Universitätsklinikum Ulm

INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE, PROF. DR. PETER GIERSCHIK

Etablierung eines neuartigen, selektiven Transportsystems für Makrophagen und Monozyten basierend auf dem clostridialen Exoenzym C3bot und Streptavidin

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Hannes Christow

geboren in Stuttgart

Ulm 2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Barth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Huber-Lang

Tag der Promotion: 18.02.2016

Für meine drei liebsten Freunde

Ilga, Carolin und Emanuel

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis I

II Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1

1.1 Bakterielle Toxine: Struktur und Aufnahme in die Zelle 1

1.2 ADP-Ribosyltransferasen 5

1.3 Das C3-Exoenzym 8

1.4 Streptavidin: Aufbau und Biotinbindung 10

1.5 Zielsetzung 12

2 Material und Methoden 14

2.1 Material 14

2.2 Methoden 23

3 Ergebnisse 48

3.1 Klonierung der Fusionsproteine 48

3.2 Aufreinigung der Fusionsproteine 53

3.3 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Fusionsproteine 54

3.4 Charakterisierung der Zellgängigkeit der Fusionsproteine 60

4 Diskussion 72

4.1 Klonierung der Fusionsproteine 72

4.2 Aufreinigung der Fusionsproteine 73

4.3 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Fusionsproteine 74

4.4 Charakterisierung der Zellgängigkeit der Fusionsproteine 78

5 Zusammenfassung 86

6 Literaturverzeichnis 88

6.1 Zeitschriften 88

III Danksagung VII

IV Lebenslauf VIII

II Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ARTT	ADP-ribosyl-turn-turn
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BamHI	Restriktionsenzym / Schnittstelle BamHI
BAP	biotinylierte Alkalische Phosphatase
bBSA	biotinyliertes bovines Serum Albumin
BF	Biotin-Fluorescein
BglII	Restriktionsenzym / Schnittstell BglII
BSA	Rinderserumalbumin
C2	*Clostridium botulinum* C2-Toxin
C2I	enzymatisch aktive Komponente des C2-Toxins
C2II	Bindungs- und Translokationskomponente des C2-Toxins
C2IIa	Bindungs- und Translokationskomponente des C2-Toxins welche durch Trypsin aktiviert wurde
C3*bot*1 und 2	*Clostridium botulinum* C3-Exoenzym
C3*bot*1E174Q	*Clostridium botulinum* C3-Exoenzym, welches an Position 174 der AS-Kette Glutamin statt Glutamat aufweist und dadurch enzymatisch inaktiv ist
C3*cer*	*Bacillus cereus* C3-Exoenzym
C3*lim*	*Clostridium limosum* C3-Exoenzym
C3*stau*1, 2 und 3	*Staphylococcus aureus* C3-Exoenzyme 1, 2 und 3

CDT	*Clostridium difficile*-Toxin
CHO-K1	epitheliale Ovarialzellen des chinesischen Hamsters (Zelllinie)
CST	*Clostridium spiriforme*-Toxin
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins
DAPI	4‘,6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EcoRI	Restriktionsenzym / Schnittstelle EcoRI
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEA1	Early endosome antigen 1
eEF2	Elongationsfaktor 2
EGFP	“enhanced green fluorescent protein”
EtBr	Ethidium-Bromid
F-Aktin	filamentöses Aktin
F-Biotin	Fluorescein-Biotin
FLPC	Fast Protein Liquid Chromatography
G-Aktin	globuläres Aktin
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
HeLa	humane, epitheliale Zervix-Adenokarzinom-Zelllinie
HRP	Horseradish Peroxidase

Hsp90	Hitzeschockprotein 90
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
J774A.1	murine Makrophagen-Zelllinie
MEM	Minimum Essential Medium
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium
LPS	Lipopolysaccharid
N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
PBS	Phosphat Buffered Saline
PBS-T	Phosphat Buffered Saline + Tween
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
pGEX-2T	Vektor-Plasmid pGEX-2T
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PN	Phosphatnikotinamid
PNPP	*p*-Nitrophenyl Phosphat
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering Ribonukleinsäure
StrepPOD	Streptavidin-Peroxidase
STS	Serin-Threonin-Serin
Stv13	tetrameres Wildtyp-Streptavidin
Stv43	dimere Streptavidin-Mutante
TEMED	Tetraethylmethylendiamin
TE-Puffer	Tris- Ethylendiamintetraessigsäure -Puffer

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Vero	epitheliale Nierenzellen der Grünmeerkatze (Zelllinie)
VIP	vegetatives insektizidiales Protein

1 Einleitung

1.1 Bakterielle Toxine: Struktur und Aufnahme in die Zelle

Unter dem Begriff der bakteriellen Toxine versteht man verschiedenartige Faktoren, über welche Bakterien ihre Pathogenität vermitteln. Die Anwesenheit des Bakteriums ist dabei nicht erforderlich. Grundsätzlich wird in sogenannte Endotoxine und Exotoxine unterschieden.

Endotoxine sind Faktoren, die in der Zellwand gramnegativer Bakterien vorkommen. Sie bestehen aus Polysaccharidketten, einer Lipid A Einheit, die für die toxischen Effekte verantwortlich ist, sowie einem verbindenden Kern-Molekül (Jacobs et al. 1997). Diese Endotoxine werden als Lipopolysaccharide (LPS) bezeichnet. Sie entfalten ihre pathogene Wirkung erst nach der Lyse des Bakteriums und der damit verbundenen Freisetzung der LPS.

Exotoxine hingegen sind vom intakten Bakterium produzierte und sezernierte Peptide und Proteine. Sie wirken im Inneren der Zelle und verfügen über eine enzymatische Aktivität, über welche sie ihre pathogene Wirkung entfalten. Zu den typischen Eigenschaften der Exotoxine zählt eine hohe Spezifität. Diese Spezifität bezieht sich dabei sowohl auf die jeweiligen Zielzellen (Zellspezifität), sowie auf das jeweilige zu modifizierende Substrat innerhalb der Zielzelle (Substratspezifität). Exotoxine besitzen zudem ein sehr hohes toxisches Potential, sodass bereits geringe Konzentrationen genügen, um toxische Effekte in der Zielzelle hervorzurufen.

Bakterielle Exotoxine verfügen über verschiedene Mechanismen, über die sie in ihre jeweiligen Zielzellen aufgenommen werden. Zu den Exotoxinen zählt hierbei die Gruppe der AB-Toxine. AB-Toxine bringen mindestens zwei funktionell verschiedene Domänen mit sich. Die A-Domäne ist für die enzymatische Aktivität gegenüber spezifischen Substraten innerhalb der Zielzelle verantwortlich. Die B-Domäne hingegen vermittelt die Bindung an, sowie den Transport in die spezifische Zielzelle. Oft liegt auch eine eigene Translokations-Untereinheit (T-Domäne) vor. In der Transportuntereinheit sind also oft B- und T-Domänen

lokalisiert. Nur durch das Zusammenwirken der Domänen ist eine Translokation der A-Domäne über die Zellmembran der Zielzelle ins Zellinnere möglich.

Weiter unterscheidet man hierbei single-chain Toxine (Tabelle 1) und binäre Toxine (Tabelle 2). Bei single-chain Toxinen befinden sich A- und B-Domäne auf einem einzelnen Protein. Zu ihnen zählen beispielsweise die Botulinum-Neurotoxine A bis G aus *Clostridium botulinum*, das Tetanus-Neurotoxin aus *Clostridium tetani*, sowie das Diphtherie-Toxin aus *Corynebacterium diphtheriae* (Barth et al. 2004). Bei binären Toxinen liegen die A- und die B-Untereinheit auf zwei getrennten Proteinen vor. Das Zusammenwirken beider getrennter Domänen erbringt eine Wirkung an der Zielzelle. Zu diesen binären Toxinen zählt beispielsweise das C2-Toxin aus *Clostridium botulinum* (Ohishi et al. 1980). Erst die AB-Struktur ermöglicht in beiden Fällen eine zelltoxische Wirkung.

Tabelle 1 Beispiele für bakterielle single-chain Toxine in fertig vorgeformter AB-Struktur. (Modifiziert aus (Barth et al. 2004)).

[a] Repetitive, verschieden lange B-Oligopeptid-Domänen sind nachgewiesen in den C-Termini der großen clostridialen Toxine von *Clostridium difficile, Clostridium novyi* und *Clostridium sordellii*

Bakterium	**Toxin**	**Struktur (Molmasse [kDa] / A:B Ratio)**
Clostridium botulinum	Botulinum-Neurotoxine A-G	Einzelnes Protein (150 / 1:1)
Clostridium difficile	Toxine A und B	Einzelnes Protein (~270-308 / 1:x)[a]
Clostridium novyi	Alpha Toxin	Einzelnes Protein (250 / 1:x)[a]
Clostridium sordellii	Hämorrhagisches und letales Toxin	Einzelnes Protein (~260-300 / 1:x)[a]
Clostridium tetani	Tetanus-Neurotoxin	Einzelnes Protein (150 / 1:1)
Corynebacterium diphtheriae	Diphtherie-Toxin	Einzelnes Protein (58 / 1:1)
Pseudomonas aeruginosa	Exotoxin A	Einzelnes Protein (67 / 1:1)
Bordetella pertussis	Pertussis-Toxin	Multiple Proteine (105 / 1:4)
Escherichia coli	Hitze-labiles Enterotoxin	Multiple Proteine (85 / 1:5)
Vibrio cholerae	Cholera-Toxin	Multiple Proteine (85 / 1:5)

Tabelle 2 Clostridiale und bazilläre binäre AB-Toxine: Ein Überblick. (Modifiziert aus (Barth et al. 2004)).

Toxine und Domänen	Genlokation	Molmasse [kDa]	Enzymatische Aktivität
***C. perfringens* ι Toxin**	Plasmid (140 kbp)		
Ia		45	ADP-Ribosylierung Aktin
Ib		94 inaktiv	keine
		81 aktiviert	keine
***C. spiriforme* CST**	Chromosom		
Sa		44	ADP-Ribosylierung Aktin
Sb		92 inaktiv	keine
		76 aktiviert	keine
***C. difficile* CDT**	Chromosom		
CDTa		48	ADP-Ribosylierung Aktin
CDTb		99 inaktiv	keine
		75 aktiviert	keine
***C. botulinum* C2-Toxin**	Chromosom		
C2I		49	ADP-Ribosylierung Aktin
C2II		81	keine
		60	keine
***B. anthracis* Ödem- und Letal-Toxin**	Plasmid pXO1 (182 kbp)		
		89	Adenylat-Zyklase
EF		90	Zn^{2+} Metalloprotease für MAPKK
LF		83 inaktiv	keine
PA		63 aktiviert	keine
***B. cereus* VIP**	Unbekannt		
VIP2		52	ADP-Ribosylierung Aktin
VIP1		100 inaktiv	keine
		80 aktiviert	keine

Die Translokation aller untersuchten AB-Toxine erfolgt über die Bindung der B-Domäne an einen spezifischen Rezeptor und die anschließende

rezeptorvermittelte Endozytose in frühe Endosomen ins Zellinnere. Ab hier unterscheidet man zwei Wege.

Bei den sogenannten „Short-Trip-Toxinen“ kommt es zu einer Ansäuerung des frühen Endosoms über eine vesikuläre Protonenpumpe (v-ATPase) (Montecucco 1998, Sandvig et al. 2004). Durch das Absinken des pH-Wertes im Inneren des Endosoms erfolgt eine Konformationsänderung der B-Domäne, die sich anschließend in die endosomale Membran einlagert und so eine Pore für den Austritt der A-Domäne ins Zytosol der Wirtszelle schafft (Abbildung 1). Beispiele hierfür sind die Anthrax-Toxine (Friedlander 1986), das Diphtherie-Toxin (Sandvig und Olsnes 1980), sowie das C2-Toxin von *Clostridium botulinum* (Barth et al. 2000). Die Translokation der A-Untereinheit lässt sich über die Hemmung der v-ATPase mit dem Makrolid-Antibiotikum Bafilomycin-A1 verhindern (Werner et al. 1984).

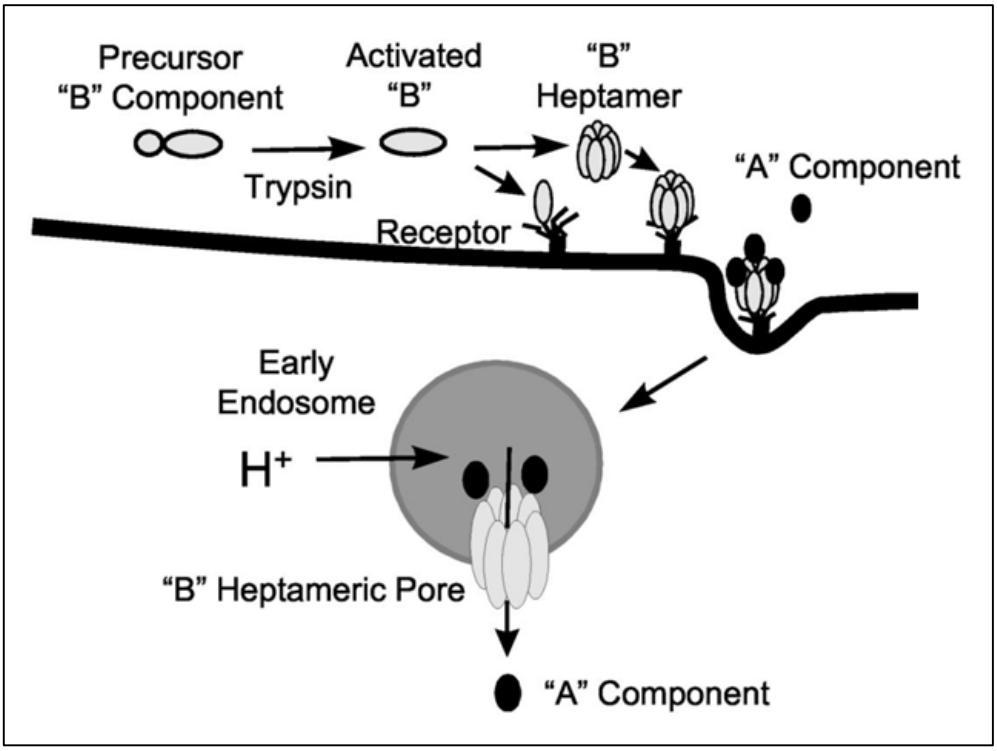

Abbildung 1 Wesentlicher Mechanismus der Aufnahme und Translokation eines binären AB-Toxins als „Short-Trip-Toxin“ ins Zytosol der Wirtszelle. Nach Aktivierung der B-Domäne kommt es zur Bindung als Heptamer an einen spezifischen Rezeptor der Zielzelle. Nach folgender Bindung der A-Domäne erfolgt die rezeptorvermittelte Endozytose. Das frühe Endosom wird anschließend angesäuert, woraufhin die A-Domäne, durch die Bildung einer Pore durch die B-Domäne, ins Zytosol der Wirtzelle translozieren kann. (Abbildung aus (Barth et al. 2004), mit freundlicher Genehmigung des ASM Verlags)

Die „Long-Trip-Toxine“ hingegen gehen ihren Weg über die Endosomen und das trans-Golgi Netzwerk, sowie über den Golgi-Apparat retrograd in das endoplasmatische Retikulum, von welchem aus die Translokation ins Zytosol stattfindet (Montecucco 1998, Sandvig et al. 2004). Zu diesen Toxinen zählen das Shiga-Toxin, das Cholera-Toxin sowie das Toxin Ricin aus der Pflanze *Rizinus communis* (Sandvig und van Deurs 2002). Auch dieser Weg kann mittels Brefeldin A, einem Antibiotikum aus *Eupenicillium brefeldianum* gehemmt werden (Chardin und McCormick 1999).

Die in dieser Arbeit verwendete Transferase C3bot1, welche neben dem C2-Toxin und Neurotoxinen (BoNts) ebenfalls von *C. botulinum* sezerniert wird, lässt sich allerdings nicht ohne weiteres in die zuvor genannten Einteilungen eingliedern. Zwar gibt es eine enzymatisch aktive A-Domäne, eine B-Domäne ist für C3bot1 jedoch nicht bekannt. Weitere Ausführungen zu den C3-Toxinen folgen unten.

1.2 ADP-Ribosyltransferasen

Viele bakterielle Toxine wirken als ADP-Ribosyltransferasen und sind potente und wichtige Virulenzfaktoren. Nach der zellulären Aufnahme, die durch sehr effiziente Aufnahmemechanismen bedingt ist, modifizieren ADP-Ribosyltransferasen hochspezifisch eukaryote Zielproteine. Meist hat dies erhebliche Auswirkungen auf zelluläre Schlüsselprozesse, welche häufig schließlich zum Zelltod führen (Aktories et al. 2004). Gemeinsam ist den Toxinen, die als ADP-Ribosyltransferasen wirken, dass sie NAD in einen ADP-Riboserest und Nikotinamid spalten und den ADP-Riboserest auf ein zelluläres Zielprotein übertragen und kovalent mit diesem verbinden (Abbildung 2). Unterteilen lassen sich diese ADP-Ribosyltransferasen in vier verschiedene Gruppen (Barth et al. 2002).

Die erste Gruppe bilden Proteine wie das Diphtherie-Toxin aus *Corynebacterium diphtheriae* oder das Pseudomonas-Exotoxin aus *Pseudomonas aeruginosa*, welche den Elongationsfaktor 2 (eEF2) hemmen, indem sie ihn ADP-ribosylieren (Collier 1975). Zur zweiten Gruppe zählen das Pertussis-Toxin aus *Bordetella pertussis* und das Cholera-Toxin aus *Vibrio cholerae*, die heterotrimere G-Proteine

ADP-ribosylieren. In die dritte Gruppe fällt das in dieser Arbeit verwendete C3-Toxin aus *Clostridium botulinum, Clostridium limosum* oder *Staphylococcus aureus*, welches die kleinen G-Proteine, wie Rho, Rac und Cdc42 ADP-ribosyliert und inaktiviert (Aktories et al. 1989). Die Toxine der vierten Gruppe ADP-ribosylieren Aktin, einen Bestandteil des Zytoskeletts einer jeden Zelle. Hierzu zählen das C2-Toxin von *Clostridium botulinum (Aktories et al. 1986)*, das vegetative insektizidiale Protein (VIP) von *Bacillus cereus* (Han et al. 1999), das Iota-Toxin von *Clostridium perfringens* (Stiles und Wilkins 1986), das *Clostridium spiriforme* Toxin (Simpson et al. 1989), sowie die *Clostridium difficile* ADP-Ribosyltransferase (Popoff et al. 1988). Eine Übersicht liefert Tabelle 3.

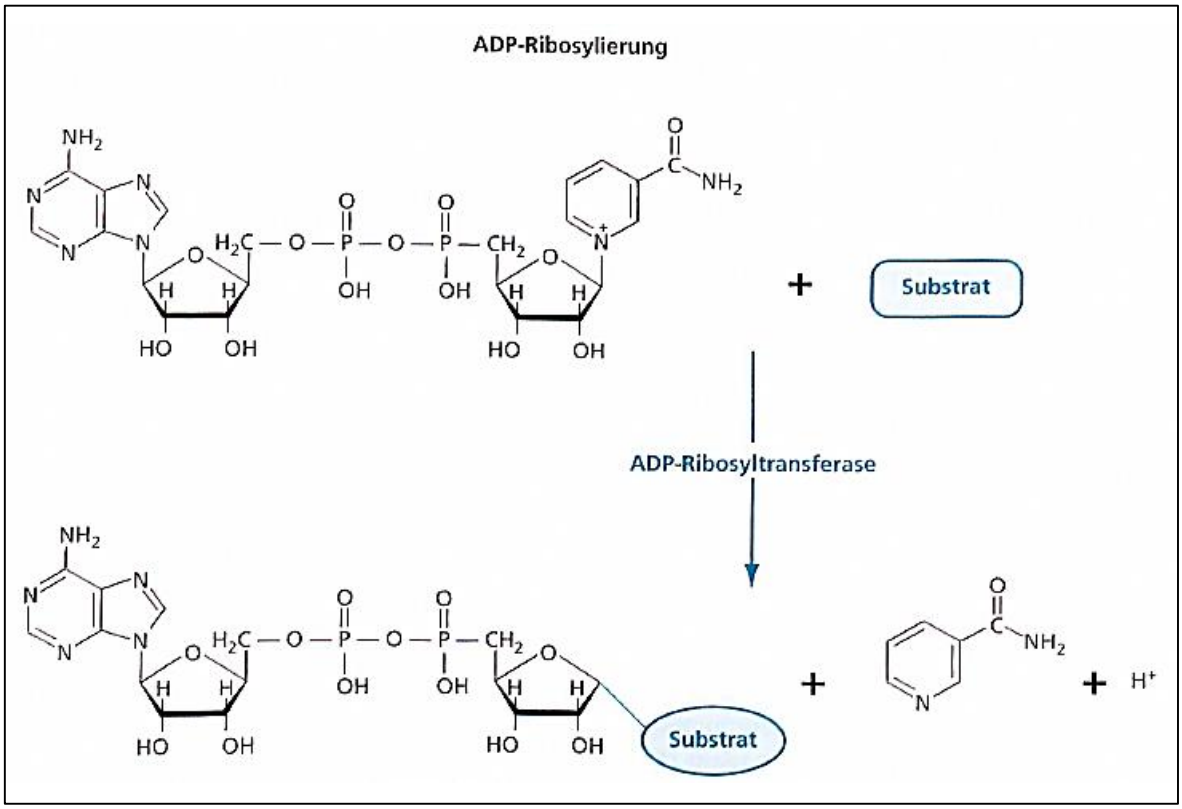

Abbildung 2 ADP-Ribosylierung von Proteinen (Abbildung aus (Barth et al. 2013) mit freundlicher Genehmigung der wissenschaftlichen Verlagsgesellschaft Stuttgart)

Tabelle 3 Überblick über verschiedene ADP-Ribosyltransferasen (Modifiziert aus (Holbourn et al. 2006))

Toxin	Organismus	Substrat
Diphtherie-Toxin	*Corynebacterium diphtheriae*	eEF2
Pseudomonas-Exotoxin	*Pseudomonas aeruginosa*	eEF2
Pertussis-Toxin	*Bordetella pertussis*	Gi, Gt, Gs-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
Cholera-Toxin	*Vibrio cholerae*	Gs-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
C3bot	*Clostridium botulinum*	RhoA, RhoB, RhoC
C3lim	*Clostridium limosum*	RhoA, RhoB, RhoC
C3stau	*Staphylococcus aureus*	RhoA, RhoB, RhoC, RhoE, Rnd3
VIP2	*Bacillus cereus*	Aktin
Iota-Toxin	*Clostridium perfringens*	Aktin
C2	*Clostridium botulinum*	Aktin
CST	*Clostridium spiriforme*	Aktin
***Clostridium difficile*-ADP-Ribosyltransferase (CDT)**	*Clostridium difficile*	Aktin

Das gegenwärtige Verständnis des Mechanismus der Katalyse ist, dass das NAD durch die ADP-Ribosyltransferase in einer Weise gebunden wird, die die Glykosidbindung des NAD der Hydrolyse zugänglich macht. Das „katalytische Glutamat“, das alle bekannten ADP-Ribosyltransferasen besitzen, bildet eine Wasserstoffbrücke mit der 2-OH-Gruppe des Ribose-Ringes. Diese Wechselwirkung stabilisiert eine positiv geladene Oxacarbenium-Ion-Zwischenstufe, welche dann durch ein neutrophiles Molekül (entweder das Protein-Substrat oder ein aktiviertes Wassermolekül) angegriffen wird (Holbourn et al. 2006). An der Bindung des NAD sind in den aktiven Zentren der verschiedenen ADP-Ribosyltransferasen die oftmals gleichen Aminosäuresequenzen beteiligt.

Beispiele für diese hoch konservierten Motive sind das STS (Serin-Threonin-Serin)-Motiv (Vogelsgesang et al. 2007), der PN (Phosphatnikotinamid)-Loop, das Arginin/Histidin-Motiv oder die α-3 Helix. Der ARTT (ADP-ribosyl-turn-turn)-Loop ist ein in allen C3-artigen Toxinen vertretenes Motiv zur Substraterkennung (Han und Tainer 2002). Abbildung 3 gibt einen Überblick über diese konservierten Aminosäuresequenzen einiger ADP-Ribosyltransferasen.

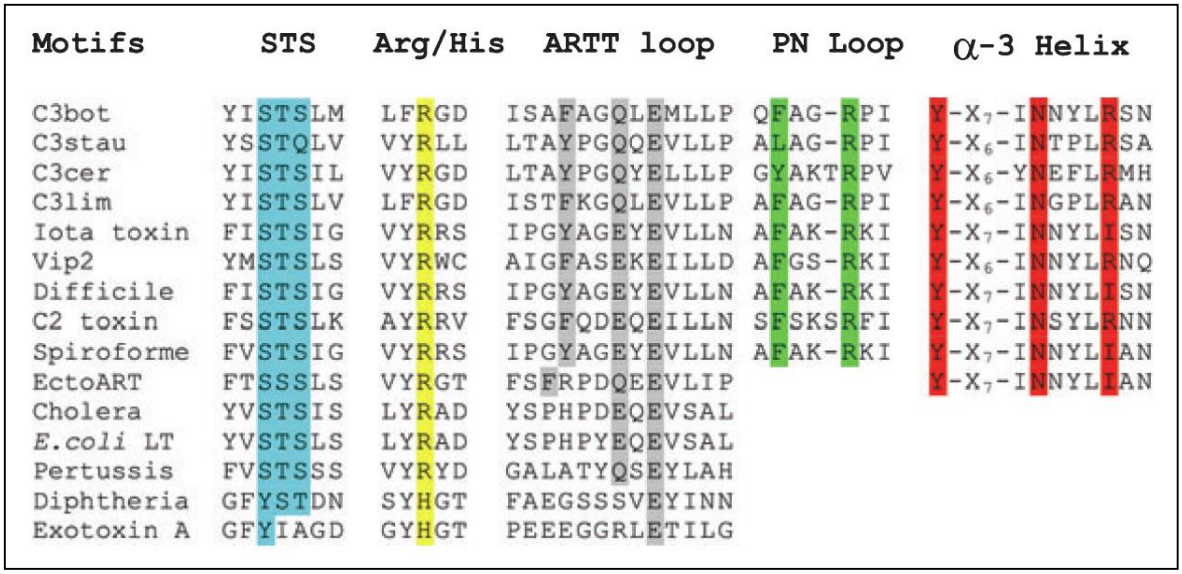

Abbildung 3 Überblick über die konservierten Motive verschiedener ADP-Ribosyltransferasen in ihren katalytischen Zentren. Farblich hervorgehoben sind jeweiligen Motive. (Abbildung aus (Holbourn et al. 2006) mit freundlicher Genehmigung des John Wiley and Sons Verlags)

1.3 Das C3-Exoenzym

Gegenwärtig sind sieben verschiedene C3-Exoenzyme bekannt. C3bot1 und 2 von *Clostridium botulinum* (Aktories und Frevert 1987), C3lim von *Clostridium limosum* , C3stau1, 2 und 3 von *Staphylococcus aureus* (Wilde et al. 2001) sowie C3cer von *Bacillus cereus* (Just, Schallehn et al. 1992). C3bot1 von *Clostridium botulinum* konnte erstmals in den Stämmen vom Typ C und D nachgewiesen werden und war das dritte entdeckte Toxin von *Clostridium botulinum*, neben dem Neurotoxin C1 und dem binären C2-Toxin (Aktories und Frevert 1987, Aktories et al. 1988, Rubin et al. 1988). Neben C3bot1 gibt es noch eine zweite von *Clostridium botulinum* produzierte Isoform, C3bot2, die eine zu 65 % identische

Aminosäuresequenz aufweist (Nemoto et al. 1991). Alle C3-Transferasen haben ein Molekulargewicht von ~25 kDa (Aktories et al. 2004) und sind phagenkodiert (Popoff et al. 1990, Sakaguchi et al. 2005). Sie alle mono-ADP-ribosyltransferieren RhoA, B und C am Aminosäurerest Asn41 und hemmen so die Rho-Aktivität. Da die Rho-Proteine wichtige Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts darstellen, kommt es nach dem Einbringen eines C3-Exoenzyms ins Zytosol einer Wirtszelle zu einem Verlust an Aktin-Filamenten und einer Veränderung der Zell-Morphologie, beispielsweise einer Abrundung der Zelle und der Bildung von Protrusionen (Barth et al. 1998, Chardin et al. 1989, Paterson et al. 1990, Ridley und Hall 1992).

Ein Kontrast zu den AB-Toxinen stellt die Tatsache dar, dass neben der eben beschriebenen A-Domäne, bislang keine B-Domäne bekannt ist. Aufgrund der extrem niedrigen zellulären Aufnahme war daher bislang vielmehr die Rede von einem Exoenzym als von einem Toxin und man ging davon aus, dass die Aufnahme von C3 durch unspezifische Pinozytose in die Zellen geschieht (Aktories et al. 2004, Just, Mohr et al. 1992). In Anwesenheit von hohen Konzentrationen an C3-Transferasen und mit langen Inkubationszeiten (24 - 48 h) konnte eine Aufnahme in verschiedene Zelllinien mit entsprechenden morphologischen Veränderungen nachgewiesen werden (Chardin et al. 1989, Verschueren et al. 1997, Wiegers et al. 1991). Eine effizientere Aufnahme der C3-Transferasen ins Zytosol der Zielzellen wurde durch eine Fusionierung an die B-Domäne anderer Toxine, etwa des C2-Toxins, erreicht. Durch die Schaffung dieser Fusionsproteine konnte das C3-Exoenzyme hocheffizient in Säugetierzellen transportiert werden (Barth et al. 1998).

In jüngeren Untersuchungen konnte in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden, dass bereits geringe Konzentrationen clostridialer C3-Transferasen ausreichen, um selektiv kultivierte makrophagenartige Zellen zu intoxikieren. So konnten die charakteristischen morphologischen Veränderungen in murinen J774A.1-Zellen bereits bei C3-Konzentrationen < 0,5 µg x ml^{-1} und einer Inkubationszeit von < 3 h nachgewiesen werden (Fahrer, Kuban et al. 2010) (Abbildung 4).

