Universitätsklinikum Ulm
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Peter Gierschik

Langzeiteffekte des Iota-Toxins aus *Clostridium perfringens* auf kultivierte Säugetierzellen

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades *Dr. med.*
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von

Hanna Hilger
geboren in Ulm

2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Barth

2. Berichterstatter: Prof Dr. Günter Speit

Tag der Promotion: 9.12.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis
Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Bakterielle Toxine 1
1.2 AB-Toxine und ihre zellulären Aufnahmemechanismen 2
1.3 Binäre Aktin-ADP-ribosylierende Toxine 3
1.4 Clostridium botulinum C2-Toxin 5
1.5 Clostridium perfringens Iota-Toxin 8
1.6 Apoptose 10
1.7 Zielsetzung der Arbeit 11

2 Material und Methoden 12
2.1 Geräte und Zubehör 12
2.2 Material 13
2.2.1 Chemikalien 13
2.2.2 Medien und Zusätze für die Kultivierung von Zellen 14
2.2.3 Zelllinien 14
2.2.4 Medium zur Anzucht prokaryotischer Zellen 15
2.2.5 Sonstige verwendete Materialien 15
2.2.6 Häufig verwendete Puffer und Lösungen 15
2.3 Methoden 17
2.3.1 Bradford-Reagenz 17
2.3.2 Passagieren von Zellen 17
2.3.3 Zytotoxizitätsexperimente 18
2.3.4 MTS-Zytotoxizitäts-Assay 18
2.3.5 Proteinbestimmung nach Bradford 18
2.3.6 Ernte der Zellen 19
2.3.7 Herstellung von Zelllysaten durch mechanischen Aufschluss 19
2.3.8 ADP-Nachribosylierung 19
2.3.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 20
2.3.10 Proteinfärbung nach Coomassie 22
2.3.11 Westernblot 22

2.3.12 Biotinylierung von Proteinen....24
2.3.13 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen....25
2.3.14 Präparation der zytosolischen Fraktion durch Ultrazentrifugation....27
2.3.15 Untersuchung der biologischen Aktivität von Toxinen....27
2.3.16 Präzipitation von biotinylierten Toxinen....27
2.3.17 Zytosolgewinnung durch Permeabilisierung der Membran mittels Digitonin.28
2.3.18 Proteinfällung mittels Methanol/Chloroform....28
2.3.19 Statistik....28

3 Ergebnisse....30
3.1 Untersuchung der zellmorphologischen Veränderungen nach Inkubation mit Iota-Toxin....30
3.2 ADP-Ribosylierung von Vero-Zellen....31
3.3 Untersuchung der Bedeutung der ADP-Ribosyltransferase....33
3.4 Aufnahme der C2I-Mutanten C2IE387Q und C2IE387/389Q in die Zelle....35
3.5 Zytotoxizitätsversuch mittels MTS....36
3.6 Apoptosenachweis bei Iota-Toxin vergifteten Vero-Zellen....38
3.7 Biologische Aktivität des Iota-Toxins....43

4 Diskussion....45
4.1 Wirkung des Iota-Toxins auf Zellen....45
4.2 Vergleiche der Wirkung von Iota- und C2-Toxin....46
4.2.1 Aktivität der Enzymkomponente....46
4.3 Pathophysiologie des Iota-Toxins....48

5 Zusammenfassung....50

6 Literaturverzeichnis....52

Danksagung....57

Lebenslauf....58

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
ADP	Adenosindiphosphat
ADP-R	ADP-Ribose
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosintriphosphat
BoNT	Botulinum Neurotoxin von *C. botulinum*
BSA	Bovines Serum-Albumin
C.	*Clostridium*
C2-Toxin	*C. botulinum* C2-Toxin
C2I	Enzymkomponente von *C. botulinum* C2-Toxin
C2II	Bindungs-/Translokationskomponente von *C. botulinum* C2-Toxin
C2IIa	aktivierte Bindungs-/Translokationskomponente
CDT	Mono-ADP-Ribosyltransferase von *C. difficile* (Substratspezifität: alpha und beta/gamma Aktin, „iota-like toxin“)
CST	Mono-ADP-Ribosyltransferase von *C. spiroforme* (Substratspezifität: alpha und beta/gamma Aktin, „iota-like toxin“)
CyPA	Cyclophilin A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
F-Aktin	filamentöses Aktin
G-Aktin	globuläres Aktin
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HSP	Hitzeschockprotein („heat shock protein“)
Ia	Enzymkomponente des Iota-Toxins aus *C. perfringens*
Ib	Bindungs-/Translokationskomponente des Iota-Toxins aus *C. perfringens*
IPTG	Isopropyl-1-thio-alpha-D-Galaktopyranosid
kDa	kilo Dalton
LB-Medium	„lysogeny broth“, Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien
LPS	Lipopolysaccharide
min	Minute
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
p. A.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1
PBS	„phosphate buffered saline“
PBST	PBS-Tween
PMSF	Phenylmethansulfanylfluorid
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TEMED	N, N, N, N-Tetraethylmethylendiamid

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht

1 Einleitung

1.1 Bakterielle Toxine

Viele pathogene Bakterien produzieren eine Vielzahl von unterschiedlichen Toxinen. Es handelt sich dabei um Pathogenitätsfaktoren mit einer eigenständigen biologischen Wirkung, die in Endotoxine und Exotoxine unterteilt werden können.

Bei den Endotoxinen handelt es sich um Bestandteile der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien. Da es sich dabei vor allem um ein Strukturgerüst aus Lipiden und Kohlenhydraten handelt, werden diese auch als Lipopolysaccharide (LPS) bezeichnet. Diese Toxine werden nicht sezerniert, sondern durch Lyse der Bakterien freigesetzt und verursachen im Wirtsorganismus durch Bindung an plasmamembranständige Rezeptoren eine unspezifische Immunantwort. Die Endotoxine sind extrem hitzestabil. Ihr Wirkort ist immer in der direkten Umgebung des lysierten Bakteriums und somit von der Anwesenheit der Bakterien abhängig.

Exotoxine hingegen sind Proteine, die aktiv sowohl von gram-negativen als auch gram-positiven Bakterien produziert und sezerniert werden. Beispiel für Exotoxine sind das Tetanus-Toxin aus *Clostridium tetani*, das Diphtherie-Toxin aus *Corynebacterium diphtheriae* und die verschiedenen Neurotoxine (BoNTs A-G) aus *Clostridium botulinum.*

Exotoxine sind sehr wichtige Krankheitserreger und stellen damit die bekanntesten toxischen Substanzen dar. Sie sind aus verschiedenen funktionellen und strukturellen Untereinheiten aufgebaut. Diese Toxine können im Gegensatz zu den Endotoxinen entfernt von dem Organismus, der sie produziert, wirken und sind meistens mit einer spezifischen Erkrankung assoziiert. Es sind verschiedene Wirkungsweisen bekannt. So kann es durch Bindung an spezifische Rezeptoren zu einer direkten Interaktion, wie zum Beispiel zur Porenbildung in der Zellmembran kommen. Klassischerweise kommt es jedoch zur Aufnahme der Toxine in das Zellinnere. Dort kann es dann zu einer enzymatischen Modifikation von spezifischen Substratmolekülen kommen. Die meistens Exotoxine sind als sogenannte AB-Toxine organisiert.

1.2 AB-Toxine und ihre zellulären Aufnahmemechanismen

Bakterielle Exotoxine vom AB-Typ bestehen aus zwei verschiedenen funktionellen Einheiten, einer Bindungs- und Transportdomäne (B-Domäne) und einer enzymatisch aktiven Domäne (A-Domäne).

Meistens liegen die A- und B-Domäne auf dem gleichen Protein vor. Es handelt sich um einkettige AB-Toxine. Ein bekanntes und gut charakterisiertes Beispiel hierfür ist das Diphterie-Toxin (Collier 1975).

Bei den binären Toxinen hingegen liegen die A- und B-Domänen auf zwei seperaten Proteinen vor, die als Komponente bezeichnet werden. Beispiele dieser Toxine sind das Iota-Toxin von *Clostridium perfringens* und das C2-Toxin aus *Clostridium botulinum* (Ohishi et al. 1980).

Der zelluläre Aufnahmemechanismus der Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine soll hier an Hand eines gut untersuchten binären AB-Toxine, dem C2-Toxin, näher erläutert werden:

Zunächst wird die B-Komponente (C2II) nach der Sezernierung aus dem Bakterium proteolytisch aktiviert (C2IIa). Sieben dieser proteolytisch aktivierten B-Komponenten bilden anschließend ein Heptamer. Die A-Komponente (C2I) kann nun an diesen Komplex binden. Nach der Bindung des C2IIa-C2I-Komplexes an einen spezifischen zellulären Rezeptor, einer Kohlenhydrat-Struktur, kommt es zur rezeptorvermittelten Endozytose und somit zur Aufnahme des Toxins in die eukaryotische Zielzelle. Dort reichert es sich in den frühen Endosomen an. Durch Ansäuerung der Endosomen kommt es zu einer Konformationsänderung der C2IIa-Moleküle. Durch diese Konformationsänderung kann sich das C2IIa-Heptamer in die Endosomenmembran einlagern. Auf diese Weise entsteht eine Pore in der Membran, durch die das C2I-Protein direkt in das Zytosol transloziert werden kann (Barth et al. 2000). Im Zytosol modifiziert die Enzymkomponente C2I spezifisch das G-Aktin (Aktories et al. 1986, Ohishi und Tsuyama 1986) an Position Arginin-177 (Vandeckerckhove et al. 1988).

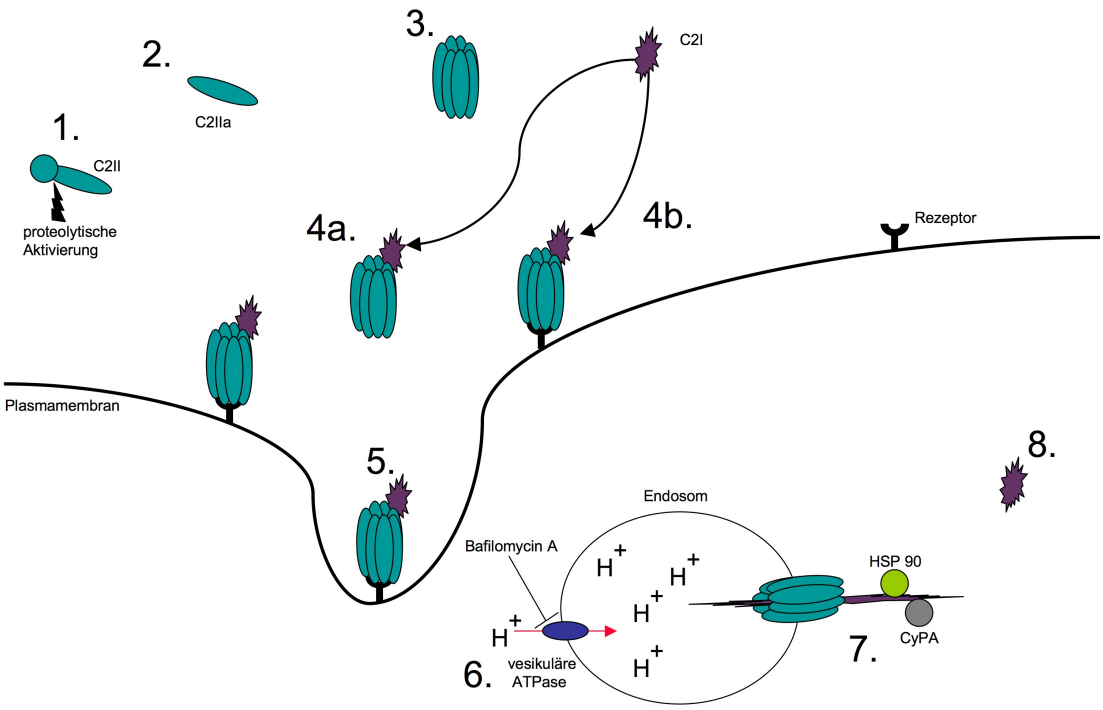

Abbildung 1: Schematische Darstellung de Aufnahme eines binären Toxins in Säugetierzellen

Der Aufnahmemechanismus eines binären Toxins läuft wie folgt ab: Die sezernierte B-Komponente liegt als Vorläuferprotein vor (1.) und muss enzymatisch aktiviert werden (2.). Sieben aktivierte Transportkomponenten bilden ein Heptamer (3.), an dieses Heptamer kann nun entweder in Lösung (4a.) oder nach Bindung an den zellulären Rezeptor (4b.) eine Enzymkomponente binden. Es kommt zur rezeptorvermittelten Endozytose (5.). Die Aufnahme von Protonen in die Endosomen (6.) führt schlussendlich zur Translokation der Enzymkomponente durch Konformationsänderung des Heptamers (7.). Im Zytosol wird C2I unter Beteiligung von HSP 90 und CyPA in die native -enzymatisch aktive- Konformation rückgefaltet (8.). (HSP 90 = Hitzeschockprotein 90, CyPA = Cyclophilin A)

1.3 Binäre Aktin-ADP-ribosylierende Toxine

Zur Gruppe der Aktin-ADP-ribosylierenden-Toxine gehört das C2-Toxin einerseits und die Gruppe der Iota-artigen Toxine andererseits. Nicht nur das in dieser Arbeit verwendeten Iota-Toxin von *C. perfringens* und das C2-Toxin von *C. botulinum*, sondern diese Gruppe umfasst noch weitere Toxine. All diesen Toxinen ist gemein, dass sie als Substrat spezifisch das G-Aktin der Zelle modifizieren.

In Abbildung 2 ist schematisch die ADP-Ribosylierung des G-Aktins dargestellt, exemplarisch wurde C2I und Iota a als ADP-ribosylierende Komponenten

verwendet.

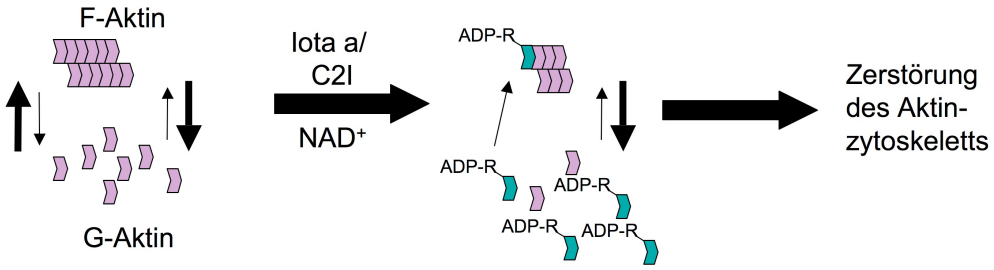

Abbildung 2: schematische Darstellung der ADP-Ribosylierung von Aktin

In der Zelle liegt ein dynamisches Gleichgewicht zwischen G- und F-Aktin vor. Durch den Einfluss von Ia oder auch C2I und dem Kosubstrat NAD^+ wird monomeres G-Aktin ADP-ribosyliert (ADP-R). Kommt es nun zu einem Anhängen eines solch modifizierten G-Aktinmonomers an das Plusende eines Aktinfilaments wirkt es als sogenanntes „capping Protein“. Das bedeutet, dass im Folgenden kein weiteres Aktinmonomer an das Filament angehängt werden kann. Dieser Mechanismus führt letztendlich zu einer vollständigen Depolymerisation der Aktinfilamente.
(F-Aktin = filamentöses Aktin, G-Aktin = monomores Aktin, NAD^+ = Nikotinamidadenin-dinukleotid, ADP-R = Adenosindiphosphat-Ribose)

G-Aktin und F-Aktin liegen normalerweise in einem Gleichgewicht in der Zelle vor. Durch ein Anhängen eines Aktinmonomers am Plusende des Aktinfilaments kommt es zu einer ständigen Polymerisation des Filaments. Gleichzeitig findet durch Abspaltung eines Aktinmonomers am Minusende eine Depolymerisation statt. Es besteht ein Kreislauf von Auf- und Abbau der Aktinfilamente.

Weiterhin ist bekannt, dass clostridiale binäre Toxine an verschiedenen gastroenterologischen Erkrankungen beteiligt sind.

Gelangt nun Iota a (Ia) oder C2I in das Zytosol der Zelle, katalysiert die Enzymkomponente die ADP-Ribosylierung des monomeren Aktins (G-Aktin). Als Kosubstrat dient dem Toxin dabei das in allen Zellen ubiquitär vorkommende Nikotinsäureamidadenindinukleotid (NAD) und es kommt zur Abspaltung einer Adenosindiphosphat-Ribose (ADP-Ribose). Dieser ADP-Ribose-Rest wird kovalent an die Aminosäure Arginin 177 des G-Aktins gebunden. Dieses Arginin liegt in der

Nähe der sogenannten ATP-Bindungsfalte, die für die Hydrolyse des ATP zu ADP essentiell ist. Die Hydrolyse von ATP ist in diesem Zusammenhang für die Polymerisation von G-Aktin zu F-Aktin notwendig. Das entstandene modifizierte G-Aktin verhindert somit die Polymerisation von F-Aktin.

