

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

**Charakterisierung der Interaktion zwischen
dem Pertussistoxin und zellulären
Wirtszellchaperonen bzw. Peptidyl-Prolyl-
cis/trans-Isomerasen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen

Fakultät der Universität Ulm

Stephanie Glück

geboren in Sigmaringen

Vorgelegt 2016

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. T. Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Barth
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Frick
Tag der Promotion:	15.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Bakterielle Toxine	1
1.2 AB-Toxine	2
1.3 ADP-Ribosyltransferasen	3
1.4 Das Pertussistoxin von <i>Bordetella pertussis</i>	4
1.5 Chaperone und PPIasen	10
1.6 Inhibitoren	13
1.7 Zielsetzung der Arbeit	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Materialien	17
2.2 Methoden	46
3 Ergebnisse	57
3.1 Vergiftungsversuche mit PT und Iotatoxin	57
3.2 Expression und Aufreinigung von rekombinantem PTS1	63
3.3 Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Untereinheit PTS1	66
3.4 <i>In vitro</i> -Enzymaktivitätstest des aufgereinigten PTS1	67
3.5 Biotinylierung von PTS1	69
3.6 Dot-Blot-Analyse der Interaktion zwischen den Wirtszellfaktoren Hsp90, Hsp70, Hsc70, FKBP51, FKBP52, CypA, Cyp40 mit der enzymatisch aktiven Untereinheit des Pertussistoxins	70
4 Diskussion	73
5 Zusammenfassung	81

6	Literaturverzeichnis	83
---	----------------------------	----

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosindiphosphat
APS.....	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bidest	doppelt destilliertes Wasser
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP.....	cyclisches Adenosinmonophosphat
CDT	Clostridium difficile toxin
CHO.....	Chinese Hamster Ovary
CypA	Cyclophilin A
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT.....	Diphtherietoxin
DTT	Dithiothreitol
E. coli.....	Escherichia coli
ECL	Enhanced Chemiluminescence
ER.....	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
FCS	Fetal Calf Serum
FE	Frühes Endosom
FK506.....	Tacrolimus
FKBP	FK506-binding protein
G _i -Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Chlorwasserstoff
HRP	Horseradish Peroxidase

Hsp70.....	Hitzeschockprotein 70
Hsp90.....	Hitzeschockprotein 90
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB	lysogeny broth
MEM	Minimum Essential Media
N	Nucleus
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH.....	Natriumhydroxid
NFAT.....	nuclear-factor-activating-T-Zell-Rezeptor
PT	Pertussistoxin
PTS1	S1- Untereinheit des Pertussistoxins
RNA.....	Ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
SDS.....	Sodiumdodecylsulfate
SE	spätes Endosom
Strep-POD	Streptavidin-Peroxidase
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGN.....	Trans-Golgi-Netzwerk
Tris.....	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

1.1 Bakterielle Toxine

Viele Erkrankungen wie beispielsweise Cholera, Diphtherie, Tetanus, Botulismus und Pertussis (Keuchhusten) werden durch Bakterien, die Toxine bilden, verursacht.

Bakterielle Toxine werden in zwei Gruppen eingeteilt: Endotoxine und Exotoxine.

Endotoxine sind Bestandteile der Bakterienzellwand und werden nicht von intakten sondern von lysierten Bakterien freigesetzt. Hierzu zählt das Lipopolysaccharid, das in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien enthalten ist und unter anderem den septischen Schock auslöst. Dieses wird durch Lyse des Bakteriums, zum Beispiel durch Antibiotika, freigesetzt und führt hauptsächlich zu einer Aktivierung der angeborenen Immunität [8, 52]. Weitere Vertreter der Endotoxine sind unter anderem das Glycolipid „Cord Factor“ [66], Peptidoglykane [58], doppelsträngige RNA [15] sowie nicht-methylierte DNA [13].

Exotoxine werden aktiv von gramnegativen sowie grampositiven Bakterien sezerniert und somit in das umgebende Medium abgegeben. Sie wirken auch in Abwesenheit des Bakteriums toxisch auf eukaryote Zellen. Die Exotoxine werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkung wiederum in drei Gruppen eingeteilt:

- Zum einen gibt es die porenbildenden Toxine, wie zum Beispiel Streptolysin-O von *Clostridium perfringens*, welche direkt die Oberflächenmembran von Zellen schädigen [9].
- Zu der zweiten Gruppe der Exotoxine gehören Toxine, die an die Oberfläche bzw. an die Oberflächenrezeptoren der Wirtszellen binden und dadurch Veränderungen an diesen auslösen. Dazu gehört zum Beispiel das *Toxic-Schock-Syndrom-Toxin* von *Staphylococcus aureus* [10], welches als Superantigen wirkt. Superantigene führen zu einer massenhaften Aktivierung und Freisetzung von Zytokinen, die zu einer schweren Entzündungsreaktion des Organismus führt [64].
- Die letzte Gruppe umfasst Exotoxine, die in das Zellinnere aufgenommen werden und dort enzymatische Reaktionen katalysieren. Zu diesen gehören auch die AB-Toxine, die im folgenden Absatz näher beschrieben werden.

1.2 AB-Toxine

AB-Toxine sind Proteine, die durch einen gemeinsamen strukturellen Aufbau gekennzeichnet sind. Sie bestehen aus verschiedenen funktionellen Domänen. Die enzymatisch aktive A-Domäne modifiziert im Zytosol ein entsprechendes Substrat, wodurch die Zelle geschädigt wird. Die B-Domäne vermittelt die Bindung und Translokation der A-Domäne in das Zytosol [7].

A- und B- Domäne können gemeinsam auf einer Polypeptid-Kette lokalisiert sein (einkettige AB-Toxine) oder aber auf zwei verschiedenen Proteinen, die nicht miteinander verbunden sind (binäre AB-Toxine). Typische Vertreter einkettiger AB-Toxine sind das Diphtherietoxin [17] und das Pseudomonas Exotoxin A [2]. Bei den binären Toxinen wie dem C2-Toxin von *Clostridium botulinum* oder den Anthraxtoxinen von *Bacillus anthracis* treffen die beiden Komponenten A und B erst auf der Oberfläche ihrer Zielzellen zusammen und vermitteln dann ihre zytotoxische Wirkung [6].

Bei der zellulären Aufnahme bakterieller AB-Toxine unterscheidet man zwei Wege. Die sogenannten „*long-trip*-Toxine“ werden über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen und dann über das trans-Golgi-Netzwerk, sowie den Golgi Apparat retrograd in das endoplasmatische Retikulum transportiert, von wo aus die Translokation der A-Domäne stattfindet. Dies gilt für das Cholera toxin von *Vibrio cholerae* [68] und das Pertussistoxin von *Bordetella Pertussis* [61]. Bei den „*short-trip*-Toxinen“ (z.B. Diphtherietoxin [67]) erfolgt die Translokation bereits nach Rezeptor-vermittelter Endozytose aus Endosomen als Folge einer Ansäuerung der Endosomen durch eine vesikuläre Protonenpumpe (v-ATPase).

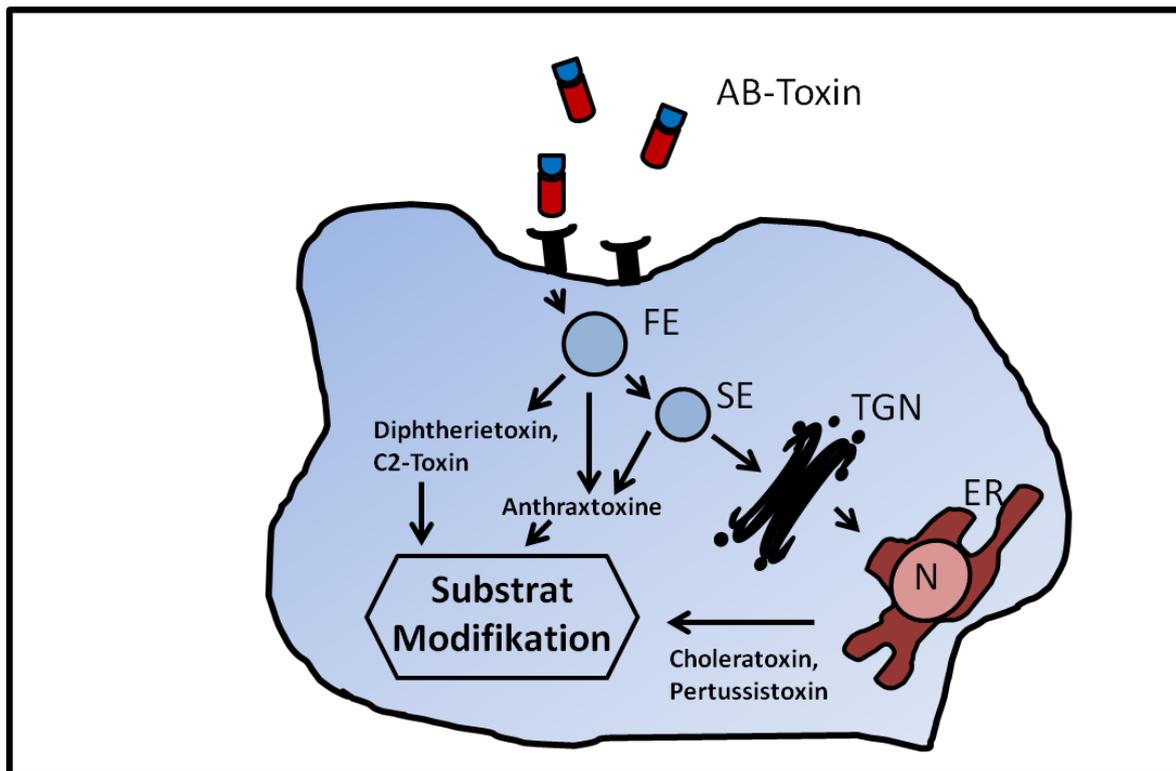


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Translokationszeitpunkte verschiedener AB-Toxine

(nach [7]). FE: Frühes Endosom. SE: Spätes Endosom. TGN: Trans-Golgi-Netzwerk. ER: Endoplasmatisches Retikulum. N: Nucleus. Die bakteriellen Toxine binden mit ihrer Bindungs-Domäne an den jeweiligen Rezeptor und werden anschließend über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen. Die A-Domänen einiger Toxine gelangen aus frühen oder späten Endosomen ins Zytosol, während andere vor der Translokation zuerst retrograd über den Golgi-Apparat zum ER transportiert werden.

1.3 ADP-Ribosyltransferasen

Zahlreiche AB-Toxine entfalten ihre zytotoxische Wirkung durch ADP-Ribosylierung eines zellulären Substrats. Dabei können die ADP-Ribosyltransferasen in verschiedene Gruppen unterteilt werden.

Zum einen gibt es Toxine, die den Elongationsfaktor 2 (eEF2) ADP-ribosylieren und somit die Proteinbiosynthese hemmen [28]. Zu dieser Gruppe gehört unter anderem das Diphtherietoxin.

Toxine, wie das in dieser Arbeit verwendete Pertussistoxin (PT) von *B. pertussis*, katalysieren die ADP-Ribosylierung der alpha-Untereinheit eines heterotrimeren G_i -Proteins [51].

Eine weitere Gruppe bilden die Toxine, die kleine GTPasen wie beispielsweise Rho ADP-ribosylieren. Hierzu zählt das C3-Toxin von *C. botulinum*.

Die letzte Gruppe wird von den Aktin-ADP-ribosylierenden Toxinen gebildet, zu denen beispielsweise das C2-Toxin von *C. botulinum* [1] und das Iotatoxin von *Clostridium perfringens* gehören.

Im Rahmen der ADP-Ribosylierung wird eine ADP-Ribose-Gruppe aus Nikotinsäureamidadenindinukleotid (NAD⁺) kovalent auf eine Aminosäure des jeweiligen spezifischen Substrats übertragen. Diese Übertragung wird durch die enzymatische Untereinheit der Toxine katalysiert und verändert die Eigenschaften des Substrats.

1.4 Das Pertussistoxin von *Bordetella pertussis*

Das Pertussistoxin wird von *B. pertussis* produziert. Bei *B. pertussis* handelt es sich um ein kleines (ca. 0,8 x 0,4 µm), kokkoides, unbewegliches, gramnegatives Stäbchen, welches ausschließlich den Menschen als Wirt hat. Es befällt die zilienträgenden Zellen des menschlichen Respirationstrakts und ruft das Krankheitsbild des Keuchhustens hervor. Die Krankheit durchläuft klassischerweise drei Stadien: *Stadium catarrhale*, *Stadium convulsivum* und *Stadium decrementi*. Das *Stadium catarrhale* wird auch Prodromalstadium genannt und beginnt nach einer Inkubationszeit von 7-14 Tagen mit einer grippeähnlichen Symptomatik wie leichtem Fieber, Schnupfen und trockenem Reizhusten. Im zweiten Stadium treten die typischen Hustenattacken auf, die typischerweise 3-6 Wochen andauern. Im letzten Stadium, dem Stadium decrementi, nehmen die Symptome über einen Zeitraum von weiteren 3-6 Wochen langsam wieder ab [73]. Der Infektionsweg ist aerogen. Die Bakterien können mit Hilfe von Adhäsinen an das Flimmerepithel des Respirationstrakts binden und durch die Freisetzung von Toxinen bzw. weiteren Virulenzfaktoren die Erkrankung auslösen [47]. Aufgrund der unspezifischen Symptome wird die Krankheit bei Erwachsenen oft spät erkannt oder als grippaler Infekt fehldiagnostiziert. Bei Neugeborenen kann sie zu Apnoe, Pneumonie, Enzephalopathie und letztendlich zum Tod führen. Derzeit gibt es keine kausale Therapie. Da die Hustenanfälle durch die von den Bakterien gebildeten Toxinen verursacht werden, kann eine frühe Antibiotikagabe den Krankheitsverlauf lediglich verkürzen oder abmildern. In einem späten Stadium dient die Antibiotikagabe ausschließlich der Verkürzung der Ansteckungsfähigkeit. Die Behandlung mit Makrolidantibiotika wie Azithromycin oder

Clarithromycin stellt den Therapiestandard dar. Zur primären Prophylaxe existiert eine wirksame Impfung. In Kombination mit höheren Impfraten könnte eine verbesserte Therapie deutlich dazu beitragen, die immer noch recht hohen Sterberaten zu senken.

1.4.1 Struktur des Pertussistoxins

Das Pertussistoxin ist ein multimeres AB₅- Toxin mit einem Molekulargewicht von 105 kDa. Es besteht aus den fünf Untereinheiten S1-S5, wobei die S4-Untereinheit zweimal vorkommt. Die S1-Untereinheit (26 kDa) trägt die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität [46, 51]. Das B-Pentamer beinhaltet die Untereinheiten S2, S3, S4 (2 x) und S5 [72]. Die A-Domäne katalysiert die Übertragung eines ADP-Riboserestes auf Cystein 351 der α -Untereinheit eines heterotrimeren G_i-Proteins, während das B-Pentamer für die Bindung des Toxins und Translokation der A-Untereinheit ins Zytosol zuständig ist [74].

Die Struktur des Toxins wird in Abbildung 2 näher erläutert.

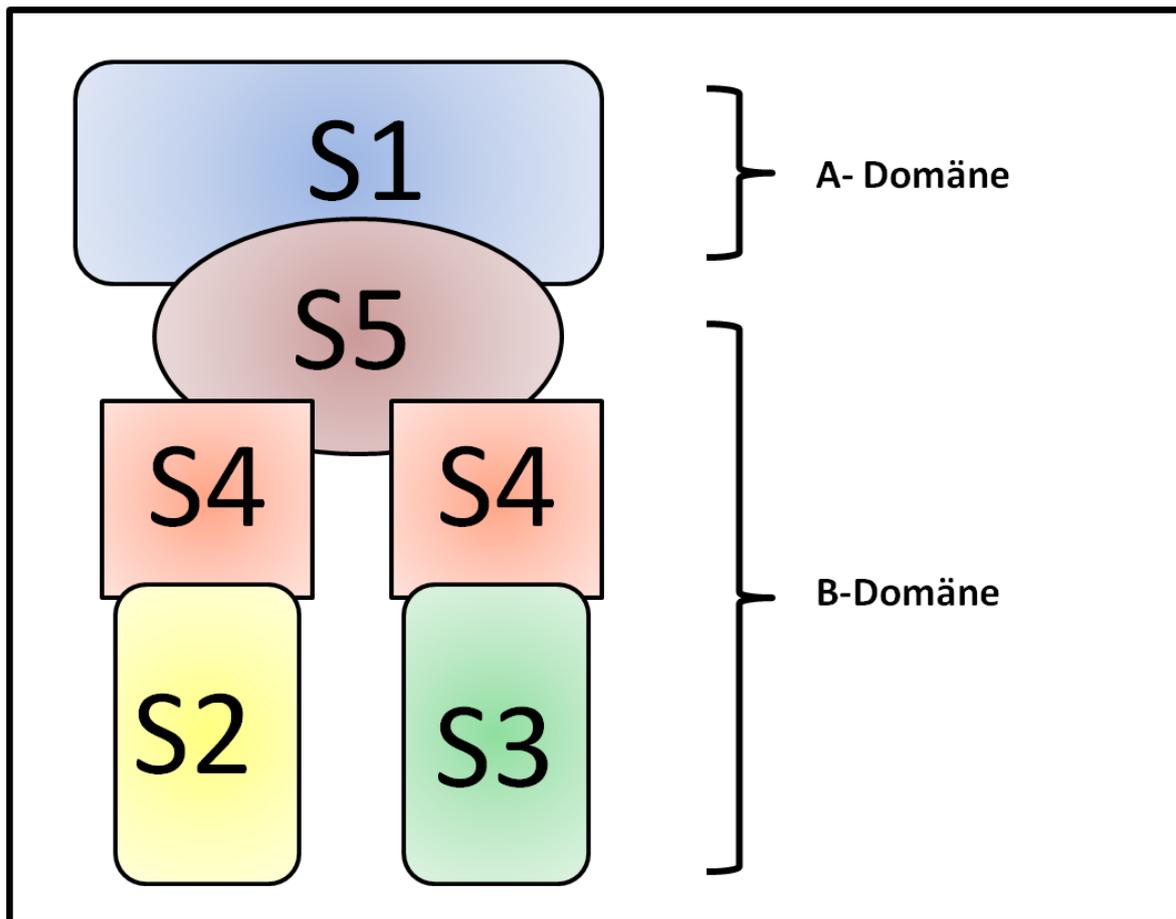


Abbildung 2: Die Struktur des Pertussistoxins

(nach [53]). A-Domäne: Wirkungsdomäne. B-Domäne: Bindungsdomäne. Das Pertussistoxin besteht aus fünf Untereinheiten, welche in einer typischen AB-Struktur angeordnet sind. Die A-Domäne (S1-Untereinheit) befindet sich auf der B-Domäne. Das B-Pentamer besteht aus zwei Dimeren, S2-S4 und S3-S4, die durch die Untereinheit S5 in Verbindung stehen.

Es besteht hohe Sequenzhomologie zwischen der S1-Untereinheit des Pertussistoxins und den katalytischen Untereinheiten anderer ADP-ribosylierenden Toxine, wie beispielsweise dem Cholera toxin, dem Diphtherietoxin und dem Exotoxin A [40]. Der C-Terminus der S1-Untereinheit besteht aus 235 Aminosäuren [49] und ist wichtig für die Interaktion der S1-Untereinheit mit dem B-Pentamer [3]. Die Aminosäurereste 195 bis 204 der S1-Untereinheit sind für die ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit des heterotrimeren $G_{i/o}$ Proteins verantwortlich, während die Reste 220 bis 235 an der Bindung der S1-Untereinheit mit dem B-Pentamer beteiligt sind [49]. An Position 41 und Position 201 enthält die A-Domäne zwei Cystein-Reste, welche im nativen Pertussistoxin Disulfidbrücken bilden. Die Reduktion der Disulfidbrücken, beispielsweise durch

Dithiothreitol, destabilisiert das Toxin und ermöglicht die Dissoziation der enzymatisch aktiven S1-Untereinheit vom B-Pentamer [14]. Außerdem führt auch die Gegenwart von ATP zu einer Dissoziation der S1-Untereinheit vom B-Pentamer [48].

1.4.2 Die zelluläre Aufnahme und Wirkung des Pertussistoxins

Das Pertussistoxin kann mit unterschiedlichen Zielzellen interagieren. Obwohl bisher keine spezifischen Rezeptoren für das Pertussistoxin identifiziert wurden, dienen viele Sialoglycoproteine [4] als Oberflächenrezeptoren. Das Toxin kann auch an Glycoproteine wie Haptoglobin und Fetuin oder an das Glycolipid GD1a binden [35]. Die Bindung des Toxins an einen Rezeptor wird durch das B-Oligomer vermittelt. Nach derzeitigem Stand der Forschung wird angenommen, dass das Toxin durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen wird und retrograd über den Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum transportiert wird [24, 61]. Dort stimuliert ATP die Dissoziation der S1-Untereinheit vom B-Oligomer [37]. Anschließend erfolgt die Translokation der S1-Untereinheit über die Membran des endoplasmatischen Retikulums in das Zytosol.

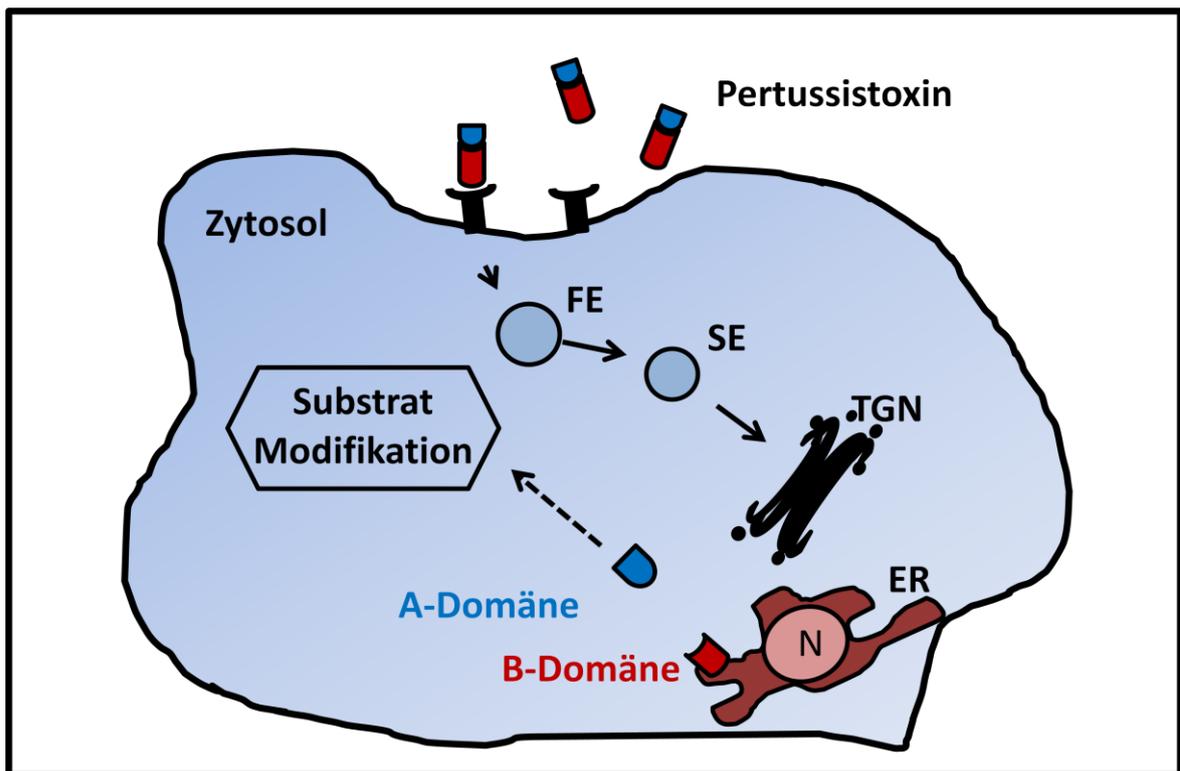


Abbildung 3: Schematische Darstellung der zellulären Aufnahme des Pertussistoxins

(nach [7]). FE: Frühes Endosom. SE: Spätes Endosom. TGN: Trans-Golgi-Netzwerk. ER: Endoplasmatisches Retikulum. N: Nucleus. A-Domäne: Wirkungsdomäne. B-Domäne: Bindungsdomäne. Nach Bindung des Toxins an den Rezeptor und anschließender Endozytose erfolgt ein retrograder Transport über das Trans-Golgi-Netzwerk zum ER. Dort erfolgt die Translokation der A-Untereinheit in das Zytosol.