Diese und andere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe legen nahe, dass für die C3-artigen Exoenzyme spezifische Transportmechanismen in Makrophagen

bestehen. Höchstwahrscheinlich handelt es sich dabei um eine Endozytose mit anschließender Translokation aus angesäuerten Endosomen ins Zytosol (Fahrer, Kuban et al. 2010, Rohrbeck et al. 2014, Rotsch et al. 2012).

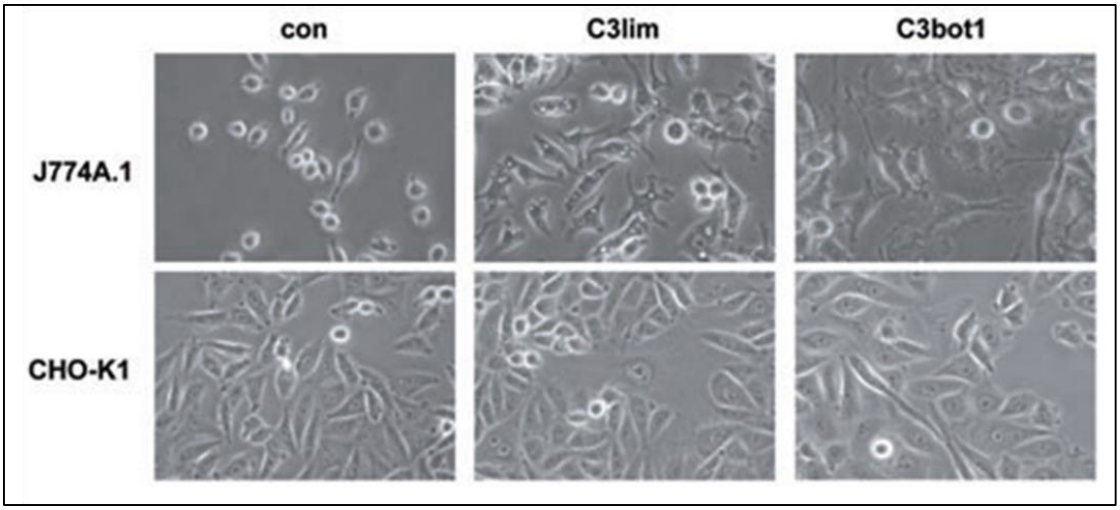

Abbildung 4 Effekt von C3lim und C3bot1 auf die Morphologie von CHO-K1- und J774A.1-Zellen. Links ist eine unbehandelte Kontrolle zu sehen (con). (Abbildung aus (Fahrer, Kuban et al. 2010) mit freundlicher Genehmigung des John Wiley and Sons Verlags)

Das in dieser Arbeit verwendete C3bot1E174Q ist eine Mutante des clostridialen C3bot1 welches an Position 174 der Aminosäure-Kette Glutamin statt Glutamat aufweist und dadurch enzymatisch inaktiv ist (Aktories et al. 1995).

1.4 Streptavidin: Aufbau und Biotinbindung

Streptavidin, das von Bakterien der Gattung *Streptomyces* produziert wird, und Avidin, welches ursprünglich aus Hühnereiweis isoliert wurde, sind strukturell (Livnah et al. 1993, Weber et al. 1989) und funktionell (Green 1975, Green 1990) gesehen zueinander analoge Proteine, die eine extrem hohe Affinität für das wasserlösliche Vitamin Biotin aufweisen ($K_d \approx 10^{-14}$-10^{-16} M). Während die Sekundär-, Tertiär- und Quartär-Struktur beider Proteine nahezu identisch ist, ist die Primär-Struktur nur moderat konserviert, mit einer Aminosäuren-Übereinstimmung von 41 % (Laitinen et al. 1999). Beide weisen ein Molekulargewicht von ~67 kDa auf und zeigen sich äußerst resistent gegenüber

Hitze (Gonzalez et al. 1999), Denaturantien (Ross et al. 1986, Rybak et al. 2004), Detergentien, niedrigem oder hohem pH (Green 1975) und Proteolysen (Ellison et al. 1995, Green 1975). Im Weiteren ist lediglich von dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Streptavidin die Rede.

Das Endprodukt, das sogenanntes „Core-Streptavidin“, besteht aus 129 Aminosäuren und entsteht durch die Abspaltung mehrerer Aminosäuren an den N- und C-Termini des posttranslationalen Proteins (Argarana et al. 1986, Bayer et al. 1989, Pahler et al. 1987). Die Untereinheiten des Streptavidins bestehen aus acht antiparallelen β-Strängen und deren verbindenden Schleifen (Hendrickson et al. 1989, Livnah et al. 1993, Pugliese et al. 1993, Weber et al. 1989). Diese falten sich als klassische antiparallele „β-barrels“ und die endgültige quartäre Struktur des Proteins ist als eine kombinierte Einheit aus allen vier „β-barrels“ geformt. Die Biotin-Bindungsstelle ist am Ende der einzelnen „β-barrels“ lokalisiert. Da das Wildtyp-Streptavidin als tetrameres Molekül mit vier „Core-Streptavidin“-Monomeren auftritt, ergeben sich so vier Biotin-Bindungsstellen (Green 1975).

Durch Wasserstoffbrücken-Bindungen, Anordnung lipophiler AS, hydrophobe Wechselwirkungen durch aromatische AS, sowie durch Modulationen der Tertiär- und Quartär-Strukturen nach Biotinbindung (Livnah et al. 1993, Weber et al. 1989), resultiert die hohe Affinität für Biotin an der Bindungsstelle. Darüber hinaus wird die Passgenauigkeit der Bindungsstelle während der Abwesenheit von Biotin durch fünf H_2O-Moleküle, die als Mimikry fungieren, aufrecht erhalten (Livnah et al. 1993).

In den folgenden Kapiteln wird von Streptavidin13 (Stv13) und Streptavidin43 (Stv43) die Rede sein. Dabei stellt Stv13 eine tetramere Mutante mit einer gegenüber Wildtyp-Streptavidin erhöhten Struktur-Stabilität und besseren Zugänglichkeit zu biotinylierter DNA (Sano et al. 1995) dar. Stv43 steht für eine dimere Streptavidin-Mutante, welche mit einem K_d-Wert von $1{,}5 \times 10^{-7}$ M eine herabgesetzte Bindungsaffinität für Biotin zeigt (Sano et al. 1997).

1.5 Zielsetzung

Monozyten und Makrophagen sind wichtige Bestandteile des Immunsystems, welche eng mit inflammatorischen Prozessen und der Kanzerogenese assoziiert sind. Diese Zelltypen repräsentieren daher äußerst attraktive und vielversprechende Ziele für einen gerichteten Arzneimitteltransport und zur genetischen Manipulation, beispielsweise im Rahmen einer Gentherapie. Bislang gibt es jedoch nur unzureichende virale und nicht-virale Methoden, um Leukozyten spezifisch zu modifizieren und beispielsweise DNA in Zellen einzuschleusen.

Jüngst konnte in der Arbeitsgruppe von Prof. Holger Barth demonstriert werden, dass C3bot selektiv in Makrophagen und Monozyten internalisiert wird und dort mittels ADP-Ribosylierung von Rho eine Remodellierung des Aktinzytoskeletts auslöst, wohingegen andere epitheliale Zellen wie HelaS3 sowie weitere Zelltypen nicht sensitiv gegenüber C3bot sind (Fahrer, Kuban et al. 2010). Die Aufnahme von C3bot in Makrophagen/Monozyten erfolgt dabei durch spezifische Endozytose und anschließende Translokation aus frühen Endosomen in das Zytosol. Interessanterweise steht eine Mutante von C3bot zur Verfügung, welche keine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität mehr aufweist und somit die Funktionen von Rho nicht beeinflusst (Aktories et al. 1995). Diese C3-Mutante wird ebenso effizient in das Zytosol aufgenommen wie das wildtypische C3-Protein und eignet sich daher zur Herstellung eines „molekularen trojanisches Pferdes“ (Pardridge 2002), welches den spezifischen Transport in Makrophagen ermöglicht. Die C3 Mutante soll dann mit Streptavidin genetisch fusioniert werden, welches eine hohe Affinität zu Biotin besitzt und als Adapter für eine Vielzahl biotinylierter Makromoleküle wie siRNA oder Proteinen dient. Ein vergleichbarer Ansatz wurde vor kurzem erfolgreich in der Arbeitsgruppe von Prof. Barth umgesetzt und führte zur Entwicklung des binären C2-Streptavidin Transporters, der jedoch keine Zelltyp-Selektivität besitzt und für alle Säugetierzellen Verwendung findet (Fahrer, Plunien et al. 2010).

Ziel dieser experimentellen Doktorarbeit ist die Etablierung eines neuartigen, selektiven Transportsystems für Makrophagen und Monozyten, basierend auf der inaktiven C3-ADP-Ribosyltransferase von *Clostridium botulinum* und Streptavidin. Das C3-Protein soll hierzu mit Streptavidin als rekombinantes Fusionsprotein

exprimiert werden. Nach erfolgreicher Isolierung muss dann eine ausführliche biochemische Charakterisierung des Fusionsproteins im Hinblick auf Zellgängigkeit und Biotinbindung stattfinden. Im Anschluss daran sollen schließlich biotinylierte (Makro)Moleküle wie Fluorescein-Biotin spezifisch in Makrophagen eingebracht werden. Die erfolgreiche Herstellung eines solchen spezifischen Transporters könnte zukünftig für eine therapeutische Anwendung von großer Bedeutung sein.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 4 Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank C150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Elektrophoresekammer klein **mittel** **groß**	Werkstatt Uni Ulm, Deutschland Peqlab Biotech, Erlangen, Deutschland Amersham, Freiburg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Cell Observer Z1	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Gefriertruhe -20 °C	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefriertruhe -80 °C	Hera Freeze Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlschrank	Bosch, Giengen, Deutschland
Magnetrührer RET basic C	IKA, Staufen, Deutschland
pH-Meter InoLap	WTW, Weilheim, Deutschland
Mikroskop Axiovert CFL 40	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Pipetten	Gilson, Middleton, USA
Photometer Gene Quant *pro*	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Schüttler Certomat BS1	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Schüttler Certomat H	Braun, Melsungen, Deutschland
Schüttler Certomat U	Braun, Melsungen, Deutschland
Sonifizierer Sonifier B-12	Branson, Dietenbach, Deutschland
Spektrophotometer DU 640	Beckman-Coulter, Fullerton, USA
Thermocycler TGradient	Biometra, Burladingen-Hausen, Deutschland

Thermomixer Comfort		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transilluminator IL 200M		Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Trockenschrank Gilowy		Meteor, Berlin, Deutschland
Überkopfschüttler Bio Rotator		BioSan, Riga, Lettland
Vakuum-Desikator		Glaswerk Wertheim, Wertheim, Deutschland
Video documentation system CF8/1 DX		Kappa, Gleichen, Deutschland
Vortexer Reax top		Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Wippe Duomax		Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Wippe Unimax		Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Zentrifugen:	**Centrifuge 5415D**	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	EBA 22	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
	Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau, Deutschland
	Zentrifuge CH-J2-HS	Beckman, Coulter, USA

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 5 Auflistung der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	**Bezugsquelle**
0,25 % Trypsin Ethylendiamintetraessigsäure Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
2-Propanol	Fluka, Buchs, Schweiz
6-Biotin-17-NAD (Nikotinamidadenindinukleotid)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar Agar Serva high gel-strength	Serva, Heidelberg, Deutschland
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ß-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz

Biotin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Biotinylierter Marker	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Biotinyliertes Oligonukleotid	Thermo Scientific, Ulm, Deutschland
Bromphenolblaunatriumsalz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Bovines Serum Albumin, Fraktion V (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Complete® Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim, Deutschland
Coomassie-Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Coomassie-Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg, Deutschland
Coumarsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Deoxynucleoside triphosphate (dNTP) mix	Peqlab Biotech GmbH, Erlangen, Deutschland
Digitonin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DNA molecular weight marker (Smart Ladder®)	Eurogentec, Köln, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat (EDTA)	Fluka, Buchs, Deutschland
Entwickler RTU 60	Adefo, Dietzenbach, Deutschland
Essigsäure 100 %	Fluka, Buchs, Schweiz
Ethanol p.A	Riedel-de Haen, Seelze, Deutschland
Ethidium-Bromid (EtBr)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Fixierer RTU 60	Adefo, Dietzenbach, Deutschland
Fluorescein-Biotin (F-Biotin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Glutathion	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glutathion SepharoseTM 4B	Amersham Bioscience, Uppsala, Schweden
Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bacto Hefeextrakt	Serva, Heidelberg, Deutschland

Hoechst	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Immobilon Western Chemiluminescent Horseradish Peroxidase (HRP) Substrate	Milipore, Billerica, USA
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumpyruvat	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Kristall-Violett	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
L-Glutamin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Luminol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium Dodecyl Sulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Page ruler prestained protein ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Page ruler stained protein ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Page stain blue Coomassie	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Phalloidin-Alexa 594	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate Tween 20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
ProLong™ Gold Antifade Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Reporter Lysis Buffer	Promega, Madison, USA
Rotiphorese Gel 30 30 % Acrylamid/BIS (37.5:1 mix)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Streptavidin-Peroxidase (Strep-POD)	Roche, Mannheim, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Thrombin	Amersham, Braunschweig, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	USB Corporation, Cleveland, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Bacto Trypton	Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H2O2) 30 %	J. T. Baker, Griesheim, Deutschland
Xylencyanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 6 Auflistung verwendeter eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	**ATCC®-Nummer**
CHO-K1	CCL-61
HeLa	CCL-2
J774A.1	TIB-67
Vero	CCL-81

2.1.4 Medien und Zusätze zur Arbeit mit Zellkulturen

Tabelle 7 Auflistung verwendeter Medien und Zusätze zur Arbeit mit Zellkulturen

Medium	**Bezugsquelle**
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
McCoy's 5A-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Minimum Essential Medium (MEM)	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Zusatz	**Bezugsquelle**
Fötales Kälber Serum	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumpyruvat	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Nicht-essentielle Aminosäuren	Gibco, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 1000 mg/ml	Gibco, Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 Bakterienstämme

Tabelle 8 Auflistung verwendeter Bakterienstämme

Bakterienstamm	**Bezugsquelle**
***Escherichia coli* DH5α (*E. coli* DH5α)**	Clontech/ITC Biotechnology, Heidelberg, Deutschland (zur Verfügung gestellt durch das Institut für Pharmakologie, Universität Ulm)
***Escherichia coli* BL21-DE3 (*E. coli* BL21-DE3)**	Novagene, Madison, USA (zur Verfügung gestellt durch das Institut für Pharmakologie, Universität Ulm)

2.1.6 Medien und Zusätze zur Arbeit mit Bakterienstämmen

Tabelle 9 Auflistung verwendeter Medien und Zusätze zur Arbeit mit Bakterienstämmen

Medium	**Zusammensetzung**
1 x Lysogeny Broth Medium (LB-Medium)	10 g Trypton (1 % w/v) 5 g Hefeextrakt (0,5 % w/v) 10 g NaCl (1 % w/v) ad 1 l H_2O bidest
Zusatz	**Bezugsquelle**
Ampicillin 100 µg/ml steril filtriert	Serva, Heidelberg, Deutschland
Chloramphenicol 34 µg/ml steril filtriert	Serva, Heidelberg, Deutschland
Kanamycin 50 µg/ml steril filtriert	Serva, Heidelberg, Deutschland
Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2.1.7 Transformierte Plasmide

Tabelle 10 Auflistung verwendeter transformierter Plasmide

Plasmid	**Bezugsquelle**
pCR®-Blunt	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pGEX2T (innerhalb des Glutathion S-Transferase [GST] Gen-Fusions-System)	Amersham, Freiburg, Deutschland

pGEX2T-C3bot1E174Q	K. Aktories; Universität Freiburg
pTSA-13 (Stv13)	Addgene, Cambridge, USA
pQE-43 (Stv43)	Addgene, Cambridge, USA
pGEX2T-Stv13-C3bot1E174Q	H. Christow, Universität Ulm
pGEX2T-Stv43-C3bot1E174Q	H. Christow, Universität Ulm

2.1.8 Oligonukleotide (Primer) und Enzyme

Tabelle 11 Auflistung verwendeter Oligonukleotide und Enzyme (alle aufgeführten Oligonukleotide wurden von Thermo Scientific, Ulm, Deutschland bezogen)

PCR-Primer	**Sequenz**
C3mut-forward	5'-TTCCGGATCCGGTGGTGGTTCTGCTTATTC-3'
C3mut-reverse	5'-CACGATGAATTCTTAAGGATTGATAGC-3'
Stv13-forward	5'-GAATTCAGATCTGGCATCACCGGCACC-3'
Stv13-reverse	5'-GCCCTTGGATCCGCCACCCGACACCTTGG-3'
Sequenzierungs-Primer	**Sequenz**
M13-forward (um die 5´-Enden der pCR®-Blunt inserts zu sequenzieren)	5´-TGTAAAACGACGGCCAGT-3´
M13-reverse (um die 3´-Enden der pCR®-Blunt inserts zu sequenzieren)	5´-CAGGAAACAGCTATGACCA-3´
pGEX5´ (um die 5´-Enden der Stv13/43-C3bot1E174Q-Inserts zu sequenzieren)	5´-CTGGCAAGCCACGTTTGG-3´
pGEX3` (um die 3´-Enden der Stv13/43-C3bot1E174Q-Inserts zu sequenzieren)	5`-GGAGCTGCATGTGTCAGAG-3´
Enzym	**Bezugsquelle**
Pwo-DNA-polymerase	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Taq-DNA-polymerase	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Antarktische Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland
Restriktionsenzyme (BamHI, BglII, EcoRI)	New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland

2.1.9 Antikörper

Tabelle 12 Auflistung verwendeter Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	**Organismus**	**Bezugsquelle**
Anti-C3bot1E174Q	Kaninchen	Pineda, Berlin, Deutschland
Anti-EEA1	Kaninchen	Acris, Herford, USA
Anti-Hsp90	Maus	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Deutschland
Anti-Streptavidin	Kaninchen	Abcam, Cambridge, England
Sekundärantikörper	**Organismus**	**Hersteller**
Anti-mouse	Ziege	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Deutschland
Anti-rabbit	Ziege	Santa Cruz Biotech, Heidelberg, Deutschland
Anti-rabbit-Alexa 568	Ziege	Abcam, Cambridge, England

2.1.10 Sonstige Materialien

Tabelle 13 Auflistung verwendeter sonstiger Materialien

Material	**Bezugsquelle**
Blotting-Papier	Macherey & Nagel, Düren, Deutschland
Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland
Dialyseschlauch Snake Skin	Thermo Scientific, Rockford, USA
Dialyseschlauch Zellu Trans	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dot Blot-Apparatur	Biometra, Göttingen, Deutschland
Glasmaterialien (Erlenmeyerkolben, Bechergläser, Pasteur Pipetten, Flaschen usw.)	Brand, Wertheim, Deutschland Schott, Mainz, Deutschland
Kunststoff Einwegmaterialien (Zellschaber, Pipetten, 15 ml und 50 ml Reaktionsgefäße, Petrischalen usw.)	Renner GmbH, Dannstadt, Deutschland Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland TPP, Trasadingen, Deutschland
Protran Nitrozellulose-Membran	Whatman, Dassel, Deutschland
Nylon Hi Bond Membran	GE Healthcare, München, Deutschland

Objektträger	Menzel Gläser, Braunschweig, Deutschland
Röntgenfilme Cronex 5	AGFA, Köln, Deutschland
Spritzen & Kanülen	Braun, Melsungen, Deutschland
UV-Quarz-Küvette	Hellma, Müllheim, Deutschland
Zählkammer nach Neubauer	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.11 Kits

Tabelle 14 Auflistung gebrauchsfertiger, in der Arbeit verwendeter Kits

Kit	Bezugsquelle
ABI PRISM® BigDye™ Terminator v2.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NucleoSpin® Extract II	Macherey Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid	Macherey Nagel, Düren, Deutschland
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Macherey Nagel, Düren, Deutschland

2.1.12 Häufig verwendete Puffer

Tabelle 15 Auflistung häufig verwendeter Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Phosphat Buffered Saline (1 x PBS)	8,0 g NaCl (137 mM) 0,2 g KCl (2.7 mM) 1,44 g NaH_2PO_4 (8 mM) 0,24 g KH_2PO_4 (1.8 mM) ad 1 l H_2O mit HCl auf pH 7,4 einstellen
Phosphat Buffered Saline + Tween (1 x PBS-T)	8,0 g NaCl (137 mM) 0,2 g KCl (2.7 mM) 1,44 g NaH_2PO_4 (8 mM) 0,24 g KH_2PO_4 (1.8 mM) 1 ml Tween 20 (0,1 %) ad 1 l H_2O mit HCl auf pH 7,4 einstellen

Strip Puffer	100 mM ß-Mercaptoethanol 2 % SDS 67,5 mM Tris-HCl pH 6,8 ad 10 ml H_2O

2.2 Methoden

2.2.1 Klonierung der Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q

2.2.1.1 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Mithilfe der PCR lässt sich eine ausgewählte DNA-Region nach Belieben oft amplifizieren (Mullis et al. 1986). Hierbei dient ein Stück Einzelstrang-DNA als Matrize, um neue Doppelstrang-DNA zu erhalten. Diese wird durch eine hitzestabile DNA-Polymerase synthetisiert, indem man die vier Deoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTPs) hinzugibt. Als Primer der DNA-Synthese dient ein Paar DNA-Oligonukleotide. Die PCR wurde in einem Thermocycler (TGradient, Biometra, Burladingen-Hausen, Deutschland) durchgeführt.

Die Gene für Stv13 und Stv43 wurde beide mithilfe des 5‘-Primers Stv13-forward, welcher eine *Bgl*II- und eine *Eco*RI-Schnittstelle besitzt, und des 3‘-Primers Stv13-reverse, welcher über eine *Bam*HI-Schnittstelle verfügt, amplifiziert.

Stv13-forward 5‘-GAATTCAGATCTGGCATCACCGGCACC-3‘

Stv13-reverse 5‘-GCCCTTGGATCCGCCACCCGACACCTTGG-3‘

Das Gen für C3bot1E174Q wurde mit dem 5‘-Primer C3mut-forward, der eine *Bam*HI-Schnittstelle besitzt und dem 3‘-Primer C3mut-reverse, der eine *Eco*RI-Schnittstelle beinhaltet, amplifiziert.

C3mut-forward 5’-TTCCGGATCCGGTGGTGGTTCTGCTTATTC-3’

C3mut-reverse 5’-CACGATGAATTCTTAAGGATTGATAGC-3’

Neben den Schnittstellen beinhalten die Primer außerdem Sequenzen für einen acht AS langen Gly/Ser-Linker zwischen den kodierenden Sequenzen für die Stv-Proteine und das C3bot1E174Q-Protein.

In den Tabellen 16 und 17 findet sich ein Überblick über die Zusammensetzung der PCR-Ansätze und die Details der PCR-Programme.

Tabelle 16 PCR-Reaktionen

Zusatz	**Mengenangabe für das Stv13-Gen**	**Mengenangabe für das Stv43-Gen**	**Mengenangabe für das C3bot1E174Q-Gen**
Chromosomale DNA	400 ng (pTSA-13)	400 ng (pQE-43)	400 ng (pGEX2T-C3botE174Q)
Pwo-DNA-Polymerase	1 U	1 U	1 U
10 x Pwo-Reaktions-Puffer	1 x	1 x	1 x
Forward-Primer	0,3 µM (Stv13-forward)	0,3 µM (Stv13-forward)	0,3 µM (C3mut-forward)
Reverse-Primer	0,3 µM (Stv13-reverse)	0,3 µM (Stv13-reverse)	0,3 µM (C3mut-reverse)
dNTP-Mix	200 µM	200 µM	200 µM
ddH_2O	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 50 µl

Tabelle 17 PCR-Programm

Programm-Schritt	**Temperatur- und Zeitangabe für das Stv13- / Stv43-Gen**	**Temperatur- und Zeitangabe für das C3bot1E174Q-Gen**	
Initiale Denaturierung	98 °C, 120 s	98 °C, 120 s	
Denaturierung	98 °C, 15 s	98 °C, 15 s	30 Zyklen
Annealing	68 °C, 30 s	62 °C, 30 s	
Elongation	68 °C, 45 s	68 °C, 100 s	
Finale Elongation	68 °C, 420 s	68 °C, 420 s	
Ende	8 °C	8 °C	

2.2.1.2 Agarose-Gel-Elektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese lassen sich die in der PCR gewonnenen DNA-Stränge nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld auftrennen und analysieren. Die negativ geladenen Nukleotide wandern dabei durch ein 1,5 %-iges Agarose-Gel bei einer angelegten Spannung von 100 V und einer Stromstärke von 210 mA über eine Stunde zum Pluspol. Dazu wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1 x TAE-Puffer gekocht und die DNA wurde mit 5 µl Ethidium-Bromid gefärbt.

In der Analyse des aufgeschnittenen pGEX2T-Vektors wurde auch ein 1 %-iges Agarose-Gel verwendet, bei dem die DNA mit 50 µl Kristallviolett gefärbt wurde (2.2.1.11).

Um die PCR-Produkte zu analysieren, wurde jede Probe mit 6 x DNA-Ladepuffer versetzt (Endkonzentration 1 x) und auf das Gel geladen. Als Marker wurde der DNA-Marker SmartLadder® (Eurogentec, Köln, Deutschland) verwendet. Die gefärbte DNA wurde anschließend mit einem UV-Transilluminator (Transilluminator IL 200M, Bachofer, Reutlingen, Deutschland) bei einer Wellenlänge von λ= 312 nm visualisiert und mithilfe eines Video-Dokumentations-Systems (Video documentation system CF8/1 DX, Kappa, Gleichen, Deutschland) dokumentiert. Die Tabellen 18 bis 20 geben einen Überblick über die Zusammensetzungen der verwendeten Gele und Puffer.

Tabelle 18 Zusammensetzung für 1,5 %-iges Agarose-Gel

Zusatz	**Menge**
Agarose	1.5 g
1 x TAE-Puffer	100 ml
Ethidium-Bromid	5 µl

Tabelle 19 Zusammensetzung für 1 x TAE-Puffer

Zusatz	Menge
Tris	40 mM
EDTA	1 mM
Essigsäure 100 %	0.1 %

Tabelle 20 Zusammensetzung für 6 x DNA-Ladepuffer (pH 7,4) (Ethidium-Bromid-Färbung)

Zusatz	Menge
Tris	10 mM
Bromphenolblaunatriumsalz	0.03 %
Xylencyanol	0.03 %
Glycerin	60 %
EDTA	60 mM

2.2.1.3 DNA-Extraktion aus Agarose-Gel

Nach Analyse der PCR-Produkte wurden die DNA-Fragmente mithilfe des Silicat-Membran basierten Kits NucleoSpin® Extract II (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) aus dem Agarose-Gel extrahiert. Dies wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde anschließend ein 1,5 %-iges Agarose-Gel mit dem Extrakt beladenen und eine Elektrophorese, wie in 2.2.1.2 angegeben, durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung des Extrakts wurde mittels densitrometrischer Auswertung mit Hilfe der Anwendung *Adobe® Photo Shop* (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) durchgeführt.

2.2.1.4 DNA-Ligation

Mithilfe der T4-DNA-Ligase wurden die extrahierten DNA-Fragmente (Inserts) in einen linearisierten, bakteriellen Vektor ligiert. Die Menge an zu verwendenden Inserts wurde gemäß der Formel $\frac{10 \times x\ bp \times 25\ ng\ (PCR-Blunt)}{3500\ bp}$ berechnet, wobei x für

die Menge an Basenpaaren des jeweiligen Inserts steht. Diese entspricht für Stv13 = 381 bp, für Stv43 = 333 bp und für C3bot1E174Q = 640 bp. In den Tabellen 21 bis 24 sind die Ansätze zu den jeweiligen Ligations-Reaktionen dargestellt.

Tabelle 21 Ansatz zur Ligation der Inserts Stv13 / Stv43 / C3bot1E174Q in linearisierten pCR®-Blunt-Vektor

Zusatz	**Menge**
pCR®-Blunt	25 ng
Insert	Molares Verhältnis von Insert : pCR®-Blunt 10:1
10 x Ligations-Puffer (mit ATP)	1 x
T4-DNA-Ligase	4 U
ddH_2O	ad 10 µl

Tabelle 22 Ansatz zur Ligation der Inserts Stv13 / Stv43 in linearisierten pGEX2T-Vektor

Zusatz	**Menge**
pGEX2T	25 ng
Insert	Molares Verhältnis von Insert : pGEX2T 10:1
10 x Ligations-Puffer (mit ATP)	1 x
T4-DNA-Ligase	600 U
ddH_2O	ad 10 µl

Tabelle 23 Ansatz zur Ligation des Inserts C3bot1E174Q in linearisierten pGEX2T-Stv13 / -Stv43-Vektor

Zusatz	**Menge**
pGEX2T-Stv13 / Stv43	25 ng
Insert	Molares Verhältnis von Insert : pGEX2T 10:1
10 x Ligations-Puffer (mit ATP)	1 x
T4-DNA-Ligase	600 U
ddH_2O	ad 15 µl

Alle Ligationsansätze wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.2.1.5 Vorbereitung und Verwendung von LB-Medium und LB-Agar-Platten

Vor der Kultivierung der Bakterienstämme *E. coli* DH5α oder BL21-D3 wurde das LB-Medium zunächst autoklaviert und dann bei 4 °C gelagert. Vor der Verwendung wurde es mit dem entsprechenden Antibiotikum, Ampicillin 100 µg/ml, Chloramphenicol 34 µg/ml oder Kanamycin 50 µg/ml versetzt, um die Bakterien mit dem jeweiligen Resistenz-Gen auf dem entsprechenden Plasmid zu selektieren.

Die LB-Agar-Platten wurden für das selektive Wachstum der genannten Bakterienstämme in einzelnen Kolonien hergestellt. Dazu wurde dem LB-Medium 2 % Agar hinzugefügt, der Ansatz wurde autoklaviert und anschließend mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt, bevor er in Petrischalen gegossen wurde, um bei 4 °C gelagert zu werden.

