

Universitätsklinikum Ulm

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. Peter Gierschik

Charakterisierung der Interaktion binärer Bakterientoxine und zellulärer Chaperone

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Natalie Böhm

geboren in Bad Homburg vor der Höhe

2018

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof Dr. Holger Barth

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Kratzer

Tag der Promotion: 10.05.2019

To the physiologist the poison becomes an instrument which dissociates and analyzes the most delicate phenomenon of living structures and by attending carefully to their mechanism in causing death, he can learn indirectly much about the physiological processes in life.

Claude Bernard, 1878

Daten der vorliegenden Dissertation wurden bereits teilweise veröffentlicht in:

***Cellular Microbiology* 2012 Aug; 14 (8):1193-1205; PMID:22420783**

doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01788.x. Epub 2012 Apr 12.

Kaiser E.[‡], Böhm N.[‡], Ernst K.[‡], Langer S., Schwan C., Aktories K., Popoff M., Fischer G., Barth H.

FK506-binding protein 51 interacts with *Clostridium botulinum* C2 toxin and FK506 inhibits membrane translocation of the toxin in mammalian cells

[‡] authors contributed equally

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
1 Einleitung	1
1.1 Bakterielle Exotoxine.....	1
1.2 Binäre Aktin-ADP-ribosylierende Toxine.....	2
1.3 <i>Clostridium botulinum</i> C2-Toxin.....	4
1.4 Zelluläre Faltungshelferproteine	9
1.5 Zielsetzung.....	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Material	18
2.2 Methoden.....	30
3 Ergebnisse.....	42
3.1 Beteiligung der FKBP's an dem Aufnahme- und Wirkmechanismus des binären C2-Toxins.....	42
3.2 Effekte der kombinierten Inhibition von Cyps und FKBP's auf den Aufnahme- und Wirkmechanismus des C2-Toxins	56
4 Diskussion	65
5 Zusammenfassung	78
6 Literaturverzeichnis.....	80
Danksagung.....	V
Curriculum Vitae	VI

Abkürzungsverzeichnis

A-Domäne	Enzymdomäne der AB-Toxine
ADP	Adenosindiphosphat
ADP-RT	Adenosindiphosphat-Ribosyltransferase
AK	Antikörper
Arg177	Arginin 177
APS	Ammoniumperoxidsulfat
<i>Aqua bidest.</i>	<i>Aqua bidestillata</i> , lat. „zweifach destilliertes Wasser“
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection, Organisation zur Sammlung, Speicherung und Verteilung von u.a. Zelllinien
ATP	Adenosintri-phosphat
Baf	Bafilomycin A1, Inhibitor der vesikulären Protonenpumpe von Endosomen
B-Domäne	Bindungs- und Translokationsdomäne der AB-Toxine
BSA	bovines Serumalbumin
<i>C.</i>	<i>Clostridium</i>
C2	<i>Clostridium botulinum</i> C2-Toxin
C2I	Enzymkomponente des C2-Toxins
C2I biot.	Biotinmarkierte Enzymkomponente des C2-Toxins
C2IN	N-Terminus der Enzymkomponente des C2 Toxins
C2II	inaktive Bindungs- und Transportkomponente des C2-Toxins
C2IIa	aktivierte Bindungs- und Transportkomponente des C2-Toxins
CDT	Clostridium Difficile Transferase, <i>Clostridium difficile</i> CDT-Toxin

CHO	Chinese Hamster Ovary, kultivierte Zelllinie von Ovarien des chinesischen Zwerghamsters
CLD	Cyclophilin-Like Domain, PPIase-Domäne der Cyclophiline
CsA	Cyclosporin A, Inhibitor der Cyclophiline
CT	<i>Vibrio cholerae</i> Cholera-Toxin
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins oder Polypeptids
Cyp	Cyclophilin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DT	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> Diphtherie-Toxin
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced Chemiluminescence, engl. „verstärkte Chemolumineszenz“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , lat. „und andere“
F-Aktin	filamentäres Aktin (Aktinfilament)
FCS	fetales Kälberserum
FKBP	FK506-Bindeprotein
FKBP-Domäne	PPIase-Domäne der FK506-Bindeproteine
FK506	Tacrolimus, Inhibitor der FK506-Bindeproteine
G-Aktin	globuläres Aktin (Aktinmonomer)
GST	Glutathion-S-Transferase
HRP	horseradish peroxidase, engl. „Meerrettichperoxidase“
HeLa	kultivierte humane Zelllinie eines Cervix-Adenokarzinoms von Henrietta Lacks
Hsp	heat shock protein, engl. „Hitzeschockprotein“
<i>in vitro</i>	lat. „im Glas“, Reaktionen außerhalb des Organismus
<i>in vivo</i>	lat. „im Lebenden“, Reaktionen im lebenden Organismus
Iota	<i>Clostridium perfringens</i> Iota-Toxin
LT	<i>Bacillus anthracis</i> Letales Toxin

MEM	Minimum Essential Medium Eagle
NAD ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NHS-Biotin	Sulfo- <i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid-Biotin
<i>N</i> -Terminus	Aminoterminus eines Proteins oder Peptids
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphat buffered saline, engl. „Phosphatpuffer“
PBS-T	Phosphatpuffer mit 0,1% Tween 20
<i>pH</i>	<i>potentia Hydrogenii</i> , lat. „Kraft des Wasserstoffs“, Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
POD	Peroxidase
PPIase	Peptidyl-Prolyl- <i>cis/trans</i> -Isomerase
PT	<i>Bordetella pertussis</i> Pertussis Toxin
Rab5	Ras-related in brain-Protein5, Marker für frühe Endosomen
Rad	Radical, Inhibitor des Hitzeschockproteins 90
rcf	relative centrifugal force, engl. „relative Zentrifugalbeschleunigung“
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate, engl. „Natriumdodecylsulfat“
SHR	Steroidhormonrezeptor
Strep-POD	Streptavidin-Peroxidase
TcdA, TcdB	<i>Clostridium difficile</i> Toxin A und Toxin B
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TPR	Tetratricopeptid-Repeat, Strukturmotiv in Proteinen
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat
VK112	nicht immunsuppressives Cyclosporin A Derivat
Vero	kultivierte Zelllinie von Nierenepithel der grünen Meerkatze

1 Einleitung

1.1 Bakterielle Exotoxine

Bakterielle Exotoxine stellen sehr wichtige Pathogenitätsfaktoren für Menschen und Tiere dar, denn durch ihre biologische Wirkung auf Zielzellen spielen sie die entscheidende Rolle bei Erkrankungen wie z. B. Botulismus, Cholera und Diphtherie. Sie werden aktiv von gramnegativen wie grampositiven Bakterien produziert und sezerniert. Exotoxine sind Proteine, die auch in Abwesenheit der Bakterien wirksam sind, da sie aufgrund ihrer Struktur und Funktion eigenständig auf Säugetierzellen einwirken und diese vergiften. Eine besondere Untergruppe der Exotoxine stellen die intrazellulär wirksamen AB-Toxine dar (Bhakdi 1998). Sie wirken nach ihrer Aufnahme in die Wirtszelle als Enzyme und modifizieren extrem effektiv und sehr spezifisch ihre jeweiligen zellulären Substratmoleküle. Diese Modifikation hat je nach Substrat große Auswirkungen auf zelluläre Funktionen wie Proteinsynthese, Zellhomöostase, Zellzyklus, Vesikeltransport oder auf das Aktinzytoskelett (Popoff 2005). AB-Toxine sind aus mindestens zwei funktionell verschiedenen Domänen aufgebaut.

Domäne B bildet dabei die Bindungs- und Translokationsdomäne, während A die enzymatisch aktive Domäne darstellt (Henkel et al. 2010). Diese Domänen können auf demselben Protein lokalisiert sein, *single chain* oder auch einkettige AB-Toxine genannt, oder auf zwei separaten Proteinen vorliegen, sogenannte binäre AB-Toxine. Die Domänen der binären AB-Toxine werden dabei als Komponenten bezeichnet (Barth et al. 2004).

Um die Enzymkomponente A in das Wirtszellzytosol zu transferieren bindet die Transportkomponente B an spezifische Rezeptoren an der Zielzelle (Lubran 1988). Sodann erfolgt die rezeptorvermittelte Endozytose und der Transport über die Membran in das Wirtszellzytosol (Barth and Stiles 2008). Die Enzymkomponente wirkt dann im Zytosol, wo sie ihr spezifisches Substrat modifiziert. Dies wiederum führt zu speziellen zellulären Reaktionen und den daraus folgenden entsprechenden klinischen Symptomen. Eine Passage der Zellmembran ohne die Anwesenheit einer B-Komponente ist nicht möglich (Alouf 2000). Genauso wenig kann eine Modifikation der intrazellulären Substrate ohne eine A-Komponente erfolgen. Die Enzymklassen, die von A-Komponenten abgebildet werden, sind mannigfaltig (Alouf 2006). In

Relevanz zu der vorliegenden Arbeit wird im Speziellen auf die Aktin-Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosyltransferasen (RT) eingegangen. Hierzu zählt die Enzymkomponente des C2-Toxins von *Clostridium (C.) botulinum* (Barth, Blöcker et al. 2002; Aktories et al. 2011; Aktories, Bärman et al. 1986), welches in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

1.2 Binäre Aktin-ADP-ribosylierende Toxine

Bei Aktin-ADP-ribosylierenden Toxinen überträgt die Enzymkomponente kovalent eine ADP-Ribose-Gruppe von dem Co-Substrat Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺), welches von der Zielzelle bereitgestellt wird, auf globuläres (G)-Aktin. Im Falle der binären clostridialen Toxine, *C. botulinum* C2-Toxin, *C. perfringens* Iota-Toxin, *C. difficile* CDT-Toxin, wird dabei die ADP-Ribose an die Aminosäure (AS)-Position Arginin 177 (Arg177) gebunden (Aktories, Ankenbauer et al. 1986; Aktories et al. 1986; Vandekerckhove et al. 1988; Ohishi u. Tsuyama 1986; Stiles et al. 2011; Schering et al. 1988; Popoff et al. 1988). Arg177 liegt dabei in der Nähe der Adenosintriphosphat (ATP)-Bindungstasche, die essentiell für die Hydrolyse von ATP zu ADP und somit notwendig für die Polymerisation von G-Aktin zu filamentären (F)-Aktin ist.

In intakten Zellen unterliegt das Aktinzytoskelett einem dynamischen Gleichgewicht aus Auf- und Abbau. Dies ist nicht nur nötig für den Erhalt der Zellstruktur sondern auch um intrazelluläre Transportfunktionen wie z. B. den Transport von Vesikeln zu Membranen, Verankerung transmembranöser Proteine oder die Zellmotilität zu ermöglichen. Am „Plus-Ende“ der Aktinfilamente kommt es dabei zu einer Anlagerung von Aktinmonomeren, die ATP gebunden haben. Nach der Bindung an das Filament, führt die Hydrolyse des ATP zu einer Konformitätsänderung des G-Aktins, sodass weitere Anlagerungen von monomerem Aktin an das Molekül und neues „Plus-Ende“ möglich sind. Durch die ADP-Ribosylierung von G-Aktin wird der Aufbau von Aktinfilamenten verhindert (Ueda u. Hayaishi 1985; Shall 1995). Dies geschieht da die Anlagerung eines ADP-ribosylierten Aktin-Moleküls an das „Plus-Ende“ eines Aktinfilaments als „capping protein“ wirkt. Durch die ADP-Ribose an Arg177 ist aus sterischen Gründen keine weitere Anlagerung möglich. Auch die Bindung von ATP wird verhindert. Die Polymerisation stoppt (Geipel et al. 1989; Wegner u. Aktories

1988; Aktories u. Wegner 1992; Reuner et al. 1987). Am „Minus-Ende“ kommt es jedoch weiterhin zur Dissoziation von G-Aktin. Somit verschiebt sich das Gleichgewicht von Auf- und Abbau der Filamente zu Gunsten des Abbaus und somit Richtung G-Aktin. Es kommt schließlich zu einer vollständigen Depolymerisation der Aktinfilamente und somit zur Zerstörung des Aktinzytoskeletts.

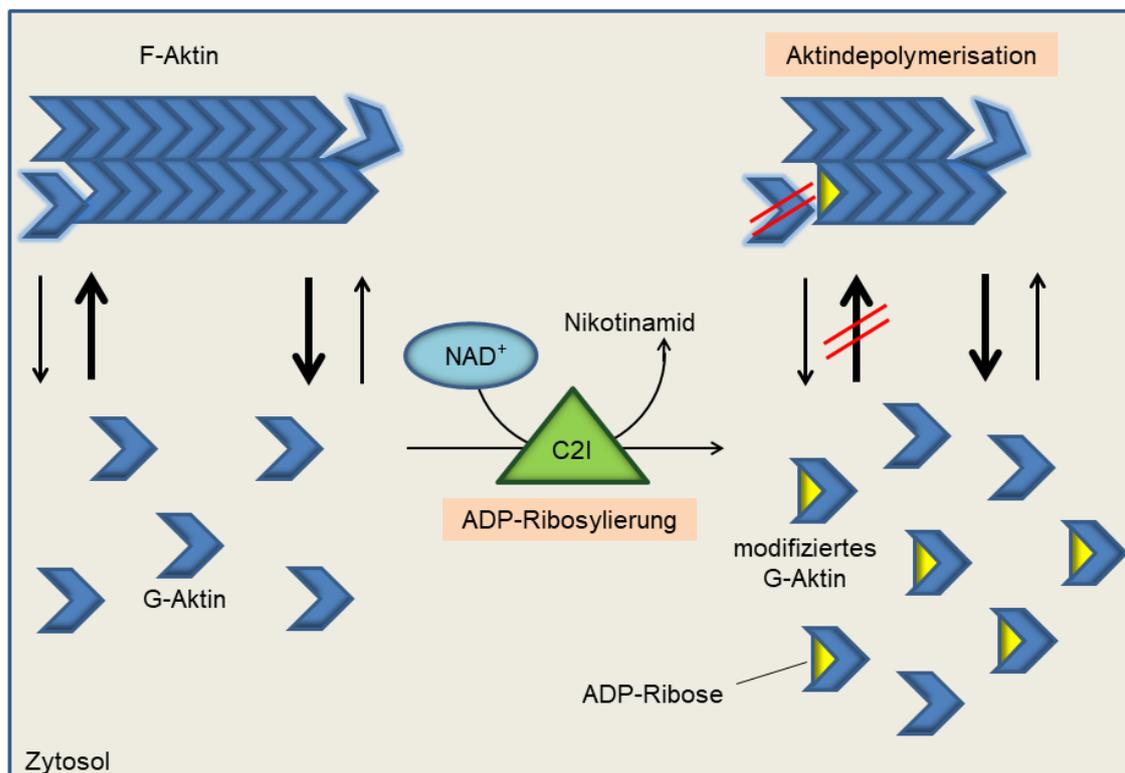


Abbildung 1: Auswirkungen der Aktin-ADP-Ribosylierung durch C2I auf die zelluläre Organisation von Aktin

In der Zelle liegt ein dynamisches Gleichgewicht zwischen G- und F-Aktin vor. Kommt es z. B. durch die Enzymkomponente C2I des C2-Toxins zu einer Mono-ADP-Ribosylierung des G-Aktins unter Zuhilfenahme des Kosubstrats NAD^+ , so wird der Aufbau von Aktinfilamenten verhindert. Dies geschieht, da die Anlagerung des modifizierten G-Aktins an das wachsende Plus-Ende als Capping Protein wirkt. Das bedeutet, dass im weiteren Verlauf kein Anhängen von G-Aktin mehr möglich ist. Die Dissoziation am Minus-Ende schreitet jedoch weiter voran, sodass es zu einer kompletten Depolymerisation des Aktinzytoskeletts kommt. (ADP = Adenosindiphosphat; C2I = Enzymkomponente des C2-Toxins von *Clostridium botulinum*; F-Aktin = filamentäres Aktin; G-Aktin = globuläres Aktin; NAD^+ = Nikotinamidadenindinukleotid) Graphik in Anlehnung an (Aktories u. Wegner 1992)

Das führt zunächst zu dem Erliegen wichtiger Zellfunktionen, dem Abrunden adhärenter Zellen und somit zu dem Verlust der Barrierefunktion epithelialer oder endothelialer Gewebe (Aktories et al. 1986; Reuner et al. 1987; Wiegers et al. 1991; Aktories u. Wegner 1992; Geipel et al. 1989; Wegner u. Aktories 1988). Im weiteren Verlauf kommt es dann zum Caspase-vermittelten Zelltod (Heine et al. 2008; Hilger et al. 2009).

Man nimmt an, dass es dem Bakterium als auch den entsprechenden Toxinen durch die Schwächung bzw. letztendlich durch die Zerstörung der epithelialen Barrierefunktion der Zielzellen ermöglicht wird, tiefer in das Gewebe einzudringen um somit die Überlebensdauer der Bakterien im Gewebe zu erhöhen.

1.3 *Clostridium botulinum* C2-Toxin

Struktur und Aufnahmemechanismus

Das C2-Toxin stellt den Prototyp der binären clostridialen Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine dar (Aktories et al. 1986). Es wird von *C. botulinum*, einem grampositiven, obligat anaeroben Stäbchenbakterium, Gruppe III (phylogenetische Einteilung) Typ C und D (Einteilung der toxinogenen Stämme) produziert (Ohishi u. Sakaguchi 1980). Daneben ist *C. botulinum* insbesondere für sein hochpotentes Botulinum Neurotoxin bekannt, das die Ursache des Botulismus darstellt.

Das C2-Toxin wird auf dem bakteriellen Plasmid codiert und wirkt für viele verschiedene Zelltypen zytotoxisch. Als potentes Enterotoxin attackiert es die Darmmukosa von Mäusen, was zu hämorrhagischen Läsionen und Nekrose führt (Ohishi u. Odagiri 1984; Ohishi 1983b; Ohishi 1983a; Simpson 1982). Zudem konnten letale Flüssigkeitsansammlungen in der Lunge und dem Darmtrakt von Hühnern und Fasanen nachgewiesen werden (Simpson 1982; Kurazono et al. 1987). Diese Effekte entstehen jedoch nur durch das Zusammenwirken der Enzymkomponente C2I, einer Mono-ADP-Ribosyl-Transferase, und der Bindungs- und Translokationskomponente C2II (Ohishi 1983a; Ohishi 1983b). Diese werden von *C. botulinum* als zwei separate Proteine produziert und sezerniert.

Struktur

Die Enzymkomponente des C2-Toxins, das C2I, besteht aus 431 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von ~ 49 kDa. C2I lässt sich in zwei funktionell unterschiedliche Domänen unterteilen: die *N*-terminale Adapterdomäne und die katalytische *C*-terminale Domäne (Barth, Hofmann et al. 1998; Barth, Preiss et al. 1998).

Die Adapterdomäne C2IN setzt sich aus den AS 1-225 zusammen. Sie ist enzymatisch inaktiv, dient jedoch als Adapter für die Interaktion mit der aktivierten Transportkomponente C2IIa (Barth et al. 1998). So konnte gezeigt werden, dass C2IN (AS 1-225), analog zu C2I (AS 1-431) in die Zielzelle aufgenommen wird (Barth, Roebing et al. 2002). Dabei scheinen die AS 1-87 essentiell für die Interaktion zwischen C2I und C2IIa sowie für die Translokation in das Zytosol der Zielzelle zu sein (Barth et al. 2002).

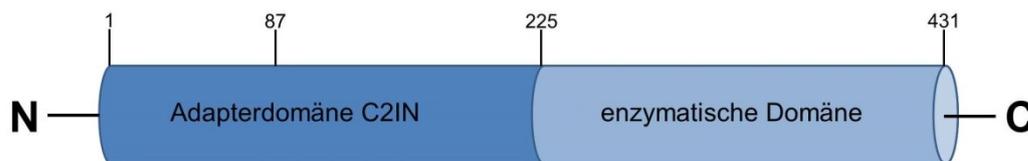


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Enzymkomponente C2I des C2-Toxins von *C. botulinum*

Die Enzymkomponente C2I besteht aus 431 Aminosäuren. Die *N*-terminale Adapterdomäne (C2IN, AS 1-225) vermittelt die Interaktion mit der Bindungs- und Translokationsdomäne C2IIa für den Transport über die zelluläre Membran in das Wirtszellzytosol. Dabei sind die AS 1-87 von essentieller Bedeutung. Der *C*-terminale Anteil des Proteins (AS 226-431) stellt mit seinen katalytischen Einheiten die enzymatisch aktive Domäne dar. Er beinhaltet die ADP-Ribosyltransferase als auch die NAD-Glykohydrolase. (ADP = Adenosindiphosphat; AS = Aminosäure; *C.* = *Clostridium*, C2I = Enzymkomponente des C2-Toxins; C2IIa = aktivierte Bindungs- und Transportkomponente des C2-Toxins; NAD = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) Graphik in Anlehnung an (Barth et al. 1998)

Die *C*-terminale Domäne des C2I, AS 226-431, beinhaltet als enzymatisch aktive Domäne die ADP-RT als auch die NAD-Glykohydrolase (Barth et al. 1998). Es finden sich spezifische Motive, die essentiell für die Aktivität der ADP-RT sind und sich ebenfalls in den bereits erwähnten Iota-Toxin von *C. perfringens* und CDT-Toxin von *C. difficile* finden lassen. Als Beispiele seien hier die zwei katalytischen Glutamate im 387ExE389-Motiv als auch das Serin-Threonin-Serin-Motiv (AS 347-349) genannt, wobei zuletzt genanntes wichtig für die Bindung von NAD an C2I ist (Barth et al.

1998; Aktories et al. 2011b; Gulke et al. 2001; Laing, Unger et al. 2011; Laing, Koch-Nolte et al. 2011; Sakurai et al. 2003; Tsuge et al. 2008).

Die Bindungs- und Transportkomponente C2II besteht aus 721 AS und weist, abhängig vom Bakterienstamm, ein Molekulargewicht von ~ 80 kDa auf (Sterthoff et al. 2010). Sie lässt sich grob in vier funktionelle Domänen (D1-D4) unterteilen, die jeweils eine spezifische Funktion bei der Aufnahme des C2-Toxins ins Wirtszellzytosol aufweisen. Analog der B-Komponente des Iota-Toxins von *C. perfringens*, unterliegt das Vorläuferprotein C2II zunächst einer proteolytischen Aktivierung um es in seine biologisch aktive Form, das C2IIa, zu überführen (Sterthoff et al. 2010; Blöcker et al. 2000; Kimura et al. 1998; Gibert et al. 2000). C2IIa liegt als Homoheptamere vor, welche die biologisch aktive Spezies darstellen (Barth et al. 2000).

Domäne 1, die *N*-terminale Domäne, besteht dabei aus der Region C2II₂₀ und der Region D1 (D1'). Zur proteolytischen Aktivierung wird die Region C2II₂₀ durch Serin-Proteasen zwischen Lysin 181 und Alanin 182 abgespalten. Dies ist *in vitro* durch eine Behandlung mit der Protease Trypsin möglich. Durch die limitierte Proteolyse entsteht die aktive Form C2IIa (AS 182-721) mit einem Molekulargewicht von ~ 60 kDa (Sterthoff et al. 2010; Schleberger et al. 2006; Barth et al. 2000; Blöcker et al. 2000; Ohishi et al. 1980). Nach der Abspaltung liegt die Region D1 (D1') am neuen *N*-Terminus zur Interaktion mit C2I frei.

Domäne 2 dient der Ausbildung von Poren in der Endosomenmembran durch Einlagerung von C2IIa-Heptameren. Durch die Poren wird die Translokation des C2I von frühen Endosomen in das Wirtszellzytosol ermöglicht (Barth et al. 2000).

Domäne 3 ist für die spontane Zusammenlagerung der aktivierten Transportkomponente zu Heptameren verantwortlich. Diese sind essentiell für die rezeptorvermittelte Endozytose als auch für die bereits genannte Porenbildung (Kaiser et al. 2006; Barth u. Stiles 2008).

Domäne 4, die *C*-terminale Domäne, vermittelt die Bindung der Heptamere an Zellrezeptoren der Wirtszelle (Blöcker et al. 2000).

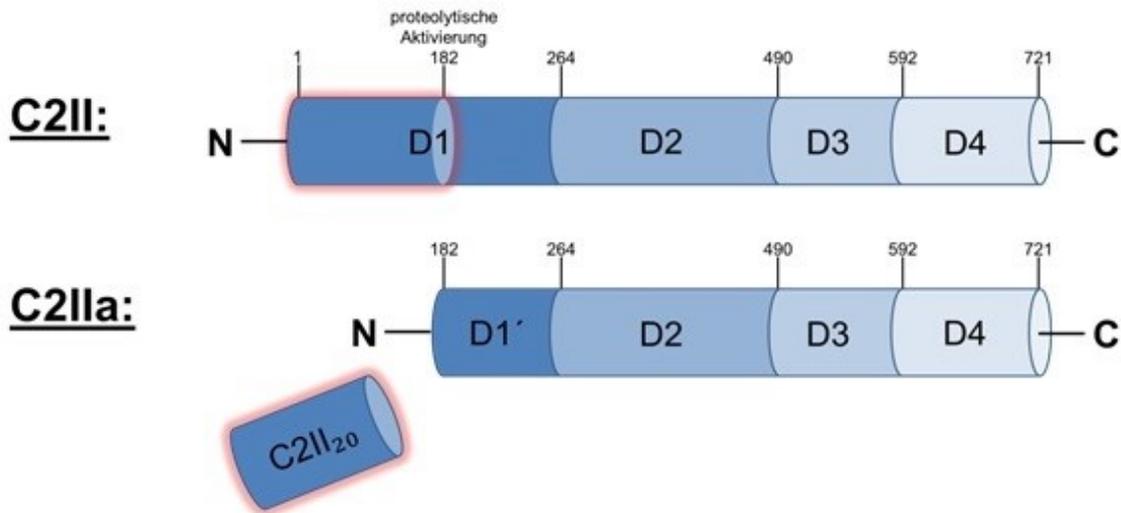


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Bindungs- und Transportkomponente C2II/C2IIa des C2-Toxins von *Clostridium botulinum*

Die Bindungskomponente C2II besteht aus 721 Aminosäuren. Sie lässt sich in vier funktionelle Domänen einteilen. Domäne 1 (AS 1-264) umfasst die Region C2II₂₀ und D1'. Durch proteolytische Abspaltung an der AS 182 wird das C2II in seine biologisch aktive Form, das C2IIa (AS 182-721), überführt. Nach der proteolytischen Aktivierung liegt am neuen N-Terminus die Region D1' zur Interaktion mit der Enzymkomponente C2I frei. Domäne 2 (AS 265-490) dient der Porenbildung während Domäne 3 (AS 491-592) für die Heptamerisierung verantwortlich ist. Domäne 4 (AS 593-721), die C-terminale Domäne, vermittelt die Bindung an Oberflächenrezeptoren der Wirtszellen. (AS = Aminosäure; C2I = Enzymkomponente des C2-Toxins; C2II = Bindungs- und Translokationskomponente des C2-Toxins; C2IIa = aktivierte Form des C2II) Graphik in Anlehnung an (Blöcker et al. 2000)

Aufnahmemechanismus

Der Aufnahmemechanismus des C2-Toxins beginnt mit der Aktivierung der Bindungs- und Transportkomponente C2II durch limitierte Proteolyse (Barth et al. 2000). Das aktivierte C2II, C2IIa, lagert sich dann zu ringförmigen Heptameren (~420 kDa) zusammen, die biologisch aktiv sind (Kaiser et al. 2006).

Diese binden an einen spezifischen Kohlenhydrat-Rezeptor der Zielzelle. Diese komplexe Asparagin-gebundene Oligosaccharidstruktur konnte auf allen bisher getesteten eukaryotischen Zellen nachgewiesen werden (Blöcker et al. 2000; Stiles et al. 2002; Eckhardt et al. 2000). Des Weiteren zeigte sich in allen untersuchten Wirbeltierzellen eine Reaktion auf das C2-Toxin, ausgenommen zufällig mutagenisierten „Chinese Hamster Ovary“ (CHO) Fibroblasten. Diese CHO-Zellen sind, bedingt durch den Verlust der N-Acetylglucosaminyltransferase I, nicht in der

Lage den Rezeptor zu produzieren und somit resistent gegen das C2-Toxin (Fritz et al. 1995).

Sowohl vor als auch nach der Bindung an den Rezeptor der Zielzelle ist eine Interaktion und Bindung der Enzymkomponente C2I möglich. Man nimmt an, dass dabei maximal drei Moleküle C2I an ein C2IIa-Heptamer binden können (Kaiser et al. 2006). Durch den gebundenen C2IIa/C2I-Komplex erfolgt die rezeptorvermittelte Endozytose (Pust et al. 2010). Die Freisetzung des C2I in das Zytosol erfolgt aus angesäuerten frühen Endosomen (Barth et al. 2000). Dieser Schritt kann durch Bafilomycin A1 (Baf), einem Makrolidantibiotikum aus *Streptomyces griseus*, effizient blockiert werden. Baf verhindert dabei, als Inhibitor der vesikulären Protonenpumpe, die Ansäuerung von Endosomen (Barth et al. 2000).

An sich bewirkt die vesikuläre Protonenpumpe über einen pH-Abfall im Lumen der Endosomen eine Konformitätsänderung des C2IIa-Heptamers (Blöcker, Bachmeyer et al. 2003; Blöcker, Pohlmann et al. 2003; Schleberger et al. 2006). Dies resultiert in einer Insertion hydrophober Bereiche des Proteins in die endosomale Membran. Die so geformte Translokationspore ist essentiell für den Transport von C2I über die Endosomenmembran in das Zytosol der Zielzellen (Falnes u. Sandvig 2000; Barth et al. 2000; Blöcker et al. 2003). Dies wird vermutlich durch den pH-Gradienten zwischen dem Endosomenlumen und dem Zytosol forciert. Die Pore weist dabei einen inneren Durchmesser von $\sim 1-2$ nm auf (Schleberger et al. 2006). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Translokation durch die Pore in partiell ungefalteter Konformation des C2I-Proteins stattfindet (Haug, Wilde et al. 2003). Nach der Rückfaltung im Zytosol der Wirtszelle erfolgt die bereits beschriebene mono-ADP-Ribosylierung von Aktin (siehe hierzu auch 1.2 Binäre Aktin-ADP-ribosylierende Toxine). Das C2-Toxin modifiziert dabei spezifisch und irreversibel die β/γ -Isoform von Aktin aus Nichtmuskelzellen und die γ -Isoform aus glatten Muskelzellen (Ohishi u. Tsuyama 1986; Vandekerckhove et al. 1988). Eine Vergiftung von Zellen durch C2-Toxin erfolgt nur, wenn beide Komponenten miteinander interagieren (Iwasaki et al. 1980).