Wird ein modifiziertes G-Aktins an ein filamentöses Aktin angehängt, kann in Folge dessen kein weiteres G-Aktin mehr an das Plusende des F-Aktins angehängt werden. Dieser Prozess wird als „capping“ bezeichnet (Wegener und Aktories 1988, Weigt et al. 1989). Die Depolymerisation am Minusende der Aktinfilamente findet weiterhin statt. Das so entstandene Ungleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation der Aktinfilamente resultiert in einer vollständigen Zerstörung des Aktinzytoskeletts, was sich morphologisch in einer Abrundung der Zellen zeigt (Reuner et al., 1987). Aktin ist jedoch nicht nur am Aufbau und Erhalt der Zellstruktur beteiligt, sondern hat auch andere Funktionen. So spielt Aktin zum Beispiel bei dem Kurzstreckentransport von Vesikeln zur Membran eine Rolle, bei der Verankerung von transmembranären Proteinen oder auch bei der Zellmotilität.

1.4 Clostridium botulinum C2-Toxin

Bei *C. botulinum* handelt es sich um ein gram-positives, obligat anaerobes Stäbchenbakterium. Es sind sieben Stämme (A-G) bekannt, die in der Lage sind Neurotoxine zu produzieren. Das von den Bakterien synthetisierte Neurotoxin (BoNT) zählt zu den potentesten Toxinen überhaupt und ist der Verursacher des Botulismus. Dabei kommt es zur Aufnahme des jeweiligen Toxins in die peripheren cholinergen präsynaptischen Nervenendigungen wo es, je nach Stamm verschieden, durch Bindung an unterschiedliche Proteine des SNARE-Komplexes die Vesikelverschmelzung mit der präsynaptischen Membran verhindert (Montecucco und Schiavo 1994). Dadurch wird eine Acetylcholinausschüttung in den synaptischen Spalt verhindert und es kommt zu den typischen Symptomen der schlaffen Muskellähmung.

Neben den Neurotoxinen produzieren die Stämme C und D von *Clostridium botulinum* das ADP-ribosylierende-C2-Toxin. Die Gene für die Neurotoxine sind auf Phagen kodiert, die des C2-Toxin hingegen auf einem bakteriellen Plasmid. Eine humanpathogene Wirkung des C2-Toxins ist bisher noch nicht sicher geklärt, da alle Serotypen, die das C2-Toxin produzieren, gleichzeitig auch das extrem potente

Neurotoxin bilden. Es ist jedoch bekannt, dass eine isolierte intravenöse Gabe von C2-Toxin in Mäusen schon nach kürzester Zeit zum Tod führt (Simpson 1982). Weiterhin kommt es zu Nekrose und hämorrhagischen Läsionen der Darmwand (Ohishi und Odagiri 1984).

Das C2-Toxin ist der Prototyp der binären ADP-ribosylierenden-Toxine. Es besteht aus zwei Komponenten, der Transportkomponente C2II und der sogenannten Enzymkomponente (A-Komponente) C2I. Diese beiden Komponenten bestehen aus zwei nicht miteinander verbundenen Proteinen, die synergistisch agieren müssen, um eine suffiziente Vergiftung zu erreichen (Ohishi et al. 1980).

C2I ist ein 49,4 kDa großes Protein, das aus 431 Aminosäuren besteht und sich in zwei Domänen unterteilt. Die N-terminale Domäne (C2IN; Aminosäure 1-225) oder auch Adaptor-Domäne, ist der enzymatisch inaktive Anteil des Proteins und beinhaltet die Bindungs- oder Interaktionsstelle des C2I für das C2IIa. Die C-terminale Domäne beinhaltet die Enzymaktivität (Aminosäuren 226-431) - die ADP-Ribosyltransferaseaktivität und zusätzlich eine NAD-Glykohydrolaseaktivität.

Es ist bekannt, dass alle ADP-Ribosyltransferasen, die spezifisch Arginin ribosylieren, ein sogenanntes „ExE“-Motiv besitzen. Dieses Motiv enthält ein katalytisches Glutamat (Jung et al. 1993), das essentiell für die Ribosylierung ist. Barth et al. konnten zeigen, dass sich dieses Motiv bei C2I zwischen den Aminosäuren 387-389 erstreckt. Dabei befindet sich das katalytische Glutamat für die ADP-Ribosyltransferase an der Aminosäure 387 und die NAD-Glykohydrolaseaktivität an der Aminosäure 389 (Barth et al. 1998). Tauscht man nun je eine dieser beiden Aminosäuren gegen ein Glutamin aus, resultiert es in einem Verlust der jeweiligen Enzymaktivität. Durch Austausch der Aminosäure 387 kommt es zum Verlust der ADP-Ribosyltransferaseaktivität, während die Aktivität der NAD^+-Glykohydrolase erhalten bleibt. Tauscht man sowohl das Glutamat 387 als auch das Glutamat 389 gegen Glutamin aus so entsteht eine Doppelmutante, die weder ADP-Ribosyltransferase- noch NAD^+-Glykosyltransferaseaktivität besitzt. Weitere wichtige konservierte Aminosäuren von C2I sind das Serin-Threonin-Serin-Motiv (Aminosäuren 347-349), welches ein wichtiger Bestandteil für die Bindung von NAD an C2I ist, sowie ein Arginin an Position 299, das ebenfalls zur Bindung von NAD^+ und somit zur Offenhaltung des aktiven Zentrums von C2I beiträgt.

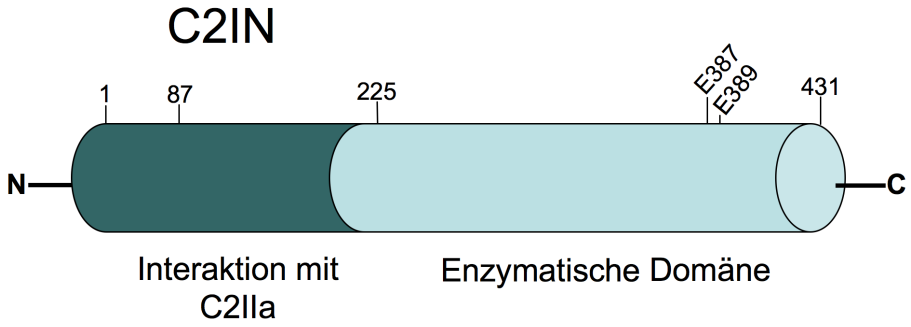

Abbildung 3: Schematische Darstellung des C2I-Proteins

Die Enzymkomponente teilt sich in die N-terminale Adapterdomäne (C2IN, Aminosäure 1-225) und eine C-terminale katalytische Einheit. Die Adapterdomäne vermittelt über Interaktion mit der Bindungs-/Translokationsdomäne des C2IIa die zelluläre Aufnahme. Dabei sind die Aminosäuren 1-87 von essenzieller Bedeutung. Für die ADP-Ribosyltransferaseaktivität ist das Glutamat-387 und das Glutamat-389 (E387/E389) essenziell. (C2IN = N-terminale Adapterdomäne des C2I-Toxins)

Die Transportkomponente C2II ist ein aus 721 Aminosäuren aufgebautes Protein mit einem Molekulargewicht von 80,4 kDa. Sie wird als Vorläuferprotein sezerniert und muss, bevor sie als Transportkomponente fungieren und C2I binden kann, proteolytisch aktiviert werden. Dabei wird ein ca. 20 kDa großes Stück vom N-terminalen Ende abgespalten.

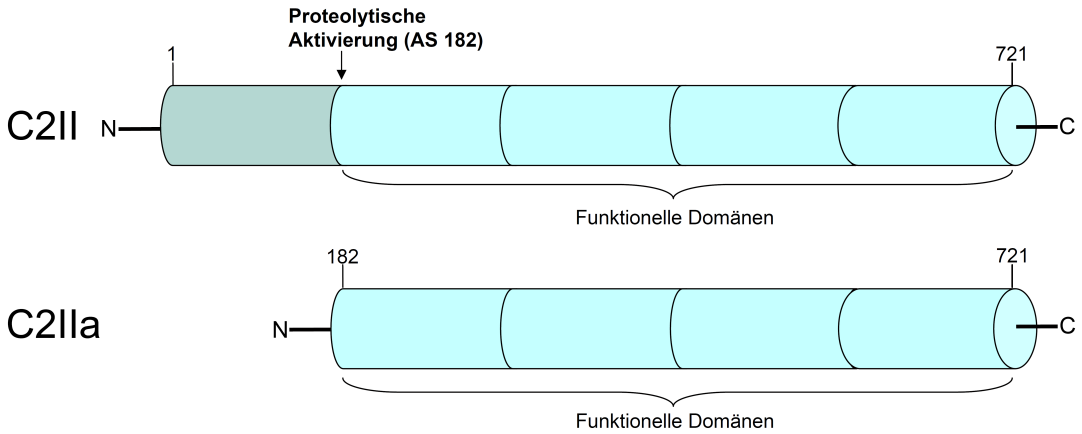

Abbildung 4: Schematische Darstellung des C2II /C2IIa

Durch proteolytische Abspaltung an der Aminosäure 182 kommt es zu einer Aktivierung des C2II-Proteins zu C2IIa. Das so entstandene C2IIa ist am Prozess der Porenbildung in der Zellmembran beteiligt. (AS = Aminosäure)

Das so entstandene aktivierte Protein C2IIa bildet in Lösung Heptamere, die als Andockstelle für C2I dienen und an einen zellulären spezifischen Rezeptor binden (Blöcker et al. 2000). Dieser Rezeptor wurde von Eckhardt et al. (2000) als eine ubiquitär vorkommende Kohlenhydratstruktur beschrieben. C2I kann sowohl in Lösung an C2IIa binden, aber auch mit dem bereits an den Rezeptor gebundenen C2IIa interagieren (Kaiser et al. 2006). Die Aufnahme in die Zelle erfolgt über rezeptorvermittelte Endozytose in die Endosomen. Anschließend wird das Heptamer durch Ansäuerung des Endosoms in die Endosomenmembran inseriert. Es kommt zur Translokation der C2I-Enzymkomponente durch C2II-Porenbildung in der Endosomenmembran aus dem Endosom in das Zytosol (Blöcker et al. 2003). Einmal in das Zytosol gelangt, ADP-ribosyliert die C2I-Komponente irreversibel das β/γ-Aktin der Zelle am Arginin-177. Es ist dabei nur in der Lage β/γ-Aktin als Substrat zu verwenden und keine weiteren Isoformen des Aktins. Es kommt zur Zerstörung des Aktinzytoskeletts, aus dem eine Abrundung der Zellen resultiert. Weiterhin ist bekannt, dass die Zellen nach 12 Stunden apoptotisch werden (Heine et al. 2008).

1.5 *Clostridium perfringens* Iota-Toxin

Clostridium perfringens ist ein anaerobes gram-positives Stäbchenbakterium. Es sind 5 Stämme bekannt, die vier verschiedene pathogene Exotoxine (α, β, ε und ι) produzieren können.

Das Iota-Toxin wird ausschließlich von *C. perfringens* Typ E Stämmen produziert und ist ein weiterer Vertreter der binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine. Es ist Verursacher von Diarrhoe in Kälbern und Lämmern (Songer 1996) sowie tödlich für Mäuse. Weiterhin verursacht es Dermonekrosen bei Meerschweinchen.

Iota Toxin besteht aus der Transportkomponente Iota b (Ib) und der Enzymkomponente Iota a (Ia).

Sowohl Ia als auch Ib sind als Einzelkomponenten nicht zytotoxisch, können also nur in Kombination wirken.

Iota a ist ein 45 kDa großes Protein bestehend aus 454 Aminosäuren. Das N-terminale Ende ist für die Interaktion mit Ib verantwortlich. Am C-terminalen Ende befindet sich, zwischen den Aminosäuren 378-380 das ExE-Motiv, das katalytisches Glutamat enthält. Es ist zuständig für die ADP-Ribosylierung des monomeren Aktins

am Arginin 177. Ia ist in der Lage, alle Isoformen von Aktin, α- und β/γ-Aktin zu ADP-ribosylieren (Ohishi et al. 2000), es besitzt demnach also im Gegensatz zu C2I keine besondere Substratspezifität. Das besondere an Ia ist, dass es die einzige Enzymkomponente aller binären Toxine ist, die durch Trypsin-ähnliche Proteasen proteolytisch aktiviert werden kann bzw. muss (Gibert et al. 2000). Diese Trypsin-ähnliche Protease wird dabei durch das Zwei-Komponenten-System VirR/VirS reguliert, das auch noch für die Regulation von vielen weiteren Genen, die für verschiedene Toxine zuständig sind, verantwortlich ist. Durch diese proteolytische Aktivierung kommt es zu einem Verlust von 9 bis 13 Aminosäuren am N-Terminus. Es ist jedoch noch nicht klar, welchen genauen Effekt diese Abspaltung zur Folge hat.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil bildet das Serin-Threonin-Serin-Motiv (AS 338-340). Dieses Motiv ist wichtig für die Bindung von NAD und somit für die ADP-Ribosylierung der monomeren Aktinmoleküle. Iota-Toxin ist verwandt mit anderen binären Toxinen, wie zum Beispiel dem CST aus *C. spiroforme* und dem CDT aus *C. difficile*, die auch als „iota-like-toxins“ zusammengefasst werden können.

Iota b, die Transportkomponente, besteht aus 836 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 98 kDa. Sie wird als Vorläuferprotein sezerniert und durch eine Serin-ähnliche Protease proteolytisch aktiviert. Dabei kommt es am N-terminalen Ende, bei AS 173, zu einer Abspaltung eines 20 kDa großen Proteins. Das so aktivierte Ib bildet nun Heptamere, die sowohl in Lösung als auch membranständig Ia binden können. Das gebildete Heptamer ist einerseits wichtig für die Aufnahme der Enzymkomponente in die Zelle, andererseits für die Translokation aus dem Endosom in das Zytosol.

Die Proteine der „iota-like-toxins“ besitzen eine Vielzahl homologer Aminosäuresequenzen. Es konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die Transportkomponenten dieser drei Toxine untereinander auszutauschen. Trotz dieses Austausches kommt es zu einer Vergiftung der Zelle. Somit ist bewiesen, dass es den verschiedenen Transportkomponenten möglich ist, unterschiedliche Enzymkomponenten zu transportieren (Gülke et al. 2001, Popoff und Boquet 1988).

1.6 Apoptose

Unter Apoptose (aus dem griechischen απόπτωσις, das Herabfallen) versteht man den programmierten Zelltod. Es handelt sich dabei um einen aktiven und unter genetischer Kontrolle stehenden Prozess. Die Aktivierung dieses zellulären „Selbstmordprogramms“ kann einerseits von außen - extrinsisch - erfolgen, andererseits intrinsisch, also durch intrazellulär ausgelöste Vorgänge.

Bei dem extrinsischen Weg kommt es durch Bindung von Zytokinen an zellständige Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie zur Konformationsänderung des Rezeptors (Ashkenazi 2002). Es folgt die Autoproteolyse von Procaspase-8 zu Caspase-8 und somit die Aktivierung der Caspase-Kaskade.

Caspasen (aus dem englischen **c**ysteinyl-**a**spartate **s**peci**f**ic **p**rote**ase**) gehören zu den Proteasen, die im katalytischen Zentrum ein Cystein beinhalten. Diese Proteasen sind in der Lage, Peptidbindungen C-terminal eines Aspartats zu spalten. Man teilt Caspasen in Effektor- und Initiator-Caspasen ein.

Initiator-Caspasen (Caspase-8 und -9), durch Autoproteolyse aktiviert (Denault und Salvesen 2002), können wiederum die Vorläufer-Proteine - Procaspasen - der Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7) aktivieren. Diese aktivierten Effektor-caspasen können zum Beispiel aktiv in den Abbau von Zellmembranbestandteilen oder passiv durch Aktivierung von sekundären Zielproteinen (z.B. DNasen) in den Stoffwechsel der Zelle eingreifen. Des Weiteren können sie bestimmte Mechanismen der DNA-Reparatur unterdrücken, so zum Beispiel auch die PARP-1 (Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1).

Der intrinsische Weg kann zum Beispiel durch Schädigung der DNA oder durch oxidativen Stress ausgelöst werden. Dabei kommt es zur Freisetzung von poroapoptotischen Proteinen (Cytochrom C) aus den Mitochondrien in das Zytoplasma (Bernadi et al. 1999) und anschließend zur Aktivierung der Caspase-Kaskade.