2.2.1.6 Transformation kompetenter Bakterienstämme (Hitze-Schock-Methode)

Um die in 2.2.1.4 ligierten Plasmide in die Bakterienstämme zu transformieren, wurde die sogenannte Hitze-Schock-Methode angewandt. Dazu wurden die *E. coli*-Stämme DH5α oder BL21-D3 kurz auf Eis vorinkubiert. Es wurden 2 µl des jeweiligen Plasmids zugefügt und für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgte der Hitze-Schock bei 42 °C für 90 Sekunden, danach weitere zwei Minuten Inkubation auf Eis. Als nächstes wurden 500 µl LB-Medium (versetzt mit 20 mM Glucose) hinzugefügt und das Ganze wurde für eine Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler (Certomat H und U, Braun, Melsungen, Deutschland) inkubiert. Es folgte das Ausplattieren der transformierten Bakterien auf die LB-Agar-Platten, welche mit dem jeweiligen Antibiotikum versetzt waren, gegen das die verwendeten Bakterienstämme kompetent sind. Die Menge an ausplattiertem Ansatz wurde zwischen 100 µl und 500 µl variiert, um die optimale Wachstumsdichte zu finden. Die Agar-Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (C150, Binder, Tuttlingen, Deutschland) inkubiert.

2.2.1.7 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR ist eine Methode, um Plasmide direkt in Bakterienkolonien zu untersuchen und damit festzustellen, ob es sich um positive Klone handelt, bei denen die Transformation erfolgreich war. Zunächst wurde ein PCR-Ansatz für die jeweilige Kolonie-PCR hergestellt. Die Primer entsprachen für das jeweilige Gen jenen aus 2.2.1.1.

Tabelle 24 Kolonie-PCR-Ansatz für pCR®-Blunt-Stv13 / -Stv43 / -C3bot1E174Q

Zusatz	**Menge**
Taq-Polymerase	1 U
10 x Taq-Reaktions-Puffer	1 x
Forward-Primer	0,3 µM
Reverse-Primer	0,3 µM
dNTP-Mix	200 µM
ddH_2O	ad 50 µl

Anschließend wurden in jeweils ein PCR-Röhrchen 50 µl PCR-Ansatz und eine kleine Menge der jeweiligen Bakterienkolonie von einer Agar-Platte zusammengebracht. Für die nachfolgende Aufreinigung des möglicherweise positiven Klons wurde wiederum eine kleine Menge derselben Kolonie auf eine neue Agar-Platte aufgetragen (Backup-Platte), welche wieder bei 37 °C über Nacht inkubiert wurde. Die PCR wurde in einem Thermocycler (TGradient, Biometra, Burladingen-Hausen, Deutschland) durchgeführt, das PCR-Programm entspricht jenem aus 2.2.1.1 (Tabelle 17).

Um die positiven Klone detektieren zu können, wurden im Anschluss an die PCR für jede Probe jeweils 10 µl einer Reaktions-Probe zusammen mit 2 µl 6 x DNA-Ladepuffer wie in 2.2.1.2 beschrieben auf 1,5 %-iges Agarose-Gel geladen und eine Elektrophorese durchgeführt und analysiert.

2.2.1.8 Plasmid-DNA-Präparation

Die Plasmid-DNA-Präparation dient der Isolation und Aufreinigung von high-copy Plasmiden aus *E. coli*-Kulturen. Die detektierten positiven Klone aus 2.2.1.7 wurden von den Backup-Platten gepickt und zur Beimpfung von 7 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum verwendet. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler (Certomat BS1, Sartorius, Göttingen, Deutschland) inkubiert. Für die Aufreinigung von 4 x 1,5 ml gesättigter *E. coli*-Kultur (Mini-Präparation) wurde das Kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) verwendet. Dies wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt, mit der Ausnahme, dass für die Elution der DNA 30 µl H_2O verwendet wurden. Für die Aufreinigung von 100 ml Kultur (Midi-Präparation) wurde das Kit NucleoBond® Xtra Midi (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) verwendet, bei dem sich im Allgemeinen an das Protokoll des Herstellers gehalten wurde. Abweichungen vom Protokoll sind im Folgenden beschrieben: Die Bakterien wurden direkt durch Zentrifugation bei 5.000 g für zehn Minuten bei Raumtemperatur zu einem Pellet verdichtet (Zentrifuge EBA 22, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Die gelöste DNA wurde unter Zentrifugation bei 10.000 g für 30 min bei 4 °C präzipitiert (Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das DNA-Pellet wurde nach dem Waschschritt bei 15.000 g für fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und in einem Vakuum-Dessikator getrocknet. Für die Lösung des DNA-Pellets wurden 70 µl H_2O verwendet.

2.2.1.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Um die Konzentration der isolierten DNA aus 2.2.1.8 zu bestimmen, wurde das Absorptionsmaß bei 260 nm in einer UV Quarz Küvette mit einem Photometer (Photometer Gene Quant *pro*, Amersham Biosciences, Freiburg) gemessen. Hierbei wurde neben der Konzentration auch die Reinheit der Probe bestimmt, womit eine Kontamination durch andere Proteine ausgeschlossen werden konnte.

2.2.1.10 Sequenzierung der DNA

Die Sequenzierung von DNA ist eine Methode die durch Sanger et al. entwickelt wurde (Sanger et al. 1977), um die genaue Nukleotidabfolge innerhalb eines DNA-Moleküls zu bestimmen. Mittels der Sequenzierung konnte die klonierte DNA auf Fehler in der Nukleotidabfolge kontrolliert werden. Die Sequenzierung wurde in Zusammenarbeit mit Frau Gierschik mit dem ABI PRISM® BigDye™ Terminator v2.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) oder durch die Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt.

2.2.1.11 Restriktions-Verdau der Plasmid-DNA

Um die Gensequenz der finalen Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und Stv43-C3botE174Q zusammenfügen zu können, mussten die verschiedenen Plasmide mit den einzelnen Komponenten an bestimmten Stellen der Arbeit mithilfe von Restriktions-Enzymen verdaut werden. So konnten die einzelnen Inserts aus den pCR-Blunt®-Vektoren geschnitten werden oder die pGEX2T-Vektoren an bestimmten Stellen geöffnet werden, um Sie wieder mit einem Insert zu ligieren (2.2.1.4). Die Tabellen 25 und 26 zeigen die Ansätze der Verdau-Reaktionen.

Tabelle 25 Verdau-Ansatz für Restriktion der Plasmide pCR-Blunt®-Stv13, pCR-Blunt®-Stv43 und pGEX2T

Zusatz	**Menge für das pCR-Blunt®-Stv13 / -Stv43-Plasmid**	**Menge für das pGEX2T-Plasmid**
Plasmid-DNA	3 µg	5 µg
***Bam*HI**	20 U	20 U
***Bgl*II**	20 U	-
10 x Tango-Puffer	1 x	1 x
100 x BSA	1 x	1 x
ddH_2O	ad 50µL	ad 50 µl

Die Ansätze wurden für drei Stunden auf dem Schüttler (Certomat H und U, Braun, Melsungen, Deutschland) bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 26 Verdau-Ansatz für Restriktion der Plasmide pCR-Blunt®-C3bot1E174Q, pGEX2T-Stv13 und pGEX2T-Stv43

Zusatz	**Menge für pCR-Blunt®-C3bot1E174Q-Plasmid**	**Menge für pGEX2T-Stv13 / -Stv43-Plasmid**
Plasmid-DNA	5 µg	3 µg
***Bam*HI**	10 U	10 U
***Eco*RI**	10 U	10 U
10 x *Eco*RI-Puffer	1 x	1 x
100 x BSA	1 x	1 x
ddH_2O	ad 50 µl	ad 50 µl

Die Ansätze wurden für zwei Stunden auf dem Schüttler (Certomat H und U, Braun, Melsungen, Deutschland) bei 37 °C inkubiert.

Um die Ergebnisse der Restriktionen visualisieren zu können, wurden jeweils 3 µl der Verdau-Ansätze auf ein 1,5 %-iges Agarose-Gel geladen und analysiert, wie in 2.2.1.2 beschrieben. Anschließend wurde der Rest des jeweiligen Ansatzes auf ein weiteres 1,5 %-iges Agarose-Gel geladen und wie in 2.2.1.3 aus dem Agarose-Gel extrahiert. Ausnahme bildet hierbei die Behandlung des aufgeschnittenen pGEX2T-Vektors, der auf ein 1 %-iges Agarose-Gel geladen wurde und mit 50 µl Kristallviolett gefärbt wurde.

2.2.1.12 Dephosphorylierung der DNA-Vektoren

Um eine Re-Ligation der aufgeschnittenen DNA-Vektoren zu verhindern, wurden die 5‘-Enden der Vektoren mit antarktischer Phosphatase dephosphoryliert. Tabelle 27 zeigt den Ansatz der Dephosphorylierungs-Reaktion.

Die Reaktion wurde für zwei Stunden bei 37 °C auf dem Schüttler (Certomat H und U, Braun, Melsungen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase für fünf Minuten bei 65 °C inaktiviert.

Tabelle 27 Dephosphorylierungs-Ansatz für Dephosphorylierung von pGEX2T, pGEX2T-Stv13 und pGEX2T-Stv43

Zusatz	**Menge**
Verdaute Vektor-DNA	Komplette Menge an extrahierter DNA
Antarktische Phosphatase	10 U
10 x Antarktische-Phosphatase-Puffer	1 x
ddH_2O	ad 40 µl

2.2.2 Expression und Aufreinigung von GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q

2.2.2.1 Proteinexpression in *E. coli*

Die Proteinexpression der Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q wurde jeweils in Kulturen des *E. coli*-Stammes BL21-DE3 vorgenommen. Zunächst wurde eine Vorkultur angesetzt, indem 100 ml LB-Medium mit der das jeweilige Plasmid tragenden Kolonie angeimpft wurde. Das LB-Medium war dabei mit 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol versetzt. Diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler (Certomat BS1, Sartorius, Göttingen, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurde die Hauptkultur, bestehend aus 1 l LB-Medium, versetzt mit ebenfalls 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol, mit 80 ml Vorkultur angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C etwa zwei bis drei Stunden auf dem Schüttler (Certomat BS1, Sartorius, Göttingen, Deutschland) inkubiert, bis eine optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0,6 bis 0,8 erreicht war. Nun wurden der Hauptkultur 200 µl 1 M Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) hinzugefügt, um die Proteinexpression zu induzieren. Anschließend wurde der Ansatz für 22 h bei 16 °C auf dem Schüttler (Certomat BS1, Sartorius, Göttingen, Deutschland) kultiviert. Als nächstes wurde die Kultur bei 5.000 upm (4.415 g) für zehn Minuten bei 4 °C im JA10-Rotor zentrifugiert (Zentrifuge CH-J2-HS, Beckman, Coulter, USA) und das erhaltene Pellet wurde bis zur folgenden Aufreinigung bei -20 °C eingefroren.

2.2.2.2 Proteinaufreinigung

Die Fusionsproteine wurden mit einem sogenannten Gluthation-S-Transferase-Tag (GST-Tag) exprimiert. Dieses Tag, also Anhängsel, ist ein 26 kDa großes Protein, welches spezifisch Glutathion als Substrat bindet. Somit kann man sich das GST-Tag zur Aufreinigung zunutze machen. Das zuvor in 2.2.2.1 gewonnene Pellet wurde in 4 ml Lyse-Puffer mit Zusätzen (Tabelle 28) resuspendiert und in SS34-Zentrifugenröhrchen überführt. In diesen wurde die Suspension sechsmal für jeweils 15 Sekunden auf Eis mit dem Sonifizierer Sonifier B-12 (Branson, Dietenbach, Deutschland) sonifiziert, dazwischen bestanden jeweils 15 sek Pause. Die sonifizierte Suspension wurde anschließend im SS34-Rotor bei 12.000 upm (17.211 g) für zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge CH-J2-HS, Beckman, Coulter, USA). Der proteinhaltige Überstand wurde in einem 15 ml Röhrchen gesammelt und das Pellet für zwei weitere Male wie oben beschrieben resuspendiert, sonifiziert, zentrifugiert und vom zu sammelnden Überstand getrennt.

Nun wurden 400 µl Gluthation Sepharose 4B Beads zunächst zweimal mit je 5 ml 1 x PBS gewaschen, bevor sie mit dem zuvor gewonnenen Proteinüberstand vereint wurden und eine Stunde bei RT im Überkopfschüttler (Bio Rotator, BioSan, Riga, Lettland) inkubiert. Anschließend wurden die Beads, welche das Protein nun über den GST-Tag gebunden hatten, mit 1.000 g über drei Minuten bei 4 °C abzentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), der Überstand verworfen, die Beads zweimal mit je 5 ml Wasch-Puffer gewaschen, dann mit 5 ml 1 x PBS gewaschen (jeweils zehn Minuten im Überkopfschüttler, dazwischen mit 1000 g über drei Minuten bei 4 °C zentrifugiert) und zuletzt mit einem ml 1 x PBS versetzt.

Da die normalerweise folgende Abspaltung des Proteins vom GST-Tag mit Thrombin nicht erfolgreich war, wurde das GST-Tag mithilfe einer Glutathion-Elution von den Beads gelöst. Dazu wurde ein Elutions-Puffer hergestellt und davon 500 µl auf die zuvor gewaschenen Beads gegeben. Es folgte eine zehnminütige Inkubation bei RT auf dem Überkopfschüttler und eine anschließende Zentrifugation mit 10.000 g für 30 Sekunden bei 4 °C (Centrifuge

5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand enthielt das jeweilige nun von den Beads gelöste Protein.

Tabelle 28 Verwendete Puffer und Zusätze zur Proteinaufreinigung mit Zusammensetzung

Puffer / Zusätze	**Zusammensetzung**
Elutions-Puffer	50 mM Tris (mit HCl eingestellt auf pH 8,0) 50 mM Gluthation 0,1 % SDS
Lyse-Puffer	10 mM NaCl 20 mM Tris mit HCl auf pH 7,4 einstellen
Lyse-Puffer-Zusätze	1 % Triton X-100 1 % Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
Wasch-Puffer	150 mM NaCl 20 mM Tris mit HCl auf pH 7,4 einstellen

2.2.3 Arbeit mit eukaryoten Zellen

2.2.3.1 Kultivierung eukaryoter Zellen

a) J774A.1

Die adhärenten J774A.1 Makrophagen wurden in Petrischalen bis zur Konfluenz bei konstant 37 °C und 5 % CO_2 in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), welches 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälber-Serum (FCS) und eine 1:100-Verdünnung Penicillin / Streptomycin enthält (Vollmedium), kultiviert. Anschließend wurden sie mit warmem 1 x Phosphat-Buffered-Saline (PBS) gewaschen, abgekratzt und je nach Wunsch in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:8 in Vollmedium neu ausgesät.

b) Vero, HeLa

Adhärente Vero- und HeLa-Zellen wurden in Petrischalen bis zu Konfluenz bei konstant 37 °C und 5 % CO_2 Minimum Essential Medium, versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, 0,1 mM nicht

essenzielle Aminosäuren und einer 1:100-Verdünnung Penicillin / Streptomycin (Vollmedium), kultiviert. Anschließend wurden sie mit warmem 1 x PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung für fünf Minuten bei RT inkubiert, um die Zellen zu lösen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 8 ml Vollmedium gestoppt und je nach Wunsch in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:8 in Vollmedium neu ausgesät.

c) CHO-K1

Adhärente CHO-K1-Zellen wurden in Petrischalen bis zu Konfluenz bei konstant 37 °C und 5 % CO_2 in McCoy`s 5A-Medium, versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS und einer 1:100-Verdünnung Penicillin / Streptomycin (Vollmedium), kultiviert. Anschließend wurden sie mit warmem 1 x PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung für fünf Minuten bei RT inkubiert, um die Zellen zu lösen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 8 ml Vollmedium gestoppt und je nach Wunsch in einem Verhältnis von 1:3 bis 1:8 in Vollmedium neu ausgesät.

2.2.3.2 Zellzählung

Um die Zellzahl in einem bestimmten Volumen an Suspension zu bestimmen, wurde die Anzahl an Zellen in 10 µl Suspension in einer so genannten Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop bestimmt. Da das Volumen eines Rechtecks der Zählkammer 0,1 mm^3, also 1 x 10^{-4} ml entspricht, wurde die Zellzahl wie folgt berechnet:

Gezählte Zellzahl in einem Rechteck x 10^4 = Zellzahl pro ml Suspension

2.2.4 Charakterisierung der Fusionsproteine

2.2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE macht die Trennung von Proteinen nach ihrer Größe mittels Anlegen eines elektrischen Feldes unter denaturierenden Konditionen möglich. Durch die Bildung von negativ geladenen Komplexen zwischen SDS und den zu trennenden Proteinen wandern diese zum Plus-Pol des elektrischen Feldes. Das DTT, welches im Ladepuffer enthalten ist, bewirkt eine Reduktion vorhandener

Disulfidbrücken und löst so hochmolekulare Proteinstrukturen auf. Verwendet wurden in dieser Arbeit SDS-Gele, die aus einem Trenngel oder Laufgel (12,5 % SDS) und einem Sammelgel (6 % SDS) bestanden. Vor der Beladung der Geltaschen wurde den aufzutrennenden Proben 5 x SDS-Laemmli-Puffer bis zu einer einfachen Endkonzentration zugefügt und sie wurden für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Die angelegte Spannung und Dauer der Elektrophorese richtete sich nach der Größe des Gels. Bei Peqlab-Gelen betrug die Spannung 300 V und die Stromstärke 45 mA bei etwa einer Stunde Laufzeit, bei großen Gelkammern (Werkstatt Ulm) 300 V, 45 mA und etwa drei Stunden Laufzeit, bei kleinen Gelkammern (Werkstatt Ulm) Spannung, 25 mA und 70 min. Zur Elektrophorese wurde ein SDS-Laufpuffer verwendet.

Bei anschließender Analyse im Western-Blot-Verfahren wurde zur Abschätzung der Molekularmasse der aufgetrennten Proteine ein prestained Marker verwendet, welcher im Gel und nach dem Blot auf der Nitrocellulose-Membran sichtbar war. Bei anschließender Färbung nach Coomassie wurde ein unstained Marker verwendet, welcher erst durch die Coomassie-Färbung sichtbar wurde.

Tabelle 29 Auflistung verwendeter Puffer mit zugehörigen Zusammensetzungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Material	**Zusammensetzung**
5 x SDS-Laemmli-Puffer (pH 6,8)	312.5 mM Tris 10 % Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) 25 % Glycerin 0,015 % Bromphenolblau 3,75 % Dithiothreitol (DTT) kurz vor Gebrauch
SDS-Laufpuffer	190 mM Glycin 27 mM Tris 0,1 % Sodium Dodecyl Sulfat (SDS)

Tabelle 30 Auflistung der verwendeten Zusätze und Mengen für Gele

Zugabe	Mengen für Laufgel		Mengen für Sammelgel
	10 % Gel	**12,5 % Gel**	**6 % Gel**
H_2O	13.2 ml	10.45 ml	8 ml
Laufgel-Puffer	8.25 ml	8.25 ml	-
Sammelgel-Puffer	-	-	3.1 ml
10 % SDS	363 µl	363 µl	125 µl
Acrylamid / BIS 30 % (37.5:1 Mix)	11 ml	13.75 ml	2.5 ml
10 % APS	330 µl	330 µl	125 µl
TEMED	22 µl	22 µl	12.5 µl

2.2.4.2 Protein-Färbung nach Coomassie

Mit dieser Methode können Proteine, nach deren Auftrennung durch die SDS-PAGE, direkt auf dem Polyacrylamid-Gel sichtbar gemacht werden. Die dazu in dieser Arbeit verwendete Färbelösung, mit dem darin enthaltenen Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250, lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt somit die aufgetrennten Proteine unspezifisch. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel dazu über 20 min auf der Wippe Unimax (Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) mit 100 ml Färbelösung inkubiert. Im Anschluss wurde das Gel in mehreren Waschschritten über jeweils fünf Minuten mit Entfärbelösung gewaschen. Zur densitrometrischen Auswertung der Proteinbanden wurde das Gel zuletzt digital eingescannt und mit der Anwendung *Adobe® Photo Shop* (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) analysiert.

Tabelle 31 Verwendete Färbe- und Entfärbelösung mit Zusammensetzung

Lösung	Zusammensetzung
Färbelösung	0,25 % Coomassie Brilliant Blue R250 45 % Methanol. 10 % Eisessig
Entfärbelösung	45 % Methanol 10 % Eisessig

2.2.4.3 Konzentrationsbestimmung mittels BSA-Standard

Zur Konzentrationsbestimmung der erhaltenen Proteine aus 2.2.2.2 wurde ein BSA-Standard angefertigt. Hierzu wurde BSA in aufsteigender Konzentration neben Proben des jeweiligen Proteins in aufsteigender Menge auf ein Gel geladen und eine SDS-PAGE durchgeführt. Alle aufgeladenen Proben wurden zunächst noch mit 5 x SDS-Laemmli-Puffer (Endkonzentration 1 x) versetzt und für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurde das Gel nach Coomassie gefärbt (2.2.3.2), eingescannt und mithilfe der Anwendung *Adobe® Photo Shop* (Adobe Systems Inc., San Jose, USA) ausgewertet. Dazu wurde zunächst eine Kalibriergerade mittels der Intensität der BSA-Banden angefertigt, um über diese anschließend auf die Konzentration des aufgetragenen Proteins zu schließen. Diese Methode geht auf diejenige des Bradford-Assays zurück, bei dem die Konzentrationen mittels photometrischer Auswertung bestimmt werden (Bradford 1976).

2.2.4.4 Immun-Blotting (Protein-Transfer und Immun-Detektion)

Beim Immun-Blotting können Proteine mittels Antikörpern auf einer Membran sichtbar gemacht und quantifiziert werden. Dazu wurden die Proteine, welche durch die SDS-PAGE (2.2.3.1) aufgetrennt wurden, durch einen Western-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran (Protran, Whatman, Dassel, Deutschland) übertragen. Dabei wurden die Proteine durch ein senkrecht zu ihrer ursprünglichen Laufrichtung verlaufendes elektrisches Feld aus dem Gel auf die Nitrozellulose-Membran transferiert. Man unterscheidet hierbei zwischen einem

Semi-Dry-Blot und einem Wet-Blot. Beim Semi-Dry-Blot werden die Membran und das Blotting-Papier mit Transfer-Puffer getränkt und es wird ohne weiteren Puffer bei 12 V und 1 mA / cm^2 für eine Stunde geblottet. Beim Wet-Blot liegen Membran und Blottingpapier während des gesamten Blots in einem Transfer-Puffer und es wird bei 60 V und 400 mA für 2,5 h bei 4 °C geblottet. Um den Transfer zu überprüfen, wurden die auf die Membran übertragenen Proteine anschließend mit einer Ponceau-S-Lösung reversibel gefärbt.

Im Anschluss wurde die Membran für eine Stunde in 5 %-iger Milchpulver-Lösung auf der Wippe geblockt, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu sättigen. Nach dreimaligem Waschen über fünf Minuten in PBS-T auf der Wippe, wurde nun mit dem jeweiligen in PBS-T gelösten Primärantikörper zur spezifischen Immun-Detektion über eine Stunde bei RT auf der Wippe inkubiert. Es folgten wiederum drei Waschschritte für jeweils acht Minuten in PBS-T auf der Wippe, bevor mit dem jeweiligen Sekundärantikörper für eine Stunde bei RT auf der Wippe inkubiert wurde. Die Sekundärantikörper sind mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und können mit der Detektionslösung zur Chemielumineszenzdetektion genutzt werden. Das in der Detektionslösung enthaltene Luminol reagiert dabei mit der Peroxidase und emittiert Licht, welches mit den verwendeten Röntgenfilmen (Cronex 5, AGFA, Köln, Deutschland) detektiert werden kann. Nach drei erneuten Waschschritten in PBS-T für jeweils acht Minuten wurde die Membran dazu für 60 sek in der Detektionslösung inkubiert und anschließend detektiert. Die verwendeten Detektionslösung waren entweder selbst hergestellt (Tabelle 32) oder fertig geliefert (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate; Millipore, Schwalbach, Deutschland)

In dieser Arbeit wurden verschiedene Primär- und Sekundärantikörper verwendet, sie werden explizit in der jeweiligen Methode erwähnt. Biotinylierte Proteine wurden mittels Strep-POD detektiert und benötigten keinen Sekundärantikörper.

Tabelle 32 Auflistung verwendeter Puffer und Lösungen für das Immun-Blotten mit Zusammensetzung

Puffer / Lösung		**Zusammensetzung**
Transfer-Puffer		27 mM Tris 190 mM Glycin 20 % Methanol
Ponceau-S-Lösung		0,2 % Ponceau-S 5 % Essigsäure
5 %-ige Milchpulver-Lösung		2,5 g Milchpulver 50 ml PBS-T
Detektionslösung (Lösung A und B: 1:1, kurz vor Gebrauch mischen)	Lösung 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
	Lösung B	4,5 ml H2O bidest 500 µl 1M Tris-HCl pH 9,0 50µl H2O2

2.2.4.5 Overlay-Assay

Der Overlay-Assay wurde zum Bindungsnachweis von biotinylierten Proteinen an die hergestellten Fusionsproteine angewandt. Dazu wurden die Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q in aufsteigenden Mengen von 5, 10, 20, 30 und 50 pmol, sowie C3bot1E174Q alleine als Negativ-Kontrolle in den gleichen Mengen mittels SDS-PAGE und Wet-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Die Proteine wurden dann zunächst mittels Ponceau-S-Färbung unspezifisch gefärbt und anschließend in 5 %-igem Milchpulver geblockt. Es folgte ein Waschschritt über fünf Minuten in 1 x PBS-T auf der Wippe, bevor die Membran mit 60 µg biotinyliertem BSA (bBSA) in 12 ml 1 x PBS-T für eine Stunde bei RT auf der Wippe inkubiert wurde. Daraufhin wurde unspezifisch gebundenes bBSA mit einem Waschschritt in 100 ml 0,35 M NaCl in 1 x PBS-T über fünf Minuten bei RT auf der Wippe entfernt. Es folgten drei weitere Waschschritte über fünf Minuten in 1 x PBS-T. Zuletzt erfolgte eine Inkubation mit Strep-POD in der Konzentration 1:5000 in 1 x PBS-T über eine Stunde bei RT auf

der Wippe mit anschließendem dreifachem Waschschritt über fünf Minuten in 1 x PBS-T. Das Strep-POD bindet hierbei an Biotin-Reste des bBSA und weist somit eine Komplexbildung zwischen diesem und dem auf der Membran fixierten Fusionsprotein nach. Dies konnte mittels der Detektionslösung aus 2.2.3.4 nachgewiesen werden.

2.2.4.6 Gelshift-Assay

Der Gelshift-Assay wurde ebenfalls zum Nachweis der Biotinbindung an die hergestellten Fusionsproteine angewandt. Er beruht darauf, dass biotinylierte Oligonukleotide mit dem zu analysierenden Fusionsprotein zusammengebracht werden und mit steigender Menge an Fusionsprotein die Menge an freien biotinylierten Oligonukleotiden abnimmt. Die freien biotinylierten Oligonukleotide können mittels StrepPOD detektiert werden. Durch steigende Konzentrationen an Fusionsprotein ist somit eine Zunahme an Komplexbildung und damit eine Abnahme des detektierten Signals zu erwarten. Das verwendete Oligonukleotid besteht aus 21 Basen, ist am 5‘-Ende biotinyliert und am 3‘-Ende digoxigeninmarkiert und befindet sich in Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer). Für den Versuch wurde das jeweilige Fusionsprotein in aufsteigenden Mengen von 0; 0,1; 1; 5; 10 und 50 pmol (Endkonzentrationen 0,004; 0,04; 0,2; 0,4 und 2 mM) vorgelegt. Des Weiteren wurde als Negativ-Kontrolle C3bot1E174Q zu 10 und 50 pmol und als Positiv-Kontrolle 0,1 %-iges StrepPOD (0 und 1 µl) verwendet. Die Proben wurden mit 1 x PBS auf 25 µl aufgefüllt und es wurden jeweils 250 fmol biotinyliertes Oligonukleotid hinzugefügt und für 30 min bei RT inkubiert. Zuletzt wurden 2,75 µl 10 x nativer Ladepuffer hinzugefügt und es wurde eine Gelelektrophorese mit einem nativen Gel bei 160 V, 400 mA für 90 min bei 4 °C durchgeführt (native PAGE).

Anschließend wurden die Proteinbanden mittels Semi-Dry-Blot bei 12 V und 400 mA über 45 min in 5 x TBE-Puffer (Endkonzentration 1 x) auf eine Nylon Hi Bond Membran (GE Healthcare, München, Deutschland) transferiert. Diese wurde nach dem Blot für 60 min bei 90 °C im Trockenschrank (Gilowy, Meteor, Berlin, Deutschland) hitzefixiert. Es folgte eine Blockierung unspezifischer

Bindungsstellen mit 2 % BSA in 30 ml PBS-T für eine Stunde bei RT. Im Anschluss wurde die Membran mit StrepPOD (1:10000) in 10 ml der Blockierlösung inkubiert, in 1 x PBS-T gewaschen und durch die Zugabe der Detektierlösung (2.2.3.4) detektiert.