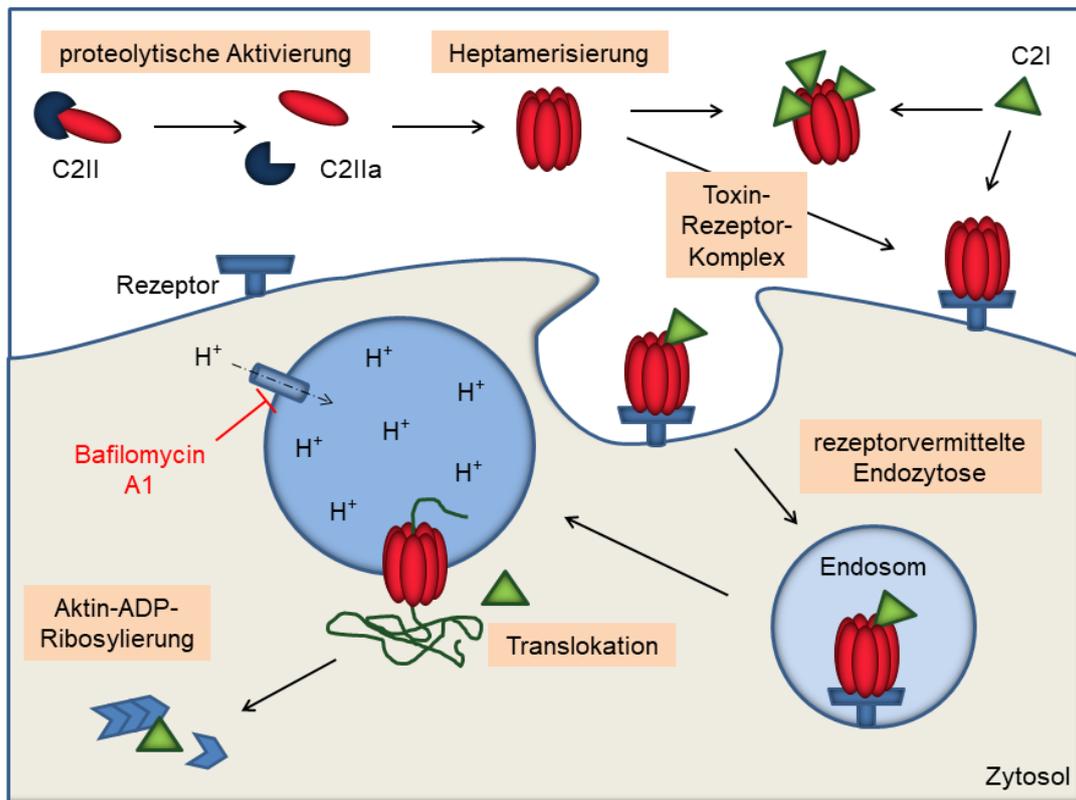


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufnahmemechanismus des C2-Toxins von *C. botulinum*

Nach der limitierten Proteolyse des C2II-Proteins, liegt die aktivierte Form, das C2IIa vor. Dieses bildet Heptamere aus, welche jeweils bis zu drei Enzymkomponenten binden können. Zeitgleich mit der Interaktion zwischen C2IIa und C2I findet eine Bindung an Oberflächenrezeptoren der Zielzellen statt. Der Toxin-Rezeptor-Komplex folgt dann der rezeptorvermittelten Endozytose. Durch die Azidifizierung in frühen Endosomen kommt es zur Einlagerung der C2IIa-Heptamere in die Endosomenmembran und Porenbildung. Dieser Schritt kann effektiv durch Bafilomycin A1, einem Inhibitor der vesikulären Protonenpumpe, gehemmt werden. Durch die gebildeten Poren, tritt das C2I in das Zytosol über. Die Translokation findet dabei in partiell ungefalteter Form statt. Nach erfolgter Rückfaltung im Zytosol der Wirtszelle mono-ADP-ribosyliert die Enzymkomponente C2I das monomere G-Aktin. (ADP = Adenosindiphosphat; *C.* = *Clostridium*, C2I = Enzymkomponente des C2-Toxins; C2II = Bindungs- und Transportkomponente des C2-Toxins; C2IIa = aktivierte Form des C2II; G-Aktin = globuläres Aktin) Graphik in Anlehnung an (Barth et al. 2004)

1.4 Zelluläre Faltungshelferproteine

Die Hauptaufgabe zellulärer Faltungshelferenzyme stellt sowohl unter normalen als auch unter Stressbedingungen die Verhinderung unproduktiver Seitenwege der Proteinfaltung, vor allem der Aggregation dar (Wegele et al. 2004). Dabei binden die Faltungshelfer an hydrophobe Seitenketten der ungefalteten Proteine (Hartl 1996) und schirmen diese gegen andere Reaktionspartner ab, ohne dabei selbst Teil der Struktur zu werden. Sie stellen somit eine Hilfe bei der Bildung der Sekundärstruktur

dar. Dies spielt im Rahmen der Entfaltung und Rückfaltung und somit insbesondere bei dem Transport über Membranen eine wichtige Rolle (Walter u. Buchner 2002).

In Bezug auf das in der Arbeit untersuchte C2-Toxin von *C. botulinum* ist C2I während seiner Translokation durch den kleinen inneren Kanal der B-Pore zumindest partiell entfaltet (Haug et al. 2003). Um seine Enzymaktivität wiederzuerlangen, ist eine Rückfaltung von C2I im Zytosol der Zielzellen nötig. Wie bereits beschrieben, bedient sich das C2-Toxin bei seiner Aufnahme zellulärer Mechanismen (siehe auch 1.3 *Clostridium botulinum* C2-Toxin-Struktur und Aufnahmemechanismus), was vermuten ließ, dass auch beim Membrantransport von C2I zelluläre Proteine beteiligt sind.

In früheren Arbeiten der AG Barth konnte für die Faltungshelferenzyme Hitzeschockprotein (heat shock protein = Hsp) 90 und Cyclophilin (Cyp) A nachgewiesen werden, dass sie die Translokation von C2I über die Endosomenmembran unterstützen. Durch die spezifische pharmakologische Hemmung dieser Faltungshelferenzyme ließ sich die Translokation von C2I in das Zytosol verhindern, wodurch C2I im Endosom verblieb (Haug, Leemhuis et al. 2003; Kaiser et al. 2009). Dabei konnte eine direkte Interaktion von C2I sowohl mit Hsp90 als auch mit CypA *in vitro* und in intakten Zellen nachgewiesen werden (Kaiser et al. 2009; Kaiser et al. 2012)

Eine Beteiligung von Hsp90 und CypA an der Membrantranslokation konnte u. a. ebenfalls für die bereits erwähnten clostridialen Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine *C. perfringens* Iota-Toxin und *C. difficile* CDT-Toxin gezeigt werden (Haug et al. 2004; Kaiser et al. 2011). Der molekulare Mechanismus der Interaktion zwischen den Toxinen und den genannten Faltungshelfern konnte bisher noch nicht genau geklärt werden, es wird jedoch vermutet, dass Hsp90 und CypA durch ihre Funktion als Faltungshelfer nicht nur an der Translokation sondern auch an der Rückfaltung beteiligt sind (Haug et al. 2003; Haug et al. 2004; Kaiser et al. 2009; Kaiser et al. 2011; Kaiser et al. 2012).

Mit diesen Entdeckungen konnte die Arbeitsgruppe Barth erstmals eine Beteiligung von Faltungshelferenzymen an der zellulären Aufnahme binärer Bakterientoxine beschreiben.

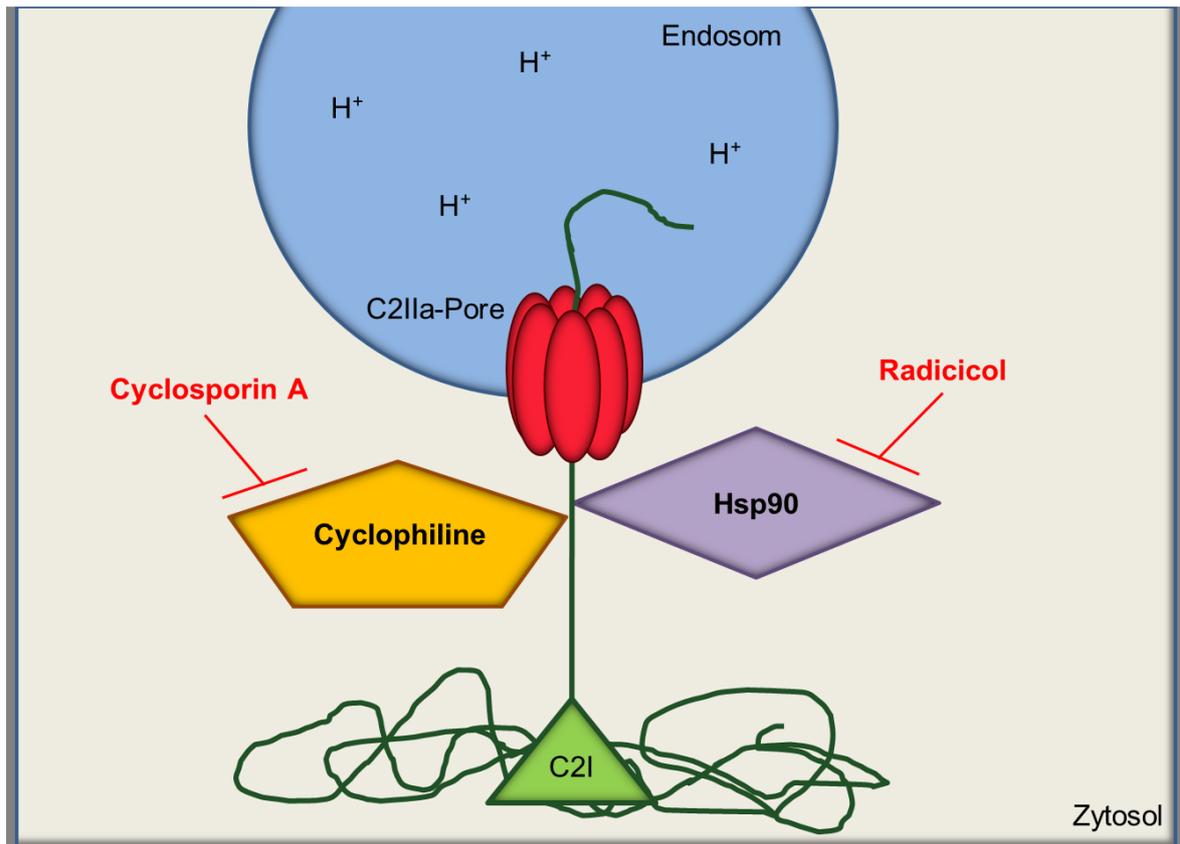


Abbildung 5: Beteiligung zellulärer Faltungshelferproteine bei der Membrantranslokation von C2I

Erfolgte Insertion des C2IIa-Heptamers in die endosomale Membran und Ausbildung einer Translokationspore für den Übertritt der Enzymkomponente C2I in das Wirtszellzytosol. Die Translokation der Enzymkomponente findet in partiell ungefalteter Form statt. Um die enzymatische Aktivität wiederzuerlangen, ist eine Rückfaltung des Proteins nötig. Es konnte bereits mit der Hilfe spezifischer Inhibitoren gezeigt werden, dass dieser Schritt durch das Hitzeschockprotein 90 und Cyclophiline, insbesondere das Cyclophilin A, erleichtert wird. (C2I = Enzymkomponente des C2-Toxins; C2IIa = aktivierte Form des C2II, der Bindungs- und Transportkomponente des C2-Toxins; Cyclosporin A = spezifischer Inhibitor der Cyclophiline; Hsp90 = Hitzeschockprotein (heat shock protein) 90; Radicol = spezifischer Inhibitor der Hitzeschockprotein 90-Familie) Graphik in Anlehnung an (Aktories u. Barth 2004)

Hitzeschockprotein 90

Hsp90, mit einem Molekulargewicht von 90 kDa, gehört zu der großen Familie der Hitzeschockproteine. Diese v. a. unter Hitzestress vermehrt exprimierten Chaperone werden anhand ihres Molekulargewichtes und ihrer Sequenzhomologien eingeteilt. Hsp90 ist ein essentielles, hochkonserviertes Protein, welches in allen bekannten eukaryotischen Zellen vorkommt. Es hat als Faltungshelfer von über 200 verschiedenen Proteinen eine wichtige Rolle in fundamentalen zellulären Prozessen inne. Darunter fallen beispielsweise die Kontrolle des Zellzyklus, Signalkaskaden und das Zellüberleben (Li et al. 2012; Li u. Buchner 2013). Neben der Faltung und

Rückfaltung von Proteinen sowie der Vermeidung von Aggregationen ungefalteter Proteine ist es auch an dem Transport von Proteinen durch das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat beteiligt (Freeman u. Morimoto 1996; Jakob et al. 1995; Schneider et al. 1996; Schumacher et al. 1996; Wiech et al. 1992). In eukaryotischen Zellen agiert Hsp90 im Verbund mit Hsp70 und weiteren Co-Chaperonen (Pratt u. Toft 2003). Hsp90 wirkt dabei als flexibles Homodimer, verbunden an der C-terminalen-Dimerisierungs-Domäne. Hier können zudem Co-Chaperone mit einem Tetratricopeptid-Repeat (TPR) gebunden werden, um in einem Multichaperonkomplex mit Hsp90 wirken zu können (Assimon et al. 2015). Jedes Protomer von Hsp90 hat zudem eine mittlere Domäne mit Bindungsmöglichkeiten für Substratproteine und Co-Chaperone. Die Aktivität von Hsp90 ist ATP-abhängig, welches an der N-terminalen ATP-Bindungsdomäne gebunden wird und zur Konformitätsänderung des Homodimers in die geschlossene Form führt (Li et al. 2012; Pearl u. Prodromou 2000). Die Hydrolyse durch die intrinsische ATPase führt dann zur Konformitätsänderung und Entlassung eines korrekt gefalteten Proteins (Pratt u. Toft 2003). Je nach Beteiligung der Co-Chaperone werden unterschiedliche Klienten bedient sowie die ATPase Aktivität reguliert (Prodromou et al. 1999). Im Falle des Hsp90-Multichaperonzyklus zur Aktivierung von Steroidhormonrezeptoren (SHR) finden sich u. a. Hsp70, Cyp40, FK506 Bindeprotein 51 und 52 als Co-Chaperone wieder. Gemeinsam ist ihnen die TPR-Domäne, mit Hilfe derer sie über das EEVD-Motiv der C-terminalen Dimerisierungs-Domäne mit Hsp90 interagieren können (Ratajczak u. Carrello 1996).

Wie bereits erwähnt, konnte mit Hilfe von spezifischen Inhibitoren des Hsp90 (Radicalol, ein Macrolidantibiotikum aus *Monosporium bonorden* und Geldanamycin, einem benzochinoidem Ansamycin von *Streptomyces hygroscopicus*) auch eine Beteiligung von Hsp90 an der Membrantranslokation von clostridialen Aktin-ADP-ribosylierenden Toxinen nachgewiesen werden. Beide Inhibitoren binden dabei an die N-terminale ATP-Bindungstasche (Schulte et al. 1998; Roe et al. 1999). Eine Konformitätsänderung der ATPase und infolgedessen des Klienten ist nicht möglich (Grenert et al. 1997; Roe et al. 1999; Prodromou et al. 1999). In Bezug auf die Toxine wird die Translokation der Enzymkomponenten in das Wirtszellzytosol und somit die Vergiftung verhindert (Haug et al. 2003; Haug et al. 2004; Kaiser et al. 2011).

Unabhängig davon zeigen beide Inhibitoren eine Relevanz in der Onkologie, wo sie starke Anti-Tumor-Effekte aufweisen. Dies lässt sich durch eine 2-10fach höhere Expression von Hsp90 in Tumorzellen gegenüber Nicht-Tumorzellen erklären. Ihre hohe Toxizität, geringe Löslichkeit und Stabilität gaben jedoch Anlass neue Derivate zu entwickeln. Dies könnte auch für Patienten interessant sein, die an einer Vergiftung mit bakteriellen Exotoxinen leiden.

Cyclophiline

Cyps gehören zu der Familie der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen (PPIasen), die ebenfalls eine Gruppe der Faltungshelferenzyme darstellt (Fischer et al. 1989). PPIasen kommen ubiquitär in allen Lebewesen vor und lassen sich in drei Klassen unterteilen: die Cyps, die FK506-Bindeproteine und die Parvuline mit verschiedenen Isoformen für jede Klasse (Fischer et al. 1989; Galat 2003; K. Lang et al. 1987; Schiene-Fischer 2015). PPIasen assistieren bei der (Rück-)Faltung von Peptiden und Proteinen zu ihrer nativen Struktur durch Beschleunigung der *cis/trans*-Isomerisierung. Dabei katalysieren sie die Bindungsachsenrotation von Prolin-Peptidbindungen. Dies stellt häufig den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Proteinfaltung dar und benötigt eine hohe Aktivierungsenergie (Fischer et al. 1984; K. Lang et al. 1987; Fischer et al. 1989; Bang u. Fischer 1991; Schmid et al. 1993; Schmid 1993; Wedemeyer et al. 2002; Wang u. Heitman 2005). PPIasen überwinden diese Energiebarriere und katalysieren die *cis/trans*-Isomerisierung ohne das Gleichgewicht der *cis/trans*-Konformation zu stören (Kim u. Baldwin 1982; Lilie et al. 1993; Gothel u. Marahiel 1999; Wedemeyer et al. 2002).

Mehrere PPIasen sind bereits das Ziel pharmazeutischer Wirkstoffe, so blockiert beispielsweise Cyclosporin A (CsA), ein zyklisches Peptid aus den norwegischen Schlauchpilzen *Tolypocladium inflatum* und *Cylindrocarpon lucidum*, als spezifischer Inhibitor die Cyps (Handschumacher et al. 1984). Eine isoformspezifische Inhibition findet durch CsA zwar nicht statt, jedoch zeigt das CypA eine höhere Affinität zu CsA als die anderen Isoformen (Daum et al. 2009; Takahashi et al. 1989). CypA ist der bekannteste Vertreter der derzeit identifizierten 18 verschiedenen Isoformen der Cyps. Als relativ kleine Isoform besteht er aus einer einzelnen PPIase-Domäne mit einem Molekulargewicht von 17,7 kDa. 1976 war CypA das erste Mitglied der PPIase-Familie, welches in Säugetierzellen identifiziert wurde. Ähnlich zu Hsp90 konnte auch

für CypA eine Beteiligung an zahlreichen zellulären Funktionen nachgewiesen werden wie z. B. an der Signaltransduktion, der Zellzyklusregulation oder auch bei der Antwort auf oxidativen Stress (Wedemeyer et al. 2002; Daum et al. 2009).

Von der Arbeitsgruppe Barth konnte zudem eine Beteiligung von CypA an dem Aufnahmemechanismus von *C. botulinum* C2-Toxin, *C. perfringens* Iota-Toxin und *C. difficile* CDT-Toxin in Säugetierzellen gezeigt werden. Wie bei Hsp90 wird durch die Inhibition der PPIase die Membrantranslokation der clostridialen ADP-ribosylierenden Toxine in das Wirtszellzytosol verhindert. Dies ließ sich sowohl *in vitro* als auch in intakten Zellen demonstrieren (Kaiser et al. 2009; Kaiser et al. 2011). Unabhängig von der oben genannten Wirkung ist CsA zudem als Immunsuppressivum bekannt, welches v. a. bei Organtransplantationen Einsatz findet um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden (Borel et al. 1976). Hierbei bindet der CsA/Cyp-Komplex inhibitorisch an die Protein-Phosphatase Calcineurin. Dadurch wird die Dephosphorylierung und somit Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nuclear-factor-activating-T-Cell verhindert. Die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Zelloberflächenrezeptoren bleibt aus, die Aktivierung und Vermehrung von Lymphozyten wird gehemmt (Clipstone u. Crabtree 1992; Liu et al. 1991; Schreiber et al. 1991; Fruman et al. 1992). Auch hier scheint CypA, durch seine hohe Affinität zu CsA im Vergleich zu den anderen Cyp-Isoformen, hauptsächlich verantwortlich für die CsA-induzierte Immunsuppression zu sein.

FK506-Bindeproteine

Wie bereits erwähnt zählen neben den Cyclophilinen auch die FK506-Bindeproteine (FKBPs) zu der Familie der PPIasen (Fischer et al. 1984). Als PPIase katalysieren die FKBPs ebenfalls die *cis/trans*-Isomerisierung von Prolin-Peptidbindungen. Obgleich sich die Cyps und FKBPs in ihrer Funktion ähneln, so unterscheiden sie sich doch in ihrer Aminosäuresequenz. Bisher sind 16 verschiedene Isoformen der FKBPs bekannt. Allen gemein ist die FKBP-Domäne, die die PPIase-Aktivität beherbergt und die Bindungsstelle für den spezifischen Inhibitor FK506 (*alias* Tacrolimus) repräsentiert (Galat 2003; Harding et al. 1989).

FK506, ein Makrolidlacton aus *Streptomyces tsukubaensis*, ist v. a. durch seine immunsuppressive Wirkung bekannt. So wird Tacrolimus vielfach in der Transplantationsmedizin eingesetzt um Abstoßungsreaktionen von Organen zu

verhindern. FK506 zählt dabei wie CsA zu den Calcineurin-Inhibitoren: Durch Bindung des FK506/FKBP-Komplexes an Calcineurin wird über die Inhibition eines komplexen Signaltransduktionswegs die Vermehrung von T-Lymphozyten gehemmt. Dieser Wirkungsmechanismus ist analog zu dem des CsA/Cyp-Komplexes (Liu et al. 1991; Schreiber et al. 1991). Auch hier hat der Prototyp FKBP12, ein nur aus einer katalytischen PPIase-Domäne bestehendes FKBP, die höchste Affinität zu FK506 und vermittelt hauptsächlich die immunsuppressive Wirkung (Weiwad et al. 2006).

Die immunmodulatorische Rolle des FK506/FKBP- bzw. des CsA/Cyp-Komplexes steht jedoch in keinem Zusammenhang mit der Wirkweise als PPIase und ist somit für die vorliegende Arbeit nicht relevant.

Im Gegensatz zu FKBP12 mit einer einzelnen FKBP-Domäne, existieren FKBP mit Multi-Domänen (Schiene-Fischer 2015). Diese enthalten neben den FKBP-Domänen wenig enzymatisch aktive TPR-Domänen, mit Hilfe derer eine Interaktion mit Hsp90 möglich ist. Diese Interaktion wird über das EEVD-Motiv der C-terminalen Dimerisierungs-Domäne von Hsp90 vermittelt (Pratt u. Toft 1997; Chen et al. 1998; Schiene-Fischer 2015). Im Falle des Hsp90-Multichaperonzyklus zur Aktivierung von SHR konnten bereits die FKBP51 und FKBP52 als Co-Chaperone identifiziert werden. Beide bestehen typischerweise aus 3 TPR-Domänen und 2 FKBP-Domänen, weisen jedoch antagonistische Rollen bei zellulären Funktionen auf (Ratajczak u. Carrello 1996; Chen et al. 1998). So erhöht FKBP52 die Affinität von Hormonen an Glukokortikoidrezeptoren, während FKBP51 einen negativen Regulator für diese Interaktion darstellt (Cheung-Flynn et al. 2005; Riggs et al. 2003; Denny et al. 2000). Des Weiteren interagiert FKBP52 ähnlich wie Cyp40 mit dem Motorprotein Dynein um die Translokation des SHR-Komplexes entlang von Mikrotubuli zum Zellkern zu vereinfachen (Galigniana et al. 2001; Galigniana et al. 2010). Auch hier zeigt FKBP51 eine antagonistische Wirkung und hemmt den Transport (Wochnik et al. 2005).

Eine Beteiligung der FKBP bei dem Aufnahmemechanismus von Toxinen konnte bislang noch nicht nachgewiesen werden, jedoch zeigten erste Vorversuche in der Arbeitsgruppe Barth, dass es sich hier um einen möglichen Interaktionspartner handelt.

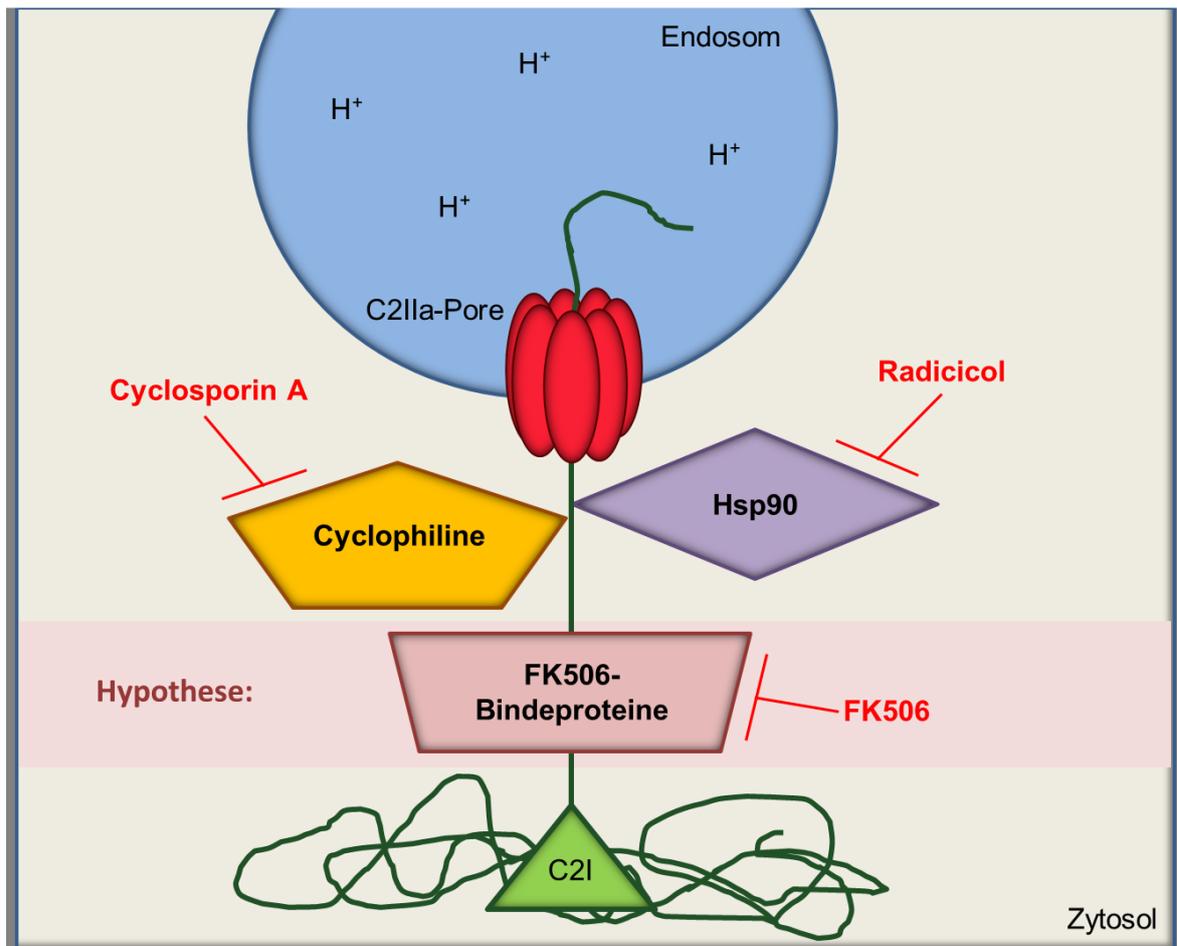


Abbildung 6: Mögliche Beteiligung zellulärer Faltungshelfer bei der Membrantranslokation von C2I

Die Translokation der Enzymkomponente C2I durch den kleinen inneren Durchmesser der C2IIa-Pore findet in partiell ungefalteter Konformation statt. Wie bereits durch die Arbeitsgruppe Barth mithilfe spezifischer Inhibitoren gezeigt werden konnte, sind das Chaperon Hsp90 als auch die PPIase Cyclophilin A an der Translokation des Toxins über die endosomale Membran beteiligt. Einen potenziellen weiteren Interaktionspartner stellen die FK506-Bindeproteine dar, die ebenfalls zur Familie der PPIasen zählen. (C2I = Enzymkomponente des C2-Toxins; C2IIa = aktivierte Form des C2II, der Bindungs- und Transportkomponente des C2-Toxins; Cyclosporin A = spezifischer Inhibitor der Cyclophiline; Hsp90 = Hitzeschockprotein (heat shock protein) 90; FK506 = Tacrolimus, spezifischer Inhibitor der FK506-Bindeproteine; PPIase = Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerase; Radicol = spezifischer Inhibitor der Hitzeschockprotein 90-Familie) Graphik in Anlehnung an (Aktories u. Barth 2004)

1.5 Zielsetzung

In den letzten Jahren konnte bereits für die zellulären Faltungshelfer Hsp90 und CypA eine Beteiligung bei der Membrantranslokation von clostridialen Aktin-ADP-ribosylierenden Toxinen aus angesäuerten Endosomen nachgewiesen werden. Dies ließ sich mit Hilfe spezifischer Inhibitoren der Faltungshelfer untersuchen. Nun war von besonderem Interesse, ob diese Toxine noch weitere zelluläre Faltungshelferenzyme für ihren intrazellulären Membrantransport nutzen, weshalb in der vorliegenden Arbeit die FKBP als potentielle Interaktionspartner für das C2-Toxin untersucht wurden. Neben den Cyps zählen auch die FKBP zur Familie der PPIasen und einige FKBP sind Co-Chaperone in Hsp90-Multichaperonkomplexen, was bei der Aktivierung des Steroidhormonrezeptors von funktioneller Bedeutung ist. Weiterhin liegt mit FK506 ein zellgängiger spezifischer Inhibitor für FKBP vor. Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden, ob und wie FKBP an der Membrantranslokation des C2-Toxins, dem Prototyp der binären clostridialen Aktin-ADP-ribosylierenden-Toxine, beteiligt sind.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Interaktion zwischen dem C2-Toxin und FKBP untersucht werden. Ziel war zu prüfen, ob in Zytotoxizitätsexperimenten die spezifische Hemmung von FKBP durch FK506 einen schützenden Effekt auf die C2 Toxin-vermittelte Abrundung von HeLa- und Vero-Zellen hat. Sollte das der Fall sein, so sollte die Ursache dafür identifiziert werden. Hierfür sollte eine Beeinflussung der Aktivität der Enzymkomponente C2I durch FK506 geprüft und getestet werden, ob durch die Inhibition der FKBP weniger C2I in das Zytosol der Wirtszelle gelangt. Weiterhin sollte *in vitro* untersucht werden, ob es zu einer direkten Interaktion von FKBP mit dem C2-Toxin kommt.

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, inwiefern sich eine kombinierte Hemmung von PPIasen (Cyps und FKBP) auf die Intoxikation mit C2-Toxin auswirkt. Dazu sollte zunächst die Vergiftungskinetik in An- und Abwesenheit der Inhibitoren, CsA und FK506, untersucht werden. Analog zum ersten Teil der Arbeit sollte zudem ausgeschlossen werden, dass die Kombination der Inhibitoren die Enzymaktivität beeinflusst. Zudem sollte die Menge an C2I im Wirtszellzytosol in An- und Abwesenheit der Inhibitoren überprüft und hinsichtlich der Frage einer synergistischen Wirkung der Inhibitoren untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Material	Bezugsquelle
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1) 30 %	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Biotinyliertes Nicotinamidadenindinukleotid (6-Biotin-17-NAD ⁺)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)-Fraktion V	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Chlorwasserstoffsäure 37% (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Complete® Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva-Electrophoresis, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva-Electrophoresis, Heidelberg
Cumarsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Digitonin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt
Eisessig (C ₂ H ₄ O ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 99,8% (C ₂ H ₆ O)	Riedel-deHaen, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz- Dihydrat (EDTA)	Roth, Karlsruhe

EZ-Link® Sulfo- <i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid (NHS)-Biotin	Pierce, Rockford, USA
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	AppliChem, Darmstadt
Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol (C ₃ H ₈ O)	Fluka, Buchs
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe
Luminol	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe
Methanol (CH ₄ O)	Fluka, Buchs, Schweiz
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Pellets	Roth, Karlsruhe
Ortho-Phosphorsäure 85% (H ₃ PO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat (Tween 20)	AppliChem, Darmstadt
Ponceau-S	AppliChem, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	USB Corporation, Cleveland USA
Wasserstoffperoxid 30% (H ₂ O ₂)	J.T. Baker, Griesheim

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
Blotting-Papier	Macherey & Nagel, Düren
Einmalpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Entwickler RTU 60	Adefo-Chemie, Dietzenbach
Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Fixierer RTU 60	Adefo-Chemie, Dietzenbach
Immobilon Western Chemiluminescent Horseradish Peroxidase(HRP) Substrate	Merck Millipore; Merck KGaA, Darmstadt
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Küvetten (Plastik)	Sarstedt, Nümbrecht
Micro Bio-Spin® Chromatographie Säulen	Bio-Rad, München
Nitrozellulose Transfer Membran	Whatman, Dassel
Page Ruler prestained Protein ladder	Fermentas GmbH, Sankt Leon-Rot
Page Ruler unstained Protein ladder	Fermentas GmbH, Sankt Leon-Rot
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilm Cronex 5, 100 NIF	Agfa, Köln
Spritzen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zellkulturplatten (12-well)	TPP®, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen (d = 10 cm)	TPP®, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber (25 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.3 Geräte

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Axiovert 40 CFL Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Bio-Dot® Microfiltration Apparatus	Bio-Rad, München
Blotter Perfect Blue Semi-Dry	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Blotter Sammy Dry (Semi-Dry)	Schleicher&Schuell GmbH, Dassel
Brutschränke	Binder, Tuttlingen und Heraeus Holding GmbH, Hanau
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Biosciences, Freiburg
Gefriertruhen -20°C	Bosch, München und Liebherr, Lindau
Gelkammer peqlab 45-2010-I	Peqlab Biotech GmbH, Erlangen
Elektrophoresekammer Hofer SE 600 Ruby	Amersham Biosciences, Freiburg
Kühlschränke	Bosch, München und Liebherr, Lindau
Magnetrührer RET basic C	IKA®, Staufen
Magnetrührer REO basic C	IKA®, Staufen
Mikrozentrifuge 220V	Roth, Karlsruhe
pH-Meter inoLap® pH 720	WTW, Weilheim
Photospektrometer DU 640	Beckmann Coulter, Fullerton USA
Pipetten	Gilson, Middleton USA und Eppendorf, Hamburg
ProgRes® C10 plus	Jenoptik AG, Jena
Schüttler Unimax 2010	Heidolph Instruments, Schwabach
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex Mixer Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwabach

Waage Balance Kern	Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Waage Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad Aqualine AL18	Bender & Hobein, Bruchsal
Wet-Blot Kammer	HSI, San Francisco USA
Wippe Duomax 1030	Heidolph Instruments, Schwabach
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

2.1.4 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

ADP-Ribosylierungspuffer

Tabelle 4: ADP-Ribosylierungspuffer: Lagerung bei -20°C; gelöst in *Aqua bidestillata*

(ADP = Adenosindiphosphat, DTT = Dithiothreitol, EDTA = Ethylendiamintetraacetat, HCl = Chlorwasserstoff, pH = *potentia Hydrogenii*, Tris = Trishydroxymethylaminomethan, Chemikalien in Spalte 1, verwendete Konzentrationen in Spalte 2)

Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Magnesiumchlorid	5 mM
Complete®-Proteaseinhibitor	1:50 (Zugabe direkt vor dem Gebrauch)

Bradford-Reagenz

Tabelle 5: Bradford-Reagenz: lichtgeschützte Lagerung bei 4 °C; gelöst in *Aqua bidestillata*

(Angaben in Prozent der Gesamtlösung, Chemikalien in Spalte 1, verwendete Mengen in Spalte 2) Zunächst lösen des Coomassie Brilliant Blue G250 im Ethanol durch Rühren über Nacht. Danach Zugabe der Ortho-Phosphorsäure unter nochmaligem Rühren für ungefähr 1 h und abschließendes Filtrieren der Reagenz.