Apoptose ist ein wichtiger Bestandteil vieler Prozesse im Körper. Sie ist zum Beispiel beteiligt an der Entwicklung und Differenzierung von Organen oder an der Regulation und Funktion des Immunsystems.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Iota-Toxin von *Clostridium perfringens* und das C2-Toxin von *Clostridium botulinum* zählen zur Familie der binären-Aktin-ADP-ribosylierenden Toxinen. In vorhergegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnte der Langzeiteffekt des C2-Toxins auf kultivierte Säugetierzellen beschrieben werden. Es wurde gezeigt, dass eine Inkubation mit C2-Toxin nach 12-24 h zu Apoptose führt (Heine et al. 2008). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, die Langzeiteffekte des Iota-Toxins auf kultivierte Säugetierzellen zu charakterisieren, insbesondere ob und in welcher Art Zelltod stattfindet. Die zentrale Frage dabei war, ob Zellen, die mit diesem Toxin behandelt wurden, typische Merkmale von Apoptose aufzeigen und in welchen Zeiträumen der Zelltod einsetzt. Es sollte zusätzlich die Frage der Langlebigkeit des Iota-Toxins geklärt werden. Weiterhin sollte mit Hilfe des C2-Toxins die Rolle der ADP-Ribosyltransferase in Hinblick auf die Apoptose untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Zubehör

Tabelle 1: Geräte und Zubehör (Bezeichnung & Hersteller)
(SDS = Natriumdodecylsulfat, PAGE = Polyacrylamidgelelektrophorese)

Axoivert 40 CFL Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Blotvorrichtung	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham, Braunschweig
Magnetrührer RET basic C	IKA, Staufen
Brutschränke	Binder, Tuttlingen
pH-Meter inoLap	WTW, Weilheim
Pipetten	Gilson, Middleton USA
SDS-PAGE Gellaufkammer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Spectro-Photometer DU 640	Beckman, München
Sonifizierer Sonifier B-12	Branson, Dietenbach
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortexer Reax	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wippe Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Zentrifugen: Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
MicroCentrifuge 220V	Roth, Karlsruhe
Minifuge GL 4400	Heraeus, Hanau
Optima TLX Ultrazentrifuge	Beckman, München
Zentrifuge CH-J2-HS	Beckman, München

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Tabelle 2: Chemikalien (Bezeichnung & Hersteller)

(IPTG = Isopropyl-1-thio-alpha-D-Galaktopyranosid, EDTA = Ethylendiaminteraacetat, p. A. = pro analysi, NAD = Nikotinamidadenindinukleotid, PMSF = Phenylsmethansulfanylfluorid, SDS = Natriumdodecylsulfat, TEMED = N, N, N, N-Tetraethylmethylendiamid, Tris = Trishydroxy-methylaminomethan)

Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Serva, Heidelberg
Ampicillin (Na-Salz)	Serva, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblaunatriumsalz	Sigma-Aldrich, Hamburg
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Hamburg
Complete®	Roche, Mannheim
Coomassie G250	Serva, Heidelberg
Coomassie R250	Serva, Heidelberg
Coumarsäure	Sigma-Aldrich, Hamburg
Digitonin	Sigma-Aldrich, Hamburg
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Ethanol p. A.	Riedel-deHaen, Seelze
Entwickler RTU 60	Adefo, Dietzenbach
Essigsäure 100 %	Merck, Darmstadt
Fixierer RTU 60	Adefo, Dietzenbach
Glycerin	Roth, Karlsruhe
H_2O_2 30 %	J.T. Baker, Griesheim
Hefeextrakt	Serva, Heidelberg
IPTG	AppliChem, Darmstadt
KCl	Roth, Karlsruhe
KH_2PO_4	Roth, Karlsruhe
Luminol	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Fluka, Buchs Schweiz

$MgCl_2$	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
NaCl	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck.Schuchart, Hohenbrunn
Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
6-Biotin-17-NAD	R&D Systems, Wiesbaden
Ortho-Phosphorsäure	Merck, Darmstadt
PMSF	Fluka, Buchs Schweiz
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt
TEMED	Roth, Karlsruhe
Thrombin 500 U	Amersham, Braunschweig
Tris	USB Corporation, Cleveland USA
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, Hamburg
Trypsininhibitor	Roche, Mannheim
Trypsin	Roche, Mannheim
Tween 20	AppliChem, Darmstadt

2.2.2 Medien und Zusätze für die Kultivierung von Zellen

Tabelle 3: Medien und Zusätze für die Kultivierung von Zellen (Bezeichnung & Hersteller)

$MgCl_2$	Roth, Karlsruhe
Minimum Essential Medium (MEM)	Gibco, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Invitrogen, Karlsruhe
Na-Pyruvat	Gibco, Karlsruhe
Nicht-essentielle Aminosäure	Gibco, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe

2.2.3 Zelllinien

Tabelle 4: Zelllinien (Bezeichnung und ATCC-Nummer)

(ATCC = American type culture collection)

HeLa	CCL-2
Vero	CCL-81

2.2.4 Medium zur Anzucht prokaryotischer Zellen

Tabelle 5: Medium zur Anzucht von prokaryotischen Zellen

(LB = „lysogeny broth“, bidest. = doppelt destilliert)

LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10g NaCl ad 1 l H_2O bidest.

2.2.5 Sonstige verwendete Materialien

Tabelle 6: Sonstige Materialien (Bezeichnung & Hersteller)

Benzamidin Sepharose 6B	Amersham Bioscience, Uppsala Schweden
Blotting-Papier	Macherey&Nagel, Düren
Glutathion Sepharose 4B	Amersham Bioscience, Uppsala Schweden
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat	Millipore, Billerica USA
Nitrocellulose Transfer Membarn	Whatman, Dassel
Page Ruler prestained Protein ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Page Ruler stained Protein ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Röntgenfilme Cronex 5	AGFA, Köln
Streptavidin-Peroxidase	Roche, Mannheim

2.2.6 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

Tabelle 7: Häufig verwendete Puffer und Lösungen (Bezeichnung & Zusammensetzung)

(Tris = Trishydroxymethylaminomethan, bidest. = doppelt destilliert, PBS =phosphate-buffered saline, PBST = phosphate-buffered saline Tween, ADP = Adenosindiphosphat, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, DTT = Dithiothreitol)

1 M Tris-HCl	121 g Tris

	ad 1 l H_2O bidest. mit HCl auf den benötigten pH-Wert eingestellt
PBST	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na_2HPO_4 0,1 % Tween ad 1 l H_2O bidest. mit HCl auf pH 7, 4 eingestellt
PBS	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,44 g Na_2HPO_4 0,24 % KH_2PO_4 ad 1 l H_2O bidest.mit HCl auf pH 7, 4 eingestellt
ADP-Ribosylierungspuffer	20 mM Tris-HCl (pH 7,5) 1 mM EDTA 1 mM DTT 5 mM $MgCl_2$ 1 x Complete®

2.3 Methoden

2.3.1 Bradford-Reagenz

Tabelle 8: Zusammensetzung des Bradford-Reagenz (Bezeichnung & Zusammensetzung)

(bidest. = doppelt destilliert)

Bradford-Reagenz	10 mg Coomassie Brilliant Blau G250 5 ml EtOH 10 ml H_3PO_4 (85 %ig) ad 100 ml H_2O bidest.

Zur Herstellung des Bradford-Reagenz wurde Coomassie Brilliant Blau in EtOH gelöst, H_3PO_4 hinzu gegeben und mit H_2O bidest. aufgefüllt. Nach dem Mischen der Lösung wurde diese über einen feinporigen Filter abfiltriert, so dass eine braun-blaue Lösung entsteht.

2.3.2 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden routinemäßig zwei- bis dreimal wöchentlich passagiert. Dazu wurden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert, das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit warmen PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Schalen für 2 min bei 37 °C erneut inkubiert. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden weitere 9 ml MEM-Medium hinzugegeben. Die durch das Trypsin abgelösten Zellen wurden samt Medium in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 1000 Upm, der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet wurde mit frischem Medium resuspendiert und die Zellen in der gewünschten Dichte in neuen Zellkulturschalen ausgesät.

2.3.3 Zytotoxizitätsexperimente

Hierzu erfolgte die Kultivierung der Zellen in Zellkulturschalen mit dem entsprechenden Medium bis zu ihrer gewünschten Dichte des Zellrasens. Nach der Zugabe der jeweiligen Toxine wurde die Morphologie der Zellen mittels des Axiovert 40 CFL Mikroskops zum gewünschten Zeitpunkt begutachtet und konnte mit Hilfe einer C 10 CCD Kamera dokumentiert werden.

2.3.4 MTS-Zytotoxizitäts-Assay

Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät und mit den gewünschten Konzentrationen der verschiedenen Toxine behandelt. Nach den Inkubationszeiträumen wurde ein Farbstoff hinzugegeben und für weiter 60 min inkubiert. Vitale Mitochondrien sind in der Lage, diesen Farbstoff zu Formazan zu reduzieren, was in einem Farbumschlag deutlich wird, der photometrisch gemessen wurde.

2.3.5 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde die Bestimmung nach Bradford (Bradford 1976) gewählt.

Je nach Proteinmenge in den Proben kommt es zu einem Farbumschlag durch die Wechselwirkungen des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G250 mit basischen Aminosäuren innerhalb der Proteine. Es kommt zu einer Verlagerung des Absorptionsmaximums von 465 nm ohne Protein auf 595 nm mit Protein. Dies kann photometrisch mit dem ELISA-Reader bestimmt werden und die jeweilige Proteinkonzentration mit Hilfe einer BSA-Eichgerade (0-250 µg/ml) ermittelt werden. Hierzu wurden 10 µl Probenvolumen (Zelllysat) mit 110 µl Bradford-Reagenz pro Well inkubiert. Es wurden stets eine Doppelbestimmung durchgeführt. Als Referenz hierzu diente Aqua bidest..

2.3.6 Ernte der Zellen

Um die Proben zu gewinnen wurden 10 cm Schalen einmal mit warmem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen 2 min bei 37 °C im Brutschrank mit 1 ml 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung inkubiert und dann in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt, 10 µl wurden entnommen und die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Proben wurden 10 min mit 800 Upm bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit ADP-Ribosylierungspuffer resuspendiert und so auf die gewünschte errechnete Zellzahl eingestellt und in ein Eppendorfgefäß überführt.

2.3.7 Herstellung von Zelllysaten durch mechanischen Aufschluss

Die Aufarbeitung der Proben erfolgte bei 4 °C, um die Aktivität von Proteasen zu unterbinden. Die Proben wurden 10 Mal mit einer 0,45 x 25 mm BL/LB Kanüle geschert und dann bei 4 °C und 14000 Upm abzentrifugiert. Das so entstandene Pellet, bestehend aus zerstörten Zellbestandteilen, wurde verworfen und der gewonnene Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt und für die weiteren Schritte verwendet.

2.3.8 ADP-Nachribosylierung

Zur Überprüfung der ADP-Ribosylierungs-Aktivität und somit als Nachweis einer Vergiftung, wurde Lysat von vergifteten Vero- sowie Kontroll-Zellen nach o. g. Methode (2.3.7) hergestellt. 30 µl jeder Probe wurden mit 10 µM biotinyliertem NAD sowie mit 300 ng Iota a Toxin versetzt und dann 30 min bei 37 °C inkubiert. In dieser Zeit wurde das noch nicht ADP-ribosylierte Aktin durch das neu hinzu gegebene Iota a unter Zuhilfenahme und Spaltung des biotinyliertem NAD^+ ADP-ribosyliert. Wurden schon alle G-Aktin-Moleküle in der intakten Zelle ADP-ribosyliert, so wurde kein weiteres Biotin-NAD gespalten und somit keine ADP-Ribosylierung mit Biotin-markierter ADP-Ribose vollzogen.

Zum Abstoppen der Reaktion wurden 9 µl 5-fach-SDS-Puffer hinzu gegeben und 10 min bei 95 °C gekocht.

2.3.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Unterschiedliche Proteine besitzen verschiedene Molekulargewichte. Zur Auftrennung dieser nach ihrer Ladung im elektrischen Feld wurde die SDS-PAGE Methode nach Laemmli (Laemmli 1970) verwendet.

Die verschiedenen Proben mit den Proteinansätzen wurden zuvor mit 5 fach SDS-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C gekocht. Dadurch wurden die bestehenden komplexen sekundären und tertiären Proteinstrukturen zerstört. Des Weiteren wurden durch die Zugabe von DTT die bestehenden Disulfidbrücken innerhalb der Proteine gespalten.

Das anionische Tensid SDS bewirkt eine konstante Negativladung aller Proteine und verhindert somit eine Protein-Protein-Wechselwirkung.

Die Trennung der Proteine erfolgte mit Hilfe eines Polyacrylamidgeles, bestehend aus einem Trenn- und Sammelgel. Durch die verschiedenartigen Prozentgehalte von Acrylamid der Trenngele und somit eine Variation der Porengröße kann man die Auflösung und Streuung der verschieden großen Proteine beeinflussen.

In dieser Arbeit wurde vor allem Gele mit einem Acrylamidgehalt von 6 % für die Sammelgele sowie Trenngele von 8 %, 12,5 % und 18 % verwendet.

Nach der Denaturierung wurden die Proteine in die Taschen des Sammelgels geladen und dann mit einer elektrischen Spannung versehen. Durch die negative Ladung aller Proteine wandern diese nun zur Anode und trennen sich entsprechend ihrer Größe in der SDS-PAGE auf. Zur Abschätzung und Kontrolle der Größe der aufgetragenen Proteine wurde immer ein Marker („prestained protein ladder“) mit auf das Gel aufgetragen.

Tabelle 9: Zusammensetzung der benutzten Puffer und Trenn- und Sammelgele (Bezeichnung & Zusammensetzung)

(SDS = Natriumdodecylsulfat, Tris = Trishydroxymethylaminomethan, bidest. = doppelt destilliert, DTT = Dithiothreitol, APS = Amoniumpersulfat, TEMED = N, N, N, N-Tetraethylmethylendiamin)

5-fach SDS-Probenpuffer (Lämmli-Puffer)	0,625 M Tris-HCL (pH 6,8) 20 % SDS

	8,5 % Glycerin 0,2 % Bromphenolblau 100 mM DTT
SDS-Laufpuffer	45 mM Glycin 120 mM Tris 0,1 % SDS ad 2 l H_2O bidest.
12,5 %iges Trenngel	10,45 mlH_20 bidest. 8,25 ml 1,5 M Tris-HCL (pH 8,8) 13,75 ml Acrylamid (30 %) 363 µl SDS (10 %) 330 µl APS (10 %) 22 µl TEMED
18 %iges Trenngel	4,4 ml H_20 bidest 8,25 ml 1,5 M Tris-HCL (pH 8,8) 19,8 ml Acrylamid (30 %) 363 µl SDS (10 %) 330 µl APS (10 %) 22 µl TEMED
6 %iges Sammelgel:	6,6 ml H_20 bidest 3,1 ml 1,5 M Tris-HCL (pH 8,8) 2,5 ml Acrylamid (30 %) 125 µl SDS (10 %) 125 µl APS (10 %) 12,5 µl TEMED

2.3.10 Proteinfärbung nach Coomassie

Mit dieser Methode ist es möglich, Proteine durch Anlagerung des Coomassie-Farbstoffes an basische und aromatische Aminosäuren unspezifisch anzufärben und somit auf der SDS-Page sichtbar zu machen. Dafür wird die SDS-Page 20 min in Coomassie-Brilliant-Blau G250 Färbelösung bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Die Entfärbung erfolgte durch anschließende Zugabe und Inkubation mit der Entfärbelösung bei 55 °C im Wasserbad für 2 mal 20 min.

Tabelle 10: Zusammensetzung verwendeter Färbe- und Entfärbelösung (Bezeichnung & Zusammensetzung)

(bidest. = doppelt destilliert)

Coomassie-Brilliant-Blau G250 Färbelösung	2,5 g Coomassie G250 450 ml Methanol 450 ml H_20 bidest. 100 ml Eisessig
Entfärbelösung	450 ml Methanol 450 ml H_20 bidest. 100 ml Eisessig

2.3.11 Westernblot

Zum spezifischen Nachweis der sich in den SDS-Gelen befindlichen Proteine müssen diese elektrophoretisch auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen werden. Dazu wurde das Semi-Dry-Verfahren verwendet. Je nach Versuchsaufbau und Acrylamidgehalt der SDS-Gele erfolgte der Proteintransfer bei 12 V sowie 1 mA/cm^2 für 1 h bzw. 2 h.

Zum Nachweis des Transfers wurde die Nitrocellulose-Membran 5 min bei Raumtemperatur mit Ponceau S angefärbt. Der rote Ponceau S-Farbstoff bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine und macht diese somit auf der Membran sichtbar. Das anschließende Entfärben erfolgte mit Wasser.

Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran mit 5 %-Milchpulver in PBS-T für 1 h bei Raumtemperatur geblockt.

Zum Nachweis der Proteine wurden unterschiedliche Arten und Zeiten für die Inkubation mit den entsprechenden spezifischen Erst- und Zweitantikörpern verwendet.