Es wird vermutet, dass das ERAD-System (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation) an der Translokation der S1-Untereinheit ins Zytosol beteiligt ist. Das ERAD-System erkennt normalerweise fehlgefaltete Proteine über hydrophobe Reste und transportiert diese für den Proteasom-vermittelten Abbau ins Zytosol. Die S1-Untereinheit entgeht diesem Abbau vermutlich durch das Fehlen von Lysinresten, welche als Substrat für das 26S Proteasom gelten [36]. Es wird angenommen, dass auch das Chaperon Hsp90, die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase Cyclophilin A (CypA), sowie das FK506-binding Protein an der Translokation der Enzymkomponente in das Zytosol beteiligt sind. Dies konnte in der Arbeitsgruppe Barth durch den Einsatz spezifischer pharmakologischer Inhibitoren (Radicicol für Hsp90, Cyclosporin A für Cyclophilin A und FK506 für FK506-binding Protein) gezeigt werden, da diese Inhibitoren die Vergiftung von CHO-Zellen durch PT signifikant verzögern [23].

NAD⁺, das ubiquitär in jeder Zelle vorkommt, wird durch das Pertussistoxin in Nicotinamid und ADP-Ribose gespalten und stellt dadurch ADP-Ribose zur Verfügung [41], die im Zytosol von der S1-Untereinheit auf Cystein 351 im C-Terminus der α -Untereinheit eines inaktivierenden G_i-Proteins übertragen wird.

Durch die ADP-Ribosylierung wird die G_i-Protein-vermittelte Signaltransduktion gestört [20]. Da das inhibierende G_i-Protein normalerweise eine Adenylatcyclase inaktiviert, steigt durch seine PT-vermittelte Hemmung die intrazelluläre cAMP-Konzentration deutlich an. Der cAMP-Anstieg kann je nach Wirtszelle beispielsweise zu einer Aktivierung der Inselzellen des Pankreas und zu einer Lymphozytose führen [51].

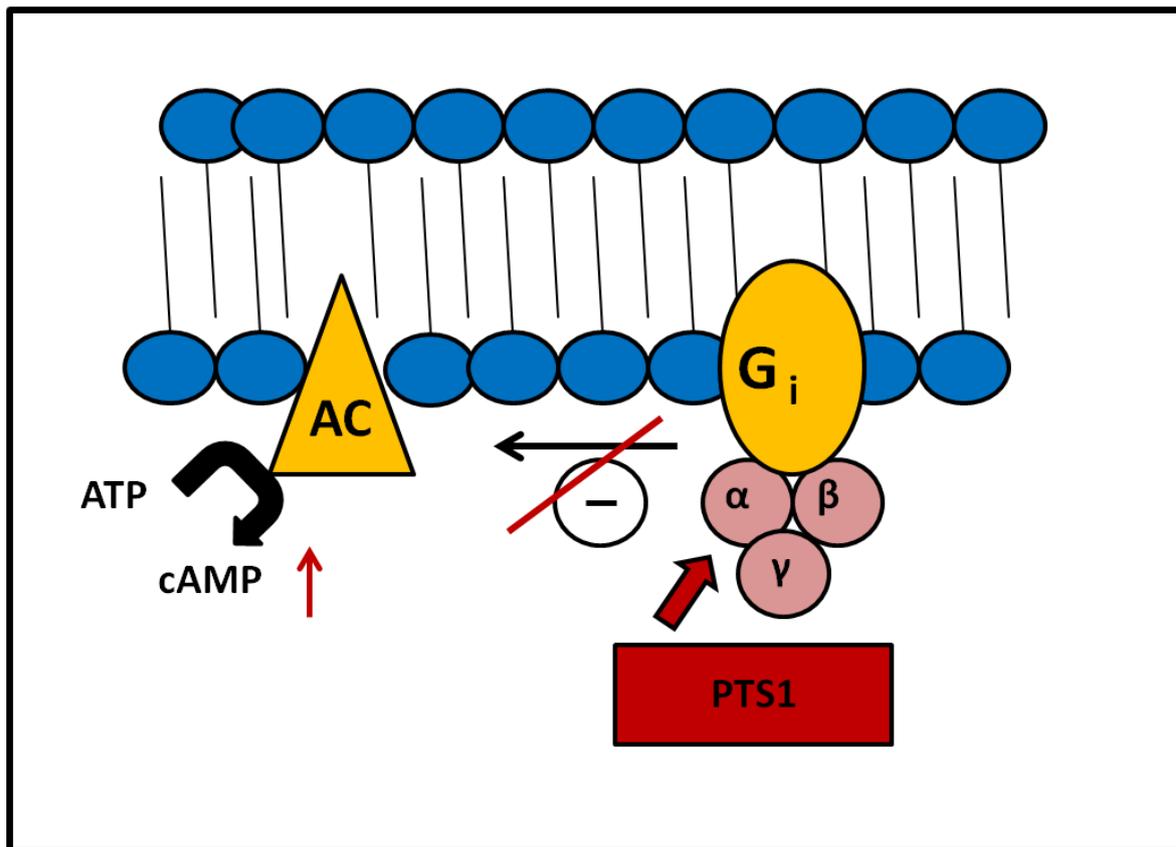


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Folgen der ADP-Ribosylierung von G_i durch PT.

AC: Adenylatzyklase. G_i : inhibitorisches G-Protein. PTS1: S1-Untereinheit des Pertussistoxins. ATP: Adenosintriphosphat. cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat. ADP: Adenosindiphosphat. PT: Pertussistoxin. Die enzymatisch aktive Untereinheit des Pertussistoxins katalysiert die ADP-Ribosylierung eines Cysteinrestes von G_i , welches dann nicht mehr in der Lage ist, seine Funktion als Inhibitor der Adenylatzyklase auszuüben. Dies führt zu einer vermehrten Aktivität der AC und somit zu einem Anstieg von cAMP.

1.5 Chaperone und PPIasen

1.5.1 Beteiligung von Wirtszell-Proteinen an der Membrantranslokation von ADP-ribosylierenden Toxinen

Die Mechanismen der zellulären Aufnahme bakterieller AB-Toxine, insbesondere ihrer Membrantranslokation, sind für viele Toxine noch nicht vollständig geklärt. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass zytosolische Faktoren wie zum Beispiel das Chaperon Hsp90 eine entscheidende Bedeutung für die Translokation der Enzymkomponenten ADP-ribosylierender AB-Toxine haben. Diese Wirtszell-Proteine spielen bei der Faltung, der Rückfaltung und dem Transport von Proteinen über Membranen eine Rolle. Für viele

dieser zytosolischen Faltungshelfer sind spezifische pharmakologische Inhibitoren bekannt, die nachfolgend näher beschrieben werden.

1.5.2 Hsp90

Hsp90 gehört mit seinem Molekulargewicht von 90 kDa zur Familie der Hitzeschockproteine. Hsp90 Proteine kommen ubiquitär in allen eukaryotischen Zellen vor und zählen mit einem Gehalt von 1-2% im Zytosol zu den am häufigsten vorkommenden Proteinen, den sog. *High-Abundant-Proteins* [18]. Ihre Funktion besteht darin neusynthetisierte Polypeptidketten zu dreidimensionalen Proteinen zu falten [30, 69, 71], diese zu aktivieren und über Membranen beziehungsweise durch das ER und den Golgi-Apparat zu transportieren. Auch die Vermeidung von Aggregationen ungefalteter Proteine gehört zu den Aufgaben der Hitzeschockproteine [42, 80]. Außerdem spielen sie auch eine Rolle bei dem proteolytischen Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System [79]. Die Hitzeschockproteine wurden ursprünglich im Zusammenhang mit Hitze als Stressfaktor entdeckt. Heute ist bekannt, dass die Hitzeschockproteine unter zellulären Stressbedingungen als adaptiver Prozess vermehrt exprimiert werden, um die Überlebenschancen der Zellen zu erhöhen. Die Funktion von Hsp90 ist ATP-abhängig [59]. Durch die Bindung von ATP an die N-terminale Domäne geht der Hsp90 Komplex von der offenen inaktiven Konformation in eine aktive geschlossene Konformation über. Erst dann kann Hsp90 seine Funktion ausüben [21, 63].

2003 wurde erstmals die Beteiligung von Hsp90 an der zellulären Aufnahme von AB-Toxinen beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Hsp90 entscheidend an der Membrantranslokation von Diphtherietoxin [65] sowie an der Translokation von C2I beteiligt ist [34]. Dasselbe konnte später auch für das Iotatoxin, das CDT-Toxin, das Cholera toxin und das Pertussistoxin gezeigt werden [33, 44, 75].

1.5.3 Hsp70

Die umfangreichste Klasse der Chaperone wird von der Hsp70-Familie gebildet. Auch Hsp70 konnte wie Hsp90 in nahezu allen Organismen nachgewiesen werden. In Säugetierzellen gibt es zwei Isoformen im Zytoplasma. Die 73 kDa große Form (Hsc70) wird konstitutiv exprimiert während die 72 kDa große Form (Hsp70) vor allem unter

Einwirkung von Hitzestress und toxischen Chemikalien vermehrt exprimiert wird. Die Funktion der Hsp70-Proteine besteht in der de novo Faltung von Proteinen, der Re-Faltung falsch gefalteter oder Hitze-denaturierter Proteine, der Solubilisierung von Proteinaggregaten, der Stabilisierung und Aktivierung von nativen Proteinen sowie dem Transport von Proteinen über Membranen [63, 69, 71]. Auch die Hsp70-Proteine arbeiten ATP-abhängig. Hsp70 interagiert dabei wahrscheinlich mit den hydrophoben Peptidsegmenten von Proteinen [54]. Die Chaperone Hsp70 und Hsp90 bilden einen Multichaperonkomplex in dem sie mit einem dritten Protein (Hop) verbunden sind. Das Zusammenspiel der beiden Chaperone ist wichtig für deren Funktion [78]. Kürzlich konnte in der Arbeitsgruppe Barth erstmals gezeigt werden, dass Hsp70 auch bei der Membrantranslokation von Diphtherietoxin, Iotatoxin, CDT-Toxin und C2I beteiligt ist.

1.5.4 Cyclophilin A

Cyclophiline gehören zur Enzymklasse der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans* –Isomerasen. Sie katalysieren die Umwandlung zwischen der *cis*- und der *trans*-Form der Prolylpeptidbindung bei Faltungsprozessen [29]. Diese Enzyme sind in der Lage den hohen Energiebedarf (20kcal/mol) der *cis/trans* Isomerisierung zu überwinden und die sehr langsam verlaufende Reaktion zu beschleunigen [77]. Es sind bislang 18 verschiedene Cyclophiline im Menschen bekannt. Sie sind an einer Vielzahl von zellulären Vorgängen beteiligt. Cyclophilin A ist ein 17,7 kDa großes Protein. PPIasen arbeiten mit Hsp90 in einem Komplex.

Heute ist bekannt, dass die Membrantranslokation von C2I aus sauren Endosomen neben Hsp90 und Hsp70 auch von dem Faltungshelferprotein Cyclophilin A [45] und Cyp40 [59] abhängt. Dies konnte auch für das Iotatoxin, das CDT, das LFN-DTA (ein Fusionsprotein, das aus der N-Terminalen Domäne des letalen Faktors und der ADP-Ribosyltransferase von DT besteht) und für das Pertussistoxin gezeigt werden [22, 25, 44]. Der genaue molekulare Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Allerdings gibt es Hinweise, dass diese Wirtszellfaktoren an der Membrantranslokation ins Zytosol beteiligt sind und nicht an anderen Schritten der Toxinaufnahme oder die Enzymaktivität der A-Untereinheit beeinflussen.

1.5.5 FK506-Bindeproteine

Die FKBP's gehören wie die Cyclophiline auch zu den Peptidyl-Prolyl-*cis/trans* – Isomerasen. Somit besitzen sie eine ähnliche Funktion, haben aber eine andere Aminosäuresequenz und Substratspezifität wie die Cyclophiline oder die Parvuline [32, 32]. Es ist bekannt, dass FKBP51 mit seinem Molekulargewicht von 51 kDa an der Membrantranslokation von C2-Toxin, Iotatoxin und CDT beteiligt ist. Es gibt auch erste Hinweise auf eine *In-vitro*-Interaktion von FKBP52 mit dem C2-Toxin [43]. Neueste Ergebnisse deuten auch auf eine Interaktion der FK506-Bindeproteine mit dem Pertussistoxin hin. Eine Interaktion von FKBP12 mit den verschiedensten Toxinen konnte dagegen ausgeschlossen werden, was auf eine spezifische Interaktion hinweist.

1.6 Inhibitoren

Für viele der Chaperone/PPIasen sind spezifische pharmakologische Inhibitoren bekannt, welche die Aufnahme der Toxine in das Zytosol von Säugetierzellen verhindern. Ein Einfluss der Inhibitoren auf die Enzymaktivität oder die ersten Schritte der Toxinaufnahme in die Zellen, wie beispielsweise Rezeptorbindung oder Endozytose, konnten ausgeschlossen werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass die zytosolischen Faktoren (Hsp90, Hsp70, Cyclophilin A, etc.) hauptsächlich an der Membrantranslokation beteiligt sind.

1.6.1 Radicicol

Radicicol ist ein zellgängiger Hsp90-Inhibitor und gehört zu den Makrolidantibiotika. Es wird von *Monosporium bonorden* synthetisiert [19] und bindet an die N-terminale ATP-Bindestelle von Hsp90. Die Interaktion mit Substraten wie beispielsweise Steroid-Rezeptoren [57] und Tyrosinkinasen [12] wird somit verhindert.

1.6.2 VER

VER-155008 ist ein von Adenosin abgeleiteter Hsp70-Inhibitor für welchen als Angriffsstelle die aminoterminalen ATPase-Domäne von Hsp70 beschrieben wurde. [81]

1.6.3 Cyclosporin A

Cyclosporin A ist ein zyklisches Peptid aus elf Aminosäuren und wird aus dem Schlauchpilz *Tolypocladium inflatum* isoliert [11]. CsA wirkt immunsuppressiv und wird deshalb hauptsächlich in der Transplantationsmedizin verwendet, um Abstoßungsreaktionen zu verhindern. Weitere Anwendungsgebiete sind beispielsweise Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und Glomerulonephritis. Cyclosporin bindet an die Prolyl-*cis-trans*-Isomerase Cyclophilin A. In Folge bindet dieser Komplex an Calcineurin und verhindert so die Bindung an den nuclear-factor-activating-T-Zell-Rezeptor (NFAT). NFAT ist ein genregulierendes Protein, welches im Zellkern benötigt wird, um die Transkription von Interleukin-2 zu erhöhen. Somit führt diese Reaktion schließlich zu einer verminderten Ausschüttung von Interleukin-2 und in Folge dessen zu einer reduzierten Aktivierung von T-Helferzellen [16, 70].

Im Zusammenhang dieser Arbeit wurde CsA als spezifischer Inhibitor von Cyclophilin A verwendet.

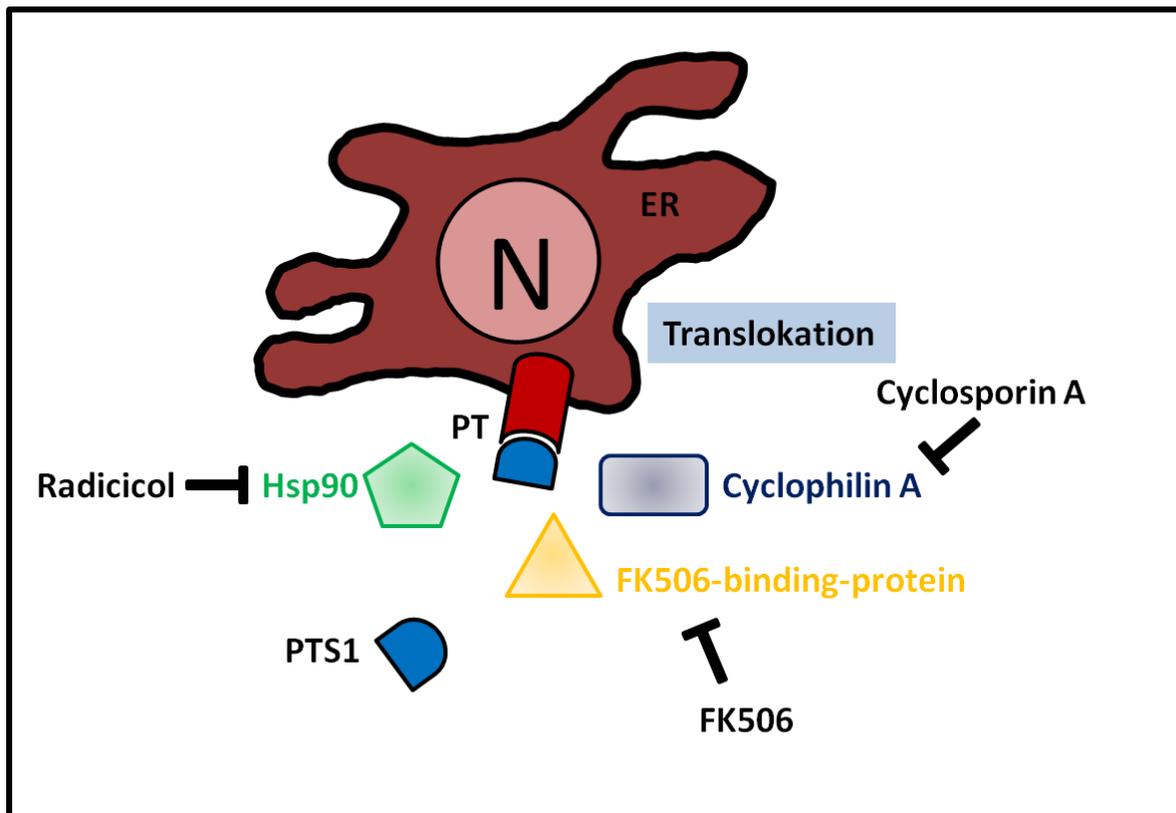


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Beteiligung von Wirtszell-Proteinen an der Membrantranslokation von PT

ER: endoplasmatisches Retikulum. N: Nucleus. PT: Pertussistoxin. Hsp90: Hitzeschockprotein 90. FK506: Tacrolimus. PTS1: S1-Untereinheit des Pertussistoxins. CHO: Chinese Hamster Ovary. Das Chaperon Hsp90, sowie die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen Cyclophilin A und FK506-Bindeproteine sind an der Translokation von PTS1 in das Zytosol beteiligt. Dies konnte durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren (Radicolol für Hsp90, Cyclosporin A für Cyclophilin A und FK506 für FK506 Bindeproteine) gezeigt werden, da diese Inhibitoren die Vergiftung von kultivierten CHO-Zellen durch PT deutlich verzögerten.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Trotz Impfstoff hat die Zahl der Keuchhustenerkrankungen in Europa, den USA und anderen Teilen der Welt in den letzten zwei Jahrzehnten stetig zugenommen. Weltweit werden 50 Millionen Fälle und 300.000 Todesfälle jährlich verzeichnet [60, 82]. Ein vermehrtes Auftreten ist vor allem bei Jugendlichen und Erwachsenen zu beobachten [38]. Dies ist zum einen auf eine abnehmende Impftrate bei Säuglingen zurückzuführen. Zum anderen spielen auch eine reduzierte Immunantwort auf den Impfstoff oder neue, nicht auf den Impfstoff ansprechende, Genotypen von *B. pertussis* eine Rolle. Die Zunahme der Keuchhustenerkrankungen könnte aber auch darin begründet sein, dass infolge neuer diagnostischer Möglichkeiten mehr Fälle entdeckt werden [55, 56, 60].

Da die Keuchhustenfälle trotz Impfstoff ständig zunehmen, wäre es von Vorteil eine kausale Therapie zu haben. Dafür muss jedoch erst der Aufnahmemechanismus und die Wirkungsweise des Pertussistoxins vollständig aufgeklärt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen PT und dem zellulären Chaperon Hsp70 bzw. weiteren Wirtszellproteinen untersucht. Die enzymatisch aktive Untereinheit von PT ADP-ribosyliert bestimmte G-Protein-Untereinheiten im Inneren von Zellen und die dadurch verursachten zellulären Reaktionen lösen beim Menschen den Keuchhusten aus. Grundlage der Untersuchungen sind Ergebnisse der Arbeitsgruppe Barth, welche zeigen, dass verschiedene Bakterientoxine wie clostridiale Aktin-ADP-ribosylierende Toxine, Diphtherietoxin und PT die Aktivitäten des Wirtszellchaperons Hsp90 und von Peptidyl-prolyl *cis/trans* Isomerasen wie Cyclophiline und FK506-Bindeproteine für den Transport ihrer enzymatisch aktiven Untereinheiten über intrazelluläre Membranen in das Zytosol von Zielzellen benötigen [22, 25, 43–45]. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Interaktion mit diesen Chaperonen spezifisch für ADP-ribosylierende Toxine ist [22, 43]. Für bestimmte ADP-ribosylierende Toxine wie Diphtherietoxin, Iotatoxin, CDT-Toxin und C2I konnte neuerdings eine Beteiligung von Hsp70 bei der Membrantranslokation nachgewiesen werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von Zellversuchen untersucht, ob auch die enzymatisch aktive Untereinheit von PT mit Hsp70 interagiert und ob diese Interaktion notwendig für deren Aufnahme in das Zytosol ist. Außerdem wurde untersucht, ob *in vitro* eine Wechselwirkung zwischen der Enzymkomponente von PT und diversen Faltungshelfern besteht. Dies konnte mit der Dot-Blot-Analyse bestimmt werden.