Coomassie Brilliant Blue G250	0,04 % (w/V)
Ethanol (99,8%)	21 % (V/V)
Ortho-Phosphorsäure (85%)	50 % (V/V)

Coomassie

Tabelle 6: Coomassie-Färbelösung; gelöst in *Aqua bidestillata*

(Angaben in Prozent der Gesamtlösung, Chemikalien in Spalte 1, verwendete Mengen in Spalte 2) Zunächst lösen des Coomassie Brilliant Blue R250 im Methanol durch ausgiebiges Rühren. Danach Zugabe des *Aqua bidestillata* und des Eisessigs unter nochmaligem Rühren für mindestens 1 h.

Coomassie Brilliant Blue R250	0.25 % (w/V)
Methanol (technische Qualität)	45 % (V/V)
Eisessig	10 % (V/V)

Tabelle 7: Coomassie-Entfärbelösung; gelöst in *Aqua bidestillata*

(Angaben in Prozent der Gesamtlösung, Chemikalien in Spalte 1, verwendete Mengen in Spalte 2)

Methanol (technische Qualität)	45 % (V/V)
Eisessig	10 % (V/V)

ECL-Lösungen

Tabelle 8: ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Lösung A:

lichtgeschützte Lagerung bei 4°C; gelöst in *Aqua bidestillata*

(HCl = Chlorwasserstoff, DMSO = Dimethylsulfoxid, pH = *potentia Hydrogenii* Tris = Trishydroxymethylaminomethan, Chemikalien in Spalte 1, verwendete Konzentrationen in Spalte 2) Luminol und Cumarsäure in DMSO gelöst und bei -20 °C gelagert. Zum Gebrauch Lösung A und Lösung B zu gleichen Teilen mischen.

Tris-HCl (pH 9,0)	100 mM
Luminol	2,5 mM
Cumarsäure	0,4 mM

Tabelle 9: ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Lösung B:

lichtgeschützte Lagerung bei 4°C; gelöst in *Aqua bidestillata*

(HCl = Chlorwasserstoff, pH = *potentia Hydrogenii*, Tris = Trishydroxymethylaminomethan, Chemikalien in Spalte 1, verwendete Konzentrationen in Spalte 2) Zum Gebrauch Lösung A und Lösung B zu gleichen Teilen mischen.

Tris-HCl (pH 9,0)	100 mM
Wasserstoffperoxid	0,3 % (V/V)

Milchpulver-Lösung

Tabelle 10: Milchpulverlösung; gelöst in 1xPBS-T

(PBS-T = phosphate-buffered saline + 0,1% Tween, Angaben in Prozent der Gesamtlösung, Chemikalie in Spalte 1, verwendete Menge in Spalte 2)

Magermilchpulver	5 % (w/V)
------------------	-----------

PBS

Tabelle 11: 1×PBS (phosphate-buffered saline); gelöst in Aqua bidestillata

(pH = *potentia Hydrogenii*, Chemikalien in Spalte 1, verwendete Konzentrationen in Spalte 2) Einstellen des pH-Wertes auf 7,4

Natriumchlorid	137 mM
Kaliumchlorid	2,7 mM
Dinatriumhydrogenphosphat,	8 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1,8 mM

PBS-T

Tabelle 12: 1×PBS-T (phosphate buffered saline + 0,1% Tween); gelöst in Aqua bidestillata

(pH = *potentia Hydrogenii*, Tween 20 = Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat, Angabe in Prozent der Gesamtlösung, Chemikalien in Spalte 1, verwendete Konzentrationen in Spalte 2) Einstellen des pH-Wertes auf 7,4

Natriumchlorid	137 mM
Kaliumchlorid	2,7 mM
Dinatriumhydrogenphosphat	8 mM
Kaliumdihydrogenphosphat	1,8 mM
Tween 20	0,1 % (V/V)

Ponceau S-Lösung

Tabelle 13: 1×Ponceau S-Lösung; gelöst in Aqua bidestillata

(Angaben in Prozent der Gesamtlösung, Chemikalien in Spalte 1, verwendete Konzentrationen in Spalte 2)

Ponceau S	0,2 % (w/V)
Eisessig	5 % (V/V)

Sammelgelpuffer

Tabelle 14: Sammelgelpuffer; gelöst in *Aqua bidestillata*

(Tris = Trishydroxymethylaminomethan, Chemikalie in Spalte 1, verwendete Konzentration in Spalte 2);
Einstellung des pH-Wertes auf 6,8

Tris	0,5 mM
------	--------

SDS-Laufgelpuffer

Tabelle 15: 1×SDS-Laufgelpuffer; gelöst in *Aqua bidestillata*

(SDS = Natriumdodecylsulfat, Tris = Trishydroxymethylaminomethan, Angabe in Prozent der Gesamtlösung,
Chemikalien in Spalte 1, verwendete Konzentrationen in Spalte 2)

Tris	27 mM
Glycin	190 mM
SDS	0,1 % (w/V)

5×SDS-Probenpuffer

Tabelle 16: 5×SDS-Probenpuffer; gelöst in *Aqua bidestillata*

(HCl = Chlorwasserstoff, DTT = Dithiothreitol, SDS = Natriumdodecylsulfat, Tris =
Trishydroxymethylaminomethan, Angaben in Prozent der Gesamtlösung, Chemikalien in Spalte 1, verwendete
Mengen in Spalte 2)

Tris-HCl (pH 6,8)	312,5 mM
SDS	10 % (w/V)
Glycerin	25 % (V/V)
Bromphenolblau	0,015 % (w/V)
DTT	10 % (V/V) (Zugabe direkt vor dem Gebrauch)

Strip-Puffer

Tabelle 17: Strip-Puffer: Lösung A (sauer); gelöst in *Aqua bidestillata*

(Chemikalien in Spalte 1, verwendete Konzentrationen in Spalte 2) Einstellen des pH-Wertes mit
Chlorwasserstoffsäure auf 2,0

Glycin	0,2 M
Natriumchlorid	0,5 M

Tabelle 18: Strip-Puffer: Lösung B (alkalisch); gelöst in *Aqua bidestillata*

(Tris = Trishydroxymethylaminomethan, Chemikalie in Spalte 1, verwendete Konzentration in Spalte 2) Einstellen des pH-Wertes mit Natronlauge auf 11

Tris	0,5 M
------	-------

Towbin-Transfer-Puffer

Tabelle 19: 1×Towbin-Transfer-Puffer; gelöst in *Aqua bidestillata*

(Tris = Trishydroxymethylaminomethan, Angabe in Prozent der Gesamtlösung, Chemikalien in Spalte 1, verwendete Konzentrationen in Spalte 2)

Tris	27 mM
Glycin	190 mM
Methanol	20 % (V/V)

Trenngelpuffer

Tabelle 20: Trenngelpuffer; gelöst in *Aqua bidestillata*

(Tris = Trishydroxymethylaminomethan, Chemikalie in Spalte 1, verwendete Konzentration in Spalte 2) Einstellung des pH-Wertes auf 8,8

Tris	1,5 mM
------	--------

2.1.5 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 21: Darstellung der verwendeten eukaryotischen Zelllinien

(ATCC = American Type Culture Collection) Alle Zelllinien der Arbeitsgruppe wurden regelmäßig auf Mycoplasmen getestet (Mycoplasmentest per Venor®GeM von Minerva biolabs, Berlin).

Zelllinie	Ursprungsspezies	Ursprungsgewebe	Morphologie	ATCC-Nummer
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Zervix (Adenokarzinom)	Epithel	CCL-2
Vero	<i>Chlorocebus aethiops</i>	Niere	Epithel	CCL-81

2.1.6 Nährmedium und Zusätze für die Zellkulturen

Tabelle 22: Nährmedium und Zusätze für die Kultivierung von Zellen.

(FCS = Fetales Kälberserum, MEM = Minimum Essential Medium Eagle, CO₂ = Kohlendioxid) Beide Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Die Antibiotika wurden steril filtriert und bei -20°C gelagert. Angaben in Prozent der Gesamtlösung.

Medium		Bezugsquelle
MEM		Gibco®, Karlsruhe
Zusatz	verwendete Mengen	Bezugsquelle
FCS	10 % (V/V)	Invitrogen, Karlsruhe
Natrium-Pyruvat	1 mM	Gibco®, Karlsruhe
L-Glutamin	2 mM	Gibco®, Karlsruhe
Nicht-essentielle Aminosäuren	0,1 mM	Gibco®, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin Stammlösung 1000 mg/ml	10 mg/ml	Gibco®, Karlsruhe

2.1.7 Toxine

Tabelle 23: Verwendetes Toxin sowie dessen Ursprung und Herkunft

(GST = Glutathion-S-Transferase)

Toxin	Ursprung	Herkunft
C2-Toxin	<i>Clostridium botulinum</i>	Expression des rekombinanten Toxins in <i>Escherichia coli</i> und Aufreinigung über das GST-System (Barth et al. 1998; Barth et al. 2000), Aktivierung des C2II mittels Trypsin (Barth et al. 2000)

2.1.8 Verwendete Inhibitoren

Tabelle 24: Auflistung der verwendeten Inhibitoren

(DMSO = Dimethylsulfoxid)

Inhibitor	Gelöst in	Lagerung	Bezugsquelle
Bafilomycin A1	DMSO	-20 °C lichtgeschützt	Calbiochem GmbH, Bad Soden
Cyclosporin A	Ethanol	4 °C, lichtgeschützt	Fluka, München
FK 506/Tacrolimus	Ethanol	-20 °C lichtgeschützt	Sigma Aldrich, Taufkirchen

2.1.9 FK506-Bindeproteine

Es wurden die FKBP's 12, 51 und 52 verwendet. Diese wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Gunter S. Fischer des Max-Planck-Instituts für biophysikalische Chemie in Göttingen, BO Halle (Saale) zur Verfügung gestellt. Die Expression der FKBP's fand mittels pET28a (Novagen, Darmstadt) in *Escherichia coli* Rosetta-Zellen statt. Die anschließende Aufreinigung erfolgte gemäß veröffentlichter Prozeduren.

2.1.10 Antikörper und Lösung für Western- und Dot-Blot-Analysen

Tabelle 25: Auflistung der verwendeten Primärantikörper für Western-Blot-Analysen

(Hsp90 = Hitzeschockprotein 90, Rab5 = Rab(Ras-related in brain)-Protein 5, PBS-T = phosphate buffered saline with Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat))

Epitop	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Hsp90	Maus	1:1000 in PBS-T	Santa Cruz Biotech, Heidelberg
Rab5	Maus	1:500 in PBS-T	Santa Cruz Biotech, Heidelberg

Tabelle 26: Verwendeter Sekundärantikörper für Western-Blot-Analysen

(PBS-T = phosphate buffered saline with Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat))

Zielspezies	Herkunftsspezies	Verdünnung	Hersteller
Maus	Ziege	1:2500 in PBS-T	Santa Cruz Biotech, Heidelberg

Tabelle 27: Lösung für Western- und Dot-Blot-Analysen

(POD = Peroxidase, PBS-T = phosphate buffered saline with Tween 20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat))

Lösung	Verdünnung bzw. Konzentration	Hersteller
Streptavidin-POD	1:2000 in PBS-T	Roche, Mannheim

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Vero- sowie HeLa-Zellen sind adhärent wachsende Zellen, die im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert wurden. Jeden zweiten bis dritten Tag wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen einmalig mit 37 °C warmen 1× phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von 2 ml 0,25 % Trypsin-EDTA-Lösung von der 10 cm Zellkulturschale gelöst. Dazu fand eine zweiminütige Inkubation der Zellen mit der Lösung im Brutschrank statt. Die Reaktion wurde mit 8 ml serumhaltigen Medium gestoppt, die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und vorsichtig durchmischt. Zur weiteren Kultivierung wurde die Zellsuspension in der Regel in einem Verhältnis von 1:5 zu frischem serumhaltigen Medium in eine neue Zellkulturschale überführt (Gesamtvolumen 10 ml) und im Brutschrank gelagert. Zum Aussäen der Zellen für Experimente wurde zunächst die Gesamtzellzahl der Zellsuspension mittels einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Anschließend konnte die gewünschte Zellzahl bzw. das entsprechende Volumen der Zellsuspension in die 12-Loch Zellkulturplatten gegeben werden.

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die maximale Passagierzahl der Zellen lag bei 25.

2.2.2 Zytotoxizitätsexperimente

Mit Hilfe der Zytotoxizitätsexperimente sollte festgestellt werden, ob der Inhibitor FK506 bzw. die Kombination der Inhibitoren FK506 + CsA einen Einfluss auf die Vergiftung von Vero- bzw. HeLa-Zellen mit C2-Toxin hat. Die Methodik wurde bereits vielfach in der Arbeitsgruppe Barth für beide Zelllinien beschrieben und angewendet (Barth et al. 2000; Barth et al. 2002). Für diese Versuche sollten sowohl die mit HeLa- als auch die mit Vero-Zellen ausgesäten Zellkulturplatten eine ca. 70 %-ige Konfluenz aufweisen. Hierzu wurde mittels einer Neubauer Zählkammer eine definierte Menge von Zellen bestimmt und in einer 12-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Diese wurden in der Regel für drei Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in serumhaltigem

Medium kultiviert. Am Versuchstag wurde dann das FCS-haltige Medium abgenommen und durch serumfreies MEM (1 ml/well) ersetzt. Anschließend fand eine dreißigminütige Vorinkubation der Inhibitoren bei 37 °C und 5 % CO₂ statt. Dazu wurden 10 µM CsA und 20 µM FK506 eingesetzt. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Inhibitoren wurde der Versuchsansatz zusätzlich in Aluminiumfolie gehüllt. Im Anschluss daran wurde das Toxin in einer Konzentration von 50 ng/ml C2I und 100 ng/ml C2IIa zugegeben. Nun wurde in definierten Zeitabständen die Morphologie der Zellen beobachtet und photographisch festgehalten. Hierzu wurden jeweils drei repräsentative Bildabschnitte pro well dokumentiert. Anhand dieser erfolgte die quantitative Auswertung durch die Bestimmung des Anteils abgerundeter Zellen an der Gesamtzellzahl im Zeitverlauf. Da die Dokumentationszeiten sowie etwaige Versuchsansätze variieren, werden sie direkt zum dazugehörigen Resultat im Ergebnisteil dieser Arbeit angegeben.

Zusätzlich fand in einigen Versuchsansätzen eine Kontrolle des Inhibitorlösungsmittels Ethanol statt. Dazu wurde zeitgleich mit den Inhibitoren das entsprechende Volumen Ethanol auf die jeweiligen Zellen gegeben und ebenfalls für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ vorinkubiert. Das weitere Vorgehen entsprach dem Versuchsablauf wie oben beschrieben (Ergebnisse nicht dargestellt).

2.2.3 Herstellung von Zelllysaten durch mechanischen Aufschluss

Zur Herstellung von Zelllysaten wurde das Medium von 10 cm Zellkulturschalen dicht gewachsener Vero-Zellen abgenommen. Danach fand eine einmalige Waschung mit PBS statt, welches im Anschluss gründlich abgesaugt wurde. Nun wurden die Zellen in je 200 µl ADP-Ribosylierungspuffer pro Schale mittels eines Zellschabers abgeschabt und mit der Pipette in ein Eppendorfgefäß überführt. Während aller weiteren Vorgänge wurde die Zellsuspension auf Eis gehalten um die Aktivität von Proteasen zu unterbinden. Mit einer Spritze (BD Plastipak®, 1 ml) und einer Kanüle (Sterican®, 26 G×1", Gr. 18 = 0,45×25 mm) wurde die Zellsuspension mindestens 10× aufgezogen und somit mittels Scherkräfte ein mechanischer Aufschluss der Zellen erreicht. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 4 °C und 20.817 rcf abzentrifugiert. Der gewonnene Überstand entsprach dem Zelllysaten. Dieser wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und für die weiteren Schritte verwendet. Das Pellet, bestehend aus zerstörten Zellmembranbestandteilen, wurde verworfen.

2.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Diese Methode wurde angewandt um die Proteinkonzentration in den Zelllysaten zu bestimmen. Die Grundlage dieser Konzentrationsbestimmung bildet die Wechselwirkung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 mit basischen Aminosäuren. Lagert sich der Farbstoff innerhalb eines Proteins an diese Aminosäuren an, verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm (ohne Protein) auf 595 nm (mit Protein). Je größer dabei die Proteinmenge ist, desto deutlicher ist der Farbumschlag. Dies ist photometrisch messbar. Die Proteinkonzentration kann dann anhand der ermittelten Werte sowie einer erstellten Eichgerade aus bovinem Serumalbumin (BSA) errechnet werden. Für die Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 2,5 µl bzw. 10 µl der Probe, für den Leerlauf jeweils die entsprechende Menge ADP-Ribosylierungspuffer, mit 797,5 µl bzw. 790 µl *Aqua bidestillata (Aqua bidest.)* und 200 µl Bradford-Reagenz versetzt (Gesamtvolumen 1 ml) und für 2 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dabei wurde stets eine Doppelbestimmung jeder Probe durchgeführt und der Mittelwert errechnet. Die Messwerte lagen im linearen Bereich der Eichkurve.

2.2.5 ADP-Ribosylierung von Aktin *in vitro*

Die Methode diente der Überprüfung, ob der Inhibitor FK506 bzw. die Kombination der Inhibitoren FK506 + CsA einen Einfluss auf die Aktivität der ADP-RT des C2I *in vitro* haben. Die Methodik wurde wie bereits von Kaiser (Kaiser et al. 2009) beschrieben durchgeführt. Hierzu wurde, wie in Abschnitt 2.2.3 erläutert, Zelllysate hergestellt und dessen Proteinkonzentration, wie in Abschnitt 2.2.4 näher erläutert, bestimmt. Für den Versuch an sich wurden insgesamt drei verschiedene Ansätze angelegt (siehe Tabelle 28), wobei jeder Ansatz pro Zeitwert aus drei Proben bestand. Das Proteingemisch aus dem Zelllysate fungiert dabei als Aktinquelle.

Tabelle 28: Auflistung der drei verschiedenen Ansatz-Sets für die ADP-Ribosylierung von Aktin *in vitro*

(ADP = Adenosindiphosphat, CsA = Cyclosporin A, FK506 = Tacrolimus, V = Volumen) Auffüllung der Ansätze bzw. entsprechende Verdünnungen der Einzelkomponenten wurden mit ADP-Ribosylierungspuffer + Complete® hergestellt

	Lysat	FK506	CsA	Ethanol
Ansatz-Set 1	40 µg	20 µM	10 µM	-
Ansatz-Set 2	40 µg	20 µM	-	entsprechend dem V von 10 µM CsA
Ansatz-Set 3	40 µg	-	-	Entsprechend dem V von 10 µM CsA und 20 µM FK506

Die Ansätze wurden kurz abzentrifugiert und für 30 min bei 37 °C und 0,15093 rcf im Thermomixer inkubiert. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Inhibitoren wurde der Thermomixer mit Aluminiumfolie verhängt. Anschließend wurden die Ansätze mit 10 µM biotinmarkiertem NAD⁺ und ADP-Ribosylierungspuffer + Complete® versetzt. Dies wurde erneut kurz abzentrifugiert. Nach der Zugabe von 1 ng/ml C2I wurden die Proben für 5 min und 15 min bei 37 °C und 0,15093 rcf inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 × SDS-Probenpuffer und Kochen der Proben bei 95 C für 5 min gestoppt. Im Anschluss daran wurden die Proben einer Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, siehe Abschnitt 2.2.6) und einer Western-Blot-Analyse (siehe Abschnitt 2.2.8) unterzogen. Das Aktin, welches durch das Toxin mit Biotin-ADP-Ribose modifiziert wurde, konnte dann direkt durch Streptavidin-Peroxidase (Strep-POD) und die Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Reaktion nachgewiesen werden.

2.2.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Analyse von Proteinen. Diese werden hierbei nach ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld aufgetrennt. Methodik beschrieben von Laemmli (Laemmli 1970).

Zur Probenvorbereitung wurden die Proteinansätze zunächst mit 5×SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C gekocht. Dies ermöglicht das Aufbrechen von Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrückenbindungen. Das im Ladepuffer enthaltene Dithiothreitol (DTT) führt zusätzlich zu einer Spaltung von Disulfidbrücken durch Reduktion. Das SDS als anionisches Tensid bewirkt zudem eine Überdeckung der Eigenladung der Proteine. Somit weisen alle Proteine ein konstant negatives Ladungsverhältnis auf.

Die Auftrennung der denaturierten Proben erfolgte in einer diskontinuierlichen SDS-PAGE, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel (zur Herstellung siehe 2.2.6) Dazu wurden die Proben in die Taschen des Gels geladen. Das Anlegen von elektrischer Spannung bewirkt dann eine Migration der negativ geladenen Proteine durch das Gel zur Anode. Hierbei fungiert das Gel als Sieb, sodass am Ende des Vorgangs die Proteine nach ihrer Größe sortiert sind und durch weitere Verfahren sichtbar gemacht werden können (siehe Abschnitt 2.2.7 Proteinfärbung nach Coomassie sowie 2.2.8 Western-Blot-Analyse). Die angelegte Spannung und Dauer der Elektrophorese variiert dabei je nach verwendeter Laufapparatur. Um die Proteingröße einschätzen zu können, wurde als Referenz jeweils ein Marker (Page Ruler prestained oder unstained Protein ladder®) verwendet. Während die Proteine des prestained Markers direkt sichtbar sind und für Western-Blot-Analysen Verwendung fanden, wurde der unstained Marker erst durch die Proteinfärbung nach Coomassie sichtbar und für Konzentrationsbestimmungen genutzt.

Tabelle 29: Pipettierschema für ein 12,5 %iges SDS-Polyacrylamidgel in der Größe 18×13 cm

(APS = Ammoniumperoxidsulfat, SDS = Natriumdodecylsulfat, TEMED = Tetramethylethylendiamin; Chemikalien, Lösungen und Puffer in Spalte 1, verwendete Mengen für das Trenngel in Spalte 2 und für das Sammelgel in Spalte 3) Für die Herstellung des Trenn- und Sammelgelpuffers siehe Tabelle 14: und Tabelle 20: im Abschnitt 2.1.4 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

Größe: 18×13 cm Dicke: 1,5 mm	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (6 %)
<i>Aqua bidestillata</i> [ml]	10,45	8
Trenngelpuffer [ml]	8,25	-
Sammelgelpuffer [ml]	-	3,1
SDS (10 %) [μl]	363	125
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %) [ml]	13,75	2,5
APS (10 %)[μl]	330	125
TEMED [μl]	22	12,5

2.2.7 Proteinfärbung nach Coomassie

Diese Methode dient dem unspezifischen Anfärben von Proteinen, indem sich der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert. Sie erfolgte nach der Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.6). Hierzu wurde das Gel bei Raumtemperatur für 30 min auf der Wippe mit Coomassie Brilliant Blue R250-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel für jeweils 15 min bei RT mit der Coomassie-Entfärbelösung behandelt. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt bis nur noch die Proteinbanden angefärbt, der Hintergrund allerdings annähernd farblos war. Abschließend konnte das Gel eingescannt und densitometrisch ausgewertet werden.

2.2.8 Western-Blot-Analyse

Der Western-Blot stellt eine Methode dar um die mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.2.6) nach ihrer Größe aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran zu transferieren und anschließend durch verschiedene Reaktionen nachzuweisen.

Hierbei wird zunächst ein senkrecht zum Polyacrylamid-Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Die Proteine wandern dann auf die Anode zu. Mit Ausnahme des Biotinylierungsnachweises (Semi-Dry-Blot-Verfahren) wurde dafür eine mit Towbin-Puffer gefüllte Wet-Blot-Apparatur verwendet. Der Transfer erfolgte bei 4 °C, 400 mA und einen Zeitraum von 2,5 h, für den Semi-Dry-Blot bei RT, 1 mA/cm² und 1 h. Im Anschluss daran wurde die Membran für 10 min bei RT auf der Wippe mit einer Ponceau-S-Lösung gefärbt, um den Erfolg des Transfers zu überprüfen. Der rote Ponceau S-Farbstoff bindet dabei reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen und führt somit zu einer unspezifischen Färbung. Das anschließende Entfärben mit Wasser wurde bis zur deutlichen Sichtbarkeit der Proteinbanden durchgeführt. Dies wurde dokumentiert. Um für das weitere Procedere unspezifische Bindungsstellen zu blocken, wurde die Membran mit 5 %iger Milchpulver-PBS-T-Lösung für 30 min (2.2.5 ADP-Ribosylierung von Aktin *in vitro*) bzw. 1 h (2.2.10 Detektion von biotinyliertem C2I im Zytosol der Zielzellen) bei RT auf der Wippe inkubiert.

Für den Nachweis biotinmarkierter Proteine erfolgte anschließend eine Inkubation der Membran mit Strep-POD (1:2000 in PBS-T) für 1 h bei RT. Dabei ermöglicht die hochaffine Bindung des Streptavidins an Biotin einen direkten Nachweis. Darauffolgend wurde die Membran zweimal für jeweils 10 min mit PBS-T bei RT gewaschen. Danach erfolgte die Detektion mittels Chemolumineszenz. Die dazu benötigten Lösungen A und B waren je nach Versuch gekauft oder selbst hergestellt. Bei der Detektion wird das emittierte Licht, das durch die Oxidation des Luminols (in Lösung A enthalten) durch das Enzym Peroxidase entsteht, mit Hilfe eines Röntgenfilms nachgewiesen. Das in der Lösung B vorhandene Wasserstoffperoxid katalysiert diese Reaktion.

Für den Nachweis anderer Proteine wurde die Membran zunächst für 1 h bei RT mit einem spezifischen Erstantikörper inkubiert. Nach einem zweimaligen Waschschrift, jeweils 10 min mit PBS-T bei RT, wurde die Membran mit einem Zweitantikörper, der an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, ebenfalls für 1 h bei RT inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschriften erfolgte der Proteinnachweis mittels Chemolumineszenz, wie weiter oben im Text beschrieben. Informationen über die jeweiligen Antikörper (AK) können den Tabellen in Abschnitt 2.1.10 entnommen werden.

2.2.9 Biotinylierung der Enzymkomponente C2I

Die Biotinylierung des C2I diente dazu das Vorhandensein des Proteins, die Interaktionen oder die Menge dessen zu einem bestimmten Zeitpunkt direkt nachweisen zu können. Die Grundlage bildet hierbei das Vitamin Biotin, welches mit einer hohen Affinität an Avidin und Streptavidin und somit ebenfalls an Strep-POD bindet. Durch seine geringe Größe (244 Da) kann Biotin mit Proteinen kovalente Verbindungen eingehen, ohne deren biologische Aktivität zu verändern. Zur Biotinylierung der Enzymkomponente wurde Sulfo-*N*-Hydroxysulfosuccinimid (NHS)-Biotin verwendet, welches hocheffizient mit primären Aminogruppen reagiert. Dazu wurde das C2I zunächst im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt um eine für die Biotinylierung geeignete Konzentration des Proteins zu erhalten. Anschließend wurde die Toxinkomponente mit dem errechneten zwanzigfachen Überschuss einer 10 mM Biotinlösung für 30 min bei RT inkubiert. Die Berechnungen erfolgten dabei nach den vom Hersteller empfohlenen Angaben.

Im Anschluss daran wurde das nicht gebundene Biotin mit Hilfe von Micro Bio-Spin® Chromatographie-Säulen abgetrennt. Die Durchführung mit mehrmaligen Zentrifugationsschritten erfolgte dabei nach Vorgaben des Herstellers.

Da sich durch die Biotinylierung in der Regel die Konzentration des Proteins deutlich ändert, wurde nachfolgend eine erneute Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden die Proben sowie ein BSA-Standard mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.6) separiert und das Gel mit Coomassie angefärbt (siehe auch 2.2.7). Anhand der BSA-Kalibriergeraden konnte das Gel densitometrisch ausgewertet und somit die Proteinkonzentration errechnet werden. Zusätzlich erfolgte die Überprüfung der Biotinmarkierung durch eine SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse (siehe 2.2.8). Als Detektionslösung wurde hierzu Strep-POD eingesetzt.

2.2.10 Detektion von biotinyliertem C2I im Zytosol der Zielzellen

Mit Hilfe dieser Methode sollte der Einfluss von FK506 bzw. der Kombination von FK506 + CsA auf die Aufnahme des C2-Toxins in die Zielzellen untersucht werden. Grundlage dessen stellt der bisher bekannte Aufnahmemechanismus des Toxins dar (siehe hierzu auch 1.3 *Clostridium botulinum* C2-Toxin). Die Durchführung erfolgte

dabei gemäß der von Kaiser genutzten Methodik (Kaiser et al. 2009) beschrieben von Wiedlocha und Mitarbeitern (Wiedlocha et al. 2005; Kaiser et al. 2009).

Für den Versuch wurde eine definierte Menge an Vero-Zellen unter Zuhilfenahme einer Neubauer Zählkammer bestimmt, in einer 12-Loch Zellkulturplatte ausgesät und für drei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Versuchstag wurde dann das serumhaltige Medium durch serumfreies MEM ersetzt. Die Inkubation der Inhibitoren (Baf 100 nM, CsA 10 µM, FK506 20 µM) erfolgte analog zu den Zytotoxizitätsexperimenten lichtgeschützt für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Kontrollzellen blieben für diese Zeit unbehandelt. Darauf folgte die Inkubation der Zellen mit C2IIa (100 ng/ml) und biotinyliertem C2I (50 ng/ml) für 2 h bei den oben angegebenen Bedingungen. Anschließend wurde das Medium abgenommen und zweimal mit 1×PBS gewaschen um nicht gebundenes Toxin zu entfernen. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 25 °C mit Digitonin-Puffer (20 µg/ml in PBS) inkubiert. Digitonin ist ein Inhaltsstoff des Fingerhutsamens (*Digitalis purpurea*) und führt zu einer selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran. Durch die Variation der Inkubationszeit sowie der Konzentration des Digitonins kann die Größe der Poren und somit das Ausmaß der Membranschädigung reguliert werden. Eine weitere Inkubation der Zellen für 25 min bei 4 °C diente folglich nur der Extraktion der zytosolischen Proteine einschließlich des biotinmarkierten C2I. Endosomen oder anderen Zellorganellen sollte der Austritt aus den, durch das Digitonin entstandenen, Poren aufgrund ihrer Größe jedoch nicht möglich sein. Der Überstand der 12-Loch Zellkulturplatte entsprach demnach dem Zytosol, der darin enthaltenen Proteine und dem Digitonin-Puffer. Dieser Überstand wurde abgenommen, mit 5×SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C gekocht.

Die in der 12-Loch Zellkulturplatte enthaltenen Zellen wurden mit 1×PBS gewaschen und in je 100 µl 2,5×SDS-Probenpuffer (gelöst in *Aqua bidestillata*) pro well abgeschabt. Anschließend fand auch hier eine Erhitzung der Proben für 10 min bei 95 °C statt.

Es folgte eine SDS-PAGE (siehe 2.2.6) aller Proben einschließlich einer Positivkontrolle des biotinylierten C2I sowie eine Western-Blot-Analyse (siehe 2.2.8). Hierzu wurde die Ponceau S-gefärbte Nitrozellulosemembran zweimal geschnitten; auf Höhe der 72 kDa-Bande sowie auf Höhe der 34 kDa-Bande.