Für den Nachweis von biotinmarkierten Proteinen wurde die Membran nach erfolgter Blockierung 1 h bei Raumtemperatur mit Streptavidin-Peroxidase in PBST mit einer Verdünnung von 1:2500 inkubiert. Streptavidin-Peroxidase bindet hochaffin an biotinylierte Proteine, so dass biotinmarkierte Proteine (C2I biot, Ia biot) anschließend mithilfe von Chemolumineszenz nachgewiesen werden können.

Tabelle 11: verwendete Antikörper

(α = anti, PARP-1 = Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1, PBST = phosphate-buffered saline Tween, ÜN = über Nacht, RT = Raumtemperatur, HSP 90 = Hitzeschockprotein 90)

Antikörper	Verdünnung	Verdünnung in	Inkubations-zeit	Inkubations-temperatur	Sekundär-antiköper	Verdünnung in PBS-T
α-PARP	1:400	5 % Milchpulver in PBST	ÜN	4 °C	Goat-anti-mouse	1:2000
α-cleaved-Caspase	1:500	5 % Milchpulver in PBST	ÜN	4 °C	Goat-anti-rabbit	1:1500
α-Aktin	1:20000	PBST	1 h	RT	Goat-anti-mouse	1:2000
Streptavidin-Peroxidase	1:2500	PBST	1 h	RT	-	-
α-Cyclophilin A	1:10000	PBST	1 h	RT	Goat-anti-rabbit	1:2500
α-HSP-90	1:200	PBST	1 h	RT	Goat-anti-mouse	1:2000

Die verwendeten Sekundärantikörper, die an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt sind, wurden für 1 h bei RT inkubiert. Der Proteinnachweis erfolgte mittels Chemolumineszenz. Dabei katalysiert die Peroxidase die Oxidation von dem in Lösung A enthaltenem Luminol zu 3-Aminophthalsäure unter Beteiligung des in Lösung B enthaltenen H_2O_2. Dadurch wird Licht emittiert, das durch Auflegen eines Röntgenfilmes detektiert werden kann und somit einen Nachweis für das

Vorhandensein der Proteine darstellt.

Tabelle 12: Verwendete Puffer und Lösungen (Bezeichnung & Zusammensetzung)

(Tris = Trishydroxymethylaminomethan, bidest. = doppelt destilliert, PBST = phosphate-buffered saline Tween, SDS = Natriumdodecylsulfat, BSA = Bovines Serum Albumin)

Towbin-Puffer / Blotpuffer für Western-Blot:	192 mM Glycin 20 % Methanol 0,1 % SDS 25 mM Tris
Ponceau S Lösung	0,2 % Ponceau S 5,0 % Essigsäure
Milchpulverlösung	5 % Milchpulver ad 50 ml PBST
BSA-Lösung	2,5 % BSA ad 50 ml PBST
Detektions-Lösungen A	4,4 ml H_2O bidest. 500 µl 1M Tris-HCl (pH 9,0) 50 µl 250 mM Luminol 22 µl 90 mM Coumarsäure
Detektions-Lösungen B	4,5 ml H_2O bidest. 500 µl 1M Tris-HCl (pH 9,0) 50 µl 30 % H_2O_2

2.3.12 Biotinylierung von Proteinen

Der Nachweis von Proteinen kann einerseits durch spezifische Antikörper geschehen, andererseits ist es möglich, Proteine mit dem Vitamin Biotin zu markieren.

Biotin ist ein 244 Dalton großes Vitamin, das die Eigenschaft hat hochaffin an Streptavidin und Avidin zu binden. Somit ist es, wie bereits beschrieben, eine weitere Möglichkeit, die nun biotinmarkierten Proteine mit Streptavidin-Peroxidase und die

dadurch mögliche Chemolumineszenz-Reaktion direkt nachzuweisen. Das spielt besonders bei dem Versuch eine Rolle, die Aufnahme und den Abbau bestimmter Proteine im Zytosol zu charakterisieren.

Die Proteine wurden mit Hilfe des EZ-Link Micro Sulfo-NHS-Biotinylation-Kit biotinyliert.

Die enzymatisch aktive Toxinkomponente Iota a wurde mit einem errechnetem zehnfachen Überschuss einer 20 mM Biotinlösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Berechnung erfolgte nach folgender vom Hersteller empfohlenen Formel:

$$\frac{Volumen\,Toxin\,[ml]\cdot Konz.\,Toxin\,[\mu g/ml]\cdot Menge\,an\,Biotin\ddot{u}berschuss\,(20)}{Molekulargewicht\,Toxin\,[Da]} = Biotin\,\mu l$$

Anschließend wurde das nicht gebundene Biotin nun über die in dem EZ-Link Micro Sulfo-NHS-Biotinylation-Kit enthaltene Säulen entfernt. Die Säulen wurden zuvor 3 mal mit PBS 2 min mit 1000 Upm bei Raumtemperatur gewaschen. Nach Zugabe des Biotin-Toxin Gemisches wurde die Säule erneut 2 min mit 1000 Upm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Somit blieb der Biotinüberschuss an den Säulen haften, das entstandene Eluat wurde weiter verwendet. Mittels der SDS-PAGE und Coomassie-Färbung wurde die neue Toxinkonzentration bestimmt, die Biotinmarkierung wurde mittels Westernblot und Streptavidin-Peroxidase-Inkubation überprüft.

2.3.13 Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Das folgende Protokoll wurde für die Aufreinigung aller rekombinanten Proteine verwendet, die bei Beginn dieser Arbeit bereits kloniert in einem pGEX-Expressionsvektor vorlagen.

Der Glutathion-S-Transferase-Tag ist ein 26 kDa großes Protein aus *Schistosoma japonicum*. Dieser GST-Tag wird N-terminal an das zu exprimierende Protein fusioniert. Der GST-Tag hat die Eigenschaft, sehr spezifisch und mit einer hohen

Affinität an Glutathion zu binden. Es besteht somit die Möglichkeit, das Protein über diesen GST-Tag an Glutathion-gekoppelte Sepharose-Beads zu binden. Durch Spaltung mit Thrombin kann der GST-Anteil wieder entfernt werden.

Die Anzucht der die rekombinanten Proteine produzierenden *E. coli*-Stämme erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde eine Vorkultur angesetzt. Dazu wurden 200 ml 1-fach LB-Medium mit dem entsprechenden Glycerinstock angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Für die Hauptkultur wurde 1 l 1-fach LB-Medium, versetzt mit 100 µg/ml Ampicilin mit 40 ml dieser Vorkultur angeimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler solange inkubiert, bis eine optische Dichte von 0,6 bis 0,8 erreicht wurde. Durch Zugabe von 200 µM IPTG wurde die Proteinexpression induziert. Die weitere Inkubation erfolgte bei 29 °C über Nacht auf dem Schüttler. Alle weiteren Schritte der Proteinaufreinigung erfolgten nun auf Eis. Die Bakterien wurden 10 min bei 5000 Upm abzentrifugiert und das so entstandene Pellet mit 10 ml Lysepuffer und 1 % Triton X-100 resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch 6 x 15 sec sonifizieren. Das Abtrennen der Zelltrümmer erfolgte durch erneute Zentrifugation für 10 min bei 10000 Upm. Der so entstandene Überstand wurde auf 400 µl Glutathion-Sepharose-Beads gegeben und für 1 h bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Beads wurden zuvor 2 mal mit 2-5 ml PBS 3 min mit 1000 Upm bei Raumtemperatur gewaschen. Um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen, wurden die Beads für 3 min mit 1000 Upm bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Es erfolgten nun zwei weitere Waschschritte mit jeweils 5 ml Waschpuffer sowie zwei Waschschritte mit 1 ml PBS (3 min, 1000 Upm, 4 °C). Die Überstände wurden jeweils verworfen. Das so entstandene Pellet wurde mit 10 Units Thrombin und 400 µl PBS versetzt und 45 min bei Raumtemperatur auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Das Thrombin bewirkt die Abspaltung des Proteins von den GST-Beads. Anschließen erfolgte eine erneute Zentrifugation für 3 min mit 1000 Upm bei 4 °C. Um nun das eingesetzte Thrombin aus der Lösung zu entfernen, wurde der Überstand auf 60 µl Benzamidinbeads gegeben und 10 min bei 4 °C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Der nach einer erneuten Zentrifugation (3 min, 1000 Upm, 4 °C) entstandene Überstand, das Eluat, wurde à 20 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Die Konzentration der aufgereinigten Proteine wurde mittels SDS-Page bestimmt.

2.3.14 Präparation der zytosolischen Fraktion durch Ultrazentrifugation

Um Bestandteile des Zytosols untersuchen zu können, wurde das Zelllysat nach dem mechanischem Aufschluss für 1 h bei 40000 Upm in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Das so entstandene Pellet entsprach den Membranbestandteilen und der Überstand dem Zytosol.

2.3.15 Untersuchung der biologischen Aktivität von Toxinen

Um herauszufinden, ob und wenn ja wie lang die Enzymkomponente des Iota Toxins im Zytosol biologisch aktiv ist, wurden vergiftete Vero-Zellen lysiert und die zytosolische Fraktion mittels Ultrazentrifugation präpariert. Danach wurden frische Zellen mit dem Zytosol und frischer Transportkomponente vergiftet und die morphologischen Veränderungen fotografisch dokumentiert. Die morphologisch veränderten Zellen wurden anschließend statistisch ausgewertet.

2.3.16 Präzipitation von biotinylierten Toxinen

Die Toxine wurden nach o. g. Methode (2.3.12) mit Biotin markiert, um festzustellen, ob das Chaperon HSP 90, sowie Cyclophilin A, ein Katalysator zur Proteinfaltung, sowohl an Iota a als auch an C2I bindet.

Dazu wurden Vero-Zellen lysiert, jeweils 200 µg des Lysats mit 1 µg Toxin, hier C2I-biot, und Ia-biot, für 1 h bei 37 °C inkubiert und danach auf 60 µl gewaschene Streptavidin-Beads gegeben. Da Biotin hochaffin an Streptavidin binden kann, können somit die biotinmarkierten Toxine und die an diese gebundenen zellulären Bestandteile isoliert werden. Diese wurden auf dem Überkopfschüttler 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Proben wurden abzentrifugiert (2 min, 4 °C 1000 Upm), der Überstand abgenommen und die Beads erneut 3 mal gewaschen (2 min, 4 °C, 100 Upm) und mit 30 µl 2,5-fach Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95 °C gekocht. Nach erneutem Abzentrifugieren (2 min, 4 °C, 1000 Upm) wurde der Überstand verwendet. Die Trennung und Detektion der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblotting.

2.3.17 Zytosolgewinnung durch Permeabilisierung der Membran mittels Digitonin

Zellen wurden mit 0,2 µg/ml C2I, C2IE387Q oder C2IE387/389Q jeweils in Kombination mit 0,4 µg/ml C2IIa vergiftet. Nach den gewünschten Zeitpunkten wurde das Medium abgenommen. Danach wurden die Zellen erst 5 min bei 25 °C und nachfolgend für 30 min auf Eis (4 °C) mit 20 µg/ml Digitonin-Puffer inkubiert. Digitonin ist ein Inhaltsstoff des Fingerhutsamens (*Digitalis purpurea*) und hat die Eigenschaft, selektiv die Plasmamembran zu permeabilisieren. Durch diese Methode ist es möglich, durch Variation der Inkubationszeiten sowie der verwendeten Konzentration die Größe der Poren und somit das Ausmaß der Membranschädigung zu regulieren. Der so entstandene Überstand entsprach der zytosolischen Fraktion und wurde in ein Eppendorfgefäß überführt.

2.3.18 Proteinfällung mittels Methanol/Chloroform

Da es sich durch die Zytosolgewinnung mittels Digitonin (2.3.17) um relativ kleine Mengen an Protein in einem relativ großem Volumen handelt, wurde die zytosolische Fraktion einer Proteinfällung unterzogen.

Dazu wurde das gleiche Volumen Methanol sowie ¼ des Volumens Chloroform zu der zytosolischen Fraktion gegeben. Die Proben wurden sorgfältig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur und 20000 x g abzentrifugiert. Es entstehen 3 Phasen. Die obere Phase wurde abgenommen und verworfen. Nach der Zugabe von ¾ Volumen Methanol wurde die Probe erneut 5 min bei Raumtemperatur und 20000 x g abzentrifugiert. Das so entstandene Pellet wurde 30 min bei 55 °C bei 300 Upm getrocknet, anschließend mit 30 µl 1-fach SDS-Probenpuffer für weitere 10 min bei 55 °C inkubiert und anschließend für 10 min bei 95 °C denaturiert. Zur weiteren Analyse wurden die Proben durch eine SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet.

2.3.19 Statistik

Die jeweiligen Versuche wurden unabhängig von einander mit einer Häufigkeit von mindestens dreimal (n = 3) durchgeführt, der Mittelwert und die Standard-

abweichung wurden errechnet und in den Abbildungen dieser Arbeit angegeben. Die abgebildeten Graphiken und Darstellungen wurden mit Hilfe der PC-Software GraphPad Prism 4 erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung der zellmorphologischen Veränderungen nach Inkubation mit Iota-Toxin

Es konnte in der Arbeitsgruppe von Prof. Holger Barth bereits gezeigt werden, dass das C2 Toxin aus *Clostridium botulinum* zelltyp- und konzentrationsunabhängig eine Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen (Epithelzellen, Makrophagen, Fibroblasten usw.) irreversibel vergiftet, was sich in einer morphologischen Veränderung der Zellen zeigt. Dabei runden die Zellen ab und verlieren ihre Adhärenz. Im weiteren Verlauf der Zellvergiftung kommt es nach 12-24 h zur Apoptose (Heine et al. 2008).

Es war nun von großem Interesse zu untersuchen, wie es sich mit den oben genannten Aspekten bei dem Iota Toxin aus *Clostridium perfringens* verhält, welches die gleichen molekularen und zellulären Wirkungen aufweist wie das C2-Toxin.

Als erstes sollte nun die Vergiftung und die daraus resultierenden morphologischen Veränderungen untersucht und mit den Ergebnissen des C2-Toxins verglichen werden. Dazu wurden kultivierte Nierenepithelzellen der Grünen Meerkatze, sogenannte Vero-Zellen, bis zur Semi-Konfluenz hin kultiviert und dann mit 0,2 µg/ml Iota a und 0,4 µg/ml Iota b über verschieden lange Zeiträume behandelt. Die morphologischen Veränderungen wurden fotografisch dokumentiert.

Abbildung 5 zeigt oben links Zellen, die ohne Toxin belassen wurden. Diese Zellen wurde 24 h lang in toxinfreiem Medium kultiviert. Nach 3 h wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Diese Zellen zeigten wie erwartet keine toxin-morphologischen Veränderungen, rundeten also nicht ab, sondern blieben morphologisch unverändert. Es zeigte sich jedoch, dass Zellen, die mit Iota Toxin behandelt wurden typische morphologische Veränderungen aufwiesen, was in einer Abrundung und Ablösung der Zellen deutlich wurde. Wie in Abbildung 5 dargestellt, waren kultivierte Vero-Zellen, die mit Iota Toxin behandelt wurden, nach 3 h zu 100% abgerundet. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Iota-behandelte Vero-Zellen bis hin zu 24 h abgerundet blieben. Es zeigten sich keine Anzeichen einer Erholung der Zellen, wie in Abbildung 5 unten links zu sehen ist. Wurde das toxinhaltige Medium nach 3 h entfernt und erfolgte die weitere Inkubation der Zellen

mit frischem, toxinfreiem Medium, blieben die Zellen weiterhin rund. Auch bei weiterer Inkubation mit dem Iota-Toxin bis hin zu 48 h blieben die Zellen rund (nicht gezeigte Daten).