Die Ergebnisse sollen zum besseren Verständnis des zellulären Aufnahmemechanismus von PT beitragen. Darüberhinaus können sie aber auch einen generellen Beitrag zum Verständnis der molekularen Interaktion zwischen ADP-ribosylierenden Bakterientoxinen und Wirtszellchaperonen leisten und zur Entwicklung neuartiger pharmakologischer Strategien zur Therapie Toxin-vermittelter Krankheiten beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Substanzen

Chemikalien	Firma/Herkunft	Ort
2-Propanol	Fluka	Buchs (CH)
Acrylamid /BIS 30%	Roth	Karlsruhe (D)
Agar	Becton Dickinson	Le Pont de Claix (F)
Agarose	Life Technologies GmbH	Darmstadt (D)
Aktivkohle	Sigmar-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (D)
Ampicillin	Serva	Heidelberg (D)
APS	Roth	Karlsruhe (D)
Bacto- Hefeextrakt	AppliChem	Darmstadt D)

Fortsetzung von Tabelle 1 auf Seite 18

Fortsetzung von Tabelle 1 auf Seite 17

Chemikalien	Firma/ Herkunft	Ort
Bacto-Trypton	AppliChem	Darmstadt (D)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (D)
BSA	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH	München (D)
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega GmbH	Mannheim (D)
Complete Protease Inhibitor	Roche	Mannheim (D)
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva	Heidelberg (D)
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva	Heidelberg (D)
Dithiothreitol	Applied Chemicals	Basel (CH)
DMEM	Gibco	Karlsruhe (D)

Fortsetzung von Tabelle 1 auf Seite 19

Fortsetzung von Tabelle 1 auf Seite 18

Chemikalien	Firma/ Herkunft	Ort
DMSO	AppliChem	Darmstadt (D)
ECL-Lösung	AppliChem	Darmstadt (D)
Eisessig	Merck	Darmstadt (D)
Ethanol 99,8% (absolut)	VWR International GmbH	Darmstadt (D)
Ethanol 99,8% (technisch)	VWR International GmbH	Darmstadt (D)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (D)
FCS	Gibco	Karlsruhe (D)
Glycerin (>99,5%)	Roth	Karlsruhe (D)
Glycin	AppliChem	Darmstadt (D)
Hefeextrakt	AppliChem	Darmstadt (D)

Fortsetzung von Tabelle 1 auf Seite 20

Fortsetzung von Tabelle 1 auf Seite 19

Chemikalien	Firma/ Herkunft	Ort
IPTG	AppliChem	Darmstadt (D)
Kaliumchlorid	Roth	Karlsruhe (D)
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (D)
Luminol	AppliChem	Darmstadt (D)
Methanol	Fluka	Buchs (CH)
Milchpulver Blotting Grade	Roth	Karlsruhe
MTS-CellTiter 96®AQ for cell proliferation assay	Promega	Mannheim (D)
Natriumchlorid	AppliChem	Darmstadt (D)
p-Coumarsäure	Sigmar-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (D)
Penicillin	AppliChem	Darmstadt (D)
Ponceau-S	AppliChem	Darmstadt (D)

Fortsetzung von Tabelle 1 auf Seite 21

Fortsetzung von Tabelle 1 auf Seite 20

Chemikalien	Firma/ Herkunft	Ort
Salzsäure	AppliChem	Darmstadt (D)
SDS-Pellets	Roth	Karlsruhe (D)
Strep-POD	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (D)
Streptomycin	Gibco	Karlsruhe (D)
Sulfo-NHS-Biotin	Pierce	Rockford (USA)
TALON Cell Thru Resin	Clontech Laboratories Inc. , A Takara Biocompany	USA
TEMED	Roth	Karlsruhe (D)
Tris	AppliChem	Darmstadt (D)
Trypsin	Sigmar-Aldrich Chemie GmbH	Steinheim (D)

Fortsetzung von Tabelle 1 auf Seite 22

Fortsetzung von Tabelle 1 auf Seite 21

Chemikalien	Firma/ Herkunft	Ort
Tween 2.0	AppliChem	Darmstadt (D)
Wasserstoffperoxid 30%	J. T. Baker	Griesheim (D)
Ziege-anti-Maus IgG- HRP	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (D)
6-Biotin-17-NAD	R&D Systems	Wiesbaden (D)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Die für die Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Material	Firma/Herkunft	Ort
Blotting Papier	Macherey-Nagel	Düren (D)
Deckgläser	Menzel	Braunschweig (D)
Einmalpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Entwickler und Fixierer, RTU60	Adefo Chemie	Dietzenbach (D)

Fortsetzung von Tabelle 2 auf Seite 23

Fortsetzung von Tabelle 2 auf Seite 22

Material	Firma/Herkunft	Ort
Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrat	Milipore	Schwalbach (D)
Medical X-ray Film Cronex 5, 100 NIF	AGFA	Köln (D)
Nitrozellulose- Transfer- Membran	Whatman	Dassel (D)
NucleoSpin® Plasmid	Macherey Nagel	Düren (D)
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH	St. Leon-Rot (D)
Parafilm "M"	American National Can	Greenwich (USA)
Pipettenspitzen (1000µl)	Greiner BIO-One	Solingen (D)
Pipettenspitzen (10µl, 200µl)	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Polystyrol Küvetten	Sarstedt	Nümbrecht (D)
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5 ml, 2ml)	Sarstedt	Nümbrecht (D)

Fortsetzung von Tabelle 2 auf Seite 24

Fortsetzung von Tabelle 2 auf Seite 23

Material	Firma/ Herkunft	Ort
Vivaspin 500	Sartorius AG	Göttingen (D)
Zellkulturflächen	TPP	Trasadingen (CH)
Zellkulturplatten (12-Well, 24-Well)	TPP	Trasadingen (CH)
Zellkulturschalen (d= 10cm)	TPP	Trasadingen (CH)
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50 ml)	TPP	Trasadingen (CH)

2.1.3 Geräte

In nachfolgender Tabelle 3 sind alle verwendeten Geräte aufgeführt.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Firma/ Herkunft	Ort
Autoklav	Webeco	Stuttgart (D)
Biocel Mili-Q	Milipore	Schwalbach (D)
Blotter Perfect Blue Semi - Dry	peqLab Biotech GmbH	Erlangen (D)

Fortsetzung von Tabelle 3 auf Seite 25

Fortsetzung von Tabelle 3 auf Seite 24

Gerät	Firma/ Herkunft	Ort
Brutschrank	Binder	Tuttlingen (D)
Einschweißgerät Severin Filio	Severin	Sundern (D)
Eismaschine	ZIGERA Eismaschinen	Isernhagen (D)
Electrophoresis Power Supply EPS 601	Amersham Bioscience	Freiburg (D)
ELISA Reader EL 340 Microplate	Bio Tek Instruments	Winooski (USA)
Eppendorf Centrifuge 5415 D	Eppendorf	Hamburg (D)
Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf	Hamburg (D)
Gefrierschrank -20°C	Liebherr	Ochsenhausen (D)
Gefrierschrank Hera freeze (-80 °C)	Heraeus	Hanau (D)

Fortsetzung von Tabelle 3 auf Seite 26

Fortsetzung von Tabelle 3 auf Seite 25

Gerät	Firma/ Herkunft	Ort
Gelkammer 8cm x 10cm	Werkstatt der Universität Ulm	Ulm (D)
Gelkammer PerfectBlue Doppelglassystem Twin ExW S	peqLab Biotech GmbH	Erlangen
Inkubationsschüttler CERTOMAT ® BS-1,H	Sartorius	Göttingen (D)
J2-HS Centrifuge	Beckman Coulter GmbH	Fullerton (USA)
Kühlschrank	Bosch	Giengen (D)
Magnetrührer IKA-RET basic C	IKA Werke	Staufen (D)
Megafuge 1.0	Heraeus	Hanau (D)
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss	Jena (D)
Multikanalpipette Transferpette-8	Brand	Wertheim (D)
pH-Meter ino Lab pH 720	WTW	Weilheim (D)

Fortsetzung von Tabelle 3 auf Seite 27

Fortsetzung von Tabelle 3 auf Seite 26

Gerät	Firma/ Herkunft	Ort
Pipette Eppendorf Reference	Eppendorf	Hamburg (D)
Pipette Pipetman	Gilson	Limburg (D)
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences	Fernwald (D)
Plattform Schüttler Unimax 2010	Heidolph	Schwabach (D)
Rotationsschüttler REAX 2	Heidolph	Schwabach (D)
Scanner Epson Perfection 2480	Seiko Epson Corporation	Meerbusch (D)
SDS-PAGE Gellaufkammer	Peqlab Biotech GmbH	Erlangen (D)
Sicherheitsbank HERASafe HS 12	Heraeus	Hanau (D)
Sonifizierer B-12	Branson	Dietzenbach (D)
Spectrophotometer DU 640	Beckman Coulter GmbH	Fullerton (USA)
Thermomixer Comfort	Eppendorf	Hamburg (D)

Fortsetzung von Tabelle 3 auf Seite 28

Fortsetzung von Tabelle 3 auf Seite 27

Gerät	Firma/ Herkunft	Ort
Überkopfschüttler Bio Rotator RS Multi	peqLab Biotech GmbH	Erlangen (D)
Vortexer REAX top	Heidolph	Schwabach (D)
Waage Kern EG	Kern & Sohn GmbH	Balingen (D)
Wasserbad	Bender & Hobein	Bruchsal (D)
Wippe Duomax 1030	Heidolph	Schwabach (D)

2.1.4 Eukaryotische Zelllinien

Die verwendeten eukaryotischen Zelllinien sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Liste der eukaryotischen Zelllinien

Zelllinie	ATTC-Nummer
CHO-K1 Fibroblasten aus den Ovarien des chinesischen Hamsters (Cricetulus griseus)	CCL-61
Vero Nierenepithelzellen der grünen Meerkatze (Chlorocebus sp.)	CCL-81

2.1.5 Antibiotika

In Tabelle 5 sind die in der Arbeit verwendeten Antibiotika dargestellt.

Tabelle 5: Liste der Antibiotika

Antibiotikum	Firma/ Herkunft	Ort
Ampicillin	Serva	Heidelberg (D)
Penicillin	AppliChem	Darmstadt (D)
Streptomycin	Gibco	Karlsruhe (D)

2.1.6 Bakterien

Nachfolgende Tabelle zeigt die in der Arbeit verwendeten Bakterien.

Tabelle 6: Verwendete Bakterien

Bakterium	ATTC-Nummer/Quelle
BL21 E. coli	BAA-1025

2.1.7 Plasmide

Die in Tabelle 7 dargestellten Plasmide wurden in der Arbeit verwendet.

Tabelle 7: Verwendete Plasmide

Plasmid	Firma/ Herkunft	Ort
ptacC180	Dr. J. T. Barbieri	Wisconsin (USA)

2.1.8 Restriktionsendonukleasen

Die in der Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Restriktionsendonukleasen

Enzym	Firma/ Herkunft	Ort
BamH I Restriktionsenzym	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main (D)
Hind III Restriktionsenzym	New England Biolabs GmbH	Frankfurt am Main (D)

2.1.9 Antikörper

Folgende Antikörper wurden in der Arbeit verwendet.

Tabelle 9: Antikörper

Antikörper	Firma/Herkunft	Ort
Bordetella pertussis toxin subunit 1	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (D)
Streptavidin-POD	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (D)
Ziege anti Maus IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg (D)

2.1.10 Toxine

Die in der Arbeit verwendeten Toxine sind in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Liste der Toxine

Toxin	Ursprung	Herkunft
Iotatoxin	Clostridium perfringens	Rekombinante Toxine in E. coli exprimiert und über GST-System aufgereinigt, erhalten von Dr. Michel R. Popoff, Pasteur-Institut, Paris
Pertussistoxin	Bordetella pertussis	Sigma Aldrich Chemie GmbH (D)

2.1.11 Inhibitoren der Toxinfreisetzung

Tabelle 11 zeigt die in der Arbeit verwendeten Inhibitoren der Toxinfreisetzung.

Tabelle 11: Liste der Inhibitoren

Inhibitor	Firma/ Herkunft	Ort
Radicalcol (gelöst in Ethanol)	Sigma-Aldrich	München (D)
VER-155008 (gelöst in DMSO)	Sigma-Aldrich	München (D)
CsA (gelöst in Ethanol)	Fluka	München (D)
FK506 (gelöst in Ethanol)		

2.1.12 Chaperone und PPIasen

Die für die Arbeit verwendeten Chaperone und PPIasen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Chaperone und PPIasen

Inhibitor	Firma/ Herkunft	Ort
CypA	Prof. Dr. Gunter Fischer, Max Planck Research Site for Enzymology of Protein Folding	Halle

Fortsetzung von Tabelle 12 auf Seite 33

Fortsetzung von Tabelle 12 auf Seite 32

Inhibitor	Firma/ Herkunft	Ort
Cyp40	Prof. Dr. Gunter Fischer, Max Planck Research Site fo Enzymology of Protein Folding	Halle
Hsp90	Prof. Dr. Gunter Fischer, Max Planck Research Site fo Enzymology of Protein Folding	Halle
Hsp70	Prof. Dr. Gunter Fischer, Max Planck Research Site fo Enzymology of Protein Folding	Halle
Hsc70	Prof. Dr. Gunter Fischer, Max Planck Research Site fo Enzymology of Protein Folding	Halle

Fortsetzung von Tabelle 12 auf Seite 34

Fortsetzung von Tabelle 12 auf Seite 33

Inhibitor	Firma/ Herkunft	Ort
FKBP51	Prof. Dr. Gunter Fischer, Max Planck Research Site fo Enzymology of Protein Folding	Halle
FKBP52	Prof. Dr. Gunter Fischer, Max Planck Research Site fo Enzymology of Protein Folding	Halle
FKBP12	Prof. Dr. Gunter Fischer, Max Planck Research Site fo Enzymology of Protein Folding	Halle

2.1.13 Lösungen und Puffer

Für die entsprechenden Lösungen und Puffer wurde Aqua bidest. zum Auffüllen sowie HCl und NaOH zur Einstellung des pH-Wertes verwendet

Tabelle 13: Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
ADP-Ribosylierungspuffer (nach Barbieri)	9 mM ATP 1 M Tris-HCL 1 M DTT
Blockierlösung Milchpulver	5% Milchpulver in PBS-T
Coomassie Entfärber	45% Methanol 10% Eisessig
Coomassie Färber	3 mM Coomassie Brilliant Blue R250 45% Methanol 10% Eisessig Das Coomassie wird in Methanol gelöst und 2h gerührt. Danach wird H ₂ O und Eisessig hinzugefügt und eine weitere Stunde gerührt

Fortsetzung von Tabelle 13 auf Seite 36

Fortsetzung von Tabelle 13 auf Seite 35

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
ECL	<p><u>Lösung A</u></p> <p>100 mM Tris-HCL pH 9,0</p> <p>2,5 mM Luminol</p> <p>0,4 mM Cumarsäure</p> <p><u>Lösung B</u></p> <p>100 mM Tris-HCL pH 9,0</p> <p>0,3% (v/v) H₂O₂</p> <p>Die Lösungen A und B werden im Verhältnis 1:1 gemischt und auf die Membran gegeben.</p>
Elutionslösung (5/ 10/ 50/ 100 mM Imidazol mit Complete)	<p>1 M Imidazol</p> <p>1 Tablette 50x complete</p> <p>1X PBS</p>

Fortsetzung von Tabelle 13 auf Seite 37

Fortsetzung von Tabelle 13 auf Seite 36

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Laemmli-Ladepuffer (5x)	625 mM Tris-HCL pH 6,8 20 % SDS 8,5 % Glycerin 0,2 % Bromphenolblau → Zugabe von 10% 1M DTT vor Gebrauch.
PBS (10x)	1,8 mM KH_2PO_4 100 mM KCL 10 mM Na_2HPO_4 138,9 mM NaCl → auf pH 6,8 einstellen
PBS-T (1x)	10 % 10x PBS 0,1 % Tween 20

Fortsetzung von Tabelle 13 auf Seite 38

Fortsetzung von Tabelle 13 auf Seite 37

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Ponceau S Färber	2,6 mM Ponceau S 5 % Eisessig →Gemisch gut rühren
SDS-PAGE Laufgelpuffer (10X)	272 mM Tris 1,92 M Glycin
SDS-PAGE Laufgelpuffer (1x)	10% 10x SDS-PAGE Laufgelpuffer 0,1% SDS
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCL pH 6,8
SDS-PAGE Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCL pH 8,8

Fortsetzung von Tabelle 13 auf Seite 39

Fortsetzung von Tabelle 13 auf Seite 38

Lösung/Puffer	Zusammensetzung
Stripping- Puffer	<u>Puffer A</u> 0,2 M Glycin 0,5 M NaCl pH: 2,0 <u>Puffer B</u> 0,5 M Tris pH: 11,0
TAE Puffer	10mM Tris-HCL pH 7,4 1MM EDTA
Towbin-Puffer	192 mM Tris 25 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol

2.1.14 Kulturmedien

Die während der Arbeit verwendeten Kulturmedien sind in Tabell 14 dargestellt.

Tabelle 14: Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung
CHO-Medium	DMEM + 5% FCS Hams F-12 10 mg/ml Penicillin/Steptomycin
LB-Medium (10x) 1 Liter	100 g Bacto Trypton 50 g Bacto Hefeextrakt 100 g NaCl →Autoklavieren ggf. ab 50°C Antibiotika hinzu geben
LB-Medium (1x)	LB-Medium (10x) 1:9 mit bidest. H ₂ O auffüllen

Fortsetzung von Tabelle 14 auf Seite 41

Fortsetzung von Tabelle 14 auf Seite 40

Medium	Zusammensetzung
MEM (Vero)	MEM + 10% FCS 1,5 g/l Natriumhydrogencarbonat 1 mM Na-Pyruvat 2 mM L-Glutamin 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren 10 mg/ml Penicillin/Steptomycin

2.1.15 SDS-Gele

Die SDS-Gele wurden wie nachfolgend beschrieben hergestellt.

Tabelle 15: SDS-Gele

Gel	Zusammensetzung
Gel 12,5% 17,5 cm x 8 cm x 0,8 mm (2 Gele)	<u>Trenngel (12,5%):</u> 8 ml H ₂ O 6,2 ml Trenngelpuffer 273 µl 10% SDS-Lösung 10,4 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 248 µl 10% Ammoniumperoxiddisulfat-Lösung 25 µl Tetramethylethylendiamin <u>Sammelgel (6%):</u> 8 ml H ₂ O 3,8 ml Sammelgelpuffer 150 µl 10% SDS-Lösung 3 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 150 µl 10% Ammoniumperoxiddisulfat-Lösung 17 µl Tetramethylethylendiamin

Fortsetzung von Tabelle 15 auf Seite 43

Fortsetzung von Tabelle 15 auf Seite 42

Gel	Zusammensetzung
Gel 12,5% 8,5 cm x 6 cm x 1,5 mm (4 Gele)	<u>Trenngel (12,5%):</u> 15,9 ml H ₂ O 12,3 ml Trenngelpuffer 546 µl 10% SDS-Lösung 20,7 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 495 µl 10% Ammoniumperoxiddisulfat-Lösung 40 µl Tetramethylethylendiamin <u>Sammelgel (6%):</u> 5,3 ml H ₂ O 2,5 ml Sammelgelpuffer 100 µl 10% SDS-Lösung 2 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 100 µl 10% Ammoniumperoxiddisulfat-Lösung 13 µl Tetramethylethylendiamin

2.1.16 Molekulargewichtsmarker

Die in der Arbeit verwendeten Molekulargewichtsmarker sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Molekulargewichtsmarker

Marker	Firma/ Herkunft	Ort
DNA SmartLadder	Eurogentec	Köln (D)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)
PageRuler Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific	Waltham (USA)

2.1.17 Software-Programme

In Tabelle 17 sind die verwendeten Software-Programme sowie die jeweiligen Hersteller dargestellt.

Tabelle 17: Software-Programme

Software	Firma/ Herkunft	Ort
Adobe Photoshop CS3 7.0	Adobe Systems Inc.	San Jose (USA)
AxioVision Rel. 4.7	Zeiss	Göttingen (D)
GraphPad Prism 5.01	Statcon	Witzenhausen (D)
ImageJ 1.4.3.67	NIH	Washington (USA)
MS Office 2010	Microsoft Corporation	Richmond (USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung der eukaryotischen Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Vero- und CHO-Zellen sind eukaryotische Zellen und wachsen in Kultur adhärent. Vero-Zellen sind Nierenepithelzellen der grünen Meerkatze (*Chlorocebus sp.*) und CHO-Zellen sind Fibroblasten aus den Ovarien des chinesischen Hamsters (*Cricetulus griseus*). Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde zunächst das jeweilige Medium abgesaugt und dann mit sterilem 1 x PBS (37°C) gewaschen. Die Zellen wurden mittels 2ml 0,25%iger Trypsin-EDTA Lösung von der Zellkulturflasche gelöst. Um das Trypsin zu inaktivieren wurde 8 ml des jeweiligen Nährmediums hinzugegeben. Daraufhin wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die CHO-Zellen wurden nun mit 1000 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Die Verozellen konnten ohne den beschriebenen Zentrifugationsschritt ausgesät werden. Damit die Zellzahl für die Zytotoxizitätsexperimente nicht zu stark variierte, wurde diese mikroskopisch mithilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt und anschließend eine bestimmte Zellzahl in 12-, 24-, sowie 96-Well-Platten ausgesät. Für Versuche am Folgetag wurden 1 x 10⁶ und 5 x 10⁷ Zellen pro 12,5 ml Medium, für Versuche zwei Tage später wurden 3 x 10⁵ Zellen pro 12,5 ml Medium ausgesät. Für die weitere Kultivierung wurde die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:5 für zwei Tage bzw. 1:10 für drei Tage in eine neue Kulturflasche überführt und im Brutschrank gelagert. Es gab maximal 25 Passagen von einer Zellcharge. Die Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in der *Bench Hera Safe* durchgeführt.

2.2.2 Zytotoxizitätsexperimente

Die Vergiftung von CHO-Zellen mit Pertussistoxin bzw. von Vero-Zellen mit Iotatoxin wurde durchgeführt um festzustellen, ob der Inhibitor VER-155008 (Hsp70 Inhibitor) einen Einfluss auf die Vergiftungen hat. Der Inhibitor Radicol (Hsp90 Inhibitor) wurde dabei als Positivkontrolle eingesetzt, da hier bereits ein inhibitorischer Effekt für das Pertussistoxin und auch Iotatoxin bekannt ist.

Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von 7 x 10⁵ Zellen und 1 x 10⁶ Zellen auf eine 12- oder 24-Well-Platte ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂

kultiviert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgesaugt, mit kaltem 1 x PBS gewaschen, und durch frisches Medium ersetzt. Die Inhibitoren wurden in verschiedenen Konzentrationen dann bei 37°C für 30-40 min vorinkubiert.

Danach erfolgte die Vergiftung mit Pertussistoxin mit einer Konzentration von 10ng/ml und 5ng/ml. Nach 1,5h wurde das Medium erneut abgesaugt und durch frisches 37°C warmes Medium ersetzt. Nach 16h bis 24h konnte die veränderte Zellmorphologie beobachtet und fotografisch festgehalten werden. Aus drei Aufnahmen wurde die Zellzahl ermittelt und mit Hilfe von GraphPad Prism 5 graphisch ausgewertet.

Bei der Vergiftung mit Iotatoxin wurde die Morphologie der Verozellen sofort nach Toxinzugabe (50ng/ml Ia und 100ng/ml Ib) in definierten Zeitabständen beobachtet und jeweils drei repräsentative Bildabschnitte gemacht, bei denen das Verhältnis von abgerundeten Zellen zu normalen Zellen bestimmt wurde. Die graphische Auswertung erfolgte ebenfalls mit GraphPad Prism 5.

Die Zytotoxizitätsexperimente wurden wie oben schon beschrieben auch mit weiteren schon bekannten Inhibitoren wie zum Beispiel FK506, CsA und BrefeldinA auf 96-Well-Platten durchgeführt. Anschließend wurde die Morphologie photographisch festgehalten und die Zellviabilität mithilfe des MTS basierten Zellviabilitätstest bestimmt (siehe 2.2.3).