Der Membrananteil oberhalb der 72 kDa wurde als Ladekontrolle, zum Nachweis gleicher Proteinmengen, mit einem AK gegen das Hsp90 für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss an die in Abschnitt 2.2.8 genauer beschriebene zweimalige Waschung mit PBS-T für 10 min, wurde die Membran mit einem Sekundärantikörper gegen die Spezies des Primärantikörpers für ebenfalls 1 h bei RT inkubiert. Nach erneuter Waschung erfolgte dann die Detektion.

Der Membrananteil unterhalb der 34 kDa wurde mit einem AK gegen das Ras-related in brain-Protein 5 (Rab5) für 1 h bei RT inkubiert. Rab5 reguliert u.a. die Fusion Clathrin-umhüllter Vesikel und früher Endosomen bzw. die Fusion von Endosomen miteinander und ist somit überwiegend dort lokalisiert. Ein solcher Nachweis sollte somit sicherstellen, dass das Zytosol keine, die Zellproben jedoch viele Endosomen enthalten. Im Anschluss an die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde weiter wie im obigen Abschnitt beschrieben verfahren.

Mit Hilfe von Strep-POD wurde auf dem mittleren Abschnitt der Membran (zwischen 34 kDa und 72 kDa) das biotinmarkierte C2I direkt nachgewiesen (siehe hierzu auch 2.2.8).

Alle näheren Angaben über die AK bzw. die Strep-POD-Lösung finden sich im Abschnitt 2.1.10 sowie den dort aufgeführten Tabellen (Tabelle 25, 26 und 27).

2.2.11 Dot-Blot-Analyse

Mit dieser Methode ist es u.a. möglich direkte Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* zu testen. Diese Methodik wurde bereits beschrieben und zu vergleichbaren Analysen von Kaiser et al. (2011) genutzt. In dieser Arbeit wurde die Interaktion von FKBP's und C2I, der Enzymkomponente des C2-Toxins, untersucht.

Dazu wurde die Apparatur nach kurzem Einlegen der Nitrozellulosemembran in 1×PBS nach unten dargestellter Abbildung zusammengebaut (Abbildung 7). Danach wurden die rekombinant hergestellten FKBP's 12, 51 und 52 in absteigender Konzentration (maximale Anfangskonzentration 2 µg, gelöst in 1×PBS), jedoch bei gleichbleibendem Volumen von 100 µl in die Spotlöcher der Apparatur gegeben. Gleiches galt für die Positivkontrolle mit biotinmarkiertem C2I (maximale Anfangskonzentration 1 µg). Bahnen für Negativkontrollen wurden mit 100 µl 1×PBS beladen, ungenutzte Bahnen abgeklebt. Daraufhin wurde ein leichtes Vakuum

angelegt um die Proteine in die Membrane zu ziehen. Der Erfolg dieser Übertragung wurde durch eine Ponceau S-Färbung (siehe auch 2.2.8) überprüft. Im Anschluss daran wurde, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, die Membran mit 5 %iger Milchpulver-PBS-T-Lösung für 1 h bei RT auf der Wippe inkubiert. Daraufhin wurde die Membran zweigeteilt.

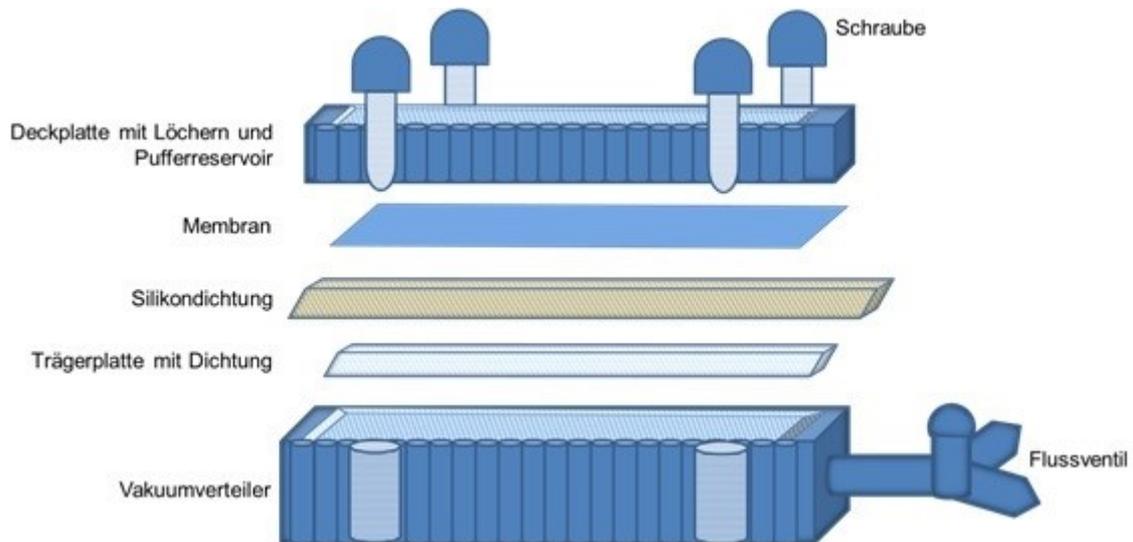


Abbildung 7: Schematischer Aufbau der Dot-Blot-Apparatur

Nach korrekter Montage, Fixierung der Apparatur mittels der vier Schrauben. Anlage eines Vakuums über das Flussventil. Über den Vakuumverteiler gleichmäßiges Ansaugen und Fixieren der zuvor in das Pufferreservoir der Deckplatte aufgetragenen Proteine auf der Nitrozellulosemembran. Graphik in Anlehnung an Bio-Dot® Apparatus Assembly

Bei der einen Hälfte wurde eine mögliche Bindung des biotinmarkierten C2I an die FKBP's bzw. als Negativkontrolle an die Nitrozellulosemembran untersucht. Dazu erfolgte eine Inkubation mit biotinmarkiertem C2I (200 ng/ml, gelöst in PBS-T) für 1 h bei RT. Im Anschluss daran wurde die Membran dreimalig mit PBS-T für 5 min gewaschen und folgend mit Strep-POD für 1 h bei RT inkubiert. Daraufhin fand eine viermalige Waschung der Membran mit PBS-T für je 5 min statt. Die Detektion erfolgte dann gemeinsam mit dem anderen Teilstück der Membran mittels selbsthergestellter Chemolumineszenz-Lösung.

Mit der anderen Hälfte der Membran sollte eine mögliche direkte Interaktion der Strep-POD-Lösung mit den FKBP ausgeschlossen werden. Gleichzeitig sollte aber auch die direkte Bindung der Strep-POD-Lösung an das bioninylierte C2I als

Positivkontrolle sichtbar werden. Hierzu erfolgte die Inkubation mit Strep-POD für 1 h bei RT direkt nach der Blockierung durch die Milchpulver-Lösung. Darauf folgte gleichsam dem anderen Teilstück eine viermalige Waschung der Membran mit PBS-T für je 5 min und die gemeinsame Detektion. Die gemeinsame Detektion ist hierbei zum Vergleich der Signalintensität von hoher Relevanz.

Die Nutzung von biotinyliertem C2I für die Versuche ermöglicht einen direkten Nachweis mittels Strep-POD. Dabei geht das Biotin kovalente Verbindungen mit dem C2I ein ohne dessen biologische Aktivität zu verändern.

2.2.12 Strippen von Nitrozellulosemembranen

Mit Hilfe dieser Methode können Nitrozellulosemembranen, die zuvor bereits mit AKs inkubiert waren, für eine andere AK-Inkubation zugänglich gemacht werden. Hierzu wurde die Membran einmalig mit PBS-T gewaschen um die noch vorhandene Chemolumineszenz-Lösung abzuspielen. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation mit Strip-Puffer A für 5 min bei RT. Die Membran wurde dann 10× mit H₂O gewaschen bevor sie mit Strip-Puffer B für weitere 10 min inkubiert wurde. Abschließend fand eine erneute Waschung der Membran mit H₂O statt. Die Membran konnte dann der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Magermilchpulver-Lösung und einem neuen AK zugeführt werden.

2.2.13 Statistik

Alle Versuche wurden unabhängig voneinander mindestens zweimal durchgeführt. Die Graphiken und Diagramme im Ergebnisteil dieser Arbeit stellen repräsentative Resultate für die durchgeführten Experimente dar. In den dargestellten Western-Blot-Analysen wurden die Proteinbanden auf der gleichen Membran nachgewiesen und nur zu Darstellungszwecken digital ausgeschnitten und rekombiniert. Für die Densitometrie wurde Adobe® Photoshop 7.0 Software (Adobe Systems, Incorporated) verwendet. Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphiken erfolgte mit Hilfe der Prism®4 Software (GraphPad Software, Incorporated). Die im Diagramm dargestellten Werte sind als Mittelwerte ± Standardabweichung ($n=3$) angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Beteiligung der FKBP's an dem Aufnahme- und Wirkmechanismus des binären C2-Toxins

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die zelleigenen FKBP's an der Vergiftung von Säugetierzellen mit C2-Toxin beteiligt sind. Hierzu wurde der zellgängige, spezifische pharmakologische Inhibitor der FKBP's, FK506, eingesetzt.

3.1.1 Zytotoxizitätsexperimente

Das Ziel der Zytotoxizitätsexperimente war herauszufinden, ob die spezifische Inhibition der FKBP's einen Effekt auf die toxinbedingte Abrundung der Zellen hat.

Hierzu wurden zunächst HeLa-Zellen in einer 12-Loch-Zellkulturplatte (wie in 2.2.2 beschrieben) kultiviert. Nach dem Wechsel des serumhaltigen Mediums gegen ein serumfreies Medium, folgte die Zugabe des Inhibitors FK506 in den jeweiligen Ansätzen. In Vorversuchen erwies sich dabei eine Konzentration von 20 μM als sinnvoll. Die Ansätze wurden daraufhin lichtgeschützt bei 37 °C und 5 % CO_2 für 30 min inkubiert bevor das C2-Toxin (C2I 50 ng/ml; C2IIa 100 ng/ml) zugegeben wurde.

Um die fortschreitende Abrundung der Zellen als Zeichen der Intoxikation beurteilen zu können, erfolgte in definierten Zeitabständen eine photographische Dokumentation der Ansätze (Abbildung 8). Zur quantitativen Analyse wurden pro well und Zeiteinheit jeweils drei repräsentative Bilder aufgenommen und anhand derer der Anteil abgerundeter Zellen an der jeweiligen Gesamtzellzahl bestimmt. Hierbei wurde zur Untersuchung des Inhibitoreffektes auf die Intoxikation ein Ansatz nur mit Toxin behandelt, ein weiterer mit Toxin und Inhibitor. Zum Ausschluss etwaiger Effekte des FK506 auf die Zellen selbst, gab es einen Ansatz nur mit Inhibitor ohne Toxin. Ebenso wurde zur Kontrolle ein Ansatz komplett unbehandelt belassen.

Hier ist bereits in den Bildaufnahmen ein deutlicher Unterschied der vier Ansätze in Bezug auf die Morphologie ihrer Zellen ersichtlich. Während die Mehrheit der nur mit C2-Toxin behandelten Zellen im Zeitverlauf die vergiftungsbedingte Abrundung zeigt,

erscheint der größere Anteil der Zellen im Ansatz mit Toxin und Inhibitor noch adhärent (Abbildung 8: Graphiken C2 und C2 + FK506 exemplarisch für den Zeitpunkt 6 h). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erkennt man allerdings auch in der Inhibitor-Kontrolle leichte morphologische Veränderungen in Form von zellulären Ausläufern. Das sind vermutlich Stressreaktionen der Zellen, die überwiegend durch das Ethanol, welches als Lösungsmittel des FK506 dient, bedingt sind (Abbildung 8: Graphiken Kontrolle und FK506). Mithilfe der statistischen Auswertung lassen sich die Beobachtungen aus den Abbildungen bestätigen (Abbildung 8: Säulendiagramm).

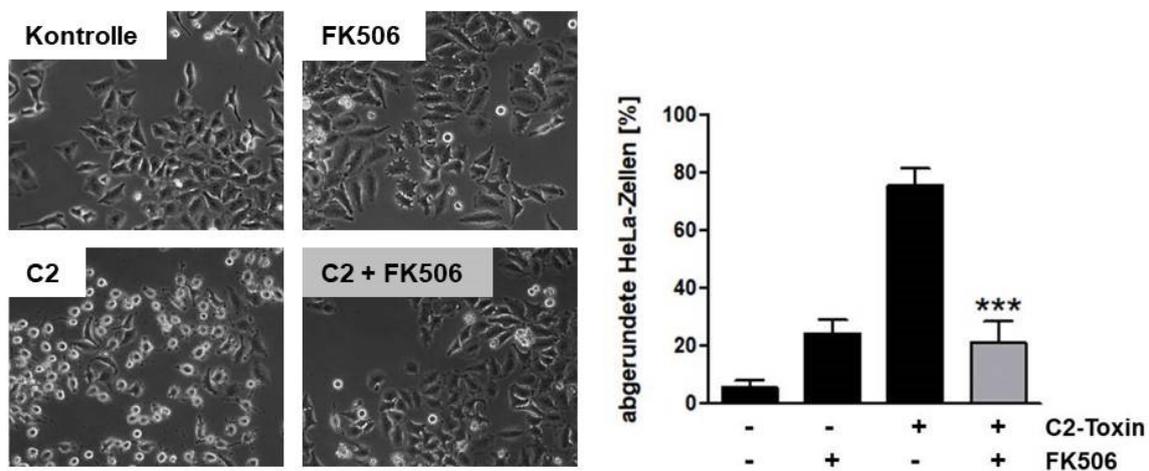


Abbildung 8: Effekte des Inhibitors FK506 auf die Vergiftung von HeLa-Zellen mit C2-Toxin

HeLa-Zellen wurden 30 min mit 20 μ M FK506 vorinkubiert oder unbehandelt belassen (Kontrolle und C2). Danach erfolgte die Zugabe von C2-Toxin (C2I 50 ng/ml; C2IIa 100 ng/ml). Die dargestellten Photographien zeigen exemplarisch die Morphologie der Zellen 6 h nach der Zugabe des Toxins. Zur quantitativen Analyse wurde der Anteil abgerundeter Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt und statistisch ausgewertet. Die graphische Darstellung ist ebenfalls exemplarisch für den Zeitpunkt +6 h gezeigt. Angaben der Werte als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$). Die Signifikanz wurde durch den Student t -Test (** $p < 0,0005$) ermittelt und bezieht sich auf den Wert des nur mit C2-Toxin behandelten Ansatzes. (C2 = C2-Toxin) Darstellungen in Anlehnung an (Kaiser et al. 2012)

Betrachtet man die Zellen im Zeitverlauf, zeigt sich eine, im Verhältnis zur C2-Intoxikation gesehene, Verminderung der Abrundung (Abbildung 9). Durch die Anwesenheit von FK506 wird somit die Abrundung von HeLa-Zellen durch C2-Toxin signifikant vermindert.

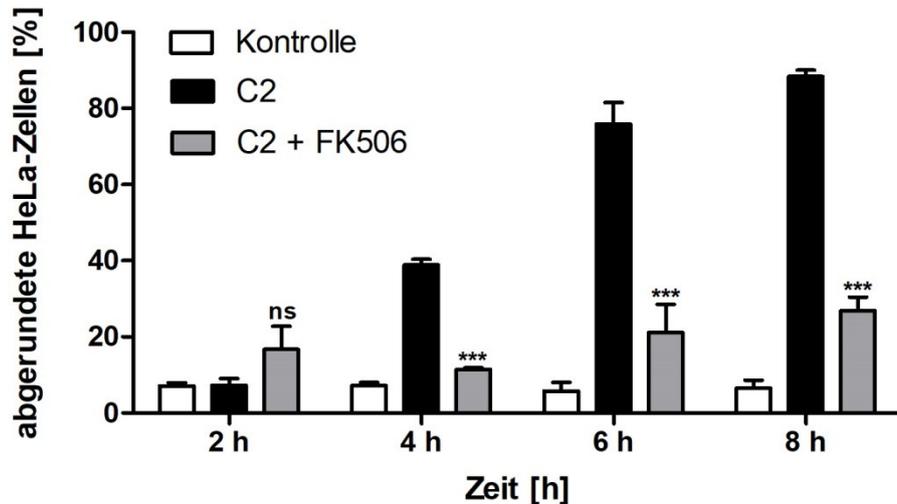


Abbildung 9: Effekte von FK506 auf die Vergiftung von HeLa-Zellen mit C2-Toxin im Zeitverlauf

Das Diagramm zeigt die quantitative Auswertung eines Vergiftungsverlaufs von HeLa-Zellen durch C2-Toxin mit und ohne FK506. Hierzu fand eine dreißigminütige Vorinkubation der Zellen mit 20 μ M FK506 statt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Toxins (C2I 50 ng/ml; C2IIa 100 ng/ml). Die Kontrollzellen wurden entsprechend unbehandelt belassen. Zur quantitativen Analyse wurde der Anteil abgerundeter Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt und statistisch ausgewertet. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$) angegeben. Die Signifikanz wurde durch den Student t -Test ($***p \leq 0,0005$) ermittelt und bezieht sich auf den Wert des nur mit C2-Toxin behandelten Ansatzes. (C2 = C2-Toxin) Darstellung in Anlehnung an (Kaiser et al. 2012)

Um zu prüfen, ob sich diese Inhibition nur bei HeLa-Zellen finden lässt oder ob ein ähnlicher Effekt auch bei anderen Säugetierzellen zu beobachten ist, wurde eine zweite Zelllinie hinsichtlich ihrer Vergiftungskinetik unter der Präsenz von FK506 untersucht. Die hierzu verwendeten Vero-Zellen sind Nierenepithelzellen der grünen Meerkatze. Diese wurden dabei wie die HeLa-Zellen zunächst in einer 12-Loch-Zellkulturplatte kultiviert und für zwei bis drei Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zu einer ca. 70 %igen Konfluenz inkubiert. Für den Versuch erfolgte der Wechsel des serumhaltigen gegen das serumfreie Medium und die Vorinkubation der jeweiligen Ansätze mit FK506 (20 μ M). Nach 30 min wurde das C2-Toxin, bestehend aus der Kombination von C2I (50 ng/ml) und C2IIa (100 ng/ml) zugegeben. Auch hier fand in definierten Zeitabständen eine photographische Dokumentation der vier bereits bekannten Ansätze statt: eine unbehandelte Kontrolle, nur mit Inhibitor behandelte Zellen, ein Ansatz mit C2-Toxin zum Vergleich der voranschreitenden Intoxikation und ein Ansatz mit C2-Toxin und FK506 (Abbildung 10: exemplarisch für den Zeitpunkt 5h).

Als Zeichen der Vergiftung zeigt sich analog zu den HeLa-Zellen auch bei den Vero-Zellen eine deutliche Abrundung der mit C2-Toxin behandelten Zellen. In der Anwesenheit von FK506 ist eine signifikante Reduktion der Menge runder, d.h. C2-Toxin-vergifteter, Zellen erkennbar (Abbildung 10: Graphiken C2 und C2 + FK506), was darauf hinweist, dass FKBP an der Wirkung des C2-Toxins beteiligt sind.

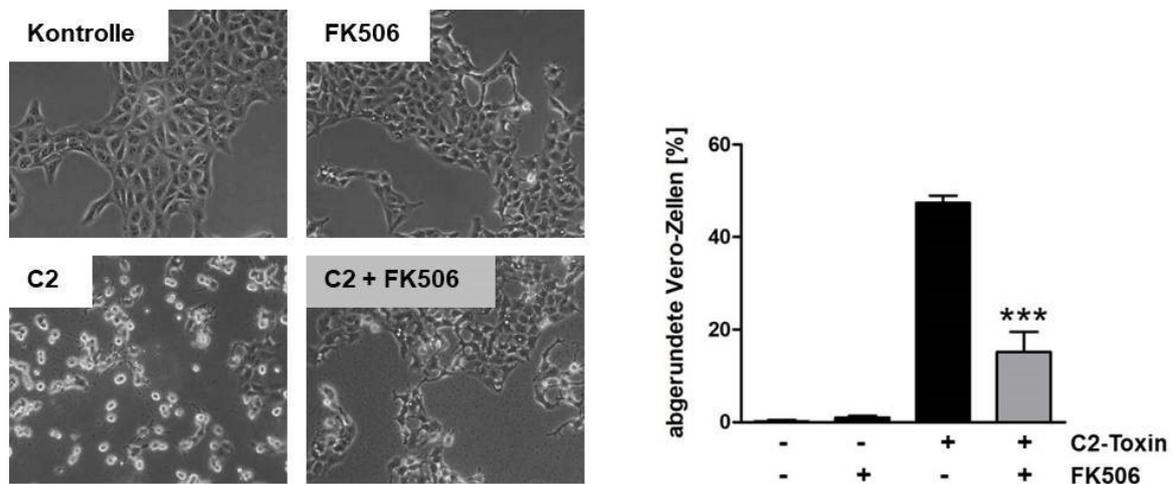


Abbildung 10: Effekte des Inhibitors FK506 auf die Vergiftung von Vero-Zellen mit C2-Toxin

Vero-Zellen wurden mit 20 μ M FK506 30 min vorinkubiert oder unbehandelt belassen (Kontrolle und C2). Danach erfolgte die Zugabe des C2-Toxins (C2I 50 ng/ml; C2IIa 100 ng/ml). Die dargestellten Photographien zeigen exemplarisch die Morphologie der Zellen 5 h nach der Zugabe des Toxins. Zur quantitativen Analyse wurde der Anteil abgerundeter Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt und statistisch ausgewertet. Die graphische Darstellung ist ebenfalls exemplarisch für den Zeitpunkt +5 h gezeigt. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$) angegeben. Die Signifikanz wurde durch den Student t -Test (** $p = 0,0003$) ermittelt und bezieht sich auf den Wert des nur mit C2-Toxin behandelten Ansatzes. (C2 = C2-Toxin)

Im Zeitverlauf lässt sich in Anwesenheit von FK506 auch bei Vero-Zellen ein späterer Beginn der Abrundung als auch ein langsames Fortschreiten der Vergiftung erkennen (Abbildung 11: C2 und C2 + FK506). Folglich inhibiert FK506 bei Vero-Zellen die vergiftungsbedingte Abrundung durch C2-Toxin. Der FKBP-Inhibitor FK506 hemmt demzufolge sowohl bei HeLa- als auch Vero-Zellen die Abrundung durch C2-Toxin.

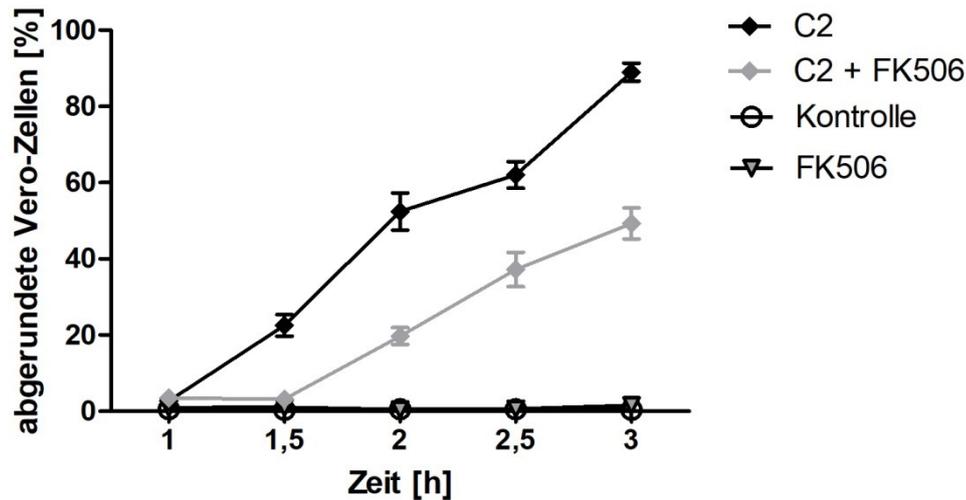


Abbildung 11: Effekte von FK506 auf die Vergiftung von Vero-Zellen mit C2-Toxin im Zeitverlauf

Das Diagramm zeigt die quantitative Auswertung eines Vergiftungsverlaufs von Vero-Zellen durch C2-Toxin mit und ohne FK506. Hierzu fand eine dreißigminütige Vorinkubation der Zellen mit 20 μM FK506 statt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Toxins (C2I 50 ng/ml; C2IIa 100 ng/ml). Die Kontrollzellen wurden entsprechend unbehandelt belassen. Zur quantitativen Analyse wurde der Anteil abgerundeter Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt und statistisch ausgewertet. Angaben der Werte als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$). (C2 = C2-Toxin) Darstellung in Anlehnung an (Kaiser et al. 2012)

3.1.2 Effekte von FK506 auf die Enzymaktivität von C2I *in vitro*

Um einen Einfluss des Inhibitors auf die Enzymkomponente des C2-Toxins auszuschließen, wurde die Aktivität der Ribosyltransferase in An- und Abwesenheit von FK506 bestimmt. Grundlage dieses Versuchs bildet die ADP-Ribosylierung von Aktin, bei der die Transferase, wie in 1.2 näher erläutert, eine ADP-Ribose von NAD^+ auf monomeres G-Aktin überträgt. Setzt man nun im Überschuss biotinmarkiertes NAD^+ ein, so wird durch die ADP-RT Biotin-ADP-Ribose als Cosubstrat verwendet und kovalent an G-Aktin gebunden. Das modifizierte G-Aktin spiegelt dann direkt die enzymatische Aktivität der Transferase und somit des C2I wider.

Für diese *In-vitro*-ADP-Ribosylierung (siehe hierzu auch 2.2.5) diente das Protein aus Vero-Zelllysat als Aktin- und somit Substratquelle. 40 μg jenes Proteins wurden analog zu den Zytotoxizitätsversuchen mit 20 μM FK506 bzw. mit dem entsprechenden Volumen Ethanol versetzt und für 30 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ lichtgeschützt inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des biotinmarkierten NAD^+ (10 μM) sowie der Enzymkomponente des C2-Toxins, C2I (1 ng/ml). Das durch C2I modifizierte Aktin konnte dann über die biotinmarkierte ADP-Ribose mittels

Streptavidin-Peroxidase spezifisch nachgewiesen werden (siehe hierzu auch Western-Blot-Analyse 2.2.8). Die Intensität der Banden, die der Menge des modifizierten Aktins entspricht und somit die Enzymaktivität widerspiegelt, wurde densitometrisch ausgewertet und ist in Abbildung 12 graphisch dargestellt.

Hier zeigt sich bei beiden Zeitwerten eine vergleichbare Intensität zwischen der mit und der ohne FK506 behandelten Ansätze. FK506 hat somit keinen Effekt auf die enzymatische Aktivität der Aktin-ADP-RT von C2I *in vitro*.

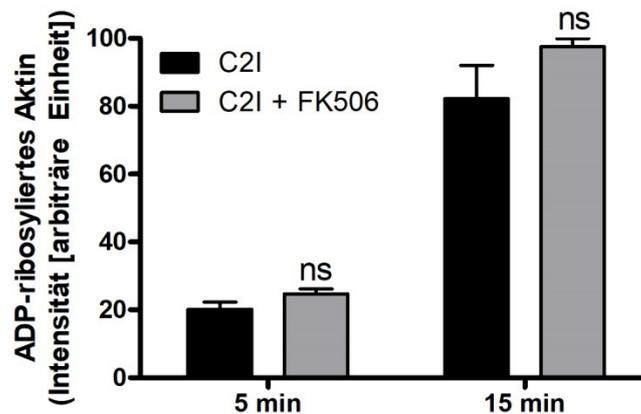


Abbildung 12: FK506 hat keinen Effekt auf die Enzymaktivität von C2I *in vitro*

40 µg Protein aus Vero-Zelllysate wurde für 30 min bei 37 °C mit FK506 (20 µM) bzw. dem entsprechenden Volumen Ethanol inkubiert. Anschließend wurde biotinmarkiertes NAD⁺ (10 µM) und C2I (1 ng/ml) zugegeben. Die Ansätze wurden für 5 min und 15 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE und die Western-Blot-Analyse. Das ADP-ribosylierte Aktin wurde mit Streptavidin-Peroxidase detektiert. Die Intensität des biotinmarkierten Aktins wurde mittels Densitometrie bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung ($n = 3$) angegeben. Die Signifikanz wurde für jeden der beiden Zeitpunkte durch den Student *t*-Test ermittelt und bezieht sich jeweils auf den Wert des nur mit C2I behandelten Ansatzes entsprechend des dazugehörigen Zeitpunktes (ns = nicht signifikant). (ADP = Adenosindiphosphat; C2I = Enzymkomponente des C2-Toxins; NAD⁺ = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid; SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) Darstellung in Anlehnung an (Kaiser et al. 2012)

Unter der Voraussetzung, dass die Wirkung der Enzymkomponente nicht beeinflusst wird, sollte die Inhibition der FKBP folglich einen Effekt auf die, durch die Bindungskomponente vermittelte, Aufnahme des C2-Toxins in die Zielzellen zeigen. Dazu wurde untersucht, ob in der Anwesenheit von FK506 weniger C2I im Zytosol von Vero-Zellen vorzufinden ist.

3.1.3 Detektion von biotinyliertem C2I im Zytosol von Vero-Zellen unter der Wirkung von FK506

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob FK506 an der Aufnahme von C2I in das Zytosol beteiligt ist, d. h. ob durch die Hemmung der FKBP's weniger Toxin das Zytosol der Zielzellen erreicht. Zum besseren Nachweis von C2I im Zytosol, wurde C2I biotinyliert, was einen direkten Nachweis mittels Strep-POD ermöglicht.

Für die Biotinylierung (siehe auch 2.2.9) wurde das C2I zunächst in einem Verhältnis von 1:1 mit PBS verdünnt um eine geeignete Konzentration des Proteins zu erhalten. Im Anschluss daran wurde die Enzymkomponente mit dem 20fachen Überschuss von Sulfo-NHS-Biotin für 30 min bei RT inkubiert. Die Berechnungen und die Durchführung erfolgten dabei jeweils nach den vom Hersteller empfohlenen Angaben. Abschließend wurde mittels Chromatographie-Säulen das überschüssige Biotin abgetrennt. Alsdann fand eine erneute Konzentrationsbestimmung des biotinylierten Proteins statt. Hierzu wurden sowohl Proben des Proteins als auch eines BSA-Standards mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.6) separiert.

Zur Bestätigung einer erfolgreichen Biotinmarkierung wurde eine SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse durchgeführt. Das Protein wurde dabei in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen und nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran mit dem ECL-System nachgewiesen. In der erwarteten Laufhöhe (50 kDa) zeigten sich einzelne Banden, die mit steigender Proteinkonzentration und somit der Biotinmenge deutlich an Signalintensität zunahm (Abbildung 13: A exemplarisch für 50 ng und 500 ng). Die Biotinylierung von C2I war somit erfolgreich.

Zusätzlich fand eine Überprüfung der gleichsamigen Vergiftungskinetik von biotinyliertem (C2I biot.) und nicht biotinyliertem C2I statt (Abbildung 13: B). Hierzu wurden Vero-Zellen für zwei bis drei Tage in einer 12-Loch-Zellkulturplatte kultiviert und am Versuchstag mit dem Inhibitor FK506 (20 μ M) vorinkubiert oder unbehandelt belassen. Nach 30 min erfolgte die Zugabe des Toxins (C2I 50 ng/ml bzw. C2I biot. 50 ng/ml; C2IIa 100 ng/ml). In definierten Zeitabständen wurde der Fortschritt der Vergiftung photographisch dokumentiert. In den beiden Toxinansätzen zeigte sich eine vergleichbare Abrundung der Zellen im Zeitverlauf (Abbildung 13: B exemplarisch für den Zeitwert 5 h). Eine Reduktion der

morphologischen Vergiftungszeichen durch FK506 zeigte sich ebenfalls auch bei der mit biotinyliertem C2I behandelten Zellen (Daten nicht gezeigt).