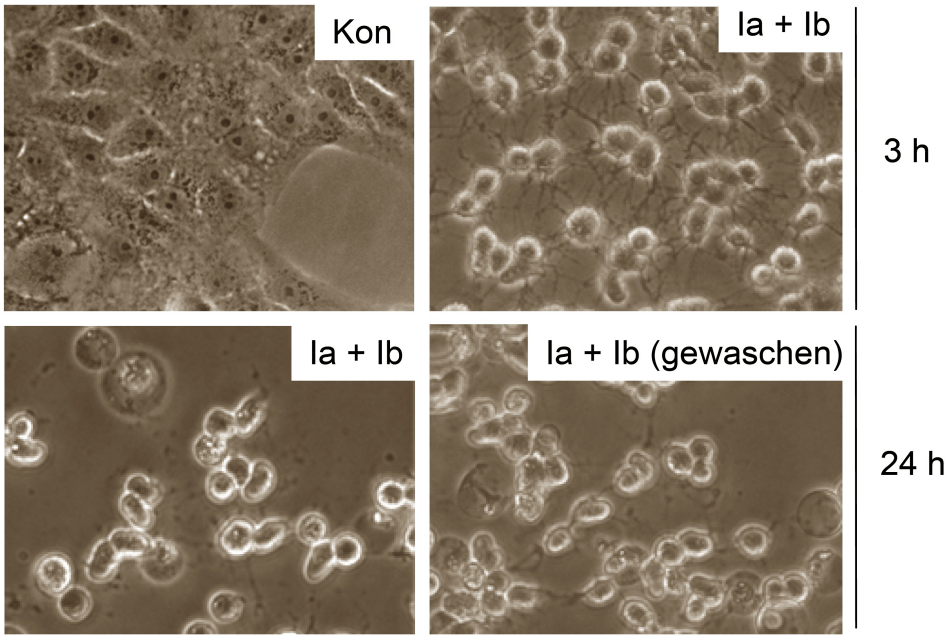

Abbildung 5: Morphologieveränderungen von Vero-Zellen durch Iota-Toxin

Vero-Zellen wurden bei 37 °C für jeweils 3 h mit 0,2 µg/ml Ia und 0,4 µg/ml Ib oder ohne Toxin inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt oder für weiter 21 h mit toxinhaltigen Medium inkubiert. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit 200-facher Vergrößerung fotografisch dokumentiert.
(Kon = Kontrolle, d.h. nicht Toxin behandelt, Ia = Iota a, Ib = Iota b)

3.2 ADP-Ribosylierung von Vero-Zellen

Aktin liegt in der Zelle in zwei unterschiedlichen Formen vor, einerseits in dem filamentösem (F-) Aktin andererseits in dem globulärem (G-) Aktin. Es ist bekannt, dass Iota-Toxin, wie auch andere clostridiale Toxine, G-Aktin der Zelle als Substrat für die ADP-Ribosyltransferase verwendet. Diese Reaktion findet jedoch nur statt, wenn das Toxin in die Zelle aufgenommen wurde.

Zur weiteren Charakterisierung des Iota-Toxin-Wildtyps wurde die ADP-Ribosyltransferaseaktivität des Toxins untersucht. Dazu wurden Vero-Zellen für 3 h,

24 h und 48 h mit jeweils 0,2 µg/ml Ia und 0,4 µg/ml Ib behandelt. Das Medium wurde nach 3 h gewechselt und die Zellen bis zu den gewünschten Zeitpunkten in toxin-freiem Medium kultiviert. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden die Zellen gewaschen, geerntet und lysiert. Im Anschluss wurden die hergestellten Lysate durch einen *in vitro*-ADP-Ribosylierungsassay analysiert. Dazu wurden die Lysate mit ADP-Ribosylierungspuffer, biotinmarkiertem NAD und Iota a für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Das Ergebnis dieses Versuchs ist in Abbildung 6 dargestellt.

Aktin hat ein Molekulargewicht von 45 kDa und zeigt im Westernblotverfahren ein deutliches Signal auf dieser Höhe. Zellen, die nur mit Medium kultiviert wurden, zeigten ebenfalls ein deutliches Signal. Bei Zellen die zuvor für je 3 h bzw. 24 h mit Iota a und Iota b behandelt wurden, zeigte sich keine Signalbande. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass in Zellen, die mit Iota a und Iota b behandelt wurden, bereits nach 3 h das gesamte G-Aktin ADP-ribosyliert vorlag und somit kein Substrat für eine weitere *in vitro* ADP-Ribosylierung mit biotinmarkiertem NAD mehr vorhanden war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es in Zellen, die mit Toxin behandelt wurden, bis hin zu 24 h zu keiner neuen Bildung von unmodifiziertem Aktin gekommen war, da auch zu diesem Zeitpunkt keine erneute Bande zu sehen war. Dies lässt einen ersten Rückschluss sowohl auf die Aufnahme des Toxins in die Zelle sowie auch auf die enzymatische Aktivität und Langlebigkeit von Iota a zu.

Zur Kontrolle, ob in den verschiedenen Proben die gleichen Mengen an zellulärem Protein verwendet wurde, wurde die Gesamtmenge des Aktins bestimmt. Daraus kann geschlossen werden, ob die Proben gleich viel an zellulären Bestandteilen enthalten und ob die verschiedenen Proben miteinander verglichen werden können. In der unteren Reihe der Abbildung 6 ist zu sehen, dass sowohl bei Zellen die mit Toxin für 3 h und 24 h behandelt wurden, als auch bei den Kontrollzellen, die nur mit Medium kultiviert worden sind, ein Signal gleicher Intensität erscheint. Das bedeutet einerseits, dass gleiche Mengen an Protein verwendet wurden, andererseits, dass es durch die Toxinbehandlung zu keinem verstärkten Abbau von G-Aktin gekommen ist, da die Gesamtmenge des Aktins konstant geblieben ist. Somit beeinflusst das Iota-Toxin zwar den Auf- und Abbau der Aktinfilamente und die Stabilität des Aktinzytoskeletts, die Gesamtmenge des Aktins wird jedoch nicht verändert.

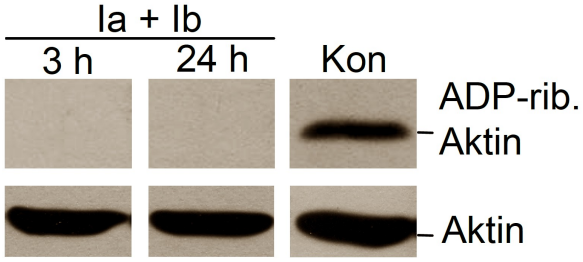

Abbildung 6: ADP-Ribosylierung und Aktin-Blot von Zelllysaten gewonnen aus Vero-Zellen

Vero-Zellen wurden für 3 h oder für 24 h mit 0,2 µg/ml Ia und 0,4 µg/ml Ib inkubiert. Die Kontrollzellen wurden für 24 h toxin-freiem Medium kultiviert. Die Zellen wurden gewaschen, geerntet und lysiert. ADP-ribosyliertes Aktin wurde mit Hilfe der *in vitro* ADP-Ribosylierung nachgewiesen. Dazu wurde das Zelllysat mit frischem Toxin und biotinmarkiertem NAD versetzt. Die Reaktion wurde nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C durch weiter 10 min bei 95 °C in SDS-Puffer abgestoppt. Die verschieden Ansätze wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran geblottet (1 mA/cm^2 für 1 h). Anschließend wurde die Membran für 1 h mit Streptavidin-Peroxidase behandelt. Das Ergebnis ist in der oberen Reihe der Abbildung dargestellt. Nur in unbehandelten Zellen (Kon) konnte einen in-vitro ADP-Ribosylierung nachgewiesen werden. Behandelte Zellen zeigten sowohl nach 3 h als auch nach 24 h keine Signalbande. Als Kontrolle der geladenen Proteinmengen wurde die Menge des Gesamtaktins bestimmt. Dazu wurde der Blot gestrippt und mit einem anti-Aktin-Antikörper behandelt. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper, zeigten sich in allen Proben gleichstarke Signalbanden (untere Reihe der Abbildung).
(Kon = Kontrolle, d.h. nicht Toxin behandelt, ADP-rib. Aktin = Adenosindiphosphat ribosyliertes Aktin, Ia = Iota a, Ib = Iota b)

3.3 Untersuchung der Bedeutung der ADP-Ribosyltransferase

Es sollte nun untersucht werden, welche Rolle die ADP-Ribosyltransferaseaktivität der clostridialen Toxine in Bezug auf die zellmorphologischen Veränderungen einnimmt. Dafür wurden verschiedenen Mutanten der clostridialen Toxinkomponente C2I verwendet. Bei der Mutante C2IE387Q handelt es sich um ein C2I-Protein, bei dem die Aminosäure Glutamat 387 durch ein Glutamin ersetzt wurde. Daraus resultiert ein Verlust der ADP-Ribosylierungsaktivität, es bleibt jedoch die Fähigkeit bestehen, NAD^+ zu glykohydrolieren. Des weiteren wurde eine C2I-Mutante verwendet, die weder die Eigenschaft der ADP-Ribosyltransferase noch der NAD^+-Glykohydrolase besitzt, C2IE387/389Q. Bei dieser Mutante wurde nicht nur die Glutaminsäure 387 durch ein Glutamin ersetzt, sondern auch die Glutaminsäure 389 (Barth et al., 1998). Mit diesen beiden Mutanten wurden nun Zytotoxizitätsversuche

durchgeführt.

Dazu wurden Vero-Zellen für 48 h mit 0,2 µg/ml C2I-Wildtyp (C2Iwt) und 0,4 µg/ml C2IIa, mit 2 µg/ml C2IE387Q und 4 µg/ml C2IIa, sowie mit 2 µg/ml C2IE387Q/389Q und 4 µg/ml C2IIa behandelt und die morphologischen Veränderungen wurden fotografisch dokumentiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 7 dargestellt.

Es zeigte sich, dass bei Zellen, die nur mit dem C2Iwt in Kombination mit C2IIa behandelt wurden nach kürzester Zeit morphologische Veränderungen auftraten. Diese Veränderungen hielten bis hin zu 48 h an und sind mit den morphologischen Effekten, die durch Iota-Toxins ausgelöst werden, vergleichbar. Bei den Zellen, die mit einer Mutante des Wildtyps behandelt wurden, entweder mit C2IE387Q oder mit C2IE387Q/389Q in Kombination mit C2IIa, zeigte sich keinerlei morphologische Veränderungen. Dies änderte sich auch nicht, wenn die zehnfache Menge des Toxins verwendet wurde. Das heißt, die Zellen blieben unverändert, zeigten keine Anzeichen der Abrundung und waren bis hin zu 48 h weiterhin teilungsfähig.

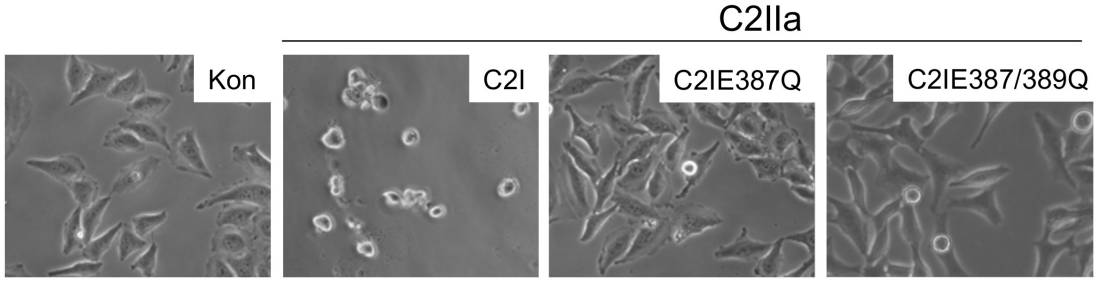

Abbildung 7: Morphologische Veränderungen von Vero-Zellen nach Inkubation mit C2I-Mutanten

Vero-Zellen wurden bei 37 °C mit 0,2 µg/ml C2Iwt und 0,4 µg/ml C2IIa, mit 2 µg/ml C2IE387/389Q und 4 µg/ml C2IIa, sowie mit 2 µg/ml C2IE387Q und 4 µg/ml C2IIa inkubiert. Als Kontrolle wurden Vero-Zellen in toxin-freiem Medium kultiviert. Nach einem Zeitraum von 48 h wurden die Zellen fotografiert (200-fache Vergrößerung) und die morphologischen Veränderungen dokumentiert. Nur die Zellen, die mit C2Iwt und C2IIa behandelt wurden zeigten eine morphologische Abweichung von den Kontrollzellen.
(Kon = Kontrolle, d.h. nicht Toxin behandelt, wt = Wildtyp)

3.4 Aufnahme der C2I-Mutanten C2IE387Q und C2IE387/389Q in die Zelle

Wie im vorangehenden Abschnitt beschrieben, zeigten die mit den C2I-Mutanten behandelten Zellen keine morphologischen Veränderungen. Um eine Aussage über die Enzymaktivität der Mutanten treffen zu können, musste im ersten Schritt untersucht werden, ob es den Mutanten überhaupt noch möglich ist, in die Zelle und somit in das Zytosol zu gelangen, oder ob durch die Veränderung des Toxins der Transport in die Zelle nicht mehr vollzogen werden kann.

Hierzu musste ein Nachweis für das Vorhandensein des veränderten C2I-Proteins im Zytosol erbracht werden. Dafür wurden kultivierte HeLa-Zellen für verschieden lange Zeiten mit jeweils 2 µg/ml der jeweiligen C2I-Mutante, C2IE387Q/389Q oder C2IE387Q, und 4 µg/ml C2IIa behandelt. Nach den entsprechenden Zeiten wurden die Zellen gewaschen und mit Digitonin behandelt. Da Digitonin die Fähigkeit besitzt Poren in der Zellmembran zu bilden, konnte somit das Zytosol durch diese Poren in der Membran ausströmen. Der so entstandene Überstand wurde abgenommen und auf Vorhandensein der Enzymkomponente mit Hilfe des Westernblotverfahrens untersucht.

In Abbildung 8 zeigt sich auf Höhe von ca. 50 kDa (entspricht der Größe der Enzymkoponente von C2I) eine Signalbande bei den Zellen, die mit jeweils einer der beiden C2I-Mutanten, C2IE387Q oder C2IE387Q/389Q, behandelt wurden. Bei den unbehandelten Kontrollzellen fehlt dieses Signal.

Da bei diesem Versuch das aus der Zelle ausgeströmte Zytosol untersucht wurde, kann aus diesem Ergebnis geschlossen werden, dass sowohl C2IE387Q als auch C2IE387Q/389Q in die Zelle aufgenommen werden. Somit beeinflusst die Veränderung des Wildtyps nicht die Aufnahme in die Zelle. Es ist davon auszugehen, dass diese Mutanten über den selben Mechanismus wie auch der C2I Wildtyp in die Zelle und somit in das Zytosol gelangen.

Die Aufnahme der Mutanten deutet weiterhin darauf hin, dass die ADP-Ribosyltransferase für eine suffiziente Vergiftung von Nöten ist und die NAD-Glycohydrolase allein keine Rolle für die Abrundung der Zellen zu spielen scheint.

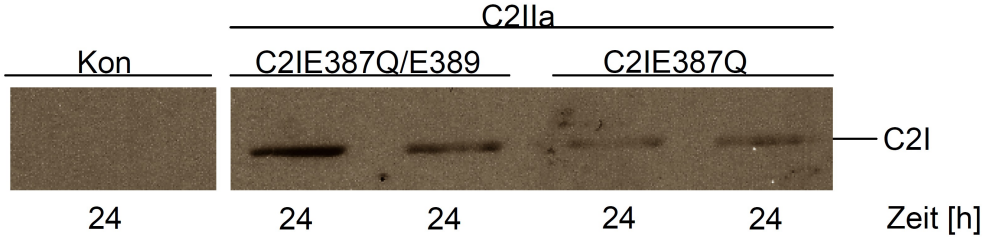

Abbildung 8: Nachweis von C2I-Mutanten im Zytosol mittels Digitonin

Vero-Zellen wurden 24 h mit 4 µg/ml C2IIa und jeweils 2 µg/ml C2IE387Q oder 2 µg/ml C2IE387/389Q behandelt bzw. für 24 h mit toxin-freiem Medium inkubiert (Kon). Nach dieser Zeit wurde das Medium verworfen und durch Digitonin-Puffer ersetzt. Es folgte eine 5 minütige Inkubation bei 25 °C gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation auf Eis. Der so entstandene Überstand wurde abgenommen, mittels Chloroform-Methanolfällung gefällt, durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Detektion erfolgte über einen C2I-spezifischen Antikörper. Es zeigt sich bei beiden Mutanten eine starke Bande auf der erwarteten Höhe, während die Kontrolle signalfrei blieb.
(Kon = Kontrolle, d.h. nicht Toxin behandelt)

3.5 Zytotoxizitätsversuch mittels MTS

Bisher wurde im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, dass das Iota-Toxin die behandelten Zellen suffizient abrundet, das G-Aktin der Zelle ADP-ribosyliert vorliegt und es zu keiner neuen Bildung von Aktin bis hin zu 48 h kommt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass C2I-Mutanten, die die Fähigkeit zur ADP-Ribosylierung verloren haben, zwar in die Zellen aufgenommen werden aber keine C2I-typischen morphologischen Veränderungen verursachen.

Die Abrundung der Zellen resultiert demnach aus der ADP-Ribosylierung des Aktins. Es ist jedoch nicht möglich, anhand der Abrundung der Zellen allein eine Aussage über den Verbleib der Zellen zu treffen. Es ist bekannt, dass in C2I behandelte HeLa-Zellen nach mehreren Stunden Apoptose ausgelöst wird (Heine et al. 2008). Es sollte nun als nächstes untersucht werden, ob Vero-Zellen, die mit Iota a und Iota b behandelt wurden, absterben und wenn ja, ob dieses Absterben durch Apoptose verursacht wird.