2.2.3 Der MTS-Zellviabilitätstest

Mit dem MTS-Zellviabilitätstest kann die Lebendzellzahl anhand deren Stoffwechselaktivität bestimmt werden. Dabei wird der Farbstoff (3-(4,5)-Dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-Tetrazol (MTS) in das Medium der Zellen gegeben. Dieser wird von lebenden Zellen in wasserlösliches Formazan umgesetzt, welches von Phenazinethosulfat mit Hilfe von NADH und NADPH reduziert wird. Das Formazan ist nun außerhalb der Zellen sichtbar und wird von Licht der Wellenlänge 490 nm absorbiert. Da tote Zellen den MTS Farbstoff nicht umsetzen können, steigt die Menge des umgesetzten Formazans proportional zur Anzahl der lebenden Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen in 96 Well-Platten auf ihre Viabilität untersucht. Dazu wurde 10 µl des MTS-Substrats zu je 100 µl Medium gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank konnte die Absorption mit Hilfe

des EL 340 Microplate Reader (Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland) gemessen werden.

2.2.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse im elektrischen Feld. Das Detergenz SDS denaturiert die Proteine und gibt ihnen eine negative Gesamtladung. Die Proteine haben nun vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften und unterscheiden sich nur noch in ihrer Größe. Aufgrund der negativen Gesamtladung wandern die Proteine beim Anlegen einer Spannung zur Anode. Die Auftrennung erfolgt dadurch, dass kleinere Proteine besser durch die Matrix von Polyacrylamid-Gelen kommen während größere Proteine mehr zurückgehalten werden.

Die Proben wurden zunächst mit 5 x Lämmli-Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt. Das im Ladepuffer enthaltene Dithiothreitol (DTT 10%) führt zur Reduktion von Disulfidbrücken. Dann wurden die Proben zusammen mit einem Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgt in einem Polyacrylamid-Gel, das aus einem Sammel- und einem Trenngel besteht. Die angelegte Spannung und Dauer der Elektrophorese variiert je nach Laufkammer. Danach wurden die Banden mittels weiteren Methoden wie beispielsweise Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (siehe 2.2.5).

2.2.5 Proteinfärbung nach Coomassie

Coomassie ist ein Triphenylmethanfarbstoff der sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren anlagert. Deshalb ist die Coomassie-Färbung eine gut geeignete Methode zur unspezifischen Färbung von Proteinen in einem Polyacrylamid Gel.

Das Gel wurde nach der Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE für 20-30 min bei Raumtemperatur in der Coomassie Färbelösung inkubiert. Im folgenden Arbeitsschritt wurde das Gel so lange mit einer Entfärber-Lösung behandelt bis nur noch die Proteinbanden angefärbt waren, der Hintergrund jedoch fast vollständig farblos war.

2.2.6 Westernblot und Bandenanalyse

Westernblot

Beim Westernblot wurden die in der SDS-PAGE (2.2.4) aufgetrennten Proteine mit Hilfe einer Semi-dry-Blot Apparatur auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend durch verschiedene Reaktionen nachgewiesen. Dazu wurde ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt. Die Bindung der Proteine an die Nitrozellulosemembran erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken. Für den elektrischen Transfer wurden zunächst die Nitrozellulosemembran und das Blotting-Papier in Towbin-Puffer eingelegt und wie in Abbildung 6 geschichtet.

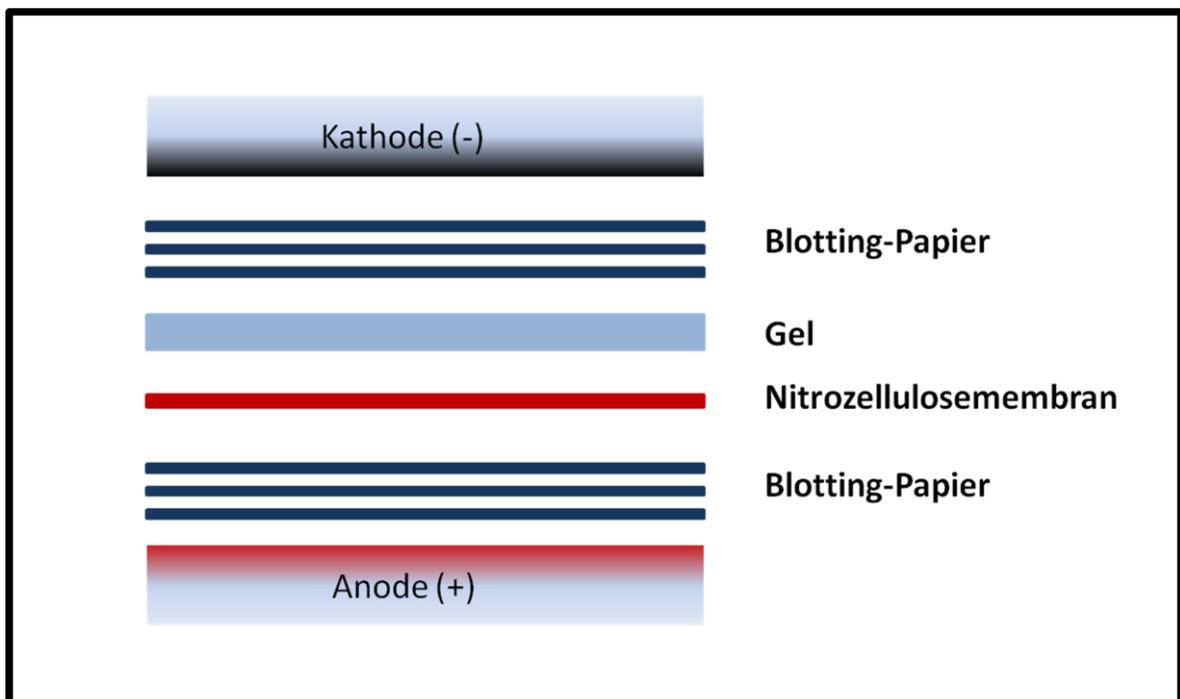


Abbildung 6: Aufbau und Schichtung eines Semi-dry-Blots.

Anschließend erfolgte der Proteintransfer für 1h bei Raumtemperatur und einer Spannung von $1\text{mA}/\text{cm}^3$. Zur Überprüfung des Transfers wurde eine Ponceau-S-Lösung verwendet, die Proteine unspezifisch und reversibel färbt (2.2.7).

Bandenanalyse

Sämtliche Schritte zur weiteren Analyse erfolgten bei Raumtemperatur in Standardblotschalen oder in Folie eingeschweißt. Die Membran wurde mit 5%iger

Milchpulver-PBS-T-Lösung für 30 min bei Raumtemperatur auf der Wippe blockiert. Dann wurde sie mit Primärantikörperlösung auf der Wippe für eine weitere Stunde inkubiert und anschließend für 3 x 5 min auf dem Schüttler mit PBS-T Lösung gewaschen. Es folgte eine weitere Inkubation für 1h mit Sekundärantikörperlösung und weitere Waschschrte, wie zuvor beschrieben. Zur Sichtbarmachung der Banden in der Dunkelkammer wurde die Membran mit *Enhanced Chemiluminescence*-Lösung (ECL-Lösung) behandelt. Das in der Lösung enthaltene Luminol wird mithilfe von H₂O₂ durch die Peroxidase, die sich am Sekundärantikörper bzw. Strep-POD befindet, oxidiert. Der Proteinnachweis erfolgt durch Chemilumineszenz, die durch Auflegen, Belichten und Entwickeln eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden kann.

2.2.7 Ponceau-S-Färbung

Die Ponceau-S-Färbung ist eine Methode zur Färbung von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran. Der Farbstoff bindet an positiv geladene Aminogruppen und führt zu einer reversiblen unspezifischen Färbung. Die Membran wurde für 10 min bei Raumtemperatur in der Ponceau-S-Lösung inkubiert. Das Entfärben mit Wasser wurde solange durchgeführt bis die Proteinbanden gut sichtbar waren.

2.2.8 Strippen von Nitrozellulosemembranen

Das Strippen ist eine Methode zur Entfernung der Antikörper bei bereits inkubierter Nitrozellulosemembran. Dadurch kann dieselbe Membran nochmal mit einem anderen Antikörper inkubiert und detektiert werden. Hierzu wurde die Membran mit PBS-T Lösung gewaschen und mit Stripppuffer A für 5 min bei RT inkubiert. Vor und nach der Inkubation mit Stripppuffer B für weitere 10 min wurde die Membran 20 x mit H₂O gewaschen. Anschließend konnte die Membran wieder mit Milchpulver sowie Primär- und Sekundärantikörper behandelt werden.

2.2.9 Isolierung der enzymatisch aktiven S1-Untereinheit des Pertussistoxins (PTS1) mithilfe eines His-Tag

Retransformation von E-coli mittels Hitzeschock

Als Transformation wird die Übertragung von DNA in kompetente Bakterienzellen bezeichnet. Von einer Retransformation spricht man, wenn die einzuschleusenden Plasmide bereits zu einem früheren Zeitpunkt aus den Bakterienzellen isoliert wurden.

Hier wurde das Plasmid ptacC180 verwendet, welches ein Codon für die His markierte enzymatisch aktive S1-Untereinheit des Pertussistoxins enthält. Dieses wurde in BL21 kompetente E. coli Zellen eingebracht.

Hierzu wurden die BL21 Zellen auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 100ng des Plasmids ptacC180 (5µl) bei 4°C für 15min inkubiert. Um die Aufnahme des Plasmids zu ermöglichen folgte ein Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 90 Sekunden und eine erneute Inkubation bei 4°C für 1-2min. Danach wurde 1ml 1 x LB-Medium hinzugegeben und das Gemisch wurde für 1h bei 37°C auf den Heizblock gestellt. Nun wurden davon 100µl bzw. 900µl auf jeweils eine LB-Agarplatte mit Ampicillin ausgestrichen, die zuvor im Brutschrank auf 37°C erwärmt wurde. Da das Plasmid auch ein Codon für Ampicillinresistenz enthielt, diente das Antibiotikum Ampicillin hier zur Selektion jener Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben. Die Bakterienklone konnten schließlich über Nacht bei 37°C im Brutschrank anwachsen.

Expression von His-PT-S1

Es wurde ein Klon von der Ampicillin-Agarplatte „abgepickt“ und in 5ml 1 x LB-Medium (mit Ampicillin) gegeben, dann über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 50ml Vorkultur pro Liter Hauptkultur angeimpft. Dazu benötigte man für 4 Liter Hauptkultur 200ml 1 x LB-Medium mit Ampicillin und 5 ml der zuvor hergestellten Lösung, die den Klon enthält. Wenn keine Retransformation durchgeführt wurde, konnte die Vorkultur mit einem zuvor angelegten Glycerolstock aus E. coli BL21 und dem Plasmid ptacC180 angeimpft werden. Die Vorkultur wurde wiederum über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Hauptkultur angelegt. Dazu wurde zu einem Liter 1 x LB-Medium 1 ml Ampicillin und 50 ml der über Nacht angewachsenen Vorkultur gegeben. Die Kultur wurde nun bei 37°C für ca. 4h inkubiert bis eine optische Dichte von 0,6-0,8

photometrisch messbar war. Die Induktion der Proteinexpression von PTS1 erfolgte durch 200µl/l IPTG. IPTG ist ein Galactose-Thioglycosid, welches als Aktivator des Lac-Operons in E. coli fungiert, indem es an den Lac Repressor bindet. Für die Expression wurde die Kultur über Nacht bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert.

Aufreinigung und Elution von His-PT-S1

Am nächsten Tag wurde die Kultur dann für 10 min bei 5000rpm und 4°C zentrifugiert um ein Zellpellet zu gewinnen. Das Pellet wurde in 10ml PBS (5mM Imidazol + 1 x Complete) resuspendiert. Dabei dient Complete als Proteaseinhibitor, welcher Peptidasen hemmt und damit den Abbau von Proteinen verhindern kann. Für den Zellaufschluss wurde die Resuspension anschließend 3 mal 30 s mit dazwischen jeweils 30s Pause auf Eis sonifiziert und daraufhin nochmals für 30 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Dadurch wurden nun die festen Zellbestandteile vom Zytosol getrennt. Der Überstand der Zentrifugation wurde dann mit 1 ml Talon® CellThru Resin Beads (Talon-Beads) pro Liter Hauptkultur über Nacht bei 4°C inkubiert. Talon® CellThru Resin Beads enthalten einen vierzähligen Ligand der mit Kobalt als Zentralatom in Verbindung steht. Kobalt hat eine hohe Bindungsaffinität für His markierte Proteine, wodurch das His-PTS1 mit dem Kobalt Ion einen stabilen Chelat-Komplex bildet.

Die Elution des His-PTS1 erfolgte mit Imidazol, das das Histidin des Proteins kompetitiv aus dem Chelat-Komplex verdrängt.

Dazu wurden die Beads zunächst 2 Mal mit 5ml PBS (5mM Imidazol + Complete) gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation der Beads mit einer 10 mM Imidazolösung für 15 min auf dem Überkopfschüttler und Zentrifugation für 2min bei 700g. Derselbe Vorgang wurde für die Konzentrationen 50mM und 100mM Imidazol wiederholt. Der Überstand bei der Zentrifugation enthält nun das His-PTS1.

Die Proteinlösung konnte mit Hilfe einer Vivaspin-Säule konzentriert und umgepuffert werden. Die Vivaspin-Säule wurde einmal mit PBS gespült (10000 g, 5min, 4°C). Anschließend wurden die Proteinlösungen (Fraktionen von 10mM, 50mM und 100mM Imidazol) nacheinander auf die Säule gegeben und erneut bei 10000g und 4°C zentrifugiert. Das aufkonzentrierte Protein wurde mit 100µl PBS von der Säule gelöst, mit 50% Glycerol versetzt und aliquotiert.

Überprüfung der erfolgreichen Expression von His-PTS1

Um zu überprüfen ob His-PTS1 in den jeweiligen Fraktionen vorhanden ist wurden zwischen den Aufreinigungsschritten nach Inkubation mit den Talon-Beads, nach dem Waschen mit 5mM Imidazol und nach dem eluieren mit 10mM/50mM/100mM Imidazol Proben entnommen. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Banden konnten mit Hilfe des Semi-dry-Blots auf eine Membran übertragen werden. Die Anfärbung der Proteine auf der Blotmembran mit Ponceau S erlaubte eine Überprüfung des Proteintransfers und eine Abschätzung der Proteinmengen vor der Immundetektion. Danach wurden die Proteinbanden auf der Membran mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert. Der Primärantikörper (His-anti-mouse) bindet spezifisch an His markierte Proteine. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden mit PBS-T wieder entfernt. Der Sekundärantikörper (goat-anti-mouse) ist ein Antikörper der an den Primärantikörper bindet und dann detektiert werden kann. Zudem kann ein weiterer Primärantikörper verwendet werden, der sich gegen das PTS1 richtet.

Zusätzlich wurde eine Konzentrationsbestimmung von PTS1 und ein Enzymaktivitätstest durchgeführt.

2.2.10 Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Untereinheit PTS1

Um die Proteinkonzentration densitometrisch zu bestimmen, wurde eine BSA Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen auf ein Agarose Gel aufgetragen. Die zu bestimmenden Proteine wurden ebenfalls in verschiedenen Mengen auf dasselbe Gel aufgetragen. Die Proteinbanden wurden mittels einer Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Nach dem Einscannen des Gels wurde eine Kalibriergerade mit Hilfe der BSA Verdünnungsreihe erstellt, durch diese dann die densitometrische Konzentrationsbestimmung mit Photoshop 7,0 erfolgte.

2.2.11 Überprüfung der Enzymaktivität von PTS1

Um zu überprüfen, ob die aufgereinigte PTS1-Untereinheit enzymatisch aktiv ist, wurde ein *In-vitro*-Enzymaktivitätstest durchgeführt. Hierfür wurde ein Ansatz mit ADP-Ribosylierungspuffer nach Barbieri, postnukleärem Überstand aus CHO-Zellen (40ng), Biotin-NAD⁺ (10 µM) und PTS1 (300 ng) hergestellt. Ein weiterer Ansatz ohne PTS1

wurde als Negativkontrolle verwendet. Dabei enthält der postnukleäre Überstand aus CHO-Zellen das von PTS1 zu modifizierende Substrat (G_i). PTS1 katalysiert die Übertragung der Biotin-ADP-Ribose mithilfe des Cosubstrates Biotin-NAD⁺ auf das inhibitorische G_i -Protein.

Die verschiedenen Ansätze wurden für 1h im Heizblock bei 21°C inkubiert. Danach wurde 6,25µl 5 x Lämmli-Ladepuffer mit 10% DTT hinzugegeben. Die Ansätze wurden für 5min bei 95°C erhitzt und anschließend mittels einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden mit einem Semi-dry-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, welche dann für 30min mit 5% Milchpulver geblockt und anschließend mit einem Antikörper gegen Biotin (Streptavidin-POD 1:2500) für 1h inkubiert wurde. Wenn PTS1 aktiv ist wird auf das inhibitorische G-Protein eine Biotin-ADP-Ribose übertragen, an welche dann der Antikörper Streptavidin-POD binden kann. Die Membran wurde 3 Mal 6 min mit PBS-T gewaschen und mit ECL auf einem Röntgenfilm detektiert. Da das inhibitorische G-Protein eine Größe von 41kDa hat, war eine Bande auf dieser Höhe sichtbar.

2.2.12 Biotinylierung von PTS1

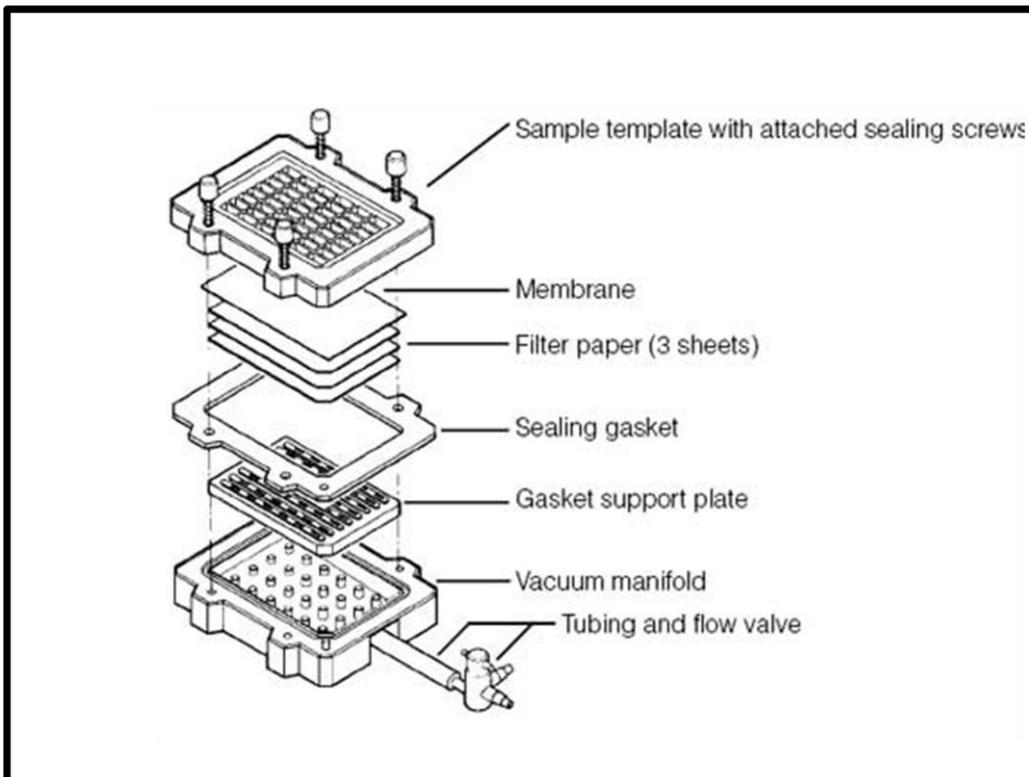
Die enzymatisch aktive Untereinheit von PT wurde zur besseren Detektierbarkeit biotinyliert. Dazu wurde PTS1 zusammen mit einem 20-fachen Überschuss von Sulfo-NHS-Biotin für zwei Stunden auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gemisch auf eine *Micro Bio-Spin® Chromatography* Säule gegeben und zentrifugiert. Das biotinylierte PTS1 trennte sich dadurch von dem nicht gebundenen Sulfo-NHS-Biotin. Die erfolgreiche Biotinylierung wurde anschließend mit Hilfe einer SDS-PAGE und einem Westernblot überprüft. Die Membran wurde hierfür mit Milchpulver geblockt, mit Strep-POD für 1h inkubiert und mit ECL detektiert. Außerdem wurde eine densitometrische Konzentrationsbestimmung wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben durchgeführt.

2.2.13 Dot-Blot-Analyse

Die Dot-Blot-Analyse dient dem Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Dabei wird die zu analysierende Probe ohne elektrophoretische Auftrennung direkt auf die Membran aufgetragen.

In diesem Versuch sollte die In-vitro-Interaktion zwischen den zellulär vorkommenden Hitzeschockproteinen bzw. PPIasen (Hsp90, Hsp70, Hsc70, FKBP51, FKBP52, CypA, Cyp40) und der enzymatisch aktiven Untereinheit des Pertussistoxins untersucht werden. Hierzu wurden die zellulären Proteine in verschiedenen Konzentrationen auf ein Gitter aufgetragen und anschließend mit Hilfe der Dot-Blot-Apparatur durch Anlegen eines Vakuums auf die darunter befindliche Nitrozellulosemembran transferiert.

Mithilfe der Ponceau-S-Färbung wurde überprüft, ob die Übertragung der Proteine gleichmäßig erfolgte. Die Membran wurde dann mit 5% Milchpulver in 1 x PBS-T für 30min inkubiert um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurde die Membran mit 200ng/ml biotinyliertem PTS1 für 1h bei RT auf der Wippe inkubiert und mit PBS-T gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine weitere Inkubation mit Strep-POD für 1h und es folgten weitere Waschschrte mit PBS-T. Im Falle einer Protein-Protein-Interaktion können die gebundenen Toxinkomponenten durch Strep-POD detektiert werden. Dazu wurde die Membran mit ECL behandelt.