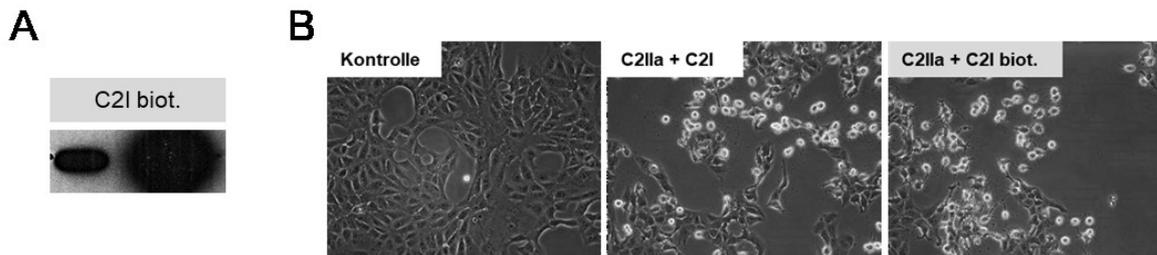


Abbildung 13: Analyse der biotinylierten Enzymkomponente C2I

A: Nachweis der Biotinmarkierung. Hierzu wurde das zuvor biotinylierte C2I in verschiedenen Konzentrationen (gezeigt für 50 ng und für 500 ng) einer SDS-PAGE unterzogen und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Mittels einer konzentrationsabhängigen Intensitätszunahme der Signale nach einer Western-Blot-Analyse mit Streptavidin-Peroxidase konnte die Biotinylierung der Enzymkomponente bestätigt werden. **B:** Überprüfung der Vergiftungskinetik des biotinylierten C2I. Vero-Zellen wurden mit der aktivierten Bindungskomponente des C2-Toxins und der biotinylierten bzw. der nicht biotinylierten Enzymkomponente inkubiert oder zur Kontrolle unbehandelt belassen. Es erfolgte eine photographische Dokumentation über die Zeit. Die dargestellten Graphiken zeigen exemplarisch die Morphologie der Zellen nach 5 h. Die mit Toxin behandelten Zellen zeugen von einer vergleichbaren Vergiftung. (C2I = Enzymkomponente des C2-Toxins; C2I biot. = biotinylierte Enzymkomponente des C2-Toxins; C2IIa = aktivierte Bindungskomponente des C2-Toxins; SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Durch den Nachweis der Biotinmarkierung des C2I-Proteins sowie der Bestätigung einer vergleichbaren Vergiftungskinetik mit biotinylierter oder nicht biotinylierter Enzymkomponente ist es nun möglich den Einfluss von FK506 auf die Aufnahme des C2-Toxins anhand des biotinylierten C2I gezielter zu untersuchen.

Dazu sollte die Menge an C2I biot. im Zytoplasma der Zielzellen unter der Wirkung von FK506 bestimmt werden (siehe auch 2.2.10). Die Grundlage jenes Versuchs bildet zum einen die derzeitige Kenntnis über den Aufnahmemechanismus des C2-Toxins zum anderen die Wirkung des Detergenz Digitonin, durch welches eine kontrollierte Permeabilisierung der Zytoplasmamembran erreicht werden konnte.

Analog zu den Zytotoxizitätsversuchen wurden auch hier Vero-Zellen in einer 12-Lochzellkulturplatte für 2-3 Tage kultiviert, bis eine ca. 70%ige Konfluenz der Zellen gegeben war. Im serumfreien Medium fand dann abermals eine dreißigminütige Vorinkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ statt. Hier wurde neben dem FK506 (20 µM), Baf (100 nM) eingesetzt. Die Kontrollzellen blieben für diesen Zeitraum

unbehandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Toxins (C2I biot. 50 ng/ml; C2IIa 100 ng/ml) und die Inkubation der Ansätze für 2 h bei 37 °C. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen um eventuell an der Zellmembran gebundenes Toxin zu entfernen. Die Zellen wurden daraufhin für 5 min bei 25 C mit Digitonin-Puffer (20 µg/ml in PBS) versetzt. Dies führt zu einer selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran. Bei einer weiteren 25-minütigen Inkubation der Zellen bei 4 °C kommt es dann zu einer Extraktion der zytosolischen Fraktion. Auch das biotinmarkierte C2I gehört, nach Aufnahme in das Wirtszellzytosol, dieser Fraktion an. Da sich durch die Variation von Inkubationszeit und Konzentration des Digitonins die Größe der Poren und somit das Ausmaß der Membranschädigung regulieren lässt, sollte es bei der hiesigen Verwendung zu keinem Austritt von Zellorganellen, insbesondere toxinbeladener Endosomen, durch die entstandenen Poren kommen.

Der Überstand der Zellen entsprach demnach der zytosolischen Fraktion. Diese, sowie die jeweiligen extrahierten Zellen, wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Western-Blot-Analyse (siehe auch 2.2.8) unterzogen.

Dabei wurde zur Immundetektion die mit Ponceau S gefärbte Nitrozellulosemembran in drei Abschnitte geteilt: Oberhalb der 72 kDa sollte mit Hilfe von Hsp90 der Nachweis vergleichbarer Proteinmengen der zytosolischen Fraktion erbracht werden. Hierzu wurde die Membran für 1 h bei RT mit einem AK gegen das Hsp90 inkubiert und für eine weitere Stunde mit einem gegen die Spezies des Primärantikörpers gerichteten Sekundärantikörper. Unterhalb der 34 kDa sollte das Markerprotein für frühe Endosomen, Rab5 (24 kDa) überprüft werden, um eine Kontamination des extrahierten Zytosols mit C2I beinhaltender früher Endosomen auszuschließen. Auch hier wurde nach einstündiger Inkubation des Primärantikörpers gegen Rab5 und erneuter Waschung ein Sekundärantikörper eingesetzt. Auf dem mittleren Abschnitt der Membran (zwischen 34 kDa und 72 kDa) konnte mit Hilfe von Strep-POD das biotinmarkierte C2I (50 kDa) direkt nachgewiesen werden. Genauere Angaben über die AKs bzw. die Strep-POD-Lösung finden sich im Abschnitt 2.1.10.

Erwartungsgemäß wurde im extrahierten Zytosol der mit Toxin behandelten Zellen biotinyliertes C2I nachgewiesen, in dem der unbehandelten Zellen jedoch nicht (Abbildung 14: C2I biot.). Wie bereits bekannt war, befindet sich weniger C2I im

Zytosol, wenn die Zellen vor der Toxinzugabe mit Baf behandelt worden waren. Nach einer Vorinkubation der Zellen mit FK506 war ebenfalls weniger C2I in der zytosolischen Fraktion nachweisbar verglichen mit den Zellen, die nur mit C2-Toxin behandelt wurden (Abbildung 14: C2I biot.).

Die Immundetektion von Hsp90 belegte innerhalb des jeweiligen Extraktes, Zytosol oder Zellen, vergleichbare Proteinmengen der Proben (Abbildung 14: Hsp90). Ein durch schwankende Beladung bedingter Nachweis geringerer Mengen von C2I konnte somit ausgeschlossen werden.

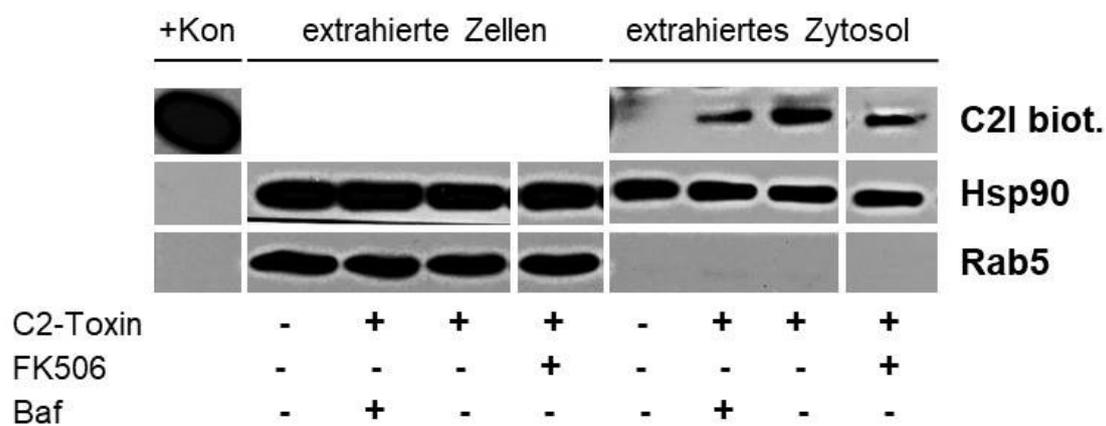


Abbildung 14: FK506 hemmt die Aufnahme von biotinyliertem C2I in das Zytosol von Vero-Zellen

Vero-Zellen wurden in serumfreiem Medium für 30 min bei 37 °C mit Bafilomycin A1 (100 nM) oder FK506 (20 µM) inkubiert oder unbehandelt belassen. Danach erfolgte die Zugabe des C2-Toxins (biotinyliertes C2I 50 ng/ml und C2IIa 100 ng/ml) und die Inkubation für 2 h. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für 5 min bei 25 °C mit Digitonin-Puffer (20 µg/ml Digitonin in PBS) inkubiert sowie für weitere 25 min auf Eis gestellt um die zytosolische Fraktion aus den Zellen zu extrahieren. Daraufhin erfolgte eine Auftrennung des extrahierten Zytosols und der jeweiligen Zellen mittels SDS-PAGE und der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Das biotinylierte C2I wurde mit Streptavidin-Peroxidase und dem ECL-System detektiert. Eine Positivkontrolle (+Kon), bestehend aus reinem C2I biot., markierte zusätzlich die Laufhöhe. Das Markerprotein früher Endosomen (Rab5) bestätigte die erfolgreiche Separation der zytosolischen Fraktion von den zurückgebliebenen extrahierten Zellen - kein Rab5-Signal in der zytosolischen Fraktion. Die Detektion von Hsp90 als Ladekontrolle bestätigte gleichmäßige Mengen von Protein innerhalb der Proben des extrahierten Zytosols. (Baf = Bafilomycin A1; C2I biot. = biotinylierte Enzymkomponente des C2-Toxins; ECL = enhanced Chemiluminescence; Hsp90 = Hitzeschockprotein 90; PBS = „phosphate buffered saline“; Rab5 = Rab (Ras-related in brain)-Protein 5; SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese; +Kon = Positivkontrolle für das biotinylierte C2I) Darstellung in Anlehnung an (Kaiser et al. 2012)

Während Rab5 in den extrahierten Zellen vorzufinden war, gab es in der zytosolischen Fraktion keinen Nachweis dieses Proteinmarkers für frühe Endosomen

(Abbildung 14: Rab5). Dies weist darauf hin, dass es zu keiner Kontamination der zytosolischen Fraktion durch C2I-beladene frühe Endosomen gekommen war.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach der Behandlung der Zellen mit FK506 weniger C2I im Zytosol C2-Toxin behandelter Zellen vorliegt. Die FKBP's scheinen folglich einen Einfluss auf den Transport von C2I in das Zytosol der Wirtszellen zu haben.

3.1.4 Analyse der Interaktion von FKBP's und C2I *in vitro*

Durch eine Dot-Blot-Analyse ist es möglich zu prüfen, ob Proteine *in vitro* direkt miteinander interagieren. In diesem Fall wurde eine Interaktion der Enzymkomponente des C2-Toxins mit den FKBP's 52, 51 und 12 untersucht.

Dazu wurden die rekombinant hergestellten FKBP 52, 51 und 12 in absteigender Konzentration auf die Nitrozellulosemembran gebロットet (Abbildung 7). Mit dem biotinmarkiertem C2I als Positivkontrolle wurde gleichermaßen verfahren. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde mittels Ponceau S-Färbung bestätigt (Abbildung 15: A und B, linke Graphiken). Zur Immundetektion wurde nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Milchpulver-Lösung die Membran zweigeteilt. Dabei wurde die eine Hälfte zunächst für 1 h mit biotinmarkiertem C2I (200 ng/ml, gelöst in PBS-T) inkubiert, um eine direkte Interaktion mit den FKBP's zu untersuchen. Die Negativkontrolle sollte eine Bindung des C2I an die Nitrozellulosemembran ausschließen. Durch eine darauffolgende Behandlung mit Strep-POD-Lösung, war es möglich eine Bindung des biotinylierten C2I an die FKBP unmittelbar zu überprüfen.

Die andere Hälfte der Membran sollte einerseits dem Ausschluss einer spontanen Interaktion von Strep-POD mit den FKBP's dienen und andererseits durch das gespottete C2I biot. als Positivkontrolle fungieren. Daher fand hier geradewegs eine Inkubation mit Strep-POD statt. Um die Signalintensitäten der Membrananteile vergleichen zu können, fand die abschließende Detektion mittels selbsthergestellter Chemolumineszenz-Lösung gemeinsam statt. Es zeigt sich ein erfolgreicher Transfer aller drei FKBP's auf die Nitrozellulosemembran (Abbildung 15: A und B, linke Graphiken).

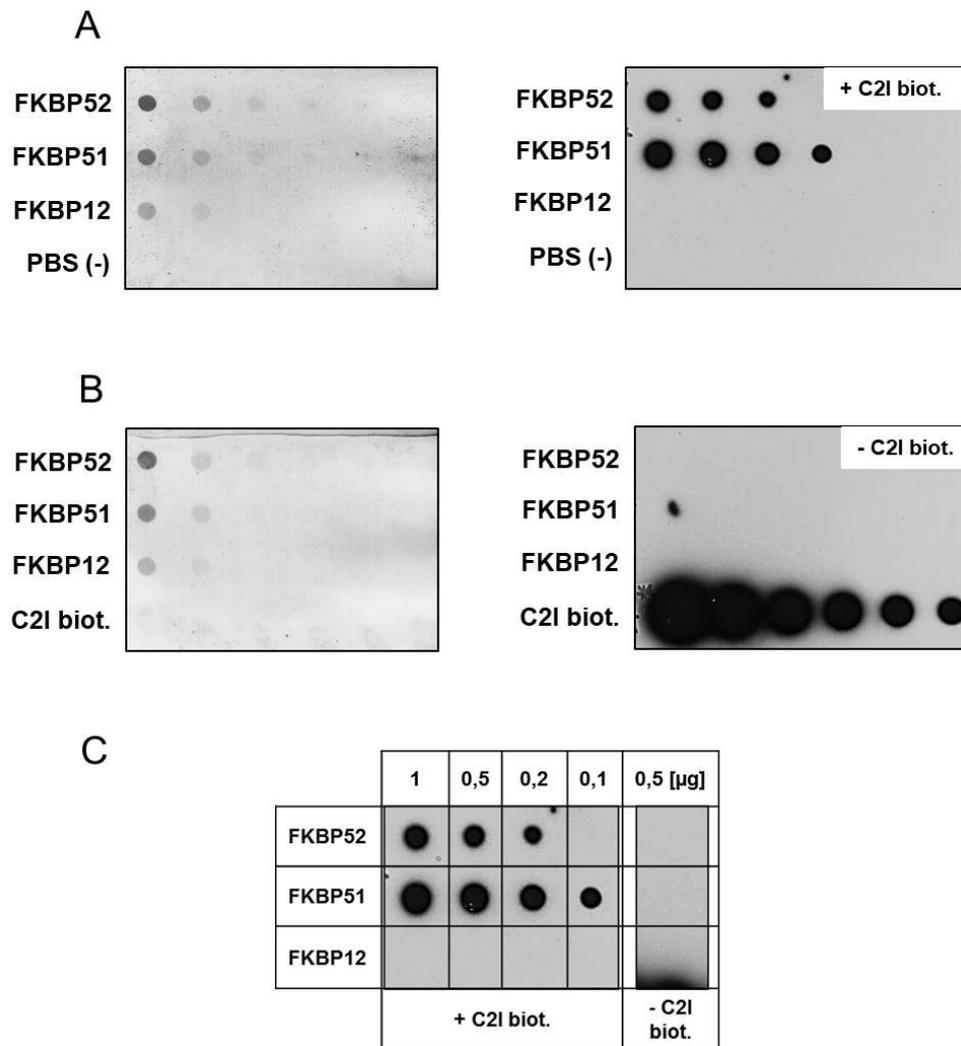


Abbildung 15: Dot-Blot-Analyse der Interaktion zwischen den FKBP 52, 51 und 12 und C2I

Die aufgereinigten FKBP 52, 51 und 12 sowie die biotinylierte Enzymkomponente des C2-Toxins wurden in absteigender Konzentration mit Hilfe einer Dot-Blot-Apparatur auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Als Kontrolle wurde PBS gespottet. Die jeweils linke Abbildung in A und B zeigt die Ponceau S-Färbung, die rechte den dazugehörigen Blot. Um die Signalstärken vergleichen zu können, fand die Immobilisierung als auch die Detektion der Membranen gemeinsam statt. **A:** Nach der Blockierung mit Milchpulver-Lösung, erfolgte die Inkubation mit C2I biot. (200 ng/ml) sowie anschließend eine Behandlung mit Streptavidin-Peroxidase-Lösung. Alle drei Proteine sind gespottet, das C2I bindet aber nur an die FKBP 52 und 51 (deutliche, konzentrationsabhängige Signale). Eine zufällige Bindung der biotinmarkierten Enzymkomponente an die Membran kann ausgeschlossen werden (Negativkontrolle mit PBS). **B:** Auf die Blockierung mittels Milchpulver folgte hier direkt die Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase-Lösung. Gut sichtbar zeigt sich eine konzentrationsabhängige Bindung des Streptavidins an das biotinmarkierte C2I (Positivkontrolle), obwohl die Proteinmengen (beginnend bei 0,125 µg) für ein Signal in der Ponceau S-Färbung anscheinend zu gering waren. Dahingegen ist die Immobilisierung der FKBP in der Ponceau S-Färbung gut zu erkennen, jedoch zeigt sich bei der Detektion kein relevantes Signal. Das Streptavidin alleine bindet folglich nicht an die Proteine. **C:** Die Graphik fasst noch einmal die Ergebnisse und Beobachtungen aus A und B zur Verdeutlichung zusammen. (C2I biot. = biotinylierte Enzymkomponente des C2-Toxins; +C2I biot. = mit C2I biot. inkubiert; -C2I biot. = nicht mit C2I biot. inkubiert; FKBP = FK506-Bindeprotein; PBS = „phosphate buffered saline“; (-) = Negativkontrolle) Darstellungen in Anlehnung an (Kaiser et al. 2012)

Das ebenfalls gespottete, biotinmarkierte C2I ist, vermutlich aufgrund der verwendeten Proteinkonzentration (maximal 0,125 µg), in der Ponceau S-Färbung nicht zu erkennen (Abbildung 15: B, linke Graphik). Die Spur der Negativkontrolle ist, wie erwartet, leer (Abbildung 15: A, linke Graphik, PBS (-)).

Nach der Detektion lässt sich eine Interaktion des C2I sowohl mit dem FKBP52 als auch mit dem FKBP51 nachweisen (konzentrationsabhängige Signale in Abbildung 15: A, rechte Graphik sowie Abbildung 15: C). Dahingegen zeigt sich keine Bindung der Enzymkomponente an das FKBP12 (ebenfalls Abbildung 15: A, rechte Graphik als auch Abbildung 15: C). Eine Verzerrung der Ergebnisse durch mögliche Bindung des biotinylierten C2I an die Membran oder des Streptavidins direkt an die Bindeproteine konnte soweit ausgeschlossen werden (Abbildung 15: A und B, rechte Graphiken).

Zusammenfassend lässt sich somit schlussfolgern, dass die FKBP52 und 51, nicht jedoch das FKBP12, *in vitro* eine direkte Interaktion mit der Enzymkomponente des C2-Toxins eingehen.

FKBP51, das in den bisher durchgeführten Versuchen die größte Bindungsaffinität zu C2I zeigte, sollte gesondert untersucht werden. Dazu wurde eine Quantifizierung der Interaktion durchgeführt. Der Versuchsaufbau blieb bis auf den Austausch der FKBP52 und 12, gegen eine Dreierprobe FKBP51 mitsamt seiner Kontrollen gleich (Abbildung 16: A, Kontrollen ohne biotinmarkiertes C2I nicht gezeigt).

Wie zu erwarten war, sind, in Abhängigkeit der Proteinkonzentration, vergleichbare Signale nachweisbar (Abbildung 16: A, rechte Graphik), was auf eine spezifische Bindung von C2I schließen lässt (Abbildung 16: B). FKBP51 zeigt folglich eine direkte Interaktion mit C2I *in vitro*.

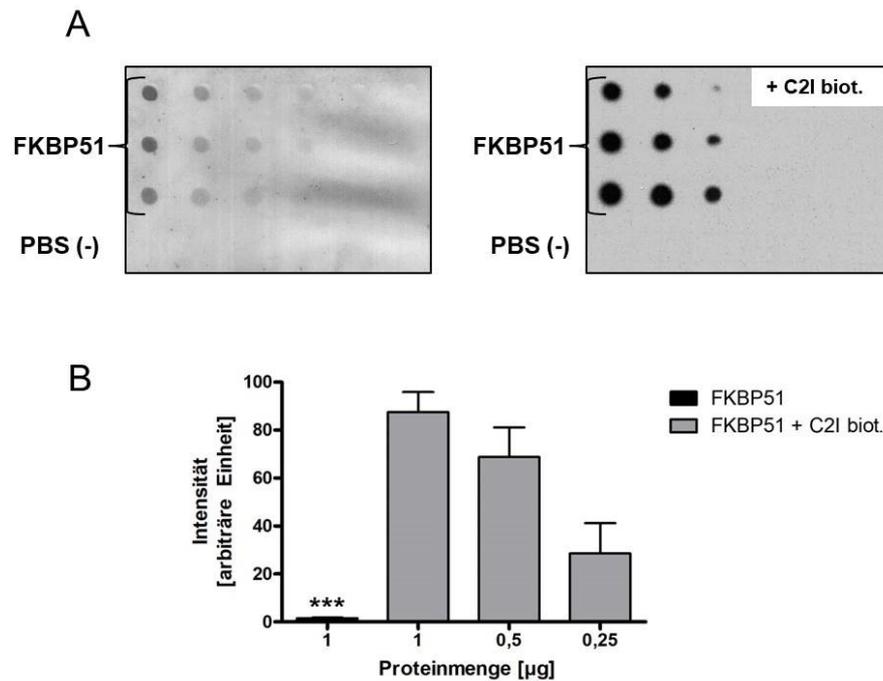


Abbildung 16: Quantifizierung der Interaktion von FKBP51 und der Enzymkomponente C2I

A: Die Ponceau S-Färbung (links) zeigt die erfolgreiche Immobilisierung des in absteigender Konzentration aufgetragenen FKBP51 auf der Nitrozellulosemembran. Diese wurde nach der Blockierung mit Milchpulver-Lösung für 1 h mit C2I biot. (200 ng/ml) sowie, nach mehrmaliger Waschung, mit Streptavidin-Peroxidase-Lösung inkubiert. Durch die Detektion mit selbsthergestellter Chemolumineszenz-Lösung, wurden deutliche, konzentrationsabhängige Signale sichtbar (rechts), die eine Bindung der Enzymkomponente an das FKBP51 implizieren. Eine mögliche Interaktion des biotinmarkierten C2I mit der Membran wurde untersucht und kann verneint werden (Negativkontrolle mit PBS). **B:** Densitometrische Auswertung der Quantifizierung. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 3$) angegeben. Die Signifikanz wurde für die Proteinmenge 1 μ g durch den Student t -Test ermittelt und bezieht sich auf den Wert FKBP51 + C2I biot. 1 μ g (** $p = 0,0005$).

(C2I biot. = biotinylierte Enzymkomponente des C2-Toxins; +C2I biot. = mit C2I biot. inkubiert; FKBP51 = FK506-Bindeprotein 51; PBS = „phosphate buffered saline“; (-) = Negativkontrolle)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Inhibition der FKBP51 die vergiftungsbedingte Abrundung sowohl von Vero- als auch von HeLa-Zellen gehemmt wird. Dieser Effekt begründet sich nicht durch eine Beeinflussung der Enzymaktivität, sondern dadurch, dass unter der Wirkung von FK506 weniger C2I im Zytosol vorzufinden ist. Zumindest *in vitro* erfolgt eine direkte Interaktion von FKBP 52 und 51 mit C2I, während C2I keine Bindung an FKBP12 zeigt.

3.2 Effekte der kombinierten Inhibition von Cyps und FKBP's auf den Aufnahme- und Wirkmechanismus des C2-Toxins

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine weitere PPIase, das CypA, am Aufnahmemechanismus des C2-Toxins beteiligt ist. Auch hier zeigte sich *in vitro* eine direkte Interaktion von CypA mit C2I. Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich daher mit der Fragestellung, inwiefern sich eine kombinierte pharmakologische Hemmung von Cyps und FKBP's auf die Vergiftung von Zellen durch C2-Toxin auswirkt. Dazu sollte zunächst die Vergiftungskinetik in An- und Abwesenheit der Inhibitoren CsA und FK506 untersucht werden.

3.2.1 Zytotoxizitätsexperimente

Analog zu den Vergiftungsversuchen mit FK506 (3.1.1) wurden auch hier zunächst HeLa-Zellen in einer 12-Loch-Zellkulturplatte kultiviert bis sie eine ca. 70%ige Konfluenz aufwiesen. Das serumhaltige Medium wurde dann durch serumfreies Medium ersetzt und die Zellen mit den Inhibitoren bei 5% CO₂ und 37° C lichtgeschützt vorinkubiert. Hierbei hatte sich eine Konzentration von 10 µM CsA als sinnvoll erwiesen. Das FK506 fand wiederum in einer Größe von 20 µM Verwendung. In der Kombination der Inhibitoren wurden entsprechend 10 µM CsA und 20 µM FK506 eingesetzt. Nach 30 min erfolgte die Zugabe der Enzymkomponente C2I (50 ng/ml) und der aktivierten Bindungskomponente C2IIa (100 ng/ml) des clostridialen C2-Toxins. Daneben gab es unbehandelte Kontrollzellen, nur mit dem jeweiligen Inhibitor oder deren Kombination behandelte Zellen sowie nur mit Toxin behandelte Zellen. Der Verlauf der Vergiftung wurde, wie bei den vorherigen Zytotoxizitätsversuchen auch, in regelmäßigen Abständen photographisch dokumentiert (zur Versuchsmethodik siehe auch 2.2.2).

Abbildung 17 stellt repräsentative Beispiele dieser Photographien als auch deren statistische Auswertung für den Zeitpunkt 4 h dar. Wie erwartet zeigt sich eine deutliche Abrundung der Zellen in dem nur mit Toxin behandelten Ansatz als Zeichen der fortgeschrittenen Intoxikation (Abbildung 17: C2). Diese wurde im Falle der mit CsA oder FK506 vorinkubierten Ansätze gehemmt. Hier sind deutlich weniger abgerundete Zellen zu erkennen (Abbildung 17: C2+CsA und C2+FK506). Auch in der Kombination zeigt sich dieses Bild (Abbildung 17:

C2+CsA+FK506). Ob sich die inhibitorischen Effekte summieren, lässt sich jedoch nicht beurteilen.

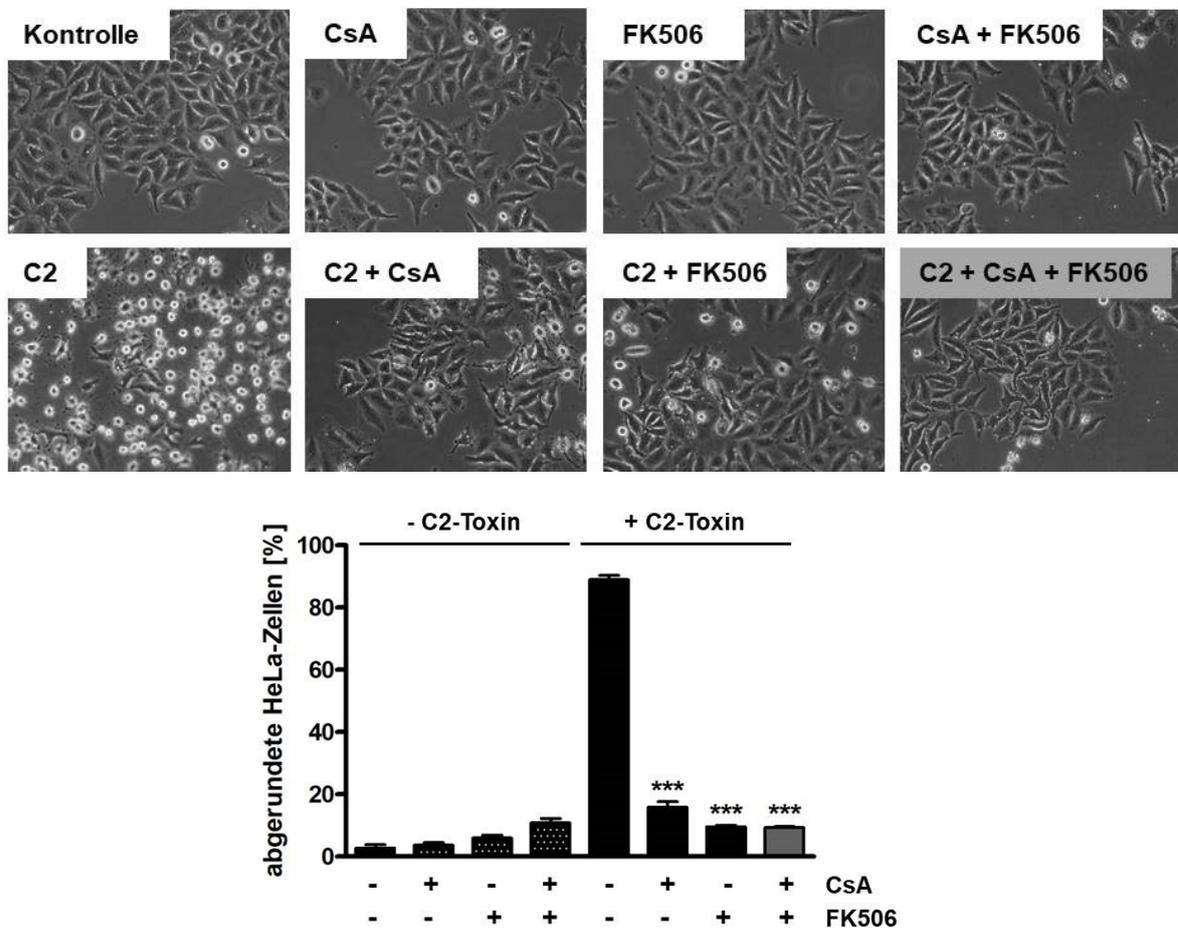


Abbildung 17: Effekte der kombinierten Inhibition auf die Vergiftung von HeLa-Zellen mit C2-Toxin

HeLa-Zellen wurden 30 min mit 10 μM CsA, 20 μM FK506 oder beiden Inhibitoren vorinkubiert. Zur Kontrolle gab es einen Ansatz unbehandelter Zellen. Danach erfolgte die Zugabe von C2-Toxin (C2I 50 ng/ml; C2IIa 100 ng/ml). Die dargestellten Photographien zeigen exemplarisch die Morphologie der Zellen 4 h nach der Zugabe des Toxins. Zur quantitativen Analyse wurde der Anteil abgerundeter Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt und statistisch ausgewertet. Die graphische Darstellung ist ebenfalls exemplarisch für den Zeitpunkt +4 h gezeigt. Angaben der Werte als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$). Die Signifikanz wurde durch den Student t -Test ($***p = 0,0001$) ermittelt und bezieht sich auf den Wert des nur mit C2-Toxin behandelten Ansatzes. (CsA = Cyclosporin A)

Die Kontrollzellen blieben weitestgehend unverändert. In den nur mit Inhibitor behandelten Ansätzen waren erneut leichte Stressreaktionen zu erkennen, die auf das Lösungsmittel Ethanol zurückzuführen sind und dementsprechend mit dessen Konzentration zunahmen.

Im Zeitverlauf der Vergiftung (Abbildung 18: Kontrollen hier nicht gezeigt) bestätigen sich die bereits erwähnten Ergebnisse. Zu erkennen ist hierbei auch, dass der Hemmeffekt der Inhibitoren mit Fortschreiten der Vergiftung deutlicher wird. Lieferten die Zytotoxizitätsversuche mit HeLa-Zellen zwar vergleichbare Resultate in Bezug auf eine Hemmung der Abrundung an sich, so war dennoch keine Aussage über die Stärke des Hemmeffektes der beiden Inhibitoren im Vergleich oder eine etwaige additive Wirkung dieser in ihrer Kombination möglich.