Dafür wurden Vero-Zellen in einer 96-Loch Platte bis zur Konfluenz hin kultiviert und mit 0,2 µg/ml Iota a und 0,4 µg/ml Iota b behandelt. Als Kontrolle wurden Vero-Zellen in toxin-freiem Medium belassen. Nach 3 h sowie nach 24 h wurde die

Vitalität der Zellen mittels MTS-Assay bestimmt. Dabei konnte, wie in Abbildung 9 gezeigt, gesehen werden, dass Zellen, die mit Toxin behandelt wurden nach 3 h keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollzellen zeigten. Daraus kann geschlossen werden, dass trotz der Abrundung der Zellen, diese immer noch vital sind und somit die Fähigkeit besitzen Stoffwechsel zu betreiben. Sie sind also nicht abgestorben. Nach 24 h zeigte sich eine deutliche Abnahme der Zellvitalität. Dies geschah auch ohne eine erneuten Zugabe von Toxin und war sowohl bei Zellen, die für die gesamte Zeit in toxinhaltigem Medium kultiviert wurden, als auch bei Zellen, bei denen nach 3 h ein Mediumwechsel erfolgte und die für die restliche Zeit in toxinfreiem Medium kultiviert wurden, der Fall. Des Weiteren zeigte sich auch bei diesen beiden kein signifikanter Unterschied.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass Zellen, die mit Iota-Toxin behandelt wurden zwar nach kürzester Zeit abrunden, jedoch trotz des Abbaus des Aktinzytoskeletts bis hin zu 24 h vital bleiben. Erst dann kommt es zu einem Absterben der behandelten Zellen.

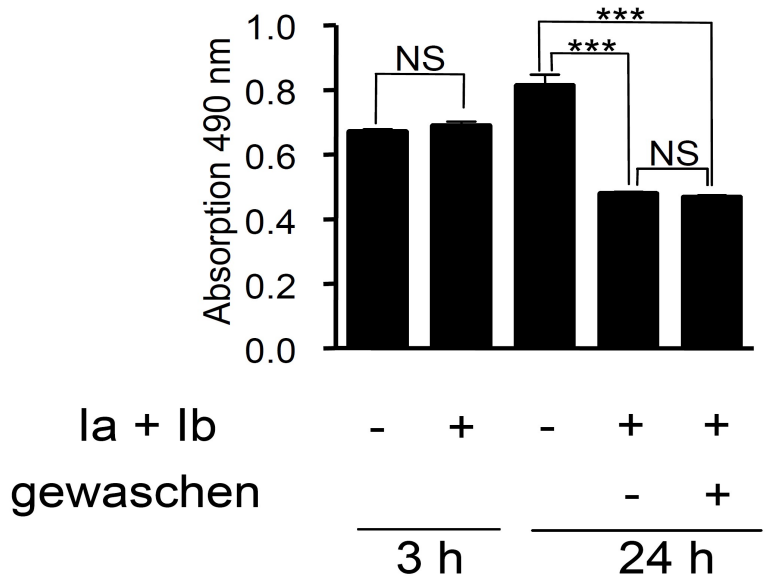

Abbildung 9: Zytotoxizitätsassay von Iota-vergifteten Vero-Zellen

Vero-Zellen wurden bei 37 °C für 3 h oder 24 h mit 0,2 µg/ml Ia und 0,4 µg/ml Ib, oder für 24 h ohne Toxin in frischem Medium inkubiert. Zusätzlich wurden Vero-Zellen 3 h mit 0,2 µg/ml Ia und 0,4 µg/ml Ib behandelt und nach diesem Zeitpunkt für weitere 21 h in frischem toxin-freiem Medium inkubiert. Nach den genannten Zeitpunkten wurden die Zellen bei 37 °C für 1 h mit MTS-Reagenz behandelt und das so entstandene Formazan wurde photometrisch bei 490 nm gemessen.

(NS = nicht signifikant, nm = Nanometer, Ia = Iota a, Ib = Iota b)

3.6 Apoptosenachweis bei Iota-Toxin vergifteten Vero-Zellen

Anhand des MTS-Assay kann jedoch nur eine Aussage über die Vitalität der Zellen getroffen werden. Demnach kann nur festgestellt werden, ob die Zellen noch vital oder bereits abgestorben sind. Jedoch können keine Schlüsse im Bezug auf die Art des Zelltods gezogen werden.

In C2I behandelte Zellen wird nach 12 h bis 18 h Apoptose ausgelöst (Heine et al. 2008). Um nun herauszufinden, ob es sich auch bei mit Iota-Toxin behandelten Vero-Zellen tatsächlich um Apoptose handelt, wurden apoptosespezifische Marker untersucht wie beispielsweise gespaltene und somit inaktive Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 (PARP-1), ein Spaltprodukt der Apoptose-spezifischen Caspase-3.

Es stellte sich die Frage, ob es möglich ist, in Zellen, die mit Toxin behandelt wurden, gespaltene PARP-1 nachzuweisen und somit einen Hinweis für das Stattfinden von Apoptose zu erhalten.

Dazu wurden Vero-Zellen mit 0,2 µg/ml Iota a und 0,4 µg/ml Iota b behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen gewaschen, geerntet und auf eine Zellzahl von $1x10^5$ Zellen/10 µl eingestellt und mit Hilfe der Westernblotanalyse untersucht.

In Abbildung 10 ist zu sehen, dass bei den Zellen, die mit Iota-Toxin behandelt wurden, eine deutliche Abnahme der ungespaltenen PARP-1 (ca. bei 116 kDa) beginnend bei 12,5 h bis hin zu 24 h festgestellt (obere Reihe). Parallel dazu nimmt die Bande der gespaltenen PARP-1 (ca. bei 87 kDa) kontinuierlich von 12,5 h bis hin zu 24 h zu. Bei 24 h ist das Bandensignal auf Höhe der ungespaltenen PARP-1 kaum noch zu erkennen, jedoch ist ein deutliches Signal auf Höhe der gespaltenen PARP-1 zu sehen. Die Abnahme der ungespaltenen PARP-1 steht jedoch in keinem mengenmäßigem Verhältnis zu der Zunahme der gespaltenen PARP-1. Das könnte eventuell auf einen vollständigen Abbau der Spaltprodukte von PARP-1 hinweisen.

Die Einzelkomponenten Ia und Ib alleine sowie Zellen, die nur mit Medium behandelt wurden, zeigten keinerlei Abnahme bzw. Veränderung in der Intensität des

PARP-1 Bandensignals.

Da es sich bei PARP-1 um ein Spaltprodukt der apoptosespezifischen Caspase-3 handelt, wurde im Anschluss der Nachweis der gespaltenen und somit aktiven Caspase-3 durchgeführt (untere Reihe in Abbildung 10) Dazu wurden die Proben mechanisch lysiert und die Aktivität der Caspase-3 mittels Westernblotanalyse ermittelt.

Es zeigte sich dabei eine deutliche Bandenaktivitätszunahme beginnend bei 12,5 h bis hin zu 24 h auf Höhe der gespaltenen Caspase-3. Die zur Kontrolle angefertigten Proben mit den jeweiligen Einzelkomponenten Ia und Ib, sowie mit Zellen, die in toxin-freiem Medium kultiviert wurden zeigten keinerlei Bandensignal auf Höhe der gespaltenen Caspase-3. Es zeigte sich, im Bezug auf die PARP-1-Spaltung, eine verfrühte Aktivierung der Caspase-3. Somit geht die Aktivierung dieser der PARP-Spaltung voraus, was dem zeitlich richtigen Ablauf des Apoptosevorgangs entspricht.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es im Zeitraum zwischen 12,5 h und 24 h zu einem deutlichen Abbau der aktiven PARP-1 kommt, sowie zu einer Zunahme des Spaltprodukts der PARP-1. Dies korreliert mit der zunehmenden Aktivierung der Caspase-3. Dies ist in einer deutlichen Zunahme des Signals der gespaltenen Caspase-3 und somit der aktiven Form dieser zu sehen. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass Iota a in Kombination mit Iota b Apoptose auslöst, jedoch auch, dass die Einzelkomponenten allein, wie erwartet, keinerlei Effekt bezüglich des Zelltods aufweisen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Apoptose mit einer ca. 10 stündigen Verspätung nach dem Erreichen einer 100%igen Vergiftung einsetzt.

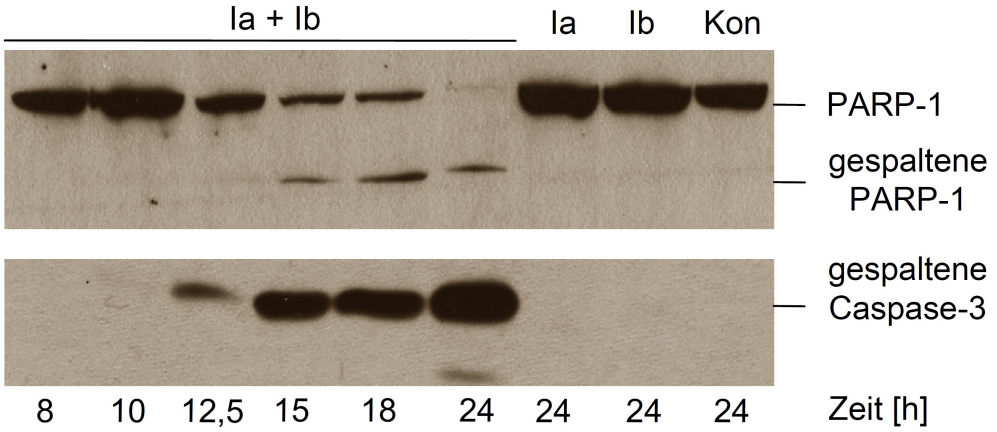

Abbildung 10: PARP-1 und Caspaseaktivität

Vero-Zellen wurden bei 37 °C für die oben gezeigten Zeiträume mit 0,2 µg/ml Ia und 0,4 µg/ml Ib, mit 0,2 µg/ml der jeweiligen Einzelkomponenten (Ia oder Ib) oder ohne Toxin in frischem Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, geerntet und auf eine Zellzahl von $1x10^5$ Zellen/10 µl eingestellt. 50 µl der jeweiligen Suspension wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Gespaltenes PARP-1, als Substrat der apoptosespezifischen Caspase-3, wurde durch den C-II-10-Antikörper bestimmt. Zusätzlich wurde die proteolytische Aktivierung der Procaspase-3 analysiert. Dazu wurden 50 µl der jeweiligen Ansätze lysiert und mittels Westernblotverfahren analysiert. Danach wurde die Caspase-3-Aktivität durch einen spezifischen Antikörper gegen gespaltene Caspase-3 detektiert. (PARP-1 = Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1, Kon = Kontrolle, d.h. nicht Toxin behandelt, Ia = Iota a, Ib = Iota b)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass mit Iota-Toxin behandelte Vero-Zellen zeitlich verzögert zur Aktinmodifikation in Apoptose gehen, sollte nun wieder die Rolle der ADP-Ribosyltransferase bzw. der NAD-Glykohydrolase im Bezug auf die Vitalität der Zellen und auf die Aktivierung von Apoptose untersucht werden.

Dazu wurden HeLa-Zellen in einer 96-Well-Platte bis zur Konfluenz hin kultiviert und mit 0,2 µg/ml C2Iwt, 2 µg/ml C2IE387Q oder 2 µg/ml C2IE387Q/389Q jeweils in Kombination mit 0,4 µg/ml bzw. 4 µg/ml C2IIa behandelt. Nach 48 h wurde mittels MTS-Assay die Vitalität der Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich eine deutliche Abnahme der Vitalität bei den Zellen, die mit C2I Wildtyp behandelt wurden (siehe Abbildung 11). Die Zellen, die mit der zehnfachen Menge an C2IE387Q und C2IE387Q/389Q behandelt wurden, zeigten wie zu erwarten war, keinen signifikanten Unterschied im Bezug auf die Vitalität zu den Kontrollzellen. Daraus lässt sich schließen, dass die veränderten Enzyme trotz Aufnahme in das Zytosol und

enzymatischer Restaktivität nicht zur Aktivierung der Apoptose beitragen. Das ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Aktivität der ADP-Ribosyltransferase bedeutend für den Vergiftungsmechanismus ist. Zudem hat die NAD-Glykohydrolase allein keinen Einfluss auf die Aktivierung von Apoptose.

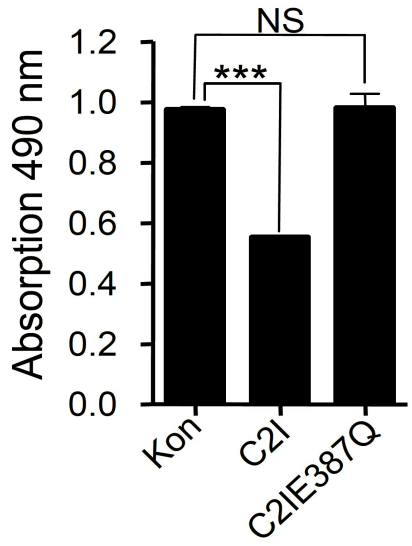

Abbildung 11: MTS-Assay von toxinbehandelten Vero-Zellen

Vero-Zellen wurden bei 37 °C für 48 h mit jeweils mit entweder 0,2 µg/ml C2Iwt (C2I) und 0,4 µg/ml C2IIa, 0,2 µg/ml C2IE387Q (C2IE387Q) in Kombination mit 0,4 µg/ml C2IIa behandelt. Als Kontrolle (Kon) wurden Vero-Zellen für 48 h unbehandelt gelassen. Nach dem entsprechenden Zeitwert wurden die Zellen bei 37°C für 1 h mit MTS-Reagenz behandelt und das so entstandene Formazan wurde photometrisch bei 490 nm gemessen.
(NS = nicht signifikant, Kon = Kontrolle,d.h. nicht Toxin behandelt, nm = Nanometer)

Um nun diese These zu überprüfen, wurde die C2I-Mutante C2IE387Q in Hinblick auf die Fähigkeit Apoptose auszulösen untersucht. Dafür wurden HeLa-Zellen für 24 h mit 0,2 µg/ml C2I und 0,4 µg/ml C2IIa, mit 2 µg/ml C2IE387Q und 4 µg/ml C2IIa sowie mit 500 nM Staurosporin als Positivkontrolle oder ganz ohne Toxin als Negativkontrolle inkubiert. Nach der gegebenen Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen, geerntet und auf eine Zellzahl von $1x10^5$ Zellen/10 µl eingestellt und mit Hilfe der Westernblotanalyse analysiert.

In Abbildung 12 ist eine deutliche Spaltung der PARP-1 bei den Zellen, die mit C2I Wildtyp behandelt wurden zu sehen. Bei der Mutante C2IE387Q, die keinerlei Aktivität im Bereich der ADP-Ribosyltransferase mehr aufzeigt, zeigt sich ein vergleichbares Ergebnis wie bei der Negativkontrolle, die nicht mit Toxin inkubiert wurde. Sowohl in der Spalte von den Kontrollzellen als auch in der Spalte der C2I-Mutante C2IE387Q liegt ausschließlich PARP-1 in der ungespaltenen Form vor und es findet sich keine Bande auf Höhe des Spaltprodukts, das auf ein Stattfinden von Apoptose hinweisen könnte. Im Gegensatz dazu zeigt sich in der Positivkontrolle (Staurosporin) nur noch ein Signal für das Spaltprodukt, es liegt keine ungespaltene PARP-1 mehr in den Zellen vor.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es sich bei der C2I-Mutante C2IE387Q um eine inaktive Form des C2I-Toxins handelt, die keinerlei Einfluss auf die ADP-Riboslyierung des G-Aktins hat. Die voraus gegangenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass jedoch genau diese Enzymaktivität für die Vergiftung der Zelle und somit für die Induktion von Apoptose von großer Bedeutung ist.

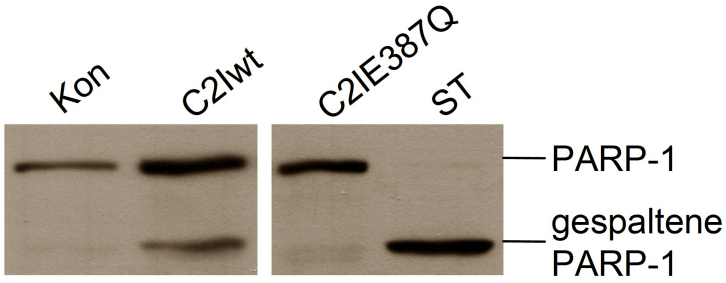

Abbildung 12: PARP-Spaltung

HeLa-Zellen wurden bei 37 °C für für 24 h mit 0,2 µg/ml C2Iwt und 0,4 µg/ml C2IIa, mit 0,2 µg/ml C2IE387Q und 0,4 µg/ml C2IIa, mit 500 nM Staurosporin oder ohne Toxin in frischem Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, geerntet und auf eine Zellzahl von $1x10^5$ Zellen/10 µl eingestellt. 50 µl der jeweiligen Suspension wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran (1,2 mA/cm2) übertragen. Gespaltenes PARP-1, als Substrat der apoptosespezifischen Caspase-3, wurde mit dem C-II-10-Antikörper nachgewiesen und mittels Chemolumineszensverfahren sichtbar gemacht. Sowohl die Kontrolle als auch die C2I Mutante zeigen keine Spaltung der PARP-1, Proben mit C2Iwt und Staurosporin hingegen zeigen eine deutliche Spaltung.
(Kon = Kontrolle, d.h. nicht Toxin behandelt, wt = Wildtyp, ST = Staurosporin, PARP-1 = Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1, Ia = Iota a, Ib = Iota b)

3.7 Biologische Aktivität des Iota-Toxins

Es ist bekannt, dass das C2I-Protein von großer Stabilität und Langlebigkeit ist. Selbst im Zytosol von vergifteten Zellen verliert es bis hin zu 48 h nicht an enzymatischer Aktivität (Heine et al. 2008). Da bisher große Ähnlichkeiten zwischen dem C2I-Protein und dem Iota a-Protein gezeigt werden konnten, stellte sich nun die Frage, wie es sich mit der Langlebigkeit der Enzymaktivität des Iota-Toxins in der Zelle verhält.