2.2.14 **Abbildung 7: Schematische Darstellung des Aufbaus der Dot-Blot-Apparatur** (nach: Bio-Dot® SF Microfiltration Apparatus Instruction Manual)

2.2.15 Statistik

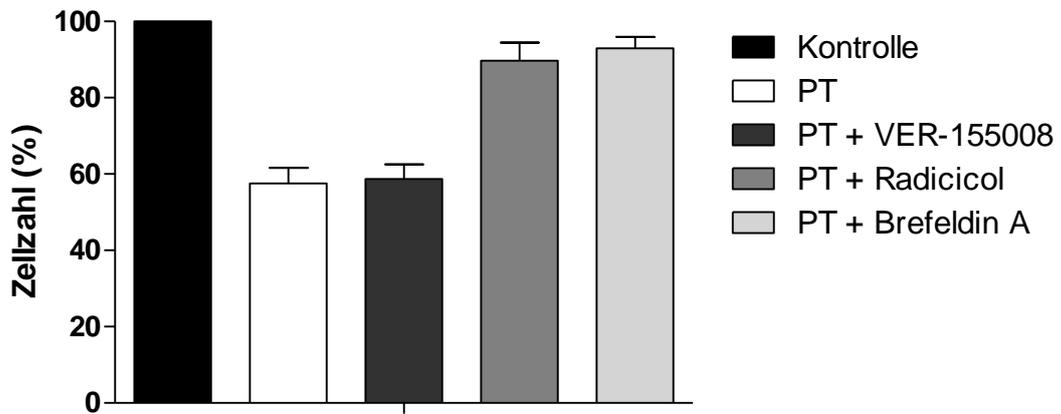
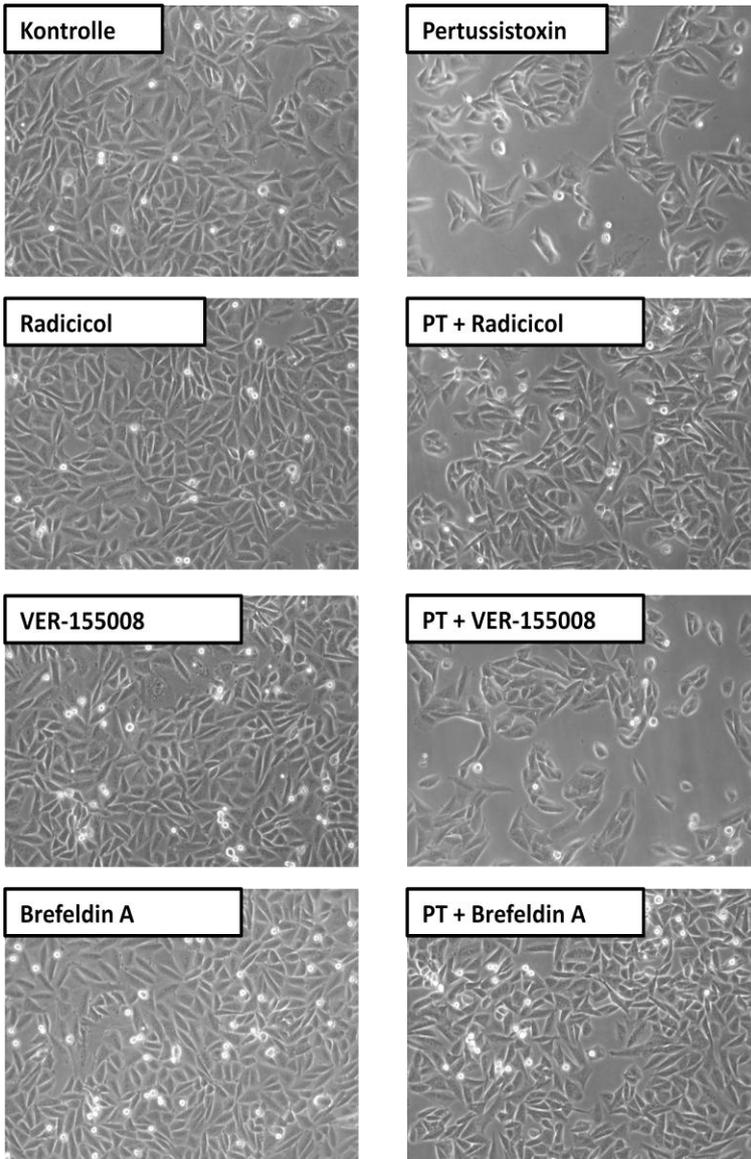
Alle Versuche wurden unabhängig voneinander mindestens zweimal durchgeführt. Die Grafiken und Diagramme im Ergebnisteil dieser Arbeit stellen repräsentative Resultate für die durchgeführten Experimente dar. Für die Densitometrie wurde die Adobe® Photoshop 7.0 Software (Adobe Systems, Incorporated) verwendet. Die statistische Auswertung und Erstellung der Grafiken erfolgte mit Hilfe der Prism®5 Software (GraphPad Software, Incorporated).

3 Ergebnisse

3.1 Vergiftungsversuche mit PT und Iotatoxin

3.1.1 Einfluss des Hsp70-Inhibitors VER-155008 auf die Vergiftung von CHO-Zellen mit Pertussistoxin

Mit diesem Experiment soll geprüft werden, ob der Hsp70-Inhibitor VER-155008 zu einer Hemmung der Vergiftung von CHO-Zellen mit Pertussistoxin führt. Der Hsp90-Inhibitor Radicicol wurde dabei als Positivkontrolle eingesetzt, da hier bereits ein inhibitorischer Effekt für das Pertussistoxin bekannt ist. Als weitere Positivkontrolle wurde Brefeldin A eingesetzt, welches zu einer vollständigen Blockierung des retrograden Transportes des Pertussistoxins führt, da es den Vesikeltransport vom Golgi-Apparat hemmt. Die CHO-Zellen wurden wie in Absatz 2.2.2 beschrieben in einer 12- bzw. 24-Well-Platte kultiviert und mit den Inhibitoren (BrefeldinA, Radicicol und VER-155008) für 30-40 min vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Pertussistoxin mit einer Konzentration von 10ng/ml bzw. 5ng/ml. Nach 12-18h wurde der Vergiftungsverlauf morphologisch beurteilt und fotografisch dokumentiert. Bei der Vergiftung von CHO-Zellen mit PT kommt es nach 12h zu einer charakteristischen Clusterbildung [39]. Der Mechanismus dieser Clusterbildung ist noch nicht bekannt. Jedoch reicht eine relativ geringe Menge PT (1ng/ml) aus, um den Clustereffekt herbeizuführen und die Zellen zu vergiften. Zur quantitativen Bestimmung der Unterschiede zwischen vergifteten Zellen und nicht vergifteten Zellen wurde die Zellzahl anhand der mikroskopischen Bilder bestimmt.



Fortsetzung von Abbildung 8 auf Seite 59

Fortsetzung von Abbildung 8 auf Seite 58

Abbildung 8: Einfluss des Inhibitors VER-155008 auf die Vergiftung von CHO-Zellen mit PT.

Untersuchung am Universitätsklinikum Ulm, 2013-2014, zur Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Pertussistoxin und zellulären Wirtszellchaperonen bzw. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. PT: Pertussistoxin. CHO: Chinese Hamster Ovary. Hsp90: Hitzeschockprotein 90. Hsp70: Hitzeschockprotein 70. CHO-Zellen wurden für 30-40 min mit dem Hsp90-Inhibitor Radicol (10 μ M), dem Hsp70-Inhibitor VER-155008 (30 μ M) und Brefeldin A (10 μ M), welches nachweislich zu einer vollständigen Blockierung des retrograden Transportes des Pertussistoxins führt, vorinkubiert bzw. im Falle der Kontrolle unbehandelt belassen. Anschließend wurde PT (5 ng/ml) hinzugefügt. Die Aufnahmen wurden 12 h nach Toxinzugabe gemacht. Bei der Vergiftung von CHO-Zellen mit PT ist nach 12h eine charakteristische Clusterbildung und eine Reduktion der Zellzahl zu sehen. Es zeigte sich eine Hemmung der PT-Vergiftung durch die Inhibitoren Radicol und Brefeldin A. Bei den mit dem Hsp70 Inhibitor VER-155008 vorbehandelten Zellen zeigte sich bei Vergiftung mit PT weder eine Clusterbildung noch eine Zellzahlreduktion. Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl der Zellen pro Bild in Prozent, wobei die unbehandelten Kontrollzellen auf 100% angenommen wurden. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben (n = 3).

Die Ergebnisse der quantitativen Analyse zeigen eine deutliche Hemmung der PT-Vergiftung durch die Inhibitoren Radicol und Brefeldin A. Allerdings ist im Gegensatz dazu kein Hemmeffekt auf die Vergiftung mit PT durch den Hsp70 Inhibitor VER-155008 sichtbar. Die Inhibitoren alleine zeigen keinen Effekt auf die Zellmorphologie bzw. Zellzahl. Hiermit wurde gezeigt, dass der Inhibitor VER-155008 unter diesen Bedingungen keinen hemmenden Effekt auf die Vergiftung von CHO-Zellen mit PT hat.

Da bereits eine zeitabhängige Verzögerung der Vergiftung von Verozellen mit Iotatoxin durch den Inhibitor VER-155008 bekannt ist, wurden die Versuche zur Absicherung erneut durchgeführt, um auszuschließen, dass der Inhibitor VER-155008 dieser Charge nicht funktionsfähig ist.

3.1.2 Einfluss des Hsp70 Inhibitors VER-155008 auf die Vergiftung von Vero-Zellen mit Iotatoxin

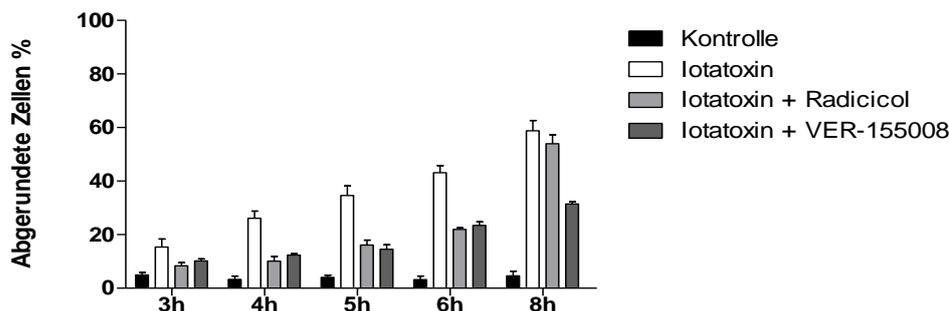
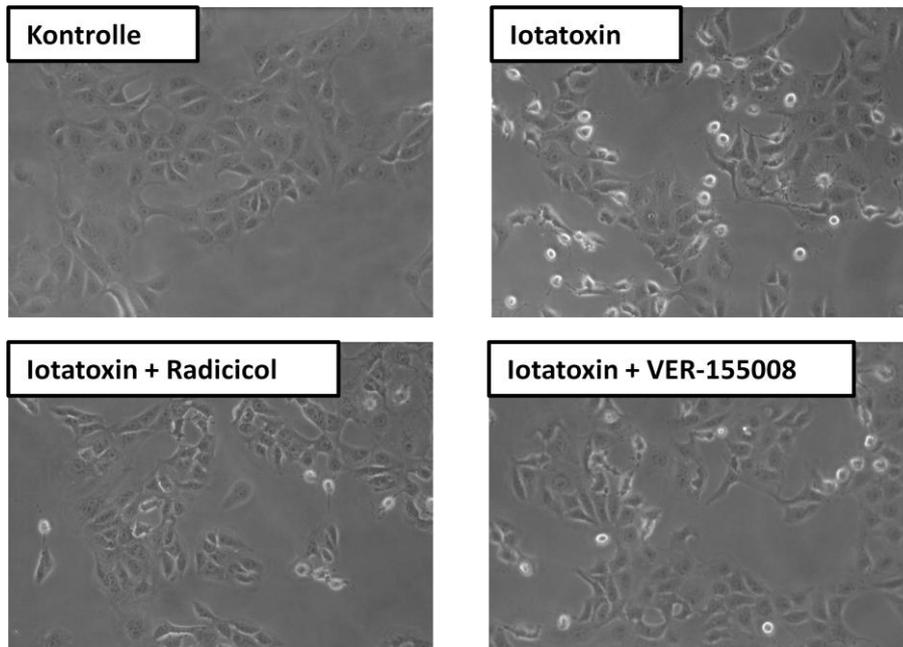


Abbildung 9: Einfluss des Inhibitors VER-155008 auf die Vergiftung von Vero-Zellen mit Iotatoxin

Untersuchung am Universitätsklinikum Ulm, 2013-2014, zur Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Pertussistoxin und zellulären Wirtszellchaperonen bzw. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. Hsp90: Hitzeschockprotein 90. Hsp70: Hitzeschockprotein 70. Dieser Versuch wurde mit Iotatoxin durchgeführt, um die Funktionsfähigkeit von VER-155008 zu überprüfen. Vero-Zellen wurden für 40 min mit dem Hsp90-Inhibitor Radicolol (10 μ M) und dem Hsp70-Inhibitor VER-155008 (30 μ M) inkubiert. Danach wurde Iotatoxin (50 ng/ml Ia und 100 ng/ml Ib) hinzugegeben. Die Kontrollzellen sind unbehandelte Vero-Zellen. Die Morphologie der Zellen ist in den Aufnahmen exemplarisch für den Zeitwert 5h dargestellt. Die Aufnahmen zeigen eine Reduktion der abgerundeten Zellen durch die beiden Inhibitoren VER-155008 und Radicolol bei der Vergiftung von Vero-Zellen mit Iotatoxin. Das Balkendiagramm zeigt die Anzahl runder Zellen in Prozent zu den jeweiligen Zeitpunkten an. Eine verminderte Anzahl runder Zellen zeigt eine Hemmung der Vergiftung.

Wie die Ergebnisse in Abbildung 9 zeigen, ist der Inhibitor VER-155008 funktionsfähig. Die Vergiftung von Vero-Zellen mit Iotatoxin wird sowohl durch den Inhibitor Radicicol als auch VER signifikant gehemmt. Der Hemmeffekt ist jedoch nicht vollständig sondern zeigt eine Verzögerung der Vergiftung mit Iotatoxin.

Somit wurde bestätigt, dass Hsp70 vermutlich an der Translokation des Iotatoxins beteiligt ist. Auf eine Beteiligung von Hsp70 bei der Translokation des Pertussistoxins gibt es unter diesen Bedingungen jedoch keinen Hinweis.

3.1.3 Bestätigung inhibitorischer Effekte von Wirtszellfaktoren auf die Vergiftung von CHO-Zellen mit PT mithilfe des MTS-basierten Zellviabilitätstests

Um die Effekte der Inhibitoren Radicicol, FK506, CsA und Brefeldin A auf die Zellvergiftung durch eine alternative Methode zu bestätigen, wurde ein MTS-Zellviabilitätstest durchgeführt. Hiermit können Aussagen über die Viabilität der behandelten CHO-Zellen getroffen werden. Dazu wurden die Zellen auf 96-Well-Platten ausgesät und am Folgetag mit verschiedenen Inhibitoren 40min vorinkubiert. Danach erfolgte die Vergiftung mit Pertussistoxin mit einer Konzentration von 10 ng/ml. Nach 24 h wurde der MTS-Zellviabilitätstest wie in 2.2.3 beschrieben durchgeführt. Als Positivkontrolle für eine Verringerung der Zellzahl wurde ein Apoptoseinduktor (Staurosporin) verwendet.

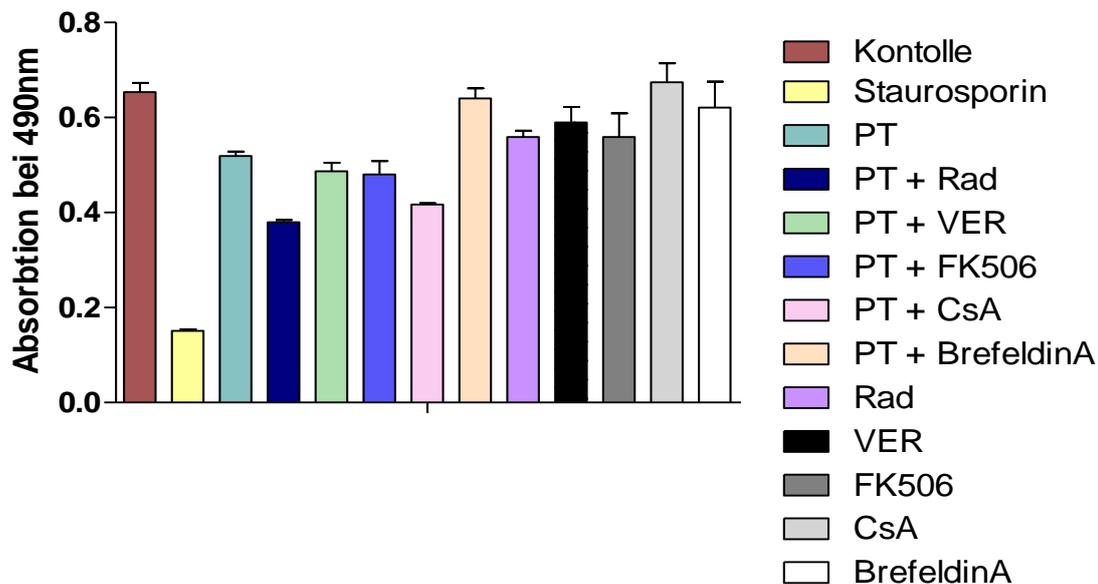


Abbildung 10: Ergebnis des MTS-Zellviabilitätstests zur Untersuchung der inhibitorischen Effekte von Radicol, VER-155008, FK506, CsA und Brefeldin A auf die Vergiftung von PT

Untersuchung am Universitätsklinikum Ulm, 2013-2014, zur Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Pertussistoxin und zellulären Wirtszellchaperonen bzw. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. PT: Pertussistoxin. Rad: Radicol. VER: VER-155008. FK506: Tacrolimus. CsA: Cyclosporin A. CHO: Chinese Hamster Ovary. Hsp90: Hitzeschockprotein 90. Hsp70: Hitzeschockprotein 70. MTS: (3-(4,5)-Dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-Tetrazol. Die CHO-Zellen wurden mit dem Hsp90-Inhibitor Radicol, mit dem Hsp70-Inhibitor VER-155008, mit Cyclosporin A, welches Cyclophilin A hemmt, und mit FK506, ein Inhibitor für das FK506-binding-protein, 40min vorinkubiert und dann für eine Stunde mit PT (10 ng/ml) inkubiert. Staurosporin, ein Apoptoseinduktor, wurde dabei als Positivkontrolle verwendet. Der MTS-Test wurde nach 24h durchgeführt. Die Höhe der Balkendiagramme zeigt die Absorption bei 490 nm. Je höher die Absorption, desto höher die Lebendzellzahl. Die Anzahl der Proben betrug n = 3.

Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, konnte eine deutlich verringerte Zellviabilität bei Staurosporin und eine weniger deutlich verringerte bei PT festgestellt werden. Eine Hemmung der PT-vermittelten Vergiftung durch die Inhibitoren konnte nur bei dem Inhibitor Brefeldin A gezeigt werden. Die Abnahme der Lebendzellzahl durch PT kann also mithilfe des MTS-Zellviabilitätstest quantifiziert werden. Der inhibitorische Effekt von Radicol, FK506 und CsA ist möglicherweise zu gering und ist dadurch im MTS-Test nicht sichtbar.

3.2 Expression und Aufreinigung von rekombinantem PTS1

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die enzymatisch aktive Untereinheit (PTS1) des Pertussistoxins benötigt, um eine *in vitro* Interaktion mit bestimmten Wirtszellfaktoren in der Dot-Blot-Analyse zu untersuchen.

Die Expression und Aufreinigung erfolgte in abgewandelter Form nach Barbieri [5] und ist in 2.2.9 genauer beschrieben.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Expression von His-PTS1, wurden zwischen den einzelnen Schritten der Elution mit Imidazol Proben entnommen, die zunächst auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden. Anschließend wurde ein Western-Blot durchgeführt und es folgte eine Inkubation mit dem α -His-Antikörper. Erwartet wurde eine Bande bei ca. 26 kDa. Zusätzlich sollten die Banden, welche nicht auf 26 kDa laufen abnehmen bzw. nicht mehr sichtbar sein. His-C2I diene als Positivkontrolle für die Detektion und sollte bei ca. 50 kDa zu sehen sein.

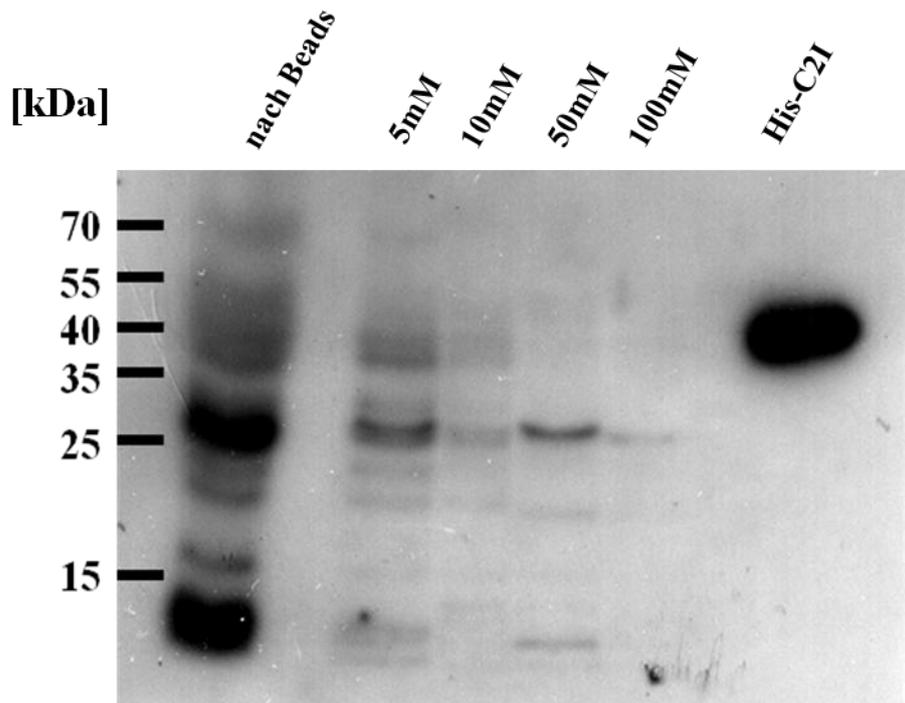


Abbildung 11: Western-Blot Analyse zur Überprüfung der Expression von His-PTS1

Untersuchung am Universitätsklinikum Ulm, 2013-2014, zur Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Pertussistoxin und zellulären Wirtszellchaperonen bzw. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. PT: Pertussistoxin. PTS1: S1-Untereinheit des Pertussistoxins. His: Polyhistidin. SDS: sodium dodecyl sulfate. C2-Toxin: Clostridium botulinum Toxin. Das Plasmid ptacC180, welches ein Codon für die His markierte enzymatisch aktive S1-Untereinheit des Pertussistoxins enthält, wurde durch Transformation in BL21 kompetente E.coli Zellen übertragen. Die Expression von His-PTS1 erfolgte über Nacht. Die Aufreinigung erfolgte mit Talon® CellThru Resin Beads (Talon-Beads), welche einen vierzähligen Ligand enthalten, der mit Kobalt als Zentralatom in Verbindung steht. Kobalt hat eine hohe Bindungsaffinität für His markierte Proteine, wodurch das His-PTS1 mit dem Kobalt Ion einen stabilen Chelat-Komplex bildet. Die Elution des His-PTS1 erfolgte mit Imidazol. Während der Aufreinigung wurden zwischen den einzelnen Elutionsschritten mit 5 mM, 10 mM, 50 mM und 100 mM Imidazol-Lösung Proben entnommen. Von diesen wurden jeweils 5 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Anschließend wurde die Membran mit Milchpulver geblockt und mit einem α-His-Antikörper behandelt. His-PTS1 hat ein Molekulargewicht von 26 kDa. His-C2I (100 ng), welches ein Molekulargewicht von 50 kDa besitzt, wurde als Positivkontrolle verwendet.

Abbildung 11 zeigt wie erwartet nach allen Elutionsschritten eine Bande bei ca. 26 kDa. Somit wurde His-PTS1 erfolgreich exprimiert.

Um das sowohl im Waschpuffer, als auch im Elutionspuffer enthaltene Imidazol zu entfernen, wurde die gereinigte Enzymfraktion mittels einer Vivaspin-Säule umgepuffert.

Nach der Umpufferung wurde erneut mittels SDS-PAGE, Westen-Blot und Antikörperinkubation überprüft, ob das His-markierte PTS1 noch vorhanden ist (Abbildung 12).