Tabelle 33 Auflistung verwendeter Puffer, Lösungen und Gele mit Zusammensetzung für Gelshift-Assay

Puffer / Lösung / Gel	Zusammensetzung
Tris-Ethylendiamintetraessigsäure-Puffer (TE-Puffer)	10 mM Tris-HCl (ph 7,4) 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
10 x nativer Ladepuffer	250 mM Tris-HCl pH 7,4 40 % Glycerin 0,2 % Bromphenolblau 0,2 % Xylencyanol
5 x Tris-Borsäure-EDTA-Laufpuffer (5 x TBE-Laufpuffer) pH 8,3	500 mM H3BO3 10 mM EDTA 500 mM Tris
BSA-Blockierlösung	1 g bovines Serum-Albumin ad 30 ml 1 x PBS-T
5 %-iges Natives Polyacrylamid-Gel	37,5 ml H_2O 12 ml 5 x TBE-Laufpuffer pH 8,3 10 ml 30 % Acrylamid 24 µL Tetraethylmethylendiamin 480 µL 10 % Ammoniumpersulfat

2.2.4.7 Digitonin-Assay

Der Digitonin-Assay wurde durchgeführt um die Spezifität der Zellgängigkeit der hergestellten Fusionsproteine in verschiedene Zelllinien zu überprüfen. Getestet wurde dabei die Zellgängigkeit in J774A.1-Makrophagen der Maus, in epitheliale Zellen der Zelllinien CHO-K1 des Hamsters, in humane HeLa-Zellen sowie in Vero-Zellen der grünen Meerkatze. Die J774A.1-Makrophagen wurden dazu sowohl mit den Fusionsproteinen, als auch mit der C3bot-Mutante C3bot1E174Q als Positiv-Kontrolle zeitabhängig, konzentrationsabhängig und im direkten Vergleich gegenüber den verschieden epithelialen Zelllinien inkubiert und mit dem

Detergenz Digitonin behandelt, um die Zellen zu permeabilisieren. Anschließend wurden der Überstand, der das Zytosol enthielt, sowie das Zellpellet auf die Aufnahme der verschiedenen Proteine hin untersucht.

Es wurden J774A.1-Makrophagen in einer Zelldichte von ~ 2,2 x 10^6, CHO-K1-Zellen von ~ 1,4 x 10^6, Vero-Zellen von ~ 1,4 x 10^6 und HeLa-Zellen von ~ 1,5 x 10^6 in einer 12-Well-Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 bebrütet. Anschließend wurden die Wells mit dem jeweiligen frischen Vollmedium und dem jeweiligen Fusionsprotein oder der C3-Mutante alleine inkubiert. Für den zeitabhängigen Assay wurden jeweils 4 µg Protein zugegeben und für 1; 6 und 24 h inkubiert. Für den konzentrationsabhängigen Assay wurden jeweils mit 0,5; 1 und 4 µg Protein für sechs Stunden inkubiert. Für direkten Vergleich zwischen den Zelllinien wurde mit jeweils 4 µg Protein für sechs Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und die Wells dreimal mit 1 ml warmem 1 x PBS gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von 2,4 µg Digitonin zusammen mit 120 µl 1 x PBS pro Well, um die inkubierten Zellen zu permeabilisieren und das Zytosol in den Überstand zu übertragen. Dazu wurden die mit Digitonin versetzten Zellen zunächst lichtgeschützt für fünf Minuten bei RT, dann für 25 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, mit 30 µl 5 x Laemmli-Laufpuffer versetzt und für zehn Minuten bei 95 °C gekocht. Die zurückgebliebenen Zellen wurden einmal mit 1 x PBS gewaschen, mit 100 µl 2,5 x Laemmli-Laufpuffer versetzt, abgekratzt, abgenommen und ebenfalls bei 95 °C für zehn Minuten gekocht.

Die gewonnen Proben wurden mittels SDS-Page aufgetrennt, mittels Wet-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit verschiedenen Primär- und Sekundärantikörpern behandelt und detektiert. Als Antikörper wurden der C3-Antikörper (1:2500), der HSP90-Antikörper (1:1000) und der EEA1-Antikörper (1:1000), sowie deren jeweilige Sekundärantikörper (1:2500) verwendet. Mit dem C3-Antikörper konnte eine Aussage darüber getroffen werden ob und wie gut das jeweilige Protein in das Zytosol aufgenommen wurde. Die HSP90-Banden geben Aufschluss über die Vergleichbarkeit der Proben. EEA1 steht für die frühen Endosomen und sollte sich nur im Zellpellet, nicht aber im Überstand finden und gibt Auskunft über die Reinheit des Zytosols bzw. des Überstandes.

2.2.4.8 Dot-Blot

Der Dot-Blot (auch Spot-Blot genannt) dient dazu Proteine zu detektieren, zu analysieren und zu identifizieren. Im Unterschied zu den vorherigen Methoden wird dabei keine Gel-Elektrophorese angewandt, eine Auftrennung in einzelne Protein-Banden und Aussagen zu der Größe der Proteine sind somit nicht gewährleistet. Das Dot-Blot-Verfahren stellt allerdings eine native Methode dar. Dabei wurden native bBSA-Moleküle punktförmig direkt auf eine Nitrozellulose-Membran gespottet und mittels der nativen Fusionsproteine und Antikörper detektiert.

Zunächst wurde dazu eine Verdünnungsreihe für bBSA und BSA erstellt, sodass man Proben mit je 0,03125; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,5 und 1 µg / ml bBSA und BSA in 1 x PBS erhielt. Anschließend wurden die einzelnen Proben in der Dot-Blot-Apparatur unter Vakuum wie in Abbildung 5 dargestellt auf eine Nitrozellulose-Membran gespottet.

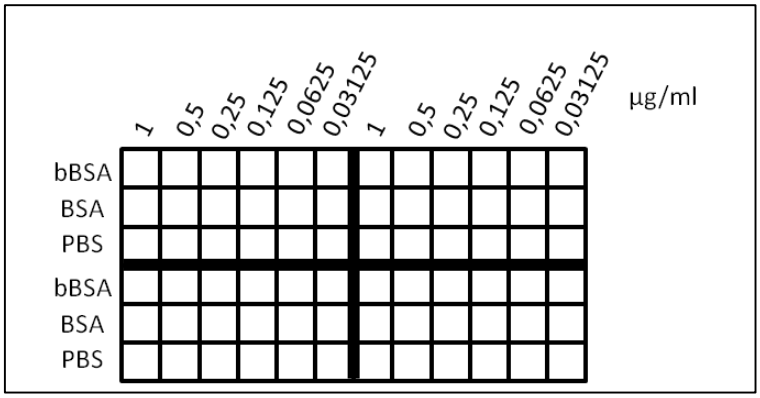

Abbildung 5 Schema der Beladung der einzelnen Wells für den Dot-Blot (bBSA = biotinyliertes bovines Serum-Antigen, BSA = bovines Serum-Antigen, PBS = Phosphat Buffered Saline)

Im Anschluss wurde die Membran für eine Stunde bei RT in 5 % Milchpulver in 1 x PBS-T auf der Wippe blockiert. Nun wurde die Membran in vier gleiche Teile geschnitten und mit verschiedenen Proteinen behandelt. Ein Teil wurde mit 25 µg GST-Stv13-C3bot1E174Q in 5 ml 1 x PBS-T, ein Teil mit 25 µg GST-Stv43-C3bot1E174Q in 5 ml 1 x PBS-T, ein Teil mit 25 µg C3bot1E174Q in 5 ml 1 x PBS-T und ein Teil mit StrepPOD (1:5000) in 5 ml 1 x PBS-T über je eine Stunde bei RT auf der Wippe inkubiert. Die Fusionsproteine sollten mit dem

gespotteten bBSA einen Komplex bilden, nicht aber mit den Negativ-Kontrollen der BSA oder PBS-Reihe. C3E174Q wurde als Negativ-Kontrolle verwendet und sollte keinerlei Komplexe bilden. StrepPOD wurde als Positiv-Kontrolle verwendet und sollte mit bBSA einen Komplex bilden. Die Membranen wurden als nächstes dreimal über acht Minuten in 1 x PBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Membranen, abgesehen von dem mit StrepPOD behandelten Teil, mit C3-Antikörper (1:5000 in 5 ml 1 x PBS-T) über eine Stunde bei RT auf der Wippe inkubiert, wieder dreimal über acht Minuten in 1 x PBS-T gewaschen und mit dem Anti-rabbit-Sekundärantikörper (1:2500 in 5 ml 1 x PBS-T) über eine Stunde bei RT auf der Wippe inkubiert und dreimal über acht Minuten in 1 x PBS-T gewaschen. Schließlich wurden die einzelnen Membran-Teile mit Detektierlösung behandelt und so vorhandenen Komplexe detektiert.

2.2.4.9 Darstellung des Transports von Biotinfluorescein (BF) durch die Fusionsproteine in J774A.1-Makrophagen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie

Der Farbstoff Fluorescein ist ein Fluoreszenzfarbstoff, dessen Absorptionsmaximum bei 495 nm liegt. Wird er mit Blaulicht angeregt, emittiert er grünes Licht mit einer Wellenlänge von 530 nm. Gekoppelt an Biotin, soll eine Komplexbildung mit den hergestellten Fusionsproteinen ermöglicht und ein optischer Nachweis der Proteinaufnahme in J774A.1-Makrophagen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie geliefert werden.

Dazu wurden die J774A.1-Zellen in einer Zelldichte von 5 x 10^5 in einer 12-Well-Platte auf sterilen Deckgläschen ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO_2 über Nacht kultiviert. Die Versuchsproben bestanden aus 0,1 nmol Fusionsprotein / C3bot1E174Q / Streptavidin + 5 nmol BF + 1 x PBS ad 30 µl und 5 nmol BF alleine + 1 x PBS ad 30 µl und wurden für 30 min lichtgeschützt bei RT vorinkubiert. Anschließend wurde das Vollmedium abgesaugt und pro Well 1 ml serumfreies Medium mit den jeweiligen Proben zusammengefügt und für vier Stunden bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert. Nun wurde das Medium abgesaugt und die Deckgläschen wurden dreimal in 1 x PBS geschwenkt und in eine neue 12-Well-Platte überführt. Es folgte die Fixierung der Zellen bei gleichzeitiger

Anfärbung der Zellkerne mit Hoechst-Farbstoff (1:20.000) in 1 ml 4 % Para-Formaldehyd (PFA) in 1 x PBS pro Well über 20 min bei RT. Anschließend wurde die PFA-Lösung abgesaugt und für drei Minuten mit 1 ml 0,1 M Glycin in 1 x PBS pro Well inaktiviert. Es folgten drei Waschschritte über sechs Minuten mit 1 x PBS auf der Wippe.

Zur Anfärbung der frühen Endosomen, also zum Ausschluss eines Verbleibs des Fusionsproteins in diesen, erfolgte eine Behandlung mit EEA1-Antikörper (1:250) und dem Sekundärantikörper Anti-rabbit-Alexa-568 (1:400). Alternativ wurde das Zytoskelett mit Phalloidin Alexa-594 (1:200) angefärbt. Dazu wurden die Zellen mit 1 ml 0,4 % Triton-X-100 in 1 x PBS pro Well für fünf Minuten bei RT permeabilisiert und anschließend wieder viermal für je fünf Minuten in 1 x PBS gewaschen und in eine feuchte Kammer überführt. Hier wurden die Deckgläschen mit den darauf anhaftenden Zellen für 45 min bei 37 °C mit je 90 µl 5 %-iges Milchpulver in 1 x PBS bedeckt, kurz in 1 x PBS gewaschen und mit 90 µl der jeweiligen Primär- und gegebenenfalls Sekundär-Antikörper in PBS für je 45 min bei 37 °C inkubiert. Danach und gegebenenfalls dazwischen wurden die Deckgläschen in die 12-Well-Platte überführt und viermal für fünf Minuten in 1 x PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Deckgläschen mit ProLong Gold Antifade-Lösung auf Objektträger fixiert und bei 4 °C über Nacht gelagert. Alle Schritte wurden mit so wenig Licht als möglich durchgeführt.

Die Mikroskopie erfolgte mit freundlicher Genehmigung im Institut für Physiologie der Universität Ulm am Fluoreszensmikroskop Cell Observer Z1 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit Hilfe der Metamorph Software (MDS Analytical Technologies, Toronto, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung der Fusionsproteine

Die Klonierung der Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q wurde ausgehend von den Genen der drei einzelnen Komponenten begonnen, genetisch zusammengefügt und schließlich mithilfe eines Plasmids in einen expressionsfähigen Bakterienstamm eingebracht.

3.1.1 Ligation und Transformation der pCR®-Blunt-Vektoren

Zunächst wurden die Gene der einzelnen Proteinkomponenten mittels PCR amplifiziert. Die dazu verwendeten Primer beinhalteten neben verschiedenen Schnittstellen (*Bgl*II, *Eco*RI und *Bam*HI), die für das weitere Vorgehen von Bedeutung sein sollten, auch die Sequenz für einen acht Aminosäuren langen Gly/Ser-Linker zwischen den kodierenden Sequenzen, der das jeweilige Streptavidin mit der C3-Mutante verbinden sollte. Der Erfolg der PCR wurde mittels der Bandenhöhe des PCR-Produkts auf einem 1,5 %-igen Agarose-Gel sichtbar gemacht (Abbildung 6) und die amplifizierte DNA wurde über ein solches Gel mithilfe des Kits NucleoSpin® Extraxt II (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) aus dem Agarose-Gel extrahiert und anschließend auf ihre Konzentration hin geprüft.

Die in ausreichend hoher Konzentration vorliegenden DNA-Stränge der drei Komponenten wurden nun in den Klonierungsvektor pCR®-Blunt ligiert, der mit einer weiteren *Eco*RI-Schnittstelle ausgestattet ist und anschließend per Hitze-Schock-Methode in den *E. coli*-Stamm DH5α transformiert. Die transformierten Stämme wurden auf Agar-Platten ausplattiert. Nach dem Wachstum der Bakterien in Kolonien erfolgten eine Kolonie-PCR und die Kontrolle der Plasmide auf einem 1,5 %-igen Agarose-Gel (Daten nicht gezeigt). Die kontrollierten Kolonien wurden einer so genannten Mini-Präparation mit dem Kit NucleoSpin® Plasmid (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) unterzogen, um die in den Bakterienstämmen enthaltenen pCR®-Blunt-Plasmide mit den darin vorhandenen Genen

aufzureinigen. Anschließend wurde eine erste Sequenzierung der pCR®-Blunt-Plasmide durchgeführt, die eine Fortführung mit fehlerfreien DNA-Sequenzen gewährleisten sollte. Der Vergleich mit den bekannten Sequenzen für die einzelnen Primer und Proteine zeigte jeweils vollständige Übereinstimmung in allen Basen.

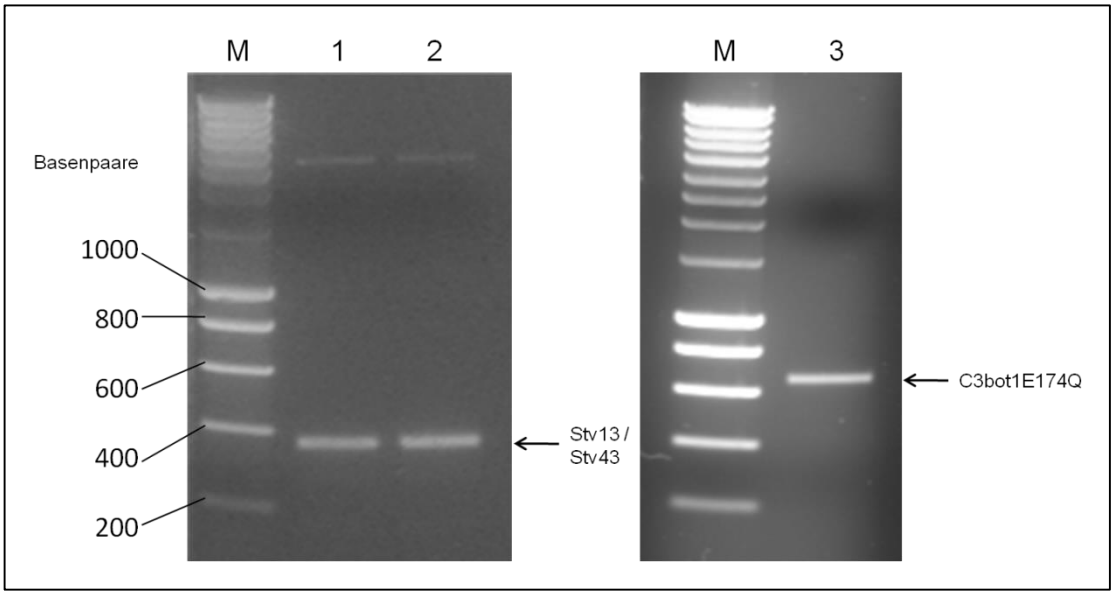

Abbildung 6 1,5 %-iges Agarose-Kontrollgel (mit Ethidium-Bromid gefärbt) um die PCR-Produkte zu kontrollieren. In Spur 1 befindet sich die amplifizierte DNA des Stv13-Gens, in Spur 2 die des Stv43-Gens, in Spur 3 die des C3bot1E174Q-Gens. Der DNA-Doppelstrang für Stv13 und Stv43 enthält 381 Basenpaare (bp), der für C3bot1E174Q enthält 633 bp. Die Elektrophorese zeigt damit Banden, die auf der richtigen Höhe laufen. DNA = Desoxyribonukleinsäure, M = Marker DNA, PCR = Polymerase-Ketten-Reaktion, Stv13 = Streptavidin 13, Stv43 = Streptavidin 43

3.1.2 Ligation und Transformation der pGEX2T-Vektoren

Die in die pCR®-Blunt-Vektoren ligierten Einzelkomponenten sollten nun in dem Expressions-Vektor pGEX2T (innerhalb des Glutathion S-Transferase [GST] Gen-Fusions-Systems) zusammengefügt werden, um die fertigen Konstrukte in einem *E. coli*-Stamm zu exprimieren und anschließend aufreinigen zu können. Dazu wurden zunächst die DNA-Doppelstränge für Stv13 und Stv43 mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Bgl*II aus ihrem jeweiligen pCR®-Blunt-Plasmid geschnitten auf ein 1,5 %-iges Agarose-Gel aufgetragen, mittels Elektrophorese aufgetrennt und mithilfe des Kits NucleoSpin® Extraxt II (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) extrahiert. Der geschlossene pGEX2T-Vektor wurde mit *Bam*HI

geöffnet und dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern. Anschließend wurden die jeweiligen DNA-Stränge für Stv13 und Stv43 in den pGEX2T-Vektor ligiert und mittels Hitze-Schock-Verfahren in DH5α-*E. coli*-Stämme transformiert. Es folgten eine weitere Mini-Präparation und eine photometrische Konzentrationsbestimmung, die ausreichend hohe Konzentrationen für die Proben ergab. Da bei der hiesigen Ligation die Möglichkeit bestand, dass die DNA-Stränge für Stv13 und Stv43 aufgrund der Schnittstellen in falscher Orientierung ligiert wurden, wurde ein Testverdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI durchgeführt und auf einem 1,5 %-igen Agarose-Gel analysiert (Abbildung 7).

Anschließend wurde auch die DNA für C3bot1E174Q mittels der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Eco*RI aus dem pCR®-Blunt-Plasmid geschnitten und auf einem 1,5 %-igen Agarose-Kontrollgel analysiert (Daten nicht gezeigt). Nach der Bestätigung der erfolgreichen Restriktion wurden wiederum die pGEX2T-Stv13 / 43-Plasmide mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI geöffnet und mit antarktischer Phosphatase dephosphorylisiert, um eine Religation zu verhindern. Es folgte die Ligation der C3bot1E174Q-DNA in die geöffneten pGEX2T-Stv13 / 43-Vektoren und die Transformation in *E. coli*-Bakterien des Stammes DH5α mittels Hitze-Schock-Verfahren. Nach Koloniebildung der ausplattierten Bakterien auf Agar-Platten wurde wiederum eine Mini-Präparation zur Plasmid-Aufreinigung durchgeführt. Es wurde ein weiterer Testverdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI mit folgender Gel-Analyse durchgeführt, um eine Ligation ohne C3bot1E174Q-Insert auszuschließen (Abbildung 8). Die in richtiger Orientierung vorliegenden pGEX2T-Plasmide wurden sequenziert, wodurch sich die fehlerfreie Basenabfolge bestätigen ließ. Um eine hohe Menge an fertigen pGEX2T-Stv13 / 43-C3bot1E174Q-Plasmiden zu erhalten, wurde zuletzt eine Midi-Präparation mithilfe des Kits NucleoBond® Xtra Midi (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) durchgeführt.

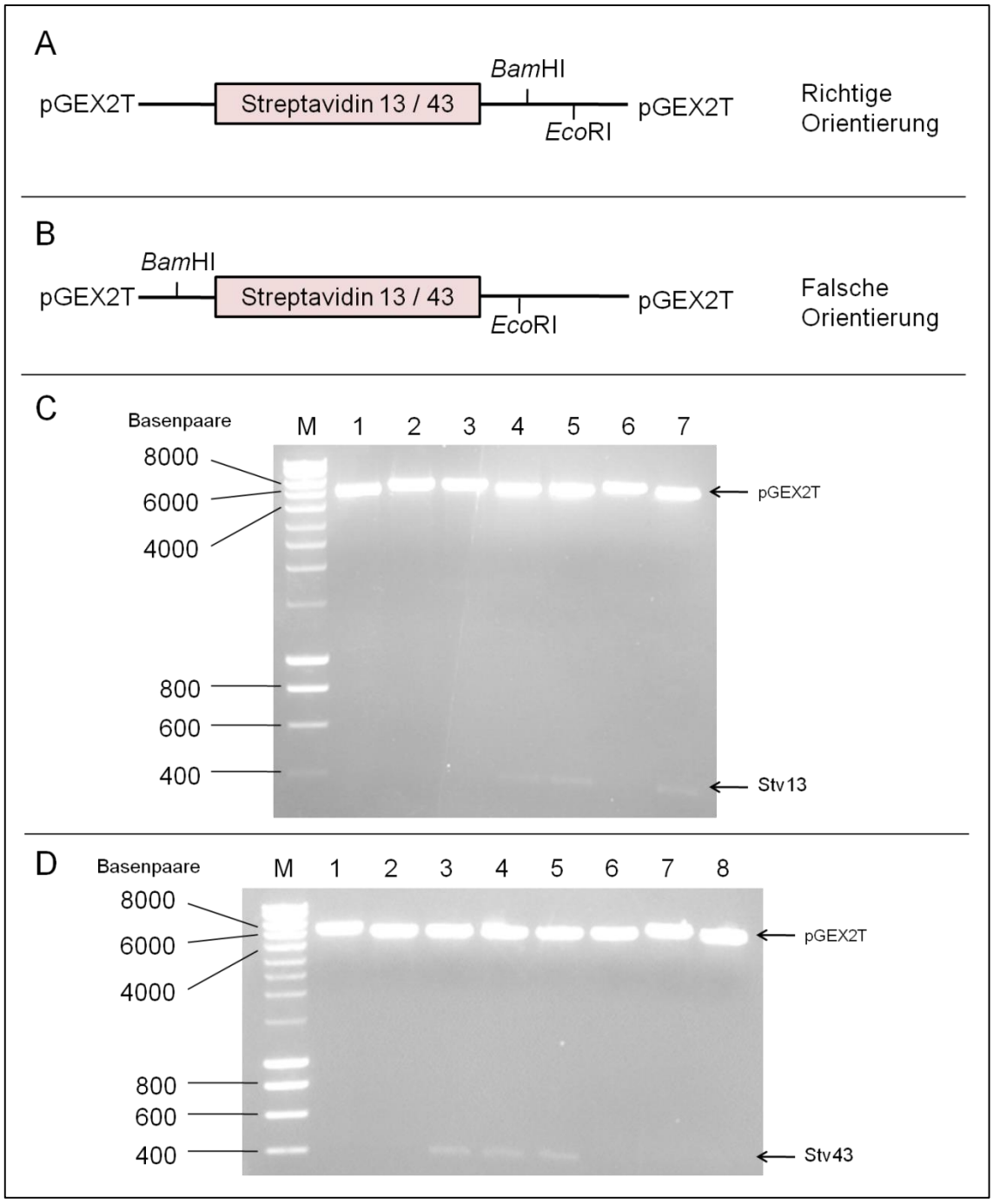

Abbildung 7 Darstellungen zum Testverdau von pGEX2T-Stv13 und pGEX2T-Stv43
A zeigt eine schematische Darstellung der Ligation von pGEX2T-Stv13 / 43 mit den Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI in richtiger Orientierung, **B** die Schnittstellen analog dazu in falscher Orientierung, **C** zeigt das Ergebnis der Elektrophorese des Testverdaus von pGEX2T-Stv13. Die Spuren 2, 3 und 6 zeigen eine Ligation in richtiger Orientierung, da sie aufgrund der enthaltenen Stv13-DNA etwas höher laufen. Die Spuren 4, 5 und 7 zeigen eine Ligation in falscher Orientierung, da sie etwas niedriger laufen und auf der Höhe knapp unter 400 Basenpaaren die ausgeschnittene Stv13-DNA zu erkennen ist. Spur 1 zeigt eine Ligation ohne Insert, da sie ebenfalls etwas niedriger läuft und keine Stv13-DNA im unteren Bereich zu erkennen ist. **D** zeigt analog dazu das Ergebnis der Elektrophorese des Testverdaus von pGEX2T-Stv43. Hier zeigen die Spuren 1 und 7 erfolgreiche Ligationen, die Spuren 3, 4 und 5 Ligationen in falscher Orientierung und die Spuren 2, 6 und 8 Ligationen ohne Inserts. DNA = Desoxyribonukleinsäure, M = Marker-DNA, Stv13 = Streptavidin 13, Stv43 = Streptavidin 43

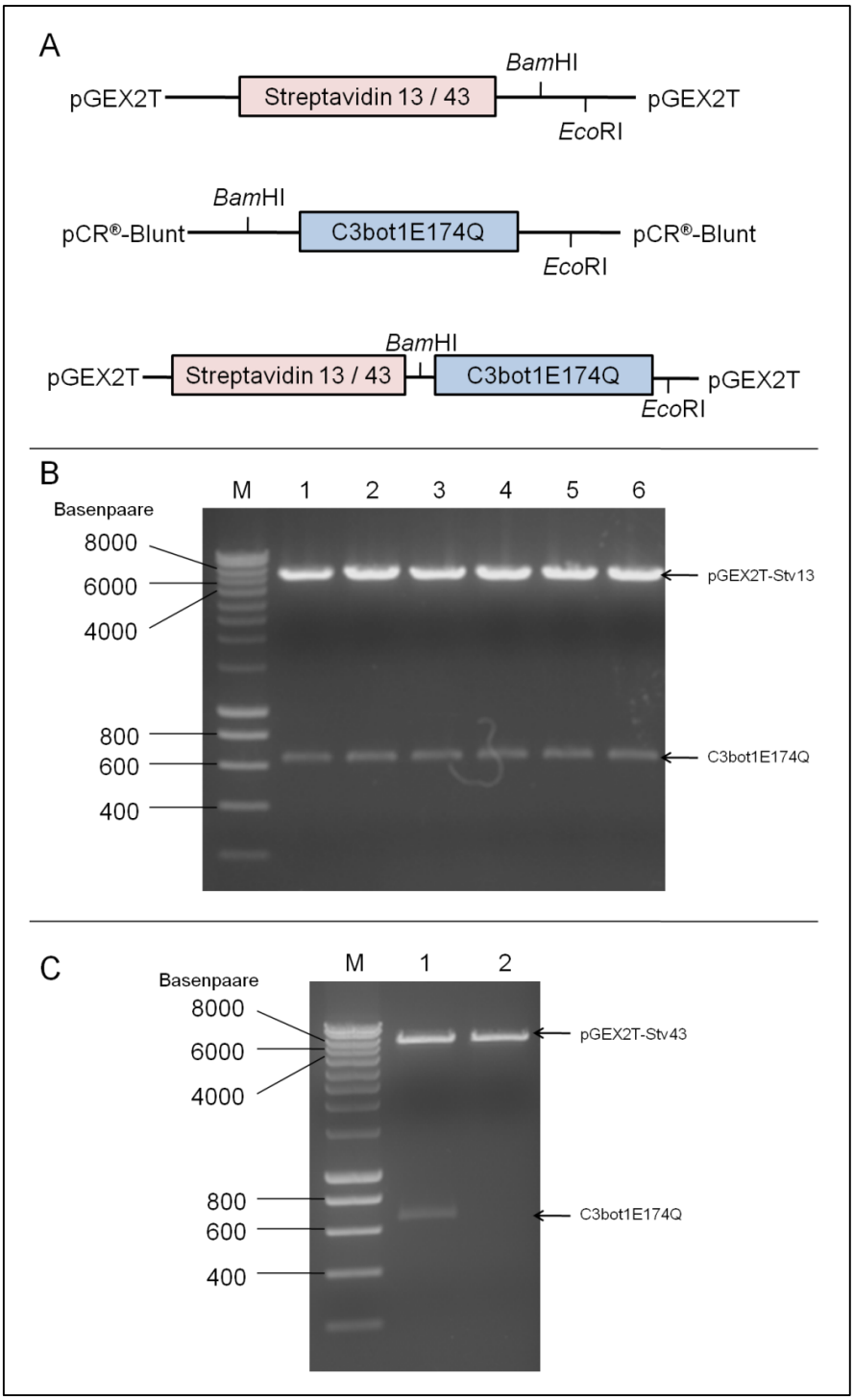

Abbildung 8 Darstellungen zum Testverdau von pGEX2T-Stv13-C3bot1E174Q und pGEX2T-C3bot1E174Q

A zeigt eine schematische Darstellung der verschiedenen Vektoren (oben und Mitte), die zur Herstellung des fertigen DNA-Konstruktes (unten) verwendet wurden, inklusive der relevanten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Eco*RI. **B** zeigt das Ergebnis der Elektrophorese des Testverdaus von pGEX2T-Stv13-C3bot1E174Q. Alle Spuren 1-6 zeigen ein positives Ergebnis, da festzustellen ist, dass das C3bot1E174Q-Insert ausgeschnitten werden konnte und mit seinen 650 Basenpaaren auf der richtigen Höhe läuft. **C** zeigt analog dazu das Ergebnis der Elektrophorese des Testverdaus von pGEX2T-GST-Stv43-C3bot1E174Q. Spur 1 zeigt ein positives Ergebnis, während Spur 2 ein aufgeschnittenes pGEX2T-Stv43-Plasmid ohne Insert zeigt. DNA = Desoxyribonukleinsäure, M = Marker-DNA, GST = Glutathion-S-Transferase, Stv13 = Streptavidin 13, Stv43 = Streptavidin 43

3.2 Aufreinigung der Fusionsproteine

Die DNA für die Fusionsproteine wurde in den pGEX2T-Vektor innerhalb des Glutathion S-Transferase [GST] Gen-Fusions-System eingebracht. Über diesen GST-Tag sollten die Fusionsproteine aufgereinigt werden. Nach Kultivierung der exprimierenden *E. coli*-Stämme DE3 und deren Induktion mit IPTG wurden zunächst über die gegenseitige Analyse verschiedener Expressionsbedingungen (zeit- und temperaturabhängig) die optimalen Bedingungen für die Expression der beiden Fusionsproteine bestimmt. Diese lagen für beide Proteine bei 22 h und 16 °C, bei höheren Temperaturen zeigten sich bereits sehr früh (< 1 h) viele Abbauprodukte (Daten nicht gezeigt). Zur Aufreinigung wurden die Proteine, die durch Lyse der Bakterienzellwand mittels Ultraschall in Lösung gebracht wurden, über ihren GST-Tag an Glutathion-Sepharose 4B Beads gebunden. Nach mehreren Waschschritten sah das ursprüngliche Protokoll eine anschließende Abspaltung der Komplexe aus Tags und Beads von den Fusionsproteinen mittels Thrombinspaltung vor. Trotz zahlreicher Versuche gelang es nicht, diese Abspaltung durchzuführen. Alternativ wurde eine Glutathion-Elution durchgeführt. Durch die Zugabe von Glutathion konnte erreicht werden, dass die Glutathion-Sepharose 4B Beads von den Bindungsstellen der GST-Tags verdrängt wurden und die Aufreinigung ohne die Abspaltung des GST-Anteils gelang. In Abbildung 9 sind die einzelnen Aufreinigungsschritte in einer SDS-PAGE dargestellt.