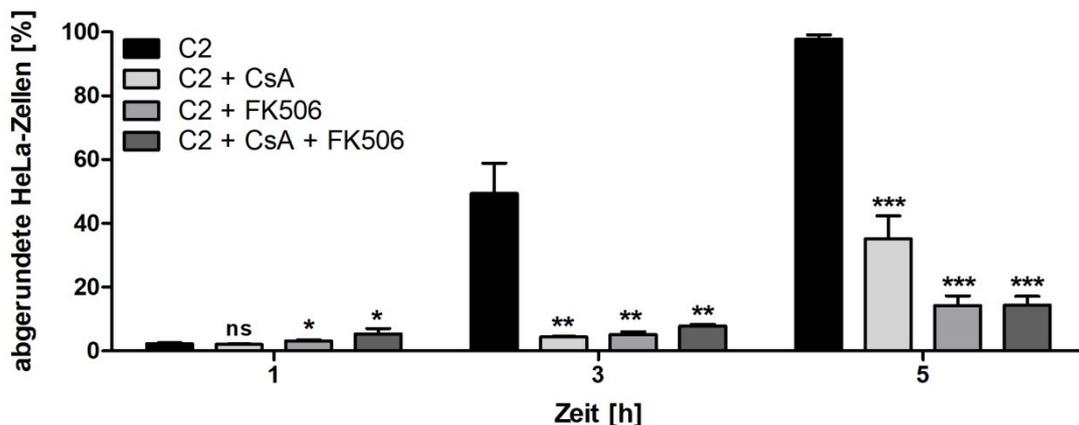


Abbildung 18: Effekte der kombinierten Inhibition auf die Vergiftung von HeLa-Zellen mit C2-Toxin im Zeitverlauf

Das Diagramm zeigt die quantitative Auswertung eines Vergiftungsverlaufs von HeLa-Zellen durch C2-Toxin mit und ohne Inhibitoren. Hierzu fand eine dreißigminütige Vorinkubation der Zellen mit 10 μ M CsA, 20 μ M FK506 oder der Kombination beider statt. Anschließend erfolgte die Zugabe des Toxins (C2I 50 ng/ml; C2IIa 100 ng/ml). Zur quantitativen Analyse wurde der Anteil abgerundeter Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt und statistisch ausgewertet. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$) angegeben. Die Signifikanz wurde durch den Student t -Test ($***p \leq 0,0001$, $**p \leq 0,0017$, $*p \leq 0,0431$) ermittelt und bezieht sich auf den Wert des nur mit C2-Toxin behandelten Ansatzes. (C2 = C2-Toxin; CsA = Cyclosporin A; ns = nicht signifikant)

Somit fanden zur weiteren Untersuchung der kombinatorischen Inhibition der Cyps und FKBP's Vergiftungsversuche mit Vero-Zellen statt. Auch hier wurden die Zellen für zwei bis drei Tage kultiviert bis sie die gewünschte Konfluenz aufwiesen. Nach dem Wechsel des Mediums fand, analog zu den Zytotoxizitätsexperimenten mit HeLa-Zellen, eine Vorinkubation der jeweiligen Ansätze mit den Inhibitoren statt. CsA wurde dabei in einer Konzentration von 10 μ M, FK506 von 20 μ M eingesetzt. Die Zugabe des C2-Toxins (C2I 50 ng/ml; C2IIa 100 ng/ml) erfolgte nach 30 min. In definierten Zeitabständen fand auch hier eine photographische Dokumentation der verschiedenen Ansätze statt, welche anschließend quantitativ ausgewertet wurde.

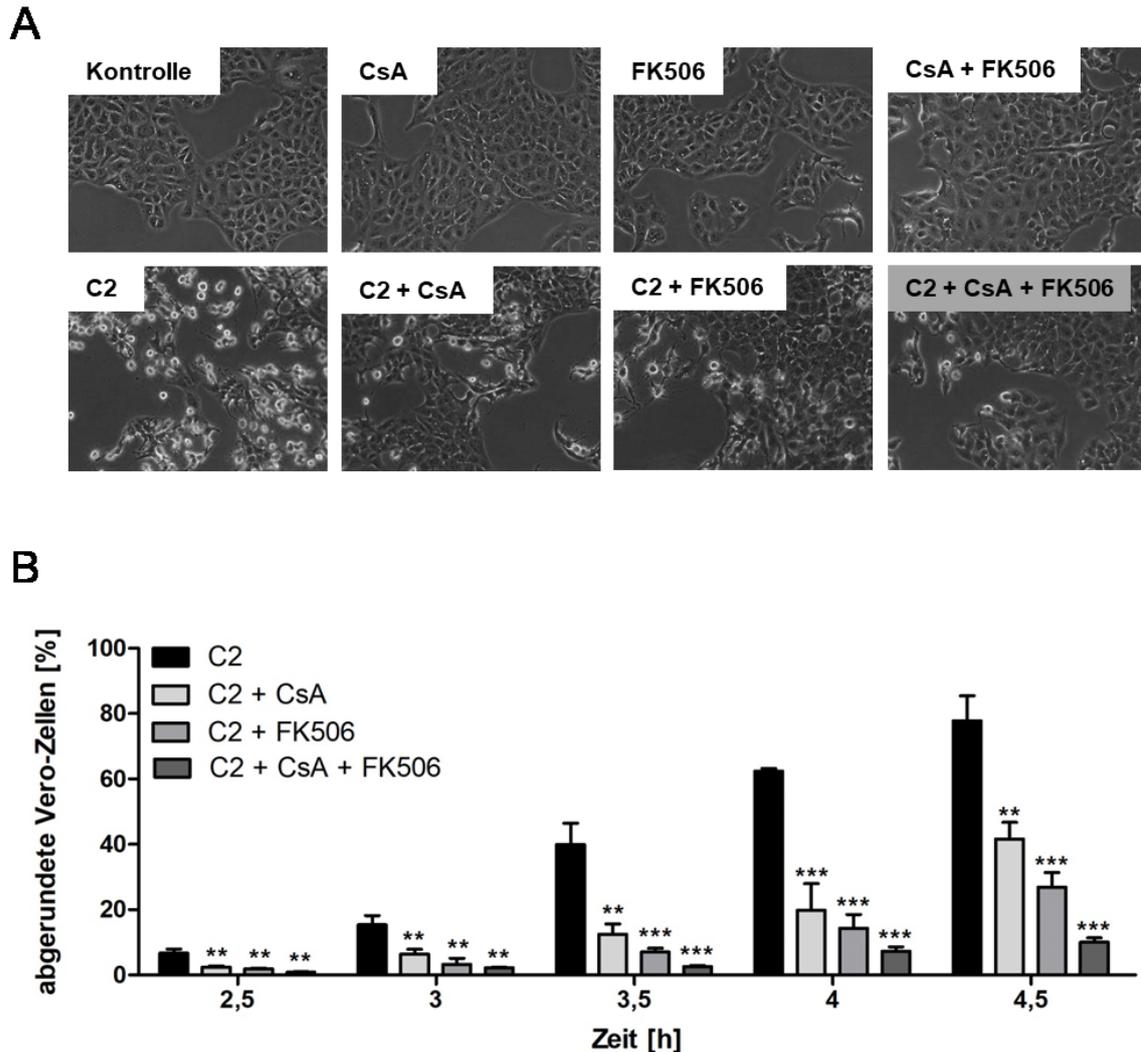


Abbildung 19: Effekte der kombinierten Inhibition auf die Vergiftung von Vero-Zellen mit C2-Toxin

Vero-Zellen wurden 30 min mit 10 μ M CsA, 20 μ M FK506 oder beiden Inhibitoren vorinkubiert. Zur Kontrolle gab es einen Ansatz unbehandelter Zellen. Danach wurde das C2-Toxin (C2I 50 ng/ml; C2IIa 100 ng/ml) hinzugefügt. **A:** Die dargestellten Photographien zeigen exemplarisch die Morphologie der Zellen 4 h nach der Zugabe des Toxins. **B:** Zur quantitativen Analyse wurde der Anteil abgerundeter Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt und statistisch ausgewertet. Die graphische Darstellung zeigt dabei den Verlauf der Vergiftung über die Zeit. Angaben der Werte als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n = 3$). Die Signifikanz wurde durch den Student t -Test ($***p \leq 0,001$, $**p \leq 0,0089$) ermittelt und bezieht sich auf den Wert des nur mit C2-Toxin behandelten Ansatzes. (C2 = C2-Toxin; CsA = Cyclosporin A) Darstellungen in Anlehnung an (Kaiser et al. 2012)

Die oben stehenden Photographien (Abbildung 19: A) zeigen repräsentativ die verschiedenen Ansätze zu dem Zeitwert +4 h. Hierbei weisen die nur mit Toxin behandelten Zellen (Abbildung 19: A C2) eine deutliche Abrundung auf. Die Ansätze, die zuvor mit einem Inhibitor bzw. der Kombination beider Inhibitoren behandelt worden waren (Abbildung 19: A C2+CsA; C2+FK506; C2+CsA+FK506), zeigen signifikant weniger abgerundete Zellen. Wie bei den HeLa-Zellen ist allerdings auch

hier noch keine Aussage über synergistische Effekte in der kombinierten Inhibition möglich. Derweil weisen die unbehandelten Kontrollzellen keine, die nur mit Inhibitor behandelten Zellen nur sehr geringe morphologische Veränderungen auf (Abbildung 19: A obere Reihe), die am ehesten auf das Ethanol zurückzuführen sind.

Die Graphik (Abbildung 19: B), die exemplarisch den Zeitverlauf der Vergiftung unter der Wirkung von CsA und FK506 wiedergibt, affirmiert die bereits gemachten Beobachtungen. In Bezug auf die Wirkstärke der PPlase-Hemmer zeigt sich hier zusätzlich ein verstärkender inhibitorischer Effekt der Kombination im Vergleich zu der Wirkung der einzelnen Substanzen. Es werden folglich durch die kombinierte Inhibition von Cyps und FKBP's weniger Zellen durch C2-Toxin vergiftet als bei der Hemmung nur einer PPlasen-Klasse.

Weder bei HeLa- noch bei Vero-Zellen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Wirkstärke der einzelnen Inhibitoren (Ergebnisse des Student *t*-Test hierzu nicht gezeigt).

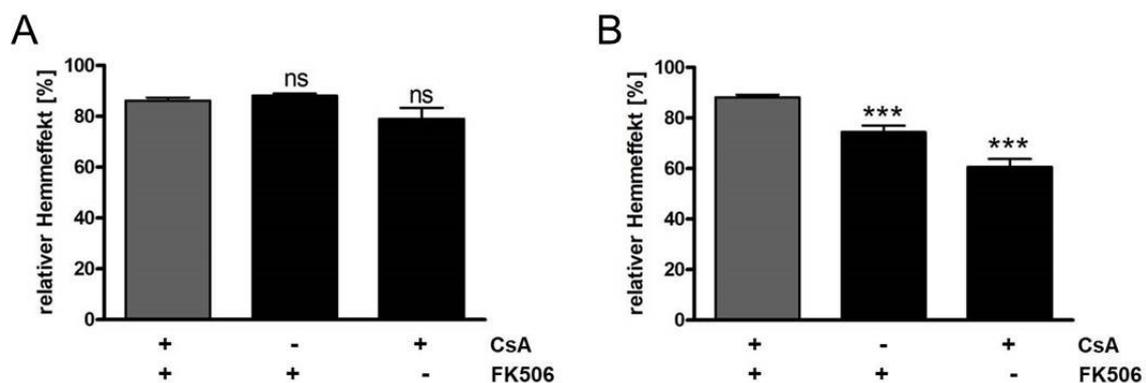


Abbildung 20: Relative Hemmeffekte der Inhibitoren Cyclosporin A und FK506 auf Vergiftungen mit C2-Toxin

Die Graphiken zeigen die quantitative Auswertung zweier Zytotoxizitätsversuche (A HeLa, B Vero). Dazu wurden die Zellen 30 min mit 10 μ M CsA, 20 μ M FK506 oder beiden Inhibitoren vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe des C2-Toxins (C2I 50 ng/ml; C2IIa 100 ng/ml) und die photographische Dokumentation der Ansätze in definierten Zeitintervallen. Zur Analyse wurde pro Zeitwert und Ansatz der Anteil abgerundeter Zellen an der Gesamtzellzahl bestimmt und der relative Hemmeffekt errechnet. Dieser gibt den prozentualen Anteil der Zellen wieder, die durch die Anwesenheit des Inhibitors bzw. der Inhibitor Kombination nicht abrundeten und steht somit im Verhältnis zu dem nur mit Toxin behandelten Ansatz. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung ($n \geq 9$) angegeben. Die Signifikanz wurde durch den Student *t*-Test ($***p < 0,0001$) ermittelt und bezieht sich auf den Wert der kombinierten Inhibition. (CsA = Cyclosporin A; ns = nicht signifikant)

Abbildung 20 veranschaulicht dieses Ergebnis, indem es den prozentualen Anteil der Zellen angibt, welche durch den Inhibitor bzw. deren Kombination vor der Vergiftung durch C2-Toxin geschützt wurden. Während sich bei HeLa-Zellen (Abbildung 20: A) keine Zunahme des Hemmeffektes in der gleichzeitigen Anwesenheit von CsA und FK506 verglichen mit den Einzelkomponenten abzeichnet, zeigt sich bei Vero-Zellen (Abbildung 20: B) diesbezüglich ein verstärkter Effekt in der Kombination.

3.2.2 Effekte der Kombination von CsA und FK506 auf die Enzymaktivität von C2I *in vitro*

Wie im ersten Teil der Ergebnisse bereits ausführlich beschrieben, besteht grundsätzlich die Möglichkeit, dass die inhibitorische Wirkung der PPIase-Hemmer auf die Vergiftung der Zellen durch C2-Toxin von einer Hemmung der Enzymaktivität von C2I herrührt. Für die einzelnen Inhibitoren getrennt betrachtet, konnte dies bereits negiert werden. Dennoch sollte mit Hilfe dieses Versuchs die Aktivität der ADP-RT in An- und Abwesenheit der Inhibitoren bestimmt werden, um auch hier einen Effekt ausschließen zu können.

Als Aktin- und somit Substratquelle für diesen Versuch dienten 40 µg Protein aus Vero-Lysat (Herstellung von Zelllysaten 2.2.3). Analog zu den Zytotoxizitätsversuchen fand eine 30-minütige Vorinkubation mit den Inhibitoren CsA (10 µM) bzw. FK506 (20 µM) statt. Der Kontrollansatz wurde zeitgleich mit dem entsprechenden Volumen Ethanol behandelt. Im Anschluss wurden die Proben mit dem biotinmarkierten NAD⁺ (10 µM) versetzt. Nach der Zugabe der Enzymkomponente C2I (1 ng/ml) wurden die Proben für 5 min bzw. 15 min bei 37 °C inkubiert, bevor die Reaktion durch 5 x SDS-Probenpuffer und Kochen der Ansätze gestoppt wurde. In der Western Blot-Analyse entspricht die Intensität der Banden der Menge des durch C2I modifizierten Aktins und dient somit der Erfassung der Enzymaktivität von C2I. Abbildung 21 zeigt die graphische Darstellung dieses Versuchs nach densitometrischer Auswertung.

Sowohl bei 5 min als auch bei 15 min imponiert eine vergleichbare Intensität zwischen der Kontrolle und der mit den Inhibitoren behandelten Ansätze. Die Kombination von CsA und FK506 hat folglich *in vitro* keinen Effekt auf die Enzymaktivität von C2I.

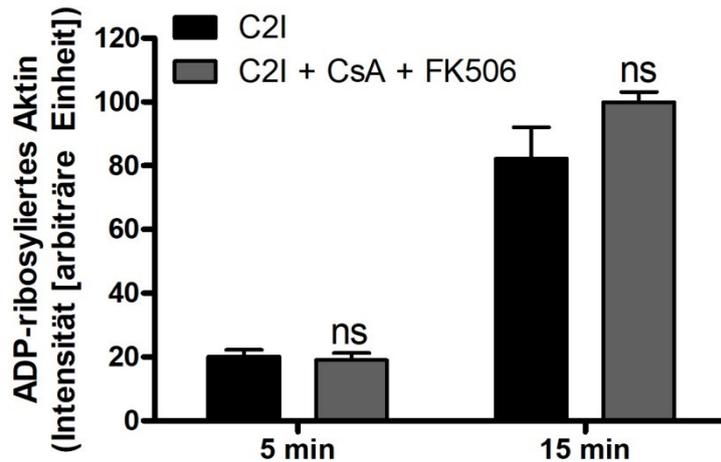


Abbildung 21: Die Kombination von Cyclosporin A und FK506 hat *in vitro* keinen Effekt auf die Enzymaktivität der ADP-Ribosyltransferase von C2I

40 µg Protein aus Vero-Zelllysate wurde für 30 min bei 37 °C mit Cyclosporin A (10 µM) und FK506 (20 µM) bzw. dem entsprechenden Volumen Ethanol inkubiert. Anschließend wurde biotinmarkiertes NAD⁺ (10 µM) und C2I (1 ng/ml) zugegeben. Die Ansätze wurden für 5 min und 15 min bei 37 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Auftrennung der Proben mittels SDS-PAGE und die Western-Blot-Analyse. Das ADP-ribosylierte Aktin wurde mit Streptavidin-Peroxidase detektiert. Die Intensität des biotinmarkierten Aktins wurde mittels Densitometrie bestimmt. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung ($n = 3$) angegeben. Die Signifikanz wurde für jeden der beiden Zeitpunkte durch den Student *t*-Test ermittelt und bezieht sich jeweils auf den Wert des nur mit C2I behandelten Ansatzes entsprechend des dazugehörigen Zeitpunktes (ns = nicht signifikant). (ADP = Adenosindiphosphat; C2I = Enzymkomponente des C2-Toxins; CsA = Cyclosporin A; NAD⁺ = Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid; SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Als Nächstes wurde deshalb die Wirkung der Inhibitor-Kombination auf den Aufnahmemechanismus des C2-Toxins untersucht.

3.2.3 Detektion von biotinyliertem C2I im Zytosol von Vero-Zellen unter der kombinierten Wirkung von CsA und FK506

Da in den Zytotoxizitätsexperimenten (siehe 3.2.1) bereits nachgewiesen werden konnte, dass durch die Kombination der beiden Inhibitoren mehr Vero-Zellen vor einer Abrundung durch C2-Toxin bewahrt wurden als durch den Einsatz nur einer der beiden Inhibitoren, liegt es nun nahe, die Menge an C2I zu ermitteln, die in Anwesenheit der kombinierten Inhibition im Zytosol der Zielzellen vorzufinden ist. Zum besseren Nachweis wurde auch hier das biotinmarkierte C2I-Protein eingesetzt (zur Biotinylierung siehe 2.2.9).

Für den Versuch (siehe auch 2.2.10) wurden Vero-Zellen, nach einer zwei- bis dreitägigen Kultivierung in serumfreiem Medium mit CsA (10 μ M), FK506 (20 μ M) oder der Kombination beider Inhibitoren für 30 min inkubiert. Die Kontrollzellen blieben für diese Zeit unbehandelt. Anschließend erfolgte die Zugabe des C2-Toxins (C2I biot. 50 ng/ml; C2IIa 100 ng/ml) und die Inkubation der Ansätze für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Danach wurde das Medium abgenommen und die Zellen, um potentiell an die Zellmembran gebundenes Toxin zu entfernen, mit PBS gewaschen. Die folgende Zugabe von Digitonin-Puffer (20 μ g/ml in PBS) und die Inkubation der Zellen bei 25 °C für 5 min diente der selektiven Permeabilisierung der Plasmamembran. Sowohl die zytosolische Fraktion der jeweiligen Ansätze als auch deren extrahierte Zellen wurden anschließend mittels Western Blot auf die Anwesenheit von C2I analysiert.

Abbildung 22 zeigt, dass im Zytosol der nur mit C2-Toxin behandelten Zellen biotinyliertes C2I nachweisbar war, was auf eine erfolgreiche Extraktion der zytosolischen Fraktion hindeutet. Wie durch vorherige Versuche (u. a. 3.1.3) bereits belegt werden konnte, führt eine Vorinkubation der Zellen mit CsA oder FK506 zu einer vergleichsweise geringeren Menge an C2I im Zytosol gemessen mit dem Ansatz, der nur mit C2-Toxin behandelt worden war (Abbildung 22: C2I biot.). Wurden die Zellen nun zuvor mit der Kombination beider Inhibitoren inkubiert (ebenfalls Abbildung 22: C2I biot.), war die Menge an C2I in der zytosolischen Fraktion deutlich geringer, was auf einen verstärkenden Effekt der beiden Inhibitoren schließen lässt.

Als Ladekontrolle verifizierte die Immundetektion von Hsp90 dabei vergleichbare Proteinmengen innerhalb der jeweiligen Proben, Zytosol oder Zellen (Abbildung 22: Hsp90).

Erwartungsgemäß war das Markerprotein früher Endosomen, Rab5, nur in den extrahierten Zellen vorzufinden, während in der zytosolischen Fraktion kein Rab5 nachweisbar war. Dies weist darauf hin, dass sich im extrahierten Zytosol keine Endosomen befanden, und es sich somit bei dem nachgewiesenen C2I ausschließlich um bereits in das Zytosol transloziertes Protein handelt.

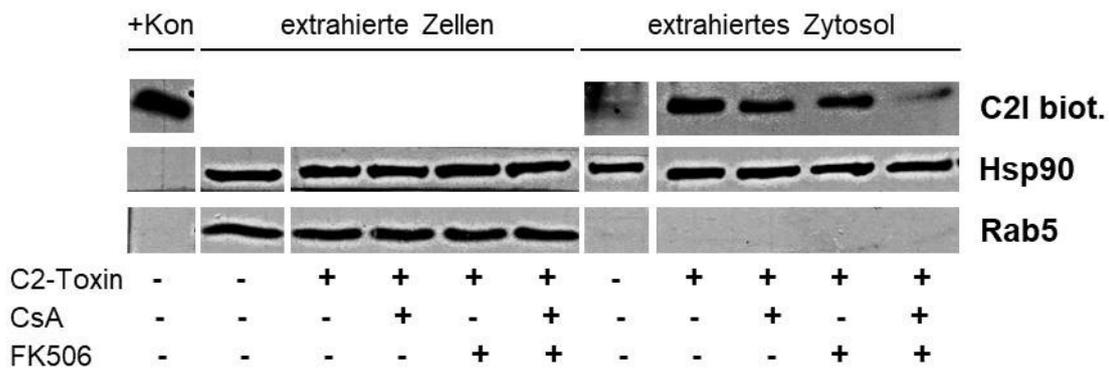


Abbildung 22: Synergistische Effekte der Inhibitor Kombination Cyclosporin A und FK506 auf die Aufnahme von C2I in das Zytosol von Vero-Zellen

Vero-Zellen wurden in serumfreiem Medium für 30 min bei 37 °C mit Cyclosporin A (10 µM), FK506 (20 µM) oder deren Kombination inkubiert. Andere Zellen wurden zur Kontrolle unbehandelt belassen. Danach erfolgte die Zugabe des C2-Toxins (biotinyliertes C2I 50 ng/ml und C2IIa 100 ng/ml) und die Inkubation dessen für 2 h. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und zur Extraktion der zytosolischen Fraktion mit Digitonin-Puffer (20 µg/ml Digitonin in PBS) inkubiert- 5 min bei 25 °C, 25 min bei 4 °C. Daraufhin erfolgte eine Auftrennung des extrahierten Zytosols und der jeweiligen Zellen durch SDS-PAGE und der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Das biotinylierte C2I wurde mittels Streptavidin-Peroxidase detektiert. Eine Positivkontrolle (+Kon), bestehend aus reinem C2I biot., markierte zusätzlich die Laufhöhe. Das Markerprotein früher Endosomen (Rab5) bestätigte die erfolgreiche Separation der zytosolischen Fraktion von den zurückgebliebenen extrahierten Zellen - kein Rab5-Signal und somit keine Endosomen in der zytosolischen Fraktion. Die Immundetektion des Hsp90 konnte gleichmäßige Mengen von Protein innerhalb der Proben des extrahierten Zytosols belegen. (C2I biot. = biotinylierte Enzymkomponente des C2-Toxins; CsA = Cyclosporin A; ECL = enhanced Chemiluminescence; Hsp90 = Hitzeschockprotein 90; PBS = „phosphate buffered saline“; Rab5 = Rab (Ras-related in brain)-Protein 5; SDS-PAGE = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese; +Kon = Positivkontrolle für das biotinylierte C2I)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in Anwesenheit der Inhibitor Kombination CsA und FK506 weniger C2I im Zytosol C2-Toxin-behandelter Vero-Zellen vorzufinden ist als in der zytosolischen Fraktion der C2-Toxin-behandelten Zellen, die nur mit einem der beiden Inhibitoren vorinkubiert wurden. Dieses Resultat unterstützt somit die Ergebnisse aus den Zytotoxizitätsexperimenten. Es ist folglich anzunehmen, dass die PPIase-Aktivitäten von FKBP's und der Cy's bei der zellulären Aufnahme des C2-Toxins gemeinsam agieren.

4 Diskussion

4.1 Beteiligung der FKBP's an dem Aufnahme- und Wirkmechanismus des binären C2-Toxins

Im Jahr 2003 konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass zelluläre Chaperone an dem Aufnahmemechanismus von bakteriellen AB-Toxinen in das Wirtszellzytosol beteiligt sind (Ratts et al. 2003; Haug et al. 2003). Darauf aufbauend wurde in den letzten Jahren von der Arbeitsgruppe Barth und anderen der Aufnahmemechanismus verschiedener Toxine sowie die Beteiligung zellulärer Faltungshelfer bei der Membrantranslokation weiter untersucht. Zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Arbeit konnte bereits eine Beteiligung des Chaperons Hsp90 und der PPIase CypA an der Membrantranslokation der binären clostridialen Toxine, C2-Toxin von *C. botulinum*, Iota-Toxin von *C. perfringens* und CDT-Toxin von *C. difficile*, demonstriert werden (Haug et al. 2003; Haug et al. 2004; Kaiser et al. 2009; Kaiser et al. 2011). So bestand zu Beginn der Anfertigung dieser Arbeit die Annahme, dass nach der rezeptorvermittelten Endozytose der Toxine, der Übertritt der Enzymkomponente über die endosomale Membran in partiell ungefalteter Konformation stattfindet. Die Faltungshelfer sollen den Übertritt durch die Translokationspore der Bindungskomponente und die Rückfaltung im Zytosol vereinfachen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle weiterer PPIasen, namentlich der FKBP's, bei der zellulären Aufnahme binärer Bakterientoxine zu charakterisieren. Hierbei galt es die Fragen zu klären, ob und ggf. wie die FKBP's an der Membrantranslokation des C2-Toxins, dem Prototyp der binären clostridialen Aktin-ADP-ribosylierenden-Toxine, beteiligt sind. Zur detaillierten Untersuchung der Wirkweise der FKBP's bediente man sich ihres spezifischen, pharmakologischen Inhibitors FK506.

In der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe von Zytotoxizitätsexperimenten gezeigt werden, dass die spezifische Inhibition der FKBP's einen eindeutigen protektiven Effekt auf die Zellvergiftung durch C2-Toxin hat. So wird durch die Anwesenheit von FK506 die Abrundung von HeLa- als auch von Vero-Zellen durch C2-Toxin deutlich vermindert. Im Zeitverlauf lässt sich in Gegenwart des Inhibitors bei beiden Zelllinien ein verzögerter Vergiftungsbeginn sowie eine langsamere Vergiftungskinetik

erkennen. Es kam jedoch zu keiner kompletten Inhibition der Zellabrundung durch FK506. Dies kann zum einen durch die, wenn auch eine hohe Aktivierungsenergie benötigende, spontane *cis/trans*-Isomerisierung erklärt werden, zum anderen durch die bereits nachgewiesene Beteiligung von CypA, einer PPIase der Klasse der Cyps. Ebenfalls ist eine Beteiligung von Parvulinen, der dritten Klasse der PPIasen, denkbar. Dadurch dass FK506 zwar nicht isoformspezifisch, jedoch spezifisch für die FKBP's ist, kann eine Inhibition anderer PPIasen durch FK506 weitgehend ausgeschlossen werden.

Da die Abrundung der mit C2-Toxin behandelten Zellen ein spezifischer und sehr sensibler Endpunkt ihrer Vergiftung, d. h. der C2I-bedingten Depolymerisation des Aktinzytoskeletts und letztendlich dem daraus folgenden Adhärenzverlust ist, weisen die Ergebnisse aus den Zytotoxizitätsexperimenten darauf hin, dass den FKBP's eine entscheidende Rolle bei der Wirkweise des C2-Toxins zukommt. Dennoch war zunächst keine Aussage über den Wirkungsmechanismus der FKBP's möglich. Infolgedessen galt es zu überprüfen, ob die Enzymaktivität des C2-Toxins eventuell durch den Inhibitor FK506 beeinflusst wird. Mithilfe von *in vitro* ADP-Ribosylierung von Aktin durch C2I ließen sich vergleichbare Intensitäten zwischen den mit und den ohne Inhibitor behandelten Ansätzen nachweisen. Dies impliziert, dass FK506, zumindest *in vitro*, keinen Effekt auf die enzymatische Aktivität der ADP-RT C2I hat.

Entsprechend der Hypothese, dass die Faltungshelfer die Translokation der Enzymkomponente über die endosomale Membran vereinfachen, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob durch die Inhibition der FKBP's weniger C2I in dem Zytosol der Wirtszellen detektierbar ist. Zum besseren Nachweis wurde C2I biotinyliert. Vorab durchgeführte Zytotoxizitätsexperimente zeigten eine vergleichbare Vergiftungskinetik wie mit unbiotinyliertem C2I, was die biologische Aktivität des biotinylierten C2I-Proteins belegte. Erwartungsgemäß wurde im extrahierten Zytosol der mit C2-Toxin behandelten Zellen biotinyliertes C2I nachgewiesen, in dem der unbehandelten Zellen jedoch nicht. Ferner wurde in einer Kontrolle mit Baf, einem Inhibitor der vesikulären Protonenpumpe, weniger C2I biot. im Zytosol detektiert. Dabei lässt sich das abgeschwächte, und nicht wie bekannt fehlende Signal in dem Ansatz am ehesten durch eine inkomplette Inhibition der vesikulären ATPase erklären. Der Grund dafür könnte eine unzureichende Menge an Baf oder eine abgeschwächte Aktivität des Inhibitors sein. Unabhängig davon war nach einer

Vorinkubation der Zellen mit FK506 ebenfalls weniger C2I biot. in der zytosolischen Fraktion nachweisbar, verglichen mit den Zellen, die nur mit C2-Toxin behandelt worden waren. Ein durch schwankende Ladungsgrößen bedingter Nachweis geringerer Mengen C2I konnte ausgeschlossen werden. Zudem ließ sich eine Kontamination des Zytosols mit C2I-beladenen frühen Endosomen negieren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nach der Behandlung der Zellen mit FK506 weniger C2I das Zytosol der mit C2-Toxin behandelten Zellen erreicht. Die FKBP s scheinen folglich einen Einfluss auf den effizienten Transport des C2-Toxins in das Zytosol der Wirtszellen zu haben.

Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Proteine in irgendeiner Form miteinander interagieren. Ob es dabei zu einer direkten Interaktion von FKBP s mit dem C2-Toxin kommt, wurde mit Hilfe des Dot-Blot Verfahrens genauer untersucht. Dadurch ließ sich nachweisen, dass die FKBP52 und 51, nicht jedoch das FKBP12, *in vitro* eine direkte Interaktion mit der biotinylierten Enzymkomponente des C2-Toxins eingehen. Dabei zeigte das FKBP51, in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, die größte Affinität zu C2I biot.. Eine Bindung des biotinylierten C2I an die Membran als auch eine Bindung des AK an die FKBP s wurde dabei ausgeschlossen. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Interaktionsbereitschaft der FKBP s mag in ihrer Struktur liegen. So besteht das FKBP12 im Gegensatz zu den FKBP s 52 und 51 aus nur einer einzelnen PPIase-Domäne, im Fall der FKBP s als FKBP-Domäne bezeichnet. Die FKBP s 52 und 51 weisen jedoch 2 FKBP-Domänen und zudem weitere 3 TPR-Domänen auf (Ratajczak u. Carrello 1996). Mit Hilfe von TPR-Domänen ist beispielsweise eine Interaktion mit Hsp90 möglich. Es wurde bereits sowohl für das FKBP52 als auch für das FKBP51 eine Interaktion mit Hsp90 im Hsp90-Multichaperonzyklus zur Aktivierung von Steroidhormon-Rezeptoren beschrieben. Dabei weisen diese zwei FKBP s jedoch weitgehend antagonistische Rollen auf. Das FKBP51, welches die größere Affinität zu C2I zu haben scheint, ist in Bezug auf den Hsp90-Multichaperonzyklus zur Aktivierung von Steroidhormonrezeptoren ein negativer Regulator des Glukokortikoid-Rezeptors, jedoch ein positiver Regulator des Androgen-Rezeptors (Stechschulte u. Sanchez 2011). Letzteres macht FKBP51 auch zum Gegenstand der Forschung in Androgen-abhängigen Prostata-Karzinomen (Periyasamy et al. 2010).