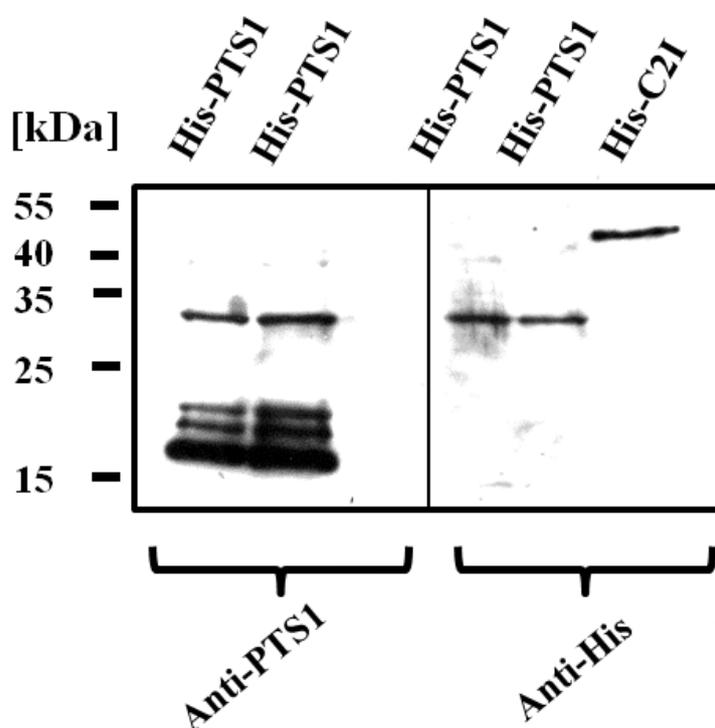


Abbildung 12: Western Blot Analyse zur Detektion von His-PTS1 nach der Entfernung des im Elutionspuffers enthaltenen Imidazols

Untersuchung am Universitätsklinikum Ulm, 2013-2014, zur Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Pertussistoxin und zellulären Wirtszellchaperonen bzw. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. PT: Pertussistoxin. PTS1: S1-Untereinheit des Pertussistoxins. His: Polyhistidin. SDS: sodium dodecyl sulfate. C2-Toxin: Clostridium botulinum Toxin. Das Plasmid ptacC180, welches ein Codon für die His markierte enzymatisch aktive S1-Untereinheit des Pertussistoxins enthält, wurde durch Transformation in BL21 kompetente E.coli Zellen übertragen. Die Expression von His-PT-S1 erfolgte über Nacht. Die Aufreinigung erfolgte mit Talon® CellThru Resin Beads (Talon-Beads). Die Elution des His-PTS1 erfolgte mit Imidazol. Die Proteinlösung konnte mit Hilfe einer Vivaspin-Säule konzentriert und umpufferung werden. Nach der Entfernung des im Elutionspuffer enthaltene Imidazol und Aufkonzentrierung wurde das aufgereinigte His-PTS1(500ng) vier Mal auf ein SDS-Gel aufgetragen und auf eine Nitrozellulose-Membran geplottet. Die Membran wurde dann in zwei Teile geschnitten. Der rechte Teil wurde mit einem Primäntikörper inkubiert, der spezifisch an His markierte Proteine bindet, während der linke Teil mit einem Primäntikörper inkubiert wurde, der gegen PTS1 gerichtet ist. His-PTS1 hat ein Molekulargewicht von 26 kDa. His-C2I (100 ng), welches ein Molekulargewicht von 50 kDa besitzt, wurde als Positivkontrolle verwendet.

Die Ergebnisse in Abbildung 12 zeigen sowohl bei der Detektion mit dem Anti-His-Antikörper, als auch bei der Detektion mit dem Anti-PTS1-Antikörper eine deutliche Bande, die ungefähr mit dem Molekulargewicht von His-PTS1 übereinstimmt. Bei der Detektion mit Anti-PTS1-Antikörper sind außerdem 3 weitere Banden sichtbar, die ein wesentlich geringeres Molekulargewicht haben. Möglicherweise sind dies Abbauprodukte der enzymatisch aktiven Untereinheit des PTs, die während der Aufreinigung bzw. Umpufferung entstanden sind.

3.3 Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Untereinheit PTS1

Um mit dem aufgereinigten PTS1 arbeiten zu können, musste die Proteinkonzentration bestimmt werden. Dazu wurde eine BSA-Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen und 1 bzw. 2 μl aufgereinigtes PTS1 auf ein Polyacrylamid Gel aufgetragen. Die entstandenen Proteinbanden wurden mittels einer Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Dadurch konnte dann eine Kalibriergerade mit Hilfe der BSA-Verdünnungsreihe erstellt werden (siehe Abbildung 13) anhand dieser die Konzentrationsbestimmung von PTS1 densitometrisch erfolgte.

Das Konzentrationsgel (nicht dargestellt) zeigte mehrere Banden mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Da PTS1 ein Molekulargewicht von ca. 26kDa hat, wurde die auf der entsprechenden Höhe liegende Bande ausgewählt, um die Konzentration zu bestimmen.

Die Konzentration des aufgereinigten PTS1 beträgt 548,3 ng/ μl .

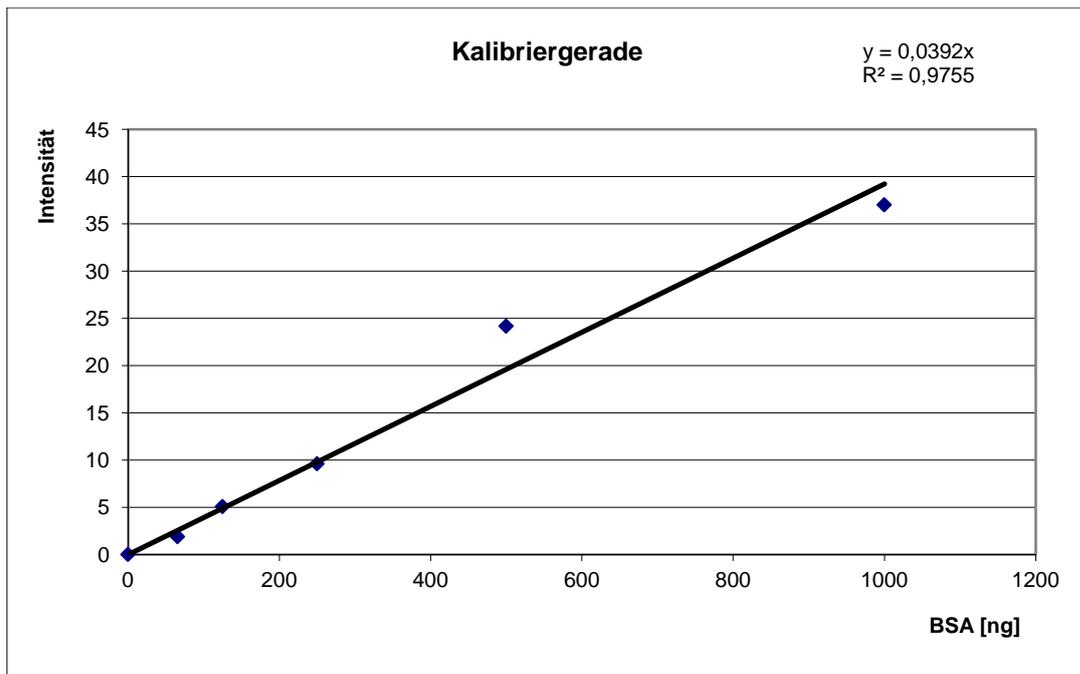


Abbildung 13: Kalibriergerade zur densitometrischen Proteinkonzentrationsbestimmung von PTS1

Untersuchung am Universitätsklinikum Ulm, 2013-2014, zur Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Pertussistoxin und zellulären Wirtszellchaperonen bzw. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. PTS1: S1-Untereinheit des Pertussistoxins. SDS: sodium dodecyl sulfate. His: Polyhistidin. BSA: bovine serum albumin. Nach Expression von His-PTS1 aus transformierten BL21 kompetenten E. coli Zellen und Aufreinigung wurde die Proteinkonzentration von PTS1 densitometrisch bestimmt. Ein BSA-Standard (Konzentration 1000 ng/μl, 500 ng/μl, 250 ng/μl, 125 ng/μl und 62,5 ng/μl) sowie 1 bzw. 2 μl PTS1 wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Proteinbanden wurden mittels Coomassiefärbung sichtbar gemacht. Die Kalibriergerade konnte densitometrisch mit Hilfe der Bandenintensität erstellt werden.

3.4 *In vitro*-Enzymaktivitätstest des aufgereinigten PTS1

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die aufgereinigte Untereinheit des Pertussistoxins enzymatisch aktiv ist. Hierfür wurde ein Ansatz mit ADP-Ribosylierungspuffer nach Barbieri, postnukleärem Überstand aus CHO-Zellen (40ng), Biotin-NAD⁺ (10μM) und PTS1 (500ng) hergestellt. Ein weiterer Ansatz ohne PTS1 wurde als Negativkontrolle verwendet. Die Proben wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, auf eine Nitrozellulosemembran geplottet und danach mit Strep-POD (1:2500) detektiert.

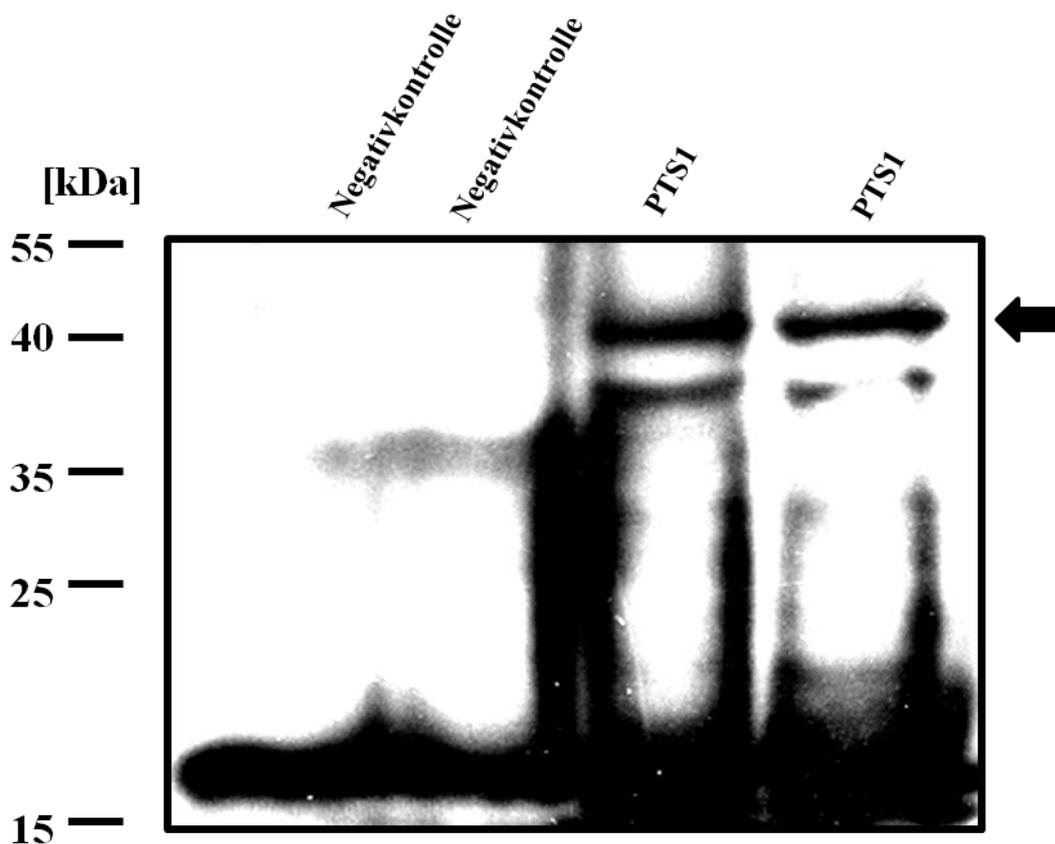


Abbildung 14: Überprüfung der Enzymaktivität des aufgereinigten PTS1

Untersuchung am Universitätsklinikum Ulm, 2013-2014, zur Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Pertussistoxin und zellulären Wirtszellchaperonen bzw. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. PTS1: S1-Untereinheit des Pertussistoxins. SDS: sodium dodecyl sulfate. ADP: Adenosindiphosphat. CHO: Chinese Hamster Ovary. NAD^+ : Nicotinamidadenindinukleotid. G_i : inhibitorisches G-Protein. Strep-POD: Streptavidin-Peroxidase. Für den *in vitro*-Enzymaktivitätstest des aufgereinigten PTS1 wurde ADP-Ribosylierungspuffer nach Barbieri, postnukleärer Überstand aus CHO-Zellen (40ng), Biotin- NAD^+ (10 μM) und PTS1 (500ng) auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geplottet. PTS1 katalysiert die Übertragung der Biotin-ADP-Ribose mithilfe des Cosubstrates Biotin- NAD^+ auf das inhibitorische G_i -Protein. Detektiert wurde das ADP-ribosylierte (biotinylierte) G_i (41kDa) durch Strep-POD. Ein weiterer Ansatz ohne PTS1 diente als Negativkontrolle.

Abbildung 14 stellt die Enzymaktivität des aufgereinigten PTS1 dar. Es ist eine Bande auf ca. 40 kDa zu sehen, da PTS1 die Übertragung der Biotin-ADP-Ribose mithilfe des Cosubstrates Biotin- NAD^+ auf das inhibitorische G_i -Protein (41kDa) katalysiert. In der Negativkontrolle ist, wie erwartet, kein Signal sichtbar.

3.5 Biotinylierung von PTS1

Um die enzymatisch aktive Untereinheit des Pertussistoxins (PTS1), die für die in 3.6 beschriebene Dot-Blot-Analyse benötigt wurde, besser detektieren zu können, wurde zunächst eine Biotinylierung durchgeführt. Aufgrund der hohen Affinität von Streptavidin an Biotin ermöglicht dies eine direkte und spezifische Detektion mittels Streptavidin-POD. Um zu überprüfen, ob die Biotinylierung einen Einfluss auf die Enzymaktivität des PTS1 hat, wurde ein Enzymaktivitätstest wie in 3.4 durchgeführt.

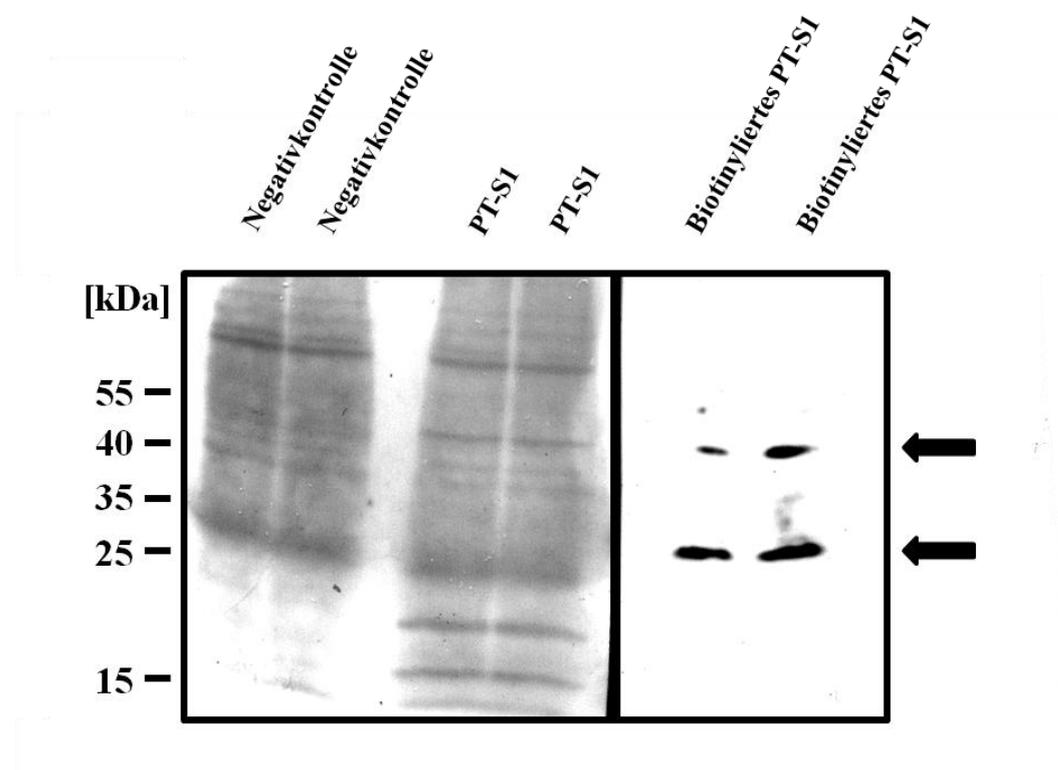


Abbildung 15: Überprüfung der Enzymaktivität des aufgereinigten biotinylierten PTS1

Untersuchung am Universitätsklinikum Ulm, 2013-2014, zur Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Pertussistoxin und zellulären Wirtszellchaperonen bzw. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. PTS1: S1-Untereinheit des Pertussistoxins. SDS: sodium dodecyl sulfate. ADP: Adenosindiphosphat. CHO: Chinese Hamster Ovary. NAD^+ : Nicotinamidadenindinukleotid. G_i : inhibitorisches G-Protein. Strep-POD: Streptavidin-Peroxidase. Die enzymatisch aktive Untereinheit des Pertussistoxins (PTS1) wurde zu besserer detektierbarkeit biotinyliert. Für den *in vitro*-Enzymaktivitätstest des biotinylierten PTS1 wurde ADP-Ribosylierungspuffer nach Barbieri, postnukleärer Überstand aus CHO-Zellen (40ng), Biotin- NAD^+ (10 μM) und PTS1 (500ng) sowie biotinyliertes PTS1 auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geplottet. Ein weiterer Ansatz ohne PTS1 diente als Negativkontrolle. Detektiert wurde das ADP-ribosylierte (biotinylierte) G_i (41kDa) durch Strep-POD. Eine weitere Bande auf 26 kDa zeigt das biotinylierte PTS1. Die Negativkontrolle zeigt kein Signal.

In Abbildung 15 ist zu sehen, dass das biotinylierte PTS1 eine Enzymaktivität aufweist. Es zeigt sich eine Bande auf ca. 40 kDa, die dadurch zustande kommt, dass PTS1 die Übertragung der Biotin-ADP-Ribose auf das inhibitorische G-Protein (41kDa) katalysiert. Außerdem ist eine weitere Bande auf 26 kDa zu sehen, die das biotinylierte PTS1 zeigt. Auch hier zeigt die Negativkontrolle kein Signal.

3.6 Dot-Blot-Analyse der Interaktion zwischen den Wirtszellfaktoren Hsp90, Hsp70, Hsc70, FKBP51, FKBP52, CypA, Cyp40 mit der enzymatisch aktiven Untereinheit des Pertussistoxins

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dot-Blot-Analyse angewendet, um die *in-vitro*-Interaktion zwischen den zellulär vorkommenden Hitzeschockproteinen bzw. PPIasen (Hsp90, Hsp70, Hsc70, FKBP51, FKBP52, CypA, Cyp40) und der enzymatisch aktiven Untereinheit des Pertussistoxins zu untersuchen. Dazu wurden verschiedenen Konzentrationen der Wirtszellfaktoren durch Anlegen eines Vakuums auf eine Nitrozellulosemembran immobilisiert. Mithilfe der Ponceau-S-Färbung wurde überprüft, ob die Übertragung der Proteine gleichmäßig erfolgte. Die Membran wurde mit Milchpulver geblockt und anschließend mit 200ng der biotinylierten Enzymkomponente inkubiert. Im Falle einer Protein-Protein-Interaktion können die gebundenen Toxinkomponenten durch Strep-POD detektiert werden.

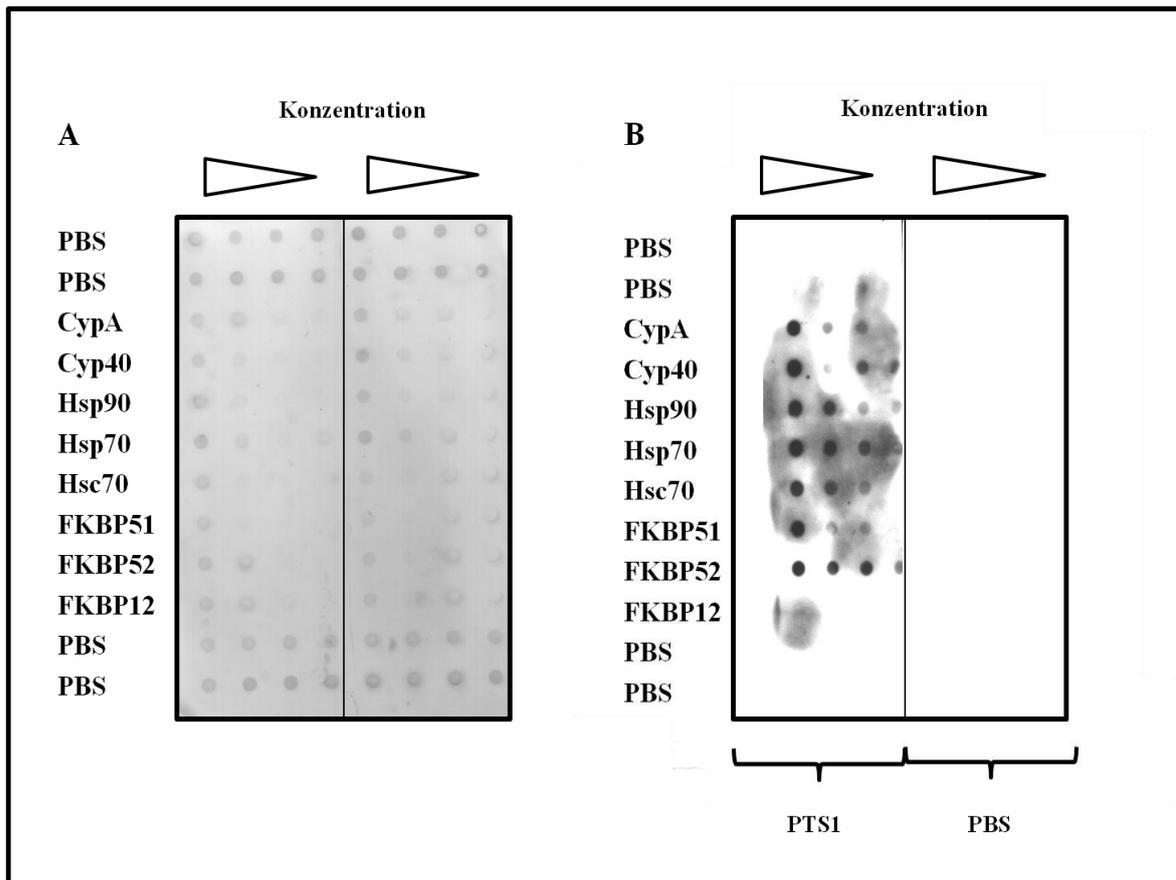


Abbildung 16: Dot-Blot-Analyse der Interaktion zwischen Chaperonen/ PPIasen und rekombinantem PTS1

Untersuchung am Universitätsklinikum Ulm, 2013-2014, zur Charakterisierung der Interaktion zwischen dem Pertussistoxin und zellulären Wirtszellchaperonen bzw. Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerasen. PTS1: S1-Untereinheit des Pertussistoxins. Strep-POD: Streptavidin-Peroxidase. PBS: phosphate buffered saline. CypA: Cyclophilin A. Cyp40: Cyclophilin 40. Hsp90: Hitzeschockprotein 90. Hsp70/Hsc70: Hitzeschockprotein 70. FKBP: FK506 binding protein. Die zellulären Proteine CypA, Cyp40, Hsp90, Hsp70, Hsc70, FKBP51, FKBP52 und FKBP12 wurden in absteigenden Konzentrationen mit Hilfe der Dot-Blot-Apparatur auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Abbildung A zeigt die Ponceau-S-Färbung der Proteine auf der Membran. Im Anschluss an die Ponceau-S-Färbung wurde die Membran in zwei Teile geschnitten und mit 5% igem Milchpulver geblockt. Der linke Teil wurde mit 200ng/ml biotinyliertem PTS1 inkubiert während der rechte Teil als Negativkontrolle dienen sollte und in PBS inkubiert wurde. Nach einigen Waschschrinen konnte das gebundene biotinylierte PTS1-Protein mit Strep-POD detektiert werden.