Dazu wurden kultiviert Vero-Zellen für verschieden lange Zeiträume, hier 2 h, 24 h und 48 h, mit 0,2 µg/ml Iota a und 0,4 µg/ml Iota b inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, geerntet und lysiert. Aus dem so entstandenen Lysat wurde mit Hilfe der Ultrazentrifugation die zytosolische Fraktion gewonnen. Diese wurde mit frischer Transportkomponente, Iota b, zu kultivierten Vero-Zellen gegeben und die zellmorphologischen Veränderungen wurden in einem Zeitraum von 30 min bis hin zu 24 h photografisch dokumentiert. Als Kontrollen wurden jeweils die zytosolische Fraktion nicht vergifteter Vero-Zellen mit neuem Iota b auf die Zellen gegeben, sowie eine erneute Vergiftung mit frischem 0,2 µg/ml Iota a und 0,4 µg/ml Iota b gestartet. Das erzielte Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt.

Es ist zu sehen, dass bei den Zellen, die mit einer Kombination aus unvergifteter zytosolischer Fraktion und frischem Iota b behandelt wurden, zu keiner Abrundung der Zellen kam. Dies entspricht somit der Negativkontrolle (Kon+Ib). Die Behandlung mit frischem Iota a in Kombination mit frischem Iota b führte bereits nach kürzester Zeit zu einer 100%ige Abrundung der Zellen. Das entspricht demnach der Positivkontrolle (Ia+Ib). Zellen, die mit der zytosolischen Fraktion aus 2 h vergifteten Zellen und neuem Iota b inkubiert wurden, zeigten eine verzögerte Abrundung der Zellen, die nach ca. 8 h die 100% erreichte.

Zellen, die mit der zytosolischen Fraktion aus 24 h und 48 h vergifteten Zellen in Kombination mit frischem Iota b inkubiert wurden, zeigten über einen relativ langen Zeitraum keine Anzeichen der klassischen zellmorphologischen Veränderungen. Erst nach einem Zeitraum von ca. 20 h konnte ein leichter Anstieg der Anzahl abgerundeter Zellen beobachtet werden. Es zeigte sich jedoch, dass bis hin zu 24 h nicht eine vollständigen Vergiftung der Zellen, sondern eine maximale Vergiftung von 50% bzw. 30% erreicht wurde. Daraus kann geschlossen werden, dass das Iota-Toxin zwar stabil bleibt, jedoch nach 24 h an enzymatischer Aktivität verliert.

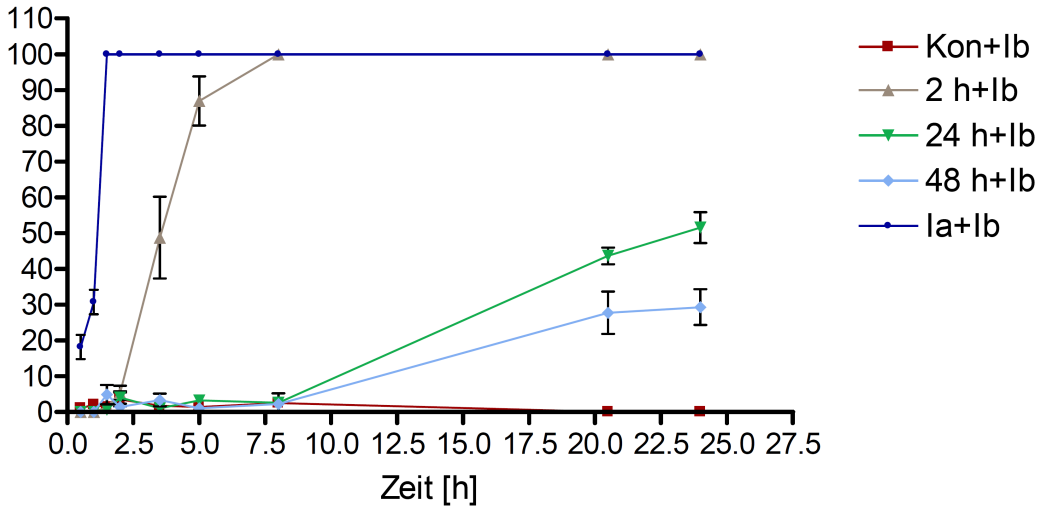

Abbildung 13: Biologische Aktivität von Iota-Toxin nach Aufnahme in die Zelle

Vero-Zellen wurden für 2 h mit 0,2 µg/ml Ia und 0,4 µg/ml Ib inkubiert, danach wurde das toxinhaltige Medium durch frisches Medium ersetzt und die Zellen weiterhin für 24 h bzw. 48 h inkubiert. Nach diesen Zeitpunkten wurden die Zellen gewaschen, geerntet und mechanisch lysiert. Zur Gewinnung der zytosolischen Fraktion wurden die Zellen für 1 h bei 4 °C mit 100000 x g ultrazentrifugiert. Die so entstandene zytosolische Fraktion wurde jeweils mit 0,4 µg/ml neuer Transportkomponente, Ib, zu naiven Vero-Zellen gegeben und die morphologischen Veränderungen bis hin zu 24 h dokumentiert. Als Kontrollen wurden gleichzeitig naive Vero-Zellen mit frischem Iota-Toxin (0,2 µg/ml Ia und 0,4 µg/ml Ib) oder mit zytosolischer Fraktion naiver Zellen in Kombination mit 0,4 µg/ml Ib inkubiert.
(Kon = Kontrolle, d.h. nicht Toxin behandelt, Ia = Iota a, Ib = Iota b)

Weiterhin wurden Anteile der zytosolischen Fraktion auf eine SDS-PAGE aufgetragen, getrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Es war nun möglich, das Iota a, das im voraus biotinyliert worden war, durch die Streptavidin-Peroxidase nachzuweisen. Dabei zeigte sich, dass es in der zytosolischen Fraktion bis hinzu 48 h möglich war biotinyliertes Iota a nachzuweisen, während in der Kontrolle kein Anzeichen gefunden werden konnte (nicht gezeigt).

4 Diskussion

Das Iota-Toxin aus *C. perfringens* gehört zu der Familie der binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine. Diese Toxine besteht aus zwei getrennten Proteinen, einer Transportkomponente und einer Enzymkomponente. Wirken diese beiden Komponenten synergistisch, kommt es zu einer Aufnahme des Toxins in die Zelle und zu einer Modifikation des zellulären Substratproteins Aktin. Dabei wird von dem ubiquitär in Zellen vorkommenden NAD^+ der ADP-Riboserest abgespalten und kovalent auf monomeres Aktin übertragen. Daraus resultiert die Depolymerisation der Aktinfilamente und dies führt zu einer Abrundung der Zelle. Bisher sind die Langzeiteffekte in Zellen nach Wirkung des Iota-Toxins nicht bekannt. Für das C2-Toxin von *C. botulinum*, einem weiteren Vertreter dieser Toxinfamilie konnte kürzlich von der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Toxinwirkung in kultivierten Zellen nach 12-15 h zu typischen Anzeichen von Apoptose führt (Heine et al. 2008). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass das C2-Toxin über einen relativ langen Zeitraum (mindestens 48 h) seine enzymatische Aktivität im Zytosol von Zellen auch nach solch langen Inkubationszeiten behält und immer noch in der Lage ist, kultivierte Zellen effizient zu vergiften (Heine et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob die Behandlung von Zellen mit Iota-Toxin ebenfalls zur Apoptose führt. Weiterhin wurde geprüft, ob die Enzymkomponente Ia nach ihrer Aufnahme in das Zytosol vergleichbare Eigenschaften hinsichtlich ihrer Stabilität umfasst wie das C2-Toxin.

4.1 Wirkung des Iota-Toxins auf Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass Zellen, die mit einer Kombination aus Iota a und Iota b behandelt wurden, nach 3 h abgerundet waren. Die Abrundung ging mit der vollständigen ADP-Ribosylierung des Aktins in der Zelle einher. Wie bereits für das C2-Toxin beschrieben (Heine et al. 2008), war die morphologische Veränderung der Zellen irreversibel. Trotz der frühzeitigen Abrundung blieben die Zellen für etwa 10 h nach Aufnahme des Iota-Toxins vital. Dies wurde durch MTS-Zytotoxizität bestimmt, bei dem es durch die Aktivität der Mitochondrien in lebenden Zellen zu einer photometrisch messbaren Umsetzung eines synthetischen Farbstoffes kommt. In diesen ersten Stunden nach der Zugabe des Toxins zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den unbehandelten Kontrollzellen und den Iota-behandelten

Zellen bezüglich ihrer Vitalität. Zellen, die mit einer Kombination aus Iota a und Iota b behandelt wurden, zeigten aber bereits nach 3 h eine vollständige ADP-Ribosylierung des zellulären Aktins. Dabei zeigte sich, dass in Zellen, die einmal mit Iota-Toxin behandelt wurden, kein modifiziertes Aktin mehr nachgewiesen werden konnte. Daraus kann geschlossen werden, dass entweder kein neues Aktin gebildet wird oder die komplette Menge des neu gebildete Aktins sehr schnell von dem noch aktiven Toxin im Zytosol modifiziert wird.

Trotz der morphologischen Veränderungen waren die Zellen weiterhin in der Lage, mitochondriale Enzyme zu bilden und somit die Umsetzung des MTS-Substrats zu katalysieren. Erst 24 h nach der einmaligen Gabe des Iota-Toxins zeigten sich Anzeichen von Zelltod. Es kam zu einem signifikanten Unterschied der Vitalität der toxinbehandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Die Vitalität der toxinbehandelten Zellen nahm deutlich ab. Es konnte gezeigt werden, dass es sich um apoptotischen Zelltod handelt, da sowohl gespaltene Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 (PARP-1) also auch aktive Caspase-3 in diesen Zellen nachgewiesen werden konnte. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Caspase-3 Spaltung der Spaltung von PARP-1 zeitlich voraus geht. Bei PARP-1 handelt es sich um ein Substrat der Caspase, das erst durch eine vorangegangene Aktivierung der Caspase-3 gespalten werden kann. Diese Beobachtung entspricht dem natürlichen Verlauf während der Apoptose, in der es kaskadenartig zur Aktivierung bzw. Deaktivierung verschiedener Proteine und Enzyme kommt.

4.2 Vergleiche der Wirkung von Iota- und C2-Toxin

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war der Vergleich der Langzeiteffekte von Iota- und C2-Toxin.

4.2.1 Aktivität der Enzymkomponente

Bezüglich der Langzeiteffekte konnten Parallelen zwischen dem Iota-Toxin und dem C2-Toxin gesehen werden. Beide Toxine zeigen zellspezifisch Anzeichen der Vergiftung, die sich zunächst als Veränderungen im Aktinzytoskelett manifestieren und letztendlich dadurch zu einem Adhärenzverlust der Zellen führt. In diesem Zustand sind die Zellen jedoch noch vital. Das Einsetzen des Zelltods, der bei beiden Toxinen als Apoptose identifiziert werden konnte, erfolgt weitaus später.

Betrachtet man die Enzymaktivität der Toxine nach 48 h im Zytosol der vergifteten Zellen, ist es den Zellen, die mit Iota-Toxin oder dem C2-Toxin inkubiert wurden, möglich, frisches Aktin erneut zu ADP-ribosylieren. Qualitativ ließ sich kein Unterschied zwischen den beiden Toxin feststellen. Das Signal für Aktin im Westernblot blieb bis hin zu 24 h für die jeweiligen Toxine konstant. Das bedeutet, dass es bis hin zu 24 h zu keinem messbaren Aktivitätsverlust kam. Insgesamt fiel jedoch auf, dass trotz vergleichbar verwendeter Toxinmenge und Zellzahl die Aktivität des C2-Toxins die des Iota-Toxins übertraf (Hilger et al. 2009).

Das Iota-Toxin wie auch das C2-Toxin besitzen neben der ADP-Ribosyltransferaseaktivität noch eine weitere Enzymaktivität. Dabei handelt es sich um die NAD-Glykohydrolase (Barth et al. 1998). In dieser Arbeit wurden mit der Mutante C2IE387/389 die Bedeutung der ADP-Ribosyltransferaseaktivität untersucht. Zudem konnten aus den durchgeführten Versuchen Rückschlüsse auf die Bedeutsamkeit der NAD-Glykohydrolaseaktivität gezogen werden. Die Rolle dieser NAD-Glykohydrolaseaktivität ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Was jedoch geklärt werden konnte ist, dass diese Enzymaktivität anscheinend alleine nicht ausreicht, um eine effektive Vergiftung herzustellen. Weiterhin ist die Apoptose durch die NAD-Glykohydrolaseaktivität allein nicht auslösbar (Hilger et al. 2009). Es kann, die funktionellen Gemeinsamkeiten der beiden Toxine bedenkend, vermutet werden, dass das auch für das Iota-Toxin gilt.

Grundsätzlich ist jedoch vorstellbar, dass die Depletion von zellulärem NAD^+ in Kombination mit der ADP-Ribosyltransferase das Einsetzen der Apoptose beschleunigt. NAD wird in der Zelle aus ATP hergestellt. Somit kommt es durch einen erhöhten NAD-Bedarf zu einem vermehrten Abbau bzw. Umbau von ATP zu NAD. Es ist beschrieben, dass genau dieser Mechanismus von anderen zellulären Proteinen benutzt wird, um unter bestimmten Umständen Apoptose auszulösen. So kommt es zum Beispiel durch die massive Aktivierung des DNA-Reparaturenzyms PARP-1 nach einer gravierenden DNA-Schädigung zu einem erhöhten Verbrauch des NADs. Ist der Verbrauch des NAD so hoch bedeutet das, dass der entstandene DNA-Schaden nicht mehr zu reparieren ist und es kommt infolge dessen zum programmierten Zelltod (Kauppinen und Swanson 2007).

Bei der Betrachtung der biologischen Aktivität konnte jedoch gesehen werden, dass es einen Unterschied zwischen dem Iota-Toxin und dem C2-Toxin gibt. Hat man die

zytosolische Fraktion von Zellen, die entweder 24 h mit dem Iota-Toxin oder mit dem C2-Toxin behandelt wurden, auf native Zellen gegeben, so stellte sich bei dem Iota-Toxin nach 20 h eine 50%ige Abrundung der Zellen dar. Im Gegensatz dazu konnte bei dem C2-Toxin bereits nach 3 h eine 50%ige Abrundung beobachtet werden. Die Enzymkomponenten beider Proteintoxine können bis hin zu 48 h im Zytosol nachgewiesen werden (Hilger et al 2009, Heine et al. 2008). Trotz dieser gleichen Aktivität der Enzymkomponente *in vitro* bleibt der Unterschied im Hinblick auf die biologische Aktivität, dem Verhalten der Enzymkomponente nach der Aufnahme in die Zelle, zwischen dem C2-Toxin und dem Iota-Toxin bestehen. Es ist bekannt, dass die Interaktionsdomäne des Ia mit dem Ib sich in der N-terminalen Dömane der Enzymkomponente befindet (Marvaud et al. 2002) Es ist daher möglich, dass es nach der Aufnahme des Iota-Toxins in die Zielzelle zu einem Abbau des N-Terminus kommt. Daraus resultiert ein Verlust der Bindung zwischen der Enzym- und der Transportkomponente. Demnach ist es der Enzymkomponente nicht mehr möglich, trotz eines gravierenden Überschusses der Transportkomponente, in Zellen aufgenommen zu werden. Es konnten jedoch keine Abbauprodukte der N-terminalen Domäne in dem Zytosol der Zellen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Solche möglichen Abbauprodukte sind durch ihre geringe Größe nicht im Westernblotverfahren nachweisbar. Es könnte jedoch auch sein, dass es nicht durch einen Abbau zu einem Funktionsverlust der N-terminalen Domäne kommt, sondern eine alleinige Modifikation am N-Terminus die Interaktion von Iota a mit dem Iota b behindert.