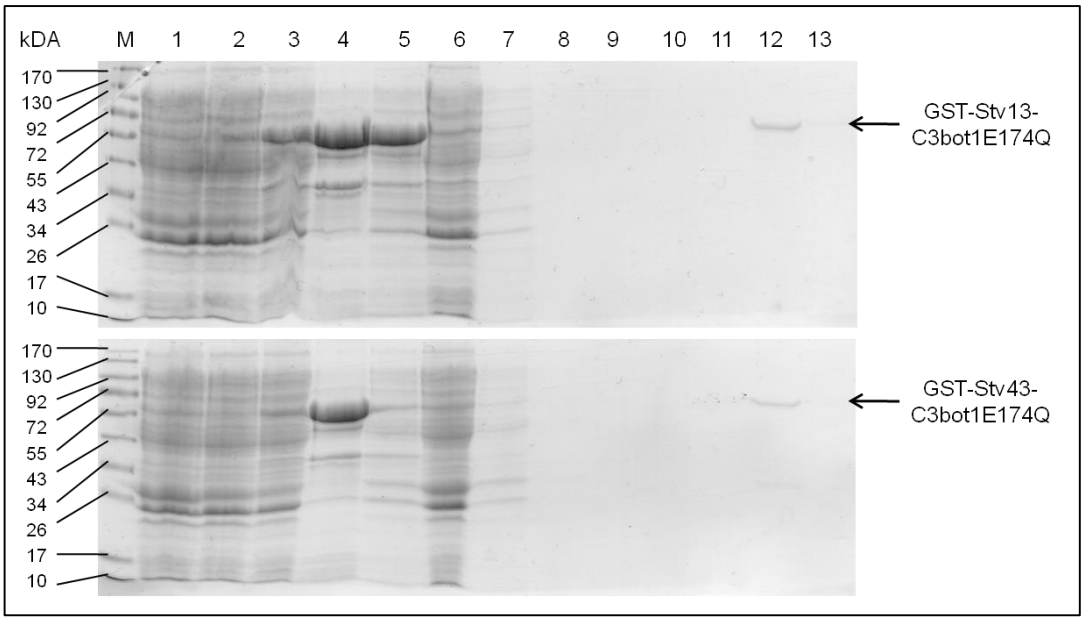

Abbildung 9 Analyse der Aufreinigungsschritte der Konstrukte GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q
Die Abbildung zeigt die SDS-PAGE-Gele nach Coomassie-Färbung der Proteine zur Kontrolle der Aufreinigung der Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q (oberes Gel) und GST-Stv43-C3bot1E174Q (unteres Gel). Die Spuren 1 bis 3 zeigen den Überstand nach jeder der drei Sonifizierungen. Erst nach der dritten Sonifizierung sieht man eine Zunahme der Proteinbanden auf Höhe des Fusionsproteins. Wie man in den Spuren 4 und 5 sieht, verbleibt dabei ein Großteil an Protein in den Bakterienzellen. Spur 6 zeigt den Überstand vor den Waschschritten. Durch die Waschschritte (Spuren 7 bis 9) geht kaum Protein verloren, hier ist das Protein bereits über den GST-Tag an die Glutathion-Sepharose 4B Beads gebunden. Die Spuren 10 bis 12 zeigen das Ergebnis der Glutathion-Elution. Erst in der letzten Spur (Spur 12) mit 50 mM Glutathion + 0,1 % SDS zeigt sich eine Ablösung des Fusionsproteins von den Beads. Der GST-Tag wird allerdings nicht abgespalten und bleibt erhalten. Daher ist die Höhe des Proteins auf etwa 64,5 kDa Molekulargewicht. Die letzte Spur zeigt dass die Fusionsproteine von den Beads abgelöst wurden. GST = Glutathion-S-Transferase, M = Protein-Marker, SDS = Natriumdodecylsulfat, Stv13 = Streptavidin 13, Stv43 = Streptavidin 43

3.3 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Fusionsproteine

3.3.1 Charakterisierung der Biotinbindung der Fusionsproteine mittels Overlay-Assay

Um die Biotinbindung der hergestellten Konstrukte zu untersuchen, wurde der Overlay-Assay durchgeführt. Die aufgereinigten Fusionsproteine und C3bot1E174Q alleine als Negativ-Kontrolle wurden in aufsteigender Konzentration mittels SDS-PAGE und anschließendem Wet-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Daraufhin erfolgte zunächst eine unspezifische Färbung mit Ponceau-S, in welcher alle Proteinbanden sichtbar gemacht werden konnten (Daten nicht gezeigt). Die Biotinbindung wurde anschließend mithilfe von biotinyliertem BSA (bBSA) nachgewiesen. Dazu wurde

die Membran mit bBSA inkubiert und nachfolgend mehrmals gewaschen, um ungebundenes Protein zu entfernen und unspezifische elektrostatische Interaktionen auszuschließen. Die Detektion des an die Fusionsproteine gebundenen bBSA erfolgte dann mit StrepPOD.

Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse des Overlay-Assays. Dabei war zu erkennen, dass beide Konstrukte eine konzentrationsabhängige Zunahme in der Stärke des Signals bereits ab der kleinsten verwendeten Konzentration von 5 pmol zeigten. Die folgenden Konzentrationen von 10, 20, 30 und 50 pmol zeigten für beide Konstrukte eine Zunahme der Signalintensität. Zusätzlich fanden sich in den Spuren von GST-Stv13-C3bot1E174Q ab einer Konzentration von 10 pmol deutliche Banden auf Höhen zwischen 26 und 17 kDa. Diese könnten Abbauprodukte des Konstrukts darstellen. Zum Ausschluss unspezifischer Interaktionen zwischen C3bot1E174Q und bBSA, wurde die C3-Mutante alleine in den Konzentrationen von 30 und 50 pmol als Negativ-Kontrolle aufgetragen. In diesen Spuren konnte keine Bindung von bBSA nachgewiesen werden.

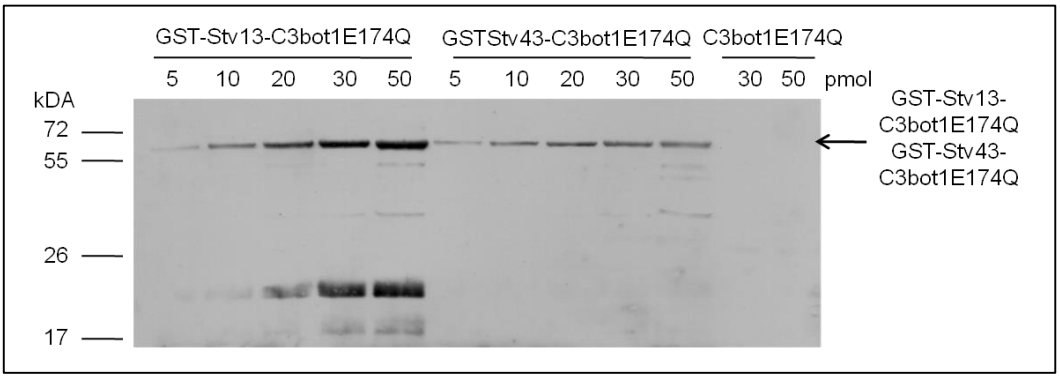

Abbildung 10 Analyse der Biotinbindung der Konstrukte GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q mittels Overlay-Assay mit biotinyliertem bBSA im Westerblot-Verfahren
Nach dem Transfer der beiden Konstrukte und der C3-Mutante auf eine Nitrozellulose-Membran wurde mit bBSA inkubiert. Die Detektion der freien Biotin-Reste des gebundenen bBSA erfolgte mittels StrepPOD. Die beiden Konstrukte binden in aufsteigenden Konzentrationen bereits ab einer Konzentration von 5 pmol nachweisbar bBSA, während bei der Negativ-Kontrolle mit C3bot1E174Q auch bei hohen Konzentrationen von 30 und 50 pmol keine unspezifische Bindung nachweisbar ist. Bei den Banden auf der Höhe zwischen 26 und 17 kDa unter GST-Stv13-C3bot1E174Q könnte es sich um Abbauprodukte des Konstrukts handeln. bBSA = biotinyliertes bovines Serum Albumin, GST = Glutathion-S-Transferase, Stv13 = Streptavidin 13, Stv43 = Streptavidin 43

3.3.2 Analyse der Biotinbindung der Fusionsproteine mittels Gelshift-Assay

Um die Biotinbindung der nativen Konstrukte in flüssiger Phase zu untersuchen, wurde der Gelshift-Assay durchgeführt. Dabei wurden die Konstrukte in verschiedenen Konzentrationen (0 bis 50 pmol) mit einer festgelegten Konzentration an biotinylierten Oligonukleotiden (250 fmol) zusammengebracht und inkubiert. Um die zu erwartende Komplexbildung zwischen Konstrukt und biotinylierten Oligonukleotiden darstellen zu können, wurden die Proben auf ein natives Gel geladen, um die freien Oligonukleotide von den Komplexen zu trennen. Mittels Semi-Dry-Blot wurden die Proteine auf eine Nylonmembran transferiert. Im Falle einer stattgehabten Komplexbildung wäre eine Abnahme an freien biotinylierten Oligonukleotiden zu erwarten gewesen. Freie Oligonukleotide sind dank ihres freien Biotin-Restes mit StrepPOD zu detektieren. Es wäre also eine Abnahme des Signals mit steigender Konzentration der Konstrukte zu erwarten gewesen.

Abbildung 11 zeigt, dass bei GST-Stv13-C3bot1E174Q bereits bei einer Konzentration von 1 pmol kein Signal mehr zu detektieren war und somit bereits alle Oligonukleotide gebunden waren. Bei GST-Stv43-C3bot1E174Q wurde das Signal hingegen erst bei einer Konzentration von 50 pmol schwächer. Die Bindung schien bei diesem Konstrukt wesentlich schwächer ausgeprägt gewesen zu sein. Um eine unspezifische Interaktion mit C3bot1E174Q auszuschließen wurde eine Negativ-Kontrolle mit zwei Konzentrationen C3bot1E174Q (10 und 50 pmol) plus Oligonukleotiden angefertigt. Wie in Abbildung 11 zu sehen ist, war das Signal bei einer Konzentration von 50 pmol nur schwach vorhanden, woraus man eine unspezifische Bindung bei hohen Konzentrationen nicht ausschließen konnte. Als Positiv-Kontrolle wurden die Oligonukleotide mit StrepPOD zusammengebracht, auf der entsprechenden Höhe zeigte sich erwartungsgemäß ein sehr starkes Signal.

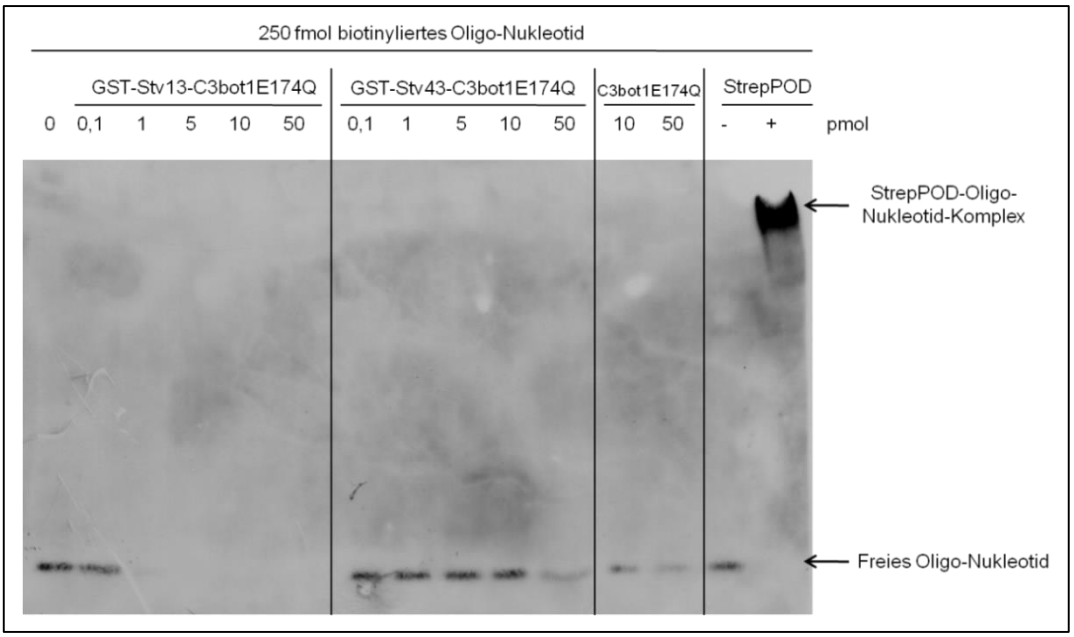

Abbildung 11 Analyse der Biotinbindung der nativen Konstrukte GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q mittels Gelshift-Assay
Nachdem die beiden Konstrukte in verschiedenen Konzentrationen mit jeweils 250 fmol biotinyliertem Oligonukleotid inkubiert wurden, wurden die Komplexe mittels nativer Gelelektrophorese von den freien Oligonukleotiden getrennt und mittels Semi-Dry-Blot auf eine Nylonmembran transferiert. Die freien Oligonukleotide konnten anschließend mittels StrepPOD detektiert werden. GST-Stv13-C3bot1E174Q bindet bereits ab 1 pmol nahezu alle Oligonukleotide, sodass lediglich bei einer Konzentration von 0,1 pmol ein deutliches Signal der freien Oligonukleotide zu sehen ist. GST-Stv43-C3bot1E174Q weist hingegen erst ab 50 pmol eine sichtbare Bindung auf. Die Negativ-Kontrolle mit C3bot1E174Q zeigt, dass es sich bei einer Konzentration von 50 pmol um eine unspezifische Komplexbildung handeln könnte. Die Positiv-Kontrolle mit StrepPOD (+) zeigt ein deutliches Signal auf der entsprechenden Höhe als Zeichen einer Komplexbildung zwischen StrepPOD und den biotinylierten Oligonukleotiden. Die zusätzliche Negativ-Kontrolle ohne StrepPOD (-) zeigt wie erwartet ein deutliches Signal als Zeichen freier Oligonukleotide. GST = Glutathion-S-Transferase, StrepPOD = Streptavidin Peroxidase, Stv13 = Streptavidin 13, Stv43 = Streptavidin 43

3.3.3 Analyse der Biotinbindung der Fusionsproteine mittels Dot-Blot

Eine weitere Methode zur Analyse der Biotinbindung der nativen Konstrukte stellt der Dot-Blot (auch Spot-Blot genannt) dar. Im Gegensatz zu den vorher erwähnten Methoden findet hierbei jedoch keine Auftrennung der Proteine mittels Elektrophorese statt. Somit kann keine Aussage über die Proteingröße oder -reinheit getroffen werden. Mittels einer speziellen Dot-Blot-Apparatur wurden bBSA und BSA (nicht biotinyliert) in verschiedenen Konzentrationen auf eine Nitrozellulose-Membran gespottet. Zum Nachweis des erfolgreichen Transfers wurde die Proteine auf der Membran mit Ponceau-S gefärbt (Abbildung 12 A). Anschließend wurde die jeweilige Membran mit einem der beiden Konstrukte GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q in nativer Form inkubiert und diese Proteine darauf mittels C3-Antikörper detektiert. Bei

erwartungsgemäßer Bindung des Konstrukts an die bBSA-Spots wäre ein Signal zu detektieren gewesen. Wie Abbildung 12 B zeigt, kam es bei der mit GST-Stv13-C3bot1E174Q inkubierten Membran zu der erwarteten Bindung des Konstrukts an die bBSA-Spots. Mit zunehmender Konzentration stieg auch die Intensität des Signals, während die Negativ-Kontrolle mit BSA und PBS ohne Signal blieb.

Bei der mit GST-Stv43-C3bot1E174Q behandelten Membran konnten hingegen keine Signale detektiert werden wie in Abbildung 12 C zu sehen ist. Somit lag kein Hinweis auf eine Bindung vor. Um eine unspezifische Komplexbildung zwischen C3bot1E174Q und bBSA auszuschließen, wurde eine Membran als Negativkontrolle mit C3bot1E174Q in der entsprechenden Konzentration behandelt (Abbildung 12 D). Wie erwartet wurden hier keine Signale detektiert. Die als Positiv-Kontrolle mit StrepPOD behandelte Membran zeigte wie erwartet konzentrationsabhängige Signale bei den bBSA-Spots (Abbildung 12 E).

Zusammenfassend konnte nach der erfolgreichen Herstellung und Aufreinigung der beiden Fusionsproteine für GST-Stv13-C3bot1E174Q die Funktion der Biotinbindung in nativer und nicht-nativer Form des Fusionsproteins dargestellt werden. Für GST-Stv43-C3bot1E174Q hingegen konnte die Funktion der Biotinbindung nur in nicht-nativer Form nachgewiesen werden.

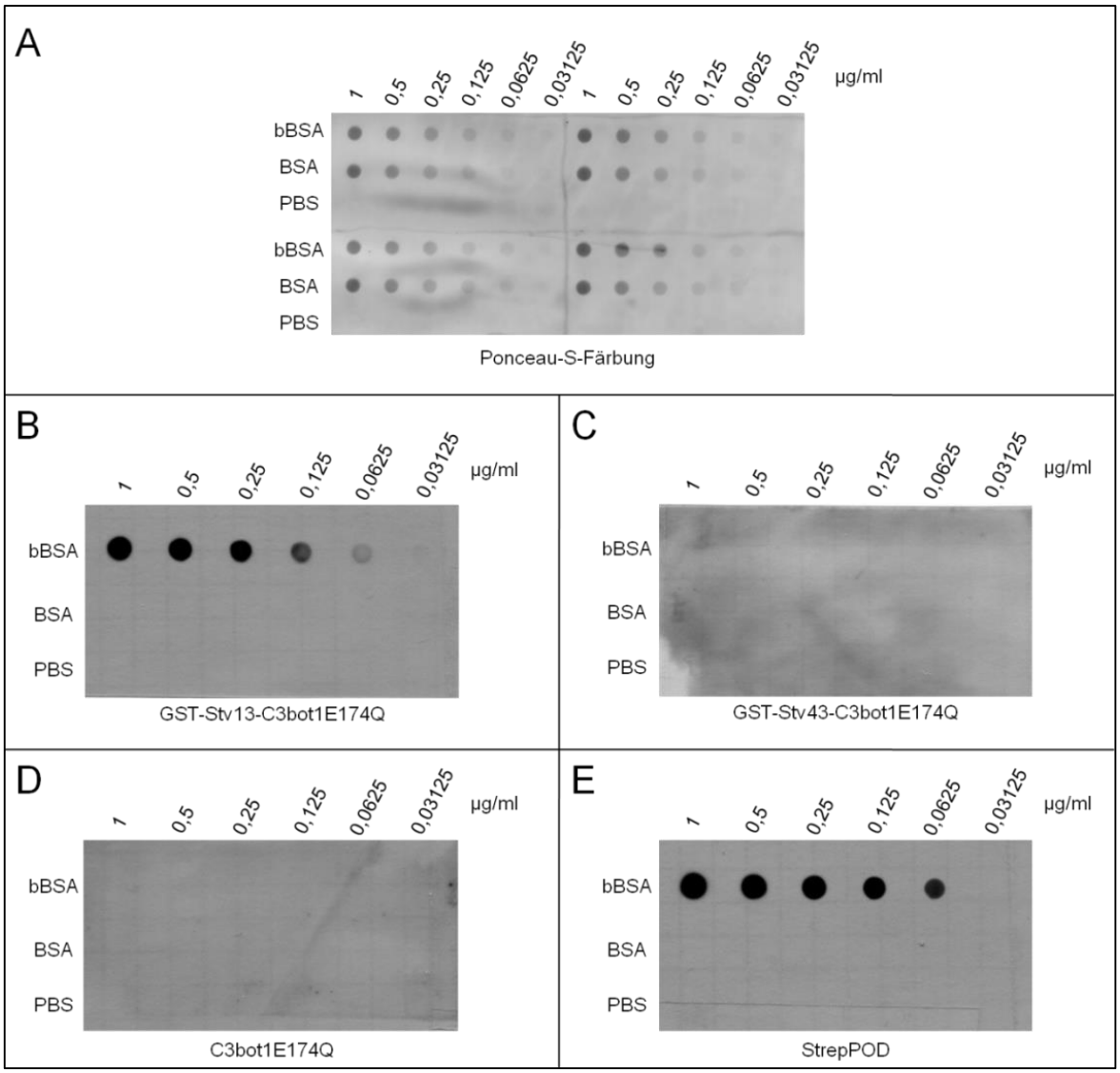

Abbildung 12 Analyse der Biotinbindung der nativen Konstrukte GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q mittels Dot-Blot

Nach dem Spotten von bBSA, BSA und PBS wurde ein Overlay mit nativem GST-Stv13-C3bot1E174Q und nativem GST-Stv43-C3bot1E174Q durchgeführt, um eine Bindung der Konstrukte an bBSA zu erreichen. Der Nachweis der Bindung erfolgte durch die Detektion mit C3-Antikörper.

A Ponceau-S-Färbung der vier Membranen zum Nachweis der gespotteten Proteine
B Overlay mit GST-Stv13-C3bot1E174Q und Detektion mittels C3-Antikörper
C Overlay mit GST-Stv43-C3bot1E174Q und Detektion mittels C3-Antikörper
D Negativ-Kontrolle mit C3bot1E174Q-Overlay und Detektion mittels C3-Antikörper
E Positiv-Kontrolle mittels Streptavidin Peroxidase (StrepPOD)-Overlay

bBSA = biotinyliertes bovines Serum Albumin, BSA = bovines Serum Albumin, GST = Glutathion-S-Transferase, PBS = Phosphat Buffered Saline, StrepPOD = Streptavidin Peroxidase, Stv13 = Streptavidin 13, Stv43 = Streptavidin 43. Erstveröffentlichung in: (Christow et al. 2013)

3.4 Charakterisierung der Zellgängigkeit der Fusionsproteine

In den folgenden Versuchen wurde die Eigenschaft der hergestellten Fusionsproteine zur selektiven Internalisierung in Makrophagen-Zelllinien analysiert. Die Streptavidin-Anteile der Fusionsproteine sollten dabei als Adapter für einen Transport biotinylierter Moleküle dienen.

3.4.1 Digitonin-Assay

Der Digitonin-Assay ist eine Methode zur Analyse der Zellgängigkeit eines Proteins in verschiedenen Zelllinien. Nach der Inkubation einer Zelllinie mit dem jeweiligen Konstrukt wurden die Zellen mithilfe des Detergenz Digitonin permeabilisiert. Anschließend wurden das dabei in den Überstand übertretende Zytosol sowie das Zellpellet mittels Western-Blot-Verfahren analysiert. Sollte das Konstrukt wie erwartet in das Zytosol transportiert worden sein, konnte man es mit dem C3-Antikörper im Überstand detektieren. Fusionsproteine, die sich nicht im Zytosol, aber etwa an der Zellmembran oder innerhalb von Endosomen befanden, wären im Zellpellet zu detektieren gewesen. Der Digitonin-Assay wurde in verschiedenen Versuchsaufbauten durchgeführt. Dabei wurden verschiedene Faktoren, wie die Konzentration an Konstrukt (3.4.1.1), die Inkubationsdauer (3.4.1.2) sowie die verwendeten Zelllinien (3.4.1.3) variiert.

3.4.1.1 Digitonin-Assay – Konzentrationsabhängig

Im konzentrationsabhängigen Digitonin-Assay wurden Maus-Makrophagen der Zelllinie J774A.1 mit verschiedenen Konzentrationen der Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q sowie C3bot1E174Q über sechs Stunden inkubiert und anschließend mit dem Detergenz Digitonin behandelt. Die Überstände und Zellpellets wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Wet-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Eine Ponceau-S-Färbung zur unspezifischen Proteinfärbung zeigte eine jeweils gleichmäßige Proteinverteilung für die Proben der Überstände und der Zellpellets (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Membran auf verschiedenen

Höhen getrennt und mit verschiedenen Antikörpern detektiert. Zwischen 17 und 72 kDa wurde eine C3-Detektion zum Nachweis der Konstrukte durchgeführt. Zwischen 72 und 130 kDa wurde das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) detektiert, das sich sowohl im Überstand als auch im Zellpellet finden sollte, um eine Vergleichbarkeit der Proben sicherzustellen. Zwischen 130 und 170 kDa wurde eine Detektion auf den spezifischen Marker für frühe Endosomen, Early Endosome Antigen 1 (EEA1), welches sich nur im Zellpellet befinden sollte, durchgeführt, um einen Übertritt von Endosomen in den Überstand auszuschließen und die Vergleichbarkeit der Pellet-Proben zu gewährleisten. Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse des konzentrationsabhängigen Digitonin-Assays. Dabei zeigte sich in der C3-Detektion wie erwartet ein Vorhandensein der Fusionsproteine und der C3-Mutante alleine sowohl im Überstand (Abbildung 13 A), als auch im Zellpellet (Abbildung 13 B). Mit zunehmender Konzentration der inkubierten Proteine war eine Zunahme der Signalintensität zu beobachten. Die Detektionen auf Hsp90 und EEA1 lieferten ebenfalls das erwartete Ergebnis (Abbildung 13 A und B).

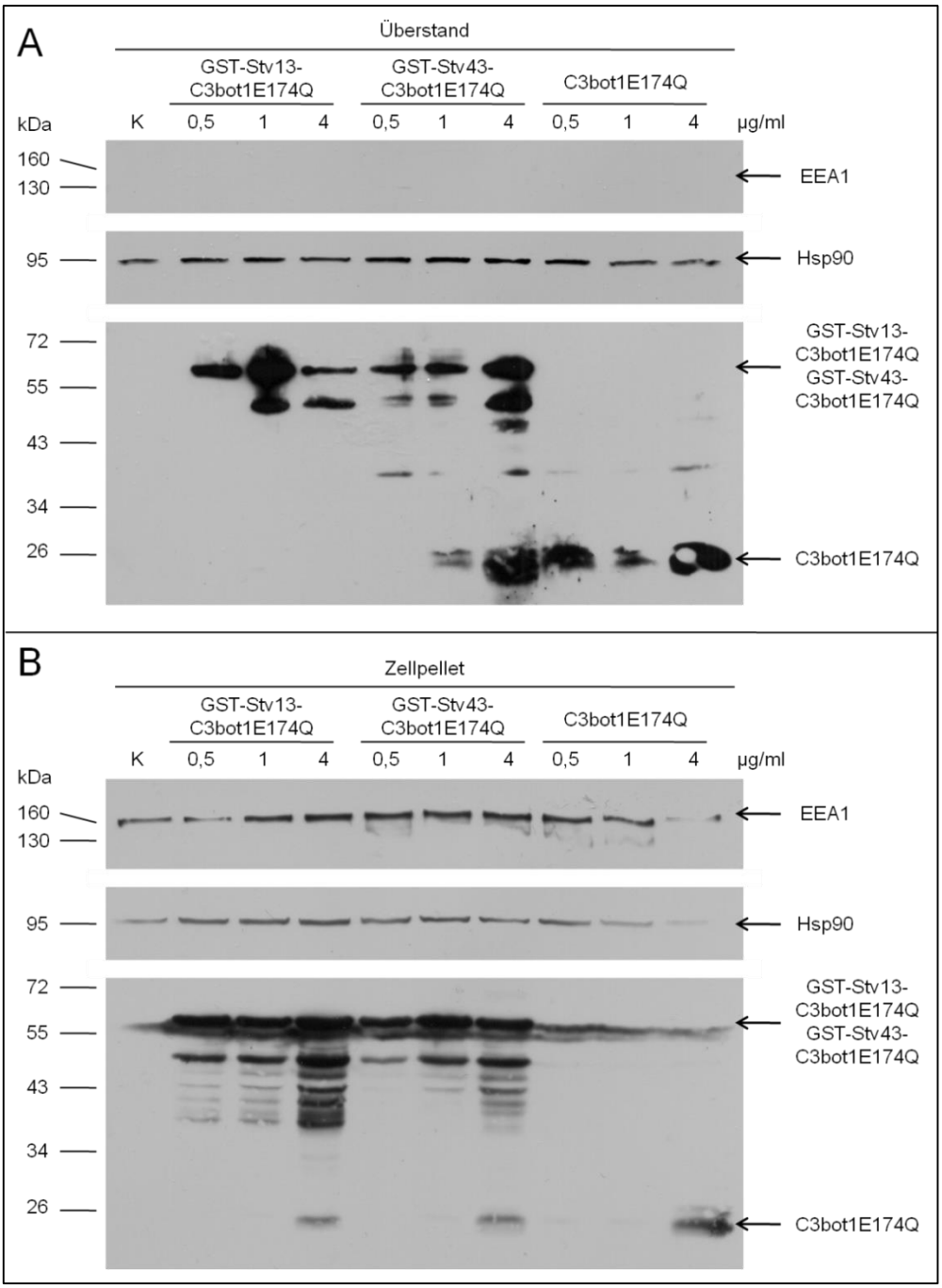

Abbildung 13 Analyse der Zellgängigkeit der Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q mittels konzentrationsabhängigem Digitonin-Assay
Nach der Inkubation von Maus-Makrophagen der Zelllinie J774A.1 mit den verschiedenen Konzentrationen der Konstrukte GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q sowie der C3-Mutante C3bot1E174Q alleine wurden die Zellen mit dem Detergenz Digitonin permeabilisiert, um ein Übertreten des Zytosols in den Überstand zu erreichen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Anschließend wurden die Proteine aus Überstand und Zellpellet mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Wet-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert, wo sie mit verschiedenen Antikörpern (oben EEA-1-Antikörper, Mitte Hsp90-Antikörper, unten C3-Antikörper) detektiert wurden.
A Analyse des Überstands
B Analyse des Zellpellets
EEA1 = Early-Endosome-Antigen-1, GST = Glutathion-S-Transferase, Hsp90 = Hitzeschockprotein 90, K = Kontrolle mit Zellen ohne Inkubation mit Konstrukt oder C3-Mutante, Stv13 = Streptavidin 13, Stv43 = Streptavidin 43. Erstveröffentlichung in (Christow et al. 2013)

3.4.1.2 Digitonin-Assay – Zeitabhängig

Im zeitabhängigen Digitonin-Assay wurden Maus-Makrophagen der Zelllinie J774A.1 mit jeweils 4 µg/ml der Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q (Daten nicht gezeigt) sowie C3bot1E174Q über 1; 6 und 24 h inkubiert und anschließend mit dem Detergenz Digitonin behandelt. Das weitere Verfahren zur Analyse von Überstand und Zellpellet entsprach dem vorangegangen (siehe 3.4.1.1). Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse. Dabei war zu sehen, dass sich das Konstrukt und die C3-Mutante wie erwartet in Überstand und Zellpellet nachweisen ließen. Mit zunehmender Inkubationszeit war eine Zunahme der Signalintensität zu beobachten. Die Detektion von Hsp90 zeigte wie erwartet gleichmäßig vorhandene Banden im Überstand und Zellpellet, wobei jedoch die Banden im Überstand der unbehandelten Kontrollzellen sowie die Banden im Überstand der über eine und sechs Stunden mit C3bot1E174Q behandelten Zellen nicht dargestellt werden konnten. Die Detektion für EEA1 fiel ebenfalls wie erwartet aus: Signale zeigten sich lediglich in den Proben der Zellpellets, wobei jedoch die Bande bei der 24-stündigen Inkubation mit dem Konstrukt nicht dargestellt werden konnte.