Das Ergebnis in Abbildung 16 zeigt, dass es zwischen fast allen Wirtszellfaktoren (Hsp90, Hsp70, Hsc70, FKBP51, FKBP52, CypA, Cyp40) und der enzymatisch aktiven Untereinheit PTS1 eine *in vitro* Interaktion gibt. Da man keine Interaktion von FKBP 12 mit PT vermutet [43], diente FKBP12 als Negativkontrolle. Die Protein-Protein-Interaktion scheint spezifisch zu sein, da bei Inkubation der Membran mit PBS anstelle von biotinyliertem Toxin kein Signal zu erkennen war. Außerdem bindet PTS1 nicht an die Membran, wenn keine Wirtszellfaktoren auf der Membran sind. Die Ponceau-S-Färbung zeigt, dass die zellulären Proteine erfolgreich auf die Membran transferiert wurden. Zusammenfassend ergaben die Ergebnisse dieser Arbeit wichtige Fakten über die Membrantranslokation von PT. Zuerst wurde die enzymatische aktive Untereinheit PTS1 exprimiert und aufgereinigt. Um diese besser detektieren zu können wurde eine Biotinylierung durchgeführt. Das biotinylierte PTS1 konnte dann für die Dot-Blot-Analyse verwendet werden, mit der die Interaktion zwischen verschiedenen Wirtszellfaktoren und PTS1 untersucht wurde. Die Dot-Blot-Analyse ergab, dass PT *in vitro* mit den Wirtszellproteinen Hsp90, Hsp70, Hsc70, FKBP51, FKBP52, CypA und Cyp40 interagiert. Bei den Zytotoxizitätsexperimenten gab es in dieser Arbeit unter den genannten Bedingungen allerdings kein Hinweis darauf, dass Hsp70 bei der Membrantranslokation von PT beteiligt ist.

4 Diskussion

Das Pertussistoxin von *B. pertussis* ist ein AB₅-Toxin. Es ist bereits bekannt, dass das Toxin über Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zielzelle aufgenommen wird und dann retrograd über den Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum transportiert wird [61]. Die A-Domäne katalysiert die Übertragung eines ADP-Riboserestes auf ein heterotrimeres G_i-Protein, während das B-Oligomer für die Bindung und Translokation der A-Domäne ins Zytosol zuständig ist [74].

Die durchgeführten Experimente sollen dazu beitragen, den zellulären Aufnahmemechanismus von ADP-ribosylierenden Toxinen besser zu verstehen. In dieser Arbeit wurde insbesondere die Rolle von Chaperonen und PPIasen bei der Membrantranslokation des Pertussistoxins genauer untersucht.

Für das Diphtherie-Toxin, ein einkettiges AB-Toxin, wurde im Jahre 2003 erstmals die Beteiligung von zytosolischen Translokationsfaktoren an der zellulären Aufnahme beschrieben. Die damaligen Ergebnisse zeigten, dass sowohl ATP als auch ein Komplex aus zytosolischen Translokationsfaktoren für die Membrantranslokation des Diphtherie-Toxins aus frühen Endosomen erforderlich sind. Zu diesem Komplex gehören unter anderem eine Thioredoxin-Reduktase und das Hitzeschockprotein Hsp90 [65]. Etwa zur gleichen Zeit wurde von der Arbeitsgruppe Barth gezeigt, dass Hsp90 entscheidend an der Membrantranslokation von C2I beteiligt ist [34]. Inzwischen weiß man, dass Hsp90, CypA und FKBP für die Translokation der clostridialen Aktin-ADP-ribosylierende Toxine C2, Iota und CDT von Bedeutung sind [33, 34, 43–45, 45]. Das Choleratoxin, welches einem retrograden Transport über den Golgi-Apparat zum ER unterliegt, benötigt Hsp90 für die Translokation [75]. Für das PT, welches wie das Choleratoxin retrograd zum ER transportiert wird, weisen neueste Ergebnisse der AG Barth ebenfalls auf eine Beteiligung von Hsp90, CypA und FKBP bei der Translokation hin [23]. Für bestimmte ADP-ribosylierende Toxine, u.a. für DT, Iotatoxin, C2 und CDT konnte die AG Barth neuerdings erstmals eine Beteiligung von Hsp70 bei der Membrantranslokation nachweisen [26, 27]. Interessanterweise konnte für andere AB-Toxine, deren Enzymaktivität nicht auf einer ADP-Ribosylierung beruht, keine Beteiligung der zytosolischen Faktoren nachgewiesen werden. Hier sind beispielsweise das Lethaltoxin von *B. anthracis* (Metalloprotease) [22], die clostridialen Toxine TcdA und TcdB von *C.*

difficile (Glucosyltransferasen) und die Neurotoxine von *C. botulinum* (Proteasen) zu nennen.

Diese Ergebnisse deuten stark auf einen gemeinsamen Translokationsmechanismus aller ADP-ribosylierenden Toxine hin. Deshalb gilt es weitere Toxine und deren Interaktion mit zytosolischen Faktoren zu analysieren. In dieser Arbeit wurde erstmals untersucht, ob auch die enzymatisch aktive Untereinheit von PT mit Hsp70 interagiert und ob diese Interaktion notwendig für die Aufnahme in das Zellinnere ist.

Hierfür wurden Zytotoxizitätsexperimente durchgeführt. Bei der Vergiftung von CHO-Zellen mit Pertussistoxin zeigte sich unter den beschriebenen Bedingungen erstaunlicherweise kein Hemmeffekt durch den Hsp70 Inhibitor VER-155008. Die CHO-Zellen vergifteten mit und ohne VER-155008 vergleichbar schnell. Um auszuschließen, dass der Inhibitor VER-155008 nicht funktionsfähig ist, wurden Vergiftungen von Verozellen mit Iotatoxin durchgeführt. Bei vorherigen Vergiftungsversuchen von Verozellen mit Iotatoxin konnte bereits ein protektiver Effekt der Substanz VER-155008 beobachtet werden. In diesem Zellvergiftungsversuch zeigte sich wiederum, dass Vero-Zellen, die mit Iotatoxin behandelt wurden, durch VER-155008 vor einer Vergiftung geschützt werden. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass der Hsp70 Inhibitor nicht funktionsfähig ist.

Desweiteren wäre es möglich, dass der Hsp70 Inhibitor VER-155008 nur eine sehr schwache protektive Wirkung auf die Vergiftungen hat und somit unter den im Methodenteil beschriebenen Bedingungen nicht quantifizierbar ist. Man könnte dies dadurch erklären, dass der zytotoxische Effekt der bisher untersuchten Toxine, die mit Hsp70 interagieren, auf eine eindeutige Abrundung der jeweiligen Zellen beruht, während mit Pertussistoxin vergiftete CHO-Zellen ausschließlich eine Clusterbildung zeigen, ein Effekt, den man erst nach 12h beobachten kann und dessen Ausprägung nicht so extrem deutlich ist, wie die Abrundung einzelner Zellen [39]. Ein möglicher inhibitorischer Effekt von Hsp70 wurde somit zu einer weniger stark ausgeprägten Clusterbildung führen, die eventuell schwer zu sehen sein könnte. Außerdem ist es nahezu unmöglich die Translokation von PTS1 vollständig zu hemmen. Da PTS1 ein Enzym ist, reicht theoretisch ein einziges Molekül aus, um die ADP-Ribosylierung einer erheblichen Menge an G-Proteinen zu katalysieren und dadurch die PT-spezifische Clusterbildung zu verursachen. Da die Zellen zudem erst nach 12 bis 18 Stunden fotografiert wurden, hat selbst eine geringe Menge an PTS1 genug Zeit seine katalytische Aktivität auszuüben.

Es ist bekannt, dass das Wirtszellchaperon Hsp70 aus einer aminoterminalen ATPase Domäne und einer carboxyterminalen Peptidbindedomäne besteht. Für den in dieser Arbeit verwendeten Inhibitor VER-155008 wurde als Angriffsstelle die aminoterminalen ATPase-Domäne beschrieben [81]. Eigentlich sollte ein direkter Inhibitor gegen die ATPase-Domäne eine gute Möglichkeit darstellen die Funktionen von Hsp70 zu blockieren. Jedoch hat man bereits herausgefunden, dass Hsp70, trotz fehlender ATPase Aktivität, einen gewissen Schutz für die Zelle gegen Hitzestress bietet [50]. Das deutet darauf hin, dass für die Funktion von Hsp70 nicht nur die ATPase-Aktivität sondern auch die Substratbindedomäne benötigt wird. Man geht davon aus, dass die Substratbindedomäne zeitweise mit einer Vielzahl von unvollständig gefalteten oder nicht gefalteten Proteinen interagiert, um die Proteinfaltung zu regulieren. Da in dieser Arbeit der Hsp70 Inhibitor VER-155008 verwendet wurde, der ausschließlich die ATPase-Domäne blockiert, ist es durchaus möglich, dass Hsp70 weiterhin einen Teil seiner Aufgaben ausführen kann. Somit ist nicht auszuschließen, dass Hsp70 an der Membrantranslokation von PT beteiligt ist. In Ermangelung eines spezifischen Hsp70 Inhibitors, der die Peptidbindedomäne blockiert, konnte die Rolle von Hsp70 bisher noch nicht genauer untersucht werden. Bei neueren Untersuchungen wurde jedoch der erste Hsp70 Inhibitor (9-Aminoacridizium Derivat) entwickelt, der die Peptidbindedomäne blockiert [26]. Dies bildet nun eine neue interessante Alternative, die Hsp70 Funktion komplett zu hemmen. Der neue Hsp70 Inhibitor wurde bereits in Zytotoxizitätsexperimenten getestet. Bei einer Vergiftung von Verozellen mit Iotatoxin ist ein deutlicher protektiver Effekt der Substanz zu beobachten. Zukünftig könnten weitere Experimente mit dem neuen Hsp70 Inhibitor interessante Erkenntnisse liefern, die zum weiteren Verständnis des Aufnahmemechanismus von ADP-ribosylierenden Toxinen beitragen.

In den Vergiftungsexperimenten konnte ein inhibitorischer Effekt von Wirtszellfaktoren auf die Vergiftung von CHO-Zellen mit PT bereits gezeigt werden. Dieser sollte nochmals mit einer anderen Methode bestätigt werden und außerdem sollte der Effekt auf die Zellviabilität untersucht werden. Hierfür wurden CHO-Zellen mit den Inhibitoren der verschiedenen Wirtszellfaktoren Radicol, FK506, CsA, VER- 155008 und Brefeldin A inkubiert und mit PT vergiftet. Anschließend wurde ein MTS-Zellviabilitätstest durchgeführt mit dem die Lebendzellzahl anhand deren Stoffwechselaktivität bestimmt wird. Erstaunlicherweise konnte trotz funktionierender Positivkontrolle bei der Vergiftung mit PT nur ein protektiver Effekt der Substanz Brefeldin A gezeigt werden. Dies ist

möglicherweise dadurch zu erklären, dass der inhibitorische Effekt von Radicol, FK506 und CsA zu gering und die Methode des MTS-Tests nicht sensitiv genug ist. Gestützt wird diese Annahme dadurch, dass die Vergiftung durch die spezifischen Inhibitoren nur verzögert und nicht vollständig gehemmt wird. Im Gegensatz dazu führt Brefeldin A zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Vergiftung mit PT, indem der Golgi-Apparat zerfällt und somit der retrograde Transport von PT unterbrochen wird [31].

In dieser Arbeit wurde die enzymatisch aktive Untereinheit von PT (PTS1) exprimiert und aufgereinigt, um diese für weitere Experimente, welche Aufschluss über die *in vitro* Interaktion von PT mit bestimmten Wirtszellfaktoren geben sollen, zu verwenden. Die Expression war letztendlich erfolgreich, da wie erwartet bei der Detektion mittels Anti-PTS1-AK bzw. Anti-His-AK eine deutliche Bande mit dem Molekulargewicht von ca. 26 kDa zu sehen war. Entgegen der Erwartung waren bei der Detektion mit Anti-PTS1-AK jedoch zusätzlich drei weitere Banden sichtbar, die ein wesentlich geringeres Molekulargewicht aufwiesen. Obwohl während der Aufreinigung ein Proteaseinhibitor verwendet wurde, könnten diese Banden Abbauprodukte von His-PTS1 sein, die während der Aufreinigung bzw. Umpufferung entstanden sind. Da die Banden bei der Detektion mit dem Anti-His-AK nicht vorhanden waren und der His-Tag am N-terminalen Ende der katalytischen A-Domäne hängt, findet der Abbau vermutlich C-terminal statt. Die Konzentration des aufgereinigten PTS1 wurde mit Hilfe eines Konzentrationsgels bestimmt. Hierbei fiel auf, dass mehrere Banden auf unterschiedlichen Höhen sichtbar waren, was darauf hindeutet, dass die Aufreinigung nicht effektiv verlaufen ist. Somit ist das His-PTS1 wahrscheinlich mit anderen Proteinen verunreinigt. Das könnte zum einen daran liegen, dass die Talon® CellThru Resin Beads unspezifisch auch andere Proteine gebunden haben. Zum anderen könnte es sein, dass weitere Proteine eine Bindung mit His-PTS1 eingehen und zusammen mit diesem aus dem Proteingemisch extrahiert werden. Eine weitere Theorie wäre, dass das His-PTS1 bei der Aufreinigung bzw. Umpufferung eine Konformation einnimmt, bei der die His-Bindestelle nicht gut zugänglich ist. Das würde dazu führen, dass das His-markierte PTS1 Schwierigkeiten hat an die Talon® CellThru Resin Beads zu binden und somit die unspezifische Bindung anderer Proteine an die Beads begünstigt wird. Diese Theorie könnte auch ein Erklärungsansatz für die generellen Schwierigkeiten bei der Aufreinigung sein. Um zu überprüfen, ob die aufgereinigte Untereinheit des Pertussistoxins enzymatisch aktiv ist, wurde ein *In-vitro*-Enzymaktivitätstest durchgeführt. Die Bande auf ca. 40 kDa lässt darauf schließen, dass

eine Übertragung der Biotin-ADP-Ribose aus dem Cosubstrat NAD^+ auf das inhibitorische G-Protein (41kDa) stattgefunden hat und His-PTS1 somit die gewünschte Enzymaktivität besitzt.

In der vorliegenden Arbeit konnte zudem mit Hilfe der Dot-Blot-Analyse gezeigt werden, dass PTS1 mit den Wirtszellproteinen Hsp90, Hsp70, Hsc70, CypA, Cyp40, FKBP51 und FKBP52 *in vitro* spezifisch interagiert. Zur Verbesserung der Detektion von PTS1 wurde die enzymatisch aktive Untereinheit des Pertussistoxins zunächst biotinyliert. Mittels SDS-Page, Western-Blot und Detektion mit Strep-POD konnte gezeigt werden, dass die Biotinylierung erfolgreich war. Beim Enzymaktivitätstest des biotinylierten PTS1 wurden wie erwartet zwei Banden sichtbar. Die eine Bande auf ca. 26 kDa zeigt das biotinylierte PTS1, während die andere Bande auf 40 kDa darauf hinweist, dass das biotinylierte PTS1 eine Enzymaktivität aufweist. Das biotinylierte PTS1 konnte somit für die weiteren Interaktionsstudien verwendet werden. Die Ergebnisse der Arbeit Dmochewitz und Lillich et al. zeigen, dass der Dot-Blot als spezifische und selektive Methode zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt werden kann. Durch die *in vitro* Interaktionsanalyse konnte somit geklärt werden, dass PTS1 direkt an Hsp90, Hsp70, Hsc70, CypA, Cyp40, FKBP51 und FKBP52 bindet. FKBP12 diente dabei als Negativkontrolle, da auch bei vorher durchgeführten Versuchen keine Interaktion von FKBP12 mit anderen ADP-ribosylierenden Toxinen festgestellt wurde [43]. FKBP12 ist wahrscheinlich nicht an der Membrantranslokation beteiligt. Mittlerweile wurden diese Ergebnisse teilweise mit Hilfe der Kopräzipitation und der Fluoreszenzmikroskopie in der AG Barth bestätigt. In Kopräzipitationsexperimenten zeigte sich eine Interaktion zwischen PTS1 und den PPIasen CypA, Cyp40 und FKBP51. Hsp90 und Hsc70 interagierten dahingegen nicht mit PTS1 [76].

Wie bereits erwähnt, wurde im Jahr 2003 gezeigt, dass ein Komplex aus zytosolischen Translokationsfaktoren, der unter anderem Hsp90 und eine Thioredoxin-Reduktase enthält, an der Translokation von Diphtherietoxin beteiligt ist [65]. Dies legt die Vermutung nahe, dass bei der Translokation von ADP-ribosylierenden Toxinen nicht nur einzelne Wirtszellproteine beteiligt sind, sondern dass ein Multichaperonkomplex existiert, der die Translokation vermittelt. Solch ein Hsp90 Multichaperonkomplex ist bereits für die Aktivierung und Translokation von Steroid-Hormon-Rezeptoren bekannt [62]. Auch die in dieser Arbeit untersuchten Interaktionen zwischen PTS1 und den Wirtszellproteinen Hsp90, Hsp70, Hsc70, CypA, Cyp40, FKBP51 und FKBP52 unterstützen diese Theorie.

Es gilt jedoch weiter zu untersuchen, ob die Wirtszellfaktoren zur gleichen Zeit oder nacheinander in Interaktion mit PTS1 treten.

Interessant ist, dass Hsp70 in den *in vitro* Interaktionsanalysen direkt mit PTS1 interagiert während in den Zytotoxizitätsversuchen unter den beschriebenen Bedingungen kein protektiver Effekt von VER-155008 beobachtet wurde. Auf den ersten Blick sind diese beiden Ergebnisse kontrovers. Wie bereits erwähnt besteht Hsp70 aber aus einer N-terminalen ATPase Domäne und einer C-terminalen Peptidbindedomäne, die beide eine Funktion ausüben. Es wird angenommen, dass Hsp70, trotz fehlender ATPase Aktivität, einen Schutz vor Hitzestress bieten kann [50]. Somit übt Hsp70 auch ohne ATPase Aktivität gewisse Funktionen aus. Da in dieser Arbeit ausschließlich die ATPase-Domäne gehemmt wurde, ist nicht auszuschließen, dass die Peptidbindedomäne eine bei der Membrantranslokation von PT benötigte Funktion weiter ausübt. Dieser Aspekt sollte in weiteren Experimenten näher untersucht werden.

Außerdem könnte es sein, dass andere an der Translokation beteiligte Faktoren die Wirkung von Hsp70 kompensieren. Somit hätte der Hsp70 Inhibitor keinen starken protektiven Effekt auf die Vergiftung von PT mit CHO-Zellen. Hsp70 könnte aber dennoch ein Bestandteil des Multichaperonkomplexes sein, der an der Translokation von PT ins Zytosol beteiligt ist. Zudem wäre es möglich, dass Hsp70 nur ein Bestandteil des Komplexes ist, aber keine aktive Funktion hat.

Alles in allem lässt sich sagen, dass viele PPIasen und Chaperone an PTS1 binden und deren Hemmung einen protektiven Effekt auf die Vergiftung von CHO-Zellen mit PT hat. So gibt es beispielsweise in dieser Arbeit Hinweise auf eine *in vitro* Interaktion zwischen PTS1 und den Wirtszellproteinen Hsp90, Hsp70, Hsc70, CypA, Cyp40, FKBP51 und FKBP52. In vorherigen Zytotoxizitätsexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Wirtszellfaktoren Hsp90, CypA, Cyp40, FKBP51 und FKBP52 durch deren spezifischen Inhibitoren zu einer Reduzierung des Vergiftungseffektes führt. Neueste Ergebnisse der AG Barth haben unter anderen Bedingungen bereits einen protektiven Effekt des Hsp70 Inhibitors VER bei der Vergiftung von CHO-Zellen mit PT gezeigt. Zudem wurde mittels Konfokalmikroskopie gezeigt, dass eine geringere Menge an PT in die Zellen gelang, wenn die Zellen mit den Inhibitoren der Chaperone und PPIasen vorinkubiert wurden. Dies unterstützt die Ergebnisse der *in vitro* Interaktionsanalysen der vorliegenden Arbeit und deutet auf eine Beteiligung der Chaperone und PPIasen bei der Membrantranslokation von PT hin [76]. Das Vorhandensein bzw. die Funktionsweise eines

Multichaperonkomplexes sollte allerdings noch weiter untersucht werden. Weitere Untersuchungen können zu einem besseren Verständnis des Aufnahmemechanismus von PT und auch weiteren ADP-ribosylierenden Bakterien führen.

Die neuen Kenntnisse könnten schließlich auch von medizinischer Relevanz sein. Die gezielte pharmakologische Hemmung bestimmter Chaperone oder PPIasen könnte eventuell für neue therapeutische Strategien gegen Krankheiten wie zum Beispiel Keuchhusten und Cholera genutzt werden. Dabei gilt zu erwähnen, dass die PPIase Inhibitoren CsA und FK506 bereits zugelassene Medikamente sind und als Immunsuppressiva nach Organtransplantationen oder bei Autoimmunerkrankungen angewendet werden. Aufgrund der immunsuppressiven Wirkung ist eine direkte Anwendung dieser Substanzen zur Therapie von Infektionserkrankungen beim Menschen nicht empfehlenswert. Jedoch könnten neue PPIase Inhibitoren entwickelt werden, die nicht immunsuppressiv wirken. Ein Beispiel hierfür ist der CypA Inhibitor VK112, ein Derivat des CsAs, der bereits einen protektiven Effekt bei der Vergiftung kultivierter Zellen mit anderen Toxinen zeigte [25].

Hsp90 Inhibitoren, wie beispielsweise Radicol, werden bereits in der Krebstherapie eingesetzt. Jedoch wäre eine Entwicklung von spezifischen Inhibitoren, die nicht alle Hsp90 Funktionen hemmen, wünschenswert. Diese könnten dann selektiv deren Aufgabe bei der Membrantranslokation hemmen und wären somit im Hinblick auf eine Therapie von Keuchhusten bzw. anderen Toxin-vermittelten Infektionskrankheiten besser verträglich.