4.3 Pathophysiologie des Iota-Toxins

Clostridium perfringens produziert eine Vielzahl an Toxinen und ist an der Entstehung verschiedener Erkrankungen beteiligt. So gehört es zum Beispiel zu den Hauptauslösern des Gasbrandes in Menschen. Hierbei wird vor allem die Beteiligung von dem *C. perfringens* Typ A -Stamm diskutiert (Myers et al. 2006), der in der Lage ist, eine Vielzahl von virulenten Toxinen zu produzieren (Mollby et al. 1976). Es ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt, ob es möglich sein kann, dass auch weitere Stämme und somit andere Toxine an der Entstehung dieser Myonekrose und der daraus resultierende Erkrankung beteiligt sind.

Beim Gasbrand handelt es sich um eine infektiös-toxische Erkrankung, die aus einer

Verschmutzung der Wunde mit verschiedenen Clostridien-Stämmen resultiert.

Es ist bekannt, dass sowohl neutrophile Granulozyten als auch Monozyten eine große Rolle in der Eindämmung des Gasbrandes spielen. Es konnte gezeigt werden, dass Gewebsmakrophagen in der Lage sind, *C. perfringens* Stämme bei Kontakt effektiv abzutöten (O'brien et al. 2007). Weiterhin überleben nur 33% der Mäuse, die eine verminderte Anzahl an zirkulierenden Monozyten aufweisen, die ersten 24 h nach Infektion mit *C. perfringens.* Die Kontrollgruppe hingegen, bei denen eine normale Anzahl an zirkulierenden Monozyten festgestellt werden konnten, wies nach 24 h eine 100%ige Überlebensrate auf (O'Brien et al. 2007). Es ist jedoch nicht bekannt, ob die *C. perfringens* Stämme, die in der Lage sind, das Iota-Toxin zu produzieren, auch an der Infektion und somit an der Auslösung des Gasbrandes beteiligt sind. Es wäre interessant zu untersuchen, wie es sich mit der Sensitivität von Makrophagen für das Iota-Toxin verhält. Makrophagen besitzen ein Aktinzytoskelett, das wichtig für ihre Beweglichkeit und für ihre Fähigkeit ist, andere körpereigene und -fremde Substanzen zu phagozytieren. Würde es durch die Aufnahme des Toxins in die Makrophagen zu einer ADP-Ribosylierung des Aktins kommen, würde daraus ein Verlust ihrer Fähigkeiten resultieren, an Zielorte zu wandern und schädliche Substanzen durch Phagozytose zu eliminieren. Das wiederum würde bedeuten, dass das Vorhandensein des Iota-Toxins eine Ausbreitung der Infektion begünstigen und eventuell anderen Toxinen den Weg bereiten könnte.

Auch das Stattfinden von Apoptose im Gegensatz zur Nekrose könnte in dieser Hinsicht eine bedeutende Rolle spielen. Es ist bekannt, dass Nekrose eine starke Entzündungsreaktion durch ein massives Einwandern von Entzündungszellen hervorruft. Bei Apoptose hingegen kommt es zu einer lokalen Lyse der Zellen. Die dabei entstehenden Reste werden entweder durch die umgebenden Zellen oder durch vereinzelte Makrophagen beseitigt. Das bedeutet, dass es nur zu einer bedingten Aktivierung des Immunsystems kommt. Da Zellen, die mit dem Iota-Toxin behandelt wurden, in Apoptose gehen (Hilger et al. 2009), könnte dies ein weiterer Mechanismus in Hinblick auf das Ausbreiten einer Infektion, bzw. das Begünstigen von Infektionen und Ausbreiten von pathologischen Veränderungen durch andere Toxine sein. Würden die Zellen nekrotisch werden, hätte dies die oben genannte massive Einwanderung von Makrophagen und anderen Immunzellen zur Folge, was eine Eindämmung der bestehenden Infektion bedeuten würde.

5 Zusammenfassung

Das Iota-Toxin von *Clostridium perfringens* ist ein binäres Toxin, welches aus einer Transportkomponente (Ib) und einer separaten Enzymkomponente (Ia) besteht. Zur Vermittlung der zytotoxischen Wirkung bewerkstelligt Ib den Transport von Ia in das Zytosol eukaryonter Zellen. Ia stellt ein 45 kDa großes Protein dar, welches im Zytosol eukaryonter Zellen monomere Aktinmoleküle (G-Aktin) mono-ADP-ribosyliert. Die Adenosindiphosphat-Ribosylierung (ADP-Ribosylierung) von G-Aktin führt zu einer raschen Depolymerisation der zellulären Aktinfilamente, was in einer Morphologieveränderung der Zellen deutlich wird. Kultivierte adhärente Zellen runden in Folge der Toxinwirkung ab. Während die molekularen Mechanismen der Toxinwirkung und die unmittelbaren Effekte auf das Aktinzytoskelett eingehend charakterisiert wurden, sind die weiterführenden zellulären Konsequenzen weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher diese Aspekte untersucht und insbesondere die zellulären Langzeiteffekte nach einer Vergiftung von kultivierten Säugetierzellen mit dem Iota-Toxin genauer charakterisiert. Die entscheidende Frage war hierbei, ob die Toxinwirkung reversibel ist, vergiftete Zellen also überleben können. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Nierenepithelzellen der Grünen Meerkatze (Vero-Zellen) mit Iota-Toxin irreversibel verläuft. Die Toxin-vermittelte Zellabrundung bleibt erhalten, auch wenn das Toxin nach Aufnahme in die Zellen aus dem Kulturmedium entfernt wird. In Übereinstimmung mit diesem Befund war in Toxin-behandelten Zellen das gesamte Aktin ADP-ribosyliert und auch 24 Stunden nach der Toxinbehandlung war in den vergifteten Zellen kein unmodifiziertes Aktin nachweisbar. Interessanterweise konnte im Zytosol von Zellen, die mit Iota-Toxin inkubiert wurden, enzymatisch aktives Toxin über einen Zeitraum bis zu 48 Stunden nachgewiesen werden. Nach unserer derzeitigen Hypothese stellt diese bemerkenswerte Stabilität des Iota-Toxins im Zytosol die Grundlage der irreversiblen Wirkung des Toxins dar, indem neu synthetisiertes Aktin unmittelbar ADP-ribosyliert wird und dadurch ein möglicher Neuaufbau von Aktinfilamenten verhindert wird. Eine wichtige Beobachtung war, dass die Behandlung von Zellen mit Iota-Toxin zu einem Caspase-vermittelten Zelltod führt, der aber erst etwa 24 Stunden nach der Toxin-vermittelten Zellabrundung nachweisbar ist.

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für das C2-Toxin von *Clostridium botulinum*, einem weiteren Vertreter der binären Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine, gefunden. Ein enzymatisch inaktives C2-Toxin, welches ebenfalls in das Zytosol von Zellen aufgenommen wird, zeigte keinen Effekt auf das Aktinzytoskelett und hatte entsprechend keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die beschriebenen Eigenschaften des Iota-Toxins, wie die bemerkenswerte Langlebigkeit der Enzymkomponente im Zytosol von Säugetierzellen, offenbar typisch für die Mitglieder dieser Toxinfamilie sind. Die permanente und langanhaltende ADP-Ribosylierung von Aktin durch diese Toxine im Zytosol vergifteter Zellen ist demnach sehr wahrscheinlich die Voraussetzung für den irreversiblen Effekt dieser Toxine und für ihre Fähigkeit, Apoptose auszulösen.

Die neuen Befunde leisten somit einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis der Wirkungsweise und der pathophysiologischen Rolle binärer Aktin-ADP-ribosylierender Bakterientoxine.

6 Literaturverzeichnis

1. Aktories, K, Barmann, M, Ohishi, I, Tsuyama, S, Jakobs, KH, und Habermann, E: Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. Nature 322; 390 - 392 (1986)

2. Ashkenazi, A: Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. Nat.Rev.Cancer 2; 420 - 430 (2002)

3. Barth, H, Preiss, JC, Hofmann, F, und Aktories, K: Characterization of the catalytic site of the ADP-ribosyltransferase Clostridium botulinum C2 toxin by site-directed mutagenesis. J.Biol.Chem. 273; 29506 - 29511 (1998)

4. Barth, H, Blöcker, D, Behlke, J, Bergsma-Schutter, W, Brisson, A, Benz, R, und Aktories, K: Cellular uptake of Clostridium botulinum C2 toxin requires oligomerization and acidification. J.Biol.Chem. 275; 18704 - 18711 (2000)

5. Bernardi, P, Scorrano, L, Colonna, R, Petronilli, V, und Di Lisa, F: Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. Eur.J.Biochem. 264; 687 - 701 (1999)

6. Blöcker, D, Barth, H, Maier, E, Benz, R, Barbieri, JT, und Aktories, K: The C terminus of component C2II of Clostridium botulinum C2 toxin is essential for receptor binding. Infect.Immun. 68; 4566 - 4573 (2000)

7. Blöcker, D, Pohlmann, K, Haug, G, Bachmeyer, C, Benz, R, Aktories, K, und 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)

8. Bradford, MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.Biochem. 72; 248 - 254 (1976)

9. Collier, RJ: Diphtheria toxin: mode of action and structure. Bacteriol.Rev. 39; 54 - 85 (1975)

10. Denault, JB und Salvesen, GS: Caspases: keys in the ignition of cell death. Chem.Rev. 102; 4489 - 4500 (2002)

11. Eckhardt, M, Barth, H, Blöcker, D, und Aktories, K: Binding of Clostridium botulinum C2 toxin to asparagine-linked complex and hybrid carbohydrates 1. J.Biol.Chem. 275; 2328 - 2334 (2000)

12. Gibert, M, Petit, L, Raffestin, S, Okabe, A, und Popoff, MR: *Clostridium perfringens* iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity. Infect.Immun. 68; 3848 - 3853 (2000)

13. Gulke, I, Pfeifer, G, Liese, J, Fritz, M, Hofmann, F, Aktories, K, und Barth, H: Characterization of the enzymatic component of the ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. Infect.Immun. 69; 6004 - 6011 (2001)

14. Heine, K, Pust, S, Enzenmuller, S, und 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)

15. Hilger, H, Pust, S, von Figura, G, Kaiser, E, Stiles, BG, Popoff, MR, und Barth, H: The long-lived nature of Clostridium perfringens iota toxin in mammalian cells induces delayed apoptosis. Infect.Immun. 77; 5593 - 5601 (2009)

16. Jung, M, Just, I, van Damme, J, Vandekerckhove, J, und Aktories, K: NAD-binding site of the C3-like ADP-ribosyltransferase from *Clostridium limosum*. J.Biol.Chem. 268; 23215 - 23218 (1993)

17. Kaiser, E, Haug, G, Hliscs, M, Aktories, K, und Barth, H: Formation of a biologically active toxin complex of the binary Clostridium botulinum C2 toxin without cell membrane interaction. Biochemistry 45; 13361 - 13368 (2006)

18. Kauppinen, TM und Swanson, RA: The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in CNS disease. Neuroscience 145; 1267 - 1272 (2007)

19. Laemmli, UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227; 680 - 685 (1970)

20. Marquardt, H und Schäfer, S: Lehrbuch der Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart, 2. Auflage (2004)

21. Marvaud, JC, Stiles, BG, Chenal, A, Gillet, D, Gibert, M, Smith, LA, und Popoff, MR: Clostridium perfringens iota toxin. Mapping of the Ia domain involved in docking with Ib and cellular internalization. J.Biol.Chem. 277; 43659 - 43666 (2002)

22. Mollby, R, Holme, T, Nord, CE, Smyth, CJ, und Wadstrom, T: Production of phospholipase C (alpha-toxin), haemolysins and lethal toxins by *Clostridium perfringens* types A to D. J.Gen.Microbiol. 96; 137 - 144 (1976)

23. Montecucco, C und Schiavo, G: Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. Mol.Microbiol. 13; 1 - 8 (1994)

24. Myers, GS, Rasko, DA, Cheung, JK, Ravel, J, Seshadri, R, DeBoy, RT, Ren, Q, Varga, J, Awad, MM, Brinkac, LM, Daugherty, SC, Haft, DH, Dodson, RJ, Madupu, R, Nelson, WC, Rosovitz, MJ, Sullivan, SA, Khouri, H, Dimitrov, GI, Watkins, KL, Mulligan, S, Benton, J, Radune, D, Fisher, DJ, Atkins, HS, Hiscox, T, Jost, BH, Billington, SJ, Songer, JG, McClane, BA, Titball, RW, Rood, JI, Melville, SB, und Paulsen, IT: Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, *Clostridium perfringens*. Genome Res. 16; 1031 - 1040 (2006)

25. O'Brien, DK, Therit, BH, Woodman, ME, und Melville, SB: The role of neutrophils and monocytic cells in controlling the initiation of Clostridium perfringens gas gangrene. FEMS Immunol.Med.Microbiol. 50; 86 - 93 (2007)

26. Ohishi I: Structure and function of actin-adenosine-diphosphate-ribosylating toxins. Aus Bacterial Protein Toxins: Aktories, K und Just, I. Berlin:Springer Verlag, S. 253 - 273 (2000)

27. Ohishi, I, Iwasaki, M, und Sakaguchi, G: Purification and characterization of two components of botulinum C2 toxin. Infect.Immun. 30; 668 - 673 (1980)

28. Ohishi, I und Odagiri, Y: Histopathological effect of botulinum C2 toxin on mouse intestines. Infect.Immun. 43; 54 - 58 (1984)

29. Ohishi, I und Tsuyama, S: ADP-ribosylation of nonmuscle actin with component I of C2 toxin. Biochem.Biophys.Res.Commun. 136; 802 - 806 (1986)

30. Ohishi, I: NAD-glycohydrolase activity of botulinum C2 toxin: a possible role of component I in the mode of action of the toxin. J.Biochem. 100; 407 - 413 (1986)

31. Popoff, MR und Boquet, P: Clostridium spiroforme toxin is a binary toxin which ADP-ribosylates cellular actin. Biochem.Biophys.Res.Commun. 152; 1361 - 1368 (1988)

32. Reuner, KH, Presek, P, Boschek, CB, und Aktories, K: Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin and disorganizes the microfilament network in intact cells. Eur.J.Cell Biol. 43; 134 - 140 (1987)

33. Simpson, LL: A comparison of the pharmacological properties of *Clostridium botulinum* type C1 and C2 toxins. J.Pharmacol.Exp.Ther. 223; 695 - 701 (1982)

34. Songer, JG: Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin.Microbiol.Rev. 9; 216 - 234 (1996)

35. Stiles, BG, Hale, ML, Marvaud, JC, und Popoff, MR: Clostridium perfringens iota toxin: characterization of the cell-associated iota b complex. Biochem.J. 367; 801 - 808 (2002)

36. Vandekerckhove, J, Schering, B, Barmann, M, und Aktories, K: Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates cytoplasmic beta/gamma-actin in arginine 177. J.Biol.Chem. 263; 696 - 700 (1988)

37. Wegner, A und Aktories, K: ADP-ribosylated actin caps the barbed ends of actin filaments. J.Biol.Chem. 263; 13739 - 13742 (1988)

38. Weigt, C, Just, I, Wegner, A, und Aktories, K: Nonmuscle actin ADP-ribosylated by botulinum C2 toxin caps actin filaments. FEBS Lett. 246; 181 - 184 (1989)

Danksagung

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Holger Barth für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas, die hilfsbereite Betreuung und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Speit danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Herrn Prof. Gierschik danke ich für die Möglichkeit, in seinem Institut zu promovieren.

Ich möchte mich bei Karin und Eva bedanken, die mir die ersten Schritte im Labor ermöglicht haben, mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und weit mehr geworden sind, als nur Arbeitskollegen; ich danke Euch von Herzen dafür!

Ray danke ich für all die tollen Stunden im Labor und für die Freude, die wir beide daran hatten.

Nicht zu vergessen sind natürlich Steffi, Ulrike, Claudi, Irene, Helmut, Jörg, Maren, Lydie, Nata und alle weiteren Mitarbeitern des Instituts, denen ich für die gute Zusammenarbeit danken möchte.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Hanna Andrea Hilger
Geburtstag	23. März 1985
Geburtsort	Ulm
Eltern	Prof. Dr. rer. nat. Gudrun Ahnert-Hilger
	Prof. Dr. rer. nat. Hartmut Hilger

Schulbildung

1991-1995	Dunant-Grundschule Berlin Steglitz
1995-2004	Gymnasium Steglitz, Berlin
2001-2002	Mirani State Highschool, Mirani Queensland Australia
Juni 2004	Abitur

Studium

Seit Wintersemester 2004/05	Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm
Herbst 2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Seit März 2008	Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Ulm
Wintersemester 08/09	Teilnahme am Programm Experimentelle Medizin der Universität Ulm
Februar 2010 – Februar 2011	Praktisches Jahr (TUFTs University Boston Massachusetts USA und Bundeswehrkrankenhaus Ulm)
April 2011	Schriftlicher Teil des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

Publikationen

Hanna Hilger, Sascha Pust, Guido von Figura, Eva Kaiser, Bradley G. Stiles, Michel R. Popoff, Holger Barth

The long-lived nature of *Clostridium perfringens* Iota Toxin in mammalian cells induces delayed apoptosis. Infection and Immunity 77; 5593 - 5601 (2009)