Prognostischer Wert der Texturanalyse und bildbasierter Biomarker der MRT und Iod-123-MIBG-Szintigraphie bei Neuroblastom-Patienten". K. Kneer, **N. Eberhardt***, C. S. Lisson, A. Boos, C. Otto, G. Glatting, C. Beltinger, M. Beer, A. J. Beer und V. Prasad – „Evaluation des prognostischen und prädiktiven Wertes der Iod-123-MIBG-SPECT/CT bei Neuroblastomen". K. Kneer, **N. Eberhardt***, D. Weiss, R. Mayer-Steinacker, G. Glatting, M. Beer, V. Prasad und A. J. Beer – „Evaluation des prognostischen Wertes der Texturanalyse der F-18-FDG-PET/CT bei Knochensarkomen". K. Kneer, **N. Eberhardt***, J. Raacke, S. Rüdiger, C. Kropf-Sanchen, M. Beer, V. Prasad und A. J. Beer – „Prognostischer Wert der F-18-FDG-PET/CT inklusive Texturanalyse bei NSCLC: Abhängigkeit von Grading und Histologie". (* präsentierender Autor)

30.08. – 01.09.2018: **Deutsche Gesellschaft für Nuklearmedizin (DGN) Summer School 2018** in Berlin an der Charité – Universitätsmedizin Berlin - Stipendium-Teilnahme.

18.04. – 21.04.2018: **56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin (DGN)** in Bremen – Vortrag: N. J. Begum*, A. Thieme, **N. Eberhardt**, R. Tauber, M. Eiber, A. J. Beer, G. Glatting, P. Kletting – „Abhängigkeit der BED-Werte von den Gesamttumorvolumina für Lu-177-markierte PSMA-Liganden". (* präsentierender Autor)

26.02. – 01.03.2018: **3rd German Pharm-Tox Summit 2018** – 84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Göttingen – Poster-Beitrag: K. Ernst*, A.-K. Mittler, **N. Eberhardt**, M. Vollmer, J. Wirsching, A. Anastasia, M. Frick und H. Barth – „Pertussis toxin requires host cell chaperones for its uptake into mammalian cells". (* präsentierender Autor)

06.03. – 09.03.2017: **2nd German Pharm-Tox Summit 2017** – 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) in Heidelberg – Poster-Beitrag: K. Ernst*, **N. Eberhardt**, M. Vollmer, J. Wirsching, C. Schiene-Fischer und H. Barth – „The cellular uptake of pertussis toxin is facilitated by host cell chaperones". (* präsentierender Autor)

22.06. – 26.06.2013: **ETOX 16 European Workshop on Bacterial Protein Toxins** in Freiburg – Poster-Beitrag: **N. Eberhardt*** und H. Barth – „Role of host cell chaperones in cellular uptake of Pertussis toxin". (* präsentierender Autor)

11.04. – 13.04.2013: **Spring Meeting 2013 der International Graduate School in Molecular Medicine Ulm** in Ulm – Poster-Beitrag: **N. Eberhardt*** und H. Barth – „Interaction between Pertussis toxin and host cell chaperones / PPIases". (* präsentierender Autor)

Praktika & Auslandserfahrung

01.03. – 31.03.2014:	**Famulatur Rechtsmedizin**, Institut für Rechtsmedizin, Kantonsspital St. Gallen, Schweiz, (Prof. Dr. R. Hausmann)
28.10. – 10.11.2013:	**Famulatur Nuklearmedizin**, Klinik für Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Ulm (Prof. Dr. S. N. Reske)
18.08. – 05.09.2013:	**Famulatur Anästhesie und Intensivmedizin**, Klinik für Anästhesiologie, The Medical Specialist Group, Guernsey, Kanalinseln
11.03. – 09.04.2013:	**Famulatur Radiologie und Neuroradiologie**, Klinik für Radiologie und Neuroradiologie, Klinikum Christophsbad Göppingen (Prof. Dr. B. Tomandl)
05.03. – 04.04.2012:	**Famulatur Pathologie**, Institut für Pathologie, ALB FILS KLINIKEN, Klinik am Eichert Göppingen (PD Dr. V. Bürkle)
02.09. – 01.10.2009:	**Pflegepraktikum**, Phlebologisch-Chirurgische Klinik Dr. Schnek, Göppingen
16.03. – 19.04.2009:	**Pflegepraktikum**, Orthopädie, Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm gGmbH
04.08. – 05.09.2008:	**Pflegepraktikum**, Innere Medizin, ALB FILS KLINIKEN, Helfenstein Klinik Geislingen
20.10. – 26.10.2005:	**Berufs- und Studienorientierung an Gymnasien („BOGY-Praktikum“)**, Kommunikations- und Informationszentrum (KIZ) der Universität Ulm
14.03. – 18.03.2005:	**„Compassion Woche“**, Schule für Hörgeschädigte St. Josef, Schwäbisch-Gmünd