Da trotz Impfstoff die Zahl der Keuchhustenerkrankungen ständig zunimmt und es momentan keine kausale Therapie gibt, ist die Forschung am Pertussistoxin sehr bedeutsam. Eine kausale Therapie gegen Keuchhusten könnte erheblich dazu beitragen die Sterberaten zu reduzieren. Aufgrund der unspezifischen Symptome wird die Krankheit bei Erwachsenen oft zu spät erkannt. Da die Symptomatik aber durch die von den Bakterien gebildeten Toxinen verursacht wird, kann nur eine frühe Antibiotikagabe mit Makrolidantibiotika den Krankheitsverlauf verkürzen oder abmildern. Eine Therapie, die auf einer Hemmung der Membrantranslokation des Pertussistoxins beruht, könnte auch in einem späteren Krankheitsstadium wirksam sein. Selbst wenn das Toxin bereits in die Zelle gelangt ist, kann der zytotoxische Effekt durch eine Hemmung der Membrantranslokation des Toxins in das Zytosol noch verhindert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen Beitrag zum besseren Verständnis des zellulären Aufnahmemechanismus von PT und können deshalb zur Entwicklung einer möglichen Therapie beitragen. Da frühere Ergebnisse stark darauf hin deuten, dass eine Interaktion mit Chaperonen und PPIasen beim Membrantransport spezifisch für ADP-ribosylierende Toxine ist, könnten die Ergebnisse auch zur Entwicklung einer neuen therapeutischen Strategie für alle Krankheiten, die durch ADP-ribosylierende Toxine verursacht werden, beitragen.

5 Zusammenfassung

Das Pertussistoxin gehört zu den AB₅-Toxinen und stellt einen wichtigen Pathogenitätsfaktor von *Bordetella pertussis*, dem Erreger des Keuchhustens, dar. Das Toxin besteht aus einer A-Domäne (Wirkungsdomäne) und einer B-Domäne (Bindungsdomäne). Dabei vermittelt die B-Domäne die zelluläre Aufnahme, sowie die Membrantranslokation der Enzymkomponente ins Zytosol. Im Zytosol katalysiert die A-Domäne dann die Übertragung eines Adenosindiphosphat-ribose-Phosphatrestes auf die α -Untereinheit eines inaktivierenden Guanosintriphosphat-bindendes Protein und die dadurch verursachten zellulären Reaktionen lösen beim Menschen den Keuchhusten aus. In der Arbeitsgruppe Barth wird der molekulare Aufnahmemechanismus sowie die Beteiligung von zytosolischen Wirtszellfaktoren an der Membrantranslokation von Adenosindiphosphat-ribosylierenden Toxinen näher untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der Dot-Blot-Analyse gezeigt, dass die S1-Untereinheit des Pertussistoxins *in vitro* mit den zytosolischen Faktoren Hitzeschockprotein 90 (Hsp90), Hitzeschockprotein 70 (Hsp70), Cyclophilin A (CypA), Cyclophilin 40 (Cyp40), FK506-binding protein 51 (FKBP51) und FK506-binding protein 52 (FKBP52) spezifisch interagiert. In vorherigen Zytotoxizitätsexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Wirtszellfaktoren Hsp90, CypA, Cyp40, FKBP51 und FKBP52 durch deren spezifischen Inhibitoren zu einer Reduzierung des Vergiftungseffektes führt. Dies deutet darauf hin, dass diese Faktoren möglicherweise an der Membrantranslokation von Pertussistoxin beteiligt sind. In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob der Hsp70 Inhibitor VER-155008 einen protektiven Effekt auf die Vergiftung von CHO (Chinese Hamster Ovary)- Zellen mit dem Pertussistoxin hat. Eine hemmende Wirkung von VER-155008 konnte jedoch unter diesen Bedingungen nicht beobachtet werden. Da VER-155008 aber nur die Amino-terminale Adenosintriphosphatasedomäne blockiert und die Carboxy-terminale Peptidbindedomäne gewisse Funktionen isoliert ausüben kann, ist nicht auszuschließen, dass Hsp70 trotzdem an der Membrantranslokation von Pertussistoxin beteiligt ist. Neueste Ergebnisse der AG Barth unterstützen die These, dass auch Hsp70 an der Membrantranslokation von Pertussistoxin beteiligt ist. Zum einen konnte für den Hsp70 Inhibitor VER-155008 unter anderen Bedingungen eine hemmende Wirkung auf die Vergiftung von CHO-Zellen mit Pertussistoxin nachgewiesen werden, zum anderen wurde mittels Konfokalmikroskopie gezeigt, dass eine geringere Menge an Pertussistoxin in die

Zellen gelangt, wenn die Zellen mit den Inhibitoren der Wirtszellfaktoren vorinkubiert wurden.

Die Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis des zellulären Aufnahmemechanismus von Pertussistoxin bei. Darüber hinaus könnte die gezielte pharmakologische Hemmung bestimmter Chaperone oder Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen zur Entwicklung neuartiger pharmakologischer Strategien zur Therapie Toxin-vermittelter Krankheiten wie zum Beispiel dem Pertussistoxin genutzt werden.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Aktories K, Bärmann M, Ohishi I, Tsuyama S, Jakobs KH, Habermann E 1986 Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin *Nature* **322** 390–2
- [2] Allured VS, Collier RJ, Carroll SF, McKay DB 1986 Structure of exotoxin A of *Pseudomonas aeruginosa* at 3.0-Angstrom resolution *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83** 1320–4
- [3] Antoine R L C 1990 Roles of the Disulfide Bond and the Carboxy-Terminal Region of the SI Subunit in the Assembly and Biosynthesis of Pertussis Toxin *Infect. Immun.* **58** 1518–26
- [4] Armstrong GD, Howard LA, Pepler MS 1988 Use of Glycosyltransferases to Restore Pertussis Toxin Receptor Activity to Asialoagalactofetui *J. Biol. Chem.* **263** 8677–84
- [5] Barbieri JT, Moloney BK, Mende-Mueller LM 1989 Expression and secretion of the S-1 subunit and C180 peptide of pertussis toxin in *Escherichia coli* *J. Bacteriol* **171** 4362–9
- [6] Barth H, Aktories K, Popoff MR, Stiles BG 2004 Binary bacterial toxins: biochemistry, biology, and applications of common *Clostridium* and *Bacillus* proteins *Microbiol. Rev.* **68** 373–402
- [7] Barth H, Stiles BG 2008 Binary actin-ADP-ribosylating toxins and their use as molecular Trojan horses for drug delivery into eukaryotic cells *Curr. Med. Chem.* **15** 459–69
- [8] Beutler B, Hoebe K, Du X, Ulevitch RJ 2003 How we detect microbes and respond to them: the Toll-like receptors and their transducers *J. Leukoc. Biol.* **74** 479–85
- [9] Bhakdi S, Trantum-Jensen J, Sziegoleit A 1985 Mechanism of membrane damage by streptolysin-O *Infect. Immun.* **47** 52–60
- [10] Bonventre PF, Heeg H, Cullen C, Lian CJ 1993 Toxicity of recombinant toxic shock syndrome toxin 1 and mutant toxins produced by *Staphylococcus aureus* in a rabbit infection model of toxic shock syndrome *Infect. Immun.* **61** 793–9
- [11] Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H 1994 Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent *Agents Actions* **43** 179–86

- [12] Brugge J, Yonemoto W, Darrow D 1983 Interaction between the Rous sarcoma virus transforming protein and two cellular phosphoproteins: analysis of the turnover and distribution of this complex *J Mol Cell Biol* **3** 9–19
- [13] Bültmann B, Finger H, Heymer B, Schachenmayr W, Hof H, Haferkamp O 1975 Adjuvancy of streptococcal nucleic acids *Z Immunitätsforsch Exp Klin Immunol* **148** 425–30
- [14] Burns DL, Manclark CR 1989 Role of Cysteine 41 of the A Subunit of Pertussis Toxin *J. Biol. Chem.* **264** 564–8
- [15] Capanna SL, Kong YM 1974 Further studies on the prevention of tolerance induction by poly A: U *Immunology* **27** 647
- [16] Clipstone NA, Crabtree GR 1992 Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation *Nature* **357** 695–7
- [17] Collier RJ 1975 Diphtheria toxin: mode of action and structure *Bacteriol Rev* **39** 54–85
- [18] Csermely P, Schnaider T, Soti C, Prohászka Z, Nardai G 1998 The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. *Pharmacol Ther* **79** 129–68
- [19] Delmotte P D-P J 1953 A new antifungal substance of fungal origin *Nature* **171** 344
- [20] Deng Q, Barbieri JT 2008 Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins *Annu. Rev. Microbiol.* **62** 271–88
- [21] Didenko T, Duarte AMS, Karagöz GE, Rüdiger SGD 2012 Hsp90 structure and function studied by NMR spectroscopy *Biochim. Biophys. Acta* **1823** 636–47
- [22] Dmochewicz L, Lillich M, Kaiser E, Jennings LD, Lang AE, Buchner J, Fischer G, Aktories K, Collier RJ, Barth H 2011 Role of CypA and Hsp90 in membrane translocation mediated by anthrax protective antigen *Cell. Microbiol.* **13** 359–73
- [23] Eberhardt N 2016 Interaktion des Pertussistoxins mit dem Chaperon Hsp90 und Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerasen während seiner Aufnahme in Säugetierzellen *Medizinische Dissertation (unveröffentlicht)* Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm

- [24] el Bayâ A, Linnemann R, Olleschik-Elbheim L, von Robenek H, Schmidt MA 1997 Endocytosis and retrograde transport of pertussis toxin to the Golgi complex as a prerequisite for cellular intoxication *Eur. J. Cell Biol.* **73** 40–8
- [25] Ernst K, Langer S, Kaiser E, Osseforth C, Michaelis J, Popoff MR, Schwan C, Aktories K, Kahlert V, Malesevic M, Schiene-Fischer C, Barth H 2015 Cyclophilin-facilitated membrane translocation as pharmacological target to prevent intoxication of mammalian cells by binary clostridial actin ADP-ribosylated toxins *J. Mol. Biol.* **427** 1224–38
- [26] Ernst K, Liebscher M, Mathea S, Granzhan A, Schmid J, Popoff MR, Ihmels H, Barth H, Schiene-Fischer C A novel Hsp70 inhibitor prevents cell intoxication with the actin ADP-ribosylating *Clostridium perfringens* iota toxin: (Publikation in Vorbereitung)
- [27] Feigl P (unveröffentlichte Befunde)
- [28] Fendrick JL, Iglewski WJ, Moehring JM, Moehring TJ 1992 Characterization of the endogenous ADP-ribosylation of wild-type and mutant elongation factor 2 in eukaryotic cells *Eur. J. Biochem.* **205** 25–31
- [29] Fischer G, Bang H, Mech C 1983 Determination of enzymatic catalysis for the cis-trans-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides *Biomed. Biochim. Acta* **43** 1101–11
- [30] Freeman BC 1996 The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hdj-1 have distinct roles in recognition of a non-native protein and protein refolding *EMBO J.* **15** 2969–79
- [31] Fujiwara T, Oda K, Yokota S, Takatsuki A, Ikehara Y 1988 Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum *J. Biol. Chem.* **263** 18545–52
- [32] Galat A B J 2010 Molecular aspects of cyclophilins mediating therapeutic actions of their ligands *Cell. Mol. Life Sci.* **67** 3467–88
- [33] Haug G, Aktories K, Barth H 2003 The Host Cell Chaperone Hsp90 Is Necessary for Cytotoxic Action of the Binary Iota-Like Toxins *Infect. Immun.* **72** 3066–8

- [34] Haug G, Leemhuis J, Tiemann D, Meyer DK, Aktories K, Barth H 2003 The host cell chaperone Hsp90 is essential for translocation of the binary Clostridium botulinum C2 toxin into the cytosol *J. Biol. Chem.* **278** 32266–74
- [35] Hausman SZ B D 1993 Binding of Pertussis Toxin to Lipid Vesicles Containing Glycolipids *Infect. Immun.* **61** 335–7
- [36] Hazes B R R 1997 Accumulating evidence suggests that several AB-toxins subvert the endoplasmic reticulum-associated protein degradation pathway to enter target cells *Biochemistry* **36** 11051–4
- [37] Hazes B, Boodhoo A, Cockle SA, Read RJ 1996 Crystal structure of the pertussis toxin-ATP complex: a molecular sensor *J. Mol. Biol.* **258** 661–71
- [38] Heininger U C J 2006 Pertussis immunisation in adolescents and adults-Bordetella pertussis epidemiology should guide vaccination recommendations *Expert Opin Biol Ther.* **6** 685–97
- [39] Hewlett EL, Sauer KT, Myers GA, Cowell JL, Guerrant RL 1983 Induction of a novel morphological response in Chinese hamster ovary cells by pertussis toxin *Infect. Immun.* **40** 1198–203
- [40] Holbourn KP, Shone CC, Acharya KR 2006 A family of killer toxins. Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins *FEBS J.* **273** 4579–93
- [41] Hsia JA, Tsai SC, Adamik R, Yost DA, Hewlett EL, Moss J 1983 Amino Acid-specific ADP-ribosylation sensitivity to Hydroxylamine of Cystein(ADP-Ribose)Protein and Arginine(ADP-Ribose)Protein linkages *J. Biol. Chem.* **260** 16187–91
- [42] Jakob U, Lilie H, Meyer I, Buchner J 1995 Transient Interaction of Hsp90 with Early Unfolding Intermediates of Citrate Synthase *J. Biol. Chem.* **270** 7288–94
- [43] Kaiser E, Böhm N, Ernst K, Langer S, Schwan C, Aktories K, Popoff M, Fischer G, Barth H 2012 FK506-binding protein 51 interacts with Clostridium botulinum C2 toxin and FK506 inhibits membrane translocation of the toxin in mammalian cells *Cell. Microbiol.* **14** 1193–205
- [44] Kaiser E, Kroll C, Ernst K, Schwan C, Popoff M, Fischer G, Buchner J, Aktories K, Barth H 2011 Membrane translocation of binary actin-ADP-ribosylating toxins from

- Clostridium difficile and Clostridium perfringens is facilitated by cyclophilin A and Hsp90 *Infect. Immun.* **79** 3913–21
- [45] Kaiser E, Pust S, Kroll C, Barth H 2009 Cyclophilin A facilitates translocation of the Clostridium botulinum C2 toxin across membranes of acidified endosomes into the cytosol of mammalian cells *Cell. Microbiol.* **11** 780–95
- [46] Katada T, Tamura M, Ui M 1983 The A protomer of islet-activating protein, pertussis toxin, as an active peptide catalyzing ADP-ribosylation of a membrane protein *Arch. Biochem. Biophys.* **224** 290–8
- [47] Köhler W, Ansorg R, Brandis H, Köhler-Eggers-Fleischer-Marre-Pfister-Pulverer (ed) 2001 *Medizinische Mikrobiologie ; 197 Tabellen* 8th edn (München: Urban & Fischer)
- [48] Krueger KM, Barbieri JT 1993 Molecular Characterization of the in Vitro Activation of Pertussis Toxin by ATP *J. Biol. Chem.* **268** 12570–8
- [49] Krueger KM, Barbieri JT 1994 Assignment of Functional Domains Involved in ADP-Ribosylation and B-Oligomer Binding within the Carboxyl Terminus of the SI Subunit of Pertussis Toxin *Infect. Immun.* **62** 2071–8
- [50] Li GC, Li L, Liu RY, Rehman M, Lee WM 1992 Heat shock protein hsp70 protects cells from thermal stress even after deletion of its ATP-binding domain *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89** 2036–40
- [51] Loch C, Coutte L, Mielcarek N 2011 The ins and outs of pertussis toxin *FEBS J.* **278** 4668–82
- [52] Luderitz O, Galanos C, Lehmann V, Nurminen M, Rietschel ET, Rosenfelder G, Simon M, Westphal O 1973 Lipid A: Chemical Structure and Biological Activity *J. Infect. Dis.* **128** S17-S29
- [53] Mangmool S and Kurose H 2011 G(i/o) protein-dependent and -independent actions of Pertussis Toxin (PTX) *Toxins* **3** 884–99
- [54] Mayer MP B B 2005 Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism *Cell. Mol. Life Sci.* **62** 670–84
- [55] Mooi F R, van Loo I H M, van Gent M, He Q, Bart M J, Heuvelman K J, Greeff S C de, Diavatopoulos D, Teunis P and Nagelkerke N 2009 Bordetella pertussis strains

- with increased toxin production associated with pertussis resurgence *Emerging Infect. Dis.* **15** 1206–13
- [56] Mooi FR, van der Maas NAT, De Melker HE 2014 Pertussis resurgence: waning immunity and pathogen adaptation—two sides of the same coin *Epidemiol. Infect.* **142** 685–94
- [57] Nathan DF, Lindquist S 1995 Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase *Mol. Cell. Biol.* **15** 3917–25
- [58] Nauciel C, Fleck J, Martin J-P, Mock M, Nguyen-Huy H 1974 Adjuvant activity of bacterial peptidoglycans on the production of delayed hypersensitivity and on antibody response *Eur. J. Immunol.* **4** 352–6
- [59] Obermann WMJ, Sondermann H, Russo AA, Pavletich NP, Hartl FU 1998 In Vivo Function of Hsp90 Is Dependent on ATP Binding and ATP Hydrolysis *J. Cell Biol.* **143** 901–10
- [60] Octavia S, Sintchenko V, Gilbert GL, Lawrence A, Keil AD, Hogg G, Lan R 2012 Newly emerging clones of *Bordetella pertussis* carrying *prn2* and *ptxP3* alleles implicated in Australian pertussis epidemic in 2008–2010 *J. Infect. Dis.* **205** 1220–4
- [61] Plaut RD C N 2008 Retrograde transport of pertussis toxin in the mammalian cell *Cell. Microbiol.* **10** 1130–9
- [62] Pratt WB T D 1997 Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones *Endocr. Rev.* **18** 306–60
- [63] Pratt, WB, Toft DO 2003 Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **228** 111–33
- [64] Proft T F J 2003 Bacterial superantigens *Clin. Exp. Immunol.* **133** 299–306
- [65] Ratts R, Zeng H, Berg EA, Blue C, McComb ME, Costello CE, vanderSpek JC, Murphy JR 2003 The cytosolic entry of diphtheria toxin catalytic domain requires a host cell cytosolic translocation factor complex *J. Cell Biol.* **160** 1139–50
- [66] Saito R, Tanaka A, Sugiyama K, Azuma I, Yamamura Y 1976 Adjuvant effect of cord factor, a mycobacterial lipid *Infect. Immun.* **13** 776–81

- [67] Sandvig K O S 1980 Diphtheria toxin entry into cells is facilitated by low pH *J. Cell Biol.* **87** 828–32
- [68] Sandvig K, van Deurs B 2002 Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and Shiga toxin *FEBS lett.* **529** 49–53
- [69] Schneider C, Sepp-Lorenzino L, Nimmegern E, Ouerfelli O, Danishefsky S, Rosen N, Hartl FU 1996 Pharmacologic shifting of a balance between protein refolding and degradation mediated by Hsp90 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93** 14536–41
- [70] Schreiber SL, Liu J, Albers MW, Karmacharya R, Koh E, Martin PK, Rosen MK, Standaert RF, Wandless TJ. 1991 Immunophilin-ligand complexes as probes of intracellular signaling pathways *Transplantation Proceedings* **23** 2839–44
- [71] Schumacher RJ, Hansen WJ, Freeman BC, Alnemri E, Litwack G, Toft DO 1996 Cooperative action of Hsp70, Hsp90, and DnaJ proteins in protein renaturation *Biochemistry* **35** 14889–98
- [72] Stein PE, Boodhoo A, Armstrong GD, Cockle SA, Klein MH, Read RJ 1994 The crystal structure of pertussis toxin *Structure* **2** 45–57
- [73] Suerbaum S, Hahn H, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF 2012 *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie (Springer-Lehrbuch)* 7th edn (Berlin: Springer)
- [74] Tamura M, Nogimori K, Yajima M, Ase K, Ui M 1983 A Role of the B-Oligomer Moiety of Islet-activating Protein, Pertussis Toxin, in A Role of the B-Oligomer Moiety of Islet-activating Protein, Pertussis Toxin, in Development of the Biological Effects on Intact Cells *J. Biol. Chem.* **258** 6756–61
- [75] Taylor M, Navarro-Garcia F, Huerta J, Burrell H, Massey S, Ireton K, Teter K 2010 Hsp90 is required for transfer of the cholera toxin A1 subunit from the endoplasmic reticulum to the cytosol *J. Biol. Chem.* **285** 31261–7
- [76] Vollmer M 2015 Pertussis toxin interacts with chaperones and peptidyl-prolyl cis-trans isomerases during its cellular uptake *Masterarbeit Pharmakologie und Toxikologie, Universität Ulm*
- [77] Wedemeyer WJ, Welker E, Scheraga HA 2002 Proline cis-trans isomerization and protein folding *Biochemistry* **41** 14637–44

- [78] Wegele H, Müller L, Buchner J 2004 Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **151** 1–44
- [79] Whitesell L L S L 2005 HSP90 and the chaperoning of cancer *Nat. Rev. Cancer* **5** 761–72
- [80] Wiech H, Buchner J, Zimmermann R, Jakob U 1992 Hsp90 chaperones protein folding in vitro *Nature* **358** 169–70
- [81] Williamson DS, Borgognoni J, Clay A, Daniels Z, Dokurno P, Drysdale MJ, Foloppe N, Francis GL, Graham CJ, Howes R, Macias AT, Murray JB, Parsons R, Shaw T, Surgenor AE, Terry L, Wang Y, Wood M, Massey AJ 2009 Novel adenosine-derived inhibitors of 70 kDa heat shock protein, discovered through structure-based design *J. Med. Chem.* **52** 1510–3
- [82] Zepp F, Heininger U, Mertsola J, Bernatowska E, Guiso N, Roord J, Tozzi A E and van Damme P 2011 Rationale for pertussis booster vaccination throughout life in Europe *Lancet Infect Dis* **11** 557–70

Danksagung

Ich danke besonders meinem Doktorvater Prof. Dr. Holger Barth für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und natürlich für die stets kompetente und engagierte Betreuung.

Desweiteren möchte ich ein herzliches Dankeschön an Christina, Katharina, Leonie, Nina, Stephan, Volker, Nadja, Sabine und Ulrike aussprechen. Vielen Dank für die Einarbeitung in neue Methoden, die wertvollen Tipps und die motivierenden Worte.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meiner Familie und bei allen Freunden bedanken, die immer für mich da waren und mich während des Studiums finanziell, seelisch und moralisch unterstützt haben.

Lebenslauf

Name: Stephanie Glück

Geburtsdatum: 07.02.1990

Geburtsort: Sigmaringen

Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildung

1996-2000	Besuch der Grundschule Sigmaringendorf/ Laucherthal
2000-2009	Besuch des Gymnasiums Liebfrauenschule Sigmaringen
23.06.2009	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
Oktober 2009	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Ulm
September 2011	Bestehen des 1. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung (Physikum)
April 2015	Bestehen des 2. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung
2015-2016	Praktisches Jahr in den Fachbereichen Innere Medizin, Augenheilkunde und Chirurgie
November 2016	Bestehen des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung

Stipendien/Preise

- 2008 Erfolgreiche Teilnahme bei dem Regional- und Landeswettbewerb
Jugend forscht im Fachgebiet Biologie
- 2009 20. Internationale Biologieolympiade: Teilnehmer der 3. Auswahlrunde
in Kiel
- 2013 Aufnahme in das Promotionsprogramm Experimentelle Medizin der
Universität Ulm und Beginn der Doktorarbeit im Rahmen eines
Freisemesters in der Abteilung Pharmakologie und Toxikologie
- 2015 Erhalt eines 4-wöchigen Forschungsstipendiums der BVMD an der
Universidad de Chile in Santiago (Chile)

Berufserfahrung

- 2012-2013 diverse Praktika im Rahmen des Studiums in den Fachbereichen
Gynäkologie, Ophthalmologie, Anästhesie und innere Medizin
(insgesamt vier Monate)