Die bisherigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammenfassend, lässt sich die aufgestellte Hypothese einer Interaktion der FKBP's mit dem C2-Toxin bestätigen. So wird durch die Inhibition der FKBP's die vergiftungsbedingte Abrundung sowohl von Vero- als auch von HeLa-Zellen deutlich reduziert bzw. verzögert. Dieser Effekt wird nicht durch eine Beeinflussung der Enzymaktivität von C2I hervorgerufen sondern dadurch, dass unter der Wirkung von FK506 weniger C2I in das Zytosol der Wirtszellen gelangt. Hierbei kommt es *in vitro* zu einer direkten Interaktion der FKBP's 52 und 51 mit C2I, wobei FKBP51 die größere Bindungsaffinität zu C2I aufweist. FKBP12 zeigt keine direkte Bindung, was die Spezifität der Interaktion belegt.

Seit Generierung der vorliegenden Ergebnisse konnte zudem ein Einfluss von FK506 auf die Rezeptorbindung des C2-Toxins an der Zelloberfläche ausgeschlossen werden. (Kaiser et al. 2012). Des Weiteren wurde gezeigt, dass FK506 die ADP-Ribosylierung von Aktin durch C2I in intakten Zellen hemmt (Kaiser et al. 2012). Dies spiegelt die Ergebnisse der Zytotoxizitätsversuche wieder, in denen es in der Gegenwart von FK506 zu einer Inhibition der toxinbedingten Abrundung der Zellen kam. Darüberhinaus konnte die Hypothese, dass die Faltungshelfer an der Membrantranslokation der Enzymkomponente in das Zytosol beteiligt sind, weiter erhärtet werden, indem mittels Co-Präzipitation nachgewiesen wurde, dass FKBP51 auch in intakten Zellen mit C2I interagiert. Eine Aussage ob es zu einer direkten Bindung an C2I in intakten Zellen kommt oder ob FKBP51 als Teil eines Multichaperonkomplexes agiert, ist hierbei jedoch nicht möglich (Kaiser et al. 2012). Schlussfolgernd deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die PPIase-Aktivität der FKBP's notwendig für die Membrantranslokation von C2I ist.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen fanden weitere Untersuchungen mit anderen Toxinen statt. So konnte neben dem C2-Toxin von *C. botulinum* auch für das *C. difficile* CDT-Toxin und das *C. perfringens* Iota-Toxin eine Beteiligung der FKBP's an der Membrantranslokation der Enzymkomponente nachgewiesen werden. Die binären clostridialen Aktin-ADP-ribosylierenden Toxine C2-, CDT- und Iota-Toxin bedienen sich somit dem Chaperon Hsp90 als auch den PPIasen der Klassen der Cyps und der FKBP's (Ernst et al. 2015; Kaiser et al. 2012; Kaiser et al. 2011; Kaiser et al. 2009; Haug et al. 2003).

Vergleichbare Ergebnisse konnten auch für die einkettigen AB-Toxine *Bordetella pertussis* Pertussis-Toxin (PT) und *Corynebacterium diphtheriae* Diphtherie-Toxin (DT) (Schuster et al. 2017; Ratts et al. 2003) gewonnen werden. Zudem zeigte das ebenfalls einkettige Cholera-Toxin (CT) von *Vibrio cholerae* eine Beteiligung des Chaperons Hsp90 um seine Enzymdomäne in das Wirtszellzytosol zu transferieren (Burress et al. 2014; Taylor et al. 2010). Ferner konnten neuere Erkenntnisse erbracht werden, dass auch das dreiteilige Aktin-ADP-ribosylierende Toxin PTC3 von *Photobacterium luminescens* mit Hsp90, CypA, Cyp40 sowie FKBP51 interagiert (Lang et al. 2014; Lang et al. 2011).

Dabei fällt auf, dass alle Toxine, die sich des Chaperons Hsp90 und/oder der PPIasen bedienen, ADP-RTs sind. Diese übertragen eine ADP-Ribose von NAD⁺ auf ein ihnen spezifisches Substrat wie beispielsweise auf Aktin (C2-, Iota-, CDT-Toxin, PTC3), auf G-Proteine (PT, CT) oder auf Elongationsfaktoren (DT).

Im Gegensatz dazu läuft die Translokation von *C. difficile* Toxin A und B (TcdA, TcdB), beides Glycosyltransferasen, als auch die des binären Letalen Toxins (LT = aktiviertes Protektives Antigen-Letaler Faktor (PA63-LF)) von *Bacillus anthracis*, einer Metalloprotease, unabhängig von Hsp90 und Cyps ab (Dmochewitz et al. 2011; Kaiser et al. 2011; Kaiser et al. 2009; Zornetta et al. 2010; Haug et al. 2003).

Rekombinante Fusionstoxine jedoch, die eine ADP-RT-Domäne innehaben, wie beispielsweise PA63/LF_NDTA, wobei LF_N die N-terminale Domäne des Letalen Faktors ohne enzymatische Aktivität darstellt und DTA die ADP-RT des Diphtherie-Toxins, benötigen Hsp90 und CypA für einen effizienten Transport in das Zytosol der Wirtszellen (Dmochewitz et al. 2011; Haug et al. 2003). Ähnliche Ergebnisse zeigt das Fusionstoxin C2IIa/C2IN-C3lim, bestehend aus der N-terminalen Domäne von C2I, die für die Interaktion mit C2IIa verantwortlich ist, und dem C3-Toxin von *C. limosum*, die als enzymatisch aktive Domäne G-Proteine ADP-ribosyliert (Barth et al. 1998; Barth et al. 2002). Darüber hinaus zeigten neueste Untersuchungen, dass die Translokation der isolierten ADP-RT-Domäne von *Photobacterium luminescens* His-TccC3hvr durch die *Bacillus anthracis* PA63-Pore von Hsp90 und PPIasen vereinfacht wird (Lang et al. 2014; Ernst et al. 2017; Gatsogiannis et al. 2013; Meusch et al. 2014).

Im Umkehrschluss kam es zu keiner Beteiligung der Faltungshelfer, spaltete man die ADP-RT von der Enzymkomponente ab, wie beispielweise bei C2IN oder dem

Fusionstoxin C2IN-Streptavidin, bei der das nicht enzymatisch aktive Streptavidin an die N-terminale Domäne der A-Komponente gebunden wurde (Ernst et al. 2017).

Diese Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass die Interaktion der Toxine mit Hsp90 und den PPIasen (Cyts und FKBP) über die ADP-RT-Domäne vermittelt wird und somit einen selektiven Mechanismus für ADP-ribosylierende Toxine darstellen könnte.

Diese Hypothese wird von der Tatsache unterstützt, dass es nicht von Belang zu sein scheint, ob es sich dabei um einkettige (PT, DT, CT), binäre (C2, CDT, Iota, PA63/LF_NDTA, C2IIa/C2IN-C3lim) oder gar dreiteilige AB-Toxine (PTC3) handelt. Ebenso wenig Relevanz spielt das zu modifizierende intrazelluläre Substrat oder der Oberflächenrezeptor an der Zellmembran. Desweiteren scheint auch der unterschiedliche Aufnahmemechanismus als short-trip Toxin über frühe (C2, CDT, DT, C2IIa/C2IN-C3lim) oder späte Endosomen (PA63/LF_NDTA), in einem Stadium dazwischen liegender Endosomen (Iota) oder gar als long-trip Toxin über den Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum (CT, PT) irrelevant für die Interaktion mit Hsp90 und/oder den PPIasen zu sein. Letzteres v. a. impliziert, dass die Beteiligung der Faltungshelfer nicht von einem speziellen Typ der Translokationspore, sondern vielmehr direkt von der ADP-RT abhängt.

Eine weitere Bestätigung dessen zeigt sich darin, dass *in vitro* eine direkte Interaktion von Hsp90 und den PPIasen mit den Enzymkomponenten, nicht jedoch mit den Bindungskomponenten des C2-, Iota- und CDT-Toxins demonstriert werden konnte (Kaiser et al. 2011; Ernst et al. 2015). Bemerkenswert ist dabei, dass *in vitro* die Bindungsaffinität der Faltungshelfer mit der A-Komponente dieser clostridialen Toxine in der ungefalteten Form höher ist (Ernst et al. 2015; Kaiser et al. 2012). Dies erscheint v. a. vor dem Hintergrund sinnvoll, da die A-Komponenten bei ihrem Durchtritt durch die engen Translokationsporen der B-Komponenten zumindest partiell entfaltet sein müssen. Hsp90 als auch die PPIasen wiederum agieren in ihrer Funktion als Faltungshelfer vornehmlich mit ungefalteten Proteinen (Haug et al. 2003; Pratt u. Toft 1997). Eine Erklärung warum gerade die ADP-RT von den Faltungshelfern erkannt werden, könnte die hoch konservierte Tertiärstruktur der ADP-RT mit dem β -Faltblatt und der alpha-Helix in der katalytischen Seite sein (Simon et al. 2014; Aktories et al. 2011b; Marsischky et al. 1995).

Sollte sich weiterhin bestätigen, dass sich nur ADP-ribosylierende Toxine dieses selektiven Aufnahmemechanismus bedienen, so könnte man durch die spezifische Inhibition der beteiligten zellulären Faktoren die Aufnahme und Wirkung von bakteriellen ADP-RT verhindern. Genauer gesagt führt eine Inhibition der Membrantranslokation ADP-ribosylierender Toxine dazu, dass das Wirtszellzytosol von der A-Komponente nicht erreicht und somit das intrazelluläre Substrat nicht modifiziert wird. Dies verhindert oder hemmt zumindest die toxinspezifischen Effekte und somit die klinischen Symptome, die durch dieses bakterielle Toxin entstehen würde. Die bisherigen Inhibitoren der PPlasen, CsA und FK506, haben jedoch unabhängig von der hier gezeigten Wirkweise eine immunsuppressive Wirkung als Calcineurin-Inhibitor (Borel 2002; Liu et al. 1991; Borel et al. 1976; Schreiber et al. 1991; Krönke et al. 1984; Swanson et al. 1992). Bei einer Intoxikation oder/und einer Infektion mit einem Toxin produzierendem Bakterium wäre eine Therapie mit einem Immunsuppressivum jedoch denkbar ungünstig. Das CsA betreffend wurde bereits ein neues Derivat entwickelt, das VK112, das keine immunmodulatorische Wirkung aufweist jedoch noch immer potent die PPlase-Aktivität von Cyps hemmt (Daum et al. 2009; Malesevic et al. 2010). Somit schützt es, analog dem CsA, Zellen vor der Intoxikation mit C2-, Iota- und CDT-Toxin indem es den Membrantransport ihrer ADP-RT in das Zytosol inhibiert (Ernst et al. 2015).

Das könnte gerade in Zeiten von multiresistenten Keimen eine komplett neue therapeutische Strategie gegen Krankheiten darstellen, die mit ADP-ribosylierenden Toxinen assoziiert sind wie z. B. Diphtherie (Krupp), Cholera (Gallebrechdurchfall) oder Pertussis (Keuchhusten).

Neben steigenden Resistenzraten wirken Antibiotika zudem lediglich bakteriostatisch oder bakterizid, d.h. sie attackieren nur Strukturen oder Mechanismen von Bakterienzellen nicht aber von bereits sezernierten Exotoxinen. Infolgedessen kann ausschließlich eine weitere Produktion verhindert werden. Die bereits freigesetzten Toxine bleiben ungehindert. Vereinzelt existieren Antitoxine, wie z. B. das Diphtherie-Antitoxin, die an diesem Punkt ansetzen und als Antikörper bereits zirkulierendes Toxin unschädlich machen. Dennoch zeigen sich auch hier Grenzen des Wirkstoffs, der nur freie, nicht intrazelluläre Proteine neutralisieren kann. Jedoch könnte eine Wirkung des bereits gebundenen oder endozytierten Toxins durch spezifische pharmakologische Inhibitoren der involvierten zellulären Faktoren verhindert

werden, indem die Membrantranslokation und infolgedessen die Substratmodifizierung durch die bakterielle ADP-RT verhindert wird.

Dies könnte neben einer Infektion mit Toxin produzierenden Bakterien wie dem bereits erwähnten *Corynebacterium diphtheriae* aber auch den hypervirulenten Stämmen von *C. difficile*, welche neben den Glucosyltransferasen TcdA und TcdB die ADP-RT CDT produzieren (Carroll u. Bartlett 2011), als auch insbesondere bei Lebensmittelvergiftungen eine wichtige Rolle spielen. Zudem stellt sich die Frage, ob auch andere Enzymklassen der AB-Toxine einen eigenen, spezifischen Aufnahmemechanismus besitzen.

Darüber hinaus kann nicht nur die Verhinderung der enzymatischen Wirkung der Toxine, sondern auch gerade diese der gewünschte Effekt sein. Das ist insbesondere für die Botulinum-Neurotoxine bekannt. Jene Metalloproteasen werden durch gezielte Anwendung zu medizinischen und kosmetischen Zwecken eingesetzt. Gegenstand der Untersuchung der Arbeitsgruppe Barth in Kooperation mit der Traumatologie-Forschungsgruppe des Universitätsklinikums Ulm ist derzeit das ADP-ribosylierende C3-Toxin von *C. botulinum* und *C. limosum*, welches durch die Inhibition von Rho-GTPasen in Monozyten und Makrophagen zahlreiche Aktin abhängige Prozesse, wie z. B. die Migration oder Chemotaxis beeinflusst. Im Falle des untersuchten stumpfen Thoraxtraumas stellt es somit einen potenziellen Faktor dar um die Migration von Monozyten und interstitiellen Makrophagen in die Lunge zu verhindern und die systemische posttraumatische Inflammation zu verringern. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit des Wissens über den Aufnahme- und Wirkmechanismus der Toxine.

Die vorliegende Arbeit liefert somit einen entscheidenden Beitrag zum Verständnis bakterieller Wirkungsweisen und mögliche Ansatzpunkte medizinischer Therapien gegen und mit bakteriellen Toxinen.

4.2 Effekte der kombinierten Inhibition von Cyps und FKBP's auf den Aufnahme und Wirkmechanismus des binären C2-Toxins

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte die Beteiligung von FKBP's an der Membrantranslokation des C2-Toxins nachgewiesen werden. Darauf aufbauend beschäftigt sich der zweite Teil dieser Arbeit mit der Fragestellung inwiefern sich

eine kombinierte Hemmung von PPIasen (Cyps und FKBP) auf die Intoxikation mit C2-Toxin auswirkt. Für CypA war bereits zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit eine Beteiligung am Aufnahmemechanismus des C2-Toxins beschrieben worden (Kaiser et al. 2009). Analog zu FKBP 51 und 52 zeigte sich eine direkte Interaktion des CypA mit der Enzymkomponente C2I *in vitro*.

Zunächst sollte die Vergiftungskinetik in An- und Abwesenheit der Inhibitoren CsA und FK506 untersucht werden. Hierzu wurden analog zum ersten Teil dieser Arbeit die Zelllinien HeLa und Vero genutzt. Entsprechend den bereits vorgelegten Ergebnissen zeigt sich in Anwesenheit von CsA bzw. FK506 eine Verminderung der Abrundung der Zellen durch C2-Toxin. Wie postuliert, ist auch in der Kombination der Inhibitoren eine verringerte Menge an abgerundeten Zellen nachweisbar, verglichen mit den Ansätzen der nur mit Toxin behandelten Zellen. Im Zeitverlauf lässt sich in Gegenwart beider Inhibitoren in Kombination sowohl bei HeLa- als auch bei Vero-Zellen ein verzögerter Vergiftungsbeginn als auch eine langsamere Vergiftungskinetik erkennen. Bei den HeLa-Zellen lässt sich jedoch nicht beurteilen, ob sich die inhibitorischen Effekte in der Kombination aufsummieren. Auffallend war hier, dass die unbehandelten Kontrollzellen weitestgehend unverändert blieben, während die nur mit Inhibitor behandelten Ansätze leichte Stressreaktionen u. a. in Form von Abrundungen der Zellen aufwiesen. Diese sind am ehesten auf das Ethanol, das Lösungsmittel des CsA als auch des FK506, zurückzuführen und nahmen dementsprechend mit dessen Konzentration, ersichtlich v. a. in der Kombination der Inhibitoren, zu (Daten hier nicht gezeigt). Eine Aussage über eine etwaige additive Wirkung der Inhibitoren in ihrer Kombination ist somit nicht möglich. Dahingegen zeigt sich bei Vero-Zellen ein verstärkter Hemmeffekt in der gleichzeitigen Anwesenheit von CsA und FK506 verglichen mit den einzelnen Inhibitoren. Hier werden folglich durch die kombinierte Inhibition von Cyps und FKBP weniger Zellen durch C2-Toxin vergiftet als bei der Hemmung nur einer PPIasen-Klasse. Weder bei HeLa- noch bei Vero-Zellen zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Wirkstärke der einzelnen Inhibitoren (Daten hier nicht gezeigt).

Es bestand auch hier die Möglichkeit, dass die protektive Wirkung der PPIase-Inhibitoren auf die Vergiftung der Zellen durch eine Hemmung der Enzymaktivität von C2I verursacht wird. Da allerdings sowohl für CsA als auch für FK506 alleine bereits ein Effekt auf die Enzymaktivität ausgeschlossen werden konnte, war

anzunehmen, dass auch die Kombination beider Inhibitoren keinen Einfluss aufweist. Erwartungsgemäß zeigten sich vergleichbare Intensitäten der Aktin-ADP-Ribosylierung zwischen der mit C2I und der mit C2I in Anwesenheit der beiden Inhibitoren behandelten Ansätze. Die Kombination von CsA und FK506 hat folglich *in vitro* keinen Effekt auf die Enzymaktivität von C2I.

In Analogie zum ersten Teil dieser Arbeit wurde als nächstes die Menge an C2I im Zytosol der Wirtszellen bestimmt. Hinsichtlich der Frage einer synergistischen Wirkung der Inhibitoren, fand auch hier eine Untersuchung in An- bzw. Abwesenheit und in der Kombination der Inhibitoren statt. Gemäß dem Resultat aus den Zytotoxizitätsexperimenten, lässt sich in Anwesenheit der Inhibitorkombination CsA und FK506 weniger C2I im Zytosol von Vero-Zellen detektieren als in der zytosolischen Fraktion der Zellen, die nur mit einem der beiden Inhibitoren vorinkubiert wurden. Es ist folglich anzunehmen, dass die FKBP's und die Cyps bei der zellulären Aufnahme des C2-Toxins gemeinsam agieren.

Auf den Ergebnissen dieser Arbeit aufbauend, wurden weitere Untersuchungen mit der Inhibitorkombination FK506 und CsA durchgeführt. So konnte im Verlauf gezeigt werden, dass in der Anwesenheit der beiden Inhibitoren die Anzahl von ADP-ribosyliertem Aktin im Zytosol der Wirtszellen vermindert wird. Dies entspricht den hier gezeigten Resultaten, dass weniger C2I das Zytosol der Wirtszellen erreicht (Kaiser et al. 2012; Kaiser et al. 2011; Kaiser et al. 2009).

Desweiteren fanden ähnliche Versuche in der Kombination Hsp90- und PPIase-Inhibitor statt. Interessanterweise hat diese Inhibitorkombination ebenfalls synergistische Effekte auf die Intoxikation der Zellen mit C2-Toxin, was vermuten lässt, dass Hsp90 und PPIasen möglicherweise zusammen interagieren (Kaiser et al. 2012; Kaiser et al. 2009). Bemerkenswerterweise übt Hsp90 seine Funktion oft zusammen mit anderen Faltungshelfern wie den PPIasen der Cyp- oder FKBP-Familie aus. Diese Interaktion von Hsp90 mit Cyps und FKBP's wird durch bestimmte Interaktionsmotive vereinfacht. So binden Immunophiline mit ihrer TPR-Domäne an das EEVD-Motiv von Hsp90 (Ratajczak u. Carrello 1996).

Das Tetratricopeptid-Repeat (TPR)-Motiv ist eine Sequenz von 34-Aminosäuren, das in vielen verschiedenen Proteinen mit einer unterschiedlichen Anzahl von Tandem-Repeats vorkommt (D'Andrea u. Regan 2003; Lamb et al. 1995). In einer Vielzahl von biologischen Systemen vermittelt es Protein-Protein-Interaktionen. So agieren TPR-

Motiv-enhaltende Proteine als Gerüste für den Aufbau verschiedener Multiproteinkomplexe.

Während alle Klassen der PPIasen ihre spezifische PPIase-Domäne aufweisen, so findet sich besagte TPR-Domäne nicht in allen Isoformen der CyPs und der FKBP's wieder. So weist CypA nur die PPIase-Domäne, im Fall der CyPs als *cyclophilin-like domain* (CLD) bezeichnet, auf, jedoch keine TPR-Domäne. Analog dazu beinhaltet das FKBP12 nur seine FKBP-Domäne, die für die FKBP spezifische PPIase-Domäne, nicht jedoch eine TPR-Domäne. Dahingegen weisen beispielsweise die im ersten Teil der Arbeit genauer untersuchten FKBP's 51 und 52 neben 2 FKBP-Domänen, 3 TPR-Domänen auf.

Für Hsp90 kennt man eine wachsende Anzahl von TPR-Interaktionspartnern. Das Zusammenspiel dieser Interaktion ist in Bezug auf den Aktivierungszyklus des Steroidhormonrezeptors gut untersucht (Li et al. 2012). So kommt es hier zu einer Interaktion von unterschiedlichsten Faltungshelfern, wobei die Chaperone Hsp90 und Hsp70 der aktuell gängigen Lehrmeinung nach, im Mittelpunkt des Aktivierungszyklus stehen und sich weitere Faltungshelfer als Co-Chaperone in verschiedenen Stadien zu Nutze machen: Hsp70 interagiert dabei zunächst mit Hsp70-regulierenden Proteinen der Klasse der Hsp40/J-Domänen-Proteine, welche das Substrat anliefern. Darauffolgend wird über das Adapterprotein Hop eine Interaktion von Hsp70 und Hsp90 vermittelt und das Substrat auf Hsp90 übertragen. Mit Hsp90 agieren nachgewiesenermaßen die Co-Chaperone FKBP52, FKBP51, Cyp40 und p23. Welche Funktion die einzelnen Komponenten in den verschiedenen Komplexen und Abschnitten des Aktivierungszyklus ausüben ist noch nicht genau geklärt.

Mit diesem Wissen und den in der Arbeitsgruppe Barth gewonnenen Ergebnissen, bestand die Hypothese eines möglichen Multichaperonkomplexes zur Aufnahme von ADP-ribosylierenden Toxinen in die Zelle. Es konnte bereits in Analogie zu dem Multichaperonkomplex zur Aktivierung des SHR eine Beteiligung von Hsp90, FKBP51 und gewissermaßen auch des FKBP52 nachgewiesen werden. Interessante Ziele weiterer Untersuchungen stellten folglich das Hsp70 und das Cyp40 dar.

Cyp40 repräsentiert eine multi-Domänen Isoform der Cyclophiline, welche neben der CLD zudem aus 3 TPR-Domänen besteht, welche für die Bindung an das EEVD-Motiv von Hsp90 nötig sind (Pratt u. Toft 1997). Am Beispiel des Multichaperonkomplexes

zur Aktivierung des SHR konnte gezeigt werden, dass das FKBP52, 51 und Cyp40 dabei um die Bindung am EEVD-Motiv konkurrieren (Pratt u. Toft 1997) und unterschiedliche Wirkungen auf den Aktivierungszyklus haben.

So vereinfacht Cyp40 den Transport des Glukokortikoidrezeptors entlang des Zytoskeletts in den Zellkern durch die Interaktion mit dem Motorprotein Dynein (Galigniana et al. 2001; Owens-Grillo et al. 1995), analog zu FKBP52.

Da CsA nicht isoformspezifisch inhibiert, kann bei den bereits durchgeführten Versuchen mit CsA bezüglich einer Beteiligung von CyPs an der Membrantranslokation von Toxinen eine entsprechende Beteiligung durch Cyp40 postuliert werden. In der Arbeitsgruppe Barth konnte zudem gezeigt werden, dass es wie bei FKBP51 zu einer direkten Protein-Protein-Interaktion von Cyp40 mit den Enzymkomponenten des C2-, Iota- und CDT-Toxins *in vitro* kommt (Ernst et al. 2015; Kaiser et al. 2012; Kaiser et al. 2011; Kaiser et al. 2009). Bemerkenswert ist, dass in Lysaten mit C2-Toxin vergifteter Zellen neben der Co-Präzipitation von Hsp90 mit C2I eine Co-Präzipitation mit Cyp40 und FKBP51 gezeigt werden konnte (Ernst et al. 2015; Kaiser et al. 2012). Dies bestätigt die Hypothese eines Multichaperonkomplexes zur Aufnahme von ADP-ribosylierenden Toxinen in die Zelle.

Hsp70 gehört wie Hsp90 zur Familie der Hitzeschockproteine. Es assistiert bei der korrekten Faltung und Aktivierung vieler Proteine und wird vermehrt bei Hitzestress und toxischen Chemikalien exprimiert. Neben einer häufigen Interaktion des Hsp70 mit seinem Co-Chaperon Hsp40, agiert es zudem im Multichaperonkomplex zur Aktivierung des SHR mit Hsp90. Seit der kürzlichen Entwicklung eines spezifischen Hsp70-Inhibitors, HA9, durch die Arbeitsgruppe Schiene-Fischer ist eine genauere Untersuchung dieses Chaperons an der Beteiligung zellulärer Prozesse möglich. So konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass Hsp70 mit den Enzymkomponenten des C2-, Iota- und CDT-Toxins interagiert und ihren Transport in das Wirtszellzytosol vereinfacht (Ernst et al. 2017). Darüberhinaus konnte eine pharmakologische Inhibition von Hsp70 lebende Zellen und aus Stammzellen gewonnene menschliche Mini-Därme vor einer Intoxikation mit clostridialen Toxinen schützen (Ernst et al. 2017)

Diese Ergebnisse unterstreichen, dass die spezifische Interaktion zwischen ADP-ribosylierenden Toxinen und zellulären Faltungshelfern weiterer Untersuchung bedarf. Es ist bisher nicht sicher geklärt, ob die Faltungshelfer als Teil eines Multichaperonkomplexes, wie bei dem Aktivierungszyklus des SHR, zusammen agieren. Obgleich sich viele der bei dem Aktivierungszyklus bereits identifizierten Faltungshelfer auch bei der Membrantranslokation der ADP-ribosylierenden Toxine wiederfinden, so z. B. Hsp90, FKBP51, Cyp40 und Hsp70 (Ni et al. 2010; Pirkl u. Buchner 2001; Buchner et al. 1998; Stechschulte u. Sanchez 2011). Die Untersuchung weiterer am Aktivierungszyklus beteiligter Proteine, z. B. Hsp40, Hop, p23, und die genauere Analyse von FKBP52 an der Membrantranslokation von ADP-ribosylierenden Toxinen stehen derzeit noch aus. Sollte sich dabei die Hypothese eines Multichaperonkomplexes bestätigen, wäre zu klären ob und wie CypA, welches keine TPR-Domäne zur Interaktion mit Hsp90 aufweist, mit den Proteinen interagiert. Desweiteren wäre eine Untersuchung auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede sowohl der an der Toxinaufnahme beteiligten Multichaperonkomplexe untereinander als auch in Bezug zum Aktivierungszyklus des SHR interessant.

5 Zusammenfassung

Das C2-Toxin von *Clostridium botulinum* ist der Prototyp der binären clostridialen Aktin-Adenosindiphosphat (ADP)-ribosylierenden-Toxine, welche im Zellzytosol, durch die Übertragung einer ADP-Ribose auf globuläres Aktin, eine Depolymerisation von Aktinfilamenten bewirken. Das C2-Toxin besteht aus zwei Proteinen, der Bindungs- und Translokationskomponente C2II und der separaten Enzymkomponente C2I. Durch die Bindung der aktivierten B-Komponente, C2IIa, an Oberflächenrezeptoren der Zielzelle, erfolgt die rezeptorvermittelte Endozytose des C2IIa/C2I-Komplexes. In sauren Endosomen kommt es anschließend zur Ausbildung von transmembranösen Poren durch C2IIa. Daraufhin erfolgt die Translokation von zumindest partiell entfaltetem C2I durch diese Poren in das Wirtszellzytosol. Für das C2-Toxin konnte eine Beteiligung bestimmter zellulärer Faltungshelfer an der Membrantranslokation nachgewiesen werden, namentlich das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) und die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPIase) Cyclophilin A (CypA).

In der vorliegenden Arbeit wurden die FK506-Bindeproteine (FKBP), eine weitere Klasse der PPIasen, hinsichtlich einer Beteiligung an dem zellulären Aufnahmemechanismus des C2-Toxins untersucht.

In Zytotoxizitätsexperimenten konnte gezeigt werden, dass die spezifische pharmakologische Hemmung der FKBP kultivierte Zellen vor der Intoxikation mit C2-Toxin schützt. Dabei ließ sich ein Effekt von FK506, dem Inhibitor der FKBP, auf die Enzymaktivität von C2I ausschließen. Des Weiteren wurde die Menge an C2I in An- und Abwesenheit von FK506 im Zytosol Digitonin-extrahierter Zellen bestimmt. Erwartungsgemäß ließ sich weniger C2I in Anwesenheit des Inhibitors nachweisen. Dies impliziert, dass den FKBP eine entscheidende Rolle bei dem Aufnahmemechanismus des C2-Toxins zukommt. Für FKBP52 als auch für FKBP51 konnte zudem mit Hilfe des Dot-Blot-Verfahrens eine direkte Interaktion mit C2I *in vitro* nachgewiesen werden. Das nicht homologe FKBP12 hingegen zeigte keine direkte Bindung an C2I *in vitro*, was die Spezifität der Interaktion von C2I mit FKBP51/52 belegt.

In der vorliegenden Arbeit wurde des Weiteren die Wirkung einer kombinierten Inhibition von PPIasen, Cyps und FKBP, auf den Aufnahmemechanismus von C2-Toxin untersucht. Hier zeigte sich sowohl in Zytotoxizitätsexperimenten mit der

Vero-Zelllinie als auch bei der Aufnahme von C2I in diese Zellen ein verstärkender Effekt der Inhibitor Kombination verglichen mit der Inhibition der einzelnen PPIasen. Die Wirkstärke der einzelnen Inhibitoren wies dabei keinen signifikanten Unterschied verglichen mit der jeweils anderen Komponente auf. Ein Effekt auf die Enzymaktivität konnte auch hier ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben somit entscheidende Hinweise zur zellulären Funktion von PPIasen und identifizieren FKBP51 und 52 als neue Interaktionspartner des C2-Toxins bei der intrazellulären Membrantranslokation. Desweiteren lassen die Untersuchungen der kombinierten Inhibition vermuten, dass Cyps und FKBP51 bei der Aufnahme des C2-Toxins gemeinsam agieren. Damit liefert diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Aufnahmemechanismus bakterieller Proteintoxine.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen konnte in nachfolgenden Arbeiten für eine Vielzahl anderer bakterieller AB-Toxine eine Beteiligung der FKBP51, vornehmlich des FKBP51, an der Membrantranslokation nachgewiesen werden. Darüber hinaus legen alle bisherigen Ergebnisse nahe, dass eine Hsp90-/ PPIase-abhängige Membrantranslokation eine spezifische gemeinsame Eigenschaft ADP-ribosylierender Toxine darstellt. Diese Spezifität der ADP-ribosylierenden Toxine macht PPIasen attraktiv als Ziele therapeutischer Strategien gegen Krankheiten, die durch ADP-ribosylierende Toxine verursacht werden, wie Diphtherie, Pertussis und Darmerkrankungen.

Zudem legten nachfolgend durchgeführte Analysen die Vermutung nahe, dass die Faltungshelfer bei der Membrantranslokation von ADP-ribosylierenden Toxinen in einem Multichaperonkomplex ähnlich dem des Aktivierungszyklus von Steroidhormonrezeptoren zusammen agieren, obgleich der genaue molekulare Mechanismus der Interaktion derzeit noch unklar bleibt.