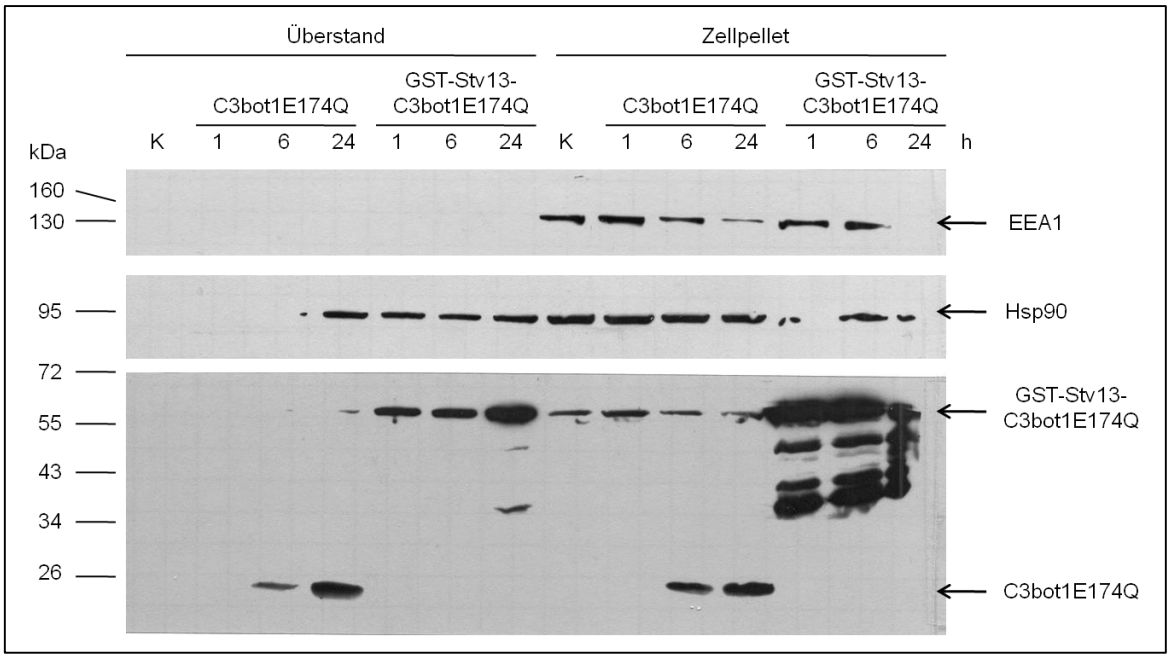

Abbildung 14 Analyse der Zellgängigkeit des Fusionsproteins GST-Stv13-C3bot1E174Q mittels zeitabhängigem Digitonin-Assay
Nach der Inkubation von Maus-Makrophagen der Zelllinie J774A.1 mit dem Konstrukt GST-Stv13-C3bot1E174Q sowie der C3-Mutante C3bot1E174Q alleine über eine, sechs und 24 h wurden die Zellen mit dem Detergenz Digitonin permeabilisiert, um ein Übertreten des Zytosols in den Überstand zu erreichen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Anschließend wurden die Proteine aus Überstand und Zellpellet mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Wet-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert, wo sie mit verschiedenen Antikörpern (oben EEA-1-Antikörper, in der Mitte Hsp90-Antikörper, unten C3-Antikörper) detektiert wurden.
EEA1 = Early-Endosome-Antigen-1, GST = Glutathion-S-Transferase, Hsp90 = Hitzeschockprotein 90, K = Kontrolle mit Zellen ohne Inkubation mit Konstrukt oder C3-Mutante, Stv13 = Streptavidin 13, Stv43 = Streptavidin 43

3.4.1.3 Digitonin-Assay – Zelllinien im Vergleich

Die dritte Variante der durchgeführten Digitonin-Assays verglich die Zellgängigkeit der Konstrukte GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q sowie C3bot1E174Q in verschiedenen Zelllinien. Dabei wurden jeweils Maus-Makrophagen der Zelllinie J774A.1 direkt verglichen mit Hamster-Ovarial-Zellen der Zelllinie CHO-K1, menschlichen Epithelzellen eines Zervix-Karzinoms der Zelllinie HeLa oder Nierenzellen aus der grünen Meerkatze der Zelllinie Vero. Es wurden die jeweiligen Zellen mit jeweils 4 µg/ml der beiden Konstrukte oder der C3-Mutante alleine über sechs Stunden inkubiert und daraufhin mit dem Detergenz Digitonin permeabilisiert, um einen Übertritt des Zytosols in den Überstand zu gewährleisten. Anschließend wurde wie in 3.4.1.1 beschrieben verfahren. Die Abbildungen 15 und 16 zeigen die Ergebnisse.

Abbildung 15 zeigt den Vergleich zwischen J774A.1-, CHO-K1 und Vero-Zellen, die jeweils mit 4 µg/ml GST-Stv13-C3bot1E174Q, GST-Stv43-C3bot1E174Q oder C3bot1E174Q behandelt wurden. Dabei war wie erwartet zu erkennen, dass die Konstrukte und die C3Mutante alleine im Überstand und damit im Zytosol der J774A.1-Makrophagen zu detektieren waren. Die Konstrukte waren jedoch auch im Zytosol der CHO-K1- und der Vero-Zellen zu finden. Die C3Mutante konnte hingegen wie erwartet nicht im Zytosol der beiden letztgenannten Zelllinien nachgewiesen werden. Die Analyse der Zellpellets bestätigte diese Ergebnisse. Die Detektion von Hsp90 zeigte wie erwartet in den Proben der Überstände und der Pellets gleichmäßige Signale. Eine Bande konnte nicht detektiert werden. Die Detektion von EEA1 zeigte in den Überstand-Proben wie erwartet kein Signal, während bei den Zellpellet-Proben wie erwartet Signale zu finden waren. Auch hier konnte eine Bande nicht detektiert werden.

Abbildung 16 zeigt den Vergleich zwischen J774A.1-Makrophagen und HeLa-Zellen, die mit jeweils 1 oder 4 µg/ml GST-Stv13-C3bot1E174Q, GST-Stv43-C3bot1E174Q oder C3bot1E174Q behandelt wurden. Es zeigte sich analog zum vorangegangen Versuch eine Aufnahme der Fusionsproteine ins Zytosol beider Zelllinien bei 1 und 4 µg/ml, während die C3-Mutante lediglich im Zytosol der J774A.1-Zellen bei einer Konzentration von 4 µg/ml nachzuweisen war. Auch hier bestätigte die Analyse der Zellpellets die Ergebnisse. Die Detektion von Hsp90 wies wie erwartet Signale in den Proben des Überstands und der Pellets auf, wobei eine Bande fehlte. Die Detektion von EEA1 zeigte wie erwartet lediglich Signale in den Proben der Pellets, wobei diese in unterschiedlicher Intensität nachzuweisen waren.

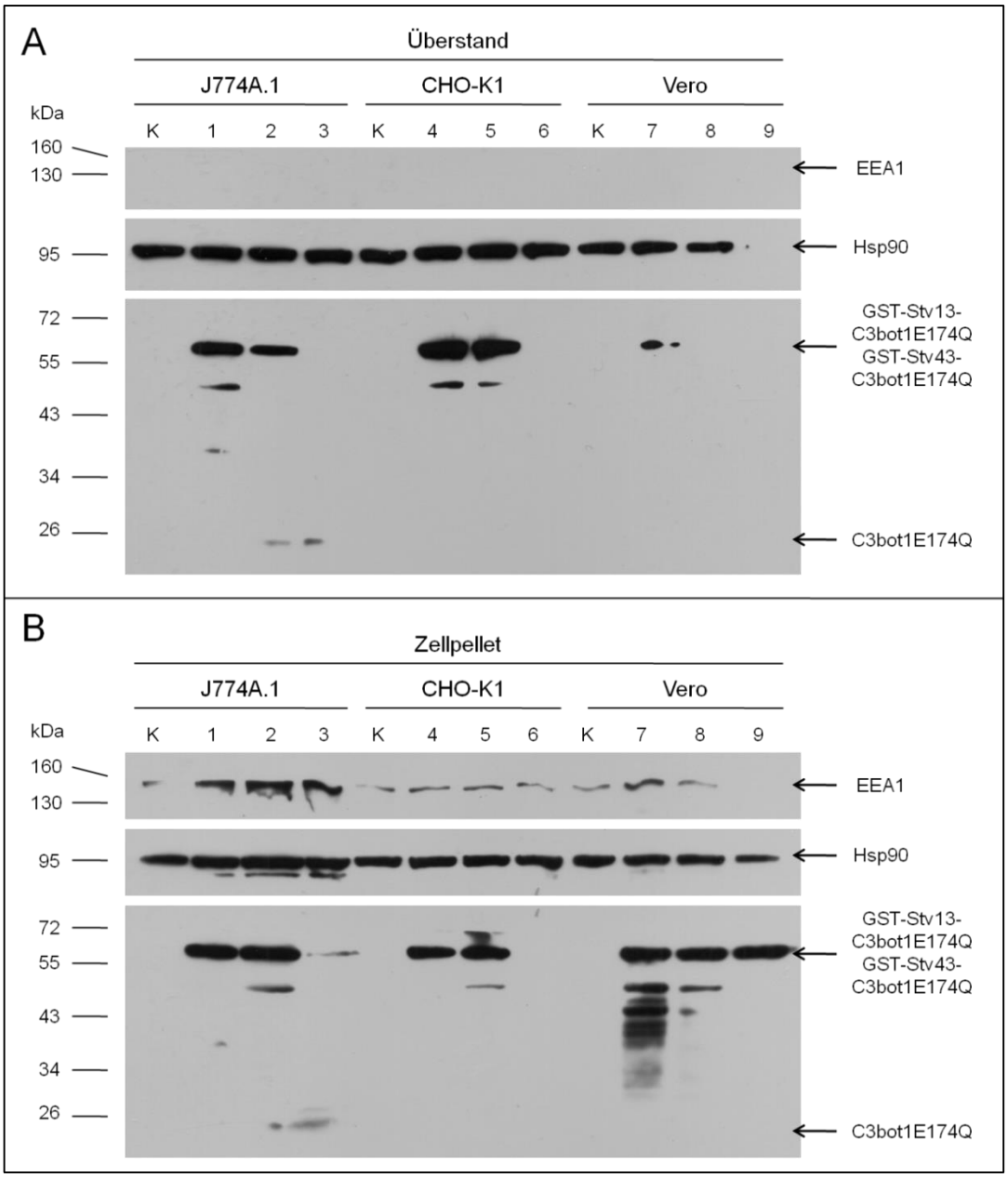

Abbildung 15 Analyse der Zellgängigkeit der Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q mittels Digitonin-Assay in die Zelllinien J774A.1, CHO-K1 und Vero im Vergleich
Nach der Inkubation von Maus-Makrophagen der Zelllinie J774A.1, sowie Hamster-Ovarialzellen der Zelllinie CHO-K1 und epithelialen Nierenzellen der grünen Meerkatze der Zelllinie Vero mit jeweils 4 µg/ml der Konstrukte GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q sowie der C3-Mutante C3bot1E174Q alleine wurden die Zellen mit dem Detergenz Digitonin permeabilisiert, um ein Übertreten des Zytosols in den Überstand zu erreichen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Anschließend wurden die Proteine aus Überstand und Zellpellet mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Wet-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert, wo sie mit verschiedenen Antikörpern (oben EEA-1-Antikörper, Mitte Hsp90-Antikörper, unten C3-Antikörper) detektiert wurden.
A Analyse des Überstands
B Analyse des Zellpellets
1, 4, 7 = GST-Stv13-C3bot1E174Q
2, 5, 8 = GST-Stv43-C3bot1E174Q
3, 6, 9 = C3bot1E174Q
EEA1 = Early-Endosome-Antigen-1, GST = Glutathion-S-Transferase, Hsp90 = Hitzeschockprotein 90, K = Kontrolle mit Zellen ohne Inkubation mit Konstrukt oder C3-Mutante, Stv13 = Streptavidin 13, Stv43 = Streptavidin 43

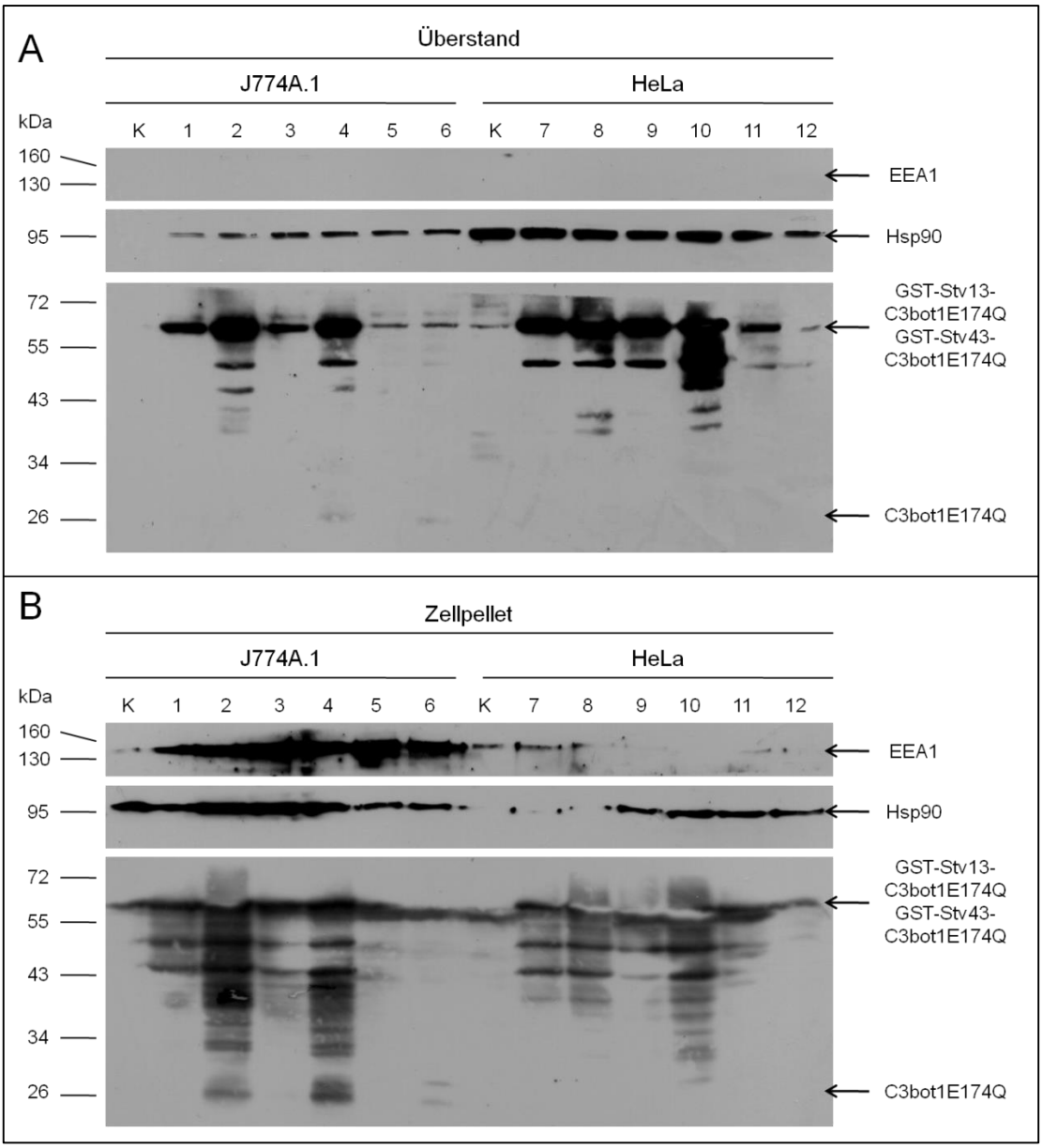

Abbildung 16 Analyse der Zellgängigkeit der Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q mittels Digitonin-Assay in die Zelllinien J774A.1und HeLa im Vergleich
Nach der Inkubation von Maus-Makrophagen der Zelllinie J774A.1, sowie humanen Cervix-Karzinomzellen der Zelllinie HeLa mit jeweils 1 oder 4 µg/ml der Konstrukte GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q sowie der C3-Mutante C3bot1E174Q alleine wurden die Zellen mit dem Detergenz Digitonin permeabilisiert, um ein Übertreten des Zytosols in den Überstand zu erreichen. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Anschließend wurden die Proteine aus Überstand und Zellpellet mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Wet-Blot auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert, wo sie mit Antikörpern (oben EEA-1-Antikörper, Mitte Hsp90-Antikörper, unten C3-Antikörper) detektiert wurden.
A Analyse des Überstands
B Analyse des Zellpellets
1, 7 = 1 µg/ml GST-Stv13-C3bot1E174Q
2, 8 = 1 µg/ml GST-Stv43-C3bot1E174Q
3, 9 = 1 µg/ml C3bot1E174Q
4, 10 = 4 µg/ml GST-Stv13-C3bot1E174Q
5, 11 = 4 µg/ml GST-Stv43-C3bot1E174Q
6, 12 = 4 µg/ml C3bot1E174Q
EEA1 = Early-Endosome-Antigen-1, GST = Glutathion-S-Transferase, Hsp90 = Hitzeschockprotein 90,
K = Kontrolle mit Zellen ohne Inkubation mit Konstrukt oder C3-Mutante, Stv13 = Streptavidin 13,
Stv43 = Streptavidin 43

3.4.2 Charakterisierung der Fusionsprotein-vermittelten Aufnahme von Fluorescein-Biotin in J774A.1-Makrophagen durch Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Aufnahmeversuche wurden Makrophagen der Zelllinie J774A.1 kultiviert und unter sterilen Bedingungen auf Deckplättchen mit einem vorinkubierten Komplex aus Fluorescein-Biotin (F-Biotin) und dem jeweiligen Fusionsprotein über vier Stunden inkubiert. Die Fusionsproteine werden hier Transporter genannt, da sie in diesem Versuch als Transporter für F-Biotin in das Zytosol zum Einsatz kamen. Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen fixiert und es wurde eine Behandlung mit Hoechst zur Färbung der Zellkerne, sowie eine Immunfärbung der frühen Endosomen mit EEA1 (Abbildung 17) oder der F-Aktin-Filamente mit Phalloidin (Abbildung 18) durchgeführt. Anschließend wurde das mittels Fusionsprotein internalisierte F-Biotin durch Anregung des Fluoresceins mit Blaulicht der Wellenlänge λ = 495 nm detektiert. Um einen unspezifischen Transport auszuschließen, wurden unter denselben Bedingungen verschiedene Kontrollen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit F-Biotin allein, F-Biotin mit Streptavidin oder F-Biotin mit C3bot1E174Q behandelt.

Wie in den Abbildungen 17 und 18 zu erkennen ist, zeigten die Zellen, die mit dem Komplex aus F-Biotin und GST-Stv13-C3bot1E174Q behandelt wurden, deutliche Fluoreszenz-Signale im Zellinneren bzw. Zell-assoziiert. Abbildung 17 zeigt, dass diese Signale nicht auf den Signalen der frühen Endosomen zu finden waren. Die Kontrollen wiesen keinerlei definierte Fluoreszenz-Foci auf, woraus sich schließen ließ, dass es sich hierbei um keinerlei unspezifischen Transport ins Zellinnere handelte. Der Komplex aus F-Biotin und GST-Stv43-C3bot1E174Q hingegen ergab keinerlei Signale im Sinne eines erfolgreichen Transports von F-Biotin.

Fasst man die Zellversuche zusammen, war in den Digitonin-Assays eine konzentrations- und zeitabhängige Aufnahme beider Fusionsproteine sowie von C3bot1E174Q ins Zytosol von Makrophagen der Zelllinie J744A.1 zu beobachten. Die Konstrukte konnten nach Inkubation auch im Zytosol anderer Zelllinien (HeLa, CHO-K1 und Vero) nachgewiesen werden, womit eine Makrophagen-spezifische Aufnahme, anders als bei der C3-Mutante, nicht gezeigt werden konnte.

In den Untersuchungen zur Fusionsprotein-vermittelten Aufnahme von Fluorescein-Biotin in J774A.1-Makrophagen konnte lediglich das Konstrukt GST-Stv13-C3bot1E174Q im Zytosol nachgewiesen werden. Betrachtet man die vorangehenden Versuche ist davon auszugehen, dass das Konstrukt GST-Stv43-C3bot1E174Q ebenfalls ins Zytosol der Makrophagen gelangte, die Bindung von Fluorescein-Biotin an das native Konstrukt jedoch nicht stattfand und somit kein Signal zu sehen war.

Zusammengefasst konnten die beiden Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q erfolgreich kloniert, exprimiert und aufgereinigt werden. Anschließend konnte die Funktionalität der Bindung von Biotin an das Fusionsprotein GST-Stv13-C3bot1E174Q gezeigt werden (kein Nachweis der Bindung von Biotin an das native Fusionsprotein GST-Stv43-C3bot1E174Q). In den Zellversuchen zeigte sich eine konzentrations- und zeitabhängige Aufnahme beider Fusionsproteine in das Zytosol von Makrophagen der Zelllinie J744A.1, sowie in das Zytosol anderer Zelllinien (HeLa, CHO-K1, Vero). Ein durch das Fusionsprotein GST-Stv13-C3bot1E174Q vermittelte Transport von Fluorescein-Biotin ins das Zytosol von J774A.1-Makrophagen konnte nachgewiesen werden.

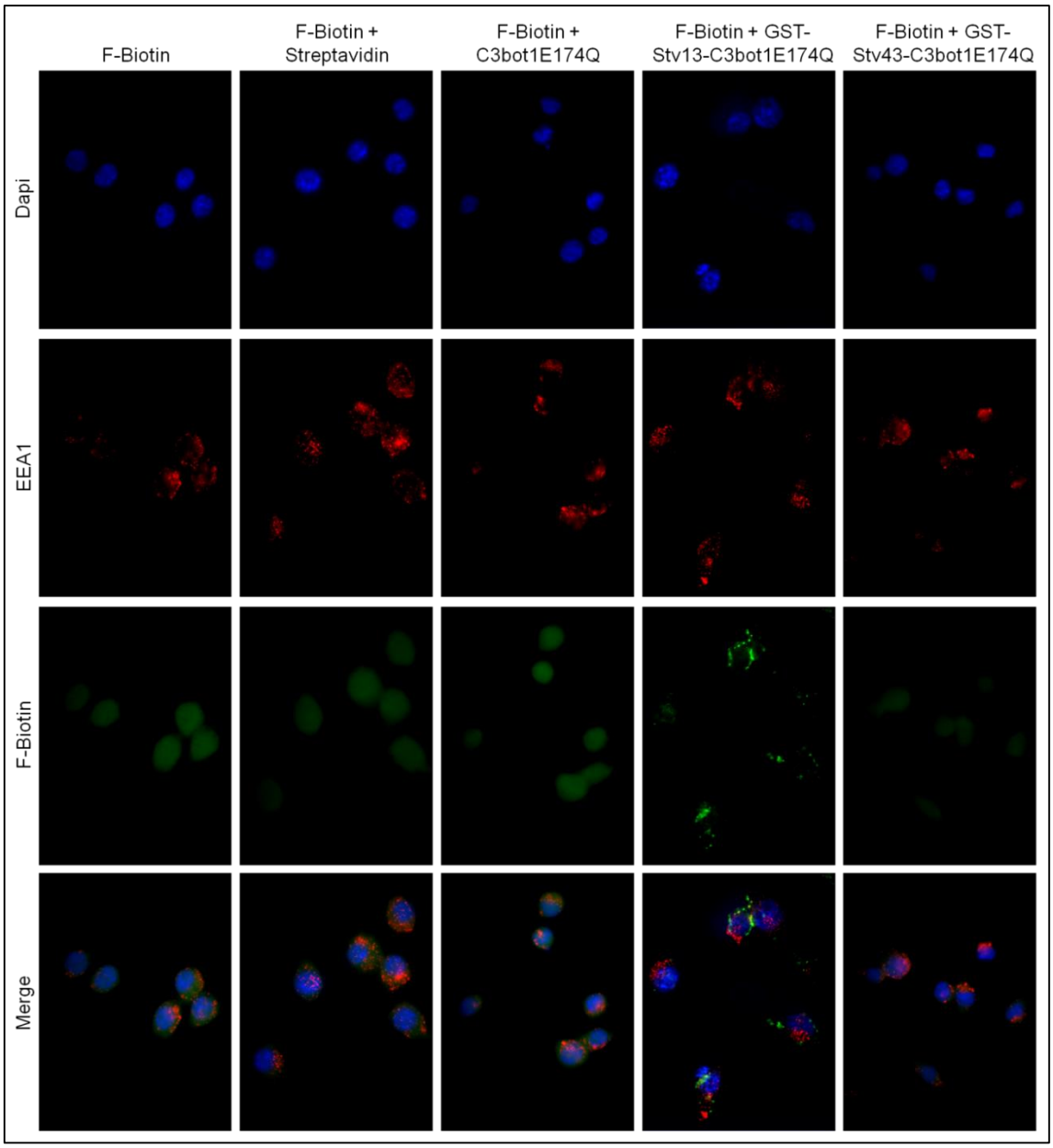

Abbildung 17 Immunofluoreszenz-Analyse der Aufnahme von F-Biotin in J774A.1-Makrophagen durch die Transporter GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q
Flourenszensmikroskopische Bilder in 400-facher Vergrößerung von J774A.1-Makrophagen, die mit den beiden Fusionsproteinen als Transporter für F-Biotin behandelt wurden, sowie verschiedene Kontrollen, um eine unspezifische Internalisierung von F-Biotin auszuschließen.
F-Biotin Makrophagen behandelt mit F-Biotin ohne Vorinkubation mit einem der beiden Transporter, C3bot1E174Q oder Streptavidin, um eine unspezifische Internalisierung von F-Biotin auszuschließen.
F-Biotin + Streptavidin Makrophagen behandelt mit F-Biotin und Streptavidin ohne Vorinkubation mit einem der beiden Transporter oder C3bot1E174Q, um eine unspezifische Internalisierung des Komplexes aus F-Biotin und Streptavidin auszuschließen.
F-Biotin + C3bot1E174Q Makrophagen behandelt mit F-Biotin und C3bot1E174Q ohne Vorinkubation mit einem der beiden Transporter oder Streptavidin, um eine unspezifische Internalisierung des Komplexes aus F-Biotin und C3bot1E174Q auszuschließen.
F-Biotin + GST-Stv13-C3bot1E174Q Makrophagen behandelt mit F-Biotin und GST-Stv13-C3bot1E174Q, um eine spezifische Aufnahme nachzuweisen.
F-Biotin + GST-Stv43-C3bot1E174Q Makrophagen behandelt mit F-Biotin und GST-Stv43-C3bot1E174Q, um eine spezifische Aufnahme nachzuweisen. Dapi = 4′,6-Diamidin-2-phenylindol, EEA1 = Early-Endosome-Antigen 1, F-Biotin = Fluorescein-Biotin, GST = Glutathion-S-Transferase, Stv13 = Streptavidin 13, Stv43 = Streptavidin 43