6 Literaturverzeichnis

1. Aktories K, Ankenbauer T, Schering B, Jakobs K H: ADP-ribosylation of platelet actin by botulinum C2 toxin. *European journal of biochemistry / FEBS*, 161: 155-162 (1986)
2. Aktories K, Bärmann M, Ohishi I, Tsuyama S, Jakobs K H, Habermann E: Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature*, 322: 390-392 (1986)
3. Aktories K, Barth H: Clostridium botulinum C2 toxin--new insights into the cellular up-take of the actin-ADP-ribosylating toxin. *International journal of medical microbiology : IJMM*, 293: 557-564 (2004)
4. Aktories K, Lang A E, Schwan C, Mannherz H G: Actin as target for modification by bacterial protein toxins. *The FEBS journal*, 278: 4526-4543 (2011)
6. Aktories K, Wegner A: Mechanisms of the cytopathic action of actin-ADP-ribosylating toxins. *Molecular microbiology*, 6: 2905-2908 (1992)
7. Alouf J E: Introductory section: a 116-year old story of bacterial protein toxins (1888-2004): from "diphtheritic poison" to molecular toxinology. In: Alouf J E and Popoff M R (Hrsg) *The comprehensive sourcebook of the bacterial protein toxins*, Bd 1, 3., Elsevier Ltd., Burlington USA, San Diego USA, London UK, S. 3-21 (2006)
8. Alouf J E: Bacterial protein toxins. An overview. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 145: 1-26 (2000)
9. Assimon V A, Southworth D R, Gestwicki J E: Specific Binding of Tetratricopeptide Repeat Proteins to Heat Shock Protein 70 (Hsp70) and Heat Shock Protein 90 (Hsp90) Is Regulated by Affinity and Phosphorylation. *Biochemistry*, 54: 7120-7131 (2015)
10. Bang H, Fischer G: Slow conformational changes in protein folding can be accelerated by enzymes. *Biomedica biochimica acta*, 50: S137-42 (1991)
11. Barth H, Aktories K, Popoff M R, Stiles B G: Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common Clostridium and Bacillus proteins. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 68: 373-402, table of contents (2004)
12. Barth H, Blocker D, Aktories K: The uptake machinery of clostridial actin ADP-ribosylating toxins--a cell delivery system for fusion proteins and polypeptide drugs. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 366: 501-512 (2002)
13. Barth H, Blocker D, Behlke J, Bergsma-Schutter W, Brisson A, Benz R, Aktories K: Cellular uptake of Clostridium botulinum C2 toxin requires oligomerization and acidification. *The Journal of biological chemistry*, 275: 18704-18711 (2000)

14. Barth H, Hofmann F, Olenik C, Just I, Aktories K: The N-terminal part of the enzyme component (C2I) of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin interacts with the binding component C2II and functions as a carrier system for a Rho ADP-ribosylating C3-like fusion toxin. *Infection and immunity*, 66: 1364-1369 (1998)
15. Barth H, Preiss J C, Hofmann F, Aktories K: Characterization of the catalytic site of the ADP-ribosyltransferase *Clostridium botulinum* C2 toxin by site-directed mutagenesis. *The Journal of biological chemistry*, 273: 29506-29511 (1998)
16. Barth H, Roebling R, Fritz M, Aktories K: The binary *Clostridium botulinum* C2 toxin as a protein delivery system: identification of the minimal protein region necessary for interaction of toxin components. *The Journal of biological chemistry*, 277: 5074-5081 (2002)
17. Barth H, Stiles B G: Binary actin-ADP-ribosylating toxins and their use as molecular Trojan horses for drug delivery into eukaryotic cells. *Current medicinal chemistry*, 15: 459-469 (2008)
18. Bhakdi S: Microbial toxins. *Wiener klinische Wochenschrift*, 110: 660-668 (1998)
19. Blöcker D, Bachmeyer C, Benz R, Aktories K, Barth H: Channel formation by the binding component of *Clostridium botulinum* C2 toxin: glutamate 307 of C2II affects channel properties in vitro and pH-dependent C2I translocation in vivo. *Biochemistry*, 42: 5368-5377 (2003)
20. Blöcker D, Barth H, Maier E, Benz R, Barbieri J T, Aktories K: The C terminus of component C2II of *Clostridium botulinum* C2 toxin is essential for receptor binding. *Infection and immunity*, 68: 4566-4573 (2000)
21. Blöcker D, Pohlmann K, Haug G, Bachmeyer C, Benz R, Aktories K, Barth H: *Clostridium botulinum* C2 toxin: low pH-induced pore formation is required for translocation of the enzyme component C2I into the cytosol of host cells. *The Journal of biological chemistry*, 278: 37360-37367 (2003)
22. Borel J F: History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. *Wiener klinische Wochenschrift*, 114: 433-437 (2002)
23. Borel J F, Feurer C, Gubler H U, Stahelin H: Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents and Actions*, 6: 468-475 (1976)
24. Buchner J, Weikl T, Bugl H, Pirkl F, Bose S: Purification of Hsp90 partner proteins Hop/p60, p23, and FKBP52. *Methods in enzymology*, 290: 418-429 (1998)
25. Burress H, Taylor M, Banerjee T, Tatulian S A, Teter K: Co- and post-translocation roles for HSP90 in cholera intoxication. *The Journal of biological chemistry*, 289: 33644-33654 (2014)
26. Carroll K C, Bartlett J G: Biology of *Clostridium difficile*: implications for epidemiology and diagnosis. *Annual Review of Microbiology*, 65: 501-521 (2011)

27. Chen S, Sullivan W P, Toft D O, Smith D F: Differential interactions of p23 and the TPR-containing proteins Hop, Cyp40, FKBP52 and FKBP51 with Hsp90 mutants. *Cell stress & chaperones*, 3: 118-129 (1998)
28. Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Cox M B, Riggs D L, Suarez-Quian C, Smith D F: Physiological role for the cochaperone FKBP52 in androgen receptor signaling. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 19: 1654-1666 (2005)
29. Clipstone N A, Crabtree G R: Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature*, 357: 695-697 (1992)
30. D'Andrea L D, Regan L: TPR proteins: the versatile helix. *Trends in biochemical sciences*, 28: 655-662 (2003)
31. Daum S, Schumann M, Mathea S, Aumuller T, Balsley M A, Constant S L, de Lacroix B F, Kruska F, Braun M, Schiene-Fischer C: Isoform-specific inhibition of cyclophilins. *Biochemistry*, 48: 6268-6277 (2009)
32. Denny W B, Valentine D L, Reynolds P D, Smith D F, Scammell J G: Squirrel monkey immunophilin FKBP51 is a potent inhibitor of glucocorticoid receptor binding. *Endocrinology*, 141: 4107-4113 (2000)
33. Dmochewitz L, Lillich M, Kaiser E, Jennings L D, Lang A E, Buchner J, Fischer G, Aktories K, Collier R J, Barth H: Role of CypA and Hsp90 in membrane translocation mediated by anthrax protective antigen. *Cellular microbiology*, 13: 359-373 (2011)
34. Eckhardt M, Barth H, Blocker D, Aktories K: Binding of *Clostridium botulinum* C2 toxin to asparagine-linked complex and hybrid carbohydrates. *The Journal of biological chemistry*, 275: 2328-2334 (2000)
35. Ernst K, Langer S, Kaiser E, Osseforth C, Michaelis J, Popoff M R, Schwan C, Aktories K, Kahlert V, Malesevic M, Schiene-Fischer C, Barth H: Cyclophilin-facilitated membrane translocation as pharmacological target to prevent intoxication of mammalian cells by binary clostridial actin ADP-ribosylated toxins. *Journal of Molecular Biology*, 427: 1224-1238 (2015)
36. Ernst K, Schmid J, Beck M, Hagele M, Hohwieler M, Hauff P, Uckert A K, Anastasia A, Fauler M, Jank T, Aktories K, Popoff M R, Schiene-Fischer C, Kleger A, Muller M, Frick M, Barth H: Hsp70 facilitates trans-membrane transport of bacterial ADP-ribosylating toxins into the cytosol of mammalian cells. *Scientific reports*, 7: 2724-017-02882-y (2017)
37. Falnes P O, Sandvig K: Penetration of protein toxins into cells. *Current opinion in cell biology*, 12: 407-413 (2000)
38. Fischer G, Bang H, Mech C: Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomedica biochimica acta*, 43: 1101-1111 (1984)

39. Fischer G, Wittmann-Liebold B, Lang K, Kiefhaber T, Schmid F X: Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*, 337: 476-478 (1989)
40. Freeman B C, Morimoto R I: The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding. *The EMBO journal*, 15: 2969-2979 (1996)
41. Fritz G, Schroeder P, Aktories K: Isolation and characterization of a *Clostridium botulinum* C2 toxin-resistant cell line: evidence for possible involvement of the cellular C2II receptor in growth regulation. *Infection and immunity*, 63: 2334-2340 (1995)
42. Fruman D A, Klee C B, Bierer B E, Burakoff S J: Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 3686-3690 (1992)
43. Galat A: Peptidylprolyl cis/trans isomerases (immunophilins): biological diversity--targets--functions. *Current topics in medicinal chemistry*, 3: 1315-1347 (2003)
44. Galigniana M D, Echeverria P C, Erlejman A G, Piwien-Pilipuk G: Role of molecular chaperones and TPR-domain proteins in the cytoplasmic transport of steroid receptors and their passage through the nuclear pore. *Nucleus (Austin, Tex.)*, 1: 299-308 (2010)
45. Galigniana M D, Radanyi C, Renoir J M, Housley P R, Pratt W B: Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *The Journal of biological chemistry*, 276: 14884-14889 (2001)
46. Gatsogiannis C, Lang A E, Meusch D, Pfaumann V, Hofnagel O, Benz R, Aktories K, Raunser S: A syringe-like injection mechanism in *Photobacterium luminescens* toxins. *Nature*, 495: 520-523 (2013)
47. Geipel U, Just I, Schering B, Haas D, Aktories K: ADP-ribosylation of actin causes increase in the rate of ATP exchange and inhibition of ATP hydrolysis. *European journal of biochemistry / FEBS*, 179: 229-232 (1989)
48. Gibert M, Petit L, Raffestin S, Okabe A, Popoff M R: *Clostridium perfringens* iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity. *Infection and immunity*, 68: 3848-3853 (2000)
49. Gotherl S F, Marahiel M A: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 55: 423-436 (1999)

50. Grenert J P, Sullivan W P, Fadden P, Haystead T A, Clark J, Mimnaugh E, Krutzsch H, Ochel H J, Schulte T W, Sausville E, Neckers L M, Toft D O: The amino-terminal domain of heat shock protein 90 (hsp90) that binds geldanamycin is an ATP/ADP switch domain that regulates hsp90 conformation. *The Journal of biological chemistry*, 272: 23843-23850 (1997)
51. Gulke I, Pfeifer G, Liese J, Fritz M, Hofmann F, Aktories K, Barth H: Characterization of the enzymatic component of the ADP-ribosyltransferase toxin CDTa from *Clostridium difficile*. *Infection and immunity*, 69: 6004-6011 (2001)
52. Handschumacher R E, Harding M W, Rice J, Drugge R J, Speicher D W: Cyclophilin: a specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. *Science (New York, N.Y.)*, 226: 544-547 (1984)
53. Harding M W, Galat A, Uehling D E, Schreiber S L: A receptor for the immunosuppressant FK506 is a cis-trans peptidyl-prolyl isomerase. *Nature*, 341: 758-760 (1989)
54. Hartl F U: Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381: 571-579 (1996)
55. Haug G, Aktories K, Barth H: The host cell chaperone Hsp90 is necessary for cytotoxic action of the binary iota-like toxins. *Infection and immunity*, 72: 3066-3068 (2004)
56. Haug G, Leemhuis J, Tiemann D, Meyer D K, Aktories K, Barth H: The host cell chaperone Hsp90 is essential for translocation of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin into the cytosol. *The Journal of biological chemistry*, 278: 32266-32274 (2003)
57. Haug G, Wilde C, Leemhuis J, Meyer D K, Aktories K, Barth H: Cellular uptake of *Clostridium botulinum* C2 toxin: membrane translocation of a fusion toxin requires unfolding of its dihydrofolate reductase domain. *Biochemistry*, 42: 15284-15291 (2003)
58. Heine K, Pust S, Enzenmuller S, Barth H: ADP-ribosylation of actin by the *Clostridium botulinum* C2 toxin in mammalian cells results in delayed caspase-dependent apoptotic cell death. *Infection and immunity*, 76: 4600-4608 (2008)
59. Henkel J S, Baldwin M R, Barbieri J T: Toxins from bacteria. *EXS*, 100: 1-29 (2010)
60. Hilger H, Pust S, von Figura G, Kaiser E, Stiles B G, Popoff M R, Barth H: The long-lived nature of *clostridium perfringens* iota toxin in mammalian cells induces delayed apoptosis. *Infection and immunity*, 77: 5593-5601 (2009)
61. Iwasaki M, Ohishi I, Sakaguchi G: Evidence that botulinum C2 toxin has two dissimilar components. *Infection and immunity*, 29: 390-394 (1980)

62. Jakob U, Lilie H, Meyer I, Buchner J: Transient interaction of Hsp90 with early unfolding intermediates of citrate synthase. Implications for heat shock in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 270: 7288-7294 (1995)
63. Kaiser E, Böhm N, Ernst K, Langer S, Schwan C, Aktories K, Popoff M, Fischer G, Barth H: FK506-binding protein 51 interacts with *Clostridium botulinum* C2 toxin and FK506 inhibits membrane translocation of the toxin in mammalian cells. *Cellular microbiology*, 14: 1193-1205 (2012)
64. Kaiser E, Haug G, Hliscs M, Aktories K, Barth H: Formation of a biologically active toxin complex of the binary *Clostridium botulinum* C2 toxin without cell membrane interaction. *Biochemistry*, 45: 13361-13368 (2006)
65. Kaiser E, Kroll C, Ernst K, Schwan C, Popoff M, Fischer G, Buchner J, Aktories K, Barth H: Membrane translocation of binary actin-ADP-ribosylating toxins from *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* is facilitated by cyclophilin A and Hsp90. *Infection and immunity*, 79: 3913-3921 (2011)
66. Kaiser E, Pust S, Kroll C, Barth H: Cyclophilin A facilitates translocation of the *Clostridium botulinum* C2 toxin across membranes of acidified endosomes into the cytosol of mammalian cells. *Cellular microbiology*, 11: 780-795 (2009)
67. Kim P S, Baldwin R L: Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding. *Annual Review of Biochemistry*, 51: 459-489 (1982)
68. Kimura K, Kubota T, Ohishi I, Isogai E, Isogai H, Fujii N: The gene for component-II of botulinum C2 toxin. *Veterinary microbiology*, 62: 27-34 (1998)
69. Krönke M, Leonard W J, Depper J M, Arya S K, Wong-Staal F, Gallo R C, Waldmann T A, Greene W C: Cyclosporin A inhibits T-cell growth factor gene expression at the level of mRNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81: 5214-5218 (1984)
70. Kurazono H, Hosokawa M, Matsuda H, Sakaguchi G: Fluid accumulation in the ligated intestinal loop and histopathological changes of the intestinal mucosa caused by *Clostridium botulinum* C2 toxin in the pheasant and chicken. *Research in veterinary science*, 42: 349-353 (1987)
71. Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685 (1970)
72. Laing S, Koch-Nolte F, Haag F, Buck F: Strategies for the identification of arginine ADP-ribosylation sites. *Journal of proteomics*, 75: 169-176 (2011)
73. Laing S, Unger M, Koch-Nolte F, Haag F: ADP-ribosylation of arginine. *Amino acids*, 41: 257-269 (2011)
74. Lamb J R, Tugendreich S, Hieter P: Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR? *Trends in biochemical sciences*, 20: 257-259 (1995)

75. Lang A E, Ernst K, Lee H, Papatheodorou P, Schwan C, Barth H, Aktories K: The chaperone Hsp90 and PPIases of the cyclophilin and FKBP families facilitate membrane translocation of *Photobacterium luminescens* ADP-ribosyltransferases. *Cellular microbiology*, 16: 490-503 (2014)
76. Lang A E, Schmidt G, Sheets J J, Aktories K: Targeting of the actin cytoskeleton by insecticidal toxins from *Photobacterium luminescens*. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 383: 227-235 (2011)
77. Lang K, Schmid F X, Fischer G: Catalysis of protein folding by prolyl isomerase. *Nature*, 329: 268-270 (1987)
78. Li J, Buchner J: Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. *Biomedical journal*, 36: 106-117 (2013)
79. Li J, Soroka J, Buchner J: The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochimica et biophysica acta*, 1823: 624-635 (2012)
80. Lilie H, Lang K, Rudolph R, Buchner J: Prolyl isomerases catalyze antibody folding in vitro. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 2: 1490-1496 (1993)
81. Liu J, Farmer J D, Jr, Lane W S, Friedman J, Weissman I, Schreiber S L: Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell*, 66: 807-815 (1991)
82. Lubran M M: Bacterial toxins. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 18: 58-71 (1988)
83. Malesevic M, Kuhling J, Erdmann F, Balsley M A, Bukrinsky M I, Constant S L, Fischer G: A cyclosporin derivative discriminates between extracellular and intracellular cyclophilins. *Angewandte Chemie (International ed.in English)*, 49: 213-215 (2010)
84. Marsischky G T, Wilson B A, Collier R J: Role of glutamic acid 988 of human poly-ADP-ribose polymerase in polymer formation. Evidence for active site similarities to the ADP-ribosylating toxins. *The Journal of biological chemistry*, 270: 3247-3254 (1995)
85. Meusch D, Gatsogiannis C, Efremov R G, Lang A E, Hofnagel O, Vetter I R, Aktories K, Raunser S: Mechanism of Tc toxin action revealed in molecular detail. *Nature*, 508: 61-65 (2014)
86. Ni L, Yang C S, Gioeli D, Frierson H, Toft D O, Paschal B M: FKBP51 promotes assembly of the Hsp90 chaperone complex and regulates androgen receptor signaling in prostate cancer cells. *Molecular and cellular biology*, 30: 1243-1253 (2010)
87. Ohishi I: Lethal and vascular permeability activities of botulinum C2 toxin induced by separate injections of the two toxin components. *Infection and immunity*, 40: 336-339 (1983a)

88. Ohishi I: Response of mouse intestinal loop to botulinum C2 toxin: enterotoxic activity induced by cooperation of nonlinked protein components. *Infection and immunity*, 40: 691-695 (1983b)
89. Ohishi I, Iwasaki M, Sakaguchi G: Purification and characterization of two components of botulinum C2 toxin. *Infection and immunity*, 30: 668-673 (1980)
90. Ohishi I, Odagiri Y: Histopathological effect of botulinum C2 toxin on mouse intestines. *Infection and immunity*, 43: 54-58 (1984)
91. Ohishi I, Sakaguchi G: Oral toxicities of *Clostridium botulinum* type C and D toxins of different molecular sizes. *Infection and immunity*, 28: 303-309 (1980)
92. Ohishi I, Tsuyama S: ADP-ribosylation of nonmuscle actin with component I of C2 toxin. *Biochemical and biophysical research communications*, 136: 802-806 (1986)
93. Owens-Grillo J K, Hoffmann K, Hutchison K A, Yem A W, Deibel M R, Jr, Handschumacher R E, Pratt W B: The cyclosporin A-binding immunophilin CyP-40 and the FK506-binding immunophilin hsp56 bind to a common site on hsp90 and exist in independent cytosolic heterocomplexes with the untransformed glucocorticoid receptor. *The Journal of biological chemistry*, 270: 20479-20484 (1995)
94. Pearl L H, Prodromou C: Structure and in vivo function of Hsp90. *Current opinion in structural biology*, 10: 46-51 (2000)
95. Periyasamy S, Hinds T, Jr, Shemshedini L, Shou W, Sanchez E R: FKBP51 and Cyp40 are positive regulators of androgen-dependent prostate cancer cell growth and the targets of FK506 and cyclosporin A. *Oncogene*, 29: 1691-1701 (2010)
96. Pirkl F, Buchner J: Functional analysis of the Hsp90-associated human peptidyl prolyl cis/trans isomerases FKBP51, FKBP52 and Cyp40. *Journal of Molecular Biology*, 308: 795-806 (2001)
97. Popoff M R: Bacterial exotoxins. *Contributions to microbiology*, 12: 28-54 (2005)
98. Popoff M R, Rubin E J, Gill D M, Boquet P: Actin-specific ADP-ribosyltransferase produced by a *Clostridium difficile* strain. *Infection and immunity*, 56: 2299-2306 (1988)
99. Pratt W B, Toft D O: Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 228: 111-133 (2003)
100. Pratt W B, Toft D O: Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine reviews*, 18: 306-360 (1997)

101. Prodromou C, Siligardi G, O'Brien R, Woolfson D N, Regan L, Panaretou B, Ladbury J E, Piper P W, Pearl L H: Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *The EMBO journal*, 18: 754-762 (1999)
102. Pust S, Barth H, Sandvig K: Clostridium botulinum C2 toxin is internalized by clathrin- and Rho-dependent mechanisms. *Cellular microbiology*, 12: 1809-1820 (2010)
103. Ratajczak T, Carrello A: Cyclophilin 40 (CyP-40), mapping of its hsp90 binding domain and evidence that FKBP52 competes with CyP-40 for hsp90 binding. *The Journal of biological chemistry*, 271: 2961-2965 (1996)
104. Ratts R, Zeng H, Berg E A, Blue C, McComb M E, Costello C E, vanderSpek J C, Murphy J R: The cytosolic entry of diphtheria toxin catalytic domain requires a host cell cytosolic translocation factor complex. *The Journal of cell biology*, 160: 1139-1150 (2003)
105. Reuner K H, Presek P, Boschek C B, Aktories K: Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin and disorganizes the microfilament network in intact cells. *European journal of cell biology*, 43: 134-140 (1987)
106. Riggs D L, Roberts P J, Chirillo S C, Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Ratajczak T, Gaber R, Picard D, Smith D F: The Hsp90-binding peptidylprolyl isomerase FKBP52 potentiates glucocorticoid signaling in vivo. *The EMBO journal*, 22: 1158-1167 (2003)
107. Roe S M, Prodromou C, O'Brien R, Ladbury J E, Piper P W, Pearl L H: Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin. *Journal of medicinal chemistry*, 42: 260-266 (1999)
108. Sakurai J, Nagahama M, Hisatsune J, Katunuma N, Tsuge H: Clostridium perfringens iota-toxin, ADP-ribosyltransferase: structure and mechanism of action. *Advances in Enzyme Regulation*, 43: 361-377 (2003)
109. Schering B, Barmann M, Chhatwal G S, Geipel U, Aktories K: ADP-ribosylation of skeletal muscle and non-muscle actin by Clostridium perfringens iota toxin. *European journal of biochemistry / FEBS*, 171: 225-229 (1988)
110. Schiene-Fischer C: Multidomain Peptidyl Prolyl cis/trans Isomerases. *Biochimica et biophysica acta*, 1850: 2005-2016 (2015)
111. Schleberger C, Hochmann H, Barth H, Aktories K, Schulz G E: Structure and action of the binary C2 toxin from Clostridium botulinum. *Journal of Molecular Biology*, 364: 705-715 (2006)
112. Schmid F X: Prolyl isomerase: enzymatic catalysis of slow protein-folding reactions. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22: 123-142 (1993)

113. Schmid F X, Mayr L M, Mucke M, Schonbrunner E R: Prolyl isomerases: role in protein folding. *Advances in Protein Chemistry*, 44: 25-66 (1993)
114. Schneider C, Sepp-Lorenzino L, Nimmesgern E, Ouerfelli O, Danishefsky S, Rosen N, Hartl F U: Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 14536-14541 (1996)
115. Schreiber S L, Liu J, Albers M W, Karmacharya R, Koh E, Martin P K, Rosen M K, Standaert R F, Wandless T J: Immunophilin-ligand complexes as probes of intracellular signaling pathways. *Transplantation proceedings*, 23: 2839-2844 (1991)
116. Schulte T W, Akinaga S, Soga S, Sullivan W, Stensgard B, Toft D, Neckers L M: Antibiotic radicicol binds to the N-terminal domain of Hsp90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cell stress & chaperones*, 3: 100-108 (1998)
117. Schumacher R J, Hansen W J, Freeman B C, Alnemri E, Litwack G, Toft D O: Cooperative action of Hsp70, Hsp90, and DnaJ proteins in protein renaturation. *Biochemistry*, 35: 14889-14898 (1996)
118. Schuster M, Schnell L, Feigl P, Birkhofer C, Mohr K, Roeder M, Carle S, Langer S, Tippel F, Buchner J, Fischer G, Hausch F, Frick M, Schwan C, Aktories K, Schiene-Fischer C, Barth H: The Hsp90 machinery facilitates the transport of diphtheria toxin into human cells. *Scientific reports*, 7: 613-017-00780-x (2017)
119. Shall S: ADP-ribosylation reactions. *Biochimie*, 77: 313-318 (1995)
120. Simon N C, Aktories K, Barbieri J T: Novel bacterial ADP-ribosylating toxins: structure and function. *Nature reviews.Microbiology*, 12: 599-611 (2014)
121. Simpson L L: A comparison of the pharmacological properties of Clostridium botulinum type C1 and C2 toxins. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 223: 695-701 (1982)
122. Stechschulte L A, Sanchez E R: FKBP51-a selective modulator of glucocorticoid and androgen sensitivity. *Current opinion in pharmacology*, 11: 332-337 (2011)
123. Sterthoff C, Lang A E, Schwan C, Tauch A, Aktories K: Functional characterization of an extended binding component of the actin-ADP-ribosylating C2 toxin detected in Clostridium botulinum strain (C) 2300. *Infection and immunity*, 78: 1468-1474 (2010)
124. Stiles B G, Blocker D, Hale M L, Guethhoff M A, Barth H: Clostridium botulinum C2 toxin: binding studies with fluorescence-activated cytometry. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 40: 1135-1140 (2002)
125. Stiles B G, Wigelsworth D J, Popoff M R, Barth H: Clostridial binary toxins: iota and C2 family portraits. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 1: 11 (2011)

126. Swanson S K, Born T, Zydowsky L D, Cho H, Chang H Y, Walsh C T, Rusnak F: Cyclosporin-mediated inhibition of bovine calcineurin by cyclophilins A and B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 3741-3745 (1992)
127. Takahashi N, Hayano T, Suzuki M: Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin. *Nature*, 337: 473-475 (1989)
128. Taylor M, Navarro-Garcia F, Huerta J, Burress H, Massey S, Ireton K, Teter K: Hsp90 is required for transfer of the cholera toxin A1 subunit from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *The Journal of biological chemistry*, 285: 31261-31267 (2010)
129. Tsuge H, Nagahama M, Oda M, Iwamoto S, Utsunomiya H, Marquez V E, Katunuma N, Nishizawa M, Sakurai J: Structural basis of actin recognition and arginine ADP-ribosylation by *Clostridium perfringens* iota-toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 7399-7404 (2008)
130. Ueda K, Hayaishi O: ADP-ribosylation. *Annual Review of Biochemistry*, 54: 73-100 (1985)
131. Vandekerckhove J, Schering B, Barmann M, Aktories K: Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates cytoplasmic beta/gamma-actin in arginine 177. *The Journal of biological chemistry*, 263: 696-700 (1988)
132. Walter S, Buchner J: Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angewandte Chemie (International ed.in English)*, 41: 1098-1113 (2002)
133. Wang P, Heitman J: The cyclophilins. *Genome biology*, 6: 226 (2005)
134. Wedemeyer W J, Welker E, Scheraga H A: Proline cis-trans isomerization and protein folding. *Biochemistry*, 41: 14637-14644 (2002)
135. Wegele H, Muller L, Buchner J: Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 151: 1-44 (2004)
136. Wegner A, Aktories K: ADP-ribosylated actin caps the barbed ends of actin filaments. *The Journal of biological chemistry*, 263: 13739-13742 (1988)
137. Weiwad M, Edlich F, Kilka S, Erdmann F, Jarczowski F, Dorn M, Moutty M C, Fischer G: Comparative analysis of calcineurin inhibition by complexes of immunosuppressive drugs with human FK506 binding proteins. *Biochemistry*, 45: 15776-15784 (2006)
138. Wiech H, Buchner J, Zimmermann R, Jakob U: Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature*, 358: 169-170 (1992)
139. Wiedlocha A, Nilsen T, Wesche J, Sorensen V, Malecki J, Marcinkowska E, Olsnes S: Phosphorylation-regulated nucleocytoplasmic trafficking of internalized fibroblast growth factor-1. *Molecular biology of the cell*, 16: 794-810 (2005)

140. Wieggers W, Just I, Muller H, Hellwig A, Traub P, Aktories K: Alteration of the cytoskeleton of mammalian cells cultured in vitro by Clostridium botulinum C2 toxin and C3 ADP-ribosyltransferase. *European journal of cell biology*, 54: 237-245 (1991)
141. Wochnik G M, Ruegg J, Abel G A, Schmidt U, Holsboer F, Rein T: FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 280: 4609-4616 (2005)
142. Zornetta I, Brandi L, Janowiak B, Dal Molin F, Tonello F, Collier R J, Montecucco C: Imaging the cell entry of the anthrax oedema and lethal toxins with fluorescent protein chimeras. *Cellular microbiology*, 12: 1435-1445 (2010)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst herzlich bei Prof. Dr. Holger Barth für die Überlassung des interessanten Themas, die engagierte Betreuung und hilfsbereite Unterstützung bei der lange andauernden Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Kratzer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an Prof. Dr. Fischer für die Bereitstellung der FK506-Bindeproteine. Ein besonderer Dank geht ebenfalls an das Promotionsprogramm „Experimentelle Medizin“ der International Graduate School in Molecular Medicine Ulm für den wissenschaftlichen Austausch, die Anregungen sowie für die finanzielle Unterstützung.

Herzlichst möchte ich mich bei Dr. Eva Kaiser für die geduldige Einführung in die Laborarbeit, die geteilte Erstautorenschaft und die tolle Betreuung bis zu dem wundervollen Grund ihres Gehens bedanken.

Der Arbeitsgruppe Barth danke ich für die unermüdliche Hilfestellung, die Aufmunterung nach Fehlschlägen und die vielen lustigen Stunden, die wir gemeinsam verbracht haben-besonderer Dank geht dabei an Lydia, Ulrike, Joschua, Leonie und Katharina.

Danke an Hanna, ohne die ich diese Doktorarbeit nie angetreten hätte.

Der GNT-Lab-Crew danke ich für die schöne Zeit in und außerhalb des Labors, die offenen Ohren und die wundervollen Donnerstagabende.

Ein großer Dank geht zudem an meine Eltern und meine Schwester für ihre fortwährende Unterstützung, den festen Glauben in meine Fähigkeiten und dafür mir in den Arsch zu treten. Tausend Dank!

Danke dir, liebster Benny, für deine Geduld und den wichtigen Antrieb in der finalen Phase.

Ein riesiges Dankeschön auch an meine Freunde, die mein Gejammer binnen der vielen Jahre vom Beginn bis zur Fertigstellung dieser Arbeit ertragen mussten und dennoch immer für mich da sind.

Ein letzter Dank hiermit auch insbesondere an Jay für den Kaffee am Morgen und die Bereitstellung seiner Wohnung, in der ein großer Teil dieser Arbeit entstand.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name	Böhm
Vorname	Natalie Yvonne
Geburtsort	Bad Homburg vor der Höhe

Ausbildung

10/2006-05/2013	Studium der Humanmedizin, Universität Ulm Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung 2008 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 2013
06/2004	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife Philipp-Reis-Schule, Friedrichsdorf

Berufliche Tätigkeit

Seit 01/2015	Kreisspitalstiftung Weißenhorn, Facharztausbildung Viszeralchirurgie Donauklinik Neu-Ulm 01/2015-01/2016 Stiftungsklinik Weißenhorn seit 02/2016
--------------	---

Lehrtätigkeit

10/2009-09/2013	Tutor für das Wahlfach „Praktikum Sonographie“ im Rahmen des Medizinstudiums als auch für den „Grund- und Refresherkurs Sonographie“ in der ärztlichen Weiterbildung Ausgerichtet von dem Universitätsklinikum Ulm bzw. in Zusammenarbeit mit dem Bundeswehrkrankenhaus Ulm
04/2009-09/2009	Tutor für das „Praktikum Biochemie“ im Rahmen des Medizinstudiums Institut für physiologische Chemie, Universität Ulm
10/2008-04/2009	Tutor für den „Präparierkurs“ im Rahmen des Medizinstudiums sowie für das Wahlfach „Anatomie im Bild“ Institut für Anatomie und Zellbiologie, Universität Ulm

Promotion

- 2018 **Institut für Pharmakologie und Toxikologie,
Universität Ulm**
Titel: Charakterisierung der Interaktion binärer
Bakterientoxine und zellulärer Chaperone
- 10/2009-06/2010 **Stipendium durch die medizinische Fakultät der
Universität Ulm und Teilnahme am
Promotionsprogramm „Experimentelle Medizin“**
Förderung durch die International Graduate School in
Molecular Medicine Ulm

Publikation

***Cellular Microbiology* 2012; 14 (8):1193-205; PMID:22420783**

Kaiser E.[‡], Böhm N.[‡], Ernst K.[‡], Langer S., Schwan C., Aktories K., Popoff M., Fischer G., Barth H.

FK506-binding protein 51 interacts with *Clostridium botulinum* C2 toxin and FK506 inhibits membrane translocation of the toxin in mammalian cells

[‡] authors contributed equally

***Rencontres en Toxinologie* 2011; 19 toxins and ion transfers: 111-113,**

www.sfet.asso.fr

Kaiser E., Ernst K., Kroll C., Böhm N., Barth H.

New aspects on membrane translocation of the poreforming *Clostridium botulinum* C2-toxin