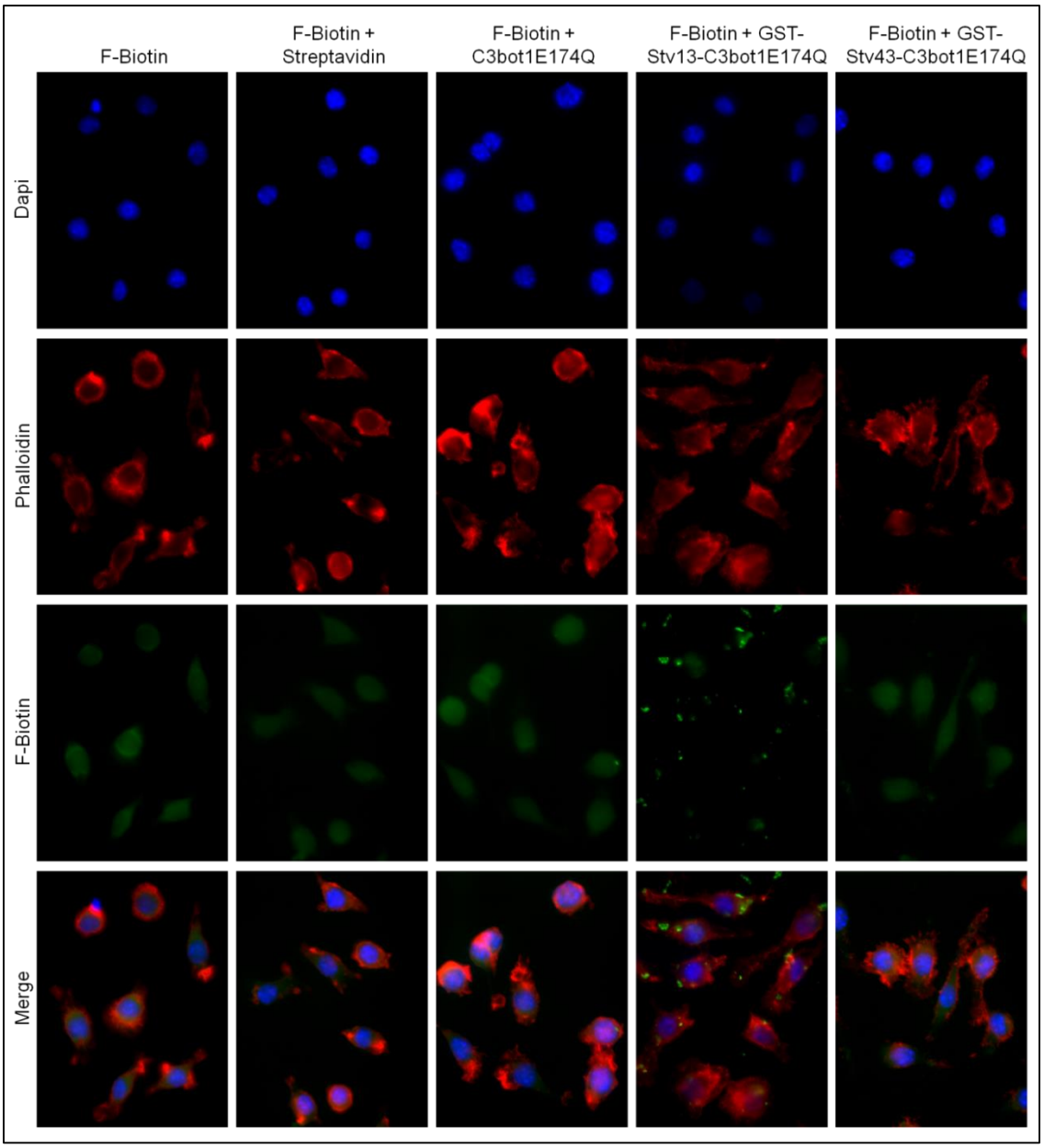

Abbildung 18 Immunofluoreszenz-Analyse der Aufnahme von F-Biotin in J774A1-Makrophagen durch die Transporter GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q Flourenszensmikroskopische Bilder in 400-facher Vergrößerung von J774A.1-Makrophagen, die mit den beiden Fusionsproteinen als Transporter für F-Biotin behandelt wurden, sowie verschiedene Kontrollen, um eine unspezifische Internalisierung von F-Biotin auszuschließen.
F-Biotin Makrophagen behandelt mit F-Biotin ohne Vorinkubation mit einem der beiden Transporter, C3bot1E174Q oder Streptavidin, um eine unspezifische Internalisierung von F-Biotin auszuschließen.
F-Biotin + Streptavidin Makrophagen behandelt mit F-Biotin und Streptavidin ohne Vorinkubation mit einem der beiden Transporter oder C3bot1E174Q, um eine unspezifische Internalisierung des Komplexes aus F-Biotin und Streptavidin auszuschließen.
F-Biotin + C3bot1E174Q Makrophagen behandelt mit F-Biotin und C3bot1E174Q ohne Vorinkubation mit einem der beiden Transporter oder Streptavidin, um eine unspezifische Internalisierung des Komplexes aus F-Biotin und C3bot1E174Q auszuschließen.
F-Biotin + GST-Stv13-C3bot1E174Q Makrophagen behandelt mit F-Biotin und GST-Stv13-C3bot1E174Q, um eine spezifische Aufnahme nachzuweisen.
F-Biotin + GST-Stv43-C3bot1E174Q Makrophagen behandelt mit F-Biotin und GST-Stv43-C3bot1E174Q, um eine spezifische Aufnahme nachzuweisen. Dapi = 4′,6-Diamidin-2-phenylindol, EEA1 = Early-Endosome-Antigen 1, F-Biotin = Fluorescein-Biotin, GST = Glutathion-S-Transferase, Stv13 = Streptavidin 13, Stv43 = Streptavidin 43

4 Diskussion

4.1 Klonierung der Fusionsproteine

Die in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q mussten zunächst hergestellt werden. Das geplante Vorgehen sah eine genetische Klonierung der beiden rekombinanten Proteine vor. In der Arbeitsgruppe Barth wurde bereits ein vergleichbarer Transporter aus Wildtyp-Streptavidin und der C3-Mutante C3bot1E174Q mittels chemischer Koppelung der einzelnen Komponenten hergestellt und charakterisiert (Lillich et al. 2012). Dieser gekoppelte Transporter demonstrierte zwar die grundsätzliche Verwendbarkeit eines Streptavidin-C3bot1E174Q-Transporters, um biotinylierte Moleküle in das Zytosol von Makrophagen zu transportieren, ein gentechnisch hergestelltes, rekombinantes Fusionsprotein würde jedoch einen weitaus besser definierten und reproduzierbaren Transporter darstellen, was die Indikation zur Klonierung ergab.

Die einzelnen Gene wurden zunächst mittels PCR aus den Plasmiden pGEX-2T-C3bot1E174Q (für die C3-Mutante), pTSA-13 (für Stv13) und pQE-43 (für Stv43) amplifiziert. Der für das C3bot1E174Q-Gen verwendete 5‘-Primer, der in der Arbeitsgruppe auch für C3bot1 verwendet wurde, wurde aufgrund erhaltener fehlerhafter Sequenzen durch einen neuen 5‘-Primer ersetzt (siehe 2.1.8). Das weitere Vorgehen, das zur Fusion der verschiedenen DNA-Stränge in die Expressionsvektoren führte, erfolgte ohne Probleme oder Abweichungen nach dem ursprünglichen Protokoll. Zur abschließenden Kontrolle der fertigen DNA-Sequenzen der Fusionsproteine wurden Sequenzierungen durchgeführt und mit den geplanten Zielsequenzen verglichen. Die weitere Verwendung eines fehlerfreien DNA-Endproduktes wurde so sichergestellt, um mit der Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine fortfahren zu können.

4.2 Aufreinigung der Fusionsproteine

4.2.1 Expression der Fusionsproteine

Die Expression der Fusionsproteine in *E. coli*-Bakterien des Stammes BL21-Rosetta wurde durch die Durchführung eines Expressionsverlaufs untersucht und optimiert. Die Induktion erfolgte mit Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid.

So zeigte sich, dass hohe Mengen an Protein bei einer Expression über 22 h bei 16 °C gebildet wurden. Bei höheren Temperaturen ergaben sich zwar höhere Mengen an Protein, jedoch zeigten sich hier auch große Mengen an Abbauprodukten. Um eine Verunreinigung durch diese Abbauprodukte in den folgenden Aufreinigungsschritten zu verhindern, wurde daher die Expression bei einer Temperatur von 16 °C bevorzugt.

4.2.2 Aufreinigung der Fusionsproteine

Die Fusionsproteine wurden an Glutathion-Sepharose-Transferase (GST) gekoppelt. Mithilfe dieses GST-Tags sollte eine Aufreinigung nach erfolgter Expression in *E. coli*-Bakterien des Stammes BL21-Rosetta gelingen. Dazu wurden das induzierte und inkubierte Bakterien-Pellet in Lyse-Puffer resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Bakterien-Zellwand mittels Ultraschall. Der nach erneuter Zentrifugation erhaltene Überstand sollte das Fusionsprotein enthalten und weiteren Aufreinigungsschritten zugeführt werden. Es zeigte sich jedoch, dass nur geringe Mengen Protein in den Überstand übergingen und der Großteil im Pellet verblieb. Durch eine Erhöhung der Ultraschallanwendungen konnte die Proteinausbeute maßgeblich verbessert werden. Das im Überstand befindliche Protein sollte nun über seinen GST-Tag mithilfe von Glutathion-Sepharose 4B Beads gebunden und anschließend nach mehreren Waschschritten mit Thrombin vom Tag geschnitten werden. Es zeigte sich jedoch, dass ein solcher Thrombinverdau nicht zum gewünschten Ergebnis führte. Zwar wurde das Protein nachweislich an die Beads gebunden, der Verdau brachte jedoch keine Ablösung vom GST-Tag. Daher wurde das Protokoll im Sinne einer Glutathion-Elution variiert. Es zeigte sich, dass das Protein (mitsamt dem GST-Tag) mithilfe eines Elutions-Puffers, bestehend aus

50 mM Tris HCl pH 8,0 + 50 mM Glutathion + 0,1 % SDS, von den Beads gelöst werden konnte. Die Befürchtung, das denaturierende SDS könnte eine Beeinträchtigung des Fusionsproteins mit sich bringen, wurde durch nachfolgende Versuche in der Arbeitsgruppe ausgeräumt (persönliche Mitteilung durch M. Lillich und J. Fahrer). Ausgehend von den positiven Ergebnissen der Aufreinigung konnte die Methode der Aufreinigung von GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q mittels Glutathion-Elution weiter verbessert und etabliert werden. Auffällig war auch, dass große Mengen an Protein nach erfolgter Aufreinigung ausfielen und damit nicht weiter verwendet werden konnten. Dabei wurde das Protokoll hinsichtlich Waschschritten, Zentrifugation, Geschwindigkeiten und ununterbrochener Kühlkette optimiert, bis zufriedenstellende Mengen an Fusionsprotein gewonnen werden konnten und die Menge an ausgefallenem Protein auf ein Minimum reduziert war. Die Untersuchung der Einzelschritte zeigte, dass nach wie vor hohe Mengen an Protein im Bakterien-Zellpellet verblieben. Eine Theorie hierzu wäre die Bildung von Einschlusskörperchen, sogenannter „inclusion bodies“. Die Bildung dieser „inclusion bodies“ ist ein bekanntes Phänomen, das bei der Überexpression in *E. coli*-Stämmen auftritt (Baneyx und Mujacic 2004). Demnach bildet sich in den Bakterienzellen ein unlösliches Aggregat aus korrekt prozessiertem, jedoch inkomplett gefaltetem Protein. Aufgrund der ausreichend hohen Proteinausbeute durch die Glutathion-Elution wurde von der Etablierung einer Methode zur Präparation und Aufreinigung dieser „inclusion bodies“, wie durch Sano und Kollegen beschrieben (Sano et al. 1997), abgesehen.

4.3 Charakterisierung der Bindungseigenschaften der Fusionsproteine

Die beiden hergestellten Fusionsproteine bestehen gleichermaßen zu einem Teil aus der C3-Mutante C3bot1E174Q und aus jeweils einer von zwei verwendeten Streptavidin-Mutanten.

Bei der C3-Mutante C3bot1E174Q handelt es sich um das C3bot1-Toxin, welches an der Position 174 der Aminosäure-Kette Glutamin statt Glutamat aufweist und dadurch enzymatisch inaktiv ist (Aktories et al. 1995).

Das natürliche Wildtyp-Streptavidin aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* bindet das wasserlösliche Vitamin Biotin kovalent mit einer sehr hohen Affinität (K_d-Wert = 10^{-14} - 10^{-16} M). Für die vorliegende Arbeit wurden die rekombinanten Streptavidin-Mutanten Stv13 und Stv43 verwendet. Bei Stv13 handelt es sich um eine tetramere Streptavidin-Mutante mit einer gegenüber Wildtyp-Streptavidin erhöhten Struktur-Stabilität und besseren Zugänglichkeit zu biotinylierter DNA (Sano et al. 1995). Stv43 ist eine dimere Streptavidin-Mutante, welche mit einem K_d-Wert von 1,5 x 10^{-7} M eine herabgesetzte Bindungsaffinität für Biotin zeigt (Sano et al. 1997). Ein großer Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung und dem Vergleich der Biotinbindung der beiden hergestellten Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q mittels verschiedener Methoden.

4.3.1 Analyse der Biotinbindung mittels Overlay-Assay

Mittels des Overlay-Assays konnte eine spezifische Bindung der Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q an biotinyliertes bovines Serum Albumin (bBSA) nachgewiesen werden. Dazu wurden die Fusionsproteine mithilfe einer SDS-PAGE auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit bBSA inkubiert. Nach den anschließenden Waschschritten, die dazu dienten unspezifisch gebundenes Protein zu entfernen, wurden die freien Biotinreste der an die Fusionsproteine gebundenen bBSA-Moleküle detektiert.

Für beide Fusionsproteine konnte eine spezifische und konzentrationsabhängige Bindung von bBSA nachgewiesen werden. Die Bindung war bereits bei 5 pmol Fusionsprotein zu beobachten. Die Signalintensitäten für GST-Stv13-C3bot1E174Q waren bei jeweils gleichen Konzentrationen gegenüber GST-Stv43-C3bot1E174Q erhöht, woraus sich eine bessere Biotinbindung für das Stv13-Fusionsprotein ableiten lässt. Die Banden im Bereich zwischen 26 und 17 kDa könnten Abbauprodukte des Stv13-Fusionsproteins darstellen. Auch die Ergebnisse in der Kontrolle mit C3bot1E174Q sprechen für eine spezifische Bindung der Fusionsproteine an das bBSA.

Wie beschrieben wurden zur Aufreinigung der Fusionsproteine geringe Konzentrationen des Agens SDS verwendet. SDS besitzt denaturierende Eigenschaften. Aufgrund der Ergebnisse im Overlay-Assay (und den nachfolgenden Assays) konnte jedoch davon ausgegangen werden, dass es zu keinerlei Funktionseinschränkung von Streptavidin gekommen war. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Beobachtungen, denen zufolge Streptavidin ein hohes Maß an Resistenzen gegenüber denaturierenden Agentien aufweist (Wilchek et al. 2006).

Die positiven Ergebnisse des Overlay-Assays bewiesen die korrekte Funktionsfähigkeit des Streptavidins in den Fusionsproteinen. Ausgehend von diesem Umstand konnten weitere Versuche zur Aufnahme biotinylierter Moleküle in Makrophagen mittels Fusionsproteinen geplant und durchgeführt werden.

4.3.2 Analyse der Biotinbindung mittels Gelshift-Assay

Nach dem erbrachten qualitativen Bindungsnachweis der Fusionsproteine an biotinyliertes BSA sollte mithilfe des Gelshift-Assays die Bindungsaffinität detaillierter untersucht werden. In der Durchführung des Assays erfolgte eine Komplexbildung zwischen den Fusionsproteinen in verschiedenen Konzentrationen und biotinylierten Oligonukleotiden in flüssiger Phase. Einen Vorteil bei der Anwendung dieser Methode stellte die Möglichkeit zur Untersuchung der nativen Fusionsproteine dar. Mit zunehmender Konzentration an Fusionsprotein sollte eine abnehmende Konzentration an freien Oligonukleotiden erreicht werden. Zur Auftrennung der Komplexe und der freien Oligonukleotide wurde anschließend eine native Elektrophorese mit folgender Detektion der freien Oligonukleotide durchgeführt.

Die beiden Fusionsproteine zeigten unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu den biotinylierten Oligonukleotiden. Das GST-Stv13-C3bot1E174Q-Konstrukt wies bereits bei der niedrigsten Konzentration eine Komplexbildung im Sinne eines schwächeren Signals auf und hatte schon bei der nächsthöheren Konzentration von 1 pmol die gesamte Menge an Oligonukleotiden gebunden. Somit ist für GST-Stv13-C3bot1E174Q von einer sehr hohen Bindungsaffinität zu biotinylierten

Substanzen auszugehen. Bei dem GST-Stv43-C3bot1E174Q-Konstrukt war erst ab einer Konzentration von 50 pmol eine Komplexbildung im Sinne eines schwächeren Signals nachweisbar. Dies entspricht gegenüber den 250 fmol an biotinylierten Oligonukleotiden einer 200-fachen Konzentration an Konstrukt. Somit ist, beachtet man die Kontrollen, nicht sicher von einer unspezifischen Bindung, wie sie bei 50 pmol C3bot1E174Q zu beobachten war, abzusehen.

Von der Ermittlung einer Dissoziationskonstante (K_d-Wert), also der Konzentration an Konstrukt, bei welcher 50% der biotinylierten Oligonukleotide gebunden vorliegen, wurde aufgrund der noch am Anfang stehenden Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit abgesehen. Mit der Anfertigung mehrerer Verdünnungsreihen ließe sich die Konstante durch die Methode des Gelshift-Assays annäherungsweise berechnen, wie die Arbeit von Heffler et al zeigt (Heffler et al. 2012). Der K_d-Wert für GST-Stv13-C3bot1E174Q dürfte sich, zieht man diese Methodik heran, im unteren µM Bereich zwischen 0,04 µM und 0,4 µM befinden.

4.3.3 Analyse der Biotinbindung mittels Dot-Blot

Der Dot-Blot stellt eine schnelle Methode zur qualitativen Untersuchung der Funktionalität der Bindung der Fusionsproteine an biotinylierte Substanzen dar. Ebenso wie der Gelshift-Assay wird hierbei die native Form der Proteine untersucht. Mithilfe dieser Methode konnten bereits in anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen nachgewiesen werden. So gelang es Ernst et al. erfolgreich, die direkte Interaktion von Cyp40 mit C2I, CDTa und Iota-ähnlichen Toxinen ohne die Anwesenheit von möglichen Adaptor-Proteinen nachzuweisen (Ernst et al. 2014). Beim Dot-Blot-Assay handelt es sich, wie dieses Beispiel zeigt, um eine zuverlässige und etablierte Methode direkte Interaktionen *in vitro* nachzuweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurden biotinyliertes BSA sowie unbiotinyliertes BSA und PBS-Lösung als Kontrolle in absteigender Konzentration mittels einer Vakuum-Vorrichtung auf eine Nitrozellulose-Membran gespottet und anschließend

mit den Konstrukten oder C3bot1E174Q alleine inkubiert und schließlich mit C3-Antikörper detektiert.

Das GST-Stv13-C3bot1E174Q-Konstrukt zeigte analog zu den vorangegangen Untersuchungen eine hochaffine Bindung bis zu den niedrigsten Konzentrationen. Die Kontrollen blieben wie erwartet frei, sodass eine unspezifische Bindung an das bovine Serum Albumin ausgeschlossen werden konnte. Das GST-Stv43-C3bot1E174Q-Konstrukt hingegen zeigte erneut, wie im Gelshift-Assay, keinen hinreichenden Nachweis einer spezifischen Bindung an bBSA. Es fanden sich keinerlei Signale.

Dieses Ergebnis und das Ergebnis aus dem Gelshift- und dem Overlay-Assay legten nahe, dass die native Form des GST-Stv43-C3bot1E174Q nicht zu einer Komplexbildung mit Biotin in der Lage ist. Möglicherweise verhindert die native Ausbildung der Stv43-Dimere und deren Faltung in Verbindung mit der C3-Mutante die Bindung von Biotin. Zu bemerken ist, dass sich dies auf die nativen Untersuchungen beschränkt, denn der Overlay-Assay als Methode zum Nachweis der Interaktion zwischen den Fusionsproteinen und Biotin unter nicht-nativen Bedingungen wies, wie oben erwähnt, die Funktionalität der Biotinbindung nach.

4.4 Charakterisierung der Zellgängigkeit der Fusionsproteine

Durch die vorangehend beschriebene Charakterisierung der Biotinbindungs-eigenschaften konnte für das Fusionsprotein GST-Stv43-C3bot1E174Q eine erfolgreiche Bindung an Biotin im Overlay-Assay gezeigt werden, nicht jedoch in den nativen Untersuchungen des Gelshift-Assays und des Dot-Blots. Für das Fusionsprotein GST-Stv13-C3bot1E174Q konnte die Funktionalität der Biotinbindung in allen angewandten Methoden nachgewiesen werden. Respektive dieser Charakterisierung wurde in den folgenden Untersuchungen auf die Zellgängigkeit und die Transporteigenschaften der Fusionsproteine eingegangen. Zur Beschreibung der Zellgängigkeit wurden Digitonin-Assays mit unter-schiedlichen Konzentrationen an Fusionsprotein, Inkubationszeiten und Zelllinien durchgeführt. Um die Transporteigenschaften zu charakterisieren, wurde im

Rahmen dieser Arbeit zunächst die Internalisierung von biotinyliertem Fluorescein in Makrophagenzellen untersucht.

In anderen Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Holger Barth konnte bereits anhand dieser Versuche gezeigt werden, dass vergleichbare Transportsysteme in das Zytosol von Makrophagenzellen internalisiert werden. So wurde ein rekombinantes Fusionsprotein, bestehend aus C3bot1E174Q und der enzymatisch aktiven Domäne des C2-Toxins C2I (Dmochewitz et al. 2013), sowie das bereits erwähnte chemisch konjugierte Fusionsprotein, bestehend aus C3bot1E174Q und Streptavidin (Lillich et al. 2012), hergestellt und hinsichtlich der Zellgängigkeit untersucht. Ausgehend von Untersuchungen, in welchen gezeigt werden konnte, dass die C3-Mutante C3bot1E174Q selektiv in das Zytosol von Makrophagen-Zellen, nicht aber in epitheliale Zellen wie CHO-K1, HeLa oder Vero, aufgenommen wird (Fahrer, Kuban et al. 2010), bestand die Annahme, dass die Fusionsproteine GST-Stv13-C3bot1E174Q und GST-Stv43-C3bot1E174Q ebenfalls selektiv in Makrophagen-Zellen internalisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Internalisierung der Fusionsproteine sowie der Transport von biotinyliertem Fluorescein in das Zytosol von Makrophagen erfolgreich nachgewiesen werden. In folgenden Versuchen, die Gegenstand anderer Arbeiten waren, konnte bereits der Transport größerer Moleküle wie der enzymatischen Domäne des Diphterie-Toxins in das Zytosol von Makrophagen erfolgreich demonstriert werden (Christow et al. 2013). Dies unterstreicht die breite Anwendbarkeit unseres Transporters als molekulares „Trojanisches Pferd“, welches prinzipiell mit unterschiedlicher „Fracht“ ausgestattet werden kann.

4.4.1 Digitonin-Assay zur Charakterisierung der Zellgängigkeit der Fusionsproteine

Der Digitonin-Assay stellt eine Möglichkeit zur Analyse der spezifischen Zellgängigkeit der zu untersuchenden Fusionsproteine in verschiedene Zelllinien unter verschiedenen Bedingungen dar. Dabei kann das Zytosol und sein Inhalt isoliert untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurden dabei verschiedene Konzentrationen an Fusionsprotein, variierende Inkubationszeiten und nicht zuletzt unterschiedlicher Zelllinien untersucht. Zu beachten ist, dass mit diesem Assay

eine qualitative Aussage zur Funktionalität der Internalisierung möglich ist, detaillierte quantitative Aussagen sich jedoch mangels Kontrollierbarkeit der letztlich verwendeten Zellzahl pro Untersuchung nur schwer treffen lassen (Adam et al. 1992, Melchior 1998).

Erfolgreiche Anwendung fand dieser Assay bereits in unserer Arbeitsgruppe unter anderem beim Nachweis des inhibierenden Effekts von FR506 bezüglich der Translokation von C2-Toxin in das Zytosol von untersuchten Zellen (Kaiser et al. 2012).

4.4.1.1 Digitonin-Assay – Konzentrationsabhängig

Beim konzentrationsabhängigen Digitonin-Assay wurden Makrophagen der Zelllinie J774A.1 mit den verschiedenen Konzentrationen an Fusionsprotein inkubiert. Nach der Zellpermeabilisierung wurden der Überstand sowie das Zellpellet auf die Internalisierung der Fusionsproteine in das Zytosol untersucht. Eine konzentrationsabhängige Internalisierung der beiden Fusionsproteine und der zur Kontrolle verwendeten C3-Mutante (von der bekannt ist, dass sie spezifisch in Makrophagen aufgenommen wird (Fahrer, Kuban et al. 2010)) in die Zellen und in das Zytosol konnte entsprechend bereits bei geringen Konzentrationen von 0,5 µg/ml nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurden Banden detektiert, die ausgehend von ihrer Größe als Abbauprodukte der Transporter interpretiert werden können.

4.4.1.2 Digitonin-Assay – Zeitabhängig

Beim zeitabhängigen Digitonin-Assay wurden Maus-Makrophagen der Zelllinie J774A.1 über verschiedene Zeiten inkubiert. Während eine Aufnahme des Fusionsproteins bereits nach einer Stunde nachweisbar war, ließ sich die Internalisierung der C3-Mutante erst nach sechs Stunden detektieren. Dies legt eine gute Funktionalität der Transporter-Aufnahme in die Zelle und in das Zytosol der Makrophagen nahe. Auch in diesem Versuch zeigten sich mit zunehmender Inkubationszeit besonders für den Transporter Banden kleinerer Größe, die als

Abbauprodukte interpretiert werden können. Die Vergleichbarkeit der Proben konnte auch hier mittels Detektion von EEA1 und Hsp90 gewährleitstet werden.

4.4.1.3 Digitonin-Assay – Zelllinien im Vergleich

Nachdem die Internalisierung der Transporter in Maus-Makrophagen der Zelllinie J744A.1 erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wurde eine Untersuchung der Spezifität durchgeführt. Dazu wurde die Internalisierung der Transporter in Zellen anderer Zelllinien überprüft. Die Spezifität der Transporter für Makrophagen konnte aufgrund dieser Ergebnisse nicht gezeigt werden. Mögliche Ursachen dafür wären der Verlust der Spezifität durch die Koppelung an Streptavidin oder der verbliebene GST-Tag, die zu einer Änderung der Proteinstruktur führen könnten. Ein definitiver Grund für die nicht darstellbare Spezifität steht weiterhin aus. Nichtsdestotrotz konnte eine sehr effektive Aufnahme der Transporter in die Zellen gezeigt werden, die der Internalisierung der C3-Mutante anhand der gezeigten Ergebnisse überlegen zu sein scheint. Dies legt die Frage nahe, ob die gleichen Transportmechanismen zur Internalisierung in das Zytosol eine Rolle spielen. Auch in diesem Versuch konnte die zuvor beschriebene Konzentrationsabhängigkeit sowie die Bildung von Abbauprodukten dargestellt werden.

4.4.2 Charakterisierung der Fusionsprotein-vermittelten Aufnahme von Fluorescein-Biotin in J774A.1-Makrophagen durch Immunfluoreszenzmikroskopie

Um die Transportfunktion der Fusionsproteine näher zu charakterisieren, wurde die Internalisierung von biotinyliertem Fluorescein in das Zytosol von Makrophagenzellen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass der Transporter GST-Stv13-C3bot1E174Q die „Fracht“ erfolgreich in die Makrophagen einbringt, ein unspezifischer Transport und der Verbleib der Fracht in frühen Endosomen konnten ausgeschlossen werden.

Angesichts der dargestellten Ergebnisse ist es naheliegend, dass sich die „Fracht“ im Zytosol der Zellen befand und ein spezifischer Transportmechanismus eine

entscheidende Rolle spielt. Da es sich bei Fluorescein um ein sehr pH-sensibles Protein handelt, konnte eine Lokalisation der Komplexe in sauren Vesikeln, wie beispielsweise Lysosomen nicht ausgeschlossen werden. Um eine genauere Aussage treffen zu können, in welchen Kompartimenten der Zellen sich der Komplex befindet, wären weitere Untersuchungen mittels Konfokalmikroskopie notwendig. Ebenfalls von Nutzen wären weitere Untersuchungen des Transports mit dem pH-stabilen Biocytin-Alexa 488, wie sie beispielsweise in einer verwandten Arbeit unserer Arbeitsgruppe zum Transporter C2IN-Streptavidin/C2IIa erbracht wurden (Fahrer, Plunien et al. 2010)

Bei den Versuchen mit dem Transporter GST-Stv43-C3bot1E174Q konnte kein Nachweis einer erfolgreichen Internalisierung des Fluorescein-Biotins erbracht werden. Damit fehlte auch in dieser nativen Untersuchung der Stv43-Variante des Fusionsproteins der Nachweis einer funktionierenden Bindung bzw. eines funktionierenden Transports.

4.4.3 Der GST-Stv-C3bot1E174Q-Transporter im Vergleich mit anderen Streptavidin- / Avidin-basierten Transportsystemen

Der Ansatz dieser Arbeit, einen Transporter für molekulare Fracht in eukaryote Zellen herzustellen, wurde bereits in zahlreichen Arbeitsgruppen verfolgt. Mit dem Vitamin Biotin findet sich, basierend auf der hochkovalenten Bindung an die Proteine Streptavidin (aus *Streptomyces*-Bakterien) und Avidin (gewonnen aus Hühnereiweiß), ein vielversprechendes Werkzeug für biotechnologische und biomedizinische Anwendungen, wobei Streptavidin / Avidin eine Adapterfunktion erfüllen. So können biotinylierte Moleküle wie Proteine und Peptide aber auch RNA bis hin zu radioaktiven Molekülen hochkovalent an Verbindungen, die Streptavidin / Avidin enthalten, gebunden werden.

Die Herstellung dieser Transportsysteme besteht dabei in der Koppelung von Proteinen, wie Antikörpern oder Toxinen, an Streptavidin- / Avidin-Komplexe. Diese Koppelung entsteht vornehmlich auf genetischer Ebene oder durch Biokonjugation.

Schon 1997 gelang es, einen monoklonalen Antikörper gegen humanes Insulin an Streptavidin zu koppeln und so biotinylierte Peptide über die Blut-Hirn-Schranke von Rhesusaffen zu transportierten. Die Aufnahme dieser Peptide in Zellen gelang über die Bindung der Antikörper an Insulin-Rezeptoren mit einer anschließenden rezeptorvermittelten Endozytose. Aufgrund der hohen Antigen-Antikörper-Spezifität zeigten sich jedoch Probleme in der Anwendbarkeit des Transporters auf andere Spezies (Wu et al. 1997). Verantwortlich sind die Unterschiede zur humanen Erbinformation bei dem verwendeten Insulin-Antikörper.

Ein anderes Beispiel lieferten Xia und Kollegen, die anhand der Koppelung eines Transferrinrezeptor-Antikörpers an Streptavidin die Aufnahme von biotinylierter siRNA in mit Luziferasegen transfizierten Glia-Zellen von Ratten zeigen konnten. Nach der Internalisierung kam es so durch RNA-Interferenzen zu einer Inhibierung des Luziferase-Rezeptor-Gens in den kranialen Glia-Zellen (Xia et al. 2007).

Im Kontrast hierzu stellt der Rezeptor des C2-Toxins aus *Clostridium botulinum* eine komplexe Kohlenhydrat-Struktur dar, welcher auf der Oberfläche jeglicher bislang getesteter eukaryotischer Zellen vorkommt (Eckhardt et al. 2000). Eine Anwendbarkeit auf verschiedene Zelltypen innerhalb verschiedener Spezies ist somit gewährleistet. Ziel der Arbeit von Fahrer und Kollegen innerhalb unserer und anderer Arbeitsgruppen war es, ein universelles C2-Transportsystem zu generieren. Dabei wurde als Adapter die Domäne C2IN genetisch an Streptavidin fusioniert und mit der aktivierten Transportdomäne C2IIa zusammengebracht. So gelang, analog zu den Versuchen in dieser Arbeit, die Internalisierung biotinylierten Fluoresceins, aber auch der Transport von C3-Toxin, des Tumorsupressorproteins p53 oder siRNA in verschiedene Zelllinien (Fahrer, Plunien et al. 2010, Fahrer et al. 2013). Je nach Anwendungsgebiet bringt dies Vor- und Nachteile mit sich. In der systemischen Therapieanwendung bei Tumorerkrankung wären auch gesunde Zellen von einer Anwendung betroffen. Eine intratumorale Anwendung bei soliden Tumoren hingegen wäre denkbar.

Als Alternative zur Kopplung von Streptavidin / Avidin an spezifische Antikörper können sogenannte Aptamere verwendet werden. Diese einzelsträngigen RNA- oder DNA-Moleküle verfügen mittels ihrer 3D-Struktur über die Fähigkeit ähnlich spezifisch und affin wie Antikörper an Zielstrukturen auf der Zelle zu binden

(Ellington und Szostak 1990) und anschließend internalisiert zu werden (Hicke und Stephens 2000). So konnte bereits biotinylierte siRNA, nach Koppelung an Streptavidin, mithilfe eines biotinylierten Aptamers gegen ein Prostata-spezifisches Membran-Antigen in Prostata-Karzinom-Zellen transportiert werden (Chu et al. 2006). Neben der hohen Spezifität bringen Aptamere, aufgrund ihrer geringeren Größe, des Weiteren den Vorteil einer schnelleren Gewebepenetration mit sich (Bruno 2013). In praktischen Anwendungen, wie in der Radioimmuntherapie, wäre so gegenüber Ansätzen mit Toxin-Transportsystemen eine deutlich geringere Bluthalbwertszeit gewährleistet. Jedoch fehlt auch hier die Anwendbarkeit eines Transportsystems auf verschiedene Spezies oder Zelltypen.

Sogenannte ZPP (*Zell-penetrierende-Peptide*) wie beispielsweise das 11-Aminosäuren lange TAT (*Transactivator of Transcription)* Peptid sind ebenfalls Grundlage der Herstellung und Charakterisierung möglicher Transportsysteme. Das TAT-Peptid wird nachgewiesener Weise über Endozytose (Fittipaldi et al. 2003) oder Makropinozytose (Wadia et al. 2004) in Zellen aufgenommen. So wurde in der Arbeitsgruppe von Rinne eine Koppelung des TAT-Peptids an Streptavidin durchgeführt. Über dieses System ließen sich ebenfalls biotinylierte Substanzen in verschiedene Zelltypen einbringen. Dabei wurde zunächst eine Akkumulation des Transporters in Endosomen beobachtet. Durch die Komplexierung des Transporters mit einem pH-responsiven Polymer konnte dieser Umstand beseitigt werden (Albarran et al. 2005, Rinne et al. 2007). Problem in der Anwendbarkeit war jedoch auch hier, ähnlich wie bei den zuvor beschriebenen C2-Systemen, die gänzlich fehlende Spezifität auf bestimmte Zellreihen. Außerdem ist der Mechanismus der Internalisierung in die Zellen, wie beim in dieser Arbeit verwendeten C3-Toxin, nicht abschließend verstanden.

Zeng und Kollegen konnten durch ein weiteres Transportsystem das Gen des Tumorsupressorproteins p53 in Zellen einbringen. Es ist bekannt, dass in etwa der Hälfte aller Tumorzellen eine Mutation im p53-Gen vorliegt, wodurch die Induktion der Apoptose in Tumorzellen verhindert wird. Mutationen im p53-Gen spielen damit eine zentrale Rolle in der Kanzerogenese. Zeng und Mitarbeiter koppelten den biotinylierten viralen Vektor PEI-SS mit dem enthaltenen p53-Gen mittels Avidin an einen biotinylierten monoklonalen Transferrinantikörper. Viele

Tumorzellen weisen eine Überexpression des Transferrinrezeptors auf. So können diese Tumorzellen gezielt mit dem PEI-SS-Vektor und dem darin enthaltenen p53-Gen transfiziert werden. In den behandelten Tumor-Zelllinien HeLa und HepG2 konnte eine signifikante Zunahme von Zeichen der Apoptose beobachtet werden. Die Zellen der Linie COS7, welche keine Tumorzelllinie darstellt, verblieb durch die Transfektion unbeeinflusst (Zeng et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich die hier vorgestellten Transportsysteme entweder sehr spezifisch auf bestimmte Zelltypen innerhalb einer oder weniger Spezies, oder aber unspezifisch auf verschiedene Zelltypen verschiedener Spezies anwenden lassen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Transportsystem herzustellen, das eine Fracht spezifisch in eine bestimmte Art von Zellen mit Anwendbarkeit auf verschiedene Spezies transportiert. Das C3-Toxin aus *C. botulinum* internalisiert nach aktuellem Wissensstand spezifisch in Monozyten/Makrophagen verschiedener Spezies sowie in primäre Zellen aus Blutspendern (Dmochewitz et al. 2013). In der Arbeitsgruppe Barth konnte zwar gezeigt werden, dass die Aufnahme von C3botE174Q-C2I nach Behandlung mit Bafilomycin A1 reduziert ist, was für einen Transport über saure Endosomen spricht, trotzdem ist der vollständige Transportmechanismus noch nicht abschließend geklärt. Ein erfolgreicher Transport molekularer Fracht in das Zytosol von Makrophagen konnte in dieser Arbeit jedoch nachgewiesen werden. Wider Erwarten gab es Hinweise, dass die Spezifität der Mutante C3bot1E174Q nach der genetischen Fusion mit Streptavidin möglicherweise verlorengegangen sein könnte. Weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigen bereits aber Hinweise auf eine Widerherstellung der Spezifität nach weiterer Koppelung von Liganden, die das Streptavidin „abschirmen“.

Dennoch ist es gelungen, in dieser Arbeit ein neuartiges Transportsystem zu etablieren. Gegenstand anderer Arbeiten wird es in Zukunft sein, weitere Transportversuche durchzuführen und die detaillierter charakterisierte Anwendbarkeit auf verschiedene Zelltypen im Vergleich zu untersuchen.

5 Zusammenfassung

Bereits in der Vergangenheit konnten in unserer und anderen Arbeitsgruppen erfolgreich rekombinante Fusionsproteine basierend auf den clostridialen Toxinen wie den C2- und C3-Toxinen hergestellt werden. Diese machten eine genauere Charakterisierung der kleinen GTPasen (RhoA, -B und C) durch die Nutzung der Aufnahmemechanismen durch Endozytose und folgender Translokation in das Zytosol durch Ansäuerung endosomaler Vesikel möglich. Die Herstellung neuer Fusionsproteine stellt jedoch eine jeweils sehr zeitintensive Arbeit dar und ist auf Proteine als „Frachtgut“ beschränkt. Um eine erweiterte Nutzung im Sinne weiterer Charakterisierungen, aber auch der medizinischen Anwendung zu gewährleisten, ist deshalb die Herstellung universeller Transportsysteme von großem Interesse. Eine Koppelung der Toxine / Exoenzyme an Streptavidin, welches hochkovalent das Vitamin Biotin bindet, stellt dabei eine vielversprechende Lösung für den Transport verschiedenster biotinylierter Liganden in verschiedene Zellen dar. Als „Frachtgut“ kommen so beispielsweise neben small interfering Ribonukleinsäure (siRNA) auch niedermolekulare pharmakologisch wirksame Substanzen in Frage, die nicht in Zellen gelangen.

Ziel dieser Arbeit war es, ein spezifisches Transportsystem für Monozyten / Makrophagen, basierend auf dem clostridialen Exoenzym C3bot1E174Q (Mutante des *Clostridium botulinum* C3-Exoenzym, welches an Position 174 der AS-Kette Glutamin statt Glutamat aufweist und dadurch enzymatisch inaktiv ist), herzustellen. C3bot1E174Q, wird spezifisch in Monozyten / Makrophagen internalisiert. Des Weiteren sollten eine Charakterisierung der Bindungseigenschaften des Fusionsproteins und die spezifische Internalisierung in Monozyten / Makrophagen erfolgen.

C3bot1E174Q wurde zunächst genetisch an Streptavidin gekoppelt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des rekombinanten Fusionsproteins. Dabei wurden bestehende Protokolle zur Aufreinigung so modifiziert, dass das Fusionsprotein (mit verbleibendem Glutathion-S-Transferase-Tag (GST-Tag)) mit gutem Reinheitsgrad isoliert werden konnte. Anschließend erfolgte die genaue

Charakterisierung der Bindungseigenschaften des Proteins an biotinylierte Liganden, sowohl in denaturiertem, als auch in nativem Zustand. Der so erbrachte Bindungsnachweis war Voraussetzung für die sich nun anschließenden Transportversuche. Hierbei konnte die Internalisierung einer molekularen Fracht in Form von Biotin-Fluorescein in eukaryote Zellen nachgewiesen werden. Ein spezifischer Transport in Monozyten / Makrophagen konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, die bereits bewiesene Spezifität des C3bot1E174Q war möglicherweise nach der Koppelung an Streptavidin verloren gegangen. In späteren Arbeiten konnte die Zellselektivität wieder nachgewiesen werden, möglicherweise kann dies durch das „Abschirmen“ von Streptavidin durch andere Liganden erreicht werden.

Es konnte mit dieser Arbeit die Grundlage für weiterführende Untersuchungen des neuartigen Transportsystems C3bot1E174Q-Streptavin gelegt werden. So besteht die Möglichkeit zur Anwendung in der experimentellen Makrophagen-Forschung und Zellbiologie. Darüber hinaus ist eine zukünftige medizinische Anwendbarkeit des hier etablierten Systems in Makrophagen-assoziierten Erkrankungen nach weiterführenden Untersuchungen denkbar.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Zeitschriften

1. Adam S A, Sterne-Marr R und Gerace L: Nuclear protein import using digitonin-permeabilized cells. Methods Enzymol. 219: 97-110 (1992)

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

3. Aktories K, Braun U, Rosener S, Just I und Hall A: The rho gene product expressed in E. coli is a substrate of botulinum ADP-ribosyltransferase C3. Biochem Biophys Res Commun. 158: 209-213 (1989)

4. Aktories K und Frevert J: ADP-ribosylation of a 21-24 kDa eukaryotic protein(s) by C3, a novel botulinum ADP-ribosyltransferase, is regulated by guanine nucleotide. Biochem J. 247: 363-368 (1987)

5. Aktories K, Jung M, Bohmer J, Fritz G, Vandekerckhove J und Just I: Studies on the active-site structure of C3-like exoenzymes: involvement of glutamic acid in catalysis of ADP-ribosylation. Biochimie. 77: 326-332 (1995)

6. Aktories K, Rosener S, Blaschke U und Chhatwal G S: Botulinum ADP-ribosyltransferase C3. Purification of the enzyme and characterization of the ADP-ribosylation reaction in platelet membranes. Eur J Biochem. 172: 445-450 (1988)

7. Aktories K, Wilde C und Vogelsgesang M: Rho-modifying C3-like ADP-ribosyltransferases. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 152: 1-22 (2004)

8. Albarran B, To R und Stayton P S: A TAT-streptavidin fusion protein directs uptake of biotinylated cargo into mammalian cells. Protein Eng Des Sel. 18: 147-152 (2005)

9. Argarana C E, Kuntz I D, Birken S, Axel R und Cantor C R: Molecular cloning and nucleotide sequence of the streptavidin gene. Nucleic Acids Res. 14: 1871-1882 (1986)

10. Baneyx F und Mujacic M: Recombinant protein folding and misfolding in Escherichia coli. Nat Biotechnol. 22: 1399-1408 (2004)

11. Barth H, Aktories K, Popoff M R und Stiles B G: Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common Clostridium and Bacillus proteins. Microbiol Mol Biol Rev. 68: 373-402 (2004)

12. Barth H, Bigalke H, Gerhard R, Marquardt H und Schäfer S: Bakterielle Toxine. "Toxikologie". Wissenschafliche Verlagsgesellschaft Stuttgart. 3. Aufl.: 1164, Abb 42.5 (2013)

13. Barth H, Blocker D und Aktories K: The uptake machinery of clostridial actin ADP-ribosylating toxins--a cell delivery system for fusion proteins and polypeptide drugs. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 366: 501-512 (2002)

14. Barth H, Blocker 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)

15. Barth H, Hofmann F, Olenik C, Just I und Aktories K: The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary Clostridium botulinum C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin. Infect Immun. 66: 1364-1369 (1998)

16. Bayer E A, Ben-Hur H, Hiller Y und Wilchek M: Postsecretory modifications of streptavidin. Biochem J. 259: 369-376 (1989)

17. Bradford M M: 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)

18. Bruno J G: A review of therapeutic aptamer conjugates with emphasis on new approaches. Pharmaceuticals (Basel). 6: 340-357 (2013)

19. Chardin P, Boquet P, Madaule P, Popoff M R, Rubin E J und Gill D M: The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. EMBO J. 8: 1087-1092 (1989)

20. Chardin P und McCormick F: Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. Cell. 97: 153-155 (1999)

21. Christow H, Lillich M, Sold A, Fahrer J und Barth H: Recombinant streptavidin-C3bot for delivery of proteins into macrophages. Toxicon. 75: 144-147 (2013)

22. Chu T C, Twu K Y, Ellington A D und Levy M: Aptamer mediated siRNA delivery. Nucleic Acids Res. 34: e73 (2006)

23. Collier R J: Diphtheria toxin: mode of action and structure. Bacteriol Rev. 39: 54-85 (1975)

24. Dmochewitz L, Fortsch C, Zwerger C, Vaeth M, Felder E, Huber-Lang M und Barth H: A recombinant fusion toxin based on enzymatic inactive C3bot1 selectively targets macrophages. PLoS One. 8: e54517 (2013)

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

26. Ellington A D und Szostak J W: In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature. 346: 818-822 (1990)

27. Ellison D, Hinton J, Hubbard S J und Beynon R J: Limited proteolysis of native proteins: the interaction between avidin and proteinase K. Protein Sci. 4: 1337-1345 (1995)

28. Ernst K, Langer S, Kaiser E, Osseforth C, Michaelis J, Popoff M R, Schwan C, Aktories K, Kahlert V, Malesevic M, Schiene-Fischer C und Barth H: Cyclophilin-Facilitated Membrane Translocation as Pharmacological Target to Prevent Intoxication of Mammalian Cells by Binary Clostridial Actin ADP-Ribosylated Toxins. J Mol Biol. (2014)

29. Fahrer J, Kuban J, Heine K, Rupps G, Kaiser E, Felder E, Benz R und Barth H: Selective and specific internalization of clostridial C3 ADP-ribosyltransferases into macrophages and monocytes. Cell Microbiol. 12: 233-247 (2010)

30. Fahrer J, Plunien R, Binder U, Langer T, Seliger H und Barth H: Genetically engineered clostridial C2 toxin as a novel delivery system for living mammalian cells. Bioconjug Chem. 21: 130-139 (2010)

31. Fahrer J, Rausch J und Barth H: A cell-permeable fusion protein based on Clostridium botulinum C2 toxin for delivery of p53 tumorsuppressor into cancer cells. PLoS One. 8: e72455 (2013)

32. Fittipaldi A, Ferrari A, Zoppe M, Arcangeli C, Pellegrini V, Beltram F und Giacca M: Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. J Biol Chem. 278: 34141-34149 (2003)

33. Friedlander A M: Macrophages are sensitive to anthrax lethal toxin through an acid-dependent process. J Biol Chem. 261: 7123-7126 (1986)

34. Gonzalez M, Argarana C E und Fidelio G D: Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding. Biomol Eng. 16: 67-72 (1999)

35. Green N M: Avidin. Adv Protein Chem. 29: 85-133 (1975)

36. Green N M: Avidin and streptavidin. Methods Enzymol. 184: 51-67 (1990)

37. Han S, Craig J A, Putnam C D, Carozzi N B und Tainer J A: Evolution and mechanism from structures of an ADP-ribosylating toxin and NAD complex. Nat Struct Biol. 6: 932-936 (1999)

38. Han S und Tainer J A: The ARTT motif and a unified structural understanding of substrate recognition in ADP-ribosylating bacterial toxins and eukaryotic ADP-ribosyltransferases. Int J Med Microbiol. 291: 523-529 (2002)

39. Heffler M A, Walters R D und Kugel J F: Using electrophoretic mobility shift assays to measure equilibrium dissociation constants: GAL4-p53 binding DNA as a model system. Biochem Mol Biol Educ. 40: 383-387 (2012)

40. Hendrickson W A, Pahler A, Smith J L, Satow Y, Merritt E A und Phizackerley R P: Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. Proc Natl Acad Sci U S A. 86: 2190-2194 (1989)

41. Hicke B J und Stephens A W: Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy. J Clin Invest. 106: 923-928 (2000)

42. Holbourn K P, Shone C C und Acharya K R: A family of killer toxins. Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins. FEBS J. 273: 4579-4593 (2006)

43. Jacobs R R, Douwes J und Heederik D: Endotoxin Structure. Int J Occup Environ Med. 3: 6-7 (1997)

44. Just I, Mohr C, Schallehn G, Menard L, Didsbury J R, Vandekerckhove J, van Damme J und Aktories K: Purification and characterization of an ADP-ribosyltransferase produced by Clostridium limosum. J Biol Chem. 267: 10274-10280 (1992)

45. Just I, Schallehn G und Aktories K: ADP-ribosylation of small GTP-binding proteins by Bacillus cereus. Biochem Biophys Res Commun. 183: 931-936 (1992)

46. Kaiser E, Bohm N, Ernst K, Langer S, Schwan C, Aktories K, Popoff M, Fischer G und Barth H: FK506-binding protein 51 interacts with Clostridium botulinum C2 toxin and FK506 inhibits membrane translocation of the toxin in mammalian cells. Cell Microbiol. 14: 1193-1205 (2012)

47. Laitinen O H, Airenne K J, Marttila A T, Kulik T, Porkka E, Bayer E A, Wilchek M und Kulomaa M S: Mutation of a critical tryptophan to lysine in avidin or streptavidin may explain why sea urchin fibropellin adopts an avidin-like domain. FEBS Lett. 461: 52-58 (1999)

48. Lillich M, Chen X, Weil T, Barth H und Fahrer J: Streptavidin-conjugated C3 protein mediates the delivery of mono-biotinylated RNAse A into macrophages. Bioconjug Chem. 23: 1426-1436 (2012)

49. Livnah O, Bayer E A, Wilchek M und Sussman J L: Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 90: 5076-5080 (1993)

50. Melchior F: Nuclear protein import in a permeabilized cell assay. Methods Mol Biol. 88: 265-273 (1998)

51. Montecucco C: Protein toxins and membrane transport. Curr Opin Cell Biol. 10: 530-536 (1998)

52. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 51 Pt 1: 263-273 (1986)

53. Nemoto Y, Namba T, Kozaki S und Narumiya S: Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase gene. Cloning, sequencing, and expression of a functional protein in Escherichia coli. J Biol Chem. 266: 19312-19319 (1991)

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

55. Pahler A, Hendrickson W A, Kolks M A, Argarana C E und Cantor C R: Characterization and crystallization of core streptavidin. J Biol Chem. 262: 13933-13937 (1987)

56. Pardridge W M: Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. Nat Rev Drug Discov. 1: 131-139 (2002)

57. Paterson H F, Self A J, Garrett M D, Just I, Aktories K und Hall A: Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. J Cell Biol. 111: 1001-1007 (1990)

58. Popoff M, Boquet P, Gill D M und Eklund M W: DNA sequence of exoenzyme C3, an ADP-ribosyltransferase encoded by Clostridium botulinum C and D phages. Nucleic Acids Res. 18: 1291 (1990)

59. Popoff M R, Rubin E J, Gill D M und Boquet P: Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a Clostridium difficile strain. Infect Immun. 56: 2299-2306 (1988)

60. Pugliese L, Coda A, Malcovati M und Bolognesi M: Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 A resolution. J Mol Biol. 231: 698-710 (1993)

61. Ridley A J und Hall A: The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. Cell. 70: 389-399 (1992)

62. Rinne J, Albarran B, Jylhava J, Ihalainen T O, Kankaanpaa P, Hytonen V P, Stayton P S, Kulomaa M S und Vihinen-Ranta M: Internalization of novel non-viral vector TAT-streptavidin into human cells. BMC Biotechnol. 7: 1 (2007)

63. Rohrbeck A, von Elsner L, Hagemann S und Just I: Binding of Clostridium botulinum C3 exoenzyme to intact cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 387: 523-532 (2014)

64. Ross S E, Carson S D und Fink L M: Effects of detergents on avidin-biotin interaction. Biotechniques. 4: 350-354 (1986)

65. Rotsch J, Rohrbeck A, May M, Kolbe T, Hagemann S, Schelle I, Just I, Genth H und Huelsenbeck S C: Inhibition of macrophage migration by C. botulinum exoenzyme C3. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 385: 883-890 (2012)

66. Rubin E J, Gill D M, Boquet P und Popoff M R: Functional modification of a 21-kilodalton G protein when ADP-ribosylated by exoenzyme C3 of Clostridium botulinum. Mol Cell Biol. 8: 418-426 (1988)

67. Rybak J N, Scheurer S B, Neri D und Elia G: Purification of biotinylated proteins on streptavidin resin: a protocol for quantitative elution. Proteomics. 4: 2296-2299 (2004)

68. Sakaguchi Y, Hayashi T, Kurokawa K, Nakayama K, Oshima K, Fujinaga Y, Ohnishi M, Ohtsubo E, Hattori M und Oguma K: The genome sequence of Clostridium botulinum type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny. Proc Natl Acad Sci U S A. 102: 17472-17477 (2005)

69. Sandvig K und Olsnes S: Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH. J Cell Biol. 87: 828-832 (1980)

70. Sandvig K, Spilsberg B, Lauvrak S U, Torgersen M L, Iversen T G und van Deurs B: Pathways followed by protein toxins into cells. Int J Med Microbiol. 293: 483-490 (2004)

71. Sandvig K und van Deurs B: Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin. FEBS Lett. 529: 49-53 (2002)

72. Sanger F, Nicklen S und Coulson A R: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 74: 5463-5467 (1977)

73. Sano T, Pandori M W, Chen X, Smith C L und Cantor C R: Recombinant core streptavidins. A minimum-sized core streptavidin has enhanced structural stability and higher accessibility to biotinylated macromolecules. J Biol Chem. 270: 28204-28209 (1995)

74. Sano T, Vajda S, Smith C L und Cantor C R: Engineering subunit association of multisubunit proteins: a dimeric streptavidin. Proc Natl Acad Sci U S A. 94: 6153-6158 (1997)

75. Simpson L L, Stiles B G, Zepeda H und Wilkins T D: Production by Clostridium spiroforme of an iotalike toxin that possesses mono(ADP-ribosyl)transferase activity: identification of a novel class of ADP-ribosyltransferases. Infect Immun. 57: 255-261 (1989)

76. Stiles B G und Wilkins T D: Purification and characterization of Clostridium perfringens iota toxin: dependence on two nonlinked proteins for biological activity. Infect Immun. 54: 683-688 (1986)

77. Verschueren H, De Baetselier P, De Braekeleer J, Dewit J, Aktories K und Just I: ADP-ribosylation of Rho-proteins with botulinum C3 exoenzyme inhibits invasion and shape changes of T-lymphoma cells. Eur J Cell Biol. 73: 182-187 (1997)

78. Vogelsgesang M, Pautsch A und Aktories K: C3 exoenzymes, novel insights into structure and action of Rho-ADP-ribosylating toxins. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 374: 347-360 (2007)

79. Wadia J S, Stan R V und Dowdy S F: Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. Nat Med. 10: 310-315 (2004)

80. Weber P C, Ohlendorf D H, Wendoloski J J und Salemme F R: Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. Science. 243: 85-88 (1989)

81. Werner G, Hagenmaier H, Drautz H, Baumgartner A und Zahner H: Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity. J Antibiot (Tokyo). 37: 110-117 (1984)

82. Wiegers W, Just I, Muller H, Hellwig A, Traub P und Aktories K: Alteration of the cytoskeleton of mammalian cells cultured in vitro by Clostridium botulinum C2 toxin and C3 ADP-ribosyltransferase. Eur J Cell Biol. 54: 237-245 (1991)

83. Wilchek M, Bayer E A und Livnah O: Essentials of biorecognition: the (strept)avidin-biotin system as a model for protein-protein and protein-ligand interaction. Immunol Lett. 103: 27-32 (2006)

84. Wilde C, Chhatwal G S, Schmalzing G, Aktories K und Just I: A novel C3-like ADP-ribosyltransferase from Staphylococcus aureus modifying RhoE and Rnd3. J Biol Chem. 276: 9537-9542 (2001)

85. Wu D, Yang J und Pardridge W M: Drug targeting of a peptide radiopharmaceutical through the primate blood-brain barrier in vivo with a monoclonal antibody to the human insulin receptor. J Clin Invest. 100: 1804-1812 (1997)

86. Xia C F, Zhang Y, Boado R J und Pardridge W M: Intravenous siRNA of brain cancer with receptor targeting and avidin-biotin technology. Pharm Res. 24: 2309-2316 (2007)

87. Zeng X, Sun Y X, Qu W, Zhang X Z und Zhuo R X: Biotinylated transferrin/avidin/biotinylated disulfide containing PEI bioconjugates mediated p53 gene delivery system for tumor targeted transfection. Biomaterials. 31: 4771-4780 (2010)

III Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Barth für die intensive und lückenlose Betreuung sowie für die Bereitstellung des interessanten Themas bedanken. Dabei auch einen besonderen Dank für die kritische Auseinandersetzung und die hilfreichen Hinweise bei der schriftlichen Ausarbeitung meiner Dissertation.

Meiner Betreuerin Dr. Maren Lillich danke ich ebenfalls für die komplette Betreuung sowie für die geteilte Erstautorenschaft bei der Veröffentlichung unserer Ergebnisse. Hier auch einen besonderen Dank an Dr. Jörg Fahrer der mir mit Rat und Tat zu Beginn meiner Arbeit zur Seite stand.

Für die vielen anregenden, arbeitsamen und auch unterhaltsamen Stunden im Labor möchte ich mich bei der gesamten AG Barth bedanken, insbesondere bei Katharina, Lydia, Ulrike und Christian.

Danke an das Promotionsprogramm „Experimentelle Medizin“ der International Graduate School Ulm für die professionelle Betreuung, sowie für die finanzielle Unterstützung.

Größter Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester, dafür dass Ihr stets hinter mir steht, für mich da seid und ich mich immer auf euch verlassen kann.

Danke an meine liebe Natalie für den wichtigen Antrieb in der finalen Phase.

Danke auch an meine lieben Freunde Florian, Franz, Johannes, Manuel und Philipp die mich während und nach meinem Studium bis heute begleiten.

Ein letzter Dank auch an Tanja und Ivan Malchev für die „Bemutterung“ während meiner Zeit in Bulgarien, wo der Hauptteil dieser Arbeit entstand.

IV Lebenslauf

Hannes Christow *31.07.1986, Stuttgart

Bildung

Limburg-Grundschule, Weilheim an der Teck 1993 – 1997

Schloss-Gymnasium, Kirchheim unter Teck 1997 – 2006

Hochschulreife 2006

Studium der Humanmedizin, Universität Ulm 2006 – 2013

Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung 2008

Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 2013

Berufliche Tätigkeit

Agaplesion Bethesda Klinik Ulm seit 2014

Facharztausbildung Innere Medizin

Institut für Molekulare Medizin, Universität Ulm seit 2015

Forschungstätigkeit im Rahmen des SFB 1149

Lehrtätigkeit

Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm 2008 – 2013

POL Pharmakologie und Toxikologie Tutor, ab 2009 studentische Leitung

Agaplesion Bethesda Klinik Ulm seit 2014

Studentenunterricht im Rahmen der PJ-Seminare, Seminar Geriatrie, Vorlesung Geriatrie

Promotion

Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm 2016

Titel: Etablierung eines neuartigen, selektiven Transportsystems für Makrophagen und Monozyten basierend auf dem clostridialen Exoenzym C3bot und Streptavidin

Publikation

Christow H, Lillich M, Sold A, Fahrer J und Barth H: Recombinant streptavidin-C3bot for delivery of proteins into macrophages. Toxicon. (2013)